

厚生労働化学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
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
（H30-化学-一般-002）

平成 30 年度 分担研究報告書

分担研究課題：化学物質ばく露影響の病理学的解析

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

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

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ตอบสนอง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。

本分担研究では、溶媒（コントロール）、四塩化炭素、ベンゾトリアゾール類 5 種類の経口投与実験、およびばく露動物の臓器の病理切片作成を行った。

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

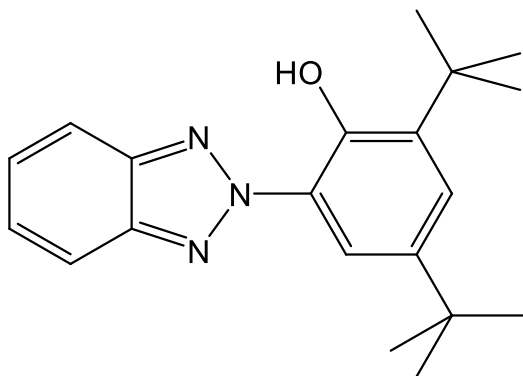
本研究においては、化審法における優先評価化学物質を迅速に安全性評価するために、血液中の核酸をバイオマーカーに用いた化学物質の高感度な有害性評価系の開発を行う。国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部においては、化学物質のマウスへの投与実験および採血、エクソソーム RNA の次世代シーケンサーによる網羅的解析を行い、国立がん研究センター研究所・分子細胞治療研究分野においては、マウス血液からのエクソソーム RNA 採取の標準化プロトコールの作成を行い、国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・安全性予測評価部においては、本研究において得られるベンゾトリアゾール構造を持つ 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：

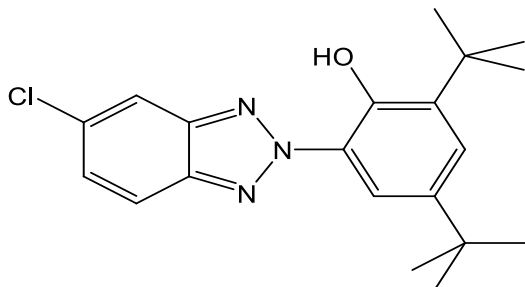
国立医薬品食品衛生研究所・動物室において日本チャールズリバー（株）より、C57BL/6J マウス（♂、10 週齢）を購入し、馴化期間として、2 週間飼育し、12 週齢で

投与実験を行う。飼育方法は、1 ケージに 1 匹で、ケージ交換は週に 1 回、床敷の種類は木製、給餌方法は、自由摂取、飼料の種類は、CRF-1、給水方法は給水瓶とした。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）のうち以下の 5 種類を高用量、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 に単回経口投与を行った。単回投与後、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。

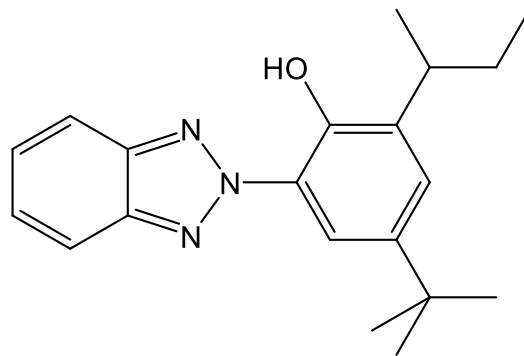
(2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phenol (CAS:3846-71-7)



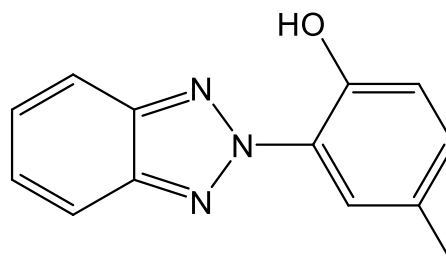
2,4-di-tert-butyl-6-(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)phenol (CAS:3864-99-1)



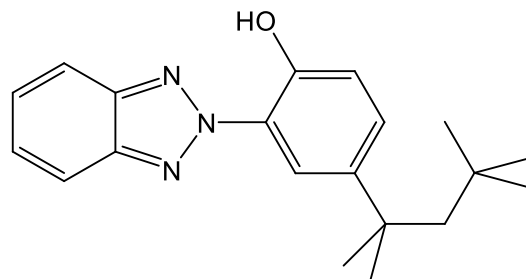
2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-phenylpropan-2-yl)phenol (CAS:70321-86-7)



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)



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。

C. 研究結果

C-1：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-2：病理組織学的検査（平林）：

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に関しては、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。

D. 考察

溶媒コントロール、およびベンゾトリアゾール類の単回ばく露実験を行なった。さらに、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。これらのことから、化学物質のばく露実験系はうまくいっていると思われる。また、すべてのばく露個体において、病理解析用のホルマリン固定を行ない、計画通り進んでいる。

E. 結論

このように、本研究の第一の目的として揚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、分担研究者が担当した化学物質のばく露実験はうまくいっている。

また、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なうための、病理解析用サンプル作成は計画通り進んでいる。

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。研究分担者は、ばく露実験および病理解析を行うことで、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の実データの裏付けを行うことで、動物愛護の3Rに資する評価系に貢献できる。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. 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, 田埜 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)

G. 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

