厚生労働化学研究費補助金

化学物質リスク事業研究事業

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~令和2年度 総合研究報告書

研究代表者 小野 竜一

令和3(2021)年 3月

Г

目、次	
I. 総合研究報告	
血液中の核酸をバイオマーカーに用いた	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	37

I. 総合研究報告書

(H30-化学-一般-002) 総合研究報告書

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 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した。

平成 30 年度(初年度)は、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 単離方法の検証を行なった。

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ールを採用するに到った。

令和元年度においては、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最適化プロトコールの作成を行なった。

令和2年度(最終年度)では、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42個単離したことを報告するに 至った (**Ono R.** et al., *Toxicology Reports* 2020)。

さらに、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して、エクソソー

ム中の small RNA の網羅的スクリーニングを行い、1318 個の新規バイオマーカー候補を得た。

また、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のエクソソーム RNA の次世代シーケンスによる網羅的遺伝子発現解析を行い、ベンゾトリアゾール類5種 類のそれぞれに特異的なバイオマーカー候補となる476個の新規 small RNA の単離に成功 した。さらに、これらを含むエクソソーム RNA の網羅的発現データをクラスタリングす ると、ベンゾトリアゾール5種類を2群に層別できることを明らかにした。これらの層別 化の結果は、病理所見における肝臓障害の有無によって層別化されたと考えられる。

このことから、今回、四塩化炭素およびベンゾトリアゾールばく露により生じた肝臓障害 をエクソソーム RNA を指標とした次世代型安全性評価法により、迅速かつ高感度に毒性 を見出すことに成功した。

各種化学物質の毒性データが集積されることに伴い、これらを利用した血液1滴からの高 感度かつ迅速な毒性予測が実現できる。また、長期反復毒性試験の大幅な短期化にも貢献 することが期待される。

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 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
- 来形麻樹子 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

(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。

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、エクソソーム RNA をバ イオマーカーとした有害性評価の結果と病理所見を 比較検証することで、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べ 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。

<u>・化学物質の投与実験と採血方法の検証:</u>

国立医薬品食品衛生研究所・動物室において C57BL6J マウス(3、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)phen -ol (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。)

また、血液の凝固促進剤、血清、血餅の分離材が入った市販の血清分離専用チューブ(以降、血清分離専 用チューブ)による血清採取の比較検討も行った。マ ウス血液を血清分離専用チューブに入れ、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 単離の最適化

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 エスタンブロッティングにより、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。

<u>・定量的 PCR による次世代シーケンス結果のバリデ</u> <u>ーション</u>

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 x 10⁶ – 5.0 x 10⁰ 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。

<u>・生化学検査</u>:

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。

シグナルパスウェイの単離においては、マイクロア レイやメタボロミクス、プロテオミクス、RNA-Seq などの実験より得られたデータをもとにして生物学 的な機能の解釈やパスウェイ解析を行うことができ る Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Tommy Digital Biology 社)を利用した解析をベンゾトリアゾール類 のばく露をした肝臓におけるトキシコゲノミクスデ ータに対して行なっている。

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-1:採血方法の検証(採血:小野、検証:落谷)(H30):

平成30年度(初年度)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(血清分離専用 チューブ)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)



Orbital sinus (eye)

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 な差はなかったので、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 μl (N=12)、方法②の 場合、血清量は 376 μl (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 倍多くの粒子を血清分離専用チュー ブ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。



- 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 血清分離専用チューブ 3 眼採血 通常チューブ
- 4 眼採血 血清分離専用チューブ

その結果、方法①の方が、方法②(血清分離専用チューブを使用)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、血清分離専用チューブを使用した場合は、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: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 ♂ 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:

User Lines:

Fitted Curve : Completed Tracks:

Drift Velocity:

Size Distribution:

Mean: 85 nm, Mode: 57 nm, SD: 39 nm D10: 47, D50: 73, D90: 132, D70: 99 Cumulative Data (nm): 0 nm, 0 nm Total Concentration: 22.69 particles / frame, 1.96E8 particles / ml Selected Concentration: 0.00 particles / frame, 0.00E8 particles / ml Mean: 0 nm, SD: 0 961 495 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)

④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、① 67nm②18nm③57nm④36nm 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。

C-3: <u>マウス血液からのエクソソーム RNA 単離の</u> 標準化(小野)(H30):

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:サイズセレ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、 サイズセレクションマシーン (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:サイズセレ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-4: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)(R1):

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、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。

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 xG, 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。

 認 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。

<u>C-5:化学物質の投与実験(小野、平林)(H30-R1):</u>

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)の投与実験実験を行なった。

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。

ベンゾトリアゾール類5種類の分子構造は、以下の通 りである。

(2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phe nol

(CAS:3846-71-7)



2,4-di-tert-butyl-6-(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)phen

ol

(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)



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-6:四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 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。



C−7: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 <u>−</u>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、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

义

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(µl)



义

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。

<u>C-8:病理組織学検査と生化学検査(平林):</u>

平成30年度、令和元年度、令和2年度研究において、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、腎臓のホロ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-8-1:四塩化炭素投与

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



図 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 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(下図 c)。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 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(下図 d)とAST(下図 e)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 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、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-8-2: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 (下図 a, 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 (下図 a, 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 (下図 c)。また、Mitosis 細胞の増加 が見られた (下図 c)。また、Mitosis 細胞の増加 が見られた (下図 c)。また、Mitosis 細胞の増加 がえらに見られた (下図 d)。



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



8時間後 24時間後 96時間後 168時間後 2時間後 4時間後 肝臟重量 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 $^{++}$ +

义

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

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。



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 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ーシス像は全 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。

C-8-3: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。門脈周囲の肝細胞が空胞化を 起こしている。

C-8-5:<u>ベンゾトリアゾール (CAS#70321-86-7) 投</u> <u>与</u>

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 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



図 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-8-4:<u>ベンゾトリアゾール (CAS#3864-99-1) 投</u> <u>与</u>

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。

C-8-6:<u>ベンゾトリアゾール (CAS#3147-75-9) 投</u> <u>与</u>

ベンゾトリアゾール (CAS#3147-75-9) 投与群 (1000 mg / kg) の H&E 染色像では、ベンゾトリアゾール (CAS#3147-75-9) 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 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



図 ベンゾトリアゾール (CAS#3147-75-9)投与後 24 時間後の肝臓の H&E 染色像

C−8−8: ベンゾトリアゾール 類5種類の投与後2 4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4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3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。

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- trimethylpenta n-2-yl)phenol
肝臟重量	+	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし
hypertrophy	+	-	-	-	-
Mitosis 細胞	+	-	-	-	-
細胞の空胞化	-	+	-	-	-

図 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 C-9:四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、落 谷):

C-9-1:四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~令和2年度にかけて、現在、miRbase (http://mirbase.org) に報告されているマウスの microRNA 2110 個(令和元年時点)に関して網羅的 遺伝子発現解析を詳細に行ない、学術論文を報告す るに至った (Ono R. et al., Toxicology Reports 2020)。

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 では全く誘導がかから 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 ガシ、70mg/kg Processed Signal 3 と比較し、2倍以上 明らかにした。

CCL4 0







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的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 4 個の 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
$mm_1 - miR = 6240$	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 miP_676_3p	5 767312941	0.002546729
$mmu = m_{LR} = 0.70 - 3p$	28 52101857	0.002340723
$mmu = m_{LR} - 343 - 5p$	20.J21J10J7	0.002031023
	N.A.	0.003074075
mmu = mir = 203D = 3D	11.01012340	0.003213303
mmu - mir - 2ia - 5p	10 1/000/01	0.003/30011
mmu-mik-iuib-sp	10.14000491	0.004090045
mmu-mik-183-5p	31.10021919	0.004545205
mmu-m1R-455-5p	N.A.	0.004689289
mmu-mik-29a-3p	14.18293213	0.004851941
mmu-miR-330-3p	6.900663431	0.005282091
mmu-m1R-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	0.00/34/95/
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 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。

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。 <u>・定量的 PCR による次世代シーケンス結果のバリデ</u> <u>ーション</u>

ここで得られた次世代シーケンスによる遺伝子発現 解析結果が、実際の遺伝子発現を反映しているのかを 検証するために、定量的 PCR (qRT-PCR) 解析により、 バリデーションを行なった。





図 四塩化炭素投与により誘導されるエクソソーム RNA の中で、miR-122-5p および miR192-5p に関して、同 ーサンプルを使用した、定量 PCR および次世代シーケ ンスによる遺伝子発現解析結果の比較検討を行った。 絶対定量による miR-122-5p (a) および miR192-5p (b) の遺伝子発現の定量結果。次世代シーケンスのデータ から計算された miR-122-5p (c) および miR192-5p (d) の遺伝子発現量。(有意差 (P-value) **P < 0.001, *P < 0.01 vs. コントロール)。

その結果、上図の様に、次世代シーケンスによる遺伝 子発現解析結果が、実際の遺伝子発現を反映している ことがわかった。

C-9-2: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5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-9-1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、下図のように、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 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 コーンオイル、四塩化灰素 (/mg/kg、/0mg/kg)、ヘ ンゾトリアゾール4種類のばく露後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 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 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種類のみのばく露によって誘 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 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#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 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 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 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 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)。

令和2年度においては、四塩化炭素ばく露により 誘導されるエクソソーム中の small RNA の網羅的単 離を行なった。その結果、1318 個の新規バイオマー カー候補の単離に至った。これらの small RNA は、 非常に高感度な四塩化炭素ばく露によるバイオマー カーとなっている。

さらに、ベンゾトリアゾール(CAS#3147-75-9)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。 その結果、総計 477 個の small RNA がベンゾトリア ゾール類に特異的なバイオマーカー候補として単離 された。このうち、1 個は、既知の miRNA である miRNA-301 であった。

その他の466 個は、新規の small RNA であった。ベ ンゾトリアゾール類5 種類の結果を比較すると、下 図の様に、ベンゾトリアゾール(CAS#3846-71-7)とベ ンゾトリアゾール(CAS#2440-22-4)の単回投与時に 遺伝子発現が誘導されるエクソソーム RNA は、非常 に共通性が高く、ベンゾトリアゾール (CAS#70321-86-7)、ベンゾトリアゾール (CAS#3147-75-9)、および、ベンゾトリアゾール (CAS#3864-99-1)の単回投与時に遺伝子発現が誘導 されるエクソソーム RNA にも非常に共通性が高い ことが明らかになった。

この結果は、エクソソーム RNA のクラスタリング の結果からも明らかになっている。



図 ベンゾトリアゾール類5種類のエクソソーム RNA の発 現データのクラスタリングを行なった。その結果、ベンゾト リアゾール類の第一群、および第二群に層別化されるこ とが判明した。



図 ベンゾトリアゾール類5種類のマウスへの投与によ り誘導されるエクソソーム RNA のリストを比較した棒グラ フ。 C−10: 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 <u>ローチ</u>(広瀬):

C-10-1: <u>ベンゾトリアゾール類の投与により肝臓</u> 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24 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 recptor: 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。

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- trimethylpenta n-2-yl)phenol
	Up probesets	5480	150	3230	370	250
	AhR-Cyp1*	0	0	0	0	0
Transcriptomic	CAR-Cyp2*	100	0	50	0	40
(*semiquantitati ve relative	SXR/PXR- Cyp3*	100	0	80	0	0
degree of	PPAR-Cyp4*	100	0	100	30	40
induction)	Nrf2-phase II enzymes*	100	10	50	5	0
	Nrf2/Keap1*	100	0	80	0	0

図 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-10-2:<u>ベンゾトリアゾール類の投与により発現</u> 誘導される small RNA 遺伝子発現パスウェイの同 <u>定</u>:

令和2年度において、ベンゾトリアゾール (CAS#3147-75-9)の単回投与に特異的でエクソソーム RNAのスクリーニングを終え、さらに、ベンゾトリ アゾール類5種類のばく露実験において、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 c-4-2項 で行なった。その結果より、ベンゾトリアゾール (CAS#3846-71-7)とベンゾトリアゾール (CAS#2440-22-4)の単回投与時に遺伝子発現が誘導さ れるエクソソーム RNAは、非常に共通性が高く、ベ ンゾトリアゾール(CAS#70321-86-7)、ベンゾトリアゾ ール(CAS#3147-75-9)、および、ベンゾトリアゾール (CAS#3864-99-1)の単回投与時に遺伝子発現が誘導さ れるエクソソーム RNA にも非常に共通性が高いこと が明らかになっている。

すなわち、ベンゾトリアゾール類5種類は、エクソ ソーム中の small RNA をバイオマーカーとして層別 化することによって、以下の2群に分けることが可 能となった。

第一群 ベンゾトリアゾール(CAS#3846-71-7) ベンゾトリアゾール(CAS#2440-22-4)

第二群 ベンゾトリアゾール(CAS#70321-86-7) ベンゾトリアゾール(CAS#3147-75-9) ベンゾトリアゾール(CAS#3864-99-1)

図 ベンゾトリアゾールのばく露に伴い誘導されるバイオ マーカーで層別化すると、第一群と第二群に分けること ができる。

肝臓での病理所見では、第一群のみ、肝臓における 異常が見られ、第二群では、肝臓における異常所見は 見られていない。このようなことから、第一群に属す る 371 個のエクソソーム中の small おける特異的なバ イオマーカーは、ベンゾトリアゾール類ばく露による 肝臓障害の鋭敏なバイオマーカーになっている可能 性がある。

また、 の毒性 に障害が	ベンゾトリ ³⁸⁴⁶⁻⁷¹⁻⁷ 式験(<u>CEP</u>) 24benzotriazol-2-y)4,6- ジ見(y)metro/る。	アゾール 2440,224 のデータ 2-(benzotriazol-2- yl)-4-methylphenol	類のラッ 3864-99-1 2,~di dent botyl-65 (5-chloro-2H- benzotriazol-2- yl)phenol	ノトへの 70321-86-7 マ-(benz04/1320/2- yl)-4,6-bis(2- phenylpropan-2- yl)phenol	反復投与 3147-75-9 动enzotr醫職 yl)4(2,4,4 trimethypentan2- yl)phenol
肝臓障害 (<u>木研究)</u>	+	+	-	-	
、GLAデー大主 ー・ファート友を終	に、第一群	と第三群	のベンン	バトリア	ゾールで
は、病理	里組織学的に	こ違いが有	存在して	いる。	

++

+++ +++

يد يد يد

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
Experimental result (GLP)	NOAEL-0.1 mg/kg bw/day (0.0003 mm/kg/day) Liver; weight increase, hypertrophy of hepatocyte (0.5 mg/kg bw/day in male), (0.5 mg/kg bw/day in male), cystic degeneration and hepatoce-liular foci (0.5 mg/kg bw/day in male), cystic degeneration and hepatocyte (2.5 mg/kg bw/day in male) Hematological effects (0.5 mg/kg bw/day in male), Rats, 0.0.1.0.5, 2.5 mg/kg bw/day (male), 0.0.5, 2.5, 12.5 mg/kg bw/day (Hirata-Koizumi et al., 2008) [key study]	NOEL= <30 mg/kg bw/day (-0.133 mmol/kg bw/day (-0.133 mmol/kg bw/day) Liver; weight increase, hypertrophy of hepatocyte (30 mg/kg bw/day in female), bw/day in female), bw/day in female), dogeneration in regeneration in proximal tubules (100 mg/kg bw/day, 10 mg/kg bw/day, Rats, 0, 30, 100, 300 mg/kg bw/day, Rats,	NOEL=2.5 mg/kg bw/day (0.007 mmol/kg/day) Alb, A/G ratio increase (25 mg/kg bw/day in male), Livor; weight bw/day in male), Rats, bw/day in male), Bw/day in male), Bw/day in male), Bw/day in male), Bw/day in male), Bw/day in male), Bw/day in male), Bw/	NOAEL-50 ppm (ca. 2.5 mg/kg bw/day) (c.0056 mmOl/kg bw/day), female), 300 ppm (ca. 15 mg/kg bw/day (0.0336 mmOl/kg bw/day), male) Liver; weight increase, hypetrophy and/or cy/toplasmic Vacuelation of hepatocyte (2000 ppm in memale), Rats, 0, 50, 300, 2000, Beaster et al., 1987)	No data
Experimental result (GLP)	NOAEL=<0.5 mg/kg bw/day (0.0015 mm/kg/day) Liver; vacuolar degeneration, hypetrophy of hepatocyte, bile duct periferation (0.5 mg/kg bw/day in male), focal necrosis (2.5 mg/kg bw/day in male) Hematological effects (2.5 mg/kg bw/day in male, Heart; degeneration and hypetrophy of myocardium and call infitration (0.5 mg/kg bw/day in male and 12.5 mg/kg bw/day in male and Kidney; hypetrophy of hubular optimelium (0.2.5 mg/kg bw/day in male and female). Thyroid; follicular cell bw/day, in anale and female), Rats, 0, 0.5, 2.5, 1.2.5, 6.2.5 mg/kg bw/day, Gavage (Hirtat-Aciazumi et al., 2007) [key study]	No data	No data	No data	No data

図 GLP 試験で既に報告されているラットにおける反復 投与によるベンゾトリアゾール類5種類の毒性所見のま とめ。

次に、ベンゾトリアゾール類ばく露により、肝臓において活性化した主要な異物代謝に関連するシグナル パスウェイの肝臓におけるマイクロアレイデータ (C-5-1項で示した)の probe set の数から判断するの は困難であった。

そこで、マイクロアレイやメタボロミクス、プロテ オミクス、RNA-Seq などの実験より得られたデータ をもとにして生物学的な機能の解釈やパスウェイ解 析を行うことができる Ingenuity Pathways Analysis (IPA) 解析を肝臓におけるトキシコゲノミクスデー タに対して行なった。 その結果、ベンゾトリアゾール類の第二群は、肝臓 で非常に強い PPARA 活性を示しており、PPARA シグ ナルパスウェイをバイオマーカーが反映している可 能性がある。

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- trimethylpenta n-2-yl)phenol
RICTOR	+++		+++		
CD 437	+++		+++		
NFE2L2	+++	+	+++	+	
MYC	+++		+++		
MYCN	+++		+++		
PPARA	++		+++	+++	+++

図 ベンゾトリアゾール類5種類のマウスへの投与により 誘導される遺伝子群に関して、IPA 解析を行なった結果 のまとめ。

1x10-11~1x10-20:+ 1x10-21~1x10-30:++ 1x10-31~ :+++ (赤色でマーク)

D. 考察

ヒトにおいては、血液一滴からのエクソソーム RNA や血液中のマイクロ RNA をバイオマーカーとした高 感度ながん診断が進み、13種類のがんを90%以上 の精度で診断可能になってきている。

その一方、動物モデルを利用した報告は、ヒトに比 べて、その報告数は少なく、エクソソームの単離や、 エクソソーム RNA の精製の最適化プロトコールが定 まっていない状況であった。

平成30年度研究(3年計画の1年目)においては、 マウスからの血液採取の最適化、血清採取の最適化、 エクソソーム単離の最適化、およびエクソソーム RNA単離および解析の最適化条件の検証を行った。

令和元年度(3年計画の2年目)においては、平成 30年度の結果をふまえて、エクソソーム RNAの単 離および解析の最適化プロトコールの作成に成功した。

この最適化プロトコールを利用して、肝臓障害の陽 性コントロール物質である四塩化炭素を投与したマ ウス、および、その溶媒コントロールであるコーンオ イルを投与したマウスのエクソソーム RNA を次世代 シーケンスによる網羅的遺伝子発現解析を行なった。

最初に、ここで得られた次世代シーケンスによる遺 伝子発現解析結果が、定量 PCR による絶対定量結果 と同等の結果が得られたことから、次世代シーケンス による遺伝子発現解析の定量性が高いことを明らか にした。

次に、次世代シーケンスより得られたデータの詳細 を解析した結果、四塩化炭素による肝障害のバイオマ ーカー候補として42個の新規 miRNA を単離する ことに成功した。

最終年度である令和2年度研究では、令和元年度研 究までにより得られた解析結果、すなわち、本研究課 題で作成したエクソソーム単離と解析の最適化プロ トコールと、四塩化炭素による肝障害のバイオマーカ ー候補として42個の新規 miRNA を学術論文とし て報告するに至った (Ono R. et al., *Toxicology Reports* 2020)。

新たに開発した最適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。このことからも、 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、四塩化炭素による肝障害のバイオマーカー 候補として 1318 個の新規 エクソソーム small RNA を報告した。これらの small RNA は、バイオマーカー として非常に感度が高く、現在までに用いられてきた miRNA よりも数が多く、より良いバイオマーカーで あると言える。

また、平成30年度には、ベンゾトリアゾール類1 種類の投与実験を行い、令和元年度において、ベン ゾトリアゾール類4種類の投与実験を行なうことで、 本研究計画におけるベンゾトリアゾール類5種類の 化学物質の投与実験を修了している。

これらの投与実験においては、投与されたマウスの 採血を行うと同時に、腎臓および肝臓の病理学的解 析を行った。血液サンプルからは、血清を抽出し、 エクソソーム解析、および、血清生化学解析を行っ た。

ベンゾトリアゾール類5種類を投与したマウスの 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、総計 477 個の small RNA がベ ンゾトリアゾール類に特異的なバイオマーカー候補 として単離された。

このうち、1 個は、既知の miRNA である miRNA-301 であった。

その他の466 個は、新規の small RNA であった。ベ ンゾトリアゾール類5種類のエクソソーム RNA の 網羅的発現データをクラスタリングすることにより、 第一群と第二群に層別化することができた。

今回、エクソソーム RNA の遺伝子発現データのク ラスタリングにより、ベンゾトリアゾールを第一群 と第二群に層別化できたのだが、これらは、ベンゾ トリアゾール類のばく露実験によって見られた肝臓 における病理所見と一致していた。

第一群でのみ肝臓で障害が確認され、第二群では 病理所見が確認されなかった。

このことから、ベンゾトリアゾールによる肝臓障害 のバイオマーカーである可能性が高い。ただし、四 塩化炭素による肝障害のマーカーとは重複が少ない ことから、肝障害を起こす機序に違いがあると考え られる。

また、ベンゾトリアゾール類のラットへの反復投与 の毒性試験(GLP)のデータでは、第一群のみ、腎臓 に障害が見られる。今回のばく露実験は、単回投与で あることで、腎臓に病理所見は見られなかったのだが、 本来、反復投与で生じる腎臓障害を単回投与にて検出 できた可能性もあると考えられる。 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。ベンンゾトリアゾールの第二 群は、IPA 解析より、PPARA シグナルパスウェイが 活性化していることを明らかにした。よって、化学物 質投与により活性化したシグナルパスウェイを反映 するエクソソーム RNA をバイオマーカーとすること で検出できると考えられる。また、第一群、および第 二群においても、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。

本研究課題の3年間の計画は、計画通りに順調に進 捗し、血液1滴からの高感度かつ迅速な次世代型毒性 評価法の最適化プロトコールの確立に成功した。さら に、ベンゾトリアゾール類5種類を投与したマウスの 解析より、エクソソーム RNA を毒性指標とした毒性 予測評価が可能であることが示された。

今後は、既知の毒性の知られた化学物質のばく露実験 のデータなどの集積を行うことで、毒性を予測評価の 精度が大幅に向上することが想定される。 本研究は、計画通りに進捗した。

平成30年度研究(3年計画の1年目)研究におい て、マウスにおける採血方法、血清の抽出方法、エク ソソームの収集方法、エクソソーム RNAの単離方法、 およびエクソソーム RNAの網羅的遺伝子発現解析方 法の検証を行い、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を行な い、令和元年度研究(3年計画の2年目)において、 エクソソーム RNA を毒性指標とした次世代型毒性評 価法の最適化プロトコールの作成に成功した。

令和2年度には、この最適化プロトコールを学術論 文として報告した (**Ono R.** et al., *Toxicology Reports* 2020)。

この最適化化プロトコールを利用することで、四塩 化炭素ばく露による肝臓障害の新規バイオマーカー として、エクソソーム中に含まれる miRNA を42個 報告した (**Ono R.** et al., *Toxicology Reports* 2020)。

これらのバイオマーカーは、既知の肝臓障害のバイ オマーカーである miR-122 や miR-192 と同様な反 応を示し、有力なバイオマーカー候補である。

さらに、miRNA としての報告はない、未知の small RNA をバイオマーカーとして利用できるかの検討を 行なった結果、1318 個の新規 エクソソーム small RNA の単離に成功した。

これらのバイオマーカーを利用して、次世代シーケンス、もしくは定量 PCR を行うことで、高感度かつ迅速な毒性評価を可能にした。

さらに、令和2年度においてはベンゾトリアゾール 5種類の投与実験における病理組織学的解析および エクソソーム RNA の網羅的遺伝子発現解析を行なっ 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3種類に共 通するバイオマーカー、2種類に共通するバイオマー カー、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。

これらの結果から、ベンゾトリアゾール類は、2群 に分けることが可能になった。第一群は、ベンゾトリ アゾール投与による肝臓障害のバイオマーカーとな っており、第二群は、ベンゾトリアゾール類ばく露に よって活性化された PPARA 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。 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 積に大きく貢献すると考えられる。

<u>※本研究費補助金によって主に行われた論文、著書、</u> 学会発表には〇印を付けている。

1. 論文発表(抜粋)

(平成31年度)

Ryuichi Ono & Shihori Tanabe

The gene and microRNA networks of stem cells and reprogramming

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

Igarashi, T., Takashima, H., Takabe, M., Suzuki, H., Ushida, K., Kawamura, T., Matsumoto, M. Iso T, Tanabe S, Inoue K, Ono A, Yamada T, <u>Hirose A</u>. 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, <u>Hirose A.</u> 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., <u>Hirose,</u> <u>A.</u>

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, <u>Ochiya T</u>, 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, <u>Ochiya T.</u> 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 encapusulated 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, <u>Ochiya T.</u> 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, <u>Ochiya T.</u> 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, <u>Ochiya T.</u> CD44 exerts a functional role during EMT induction in cisplatin-resistant head and neck cancer cells. *Oncotarget.* 2018

O* <u>Ono R.</u>, YasuhikoY., 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

(令和元年度)

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、田村幸太朗、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

O <u>Ryuichi Ono</u> & 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, R alda G, Zhai P, Tong M, Byun J, Tang F, Einaga Y, Huang CY, Kashihara T, Zhao M, Nah J, Tian B, <u>Hirabayashi Y</u>, Yodoi J, Sadoshima J.

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

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

Matsumoto M, Iso T, Igarashi T, Tanabe S, Inoue K, <u>Hirose A.</u>

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

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

(令和2年度)

O<u>*Ono R</u>, Yoshioka Y, Furukawa Y, Naruse M, Kuwagata M, Ochiya T, Kitajima S, Hirabayashi Y. Novel hepatotoxicity biomarkers of extracellular vesicle (EV)-associated miRNAs induced by CCl4. *Toxicology Reports* 2020 May 29;7:685-692.

* corresponding author

Tanabe S, Quader S, <u>Ono R</u>, Cabral H, Aoyagi K, Hirose A, Yokozaki H, Sasaki H.

Molecular Network Profiling in Intestinal- and Diffuse-Type Gastric Cancer

Cancers (Basel). 2020 Dec 18;12(12):3833.

Tanabe S, Quader S, Cabral H, Ono R.

Interplay of EMT and CSC in Cancer and the Potential Therapeutic Strategies.

Frontiers in Pharmacology 2020 Jun 17;11:904. doi: 10.3389/fphar.2020.00904. eCollection 2020.

2. 学会発表(抜粋)

(平成31年度)

(1) <u>Hirose, A.</u>, 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., <u>Hirose, A.</u> Evaluation of QSAR models for daphnia and fish chronic toxicities of human pharmaceuticals. SETAC Europe 28th Annual Meeting (May 2018 Rome, Italy)

(3) <u>Ryuichi Ono</u>, Yukuto Yasuhiko, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and <u>Yoko Hirabayashi</u> 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, <u>平林 容子</u> 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、相﨑健一、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) <u>平林容子</u>: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, <u>Ono R</u>, <u>Hirabayashi Y</u>, 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) <u>Ryuichi Ono</u>, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Satoshi Kitajima, <u>Takahiro Ochiya</u>, <u>Yoko Hirabayashi</u>

Standardization of exosome isolation in mice corresponding to toxicity test Japanese Society of Extracellular Vesicles Conference 2018 (2018.8.30.),

(9) <u>Ryuichi Ono</u>, Keiko Tano, Satoshi Yasuda, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Yoji Sato and <u>Yoko Hirabayashi</u>

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, <u>Ryuichi Ono</u>, 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., <u>Hirose, A.</u> 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)

(令和元年度)

<u>小野竜一</u>、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.)

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

<u>Ryuichi Ono</u>, 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

O **<u>Ryuichi Ono</u>**, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and <u>Yoko Hirabayashi</u> 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

〇小野竜一

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)

〇<u>小野竜一</u>

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)

O 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) O <u>Ryuichi Ono</u>, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and <u>Yoko Hirabayashi</u>

Horizontal gene transfer mediated by exosomes: a possible new risk for genome editing

Keystone Symposia Conference: Engineering the Genome (Feburuary 2020, Banff, Canada)

O <u>Ryuichi Ono</u>, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, <u>Takahiro Ochiya</u>, Satoshi Kitajima, <u>Yoko Hirabayashi</u> 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, <u>山田 隆志</u>, <u>広瀬 明彦</u> 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, <u>広瀬</u> <u>明彦</u> 食品用器具・容器包装材料のポジティブリスト化に向

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)

<u>田邊思帆里</u>,青柳一彦, Sabina Quader, Horacio Cabral, <u>小野竜一</u>,<u>広瀬明彦</u>,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

<u>田邊思帆里</u>, 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)

<u>田邊思帆里</u>,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)

<u>田邊思帆里</u>,青柳一彦, Sabina Quader, <u>小野竜一</u>, <u>広</u> <u>瀬明彦</u>,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

<u>田邊思帆里</u>, Sabina Quader, 小野竜一, 青柳一彦, <u>広</u>

<u>瀬明彦</u>, 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, <u>Ryuichi Ono</u>, Kazuhiko Aoyagi, <u>Akihiko Hirose</u>, Hiroshi Yokozaki, Hiroki Sasaki MOLECULAR NETWORK PATHWAY MECHANISM IN DRUG RESISTANCE, CANCER AND STEM CELLS ISSCR (International Society for Stem Cell Research) 2019 Annual Meeting 2019.6.28

(令和2年度)

<u>小野竜一</u> ゲノム編集におけるオンターゲットリスクと遺伝子 水平伝搬 第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29.) (シンポジウムオーガナイザー)

<u>小野竜一</u>、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純 化学物質の反復投与によるゲノムワイドなヒストン 修飾の変化 第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.30.) (招待講演)

〇小野竜一

エクソソーム中の miRNA をバイオマーカーとしたリ キッドバイオプシー 第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.7.1.) (招待講演)

O<u>Ryuichi Ono</u>

Identification of novel EV-associated miRNAs as toxic biomarkers in mouse International Society for Extracellular Vesicles annual meeting 2020 (2020.7.22.)

小野竜一

哺乳類のレトロトランスポゾン研究から解き明かす 多様な生命機能 第 92 回日本遺伝学会学術年会 (2020.9.17.) (招待講演)

〇<u>小野竜一</u>

エクソソーム中の miRNA をバイオマーカーとした毒 性評価法の開発 第7回日本細胞外小胞学会学術年会 (2020.10.26.)

小野竜一

A novel risk for genome editing 南米毒性学会学術年会 2020 (2020.11.19.) (招待講演)

〇<u>小野竜一</u>

EV-mediated horizontal gene transfer 第 43 回日本分子生物学会学術年会 (2020.12.2.) (招待講演)

G. 知的所有権の取得状況

- 1. 特許取得 なし
- 実用新案登録 なし
- 3. その他
 - なし

Ⅱ.研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

	v.,	-	L
2.41	F	=-	_
*	÷.	D I	` ۸
1.1		H.1	-

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ryuichi Ono & Sh ihori Tanabe	The gene and microRN A networks of stem cell s and reprogramming (r eview)	AIMS Cell and Tissue Engine ering	2(4)	238-245	2018
Igarashi T, Seriza wa H, Kobayashi K, Suzuki H, Mat sumoto M, Iso T, Kawamura T, Ino ue K, Ono A, Yam ada T, Hirose A.	Initial hazard assessmen t of 4-benzylphenol, a st ructural analog of bisph enol F: Genotoxicity test s in vitro and a 28-day repeated-dose toxicity st udy in rats.	Regul. Toxicol. Pharmacol.	96	64-75	2018
Igarashi, T., Taka shima, H., Takab e, M., Suzuki, H., Ushida, K., Kaw amura, T., Matsu moto, M. Iso T, T anabe 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/development al toxicity screening test is rats.	Regul. Toxicol. Pharmacol.	100	105-117	2018
Ryuichi Ono, Yuk uto Yasuhiko, Ken ichi Aisaki, Satosh i Kitajima, Jun K anno, and Yoko H irabayashi	Exosome-mediated horizo ntal gene transfer occur s in double-strand break repair during genome e diting	Communication s Biology	Feb 8;2	57	2019

Matsumoto M, Iso T, Igarashi T, Ta nabe S, Inoue K, <u>Hirose A.</u>	Summary information of human health hazard as sessment of existing che mical substances(V).	Bull. Natl Ins t. Haelth Sci.	137	66-72	2019
<u>Ono R</u> , Yoshioka Y, Furukawa Y, Naruse M, Kuwa gata M, Ochiya T, Kitajima S, Hi rabayashi Y.	Novel hepatotoxicity bi omarkers of extracellula r vesicle (EV)-associate d miRNAs induced by CCl4.	Toxicology Re ports	May 29;7:	685-692	2020
<u>Tanabe S,</u> Quader S, Cabral H, <u>On</u> <u>o R</u> .	Interplay of EMT and CSC in Cancer and the Potential Therapeutic S trategies.	Front Pharma col.	Jun 17;11:	904	2020
<u>Tanabe S</u> , Quader S, <u>Ono R</u> , Cabra l H, Aoyagi K, <u>H</u> irose A, Yokozaki H, Sasaki H.	Molecular Network Prof iling in Intestinal- and Diffuse-Type Gastric Ca ncer	<i>Cancers</i> (Base l)	Dec 18;12(1 2):	3833	2020