

厚生労働化学研究費（化学物質リスク研究事業）
血液中の核酸をバイオマーカーに用いた化学物質の高感度な有害性評価に資する研究
（H30-化学一般-002）

令和元年度 分担研究報告書

分担研究課題：マウスを用いたエクソソーム単離法の最適化・標準化

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・教授

研究協力者：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

研究要旨

日常生活に欠かすことのできない様々な物質がヒトの健康や環境に害を及ぼす危険性があり、それを把握することは、健康危機を適切に管理・回避し、安全な生活を維持するために必須である。

トキシコゲノミクス技術を用いた化学物質の単回暴露の際のデータの蓄積によって、分子メカニズムに基づく化学物質の高精度な影響評価が、実用化段階に到達しつつある。ただし、データは特定の臓器（主に肝臓）に由来し、毒性評価に求められる個体レベルでの網羅性については、多くの労力とコストが必要となる。

本研究では、ヒトに対する予測性の向上を目指した全身を網羅した次世代型安全性評価法の確立および毒性データの集積を目的としている。

最近の知見により、血液中には、細胞より分泌された小胞として知られるエクソソームが循環していることが明らかとなり、特にヒトにおいて腫瘍細胞種特異的なエクソソームをバイオマーカーとした診断精度は 90 % を超えるとの報告がある。また、炎症や化学物質誘発性の臓器障害に対する特異的な血液中のバイオマーカーとして、エクソソームの内部に含まれるマイクロ RNA (miRNA) やメッセンジャー RNA (mRNA) が同定されつつある。

そこで、化学物質等による有害事象にตอบสนองして、組織・臓器から血液中に放出されるエクソソームに含まれる RNA は、毒性評価の為の新規バイオマーカーとしての有用性が期待されることから、本研究では、化学物質ばく露後のマウスの血液中のエクソソーム RNA の網羅的解析により、標的臓器を特定し、更に毒性発現機序の解明を目指す事で、化学物質の「次世代型」有害性評価による迅速化、高度化および標準化を行うことを目的とした。

本分担研究においては、平成 30 年度（初年度）および令和元年度においては、エクソソーム RNA をバイオマーカーとした化学物質の次世代型安全性評価法の標準化プロトコールの作成を行なった。

令和 2 年度（最終年度）では、標準化プロトコールを用いて、四塩化炭素投与による肝毒性を検出する新規バイオマーカーとなりうる miRNA を 4 2 個単離したことを報告するに至った (**Ono R.** et al., *Toxicology Reports* 2020)。

さらに、四塩化炭素投与による肝毒性を検出する新規バイオマーカーとして、エクソソーム中の small RNA の網羅的スクリーニングを行い、1318 個の新規バイオマーカー候補を得た。

本研究により、マウスにおけるエクソソーム研究の最適化プロトコールが確定し、これらを用いることで、ベンゾトリアゾール類 5 種類のばく露実験によって生じた肝臓障害をエクソソーム RNA を指標とした次世代型安全性評価法により、迅速かつ高感度に毒性を見出すことに成功した。

各種化学物質の毒性データが集積されるに伴い、これらを利用したカテゴリーアプローチを行うことで、血液 1 滴からの高感度かつ迅速な毒性予測が実現できる。また、長期反復毒性試験の大幅な短期化にも貢献することが期待される。

。

A. 研究目的

(背景)

血液中には、血球細胞の他に血流中を循環する cell free DNA (cfDNA) や分泌顆粒として知られるエクソソーム内に含まれる RNA が存在する。cfDNA は、生体内で障害を受けた細胞から放出され、cfDNA の DNA メチル化状態は、放出元臓器の DNA メチル化状態を反映することから、障害を受けた組織が同定され得る。エクソソームは、数十～百ナノメートル程度の脂質二重膜の小胞であり、細胞より体液中に分泌される。この中に含まれる RNA には、細胞特異的なものが存在し、腫瘍細胞特異的なエクソソームをバイオマーカーとして 90 % を超える早期がんの診断精度が謳われている。また、ヒト肺微小血管内皮培養細胞は、タバコの煙の刺激で特異的なエクソソーム RNA を放出する報告もあり、これらの指標は毒性評価の為の新規バイオマーカーとしての有用性が期待される。

(目的)

本研究では、化学物質ばく露後のマウスの血液中の核酸のうち、エクソソーム RNA の網羅的解析により、標的臓器を特定し、更に毒性発現機序の解明を目指す事で、化学物質の「次世代型」有害性評価による迅速化、高度化および標準化を行うことを目的とする。ここでは、国立医薬品食品衛生研究所において毒性試験および各種臓器での網羅的遺伝子発現解析を行ったベンゾトリアゾール類を対象とする予定である。これらは化学構造の側鎖の違いで毒性の強さや発現する臓器に違いがあり、エクソソーム RNA をバイオマーカーとした有害性評価の有用性を検証する上で効果的である。また、ベンゾトリアゾール構造からのカテゴリーアプローチによる毒性の予測評価に対しても有用な情報を提供しうるかの如何が検討可能となる。

(期待される効果)

本研究は、少量の血液より、エクソソーム RNA を網羅的に解析し、全身を網羅した毒性バイオマーカーデータベースを構築することで化学物質の高感度な有害性評価を可能とする次世代型の有害性評価法である。さらに、この次世代型有害性評価法は、少量の採血のみで高感度に有害性評価を可能となることから、将来的には化学物質を同一個体に反復ばく露を行ない、継時的に採血を行うことで、従来法に比較し短期間に少数の動物使用で有害性評価が可能となり、動物愛護の 3R に資する評価系となることが期待される。

B. 研究方法

本研究においては、化審法における優先評価化学物質を迅速に安全性評価するために、血液中の核酸をバイオマーカーに用いた化学物質の高感度な有害性評価系の開発を行う。国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部においては、化学物質のマウスへの投与実験および採血、エクソソーム RNA の次世代シーケンサーによる網羅的解析を行い、東京医科大学・医学総合研究所・分子細胞治療研究部門においては、マウス血液からのエクソソーム RNA 採取の標準化プロトコールの作成を行い、国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・安全性予測評価部においては、本研究において得られるベンゾトリアゾール構造を持つ 5 物質のばく露に特異的なエクソソーム RNA の結果と、化学構造の基本構造は同じであるが、側鎖の違いなどによりその毒性の強さや発現する臓器に違いがあるベンゾトリアゾール類の毒性情報を利用することで、カテゴリーアプローチ手法を用いた毒性予測評価の精度を飛躍的に向上させ、化審法における優先評価化学物質の毒性評価の迅速な毒性評価および毒性予測評価に貢献する。

・化学物質の投与実験と採血方法の検証：

国立医薬品食品衛生研究所・動物室において C57BL6J マウス (♂、12 週齢) に対して肝臓障害の陽性コントロール物質として四塩化炭素を高用量 (70mg/kg) および低容量 (7mg/kg)、ベンゾトリアゾール構造を持つ化学物質 (10 種類) のうち 5 種類：

- ・2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phenol (CAS#3846-71-7)、
- ・2,4-di-tert-butyl-6-(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)phenol (CAS#3864-99-1)、
- ・2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-phenylpropan-2-yl)phenol (CAS#70321-86-7)、
- ・2-(benzotriazol-2-yl)-4-methylphenol (CAS#2440-22-4)、
- ・2-(benzotriazol-2-yl)-4-(2,4,4-trimethylpentan-2-yl)phenol (CAS#3147-75-9)

を高用量 (1000mg/kg)、中用量 (300mg/kg)、低容量 (100mg/kg) の 3 用量 (2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phenol (CAS:3846-71-7) に関しては高用量のみ)、およびその溶媒コントロールとしてコーンオイルを 10:00 AM に単回投与し、2 時間、4 時間、8 時間、24 時間後にイソフルラン麻酔下において左心房より血液を採取する。肉眼所見で臓器に障害の起さない用量を設定し、その後の解析を行なう。

これらのベンゾトリアゾール類 5 種類の化学物質を

CAS 番号、もしくは Benzo0000 (0000 は、各ベンゾトリアゾールの CAS 番号の最初の 4 桁)と省略する場合がある。

マウス血液を採取後、室温で 30 分間静置し、氷上に移す。全てのサンプルの準備が整い次第、2000 x G、10 分遠心分離を行う。遠心分離後は、上層の血清成分を新しいチューブに移し、総容量を測定後に -80 度で保存を行う。

(動物実験を行う際の研究協力者として北嶋聡(毒性部・部長/研究協力者)・古川祐介(若手研究協力者)を加えた。)

・マウス血液からのエクソソーム RNA 単離の標準化

国立医薬品食品衛生研究所において採取された血液サンプルを用いて、国立がん研究センター研究所・分子細胞治療研究分野(令和元年度より東京医科大学・分子細胞治療研究部門)においてヒトの血液からのエクソソーム単離方法の最適化で行った種々の血中のエクソソーム単離方法の比較検討を平成 30 年度研究で行なっている。具体的には、ポリマー沈降法、カラム精製法、超遠心ペレットダウン法を行い、エクソソーム単離後は、Nanosight またはエクソソームの表面抗原に対するウエスタンブロッティングやエクソスクリーン法により、単離されたエクソソームの大きさと分布、数のカウントを行い、それぞれのエクソソーム単離法におけるエクソソーム回収率を定量し、超遠心ペレットダウン法が効率的であった(研究協力者として吉岡祐亮(東京医科大学・分子細胞治療研究部門・講師/若手研究協力者)を加えた。)

・エクソソーム RNA 網羅的遺伝子発現解析

国立医薬品食品衛生研究所において採取された血液サンプルより抽出されたエクソソームは、Quiazol solution (Qiagen) によって溶解され、miRNeasy micro-elution kit (Qiagen) によって、RNA を抽出および精製する。エクソソーム RNA は、Clontech 社の SMARTer smRNA-Seq kit for Illumina を用いて、次世代シーケンス用ライブラリーを作成する。作成した次世代シーケンス用ライブラリーは、Bluepippin サイズセレクターを用いて、148 bp ~ 185 bp のマイクロ RNA 画分だけを抽出する。サイズセレクションを行ったエクソソーム RNA の次世代シーケンス用ライブラリーは、KAPA Library Quantification Kit Illumina® Platforms (Nippon Genetics, Japan) または、Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit (Life Technologies, CA, USA) によって、濃度測定を行った上で、2.0 pM のライブラリーを、毒性部で所有す

る Illumina 社 Nextseq500 を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行う。

・エクソソーム RNA の RNA-seq データ解析

Illumina 社 Nextseq500 より出力された raw data (raw reads) は、BCL2-FASTQ program (Illumina, USA) により、FASTQ format に変換する。以降、全てのデータ解析は、Galaxy platform (<https://usegalaxy.org>) で行った。FASTQ は、Filter by quality program を用いて、quality score が 20 以上のシーケンスが 90% 存在するシーケンスのみ解析対象とした。また、5' および 3' 末端のアダプター配列は、Trim FASTQ program によって除いている。

これらの処理を行ったシーケンスデータは、マウスゲノム (mm10) に対し TopHat program を用いてマッピング作業を行い、BAM ファイルを生成した。

BAM ファイルは、Cufflinks and Cuffnorm programs を用いて、転写産物の定量化および、サンプル間のノーマライゼーションを行う。

マウス miRNA のリファレンスシーケンスは、miRbase (<http://mirbase.org>) を利用した。

・定量的 PCR による次世代シーケンス結果のバリデーション

Illumina 社 Nextseq500 を使用して得られた、次世代シーケンスによる遺伝子発現解析結果を定量的 PCR (qRT-PCR) 解析により、バリデーションを行う。エクソソーム RNA は、Clontech 社の SMARTer smRNA-Seq kit for Illumina を用いて、次世代シーケンス用ライブラリーを作成されており、この際に small RNA に付加されたアダプターと small RNA 自身に対応する領域に qRT-PCR 用のプライマーを作成した。以下に qRT-PCR 用のプライマーを示す。

5' adapter primer: AATGATACGGCGACCACCGA ,
miR-122-5p-specific-primer:
CAAACACCATTGTCACACTCCA,
miR-192-5p-specific-primer:
GGCTGTCAATTCATAGGTCAG

qRT-PCR は、ABI7500HT (Applied Biosystems, Hercules, FL, USA) によって行う。

cDNA は、1 反応につき、0.2pM 用いて、Powerup SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) PCR 酵素および SYBR Green 試薬を用いて qRT-PCR 解析を行う。qRT-PCR 解析は、絶対定量法を用いる。以下の合成オリゴを希釈することで、standard curve を作成している。

miR-122-5p-Standard-oligo:
AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAGA
TCGCTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA
GACAGGGCTGGAGTGTGACAATGGTGTGTTG,
miR-192-5p-Standard-oligo:AATGATACGGCGACC
ACCGAGATCTACACTAGATCGCTCGTCGGCAG
CGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGCCTGACC
TATGAATTGACAGCC
希釈率は、10倍で、 $5.0 \times 10^6 - 5.0 \times 10^0$
copies/PCR で行なっている。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。

C. 研究結果

C-1:エクソソーム RNA 解析の標準化プロトコールの作成 (小野、落谷):

平成30年度研究において、採血方法、エクソソームの単離方法、エクソソーム RNA の解析方法の最適条件の決定に成功している。これらの研究結果をふまえて、令和元年度研究において、エクソソーム RNA 解析の標準化プロトコールを以下の様に作成した。

- ① C57BL/6J マウス♂ (12 週齢) に、化学物質および溶媒コントロールを 10:00 AM に単回投与し、2 時間、4 時間、8 時間、24 時間後にイソフルラン麻酔下において左心房より血液を採取する。
- ② マウス血液を採取後、室温で 30 分間静置し、氷上に移す。全てのサンプルの準備が整い次第、2000 x G, 10 分遠心分離を行う。遠心分離後は、上層の血清成分を新しいチューブに移し、総容量を測定後に -80 度で保存を行う。
- ③ 超遠心ペレットダウン法によりエクソソームの回収を行う。
- ④ 回収したエクソソームより QIAGEN 社の miRNeasy Micro kit を用いてエクソソーム RNA 抽出を行う。
- ⑤ Clontech 社の SMARTer smRNA-Seq kit for Illumina を用いて、エクソソーム RNA より次世代シーケンス用ライブラリーを作成する。
- ⑥ Bluepippin サイズセレクターを用いて、マイクロ RNA 画分だけを抽出した上で、毒性部で所有する Illumina 社 Nextseq500 を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行う。

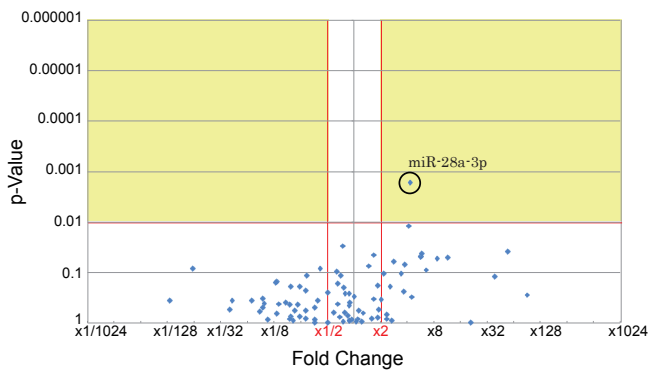
C-2：四塩化炭素ばく露に特異的なバイオマーカーの探索：

平成30年度においては、四塩化炭素 (7mg/kg および 70mg/kg)、その溶媒となるコーンオイルの単回投与実験を行い、四塩化炭素投与群と溶媒投与群とのエクソソーム RNA の遺伝子発現を比較した結果、多くの毒性バイオマーカー候補の単離に成功している。

令和元年度は、現在、miRbase (<http://mirbase.org>) に報告されているマウスの microRNA 2110 個に関して網羅的遺伝子発現解析を詳細に行ない、学術論文を投稿するに至った。

既知の肝臓障害のバイオマーカーとなる miR-122 および miR-192 は、いずれも 70mg/kg の単回ばく露では、溶媒投与群と比較し、100 倍を超える遺伝子発現が誘導されたが、7mg/kg では全く誘導がなかった。これは、病理組織学的検査と生化学検査により、肝臓障害が 7mg/kg 投与では検出されなかったことと同様の結果を示しており、miR-122 および miR-192 は有用なバイオマーカーとなることを示している。さらに、miR-122 および miR-192 の他に 42 個の miRNA が、70mg/kg の単回ばく露では、溶媒投与群と比較し、2 倍以上の遺伝子発現を誘導することを明らかにした (図 1, 3)。

a) 7 mg/kg CCl4



b) 70 mg/kg CCl4

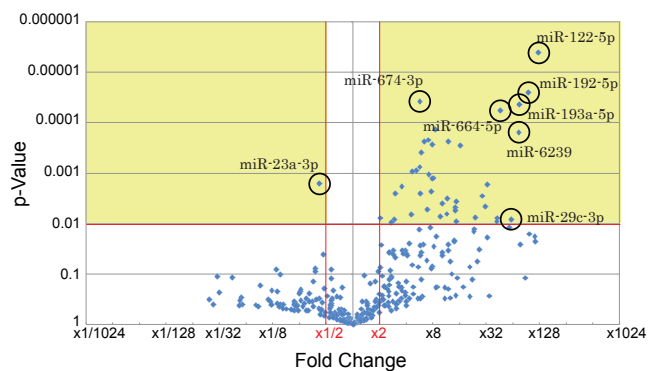


図1 四塩化炭素投与により誘導されるエクソソーム RNA の単離 (a)コーンオイル経口投与 (n = 12) および 7 mg / kg 四塩化炭素経口投与 (n = 3) のエクソソーム RNA 網

羅的遺伝子発現解析結果を表すボルケーノプロット。(b)コーンオイル経口投与 (n = 12) および 70 mg / kg 四塩化炭素経口投与 (n = 9) のエクソソーム RNA 網羅的遺伝子発現解析結果を表すボルケーノプロット。y 軸 (P 値) ベージュ色の領域のドットは、コーンオイル (コントロール) と CCl4 (7 mg / kg (a)、70 の間の発現に 2 倍以上の有意な変化 (P <= 0.01) を示す。

一例として、miR-423-5p や miR-29c-3p は、四塩化炭素投与 (70mg/kg) においては、エクソソーム RNA としての遺伝子発現が大きく亢進するが、溶媒投与群および病理学および生化学的に病変の起きていない四塩化炭素投与群 (7mg/kg) においては、遺伝子発現の亢進は誘導されていない (図 2)。

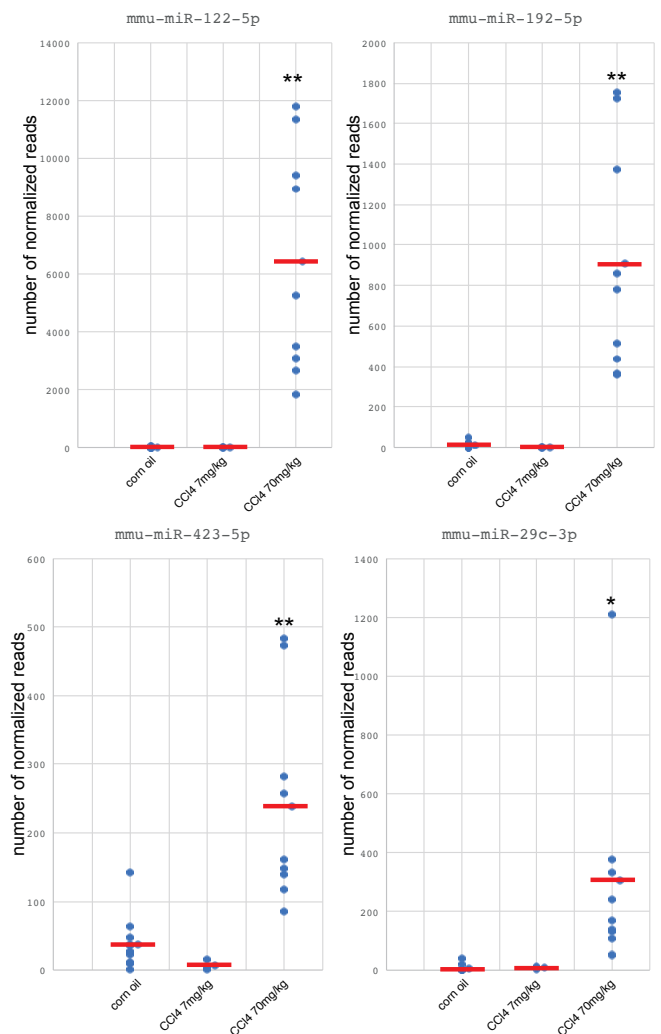


図2 4つの EV-associated miRNA (miR-122, miR-192, miR-423, miR-29c) の実際のシーケンスのリード数のプロット図。プロット上の赤いバーは、各サンプルの平均を表す。** P < 0.001, * P < 0.01 (コーンオイル投与群との比較)

miRNA	Fold change	P-value
mmu-miR-122-5p	124.3457982	4.10052E-06
mmu-miR-192-5p	95.40790089	2.52392E-05
mmu-miR-674-3p	5.706957637	3.73766E-05
mmu-miR-193a-5p	75.82387022	4.35667E-05
mmu-miR-192-3p	N.A.	4.80562E-05
mmu-miR-664-5p	45.71782006	5.85249E-05
mmu-miR-30d-5p	8.516113665	0.00013605
mmu-miR-6239	74.72199455	0.000155712
mmu-miR-1247-5p	N.A.	0.000174168
mmu-miR-28a-3p	7.083817232	0.000220674
mmu-miR-22-5p	11.76744086	0.000235333
mmu-miR-423-5p	6.388818576	0.000240415
mmu-miR-187-3p	N.A.	0.000252835
mmu-miR-130a-3p	7.862186383	0.000272001
mmu-miR-193a-3p	16.22203082	0.000282773
mmu-miR-210-3p	5.932110798	0.000387975
mmu-miR-1249-3p	5.668511989	0.000755986
mmu-miR-532-3p	5.228119523	0.000912155
mmu-miR-425-5p	4.768893321	0.000917652
mmu-miR-339-5p	7.229527922	0.00108171
mmu-miR-574-3p	8.261805959	0.001235294
mmu-miR-6240	7.923153144	0.001268117
mmu-miR-23a-3p	0.420764258	0.001636375
mmu-miR-874-3p	33.09392448	0.001684601
mmu-miR-21a-5p	3.546441934	0.001833359
mmu-miR-324-3p	7.69715977	0.0023448
mmu-miR-744-5p	3.003918983	0.002546474
mmu-miR-676-3p	5.767312941	0.002546729
mmu-miR-345-3p	28.52191857	0.002851029
mmu-miR-376b-3p	N.A.	0.003074675
mmu-miR-203b-5p	11.61612346	0.003215505
mmu-miR-21a-3p	14.70577286	0.003736011
mmu-miR-101b-3p	10.14888491	0.004098845
mmu-miR-183-5p	31.16821919	0.004545263
mmu-miR-455-5p	N.A.	0.004689289
mmu-miR-29a-3p	14.18293213	0.004851941
mmu-miR-330-3p	6.900663431	0.005282091
mmu-miR-362-3p	14.18493622	0.005383571
mmu-miR-378a-3p	11.52840894	0.006486874
mmu-miR-27b-3p	4.550345431	0.006635769
mmu-miR-30a-5p	9.760313913	0.007347957
mmu-miR-34a-5p	24.45306825	0.007460881
mmu-miR-125a-5p	2.042752023	0.007747797
mmu-miR-802-5p	42.76078307	0.00781044
mmu-miR-1843a-5p	N.A.	0.008113383
mmu-miR-29c-3p	61.4392178	0.008149335
mmu-miR-2137	2.958524964	0.008523622
mmu-miR-379-5p	14.77543169	0.009083035
mmu-let-7g-3p	42.35147351	0.00919447
mmu-miR-221-3p	2.714900374	0.009578552

図 3 四塩化炭素投与により誘導されるエクソソーム RNA のリスト (a)コーンオイル経口投与(n = 12)および 70 mg / kg 四塩化炭素経口投与(n = 9)のエクソソーム RNA 網羅的遺伝子発現解析結果より得られた発現に 2 倍以上の有意な変化 (P ≤ 0.01) があった EV-associated miRNA の発現量の変化 (Fold change) および有意差 (P-value) を示したリスト。

令和 2 年度においては、さらに、ここまで単離した miRNA バイオマーカーを利用したクラスタリングによって、実際に肝臓障害の有無を層別化することが可能であるのかを検証した。

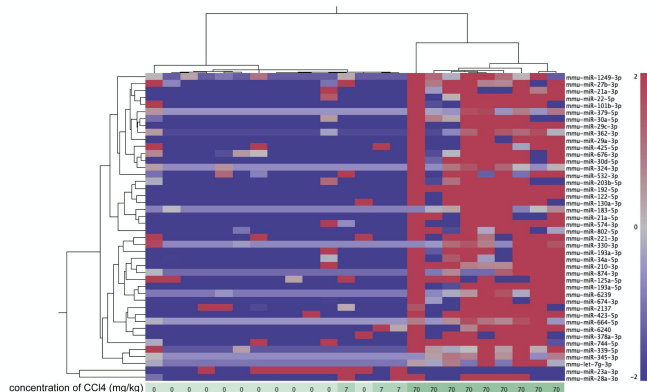


図 4 四塩化炭素投与により誘導されるエクソソーム中の miRNA を肝臓障害のバイオマーカーとして、コーンオイル経口投与(n = 12)、7 mg / kg 四塩化炭素経口投与(n = 3)、70 mg / kg 四塩化炭素経口投与(n = 9)の遺伝子発現解析結果のクラスタリングを行った。

その結果、肝臓障害の起こらないコーンオイル投与群および 7 mg / kg 四塩化炭素投与群は、肝臓障害の起こる 70 mg / kg 四塩化炭素投与群の間で、クラスタリングにより、層別化できることが明らかにできた。

D. 考察

最終年度である令和 2 年度研究では、四塩化炭素投与マウスを肝臓障害のモデルとして利用し、エクソソーム RNA をバイオマーカーとした次世代型毒性評価法の標準化プロトコルの作成に成功し、論文として報告するに至った (Ono R, et al., *Toxicology Reports* 2020)。

新たに開発した標準化プロトコルを利用することで、四塩化炭素による肝臓障害のバイオマーカーとして 42 個の新規 miRNA を報告した。このことから、本研究課題で作成した標準化プロトコルは非常に感度の高い系になっているといえる。

さらに、四塩化炭素による肝臓障害のバイオマーカーとして 1318 個の新規 エクソソーム small RNA を報告した。これらの small RNA は、バイオマーカーとして非常に感度が高く、現在までに用いられてきた miRNA よりも数が多く、より良いバイオマーカーであると言える。

これらのエクソソーム small RNA をバイオマーカーとして利用してクラスタリングを行うことで、肝臓障害の生じないコーンオイル投与群と 7 mg / kg 四塩化

炭素投与群と、肝臓障害を生じる 70 mg/kg 四塩化炭素投与群とに、層別化することが可能であることを明らかにした。

これらのエクソソーム解析の最適化プロトコールを利用することにより、ベンゾトリアゾール類 5 種類を第一群と第二群に層別化に成功し、毒性予測評価を可能にした、すなわち、血液 1 滴からの高感度かつ迅速な次世代型毒性評価法のプロトコールの確立に成功した。

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

E. 結論

本研究は、計画通りに進捗した。

初年度（平成 30 年度）研究で得られた化学物質投与実験およびエクソソーム RNA の網羅的遺伝子解析の至適条件の検証結果から、令和元年度に標準化プロトコールの作成に至った。

令和 2 年度には、この標準化プロトコールを論文として報告した (**Ono R.** et al., *Toxicology Reports* 2020)。この標準化プロトコールを利用することで、四塩化炭素ばく露による肝臓障害の新規バイオマーカーとして、エクソソーム中に含まれる miRNA を 42 個報告した (**Ono R.** et al., *Toxicology Reports* 2020)。

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

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

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

これらの結果より、エクソソーム RNA をバイオマーカーに用いた次世代型の安全性評価法は、微量血液で高感度かつ迅速な安全性評価を可能とすることから、動物愛護の 3R に資する評価系となることが期待される。

また、既存の安全性評価法と比較しても、短期、小規模動物試験で可能であり、高いスループット性を発揮するものであり、今後の化学物質の毒性データの集

積に大きく貢献すると考えられる。

F. 研究発表

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

1. 論文発表（抜粋）

(令和 2 年度)

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

* corresponding author

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

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

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

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

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

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

(令和元年度、平成 31 年度)

○* **Ono R.**, Yasuhiko Y., Aisaki K., Kitajima S., Kanno J. and **Hirabayashi Y.**

Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing

Communications Biology 2019, Feb 8;2:57. doi: 10.1038/s42003-019-0300-2. * corresponding author

Ryuichi Ono & Shihori Tanabe

The gene and microRNA networks of stem cells and reprogramming

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

Oka SI, Chin A, Park JY, Ikeda S, Mizushima W, Ralda G, Zhai P, Tong M, Byun J, Tang F, Einaga Y, Huang CY, Kashihara T, Zhao M, Nah J, Tian B, **Hirabayashi Y.** Yodoi J, Sadoshima J.

Thioredoxin-I maintains mitochondrial function via mTOR signaling in the heart.

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

Matsumoto M, Iso T, Igarashi T, Tanabe S, Inoue K, **Hirose A.**
Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances(V).
Bull. Natl Inst. Health Sci., 2019, 137, 66-72.

Igarashi, T., Takashima, H., Takabe, M., Suzuki, H., Ushida, K., Kawamura, T., Matsumoto, M. Iso T, Tanabe S, Inoue K, Ono A, Yamada T, **Hirose A.** Initial hazard assessment of benzyl salicylate: In vitro genotoxicity test and combined repeated-dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats.
Regul. Toxicol. Pharmacol., 100, 105-117, 2018.

Igarashi T, Serizawa H, Kobayashi K, Suzuki H, Matsumoto M, Iso T, Kawamura T, Inoue K, Ono A, Yamada T, **Hirose A.** Initial hazard assessment of 4-benzylphenol, a structural analog of bisphenol F: Genotoxicity tests in vitro and a 28-day repeated-dose toxicity study in rats.
Regul. Toxicol. Pharmacol., 96, 64-75, 2018.

Yamada, T., Tanaka, Y., Hasegawa, R., Igarashi, T., **Hirose, A.**
Male-specific prolongation of prothombin time by industrial chemicals,
Fundam. Toxicol. Sci., 5, 75-82, 2018.

Matsumoto, M., Furukawa, M., Kobayashi, K, Iso, T., Igarashi, T., Yamada, T., **Hirose, A.**
A 28-day repeated oral-dose toxicity study of insecticide synergist N-(2-ethyl-hexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2.2.2]oct-5-ene-2,3-dicarboximide in rats,
Fundam. Toxicol. Sci., 5, 1-11, 2018.

Akazawa Y, Mizuno S, Fujinami N, Suzuki T, Yoshioka Y, **Ochiya T.**, Nakamoto Y, Nakatsura T.
Usefulness of serum microRNA as a predictive marker of recurrence and prognosis in biliary tract cancer after radical surgery
Scientific Reports, 2019 Apr 11;9(1):5925. doi: 10.1038/s41598-019-42392-7.

Kikuchi S, Yoshioka Y, Prieto-Vila M, **Ochiya T.**
Involvement of Extracellular Vesicles in Vascular-Related Functions in Cancer Progression and Metastasis
Int J Mol Sci. 2019 May 26;20(10):2584. doi: 10.3390/ijms20102584.

Yoshioka Y, Katsuda T, **Ochiya T.**
Extracellular vesicles and encapsulated miRNAs as emerging cancer biomarkers for novel liquid biopsy.
Jpn J Clin Oncol. 48(10):869-876. 2018. Review.

Matsuzaki J, **Ochiya T.**
Extracellular microRNAs and oxidative stress in liver injury: a systematic mini review.
J Clin Biochem Nutr. Jul;63(1):6-11. doi: 10.3164/jcfn.17-123. 2018 Review.

Otsuka K, Yamamoto Y, **Ochiya T.**
Regulatory role of resveratrol, a microRNA-controlling compound, in HNRNP1 expression, which is associated with poor prognosis in breast cancer.
Oncotarget. 15;9(37):24718-24730. 2018

Sanchez Calle A, Kawamura Y, Yamamoto Y, Takeshita F, **Ochiya T.**
Emerging roles of long non-coding RNA in cancer.
Cancer Sci. Jul;109(7):2093-2100. doi: 10.1111/cas.13642. Epub 2018 Review.

Miyazaki H, Takahashi RU, Prieto-Vila M, Kawamura Y, Kondo S, Shirota T, **Ochiya T.**
CD44 exerts a functional role during EMT induction in cisplatin-resistant head and neck cancer cells.
Oncotarget. 2018

2. 学会発表（抜粋）

（令和2年度）

○**小野竜一**
EV-mediated horizontal gene transfer
第43回日本分子生物学会学術年会（2020.12.2.）
（招待講演）

小野竜一
A novel risk for genome editing
南米毒性学会学術年会 2020（2020.11.19.）
（招待講演）

○**小野竜一**
エクソソーム中の miRNA をバイオマーカーとした毒性評価法の開発
第7回日本細胞外小胞学会学術年会（2020.10.26.）

小野竜一
哺乳類のレトロトランスポゾン研究から解き明かす多様な生命機能
第92回日本遺伝学会学術年会（2020.9.17.）
（招待講演）

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

○**小野竜一**
エクソソーム中の miRNA をバイオマーカーとしたリキッドバイオプシー
第47回日本毒性学会学術年会（2020.7.1.）
（招待講演）

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

(招待講演)

小野竜一

ゲノム編集におけるオンターゲットリスクと遺伝子水平伝搬

第47回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29.)

(シンポジウムオーガナイザー)

(令和元年度、平成31年度)

小野竜一、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純

Pericellome プロジェクトから見えてきたエピジェネティクス影響

第46回日本毒性学会学術年会 (2019.7.19.)

○ Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Takahiro Ochiya, Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayashi

Evaluation of exosomes as toxic biomarkers in mouse
15th International Congress of Toxicology (ICTXV)
(2019.7.16-18.), Hawaii, USA

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

Molecular Basis of the 'Baseline Response' and 'Transient Response' Observed in the Newly Designed Repeated Dose Study: Epigenetic Modifications
Gordon Research Conference (2019.8.11-16.), MA, USA

○ Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Yoko Hirabayashi

Exosome-mediated horizontal gene transfer: a possible new risk for genome editing
55th Congress of the European Societies of Toxicology
(2019.9.8-11.) Helsinki, Finland

○ 小野竜一

Exosome-mediated horizontal gene transfer: a possible new risk for genome editing
第78回 日本癌学会学術総会
(2019.9.26-28.) 京都国際会館 (招待講演)

○ 小野竜一

EV を介した遺伝子水平伝搬によるゲノム進化の可能性
第6回日本細胞外小胞学会学術集会
(2019.10.24-25.) 国立がん研究センター研究所
(招待講演)

○ Ryuichi Ono

Extracellular vesicles-mediated horizontal gene transfer: a possible new risk for genome editing
第1回アジア環太平洋細胞外小胞学会学術集会
(2019.11.24-25.) 国立がん研究センター研究所
(招待講演)

○ Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Yoko Hirabayashi

Horizontal gene transfer mediated by exosomes: a possible

new risk for genome editing

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

○ Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Takahiro Ochiya, Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayashi

Evaluation of extracellular vesicles (EVs) as toxic biomarkers in mouse
59th Annual Meeting of Society of Toxicology (March 2020, Anahaim, USA)

大野 彰子, 山田 隆志, 広瀬 明彦

データベースを活用した神経毒性の in silico 予測手法の開発
第46回日本毒性学会学術年会 (2019年6月徳島)

磯 貴子, 松本 真理子, 鈴木 洋, 川村 智子, 山田 隆志, 井上 薫, 杉山 圭一, 森田 健, 本間 正充, 広瀬 明彦

食品用器具・容器包装材料のポジティブリスト化に向けた安全性評価: 脂肪酸類のグループ評価.
第46回日本毒性学会学術年会 (2019年6月徳島)

五十嵐 智女, 鈴木 洋, 牛田 和夫, 松本 真理子, 井上 薫, 広瀬 明彦

化審法既存化学物質のスクリーニング評価における1,4-ジクロロブタンの有害性評価.
第46回日本毒性学会学術大会 (2019年6月徳島)

田邊思帆里, 青柳一彦, Sabina Quader, Horacio Cabral,

小野竜一, 広瀬明彦, 横崎 宏, 佐々木博己
がん及び幹細胞における Wnt/beta-catenin シグナルパスウェイ
日本薬学会第140年会 2020.3.28

田邊思帆里, 青柳一彦, Sabina Quader, Horacio Cabral,

小野竜一, 広瀬明彦, 横崎 宏, 佐々木博己
がん関連 Wnt/beta-catenin シグナルパスウェイに関する有害性発現経路 (Adverse Outcome Pathway; AOP) の開発
第93回日本薬理学会年会 (2020.3.16-18)

田邊思帆里, 青柳一彦, Sabina Quader, Horacio Cabral,

小野竜一, 広瀬明彦, 横崎 宏, 佐々木博己
骨髄由来間葉系幹細胞及び胃がんにおける上皮間葉転換関連分子パスウェイ及びがん幹細胞ネットワーク
第19回日本再生医療学会総会 (2020.3.12-14)

田邊思帆里, 青柳一彦, Sabina Quader, 小野竜一, 広瀬明彦, 横崎 宏, 佐々木博己

The Wnt/beta-catenin signaling pathway and its relation to cancer and stem cells
第2回医薬品毒性機序研究会 2020.1.23&24

田邊思帆里, Sabina Quader, 小野竜一, 青柳一彦, 広瀬明彦, 横崎 宏, 佐々木博己

胃がん及び幹細胞における上皮間葉転換関連ネットワークパスウェイ

第 78 回日本癌学会学術総会 2019.9.27

Shihori Tanabe, Sabina Quader, **Ryuichi Ono**, Kazuhiko Aoyagi, **Akihiko Hirose**, Hiroshi Yokozaki, Hiroki Sasaki
MOLECULAR NETWORK PATHWAY MECHANISM
IN DRUG RESISTANCE, CANCER AND STEM CELLS
ISSCR (International Society for Stem Cell Research)
2019 Annual Meeting 2019.6.28

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