

別添1

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

エクソソームRNAを毒性指標とした次世代型
催奇形性評価法の開発に資する研究 (21KD1001)

令和3年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小野 竜一

令和4(2022)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

エクソソームRNAを毒性指標とした 次世代型催奇形性評価法の開発に資する研究 小野 竜一	----- 1
--	---------

II. 分担研究報告

1. 化学物質のばく露実験の実施 と研究と毒性予測評価 小野 竜一 落谷 孝広	----- 17
2. 妊娠母動物の毒性評価と 胎仔の催奇形性評価 桑形麻樹子	----- 29
3. オルガノイド由来エクソソーム による毒性評価 成瀬 美衣	----- 37
4. ノックアウトマウスの作製 伊川正人	----- 45
5. 化学物質ばく露影響の病理学的解析 平林 容子	----- 53

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 61
---------------------	----------

2 別添 3

I. 総括研究報告書

エクソソーム RNA を毒性指標とした
次世代型催奇形性評価法の開発に資する研究
(21KD1001)

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

科学技術の進展に伴い年々増加する新規化学物質の安全性確保は極めて重要な課題であり、それらの生体影響の評価には、毒性機序の解明が必須とされるが、特に、生殖発生毒性学の分野は他の毒性分野よりもメカニズム解析が遅れている。評価方法が経験値に依存する由縁でもある。

我々は、これまでに、細胞間情報伝達の1つとして細胞から分泌される小胞であるエクソソーム中に含まれる RNA を指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2 年度）において行い、成獣雄マウスに対して、血液1滴から全身の病理組織学的診断を検出する高感度な系の確立に成功している (**Ono R.** et al., *Toxicology Reports* 2020)。

本研究においては、エクソソーム RNA を腹単位の毒性指標とする次世代型催奇形性評価法の開発を行うことで、これまでの経験重視に依存していた催奇形性の評価をメカニズムに基づいた安全性評価にステップアップし、リスク評価時に常に一定の判断基準による評価が可能となることで、催奇形性作用を持つ化合物の迅速化、高感度化した評価が期待される。

特に、胎児の正常な発生に必須なマイクロ RNA の存在が明らかになり、さらに、マイクロ RNA が催奇形性に寄与している報告もされていることから、本研究により、催奇形性に寄与するエクソソーム中のマイクロ RNA を明らかにすることは、催奇形性のメカニズムの解明に大きく貢献する。

また、エクソソーム RNA を毒性指標とする評価法を催奇形性評価だけでなく、オルガノイド 3D 培養法を利用した代替法への応用も視野に入れた本研究は、生殖発生毒性評価、エクソソーム RNA といった新たなバイオマーカー評価およびオルガノイド 3D 培養による in vitro 評価を融合させた計画となっている。

3年計画の初年度にあたる R3 年度の進捗は以下の通りである。

- (1) マウスの正常な発生・発達段階に特異的に誘導されるエクソソーム RNA の同定、雌雄に特異的なエクソソーム RNA の同定、妊娠の有無に特異的なエクソソーム RNA の同定に成功した。
- (2) 遺伝子改変動物をモデル動物として利用することにより、自己免疫疾患における炎症反応に特異的なエクソソーム RNA の同定に成功した。
- (3) 化学物質投与により催奇形性を発現する動物実験の条件検討を行った。
- (4) 化学物質投与をすることなく胎児に形態形成異常を引き起こす遺伝子改変マウスの導入および作製にも成功した。
- (5) オルガノイド 3D 培養法を利用した代替法の検討のために、マウスの肺、肝臓、大腸よりオルガノイドの樹立することに成功した。

令和3年度研究（3年計画の1年目）は、計画通りに進捗している。

研究分担者

桑形麻樹子	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・室長
成瀬美衣	国立がん研究センター 安全性生物試験研究センター 研究所・動物実験施設・研究員
伊川正人	大阪大学 微生物病研究所 動物実験施設・教授
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
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
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
江森 千紘	大阪大学 微生物病研究所 動物実験施設・助教
Yonggang Lu	大阪大学 微生物病研究所 動物実験施設・特任助教

A. 研究目的

化学物質の有害性評価、特に化審法におけるヒト健康影響に関する有害性において、化学物質の生殖発生への影響を迅速かつ正確に評価することは最重要課題の一つである。現行の生殖発生毒性試験法は、莫大な費用、時間や労力以外に、観察者の経験に依存する部分や、得られる判定基準が必ずしも施設間で一定とは言えない部分がある。

その内の1つである胚・胎児発生に関する試験（発生毒性試験）では、母毒性評価とともに胎児形態観察（外表、内臓および骨格観察）から催奇形性を評価する。その際に、腹内・腹間の感受性に差がある中で、形態変化を異常か変異に分類し、その発現率から催奇形性を判断する事は困難な場合がある。

近年、細胞間情報伝達の1つとして、細胞から分泌される小胞であるエクソソームが注目されている。エクソソームは体液中（血液、髄液など）を循環し、細胞特異的なマイクロRNAを内包することから、研究分担者の東京医大・落谷らは、腫瘍細胞に特異的なマイクロRNAを指標にした、血液1滴による13種類の早期がん診断法（精度95%以上）を開発した経験を持つ。

我々は、エクソソームRNAを指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2年度）において行い、成獣雄マウスに対して、血液1滴から全身の病理組織学的診断を検出する高感度な系の確立に成功している（[Ono R. et al., Toxicology Reports 2020](#)）。

本研究は、これまでの実績、経験を活かし、エクソソームRNAを指標にした次世代型の催奇形性評価法の確立と催奇形性の発現メカニズムの解明を目的とする。

エクソソーム中に多く内包されることが知られるマイクロRNAが催奇形性に寄与している報告もことから、本研究の特徴は、エクソソームRNAを指標することで、リスク評価時に常に一定の判断基準による評価が可能な次世代型催奇形性評価法を開発すると同時に、生殖発生毒性のメカニズムの解明にも繋がることである。

また、エクソソームRNAを毒性指標とした動物実験に依存しないオルガノイド3D培養法を利用した次世代型代替法の開発も視野に入れている。オルガノイドは、臓器を構成する能力を持った未分化な組織幹・前駆細胞が、3D培養環境の中で、形態形成過程の特徴を模倣してミニ臓器が形成されるものであり、発生期の模倣モデルとして、化学物質や薬物による毒性影響の評価にも適用できると考えられる。本研

究計画においては、まずは、オルガノイド由来のエクソソームにおいても毒性評価が可能かを明らかにすることを目的としている。動物福祉(3Rs)の観点による代替法への応用を考慮した取組の一環である。具体的には、オルガノイドの培養上清中のエクソソームが *in vivo* のエクソソームと同様に毒性バイオマーカーとなりうるのかの検証を行う。

B. 研究方法

本研究においては、毒性発現メカニズムを考慮した次世代型の生殖発生毒性評価法を確立することを目的に、以下の概要を行う。

● エクソソーム RNA を腹単位の毒性指標とする次世代型催奇形性評価法を開発するために、妊娠マウスに既知の催奇形性化合物を経口投与し、胎児に発現する形態変化から毒性指標となるエクソソーム RNA の同定を次世代シーケンス解析により行う。

● 本研究で同定された催奇形性のバイオマーカーとなるエクソソーム RNA のノックアウトマウスおよび過剰発現マウスを作製することで、催奇形性の発現メカニズムを解明する。

● *in vivo* の特性を高度に保存した *in vitro* モデルとされるオルガノイド 3D 培養法の培養上清中に細胞より分泌されるエクソソームを毒性指標として利用可能かを検討し、動物実験によらない次世代型代替法の開発を行う。

これらに加えて、対象マウス個体の一般的な毒性評価を行うことで、現行の生殖毒性評価と本研究で開発する次世代型生殖毒性評価法の比較を行う。

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においては、化学物質のマウスへの投与実験および採血および胎児観察(桑形)、化学物質の用量設定実験および病理組織学的検査・生化学検査(平林)、エクソソームの抽出およびエクソソーム RNA の次世代シーケンサーによる網羅的解析(小野)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、催奇形性のバイオマーカー候補の探索およびその詳細の解析(落谷)を行い、大阪大学・微生物病研究所(伊川)においては、本研究において得られる発生ステージに特異的なマイクロ RNA の変異マウスの作製、および催奇形性解析に適したモデルマウスの作製(伊川)を行う。また、国立がん研究センター(成瀬)においては、毒性バイオマーカーであるエクソソーム RNA が、オルガノイド 3D 培養上清中に細胞より分泌されるエクソソームにおい

ても毒性指標となるのかを検討する。

・発生ステージに特異的なエクソソーム RNA の同定

国立医薬品食品衛生研究所・動物室において C57BL6/J ♂および♀(8週齢、12週齢、24ヶ月齢など)および、発生毒性を検出するために重要なポイントである(1)妊娠初期(着床直後、妊娠9日)、(2)妊娠中期(口蓋閉鎖時、妊娠15日)、(3)妊娠末期(帝王切開時、妊娠18日)(4)非妊娠の母体血および羊水中のエクソソーム RNA の網羅的遺伝子発現プロファイルを次世代シーケンスにより決定する。

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。

・マウス血液からのエクソソーム RNA 単離

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、国立医薬品食品衛生研究所および東京医科大学・分子細胞治療研究部門においてエクソソームの単離を行う。具体的には、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ト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、エクソソーム単離効率の評価を行う。

・マウスを用いたバルプロ酸ナトリウム経口投与による母動物血清中並びに胎児及びその附属物中エクソソームの解析のための試料採取法

1.使用動物

動物種：マウス (SPF)

系統：C57BL/6J

供給源：日本チャールス・リバー株式会社

匹数：7匹(妊娠15日)

2.帝王切開

妊娠15日相当日(膣栓確認日=妊娠0日)の午前中にイソフルランにて母動物を吸入麻酔後、採血(採血候補部位：心採血あるいは腹大動脈)した。

着床の有無により妊娠の成否を確認した。

妊娠が認められた母動物は卵巣および子宮を摘出し、子宮壁を切開後、左右子宮角の着床数を確認した。

卵黄囊膜に覆われた状態で胚及び胎盤を摘出し、各子宮内容物ごとくに卵黄囊膜、羊水、胚、胎盤を評価できる試料採取法を検討した。

3. マウス血漿および子宮内容物(卵黄囊膜、羊水、胚、胎盤)のバルプロ酸ナトリウム濃度測定

上記、2.にて得られた無処置妊娠マウス血漿および妊娠15日の子宮内容物中のバルプロ酸ナトリウム

濃度測定のために、LC-MS/MSによる簡易バリデーション試験を実施した。

なお、分析は株式会社ボゾリサーチセンターつくば研究所に委託した。

測定対象物質：バルプロ酸
標準物質：valproic acid sodium salt
ロット番号：WXBD4552V
塩換算係数：0.8677 (=144.21/166.19)
内標準物質：Diclofenac sodium salt
ロット番号：P7E3B

・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、Qiazol 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 および国立医薬品食品衛生研究所の共通機器である Illumina 社 Nextseq2000 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。

・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 で臓器・器官の固定を行う。常法に従って、パラフィンブロック標本を作製し、薄切を行い、hematoxylin and eosin (H&E) 染色を行う。病理組織学的検査結果とエクソソーム RNA の解析の結果の比較を行い、エクソソーム RNA をバイオマーカーとした次世代有害性評価法の有効性を検証する。

・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。

・遺伝子改変マウスを利用した発生異常および形態形成異常に特異的なバイオマーカーの単離

発生ステージに特異的なマイクロ RNA の変異マウスの作製、および催奇形性解析に適したモデルマウスの作製を行う。遺伝子改変マウスの作製には、エレクトロポレーションによる CRISPR/Cas9 RNP 導入法を利用する。その手順は、以下の通りである。

ガイド(g) RNA の調整

crRNA 溶液 (100 μ M)、tracrRNA 溶液 (100 μ M)、を RNase free water により 10 μ M に希釈し、95°C で 1 分間インキュベート後に室温に 1 時間ほど静置。10 μ M の gRNA を OPTI-MEM で 200 ng/ μ l に希釈する。

エレクトロポレーション用の溶液の調整

・ Cas9 溶液(1 μ g/ μ l)	4 μ l
・ gRNA 溶液(200 ng/ μ l)	8 μ l
・ oligoDNA (2 μ g/ μ l)	4 μ l
・ OPTI-MEM	24 μ l

利用する tracrRNA および Cas9 タンパクは、以下を使用。

tracrRNA (Sigma)
cat no. TRACRRA05N

Cas9 (Thermo Fisher Scientific)
TrueCut Cas9 Protein V2
cat no. A36497 (25 µg)

37°Cで 5 分間インキュベート後に oligoDNA (ssODN or dsDNA, final: 200 ng/µl)を添加し、Nepagene 製エレクトロポレーターにて、マウス受精卵にエレクトロポレーションを行う。エレクトロポレーションの設定値は、以下の通りである。

(上段 : Poring Pulse, 下段 : Transfer Pulse)

項目 : Voltage [V], Pulse Length [msec], Pulse Interval [msec], Number of pulses, Decay Rate [%]

上段 : 225 V、2 msec、50 msec、4 pulses、10 rate、+

下段 : 20 V、50 msec、50 msec、5 pulses、40 rate、+

/-

・ オルガノイドの培養上清中に含まれるエクソソーム RNA をバイオマーカーに用いた代替法の検討

C57BL6/J ♂マウス (5 週齢) および F1 (C57BL6/J ♂ x JF1) (5 週齢) マウスを解剖し、肝臓、肺、大腸を採取する。これらをハサミにて 1mm 角に刻み、PBS にて洗浄後に collagenase 処理を行う。その後 40 µm セルストレーナーを通し、酵素的および物理的に組織を破碎した後、MBOC (Matrigel Bilayer Organoid Culture) 法を用いて細胞をマトリゲルに包埋し、各臓器毎の至適培地を添加し培養を行った。

(倫理面の配慮)

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の配慮を十分行い、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

・次世代型催奇形性試験法の確立に向けた動物実験系の高度化 (桑形)

1. 帝王切開

本研究における妊娠期エクソソーム解析は妊娠9日、妊娠15日および妊娠18日を予定している。

研究代表者の先行研究により妊娠15日のエクソソーム解析予備データがあることから、今年度は妊娠15日にて試料を採取した。

2日間にわたり、解剖を実施した。7例いずれも妊娠していた。

2. 母動物採血

麻酔後、心採血および腹大動脈からの採血を試みたが、薬物動態を調べることから血液成分を一定にするために腹大動脈から採血することにした。

ヘパリンNa入りの1mLシリンジにて採血し、1.5 mLチューブに採取して、1000Gにて3分間、遠心し、血漿を分離した。血漿はタンパク低吸着の1.5 mLチューブにいれ、-80°Cの冷凍庫に保管した。

3. 子宮内容物の採取

着床位置に合わせて子宮内容物番号をふり、PBS入り滅菌シャーレ (110x10 mm) 中にて子宮壁を両鈍眼科ハサミおよび先鋭ピンセットにて子宮広間膜側を切開し、1個体ずつ子宮壁から先曲がりピンセット (NO.7) を用いて子宮壁から剥離させ、PBS入りのペトリディッシュ (35 x10 mm, sterile, Falcon) にいれた。

PBSが入っていない別のペトリディッシュ内で卵黄囊膜の一部マクロスプリング剪刀にて切れ込みをいれ、250 μ Lのエップンドルフチューブを卵黄囊内に挿入し、羊水を採取した。

羊水採取後、卵黄囊膜を切開し、胚、卵黄囊膜および胎盤に分け、それぞれ2.5 mLのポリプロピレンチューブに入れた。

なお、全てのチューブは試料保管前に重量を測定し、試料保管後に再度重量を測定し、その差を求めて試料重量として記録した。

4. マウス血漿および子宮内容物 (卵黄囊膜、羊水、胚、胎盤) のバルプロ酸ナトリウム濃度測定法の分析バリデーション

血漿、羊水、胚、胎盤、卵黄囊膜の検量線の各濃度 (血漿、羊水: 1.00~2.00 μ g/mL、胎児、胎盤、卵黄囊膜: 2.00~4.00 μ g/mL) における真度はそれぞれ、92.5~114.0%、94.5~105.0%、93.5~110%、88.0~105.5%及び85.7~114.5%となり、いずれも判定基準を満たした。従って、検量線の直線性は良好であると判断した。

バリデーション項目 (選択性、検量線の直線性) が判定基準を満たしたため、本測定法はマウス血漿、羊水: 1.00~2.00 μ g/mL、子宮内容物: 2.00~4.00 μ g/mLの範囲にてバルプロ酸濃度測定に適用できると判断した。

・発生ステージに特異的なエクソソーム RNA の同定 (小野、落谷)

催奇形性のバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA を単離するにあたり、背景データとして、発生ステージおよび性別に特異的なエクソソーム

RNA の同定を試みた。最初に、C57BL6/J σ および ρ (8週齢、12週齢、24ヶ月齢など) および、発生毒性を検出するために重要なポイントである (1)妊娠初期 (着床直後、妊娠9日)、(2)妊娠中期 (口蓋閉鎖時、妊娠15日)、(3)妊娠末期 (帝王切開時、妊娠18日) (4)非妊娠の母体血の採取を行った。

現在までに、C57BL6/J σ (8週齢、12週齢、24ヶ月齢) の血清より収集したエクソソーム中の small RNA の網羅的遺伝子発現プロファイルを次世代シーケンスにより決定した。

尚、2003年に創設された世界的な遺伝子発現解析プロジェクトである ENCODE (ENCyclopedia of DNA Elements) において、次世代シーケンスによる遺伝子発現解析方法についてガイドライン (ENCODE Guidelines and Best Practices for RNA-Seq) が示されている。ガイドラインでは、次世代シーケンスによる遺伝子発現解析は、解析精度および再現性が高いためにテクニカルレプリケート (同一検体による再現性/測定誤差の検討) は行わず、解析個体数を増やすこと (生物学的レプリケート) が推奨されている。本研究においても、このガイドラインに従い、各群 n=3~5、個体毎に単回測定としている。

8週齢、24ヶ月齢を比較し、有意差 $P<0.05$ かつ、read 数が100以上のものをスクリーニングすることで、総計63個の発達特異的なエクソソーム RNA の単離に成功した。

下図にあるように、Csn1a1 (casein kinase 1, alpha 1) 遺伝子中の small RNA は、老齢 (24ヶ月齢) に特異的な発現を示した。一方、Krt18 (keratin 18) 遺伝子中の small RNA は、年齢に依存して発現が上昇している。これらの small RNA は、発現量が非常に高く、老齢バイオマーカーとしての利用が期待される。

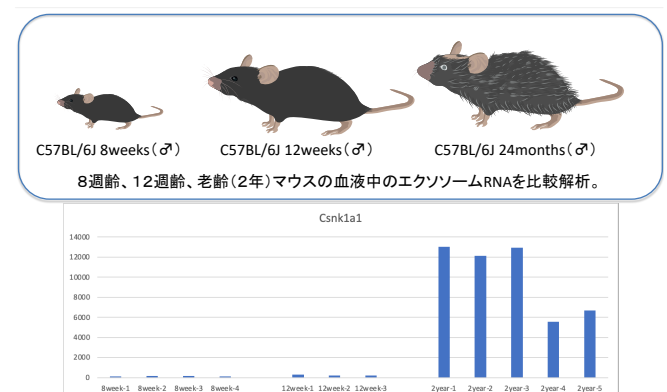


図: 8週齢 (左)、12週齢 (中央)、24ヶ月齢 (右) マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数): Csn1a1 (casein kinase 1, alpha 1) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

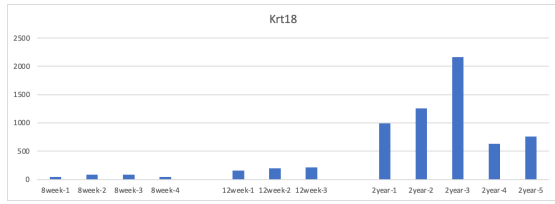
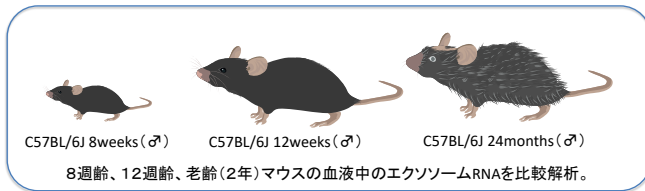


図: 8週齢(左)、12週齢(中央)、24ヶ月齢(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Krt18 (keratin 18) 遺伝子中に存在する新規 small RNA

また、Myo1d (myosin ID) 遺伝子および Syne1 (spectrin repeat containing, nuclear envelope 1) 遺伝子中に存在するエクソソーム RNA は、若齢期に特異的な遺伝子発現を示す。遺伝子発現量も非常に高いことから、若齢期特異的なバイオマーカーとしての利用が期待できる。

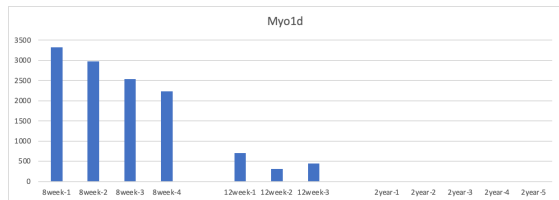
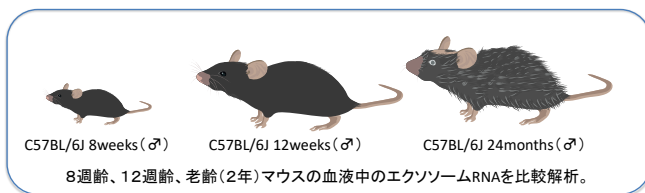


図: 8週齢(左)、12週齢(中央)、24ヶ月齢(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Myo1d (myosin ID) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

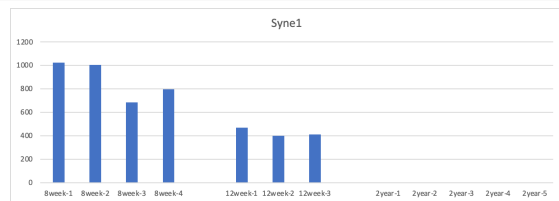
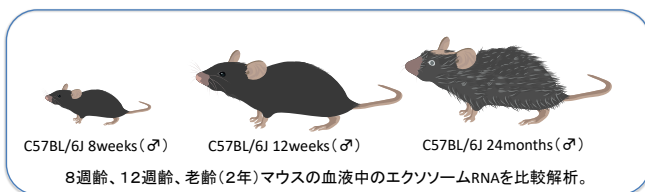


図: 8週齢(左)、12週齢(中央)、24ヶ月齢(右)マウ

スの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Syne1 (spectrin repeat containing, nuclear envelope 1) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

・性別に特異的なエクソソーム RNA の同定 (小野、落谷)

発生・発達ステージに特異的なエクソソーム RNA の同定に成功したことから、次に、性別に特異的なエクソソーム RNA の同定を行った。非妊娠♀および妊娠♀と8週齢♂マウス間におけるエクソソーム RNA の網羅的遺伝子発現解析結果を比較することにより性別特異的な発現を示す遺伝子群のスクリーニングを行った。

以下に、雄に特異的な遺伝子発現を示すエクソソーム RNA のうち、一例として、Emr1 (EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1) 遺伝子、Drap2 遺伝子中に存在する新規 small RNA の遺伝子発現解析プロファイルの結果を示す。

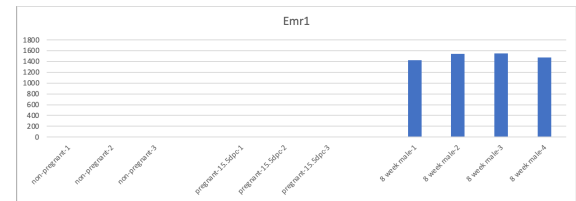
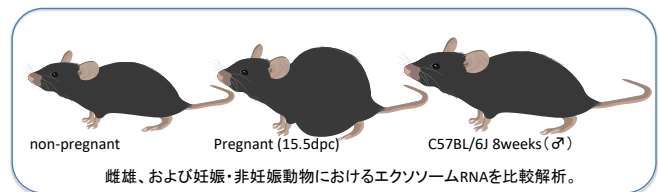


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Emr1 (EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

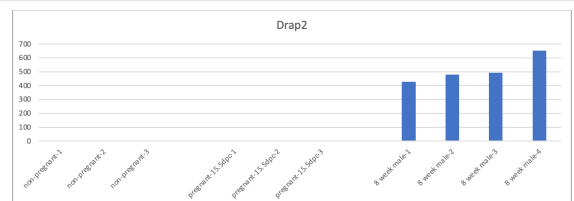
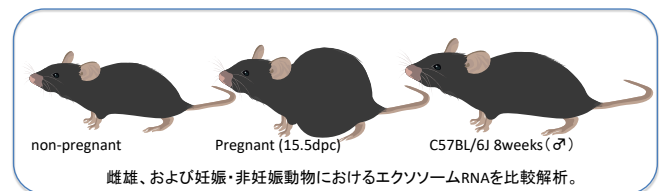


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比

較 (Y軸: read数) : Dpf3 (D4, zinc and double PHD fingers, family 3) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

次に、雌(妊娠中および非妊娠状態)において特異的に発現するエクソソーム RNA の同定を行った。単離された雌に特異的に発現しているエクソソーム中の small RNA の中で代表的なものを2個に関して、その詳細を以下に示す。

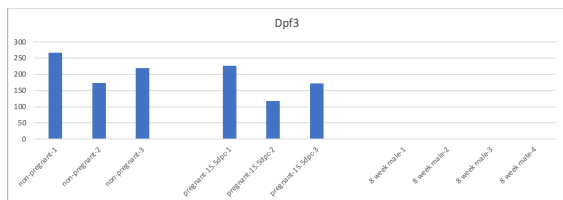


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Dpf3 (D4, zinc and double PHD fingers, family 3) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

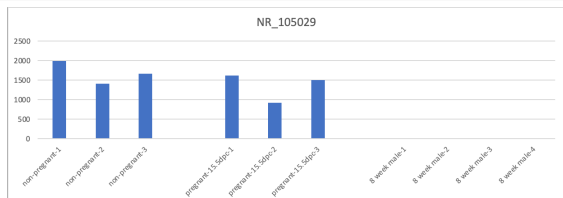
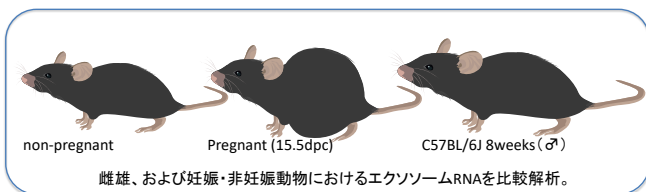


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : NR_105029 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

次に、雄および非妊娠状態の雌においては、遺伝子発現がないが、妊娠により、遺伝異子が誘導されるエクソソーム中の新規 small RNA のスクリーニングを行い、妊娠に特異的なバイオマーカーの単離に成功した。

これらの中で代表的なものを2個に関して、その詳細を以下に示す。

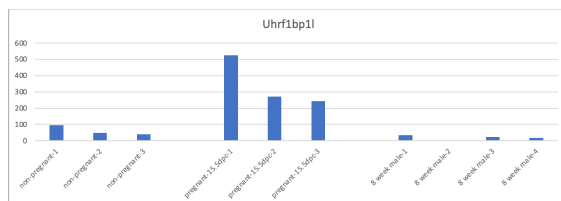
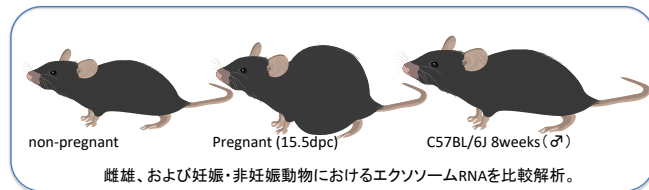


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : UHRF1 (ICBP90) binding protein 1-like 遺伝子中に存在する新規 small RNA

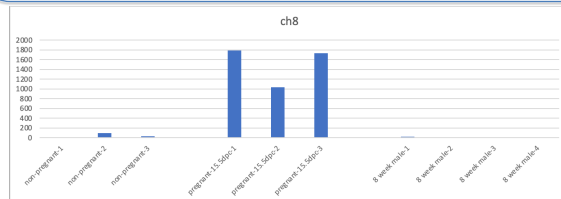
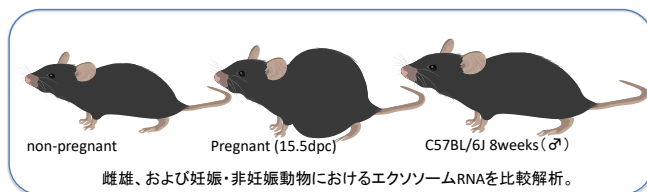


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : 8番染色体に位置する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

・炎症に特異的なエクソソーム RNA の同定 (小野、落谷、平林)

現在までに、エクソソーム RNA を発がんバイオマーカーの指標として利用した早期がん診断が行われ、さらに、我々は、化学物質投与による肝毒性評価の指標として、エクソソーム RNA を利用可能なことを証明してきた。本研究においては、催奇形性のバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の同定を目的としているが、成体における骨格異常や、発達障害などの各種障害のバイオマーカーとしても利用可能と考えられる。

そこで、様々な表現型を持つ遺伝子変異を、発達障害などのモデルとして利用することとした。最初に、自己免疫疾患マウスモデルとして知られる Irf2 欠損マウスに特異的なエクソソーム RNA が存在するのかの解析を行った。

同腹由来の6匹の雌（5ヶ月齢：野生型4匹、Irf2 hetero 1匹、Irf2 KO 1匹）の解剖を行い、肝臓および腎臓の病理解析、採血を行い、血液生化学検査およびエクソソームRNAの網羅的解析を行った。

Irf2 KO マウスにおいては、体重は野生型と変わらないが、肝臓が野生型の1.8倍、腎臓が1.5倍の重量があった。Irf2 KO マウスの肝臓における H&E 像では、肝細胞の壊死、および、肥大が確認された。また、野生型では見られない髄外造血像も確認された。肝臓の重量増加は、これらが原因であると考えられる。一方、腎臓における H&E 像では、野生型では、糸球体にしっかりと内皮細胞が確認され、毛細血管も正常な形態を維持しているが、Irf2 KO マウスの糸球体においては、正常な内皮細胞の欠落、および毛細血管の拡張が確認された。

このように、自己免疫疾患を起こすことにより、様々な病変を持つ Irf2 KO マウスに特異的なエクソソーム RNA を同定し、その詳細を解析することで、様々な病変に対するバイオマーカーの同定につながる。

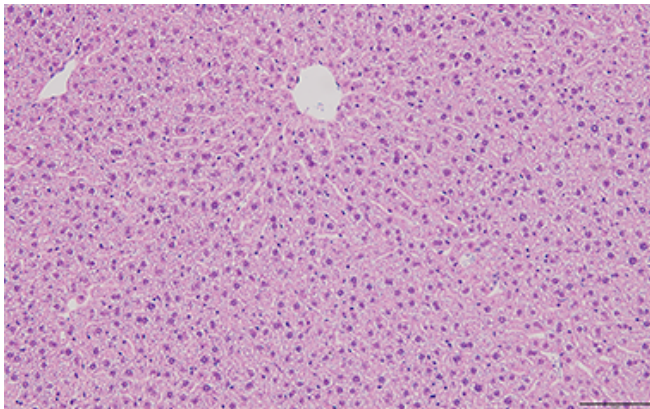


図: 野生型マウス（5ヶ月齢）の肝臓におけるH&E染色像。

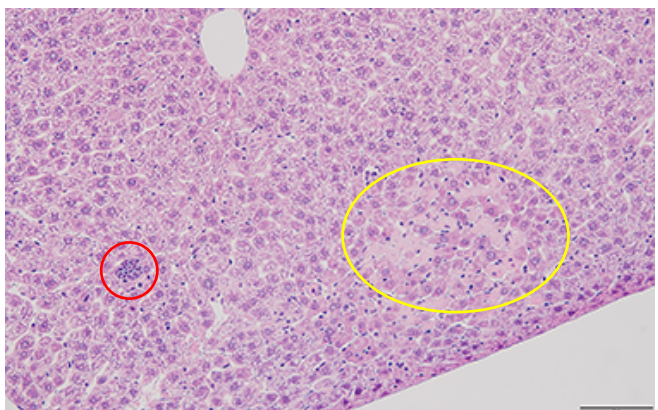


図: Irf2 KO マウス(5ヶ月齢)の肝臓におけるH&E染色像。野生型には見られていない髄外造血像(赤丸)、および肝細胞壊死(黄色丸)が確認された。

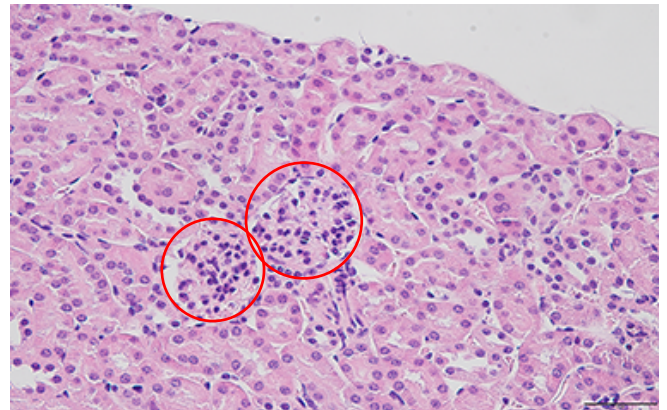


図: 野生型マウス（5ヶ月齢）の腎臓におけるH&E染色像。正常な糸球体像(赤丸)が確認できる。

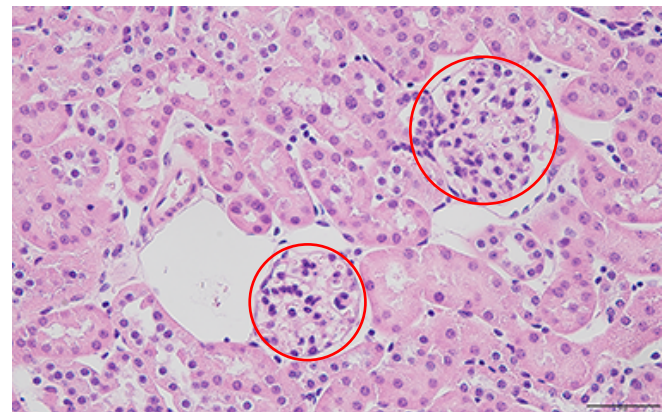


図: Irf2 KO マウス(5ヶ月齢)の腎臓におけるH&E染色像。内皮細胞を欠き、毛細血管が拡張した異常な糸球体像(赤丸)が確認できる。

・血液生化学（平林）

H&E 染色像の解析を行った、野生型、Irf2 hetero マウス、Irf2 KO マウスの血液を採取し、血清成分の抽出を行い、血液生化学解析を行った。

その結果、肝臓障害のマーカーである AST および ALT については、野生型と比較して高い値を示した。また、腎臓障害のマーカーである BUN および CRE については、BUN では変化がないが、CRE が高い値になっており、肝臓、腎臓ともに、病理切片から予想された通りに、野生型と比較して機能低下が確認された。

	AST(U/l)	ALT(U/l)	BUN(mg/dl)	CRE(mg/dl)
WT1	75	18	20.9	0.23
WT2	87	23	26.2	0.17
WT3	78	25	32.8	0.27
WT4	83	19	27.2	0.17
KO	127	74	24.9	0.70
hetero	52	25	27.8	0.19

図: 野生型、Irf2 KO マウスにおける血液生化学解析の結果

・炎症反応に特異的なエクソソーム RNA の網羅的スクリーニング (小野、落谷)

血液生化学に利用した血清の残りを利用して、超遠心ペレットダウン法にてエクソソームの抽出を行い、そこからエクソソーム RNA を精製後に、エクソソームRNAの次世代シーケンサーを利用した網羅的遺伝子発現解析を行った。

令和3年度においては、野生型においては発現がないが、Irf2 KO マウスのみで発現が誘導されているエクソソーム RNA の単離のみを行った。

マッピングされた次世代シーケンサーRead 数が10以上のものでは、103 個の small RNA が同定された。そのうち、発現量の多い上位 10 個について詳細な解析を行った。

現在、既知の miRNA のデータベースである miRbaseに報告されている既知のmiRNAは、マウスにおいて、1234 個であった。今回、Irf2 KO マウスにて発現誘導のあった small RNA 上位 10 個を RNA の二次元構造予測ツール (RNAfold) を用いて、ヘアピン構造をとり、miRNA としてプロセスされるかの検証を行った。このうちの一つは、既知の miRNA である miRNA206 であった。

これらの small RNA は全て、既知の遺伝子である Abtb2 (ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2)、Col4a2 (collagen, type IV, alpha 2)、Linc-md1 (long intergenic non-protein coding RNA of muscle differentiation 1)、および Rabgap11 (RAB GTPase activating protein 1-like) のイントロン中、もしくはエクソン中にマップされた small RNA である。二次元構造予測の結果を、下記に示した。

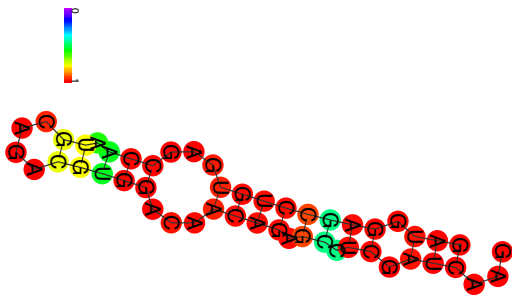


図: Abtb2 (ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2) 遺伝子中に存在する新規 small RNA の二次元構造予測

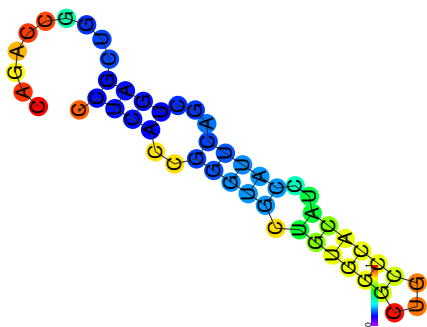


図: Col4a2 (collagen, type IV, alpha 2) 遺伝子中に存在する新規 small RNA の二次元構造予測

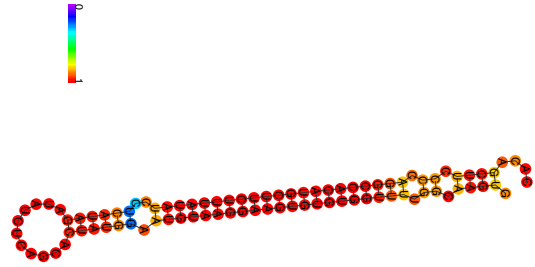


図: Linc-md1 (long intergenic non-protein coding RNA of muscle differentiation 1) 遺伝子中に存在するMir206の二次元構造予測

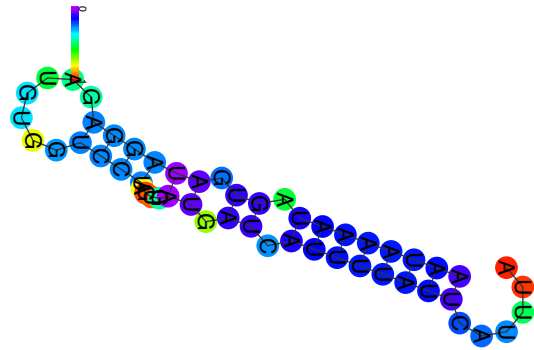


図: Rabgap11 (RAB GTPase activating protein 1-like) 遺伝子中に存在する新規 small RNA の二次元構造予測

・遺伝子改変動物作製による催奇形性モデルの作出 (伊川)

効率よく催奇形性を発現させるモデルを作出するために、遺伝子改変動物の導入および作出を行う。父性発現インプリンティング遺伝子 Peg10 および母性発現インプリンティング遺伝子 Mash2 は、胎盤形成に必須な遺伝子であり、その欠損マウスにおいては、胎盤形成不全により致死になることが報告されている。

これらの遺伝子は、インプリンティング遺伝子であるので、子宮内において、野生型:KO=1:1の比率で存在する。よって、効率よくKO個体を得ることができる特徴がある。

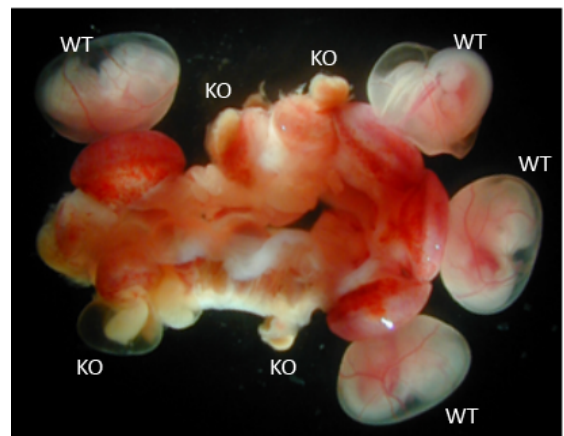


図: 野生型♀マウスとPeg10 KO マウスを交配し、受精後1日目での解剖像。野生型 (WT) と Peg10 欠損 (KO) の個体が 1:1 の比率で確認できる。

そこで、これらの遺伝子欠損マウスの導入および作出を行った。Mash2 欠損マウスについては、国立医薬品食品衛生研究所で既に維持していた系統を繁殖させ、催奇形性のモデルマウスとして利用する準備が完了した。Peg10 欠損マウスについては、大阪大学において、CRISPR/Cas9 システムを用いて、Peg10 欠損マウスの作製を行ない、1 匹の遺伝子改変動物を得られた。

また、エクソソーム RNA は、形態形成異常以外にも、Irf2 KO マウスの解析結果より、炎症反応などのバイオマーカーとなりうるものが本研究において明らかになったことから、胎児の代謝異常などの検出も可能になるかの検討を行うこととした。遺伝子欠損により体内の銅代謝異常が起こることが知られる Atp7b 遺伝子の変異マウスの作製を行い、複数のラインの Atp7b 変異マウスの作製に成功している。

Atp7b 遺伝子のエクソン 8 およびエクソン 11 をターゲットとして受精卵においてゲノム編集を行い、産まれた変異マウスのオンターゲット部位のゲノム編集結果を下記に示した。

マウス名前	雌雄	アレル 1	アレル 2
Atp7b-ex8-01	♂	8bp deletion	2bp insertion
Atp7b-ex8-02	♂	逆位挿入	
Atp7b-ex8-03	♂		
Atp7b-ex8-04	♂	2bp insertion	1bp insertion
Atp7b-ex8-12	♂	6bp deletion	
Atp7b-ex8-13	♂	Large deletion	
Atp7b-ex8-14	♂		
Atp7b-ex8-15	♂		
Atp7b-ex8-16	♂	1bp deletion	

図: Atp7b (ATPase Copper Transporting Beta) 遺伝子エクソン 8 に対するゲノム編集により産まれてきた雄マウスのジェノタイプ。空欄は、複雑なゲノム編集により、変異配列を特定できていない。

マウス名前	雌雄	アレル 1	アレル 2
Atp7b-ex8-05	♀	10bp deletion	3bp deletion
Atp7b-ex8-06	♀		
Atp7b-ex8-07	♀	10 bp deletion homo	
Atp7b-ex8-08	♀		1bp insertion
Atp7b-ex8-09	♀		
Atp7b-ex8-10	♀	10 bp deletion homo	
Atp7b-ex8-11	♀		
Atp7b-ex8-17	♀	5bp deletion	
Atp7b-ex8-18	♀	4bp insertion	
Atp7b-ex8-19	♀		
Atp7b-ex8-20	♀		
Atp7b-ex8-21	♀	4bp insertion	

図: Atp7b (ATPase Copper Transporting Beta) 遺伝子エクソン 8 に対するゲノム編集により産まれてきた雌マウスのジェノタイプ。空欄は、複雑なゲノム編集により、変異配列を特定できていない。

マウス名前	雌雄	アレル 1	アレル 2
Atp7b-ex11-01	♂	9bp insert homo CATTAAGCT	3bp deletion
Atp7b-ex11-02	♂	2bp deletion homo CC	
Atp7b-ex11-03	♂	1bp deletion homo CCC>TT	
Atp7b-ex11-04	♂	2bp insert homo CC	1bp insertion
Atp7b-ex11-05	♂	1bp deletion homo C	
Atp7b-ex11-12	♂		

図: Atp7b (ATPase Copper Transporting Beta) 遺伝子エクソン 11 に対するゲノム編集により産まれてきた雄マウスのジェノタイプ。空欄は、複雑なゲノム編集により、変異配列を特定できていない。

マウス名前	雌雄	アレル 1	アレル 2
Atp7b-ex11-06	♀	1bp deletion homo A	
Atp7b-ex11-07	♀	human type	
Atp7b-ex11-08	♀	2bp deletion	1bp insert C
Atp7b-ex11-09	♀	2bp deletion homo CC	
Atp7b-ex11-10	♀		
Atp7b-ex11-11	♀	1bp deletion	
Atp7b-ex11-13	♀		
Atp7b-ex11-14	♀	1bp deletion homo C	

図: Atp7b (ATPase Copper Transporting Beta) 遺伝子エクソン 11 に対するゲノム編集により産まれてきた雄マウスのジェノタイプ。空欄は、複雑なゲノム編集により、変異配列を特定できていない。

・オルガノイドの培養上清中に含まれるエクソソーム RNA をバイオマーカーに用いた代替法の検討 (成瀬)

近年開発されたオルガノイド 3D 培養法は、*in vivo* の特性を高度に保存した *in vitro* モデルとなっている。オルガノイドは、臓器を構成する能力を持った未分化な組織幹・前駆細胞が、3D 培養環境の中で、形態形成過程の特徴を模倣してミニ臓器が形成されるものであり、発生期の模倣モデルとして、化学物質や薬物による毒性影響の評価にも適用できるものと考えられる。本研究計画においては、まずは、オルガノイド由来のエクソソームにおいても毒性評価が可能かを明らかにする。

血液中のエクソソーム RNA を毒性指標とした我々の次世代型毒性評価法は、迅速かつ高感度に評価可能な方法になっている。しかしながら、動物愛護の

観点から、今後において、動物実験によらない毒性評価が必要となる可能性を考慮し、我々が既に単離している毒性バイオマーカーであるエクソソーム RNA が、オルガノイド 3D 培養上清中に細胞より分泌されるエクソソームにおいても毒性指標となるのかを検討を行う。

R3 年度においては、C57BL6/J ♂マウス (5 週齢) の肝臓、肺、大腸よりオルガノイドの作製を行った。具体的には、C57BL6/J ♂マウス (5 週齢) の解剖を行い、肝臓、肺、大腸の採取を行なった。全ての解剖用具は、乾熱滅菌済みのものを使用した。

大腸については、腸管を切開し、腸管の内容物を取り除く作業を行う。その後、肝臓、肺、大腸を PBS にて、3 回洗浄を行った。

当該臓器を滅菌消毒済みのハサミにて 1mm 角に刻み、PBS にて洗浄後に collagenase 処理を行った。その後に 40 μm 幅のセルストレーナーにて、フィルトレーションを行い、酵素的および物理的に組織を破砕した後に、MBOC (Matrigel Bilayer Organoid Culture) 法を用いて細胞をマトリゲルに包埋し、各臓器毎の至適培地を添加し培養を行った。

その後、数回のパッセージを経て、オルガノイド 3D 培養法を利用した代替法の検討のためのマウスの肺、肝臓、大腸由来のオルガノイドを樹立することに成功した。

樹立したオルガノイドは、以下の 3 種類である。

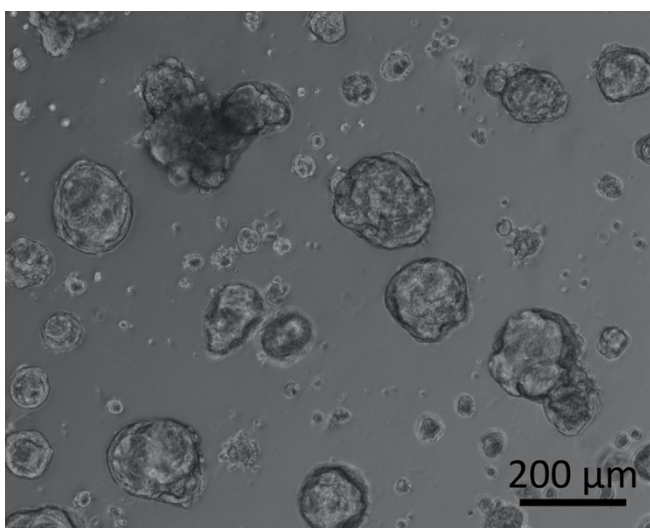


図: C57BL6/J の肺から樹立したオルガノイドの位相差顕微鏡像。(スケールバー=200 μm)

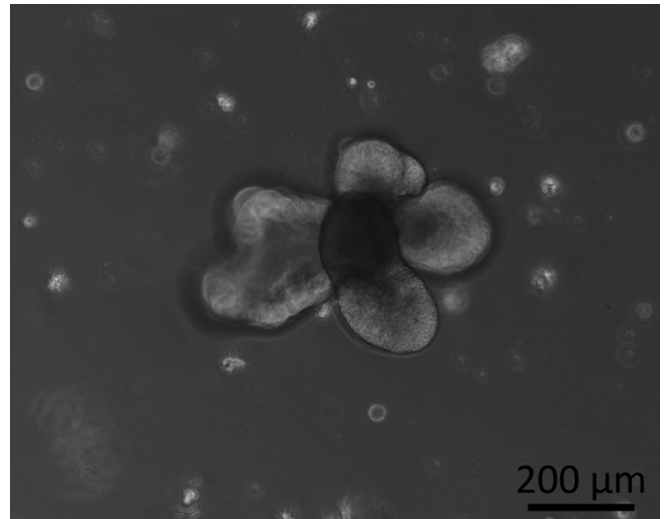


図: C57BL6/J の肝臓から樹立したオルガノイドの位相差顕微鏡像。(スケールバー=200 μm)

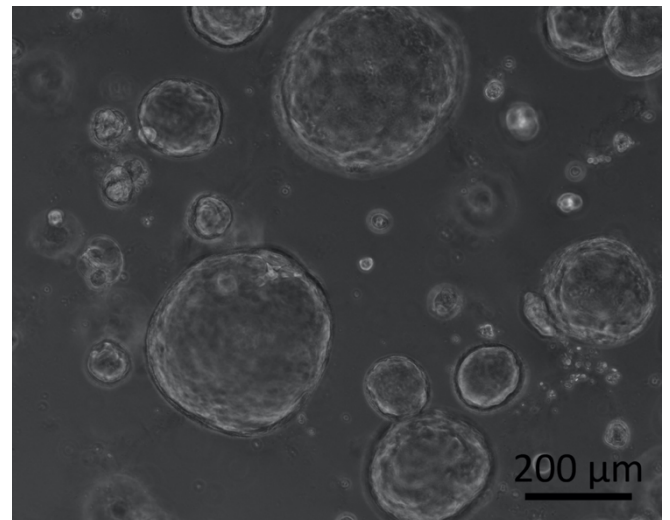


図: C57BL6/J の大腸から樹立したオルガノイドの位相差顕微鏡像。(スケールバー=200 μm)

R4 年度において、これらの培養上清が、*in vivo* を反映しうるのかの評価を行う予定である。

D. 考察

令和3年度においては、催奇形性のバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA を単離するための基盤的研究を行った。最初に、妊娠動物を利用した次世代型催奇形性評価法を確立するための動物実験系の確立を行った。具体的には、種々の妊娠状態にある雌マウスを対象とした、採血方法の検討、血清単離法の検討、胎児由来の羊水の採取方法の検討、羊水由来のエクソソーム単離方法の検討である。

我々は、エクソソーム RNA を指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業 (H30-R2 年度) において行い、成獣雄マウスに対して、血液1滴から全身の病理組織学的診断を検出する高感度な系の確立に成功している (Ono R. *et al.*, *Toxicology Reports* 2020)。

今回、対象動物が、雌マウスおよび胎児になることにより、雄マウスとは異なる点が数多く確認する必要があった。

特に、母動物の血液に加え、胎児由来の羊水のサンプリングおよび胎児からの血液採取など、検証すべき点が数多くあった。また、化学物質投与による催奇形性発現系 (VPA) の検討も行っている。R4 年度からは、実際に VPA を投与し、催奇形性を発現するモデル系を解析の対象とする予定である。

次に、発生・発達段階に特異的なエクソソーム RNA の単離、雌雄に特異的なエクソソーム RNA の単離、妊娠に特異的なエクソソーム RNA の単離を行った。

これまでに、老齢マウスのバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の単離、若齢マウスのバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の単離、雄特異的バイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の単離、雌特異的バイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の単離、妊娠・非妊娠のバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の単離に成功している。

R3 年度においては、若齢 (8 週齢)、成体 (12 週齢)、老齢 (24 ヶ月齢) の雄で比較をしていることから、R4 年度には、生後3日齢、6ヶ月齢、12ヶ月齢などを追加する。また、胎児期 (羊水もしくは血液) におけるエクソソーム RNA の網羅的遺伝子発現解析も行う。

雌雄に特異的なエクソソーム RNA に関しては、雄特異的なエクソソーム RNA として、Y 染色体上の RNA が数多く単離されるのではないかと推察していたが、多くは上染色体上の small RNA であった。これらは、性分化後に、精巣の発達などの性成熟に機能している可能性も考えられる。

また、妊娠・非妊娠雌に特異的なエクソソーム RNA に関しては、妊娠の維持や、出産に必須な機能を持

つエクソソーム中の small RNA である可能性と、母動物の体内にいる胎児由来のエクソソーム中の small RNA である可能性が考えられ、R4 年度にその由来について検討をする。

また、R3 年度においては、催奇形性のバイオマーカーの効率的な探索のために、遺伝子組み換えマウスをモデル動物として利用することに取り組んだ。哺乳類の免疫には、感染した病原体を特異的に見分け、それを記憶することで、同じ病原体に出会った時に効果的に病原体を排除できる仕組みである獲得免疫の他に、受容体を介して、侵入してきた病原体や異常になった自己の細胞をいち早く感知し、それを排除する仕組みである自然免疫が存在する。自然免疫は、ウィルス RNA を模倣した核酸アナログである Poly I:C を投与することで、誘導できることが知られている。ここで、本来、自然免疫を抑制している *Irf2* 遺伝子の欠損マウスを利用することで、慢性的に自然免疫が活性化された状態を作り出すことができる。

R3 年度においては、5ヶ月齢の雌動物を利用して自然免疫に特異的なバイオマーカーの探索を行った。103 個の *Irf2* KO マウスに特異的なエクソソーム RNA の単離に成功した。これらは、*Irf2* KO マウスの持つ様々な自己免疫疾患による症状のバイオマーカーとなっていると考えられる。これらの表現型の出現する前の若い個体を用いての同様の解析を行うことで、ここで単離した特異的なエクソソーム RNA が、自己免疫疾患の症状に特異的なのか、*Irf2* 遺伝子欠損によるインターフェロン応答遺伝子群 (ISGs) の活性化に特異的なのかを明らかにできると考えている。

R3 年度においては、催奇形性のモデルマウスとして利用するための、遺伝子改変マウスの導入および作製を進めた。胎盤形成により初期胚致死となる *Peg10* KO マウスおよび *Mash2* KO マウスを比較することにより、確実に初期胚致死のバイオマーカーを単離できると考えている。また、*Peg10* KO マウスおよび *Mash2* KO マウスは、初期胚致死になるという点では同じであっても、*Peg10* KO マウスでは胎盤の母体側と接する面に存在する trophoblast giant cell の数が増えることはないが、*Mash2* KO マウスにおいては、trophoblast giant cell の数が過剰になる表現型を持つ。よって、*Mash2* KO マウスに特異的なものがあれば、それは、trophoblast giant cell に由来するものである可能性があると考えている。

また、胎児期の形態形成異常だけでなく、胎児期の代謝異常なども検出できる可能性を考え、遺伝子欠損により体内の銅代謝異常が起こることが知られる *Atp7b* 遺伝子の変異マウスの作製を行った。*Atp7b* 欠損による銅代謝異常を胎児期にリキッドバイオ

シーにより検出できるようになると、迅速かつ安全な遺伝病の胎児期スクリーニングにも利用可能だと考えられる。

また、エクソソーム RNA を毒性指標とした動物実験に依存しないオルガノイド 3D 培養法を利用した次世代型代替法の開発も視野に入れており、R3 年度は、肺、肝臓および大腸のオルガノイドを樹立することに成功した。R4 年度以降に、これらのオルガノイドの培養上清に分泌されるエクソソームが、*in vivo* でのエクソソームを反映しているのかを検証していく予定である。

E. 結論

本研究は、R3 年度の研究計画通りに進捗した。

R3 年度研究（3年計画の1年目）研究において、以下の5項目において進捗が見られた。

(1) マウスの正常な発生・発達段階に特異的に誘導されるエクソソーム RNA の同定、雌雄に特異的なエクソソーム RNA の同定、妊娠の有無に特異的なエクソソーム RNA の同定に成功した。

発生・発達段階に特異的に誘導されるエクソソーム RNA の同定からは、マウスの血液1滴からの老齢バイオマーカー、幼若バイオマーカーの単離に成功したと言える。催奇形性のバイオマーカー候補になると同時に、成体における体内年齢の計測が可能となる可能性がある。

雌雄に特異的なエクソソーム RNA の同定からは、妊娠母動物の血液中のエクソソームを解析する際の、胎児性別の偏りによる影響を考慮するために必須なデータとなる。

妊娠の有無に特異的なエクソソーム RNA の同定からは、正常な妊娠のバイオマーカー候補が濃縮されている可能性があり、有力な催奇形性のバイオマーカー候補になる。

(2) 遺伝子改変動物をモデル動物として利用することにより、自己免疫疾患における炎症反応に特異的なエクソソーム RNA の同定に成功した。

我々は、エクソソーム RNA を指標として、癌細胞の存在や、化学物質による細胞障害の検出に成功してきたが、単一遺伝子欠損の影響による炎症反応のバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の同定に成功した意義は大きい。様々な条件でバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の単離に成功

したとしても、それが本当に狙った細胞の障害に由来するものなのかを証明することは難しかった。そこで、同一の表現型を持つ、複数の遺伝子改変動物を利用して、特異的なエクソソーム RNA を同定し、比較することにより、バイオマーカーの機能をメカニズムベースで考えることができる。

(3) 今年度はエクソソーム解析候補時期の1つである妊娠15日マウスを用いて、解剖および子宮内容物採取の流れを確立した。また、来年度実施予定のVPA投与の動物実験における分析法も確立した。

この手法を基に、その他の妊娠ステージについても検討し、それぞれのステージでの試料採取法に応用する予定である。また、令和4年度に実施する、マウスを用いたVPA経口投与による母動物血清中並びに胎児及びその附属物中エクソソームの解析のための試料採取、および薬物動態を検討するための動物実験の立案に繋げた。

なお、VPA動物実験は、株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所に委託する予定である。

(4) 化学物質投与をすることなく、胎児に形態形成異常を引き起こす遺伝子改変マウスの導入および作製にも成功した。

具体的には、(2) で利用した自己免疫疾患の表現型を持つ *Irf2 KO* マウスの他に、胎盤形成不全による初期胚致死を引き起こす *Mash2 KO* マウスの導入、および、同様の表現型を持つ *Peg10 KO* マウスの作製を行った。さらに、形態形成異常の表現型を持たないが、銅代謝異常の表現型を持つ *Atp7b* 遺伝子改変マウスの作製にも成功した。

R4 年度以降に、これらの遺伝子改変マウスを催奇形性のバイオマーカーとして利用し、催奇形性バイオマーカーの単離を行う。

(5) オルガノイド 3D 培養法を利用した代替法の検討のために、マウスの肺、肝臓、大腸よりオルガノイドの樹立することに成功した。

R4 年度以降に、これらのオルガノイドを利用して、毒性バイオマーカーとして単離したエクソソーム RNA が、*in vitro* においても機能しうるのかの検証を行う。

本研究を推進することで、エクソソーム RNA を指標としたリスク評価により、常に一定の判断基準による評価が可能な次世代型催奇形性評価法を開発すると同時に、生殖発生毒性のメカニズムの解明にも繋げられると考えられ、厚生労働行政に貢献しうる研究開発となっている。

F. 研究発表

1. 論文発表 (令和3年度)

Nagaishi T, Watabe T, Kotake K, Kumazawa T, Aida T, Tanaka K, **Ono R**, Ishino F, Usami T, Miura T, Hirakata S, Kawasaki H, Tsugawa N, Yamada D, Hirayama K, Yoshikawa S, Karasuyama H, Okamoto R, Watanabe M, Blumberg RS, Adachi T.

Immunoglobulin A-specific deficiency induces spontaneous inflammation specifically in the ileum.

Gut. 2021 May 7;gutjnl-2020-322873.

○ Shiura H, **Ono R**, Tachibana S, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F.

PEG10 viral aspartic protease domain is essential for the maintenance of fetal capillary structure in the mouse placenta.

Development. 2021 Oct 1;148(19):dev199564.

Tanabe S, Quader S, **Ono R**, Cabral H, Aoyagi K, Hirose A, Yokozaki H, Sasaki H.

Cell Cycle Regulation and DNA Damage Response Networks in Diffuse- and Intestinal-Type Gastric Cancer.

Cancers (Basel). 2021 Nov 18;13(22):5786.

○ **Naruse M**, Ishigamori R, Imai T.

The Unique Genetic and Histological Characteristics of DMBA-Induced Mammary Tumors in an Organoid-Based Carcinogenesis Model.

Front Genet. 2021 Nov 29;12:765131.

Komiya M, Ishigamori R, **Naruse M**, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, Totsuka Y.

Establishment of novel genotoxicity assay system using murine normal epithelial tissue-derived organoids.

Front Genet 2021 Nov 18;12: 768781.

○**Kuwagata M**., Hasegawa T., Takashima H., Shimizu M., Kitajima S., Yamazaki H.:

Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species. *J. Toxicol. Sci.*, 46, 553-560, 2021.

Yamada T., Miura M., Kawamura T., Ushida K., Inoue K., **Kuwagata M**., Katsutani N., Hirose A.: Constructing a developmental and reproductive toxicity database of chemicals (DART NIHS DB) for integrated approaches to testing and assessment. *J Toxicol Sci*. 46, 531-538, 2021.

Taquahashi Y., Saito H., **Kuwagata M**., Kitajima S.: Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals. *Fundam. Toxicol. Sci*. 8, 169-175, 2021.

Yamamoto E., Taquahashi Y., **Kuwagata M**., Saito S., Matsushita K., Toyoda T., Sato F., Kitajima S., Ogawa K., Izutsu K., Saito Y., Hirabayashi Y., Iimura Y., Honma M., Okuda H., Goda Y.: Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- μ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. *Int J Pharmaceutics* 595: 120241, 2021.

Harada T, Tsuboi I, Hino H, Yuda M, **Hirabayashi Y**, Hirai S, Aizawa S.

Age-related exacerbation of hematopoietic organ damage induced by systemic hyper-inflammation in senescence-accelerated mice.

Sci Rep. 2021 Dec 1;11(1):23250.

Okubo Y, Ohtake F, Igarashi K, Yasuhiko Y, **Hirabayashi Y**, Saga Y, Kanno J.

Cleaved Delta like 1 intracellular domain regulates neural development via Notch signal-dependent and -independent pathways.

Development. 2021 Oct 1;148(19):dev193664.

Hirabayashi Y, Maki K, Kinoshita K, Nakazawa T, Obika S, Naota M, Watanabe K, Suzuki M, Arato T, Fujisaka A, Fueki O, Ito K, Onodera H.

Considerations of the Japanese Research Working Group for the ICH S6 & Related Issues Regarding Nonclinical Safety Assessments of Oligonucleotide Therapeutics: Comparison with Those of Biopharmaceuticals.

Nucleic Acid Ther. 2021 Apr;31(2):114-125.

Hwang JY, Wang H, Lu Y, **Ikawa M**, Chung JJ.

C2cd6-encoded CatSpert targets sperm calcium channel to Ca²⁺ signaling domains in the flagellar membrane.

Cell Rep. 2022 Jan 5:110226.

Morohoshi A, Miyata H, Oyama Y, Oura S, Noda T, **Ikawa M**.

FAM71F1 binds to RAB2A and RAB2B and is essential for acrosome formation and male fertility in mice.

Development. 2021 Nov 1;148(21):dev199644.

Fujihara Y, Herberg S, Blaha A, Panser K, Kobayashi K, Larasati T, Novatchkova M, Theussl HC, Olszanska O, **Ikawa M**, Pauli A.

The conserved fertility factor SPACA4/Bouncer has divergent modes of action in vertebrate fertilization.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Sep 28; 118(39): e2108777118.

Miyata H, Oura S, Morohoshi A, Shimada K, Mashiko D, Oyama Y, Kaneda Y, Matsumura T, Abbasi F, **Ikawa M**. SPATA33 localizes calcineurin to the mitochondria and regulates sperm motility in mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Aug 31;118(35): e2106673118.

Fujita Y, Hoshina T, Matsuzaki J, **Yoshioka Y**, Kadota T,

Hosaka Y, Fujimoto S, Kawamoto H, Watanabe N, Sawaki K, Sakamoto Y, Miyajima M, Lee K, Nakaharai K, Horino T, Nakagawa R, Araya J, Miyato M, Yoshida M, Kuwano K, **Ochiya T**.

Early prediction of COVID-19 severity using extracellular vesicle COPB2.

J Extracell Vesicles. 2021 Jun;10(8):e12092.

Ichinohe N, Ishii M, Tanimizu N, Mizuguchi T, Yoshioka Y, **Ochiya T**, Suzuki H, Mitaka T.

Extracellular vesicles containing miR-146a-5p secreted by bone marrow mesenchymal cells activate hepatocytic progenitors in regenerating rat livers.

Stem Cell Res Ther. 2021 May 29;12(1):312.

Torii C, Maishi N, Kawamoto T, Morimoto M, Akiyama K, **Yoshioka Y**, Minami T, Tsumita T, Alam MT, **Ochiya T**, Hida Y, Hida K.

miRNA-1246 in extracellular vesicles secreted from metastatic tumor induces drug resistance in tumor endothelial cells.

Sci Rep. 2021 Jul 5;11(1):13502. doi: 10.1038/s41598-021-92879-5.

2. 学会発表

(令和3年度)

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)

○Ryuichi Ono

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

リキッドバイオプシーによる毒性評価

第48回日本毒性学会学術年会 (2021.7.1.)

(招待講演)

小野竜一、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48回日本毒性学会学術年会 (2020.6.30.)

(招待講演)

○小野竜一

エクソソームが媒介したレトロトランスポゾンの水平遺伝による哺乳類の誕生

第21回 AB Conference (2021.8.21.)

(招待講演)

○小野竜一

エクソソームが媒介したレトロトランスポゾンの遺伝子水平遺伝による哺乳類の誕生

第93回日本遺伝学会学術年会 (2021.9.8.)

(招待講演)

○Ryuichi Ono

Novel hepatotoxicity biomarkers of exosomal miRNAs acutely induced by CCl4

アジア毒性学会学術年会 (2021.11.2.)

(招待講演)

○Ryuichi Ono

Liquid Biopsy for the Early Detection of Toxicity

韓国毒性学会学術年会 (2021.11.2.)

(招待講演)

小野竜一

ゲノム編集技術の安全性評価

第50回日本環境変異原ゲノム学会 (2021.11.1.)

(招待講演)

○ Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, **Ryuichi Ono**, Satoshi Kitajima

Comprehensive Histone, DNA methylation, and mRNA expression analysis of murine liver repeatedly exposure to

Chemicals - Percellome Project 2022 update -

米国毒性学会学術年会 (2022.3.27.)

○成瀬美衣

Gene expression profiles in CAFs exhibited individual variations by the co-culture with CRC organoids

第80回日本癌学会学術総会 (2021.9.30.)

○桑形 麻樹子、高島 宏昌、長谷川 拓郎、山崎 浩史、北嶋 聡: 雄ウサギを用いたサリドマイド経口投与による血漿から精漿中への移行評価

第48回日本毒性学会学術年会(神戸(ハイブリット))2021年7月

○高島 宏昌、羽田 亮、田中 加奈子、関 美沙、長谷川 拓郎、山崎 浩史、北嶋 聡、桑形 麻樹子: ウサギを用いたサリドマイド経口投与による催奇形作用

確認試験

第61回日本先天異常学会学術集会(東京(オンライン))2021年8月

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。

別添 4

II. 分担研究報告書

エクソソーム RNA を毒性指標とした
次世代型催奇形性評価法の開発に資する研究
(21KD1001)

令和 3 年度 分担研究報告書

分担研究課題：エクソソーム解析と毒性バイオマーカー探索

研究分担者 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

研究分担者 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
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

研究要旨

科学技術の進展に伴い年々増加する新規化学物質の安全性確保は極めて重要な課題であり、それらの生体影響の評価には、毒性機序の解明が必須とされるが、特に、生殖発生毒性学の分野は他の毒性分野よりもメカニズム解析が遅れている。評価方法が経験値に依存する由縁でもある。

我々は、これまでに、細胞間情報伝達の 1 つとして細胞から分泌される小胞であるエクソソーム中に含まれる RNA を指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2 年度）において行い、成獣雄マウスに対して、血液 1 滴から全身の病理組織学的診断を検出しうる高感度な系の確立に成功している (Ono R. et al., Toxicology Reports 2020)。

本研究においては、エクソソーム RNA を腹単位の毒性指標とする次世代型催奇形性評価法の開発を行うことで、これまでの経験重視に依存していた催奇形性の評価をメカニズムに基づいた安全性評価にステップアップし、リスク評価時に常に一定の判断基準による評価が可能となることで、催奇形性作用を持つ化合物の迅速化、高感度化した評価が期待される。

特に、胎児の正常な発生に必須なマイクロ RNA の存在が明らかになり、さらに、マイクロ RNA が催奇形性に寄与している報告もされていることから、本研究により、催奇形性に寄与するエクソソーム中のマイクロ RNA を明らかにすることは、催奇形性のメカニズムの解明に大きく貢献する。

また、エクソソーム RNA を毒性指標とする評価法を催奇形性評価だけでなく、オルガノイド 3D 培養法を利用した代替法への応用も視野に入れた本研究は、生殖発生毒性評価、エクソソーム RNA といった新たなバイオマーカー評価およびオルガノイド 3D 培養による in vitro 評価を融合させた計画となっている。

3 年計画の初年度にあたる R3 年度の本分担研究においては、マウスの正常な発生・発達段階に特異的に誘導されるエクソソーム RNA の同定、雌雄に特異的なエクソソーム RNA の同定、妊娠の有無に特異的なエクソソーム RNA の同定に成功した。また、遺伝子改変動物をモデル動物として利用することにより、自己免疫疾患における炎症反応に特異的なエクソソーム RNA の同定に成功した。

令和3年度研究（3年計画の1年目）は、計画通りに進捗している。

A. 研究目的

化学物質の有害性評価、特に化審法におけるヒト健康影響に関する有害性において、化学物質の生殖発生への影響を迅速かつ正確に評価することは最重要課題の一つである。現行の生殖発生毒性試験法は、莫大な費用、時間や労力以外に、観察者の経験に依存する部分や、得られる判定基準が必ずしも施設間で一定とは言えない部分がある。

その内の1つである胚・胎児発生に関する試験（発生毒性試験）では、母毒性評価とともに胎児形態観察（外表、内臓および骨格観察）から催奇形性を評価する。その際に、腹内・腹間の感受性に差がある中で、形態変化を異常か変異に分類し、その発現率から催奇形性を判断する事は困難な場合がある。

近年、細胞間情報伝達の1つとして、細胞から分泌される小胞であるエクソソームが注目されている。エクソソームは体液中（血液、髄液など）を循環し、細胞特異的なマイクロRNAを内包することから、研究分担者の東京医大・落谷らは、腫瘍細胞に特異的なマイクロRNAを指標にした、血液1滴による13種類の早期がん診断法（精度95%以上）を開発した経験を持つ。

我々は、エクソソームRNAを指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2年度）において行い、成獣雄マウスに対して、血液1滴から全身の病理組織学的診断を検出しようとする高感度な系の確立に成功している（**Ono R. et al., Toxicology Reports** 2020）。

本研究は、これまでの実績、経験を活かし、エクソソームRNAを指標にした次世代型の催奇形性評価法の確立と催奇形性の発現メカニズムの解明を目的とする。

エクソソーム中に多く内包されることが知られるマイクロRNAが催奇形性に寄与している報告もあることから、本研究の特徴は、エクソソームRNAを指標することで、リスク評価時に常に一定の判断基準による評価が可能な次世代型催奇形性評価法を開発すると同時に、生殖発生毒性のメカニズムの解明にも繋がることである。

また、エクソソームRNAを毒性指標とした動物実験に依存しないオルガノイド3D培養法を利用した次世代型代替法の開発も視野に入れている。オルガノイドは、臓器を構成する能力を持った未分化な組織幹・前駆細胞が、3D培養環境の中で、形態形成過程

の特徴を模倣してミニ臓器が形成されるものであり、発生期の模倣モデルとして、化学物質や薬物による毒性影響の評価にも適用できると考えられる。本研究計画においては、まずは、オルガノイド由来のエクソソームにおいても毒性評価が可能かを明らかにすることを目的としている。動物福祉（3Rs）の観点による代替法への応用を考慮した取組の一環である。具体的には、オルガノイドの培養上清中のエクソソームが *in vivo* のエクソソームと同様に毒性バイオマーカーとなりうるのかの検証を行う。

B. 研究方法

本研究においては、毒性発現メカニズムを考慮した次世代型の生殖発生毒性評価法を確立することを目的に、以下の概要を行う。

- エクソソームRNAを腹単位の毒性指標とする次世代型催奇形性評価法を開発するために、妊娠マウスに既知の催奇形性化合物を経口投与し、胎児に発現する形態変化から毒性指標となるエクソソームRNAの同定を次世代シーケンス解析により行う。

- 本研究で同定された催奇形性のバイオマーカーとなるエクソソームRNAのノックアウトマウスおよび過剰発現マウスを作製することで、催奇形性の発現メカニズムを解明する。

- *in vivo* の特性を高度に保存した *in vitro* モデルとされるオルガノイド3D培養法の培養上清中に細胞より分泌されるエクソソームを毒性指標として利用可能かを検討し、動物実験によらない次世代型代替法の開発を行う。

これらに加えて、対象マウス個体の一般的な毒性評価を行うことで、現行の生殖毒性評価と本研究で開発する次世代型生殖毒性評価法の比較を行う。

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においては、化学物質のマウスへの投与実験および採血および胎児観察（桑形）、化学物質の用量設定実験および病理組織学的検査・生化学検査（平林）、エクソソームの抽出およびエクソソームRNAの次世代シーケンサーによる網羅的解析（小野）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、催奇形性のバイオマーカー候補の探索およびその詳細の解析（落谷）を行い、大阪大学・微生物病研究所（伊川）においては、本研究にお

いて得られる発生ステージに特異的なマイクロ RNA の変異マウスの作製、および催奇形性解析に適したモデルマウスの作製 (伊川) を行う。また、国立がん研究センター (成瀬) においては、毒性バイオマーカーであるエクソソーム RNA が、オルガノイド 3D 培養上清中に細胞より分泌されるエクソソームにおいても毒性指標となるのかを検討する。

・発生ステージに特異的なエクソソーム RNA の同定

国立医薬品食品衛生研究所・動物室において C57BL6/J ♂および♀ (8 週齢、12 週齢、24 ヶ月齢など) および、発生毒性を検出するために重要なポイントである (1)妊娠初期 (着床直後、妊娠 9 日)、(2)妊娠中期 (口蓋閉鎖時、妊娠 15 日)、(3)妊娠末期 (帝王切開時、妊娠 18 日) (4)非妊娠の母体血および羊水中のエクソソーム RNA の網羅的遺伝子発現プロフィールを次世代シーケンスにより決定する。

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。

・マウス血液からのエクソソーム RNA 単離

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、国立医薬品食品衛生研究所および東京医科大学・分子細胞治療研究部門においてエクソソームの単離を行う。具体的には、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ト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、エクソソーム単離効率の評価を行う。

・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、Qiazol 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 および国立医薬品食品衛生研究所の共通機器である Illumina 社 Nextseq2000 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。

(倫理面の配慮)

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の配慮を十分に行い、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

・発生ステージに特異的なエクソソーム RNA の同定 (小野、落谷)

催奇形性のバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA を単離するにあたり、背景データとして、発生ステージおよび性別に特異的なエクソソーム RNA の同定を試みた。最初に、C57BL6/J ♂および♀ (8週齢、12週齢、24ヶ月齢など) および、発生毒性を検出するために重要なポイントである (1)妊娠初期 (着床直後、妊娠9日)、(2)妊娠中期 (口蓋閉鎖時、妊娠15日)、(3)妊娠末期 (帝王切開時、妊娠18日) (4)非妊娠の母体血の採取を行った。

現在までに、C57BL6/J ♂ (8週齢、12週齢、24ヶ月齢) の血清より収集したエクソソーム中の small RNA の網羅的遺伝子発現プロファイルを次世代シーケンスにより決定した。

尚、2003年に創設された世界的な遺伝子発現解析プロジェクトである ENCODE (ENCyclopedia of DNA Elements) において、次世代シーケンスによる遺伝子発現解析方法についてガイドライン (ENCODE Guidelines and Best Practices for RNA-Seq) が示されている。ガイドラインでは、次世代シーケンスによる遺伝子発現解析は、解析精度および再現性が高いためにテクニカルレプリケート (同一検体による再現性/測定誤差の検討) は行わず、解析個体数を増やすこと (生物学的レプリケート) が推奨されている。本研究においても、このガイドラインに従い、各群 n=3~5、個体毎に単回測定としている。

8週齢、24ヶ月齢を比較し、有意差 $P < 0.05$ かつ、read 数が 100 以上のものをスクリーニングすることで、総計 63 個の発達特異的なエクソソーム RNA の単離に成功した。

下図にあるように、Csn1a1 (casein kinase 1, alpha 1) 遺伝子中の small RNA は、老齢 (24ヶ月齢) に特異的な発現を示した。一方、Krt18 (keratin 18) 遺伝子中の small RNA は、年齢に依存して発現が上昇している。これらの small RNA は、発現量が非常に高く、老齢バイオマーカーとしての利用が期待される。

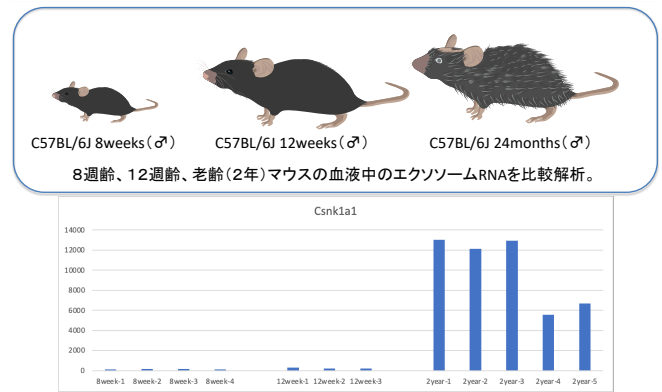


図: 8週齢 (左)、12週齢 (中央)、24ヶ月齢 (右) マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Csn1a1 (casein kinase 1, alpha 1) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

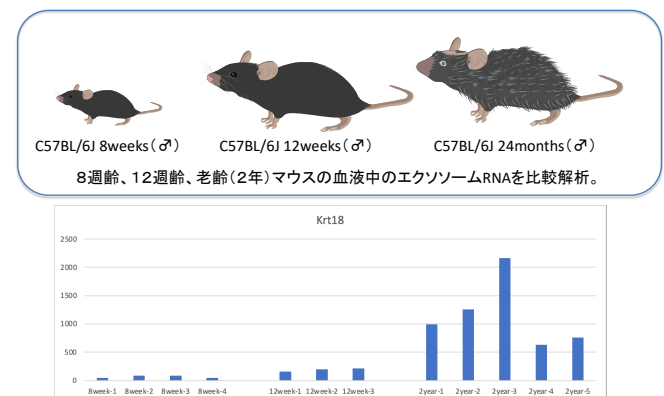


図: 8週齢 (左)、12週齢 (中央)、24ヶ月齢 (右) マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Krt18 (keratin 18) 遺伝子中に存在する新規 small RNA

また、Myo1d (myosin ID) 遺伝子および Syne1 (spectrin repeat containing, nuclear envelope 1) 遺伝子中に存在するエクソソーム RNA は、若齢期に特異的な遺伝子発現を示す。遺伝子発現量も非常に高いことから、若齢期特異的なバイオマーカーとしての利用が期待できる。

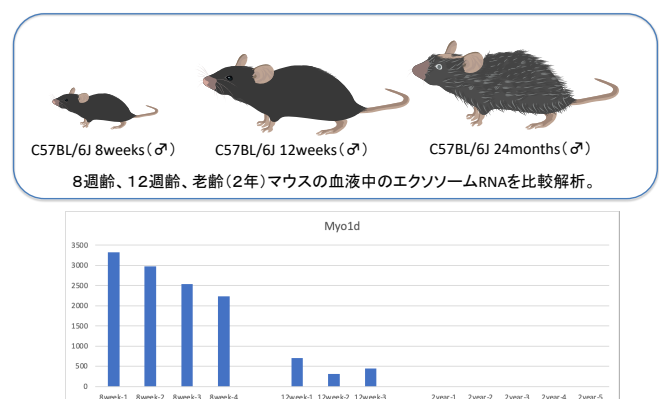


図: 8週齢(左)、12週齢(中央)、24ヶ月齢(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Myo1d (myosin ID) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

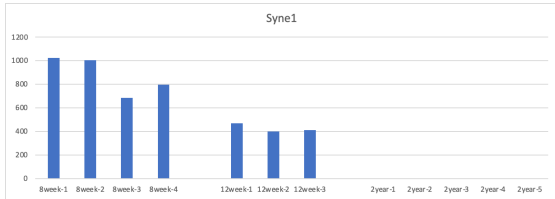
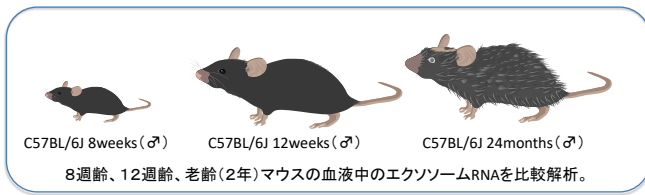


図: 8週齢(左)、12週齢(中央)、24ヶ月齢(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Syne1 (spectrin repeat containing, nuclear envelope 1) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

・性別に特異的なエクソソーム RNA の同定 (小野、落谷)

発生・発達ステージに特異的なエクソソーム RNA の同定に成功したことから、次に、性別に特異的なエクソソーム RNA の同定を行った。非妊娠♀および妊娠♀と8週齢♂マウス間におけるエクソソーム RNA の網羅的遺伝子発現解析結果を比較することにより性別特異的発現を示す遺伝子群のスクリーニングを行った。

以下に、雄に特異的な遺伝子発現を示すエクソソーム RNA のうち、一例として、Emr1 (EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1) 遺伝子、Drap2 遺伝子中に存在する新規 small RNA の遺伝子発現解析プロファイルの結果を示す。

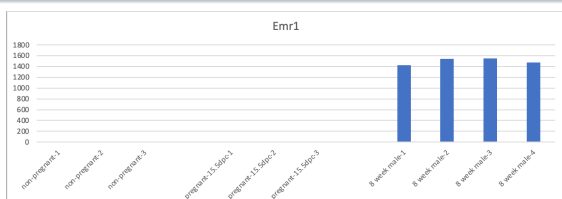


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Emr1 (EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

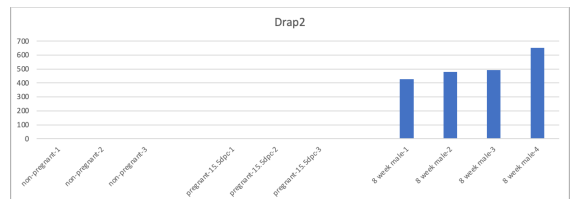
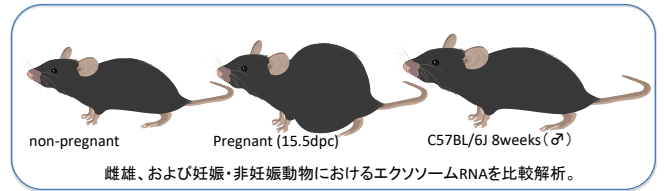


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Dpf3 (D4, zinc and double PHD fingers, family 3) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

次に、雌(妊娠中および非妊娠状態)において特異的に発現するエクソソーム RNA の同定を行った。単離された雌に特異的に発現しているエクソソーム中の small RNA の中で代表的なものを2個に関して、その詳細を以下に示す。

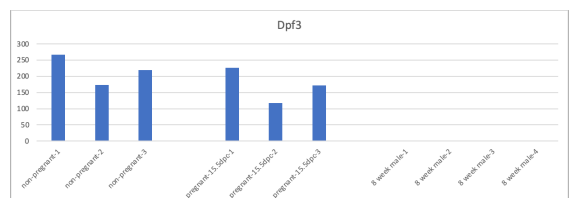
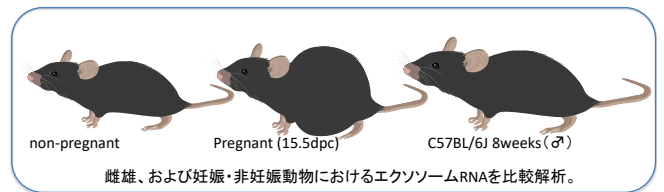


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Dpf3 (D4, zinc and double PHD fingers, family 3) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。



雌雄、および妊娠・非妊娠動物におけるエクソソームRNAを比較解析。

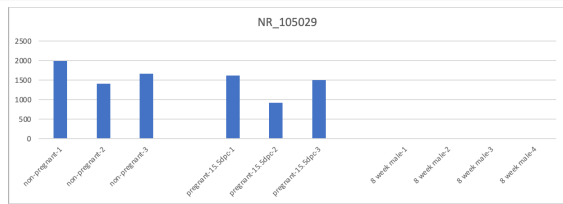
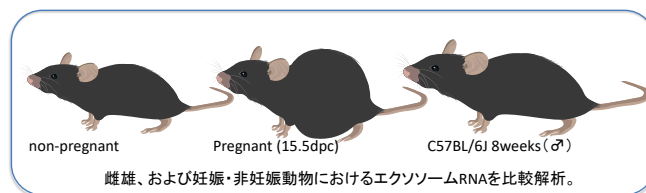


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : NR_105029 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

次に、雄および非妊娠状態の雌においては、遺伝子発現がないが、妊娠により、遺伝異子が誘導されるエクソソーム中の新規 small RNA のスクリーニングを行い、妊娠に特異的なバイオマーカーの単離に成功した。

これらの中で代表的なものを2個に関して、その詳細を以下に示す。



雌雄、および妊娠・非妊娠動物におけるエクソソームRNAを比較解析。

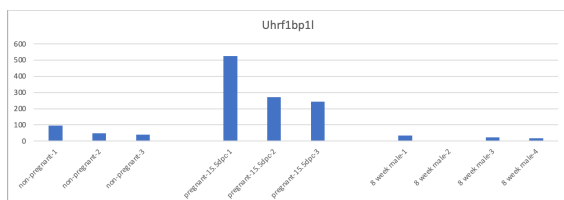
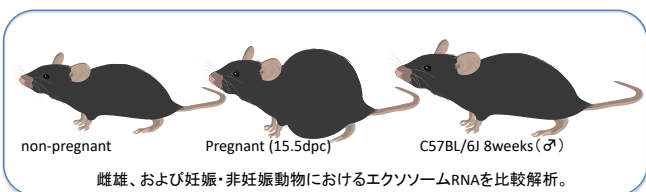


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : UHRF1 (ICBP90) binding protein 1-like 遺伝子中に存在する新規 small RNA



雌雄、および妊娠・非妊娠動物におけるエクソソームRNAを比較解析。

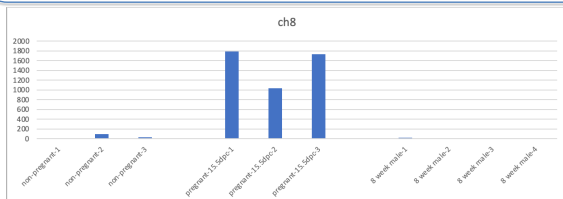


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : 8番染色体に位置する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

・炎症に特異的なエクソソーム RNA の同定 (小野、落谷)

現在までに、エクソソーム RNA を発がんバイオマーカーの指標として利用した早期がん診断が行われ、さらに、我々は、化学物質投与による肝毒性評価の指標として、エクソソーム RNA を利用可能なことを証明してきた。本研究においては、催奇形性のバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の同定を目的としているが、成体における骨格異常や、発達障害などの各種障害のバイオマーカーとしても利用可能と考えられる。

そこで、様々な表現型を持つ遺伝子変異を、発達障害などのモデルとして利用することとした。最初に、自己免疫疾患マウスモデルとして知られる Irf2 欠損マウスに特異的なエクソソーム RNA が存在するのかの解析を行った。

・炎症反応に特異的なエクソソーム RNA の網羅的スクリーニング (小野、落谷)

血液生化学に利用した血清の残りを利用して、超遠心ペレットダウン法にてエクソソームの抽出を行い、そこからエクソソーム RNA を精製後に、エクソソームRNAの次世代シーケンサーを利用した網羅的遺伝子発現解析を行った。

令和3年度においては、野生型においては発現がないが、Irf2 KO マウスのみで発現が誘導されているエクソソーム RNA の単離のみを行った。

マッピングされた次世代シーケンサーRead 数が10以上のものでは、103 個の small RNA が同定された。そのうち、発現量の多い上位 10 個について詳細な解析を行った。

現在、既知の miRNA のデータベースである miRbaseに報告されている既知のmiRNAは、マウスにおいて、1234 個であった。今回、Irf2 KO マウスにて発現誘導のあった small RNA 上位 10 個を RNA の二次元構造予測ツール (RNAfold) を用いて、ヘアピン構造をとり、miRNA としてプロセスされるかの検証を行った。このうちの一つは、既知の miRNA である miRNA206 であった。

これらの small RNA は全て、既知の遺伝子である Abtb2 (ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2)、Col4a2 (collagen, type IV, alpha 2)、Linc-md1 (long intergenic non-protein coding RNA of muscle differentiation 1)、および Rabgap11 (RAB GTPase activating protein 1-like) のイントロン中、もしくはエ

クソン中にマップされた small RNA である。二次元構造予測の結果を、下記に示した。

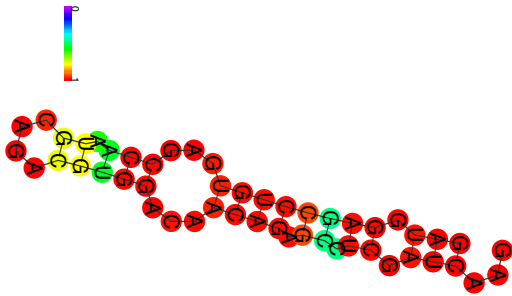


図: Abtb2 (ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2) 遺伝子中に存在する新規 small RNA の二次元構造予測

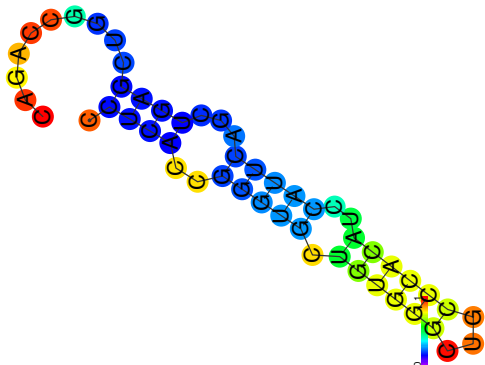


図: Col4a2 (collagen, type IV, alpha 2) 遺伝子中に存在する新規 small RNA の二次元構造予測

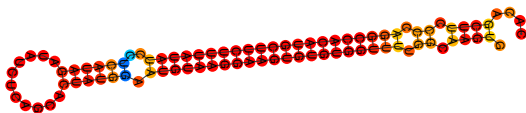


図: Linc-md1 (long intergenic non-protein coding RNA of muscle differentiation 1) 遺伝子中に存在するMir206 の二次元構造予測

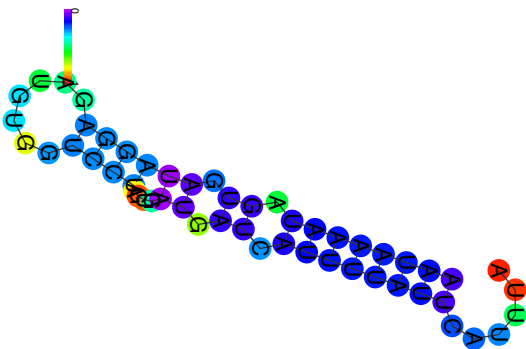


図: Rabgap11 (RAB GTPase activating protein 1-like) 遺伝子中に存在する新規 small RNA の二次元構造予測

D. 考察

令和3年度においては、催奇形性のバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA を単離するための基盤的研究を行った。最初に、妊娠動物を利用した次世代型催奇形性評価法を確立するための動物実験系の確立を行った。具体的には、種々の妊娠状態にある雌マウスを対象とした、採血方法の検討、血清単離法の検討、胎児由来の羊水の採取方法の検討、羊水由来のエクソソーム単離方法の検討である。

我々は、エクソソーム RNA を指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業 (H30-R2 年度) において行い、成獣雄マウスに対して、血液1滴から全身の病理組織学的診断を検出する高感度な系の確立に成功している (Ono R. *et al.*, *Toxicology Reports* 2020)。

今回、対象動物が、雌マウスおよび胎児になることにより、雄マウスとは異なる点が数多く確認する必要があった。

特に、母動物の血液に加え、胎児由来の羊水のサンプリングおよび胎児からの血液採取など、検証すべき点が数多くあった。また、化学物質投与による催奇形性発現系 (VPA) の検討も行っている。R4 年度からは、実際に VPA を投与し、催奇形性を発現するモデル系を解析の対象とする予定である。

次に、発生・発達段階に特異的なエクソソーム RNA の単離、雌雄に特異的なエクソソーム RNA の単離、妊娠に特異的なエクソソーム RNA の単離を行った。

これまでに、老齢マウスのバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の単離、若齢マウスのバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の単離、雄特異的バイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の単離、雌特異的バイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の単離、妊娠・非妊娠のバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の単離に成功している。

R3 年度においては、若齢 (8 週齢)、成体 (12 週齢)、老齢 (24 ヶ月齢) の雄で比較をしていることから、R4 年度には、生後3日齢、6ヶ月齢、12ヶ月齢などを追加する。また、胎児期 (羊水もしくは血液) におけるエクソソーム RNA の網羅的遺伝子発現解析も行う。

雌雄に特異的なエクソソーム RNA に関しては、雄特異的なエクソソーム RNA として、Y 染色体上の RNA が数多く単離されるのではないかと推察していたが、多くは上染色体上の small RNA であった。これらは、性分化後に、精巣の発達などの性成熟に機能している可能性も考えられる。

また、妊娠・非妊娠雌に特異的なエクソソーム RNA に関しては、妊娠の維持や、出産に必須な機能を持

つエクソソーム中の small RNA である可能性と、母動物の体内にいる胎児由来のエクソソーム中の small RNA である可能性が考えられ、R4 年度にその由来について検討をする。

また、R3 年度においては、催奇形性のバイオマーカーの効率的な探索のために、遺伝子組み換えマウスをモデル動物として利用することに取り組んだ。哺乳類の免疫には、感染した病原体を特異的に見分け、それを記憶することで、同じ病原体に出会った時に効果的に病原体を排除できる仕組みである獲得免疫の他に、受容体を介して、侵入してきた病原体や異常になった自己の細胞をいち早く感知し、それを排除する仕組みである自然免疫が存在する。自然免疫は、ウィルス RNA を模倣した核酸アナログである Poly I:C を投与することで、誘導できることが知られている。ここで、本来、自然免疫を抑制している *Irf2* 遺伝子の欠損マウスを利用することで、慢性的に自然免疫が活性化された状態を作り出すことができる。

R3 年度においては、5ヶ月齢の雌動物を利用して自然免疫に特異的なバイオマーカーの探索を行った。103 個の *Irf2* KO マウスに特異的なエクソソーム RNA の単離に成功した。これらは、*Irf2* KO マウスの持つ様々な自己免疫疾患による症状のバイオマーカーとなっていると考えられる。これらの表現型の出現する前の若い個体を用いての同様の解析を行うことで、ここで単離した特異的なエクソソーム RNA が、自己免疫疾患の症状に特異的なのか、*Irf2* 遺伝子欠損によるインターフェロン応答遺伝子群 (ISGs) の活性化に特異的なのかを明らかにできると考えている。

R3 年度においては、催奇形性のモデルマウスとして利用するための、遺伝子改変マウスの導入および作製を進めた。胎盤形成により初期胚致死となる *Peg10* KO マウスおよび *Mash2* KO マウスを比較することにより、確実に初期胚致死のバイオマーカーを単離できると考えている。また、*Peg10* KO マウスおよび *Mash2* KO マウスは、初期胚致死になるという点では同じであっても、*Peg10* KO マウスでは胎盤の母体側と接する面に存在する trophoblast giant cell の数が増えることはないが、*Mash2* KO マウスにおいては、trophoblast giant cell の数が過剰になる表現型を持つ。よって、*Mash2* KO マウスに特異的なものがあれば、それは、trophoblast giant cell に由来するものである可能性があると考えている。

また、胎児期の形態形成異常だけでなく、胎児期の代謝異常なども検出できる可能性を考え、遺伝子欠損により体内の銅代謝異常が起こることが知られる *Atp7b* 遺伝子の変異マウスの作製を行った。*Atp7b* 欠損による銅代謝異常を胎児期にリキッドバイオ

シーにより検出できるようになると、迅速かつ安全な遺伝病の胎児期スクリーニングにも利用可能だと考えられる。

また、エクソソーム RNA を毒性指標とした動物実験に依存しないオルガノイド 3D 培養法を利用した次世代型代替法の開発も視野に入れており、R3 年度は、肺、肝臓および大腸のオルガノイドを樹立することに成功した。R4 年度以降に、これらのオルガノイドの培養上清に分泌されるエクソソームが、*in vivo* でのエクソソームを反映しているのかを検証していく予定である。

E. 結論

本研究は、R3 年度の研究計画通りに進捗した。

R3 年度研究（3年計画の1年目）研究において、以下の5項目において進捗が見られた。

(1) マウスの正常な発生・発達段階に特異的に誘導されるエクソソーム RNA の同定、雌雄に特異的なエクソソーム RNA の同定、妊娠の有無に特異的なエクソソーム RNA の同定に成功した。

発生・発達段階に特異的に誘導されるエクソソーム RNA の同定からは、マウスの血液1滴からの老齢バイオマーカー、幼若バイオマーカーの単離に成功したと言える。催奇形性のバイオマーカー候補になると同時に、成体における体内年齢の計測が可能となる可能性がある。

雌雄に特異的なエクソソーム RNA の同定からは、妊娠母動物の血液中のエクソソームを解析する際の、胎児性別の偏りによる影響を考慮するために必須なデータとなる。

妊娠の有無に特異的なエクソソーム RNA の同定からは、正常な妊娠のバイオマーカー候補が濃縮されている可能性があり、有力な催奇形性のバイオマーカー候補になる。

(2) 遺伝子改変動物をモデル動物として利用することにより、自己免疫疾患における炎症反応に特異的なエクソソーム RNA の同定に成功した。

我々は、エクソソーム RNA を指標として、癌細胞の存在や、化学物質による細胞障害の検出に成功してきたが、単一遺伝子欠損の影響による炎症反応のバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の同定に成功した意義は大きい。様々な条件でバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の単離に成功

したとしても、それが本当に狙った細胞の障害に由来するものなのかを証明することは難しかった。そこで、同一の表現型を持つ、複数の遺伝子改変動物を利用して、特異的なエクソソーム RNA を同定し、比較することにより、バイオマーカーの機能をメカニズムベースで考えることができる。

(3) 化学物質投与により催奇形性を発現する動物実験の条件検討を行った。

具体的には、C57BL6/J ♂および♀（8週齢、12週齢、24ヶ月齢など）および、発生毒性を検出するために重要なポイントである ①妊娠初期（着床直後、妊娠9日）、②妊娠中期（口蓋閉鎖時、妊娠15日）、③妊娠末期（帝王切開時、妊娠18日）④非妊娠の母体血および羊水中からエクソソームを採取する条件検討を行った。また、VPA を投与し、催奇形性での条件設定の検討も行った。これらの条件検討は、R4 年度以降の動物実験を行う上で必須事項である。

(4) 化学物質投与をすることなく、胎児に形態形成異常を引き起こす遺伝子改変マウスの導入および作製にも成功した。

具体的には、(2) で利用した自己免疫疾患の表現型を持つ *Irf2 KO* マウスの他に、胎盤形成不全による初期胚致死を引き起こす *Mash2 KO* マウスの導入、および、同様の表現型を持つ *Peg10 KO* マウスの作製を行った。さらに、形態形成異常の表現型を持たないが、銅代謝異常の表現型を持つ *Atp7b* 遺伝子改変マウスの作製にも成功した。

R4 年度以降に、これらの遺伝子改変マウスを催奇形性のバイオマーカーとして利用し、催奇形性バイオマーカーの単離を行う。

(5) オルガノイド 3D 培養法を利用した代替法の検討のために、マウスの肺、肝臓、大腸よりオルガノイドの樹立することに成功した。

R4 年度以降に、これらのオルガノイドを利用して、毒性バイオマーカーとして単離したエクソソーム RNA が、*in vitro* においても機能しうるのかの検証を行う。

本研究を推進することで、エクソソーム RNA を指標としたリスク評価により、常に一定の判断基準による評価が可能な次世代型催奇形性評価法を開発すると同時に、生殖発生毒性のメカニズムの解明にも繋げられると考えられ、厚生労働行政に貢献しうる研究開発となっている。

F. 研究発表

1. 論文発表

(令和3年度)

Nagaishi T, Watabe T, Kotake K, Kumazawa T, Aida T, Tanaka K, **Ono R**, Ishino F, Usami T, Miura T, Hirakata S, Kawasaki H, Tsugawa N, Yamada D, Hirayama K, Yoshikawa S, Karasuyama H, Okamoto R, Watanabe M, Blumberg RS, Adachi T.

Immunoglobulin A-specific deficiency induces spontaneous inflammation specifically in the ileum.

Gut. 2021 May 7;gutjnl-2020-322873.

○ Shiura H, **Ono R**, Tachibana S, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F.

PEG10 viral aspartic protease domain is essential for the maintenance of fetal capillary structure in the mouse placenta.

Development. 2021 Oct 1;148(19):dev199564.

Tanabe S, Quader S, **Ono R**, Cabral H, Aoyagi K, Hirose A, Yokozaki H, Sasaki H.

Cell Cycle Regulation and DNA Damage Response Networks in Diffuse- and Intestinal-Type Gastric Cancer.

Cancers (Basel). 2021 Nov 18;13(22):5786.

○ **Naruse M**, Ishigamori R, Imai T.

The Unique Genetic and Histological Characteristics of DMBA-Induced Mammary Tumors in an Organoid-Based Carcinogenesis Model.

Front Genet. 2021 Nov 29;12:765131.

Komiya M, Ishigamori R, **Naruse M**, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, Totsuka Y.

Establishment of novel genotoxicity assay system using murine normal epithelial tissue-derived organoids.

Front Genet 2021 Nov 18;12: 768781.

○ **Kuwagata M**, Hasegawa T., Takashima H., Shimizu M., Kitajima S., Yamazaki H.:

Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species. *J. Toxicol. Sci.*, 46, 553-560, 2021.

Yamada T., Miura M., Kawamura T., Ushida K., Inoue K., **Kuwagata M**., Katsutani N., Hirose A.: Constructing a developmental and reproductive toxicity database of chemicals (DART NIHS DB) for integrated approaches to testing and assessment. *J Toxicol Sci*. 46, 531-538, 2021.

Taquahashi Y., Saito H., **Kuwagata M**., Kitajima S.: Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals. *Fundam. Toxicol. Sci.* 8, 169-175, 2021.

Yamamoto E., Taquahashi Y., **Kuwagata M**., Saito S., Matsushita K., Toyoda T., Sato F., Kitajima S., Ogawa K., Izutsu K., Saito Y., Hirabayashi Y., Imura Y., Honma M., Okuda H., Goda Y.: Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- μ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. *Int J Pharmaceutics* 595: 120241, 2021.

Harada T, Tsuboi I, Hino H, Yuda M, **Hirabayashi Y**, Hirai S, Aizawa S.

Age-related exacerbation of hematopoietic organ damage induced by systemic hyper-inflammation in senescence-accelerated mice.

Sci Rep. 2021 Dec 1;11(1):23250.

Okubo Y, Ohtake F, Igarashi K, Yasuhiko Y, **Hirabayashi Y**, Saga Y, Kanno J.

Cleaved Delta like 1 intracellular domain regulates neural development via Notch signal-dependent and -independent pathways.

Development. 2021 Oct 1;148(19):dev193664.

Hirabayashi Y, Maki K, Kinoshita K, Nakazawa T, Obika S, Naota M, Watanabe K, Suzuki M, Arato T, Fujisaka A, Fueki O, Ito K, Onodera H.

Considerations of the Japanese Research Working Group for the ICH S6 & Related Issues Regarding Nonclinical Safety Assessments of Oligonucleotide Therapeutics: Comparison with Those of Biopharmaceuticals.

Nucleic Acid Ther. 2021 Apr;31(2):114-125.

Hwang JY, Wang H, Lu Y, **Ikawa M**, Chung JJ.

C2cd6-encoded CatSpert targets sperm calcium channel to Ca²⁺ signaling domains in the flagellar membrane.

Cell Rep. 2022 Jan 5:110226.

Morohoshi A, Miyata H, Oyama Y, Oura S, Noda T, **Ikawa M**.

FAM71F1 binds to RAB2A and RAB2B and is essential for acrosome formation and male fertility in mice.

Development. 2021 Nov 1;148(21):dev199644.

Fujihara Y, Herberg S, Blaha A, Panser K, Kobayashi K, Larasati T, Novatchkova M, Theussl HC, Olszanska O, **Ikawa M**, Pauli A.

The conserved fertility factor SPACA4/Bouncer has divergent modes of action in vertebrate fertilization.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Sep 28; 118(39): e2108777118.

Miyata H, Oura S, Morohoshi A, Shimada K, Mashiko D, Oyama Y, Kaneda Y, Matsumura T, Abbasi F, **Ikawa M**. SPATA33 localizes calcineurin to the mitochondria and regulates sperm motility in mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Aug 31;118(35): e2106673118.

Fujita Y, Hoshina T, Matsuzaki J, **Yoshioka Y**, Kadota T, Hosaka Y, Fujimoto S, Kawamoto H, Watanabe N, Sawaki K, Sakamoto Y, Miyajima M, Lee K, Nakaharai K, Horino T, Nakagawa R, Araya J, Miyato M, Yoshida M, Kuwano K, **Ochiya T**.

Early prediction of COVID-19 severity using extracellular vesicle COPB2.

J Extracell Vesicles. 2021 Jun;10(8):e12092.

Ichinohe N, Ishii M, Tanimizu N, Mizuguchi T, Yoshioka Y, **Ochiya T**, Suzuki H, Mitaka T.

Extracellular vesicles containing miR-146a-5p secreted by bone marrow mesenchymal cells activate hepatocytic progenitors in regenerating rat livers.

Stem Cell Res Ther. 2021 May 29;12(1):312.

Torii C, Maishi N, Kawamoto T, Morimoto M, Akiyama K, **Yoshioka Y**, Minami T, Tsumita T, Alam MT, **Ochiya T**, Hida Y, Hida K.

miRNA-1246 in extracellular vesicles secreted from metastatic tumor induces drug resistance in tumor endothelial cells.

Sci Rep. 2021 Jul 5;11(1):13502. doi: 10.1038/s41598-021-92879-5.

2. 学会発表

(令和3年度)

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)

○Ryuichi Ono

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

リキッドバイオプシーによる毒性評価

第48回日本毒性学会学術年会 (2021.7.1.)

(招待講演)

小野竜一、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48回日本毒性学会学術年会 (2020.6.30.)

(招待講演)

○小野竜一

エクソソームが媒介したレトロトランスポゾンの水平遺伝による哺乳類の誕生

第21回 AB Conference (2021.8.21.)

(招待講演)

○小野竜一

エクソソームが媒介したレトロトランスポゾンの遺伝子水平遺伝による哺乳類の誕生

第93回日本遺伝学会学術年会 (2021.9.8.)

(招待講演)

○Ryuichi Ono

Novel hepatotoxicity biomarkers of exosomal miRNAs acutely induced by CCl4

アジア毒性学会学術年会 (2021.11.2.)

(招待講演)

○Ryuichi Ono

Liquid Biopsy for the Early Detection of Toxicity

韓国毒性学会学術年会 (2021.11.2.)

(招待講演)

小野竜一

ゲノム編集技術の安全性評価

第50回日本環境変異原ゲノム学会 (2021.11.1.)

(招待講演)

○ Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, **Ryuichi Ono**, Satoshi Kitajima

Comprehensive Histone, DNA methylation, and mRNA expression analysis of murine liver repeatedly exposure to

Chemicals - Percellome Project 2022 update -

米国毒性学会学術年会 (2022.3.27.)

○成瀬美衣

Gene expression profiles in CAFs exhibited individual

variations by the co-culture with CRC organoids

第80回日本癌学会学術総会 (2021.9.30.)

○桑形 麻樹子、高島 宏昌、長谷川 拓郎、山崎 浩

史、北嶋 聡: 雄ウサギを用いたサリドマイド経口投与による血漿から精漿中への移行評価

第48回日本毒性学会学術年会(神戸(ハイブリット))2021年7月

○高島 宏昌、羽田 亮、田中 加奈子、関 美沙、長谷川 拓郎、山崎 浩史、北嶋 聡、桑形 麻樹子:

ウサギを用いたサリドマイド経口投与による催奇形作用確認試験

第61回日本先天異常学会学術集会(東京(オンライン))2021年8月

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。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

エクソソーム RNA を毒性指標とした
次世代型催奇形性評価法の開発に資する研究
(21KD1001)

令和3年度 分担研究報告書

分担研究課題：妊娠母動物の毒性評価と胎仔の催奇形性評価

研究分担者 桑形麻樹子
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・室長

研究協力者：高島 宏昌（株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所）
長谷川 拓郎（株式会社ボゾリサーチセンターつくば研究所）

研究要旨

科学技術の進展に伴い年々増加する新規化学物質の安全性確保は極めて重要な課題であり、それらの生体影響の評価には、毒性機序の解明が必須とされるが、特に、生殖発生毒性学の分野は他の毒性分野よりもメカニズム解析が遅れている。評価方法が経験値に依存する由縁でもある。

我々は、これまでに、細胞間情報伝達の1つとして細胞から分泌される小胞であるエクソソーム中に含まれる RNA を指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2 年度）において行い、成獣雄マウスに対して、血液1滴から全身の病理組織学的診断を検出する高感度な系の確立に成功している (**Ono R. et al., *Toxicology Reports* 2020**)。

本研究においては、エクソソーム RNA を腹単位の毒性指標とする次世代型催奇形性評価法の開発を行うことで、これまでの経験重視に依存していた催奇形性の評価をメカニズムに基づいた安全性評価にステップアップし、リスク評価時に常に一定の判断基準による評価が可能となることで、催奇形性作用を持つ化合物の迅速化、高感度化した評価が期待される。

特に、胎児の正常な発生に必須なマイクロ RNA の存在が明らかになり、さらに、マイクロ RNA が催奇形性に寄与している報告もされていることから、本研究により、催奇形性に寄与するエクソソーム中のマイクロ RNA を明らかにすることは、催奇形性のメカニズムの解明に大きく貢献する。

また、エクソソーム RNA を毒性指標とする評価法を催奇形性評価だけでなく、オルガノイド 3D 培養法を利用した代替法への応用も視野に入れた本研究は、生殖発生毒性評価、エクソソーム RNA といった新たなバイオマーカー評価およびオルガノイド 3D 培養による in vitro 評価を融合させた計画となっている。

3年計画の初年度にあたる R3 年度の本分担研究においては、エクソソーム RNA を毒性指標とした次世代型催奇形性評価法の開発のために、マウス母動物血清中並びに胎児及びその附属物中エクソソームの解析のための試料採取法を検討し確立した。また、催奇形性陽性対照物質として、C57BL マウスに外脳症を誘発するバルプロ酸ナトリウムを選択した。バルプロ酸ナトリウムを妊娠マウスに経口投与して母動物血漿中および子宮内容物（胎盤、卵黄囊膜、羊膜、胎児）中の薬物動態を確認し、エクソソーム解析の補助とすることとした。今年度は、母動物血漿中および子宮内容物（胎盤、卵黄囊膜、羊膜、胎児）中における分析バリデーション試験を実施し、分析法を各化学物質投与により催奇形性を発現する動物実験の条件検討を行った。

令和3年度研究（3年計画の1年目）は、計画通りに進捗している。

A. 研究目的

化学物質の有害性評価、特に化審法におけるヒト健康影響に関する有害性において、化学物質の生殖発生への影響を迅速かつ正確に評価することは最重要課題の一つである。現行の生殖発生毒性試験法は、莫大な費用、時間や労力以外に、観察者の経験に依存する部分や、得られる判定基準が必ずしも施設間で一定とは言えない部分がある。

その内の1つである胚・胎児発生に関する試験（発生毒性試験）では、母毒性評価とともに胎児形態観察（外表、内臓および骨格観察）から催奇形性を評価する。その際に、腹内・腹間の感受性に差がある中で、形態変化を異常か変異に分類し、その発現率から催奇形性を判断する事は困難な場合がある。

近年、細胞間情報伝達の1つとして、細胞から分泌される小胞であるエクソソームが注目されている。エクソソームは体液中（血液、髄液など）を循環し、細胞特異的なマイクロRNAを内包することから、研究分担者の東京医大・落谷らは、腫瘍細胞に特異的なマイクロRNAを指標にした、血液1滴による13種類の早期がん診断法（精度95%以上）を開発した経験を持つ。

我々は、エクソソームRNAを指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2年度）において行い、成獣雄マウスに対して、血液1滴から全身の病理組織学的診断を検出しようとする高感度な系の確立に成功している（**Ono R. et al., Toxicology Reports 2020**）。

本研究は、これまでの実績、経験を活かし、エクソソームRNAを指標にした次世代型の催奇形性評価法の確立と催奇形性の発現メカニズムの解明を目的とする。

エクソソーム中に多く内包されることが知られるマイクロRNAが催奇形性に寄与している報告もあることから、本研究の特徴は、エクソソームRNAを指標することで、リスク評価時に常に一定の判断基準による評価が可能な次世代型催奇形性評価法を開発すると同時に、生殖発生毒性のメカニズムの解明にも繋がることである。

また、エクソソームRNAを毒性指標とした動物実験に依存しないオルガノイド3D培養法を利用した次世代型代替法の開発も視野に入れている。オルガノイドは、臓器を構成する能力を持った未分化な組織幹・前駆細胞が、3D培養環境の中で、形態形成過程の特徴を模倣してミニ臓器が形成されるものであり、発生期の模倣モデルとして、化学物質や薬物による毒性影響の評価にも適用できると考えられる。本研

究計画においては、まずは、オルガノイド由来のエクソソームにおいても毒性評価が可能かを明らかにすることを目的としている。動物福祉（3Rs）の観点による代替法への応用を考慮した取組の一環である。具体的には、オルガノイドの培養上清中のエクソソームが *in vivo* のエクソソームと同様に毒性バイオマーカーとなりうるのかの検証を行う。

B. 研究方法

本研究においては、毒性発現メカニズムを考慮した次世代型の生殖発生毒性評価法を確立することを目的に、以下の概要を行う。

エクソソーム解析候補時期の1つである妊娠15日マウスを用いて、解剖および子宮内容物採取方法を確立する。また、薬物投与後のエクソソーム解析の補助として母動物血漿および子宮内容物の薬物動態を確認することとし、催奇形性物質としてバルプロ酸ナトリウムによる分析法を検討する。

・マウスを用いたバルプロ酸ナトリウム経口投与による母動物血清中並びに胎児及びその附属物中エクソソームの解析のための試料採取法

1. 使用動物

動物種：マウス（SPF）

系統：C57BL/6J

供給源：日本チャールス・リバー株式会社

匹数：7匹（妊娠15日）

2. 帝王切開

妊娠15日相当日（膣栓確認日=妊娠0日）の午前中にイソフルランにて母動物を吸入麻酔後、採血（採血候補部位：心採血あるいは腹大動脈）した。

着床の有無により妊娠の成否を確認した。

妊娠が認められた母動物は卵巣および子宮を摘出し、子宮壁を切開後、左右子宮角の着床数を確認した。

卵黄嚢膜に覆われた状態で胚及び胎盤を摘出し、各子宮内容物体ごとに卵黄嚢膜、羊水、胚、胎盤を評価できる試料採取法を検討した。

3. マウス血漿および子宮内容物（卵黄嚢膜、羊水、胚、胎盤）のバルプロ酸ナトリウム濃度測定

上記、2.にて得られた無処置妊娠マウス血漿および妊娠15日の子宮内容物中のバルプロ酸ナトリウム濃度測定のために、LC-MS/MSによる簡易バリデーション試験を実施した。

なお、分析は株式会社ボゾリサーチセンターつくば研究所に委託した。

測定対象物質：バルプロ酸

標準物質：valproic acid sodium slt

ロット番号：WXBD4552V

塩換算係数：0.8677 (=144.21/166.19)

動物実験
内標準物質：Diclofenac sodium salt

ロット番号：P7E3B

（倫理面の配慮）

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

1. 帝王切開

本研究における妊娠期エクソソーム解析は妊娠9日、妊娠15日および妊娠18日を予定している。

研究代表者の先行研究により妊娠15日のエクソソーム解析予備データがあることから、今年度は妊娠15日にて試料を採取した。

2日間にわたり、解剖を実施した。7例いずれも妊娠していた。

2. 母動物採血

麻酔後、心採血および腹大動脈からの採血を試みたが、薬物動態を調べることから血液成分を一定にするために腹大動脈から採血することにした。

ヘパリンNa入りの1mLシリンジにて採血し、1.5 mLチューブに採取して、1000Gにて3分間、遠心し、血漿を分離した。血漿はタンパク低吸着の1.5 mLチューブにいれ、-80°Cの冷凍庫に保管した。

3. 子宮内容物の採取

着床位置に合わせて子宮内容物番号をふり、PBS入り滅菌シャーレ(110x10 mm)中にて子宮壁を両鈍眼科ハサミおよび先鋭ピンセットにて子宮広間膜側を切開し、1個体づつ子宮壁から先曲がりピンセット(NO.7)を用いて子宮壁から剥離させ、PBS入りのペトリディッシュ(35 x10 mm、sterile、Falcon)にいれた。

PBSが入っていない別のペトリディッシュ内で卵黄囊膜の一部マクロスプリング剪刀にて切れ込みをいれ、250 μ Lのエッペンドルフチューブを卵黄囊内に挿入し、羊水を採取した。

羊水採取後、卵黄囊膜を切開し、胚、卵黄囊膜および胎盤に分け、それぞれ2.5 mLのポリプロピレンチューブに入れた。

なお、全てのチューブは試料保管前に重量を測定し、試料保管後に再度重量を測定し、その差を求めて試料重量として記録した。

4. マウス血漿および子宮内容物(卵黄囊膜、羊水、胚、胎盤)のバルプロ酸ナトリウム濃度測定法の分析バリデーション

血漿、羊水、胚、胎盤、卵黄囊膜の検量線の各濃度(血漿、羊水:1.00~2.00 μ g/mL、胎児、胎盤、卵黄囊膜:2.00~4.00 μ g/mL)における真度はそれぞれ、92.5~114.0%、94.5~105.0%、93.5~110%、88.0~105.5%及び85.7~114.5%となり、いずれも判定基準を満たした。従って、検量線の直線性は良好であると判断した。

バリデーション項目(選択性、検量線の直線性)が判定基準を満たしたため、本測定法はマウス血漿、羊水:1.00~2.00 μ g/mL、子宮内容物:2.00~4.00 μ g/mLの範囲にてバルプロ酸濃度測定に適用できると判断した。

D. 考察

令和3年度においては、催奇形性のバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA を単離するための基盤的研究を行った。最初に、妊娠動物を利用した次世代型催奇形性評価法を確立するための動物実験系の確立を行った。具体的には、妊娠15日目にある雌マウスを対象とした、採血方法の検討、血清单離法の検討、胎児由来の羊水の採取方法の検討、用水由来のエクソソーム単離方法の検討である。

我々は、エクソソーム RNA を指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2年度）において行い、成獣雄マウスに対して、血液1滴から全身の病理組織学的診断を検出する高感度な系の確立に成功している（Ono R. *et al.*, *Toxicology Reports* 2020）。

今回、対象動物が、雌マウスおよび胎児になることにより、雄マウスとは異なる点が数多く確認する必要があった。

特に、母動物の血液に加え、胎児由来の羊水のサンプリングおよび胎児からの血液採取など、検証すべき点が数多くあった。また、化学物質投与による催奇形性発現系（VPA）の検討も行っている。R4年度からは、実際にVPAを投与し、催奇形性を発現するモデル系を解析の対象とする予定である。

E. 結論

今年度はエクソソーム解析候補時期の1つである妊娠15日マウスを用いて、解剖および子宮内容物採取の流れを確立した。また、来年度実施予定のVPA動物実験における分析法も確立した。

この手法を基に、その他の妊娠ステージについても検討し、それぞれのステージでの試料採取法に応用する予定である。また、令和4年度に実施する、マウスを用いたVPA経口投与による母動物血清中並びに胎児及びその附属物中エクソソームの解析のための試料採取、および薬物動態を検討するための動物実験の立案に繋げた。

なお、VPA動物実験は、株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所に委託する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

(令和3年度)

Nagaishi T, Watabe T, Kotake K, Kumazawa T, Aida T, Tanaka K, **Ono R**, Ishino F, Usami T, Miura T, Hirakata S, Kawasaki H, Tsugawa N, Yamada D, Hirayama K, Yoshikawa S, Karasuyama H, Okamoto R, Watanabe M, Blumberg RS, Adachi T.

Immunoglobulin A-specific deficiency induces spontaneous inflammation specifically in the ileum.

Gut. 2021 May 7;gutjnl-2020-322873.

○ Shiura H, **Ono R**, Tachibana S, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F.

PEG10 viral aspartic protease domain is essential for the maintenance of fetal capillary structure in the mouse placenta.

Development. 2021 Oct 1;148(19):dev199564.

Tanabe S, Quader S, **Ono R**, Cabral H, Aoyagi K, Hirose A, Yokozaki H, Sasaki H.

Cell Cycle Regulation and DNA Damage Response Networks in Diffuse- and Intestinal-Type Gastric Cancer.

Cancers (Basel). 2021 Nov 18;13(22):5786.

○ **Naruse M**, Ishigamori R, Imai T.

The Unique Genetic and Histological Characteristics of DMBA-Induced Mammary Tumors in an Organoid-Based Carcinogenesis Model.

Front Genet. 2021 Nov 29;12:765131.

Komiya M, Ishigamori R, **Naruse M**, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, Totsuka Y.

Establishment of novel genotoxicity assay system using murine normal epithelial tissue-derived organoids.

Front Genet 2021 Nov 18;12: 768781.

○**Kuwagata M**., Hasegawa T., Takashima H., Shimizu M., Kitajima S., Yamazaki H.:

Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species. *J. Toxicol. Sci.*, 46, 553-560, 2021.

Yamada T., Miura M., Kawamura T., Ushida K., Inoue K., **Kuwagata M**., Katsutani N., Hirose A.: Constructing a developmental and reproductive toxicity database of chemicals (DART NIHS DB) for integrated approaches to testing and assessment. *J Toxicol Sci*. 46, 531-538, 2021.

Taquahashi Y., Saito H., **Kuwagata M**., Kitajima S.: Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals. *Fundam. Toxicol. Sci.* 8, 169-175, 2021.

Yamamoto E., Taquahashi Y., **Kuwagata M**., Saito S., Matsushita K., Toyoda T., Sato F., Kitajima S., Ogawa K., Izutsu K., Saito Y., Hirabayashi Y., Imura Y., Honma M., Okuda H., Goda Y.: Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- μ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. *Int J Pharmaceutics* 595: 120241, 2021.

Harada T, Tsuboi I, Hino H, Yuda M, **Hirabayashi Y**, Hirai S, Aizawa S.

Age-related exacerbation of hematopoietic organ damage induced by systemic hyper-inflammation in senescence-accelerated mice.

Sci Rep. 2021 Dec 1;11(1):23250.

Okubo Y, Ohtake F, Igarashi K, Yasuhiko Y, **Hirabayashi Y**, Saga Y, Kanno J.

Cleaved Delta like 1 intracellular domain regulates neural development via Notch signal-dependent and -independent pathways.

Development. 2021 Oct 1;148(19):dev193664.

Hirabayashi Y, Maki K, Kinoshita K, Nakazawa T, Obika S, Naota M, Watanabe K, Suzuki M, Arato T, Fujisaka A, Fueki O, Ito K, Onodera H.

Considerations of the Japanese Research Working Group for the ICH S6 & Related Issues Regarding Nonclinical Safety Assessments of Oligonucleotide Therapeutics: Comparison with Those of Biopharmaceuticals.

Nucleic Acid Ther. 2021 Apr;31(2):114-125.

Hwang JY, Wang H, Lu Y, **Ikawa M**, Chung JJ.

C2cd6-encoded CatSpert targets sperm calcium channel to Ca²⁺ signaling domains in the flagellar membrane.

Cell Rep. 2022 Jan 5:110226.

Morohoshi A, Miyata H, Oyama Y, Oura S, Noda T, **Ikawa M**.

FAM71F1 binds to RAB2A and RAB2B and is essential for acrosome formation and male fertility in mice.

Development. 2021 Nov 1;148(21):dev199644.

Fujihara Y, Herberg S, Blaha A, Panser K, Kobayashi K, Larasati T, Novatchkova M, Theussl HC, Olszanska O, **Ikawa M**, Pauli A.

The conserved fertility factor SPACA4/Bouncer has divergent modes of action in vertebrate fertilization.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Sep 28; 118(39): e2108777118.

Miyata H, Oura S, Morohoshi A, Shimada K, Mashiko D, Oyama Y, Kaneda Y, Matsumura T, Abbasi F, **Ikawa M**. SPATA33 localizes calcineurin to the mitochondria and regulates sperm motility in mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Aug 31;118(35): e2106673118.

Fujita Y, Hoshina T, Matsuzaki J, **Yoshioka Y**, Kadota T, Hosaka Y, Fujimoto S, Kawamoto H, Watanabe N, Sawaki K, Sakamoto Y, Miyajima M, Lee K, Nakaharai K, Horino T, Nakagawa R, Araya J, Miyato M, Yoshida M, Kuwano K, **Ochiya T**.

Early prediction of COVID-19 severity using extracellular vesicle COPB2.

J Extracell Vesicles. 2021 Jun;10(8):e12092.

Ichinohe N, Ishii M, Tanimizu N, Mizuguchi T, Yoshioka Y, **Ochiya T**, Suzuki H, Mitaka T.

Extracellular vesicles containing miR-146a-5p secreted by bone marrow mesenchymal cells activate hepatocytic progenitors in regenerating rat livers.

Stem Cell Res Ther. 2021 May 29;12(1):312.

Torii C, Maishi N, Kawamoto T, Morimoto M, Akiyama K, **Yoshioka Y**, Minami T, Tsumita T, Alam MT, **Ochiya T**, Hida Y, Hida K.

miRNA-1246 in extracellular vesicles secreted from metastatic tumor induces drug resistance in tumor endothelial cells.

Sci Rep. 2021 Jul 5;11(1):13502. doi: 10.1038/s41598-021-92879-5.

2. 学会発表

(令和3年度)

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)

○**Ryuichi Ono**

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

リキッドバイオプシーによる毒性評価

第48回日本毒性学会学術年会 (2021.7.1.)

(招待講演)

小野竜一、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48回日本毒性学会学術年会 (2020.6.30.)

(招待講演)

○小野竜一

エクソソームが媒介したレトロトランスポゾンの水平遺伝による哺乳類の誕生

第21回 AB Conference (2021.8.21.)

(招待講演)

○小野竜一

エクソソームが媒介したレトロトランスポゾンの遺伝子水平遺伝による哺乳類の誕生

第93回日本遺伝学会学術年会 (2021.9.8.)

(招待講演)

○**Ryuichi Ono**

Novel hepatotoxicity biomarkers of exosomal miRNAs acutely induced by CCl4

アジア毒性学会学術年会 (2021.11.2.)

(招待講演)

○**Ryuichi Ono**

Liquid Biopsy for the Early Detection of Toxicity

韓国毒性学会学術年会 (2021.11.2.)

(招待講演)

小野竜一

ゲノム編集技術の安全性評価

第50回日本環境変異原ゲノム学会 (2021.11.1.)

(招待講演)

○ Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, **Ryuichi Ono**, Satoshi Kitajima

Comprehensive Histone, DNA methylation, and mRNA expression analysis of murine liver repeatedly exposure to Chemicals - Percellome Project 2022 update - 米国毒性学会学術年会 (2022.3.27.)

○成瀬美衣

Gene expression profiles in CAFs exhibited individual variations by the co-culture with CRC organoids

第80回日本癌学会学術総会 (2021.9.30.)

○**桑形 麻樹子**、高島 宏昌、長谷川 拓郎、山崎 浩史、北嶋 聡：雄ウサギを用いたサリドマイド経口投与による血漿から精漿中への移行評価
第48回日本毒性学会学術年会(神戸(ハイブリット))2021年7月

○高島 宏昌、羽田 亮、田中 加奈子、関 美沙、長谷川 拓郎、山崎 浩史、北嶋 聡、**桑形 麻樹子**：ウサギを用いたサリドマイド経口投与による催奇形作用確認試験
第61回日本先天異常学会学術集会(東京(オンライン))2021年8月

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。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

エクソソーム RNA を毒性指標とした
次世代型催奇形性評価法の開発に資する研究
(21KD1001)

令和3年度 分担研究報告書

分担研究課題：オルガノイド由来エクソソームによる毒性評価

研究分担者 成瀬美衣

国立がん研究センター・研究所・動物実験施設・研究員

研究協力者：野崎弘枝 国立がん研究センター・研究所・動物実験施設

研究要旨

科学技術の進展に伴い年々増加する新規化学物質の安全性確保は極めて重要な課題であり、それらの生体影響の評価には、毒性機序の解明が必須とされるが、特に、生殖発生毒性学の分野は他の毒性分野よりもメカニズム解析が遅れている。評価方法が経験値に依存する由縁でもある。

我々は、これまでに、細胞間情報伝達の1つとして細胞から分泌される小胞であるエクソソーム中に含まれる RNA を指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2年度）において行い、成獣雄マウスに対して、血液1滴から全身の病理組織学的診断を検出しうる高感度な系の確立に成功している (Ono R. et al., Toxicology Reports 2020)。

本研究においては、エクソソーム RNA を腹単位の毒性指標とする次世代型催奇形性評価法の開発を行うことで、これまでの経験重視に依存していた催奇形性の評価をメカニズムに基づいた安全性評価にステップアップし、リスク評価時に常に一定の判断基準による評価が可能となることで、催奇形性作用を持つ化合物の迅速化、高感度化した評価が期待される。

特に、胎児の正常な発生に必須なマイクロ RNA の存在が明らかになり、さらに、マイクロ RNA が催奇形性に寄与している報告もされていることから、本研究により、催奇形性に寄与するエクソソーム中のマイクロ RNA を明らかにすることは、催奇形性のメカニズムの解明に大きく貢献する。

また、エクソソーム RNA を毒性指標とする評価法を催奇形性評価だけでなく、オルガノイド 3D 培養法を利用した代替法への応用も視野に入れた本研究は、生殖発生毒性評価、エクソソーム RNA といった新たなバイオマーカー評価およびオルガノイド 3D 培養による in vitro 評価を融合させた計画となっている。

3年計画の初年度にあたる R3 年度の本分担研究においては、オルガノイド 3D 培養法を利用した代替法の検討のために、マウスの肺、肝臓、大腸よりオルガノイドの樹立することに成功した。

令和3年度研究（3年計画の1年目）は、計画通りに進捗している。

A. 研究目的

化学物質の有害性評価、特に化審法におけるヒト健康影響に関する有害性において、化学物質の生殖発生への影響を迅速かつ正確に評価することは最重要課題の一つである。現行の生殖発生毒性試験法は、莫大な費用、時間や労力以外に、観察者の経験に依存する部分や、得られる判定基準が必ずしも施設間で一定とは言えない部分がある。

その内の1つである胚・胎児発生に関する試験（発生毒性試験）では、母毒性評価とともに胎児形態観察（外表、内臓および骨格観察）から催奇形性を評価する。その際に、腹内・腹間の感受性に差がある中で、形態変化を異常か変異に分類し、その発現率から催奇形性を判断する事は困難な場合がある。

近年、細胞間情報伝達の1つとして、細胞から分泌される小胞であるエクソソームが注目されている。エクソソームは体液中（血液、髄液など）を循環し、

細胞特異的なマイクロ RNA を内包することから、研究分担者の東京医大・落谷らは、腫瘍細胞に特異的なマイクロ RNA を指標にした、血液 1 滴による 13 種類の早期がん診断法（精度 95 % 以上）を開発した経験を持つ。

我々は、エクソソーム RNA を指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2 年度）において行い、成獣雄マウスに対して、血液 1 滴から全身の病理組織学的診断を検出する高感度な系の確立に成功している（**Ono R.** et al., *Toxicology Reports* 2020）。

本研究は、これまでの実績、経験を活かし、エクソソーム RNA を指標にした次世代型の催奇形性評価法の確立と催奇形性の発現メカニズムの解明を目的とする。

エクソソーム中に多く内包されることが知られるマイクロ RNA が催奇形性に寄与している報告もあることから、本研究の特徴は、エクソソーム RNA を指標することで、リスク評価時に常に一定の判断基準による評価が可能な次世代型催奇形性評価法を開発すると同時に、生殖発生毒性のメカニズムの解明にも繋がることである。

また、エクソソーム RNA を毒性指標とした動物実験に依存しないオルガノイド 3D 培養法を利用した次世代型代替法の開発も視野に入れている。オルガノイドは、臓器を構成する能力を持った未分化な組織幹・前駆細胞が、3D 培養環境の中で、形態形成過程の特徴を模倣してミニ臓器が形成されるものであり、発生期の模倣モデルとして、化学物質や薬物による毒性影響の評価にも適用できると考えられる。本研究計画においては、まずは、オルガノイド由来のエクソソームにおいても毒性評価が可能かを明らかにすることを目的としている。動物福祉（3Rs）の観点による代替法への応用を考慮した取組の一環である。具体的には、オルガノイドの培養上清中のエクソソームが *in vivo* のエクソソームと同様に毒性バイオマーカーとなりうるのかの検証を行う。

B. 研究方法

本研究においては、毒性発現メカニズムを考慮した次世代型の生殖発生毒性評価法を確立することを目的に、以下の概要を行う。

● *in vivo* の特性を高度に保存した *in vitro* モデルとされるオルガノイド 3D 培養法の培養上清中に細胞より分泌されるエクソソームを毒性指標として利用可能かを検討し、動物実験によらない次世代型代替法の開発を行う。

・オルガノイドの培養上清中に含まれるエクソソーム RNA をバイオマーカーに用いた代替法の検討

C57BL6/J ♂マウス（5 週齢）および F1（C57BL6/J ♂ x JF1）（5 週齢）マウスを解剖し、肝臓、肺、大腸を採取する。これらをハサミにて 1mm 角に刻み、PBS にて洗浄後に collagenase 処理を行う。その後 40 μm セルストレーナーを通し、酵素的および物理的に組織を破碎した後、MBOC（Matrigel Bilayer Organoid Culture）法を用いて細胞をマトリゲルに包埋し、各臓器毎の至適培地を添加し培養を行った。

（倫理面の配慮）

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

・オルガノイドの培養上清中に含まれるエクソソーム RNA をバイオマーカーに用いた代替法の検討 (成瀬)

近年開発されたオルガノイド 3D 培養法は、*in vivo* の特性を高度に保存した *in vitro* モデルとなっている。オルガノイドは、臓器を構成する能力を持った未分化な組織幹・前駆細胞が、3D 培養環境の中で、形態形成過程の特徴を模倣してミニ臓器が形成されるものであり、発生期の模倣モデルとして、化学物質や薬物による毒性影響の評価にも適用できるものと考えられる。本研究計画においては、まずは、オルガノイド由来のエクソソームにおいても毒性評価が可能かを明らかにする。

血液中のエクソソーム RNA を毒性指標とした我々の次世代型毒性評価法は、迅速かつ高感度に評価可能な方法になっている。しかしながら、動物愛護の観点から、今後において、動物実験によらない毒性評価が必要となる可能性を考慮し、我々が既に単離している毒性バイオマーカーであるエクソソーム RNA が、オルガノイド 3D 培養上清中に細胞より分泌されるエクソソームにおいても毒性指標となるのかを検討を行う。

R3 年度においては、C57BL6/J ♂マウス (5 週齢) の肝臓、肺、大腸よりオルガノイドの作製を行った。具体的には、C57BL6/J ♂マウス (5 週齢) の解剖を行い、肝臓、肺、大腸の採取を行なった。全ての解剖用具は、乾熱滅菌済みのものを使用した。

大腸については、腸管を切開し、腸管の内容物を取り除く作業を行う。その後、肝臓、肺、大腸を PBS にて、3 回洗浄を行った。

当該臓器を滅菌消毒済みのハサミにて 1mm 角に刻み、PBS にて洗浄後に collagenase 処理を行った。その後、40 μm 幅のセルストレーナーにて、フィルトレーションを行い、酵素的および物理的に組織を破碎した後に、MBOC (Matrigel Bilayer Organoid Culture) 法を用いて細胞をマトリゲルに包埋し、各臓器毎の至適培地を添加し培養を行った。

その後、数回のパッセージを経て、オルガノイド 3D 培養法を利用した代替法の検討のためのマウスの肺、肝臓、大腸由来のオルガノイドを樹立することに成功した。

樹立したオルガノイドは、以下の 3 種類である。

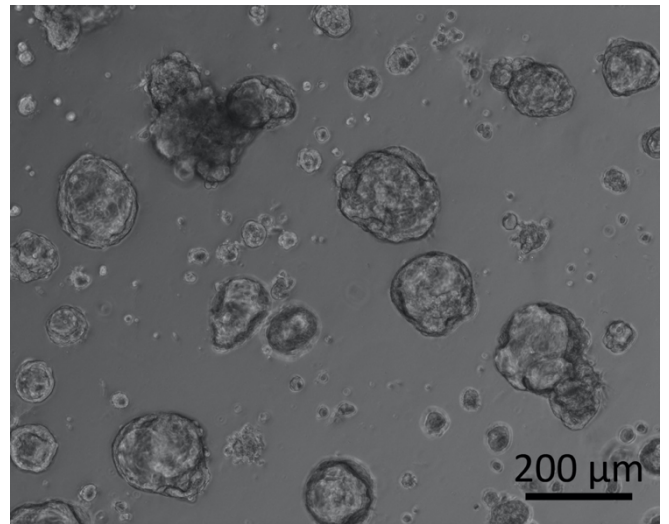


図: C57BL6/Jの肺から樹立したオルガノイドの位相差顕微鏡像。(スケールバー=200 μm)

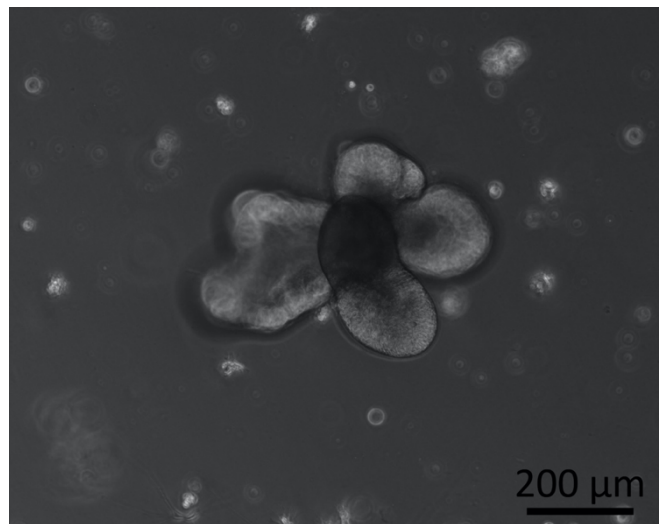


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイドの位相差顕微鏡像。(スケールバー=200 μm)

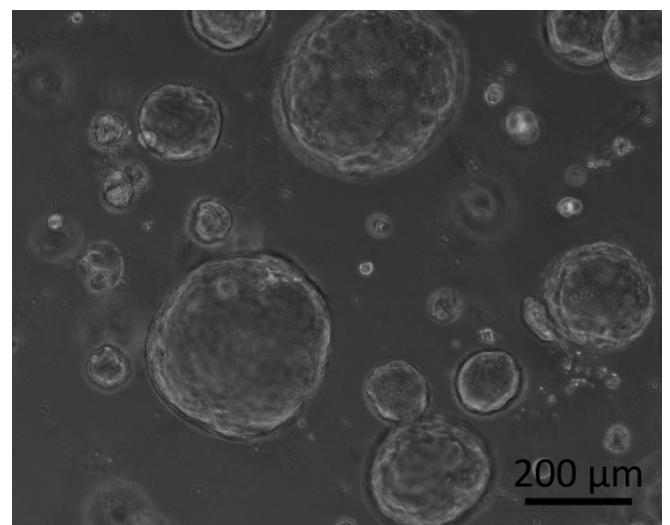


図: C57BL6/Jの大腸から樹立したオルガノイドの位相差顕微鏡像。(スケールバー=200 μm)

R4年度において、オルガノイドの培養上清中のエクソソームによる毒性評価が可能であるかを検証するために、本年度においては、樹立に成功したオルガノイドの培養上清を10 ml 採取することをを行った。

採取した培養上清は、コニカルチューブに移し、冷凍保存し、エクソソームの超遠心ペレットダウン法による抽出を行うために、研究代表者である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・小野に送った。R4年度の解析に備え、現在、デュープフリーザーの中に凍結保存中である。

R4年度において、これらの培養上清が、*in vivo* を反映しうるのかの評価を行う予定である。

D. 考察

近年、血液中には、身体中の様々な細胞より分泌される数十から百ナノメートル程度の脂質二重膜の小胞であるエクソソームが存在することが明らかになっている。エクソソームの中に含まれる RNA, DNA, タンパク質には、細胞特異的なものが含まれ、例えば、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 %を超える診断精度が謳われていることから、我々は化学物質による毒性や医薬品の副作用により障害を受けた細胞より特異的なエクソソームが放出されることが明らかにするなど、これらの指標は、発がんや、様々な疾患、毒性などの様々な評価の為に新規バイオマーカーとしての有効である、すなわちリキッドバイオプシーが有効であることを証明してきた。

エクソソームは、あらゆる細胞から体液中に分泌されるものであり、血液中のエクソソームだけでなく、尿中、唾液中のエクソソームをバイオマーカーとした早期発がん診断系の開発が進められている。

また、培養細胞においては、培養上清中へとエクソソームが分泌されることが知られており、培養上清中のエクソソームも発がんや毒性の良い指標となり得ると考えられてきた。

しかしながら、実際は、通常の培養条件においては、培養細胞は *in vivo* の特徴を反映しておらず、その培養上清中のエクソソームは、高度な毒性指標とは成り得ない問題があった。

しかしながら、3D 培養法を利用したオルガノイドは、高度に *in vivo* の特徴を反映しており、その培養上清は、毒性指標としての利用も行える可能性が高かった。

そこで、本分担研究では、オルガノイドの 3D 培養上清中のエクソソーム RNA を毒性指標とした動物実験に依存しない次世代型代替法の開発の可能性を検証することであった。

R3 年度は、C57BL6/J ♂マウス（5 週齢）の解剖を行い、肺、肝臓および大腸を採取し、それらからオルガノイドを樹立することに成功した。

R4 年度以降に、これらのオルガノイドの培養上清に分泌されるエクソソームが、*in vivo* でのエクソソームを反映しているのかを検証していくために、今年度樹立に成功したオルガノイドの培養上清を採取

し、凍結を行った。また、R4 年度には、オルガノイドに化学物質を添加し、*in vivo* と同様の挙動を示すのかを検証する予定である。

E. 結論

本研究は、R3 年度の研究計画通りに進捗した。

R3 年度研究（3 年計画の 1 年目）研究において、以下の項目において進捗が見られた。

- ・オルガノイド 3D 培養法を利用した代替法の検討のために、マウスの肺、肝臓、大腸よりオルガノイドの樹立することに成功した。

R4 年度以降に、これらのオルガノイドを利用して、毒性バイオマーカーとして単離したエクソソーム RNA が、*in vitro* においても機能しうるのかの検証を行う。

本研究を推進することで、エクソソーム RNA を指標としたリスク評価により、常に一定の判断基準による評価が可能な次世代型催奇形性評価法を開発すると同時に、生殖発生毒性のメカニズムの解明にも繋げられると考えられ、厚生労働行政に貢献しうる研究開発となっている。

F. 研究発表

1. 論文発表

(令和3年度)

Nagaishi T, Watabe T, Kotake K, Kumazawa T, Aida T, Tanaka K, **Ono R**, Ishino F, Usami T, Miura T, Hirakata S, Kawasaki H, Tsugawa N, Yamada D, Hirayama K, Yoshikawa S, Karasuyama H, Okamoto R, Watanabe M, Blumberg RS, Adachi T.

Immunoglobulin A-specific deficiency induces spontaneous inflammation specifically in the ileum.

Gut. 2021 May 7;gutjnl-2020-322873.

○ Shiura H, **Ono R**, Tachibana S, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F.

PEG10 viral aspartic protease domain is essential for the maintenance of fetal capillary structure in the mouse placenta.

Development. 2021 Oct 1;148(19):dev199564.

Tanabe S, Quader S, **Ono R**, Cabral H, Aoyagi K, Hirose A, Yokozaki H, Sasaki H.

Cell Cycle Regulation and DNA Damage Response Networks in Diffuse- and Intestinal-Type Gastric Cancer.

Cancers (Basel). 2021 Nov 18;13(22):5786.

○ **Naruse M**, Ishigamori R, Imai T.

The Unique Genetic and Histological Characteristics of DMBA-Induced Mammary Tumors in an Organoid-Based Carcinogenesis Model.

Front Genet. 2021 Nov 29;12:765131.

Komiya M, Ishigamori R, **Naruse M**, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, Totsuka Y.

Establishment of novel genotoxicity assay system using murine normal epithelial tissue-derived organoids.

Front Genet 2021 Nov 18;12: 768781.

○**Kuwagata M**., Hasegawa T., Takashima H., Shimizu M., Kitajima S., Yamazaki H.:

Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species. *J. Toxicol. Sci.*, 46, 553-560, 2021.

Yamada T., Miura M., Kawamura T., Ushida K., Inoue K., **Kuwagata M**., Katsutani N., Hirose A.: Constructing a developmental and reproductive toxicity database of chemicals (DART NIHS DB) for integrated approaches to testing and assessment. *J Toxicol Sci*. 46, 531-538, 2021.

Taquahashi Y., Saito H., **Kuwagata M**., Kitajima S.: Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals. *Fundam. Toxicol. Sci.* 8, 169-

175, 2021.

Yamamoto E., Taquahashi Y., **Kuwagata M**., Saito S., Matsushita K., Toyoda T., Sato F., Kitajima S., Ogawa K., Izutsu K., Saito Y., Hirabayashi Y., Imura Y., Honma M., Okuda H., Goda Y.: Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- μ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. *Int J Pharmaceutics* 595: 120241, 2021.

Harada T, Tsuboi I, Hino H, Yuda M, **Hirabayashi Y**, Hirai S, Aizawa S.

Age-related exacerbation of hematopoietic organ damage induced by systemic hyper-inflammation in senescence-accelerated mice.

Sci Rep. 2021 Dec 1;11(1):23250.

Okubo Y, Ohtake F, Igarashi K, Yasuhiko Y, **Hirabayashi Y**, Saga Y, Kanno J.

Cleaved Delta like 1 intracellular domain regulates neural development via Notch signal-dependent and -independent pathways.

Development. 2021 Oct 1;148(19):dev193664.

Hirabayashi Y, Maki K, Kinoshita K, Nakazawa T, Obika S, Naota M, Watanabe K, Suzuki M, Arato T, Fujisaka A, Fueki O, Ito K, Onodera H.

Considerations of the Japanese Research Working Group for the ICH S6 & Related Issues Regarding Nonclinical Safety Assessments of Oligonucleotide Therapeutics: Comparison with Those of Biopharmaceuticals.

Nucleic Acid Ther. 2021 Apr;31(2):114-125.

Hwang JY, Wang H, Lu Y, **Ikawa M**, Chung JJ.

C2cd6-encoded CatSpert targets sperm calcium channel to Ca²⁺ signaling domains in the flagellar membrane.

Cell Rep. 2022 Jan 5:110226.

Morohoshi A, Miyata H, Oyama Y, Oura S, Noda T, **Ikawa M**.

FAM71F1 binds to RAB2A and RAB2B and is essential for acrosome formation and male fertility in mice.

Development. 2021 Nov 1;148(21):dev199644.

Fujihara Y, Herberg S, Blaha A, Panser K, Kobayashi K, Larasati T, Novatchkova M, Theussl HC, Olszanska O, **Ikawa M**, Pauli A.

The conserved fertility factor SPACA4/Bouncer has divergent modes of action in vertebrate fertilization.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Sep 28; 118(39): e2108777118.

Miyata H, Oura S, Morohoshi A, Shimada K, Mashiko D, Oyama Y, Kaneda Y, Matsumura T, Abbasi F, **Ikawa M**.

SPATA33 localizes calcineurin to the mitochondria and regulates sperm motility in mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Aug 31;118(35): e2106673118.

Fujita Y, Hoshina T, Matsuzaki J, **Yoshioka Y**, Kadota T, Hosaka Y, Fujimoto S, Kawamoto H, Watanabe N, Sawaki K, Sakamoto Y, Miyajima M, Lee K, Nakaharai K, Horino T, Nakagawa R, Araya J, Miyato M, Yoshida M, Kuwano K, **Ochiya T**.

Early prediction of COVID-19 severity using extracellular vesicle COPB2.

J Extracell Vesicles. 2021 Jun;10(8):e12092.

Ichinohe N, Ishii M, Tanimizu N, Mizuguchi T, Yoshioka Y, **Ochiya T**, Suzuki H, Mitaka T.

Extracellular vesicles containing miR-146a-5p secreted by bone marrow mesenchymal cells activate hepatocytic progenitors in regenerating rat livers.

Stem Cell Res Ther. 2021 May 29;12(1):312.

Torii C, Maishi N, Kawamoto T, Morimoto M, Akiyama K, **Yoshioka Y**, Minami T, Tsumita T, Alam MT, **Ochiya T**, Hida Y, Hida K.

miRNA-1246 in extracellular vesicles secreted from metastatic tumor induces drug resistance in tumor endothelial cells.

Sci Rep. 2021 Jul 5;11(1):13502. doi: 10.1038/s41598-021-92879-5.

2. 学会発表

(令和3年度)

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)

○**Ryuichi Ono**

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

リキッドバイオプシーによる毒性評価

第48回日本毒性学会学術年会 (2021.7.1.)

(招待講演)

小野竜一、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48回日本毒性学会学術年会 (2020.6.30.)

(招待講演)

○小野竜一

エクソソームが媒介したレトロトランスポゾンの水平遺伝による哺乳類の誕生

第21回 AB Conference (2021.8.21.)

(招待講演)

○小野竜一

エクソソームが媒介したレトロトランスポゾンの遺伝子水平遺伝による哺乳類の誕生

第93回日本遺伝学会学術年会 (2021.9.8.)

(招待講演)

○**Ryuichi Ono**

Novel hepatotoxicity biomarkers of exosomal miRNAs acutely induced by CCl4

アジア毒性学会学術年会 (2021.11.2.)

(招待講演)

○**Ryuichi Ono**

Liquid Biopsy for the Early Detection of Toxicity

韓国毒性学会学術年会 (2021.11.2.)

(招待講演)

小野竜一

ゲノム編集技術の安全性評価

第50回日本環境変異原ゲノム学会 (2021.11.1.)

(招待講演)

○ Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, **Ryuichi Ono**, Satoshi Kitajima

Comprehensive Histone, DNA methylation, and mRNA expression analysis of murine liver repeatedly exposure to

Chemicals - Percellome Project 2022 update -

米国毒性学会学術年会 (2022.3.27.)

○成瀬美衣

Gene expression profiles in CAFs exhibited individual variations by the co-co-culture with CRC organoids

第80回日本癌学会学術総会 (2021.9.30.)

○**桑形 麻樹子**、高島 宏昌、長谷川 拓郎、山崎 浩史、北嶋 聡：雄ウサギを用いたサリドマイド経口投与による血漿から精漿中への移行評価

第48回日本毒性学会学術年会(神戸(ハイブリット))2021年7月

○高島 宏昌、羽田 亮、田中 加奈子、関 美沙、長谷川 拓郎、山崎 浩史、北嶋 聡、**桑形 麻樹子**：ウサギを用いたサリドマイド経口投与による催奇形作用確認試験

第61回日本先天異常学会学術集会(東京(オンライン))2021年8月

○高島 宏昌、羽田 亮、田中 加奈子、関 美沙、長谷川 拓郎、山崎 浩史、北嶋 聡、**桑形 麻樹子**：ウサギを用いたサリドマイド経口投与による催奇形作用確認試験

第61回日本先天異常学会学術集会(東京(オンライン))2021年8月

第61回日本先天異常学会学術集会(東京(オンライン))2021年8月

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。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

エクソソーム RNA を毒性指標とした
次世代型催奇形性評価法の開発に資する研究
(21KD1001)

令和3年度 分担研究報告書

分担研究課題：ノックアウトマウスの作製

研究分担者：伊川正人

大阪大学・微生物病研究所・動物実験施設・教授

研究協力者：江森 千紘 大阪大学・微生物病研究所・動物実験施設・助教

Yonggang Lu 大阪大学・微生物病研究所・動物実験施設・特任助教

研究要旨

科学技術の進展に伴い年々増加する新規化学物質の安全性確保は極めて重要な課題であり、それらの生体影響の評価には、毒性機序の解明が必須とされるが、特に、生殖発生毒性学の分野は他の毒性分野よりもメカニズム解析が遅れている。評価方法が経験値に依存する由縁でもある。

我々は、これまでに、細胞間情報伝達の1つとして細胞から分泌される小胞であるエクソソーム中に含まれる RNA を指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業 (H30-R2 年度) において行い、成獣雄マウスに対して、血液1滴から全身の病理組織学的診断を検出する高感度な系の確立に成功している (Ono R. et al., *Toxicology Reports* 2020)。

本研究においては、エクソソーム RNA を腹単位の毒性指標とする次世代型催奇形性評価法の開発を行うことで、これまでの経験重視に依存していた催奇形性の評価をメカニズムに基づいた安全性評価にステップアップし、リスク評価時に常に一定の判断基準による評価が可能となることで、催奇形性作用を持つ化合物の迅速化、高感度化した評価が期待される。

特に、胎児の正常な発生に必須なマイクロ RNA の存在が明らかになり、さらに、マイクロ RNA が催奇形性に寄与している報告もされていることから、本研究により、催奇形性に寄与するエクソソーム中のマイクロ RNA を明らかにすることは、催奇形性のメカニズムの解明に大きく貢献する。

また、エクソソーム RNA を毒性指標とする評価法を催奇形性評価だけでなく、オルガノイド 3D 培養法を利用した代替法への応用も視野に入れた本研究は、生殖発生毒性評価、エクソソーム RNA といった新たなバイオマーカー評価およびオルガノイド 3D 培養による *in vitro* 評価を融合させた計画となっている。

3年計画の初年度にあたる R3 年度の本分担研究においては、化学物質投与をすることなく胎児に形態形成異常を引き起こす遺伝子改変マウスの導入および作製にも成功した。

令和3年度研究（3年計画の1年目）は、計画通りに進捗している。

A. 研究目的

化学物質の有害性評価、特に化審法におけるヒト健康影響に関する有害性において、化学物質の生殖発生への影響を迅速かつ正確に評価することは最重要課題の一つである。現行の生殖発生毒性試験法は、

莫大な費用、時間や労力以外に、観察者の経験に依存する部分や、得られる判定基準が必ずしも施設間で一定とは言えない部分がある。

その内の1つである胚・胎児発生に関する試験（発生毒性試験）では、母毒性評価とともに胎児形態観

察（外表、内臓および骨格観察）から催奇形性を評価する。その際に、腹内・腹間の感受性に差がある中で、形態変化を異常か変異に分類し、その発現率から催奇形性を判断する事は困難な場合がある。

近年、細胞間情報伝達の1つとして、細胞から分泌される小胞であるエクソソームが注目されている。エクソソームは体液中（血液、髄液など）を循環し、細胞特異的なマイクロRNAを内包することから、研究分担者の東京医大・落谷らは、腫瘍細胞に特異的なマイクロRNAを指標にした、血液1滴による13種類の早期がん診断法（精度95%以上）を開発した経験を持つ。

我々は、エクソソームRNAを指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2年度）において行い、成獣雄マウスに対して、血液1滴から全身の病理組織学的診断を検出しようとする高感度な系の確立に成功している（**Ono R. et al., Toxicology Reports 2020**）。

本研究は、これまでの実績、経験を活かし、エクソソームRNAを指標にした次世代型の催奇形性評価法の確立と催奇形性の発現メカニズムの解明を目的とする。

エクソソーム中に多く内包されることが知られるマイクロRNAが催奇形性に寄与している報告もあることから、本研究の特徴は、エクソソームRNAを指標することで、リスク評価時に常に一定の判断基準による評価が可能な次世代型催奇形性評価法を開発すると同時に、生殖発生毒性のメカニズムの解明にも繋がることである。

また、エクソソームRNAを毒性指標とした動物実験に依存しないオルガノイド3D培養法を利用した次世代型代替法の開発も視野に入れている。オルガノイドは、臓器を構成する能力を持った未分化な組織幹・前駆細胞が、3D培養環境の中で、形態形成過程の特徴を模倣してミニ臓器が形成されるものであり、発生期の模倣モデルとして、化学物質や薬物による毒性影響の評価にも適用できると考えられる。本研究計画においては、まずは、オルガノイド由来のエクソソームにおいても毒性評価が可能かを明らかにすることを目的としている。動物福祉（3Rs）の観点による代替法への応用を考慮した取組の一環である。具体的には、オルガノイドの培養上清中のエクソソームが *in vivo* のエクソソームと同様に毒性バイオマーカーとなりうるのかの検証を行う。

B. 研究方法

本分担研究においては、毒性発現メカニズムを考慮

した次世代型の生殖発生毒性評価法を確立することを目的に、以下の概要を行う。

● 本研究で同定された催奇形性のバイオマーカーとなるエクソソームRNAのノックアウトマウスおよび過剰発現マウスを作製することで、催奇形性の発現メカニズムを解明する。

● 催奇形性解析に適したモデルマウスの作製を行う。

・遺伝子改変マウスを利用した発生異常および形態形成異常に特異的なバイオマーカーの単離

発生ステージに特異的なマイクロRNAの変異マウスの作製、および催奇形性解析に適したモデルマウスの作製を行う。

遺伝子改変マウスの作製には、エレクトロポレーションによるCRISPR/Cas9 RNP導入法を利用する。その手順は、以下の通りである。

ガイド(g) RNA の調整

crRNA 溶液 (100 μ M)、tracrRNA 溶液 (100 μ M)、をRNase free waterにより10 μ Mに希釈し、95°Cで1分間インキュベート後に室温に1時間ほど静置。

10 μ MのgRNAをOPTI-MEMで200 ng/ μ lに希釈する。

エレクトロポレーション用の溶液の調整

• Cas9 溶液(1 μ g/ μ l)	4 μ l
• gRNA 溶液(200 ng/ μ l)	8 μ l
• oligoDNA (2 μ g/ μ l)	4 μ l
• OPTI-MEM	24 μ l

利用するtracrRNAおよびCas9タンパクは、以下を使用。

tracrRNA (Sigma)

cat no. TRACRRNA05N

Cas9 (Thermo Fisher Scientific)

TrueCut Cas9 Protein V2

cat no. A36497 (25 μ g)

37°Cで5分間インキュベート後にoligoDNA (ssODN or dsDNA, final: 200 ng/ μ l)を添加し、Nepagene製エレクトロポレーターにて、マウス受精卵にエレクトロポレーションを行う。エレクトロポレーションの設定値は、以下の通りである。

（上段：Poring Pulse, 下段：Transfer Pulse）

項目：Voltage [V], Pulse Length [msec], Pulse Interval [msec], Number of pulses, Decay Rate [%]

上段：225 V、2 msec、50 msec、4 pulses、10 rate、+

下段：20 V、50 msec、50 msec、5 pulses、40 rate、+
/-

(倫理面の配慮)

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

・遺伝子改変動物作製による催奇形性モデルの作出 (伊川)

効率よく催奇形性を発現させるモデルを作出するために、遺伝子改変動物の導入および作出を行う。父性発現インプリンティング遺伝子 *Peg10* および母性発現インプリンティング遺伝子 *Mash2* は、胎盤形成に必須な遺伝子であり、その欠損マウスにおいては、胎盤形成不全により致死になることが報告されている。

これらの遺伝子は、インプリンティング遺伝子であるので、子宮内において、野生型:KO=1:1の比率で存在する。よって、効率よくKO個体を得ることができる特徴がある。

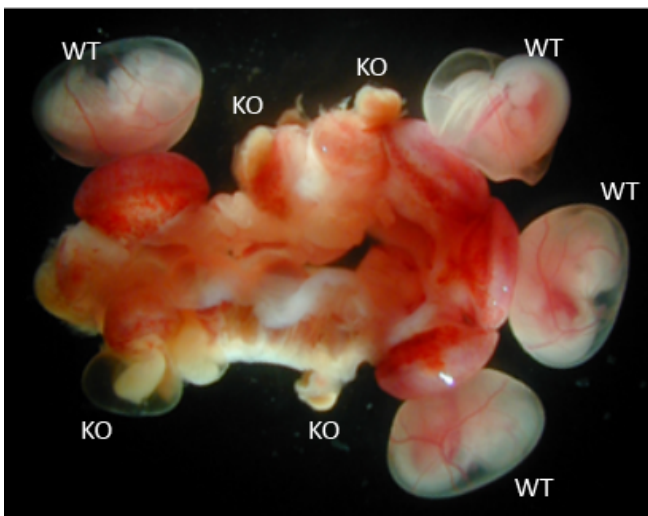


図: 野生型♀マウスと*Peg10* KO マウスを交配し、受精後1日目での解剖像。野生型 (WT) と *Peg10* 欠損 (KO) の個体が 1:1 の比率で確認できる。

そこで、これらの遺伝子欠損マウスの導入および作出を行った。*Mash2* 欠損マウスについては、国立医薬品食品衛生研究所で既に維持していた系統を繁殖させ、催奇形性のモデルマウスとして利用する準備が完了した。*Peg10* 欠損マウスについては、大阪大学において、CRISPR/Cas9 システムを用いて、*Peg10* 欠損マウスの作製を行ない、1匹の遺伝子改変動物を得られた。

また、エクソソーム RNA は、形態形成異常以外にも、*Irf2* KO マウスの解析結果より、炎症反応などのバイオマーカーとなりうる事が本研究において明らかになったことから、胎児の代謝異常などの検出も可能になるかの検討を行うこととした。遺伝子欠損により体内の銅代謝異常が起こることが知られる *Atp7b* 遺伝子の変異マウスの作製を行い、複数のラインの *Atp7b* 変異マウスの作製に成功している。

Atp7b 遺伝子のエクソン8およびエクソン11をターゲットとして受精卵においてゲノム編集を行い、産まれた変異マウスのオンターゲット部位のゲノム

編集結果を下記に示した。

マウス名前	雌雄	アレル1	アレル2
Atp7b-ex8-01	♂	8bp deletion	2bp insertion
Atp7b-ex8-02	♂	逆位挿入	
Atp7b-ex8-03	♂		
Atp7b-ex8-04	♂	2bp insertion	1bp insertion
Atp7b-ex8-12	♂	6bp deletion	
Atp7b-ex8-13	♂	Large deletion	
Atp7b-ex8-14	♂		
Atp7b-ex8-15	♂		
Atp7b-ex8-16	♂	1bp deletion	

図: *Atp7b* (ATPase Copper Transporting Beta) 遺伝子エクソン8に対するゲノム編集により産まれてきた雄マウスのジェノタイプ。空欄は、複雑なゲノム編集により、変異配列を特定できていない。

マウス名前	雌雄	アレル1	アレル2
Atp7b-ex8-05	♀	10bp deletion	3bp deletion
Atp7b-ex8-06	♀		
Atp7b-ex8-07	♀	10 bp deletion homo	
Atp7b-ex8-08	♀		1bp insertion
Atp7b-ex8-09	♀		
Atp7b-ex8-10	♀	10 bp deletion homo	
Atp7b-ex8-11	♀		
Atp7b-ex8-17	♀	5bp deletion	
Atp7b-ex8-18	♀	4bp insertion	
Atp7b-ex8-19	♀		
Atp7b-ex8-20	♀		
Atp7b-ex8-21	♀	4bp insertion	

図: *Atp7b* (ATPase Copper Transporting Beta) 遺伝子エクソン8に対するゲノム編集により産まれてきた雌マウスのジェノタイプ。空欄は、複雑なゲノム編集により、変異配列を特定できていない。

マウス名前	雌雄	アレル1	アレル2
Atp7b-ex11-01	♂	9bp insert homo CATTAAGCT	3bp deletion
Atp7b-ex11-02	♂	2bp deletion homo CC	
Atp7b-ex11-03	♂	1bp deletion homo CCC>TT	
Atp7b-ex11-04	♂	2bp insert homo CC	1bp insertion
Atp7b-ex11-05	♂	1bp deletion homo C	
Atp7b-ex11-12	♂		

図: *Atp7b* (ATPase Copper Transporting Beta) 遺伝子エクソン11に対するゲノム編集により産まれてきた雄マウスのジェノタイプ。空欄は、複雑なゲノム編集により、変異配

列を特定できていない。

マウス名前	雌雄	アレル 1	アレル 2
Atp7b-ex11-06	♀	1bp deletion homo A	
Atp7b-ex11-07	♀	human type	
Atp7b-ex11-08	♀	deletion	1bp insert C
Atp7b-ex11-09	♀	2bp deletion homo CC	
Atp7b-ex11-10	♀		
Atp7b-ex11-11	♀	1bp deletion	
Atp7b-ex11-13	♀		
Atp7b-ex11-14	♀	1bp deletion homo C	

図: Atp7b (ATPase Copper Transporting Beta) 遺伝子エクソン 11 に対するゲノム編集により産まれてきた雄マウスのジェノタイプ。空欄は、複雑なゲノム編集により、変異配列を特定できていない。

D. 考察

令和3年度においては、催奇形性のバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA を単離するための基盤的研究を行った。

また、R3 年度においては、催奇形性のモデルマウスとして利用するための、遺伝子改変マウスの導入および作製を進めた。胎盤形成により初期胚致死となる Peg10 KO マウスおよび Mash2 KO マウスを比較することにより、確実に初期胚致死のバイオマーカーを単離できると考えている。また、Peg10 KO マウスおよび Mash2 KO マウスは、初期胚致死になるという点では同じであっても、Peg10 KO マウスでは胎盤の母体側と接する面に存在する trophoblast giant cell の数が増えることはないが、Mash2 KO マウスにおいては、trophoblast giant cell の数が過剰になる表現型を持つ。よって、Mash2 KO マウスに特異的なものがあれば、それは、trophoblast giant cell に由来するものである可能性があると考えている。

また、胎児期の形態形成異常だけでなく、胎児期の代謝異常なども検出できる可能性を考え、遺伝子欠損により体内の銅代謝異常が起こることが知られる Atp7b 遺伝子の変異マウスの作製を行った。Atp7b 欠損による銅代謝異常を胎児期にリキッドバイオプシーにより検出できるようになると、迅速かつ安全な遺伝病の胎児期スクリーニングにも利用可能だと考えられる。

E. 結論

本分担研究は、R3 年度の研究計画通りに進捗した。

R3 年度研究（3年計画の1年目）研究において、以下の進捗が見られた。

（4）化学物質投与をすることなく、胎児に形態形成異常を引き起こす遺伝子改変マウスの導入および作製にも成功した。

具体的には、胎盤形成不全による初期胚致死を引き起こす Mash2 KO マウスの導入、および、同様の表現型を持つ Peg10 KO マウスの作製を行った。さらに、形態形成異常の表現型を持たないが、銅代謝異常の表現型を持つ Atp7b 遺伝子改変マウスの作製にも成功した。

R4 年度以降に、これらの遺伝子改変マウスを催奇形性のバイオマーカーとして利用し、催奇形性バイオマーカーの単離を行う。

本研究を推進することで、エクソソーム RNA を指標としたリスク評価により、常に一定の判断基準に

よる評価が可能な次世代型催奇形性評価法を開発すると同時に、生殖発生毒性のメカニズムの解明にも繋げられると考えられ、厚生労働行政に貢献しうる研究開発となっている。

F. 研究発表

1. 論文発表 (令和3年度)

Nagaishi T, Watabe T, Kotake K, Kumazawa T, Aida T, Tanaka K, **Ono R**, Ishino F, Usami T, Miura T, Hirakata S, Kawasaki H, Tsugawa N, Yamada D, Hirayama K, Yoshikawa S, Karasuyama H, Okamoto R, Watanabe M, Blumberg RS, Adachi T. Immunoglobulin A-specific deficiency induces spontaneous inflammation specifically in the ileum. *Gut*. 2021 May 7;gutjnl-2020-322873.

○ Shiura H, **Ono R**, Tachibana S, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F. PEG10 viral aspartic protease domain is essential for the maintenance of fetal capillary structure in the mouse placenta. *Development*. 2021 Oct 1;148(19):dev199564.

Tanabe S, Quader S, **Ono R**, Cabral H, Aoyagi K, Hirose A, Yokozaki H, Sasaki H. Cell Cycle Regulation and DNA Damage Response Networks in Diffuse- and Intestinal-Type Gastric Cancer. *Cancers* (Basel). 2021 Nov 18;13(22):5786.

○ **Naruse M**, Ishigamori R, Imai T. The Unique Genetic and Histological Characteristics of DMBA-Induced Mammary Tumors in an Organoid-Based Carcinogenesis Model. *Front Genet*. 2021 Nov 29;12:765131.

Komiya M, Ishigamori R, **Naruse M**, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, Totsuka Y. Establishment of novel genotoxicity assay system using murine normal epithelial tissue-derived organoids. *Front Genet* 2021 Nov 18;12: 768781.

○**Kuwagata M**, Hasegawa T., Takashima H., Shimizu M., Kitajima S., Yamazaki H.: Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species. *J. Toxicol. Sci.*, 46, 553-560, 2021.

Yamada T., Miura M., Kawamura T., Ushida K., Inoue K., **Kuwagata M.**, Katsutani N., Hirose A.: Constructing a developmental and reproductive toxicity database of

chemicals (DART NIHS DB) for integrated approaches to testing and assessment. *J Toxicol Sci.* 46, 531-538, 2021.

Taquahashi Y., Saito H., **Kuwagata M.**, Kitajima S.: Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals. *Fundam. Toxicol. Sci.* 8, 169-175, 2021.

Yamamoto E., Taquahashi Y., **Kuwagata M.**, Saito S., Matsushita K., Toyoda T., Sato F., Kitajima S., Ogawa K., Izutsu K., Saito Y., Hirabayashi Y., Iimura Y., Honma M., Okuda H., Goda Y.: Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- μ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. *Int J Pharmaceutics* 595: 120241, 2021.

Harada T, Tsuboi I, Hino H, Yuda M, **Hirabayashi Y.**, Hirai S, Aizawa S.
Age-related exacerbation of hematopoietic organ damage induced by systemic hyper-inflammation in senescence-accelerated mice.
Sci Rep. 2021 Dec 1;11(1):23250.

Okubo Y, Ohtake F, Igarashi K, Yasuhiko Y, **Hirabayashi Y.**, Saga Y, Kanno J.
Cleaved Delta like 1 intracellular domain regulates neural development via Notch signal-dependent and - independent pathways.
Development. 2021 Oct 1;148(19):dev193664.

Hirabayashi Y., Maki K, Kinoshita K, Nakazawa T, Obika S, Naota M, Watanabe K, Suzuki M, Arato T, Fujisaka A, Fueki O, Ito K, Onodera H.
Considerations of the Japanese Research Working Group for the ICH S6 & Related Issues Regarding Nonclinical Safety Assessments of Oligonucleotide Therapeutics: Comparison with Those of Biopharmaceuticals.
Nucleic Acid Ther. 2021 Apr;31(2):114-125.

Hwang JY, Wang H, Lu Y, **Ikawa M.**, Chung JJ.
C2cd6-encoded CatSper targets sperm calcium channel to Ca²⁺ signaling domains in the flagellar membrane.
Cell Rep. 2022 Jan 5;110226.

Morohoshi A, Miyata H, Oyama Y, Oura S, Noda T, **Ikawa M.**
FAM71F1 binds to RAB2A and RAB2B and is essential for acrosome formation and male fertility in mice.
Development. 2021 Nov 1;148(21):dev199644.

Fujihara Y, Herberg S, Blaha A, Panser K, Kobayashi K, Larasati T, Novatchkova M, Theussl HC, Olszanska O, **Ikawa M.**, Pauli A.
The conserved fertility factor SPACA4/Bouncer has divergent modes of action in vertebrate fertilization.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Sep 28; 118(39): e2108777118.

Miyata H, Oura S, Morohoshi A, Shimada K, Mashiko D, Oyama Y, Kaneda Y, Matsumura T, Abbasi F, **Ikawa M.**
SPATA33 localizes calcineurin to the mitochondria and regulates sperm motility in mice.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Aug 31;118(35): e2106673118.

Fujita Y, Hoshina T, Matsuzaki J, **Yoshioka Y.**, Kadota T, Hosaka Y, Fujimoto S, Kawamoto H, Watanabe N, Sawaki K, Sakamoto Y, Miyajima M, Lee K, Nakaharai K, Horino T, Nakagawa R, Araya J, Miyato M, Yoshida M, Kuwano K, **Ochiya T.**
Early prediction of COVID-19 severity using extracellular vesicle COPB2.
J Extracell Vesicles. 2021 Jun;10(8):e12092.

Ichinohe N, Ishii M, Tanimizu N, Mizuguchi T, Yoshioka Y, **Ochiya T.**, Suzuki H, Mitaka T.
Extracellular vesicles containing miR-146a-5p secreted by bone marrow mesenchymal cells activate hepatocytic progenitors in regenerating rat livers.
Stem Cell Res Ther. 2021 May 29;12(1):312.

Torii C, Maishi N, Kawamoto T, Morimoto M, Akiyama K, **Yoshioka Y.**, Minami T, Tsumita T, Alam MT, **Ochiya T.**, Hida Y, Hida K.
miRNA-1246 in extracellular vesicles secreted from metastatic tumor induces drug resistance in tumor endothelial cells.
Sci Rep. 2021 Jul 5;11(1):13502. doi: 10.1038/s41598-021-92879-5.

2. 学会発表 (令和3年度)

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)

○**Ryuichi Ono**
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**
リキッドバイオプシーによる毒性評価
第48回日本毒性学会学術年会 (2021.7.1.)
(招待講演)

小野竜一、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48回日本毒性学会学術年会 (2020.6.30.)
(招待講演)

○小野竜一

エクソソームが媒介したレトロトランスポゾンの水平遺伝による哺乳類の誕生
第 21 回 AB Conference (2021.8.21.)
(招待講演)

○小野竜一

エクソソームが媒介したレトロトランスポゾンの遺伝子水平遺伝による哺乳類の誕生
第 93 回日本遺伝学会学術年会 (2021.9.8.)
(招待講演)

○Ryuichi Ono

Novel hepatotoxicity biomarkers of exosomal miRNAs acutely induced by CCl4
アジア毒性学会学術年会 (2021.11.2.)
(招待講演)

○Ryuichi Ono

Liquid Biopsy for the Early Detection of Toxicity
韓国毒性学会学術年会 (2021.11.2.)
(招待講演)

小野竜一

ゲノム編集技術の安全性評価
第 50 回日本環境変異原ゲノム学会 (2021.11.1.)
(招待講演)

○ Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Ryuichi Ono, Satoshi Kitajima

Comprehensive Histone, DNA methylation, and mRNA expression analysis of murine liver repeatedly exposure to Chemicals - Percellome Project 2022 update -
米国毒性学会学術年会 (2022.3.27.)

○成瀬美衣

Gene expression profiles in CAFs exhibited individual variations by the co-co-culture with CRC organoids
第 80 回日本癌学会学術総会 (2021.9.30.)

○桑形 麻樹子、高島 宏昌、長谷川 拓郎、山崎 浩史、北嶋 聡：雄ウサギを用いたサリドマイド経口投与による血漿から精漿中への移行評価
第 48 回日本毒性学会学術年会(神戸(ハイブリット))2021 年 7 月

○高島 宏昌、羽田 亮、田中 加奈子、関 美沙、長谷川 拓郎、山崎 浩史、北嶋 聡、桑形 麻樹子：ウサギを用いたサリドマイド経口投与による催奇形作用確認試験
第 61 回日本先天異常学会学術集会(東京(オンライン)) 2021 年 8 月

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。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

エクソソーム RNA を毒性指標とした
次世代型催奇形性評価法の開発に資する研究
(21KD1001)

令和3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

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

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 美樹 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

科学技術の進展に伴い年々増加する新規化学物質の安全性確保は極めて重要な課題であり、それらの生体影響の評価には、毒性機序の解明が必須とされるが、特に、生殖発生毒性学の分野は他の毒性分野よりもメカニズム解析が遅れている。評価方法が経験値に依存する由縁でもある。

我々は、これまでに、細胞間情報伝達の1つとして細胞から分泌される小胞であるエクソソーム中に含まれる RNA を指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2年度）において行い、成獣雄マウスに対して、血液1滴から全身の病理組織学的診断を検出しうる高感度な系の確立に成功している (**Ono R.** et al., *Toxicology Reports* 2020)。

本研究においては、エクソソーム RNA を腹単位の毒性指標とする次世代型催奇形性評価法の開発を行うことで、これまでの経験重視に依存していた催奇形性の評価をメカニズムに基づいた安全性評価にステップアップし、リスク評価時に常に一定の判断基準による評価が可能となることで、催奇形性作用を持つ化合物の迅速化、高感度化した評価が期待される。

特に、胎児の正常な発生に必要なマイクロ RNA の存在が明らかになり、さらに、マイクロ RNA が催奇形性に寄与している報告もされていることから、本研究により、催奇形性に寄与するエクソソーム中のマイクロ RNA を明らかにすることは、催奇形性のメカニズムの解明に大きく貢献する。

また、エクソソーム RNA を毒性指標とする評価法を催奇形性評価だけでなく、オルガノイド 3D 培養法を利用した代替法への応用も視野に入れた本研究は、生殖発生毒性評価、エクソソーム RNA といった新たなバイオマーカー評価およびオルガノイド 3D 培養による in vitro 評価を融合させた計画となっている。

3年計画の初年度にあたる R3 年度の本分担研究においては、自然免疫として知られる I 型インターフェロンの負の制御転写因子である Irf2 の欠損マウスにおいて誘導される種々の炎症反応に特異的に誘導されるエクソソーム RNA の同定する計画において、どのような炎症反応が見られるのか、病理組織学的検査および生化学検査病理組織学的検査および生化学検査を行うことを目的とした。Irf2 欠損マウスが、肝臓および腎臓において野生型には見られない髄外造血および肝細胞壊死が確認され、腎臓においては毛細血管が拡張した異常な糸球体像検出に成功した。

令和3年度研究（3年計画の1年目）は、計画通りに進捗している。

A. 研究目的

化学物質の有害性評価、特に化審法におけるヒト健康影響に関する有害性において、化学物質の生殖発生への影響を迅速かつ正確に評価することは最重要課題の一つである。現行の生殖発生毒性試験法は、莫大な費用、時間や労力以外に、観察者の経験に依存する部分や、得られる判定基準が必ずしも施設間で一定とは言えない部分がある。

その内の1つである胚・胎児発生に関する試験（発生毒性試験）では、母毒性評価とともに胎児形態観察（外表、内臓および骨格観察）から催奇形性を評価する。その際に、腹内・腹間の感受性に差がある中で、形態変化を異常か変異に分類し、その発現率から催奇形性を判断する事は困難な場合がある。

近年、細胞間情報伝達の1つとして、細胞から分泌される小胞であるエクソソームが注目されている。エクソソームは体液中（血液、髄液など）を循環し、細胞特異的なマイクロRNAを内包することから、研究分担者の東京医大・落谷らは、腫瘍細胞に特異的なマイクロRNAを指標にした、血液1滴による13種類の早期がん診断法（精度95%以上）を開発した経験を持つ。

我々は、エクソソームRNAを指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2年度）において行い、成獣雄マウスに対して、血液1滴から全身の病理組織学的診断を検出しようとする高感度な系の確立に成功している（[Ono R. et al., Toxicology Reports 2020](#)）。

本研究は、これまでの実績、経験を活かし、エクソソームRNAを指標にした次世代型の催奇形性評価法の確立と催奇形性の発現メカニズムの解明を目的とする。

エクソソーム中に多く内包されることが知られるマイクロRNAが催奇形性に寄与している報告もあることから、本研究の特徴は、エクソソームRNAを指標することで、リスク評価時に常に一定の判断基準による評価が可能な次世代型催奇形性評価法を開発すると同時に、生殖発生毒性のメカニズムの解明にも繋がることである。

また、エクソソームRNAを毒性指標とした動物実験に依存しないオルガノイド3D培養法を利用した次世代型代替法の開発も視野に入れている。オルガノイドは、臓器を構成する能力を持った未分化な組織幹・前駆細胞が、3D培養環境の中で、形態形成過程

の特徴を模倣してミニ臓器が形成されるものであり、発生期の模倣モデルとして、化学物質や薬物による毒性影響の評価にも適用できると考えられる。本研究計画においては、まずは、オルガノイド由来のエクソソームにおいても毒性評価が可能かを明らかにすることを目的としている。動物福祉（3Rs）の観点による代替法への応用を考慮した取組の一環である。具体的には、オルガノイドの培養上清中のエクソソームが *in vivo* のエクソソームと同様に毒性バイオマーカーとなりうるのかの検証を行う。

B. 研究方法

本分担研究においては、毒性発現メカニズムを考慮した次世代型の生殖発生毒性評価法を確立することを目的に、以下の概要を行う。

● 血液中のエクソソームRNAが化学物質や医薬品投与により生じる毒性のバイオマーカーとなることを示してきたが、骨格異常、発達障害、自己免疫疾患などの各種障害のバイオマーカーとしても利用可能と考えられる。

そこで、様々な表現型を持つ遺伝子変異を、発達障害などのモデルとして利用することを計画している。今年度は、自己免疫疾患マウスモデルとして知られる *Irf2* 欠損マウスに、実際に各種炎症反応が見られるのかを病理組織学的検査および生化学検査を行う。

・自己免疫疾患モデルマウスの導入

谷口維紹（東京大学名誉教授）より、*Irf2* ヘテロ欠損マウスを導入している。

Symbol: *Irf2*

Name: interferon regulatory factor 2

Synonyms: 9830146E22Rik, *Irf-2*

Feature Type: protein coding gene

MGI:96591

NCBI Gene: 16363

Irf2 ヘテロ欠損マウス（♀）と *Irf2* ヘテロ欠損マウス（♂）を交配することで、野生型（*Irf2* +/+）、*Irf2* ヘテロ欠損（*Irf2* +/-）、*Irf2* 欠損マウス（*Irf2* KO マウス；*Irf2* -/-）を作成する。

・*Irf2* KO マウスのジェノタイピング

マウスの耳片より、DNeasy blood & tissue kit (Qiagen) を利用して、DNAを抽出。各個体より抽出したDNAを以下のPCRプライマーを使用してPCR増幅を行

い、電気泳動することでジェノタイプを決定している。

Irf2 F2A4: cgg tag act ctg aag gcg ttg tt
Irf2 F2S3: ttc cag atc ccc tgg atg cat gc
Irf2 F2N : aac gca cgg gtg ttg ggt cgt ttg

・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 で臓器・器官の固定を行う。常法に従って、パラフィンブロック標本を作製し、薄切を行い、hematoxylin and eosin (H&E) 染色を行う。病理組織学的検査結果とエクソソーム RNA の解析の結果の比較を行い、エクソソーム RNA をバイオマーカーとした次世代有害性評価法の有効性を検証する。

・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の配慮を十分行い、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

・炎症に特異的なエクソソーム RNA の同定 (小野、落谷、平林)

現在までに、エクソソーム RNA を発がんバイオマーカーの指標として利用した早期がん診断が行われ、さらに、我々は、化学物質投与による肝毒性評価の指標として、エクソソーム RNA を利用可能なことを証明してきた。本研究においては、催奇形性のバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の同定を目的としているが、成体における骨格異常や、発達障害などの各種障害のバイオマーカーとしても利用可能と考えられる。

そこで、様々な表現型を持つ遺伝子変異を、発達障害などのモデルとして利用することとした。最初に、自己免疫疾患マウスモデルとして知られる *Irf2* 欠損マウスに特異的なエクソソーム RNA が存在するのかの解析を行った。

同腹由来の6匹の雌(5ヶ月齢:野生型4匹、*Irf2* hetero 1匹、*Irf2* KO 1匹)の解剖を行い、肝臓および腎臓の病理解析、採血を行い、血液生化学検査およびエクソソームRNAの網羅的解析を行った。

Irf2 KO マウスにおいては、体重は野生型と変わらないが、肝臓が野生型の1.8倍、腎臓が1.5倍の重量があった。*Irf2* KO マウスの肝臓における H&E 像では、肝細胞の壊死、および、肥大が確認された。また、野生型では見られない髓外造血像も確認された。肝臓の重量増加は、これらが原因であると考えられる。一方、腎臓における H&E 像では、野生型では、糸球体にしっかりと内皮細胞が確認され、毛細血管も正常な形態を維持しているが、*Irf2* KO マウスの糸球体においては、正常な内皮細胞の欠落、および毛細血管の拡張が確認された。

このように、自己免疫疾患を起こすことにより、様々な病変を持つ *Irf2* KO マウスに特異的なエクソソーム RNA を同定し、その詳細を解析することで、様々な病変に対するバイオマーカーの同定につながる。

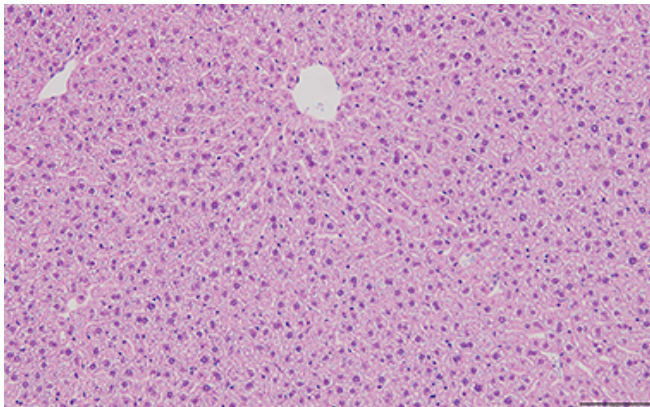


図: 野生型マウス (5ヶ月齢) の肝臓におけるH&E染色像。

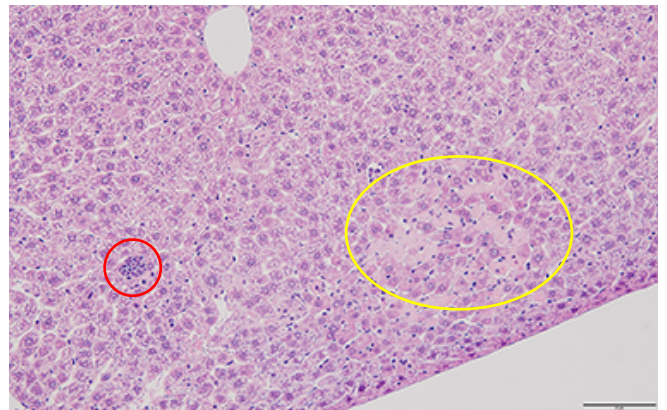


図: *Irf2* KO マウス(5ヶ月齢)の肝臓におけるH&E染色像。野生型には見られていない髓外造血像(赤丸)、および肝細胞壊死(黄色丸)が確認された。

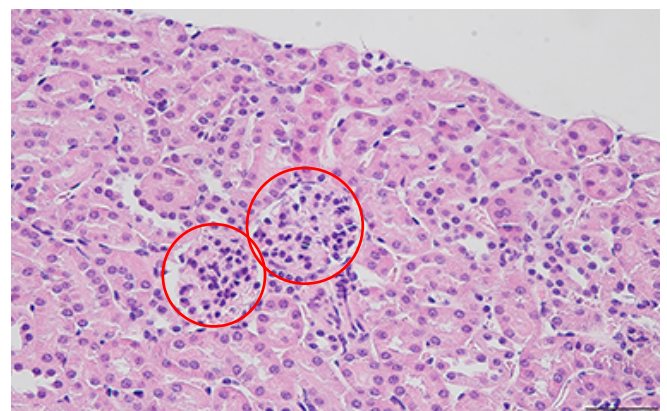


図: 野生型マウス(5ヶ月齢)の腎臓におけるH&E染色像。正常な糸球体像(赤丸)が確認できる。

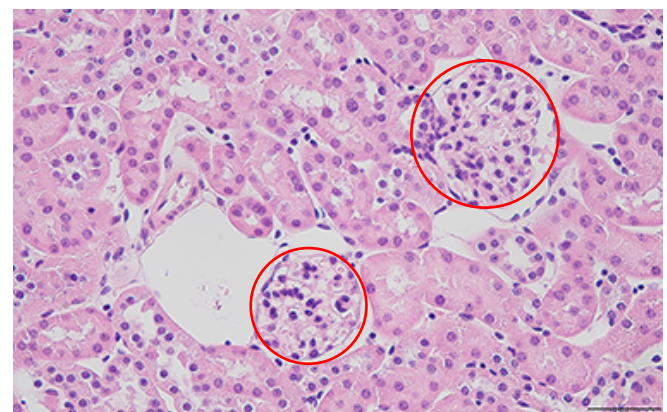


図: *Irf2* KO マウス(5ヶ月齢)の腎臓におけるH&E染色像。内皮細胞を欠き、毛細血管が拡張した異常な糸球体像(赤丸)が確認できる。

・血液生化学 (平林)

H&E 染色像の解析を行った、野生型、Irf2 hetero マウス、Irf2 KO マウスの血液を採取し、血清成分の抽出を行い、血液生化学解析を行った。

その結果、肝臓障害のマーカーである AST および ALT については、野生型と比較して高い値を示した。また、腎臓障害のマーカーである BUN および CRE については、BUN では変化がないが、CRE が高い値になっており、肝臓、腎臓ともに、病理切片から予想された通りに、野生型と比較して機能低下が確認された。

	AST(U/l)	ALT(U/l)	BUN(mg/dl)	CRE(mg/dl)
WT1	75	18	20.9	0.23
WT2	87	23	26.2	0.17
WT3	78	25	32.8	0.27
WT4	83	19	27.2	0.17
KO	127	74	24.9	0.70
hetero	52	25	27.8	0.19

図: 野生型、Irf2 KO マウスにおける血液生化学解析の結果

D. 考察

我々は、エクソソーム RNA を指標とした迅速かつ高感度な次世代型毒性試験法の開発を、厚労科研・化学物質リスク事業 (H30-R2 年度) において行い、成獣雄マウスに対して、血液 1 滴から全身の病理組織学的診断を検出する高感度な系の確立に成功している (Ono R. *et al.*, *Toxicology Reports* 2020)。

本分担研究の R3 年度においては、催奇形性のバイオマーカーの効率的な探索のために、遺伝子組み換えマウスをモデル動物として利用することに取り組んだ。

哺乳類の免疫には、感染した病原体を特異的に見分け、それを記憶することで、同じ病原体に出会った時に効果的に病原体を排除できる仕組みである獲得免疫の他に、受容体を介して、侵入してきた病原体や異常になった自己の細胞をいち早く感知し、それを排除する仕組みである自然免疫が存在する。自然免疫は、ウイルス RNA を模倣した核酸アナログである Poly I:C を投与することで、誘導できることが知られている。ここで、本来、自然免疫を抑制している *Irf2* 遺伝子の欠損マウスを利用することで、慢性的に自然免疫が活性化された状態を作り出すことができる。

R3 年度においては、5 ヶ月齢の野生型マウス、*Irf2* ヘテロ KO マウス、*Irf2* KO マウスからの採血、病理組織学的検査および生化学検査を行った。*Irf2* KO マウスにおいては、様々な自己免疫疾患による症状が見られた。

Irf2 KO マウスにおいては、体重は野生型と変わらないが、肝臓が野生型の1.8倍、腎臓が1.5倍の重量があった。*Irf2* KO マウスの肝臓における H&E 像では、肝細胞の壊死、および、肥大が確認された。また、野生型では見られない髄外造血像も確認された。肝臓の重量増加は、これらが原因であると考えられる。一方、腎臓における H&E 像では、野生型では、糸球体にしっかりと内皮細胞が確認され、毛細血管も正常な形態を維持しているが、*Irf2* KO マウスの糸球体においては、正常な内皮細胞の欠落、および毛細血管の拡張が確認された。

さらに、小野、落谷らが単離した *Irf2* KO マウスに特異的なエクソソーム RNA が、慢性炎症のバイオマーカーとなる可能性がある。*Irf2* KO マウスの表現型の出現する前の若い個体を用いての同様の解析を行うことで、ここで単離した特異的なエクソソーム RNA が、自己免疫疾患の症状に特異的なのか、*Irf2* 遺伝子欠損によるインターフェロン応答遺伝子群 (ISGs) の活性化に特異的なのかを明らかにできると考えている。

E. 結論

本研究は、R3 年度の分担研究計画通りに進捗した。

R3 年度研究 (3 年計画の 1 年目) 研究において、炎症反応のモデルとして、遺伝子改変動物である *Irf2* KO マウスを利用することにした。*Irf2* KO マウスにおいて、エクソソーム RNA の解析用に採血をするのと同時に、病理組織学的検査および生化学検査を行った。

その結果、*Irf2* KO マウスにおいては、体重は野生型と変わらないが、肝臓が野生型の 1.8 倍、腎臓が 1.5 倍の重量があった。*Irf2* KO マウスの肝臓における H&E 像では、肝細胞の壊死、および、肥大が確認された。また、野生型では見られない髄外造血像も確認された。

小野、落谷が、ここで採血した血液の解析を行い、*Irf2* KO マウスに特異的なエクソソーム RNA の同定に成功している。より、自己免疫疾患における炎症反応に特異的なエクソソーム RNA の同定に成功した。

我々は、エクソソーム RNA を指標として、癌細胞の存在や、化学物質による細胞障害の検出に成功してきたが、単一遺伝子欠損の影響による炎症反応のバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の同定に成功した意義は大きい。様々な条件でバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の単離に成功したとしても、それが本当に狙った細胞の障害に由来するものなのかを証明することは難しかった。そこで、同一の表現型を持つ、複数の遺伝子改変動物を利用して、特異的なエクソソーム RNA を同定し、比較することにより、バイオマーカーの機能をメカニズムベースで考えることができる。

本研究を推進することで、エクソソーム RNA を指標としたリスク評価により、常に一定の判断基準による評価が可能な次世代型催奇形性評価法を開発すると同時に、生殖発生毒性のメカニズムの解明にも繋げられると考えられ、厚生労働行政に貢献する研究開発となっている。

F. 研究発表

1. 論文発表 (令和 3 年度)

Nagaishi T, Watabe T, Kotake K, Kumazawa T, Aida T, Tanaka K, **Ono R**, Ishino F, Usami T, Miura T, Hirakata S, Kawasaki H, Tsugawa N, Yamada D, Hirayama K, Yoshikawa S, Karasuyama H, Okamoto R, Watanabe M,

- Blumberg RS, Adachi T.
Immunoglobulin A-specific deficiency induces spontaneous inflammation specifically in the ileum.
Gut. 2021 May 7;gutjnl-2020-322873.
- Shiura H, **Ono R**, Tachibana S, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F.
PEG10 viral aspartic protease domain is essential for the maintenance of fetal capillary structure in the mouse placenta.
Development. 2021 Oct 1;148(19):dev199564.
- Tanabe S, Quader S, **Ono R**, Cabral H, Aoyagi K, Hirose A, Yokozaki H, Sasaki H.
Cell Cycle Regulation and DNA Damage Response Networks in Diffuse- and Intestinal-Type Gastric Cancer.
Cancers (Basel). 2021 Nov 18;13(22):5786.
- **Naruse M**, Ishigamori R, Imai T.
The Unique Genetic and Histological Characteristics of DMBA-Induced Mammary Tumors in an Organoid-Based Carcinogenesis Model.
Front Genet. 2021 Nov 29;12:765131.
- Komiya M, Ishigamori R, **Naruse M**, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, Totsuka Y.
Establishment of novel genotoxicity assay system using murine normal epithelial tissue-derived organoids.
Front Genet 2021 Nov 18;12: 768781.
- **Kuwagata M**, Hasegawa T., Takashima H., Shimizu M., Kitajima S., Yamazaki H.:
Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species. *J. Toxicol. Sci.*, 46, 553-560, 2021.
- Yamada T., Miura M., Kawamura T., Ushida K., Inoue K., **Kuwagata M**., Katsutani N., Hirose A.: Constructing a developmental and reproductive toxicity database of chemicals (DART NIHS DB) for integrated approaches to testing and assessment. *J Toxicol Sci*. 46, 531-538, 2021.
- Taquahashi Y., Saito H., **Kuwagata M**., Kitajima S.:
Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals. *Fundam. Toxicol. Sci*. 8, 169-175, 2021.
- Yamamoto E., Taquahashi Y., **Kuwagata M**., Saito S., Matsushita K., Toyoda T., Sato F., Kitajima S., Ogawa K., Izutsu K., Saito Y., Hirabayashi Y., Iimura Y., Honma M., Okuda H., Goda Y.: Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- μ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. *Int J Pharmaceutics* 595: 120241, 2021.
- Harada T, Tsuboi I, Hino H, Yuda M, **Hirabayashi Y**, Hirai S, Aizawa S.
Age-related exacerbation of hematopoietic organ damage induced by systemic hyper-inflammation in senescence-accelerated mice.
Sci Rep. 2021 Dec 1;11(1):23250.
- Okubo Y, Ohtake F, Igarashi K, Yasuhiko Y, **Hirabayashi Y**, Saga Y, Kanno J.
Cleaved Delta like 1 intracellular domain regulates neural development via Notch signal-dependent and -independent pathways.
Development. 2021 Oct 1;148(19):dev193664.
- Hirabayashi Y**, Maki K, Kinoshita K, Nakazawa T, Obika S, Naota M, Watanabe K, Suzuki M, Arato T, Fujisaka A, Fueki O, Ito K, Onodera H.
Considerations of the Japanese Research Working Group for the ICH S6 & Related Issues Regarding Nonclinical Safety Assessments of Oligonucleotide Therapeutics: Comparison with Those of Biopharmaceuticals.
Nucleic Acid Ther. 2021 Apr;31(2):114-125.
- Hwang JY, Wang H, Lu Y, **Ikawa M**, Chung JJ.
C2cd6-encoded CatSpert targets sperm calcium channel to Ca²⁺ signaling domains in the flagellar membrane.
Cell Rep. 2022 Jan 5:110226.
- Morohoshi A, Miyata H, Oyama Y, Oura S, Noda T, **Ikawa M**.
FAM71F1 binds to RAB2A and RAB2B and is essential for acrosome formation and male fertility in mice.
Development. 2021 Nov 1;148(21):dev199644.
- Fujihara Y, Herberg S, Blaha A, Panser K, Kobayashi K, Larasati T, Novatchkova M, Theussl HC, Olszanska O, **Ikawa M**, Pauli A.
The conserved fertility factor SPACA4/Bouncer has divergent modes of action in vertebrate fertilization.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Sep 28; 118(39): e2108777118.
- Miyata H, Oura S, Morohoshi A, Shimada K, Mashiko D, Oyama Y, Kaneda Y, Matsumura T, Abbasi F, **Ikawa M**.
SPATA33 localizes calcineurin to the mitochondria and regulates sperm motility in mice.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Aug 31;118(35): e2106673118.
- Fujita Y, Hoshina T, Matsuzaki J, **Yoshioka Y**, Kadota T, Hosaka Y, Fujimoto S, Kawamoto H, Watanabe N, Sawaki K, Sakamoto Y, Miyajima M, Lee K, Nakaharai K, Horino T, Nakagawa R, Araya J, Miyato M, Yoshida M, Kuwano K, **Ochiva T**.
Early prediction of COVID-19 severity using extracellular vesicle COPB2.
J Extracell Vesicles. 2021 Jun;10(8):e12092.
- Ichinohe N, Ishii M, Tanimizu N, Mizuguchi T, Yoshioka

Y, **Ochiya T**, Suzuki H, Mitaka T.
Extracellular vesicles containing miR-146a-5p secreted by bone marrow mesenchymal cells activate hepatocytic progenitors in regenerating rat livers.
Stem Cell Res Ther. 2021 May 29;12(1):312.

Torii C, Maishi N, Kawamoto T, Morimoto M, Akiyama K, **Yoshioka Y**, Minami T, Tsumita T, Alam MT, **Ochiya T**, Hida Y, Hida K.
miRNA-1246 in extracellular vesicles secreted from metastatic tumor induces drug resistance in tumor endothelial cells.
Sci Rep. 2021 Jul 5;11(1):13502. doi: 10.1038/s41598-021-92879-5.

2. 学会発表 (令和3年度)

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)

○**Ryuichi Ono**
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**
リキッドバイオプシーによる毒性評価
第48回日本毒性学会学術年会 (2021.7.1.)
(招待講演)

小野竜一、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48回日本毒性学会学術年会 (2020.6.30.)
(招待講演)

○**小野竜一**
エクソソームが媒介したレトロトランスポゾンの水平遺伝による哺乳類の誕生
第21回 AB Conference (2021.8.21.)
(招待講演)

○**小野竜一**
エクソソームが媒介したレトロトランスポゾンの遺伝子水平遺伝による哺乳類の誕生
第93回日本遺伝学会学術年会 (2021.9.8.)
(招待講演)

○**Ryuichi Ono**
Novel hepatotoxicity biomarkers of exosomal miRNAs acutely induced by CCl4
アジア毒性学会学術年会 (2021.11.2.)

(招待講演)

○**Ryuichi Ono**
Liquid Biopsy for the Early Detection of Toxicity
韓国毒性学会学術年会 (2021.11.2.)
(招待講演)

小野竜一
ゲノム編集技術の安全性評価
第50回日本環境変異原ゲノム学会 (2021.11.1.)
(招待講演)

○ Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, **Ryuichi Ono**, Satoshi Kitajima
Comprehensive Histone, DNA methylation, and mRNA expression analysis of murine liver repeatedly exposure to Chemicals - Percellome Project 2022 update -
米国毒性学会学術年会 (2022.3.27.)

○**成瀬美衣**
Gene expression profiles in CAFs exhibited individual variations by the co-culture with CRC organoids
第80回日本癌学会学術総会 (2021.9.30.)

○**桑形 麻樹子**、高島 宏昌、長谷川 拓郎、山崎 浩史、北嶋 聡: 雄ウサギを用いたサリドマイド経口投与による血漿から精漿中への移行評価
第48回日本毒性学会学術年会(神戸(ハイブリット))2021年7月

○高島 宏昌、羽田 亮、田中 加奈子、関 美沙、長谷川 拓郎、山崎 浩史、北嶋 聡、**桑形 麻樹子**: ウサギを用いたサリドマイド経口投与による催奇形作用確認試験
第61回日本先天異常学会学術集会(東京(オンライン)) 2021年8月

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。

Ⅲ. 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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nagaishi T, Watabe T, Kotake K, Kumazawa T, Aida T, Tanaka K, Ono R , Ishino F, Usami T, Miura T, Hirakata S, Kawasaka H, Tsugawa N, Yamada D, Hirayama K, Yoshikawa S, Karasuyama H, Okamoto R, Watanabe M, Blumberg RS, Adachi T.	Immunoglobulin A-specific deficiency induces spontaneous inflammation specifically in the ileum.	Gut	May 7:	487-496	2021
Shiura H, Ono R , Tachibana S, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F.	PEG10 viral aspartic protease domain is essential for the maintenance of fetal capillary structure in the mouse placenta.	Development	Oct 1;148 (19)	1-7	2021
Tanabe S, Quader S, Ono R , Cabral H, Aoyagi K, Hirose A, Yokozaki H, Sasaki H.	Cell Cycle Regulation and DNA Damage Response Networks in Diffuse- and Intestinal-Type Gastric Cancer.	Cancers (Basel)	Nov 18;13 (22)	5786	2021
Naruse M , Ishigami R, Imai T.	The Unique Genetic and Histological Characteristics of DMBA-Induced Mammary Tumors in an Organoid-Based Carcinogenesis Model.	Front Genet.	Nov 29;12	765131	2021
Hirabayashi Y , Maki K, Kinoshita K, Nakazawa T, Obika S, Naota M, Watanabe K, Suzuki M, Arato T, Fujisaka A, Fueki O, Ito K, Onodera H.	Considerations of the Japanese Research Working Group for the ICH S6 & Related Issues Regarding Nonclinical Safety Assessments of Oligonucleotide Therapeutics: Comparison with Those of Biopharmaceuticals.	Nucleic Acid Ther.	Apr;31(2)	114-125.	2021

令和4年3月31日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 エクソソーム RNA を毒性指標とした次世代型催奇形性評価法の開発に資する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・室長
(氏名・フリガナ) 小野 竜一・オノ リュウイチ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 エクソソーム RNA を毒性指標とした次世代型催奇形性評価法の開発に資する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・室長
(氏名・フリガナ) 栗形 麻樹子・クワガタ マキコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和4年3月31日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 エクソソーム RNA を毒性指標とした次世代型催奇形性評価法の開発に資する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター・センター長
- (氏名・フリガナ) 平林 容子・ヒラバヤシ ヨウコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立研究開発法人国立がん研究センター

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 中釜 齊

次の職員の（令和）3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業2. 研究課題名 エクソソーム RNA を毒性指標とした次世代型催奇形性評価法の開発に資する研究3. 研究者名 （所属部署・職名）研究所動物実験施設・研究員（氏名・フリガナ）成瀬美衣・ナルセミエ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立がん研究センター	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称： ）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由： ）
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由： ）
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由： ）
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （有の場合はその内容： ）

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 大阪大学微生物病研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 岡田 雅人

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 エクソソーム RNA を毒性指標とした次世代型催奇形性評価法の開発に資する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 大阪大学微生物病研究所 ・ 教授

(氏名・フリガナ) 伊川 正人 (イカワ マサヒト)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和4年3月31日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 東京医科大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 林 由起子

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 エクソソーム RNA を毒性指標とした次世代型催奇形性評価法の開発に資する研究
- 研究者名 (所属部署・職名) 東京医科大学 医学総合研究所 教授
(氏名・フリガナ) 落谷 孝広 (オチャ タカヒロ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。