

別添 3

I. 総括研究報告書

(H30-化学-一般-002) 総括研究報告書

血液中の核酸をバイオマーカーに用いた化学物質の 高感度な有害性評価に資する研究

研究代表者 小野 竜一

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・第五室・室長

研究要旨

日常生活に欠かすことのできない様々な物質がヒトの健康や環境に害を及ぼす危険性があり、それを把握することは、健康危機を適切に管理・回避し、安全な生活を維持するために必須である。

トキシコゲノミクス技術を用いた化学物質の単回暴露の際のデータの蓄積によって、分子メカニズムに基づく化学物質の高精度な影響評価が、実用化段階に到達しつつある。ただし、データは特定の臓器（主に肝臓）に由来し、毒性評価に求められる個体レベルでの網羅性については、多くの労力とコストが必要となる。

本研究では、ヒトに対する予測性の向上を目指した全身を網羅した次世代型安全性評価法の確立および毒性データの集積を目的としている。

最近の知見により、血液中には、細胞より分泌された小胞として知られるエクソソームが循環していることが明らかとなり、特にヒトにおいて腫瘍細胞種特異的なエクソソームをバイオマーカーとした診断精度は90%を超えるとの報告がある。また、炎症や化学物質誘発性の臓器障害に対する特異的な血液中のバイオマーカーとして、エクソソームの内部に含まれるマイクロRNA (miRNA) やメッセンジャーRNA (mRNA) が同定されつつある。

そこで、化学物質等による有害事象に応答して、組織・臓器から血液中に放出されるエクソソームに含まれるRNAなどの核酸分子は、毒性評価の為の新規バイオマーカーとしての有用性が期待されることから、本研究では、化学物質ばく露後のマウスの血液中のエクソソームRNAの網羅的解析により、標的臓器を特定し、更に毒性発現機序の解明を目指す事で、化学物質の「次世代型」有害性評価による迅速化、高度化および標準化を行うことを目的とする。

この次世代型有害性評価法は、少量の採血のみで高感度に有害性評価を可能となることから、化学物質を同一個体に反復ばく露を行ない、継時的に採血を行うことで、従来法に比較し短期間に少数の動物使用で有害性評価が可能となり、動物愛護の3Rに資する評価系としても期待される。

平成30年度（初年度）は予定通り、化学物質の投与実験と採血方法の検証、およびマウス血液からのエクソソームRNA単離の標準化を行った。

ヒトにおける早期がん診断などにエクソソームRNAがバイオマーカーとした研究が進んでいる。臨床の現場では、採血の際に凝固剤および血清分離剤入り採血管が使用されることが多いが、マウスの採血方法においては、凝固剤および血清分離剤を用いた場合には、エクソソームの収量は半分になり、夾雑物が多く含まれることから、エクソソームの単離には凝固剤、血清分離剤入りのチューブを使用しないプロトコルを採用するに到った。

また、溶媒投与群および四塩化炭素投与群における採血後にエクソソームを単離し、比較することで、四塩化炭素特異的なエクソソームRNAの単離に成功した。

今年度の成果としてマウスにおけるエクソソームRNA解析の標準化に成功したことで、化学物質の次世代型評価法による毒性データ集積が期待される。

研究分担者

平林容子 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
センター長

広瀬明彦 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
安全性予測評価部・部長

落谷孝広 国立研究開発法人
国立がん研究センター研究所
分子細胞治療研究分野
プロジェクトリーダー

研究協力者

北嶋 聡 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
毒性部・部長

相崎健一 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
毒性部・第一室・室長

高橋裕次 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
毒性部・第三室・室長

古川佑介 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
毒性部

山田隆志 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
安全性予測評価部・第四室
室長

田邊志帆里 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
安全性予測評価部・第一室
主任研究官

吉岡祐亮 国立研究開発法人
国立がん研究センター研究所
分子細胞治療研究分野
研究員

A. 研究目的

(背景)

血液中には、血球細胞の他に血流中を循環する cell free DNA (cfDNA) や分泌顆粒として知られるエクソソーム内に含まれる RNA が存在する。cfDNA は、生体内で障害を受けた細胞から放出され、cfDNA の DNA メチル化状態は、放出元臓器の DNA メチル化状態を反映することから、障害を受けた組織が同定され得る。エクソソームは、数十～百ナノメートル程度の脂質二重膜の小胞であり、細胞より体液中に分泌される。この中に含まれる RNA には、細胞特異的なものが存在し、腫瘍細胞特異的なエクソソームをバイオマーカーとして 90 % を超える早期がんの診断精度が謳われている。また、ヒト肺微小血管内皮培養細胞は、タバコの煙の刺激で特異的なエクソソーム RNA を放出する報告もあり、これらの指標は毒性評価の為の新規バイオマーカーとしての有用性が期待される。

(目的)

本研究では、化学物質ばく露後のマウスの血液中の核酸のうち、エクソソーム RNA の網羅的解析により、標的臓器を特定し、更に毒性発現機序の解明を目指す事で、化学物質の「次世代型」有害性評価による迅速化、高度化および標準化を行うことを目的とする。ここでは、国立医薬品食品衛生研究所において毒性試験および各種臓器での網羅的遺伝子発現解析を行ったベンゾトリアゾール類を対象とする予定である。これらは化学構造の側鎖の違いで毒性の強さや発現する臓器に違いがあり、エクソソーム RNA をバイオマーカーとした有害性評価の有用性を検証する上で効果的である。また、ベンゾトリアゾール構造からのカテゴリーアプローチによる毒性の予測評価に対しても有用な情報を提供しうるかの如何が検討可能となる。

(期待される効果)

本研究は、少量の血液より、エクソソーム RNA を網羅的に解析し、全身を網羅した毒性バイオマーカーデータベースを構築することで化学物質の高感度な有害性評価を可能とする次世代型の有害性評価法である。さらに、この次世代型有害性評価法は、少量の採血のみで高感度に有害性評価を可能となることから、将来的には化学物質を同一個体に反復ばく露を行ない、継時的に採血を行うことで、従来法に比較し短期間に少数の動物使用で有害性評価が可能となり、動物愛護の 3R に資する評価系となることが期待される。

B. 研究方法

本研究においては、化審法における優先評価化学物質を迅速に安全性評価するために、血液中の核酸をバイオマーカーに用いた化学物質の高感度な有害性評価系の開発を行う。国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部においては、化学物質のマウスへの投与実験および採血、エクソソーム RNA の次世代シーケンサーによる網羅的解析を行い、国立がん研究センター研究所・分子細胞治療研究分野においては、マウス血液からのエクソソーム RNA 採取の標準化プロトコールの作成を行い、国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・安全性予測評価部においては、本研究において得られるベンゾトリアゾール構造を持つ 5 物質のばく露に特異的なエクソソーム RNA の結果と、化学構造の基本構造は同じであるが、側鎖の違いなどによりその毒性の強さや発現する臓器に違いがあるベンゾトリアゾール類の毒性情報を利用することで、カテゴリーアプローチ手法を用いた毒性予測評価の精度を飛躍的に向上させ、化審法における優先評価化学物質の毒性評価の迅速な毒性評価および毒性予測評価に貢献する。

・化学物質の投与実験と採血方法の検証：

国立医薬品食品衛生研究所・動物室において C57BL/6J マウス (♂、12 週齢) に対して先行実験として、ベンゾトリアゾール構造を持つ化学物質 (10 種類) のうち 5 種類

(2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phenol (CAS:3846-71-7) 、
2,4-di-tert-butyl-6-(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)phenol (CAS:3864-99-1) 、
2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-phenylpropan-2-yl)phenol (CAS:70321-86-7) 、
2-(benzotriazol-2-yl)-4-methylphenol (CAS:2440-22-4) 、
2-(benzotriazol-2-yl)-4-(2,4,4-trimethylpentan-2-yl)phenol (CAS:3147-75-9) を高用量、中用量、低容量の 3 用量、およびその溶媒コントロールとしてコーンオイル、メチルセルロースを 10:00 AM に単回経口投与し、2 時間、4 時間、8 時間、24 時間後にイソフルラン麻酔下において左心房および眼窩静脈叢より全血液を採取する。肉眼所見で臓器に障害の起きない用量を設定し、その後の解析を行う。

マウス血液を採取後、室温で 30 分間静置し、氷上に移す。全てのサンプルの準備が整い次第、2000 x G、10 分遠心分離を行う。遠心分離後は、上層の血清成分を新しいチューブに移し、総容量を測定後に -80 度で保存を行う。

また、血液の凝固促進剤、血清、血餅の分離材が入ったセパラピッドチューブ S (Fuchigami) による血清採取の比較検討も行った。マウス血液をセパラピッドチューブ S に入れ、混ぜた後に、室温で 20~30 分ほど室温で静置の後に、2000 x G、10 分遠心分離を行う。分離材の上の層が血清成分となっているので、(動物実験を行う際の研究協力者として北嶋聡 (毒性部・部長/研究協力者)・古川佑介 (若手研究協力者) を加えた。)

・マウス血液からのエクソソーム RNA 単離の標準化

国立医薬品食品衛生研究所において採取された血清サンプルを用いて、国立がん研究センター研究所・分子細胞治療研究分野においてヒトの血液からのエクソソーム単離方法の最適化で行った種々の血中のエクソソーム単離方法の比較検討を行なう。具体的には、ポリマー沈降法、カラム精製法、超遠心ペレットダウン法を行なった。

超遠心ペレットダウン法は、血清を 10000 x G で 10 分遠心を行い、夾雑物を沈殿させた後に、その上清を超遠心機 (BECKMAN) にて 210000 x G にて 32 分間超遠心を行ない、エクソソームを沈殿させる。上清を除いた後に新たに PBS を加え、再び 210000 x G にて 32 分間超遠心を行ない、上清を除く。さらにもう一度、新たに PBS を加え、210000 x G にて 32 分間超遠心を行ない、上清を除き、30 μ l PBS に懸濁し、新しいチューブに移し、-80 度にて保存する。

ポリマー沈降法は、Total exosome isolation kit (Thermo Fisher, Cat# 4478359) を用いて行った。血清を 10000 x G で 10 分遠心を行い、夾雑物を沈殿させた後に、175 μ l 上清に対して 35 μ l ポリマーを混ぜて、4 度で 30 分静置する。その後、10000 x G で 10 分遠心を行い、エクソソームを含むタンパクを沈殿させ、上清を除いた後に 50 μ l PBS に懸濁した。

エクソソームの単離後は、溶媒中のナノ粒子を可視化し解析、リアルタイムに粒子径、粒子数および濃度の測定を可能とするナノ粒子の観察・計測装置 NanoSight ナノ粒子解析システム (NanoSight LM10) を用いて解析を行った。NanoSight により、単離されたエクソソームの大きさと分布、数のカウントを行い、また、エクソソームの表面抗原の一つである CD9 に対するウエスタンブロッティングにより、ナノ粒子がエクソソームに由来するものであるかの確認を行った。エクソソーム溶液を 10 倍希釈後に、

4xSample buffer (BioRad #161-0747) を加え、TGX-gel (4-14%) にて 100V 5min の後に、150V 30min 電気泳動を行なった。プロットティングは、Biorad TransBlot Turbo を利用して行った。ブロッキングは、Blocking One (nacalai tesque) で 1 時間、1 次抗体反応は、CD9 (Abcam #82390 rat anti-mouse CD9 monoclonal antibody) を 1000 倍希釈で 1 時間後、TBS-T にて 5 分を 3 回で洗浄。2 次抗体反応は、Goat anti-rat IgG, HRP-linked (GE Healthcare) を使用し、TBS-T にて 5 分、15 分、30 分の 3 回で洗浄。その後、ImmunoStar LD (Wako) を用いて発色反応を行い、LAS300 (Fuji Film) により検出を行った。(研究協力者として吉岡祐亮 (研究員/若手研究協力者) を加えた。)

・病理組織学的検査：

エクソソーム RNA の解析のために採血を行ったマウス個体より肝臓および腎臓をすみやかにサンプル採取を行い、ホルマリン浸漬固定後に切り出しを行い、脱水処理後パラフィン包埋し、3 μ m で切片の作成を行い、H&E 染色を行なう。病理組織学的検査結果とエクソソーム RNA の解析の結果の比較を行い、エクソソーム RNA をバイオマーカーとした次世代有害性評価法の有効性を検証する。

・次世代有害性評価系の政策提言に向けた化学物質の有害性予測の向上のためのカテゴリリーアプローチ：

本研究課題においては、国立医薬品食品衛生研究所・毒性部および安全性予測評価部において毒性試験および各種臓器での網羅的遺伝子発現解析を行ったベンゾトリアゾール類を対象とした。これらの化学構造は側鎖の違いなどによりその毒性の強さや発現する臓器に違いがあることから、毒性バイオマーカーをカテゴリリーアプローチに適応するのに適した化学物質である。これらのベンゾトリアゾール類のばく露におけるエクソソーム RNA を明らかにすることで、各種臓器における特異的な毒性バイオ

マーカーや化学物質の分子構造に依存した毒性バイオマーカーの同定が可能となる。

また、これらの結果を毒性情報、網羅的遺伝子発現データと比較・検証することにより、ベンゾトリアゾール構造からのカテゴリアプローチ手法を用いた毒性予測評価を効果的に行うことが可能となる。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する指針のある場合は、その指針を遵守している。
(国立医薬品食品衛生研究所は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程(平成27年4月版))

C. 研究結果

C-1:採血方法の検証(採血:小野、検証:落谷):

最初に、採血方法の検証を行った。C57BL/6J マウス♂(12週齢)より、心採血および眼窩静脈叢採血を行い、①20~30分室温放置後に遠心分離により血清採取(通常法)、②血液凝固促進剤(シリカ)および液層分離剤入りチューブ(セパラピッドチューブS, Fuchigami)による血清採取、の2種類について比較検討を行った。

血清採取後に、超遠心ペレットダウン法により、エクソソームを回収し、粒子径分布測定装置(NanoSight)による評価を行った。

最初に、心採血、および眼窩静脈叢採血後に方法①により血清を採取し、超遠心ペレットダウン法により、エクソソームを回収し、NanoSight解析を行った。

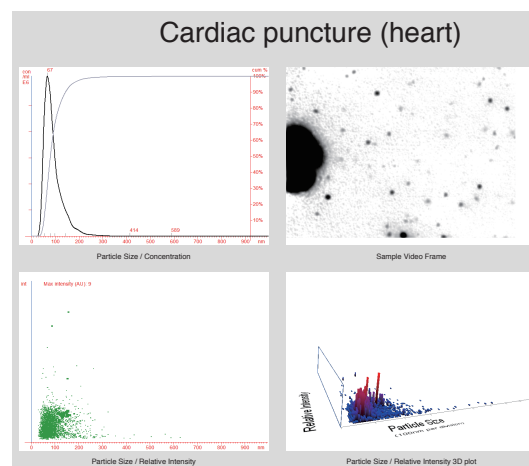


図:心採血によるエクソソームの NanoSight 解析の結果、最頻値サイズ(67nm)、濃度(3.87E8 particles/ml)

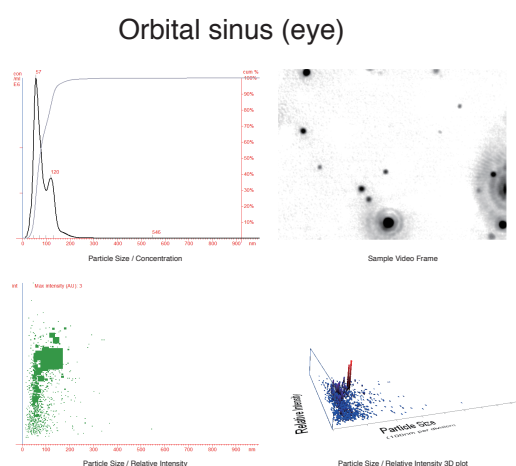
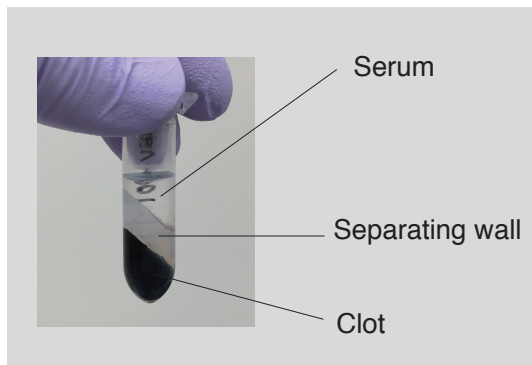


図:眼窩静脈叢採血によるエクソソームの NanoSight 解析の結果、最頻値サイズ(57nm)、濃度(1.96E8 particles/ml)

採取できたエクソソームのサイズ、濃度には、大きな差はなかったため、心採血を採用することとした。

次に、心採血および眼窩静脈叢採血を行い、血清採取方法の検討を、通常方法(方法①)、および、血液凝固促進剤・液層分離剤入りチューブ利用方法(方法②)において検討をした。



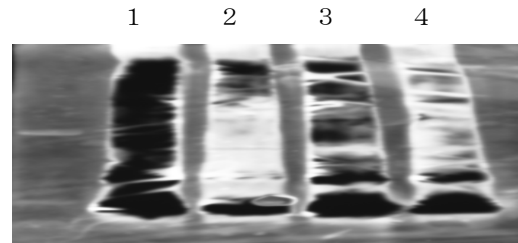
図：使用した血液凝固促進剤・液層分離剤入りチューブ。血餅と上清を分離剤が隔てるために、血清部位を血餅の混入なしに多く取れる。

方法①の場合、血清量は 335 μ l (N=12)、方法②の場合、血清量は 376 μ l (N=12) となったことから、分離が優位に働き、12 % 多く血清を採取することができた。

次に、これらの血清より、超遠心ペレットダウン法により、エクソソームを回収し、粒子径分布測定装置 (NanoSight) による評価を行った。

方法①の場合、粒子数は 3.87E8/ml、方法②の場合、粒子数は 14.30E8/ml となったことから、およそ 3.7 倍多くの粒子をセパラピッドチューブ S を利用した方が採取できたことになる。

次に、多く採取できた粒子がエクソソームによるものなのかをウエスタンブロットにより検討を行った。エクソソームの表面抗原の一つである CD9 に対するウエスタンブロットニングにより、ナノ粒子がエクソソームに由来するものであるかの確認を行った。



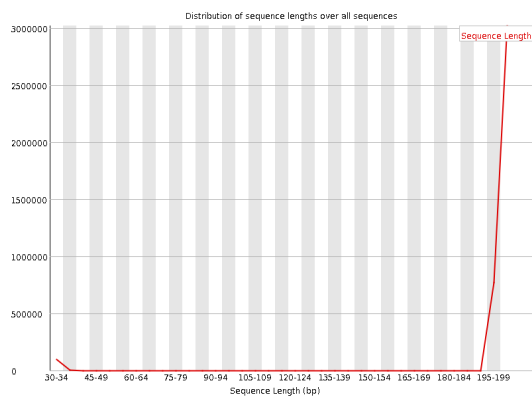
図：CD9 抗体によるウエスタンブロットの結果

- | | | |
|---|-----|--------|
| 1 | 心採血 | 通常チューブ |
| 2 | 心採血 | セパラピッド |
| 3 | 眼採血 | 通常チューブ |
| 4 | 眼採血 | セパラピッド |

その結果、方法①の方が、方法②（セパラピッドチューブ S を使用）よりも、心採血においても、眼窩静脈叢採血においても、およそ 1.6 倍の CD9 陽性シグナルが検出された。エクソソームが採れていることが明らかになった。これは、セパラピッドチューブ S を使用した場合は、何らかのタンパクの凝集した粒子の混入が多く、さらにエクソソームは、チューブに吸着される、もしくは、夾雑物と一緒に沈殿して除かれてしまうなどにより、回収率が低くなっていることを意味している。よって、本研究は、通常法による血清採取を行うこととした。

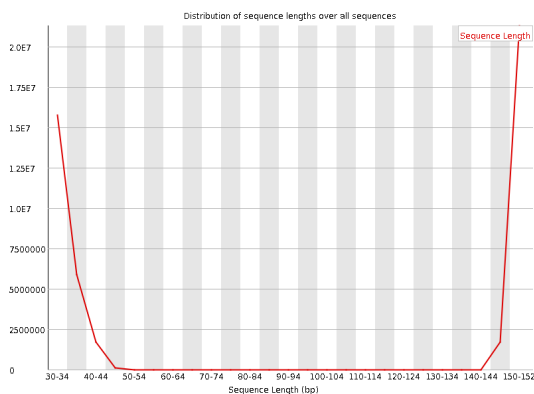
C-2：マウス血液からのエクソソーム RNA 単離の標準化（小野）：

エクソソーム RNA の解析方法について、比較検討を行った。最初に、エクソソームは、miRNA を豊富に含んでいるとされていたので、マウス血清より回収したエクソソームより RNA を抽出し、サイズセレクションを行わずに、次世代シーケンス解析（毒性部所有の Illumina 社 NextSeq）を行った。



図：サイズセクションを行わずに、次世代シーケンス解析を行った場合のシーケンス長の分布

その結果、30-34 bp と miRNA に相当する領域よりも、mRNA, rRNA に相当する長い領域 (195 bp 以上)が多く見られた。miRNA は、安定性が高くバイオマーカーとして有用であるという利点があることから、サイズセクションマシン (BluePippin) を利用して miRNA のサイズ画分のみを回収し、次世代シーケンス解析を行った。



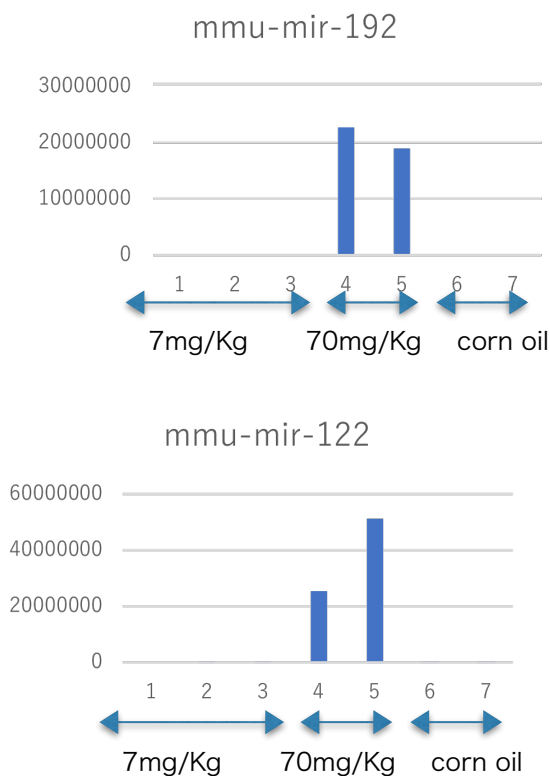
図：サイズセクションを行った場合の次世代シーケンス解析を行った場合のシーケンス長の分布

その結果、miRNA が含まれる領域 (30-34bp) は、2.6% から 33% まで上昇した。すなわち、miRNA の存在するであろう長さの領域の比率が 12.7 倍に高くなった。よって、miRNA のサイズ画分のみを解析した方が、同じ値段でより多くのサンプルを解析できるメリットとなる。

C-3：四塩化炭素ばく露特異的なバイオマーカーの探索 (小野)：

他グループからの既知の報告として、超高濃度の四塩化炭素 (300mg/kg, 5days) およびアセトアミノフェン (1500mg/kg) をラットに投与した場合に、肝臓で高発現をしている miRNA、mir122 および mir192 が血中に循環することが報告されている。これらの miRNA は、肝臓細胞において発現している miRNA のほとんどを占めているとされ、肝臓に障害が出たことで逸脱的に血中に放出された miRNA である可能性が高い。また、このような超高濃度の投与では、実用レベルでの安全性評価はできないと考えられる。

そこで、本研究においては、コントロール実験として低濃度の四塩化炭素の単回ばく露 (7mg/kg, 70mg/kg) を行っており、溶媒投与群と比較した結果、多くの毒性バイオマーカー候補の単離に成功した。最初に、mir122 および mir192 は、いずれも 70mg/kg の単回ばく露では、溶媒投与群と比較し、千倍超の発現が誘導されたが、7mg/kg では全く誘導がかからなかった。これは、肝臓が障害を受け細胞の内容物が逸脱する程度だと、mir122 および mir192 は有用なバイオマーカーとなるが、低濃度域においては、バイオマーカーの役割を果たしていないことが判明した。



図：四塩化炭素ばく露後24時間後における肝臓障害バイオマーカーである mir-192（上）および mir-122（下）の発現量変化

他方、我々は、7mg/kg から顕著な発現誘導がされるバイオマーカー候補を多数（26 個）単離することに成功した。

多くは、既知のマイクロ RNA ではなく、四塩化炭素ばく露により初めて誘導されるものであり、バイオマーカーとしてだけでなく、毒性のシグナルネットワークにどのような影響を及ぼすものなのかの解析も重要なものとなる。四塩化炭素特異的に誘導された miRNA は、通常の miRNA がヘアピン構造をしているのに対して、ヘアピン構造が予想できないので、既存の miRNA の合成経路とは違う可能性もあり、より詳細な解析により、その性質を明らかにする必要がある。

C-4：化学物質の投与実験（平林）：

各種化学物質の溶媒となりうるコーンオイル、メチルセルロース、また、肝臓障害のコントロール物質として四塩化炭素 (7mg/kg, 70mg/kg)、およびベンゾトリアゾール類 5 種類の投与実験を行った。ベンゾトリアゾール類に関しては、100mg/kg, 300mg/kg, 1000mg/kg の 3 用量で経口投与を行い、2 時間後、4 時間後、8 時間後、24 時間後のいずれかで採血を行った。

C-5：病理組織学的検査（平林）：

各本研究において行った各種化学物質および溶媒のマウスへの投与、採血実験を行った個体の一部において、肝臓および腎臓のホルマリン固定を行った。今後のエクソソーム RNA 解析により、有用な毒性バイオマーカーが検出されたサンプルにおいて病理解析を行い、バイオマーカーの有用性を確認する。

C-6：次世代有害性評価系の政策提言に向けた化学物質の有害性予測の向上のためのカテゴリーアプローチ（広瀬）：

本研究計画の今後のエクソソーム RNA の解析により得られる予定のベンゾトリアゾール類の毒性バイオマーカー以外の情報収集を行った。具体的には、既知のベンゾトリアゾール類の GLP および non-GLP データより、各種臓器における毒性情報、NOAEL、NOEL、さらにトキシコゲノミクスデータベースよりトランスクリプトーム情報、QSAR Toolbox より Parent Chemical との類似性などの情報を収集し、今後に得られる予定のベンゾトリアゾール類の毒性バイオマーカーデータを用いることで、毒性予測向上を検討する準備を整えている。また、分担研究者である平林によって、ベンゾトリアゾール類 5 種類の採血実験を行い、その際に、臓器重量（肝臓及び腎臓）、肉眼所見の毒性情報を収集した。

現在までに集計の終了した

(2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phenol (CAS:3846-71-7)) の High dose (1000mg/Kg) についての情報は下記の通りである。

名称	体重	肝臓	右腎	左腎臓	血清量
1-2時間後	28.12	1370.1	149.1	149.5	375
2-2時間後	26.93	1288.2	145.9	138.4	290
3-2時間後	25.35	1300.1	139.6	135.5	330
4-4時間後	27.95	1288.8	140.2	135.5	220
5-4時間後	26.23	1304.3	142.9	130.5	300
6-4時間後	24.95	1189.6	126.3	128.5	300
7-8時間後	27.05	1220.7	147.7	124.4	385
8-8時間後	25.54	1162.5	134.3	139.9	316
9-8時間後	23.5	1043.9	150.1	127.5	302
10-24時間後	27.2	1593.4	144.3	153.1	395
11-24時間後	25.68	1389	148.3	100.3	244
12-24時間後	24.38	1300	142.1	125.7	356
13-96時間後	27.9	2365	161	149.1	440
14-96時間後	26.14	2379.9	149.9	143.6	240
15-96時間後	24.91	2036.6	145.7	130	260
96時間後 (溶媒のみ)	27.38	1437.5	145.1	155.2	320
96時間後 (溶媒のみ)	25.69	1335	156.9	135.9	340
96時間後 (溶媒のみ)	24.69	1345.3	158.4	129.3	254

図 : 2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phenol (CAS:3846-71-7) を 1000g/Kg で経口投与を行い、2、4、8、24、96時間後におけるマウス体重(mg)、肝臓、腎臓(左、右)(mg)、の臓器重量(mg)および血清量(μ l)

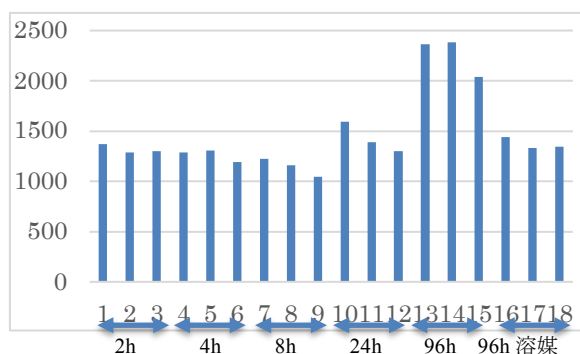


図 : 2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phenol (CAS:3846-71-7) を 1000g/Kg で経口投与を行い、2、4、8、24、96時間後における肝臓重量(mg)をグラフ化

投与後96時間後には、肝臓肥大が起こり、肝臓重量が溶媒投与群に比較して64%肥大していた。

D. 考察

コントロール実験として行った四塩化炭素ばく露実験の結果より、既に報告されているよりも低い濃度で、かつ単回ばく露という非常に厳しい条件でも、逸脱的と考えられる mir122 や mir192 の発現の誘導されないレベルの条件でありながら、新規のバイオマーカー候補を多数得ることに成功した。すなわち、高感度な毒性バイオマーカー候補の単離に至った。これは、血液からのエクソソーム RNA 単離の標準化を進めた結果によるものと思われる。このことから、ベンゾトリアゾール類についても有用なバイオマーカーの単離が可能と考えている。

また、(2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phenol (CAS:3846-71-7)) の投与実験の結果から得られた毒性情報として、投与後24時間では肝臓肥大は見られないが、96時間後では64%の肥大が見られることがわかった。これは、96時間後において確認できるバイオマーカーを単離し、それが例えば24時間後から観察できるのであれば、肝臓肥大の毒性予測マーカーになりうることを示唆している。

E. 結論

このように、本研究の第一の目的として掲げたマウスにおいてエクソソーム RNA をバイオマーカーとして次世代型の安全性評価法を確立することに関しては、コントロール物質として行った四塩化炭素ばく露群と溶媒投与群の比較から多くの有用なバイオマーカー候補が得られたことから、3年計画の初年度の結果としては、目的を達成できた。

現在までに他のグループより既に報告されていたバイオマーカーも含め、より低濃度でより多くのバイオマーカーの単離に至ったことは、採血から、エクソソームの単離、さらにエクソソームからエクソソーム RNA の単離という多くの条件の最適化を行った結果による。

また、次年度以降のバイオマーカー解析、エクソソームをバイオマーカーとしたカテゴリーアプローチ解析に関しても予定通り遂行していく予定である。

エクソソーム RNA をバイオマーカーに用いた次世代型の安全性評価法は、微量血液で超高感度かつ迅速な安全性評価を可能とすることから、動物愛護の 3R に資する評価系となることが期待される。また、既存の安全性評価法と比較しても、短期、小規模動物試験で可能であり、高いスループット性を発揮するものであり、今後の化学物質の毒性データの集積に貢献すると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

(1) Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Yoko Hirabayashi

Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing

Communications Biology, Feb 8;2:57, 2019.

(2) Ryuichi Ono & Shihori Tanabe

The gene and microRNA networks of stem cells and reprogramming (review)

AIMS Cell and Tissue Engineering, 2(4):238-245, 2018

(3) Igarashi, T., Takashima, H., Takabe, M., Suzuki, H., Ushida, K., Kawamura, T., Matsumoto, M. Iso T, Tanabe S, Inoue K, Ono A, Yamada T, Hirose A. Initial hazard assessment of benzyl salicylate: In vitro genotoxicity test and combined repeated-dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats.

Regul. Toxicol. Pharmacol., 100, 105-117, 2018.

(4) Igarashi T, Serizawa H, Kobayashi K, Suzuki H, Matsumoto M, Iso T, Kawamura T, Inoue K, Ono A, Yamada T, Hirose A. Initial

hazard assessment of 4-benzylphenol, a structural analog of bisphenol F: Genotoxicity tests in vitro and a 28-day repeated-dose toxicity study in rats.

Regul. Toxicol. Pharmacol., 96, 64-75, 2018.

2. 学会発表 (抜粋)

(1) Hirose, A., Kurimoto, M., Shiraishi, H., Yamamoto, H., Tatarazako, N., Nishimura, Yamada, T., Validation of the in silico prediction tool for toxicity of Algae by pharmaceuticals in environment. SETAC Europe 28th Annual Meeting (May 2018 Rome, Italy)

(2) Yamada, T., Kurimoto, M., Shiraishi, H., Yamamoto, H., Tatarazako, N., Nishimura, T., Hirose, A. Evaluation of QSAR models for daphnia and fish chronic toxicities of human pharmaceuticals. SETAC Europe 28th Annual Meeting (May 2018 Rome, Italy)

(3) Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Yoko Hirabayashi

DSB Repair by Capture of Unintentional Sequences, an Emerging New Possible Risk for the Genome Editing ASAITOX 2018, (2018.6.19) Pattaya, Thailand

(4) 小野 竜一, 田塾 慶子, 安田 智, 安彦 行人, 相崎 健一, 北嶋 聡, 菅野 純, 佐藤 陽治, 平林 容子

ゲノム編集を利用したヒト遺伝子治療における新たなリスクの可能性
第 45 回日本毒性学会学術年会, (2018.7.19.)

(5) 菅野純、小野竜一、相崎健一、北嶋聡
「新型」反復曝露試験における基線反応と過渡反応の分子メカニズム解析—ヒストン修飾を中心に—第 45 回日本毒性学会学術年会, (2018.7.19.)

(6) 平林容子 : シンポジウム 15 非低分子医薬品の安全性評価戦略について「核酸医薬品とその安全性評価戦略」 第 45 回日本毒性学会学術年会, (2018.7.20)

(7) Uchida E, Naito Y, Ono R, Hirabayashi Y, Inoue T, Sato Y,

Safety assessment of CRISPR-Cas9 genome editing for human gene therapy
第 24 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
(2018.7.27.)

⑧ Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Satoshi Kitajima, Takahiro Ochiya, Yoko Hirabayashi
Standardization of exosome isolation in mice corresponding to toxicity test Japanese Society of Extracellular Vesicles Conference 2018 (2018.8.30.),

(9) Ryuichi Ono, Keiko Tano, Satoshi Yasuda, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Yoji Sato and Yoko Hirabayashi
A possible risk of genome editing for human gene therapy
the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.3)
Brussels, Belgium

(10) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ryuichi Ono, Ken-ichi Aisaki,
Percellome Toxicogenomics Project: Newly Designed Repeated Dose Study
the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5)
Brussels, Belgium

(11) Yamada, T., Kurimoto, M., Miura, M., Kawamura, T., Jojima, K., Taira, N., Ohata, H., Tsujii, S., Ohno, A., Hirose, A. Establishing mechanistic key event information of repeated dose toxicity to support category-based read-across assessment. 58th Annual Meeting of Society of Toxicology (March 2019, Baltimore, USA)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

