

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 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ールの作成についての学術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ールの報告に加えて、次世代型安全性評価法の標準化プロトコールを用いて、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 4 2 個報告するに至った。

本分担研究では、上記の投稿論文において、四塩化炭素ばく露による肝臓障害を肝臓の病理組織解析および血液生化学検査を行うことで証明した。

さらに、毒性評価を行うベンゾトリアゾール類 5 種類をばく露したマウスより、血液採取を行った後に、組織病理解析用のためのパラフィンブロック作成を完了させた。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、肝臓の病理組織解析を完了した。

## 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、数十～百ナノメータ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、2 4 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さない用量を設定し、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)・古川祐介(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。

#### (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-3：病理組織学的検査と生化学検査 (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 (a) および四塩化炭素投与群 (7mg/kg) 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

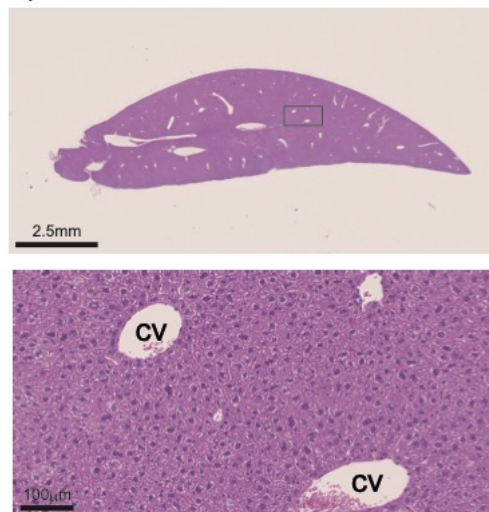


図 1 a) 四塩化炭素の溶媒コントロールとして、コーンオイルを投与し、24時間後のマウスの肝臓における H&E 染色像。上の写真の四角部分を下の写真で拡大している。中心静脈(cv)と周囲の肝細胞は正常な組織構造を示している。CV: 中央静脈

b) CCl4 (7mg/kg)

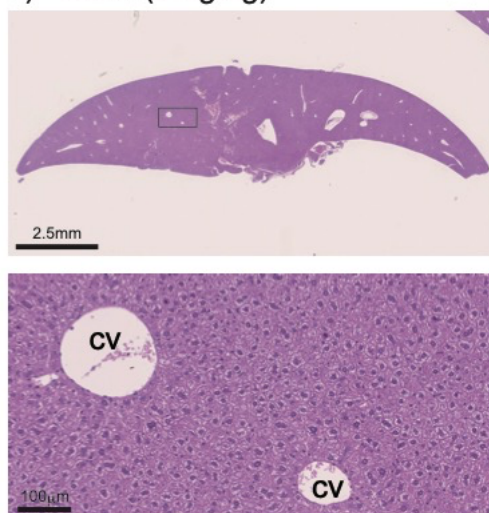


図 1 b) 四塩化炭素(7mg/kg)を投与し、24時間後のマウスの肝臓における H&E 染色像。上の写真の四角部分を下の写真で拡大している。中心静脈(cv)と周囲の肝細胞は正常な組織構造を示している。CV: 中央静脈

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) CCl<sub>4</sub> (70mg/kg)

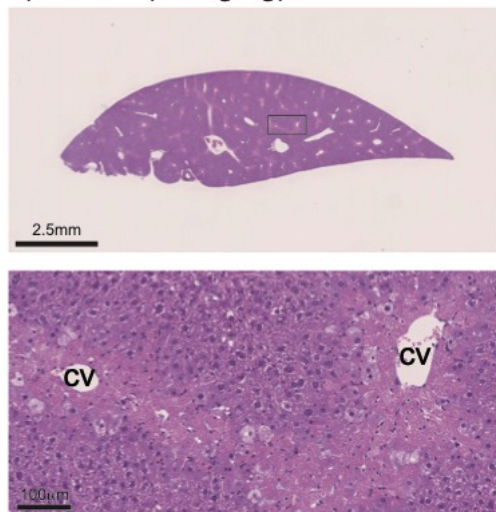


図 1c) 四塩化炭素 (70mg/kg) を投与し、24 時間後のマウスの肝臓における H&E 染色像。上の写真の四角部分を下の写真で拡大している。中心静脈 (cv) 周囲の肝細胞が空胞化し、ネクローシスを起こしている。CV: 中央静脈

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 CCl<sub>4</sub> 増加した。

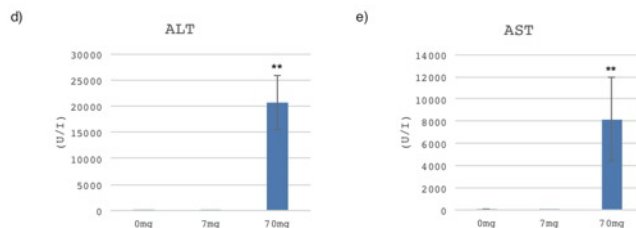


図 1 d, e) 0 mg/kg、7 mg / kg、70 mg / kg の四塩化炭素を経口投与したマウスの血清中の ALT (d) および AST (e) を表している。

結果として、CCl<sub>4</sub> 投与の結果の血清生化学分析および組織学は、70 mg / kg の CCl<sub>4</sub> 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)。

図 2 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

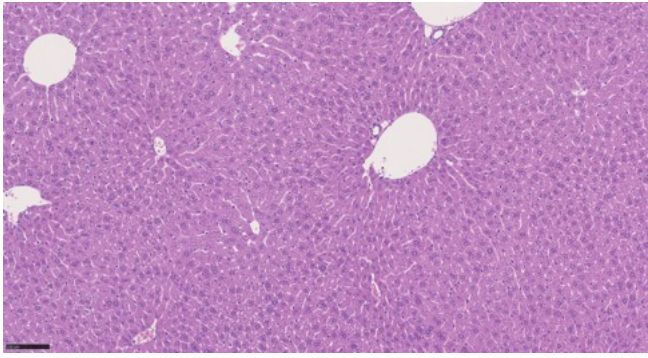


図 2 b) ベンゾトリアゾール (CAS#3846-71-7) 投与後 24時間後の肝臓の H & E 染色像

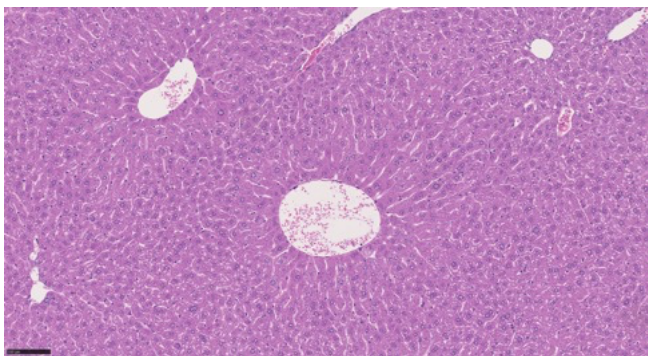


図 2 c) ベンゾトリアゾール (CAS#3846-71-7) 投与後 96時間後の肝臓の H & E 染色像

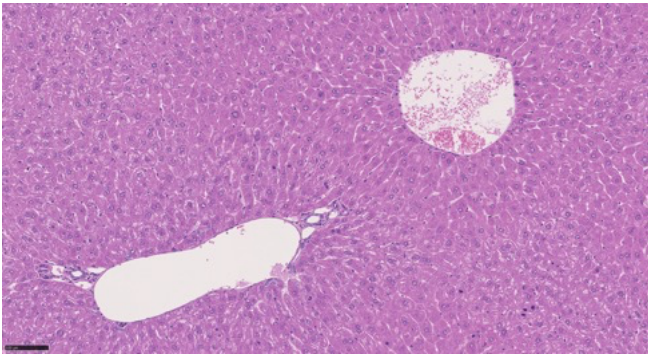


図 2 d) ベンゾトリアゾール (CAS#3846-71-7) 投与後 168時間後の肝臓の H & E 染色像



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。

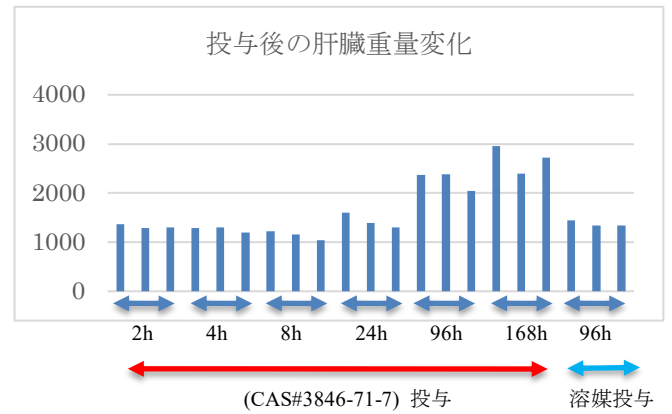


図 3

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	+	++

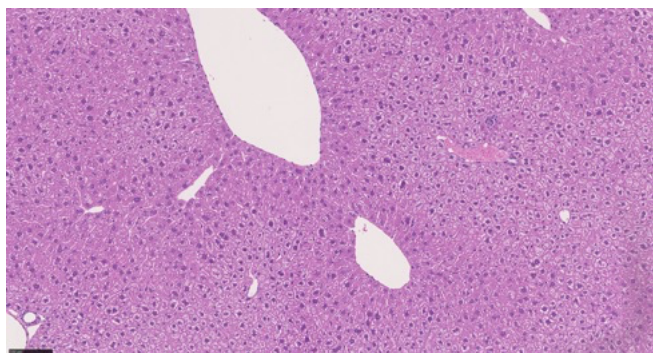
図 4

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。

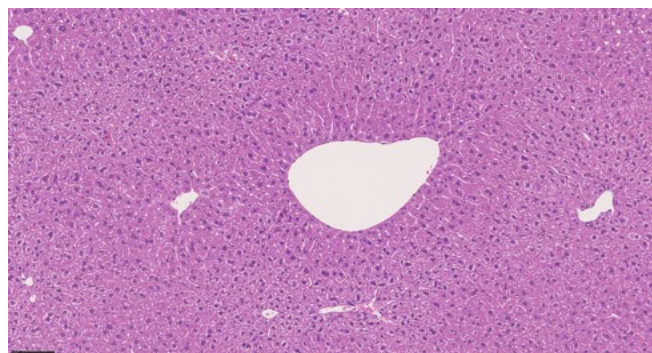
図 5 ベンゾトリアゾール (CAS#2440-22-4) 投与後 24 時間後の肝臓の H & E 染色像



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)。

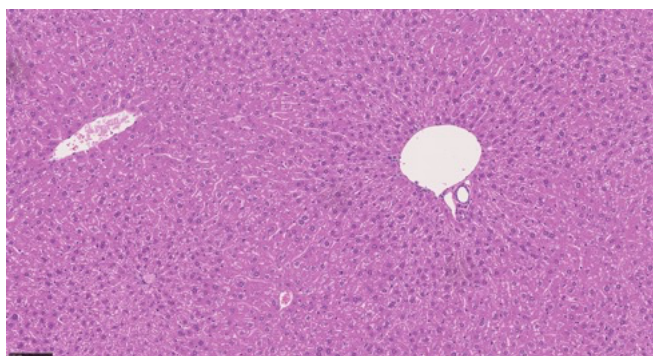
図 7 ベンゾトリアゾール (CAS#70321-86-7)投与後 24 時間後の肝臓の H & E 染色像



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組織病理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組織病理所見のまとめ

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	-	+	-	-

## 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臓障害のバイオマーカーとして42個の新規 miRNA を報告した。

本研究分担として、これらの四塩化炭素を投与したマウスの肝臓における病理組織解析および、血液生化学検査を行い、血液中のエクソソーム RNA を毒性バイオマーカーとして利用することが、非常に有効であることの証明することに成功した。

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肝臓の病理組織解析を行うことで、ベンゾトリアゾール類の毒性を明らかにすることができ、このことは、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上で有用になる。

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滴からの超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年度および令和元年度研究で得られた化学物質投与実験を行った

マウス肝臓（コーンオイル、四塩化炭素、ベンゾトリアゾール類4種類）における病理組織解析を行なった。

また、コーンオイルおよび四塩化炭素投与を行ったマウスに関しては、血液生化学検査も行った。

その結果、四塩化炭素投与実験においては、病理組織学検査および血液生化学検査で肝臓障害が見られる濃度（70mg/kg）では、新たに単離に成功した毒性バイオマーカーとなるエクソソーム RNA の発現が誘導されるが、病理組織学検査および血液生化学検査で肝臓障害が見られない濃度（7mg/kg）では、毒性バイオマーカーとなるエクソソーム RNA が誘導されない結果を得た。このことから、新たに開発した次世代型毒性評価法は、正しく機能していることが証明できた。

また、ベンゾトリアゾール類4種類を投与したマウス肝臓における病理組織解析を行ない、病理所見のないもの（2種類）、hypertrophy および mitosis 細胞の増加（1種類）、肝細胞の空胞化（1種類）という結果を得ている。

同じベンゾトリアゾール類の間でも、毒性発現の違いがあることから、今後の解析により、これらの毒性発現の違いを表す毒性バイオマーカーの単離を行う予定である。

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