

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究  
(23KD1003)

令和5年度 分担研究報告書

分担研究課題：胎盤の遺伝子発現プロファイリング

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

### 研究要旨

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。この評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。しかしながら、神経系の発生・発達は極めて複雑な現象であり、ヒトの発達神経毒性の定義ですら専門家間で認識が異なるのが現状である。また、有害発現経路(AOP)に立脚したDNTのin vitro試験法の開発が精力的になされているが、詳細なAOPの積上げ・組み合わせのみで複雑なDNTに係る試験法の開発や実体の解明が進むとは考えにくい。

本研究では、妊娠動物(マウス)の胎内における胎盤の発生への理解を深めることで、化学物質の胎児影響を予測することを目的としている。

具体的には、マウスの発生ステージごとの胎盤の網羅的遺伝子発現解析を行うことで、各ステージにおける胎盤を構成する細胞のsubtypeを明らかにすることで、胎盤の機能を明らかにする。

令和5年度においては、受精後7.5日および8.5日目のC57BL/6マウス胎盤のサンプリングを行なった。胎盤は、胎児由来の胎盤細胞と母体由来の脱落膜からなる組織であり、受精後7.5日、8.5日目においては胎盤および脱落膜の分離が可能であり、令和6年度において次世代シーケンスによる網羅的遺伝子発現解析を行う(小野)。

令和5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

「Trophectoderm」(栄養外胚葉)は、哺乳類の胚発生の初期段階で最初に形成される組織であり、胚の外側の細胞層である。マウスにおいては、受精卵が受精してから約 3.5 日目に形成されるこの層は、胚と母体組織との間に位置する胎盤を構成する細胞へと分化することが知られている。それ故、Trophectoderm が発生の過程でどのような細胞に分化していくのかを明らかにすることは、胎盤の機能を知る上で重要課題である。

マウスにおいては、胚盤胞が子宮に着床した後に、Trophectoderm が胚体外外胚葉への分化を経て、絨毛膜および胎盤外円錐を形成する。さらに、その後成熟した胎盤が形成され、Trophoblast Giant cell、spongiotrophoblast 層、labyrinth layer の 3 層構造が形成される。

今年度に解剖を行う受精後 7.5 日から 8.5 日目においては、胎盤外円錐から spongiotrophoblast が形成される重要な期間である。そこで、これらのステージにおいて網羅的遺伝子発現解析を行うことで、胎盤外円錐の分化段階に特異的なバイオマーカーの単離を行うことを目的としている。

## B. 研究方法

マウス胎盤の発生・分化のバイオマーカーとなる遺伝子を単離する目的で、マウス胎盤の発生ステージごとの網羅的遺伝子発現解析データの取得を行う。マウス胎盤は、胎児由来の胎盤細胞と母体由来の脱落膜からなる組織であり、今回は、胎盤と脱落膜の分離が可能な受精後 7.5 日、8.5 日目において胎盤および脱落膜の採取を行う。国立医薬品食品衛生研究所・動物室において C57BL6/J ♂および♀ (12 週齢) の交配を 2 ステージ (7.5dpc および 8.5dpc) 分を行う。1 ステージあたり、5 ペアで交配を行い、翌朝 10 時にプラグの確認を行う。予定日に雌性マウスをイソフルラン麻酔下で帝王切開を行い、子宮を採取し、母動物は麻酔下で頸椎脱臼による安楽死を行う。採取した子宮より、マウス胚を取り出し、胎盤および母体側組織である脱落膜の採取を行い、液体窒素にて急冷し、凍結保存を行う。

(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

### C-3-5: 発生ステージごとのマウス胎盤の網羅的遺伝子発現解析 (国立医薬品食品衛生研究所)

今年度は、マウス胎盤の発生・分化のバイオマーカー

一となる遺伝子を単離する目的で、マウスの発生ステージごとの胎盤の網羅的遺伝子発現解析を行うためのサンプリングを行った。マウス胎盤は、胎児由来の胎盤細胞と母体由来の脱落膜からなる組織であり、今回は、胎盤と脱落膜の分離が可能な受精後 7.5 日、8.5 日目において胎盤および脱落膜の採取を行なった。雌雄 C57BL6/J マウス (12 週齢) の交配を 2 ステージ (7.5dpc および 8.5dpc) 分を行った。1 ステージあたり、5 ペアで交配を行い、翌朝 10 時にプラグの確認を行なった。その結果、7.5dpc 用の交配では、5 匹中 2 匹の雌がプラグ陽性であり、8.5dpc 用の交配では、5 匹中 3 匹がプラグ陽性であった。受精後 7.5 日、8.5 日目の予定日にプラグ陽性の雌性マウスをイソフルラン麻酔科で帝王切開を行い、子宮を採取し、母動物は麻酔下で頸椎脱臼による安楽死を行った。採取した子宮より、マウス胚を取り出し、胎盤および母体側組織である脱落膜の採取を行い、液体窒素にて急冷し、凍結保存を行った。7.5dpc においては、9 匹、8 匹の正常発生胚を採取した。また、8.5dpc においては、8 匹、9 匹、7 匹の正常発生胚の採取を行った。また、これらの胎盤の網羅的遺伝子発現解析を行うための次世代シーケンス用のライブラリーとして、Clontech 社の SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit を選択し、来年度にシーケンスを行う。

## D. 考察と結論

哺乳類の正常な発生において、正常な胎盤形成は必要不可欠である。胎盤により、母子間のガス交換、栄養交換などが行われており、化学物質の胎児移行についても寄与することが知られている。

これらの母子間の物質交換は、主に labyrinth layer において母体血と胎児血との間で行われていることから、labyrinth layer の成熟が、母子間の物質交換に大きく影響する。

そこで、正常胎盤の発生過程における機能を明らかにすることで、発生ステージ特異的な化学物質の胎児移行効率などを明らかにできる。

近年、動物福祉の 3Rs の観点から、in vitro 系の毒性評価系の開発が進められている。発達神経毒性においては、胎盤において化学物質が胎児に移行するかどうかは重要になる。胎盤幹細胞や胎盤オルガノイドなどが、毒性評価系で利用されることが想定されるが、それらが、実際に in vivo を反映しているのかわくは、正常な発生過程における詳細な胎盤の遺伝子発現解を行うことで、実際に in vivo に近い遺伝子発現をしているのかのバイオマーカーとして利用する、

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

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(令和4年度)

○ \* **Ryuichi Ono**, Makiko Kuwagata, Mie Naruse, Akihito Watanabe, Masao Takano, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya, Yoko Hirabayashi, and Satoshi Kitajima.

Extracellular Vesicle Small RNAs Secreted from Mouse Amniotic Fluid Induced by Repeated Oral Administration of VPA to Pregnant Mice

*Fundamental Toxicological Sciences*, 2024 (in press)

\* **Corresponding author**

### 2. 学会発表

(令和4年度)

○ **小野 竜一**、cfDNA メチル化とエクソソーム RNA を毒性指標としたリキッドバイオプシー、第50回日本毒性学会学術年会 2023.6.21 横浜

**小野 竜一**、エクソソームを介した遺伝子水平伝搬、第50回日本毒性学会学術年会 2023.6.22 横浜

○ **Ryuichi Ono**、Liquid biopsy using cfDNA methylation and EV-associated miRNA as a toxicity biomarker、The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, 2023.7.19, Taipei (招待講演)

○ **Ryuichi Ono**、Extracellular Vesicles (EVs) as Novel Toxicity Biomarkers、The 10th 63<sup>RD</sup> ANNUAL MEETING of Society of Toxicology, 2024.3.14, Salt Lake City (招待講演)

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし。

### 2. 実用新案登録

なし。

### 3. その他

なし。