

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
生殖発生毒性評価法の開発（24KD1004）

令和6年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小野 竜一

令和7（2025）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 次世代型生殖発生毒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. 次世代型生殖発生毒性試験の開発 小野 竜一 桑形麻樹子 平林 容子	18
2. 次世代型生殖発生毒性試験の高度化 落谷 孝広 伊川正人 小野 竜一	31
3. 次世代型毒性試験のin vitroモデル開発 成瀬 美衣 落谷 孝広 小野 竜一	43

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	55
---------------------	----

I. 総括研究報告書

エクソソーム RNA を毒性指標とした
次世代型生殖発生毒性評価法の開発に資する研究
(24KD1004)

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

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で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催奇形性を判断するには莫大な時間や労力以外に、観察者の経験に依存する部分や、基準が必ずしも一定とは言えない部分がある。

近年、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、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2・R3-R5 年度、代表：小野竜一）にて、エクソソーム RNA を毒性指標とすることで、成獣の血液 1 滴から全身の病理組織学的診断が可能な次世代型毒性試験法の開発、および、妊娠動物の母体血および羊水から胎児の催奇形性を検出する高感度な系の開発に世界にさがかけて成功した（Ono R. et al., *Toxicology Reports* 2020、Ono R. et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024）。

しかし、毒性指標となる体液由来エクソソームが本当に標的とする臓器より分泌されたのかという疑問があった。我々は、目的の細胞・臓器が分泌するエクソソームのみを可視化および単離可能な“エクソソーム可視化マウス”の作製に成功し、世界で初めて、肝臓由来のエクソソームを可視化し、肝毒性バイオマーカーが確かに肝臓に由来するエクソソームに由来することの証明に成功している（論文投稿準備中）。

そこで、本研究は、我々が開発した母体血および羊水中のエクソソームを指標にした新規生殖発生毒性評価法に新たに開発に成功した“エクソソーム可視化マウス”を活用することで、毒性機序に基づいた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生殖発生毒性評価法を開発することを目的としている。

令和 6 年度の研究では、バルプロ酸を用いた催奇形性モデルマウスを用い、胎児に奇形が発生するメカニズムを詳しく調査した。同じ用量のバルプロ酸を投与しても、すべての胎児に奇形が発生するわけではなく、一部の胎児にのみ奇形が見られることが確認された。そのため、奇形の有無を判別できる羊水中のエクソソーム RNA を網羅的に解析し、バイオマーカー探索を行った。その結果、本来は妊娠 15 日目には不活化される Hbb-y 遺伝子（胎児型グロビン遺伝子）が、奇形を示す胎児においてのみ活性化されていることを明らかにした。これは、バルプロ酸によるヒストン脱アセチル化阻害作用により、胎児型グロビンの発現が誘導される可能性を示唆している。

また、エピジェネティック異常が奇形を引き起こす主要な要因であると仮定し、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の一種であるトリコスタチン A (TSA) についても同様の影響を検証することとした。母動物に高用量の TSA を投与した結果、バルプロ酸投与で見られた神経管閉鎖不全や指形成不全、胎児および胎盤の成長遅延といった異常が観察された。この結果から、TSA もバルプロ酸と同様に強い催奇形性作用を持つ可能性が高いと考えられる。これらの胎児から採取した羊水を用い、次年度に Hbb-y 遺伝子の活性化を検証する計画である。

さらに、これまで単離してきたエクソソーム RNA がどの細胞・臓器に由来するかを確定するため、特定の臓器に由来するエクソソームのみを検出・単離できる“エクソソーム可視化マウス”を作製した。このマウスでは、特定臓器から分泌されるエクソソーム表面にヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現させることに成功している。この解析系を利用することで、母体血中のエクソソームを母体由来と胎児由来に完全に分離して検出する技術を確認した。今年度は、胎児由来のエクソソームのみがヒト CD9-EGFP 融合タンパクでラベルされるようにしたマウスを用い、母体血を採取して超解像度共焦点顕微鏡で胎盤を観察することで、胎児由来エクソソームの母体側への移行を検出することに成功している。

加えて、動物実験に代わる次世代型の評価法を目指し、in vivo の特性を高度に保持する in vitro モデルとして注目されるオルガノイド 3D 培養系の上清中に含まれるエクソソームを毒性指標として利用する可能性についても検討した。今年度は、肝臓特異的（アルブミン陽性細胞特異的）にヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現する肝臓オルガノイドを樹立することに成功した。また、超解像度共焦点顕微鏡による観察およびシングルエクソソーム解析を行い、培養中の肝臓オルガノイドではアルブミン陽性の分化した肝細胞が一部しか存在しないことを確認した。

このヒト CD9-EGFP 陽性エクソソームを指標とすることで、肝臓オルガノイドの分化状況をリアルタイムでモニターすることが可能となり、肝臓オルガノイドを活用した動物実験代替法の高度化に貢献できると考えられる。これらの成果は、新しい毒性評価バイオマーカーの開発や、動物実験に依存しない次世代型試験法の確立に寄与するものである。今後は、Hbb-y 遺伝子の活性化が他のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤によっても見られるかを検証し、さらに精度の高い毒性評価技術を構築する予定である。

令和 6 年度までの研究の進捗により、エピジェネティック異常による生殖発生毒性発現機構が存在する可能性を明らかにした。令和 7 年度、および 8 年度研究計画においては、Hbb-y 遺伝子以外のエピジェネティック異常を検出可能なエクソソーム RNA の単離、および、それらを利用した標準化プロトコールの作製を行う。

本研究はエピジェネティック異常による生殖発生毒性発現機構が存在する可能性を明らかにしており、生殖発生毒性評価において、厚生労働行政に大きく貢献するものである。

研究分担者

桑形麻樹子	帝京平成大学・健康医療スポーツ学部 医療スポーツ学科・教授	相崎健一	毒性部・部長 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
成瀬美衣	国立感染症研究所 ウイルス第一部・主任研究官	高橋祐次	毒性部・第一室長 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
伊川正人	大阪大学・微生物病研究所 動物実験施設・教授		毒性部・動物管理室長
落谷孝広	東京医科大学 医学総合研究所 分子細胞治療研究部門・教授	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
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	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
		野崎弘枝	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
-----	-------------------------------

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催奇形性を判断するには莫大な時間や労力以外に、観察者の経験に依存する部分や、基準が必ずしも一定とは言えない部分がある。

近年、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、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2・R3-R5年度、代表：小野竜一）にて、エクソソームRNAを毒性指標とすることで、成獣の血液1滴から全身の病理組織学的診断が可能な次世代型毒性試験法の開発、および、妊娠動物の母体血および羊水中の胎児の催奇形性を検出する高感度な系の開発に世界にさがけて成功した（[Ono R. et al., Toxicology Reports 2020](#)、[Ono R. et al., Fundamental Toxicological Sciences 2024](#)）。

しかし、毒性指標となる体液由来エクソソームが本当に標的とする臓器より分泌されたのかという疑問があった。我々は、目的の細胞・臓器が分泌するエクソソームのみを可視化および単離可能な“エクソソーム可視化マウス”の作製に成功し、世界で初めて、肝臓由来のエクソソームを可視化し、肝毒性バイオマーカーが確かに肝臓に由来することを証明することに成功している（論文投稿準備中）。

そこで、本研究は、我々が開発した母体血および羊水中のエクソソームを指標にした新規生殖発生毒性評価法に新たに開発に成功した“エクソソーム可視化マウス”を活用することで、毒性機序に基づいた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生殖発生毒性評価法を開発することを目的としている。

＜各年度の目標＞ 令和6年度・先行研究で得られた母体血および羊水中のエクソソームRNAを生殖発生毒性物質によるマウスモデル動物の作成およびマイクロサンプリングを行う。

令和7年度・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解析を行う。妊娠動物において、胎児のみを“エクソソーム可視化マウス”を利用することで、胎児由来のエクソソームのみを可視化、および単離を行ない、毒性機序に基づいた次世代型生殖発生毒性評価法の高度化を行う。

令和8年度・次世代型生殖発生毒性評価法のバリデーションおよびガイドライン化に向けての施策検討

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。

●次世代型生殖発生毒性試験の開発（研究代表者：小野、研究分担者：桑形、平林）

エクソソームRNAを腹単位の毒性指標とする次世代型生殖発生毒性試験を開発するために、妊娠マウスに既知の生殖発生毒性物質を経口投与し、母動物の毒性検出、および、胎児に発現する形態変化から毒性指標となる母体血および羊水中のエクソソームRNAの同定を次世代シーケンス解析により行う。

●次世代型生殖発生毒性試験の高度化（研究分担者：落谷、伊川、研究代表者：小野）

我々は既に、様々な毒性バイオマーカーとなるエクソソームRNAの報告をしているが、それらが実際にどの細胞・臓器に由来したのかは確定できていなかった。そこで、任意の臓器（細胞）に由来したエクソソームの表面にのみ特異的にヒトCD9-EGFP融合タンパクを発現させる遺伝子改変マウス（エクソソーム可視化マウス）を作製し、目的臓器由来のエクソソームのみを検出・単離することに成功した。この“エクソソーム可視化マウス”を用いることで、母体血中のエクソソームを母体に由来するもの、胎児に由来するものに完全に分けての検出が可能になり、評価法の高度化に大きく寄与する。また、毒性バイオマーカーとなるエクソソームRNAの遺伝子改変マウスを作成することにより、毒性メカニズムへの関与について検証を行う。

●次世代型毒性試験のin vitro モデル開発（研究分担者：成瀬、研究代表者：小野）

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評価を行う。

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、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。

・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ティングや、エクソソームの表面タンパクに対する抗体をコーティングしたチップ上でエクソソームを捕捉して特定のエクソソームを単離可能な EXOVIEW を利用することで単離されたエクソソームの大きさと分布、数のカウント、および、シングルエクソソーム上に存在するタンパクの同定を行うことで、エクソソームが由来した細胞の同定が可能になる。

・マウスを用いたトリコスタチン A 経口投与による母動物血清中並びに胎児及び羊水中エクソソームの解析のための試料採取法

二分脊椎や無脳症、脳瘤などの神経管閉鎖障害を誘発するバルプロ酸を催奇形性陽性対照物質として、マウスの神経管閉鎖時期である妊娠 9 日から 11 日にバルプロ酸を 0、300、600 mg/kg の 3 用量経口投与し、妊娠 15 日目に、母動物血清および羊水（胎盤、卵黄囊

膜、胎児）をエクソソーム解析用に採取し、胎児の外表奇形の観察を行なっている。そこで、外表奇形の有無を検出するエクソソーム RNA を毒性指標としてバイオマーカーの単離を行なった。

得られたバイオマーカーは、Hbb-y 遺伝子の RNA 断片であった。

この遺伝子は、本来、妊娠 15 日目には不活化される Hbb-y 遺伝子の発現が、奇形胎児でのみ発現が誘導されているものである。

投与物質であるバルプロ酸は、ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC の活性を阻害することが知られており、本来、エピジェネティック制御により不活性化される Hbb-y 遺伝子の発現がエピジェネティック異常により発現が誘導されているものと考えられる。このことから、バルプロ酸と同様に HDAC 阻害作用を持つトリコスタチン A（TSA）を投与し、バルプロ酸と同様に催奇形性作用があるのかを観察し、また、母体血および羊水中のエクソソーム RNA を毒性バイオマーカーとしてスクリーニングを行う。

投与物質：トリコスタチン A

製造元：東京化成工業株式会社

CAS 番号：58880-19-6

分子量：302.37 g/mol

ロット番号：WXBD4552V

純度：>98.0% (HPLC)

性状：白色、粉末

保管条件：密栓、冷暗所

1-2. 媒体

名称：0.5 w/v% メチルセルロース溶液（略称：0.5% MC 溶液）

製造元：富士フイルム和光純薬株式会社

ロット番号：CAE0466

媒体の調製

必要量のトリコスタチン A を秤取し、0.5% MC 溶液に徐々に加えて分散させた。調製後、遮光し、冷蔵保存した。

使用動物

動物種：マウス（SPF）

系統：C57BL/6J

供給源：ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社、厚木飼育センター

入荷時週齢：雌 10 週齢、雄 11 週齢

匹数：交配用雄 12 匹、雌 24 匹

使用した妊娠動物：4 匹

入荷後 1 週間の検疫・馴化期間を経て、一般状態及び体重推移に異常のない動物を用いた。

交配：11 週齢以上の雌 1 匹に 12 週齢以上の雄 1 匹を

終夜同居させた。翌朝、膈内に腔栓が確認された雌を交尾成立動物とし、その日を妊娠 0 日とした。
群分け：交尾成立日（妊娠 0 日）ごとに行い、妊娠 0 日の体重を基に各群の体重が可能な限り均等となるようにした。

2. エクソソーム解析用試料採取試験

2-1. 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

投与経路は臨床適用経路である経口投与を選択し、投与期間は妊娠 8 日より 9 日までの 2 日間、および、7 日より 11 日までの 5 日間とした。

2-2. 投与方法

投与方法は、げっ歯類の経口投与方法に際して一般的な強制経口投与とした。

トリコスタチン A 溶液を胃ゾンデを用いて胃内に強制経口投与した（8:00~11:00 の間）。動物ごとの投与液量（表示単位：0.01 mL）は投与当日の体重を基準に算出した。

2-3. 投与量及び群構成

投与量は 0、1 及び 10 mg/kg の 3 用量とし、媒体対照群を含め試料採取時点を考慮した 6 群構成とした。すなわち、媒体対照群、1 及び 10 mg/kg 群に妊娠 12 日剖検群、妊娠 15 日剖検群をそれぞれ設けた。剖検群ごとの交尾成立雌動物数を 4 匹とした。

投与量設定根拠

既報によると、トリコスタチン A (TSA) の静脈内 (10、25、50 µg/kg 体重) および経口 (20、50、100 µg/kg 体重) の 14 日間反復投与毒性試験を *Swiss albino mice* で実施し、死亡例や体重、食物摂取量、血液・尿検査、臓器重量に有意な変化は見られなかったが、高用量群では腎臓の腫大、充血、変色が認められ、組織学的には糸球体および尿細管の変性が確認されている一方、遺伝毒性試験ではいずれの用量でも有意な変化は見られていない。この結果から、静脈内では 25 µg/kg、経口では 50 µg/kg を NOAEL としている (Haritwal T. et al., *Drug and Chemical Toxicology* Volume 47, 2024 - Issue 6, 2024)。

また、TSA の妊娠マウスへの投与については、妊娠 8 日に 0、2、4、8、16 mg/kg で投与した報告があるが、着床部位数、死亡胎児数、および吸収胎児数、平均胎児体重、外表奇形は認められていない。しかし、骨格を解析すると、TSA 曝露群の胎児では、特異的かつ用量依存的な椎骨または肋骨の癒合、椎体セグメントの重複などの体軸の異常が観察されている。

本研究においては、妊娠中に VPA を服用した場合や、妊娠マウスへの VPA 投与実験で見られる神経管閉鎖障害や指形成不全が見られる条件検討を行うために、妊娠 8 日より 2 日間の反復投与、および、妊娠 7 日より 5 日間の反復投与を 10 mg/kg を最高用量とし、低用量として 1 mg/kg として行なった。

2-5. 剖検

妊娠 12 日剖検群、妊娠 15 日剖検群において、イソフルラン吸入麻酔下で心採血した後、体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官/組織を詳細に観察した。また、肝臓、腎臓、脾臓の重量を測定し、肝臓、腎臓についてはその後の遺伝子発現解析およびタンパク解析用の採材を行い、肝臓、腎臓、脾臓は病理解析を行う。

2-6. 帝王切開及び母血清中エクソソーム解析用試料採取

剖検時に、着床の有無を肉眼的に観察して、妊娠の成否を確認した。妊娠が認められた母動物については、子宮内の生存胎児数、死亡胚・胎児数を判定・記録した。生存胎児と死亡胚・胎児の総数を着床数とした。

2-7. 母動物血清中エクソソーム解析用試料の処理

血液をポリプロピレン製容器（タンパク低吸着）に移し、室温で 30 分以上放置した後、遠心分離（4°C、3000 ×g、10 分間）により血清を得た。得られた血清試料は試験番号、試料採取時点、動物番号、試料番号、採血年月日、試料名を明記したラベルを貼付したタンパク低吸着チューブに入れ、測定時まで -80°C の冷凍庫（許容値：-70°C 以下）に保存する。

2-8. 羊水、胎児、胎盤の採取

1) 採取日及び採取時点

妊娠 12 日剖検群：各群 4 例

最終投与 1 時間後（09:00~12:00 の間）

妊娠 15 日剖検群：各群 4 例、

妊娠 12 日帝王切開とほぼ同じ時刻
（09:00~12:00 の間）

2) 対象部位（サンプル）の採取

妊娠動物の子宮壁を切開後、卵黄囊膜の外側から切開し、バリアチップで羊水をポリプロピレン製容器（タンパク低吸着）に採取した。羊水を採取した後、卵黄囊膜に被包された胎児及び胎盤を摘出した。胎児と胎盤を分離し、個別に重量を記録した。胎盤はほぼ均等に 2 分割し、それぞれ RNA later と 10% リン酸緩衝ホルマリン液を満たした 15 mL のコニカルチューブに保管した。羊水は遠心分離（4°C、6000 ×g、2 分間）後、上清をバリアチップでタンパク低吸着チューブに

移した。胎児は 10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、特に神経管の閉鎖状態に注目し、形態観察を実施した。

・エクソソーム RNA 網羅的遺伝子発現解析

国立医薬品食品衛生研究所において採取された血液サンプルより抽出されたエクソソームは、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。

・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エクソソームの由来した臓器の特定

エクソソームの表面には CD9, CD63, CD81 などのテトラスパニンが存在する。そこで、臓器、細胞特異的に CD9-EGFP 融合タンパクを発現させることで、特定の細胞から分泌されるエクソソームのみが CD9-EGFP 融合タンパクを持つことで、エクソソームがどこの臓器に由来したのかを検出することが可能になる。本研究で利用するマウス系統は以下の通りである。

CD9-EGFP ノックイン (KI) マウス (エクソソーム可視化マウス)

エクソソームはすべての臓器および細胞から分泌される細胞小胞であり、その表面には CD9, CD63, CD81 などが多く存在する。本マウスは、ROSA26 領域にチキン β アクチンプロモーターを配置し、Cre-loxP システムを利用することで臓器特異的にヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現するよう設計されたノックインマウスである。

Alb-Cre トランスジェニックマウス

肝細胞に特異的に Cre 酵素を発現するトランスジェニックマウスであり、肝臓特異的な遺伝子発現制御の研究に利用される。

Sox2-Cre トランスジェニックマウス

胚盤葉上層 (epiblast) および卵子に特異的に Cre 酵素を発現するトランスジェニックマウスであり、初期発生過程の解析や遺伝子操作に用いられる。

・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

CD9-EGFP KI マウス (flox マウス) と Alb-Cre トランスジェニックマウスを交配して作成した flox/Alb-Cre マウスの肝臓を採取する。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。その後に 40 μ m 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砕した後、MBOC (Matrigel Bilayer Organoid Culture) 法を用いて細胞をマトリゲルに包埋し、至適培地を添加し培養することでオルガノイドを樹立する。

樹立に成功した肝臓オルガノイドを超解像度共焦点

顕微鏡で観察することで、エクソソームの可視化を行う。

（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

●次世代型生殖発生毒性試験の開発（研究代表者：小野、研究分担者：桑形、平林）

・バルプロ酸投与による催奇形性に特異的なバイオマーカーとなるエクソソーム RNA の単離：

厚生労働科学研究費・化学物質リスク事業 (21KD1001) において、我々は、二分脊椎や無脳症、脳瘤などの神経管閉鎖障害を誘発するバルプロ酸を催奇形性陽性対照物質として、マウスの神経管閉鎖時期である妊娠 9 日から 11 日にバルプロ酸を 0、300、600 mg/kg の 3 用量経口投与し、妊娠 11 日目、15 日目、18 日目に、解剖を行い、胎児の外表面形観察を行い、600 mg/kg において催奇形性が発現し、投与したバルプロ酸の濃度依存的に発現の誘導、もしくは抑制される羊水中のエクソソーム RNA が複数存在することを明らかにしている（Ono R. et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024）。

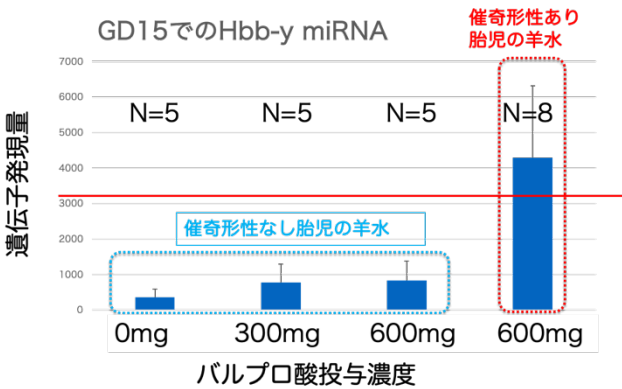
また、これらのエクソソーム RNA の中には、インプリンティング遺伝子が多く含まれていることから、これらの遺伝子発現誘導もしくは抑制には、エピジェネティック制御が関与している可能性が高い。

我々の研究で得られたバルプロ酸投与による催奇形性は、600 mg/kg 群において全ての胎児に観察されるものではなく、一部の胎児でのみ観察された。なお、妊娠 15 日目において確認された 8 匹の催奇形性の詳細は、以下の通りである。

fetus ID	neural tube closure defect	digit malformation
818	-	lack or short left 4th finger abnormal position on right 5th finger
819	meningoencephalocle	-
820	-	lack or short left 5th finger lack or short right 1st finger short right 5th finger abnormal position on right 5th finger
821	-	lack or short left 5th finger lack or short right 5th finger
822	-	lack or short left 5th finger
823	-	lack or short right 5th finger
824	-	extra right 5th finger abnormal position on right 1st toe
825	-	lack or short right 5th finger

表：厚生労働科学研究費・化学物質リスク事業 (21KD1001) において得られたバルプロ酸投与による催奇形性を発現した胎児個体とその表現型（妊娠 15 日目、600 mg/kg 群）

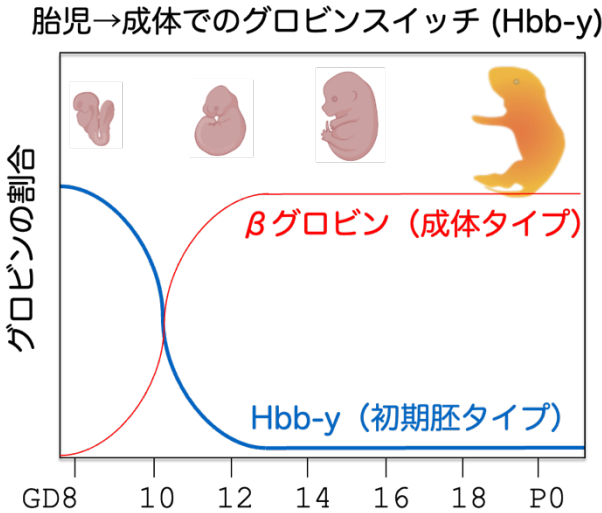
今年度は、妊娠 15 日目において催奇形性の出現しているバルプロ酸 600mg/kg 投与群において、催奇形性が見られていない胎児群と催奇形性の観察された胎児群の比較を行い、羊水中のエクソソームにおいて Hbb-y 遺伝子の発現が、奇形胎児でのみ発現が誘導されていることを明らかにした（下図）。



図：催奇形性ありの胎児の羊水に含まれるエクソソームでは、Hbb-y 遺伝子の発現が特異的に誘導されていた。

Hbb-y 遺伝子は、β グロビン遺伝子ファミリーに属する遺伝子で、マウスの胎生期に特異的に発現する胚性グロビン鎖（β-like globin chain）をコードしており、胎生期の酸素運搬に重要な役割を果たしている。

本来、Hbb-y 遺伝子は、妊娠 15 日目までには発現が抑制され、マウスの β グロビン遺伝子ファミリーの 1 つで、成人型 β グロビン（adult β-globin）鎖をコードする遺伝子である Hbb-b1 遺伝子へと発現がスイッチすることが知られている（下図）。



図：マウス胎児におけるグロビンスイッチの概略図

この遺伝子発現のスイッチ（グロビンスイッチ）は、LCR（Locus Control Region）により制御されていることが知られ、その制御の一部には、ヒストン修飾が関与することが報告されている。よって、投与物質であるバルプロ酸は、ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC の活性を阻害することが知られていることから、本来、エピジェネティック制御により不活性化される Hbb-y 遺伝子の発現がエピジェネティック異常

により発現が誘導されているものと考えられる。

そこで、Hbb-y が、エピジェネティック異常による催奇形性発現のバイオマーカーになりうるかを検討すべく、バルプロ酸と同様にヒストン脱アセチル化酵素として知られるトリコスタチン A を母動物に投与することで、トリコスタチン A にバルプロ酸と同様の発生毒性作用があるのか、また、Hbb-y がそのバイオマーカーとなりうるのかを検討することとした。

・トリコスタチン A 投与による催奇形性に特異的なバイオマーカーとなるエクソソーム RNA の単離：

トリコスタチン A (Trichostatin A, TSA) は、放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* から最初に単離され、クロマチン構造を変化させることによって遺伝子の発現を調節するという独特の作用機序を持っている。具体的には、HDAC を阻害することでヒストンのアセチル化を促進し、クロマチンを開いた状態にして特定の遺伝子を活性化する。このような機能により、トリコスタチン A はがん細胞に対して細胞周期を停止させたり、アポトーシスを誘導したり、細胞の分化を促進することができるため、乳がんや白血病、大腸がんをはじめとするさまざまな種類のがんの治療における可能性が示されている。

さらに、トリコスタチン A は抗炎症作用も有しており、炎症性サイトカインの産生を抑制することで炎症反応を抑える効果があります。そのため、がん研究だけでなく炎症性疾患の治療研究にも役立てられている。また、エピジェネティックな制御メカニズムを解明するためのツール化合物として、遺伝子発現調節に関する基礎研究でも広く活用されている。

既報によると、トリコスタチン A (TSA) の静脈内 (10、25、50 $\mu\text{g/kg}$ 体重) および経口 (20、50、100 $\mu\text{g/kg}$ 体重) の 14 日間反復投与毒性試験を *Swiss albino mice* で実施し、死亡例や体重、食物摂取量、血液・尿検査、臓器重量に有意な変化は見られなかったが、高用量群では腎臓の腫大、充血、変色が認められ、組織学的には糸球体および尿細管の変性が確認されている一方、遺伝毒性試験ではいずれの用量でも有意な変化は見られていない。この結果から、静脈内では 25 $\mu\text{g/kg}$ 、経口では 50 $\mu\text{g/kg}$ を NOAEL としている (Haritwal T. et al., *Drug and Chemical Toxicology* Volume 47, 2024 - Issue 6, 2024)。

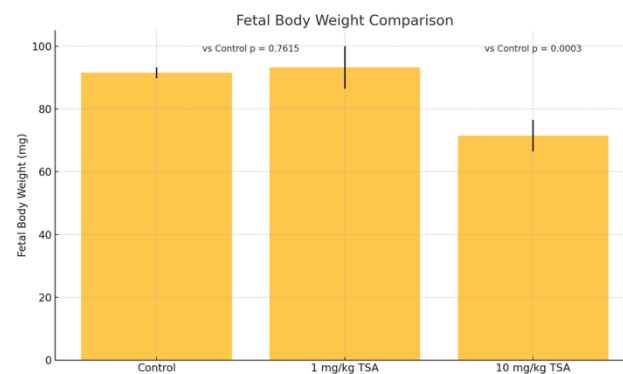
また、TSA の妊娠マウスへの投与については、妊娠 8 日に 0, 2, 4, 8, 16mg/kg で投与した報告があるが、着床部位数、死亡胎児数、および吸収胎児数、平均胎児体重、外表奇形は認められていない (Menegola E. et al.,

Birth Defects Research (Part B) Volume 74;392-398, 2005)。しかし、骨格を解析すると、TSA 曝露群の胎児では、特異的かつ用量依存的な椎骨または肋骨の癒合、椎体セグメントの重複などの体軸の異常が観察されている (Menegola E. et al., *Birth Defects Research (Part B)* Volume 74;392-398, 2005)。

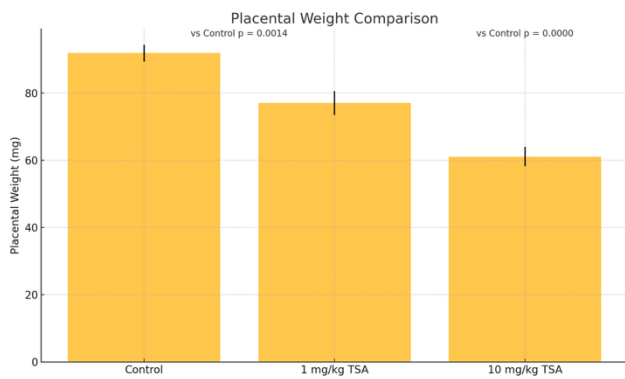
本研究においては、妊娠中に VPA を服用した場合や、妊娠マウスへの VPA 投与実験で見られる神経管閉鎖障害や指形成不全などの表原型が、同じ HDAC 阻害作用を持つ TSA の投与でも観察されるのかの条件検討を行うために、既報にあった妊娠 8 日目のみの単回投与ではなく、妊娠 8 日より 2 日間の反復投与を 10 mg/kg を最高用量とし、低用量として 1 mg/kg として行なうこととした。また、妊娠 8 日からの 2 日間の反復投与で表原型の見られない場合は、より投与期間の多い反復投与を行うこととした。

妊娠 8 日より 2 日間の反復投与において妊娠 12 日および妊娠 15 日目に解剖を行い、1 群 4 腹になる計画で交配を行った。

今年度は、十分な数の妊娠マウスを得られなかったため、妊娠 12 日目の、1mg/kg 投与群 (N=3)、10mg/kg 投与群 (N=3) の結果、および、非処置コントロール群 (N=3) のみを示す。残りの投与実験は、令和 8 年度に行う予定である。



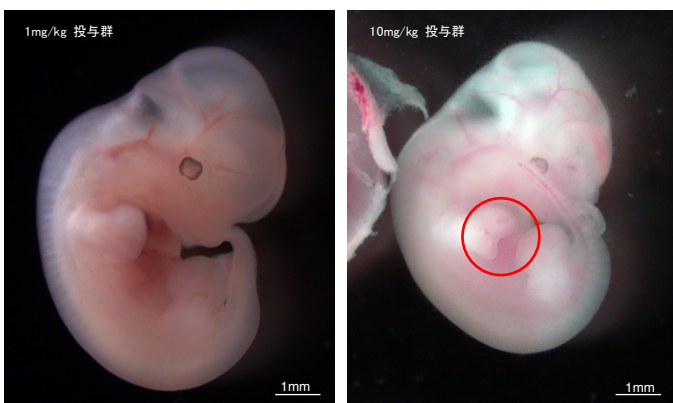
図：TSA を 1mg/kg (N=3) および 10mg/kg (N=3) で妊娠 8 日目、9 日目に経口投与を行い、妊娠 12 日目に胎児の重量測定を行なっている。
非処置コントロールの平均体重：92.1 mg
1 mg/kg TSA 群の平均体重：92.3 mg
10 mg/kg TSA 群の平均体重：71.4 mg
10 mg/kg TSA 群はコントロールと比較して、胎児体重を有意に減少させることが示された。



図：TSA を 1mg/kg (N=3) および 10mg/kg (N=3) で妊娠 8 日目、9 日目に経口投与を行い、妊娠 12 日目に胎盤の重量測定を行なっている。
 非処置コントロールの平均体重：92.3 mg
 1 mg/kg TSA 群の平均胎盤重量：76.9
 10 mg/kg TSA 群の平均胎盤重量：61.4
 1 mg/kg TSA 群、および、10 mg/kg TSA 群はともにコントロールと比較して、胎盤重量を有意に減少させることが示された。

このことから、妊娠 8 日目のみの TSA の単回投与の既報では胎児体重には影響しないとされていたが、妊娠 8 日目から 2 日間の 10mg/kg TSA の反復投与により、胎児体重、および、胎盤重量におよそ 20 %、および、30% 減少の影響が出ることが明らかになった。

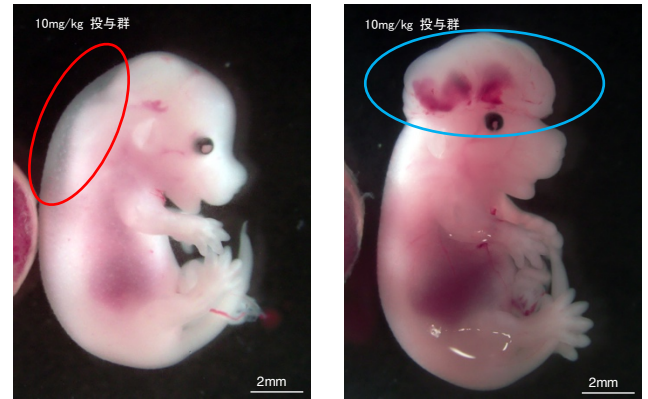
さらに、外表奇形観察を行ったところ、10mg/kg 群においては、VPA 投与と同様に、指形成異常が確認された。体重および胎盤重量の低下も VPA 投与でも観察されていたので、HDAC 阻害という共通のメカニズムが催奇形性の原因であると言える。



図：TSA を 1mg/kg (左)、および、10mg/kg (右) で妊娠 8 日目、9 日目に経口投与を行い、妊娠 12 日目に外表奇形観察を行なった。10mg/kg においては、指の異常（赤丸部分）が確認されている。

また、VPA の投与およびヒトにおける VPA の服用により神経管閉鎖不全の表原型が見られているが、10mg/kg の TSA 投与（妊娠 8 日、9 日）では見られなかった。そこで、投与日数を妊娠 7 日から 11 日に広げて反復投与を行ったところ、VPA で見られてい

た神経管閉鎖不全や、浮腫などが観察された。



図：TSA を 10mg/kg で妊娠 7 日目から 11 日目に経口投与を行い、妊娠 12 日目に外表奇形観察を行なった。浮腫（左：赤丸部分）、および、神経管閉鎖不全（右：青丸部分）が観察された。

今年度の得られた結果より、エピジェネティックな阻害作用（HDAC 阻害）は、催奇形性発現の大きな原因の一つである可能性が考えられる。

TSA 投与により、胎盤にも影響がでることを明らかにしたので、令和 8 年度には胎盤の病理解析を行う予定である。

また、他のエピジェネティック阻害剤での検証を行い、さらに、羊水中のエクソソームにおいて Hbb-y 遺伝子の発現が催奇形性のバイオマーカーになりうるのかを検証する。

●次世代型生殖発生毒性試験の高度化（研究分担者：落谷、伊川、研究代表者：小野）

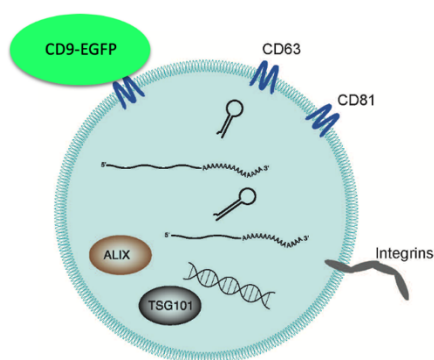
・遺伝子改変マウスを利用したエクソソームの由来した臓器の特定：

現在までに、我々は化学物質による臓器障害や遺伝子改変により引き起こされる病変などのバイオマーカーとなりうる血液中や羊水中のエクソソーム RNA の単離を行ってきた(Ono R. et al., *Toxicology Reports* 2020、Ono R. et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024)。

また、発生のステージに特異的なエクソソーム RNA や、雌雄差のあるエクソソーム RNA などの単離にも成功している。しかしながら、これらのエクソソーム RNA が実際にどのから体液中に分泌されたのかの証明はできていない。

そこで、我々は、エクソソームの由来する臓器の特定を可能とする遺伝子改変マウス“CD9-EGFP Kock-in (KI) マウス”（エクソソーム可視化マウス）の作製に成功している。

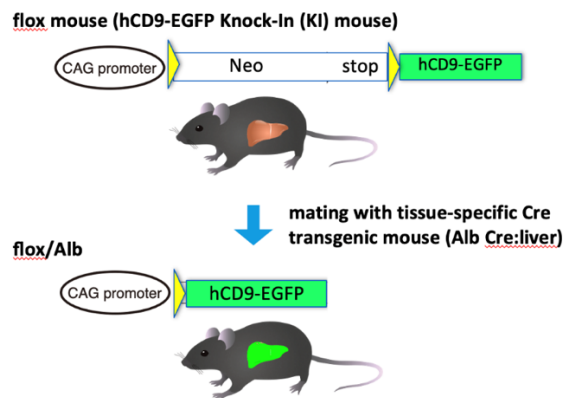
エクソソームは、脂質二重膜からなり、その表面には、CD9、CD63、CD81 などのテトラスパニンが局在することが知られている。そこで、下図の様に特定の細胞においてヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現させることで、特定の細胞に由来するエクソソームのみを EGFP の蛍光シグナル、および、ヒト CD9 に特異的な抗体を利用した免疫染色やウエスタンブロットにより検出可能になる。



図：エクソソームの模式図。表面には CD9、CD63、CD81 などのテトラスパニンが存在している。mRNA や miRNA などもエクソソームに内包されることが知られている。

このヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現するカセットを、マウス 6 番染色体上のすべての細胞で恒常的に遺伝子発現が可能な ROSA26 領域にノックインし、Cre-loxP システムを利用して条件的に発現を誘導で

きるマウスを作製した。

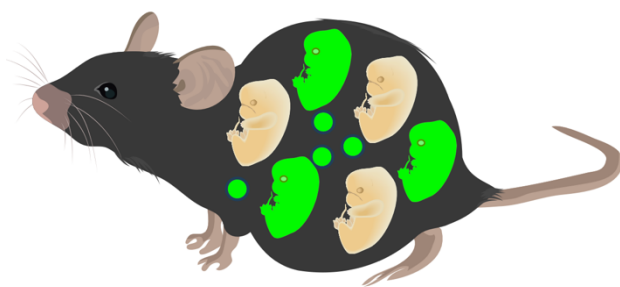


図：通常は Neomycin 耐性遺伝子を発現しているが、特定の臓器で発現する Cre トランスジェニックマウスと交配することで、特定の臓器でのみヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現ようになる。ここでは、一例として、その結果、特定の臓器から分泌されたエクソソームが EGFP でラベルされ、蛍光観察が可能になる。また、ヒト CD9 に対する抗体を用いることで、特定の臓器由来のエクソソームを捕捉し、検出することや、特異的に RNA やタンパクの解析を行うこともできる。

本研究においては、これらのエクソソーム可視化系を利用して、母子間でのエクソソーム交換を検出することが可能かを検証することとした。

CD9-EGFP Kock-in (KI) マウス (flox) マウス (♀) と epiblast 由来組織で Cre を発現する Sox2 Cre トランスジェニックマウス交配することで、flox/Sox2 Cre マウス (♂) を得た。このマウスは、体の全ての細胞でヒト CD9-EGFP を発現する CD9-EGFP allele をヘテロで有している。

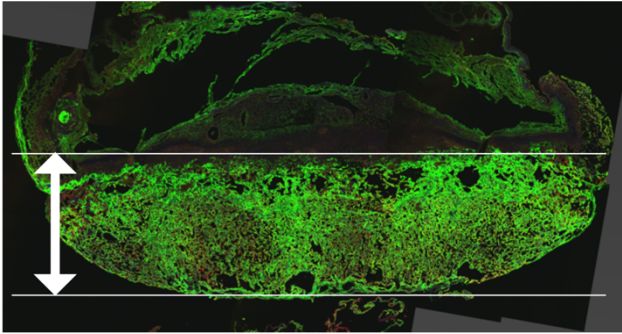
そこで、flox/Sox2 Cre マウス (♂) と野生型 C57BL/6J ♀ を交配し妊娠すると、子宮内では、半分の胎児が CD9-EGFP allele を持ち、残りの半分は野生型となる。



図：CD9-EGFP allele をヘテロで持つ flox/Sox2 Cre マウス (♂) と野生型 C57BL/6J ♀ の交配で得られる妊娠マウスの概念図。胎内の半数の胎児は CD9-EGFP allele を持つことで、全身の細胞よりヒト CD9-EGFP でラベルされたエクソソームを分泌する。EGFP を検出することで、胎児由来のエクソソームがどのくらい母動物の血液の中に循環しているのかを明らかにできる。

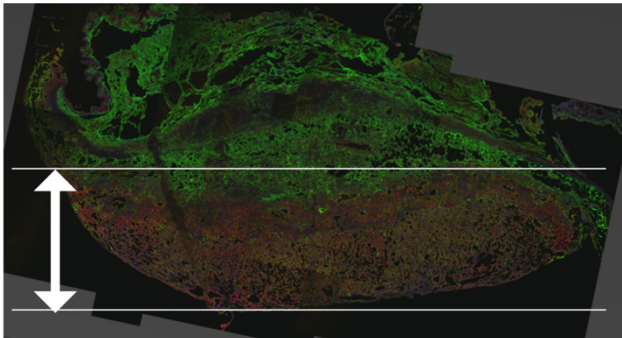
実際に得られた妊娠マウスを解剖し、EGFP を超解像

度共焦点顕微鏡で観察すると、CD9-EGFP allele を持つ胎児の胎盤は、下図の様に胎児側胎盤組織の全ての細胞が EGFP 陽性となっており、母体側胎盤(脱落膜)では、EGFP シグナルが弱くなっている。しかしながら、一定量の EGFP シグナルが観察され、これらは、胎児由来の EGFP 陽性エクソソームを取り込んだ結果である。



図：CD9-EGFP allele を持つ胎児の胎盤(白矢印部分)の EGFP 蛍光観察像。胎児側胎盤では全ての細胞が EGFP 陽性となっており、母体側胎盤(胎児胎盤より上部)においては、胎児側細胞より分泌された EGFP 陽性エクソソームを取り込むことで弱い EGFP シグナルを観察することができる。

一方、CD9-EGFP allele を持たない胎児の胎盤では一部の細胞において EGFP 陽性が確認できる。これは、CD9-EGFP allele を持つ胎児より分泌された EGFP 陽性エクソソームが母体の血液循環を通じて CD9-EGFP allele を持たない胎児組織に取り込まれたものと判断できる。



図：CD9-EGFP allele を持たない胎児の胎盤(白矢印部分)の EGFP 蛍光観察像。母体側胎盤(胎児胎盤より上部)においては、母体血を循環する CD9-EGFP allele を持つ胎児より分泌されたヒト CD9-EGFP 陽性エクソソームを取り込むことで弱い EGFP 陽性となっている。胎児側胎盤でも EGFP 陽性となっている細胞が確認できる。

来年度は、母体中を循環する胎児由来のエクソソームを免疫沈降により濃縮し、母子間でエクソソームを交換し、どのような母子間相互作用をしているのかを明らかにする。また、胎児由来の発生毒性のバイオマーカーを母体血より抽出し、解析することが可能となり、エクソソームを毒性指標とした生殖発生毒性評価法の高度化を行う。

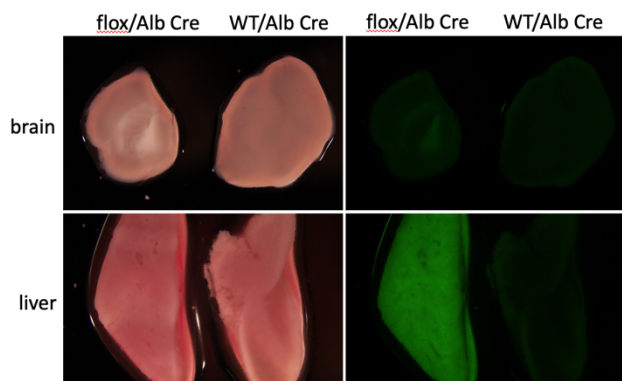
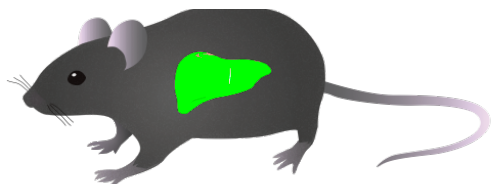
●次世代型毒性試験の *in vitro* モデル開発（研究分担者：成瀬、落谷、研究代表者：小野）

将来的な動物実験によらない安全性評価法の確立が多方面より求められており、生殖発生毒性評価法の開発と並行して、我々が既に単離した肝障害のバイオマーカーとなるエクソソーム RNA が、肝臓オルガノイドの培養上清中のエクソソームでも同様に検出されるものなのかを検討するために行なっている。

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評価を行う。

本研究では、成熟した hepatocyte に分化した細胞でのみ CD9-EGFP 陽性となる系なので、オルガノイド研究の最大懸案である臓器を反映したオルガノイドの分化条件を、EGFP 陽性細胞を指標とすることで最適化することが可能な優れたアッセイ系を確立できると考えている。

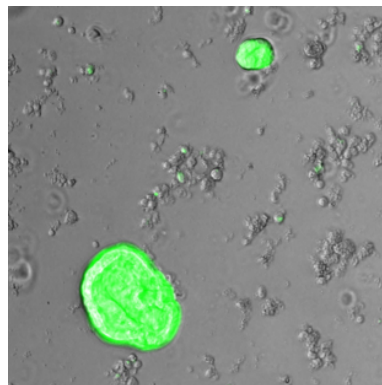
今年度は、CD9-EGFP Kock-in (KI) マウス (flox) マウス (♂) と肝臓特異的に Cre を発現する Alb Cre トランスジェニックマウスを交配することで、肝臓特異的にヒト CD9-EGFP を分泌するマウスを作製し、その肝臓よりオルガノイドの樹立を行なった。



図：肝臓特異的にヒト CD9-EGFP を発現する flox/Alb Cre マウスの臓器を蛍光観察すると、一例として、脳では EGFP が陰性であるが、肝臓では、EGFP の発現が誘導されている。

その結果、下図の通り、EGFP 陽性の肝臓オルガノイ

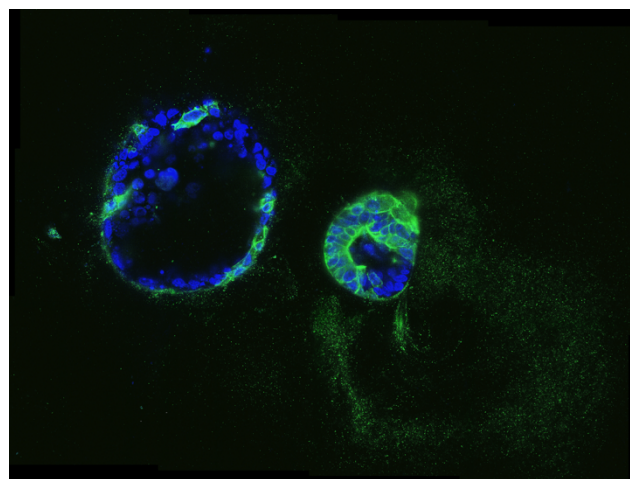
ドの樹立に成功した。



図：肝臓特異的にヒト CD9-EGFP を発現する flox/Alb Cre マウスの肝臓より樹立したオルガノイドは、蛍光観察すると、EGFP 陽性になっている。

さらに、超解像度共焦点顕微鏡を利用して flox/Alb Cre 肝臓オルガノイドを観察したところ、下図の通り、肝臓オルガノイドの全体で EGFP 陽性になっているわけではなく、一部の細胞は EGFP 陰性になっていることがわかった。これは、肝臓のオルガノイドは、hepatic stem cell が未分化な状態で細胞増殖し、それらが分化して hepatocyte になることで、初めてアルブミンを分泌するようになり、それにより、Alb Cre の発現が誘導されることで、Cre-loxP システムが働きヒト CD9-EGFP の発現が誘導されるようになるからである。

また、超解像度共焦点顕微鏡像からは、EGFP 陽性細胞から、単一エクソソームが多数分泌されている様子が下図の通りに検出できている。

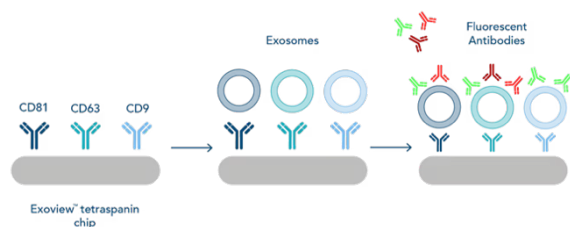


図：肝臓特異的にヒト CD9-EGFP を発現する flox/Alb Cre マウスの肝臓より樹立したオルガノイドを超解像度共焦点顕微鏡で観察すると、オルガノイドが hepatocyte に分化した細胞でのみ EGFP 陽性になっている様子が検出され、また、それらの陽性細胞からは、エクソソームの粒子が分泌される様子が観察されている。

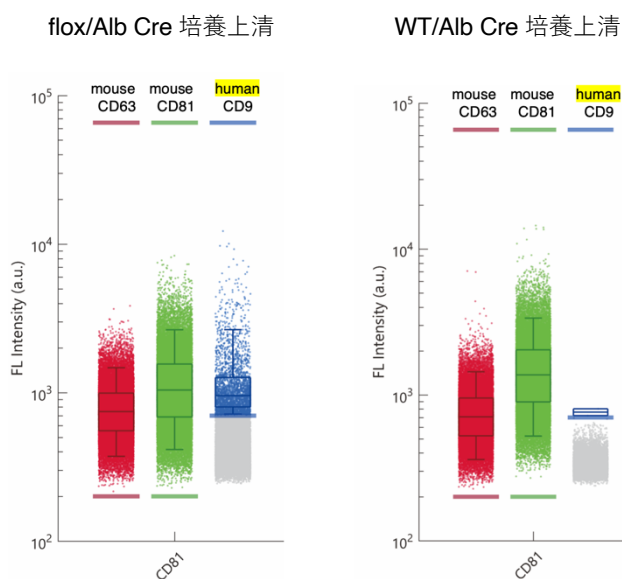
ここで、flox/Alb Cre 肝臓オルガノイドから、培養液

中にエクソソームが多数分泌されていることが検出できたので、培養液中に分泌されたエクソソームのシングルエクソソーム解析を行うことで、培養液中に存在するエクソソームのうち、どれくらいが EGFP 陽性細胞より分泌されているのかを検出することとした。

シングルエクソソーム解析には、Exoview imager を利用することとした。Exoview は、下図にある様に、チップ上にプリントされた抗テトラスパンイン抗体により、エクソソームを捕捉し、その捕捉されたエクソソームを他のエクソソームタンパクに対する最大 3 種類の蛍光抗体によりシングルエクソソーム解析を可能にする。本研究においては、ヒト CD9 抗体、マウス CD63 抗体、マウス CD81 抗体を用いて解析を行うことにより、エクソソーム上に存在するヒト CD9-EGFP をシングルエクソソーム単位で検出し、カウントすることが可能になる。



図：Exoview の概略。ExoView は、チップ上にプリントされた抗体上に単一のエクソソームを捕捉し、蛍光抗体を用いることでエクソソームの表面タンパク質をカウントおよび識別することが可能になる。（図引用：<https://www.ptglab.co.jp/news/blog/new-ways-to-study-the-elusive-exosome/>）



図：Exoview を利用した flox/Alb Cre 肝臓オルガノイド（左）および WT/Alb Cre 肝臓オルガノイド（右）の培養上清のシングルエクソソーム解析。エクソソームを検出するための蛍光抗体には、マウス CD63（赤点）、マウス CD81（青点）、ヒト CD9（緑点）抗体を用いており、ヒト CD9 抗体では、ヒト CD9-EGFP 陽性エクソソームのみを検出している。

シングルエクソソーム解析の結果、flox/Alb Cre 肝臓オルガノイドの培養上清でのみ、ヒト CD9 陽性エクソソームが検出された。このことから、我々の作製したシングルエクソソーム解析系が機能していることを示すことができた。

D. 考察と結論

考察

本研究では、母体にバルプロ酸 (VPA)、および、トリコスタチン A (TSA) を投与することで、胎児における催奇形性発現メカニズムの一端を明らかにし、羊水中のエクソソーム RNA を用いた新たなバイオマーカー探索の可能性を示した。

妊婦が VPA を服用した場合には、胎児において重篤な影響が出る可能性が広く知られており、多くの国のガイドラインで VPA の妊娠中の使用は原則として禁忌とされている。実際に見られる胎児影響として、神経管閉鎖障害や、指形成不全などの外表奇形が報告されている。我々の行った妊娠マウスへの VPA 投与実験においても神経管閉鎖障害や指形成不全などの表原型が明らかになった。VPA は、HDAC 阻害作用を持つことから、これらの催奇形性が VPA の持つ HDAC 阻害作用によるものであることが想定された。

そこで、VPA と同様に HDAC 阻害作用を持つ TSA の妊娠マウスへの投与においても、VPA と同様の催奇形性が発現するのかを検証した。

既報においては、妊娠 8 日目のみの TSA 単回投与で外表奇形は観察されなかった。そこで、妊娠 8 日より 2 日間の反復投与を 10 mg/kg を最高用量とし、低用量として 1 mg/kg として行なうこととした。

我々の行った、妊娠マウスへの TSA 反復投与によって、胎児の神経管閉鎖不全や指形成不全といった VPA で観察されていた外表奇形と同様なものが観察されたことから、エピジェネティック異常が催奇形性を誘発する主要な要因である可能性が高いと考えられる。

さらに、エクソソームの由来を明確にするために我々の作製した“エクソソーム可視化マウス”を活用することで、母体血中のエクソソームを胎児由来と母体由来に分離し、それぞれの動態を解析する技術基盤が整えることに成功した。この成果により、より精度の高いバイオマーカー探索と評価が可能となる。

加えて、将来的に動物実験を行わない毒性評価を可能とする動物実験代替法を推進するために、in vivo を高度に反映しているとされるオルガノイド 3D 培養系を用いた代替試験法の開発に資する研究にも取り組んでいる。

我々の作製した hepatocyte において特異的にヒト CD9-EGFP を発現するマウスの肝臓よりオルガノイドを樹立し、その培養上清中に肝臓オルガノイドか

ら分泌されるエクソソームを指標として検出することで、hepatocyte への分化状態をリアルタイムにモニターすることが可能な実験系の確立に成功した。肝臓オルガノイドにおけるアルブミン陽性細胞の分化状況を評価できるこの手法は、動物実験に依存しない毒性評価の高度化に資する研究になっている。

結論

本研究を通じて、催奇形性発現におけるエピジェネティック異常の重要性を示すとともに、羊水中のエクソソーム RNA を用いた新規バイオマーカー候補を提示した。

また、胎児由来および母体由来エクソソームを分離・解析するための新たな技術基盤を確立した。加えて、肝臓オルガノイドからのエクソソーム分泌を指標とすることで、動物実験代替法のさらなる発展に向けた一歩を踏み出した。

今後は、Hbb-y 遺伝子の活性化が他のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による催奇形性にも共通して見られるかを検証し、エクソソーム RNA バイオマーカーとしての有用性をさらに明確にする予定である。

また、肝臓オルガノイドを用いた評価系の精度向上を図ることで、非臨床試験における信頼性の高い代替法の確立を目指す。これらの成果は、新しい毒性評価指標や動物実験代替法の開発に寄与するものであり、今後の毒性研究において重要な知見を提供する。

E. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

●Ryuichi Ono, Makiko Kuwagata, Mie Naruse, Akihito Watanabe, Masao Takano, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(1): 37-56. [doi.org/10.2131/fts.11.37]

Fujioka T, Shiura H, Ishii M, Ono R, Endo T, Kiyonari H, Hirate Y, Ito H, Kanai-Azuma M, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F
Targeting of retrovirus-derived Rtl8a/8b reduces social response and increases apathy-like behavior associated with GABRB2 reduction
OPEN BIOLOGY 2025 Jan;15(1):240279. [doi: 10.1098/rsob.240279].

●小野 竜一
非臨床安全性評価における New approach methods としての細胞外小胞の活用
医学のあゆみ Vol.291 No.9 2024. 11. 30

Makiko Kuwagata, Yuko Doi, Hirokatsu Saito, Mariko Tsurumoto, Toshime Igarashi, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(4): 169-181. [doi.org/10.2131/fts.11.169]

Toshio Imai, Rikako Ishigamori, Mie Naruse, Masako Ochiai, Yoshiaki Maru, Yoshitaka Hippo, Yukari Totsuka
Bridging toxicological properties of environmental chemicals between animals and humans using healthy organoid systems
J Toxicol Sci. 2024;49(10):425-434. doi: 10.2131/jts.49.425.

●Yamamoto T, Nakayama J, Urabe F, Ito K, Nishida-Aoki N, Kitagawa M, Yokoi A, Kuroda M, Hattori Y, Yamamoto Y, Ochiya T.
Aberrant regulation of serine metabolism drives extracellular vesicle release and cancer progression. *Cell Rep.* 2024 Aug 27;43(8):114517.

Age-associated aberrations of the cumulus-oocyte interaction and in the zona pellucida structure reduce fertility in female mice.
Ishikawa-Yamauchi Y, Emori C, Mori H, Endo T, Kobayashi K, Watanabe Y, Sagara H, Nagata T, Motooka D, Ninomiya A, Ozawa M, Ikawa M.

Commun Biol. 2024 Dec 24;7(1):1692. doi: 10.1038/s42003-024-07305-z.

TEX38 localizes ZDHHC19 to the plasma membrane and regulates sperm head morphogenesis in mice.
Kaneda Y, Lu Y, Sun J, Shimada K, Emori C, Noda T, Koyano T, Matsuyama M, Miyata H, Ikawa M.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2025 Mar 11;122(10):e2417943122. doi: 10.1073/pnas.2417943122. Epub 2025 Mar 3.

2. 学会発表 (抜粋)

●Ryuichi Ono, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Yusuke Yoshioka, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima
Detection of EVs in Hepatotoxicity Using CD9-mEmerald Reporter Mouse
INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXTRACELLULAR VESICLES ANNUAL MEETING 2024, (2024.5.12, Melbourne, Australia) 、口頭

五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋 雄、桑形麻樹子、北嶋 聡：ゲノム編集によるノックインマウス作製時に生じた、オンターゲット部位の多様な変異とその次世代伝達、第 71 回日本実験動物学会総会、京都、2024 年 5 月 29 日、ポスター

●Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S
バルプロ酸 (VPA) の妊娠マウスへの反復投与により誘導される羊水由来の細胞外小胞 Small RNA
第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.6.21 福岡) 、口頭

●Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S
Extracellular Vesicle Small RNAs Secreted from Mouse Amniotic Fluid Induced by Repeated Oral Administration of VPA to Pregnant Mice
Annual Conference of the International Federation of Placenta Associations (IFPA 2024) (2024.9.4., Montreal, Canada)

●Ryuichi Ono, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Yusuke Yoshioka, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima
Detection of extracellular vesicles (EVs) in Hepatotoxicity Using CD9-EGFP Reporter Mouse
58th Congress of the European Societies of Toxicology (2024.9.20., Copenhagen, Denmark)

●Ryuichi Ono, Mie Naruse, Yoko Hirabayashi, Takahiro

Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima: Evaluation of CD9-EGFP Reporter Mice for Organ-Specific EV Detection、ANNUAL MEETING of Society of Toxicology, 2024.3.17, Orlando、口頭

F. 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

II. 分担研究報告書

エクソソーム RNA を毒性指標とした
次世代型生殖発生毒性評価法の開発に資する研究
(24KD1004)

令和 6 年度 分担研究報告書

分担研究課題：次世代型生殖発生毒性試験の開発

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 桑形麻樹子
帝京平成大学
健康医療スポーツ学部・医療スポーツ学科
教授

研究分担者 平林 容子
国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター・センター長

研究協力者

北嶋聡 国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・部長
相崎健一 国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・第一室長
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
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
野崎弘枝 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

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で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催奇形性を判断するには莫大な時間や労力以外に、観察者の経験に依存する部分や、基準が必ずしも一定とは言えない部分がある。

近年、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、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2・R3-R5 年度、代表：小野竜一）にて、エクソソーム RNA を毒性指標とすることで、成獣の血液 1 滴から全身の病理組織学的診断が可能な次世代型毒性試験法の開発、および、妊娠動物の母体血および羊水から胎児の催奇形性を検出する高感度な系の開発に世界にさがけて成功した（Ono R. et al., *Toxicology Reports* 2020、Ono R. et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024）。

しかし、毒性指標となる体液由来エクソソームが本当に標的とする臓器より分泌されたのかという疑問があった。我々は、目的の細胞・臓器が分泌するエクソソームのみを可視化および単離可能な“エクソソーム可視化マウス”の作製に成功し、世界で初めて、肝臓由来のエクソソームを可視化し、肝毒性バイオマーカーが確かに肝臓に由来するエクソソームに由来することの証明に成功している（論文投稿準備中）。

そこで、本研究は、我々が開発した母体血および羊水中のエクソソームを指標にした新規生殖発生毒性評価法に新たに開発に成功した“エクソソーム可視化マウス”を活用することで、毒性機序に基づいた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生殖発生毒性評価法を開発することを目的としている。

3年計画の1年目にあたる令和6年度の進捗は以下の通りである。

バルプロ酸を用いた催奇形性モデルマウスを用い、胎児に奇形が発生するメカニズムを詳しく調査した。同じ用量のバルプロ酸を投与しても、すべての胎児に奇形が発生するわけではなく、一部の胎児にのみ奇形が見られることが確認された。そのため、奇形の有無を判別できる羊水中のエクソソーム RNA を網羅的に解析し、バイオマーカー探索を行った。その結果、本来は妊娠 15 日目には不活化される Hbb-y 遺伝子（胎児型グロビン遺伝子）が、奇形を示す胎児においてのみ活性化されていることを明らかにした。これは、バルプロ酸によるヒストン脱アセチル化阻害作用により、胎児型グロビンの発現が誘導される可能性を示唆している。

また、エピジェネティック異常が奇形を引き起こす主要な要因であると仮定し、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の一種であるトリコスタチン A (TSA) についても同様の影響を検証することとした。母動物に高用量の TSA を投与した結果、バルプロ酸投与で見られた神経管閉鎖不全や指形成不全、胎児および胎盤の成長遅延といった異常が観察された。この結果から、TSA もバルプロ酸と同様に強い催奇形性作用を持つ可能性が高いと考えられる。これらの胎児から採取した羊水を用い、次年度に Hbb-y 遺伝子の活性化を検証する計画である。

令和6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催奇形性を判断するには莫大な時間や労力以外に、観察者の経験に依存する部分や、基準が必ずしも一定とは言えない部分がある。

近年、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、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2・R3-R5 年度、代表：小野竜一）にて、エクソソーム RNA を毒性指標とすることで、成獣の血液1滴から全身の病理組織学的診断が可能な次世代型毒性試験法の開発、および、妊娠動物の母体血および羊水から胎児の催奇形性を検出する高感度な系の開発に世界にさがけて成功した (**Ono R.** et al., *Toxicology Reports* 2020、**Ono R.** et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024)。

しかし、毒性指標となる体液由来エクソソームが本当に標的とする臓器より分泌されたのかという疑問があった。我々は、目的の細胞・臓器が分泌するエクソソームのみを可視化および単離可能な“エクソソーム可視化マウス”の作製に成功し、世界で初めて、肝臓由来のエクソソームを可視化し、肝毒性バイオマーカーが確かに肝臓に由来することを証明することに成功している（論文投稿準備中）。

そこで、本研究は、我々が開発した母体血および羊水中のエクソソームを指標にした新規生殖発生毒性評価法に新たに開発に成功した“エクソソーム可視化マウス”を活用することで、毒性機序に基づいた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生殖発生毒性評価法を開発することを目的としている。

＜各年度の目標＞ 令和6年度・先行研究で得られた母体血および羊水中のエクソソーム RNA を生殖発生毒性物質によるマウスモデル動物の作成およびマイクロサンプリングを行う。

令和7年度・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解析を行う。妊娠動物において、胎児のみを“エクソソーム可視化マウス”を利用することで、胎児由来のエクソソームのみを可視化、および単離を行ない、毒性機序に基づいた次世代型生殖発生毒性評価法の高度化を行う。

令和8年度・次世代型生殖発生毒性評価法のバリデーションおよびガイドライン化に向けての施策検討

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。

●次世代型生殖発生毒性試験の開発（研究代表者：小野、研究分担者：桑形、平林）

エクソソーム RNA を腹単位の毒性指標とする次世代型生殖発生毒性試験を開発するために、妊娠マウスに既知の生殖発生毒性物質を経口投与し、母動物の毒性検出、および、胎児に発現する形態変化から毒性指標となる母体血および羊水中のエクソソーム RNA の同定を次世代シーケンス解析により行う。

●次世代型生殖発生毒性試験の高度化（研究分担者：落谷、伊川、研究代表者：小野）

我々は既に、様々な毒性バイオマーカーとなるエクソソーム RNA の報告をしているが、それらが実際にどの細胞・臓器に由来したのかは確定できていなかった。そこで、任意の臓器（細胞）に由来したエクソソームの表面にのみ特異的にヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現させる遺伝子改変マウス（エクソソーム可視化マウス）を作製し、目的臓器由来のエクソソームのみを検出・単離することに成功した。この“エクソソーム可視化マウス”を用いることで、母体血中のエクソソームを母体に由来するもの、胎児に由来するものに完全に分けての検出が可能になり、評価法の高度化に大きく寄与する。また、毒性バイオマーカーとなるエクソソーム RNA の遺伝子改変マウスを作成することにより、毒性メカニズムへの関与について検証を行う。

●次世代型毒性試験の *in vitro* モデル開発（研究分担者：成瀬、研究代表者：小野）

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評価を行う。

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、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。

・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ェスタンブロットティングや、エクソソームの表面タンパクに対する抗体をコーティングしたチップ上でエクソソームを捕捉して特定のエクソソームを単離可能な EXOVIEW を利用することで単離されたエクソソームの大きさと分布、数のカウント、および、シングルエクソソーム上に存在するタンパクの同定を行うことで、エクソソームが由来した細胞の同定が可能になる。

・マウスを用いたトリコスタチン A 経口投与による母動物血清中並びに胎児及び羊水中エクソソームの解析のための試料採取法

二分脊椎や無脳症、脳瘤などの神経管閉鎖障害を誘発するバルプロ酸を催奇形性陽性対照物質として、マウスの神経管閉鎖時期である妊娠 9 日から 11 日にバルプロ酸を 0、300、600 mg/kg の 3 用量経口投与し、妊娠 15 日目に、母動物血清および羊水（胎盤、卵黄嚢膜、胎児）をエクソソーム解析用に採取し、胎児の外表面奇形の観察を行なっている。そこで、外表面奇形の有無を検出するエクソソーム RNA を毒性指標としてバイオマーカーの単離を行なった。

得られたバイオマーカーは、Hbb-y 遺伝子の RNA 断片であった。

この遺伝子は、本来、妊娠 15 日目には不活化される Hbb-y 遺伝子の発現が、奇形胎児でのみ発現が誘導されているものである。

投与物質であるバルプロ酸は、ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC の活性を阻害することが知られており、本来、エピジェネティック制御により不活性化される Hbb-y 遺伝子の発現がエピジェネティック異常により発現が誘導されているものと考えられる。このことから、バルプロ酸と同様に HDAC 阻害作用を持つトリコスタチン A（TSA）を投与し、バルプロ

酸と同様に催奇形性作用があるのかを観察し、また、母体血および羊水中のエクソソーム RNA を毒性バイオマーカーとしてスクリーニングを行う。

投与物質：トリコスタチン A
製造元：東京化成工業株式会社
CAS 番号：58880-19-6
分子量：302.37 g/mol

ロット番号：WXBD4552V
純度：>98.0%(HPLC)
性状：白色、粉末
保管条件：密栓、冷暗所

1-2. 媒体

名称：0.5 w/v%メチルセルロース溶液（略称：0.5% MC溶液）
製造元：富士フィルム和光純薬株式会社
ロット番号：CAE0466

媒体の調製

必要量のトリコスタチン A を秤取し、0.5%MC 溶液に徐々に加えて分散させた。調製後、遮光し、冷蔵保存した。

使用動物

動物種：マウス（SPF）
系統：C57BL/6J
供給源：ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社、厚木飼育センター
入荷時週齢：雌 10 週齢、雄 11 週齢
匹数：交配用雄 12 匹、雌 24 匹
使用した妊娠動物：4 匹

入荷後 1 週間の検疫・馴化期間を経て、一般状態及び体重推移に異常のない動物を用いた。

交配：11 週齢以上の雌 1 匹に 12 週齢以上の雄 1 匹を終夜同居させた。翌朝、膈内に膈栓が確認された雌を交尾成立動物とし、その日を妊娠 0 日とした。

群分け：交尾成立日（妊娠 0 日）ごとに行い、妊娠 0 日の体重を基に各群の体重が可能な限り均等となるようにした。

2. エクソソーム解析用試料採取試験

2-1. 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

投与経路は臨床適用経路である経口投与を選択し、投与期間は妊娠 8 日より 9 日までの 2 日間、および、7 日より 11 日までの 5 日間とした。

2-2. 投与方法

投与方法は、げっ歯類の経口投与方法に際して一般的な強制経口投与とした。

トリコスタチン A 溶液を胃ゾンデを用いて胃内に強制経口投与した（8:00~11:00 の間）。動物ごとの投与液量（表示単位：0.01 mL）は投与当日の体重を基準に算出した。

2-3. 投与量及び群構成

投与量は 0、1 及び 10 mg/kg の 3 用量とし、媒体対照群を含め試料採取時点を考慮した 6 群構成とした。すなわち、媒体対照群、1 及び 10 mg/kg 群に妊娠 12 日剖検群、妊娠 15 日剖検群をそれぞれ設けた。剖検群ごとの交尾成立雌動物数を 4 匹とした。

投与量設定根拠

既報によると、トリコスタチン A(TSA) の静脈内(10、25、50 µg/kg 体重)および経口(20、50、100 µg/kg 体重)の 14 日間反復投与毒性試験を *Swiss albino mice* で実施し、死亡例や体重、食物摂取量、血液・尿検査、臓器重量に有意な変化は見られなかったが、高用量群では腎臓の腫大、充血、変色が認められ、組織学的には糸球体および尿細管の変性が確認されている一方、遺伝毒性試験ではいずれの用量でも有意な変化は見られていない。この結果から、静脈内では 25 µg/kg、経口では 50 µg/kg を NOAEL としている(Haritwal T. et al., *Drug and Chemical Toxicology* Volume 47, 2024 - Issue 6, 2024)。

また、TSA の妊娠マウスへの投与については、妊娠 8 日に 0, 2, 4, 8, 16mg/kg で投与した報告があるが、着床部位数、死亡胎児数、および吸収胎児数、平均胎児体重、外表奇形は認められていない。しかし、骨格を解析すると、TSA 曝露群の胎児では、特異的かつ用量依存的な椎骨または肋骨の癒合、椎体セグメントの重複などの体軸の異常が観察されている。

本研究においては、妊娠中に VPA を服用した場合や、妊娠マウスへの VPA 投与実験で見られる神経管閉鎖障害や指形成不全が見られる条件検討を行うために、妊娠 8 日より 2 日間の反復投与、および、妊娠 7 日より 5 日間の反復投与を 10 mg/kg を最高用量とし、低用量として 1 mg/kg として行なった。

2-5. 剖検

妊娠 12 日剖検群、妊娠 15 日剖検群において、イソフルラン吸入麻酔下で心採血した後、体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官/組織を詳細に観察した。また、肝臓、腎臓、脾臓の重量を測定し、肝臓、腎臓についてはその後の遺伝子発現解析およびタンパク解析用の採材を行い、肝臓、腎臓、脾臓は病理解析を行う。

2-6. 帝王切開及び母血清中エクソソーム解析用試料採取

剖検時に、着床の有無を肉眼的に観察して、妊娠の成否を確認した。妊娠が認められた母動物については、子宮内の生存胎児数、死亡胚・胎児数を判定・記録した。生存胎児と死亡胚・胎児の総数を着床数とした。

2-7. 母動物血清中エクソソーム解析用試料の処理

血液をポリプロピレン製容器（タンパク低吸着）に移し、室温で30分以上放置した後、遠心分離（4℃、3000×g、10分間）により血清を得た。得られた血清試料は試験番号、試料採取時点、動物番号、試料番号、採血年月日、試料名を明記したラベルを貼付したタンパク低吸着チューブに入れ、測定時まで-80℃の冷凍庫（許容値：-70℃以下）に保存する。

2-8. 羊水、胎児、胎盤の採取

1) 採取日及び採取時点

妊娠12日剖検群：各群4例

最終投与1時間後（09:00~12:00の間）

妊娠15日剖検群：各群4例、

妊娠12日帝王切開とほぼ同じ時刻
（09:00~12:00の間）

2) 対象部位（サンプル）の採取

妊娠動物の子宮壁を切開後、卵黄囊膜の外側から切開し、バリアチップで羊水をポリプロピレン製容器（タンパク低吸着）に採取した。羊水を採取した後、卵黄囊膜に被包された胎児及び胎盤を摘出した。胎児と胎盤を分離し、個別に重量を記録した。胎盤はほぼ均等に2分割し、それぞれRNA later と10%リン酸緩衝ホルマリン液を満たした15 mLのコニカルチューブに保管した。羊水は遠心分離（4℃、6000×g、2分間）後、上清をバリアチップでタンパク低吸着チューブに移した。胎児は10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、特に神経管の閉鎖状態に注目し、形態観察を実施した。

・エクソソーム RNA 網羅的遺伝子発現解析

国立医薬品食品衛生研究所において採取された血液サンプルより抽出されたエクソソームは、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。

・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エクソソームの由来した臓器の特定

エクソソームの表面には CD9, CD63, CD81 などのテトラスパニンが存在する。そこで、臓器、細胞特異的に CD9-EGFP 融合タンパクを発現させることで、特定の細胞から分泌されるエクソソームのみが CD9-EGFP 融合タンパクを持つことで、エクソソームがどの臓器に由来したのかを検出することが可能にな

る。本研究で利用するマウス系統は以下の通りである。

CD9-EGFP ノックイン (KI) マウス (エクソソーム可視化マウス)

エクソソームはすべての臓器および細胞から分泌される細胞小胞であり、その表面には CD9、CD63、CD81 などが多く存在する。本マウスは、ROSA26 領域にチキン β アクチンプロモーターを配置し、Cre-loxP システムを利用することで臓器特異的にヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現するよう設計されたノックインマウスである。

Alb-Cre トランスジェニックマウス

肝細胞に特異的に Cre 酵素を発現するトランスジェニックマウスであり、肝臓特異的な遺伝子発現制御の研究に利用される。

Sox2-Cre トランスジェニックマウス

胚盤葉上層 (epiblast) および卵に特異的に Cre 酵素を発現するトランスジェニックマウスであり、初期発生過程の解析や遺伝子操作に用いられる。

・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

CD9-EGFP KI マウス (flox マウス) と Alb-Cre トランスジェニックマウスを交配して作成した flox/Alb-Cre マウスの肝臓を採取する。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。その後に 40 μ m 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砕した後、MBOC (Matrigel Bilayer Organoid Culture) 法を用いて細胞をマトリゲルに包埋し、至適培地を添加し培養することでオルガノイドを樹立する。

樹立に成功した肝臓オルガノイドを超解像度共焦点顕微鏡で観察することで、エクソソームの可視化を行う。

(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

●次世代型生殖発生毒性試験の開発（研究代表者：小野、研究分担者：桑形、平林）

・バルプロ酸投与による催奇形性に特異的なバイオマーカーとなるエクソソーム RNA の単離：

厚生労働科学研究費・化学物質リスク事業 (21KD1001) において、我々は、二分脊椎や無脳症、脳瘤などの神経管閉鎖障害を誘発するバルプロ酸を催奇形性陽性対照物質として、マウスの神経管閉鎖時期である妊娠 9 日から 11 日にバルプロ酸を 0、300、600 mg/kg の 3 用量経口投与し、妊娠 11 日目、15 日目、18 日目に、解剖を行い、胎児の外表奇形観察を行い、600 mg/kg において催奇形性が発現し、投与したバルプロ酸の濃度依存的に発現の誘導、もしくは抑制される羊水中のエクソソーム RNA が複数存在することを明らかにしている（Ono R. et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024）。

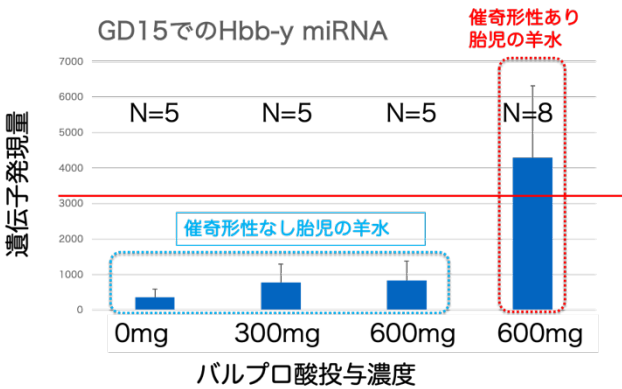
また、これらのエクソソーム RNA の中には、インプリンティング遺伝子が多く含まれていることから、これらの遺伝子発現誘導もしくは抑制には、エピジェネティック制御が関与している可能性が高い。

我々の研究で得られたバルプロ酸投与による催奇形性は、600 mg/kg 群において全ての胎児に観察されるものではなく、一部の胎児でのみ観察された。なお、妊娠 15 日目において確認された 8 匹の催奇形性の詳細は、以下の通りである。

fetus ID	neural tube closure defect	digit malformation
818	-	lack or short left 4th finger abnormal position on right 5th finger
819	meningoencephalocle	-
820	-	lack or short left 5th finger lack or short right 1st finger short right 5th finger abnormal position on right 5th finger
821	-	lack or short left 5th finger lack or short right 5th finger
822	-	lack or short left 5th finger
823	-	lack or short right 5th finger
824	-	extra right 5th finger abnormal position on right 1st toe
825	-	lack or short right 5th finger

表：厚生労働科学研究費・化学物質リスク事業 (21KD1001) において得られたバルプロ酸投与による催奇形性を発現した胎児個体とその表現型（妊娠 15 日目、600 mg/kg 群）

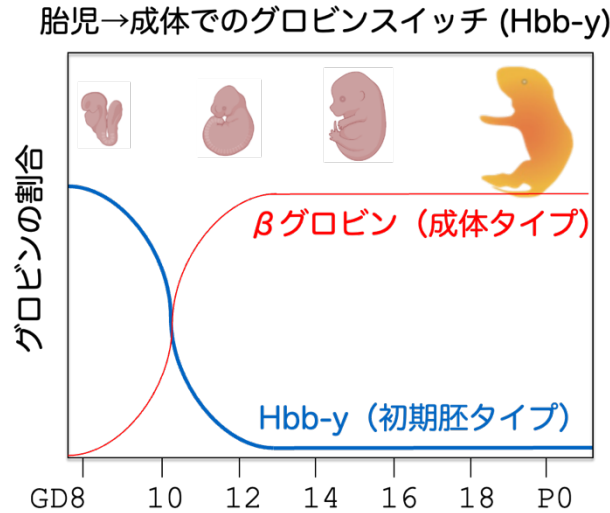
今年度は、妊娠 15 日目において催奇形性の出現しているバルプロ酸 600mg/kg 投与群において、催奇形性が見られていない胎児群と催奇形性の観察された胎児群の比較を行い、羊水中のエクソソームにおいて Hbb-y 遺伝子の発現が、奇形胎児でのみ発現が誘導されていることを明らかにした（下図）。



図：催奇形性ありの胎児の羊水に含まれるエクソソームでは、Hbb-y 遺伝子の発現が特異的に誘導されていた。

Hbb-y 遺伝子は、β グロビン遺伝子ファミリーに属する遺伝子で、マウスの胎生期に特異的に発現する胚性グロビン鎖（β-like globin chain）をコードしており、胎生期の酸素運搬に重要な役割を果たしている。

本来、Hbb-y 遺伝子は、妊娠 15 日目までには発現が抑制され、マウスの β グロビン遺伝子ファミリーの 1 つで、成人型 β グロビン（adult β-globin）鎖をコードする遺伝子である Hbb-b1 遺伝子へと発現がスイッチすることが知られている（下図）。



図：マウス胎児におけるグロビンスイッチの概略図

この遺伝子発現のスイッチ（グロビンスイッチ）は、LCR（Locus Control Region）により制御されていることが知られ、その制御の一部には、ヒストン修飾が関与することが報告されている。よって、投与物質であるバルプロ酸は、ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC の活性を阻害することが知られていることから、本来、エピジェネティック制御により不活性化される Hbb-y 遺伝子の発現がエピジェネティック異常

により発現が誘導されているものと考えられる。

そこで、Hbb-y が、エピジェネティック異常による催奇形性発現のバイオマーカーになりうるかを検討すべく、バルプロ酸と同様にヒストン脱アセチル化酵素として知られるトリコスタチン A を母動物に投与することで、トリコスタチン A にバルプロ酸と同様の発生毒性作用があるのか、また、Hbb-y がそのバイオマーカーとなりうるのかを検討することとした。

・トリコスタチン A 投与による催奇形性に特異的なバイオマーカーとなるエクソソーム RNA の単離：

トリコスタチン A (Trichostatin A, TSA) は、放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* から最初に単離され、クロマチン構造を変化させることによって遺伝子の発現を調節するという独特の作用機序を持っている。具体的には、HDAC を阻害することでヒストンのアセチル化を促進し、クロマチンを開いた状態にして特定の遺伝子を活性化する。このような機能により、トリコスタチン A はがん細胞に対して細胞周期を停止させたり、アポトーシスを誘導したり、細胞の分化を促進することができるため、乳がんや白血病、大腸がんをはじめとするさまざまな種類のがんの治療における可能性が示されている。

さらに、トリコスタチン A は抗炎症作用も有しており、炎症性サイトカインの産生を抑制することで炎症反応を抑える効果があります。そのため、がん研究だけでなく炎症性疾患の治療研究にも役立てられている。また、エピジェネティックな制御メカニズムを解明するためのツール化合物として、遺伝子発現調節に関する基礎研究でも広く活用されている。

既報によると、トリコスタチン A (TSA) の静脈内 (10、25、50 $\mu\text{g/kg}$ 体重) および経口 (20、50、100 $\mu\text{g/kg}$ 体重) の 14 日間反復投与毒性試験を *Swiss albino mice* で実施し、死亡例や体重、食物摂取量、血液・尿検査、臓器重量に有意な変化は見られなかったが、高用量群では腎臓の腫大、充血、変色が認められ、組織学的には糸球体および尿細管の変性が確認されている一方、遺伝毒性試験ではいずれの用量でも有意な変化は見られていない。この結果から、静脈内では 25 $\mu\text{g/kg}$ 、経口では 50 $\mu\text{g/kg}$ を NOAEL としている (Haritwal T. et al., *Drug and Chemical Toxicology* Volume 47, 2024 - Issue 6, 2024)。

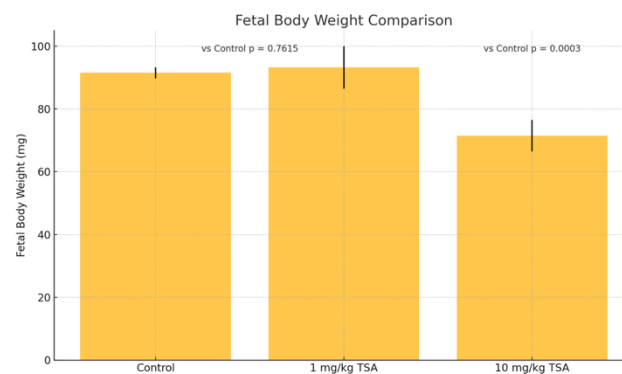
また、TSA の妊娠マウスへの投与については、妊娠 8 日に 0, 2, 4, 8, 16mg/kg で投与した報告があるが、着床部位数、死亡胎児数、および吸収胎児数、平均胎児体重、外表奇形は認められていない (Menegola E. et al.,

Birth Defects Research (Part B) Volume 74;392-398, 2005)。しかし、骨格を解析すると、TSA 曝露群の胎児では、特異的かつ用量依存的な椎骨または肋骨の癒合、椎体セグメントの重複などの体軸の異常が観察されている (Menegola E. et al., *Birth Defects Research (Part B)* Volume 74;392-398, 2005)。

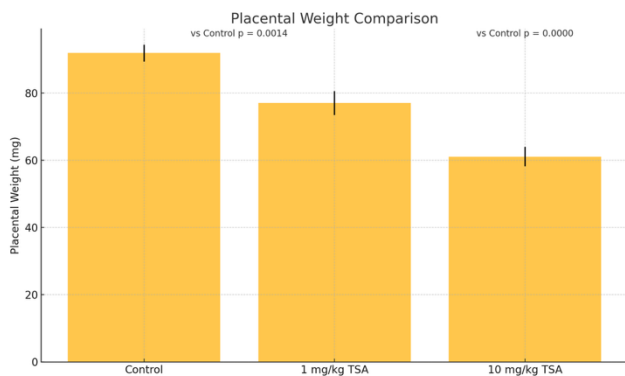
本研究においては、妊娠中に VPA を服用した場合や、妊娠マウスへの VPA 投与実験で見られる神経管閉鎖障害や指形成不全などの表原型が、同じ HDAC 阻害作用を持つ TSA の投与でも観察されるのかの条件検討を行うために、既報にあった妊娠 8 日目のみの単回投与ではなく、妊娠 8 日より 2 日間の反復投与を 10 mg/kg を最高用量とし、低用量として 1 mg/kg として行なうこととした。また、妊娠 8 日からの 2 日間の反復投与で表原型の見られない場合は、より投与期間の多い反復投与を行うこととした。

妊娠 8 日より 2 日間の反復投与において妊娠 12 日および妊娠 15 日目に解剖を行い、1 群 4 腹になる計画で交配を行った。

今年度は、十分な数の妊娠マウスを得られなかったため、妊娠 12 日目の、1mg/kg 投与群 (N=3)、10mg/kg 投与群 (N=3) の結果、および、非処置コントロール群 (N=3) のみを示す。残りの投与実験は、令和 8 年度に行う予定である。



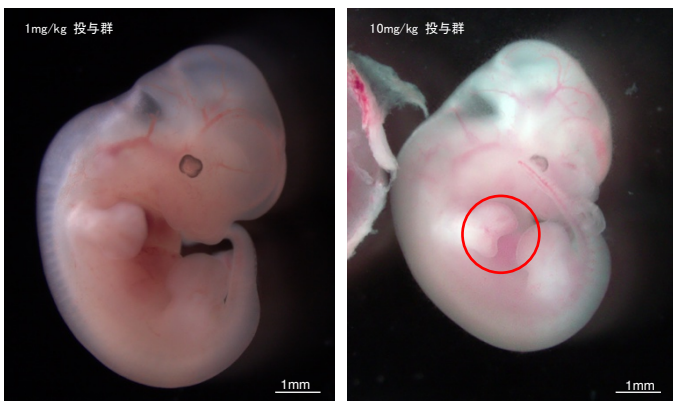
図：TSA を 1mg/kg (N=3) および 10mg/kg (N=3) で妊娠 8 日目、9 日目に経口投与を行い、妊娠 12 日目に胎児の重量測定を行なっている。
非処置コントロールの平均体重：92.1 mg
1 mg/kg TSA 群の平均体重：92.3 mg
10 mg/kg TSA 群の平均体重：71.4 mg
10 mg/kg TSA 群はコントロールと比較して、胎児体重を有意に減少させることが示された。



図：TSA を 1mg/kg (N=3) および 10mg/kg (N=3) で妊娠 8 日目、9 日目に経口投与を行い、妊娠 12 日目に胎盤の重量測定を行なっている。
非処置コントロールの平均体重：92.3 mg
1 mg/kg TSA 群の平均胎盤重量：76.9
10 mg/kg TSA 群の平均胎盤重量：61.4
1 mg/kg TSA 群、および、10 mg/kg TSA 群はともにコントロールと比較して、胎盤重量を有意に減少させることが示された。

このことから、妊娠 8 日目のみの TSA の単回投与の既報では胎児体重には影響しないとされていたが、妊娠 8 日目から 2 日間の 10mg/kg TSA の反復投与により、胎児体重、および、胎盤重量におよそ 20%、および、30% 減少の影響が出ることが明らかになった。

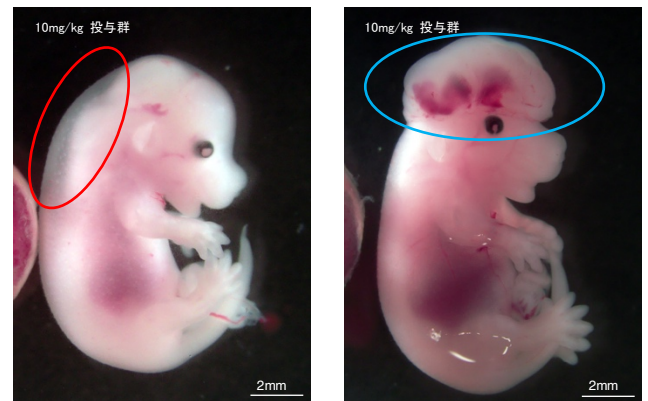
さらに、外表奇形観察を行ったところ、10mg/kg 群においては、VPA 投与と同様に、指形成異常が確認された。体重および胎盤重量の低下も VPA 投与でも観察されていたので、HDAC 阻害という共通のメカニズムが催奇形性の原因であると言える。



図：TSA を 1mg/kg (左)、および、10mg/kg (右) で妊娠 8 日目、9 日目に経口投与を行い、妊娠 12 日目に外表奇形観察を行なった。10mg/kg においては、指の異常（赤丸部分）が確認されている。

また、VPA の投与およびヒトにおける VPA の服用により神経管閉鎖不全の表原型が見られているが、10mg/kg の TSA 投与（妊娠 8 日、9 日）では見られなかった。そこで、投与日数を妊娠 7 日から 11 日に

広げて反復投与を行ったところ、VPA で見られていた神経管閉鎖不全や、浮腫などが観察された。



図：TSA を 10mg/kg で妊娠 7 日目から 11 日目に経口投与を行い、妊娠 12 日目に外表奇形観察を行なった。浮腫（左：赤丸部分）、および、神経管閉鎖不全（右：青丸部分）が観察された。

今年度の得られた結果より、エピジェネティックな阻害作用（HDAC 阻害）は、催奇形性発現の大きな原因の一つである可能性が考えられる。

TSA 投与により、胎盤にも影響がでることを明らかにしたので、令和 8 年度には胎盤の病理解析を行う予定である。

また、他のエピジェネティック阻害剤での検証を行い、さらに、羊水中のエクソソームにおいて Hbb-y 遺伝子の発現が催奇形性のバイオマーカーになりうるのかを検証する。

D. 考察と結論

考察

本研究では、バルプロ酸（VPA）およびトリコスタチン A（TSA）というヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤を用いた妊娠マウスモデルにおいて、生殖発生毒性、とくに催奇形性のメカニズムとバイオマーカー探索を目的とした包括的な解析が実施された。特に注目すべきは、VPA により神経管閉鎖障害などの外表奇形が発現するモデルにおいて、羊水中エクソソーム RNA の発現解析から Hbb-y 遺伝子の発現誘導が奇形胎児でのみ確認された点であり、この遺伝子が催奇形性における新たなバイオマーカーとして浮上したことである。

Hbb-y は胎生期に一時的に発現する胚性グロビン遺伝子であり、通常は発生の進行とともに発現が抑制され、成人型グロビン遺伝子にスイッチする。この正常な発現制御には LCR を介したエピジェネティック制御、特にヒストン修飾が関与することが知られており、HDAC 阻害によりこの切り替えが破綻する可能性が高い。実際に、VPA 投与胎児の一部でのみ Hbb-y の異常発現が見られたことは、発生異常とエピジェネティック破綻との関連を示唆する強い証拠である。

さらに、TSA を用いた実験により、同様の HDAC 阻害作用が胎児体重や胎盤重量の減少、外表奇形（指形成異常、神経管閉鎖不全）を誘発することが確認された。特に、従来の単回投与では観察されなかった毒性影響が、反復投与や投与期間の延長によって明らかになった点は、曝露条件が発生毒性の発現に与える影響の重要性を強調している。

また、TSA 投与群では胎盤にも顕著な重量減少が認められ、胎盤形成や機能への影響も含めて HDAC 阻害の影響範囲が広いことが示された。これらの結果は、VPA と TSA の共通の作用機序としての HDAC 阻害が、胎児発生において極めて重要なエピジェネティック制御を攪乱し、催奇形性を誘導することを強く支持している。

結論

本研究により、HDAC 阻害剤であるバルプロ酸およびトリコスタチン A の投与が、胎児発生に対してエピジェネティック異常を介して深刻な毒性（催奇形性）をもたらすことが実証された。特に、羊水中のエクソソーム RNA における Hbb-y 遺伝子の異常発現は、外表奇形を呈する胎児に特異的に誘導されており、催奇形性の有望な非侵襲的バイオマーカーとしての可能性が示された。

また、TSA による反復投与実験では、外表奇形や胎児体重・胎盤重量の減少といった VPA と共通した表現型が確認され、エピジェネティック制御破綻が共通の病態基盤であることが明確となった。さらに、投与条件によって毒性の発現が大きく異なる点から、毒性試験の設計における曝露期間や用量設定の重要性も強調される。

今後は、Hbb-y 以外のエクソソーム RNA の網羅的解析や、他のエピジェネティック修飾阻害剤との比較研究を通じて、発生毒性のエピジェネティックメカニズムの解明と、信頼性の高いバイオマーカーの確立を進めていく予定である。本研究は、動物実験を補完・代替する次世代型毒性評価法の確立に向けて大きな一歩となる成果である。

E. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

●Ryuichi Ono, Makiko Kuwagata, Mie Naruse, Akihito Watanabe, Masao Takano, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(1): 37-56. [doi.org/10.2131/fts.11.37]

Fujioka T, Shiura H, Ishii M, Ono R, Endo T, Kiyonari H, Hirate Y, Ito H, Kanai-Azuma M, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F
Targeting of retrovirus-derived Rtl8a/8b reduces social response and increases apathy-like behavior associated with GABRB2 reduction
OPEN BIOLOGY 2025 Jan;15(1):240279. [doi: 10.1098/rsob.240279].

●小野 竜一
非臨床安全性評価における New approach methods としての細胞外小胞の活用
医学のあゆみ Vol.291 No.9 2024. 11. 30

Makiko Kuwagata, Yuko Doi, Hirokatsu Saito, Mariko Tsurumoto, Toshime Igarashi, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(4): 169-181. [doi.org/10.2131/fts.11.169]

Toshio Imai, Rikako Ishigamori, Mie Naruse, Masako Ochiai, Yoshiaki Maru, Yoshitaka Hippo, Yukari Totsuka
Bridging toxicological properties of environmental chemicals between animals and humans using healthy organoid systems
J Toxicol Sci. 2024;49(10):425-434. doi: 10.2131/jts.49.425.

●Yamamoto T, Nakayama J, Urabe F, Ito K, Nishida-Aoki N, Kitagawa M, Yokoi A, Kuroda M, Hattori Y, Yamamoto Y, Ochiya T.
Aberrant regulation of serine metabolism drives extracellular vesicle release and cancer progression. *Cell Rep.* 2024 Aug 27;43(8):114517.

Age-associated aberrations of the cumulus-oocyte interaction and in the zona pellucida structure reduce fertility in female mice.
Ishikawa-Yamauchi Y, Emori C, Mori H, Endo T, Kobayashi K, Watanabe Y, Sagara H, Nagata T, Motooka D, Ninomiya A, Ozawa M, Ikawa M.

Commun Biol. 2024 Dec 24;7(1):1692. doi: 10.1038/s42003-024-07305-z.

TEX38 localizes ZDHHC19 to the plasma membrane and regulates sperm head morphogenesis in mice.
Kaneda Y, Lu Y, Sun J, Shimada K, Emori C, Noda T, Koyano T, Matsuyama M, Miyata H, Ikawa M.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2025 Mar 11;122(10):e2417943122. doi: 10.1073/pnas.2417943122. Epub 2025 Mar 3.

2. 学会発表 (抜粋)

●Ryuichi Ono, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Yusuke Yoshioka, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima
Detection of EVs in Hepatotoxicity Using CD9-mEmerald Reporter Mouse
INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXTRACELLULAR VESICLES ANNUAL MEETING 2024, (2024.5.12, Melbourne, Australia) 、口頭

五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋 雄、桑形麻樹子、北嶋 聡：ゲノム編集によるノックインマウス作製時に生じた、オンターゲット部位の多様な変異とその次世代伝達、第 71 回日本実験動物学会総会、京都、2024 年 5 月 29 日、ポスター

●Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S
バルプロ酸 (VPA) の妊娠マウスへの反復投与により誘導される羊水由来の細胞外小胞 Small RNA
第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.6.21 福岡) 、口頭

●Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S
Extracellular Vesicle Small RNAs Secreted from Mouse Amniotic Fluid Induced by Repeated Oral Administration of VPA to Pregnant Mice
Annual Conference of the International Federation of Placenta Associations (IFPA 2024) (2024.9.4., Montreal, Canada)

●Ryuichi Ono, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Yusuke Yoshioka, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima
Detection of extracellular vesicles (EVs) in Hepatotoxicity Using CD9-EGFP Reporter Mouse
58th Congress of the European Societies of Toxicology (2024.9.20., Copenhagen, Denmark)

●Ryuichi Ono, Mie Naruse, Yoko Hirabayashi, Takahiro

Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima: Evaluation of CD9-EGFP Reporter Mice for Organ-Specific EV Detection、ANNUAL MEETING of Society of Toxicology, 2024.3.17, Orlando、口頭

F. 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

II. 分担研究報告書

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
次世代型生殖発生毒性評価法の開発に資する研究
(24KD1004)

令和 6 年度 分担研究報告書

分担研究課題：次世代型生殖発生毒性試験の高度化

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・
特任教授

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

研究協力者

吉岡祐亮 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

研究要旨

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で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催奇形性を判断するには莫大な時間や労力以外に、観察者の経験に依存する部分や、基準が必ずしも一定とは言えない部分がある。

近年、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、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2・R3-R5 年度、代表：小野竜一）にて、エクソソーム RNA を毒性指標とすることで、成獣の血液 1 滴から全身の病理組織学的診断が可能な次世代型毒性試験法の開発、および、妊娠動物の母体血および羊水から胎児の催奇形性を検出する高感度な系の開発に世界にさきがけて成功した（Ono R. et al., *Toxicology Reports* 2020, Ono R. et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024）。

しかし、毒性指標となる体液由来エクソソームが本当に標的とする臓器より分泌されたのかという疑問があった。我々は、目的の細胞・臓器が分泌するエクソソームのみを可視化および単離可能な“エクソソーム可視化マウス”の作製に成功し、世界で初めて、肝臓由来のエクソソームを可視化し、肝毒性バイオマーカーが確かに肝臓に由来するエクソソームに由来することの証明に成功している（論文投稿準備中）。

そこで、本研究は、我々が開発した母体血および羊水中のエクソソームを指標にした新規生殖発生毒性評価

法に新たに開発に成功した“エクソソーム可視化マウス”を活用することで、毒性機序に基づいた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生殖発生毒性評価法を開発することを目的としている。

3年計画の1年目にあたる令和6年度の進捗は以下の通りである。

これまで単離してきたエクソソーム RNA がどの細胞・臓器に由来するかを確定するため、特定の臓器に由来するエクソソームのみを検出・単離できる“エクソソーム可視化マウス”を作製した。このマウスでは、特定臓器から分泌されるエクソソーム表面にヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現させることに成功している。この解析系を利用することで、母体血中のエクソソームを母体由来と胎児由来に完全に分離して検出する技術確立した。今年度は、胎児由来のエクソソームのみがヒト CD9-EGFP 融合タンパクでラベルされるようにしたマウスを用い、母体血を採取して超解像度共焦点顕微鏡で胎盤を観察することで、胎児由来エクソソームの母体側への移行を検出することに成功している。

令和6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催奇形性を判断するには莫大な時間や労力以外に、観察者の経験に依存する部分や、基準が必ずしも一定とは言えない部分がある。

近年、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、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2・R3-R5年度、代表：小野竜一）にて、エクソソームRNAを毒性指標とすることで、成獣の血液1滴から全身の病理組織学的診断が可能な次世代型毒性試験法の開発、および、妊娠動物の母体血および羊水から胎児の催奇形性を検出する高感度な系の開発に世界にさがけて成功した（**Ono R.** et al., *Toxicology Reports* 2020、**Ono R.** et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024）。

しかし、毒性指標となる体液由来エクソソームが本当に標的とする臓器より分泌されたのかという疑問があった。我々は、目的の細胞・臓器が分泌するエクソソームのみを可視化および単離可能な“エクソソーム可視化マウス”の作製に成功し、世界で初めて、肝臓由来のエクソソームを可視化し、肝毒性バイオマーカーが確かに肝臓に由来することを証明することに成功している（論文投稿準備中）。

そこで、本研究は、我々が開発した母体血および羊水中のエクソソームを指標にした新規生殖発生毒性評価法に新たに開発に成功した“エクソソーム可視化マウス”を活用することで、毒性機序に基づいた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生殖発生毒性評価法を開発することを目的としている。

＜各年度の目標＞ 令和6年度・先行研究で得られた母体血および羊水中のエクソソームRNAを生殖発生毒性物質によるマウスモデル動物の作成およびマイクロサンプリングを行う。

令和7年度・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解析を行う。妊娠動物において、胎児のみを“エクソソーム可視化マウス”を利用することで、胎児由来のエクソソームのみを可視化、および単離を行ない、毒性機序に基づいた次世代型生殖発生毒性評価法の高度化を行う。

令和8年度・次世代型生殖発生毒性評価法のバリデーションおよびガイドライン化に向けての施策検討

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。

●次世代型生殖発生毒性試験の開発（研究代表者：小野、研究分担者：桑形、平林）

エクソソーム RNA を腹単位の毒性指標とする次世代型生殖発生毒性試験を開発するために、妊娠マウスに既知の生殖発生毒性物質を経口投与し、母動物の毒性検出、および、胎児に発現する形態変化から毒性指標となる母体血および羊水中のエクソソーム RNA の同定を次世代シーケンス解析により行う。

●次世代型生殖発生毒性試験の高度化（研究分担者：落谷、伊川、研究代表者：小野）

我々は既に、様々な毒性バイオマーカーとなるエクソソーム RNA の報告をしているが、それらが実際にどの細胞・臓器に由来したのかは確定できていなかった。そこで、任意の臓器（細胞）に由来したエクソソームの表面にのみ特異的にヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現させる遺伝子改変マウス（エクソソーム可視化マウス）を作製し、目的臓器由来のエクソソームのみを検出・単離することに成功した。この“エクソソーム可視化マウス”を用いることで、母体血中のエクソソームを母体に由来するもの、胎児に由来するものに完全に分けての検出が可能になり、評価法の高度化に大きく寄与する。また、毒性バイオマーカーとなるエクソソーム RNA の遺伝子改変マウスを作成することにより、毒性メカニズムへの関与について検証を行う。

●次世代型毒性試験の *in vitro* モデル開発（研究分担者：成瀬、研究代表者：小野）

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評価を行う。

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、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。

・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ェスタンブロットティングや、エクソソームの表面タンパクに対する抗体をコーティングしたチップ上でエクソソームを捕捉して特定のエクソソームを単離可能な EXOVIEW を利用することで単離されたエクソソームの大きさと分布、数のカウント、および、シングルエクソソーム上に存在するタンパクの同定を行うことで、エクソソームが由来した細胞の同定が可能になる。

・マウスを用いたトリコスタチン A 経口投与による母動物血清中並びに胎児及び羊水中エクソソームの解析のための試料採取法

二分脊椎や無脳症、脳瘤などの神経管閉鎖障害を誘発するバルプロ酸を催奇形性陽性対照物質として、マウスの神経管閉鎖時期である妊娠 9 日から 11 日にバルプロ酸を 0、300、600 mg/kg の 3 用量経口投与し、妊娠 15 日目に、母動物血清および羊水（胎盤、卵黄嚢膜、胎児）をエクソソーム解析用に採取し、胎児の外表面奇形の観察を行なっている。そこで、外表面奇形の有無を検出するエクソソーム RNA を毒性指標としてバイオマーカーの単離を行なった。

得られたバイオマーカーは、Hbb-y 遺伝子の RNA 断片であった。

この遺伝子は、本来、妊娠 15 日目には不活化される Hbb-y 遺伝子の発現が、奇形胎児でのみ発現が誘導されているものである。

投与物質であるバルプロ酸は、ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC の活性を阻害することが知られており、本来、エピジェネティック制御により不活性化される Hbb-y 遺伝子の発現がエピジェネティック異常により発現が誘導されているものと考えられる。このことから、バルプロ酸と同様に HDAC 阻害作用を持つトリコスタチン A（TSA）を投与し、バルプソ

酸と同様に催奇形性作用があるのかを観察し、また、母体血および羊水中のエクソソーム RNA を毒性バイオマーカーとしてスクリーニングを行う。

投与物質：トリコスタチン A
製造元：東京化成工業株式会社
CAS 番号：58880-19-6
分子量：302.37 g/mol

ロット番号：WXBD4552V
純度：>98.0%(HPLC)
性状：白色、粉末
保管条件：密栓、冷暗所

1-2. 媒体

名称：0.5 w/v%メチルセルロース溶液（略称：0.5% MC溶液）
製造元：富士フィルム和光純薬株式会社
ロット番号：CAE0466

媒体の調製

必要量のトリコスタチン A を秤取し、0.5%MC 溶液に徐々に加えて分散させた。調製後、遮光し、冷蔵保存した。

使用動物

動物種：マウス（SPF）
系統：C57BL/6J
供給源：ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社、厚木飼育センター
入荷時週齢：雌 10 週齢、雄 11 週齢
匹数：交配用雄 12 匹、雌 24 匹
使用した妊娠動物：4 匹

入荷後 1 週間の検疫・馴化期間を経て、一般状態及び体重推移に異常のない動物を用いた。

交配：11 週齢以上の雌 1 匹に 12 週齢以上の雄 1 匹を終夜同居させた。翌朝、膈内に膈栓が確認された雌を交尾成立動物とし、その日を妊娠 0 日とした。

群分け：交尾成立日（妊娠 0 日）ごとに行い、妊娠 0 日の体重を基に各群の体重が可能な限り均等となるようにした。

2. エクソソーム解析用試料採取試験

2-1. 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

投与経路は臨床適用経路である経口投与を選択し、投与期間は妊娠 8 日より 9 日までの 2 日間、および、7 日より 11 日までの 5 日間とした。

2-2. 投与方法

投与方法は、げっ歯類の経口投与方法に際して一般的な強制経口投与とした。

トリコスタチン A 溶液を胃ゾンデを用いて胃内に強制経口投与した（8:00~11:00 の間）。動物ごとの投与液量（表示単位：0.01 mL）は投与当日の体重を基準に算出した。

2-3. 投与量及び群構成

投与量は 0、1 及び 10 mg/kg の 3 用量とし、媒体対照群を含め試料採取時点を考慮した 6 群構成とした。すなわち、媒体対照群、1 及び 10 mg/kg 群に妊娠 12 日剖検群、妊娠 15 日剖検群をそれぞれ設けた。剖検群ごとの交尾成立雌動物数を 4 匹とした。

投与量設定根拠

既報によると、トリコスタチン A(TSA) の静脈内(10、25、50 µg/kg 体重)および経口(20、50、100 µg/kg 体重)の 14 日間反復投与毒性試験を *Swiss albino mice* で実施し、死亡例や体重、食物摂取量、血液・尿検査、臓器重量に有意な変化は見られなかったが、高用量群では腎臓の腫大、充血、変色が認められ、組織学的には糸球体および尿細管の変性が確認されている一方、遺伝毒性試験ではいずれの用量でも有意な変化は見られていない。この結果から、静脈内では 25 µg/kg、経口では 50 µg/kg を NOAEL としている(Haritwal T. et al., *Drug and Chemical Toxicology* Volume 47, 2024 - Issue 6, 2024)。

また、TSA の妊娠マウスへの投与については、妊娠 8 日に 0, 2, 4, 8, 16mg/kg で投与した報告があるが、着床部位数、死亡胎児数、および吸収胎児数、平均胎児体重、外表奇形は認められていない。しかし、骨格を解析すると、TSA 曝露群の胎児では、特異的かつ用量依存的な椎骨または肋骨の癒合、椎体セグメントの重複などの体軸の異常が観察されている。

本研究においては、妊娠中に VPA を服用した場合や、妊娠マウスへの VPA 投与実験で見られる神経管閉鎖障害や指形成不全が見られる条件検討を行うために、妊娠 8 日より 2 日間の反復投与、および、妊娠 7 日より 5 日間の反復投与を 10 mg/kg を最高用量とし、低用量として 1 mg/kg として行なった。

2-5. 剖検

妊娠 12 日剖検群、妊娠 15 日剖検群において、イソフルラン吸入麻酔下で心採血した後、体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官/組織を詳細に観察した。また、肝臓、腎臓、脾臓の重量を測定し、肝臓、腎臓についてはその後の遺伝子発現解析およびタンパク解析用の採材を行い、肝臓、腎臓、脾臓は病理解析を行う。

2-6. 帝王切開及び母血清中エクソソーム解析用試料採取

剖検時に、着床の有無を肉眼的に観察して、妊娠の成否を確認した。妊娠が認められた母動物については、子宮内の生存胎児数、死亡胚・胎児数を判定・記録した。生存胎児と死亡胚・胎児の総数を着床数とした。

2-7. 母動物血清中エクソソーム解析用試料の処理

血液をポリプロピレン製容器（タンパク低吸着）に移し、室温で30分以上放置した後、遠心分離（4℃、3000×g、10分間）により血清を得た。得られた血清試料は試験番号、試料採取時点、動物番号、試料番号、採血年月日、試料名を明記したラベルを貼付したタンパク低吸着チューブに入れ、測定時まで-80℃の冷凍庫（許容値：-70℃以下）に保存する。

2-8. 羊水、胎児、胎盤の採取

1) 採取日及び採取時点

妊娠12日剖検群：各群4例
最終投与1時間後（09:00~12:00の間）
妊娠15日剖検群：各群4例、
妊娠12日帝王切開とほぼ同じ時刻
（09:00~12:00の間）

2) 対象部位（サンプル）の採取

妊娠動物の子宮壁を切開後、卵黄囊膜の外側から切開し、バリアチップで羊水をポリプロピレン製容器（タンパク低吸着）に採取した。羊水を採取した後、卵黄囊膜に被包された胎児及び胎盤を摘出した。胎児と胎盤を分離し、個別に重量を記録した。胎盤はほぼ均等に2分割し、それぞれRNA later と10%リン酸緩衝ホルマリン液を満たした15 mLのコニカルチューブに保管した。羊水は遠心分離（4℃、6000×g、2分間）後、上清をバリアチップでタンパク低吸着チューブに移した。胎児は10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、特に神経管の閉鎖状態に注目し、形態観察を実施した。

・エクソソーム RNA 網羅的遺伝子発現解析

国立医薬品食品衛生研究所において採取された血液サンプルより抽出されたエクソソームは、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。

・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エクソソームの由来した臓器の特定

エクソソームの表面には CD9, CD63, CD81 などのテトラスパニンが存在する。そこで、臓器、細胞特異的に CD9-EGFP 融合タンパクを発現させることで、特定の細胞から分泌されるエクソソームのみが CD9-EGFP 融合タンパクを持つことで、エクソソームがどの臓器に由来したのかを検出することが可能にな

る。本研究で利用するマウス系統は以下の通りである。

CD9-EGFP ノックイン (KI) マウス (エクソソーム可視化マウス)

エクソソームはすべての臓器および細胞から分泌される細胞小胞であり、その表面には CD9、CD63、CD81 などが多く存在する。本マウスは、ROSA26 領域にチキン β アクチンプロモーターを配置し、Cre-loxP システムを利用することで臓器特異的にヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現するよう設計されたノックインマウスである。

Alb-Cre トランスジェニックマウス

肝細胞に特異的に Cre 酵素を発現するトランスジェニックマウスであり、肝臓特異的な遺伝子発現制御の研究に利用される。

Sox2-Cre トランスジェニックマウス

胚盤葉上層 (epiblast) および卵に特異的に Cre 酵素を発現するトランスジェニックマウスであり、初期発生過程の解析や遺伝子操作に用いられる。

・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

CD9-EGFP KI マウス (flox マウス) と Alb-Cre トランスジェニックマウスを交配して作成した flox/Alb-Cre マウスの肝臓を採取する。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。その後に 40 μ m 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砕した後、MBOC (Matrigel Bilayer Organoid Culture) 法を用いて細胞をマトリゲルに包埋し、至適培地を添加し培養することでオルガノイドを樹立する。

樹立に成功した肝臓オルガノイドを超解像度共焦点顕微鏡で観察することで、エクソソームの可視化を行う。

(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

●次世代型生殖発生毒性試験の高度化（研究分担者：落谷、伊川、研究代表者：小野）

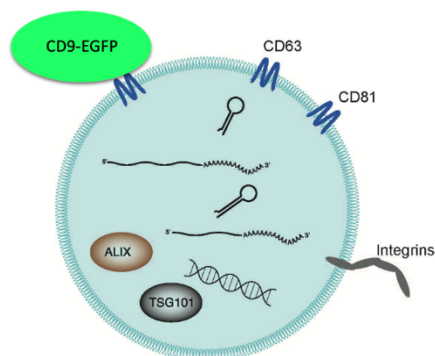
・遺伝子改変マウスを利用したエクソソームの由来した臓器の特定：

現在までに、我々は化学物質による臓器障害や遺伝子改変により引き起こされる病変などのバイオマーカーとなりうる血液中や羊水中のエクソソーム RNA の単離を行ってきた(Ono R. et al., *Toxicology Reports* 2020、Ono R. et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024)。

また、発生のステージに特異的なエクソソーム RNA や、雌雄差のあるエクソソーム RNA などの単離にも成功している。しかしながら、これらのエクソソーム RNA が実際にどのから体液中に分泌されたのかの証明はできていない。

そこで、我々は、エクソソームの由来する臓器の特定を可能とする遺伝子改変マウス“CD9-EGFP Knock-in (KI) マウス”（エクソソーム可視化マウス）の作製に成功している。

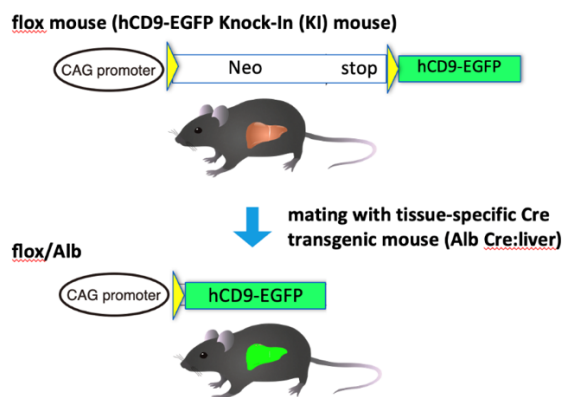
エクソソームは、脂質二重膜からなり、その表面には、CD9、CD63、CD81 などのテトラスパンインが局在することが知られている。そこで、下図の様に特定の細胞においてヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現させることで、特定の細胞に由来するエクソソームのみを EGFP の蛍光シグナル、および、ヒト CD9 に特異的な抗体を利用した免疫染色やウエスタンブロットにより検出可能になる。



図：エクソソームの模式図。表面には CD9、CD63、CD81 などのテトラスパンインが存在している。mRNA や miRNA などもエクソソームに内包されることが知られている。

このヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現するカセットを、マウス 6 番染色体上のすべての細胞で恒常的に遺伝子発現が可能な ROSA26 領域にノックインし、

Cre-loxP システムを利用して条件的に発現を誘導できるマウスを作製した。

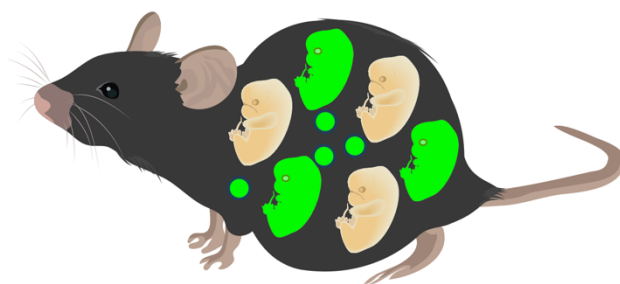


図：通常は Neomycin 耐性遺伝子を発現しているが、特定の臓器で発現する Cre トランスジェニックマウスと交配することで、特定の臓器でのみヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現するようになる。ここでは、一例として、その結果、特定の臓器から分泌されたエクソソームが EGFP でラベルされ、蛍光観察が可能になる。また、ヒト CD9 に対する抗体を用いることで、特定の臓器由来のエクソソームを捕捉し、検出することや、特異的に RNA やタンパクの解析を行うこともできる。

本研究においては、これらのエクソソーム可視化系を利用して、母子間でのエクソソーム交換を検出することが可能かを検証することとした。

CD9-EGFP Knock-in (KI) マウス (flox) マウス (♀) と epiblast 由来組織で Cre を発現する Sox2 Cre トランスジェニックマウス交配することで、flox/Sox2 Cre マウス (♂) を得た。このマウスは、体の全ての細胞でヒト CD9-EGFP を発現する CD9-EGFP allele をヘテロで有している。

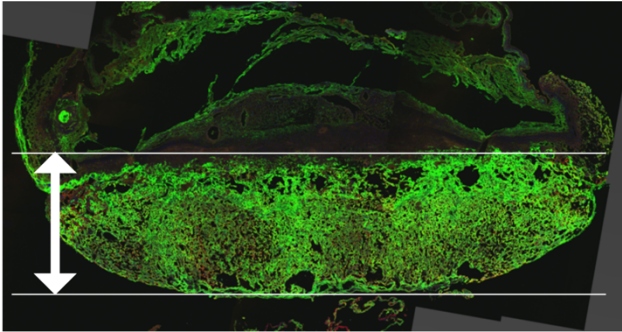
そこで、flox/Sox2 Cre マウス (♂) と野生型 C57BL/6J ♀ を交配し妊娠すると、子宮内では、半分の胎児が CD9-EGFP allele を持ち、残りの半分は野生型となる。



図：CD9-EGFP allele をヘテロで持つ flox/Sox2 Cre マウス (♂) と野生型 C57BL/6J ♀ の交配で得られる妊娠マウスの概念図。胎内の半数の胎児は CD9-EGFP allele を持つことで、全身の細胞よりヒト CD9-EGFP でラベルされたエクソソームを分泌する。EGFP を検出することで、胎児由来のエクソソームがどのくらいの母動物の血液中に循環しているのかを明らかにできる。

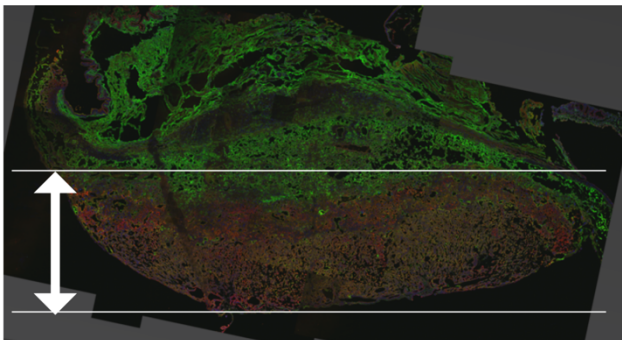
実際に得られた妊娠マウスを解剖し、EGFP を超解像度共焦点顕微鏡で観察すると、CD9-EGFP allele を持つ胎児の胎盤は、下図の様に胎児側胎盤組織の全ての細胞が EGFP 陽性となっており、母体側胎盤(脱落膜)では、EGFP シグナルが弱くなっている。しかしながら、一定量の EGFP シグナルが観察され、これらは、胎児由来の EGFP 陽性エクソソームを取り込んだ結果である。

の高度化を行う。



図：CD9-EGFP allele を持つ胎児の胎盤（白矢印部分）の EGFP 蛍光観察像。胎児側胎盤では全ての細胞が EGFP 陽性となっており、母体側胎盤（胎児胎盤より上部）においては、胎児側細胞より分泌された EGFP 陽性エクソソームを取り込むことで弱い EGFP シグナルを観察することができる。

一方、CD9-EGFP allele を持たない胎児の胎盤では一部の細胞において EGFP 陽性が確認できる。これは、CD9-EGFP allele を持つ胎児より分泌された EGFP 陽性エクソソームが母体の血液循環を通じて CD9-EGFP allele を持たない胎児組織に取り込まれたものと判断できる。



図：CD9-EGFP allele を持たない胎児の胎盤（白矢印部分）の EGFP 蛍光観察像。母体側胎盤（胎児胎盤より上部）においては、母体血を循環する CD9-EGFP allele を持つ胎児より分泌されたヒト CD9-EGFP 陽性エクソソームを取り込むことで弱い EGFP 陽性となっている。胎児側胎盤でも EGFP 陽性となっている細胞が確認できる。

来年度は、母体中を循環する胎児由来のエクソソームを免疫沈降により濃縮し、母子間でエクソソームを交換し、どのような母子間相互作用をしているのかを明らかにする。また、胎児由来の発生毒性のバイオマーカーを母体血より抽出し、解析することが可能となり、エクソソームを毒性指標とした生殖発生毒性評価法

D. 考察と結論

考察

本研究では、生殖発生毒性に対する次世代型評価法の開発に向けて、エクソソーム RNA の臓器由来の特定を可能にする実験系を構築し、その有用性を検証した。これまでに我々は、胎児の奇形や臓器障害、性差、発生ステージに特異的なエクソソーム RNA の単離に成功していたが、それらのエクソソームがどの臓器から分泌されたものであるかを直接証明する手段がなかった。そこで本研究では、エクソソーム表面に存在するテトラスパニンである CD9 に蛍光タンパク EGFP を融合させた CD9-EGFP を、Cre-loxP システムを用いて特定の組織に発現させる CD9-EGFP ノックインマウスを作製し、その活用可能性を探った。

具体的には、全身の細胞で CD9-EGFP を発現するマウスを作るため、CD9-EGFP flox アレルを持つマウスと Sox2-Cre マウスを交配し、さらにその子を野生型マウスと交配することで、子宮内に CD9-EGFP 陽性胎児と陰性胎児が混在する妊娠マウスを得た。胎児および胎盤を超解像度共焦点顕微鏡で観察した結果、CD9-EGFP を有する胎児から分泌された EGFP 陽性エクソソームが、母体側の胎盤細胞や CD9-EGFP を持たない胎児の胎盤細胞にも取り込まれていることが確認された。これにより、胎児→母体→他胎児というエクソソームの流れが可視化され、母子間でエクソソームを介した情報交換が実際に起きていることが明示された。

この成果は、エクソソームが単なる細胞間情報伝達の手段にとどまらず、母体の生理応答や他の胎児にまで影響を及ぼす可能性があることを示唆しており、胎児発生や毒性応答の新たな理解に大きな貢献をもたらすと考えられる。

結論

本研究において、我々は Cre-loxP システムを活用してヒト CD9-EGFP 融合タンパクを特異的に発現する CD9-EGFP 可視化マウスを作製し、そのエクソソームを臓器起源ごとに可視化・追跡することに成功した。このマウスモデルを用いることで、胎児由来エクソソームが母体循環に移行し、さらに他胎児にも取り込まれる現象を実証することができた。これは、母子間や胎児間でエクソソームを介した情報伝達が成立している可能性を示すものであり、エクソソームの生理学的・病態学的な意義をより深く理解する上で極めて重要な知見である。

今後は、母体血中に存在する胎児由来エクソソームを免疫沈降等により精製し、その中に含まれる RNA

やタンパク質を網羅的に解析することで、胎児の発育異常や毒性暴露に伴う特異的バイオマーカーの同定を進める予定である。これにより、妊娠中の女性に対して非侵襲的に胎児の健康状態や薬剤曝露の影響を評価することが可能となり、現在の動物依存的な生殖発生毒性試験を代替するヒト外挿性の高い評価法の確立が期待される。さらに、このモデルは毒性評価に限らず、胎児母体間相互作用や先天疾患の病態解明など、幅広い生物医学研究に応用可能な革新的ツールとなりうる。

E. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

●Ryuichi Ono, Makiko Kuwagata, Mie Naruse, Akihito Watanabe, Masao Takano, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(1): 37-56. [doi.org/10.2131/fts.11.37]

Fujioka T, Shiura H, Ishii M, Ono R, Endo T, Kiyonari H, Hirate Y, Ito H, Kanai-Azuma M, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F
Targeting of retrovirus-derived Rtl8a/8b reduces social response and increases apathy-like behavior associated with GABRB2 reduction
OPEN BIOLOGY 2025 Jan;15(1):240279. [doi: 10.1098/rsob.240279].

●小野 竜一
非臨床安全性評価における New approach methods としての細胞外小胞の活用
医学のあゆみ Vol.291 No.9 2024. 11. 30

Makiko Kuwagata, Yuko Doi, Hirokatsu Saito, Mariko Tsurumoto, Toshime Igarashi, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(4): 169-181. [doi.org/10.2131/fts.11.169]

Toshio Imai, Rikako Ishigamori, Mie Naruse, Masako Ochiai, Yoshiaki Maru, Yoshitaka Hippo, Yukari Totsuka
Bridging toxicological properties of environmental chemicals between animals and humans using healthy organoid systems
J Toxicol Sci. 2024;49(10):425-434. doi: 10.2131/jts.49.425.

●Yamamoto T, Nakayama J, Urabe F, Ito K, Nishida-Aoki N, Kitagawa M, Yokoi A, Kuroda M, Hattori Y, Yamamoto Y, Ochiya T.
Aberrant regulation of serine metabolism drives extracellular vesicle release and cancer progression. *Cell Rep.* 2024 Aug 27;43(8):114517.

Age-associated aberrations of the cumulus-oocyte interaction and in the zona pellucida structure reduce fertility in female mice.
Ishikawa-Yamauchi Y, Emori C, Mori H, Endo T, Kobayashi K, Watanabe Y, Sagara H, Nagata T, Motooka D, Ninomiya A, Ozawa M, Ikawa M.

Commun Biol. 2024 Dec 24;7(1):1692. doi: 10.1038/s42003-024-07305-z.

TEX38 localizes ZDHHC19 to the plasma membrane and regulates sperm head morphogenesis in mice.
Kaneda Y, Lu Y, Sun J, Shimada K, Emori C, Noda T, Koyano T, Matsuyama M, Miyata H, Ikawa M.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2025 Mar 11;122(10):e2417943122. doi: 10.1073/pnas.2417943122. Epub 2025 Mar 3.

2. 学会発表 (抜粋)

●Ryuichi Ono, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Yusuke Yoshioka, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima
Detection of EVs in Hepatotoxicity Using CD9-mEmerald Reporter Mouse
INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXTRACELLULAR VESICLES ANNUAL MEETING 2024, (2024.5.12, Melbourne, Australia) 、口頭

五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋 雄、桑形麻樹子、北嶋 聡：ゲノム編集によるノックインマウス作製時に生じた、オンターゲット部位の多様な変異とその次世代伝達、第 71 回日本実験動物学会総会、京都、2024 年 5 月 29 日、ポスター

●Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S
バルプロ酸 (VPA) の妊娠マウスへの反復投与により誘導される羊水由来の細胞外小胞 Small RNA
第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.6.21 福岡) 、口頭

●Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S
Extracellular Vesicle Small RNAs Secreted from Mouse Amniotic Fluid Induced by Repeated Oral Administration of VPA to Pregnant Mice
Annual Conference of the International Federation of Placenta Associations (IFPA 2024) (2024.9.4., Montreal, Canada)

●Ryuichi Ono, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Yusuke Yoshioka, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima
Detection of extracellular vesicles (EVs) in Hepatotoxicity Using CD9-EGFP Reporter Mouse
58th Congress of the European Societies of Toxicology (2024.9.20., Copenhagen, Denmark)

●Ryuichi Ono, Mie Naruse, Yoko Hirabayashi, Takahiro

Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima: Evaluation of CD9-EGFP Reporter Mice for Organ-Specific EV Detection、ANNUAL MEETING of Society of Toxicology, 2024.3.17, Orlando、口頭

F. 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

II. 分担研究報告書

エクソソーム RNA を毒性指標とした
次世代型生殖発生毒性評価法の開発に資する研究
(24KD1004)

令和 6 年度 分担研究報告書

分担研究課題：次世代型毒性試験の in vitro モデル開発

研究分担者 成瀬 美衣
国立感染症研究所・ウイルス第一部
主任研究官

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・
特任教授

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

研究協力者

吉岡祐亮 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
野崎弘枝 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

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で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催奇形性を判断するには莫大な時間や労力以外に、観察者の経験に依存する部分や、基準が必ずしも一定とは言えない部分がある。

近年、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、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2・R3-R5 年度、代表：小野竜一）にて、エクソソーム RNA を毒性指標とすることで、成獣の血液 1 滴から全身の病理組織学的診断が可能な次世代型毒性試験法の開発、および、妊娠動物の母体血および羊水から胎児の催奇形性を検出する高感度な系の開発に世界にさきがけて成功した（Ono R. et al., *Toxicology Reports* 2020、Ono R. et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024）。

しかし、毒性指標となる体液由来エクソソームが本当に標的とする臓器より分泌されたのかという疑問があった。我々は、目的の細胞・臓器が分泌するエクソソームのみを可視化および単離可能な“エクソソーム可視化マウス”の作製に成功し、世界で初めて、肝臓由来のエクソソームを可視化し、肝毒性バイオマーカーが確かに肝臓に由来するエクソソームに由来することの証明に成功している（論文投稿準備中）。

そこで、本研究は、我々が開発した母体血および羊水中のエクソソームを指標にした新規生殖発生毒性評価法に新たに開発に成功した“エクソソーム可視化マウス”を活用することで、毒性機序に基づいた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生殖発生毒性評価法を開発することを目的としている。

3年計画の1年目にあたる令和6年度の進捗は以下の通りである。

動物実験に代わる次世代型の評価法を目指し、*in vivo* の特性を高度に保持する *in vitro* モデルとして注目されるオルガノイド 3D 培養系の上清中に含まれるエクソソームを毒性指標として利用する可能性についても検討した。今年度は、肝臓特異的（アルブミン陽性細胞特異的）にヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現する肝臓オルガノイドを樹立することに成功した。また、超解像度共焦点顕微鏡による観察およびシングルエクソソーム解析を行い、培養中の肝臓オルガノイドではアルブミン陽性の分化した肝細胞が一部しか存在しないことを確認した。

令和6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催奇形性を判断するには莫大な時間や労力以外に、観察者の経験に依存する部分や、基準が必ずしも一定とは言えない部分がある。

近年、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、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2・R3-R5年度、代表：小野竜一）にて、エクソソームRNAを毒性指標とすることで、成獣の血液1滴から全身の病理組織学的診断が可能な次世代型毒性試験法の開発、および、妊娠動物の母体血および羊水から胎児の催奇形性を検出する高感度な系の開発に世界にさがけて成功した（**Ono R.** et al., *Toxicology Reports* 2020、**Ono R.** et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024）。

しかし、毒性指標となる体液由来エクソソームが本当に標的とする臓器より分泌されたのかという疑問があった。我々は、目的の細胞・臓器が分泌するエクソソームのみを可視化および単離可能な“エクソソーム可視化マウス”の作製に成功し、世界で初めて、肝臓由来のエクソソームを可視化し、肝毒性バイオマーカーが確かに肝臓に由来することを証明することに成功している（論文投稿準備中）。

そこで、本研究は、我々が開発した母体血および羊水中のエクソソームを指標にした新規生殖発生毒性評価法に新たに開発に成功した“エクソソーム可視化マウス”を活用することで、毒性機序に基づいた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生殖発生毒性評価法を開発することを目的としている。

＜各年度の目標＞ 令和6年度・先行研究で得られた母体血および羊水中のエクソソームRNAを生殖発生毒性物質によるマウスモデル動物の作成およびマイクロサンプリングを行う。

令和7年度・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解析を行う。妊娠動物において、胎児のみを“エクソソーム可視化マウス”を利用することで、胎児由来のエクソソームのみを可視化、および単離を行ない、毒性機序に基づいた次世代型生殖発生毒性評価法の高度化を行う。

令和8年度・次世代型生殖発生毒性評価法のバリデーションおよびガイドライン化に向けての施策検討

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。

●次世代型生殖発生毒性試験の開発（研究代表者：小野、研究分担者：桑形、平林）

エクソソーム RNA を腹単位の毒性指標とする次世代型生殖発生毒性試験を開発するために、妊娠マウスに既知の生殖発生毒性物質を経口投与し、母動物の毒性検出、および、胎児に発現する形態変化から毒性指標となる母体血および羊水中のエクソソーム RNA の同定を次世代シーケンス解析により行う。

●次世代型生殖発生毒性試験の高度化（研究分担者：落谷、伊川、研究代表者：小野）

我々は既に、様々な毒性バイオマーカーとなるエクソソーム RNA の報告をしているが、それらが実際にどの細胞・臓器に由来したのかは確定できていなかった。そこで、任意の臓器（細胞）に由来したエクソソームの表面にのみ特異的にヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現させる遺伝子改変マウス（エクソソーム可視化マウス）を作製し、目的臓器由来のエクソソームのみを検出・単離することに成功した。この“エクソソーム可視化マウス”を用いることで、母体血中のエクソソームを母体に由来するもの、胎児に由来するものに完全に分けての検出が可能になり、評価法の高度化に大きく寄与する。また、毒性バイオマーカーとなるエクソソーム RNA の遺伝子改変マウスを作成することにより、毒性メカニズムへの関与について検証を行う。

●次世代型毒性試験の *in vitro* モデル開発（研究分担者：成瀬、研究代表者：小野）

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評価を行う。

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、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。

・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ェスタンブロットティングや、エクソソームの表面タンパクに対する抗体をコーティングしたチップ上でエクソソームを捕捉して特定のエクソソームを単離可能な EXOVIEW を利用することで単離されたエクソソームの大きさと分布、数のカウント、および、シングルエクソソーム上に存在するタンパクの同定を行うことで、エクソソームが由来した細胞の同定が可能になる。

・マウスを用いたトリコスタチン A 経口投与による母動物血清中並びに胎児及び羊水中エクソソームの解析のための試料採取法

二分脊椎や無脳症、脳瘤などの神経管閉鎖障害を誘発するバルプロ酸を催奇形性陽性対照物質として、マウスの神経管閉鎖時期である妊娠 9 日から 11 日にバルプロ酸を 0、300、600 mg/kg の 3 用量経口投与し、妊娠 15 日目に、母動物血清および羊水（胎盤、卵黄嚢膜、胎児）をエクソソーム解析用に採取し、胎児の外表面奇形の観察を行なっている。そこで、外表面奇形の有無を検出するエクソソーム RNA を毒性指標としてバイオマーカーの単離を行なった。

得られたバイオマーカーは、Hbb-y 遺伝子の RNA 断片であった。

この遺伝子は、本来、妊娠 15 日目には不活化される Hbb-y 遺伝子の発現が、奇形胎児でのみ発現が誘導されているものである。

投与物質であるバルプロ酸は、ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC の活性を阻害することが知られており、本来、エピジェネティック制御により不活性化される Hbb-y 遺伝子の発現がエピジェネティック異常により発現が誘導されているものと考えられる。このことから、バルプロ酸と同様に HDAC 阻害作用を持つトリコスタチン A（TSA）を投与し、バルプロ

酸と同様に催奇形性作用があるのかを観察し、また、母体血および羊水中のエクソソーム RNA を毒性バイオマーカーとしてスクリーニングを行う。

投与物質：トリコスタチン A
製造元：東京化成工業株式会社
CAS 番号：58880-19-6
分子量：302.37 g/mol

ロット番号：WXBD4552V
純度：>98.0%(HPLC)
性状：白色、粉末
保管条件：密栓、冷暗所

1-2. 媒体

名称：0.5 w/v%メチルセルロース溶液（略称：0.5% MC溶液）
製造元：富士フィルム和光純薬株式会社
ロット番号：CAE0466

媒体の調製

必要量のトリコスタチン A を秤取し、0.5%MC 溶液に徐々に加えて分散させた。調製後、遮光し、冷蔵保存した。

使用動物

動物種：マウス（SPF）
系統：C57BL/6J
供給源：ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社、厚木飼育センター
入荷時週齢：雌 10 週齢、雄 11 週齢
匹数：交配用雄 12 匹、雌 24 匹
使用した妊娠動物：4 匹

入荷後 1 週間の検疫・馴化期間を経て、一般状態及び体重推移に異常のない動物を用いた。

交配：11 週齢以上の雌 1 匹に 12 週齢以上の雄 1 匹を終夜同居させた。翌朝、膣内に膣栓が確認された雌を交尾成立動物とし、その日を妊娠 0 日とした。

群分け：交尾成立日（妊娠 0 日）ごとに行い、妊娠 0 日の体重を基に各群の体重が可能な限り均等となるようにした。

2. エクソソーム解析用試料採取試験

2-1. 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

投与経路は臨床適用経路である経口投与を選択し、投与期間は妊娠 8 日より 9 日までの 2 日間、および、7 日より 11 日までの 5 日間とした。

2-2. 投与方法

投与方法は、げっ歯類の経口投与方法に際して一般的な強制経口投与とした。

トリコスタチン A 溶液を胃ゾンデを用いて胃内に強制経口投与した（8:00~11:00 の間）。動物ごとの投与液量（表示単位：0.01 mL）は投与当日の体重を基準に算出した。

2-3. 投与量及び群構成

投与量は 0、1 及び 10 mg/kg の 3 用量とし、媒体対照群を含め試料採取時点を考慮した 6 群構成とした。すなわち、媒体対照群、1 及び 10 mg/kg 群に妊娠 12 日剖検群、妊娠 15 日剖検群をそれぞれ設けた。剖検群ごとの交尾成立雌動物数を 4 匹とした。

投与量設定根拠

既報によると、トリコスタチン A(TSA) の静脈内(10、25、50 µg/kg 体重)および経口(20、50、100 µg/kg 体重)の 14 日間反復投与毒性試験を *Swiss albino mice* で実施し、死亡例や体重、食物摂取量、血液・尿検査、臓器重量に有意な変化は見られなかったが、高用量群では腎臓の腫大、充血、変色が認められ、組織学的には糸球体および尿細管の変性が確認されている一方、遺伝毒性試験ではいずれの用量でも有意な変化は見られていない。この結果から、静脈内では 25 µg/kg、経口では 50 µg/kg を NOAEL としている(Haritwal T. et al., *Drug and Chemical Toxicology* Volume 47, 2024 - Issue 6, 2024)。

また、TSA の妊娠マウスへの投与については、妊娠 8 日に 0, 2, 4, 8, 16mg/kg で投与した報告があるが、着床部位数、死亡胎児数、および吸収胎児数、平均胎児体重、外表奇形は認められていない。しかし、骨格を解析すると、TSA 曝露群の胎児では、特異的かつ用量依存的な椎骨または肋骨の癒合、椎体セグメントの重複などの体軸の異常が観察されている。

本研究においては、妊娠中に VPA を服用した場合や、妊娠マウスへの VPA 投与実験で見られる神経管閉鎖障害や指形成不全が見られる条件検討を行うために、妊娠 8 日より 2 日間の反復投与、および、妊娠 7 日より 5 日間の反復投与を 10 mg/kg を最高用量とし、低用量として 1 mg/kg として行なった。

2-5. 剖検

妊娠 12 日剖検群、妊娠 15 日剖検群において、イソフルラン吸入麻酔下で心採血した後、体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官/組織を詳細に観察した。また、肝臓、腎臓、脾臓の重量を測定し、肝臓、腎臓についてはその後の遺伝子発現解析およびタンパク解析用の採材を行い、肝臓、腎臓、脾臓は病理解析を行う。

2-6. 帝王切開及び母血清中エクソソーム解析用試料採取

剖検時に、着床の有無を肉眼的に観察して、妊娠の成否を確認した。妊娠が認められた母動物については、子宮内の生存胎児数、死亡胚・胎児数を判定・記録した。生存胎児と死亡胚・胎児の総数を着床数とした。

2-7. 母動物血清中エクソソーム解析用試料の処理

血液をポリプロピレン製容器（タンパク低吸着）に移し、室温で30分以上放置した後、遠心分離（4℃、3000 ×g、10 分間）により血清を得た。得られた血清試料は試験番号、試料採取時点、動物番号、試料番号、採血年月日、試料名を明記したラベルを貼付したタンパク低吸着チューブに入れ、測定時まで-80℃の冷凍庫（許容値：-70℃以下）に保存する。

2-8. 羊水、胎児、胎盤の採取

1) 採取日及び採取時点

妊娠 12 日剖検群：各群 4 例

最終投与 1 時間後（09:00~12:00 の間）

妊娠 15 日剖検群：各群 4 例、

妊娠 12 日帝王切開とほぼ同じ時刻
（09:00~12:00 の間）

2) 対象部位（サンプル）の採取

妊娠動物の子宮壁を切開後、卵黄囊膜の外側から切開し、バリアチップで羊水をポリプロピレン製容器（タンパク低吸着）に採取した。羊水を採取した後、卵黄囊膜に被包された胎児及び胎盤を摘出した。胎児と胎盤を分離し、個別に重量を記録した。胎盤はほぼ均等に 2 分割し、それぞれ RNA later と 10%リン酸緩衝ホルマリン液を満たした 15 mL のコニカルチューブに保管した。羊水は遠心分離（4℃、6000 ×g、2 分間）後、上清をバリアチップでタンパク低吸着チューブに移した。胎児は 10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、特に神経管の閉鎖状態に注目し、形態観察を実施した。

・エクソソーム RNA 網羅的遺伝子発現解析

国立医薬品食品衛生研究所において採取された血液サンプルより抽出されたエクソソームは、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。

・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エクソソームの由来した臓器の特定

エクソソームの表面には CD9, CD63, CD81 などのテトラスパニンが存在する。そこで、臓器、細胞特異的に CD9-EGFP 融合タンパクを発現させることで、特定の細胞から分泌されるエクソソームのみが CD9-EGFP 融合タンパクを持つことで、エクソソームがどの臓器に由来したのかを検出することが可能にな

る。本研究で利用するマウス系統は以下の通りである。

CD9-EGFP ノックイン (KI) マウス (エクソソーム可視化マウス)

エクソソームはすべての臓器および細胞から分泌される細胞小胞であり、その表面には CD9、CD63、CD81 などが多く存在する。本マウスは、ROSA26 領域にチキン β アクチンプロモーターを配置し、Cre-loxP システムを利用することで臓器特異的にヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現するよう設計されたノックインマウスである。

Alb-Cre トランスジェニックマウス

肝細胞に特異的に Cre 酵素を発現するトランスジェニックマウスであり、肝臓特異的な遺伝子発現制御の研究に利用される。

Sox2-Cre トランスジェニックマウス

胚盤葉上層 (epiblast) および卵に特異的に Cre 酵素を発現するトランスジェニックマウスであり、初期発生過程の解析や遺伝子操作に用いられる。

・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

CD9-EGFP KI マウス (flox マウス) と Alb-Cre トランスジェニックマウスを交配して作成した flox/Alb-Cre マウスの肝臓を採取する。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。その後に 40 μ m 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砕した後、MBOC (Matrigel Bilayer Organoid Culture) 法を用いて細胞をマトリゲルに包埋し、至適培地を添加し培養することでオルガノイドを樹立する。

樹立に成功した肝臓オルガノイドを超解像度共焦点顕微鏡で観察することで、エクソソームの可視化を行う。

(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

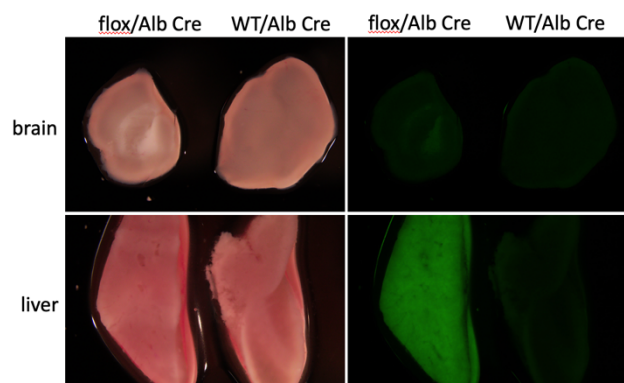
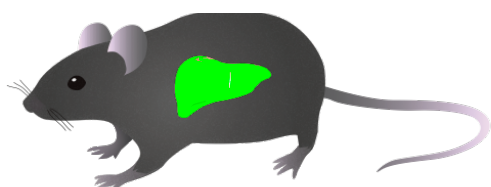
●次世代型毒性試験の *in vitro* モデル開発（研究分担者：成瀬、落谷、研究代表者：小野）

将来的な動物実験によらない安全性評価法の確立が多方面より求められており、生殖発生毒性評価法の開発と並行して、我々が既に単離した肝障害のバイオマーカーとなるエクソソーム RNA が、肝臓オルガノイドの培養上清中のエクソソームでも同様に検出されるものなのかを検討するために行なっている。

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評価を行う。

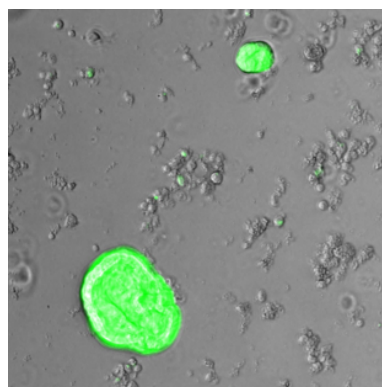
本研究では、成熟した hepatocyte に分化した細胞でのみ CD9-EGFP 陽性となる系なので、オルガノイド研究の最大懸案である臓器を反映したオルガノイドの分化条件を、EGFP 陽性細胞を指標とすることで最適化することが可能な優れたアッセイ系を確立できると考えている。

今年度は、CD9-EGFP Knock-in (KI) マウス (flox) マウス (♂) と肝臓特異的に Cre を発現する Alb Cre トランスジェニックマウスを交配することで、肝臓特異的にヒト CD9-EGFP を分泌するマウスを作製し、その肝臓よりオルガノイドの樹立を行なった。



図：肝臓特異的にヒト CD9-EGFP を発現する flox/Alb Cre マウスの臓器を蛍光観察すると、一例として、脳では EGFP が陰性であるが、肝臓では、EGFP の発現が誘導されている。

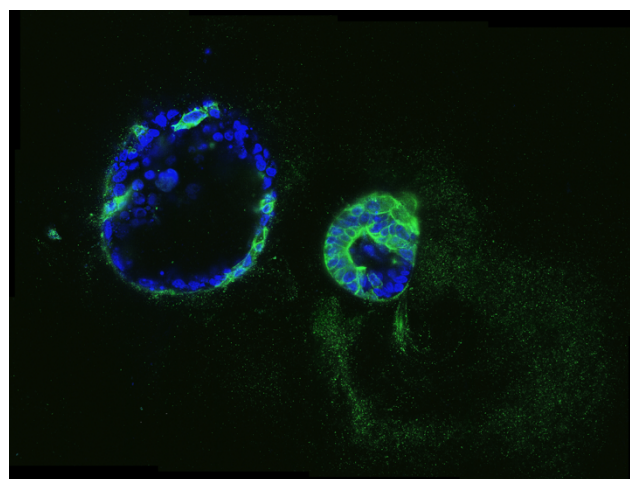
その結果、下図の通り、EGFP 陽性の肝臓オルガノイドの樹立に成功した。



図：肝臓特異的にヒト CD9-EGFP を発現する flox/Alb Cre マウスの肝臓より樹立したオルガノイドは、蛍光観察すると、EGFP 陽性になっている。

さらに、超解像度共焦点顕微鏡を利用して flox/Alb Cre 肝臓オルガノイドを観察したところ、下図の通り、肝臓オルガノイドの全体で EGFP 陽性になっているわけではなく、一部の細胞は EGFP 陰性になっていることがわかった。これは、肝臓のオルガノイドは、hepatic stem cell が未分化な状態で細胞増殖し、それらが分化して hepatocyte になることで、初めてアルブミンを分泌するようになり、それにより、Alb Cre の発現が誘導されることで、Cre-loxP システムが働きヒト CD9-EGFP の発現が誘導されるようになるからである。

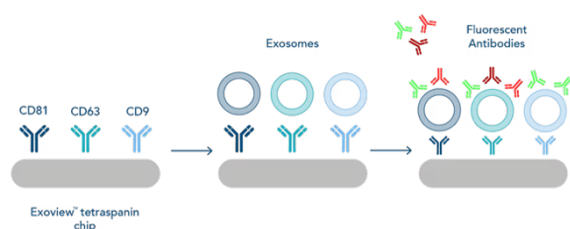
また、超解像度共焦点顕微鏡像からは、EGFP 陽性細胞から、単一エクソソームが多数分泌されている様子が下図の通りに検出できている。



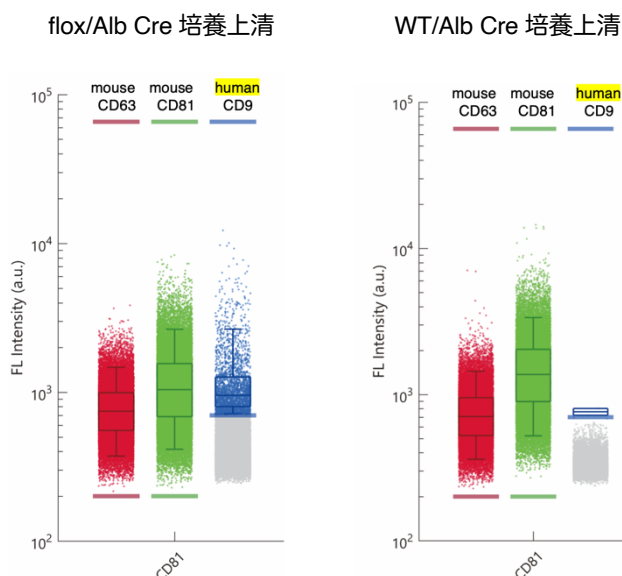
図：肝臓特異的にヒト CD9-EGFP を発現する flox/Alb Cre マウスの肝臓より樹立したオルガノイドを超解像度共焦点顕微鏡で観察すると、オルガノイドが hepatocyte に分化した細胞でのみ EGFP 陽性になっている様子が検出され、また、それらの陽性細胞からは、エクソソームの粒子が分泌される様子が観察されている。

ここで、**flox/Alb Cre** 肝臓オルガノイドから、培養液中にエクソソームが多数分泌されていることが検出できたので、培養液中に分泌されたエクソソームのシングルエクソソーム解析を行うことで、培養液中に存在するエクソソームのうち、どれくらいが **EGFP** 陽性細胞より分泌されているのかを検出することとした。

シングルエクソソーム解析には、**Exoview imager** を利用することとした。**Exoview** は、下図にある様に、チップ上にプリントされた抗テトラスパニン抗体により、エクソソームを捕捉し、その捕捉されたエクソソームを他のエクソソームタンパクに対する最大3種類の蛍光抗体によりシングルエクソソーム解析を可能にする。本研究においては、ヒト **CD9** 抗体、マウス **CD63** 抗体、マウス **CD81** 抗体を用いて解析を行うことにより、エクソソーム上に存在するヒト **CD9-EGFP** をシングルエクソソーム単位で検出し、カウントすることが可能になる。



図：Exoviewの概略。ExoViewは、チップ上にプリントされた抗体上に単一のエクソソームを捕捉し、蛍光抗体を用いることでエクソソームの表面タンパク質をカウントおよび識別することが可能になる。（図引用：<https://www.ptglab.co.jp/news/blog/new-ways-to-study-the-elusive-exosome/>）



図：Exoviewを利用した **flox/Alb Cre** 肝臓オルガノイド（左）および **WT/Alb Cre** 肝臓オルガノイド（右）の培養上清のシングルエクソソーム解析。エクソソームを検出するための蛍光抗体には、マウス **CD63**（赤点）、マウス **CD81**（青点）、ヒト **CD9**（緑点）抗体を用いており、ヒト **CD9** 抗体では、ヒト **CD9-**

EGFP 陽性エクソソームのみを検出している。

シングルエクソソーム解析の結果、**flox/Alb Cre** 肝臓オルガノイドの培養上清でのみ、ヒト **CD9** 陽性エクソソームが検出された。このことから、我々の作製したシングルエクソソーム解析系が機能していることを示すことができた。

D. 考察と結論

考察

本研究は、動物実験に依存しない次世代型毒性評価法の確立を目指し、肝オルガノイドを用いた *in vitro* モデルの開発を行ったものである。特に、肝障害時に放出されることが知られているエクソソーム RNA バイオマーカーが、肝オルガノイドの分泌するエクソソームにも反映されるかどうかを検証する点に特徴がある。

CD9-EGFP KI マウスと Alb-Cre マウスを交配することで、肝臓特異的に EGFP 標識されたエクソソームを分泌するオルガノイドを樹立し、EGFP 発現が分化した hepatocyte に限定されるという特性を活かして、オルガノイドの成熟度を可視化・定量化できるアッセイ系を構築した。さらに、超解像度共焦点顕微鏡および Exoview によるシングルエクソソーム解析を組み合わせることで、EGFP 陽性細胞に由来するエクソソームの可視化および定量が可能であることを示した。

この成果により、分化の指標を内在的に持つオルガノイドモデルが確立され、細胞の分化段階とエクソソーム分泌の関係性の検討や、毒性による分泌変化の評価に応用できる可能性が見出された。

結論

本研究により、肝臓特異的に CD9-EGFP を発現するマウス由来の肝オルガノイドを用いて、成熟した hepatocyte に由来するエクソソームを選択的に検出・解析できるアッセイ系を確立した。このシステムを用いることで、毒性物質曝露に対するエクソソーム応答の評価が動物実験を用いずに可能となるだけでなく、オルガノイド分化の最適化にも寄与する。以上より、本モデルは将来的な動物実験代替法として有望な *in vitro* 毒性評価プラットフォームとなることが期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

●Ryuichi Ono, Makiko Kuwagata, Mie Naruse, Akihito Watanabe, Masao Takano, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(1): 37-56. [doi.org/10.2131/fts.11.37]

Fujioka T, Shiura H, Ishii M, Ono R, Endo T, Kiyonari H, Hirate Y, Ito H, Kanai-Azuma M, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F
Targeting of retrovirus-derived Rtl8a/8b reduces social response and increases apathy-like behavior associated with GABRB2 reduction
OPEN BIOLOGY 2025 Jan;15(1):240279. [doi: 10.1098/rsob.240279].

●小野 竜一
非臨床安全性評価における New approach methods としての細胞外小胞の活用
医学のあゆみ Vol.291 No.9 2024. 11. 30

Makiko Kuwagata, Yuko Doi, Hirokatsu Saito, Mariko Tsurumoto, Toshime Igarashi, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(4): 169-181. [doi.org/10.2131/fts.11.169]

Toshio Imai, Rikako Ishigamori, Mie Naruse, Masako Ochiai, Yoshiaki Maru, Yoshitaka Hippo, Yukari Totsuka
Bridging toxicological properties of environmental chemicals between animals and humans using healthy organoid systems
J Toxicol Sci. 2024;49(10):425-434. doi: 10.2131/jts.49.425.

●Yamamoto T, Nakayama J, Urabe F, Ito K, Nishida-Aoki N, Kitagawa M, Yokoi A, Kuroda M, Hattori Y, Yamamoto Y, Ochiya T.
Aberrant regulation of serine metabolism drives extracellular vesicle release and cancer progression. *Cell Rep.* 2024 Aug 27;43(8):114517.

Age-associated aberrations of the cumulus-oocyte interaction and in the zona pellucida structure reduce fertility in female mice.
Ishikawa-Yamauchi Y, Emori C, Mori H, Endo T, Kobayashi K, Watanabe Y, Sagara H, Nagata T, Motooka D, Ninomiya A, Ozawa M, Ikawa M.

Commun Biol. 2024 Dec 24;7(1):1692. doi: 10.1038/s42003-024-07305-z.

TEX38 localizes ZDHHC19 to the plasma membrane and regulates sperm head morphogenesis in mice.
Kaneda Y, Lu Y, Sun J, Shimada K, Emori C, Noda T, Koyano T, Matsuyama M, Miyata H, Ikawa M.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2025 Mar 11;122(10):e2417943122. doi: 10.1073/pnas.2417943122. Epub 2025 Mar 3.

2. 学会発表 (抜粋)

●Ryuichi Ono, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Yusuke Yoshioka, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima
Detection of EVs in Hepatotoxicity Using CD9-mEmerald Reporter Mouse
INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXTRACELLULAR VESICLES ANNUAL MEETING 2024, (2024.5.12, Melbourne, Australia) 、口頭

五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋 雄、桑形麻樹子、北嶋 聡：ゲノム編集によるノックインマウス作製時に生じた、オンターゲット部位の多様な変異とその次世代伝達、第 71 回日本実験動物学会総会、京都、2024 年 5 月 29 日、ポスター

●Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S
バルプロ酸 (VPA) の妊娠マウスへの反復投与により誘導される羊水由来の細胞外小胞 Small RNA
第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.6.21 福岡) 、口頭

●Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S
Extracellular Vesicle Small RNAs Secreted from Mouse Amniotic Fluid Induced by Repeated Oral Administration of VPA to Pregnant Mice
Annual Conference of the International Federation of Placenta Associations (IFPA 2024) (2024.9.4., Montreal, Canada)

●Ryuichi Ono, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Yusuke Yoshioka, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima
Detection of extracellular vesicles (EVs) in Hepatotoxicity Using CD9-EGFP Reporter Mouse
58th Congress of the European Societies of Toxicology (2024.9.20., Copenhagen, Denmark)

●Ryuichi Ono, Mie Naruse, Yoko Hirabayashi, Takahiro

Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima: Evaluation of CD9-EGFP Reporter Mice for Organ-Specific EV Detection、ANNUAL MEETING of Society of Toxicology, 2024.3.17, Orlando、口頭

F. 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
Fujioka T, Shiura H, Ishii M, <u>Ono R</u> , Endo T, Kiyonari H, Hirata Y, Ito H, Kanai-Azuma M, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F	Targeting of retrovirus-derived Rtl8a/8b reduces social response and increases apathy-like behavior associated with GABRB2 reduction	OPEN BIOLOGY	15(1)	240279	2025
<u>小野 竜一</u>	非臨床安全性評価における New approach methods としての細胞外小胞の活用	医学のあゆみ	Vol.291 No.9	13-25	2024
<u>Makiko Kuwagata</u> , Yuko Doi, Hirokatsu Saito, Mariko Tsurumoto, Toshime Igarashi, Takuya Nishimura, Yuhji Takahashi, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima	A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats.	Fundam. Toxicol. Sci.	11(4)	169-181	2024
Toshio Imai, Rikako Ishigamori, <u>Mie Naruse</u> , Masako Ochiai, Yoshiaki Maru, Yoshitaka Hippo, Yukari Totsuka	Bridging toxicological properties of environmental chemicals between animals and humans using healthy organoid systems	J Toxicol Sci.	49(10)	425-434	2024

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 本間 正充

次の職員の令和6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 厚生労働科学研究費補助金 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生殖発生毒性評価法の開発に資する研究
- 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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☒ 有 ☐ 無	☒	国立医薬品食品衛生研究所	☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

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 本間 正充

次の職員の令和6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生殖発生毒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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

機関名 帝京平成大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 沖永 寛子

次の職員の令和6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生殖発生毒性評価法の開発に資する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 帝京平成大学・健康医療スポーツ学部医療スポーツ学科・教授
(氏名・フリガナ) 桑形 麻樹子・クワガタ マキコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

機関名 東京医科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 宮澤 啓介

次の職員の令和6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) 医学総合研究所・特任教授
(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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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 7年 3 月 31 日

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 高倉 伸幸

次の職員の令和6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生殖発生毒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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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:)	☐	☒	☐		☐

(※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」、「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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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7年3月25日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 脇田 隆宇

次の職員の令和6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生殖発生毒性評価法の開発に資する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) ウイルス第一部 主任研究官

(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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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、即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」、「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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口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。