

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。

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、エクソソーム単離方法の最適化およびエクソソームRNA解析の最適化を行った。

令和元年度（平成31年度）（3年計画の2年目）は予定通り、平成30年度に行った各種実験の至適条件を考慮し、エクソソームRNAをバイオマーカーとした化学物質の次世代型安全性評価法の標準化プロトコルの作成を行なった。さらに、作成した次世代型安全性評価法の標準化プロトコルの作成についての論文としてまとめて投稿した。

投稿論文においては、次世代型安全性評価法の標準化プロトコルの報告に加えて、次世代型安全性評価法の標準化プロトコルを用いて、四塩化炭素投与による肝毒性を検出する新規バイオマーカーとなりうるmiRNAを42個報告するに至った。

さらに、本研究計画で毒性評価を行うベンゾトリアゾール類5種類のマウスへのばく露実験を全て行ない、血清の採取および病理組織検査用のパラフィンブロック作成も完了させた。ばく露実験を終了したベンゾトリアゾール類5種類のうち、4種類については、肝臓の病理組織学検査の実施およびエクソソームRNAの次世代シーケンスによる網羅的遺伝子発現データ取得に成功した。

その結果、解析を終えたベンゾトリアゾール類4種類のそれぞれに特異的なバイオマーカー候補となるsmall RNAの単離に成功した。これらのバイオマーカーは、ベンゾトリアゾール構造の側鎖の違いなどによって誘導される生体内におけるシグナルパスウェイの違いにより生じている可能性がある。

エクソソームRNAを毒性指標とした各種化学物質の毒性データが集積されることに伴い、これらを利用したカテゴリーアプローチを行うことで、将来的には血液1滴からの高感度かつ迅速な毒性評価が可能となる。

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 東京医科大学
医学総合研究所
分子細胞治療研究部門・教授

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・第一室長
- 栗形麻樹子 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
毒性部・第二室長
- 高橋祐次 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・動物管理室長
- 吉岡祐亮 東京医科大学
医学総合研究所
分子細胞治療研究部門・講師
- 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・第四室長
- 田邊思帆里 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・主任研究官
- 立原江利加 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
- 内山美希 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
- 古川祐介 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

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、東京医科大学・医学総合研究所・分子細胞治療研究部門においては、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 C57BL6J マウス (♂、12 週齢) に対して肝臓障害の陽性コントロール物質として四塩化炭素を高用量 (70mg/kg) および低容量 (7mg/kg)、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 (1000mg/kg)、中用量(300mg/kg)、低容量 (100mg/kg) の 3 用量 (2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phenol (CAS:3846-71-7)に関しては高用量のみ)、およびその溶媒コントロールとしてコーンオイルを 10:00 AM に単回投与し、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より血液を採取する。肉眼所見で臓器に障害の起きない用量を設定し、その後の解析を行なう。

これらのベンゾトリアゾール類 5 種類の化学物質を CAS 番号、もしくは Benzo0000 (0000 は、各ベンゾトリアゾールの CAS 番号の最初の 4 桁)と省略する場合がある。

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。

(動物実験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)・古川祐介 (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液サンプルを用いて、国立がん研究センター研究所・分子細胞治療研究分野 (令和元年度より東京医科大学・分子細胞治療研究部門) 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平成 30 年度研究で行なっている。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い、エクソソーム単離後は、Nanosight またはエクソソームの表面抗原に対するウェスタンブロッティングやエクソスクリーン法により、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、それぞれのエクソソーム単離法におけるエクソソーム回収率を定量し、超遠心ペレットダウン法が効率的であった (研究協力者として吉岡祐亮 (東京医科大学・分子細胞治療研究部門・講師/若手研究協力者) を加えた。)

・エクソソーム RNA 網羅的遺伝子発現解析

国立医薬品食品衛生研究所において採取された血液サンプルより抽出されたエクソソームは、Quiazol solution (Qiagen) によって溶解され、miRNeasy micro-elution kit (Qiagen) によって、RNA を抽出および精製する。エクソソーム RNA は、Clontech 社の SMARTer smRNA-Seq kit for Illumina を用いて、次世代シーケンス用ライブラリーを作成する。作成した次世代シーケンス用ライブラリーは、Bluepippin サイズセレクターを用いて、148 bp ~ 185 bp のマイクロ RNA 画分だけを抽出する。サイズセレクションを行ったエクソソーム RNA の次世代シーケンス用ライブラリーは、KAPA Library Quantification Kit Illumina® Platforms (Nippon Genetics, Japan) または、Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit (Life Technologies, CA, USA) によって、濃度測定を行った上で、2.0 pM のライブラリーを、毒性部で所有する Illumina 社 Nextseq500 を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行う。

・エクソソーム RNA の RNA-seq データ解析

Illumina 社 Nextseq500 より出力された raw data (raw reads) は、BCL2-FASTQ program (Illumina, USA) により、FASTQ format に変換する。以降、

全てのデータ解析は、Galaxy platform (<https://usegalaxy.org>) で行った。FASTQ は、Filter by quality program を用いて、quality score が 20 以上のシーケンスが 90 % 存在するシーケンスのみ解析対象とした。また、5' および 3' 末端のアダプター配列は、Trim FASTQ program によって除いている。

これらの処理を行ったシーケンスデータは、マウスゲノム (mm10) に対し TopHat program を用いてマッピング作業を行い、BAM ファイルを生成した。

BAM ファイルは、Cufflinks and Cuffnorm programs を用いて、転写産物の定量化および、サンプル間のノーマライゼーションを行う。

マウス miRNA のリファレンスシーケンスは、miRbase (<http://mirbase.org>) を利用した。

・定量的 PCR による次世代シーケンス結果のバリデーション

Illumina 社 Nextseq500 を使用して得られた、次世代シーケンスによる遺伝子発現解析結果を定量的 PCR (qRT-PCR) 解析により、バリデーションを行う。エクソソーム RNA は、Clontech 社の SMARTer smRNA-Seq kit for Illumina を用いて、次世代シーケンス用ライブラリーを作成されており、この際に small RNA に付加されたアダプターと small RNA 自身に対応する領域に qRT-PCR 用のプライマーを作成した。以下に qRT-PCR 用のプライマーを示す。

5' adapter primer: AATGATACGGCGACCACCGA ,

miR-122-5p-specific-primer:

CAAACACCATTGTCACACTCCA,

miR-192-5p-specific-primer:

GGCTGTCAATTCATAGGTCAG

qRT-PCR は、ABI7500HT (Applied Biosystems, Hercules, FL, USA) によって行う。

cDNA は、1 反応につき、0.2pM 用いて、Powerup SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) PCR 酵素および SYBR Green 試薬を用いて qRT-PCR 解析を行う。qRT-PCR 解析は、絶対定量法を用いる。以下の合成オリゴを希釈することで、standard curve を作成している。

miR-122-5p-Standard-oligo:

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAGA

TCGCTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA

GACAGGGCTGGAGTGTGACAATGGTGTTTG,

miR-192-5p-Standard-oligo:AATGATACGGCGACC

ACCGAGATCTACACTAGATCGCTCGTCGGCAG

CGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGCCTGACC

TATGAATTGACAGCC

希釈率は、10 倍で、 $5.0 \times 10^6 - 5.0 \times 10^0$ copies/PCR で行なっている。

・病理組織学検査 :

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、肝臓および腎臓の採取を行い、10% neutral buffered formalin で組織の固定を行う。その後、パラフィンブロックを作成し、薄切を行い、hematoxylin and eosin (H&E) 染色を行い、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。

・生化学検査 :

エクソソーム RNA を毒性指標としたバイオマーカーのバリデーションの一つとして、病理組織学検査に加えて、血清生化学検査を行う。

aspartate aminotransferase (AST) および alanine aminotransferase (ALT) の項目について、automatic blood chemistry analyzer Dry-Chem NX 500V (Fuji Film Co. Ltd, Tokyo, Japan)を利用して測定する。

・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、ベンゾトリアゾール構造を持った化学物質のばく露により共通して誘導されるシグナルパスウェイのバイオマーカーなどの同定が可能となる。

また、ベンゾトリアゾール類5種類のエクソソーム RNA バイオマーカーおよびベンゾトリアゾール類の毒性情報を比較・解析することで、エクソソーム RNA を毒性バイオマーカーとしたカテゴリーアプローチが可能となるのかの検証を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規定、指針を遵守した。

C. 研究結果

C-1: エクソソーム RNA 解析の標準化プロトコールの作成 (小野、落谷) :

平成30年度研究において、採血方法、エクソソームの単離方法、エクソソーム RNA の解析方法の最適条件の決定に成功している。これらの研究結果をふまえて、令和元年度研究において、エクソソーム RNA 解析の標準化プロトコールを以下の様に作成した。

① C57BL/6J マウス♂ (12 週齢) に、化学物質および溶媒コントロールを 10:00 AM に単回投与し、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より血液を採取する。

② 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。

③ 超遠心ペレットダウン法によりエクソソームの回収を行う。

④ 回収したエクソソームより QIAGEN 社の miRNeasy Micro kit を用いてエクソソーム RNA 抽出を行う。

⑤ Clontech 社の SMARTer smRNA-Seq kit for Illumina を用いて、エクソソーム RNA より次世代シーケンス用ライブラリーを作成する。

⑥ Bluepippin サイズセレクターを用いて、マイクロ RNA 画分だけを抽出した上で、毒性部で所有する Illumina 社 Nextseq500 を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行う。

C-2 : ベンゾトリアゾール類 4 種類の投与実験 (小野) :

平成30年度においては、化学物質投与の際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 1 種 (2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phenol) (CAS#3846-71-7) (1000mg/kg) の投与実験を行った。

令和元年度研究においては、4 種類のベンゾトリアゾール類

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 (1000mg/kg)、中用量 (300mg/kg)、低容量(100mg/kg)の3用量での投与実験を行なった。これらの投与実験は、10:00 AM に単回投与し、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より血液を採取した。2 時間、4 時間後の採血は、高用量群のみ行なった。これらの投与動物において、肉眼所見においては、肝臓障害などは起きていなかった。

C-3 : 病理組織学検査と生化学検査 (平林) :

平成30年度および令和元年度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、腎臓のホルマリン固定を行ない、hematoxylin and eosin (H&E) 染色を行い、病理組織学検査を行った。また、一部においては、血液生化学検査も行った。

C-3-1 : 四塩化炭素投与

溶媒投与群 (図 1a) および四塩化炭素投与群 (7mg/kg) (図 1b) の H&E 染色像においては、正常な組織形態を示した (図 1a, b)。

a) corn oil

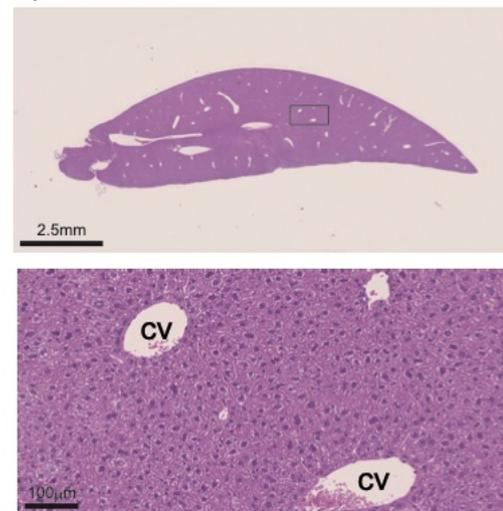


図 1 a) 四塩化炭素の溶媒コントロールとして、コーンオイルを投与し、24 時間後のマウスの肝臓における H&E 染色像。上の写真の四角部分を下の写真で拡大している。中心静脈(cv)と周囲の肝細胞は正常な組織構造を示している。CV: 中央静脈

b) CCl4 (7mg/kg)

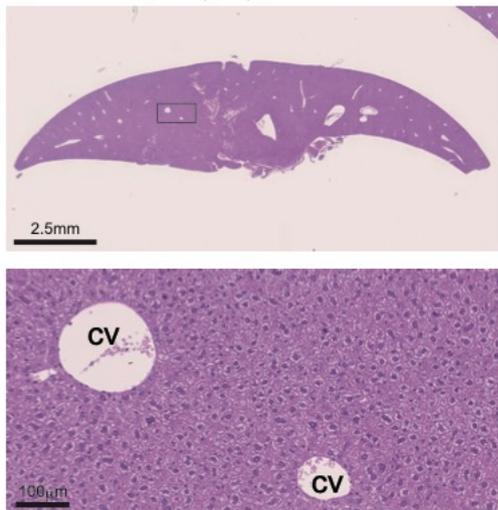


図 1 b) 四塩化炭素 (7mg/kg) を投与し、24 時間後のマウスの肝臓における H&E 染色像。上の写真の四角部分を下の写真で拡大している。中心静脈 (cv) と周囲の肝細胞は正常な組織構造を示している。CV: 中央静脈

一方、四塩化炭素投与群 (70 mg / kg) の H&E 染色像では、四塩化炭素によって誘発された肝臓の組織病理学的変化が見られた (図 1c)。中心静脈周囲の肝細胞が空胞化し、ネクローシスを起こしている。

c) CCl4 (70mg/kg)

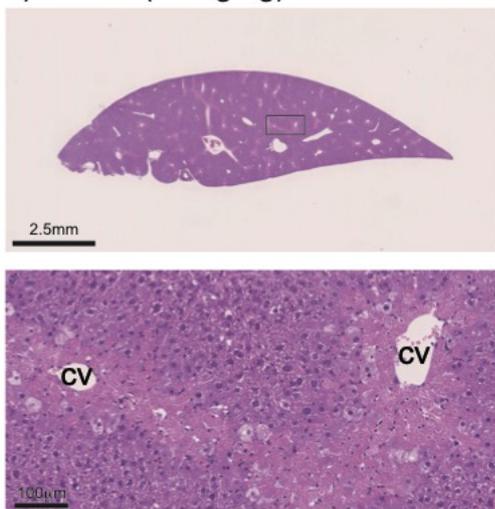


図 1 c) 四塩化炭素 (70mg/kg) を投与し、24 時間後のマウスの肝臓における H&E 染色像。上の写真の四角部分を下の写真で拡大している。中心静脈 (cv) 周囲の肝細胞が空胞化し、ネクローシスを起こしている。CV: 中央静脈

また、エクソソーム RNA を毒性指標としたバイオマーカーのバリデーションの一つとして、病理組織学検査に加えて、血清生化学検査を行った。

肝毒性の最も一般的に使用される診断テストでは、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST または SGOT) やアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT または SGPT) など、特定の肝細胞酵素の血中活性を測定する。AST は細胞の損傷に比例して血清に放出され、細胞壊死の急性期に最も上昇するが、ALT の放出は肝臓の損傷の初期に発生し、比較的長期間上昇したままになる。

ALT (図 1d) と AST (図 1e) の血中活性レベルは溶媒投与群と比較して四塩化炭素投与群 (7 mg / kg) では増加しなかったが、溶媒投与群のそれらと比較して 70 mg / kg CCl4 増加した。

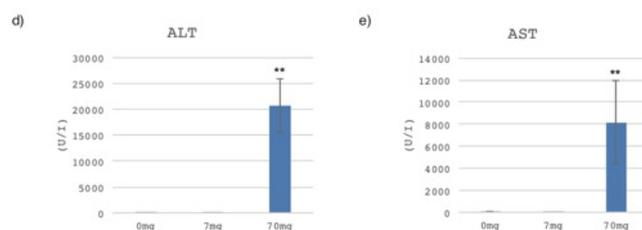


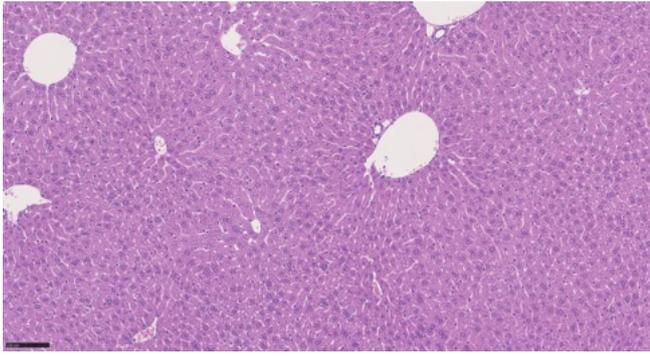
図 1d, e) 0 mg/kg、7 mg / kg、70 mg / kg の四塩化炭素を経口投与したマウスの血清中の ALT (d) および AST (e) を表している。

結果として、CCl4 投与の結果の血清生化学分析および組織学は、70 mg / kg の CCl4 投与のみが明らかな肝毒性を持つ。

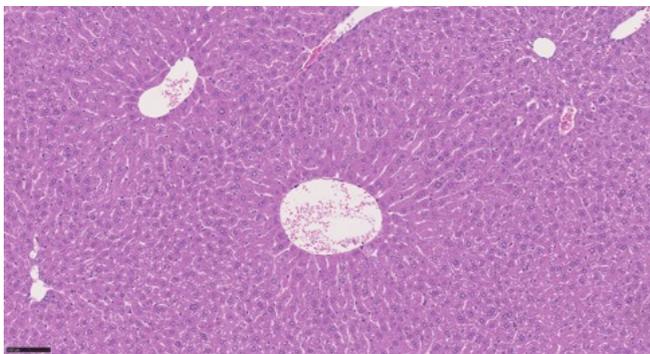
C-3-2 : ベンゾトリアゾール (CAS#3846-71-7) 投与

ベンゾトリアゾール (CAS#3846-71-7) 投与群 (1000 mg / kg) の H&E 染色像では、ベンゾトリアゾール (CAS#3846-71-7) によって誘発された肝臓の組織病理学的変化が見られた (図 2a, b, c, d)。投与後 8 時間後においては、明確な変化はないが、投与後 2 4 時間後では、中心静脈周囲の肝細胞の細胞質が膨大化し、hypertrophy を起こしている (図 2a, b)。投与後 9 6 時間後には、中心静脈周囲の肝細胞の細胞質が膨大化している細胞がさらに増えており、hypertrophy の領域が広がっている (図 2c)。また、Mitosis 細胞の増加が見られた (図 2c)。投与後 1 6 8 時間後には、ほぼ全ての肝細胞の細胞質が膨大化している hypertrophy となっている。また、Mitosis 細胞の増加がさらに見られた (図 2d)。

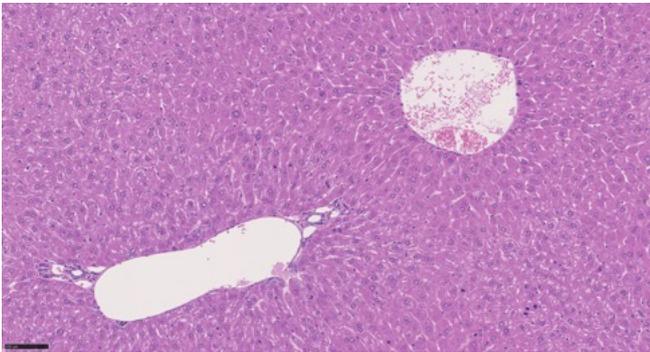
a) ベンゾトリアゾール (CAS#3846-71-7) 投与後 8時間後の肝臓の H & E 染色像



b) ベンゾトリアゾール (CAS#3846-71-7) 投与後 24 時間後の肝臓の H & E 染色像



c) ベンゾトリアゾール (CAS#3846-71-7) 投与後 96 時間後の肝臓の H & E 染色像



d) ベンゾトリアゾール (CAS#3846-71-7) 投与後 168 時間後の肝臓の H & E 染色像



ここで確認された hypertrophy は、肝臓重量の増加という表現型と一致している (図 3, 4)。一方、四塩化炭素 (70mg/kg) を投与後 24 時間のマウスの肝臓で見られた肝細胞のネクロシス像は全く見られなかった。このことから、ベンゾトリアゾール (CAS#3846-71-7) の投与で見られた肝臓重量の増加は、肝細胞の hypertrophy により生じていると結論できる。

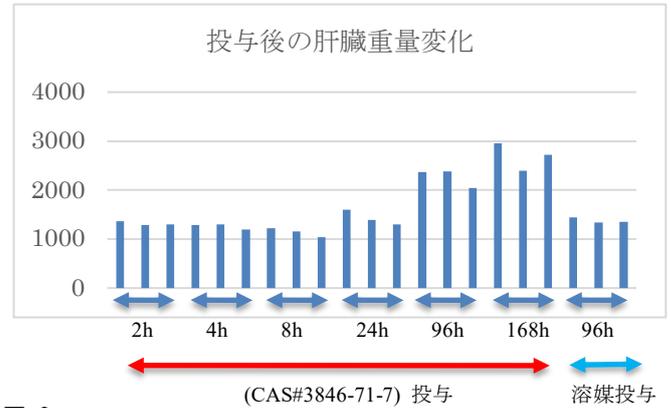


図 3

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、168 時間後における肝臓重量 (mg) をグラフ化

| | 2時間後 | 4時間後 | 8時間後 | 24時間後 | 96時間後 | 168時間後 |
|-------------|------|------|------|-------|-------|--------|
| 肝臓重量 | 変化なし | 変化なし | 変化なし | + | ++ | +++ |
| hypertrophy | 変化なし | 変化なし | 変化なし | + | ++ | +++ |
| Mitosis 細胞 | 変化なし | 変化なし | 変化なし | 変化なし | + | ++ |

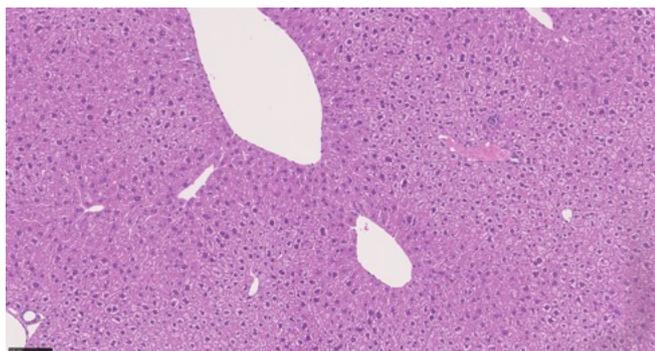
図 4

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、168 時間後における肝臓重量 (mg) および肝臓の H & E 染色像をまとめた表

C-3-3 : ベンゾトリアゾール (CAS#2440-22-4) 投与

ベンゾトリアゾール (CAS#2440-22-4) 投与群 (1000 mg / kg) の H&E 染色像では、ベンゾトリアゾール (CAS#2440-22-4) によって誘発された肝臓の組織病理学的変化が見られた (図 5)。門脈周囲の肝細胞が空胞化を起している。

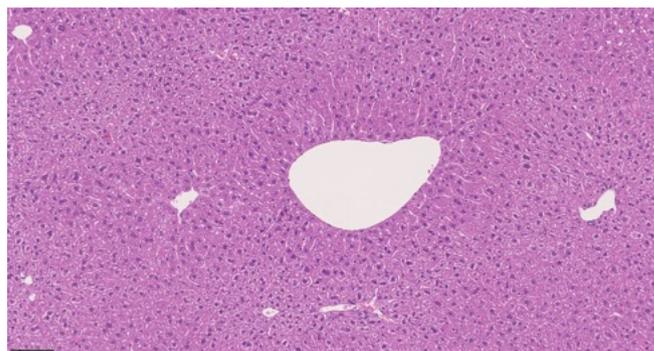
図 5 ベンゾトリアゾール (CAS#2440-22-4) 投与後 24 時間後の肝臓の H & E 染色像



C-3-5 : ベンゾトリアゾール (CAS#70321-86-7) 投与

ベンゾトリアゾール (CAS#70321-86-7) 投与群 (1000 mg / kg) の H&E 染色像では、ベンゾトリアゾール (CAS#70321-86-7) によって誘発された肝臓の組織病理学的変化が見られなかった (図 7)。

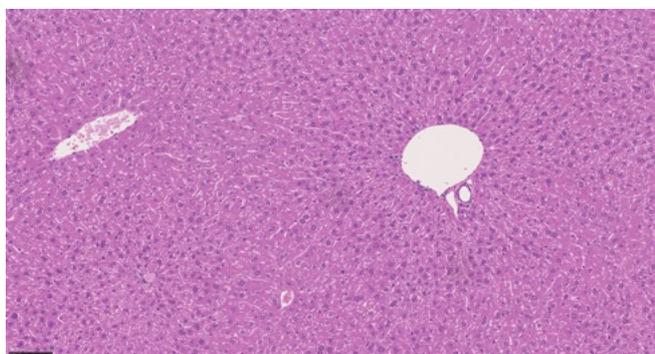
図 7 ベンゾトリアゾール (CAS#70321-86-7)投与後 24 時間後の肝臓の H & E 染色像



C-3-4 : ベンゾトリアゾール (CAS#3864-99-1) 投与

ベンゾトリアゾール (CAS#3864-99-1) 投与群 (1000 mg / kg) の H&E 染色像では、ベンゾトリアゾール (CAS#3864-99-1) によって誘発された肝臓の組織病理学的変化が見られなかった (図 6)。

図 6 ベンゾトリアゾール (CAS#3864-99-1)投与後 24 時間後の肝臓の H & E 染色像



C-3-6 : ベンゾトリアゾール 類 4 種類の投与後 24 時間後の肝臓の病理所見のまとめ

ベンゾトリアゾール類 4 種類 (1000 mg / kg) の投与後 24 時間後の肝臓における H&E 染色像では、(2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phenol) (CAS#3846-71-7)において、肝臓の hypertrophy および Mitosis 細胞の増加が見られたが、他の 3 種類においては同様の病理所見は見られなかった。ベンゾトリアゾール (CAS#2440-22-4) においては、肝細胞の空胞化が見られる一方、残り 2 種類に関してはベンゾトリアゾール類によって誘発された肝臓の病理組織学的変化が見られなかった (図 8)。

図 8 ベンゾトリアゾール投与による肝臓における病理組織所見のまとめ

| CAS | 3846-71-7 | 2440-22-4 | 3864-99-1 | 70321-86-7 |
|-------------|---|--------------------------------------|---|--|
| Name | 2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phenol | 2-(benzotriazol-2-yl)-4-methylphenol | 2,4-di-tert-butyl-6-(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)phenol | 2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-phenylpropan-2-yl)phenol |
| 肝臓重量 | + | 変化なし | 変化なし | 変化なし |
| hypertrophy | + | - | - | - |
| Mitosis 細胞 | + | - | - | - |
| 細胞の空胞化 | - | + | - | - |

C-4 : 四塩化炭素ばく露およびベンゾトリアゾール類ばく露に特異的なバイオマーカーの探索 (小野) :

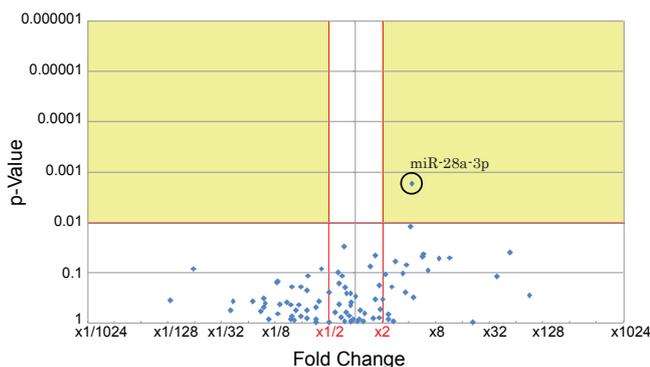
C-4-1 : 四塩化炭素ばく露に特異的なバイオマーカーの探索 :

平成30年度においては、四塩化炭素 (7mg/kg および 70mg/kg)、その溶媒となるコーンオイルの単回投与実験を行い、四塩化炭素投与群と溶媒投与群とのエクソソーム RNA の遺伝子発現を比較した結果、多くの毒性バイオマーカー候補の単離に成功している。

令和元年度は、現在、miRbase (<http://mirbase.org>) に報告されているマウスの microRNA 2110 個に関して網羅的遺伝子発現解析を詳細に行ない、学術論文を投稿するに至った。

既知の肝臓障害のバイオマーカーとなる miR-122 および miR-192 は、いずれも 70mg/kg の単回ばく露では、溶媒投与群と比較し、100 倍を超える遺伝子発現が誘導されたが、7mg/kg では全く誘導がなかった。これは、病理組織学的検査と生化学検査により、肝臓障害が 7mg/kg 投与では検出されなかったことと同様の結果を示しており、miR-122 および miR-192 は有用なバイオマーカーとなることを示している。さらに、miR-122 および miR-192 の他に 42 個の miRNA が、70mg/kg の単回ばく露では、溶媒投与群と比較し、2 倍以上の遺伝子発現を誘導することを明らかにした (図 9, 11)。

a) 7 mg/kg CCl4



b) 70 mg/kg CCl4

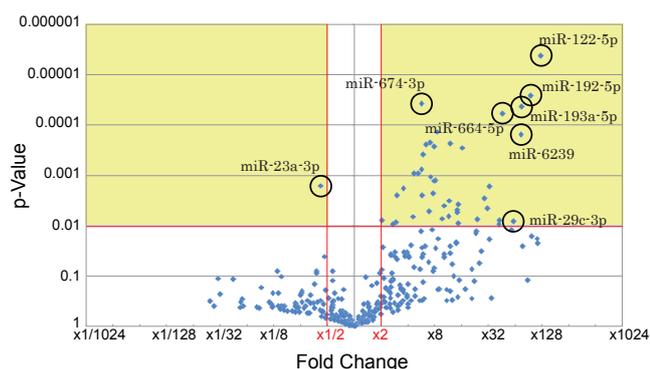


図9 四塩化炭素投与により誘導されるエクソソーム RNA の単離 (a)コーンオイル経口投与 (n = 12) および 7 mg / kg 四塩化炭素経口投与 (n = 3) のエクソソーム RNA 網羅的遺伝子発現解析結果を表すボルケーノプロット。(b)コーンオイル経口投与 (n = 12) および 70 mg / kg 四塩化炭素経口投与 (n = 9) のエクソソーム RNA 網羅的遺伝子発現解析結果を表すボルケーノプロット。y 軸 (P 値) ベージュ色の領域のドットは、コーンオイル(コントロール)と CCl4 (7 mg / kg (a)、70 の間の発現に 2 倍以上の有意な変化 (P <= 0.01) を示す。

一例として、miR-423-5p や miR-29c-3p は、四塩化炭素投与 (70mg/kg) においては、エクソソーム RNA としての遺伝子発現が大きく亢進するが、溶媒投与群および病理学および生化学的に病変の起きていない四塩化炭素投与群 (7mg/kg) においては、遺伝子発現の亢進は誘導されていない (図 10)。

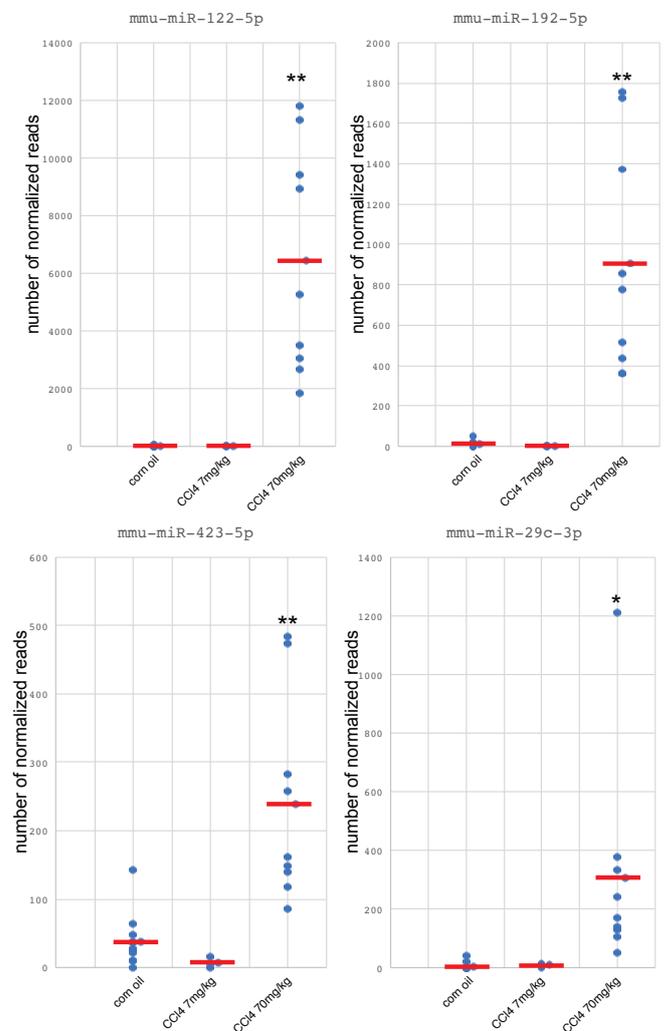


図10 4つの EV-associated miRNA (miR-122, miR-192, miR-423, miR-29c) の実際のシーケンスのリード数のプロット図。プロット上の赤いバーは、各サンプルの平均を表す。** P < 0.001, * P < 0.01 (コーンオイル投与群との比較)

| miRNA | Fold change | P-value |
|------------------|-------------|-------------|
| mmu-miR-122-5p | 124.3457982 | 4.10052E-06 |
| mmu-miR-192-5p | 95.40790089 | 2.52392E-05 |
| mmu-miR-674-3p | 5.706957637 | 3.73766E-05 |
| mmu-miR-193a-5p | 75.82387022 | 4.35667E-05 |
| mmu-miR-192-3p | N.A. | 4.80562E-05 |
| mmu-miR-664-5p | 45.71782006 | 5.85249E-05 |
| mmu-miR-30d-5p | 8.516113665 | 0.00013605 |
| mmu-miR-6239 | 74.72199455 | 0.000155712 |
| mmu-miR-1247-5p | N.A. | 0.000174168 |
| mmu-miR-28a-3p | 7.083817232 | 0.000220674 |
| mmu-miR-22-5p | 11.76744086 | 0.000235333 |
| mmu-miR-423-5p | 6.388818576 | 0.000240415 |
| mmu-miR-187-3p | N.A. | 0.000252835 |
| mmu-miR-130a-3p | 7.862186383 | 0.000272001 |
| mmu-miR-193a-3p | 16.22203082 | 0.000282773 |
| mmu-miR-210-3p | 5.932110798 | 0.000387975 |
| mmu-miR-1249-3p | 5.668511989 | 0.000755986 |
| mmu-miR-532-3p | 5.228119523 | 0.000912155 |
| mmu-miR-425-5p | 4.768893321 | 0.000917652 |
| mmu-miR-339-5p | 7.229527922 | 0.00108171 |
| mmu-miR-574-3p | 8.261805959 | 0.001235294 |
| mmu-miR-6240 | 7.923153144 | 0.001268117 |
| mmu-miR-23a-3p | 0.420764258 | 0.001636375 |
| mmu-miR-874-3p | 33.09392448 | 0.001684601 |
| mmu-miR-21a-5p | 3.546441934 | 0.001833359 |
| mmu-miR-324-3p | 7.69715977 | 0.0023448 |
| mmu-miR-744-5p | 3.003918983 | 0.002546474 |
| mmu-miR-676-3p | 5.767312941 | 0.002546729 |
| mmu-miR-345-3p | 28.52191857 | 0.002851029 |
| mmu-miR-376b-3p | N.A. | 0.003074675 |
| mmu-miR-203b-5p | 11.61612346 | 0.003215505 |
| mmu-miR-21a-3p | 14.70577286 | 0.003736011 |
| mmu-miR-101b-3p | 10.14888491 | 0.004098845 |
| mmu-miR-183-5p | 31.16821919 | 0.004545263 |
| mmu-miR-455-5p | N.A. | 0.004689289 |
| mmu-miR-29a-3p | 14.18293213 | 0.004851941 |
| mmu-miR-330-3p | 6.900663431 | 0.005282091 |
| mmu-miR-362-3p | 14.18493622 | 0.005383571 |
| mmu-miR-378a-3p | 11.52840894 | 0.006486874 |
| mmu-miR-27b-3p | 4.550345431 | 0.006635769 |
| mmu-miR-30a-5p | 9.760313913 | 0.007347957 |
| mmu-miR-34a-5p | 24.45306825 | 0.007460881 |
| mmu-miR-125a-5p | 2.042752023 | 0.007747797 |
| mmu-miR-802-5p | 42.76078307 | 0.00781044 |
| mmu-miR-1843a-5p | N.A. | 0.008113383 |
| mmu-miR-29c-3p | 61.4392178 | 0.008149335 |
| mmu-miR-2137 | 2.958524964 | 0.008523622 |
| mmu-miR-379-5p | 14.77543169 | 0.009083035 |
| mmu-let-7g-3p | 42.35147351 | 0.00919447 |
| mmu-miR-221-3p | 2.714900374 | 0.009578552 |

図 11 四塩化炭素投与により誘導されるエクソソーム RNA のリスト (a)コーンオイル経口投与(n = 12)および 70 mg / kg 四塩化炭素経口投与(n = 9)のエクソソーム RNA 網羅的遺伝子発現解析結果より得られた発現に 2 倍以上の有意な変化 (P ≤ 0.01) があった EV-associated miRNA の発現量の変化 (Fold change) および有意差 (P-value) を示したリスト。

C-4-2 : ベンゾトリアゾール類ばく露に特異的なバイオマーカーの探索 :

令和元年度においては、さらに、ベンゾトリアゾール類 4 種類の単回投与実験を行なったマウスのエクソソーム RNA の遺伝子発現の比較解析を行なった。

C-4-1 では、既知の miRNA のみを研究対象にしていたが、本項では、次世代シーケンスで検出されるすべての small RNA を解析対象とした。

四塩化炭素投与群、ベンゾトリアゾール類 4 種類の投与群、溶媒投与群のエクソソーム RNA の遺伝子発現の比較解析を行うことで、四塩化炭素ばく露のみで誘導される新たな small RNA や、各種ベンゾトリアゾールばく露に特異的な small RNA の単離に成功した。

- ・ 四塩化炭素ばく露のみで誘導される新たな small RNA

既知の肝臓障害のバイオマーカーである miR-122 および miR-192 は、図 12 のように、ベンゾトリアゾール類のばく露においては、発現誘導がされなかった。

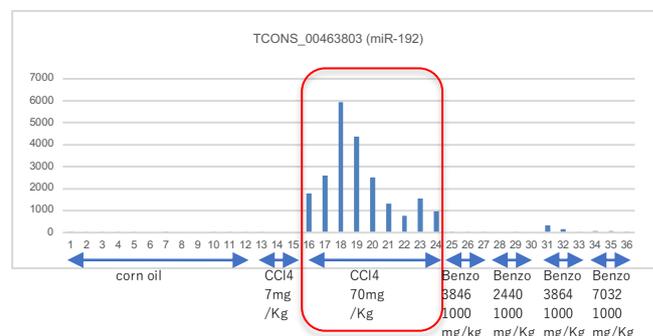
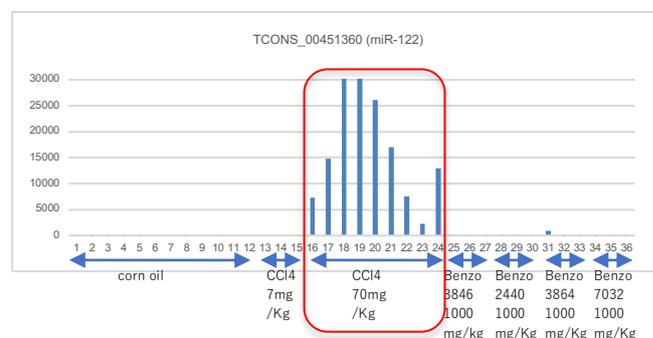


図 12 コーンオイル、四塩化炭素 (7mg/Kg、70mg/Kg)、ベンゾトリアゾール 4 種類 (ベンゾトリアゾール (CAS:3846)、ベンゾトリアゾール (CAS:2440)、ベンゾトリアゾール (CAS:3864)、ベンゾトリアゾール (CAS:7032))、ばく露後 24 時間後における既知の肝臓障害バイオマーカーである miR-122 および miR-192 の発現変化。

しかし、我々が報告した新規の肝臓障害バイオマーカーである miR-29c は、ベンゾトリアゾール (CAS#7032) においても発現誘導が確認された (図 13)。

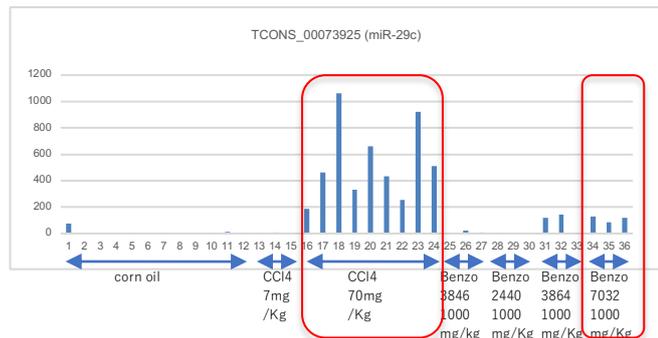


図 13 コーンオイル、四塩化炭素 (7mg/Kg、70mg/Kg)、ベンゾトリアゾール4種類のみばく露後24時間後における新規の肝臓障害バイオマーカーである miR-29c の発現変化。

解析対象を既知の miRNA から、small RNA にすることで、miR-122 や miR192 と同様の挙動を示す small RNA の単離にも成功している (図 14)。

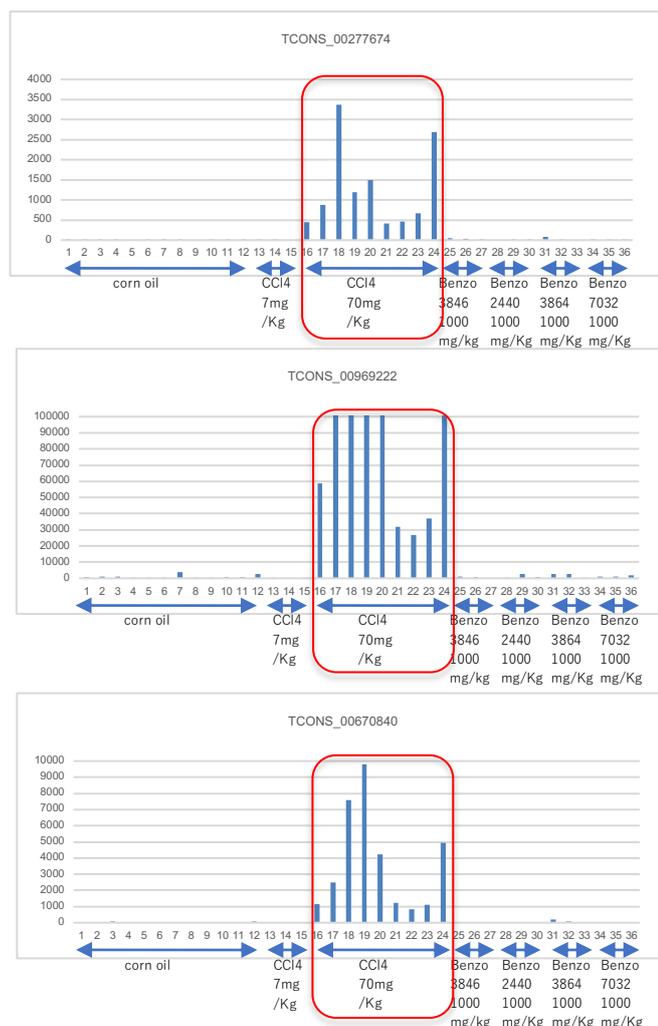


図 14 コーンオイル、四塩化炭素 (7mg/Kg、70mg/Kg)、ベンゾトリアゾール4種類のみばく露後24時間後における四塩化炭素 (70mg/kg) に特異的に発現誘導される新

規 small RNA。

ここで示す様な新規 small RNA の多くは通常のマイクロ RNA 同様にヘアピン構造が予測されるので、これらは新規マイクロ RNA である可能性が高い (図 15)。

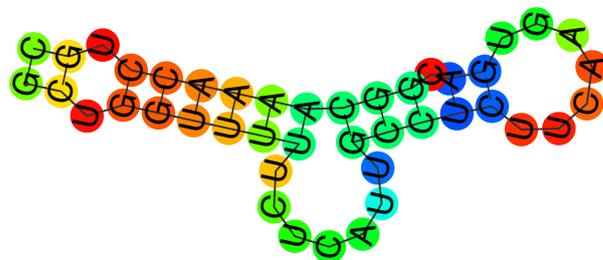


図 15 四塩化炭素ばく露でのみ誘導される新規 small RNA の RNA の二次構造を予測させた一例。ヘアピン構造をとることから、新規の microRNA と考えられる。

・ベンゾトリアゾール類ばく露のみで誘導される新たな small RNA

さらに、ベンゾトリアゾール類に特異的に誘導されるバイオマーカーのスクリーニングを行なった結果、ベンゾトリアゾール1種類のみばく露によって誘導されるバイオマーカーおよび複数のベンゾトリアゾール類に共通して誘導されるバイオマーカーの検出にも成功した。化学物質の類似した分子構造を認識してエクソソーム RNA が血中に放出されている可能性も考えられる (図 16, 17, 18, 19)。

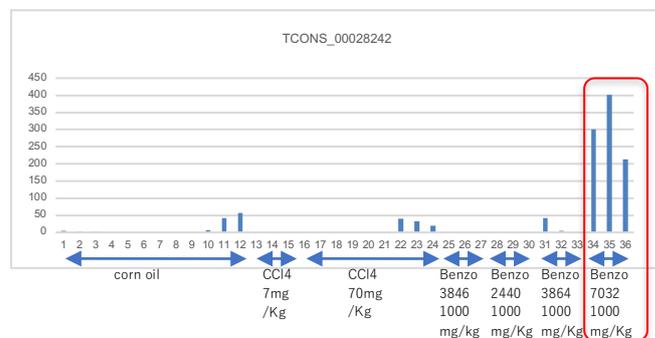


図 16 コーンオイル、四塩化炭素 (7mg/Kg、70mg/Kg)、ベンゾトリアゾール4種類のみばく露後24時間後においてベンゾチリアゾール1種類 (CAS#70321-86-7) に特異的に発現誘導される新規 small RNA (赤線四角部分)。

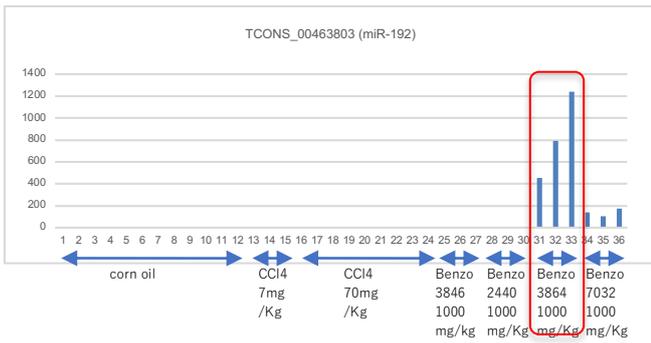


図 17 コーンオイル、四塩化炭素 (7mg/Kg、70mg/Kg)、ベンゾトリアゾール4種類のばく露後24時間後においてベンゾチリアゾール1種類 (CAS#3864-99-1) に特異的に発現誘導される新規 small RNA (赤線四角部分)。

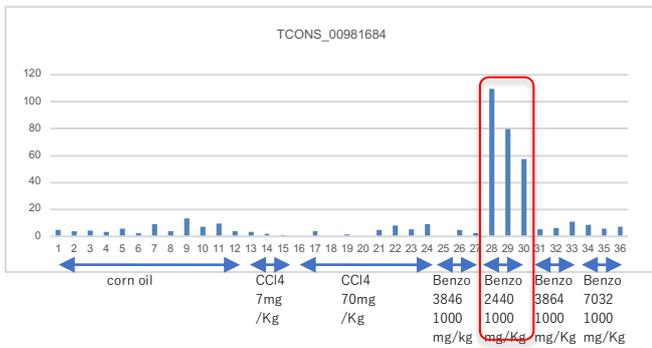


図 18 コーンオイル、四塩化炭素 (7mg/Kg、70mg/Kg)、ベンゾトリアゾール4種類のばく露後24時間後においてベンゾチリアゾール1種類 (CAS#2440-22-4) に特異的に発現誘導される新規 small RNA (赤線四角部分)。

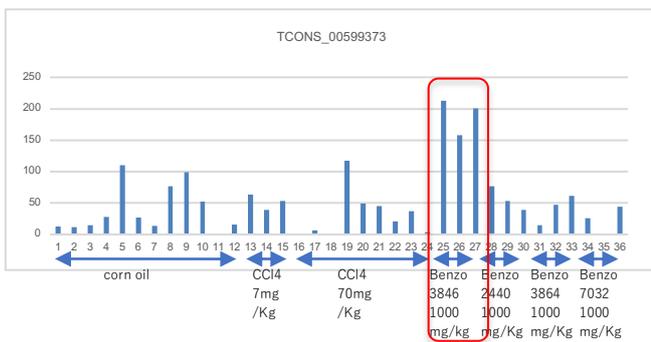


図 19 コーンオイル、四塩化炭素 (7mg/Kg、70mg/Kg)、ベンゾトリアゾール4種類のばく露後24時間後においてベンゾチリアゾール1種類 (CAS#3846-71-7) に特異的に発現誘導される新規 small RNA (赤線四角部分)。

令和元年度に解析を行った4種類のベンゾトリアゾールに関しては、それぞれに特異的な small RNA が多く存在する。

また、ベンゾトリアゾール類の一部に共通する small RNA も存在する (図 20)。

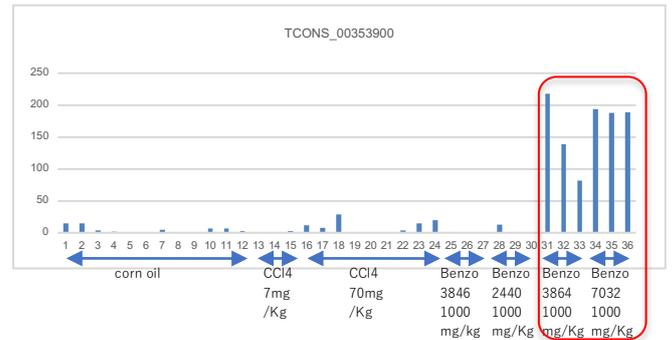
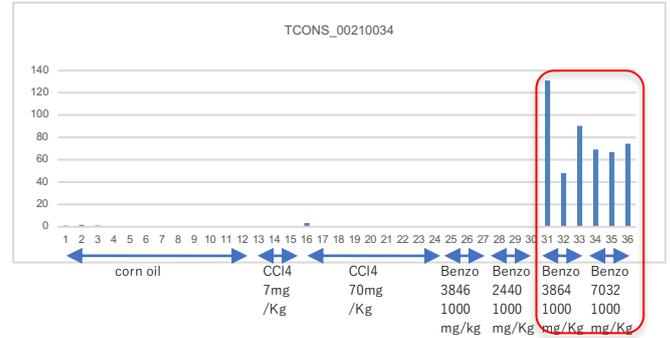


図 20 ベンゾトリアゾール類2種類のばく露に共通して誘導される新規 small RNA の一例

コーンオイル、四塩化炭素 (7mg/Kg、70mg/Kg)、ベンゾトリアゾール4種類のばく露後24時間後においてベンゾチリアゾール2種類 (CAS#3864-99-1 および CAS#70321-86-7) に特異的に発現誘導される新規 small RNA (赤線四角部分)。

C-5 : 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) :

C-5-1 : ベンゾトリアゾール類の投与により肝臓で誘導される遺伝子発現パスウェイの同定 :

ベンゾトリアゾール類 5 種類について、投与後 2 4 時間後の肝臓における網羅的遺伝子発現データであるトキシコゲノミクスデータを参照した。

主要な異物 (薬物) 代謝における主要な第一相酵素である Cytochrome P450 関連遺伝子発現パスウェイネットワークとして、AhR-Cyp1 (arylhydrocarbon receptor: AhR 依存的 Cyp1 の活性化), CAR-Cyp2 (Constitutive androstane receptor: CAR 依存的 Cyp2 の活性化), SXR/PXR-Cyp3 (pregnane X receptor: SXR/PXR 依存的 Cyp3 の活性化), PPAR-Cyp4 (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: PPAR 依存的 Cyp4 の活性化), および、第二相酵素関連遺伝子発現パスウェイネットワークとして、Nrf2-phase II enzymes (Nuclear factor erythroid 2 related factor 2/Kelch-like ECH associated protein 1: Nrf2 依存的 第二相酵素の活性化), Nrf2/Keap1 (Nuclear factor erythroid 2 related factor 2//Kelch-like ECH associated protein 1: Nrf2/Keap1 依存的 第二相酵素の活性化) について解析を行なった (図 21)。

| CAS | | 3846-71-7 | 2440-22-4 | 3864-99-1 | 70321-86-7 | 3147-75-9 |
|---|------------------------|---|--------------------------------------|---|--|--|
| Name | | 2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phenol | 2-(benzotriazol-2-yl)-4-methylphenol | 2,4-di-tert-butyl-6-(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)phenol | 2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-phenylpropan-2-yl)phenol | 2-(benzotriazol-2-yl)-4-(2,4,4-trimethylpentan-2-yl)phenol |
| Transcriptomic profile (*semiquantitative relative degree of induction) | Up probesets | 5480 | 150 | 3230 | 370 | 250 |
| | AhR-Cyp1* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | CAR-Cyp2* | 100 | 0 | 50 | 0 | 40 |
| | SXR/PXR-Cyp3* | 100 | 0 | 80 | 0 | 0 |
| | PPAR-Cyp4* | 100 | 0 | 100 | 30 | 40 |
| | Nrf2-phase II enzymes* | 100 | 10 | 50 | 5 | 0 |
| | Nrf2/Keap1* | 100 | 0 | 80 | 0 | 0 |

図 21 ベンゾトリアゾール類5種類のマウスへの投与により誘導される第1相酵素および第2相酵素に関連した共通して誘導される遺伝子発現解析。Up probesets: 遺伝子発現が誘導された遺伝子 probe set の数。

*: 最も多くの遺伝子発現が誘導されたベンゾトリアゾール (CAS#3826-71-7) によって活性化した CAR-Cyp2, SXR/PXR-Cyp3, PPAR-Cyp4, Nrf2-phase II enzymes, Nrf2/Keap1 を 100 とし、活性化しなかった AhR-Cyp1 を 0 とした場合の、活性化の相対値。

C-5-2 : ベンゾトリアゾール類の投与により発現誘導される small RNA 遺伝子発現パスウェイの同定 :

ベンゾトリアゾール類 5 種類に特異的なバイオマーカーをスクリーニングするために、令和元年度までに、4 種類のベンゾトリアゾールを投与したマウス血液中のエクソソーム RNA の次世代シーケンサーを用いた網羅的シーケンスを行なった。令和元年度は、網羅的シーケンスの解析により、現在までに、ベンゾトリアゾール類のうち、2 種類に共通するバイオマーカーが存在することが明らかになった (C-4 の項)。令和 2 年度の計画でさらに 1 種類のベンゾトリアゾール類の解析結果を追加することで、ベンゾトリアゾール類の詳細な解析が完了する予定である。それにより、ベンゾトリアゾール類 3 種類に共通するバイオマーカーなどが得られる可能性もある。

少なくとも令和元年度までの解析により、ベンゾトリアゾール類 2 種類に共通するバイオマーカーが得られていることから、これらの結果は、ベンゾトリアゾール類という分子構造の非常に近い化学物質であることから、分子構造の共通性に起因する可能性がある。

また、分子構造の共通性とは関係なく、化学物質投与により活性化された遺伝子パスウェイを反映した結果とも考えられる。ベンゾトリアゾール 2 種類ベンゾトリアゾール 2 種類 (CAS#3864-99-1 および CAS#70321-86-7) には、共通したバイオマーカーが多いが、主要な異物 (薬物) 代謝酵素関連においては、強い相関が見られていない。よって、その他の遺伝子ネットワークパスウェイも解析する必要がある。

D. 考察

平成 30 年度および令和元年度に行った四塩化炭素投与マウスを肝臓障害のモデルとして利用し、エクソソーム RNA をバイオマーカーとした次世代型毒性評価法の標準化プロトコールの作成に成功し、論文として投稿をするに至った。

新たに開発した標準化プロトコールを利用することで、四塩化炭素による肝障害のバイオマーカーとして 42 個の新規 miRNA を報告した。このことから、本研究課題で作成した標準化プロトコールは非常に感度の高い系になっているといえる。

さらに、令和元年度に新たに取得したベンゾトリアゾール類 4 種類の投与実験を行なったマウスのエクソソーム RNA の網羅的遺伝子発現結果を比較することで、新たに、四塩化炭素投与に特異的なバイオマーカーおよびベンゾトリアゾール類 4 種類のそれぞれに特異的なバイオマーカーの単離に至った。

さらに、ベンゾトリアゾール類 2 種類に共通して発現誘導されるバイオマーカーの単離にも成功している。

ベンゾトリアゾール 2 種類 (CAS#3864-99-1 および CAS#70321-86-7) に共通して誘導されるエクソソーム RNA は、ベンゾトリアゾール構造を持った化学物質ばく露により共通して誘導されるシグナルパスウェイのバイオマーカーとなっている可能性が考えられる。

このことから、令和 2 年度計画において、ベンゾトリアゾール類 5 種類のエクソソーム RNA バイオマーカーおよびベンゾトリアゾール類の毒性情報を比較・解析することで、エクソソーム RNA を毒性バイオマーカーとしたカテゴリーアプローチが可能となるのかの検証を行う。

また、分子構造の共通性とは関係なく、化学物質投与により活性化されたシグナルパスウェイを反映した結果とも考えられる。ベンゾトリアゾール 2 種類 (CAS#3864-99-1 および CAS#70321-86-7) には、最も共通したバイオマーカーが多いが、主要な異物(薬物)代謝酵素関連においては、強い相関が見られていない。よって、薬物代謝酵素以外の遺伝子ネットワークパスウェイも解析する必要がある。

また、令和元年度研究により得られた新たなバイオマーカー候補となる多くの small RNA は、二次構造予測させると、多くがヘアピン構造をとることから、新規のマイクロ RNA である可能性が高く、その生体内での毒性発現機序への寄与、および生物学的意義などを明らかにすることは、重要性が高い。

本研究計画は、令和元年度まで計画通りに順調に進捗しており、既に血液 1 滴からの高感度かつ迅速な次世代型毒性評価法を確立できている。

最終年度 (令和 2 年度計画) において、ベンゾトリアゾール類 5 種類の毒性バイオマーカーのデータが集積されることで、エクソソーム RNA をバイオマーカーとしたカテゴリーアプローチへの適応が可能となると考えている。

毒性予測評価に向けたエクソソーム RNA をバイオマーカーとした次世代型毒性評価法は、より多くの化学物質のデータを集積することでさらに毒性予測の精度が極めて高いものにできることが期待される。

E. 結論

本研究は、計画通りに進捗した。

令和元年度研究においては、平成 30 年度研究で得られた化学物質投与実験およびエクソソーム RNA の網羅的遺伝子解析の至適条件の検証結果から、標準化プロトコールの作成に至った。この標準化プロトコールに従って、今年度はベンゾトリアゾール 5 種類の投与実験および、採血、血清採取、パラフィンブロック作製を行なった。さらに、新たにベンゾトリアゾール類 4 種類の投与実験におけるエクソソーム RNA の網羅的遺伝子発現解析および肝臓における病理学的検査を行なった。

その結果、四塩化炭素特異的なバイオマーカー (エクソソーム RNA)、ベンゾトリアゾール類 2 種類に共通するバイオマーカー、ベンゾトリアゾール類 1 種類にのみ共通するバイオマーカーの単離に成功した。

これらのベンゾトリアゾール類 2 種類に共通するエクソソーム RNA は、ベンゾトリアゾール構造を持った化学物質ばく露により共通して誘導されるシグナルパスウェイのバイオマーカーとなっている可能性が考えられる。また、ベンゾトリアゾール類 1 種類にのみ特異的なエクソソーム RNA は、側鎖構造の違いにより、遺伝子発現誘導が異なるシグナルパスウェイのバイオマーカーとなっている可能性が考えられる。

令和元年度研究までに、エクソソーム RNA を毒性バイオマーカーとして利用した次世代型毒性評価法の標準化プロトコールの作成に成功し、論文として投稿するに至り、計画通りに進捗できている。

最終年度 (令和 2 年度) は、ベンゾトリアゾール 1 種類 (CAS#3147-75-9) を投与したマウス血清中のエクソソーム RNA の網羅的解析を行ない、ベンゾトリアゾール類 5 種類のデータを比較することで、エクソソーム RNA をバイオマーカーとしたカテゴリーアプローチ解析を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. 研究発表

※本研究費補助金によって主に行われた論文、著書、学会発表には○印を付けている。

1. 論文発表 (抜粋)

○ * **Ono R.**, Yasuhiko Y., Aisaki K., Kitajima S., Kanno J. and **Hirabayashi Y.**

Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing
Communications Biology 2019, Feb 8;2:57. doi: 10.1038/s42003-019-0300-2. * corresponding author

内田恵理子、山下拓真、**小野竜一**、内藤雄樹、井上貴雄

ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療の規制と安全性評価

医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, PMDRS, 2019, 50 (9), 513-522

内田恵理子、平松直人、犬飼直人、岩井謙一、渡辺武志、川崎秀吉、田村幸太郎、土屋貴穂、吉見英治、高橋則彦、伊藤辰哉、藤本和則、山下晃人、小野貴士、高木観、**小野竜一**、内藤雄樹、井上貴雄

ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療の開発動向

医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, PMDRS, 2019, 50 (8), 443-453

○ **Ryuichi Ono** & Shihori Tanabe

The gene and microRNA networks of stem cells and reprogramming

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

Oka SI, Chin A, Park JY, Ikeda S, Mizushima W, Ralda G, Zhai P, Tong M, Byun J, Tang F, Einaga Y, Huang CY, Kashihara T, Zhao M, Nah J, Tian B, **Hirabayashi Y.** Yodoi J, Sadoshima J.

Thioredoxin-1 maintains mitochondrial function via mTOR signaling in the heart.

Cardiovasc Res., 2019, doi: 10.1093/cvr/cvz251. Online ahead of print.

Matsumoto M, Iso T, Igarashi T, Tanabe S, Inoue K, **Hirose A.**

Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances(V).

Bull. Natl Inst. Health Sci., 2019, 137, 66-72.

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.

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.

Yamada, T., Tanaka, Y., Hasegawa, R., Igarashi, T., **Hirose, A.**

Male-specific prolongation of prothombin time by industrial chemicals,

Fundam. Toxicol. Sci., 5, 75-82, 2018.

Matsumoto, M., Furukawa, M., Kobayashi, K, Iso, T., Igarashi, T., Yamada, T., **Hirose, A.**

A 28-day repeated oral-dose toxicity study of insecticide synergist

N-(2-ethyl-hexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2.2.2]oct-5-ene-2,3-dicarboximide in rats,

Fundam. Toxicol. Sci., 5, 1-11, 2018.

Akazawa Y, Mizuno S, Fujinami N, Suzuki T, Yoshioka Y, **Ochiya T.** Nakamoto Y, Nakatsura T.

Usefulness of serum microRNA as a predictive marker of recurrence and prognosis in biliary tract cancer after radical surgery

Scientific Reports, 2019 Apr 11;9(1):5925. doi: 10.1038/s41598-019-42392-7.

Kikuchi S, Yoshioka Y, Prieto-Vila M, **Ochiya T.**

Involvement of Extracellular Vesicles in Vascular-Related Functions in Cancer Progression and Metastasis

Int J Mol Sci. 2019 May 26;20(10):2584. doi: 10.3390/ijms20102584.

Yoshioka Y, Katsuda T, **Ochiya T.**

Extracellular vesicles and encapsulated miRNAs as emerging cancer biomarkers for novel liquid biopsy.

Jpn J Clin Oncol. 48(10):869-876. 2018. Review.

Matsuzaki J, **Ochiya T.**

Extracellular microRNAs and oxidative stress in liver injury: a systematic mini review.

J Clin Biochem Nutr. Jul;63(1):6-11.

doi: 10.3164/jcbn.17-123. 2018 Review.

Otsuka K, Yamamoto Y, **Ochiya T.**

Regulatory role of resveratrol, a microRNA-controlling compound, in HNRNPA1 expression, which is associated with poor prognosis in breast cancer.

Oncotarget. 15;9(37):24718-24730. 2018

Sanchez Calle A, Kawamura Y, Yamamoto Y, Takeshita F, **Ochiya T.**

Emerging roles of long non-coding RNA in cancer.

Cancer Sci. Jul;109(7):2093-2100.

doi: 10.1111/cas.13642. Epub 2018 Review.

Miyazaki H, Takahashi RU, Prieto-Vila M, Kawamura Y, Kondo S, Shirota T, **Ochiya T.**

CD44 exerts a functional role during EMT induction in cisplatin-resistant head and neck cancer cells.

2. 学会発表 (抜粋)

小野竜一、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純
Percellome プロジェクトから見えてきたエピジェネティクス影響
第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019.7.19.)

○ Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Takahiro Ochiya, Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayashi
Evaluation of exosomes as toxic biomarkers in mouse
15th International Congress of Toxicology (ICTXV) (2019.7.16-18.), Hawaii, USA

Ryuichi Ono, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, and Jun Kanno
Molecular Basis of the 'Baseline Response' and 'Transient Response' Observed in the Newly Designed Repeated Dose Study: Epigenetic Modifications
Gordon Research Conference (2019.8.11-16.), MA, USA

○ Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Yoko Hirabayashi
Exosome-mediated horizontal gene transfer: a possible new risk for genome editing
55th Congress of the European Societies of Toxicology (2019.9.8-11.) Helsinki, Finland

○ 小野竜一
Exosome-mediated horizontal gene transfer: a possible new risk for genome editing
第 78 回 日本癌学会学術総会
(2019.9.26-28.) 京都国際会館 (招待講演)

○ 小野竜一
EV を介した遺伝子水平伝搬によるゲノム進化の可能性
第 6 回日本細胞外小胞学会学術集会
(2019.10.24-25.) 国立がん研究センター研究所
(招待講演)

○ Ryuichi Ono
Extracellular vesicles-mediated horizontal gene transfer: a possible new risk for genome editing
第 1 回アジア環太平洋細胞外小胞学会学術集会
(2019.11.24-25.) 国立がん研究センター研究所
(招待講演)

○ Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Yoko Hirabayashi
Horizontal gene transfer mediated by exosomes: a possible new risk for genome editing
Keystone Symposia Conference: Engineering the Genome (February 2020, Banff, Canada)

○ Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Takahiro Ochiya, Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayashi
Evaluation of extracellular vesicles (EVs) as toxic

biomarkers in mouse
59th Annual Meeting of Society of Toxicology (March 2020, Anahaim, USA)

大野 彰子, 山田 隆志, 広瀬 明彦
データベースを活用した神経毒性の in silico 予測手法の開発
第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019 年 6 月徳島)

磯 貴子, 松本 真理子, 鈴木 洋, 川村 智子, 山田 隆志, 井上 薫, 杉山 圭一, 森田 健, 本間 正充, 広瀬 明彦
食品用器具・容器包装材料のポジティブリスト化に向けた安全性評価: 脂肪酸類のグループ評価.
第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019 年 6 月徳島)

五十嵐 智女, 鈴木 洋, 牛田 和夫, 松本 真理子, 井上 薫, 広瀬 明彦
化審法既存化学物質のスクリーニング評価における 1,4-ジクロロブタンの有害性評価.
第 46 回日本毒性学会学術大会 (2019 年 6 月徳島)

田邊思帆里, 青柳一彦, Sabina Quader, Horacio Cabral, 小野竜一, 広瀬明彦, 横崎 宏, 佐々木博己
がん及び幹細胞における Wnt/beta-catenin シグナルパスウェイ
日本薬学会第 140 年会 2020.3.28

田邊思帆里, 青柳一彦, Sabina Quader, Horacio Cabral, 小野竜一, 広瀬明彦, 横崎 宏, 佐々木博己
がん関連 Wnt/beta-catenin シグナルパスウェイに関する有害性発現経路 (Adverse Outcome Pathway; AOP) の開発
第 93 回日本薬理学会年会 (2020.3.16-18)

田邊思帆里, 青柳一彦, Sabina Quader, Horacio Cabral, 小野竜一, 広瀬明彦, 横崎 宏, 佐々木博己
骨髄由来間葉系幹細胞及び胃がんにおける上皮間葉転換関連分子パスウェイ及びがん幹細胞ネットワーク
第 19 回日本再生医療学会総会 (2020.3.12-14)

田邊思帆里, 青柳一彦, Sabina Quader, 小野竜一, 広瀬明彦, 横崎 宏, 佐々木博己
The Wnt/beta-catenin signaling pathway and its relation to cancer and stem cells
第 2 回医薬品毒性機序研究会 2020.1.23&24

田邊思帆里, Sabina Quader, 小野竜一, 青柳一彦, 広瀬明彦, 横崎 宏, 佐々木博己
胃がん及び幹細胞における上皮間葉転換関連ネットワークパスウェイ
第 78 回日本癌学会学術総会 2019.9.27

Shihori Tanabe, Sabina Quader, Ryuichi Ono, Kazuhiko Aoyagi, Akihiko Hirose, Hiroshi Yokozaki, Hiroki Sasaki
MOLECULAR NETWORK PATHWAY MECHANISM IN DRUG RESISTANCE, CANCER AND STEM CELLS
ISSCR (International Society for Stem Cell Research)

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