

厚生労働化学研究費（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：マウスを用いたエクソソーム単離法の最適化・標準化

研究分担者：落谷孝広

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：吉岡祐亮 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

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 年度の分担研究では、国立医薬品食品衛生研究所で動物実験を行い、採取したマウス血清を材料にして、マウス血清から超遠心ペレットダウン法およびポリマー沈殿法の効率の良いエクソソーム分離方法の検討を行った。ポリマー沈殿法では、得られた粒子数は多いが、粒子サイズはエクソソームの他にも多くのタンパクの凝集であることが想定され、エクソソームの純度は低いと考えられる。

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。

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。

・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、心臓採血、眼窩静脈叢採血の 2 通りの採血方法を行い、これらを通常の方法（血液凝固剤および分離剤不使用）およびセパラピッドチューブ S（血液凝固剤含有、分離剤あり）により、血清を採取した。これらの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、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、粒子数および濃度を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、数のカウントを行なった。

(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 :エクソソームの単離方法の検証:

国立医薬品食品衛生研究所において、C57BL/6J σ 12 週齢より、心臓採血および眼窩静脈叢採血を行い、通常の方法により血清を採取した。これらの血清を材料として、超遠心ペレットダウン法およびポリ

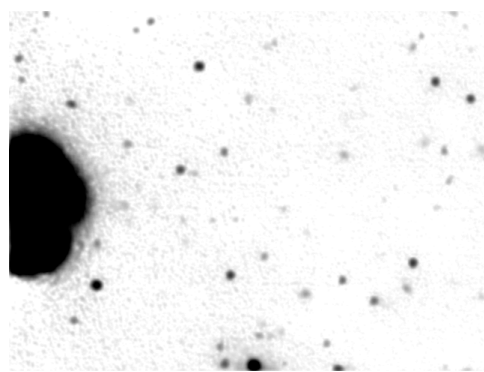
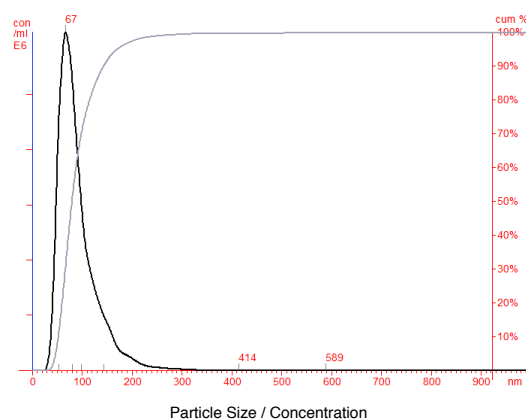
マー沈殿法を行い、エクソソームの単離方法の検討を行った。

使用したサンプルおよびエクソソーム単離法の詳細は、以下の通りである。

採血方法/血清採取方法/エクソソーム単離方法

- ①心臓採血/通常チューブ/超遠心
- ②心臓採血/通常チューブ/ポリマー
- ③眼窩採血/通常チューブ/超遠心
- ④眼窩採血/通常チューブ/ポリマー

- ①心臓採血/通常チューブ/超遠心

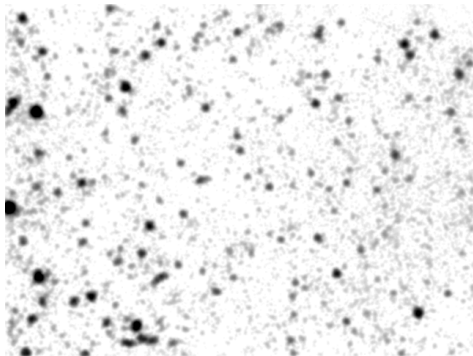
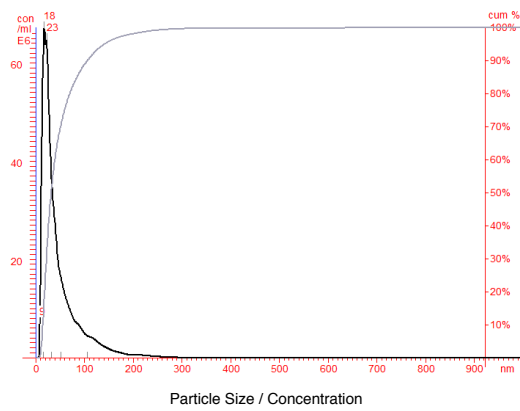


Sample Video Frame

RESULTS:
 Size Distribution: Mean: 93 nm, Mode: 67 nm, SD: 53 nm
 Cumulative Data (nm): D10: 53, D50: 80, D90: 144, D70: 99
 User Lines: 0 nm, 0 nm
 Total Concentration: 43.78 particles / frame, 3.87E8 particles / ml
 Selected Concentration: 0.00 particles / frame, 0.00E8 particles / ml
 Fitted Curve: Mean: 0 nm, SD: 0
 Completed Tracks: 3302
 Drift Velocity: 370 nm/s

図: 心臓採血/通常チューブ/超遠心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 (43.78 particles/frame)

②心臓採血／通常チューブ／ポリマー

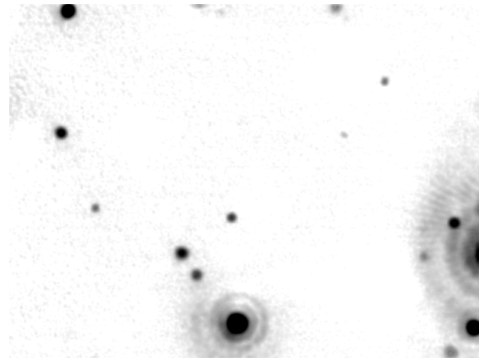
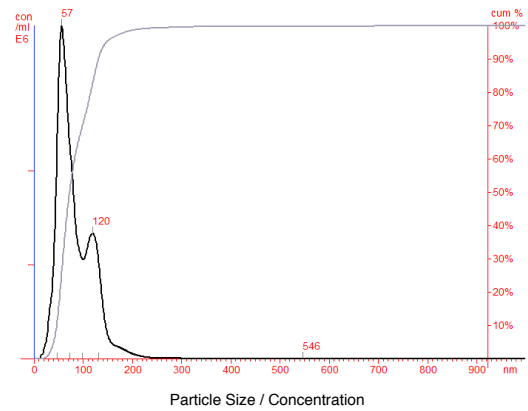


Sample Video Frame

RESULTS:
 Size Distribution: Mean: 50 nm, Mode: 18 nm, SD: 45 nm
 Cumulative Data (nm): D10: 16, D50: 33, D90: 106, D70: 52
 User Lines: 0 nm, 0 nm
 Total Concentration: 230.59 particles / frame, 24.29E8 particles / ml
 Selected Concentration: 0.00 particles / frame, 0.00E8 particles / ml
 Fitted Curve : Mean: 0 nm, SD: 0
 Completed Tracks: 7915
 Drift Velocity: 3514 nm/s

図：心採血／通常チューブ／ポリマーによるエクソソームの NanoSight 解析の結果、最頻値サイズ (18nm)、濃度 (230.59 particles/frame)

③眼窩採血／通常チューブ／超遠心

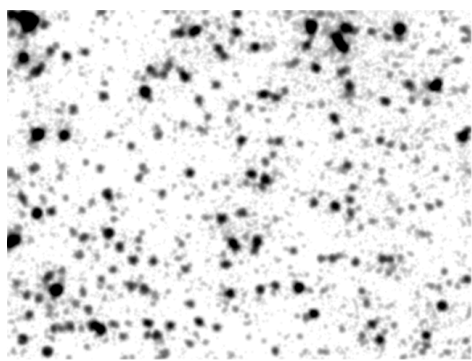
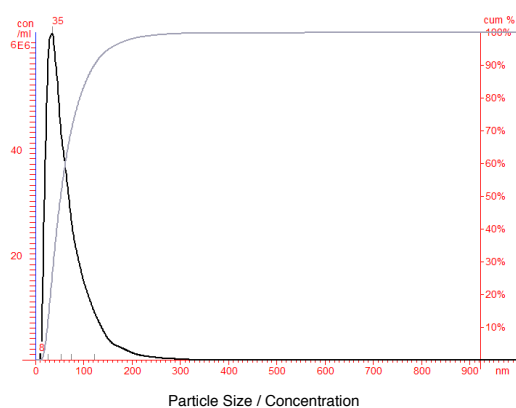


Sample Video Frame

RESULTS:
 Size Distribution: Mean: 85 nm, Mode: 57 nm, SD: 39 nm
 Cumulative Data (nm): D10: 47, D50: 73, D90: 132, D70: 99
 User Lines: 0 nm, 0 nm
 Total Concentration: 22.69 particles / frame, 1.96E8 particles / ml
 Selected Concentration: 0.00 particles / frame, 0.00E8 particles / ml
 Fitted Curve : Mean: 0 nm, SD: 0
 Completed Tracks: 961
 Drift Velocity: 495 nm/s

図：眼窩採血／通常チューブ／超遠心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 (22.69 particles/frame)

⑥眼窩採血／通常チューブ／ポリマー



Sample Video Frame

RESULTS:

Size Distribution: Mean: 66 nm, Mode: 35 nm, SD: 44 nm
Cumulative Data (nm): D10: 26, D50: 53, D90: 122, D70: 75
User Lines: 0 nm, 0 nm
Total Concentration: 332.92 particles / frame, 38.47E8 particles / ml
Selected Concentration: 0.00 particles / frame, 0.00E8 particles / ml
Fitted Curve: Mean: 0 nm, SD: 0
Completed Tracks: 14589
Drift Velocity: 1575 nm/s

図：眼窩採血／通常チューブ／ポリマーによるエクソソームの NanoSight 解析の結果、最頻値サイズ (35nm)、濃度 (332.92 particles/frame)

上記の①～④の NanoSight による解析により、観察された粒子数は、①43.78②230.59③22.69④332.92 となっており、Total exosome isolation kit を用いたポリマー沈降法の方が5倍以上多い結果となった。しかしながら、粒子の大きさを比較すると、その最頻値は、①67nm②18nm③57nm④36nm となっており、50～150nm とされるエクソソームの大きさ

を考慮すると、ポリマー沈殿により得られた多くの粒子は、エクソソームではなく、タンパクの凝集体であると結論できる。

D. 考察

平成30年度において、超遠心法およびポリマー沈殿法の検証を行った。超遠心法は、超遠心機が必要となり、どの施設でも使用可能であるという訳ではない一方、エクソソーム単離の方法として用いられた論文が多数存在し、エクソソーム単離方法として適切であると言える。一方、ポリマー法はエクソソームの純度が低く、鋭敏なバイオマーカーの単離を目指す上では、超遠心法の方が適切であると判断した。

E. 結論

このように、本研究の第一の目的は、マウスにおいて化学物質ばく露の毒性のバイオマーカーとしてエクソソーム RNA を利用することにより、超高感度な次世代型の安全性評価法を確立することである。本年度の結果より、エクソソーム単離は、超遠心ペレットダウン法が適切であると結論し、実際に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。

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)

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

