

2 別添 3

# I. 総括研究報告書



## (H30-化学-一般-002) 総括研究報告書

血液中の核酸をバイオマーカーに用いた化学物質の高感度な有害性評価に資する研究

研究代表者 小野 竜一

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・第五室・室長

### 研究要旨

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

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

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

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

そこで、化学物質等による有害事象に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。

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42個単離したことを報告するに至った (Ono R. et al., *Toxicology Reports* 2020)。

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

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

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

各種化学物質の毒性データが集積されることに伴い、これらを利用した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。

## 研究分担者

- 平林容子 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
センター長
- 広瀬明彦 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
安全性予測評価部・部長
- 落谷孝広 東京医科大学  
医学総合研究所  
分子細胞治療研究部門・教授

## 研究協力者

- 北嶋聡 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
毒性部・部長
- 相崎健一 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
毒性部・第一室長
- 栗形麻樹子 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
毒性部・第二室長
- 高橋祐次 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
毒性部・動物管理室長
- 吉岡祐亮 東京医科大学  
医学総合研究所  
分子細胞治療研究部門・講師
- 山田隆志 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
安全性予測評価部・第四室長
- 田邊思帆里 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
安全性予測評価部・主任研究官
- 立原江利加 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
毒性部
- 内山美希 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
毒性部
- 古川祐介 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
毒性部

## 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きない用量を設定し、その後の解析を行なう。

これらのベンゾトリアゾール類 5 種類の化学物質を CAS 番号、もしくは Benzo0000 (0000 は、各ベンゾトリアゾールの CAS 番号の最初の 4 桁)と省略する場合がある。

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

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

#### ・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

GACAGGGCTGGAGTGTGACAATGGTGTTTG,

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。

#### ・病理組織学検査：

エクソソーム RNA の解析のために採血を行ったマウス個体より、肝臓および腎臓の採取を行い、10% neutral buffered formalin で組織の固定を行う。その後、パラフィンブロックを作成し、薄切を行い、hematoxylin and eosin (H&E) 染色を行い、病理組織学的検査結果とエクソソーム RNA の解析の結果の比較を行い、エクソソーム RNA をバイオマーカーとした次世代有害性評価法の有効性を検証する。

#### ・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。

#### ・次世代有害性評価系の政策提言に向けた化学物質の有害性予測の向上のためのカテゴリーアプローチ：

本研究課題においては、国立医薬品食品衛生研究所・毒性部および安全性予測評価部において毒性試験および各種臓器での網羅的遺伝子発現解析を行ったベンゾトリアゾール類を対象とした。これらの化学構造は側鎖の違いなどによりその毒性の強さや発現する臓器に違いがあることから、毒性バイオマーカーをカテゴリーアプローチに適応するのに適した化学物質である。これらのベンゾトリアゾール類のばく露におけるエクソソーム RNA を明らかにすることで、ベンゾトリアゾール構造を持った化学物質のばく露により共通して誘導されるシグナルパスウェイのバイオマーカーなどの同定が可能となる。

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

また、ベンゾトリアゾール類 5 種類のエクソソーム RNA バイオマーカーおよびベンゾトリアゾール類の毒性情報を比較・解析することで、エクソソーム RNA を毒性バイオマーカーとしたカテゴリーアプローチが可能となるのかの検証を行うことが可能となる。

### (倫理面への配慮)

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

## C. 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 : ベンゾトリアゾール類 4 種類の投与実験 (小野) :

平成30年度においては、化学物質投与の際の溶媒となりうるコーンオイル、メチルセルロース、また、肝臓障害のコントロール物質として四塩化炭素 (7mg/kg, 70mg/kg)、およびベンゾトリアゾール類 1 種 (2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phenol

(CAS#3846-71-7) (1000mg/kg) の投与実験を行った。

令和元年度研究においては、4 種類のベンゾトリアゾール類

2,4-di-tert-butyl-6-(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)phenol (CAS#3864-99-1) 、 2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-phenylpropan-2-yl)phenol (CAS#70321-86-7) 、 2-(benzotriazol-2-yl)-4-methylphenol (CAS#2440-22-4)、 2-(benzotriazol-2-yl)-4-(2,4,4-trimethylpentan-2-yl)phenol (CAS#3147-75-9) を高用量 (1000mg/kg)、中用量 (300mg/kg)、低容量(100mg/kg)の3用量での投与実験を行った。これらの投与実験は、10:00 AM に単回投与し、2 時間、4 時間、8 時間、24 時間後にイソフルラン麻酔下において左心房より血液を採取した。2 時間、4 時間後の採血は、高用量群のみ行なった。これらの投与動物において、肉眼所見においては、肝臓障害などは起きていなかった。

### C-3 : 病理組織学検査と生化学検査 (平林) :

平成30年度、令和元年度、令和2年度研究において、各種化学物質および溶媒のマウスへの投与、採血実験を行った個体の一部において、肝臓、腎臓のホルマリン固定を行ない、hematoxylin and eosin (H&E) 染色を行い、病理組織学検査を行った。また、一部においては、血液生化学検査も行った。

#### C-3-1 : 四塩化炭素投与

溶媒投与群 (図 1a) および四塩化炭素投与群 (7mg/kg) (図 1b) の H&E 染色像においては、正常な組織形態を示した (図 1a、b)。

a) corn oil

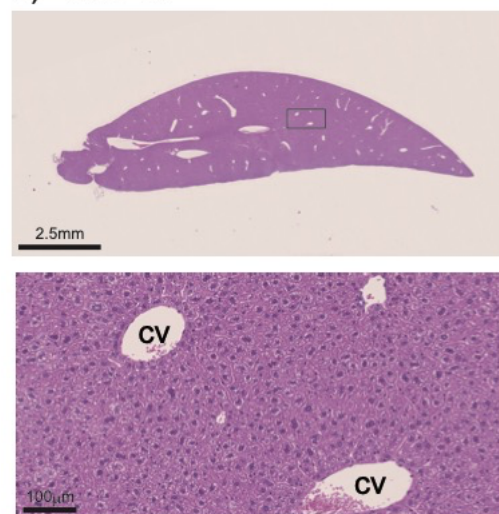


図 1 a) 四塩化炭素の溶媒コントロールとして、コーンオ

イルを投与し、24時間後のマウスの肝臓における H&E 染色像。上の写真の四角部分を下の写真で拡大している。中心静脈(cv)と周囲の肝細胞は正常な組織構造を示している。CV: 中央静脈

b) CCl<sub>4</sub> (7mg/kg)

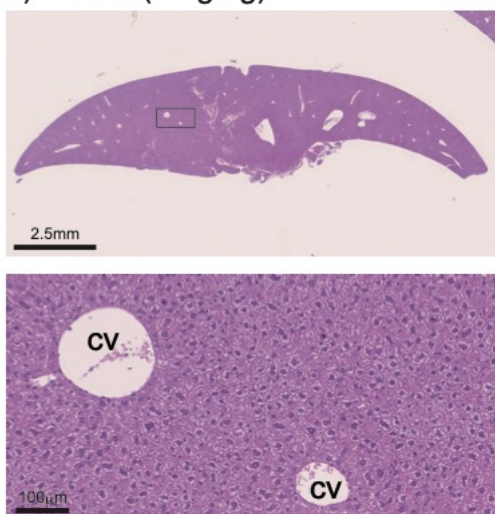


図 1 b) 四塩化炭素(7mg/kg)を投与し、24時間後のマウスの肝臓における H&E 染色像。上の写真の四角部分を下の写真で拡大している。中心静脈(cv)と周囲の肝細胞は正常な組織構造を示している。CV: 中央静脈

一方、四塩化炭素投与群 (70 mg / kg) の H&E 染色像では、四塩化炭素によって誘発された肝臓の組織病理学的変化が見られた (図 1c)。中心静脈周囲の肝細胞が空胞化し、ネクローシスを起こしている。

c) CCl<sub>4</sub> (70mg/kg)

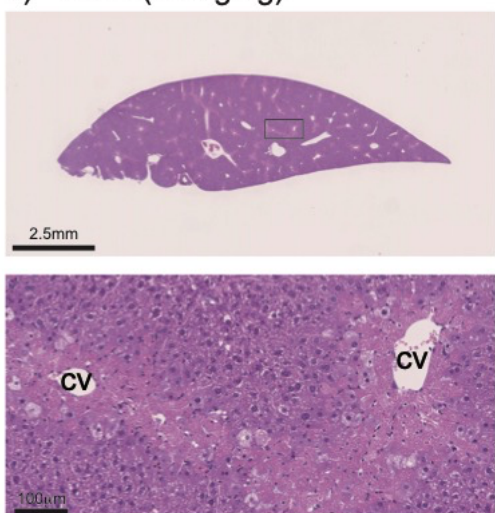


図 1 c) 四塩化炭素(70mg/kg)を投与し、24時間後のマウスの肝臓における H&E 染色像。上の写真の四角部分を下の写真で拡大している。中心静脈(cv)周囲の肝細胞が空胞化し、ネクローシスを起こしている。CV: 中央静脈

また、エクソソーム RNA を毒性指標としたバイオマ

ーカーのバリデーションの一つとして、病理組織学検査に加えて、血清生化学検査を行った。

肝毒性の最も一般的に使用される診断テストでは、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST または SGOT) やアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT または SGPT) など、特定の肝細胞酵素の血中活性を測定する。AST は細胞の損傷に比例して血清に放出され、細胞壊死の急性期に最も上昇するが、ALT の放出は肝臓の損傷の初期に発生し、比較的長期間上昇したままになる。

ALT (図 1d) と AST (図 1e) の血中活性レベルは溶媒投与群と比較して四塩化炭素投与群 (7 mg / kg) では増加しなかったが、溶媒投与群のそれらと比較して 70 mg / kg CCl<sub>4</sub> 増加した。

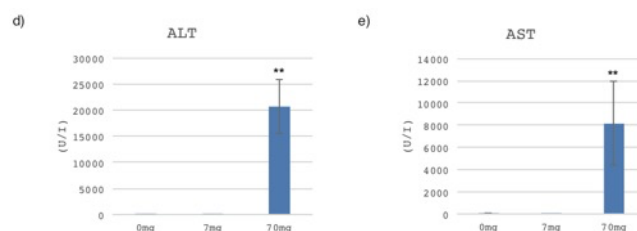


図 1d, e) 0 mg/kg、7 mg / kg、70 mg / kg の四塩化炭素を経口投与したマウスの血清中の ALT (d) および AST (e) を表している。

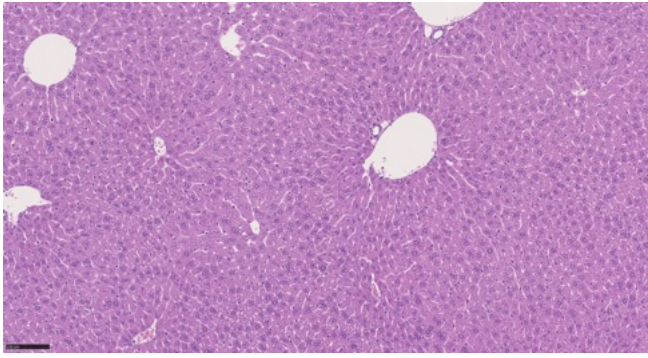
結果として、CCl<sub>4</sub> 投与の結果の血清生化学分析および組織学は、70 mg / kg の CCl<sub>4</sub> 投与のみが明らかな肝毒性を持つ。

### C-3-2 : ベンゾトリアゾール (CAS#3846-71-7) 投与

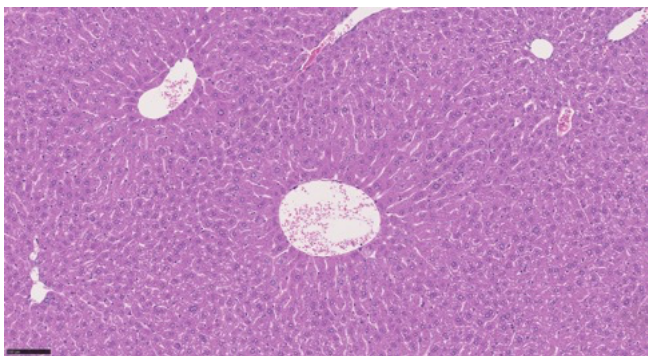
ベンゾトリアゾール (CAS#3846-71-7) 投与群 (1000 mg / kg) の H&E 染色像では、ベンゾトリアゾール (CAS#3846-71-7) によって誘発された肝臓の組織病理学的変化が見られた (図 2a, b, c, d)。投与後 8 時間後においては、明確な変化はないが、投与後 24 時間後では、中心静脈周囲の肝細胞の細胞質が膨大化し、hypertrophy を起こしている (図 2a, b)。投与後 96 時間後には、中心静脈周囲の肝細胞の細胞質が膨大化している細胞がさらに増えており、hypertrophy の領域が広がっている (図 2c)。また、Mitosis 細胞の増加が見られた (図 2c)。投与後 168 時間後には、ほぼ全ての肝細胞の細胞質が膨大化している hypertrophy となっている。また、Mitosis 細胞の増加がさらに見られた (図 2d)。



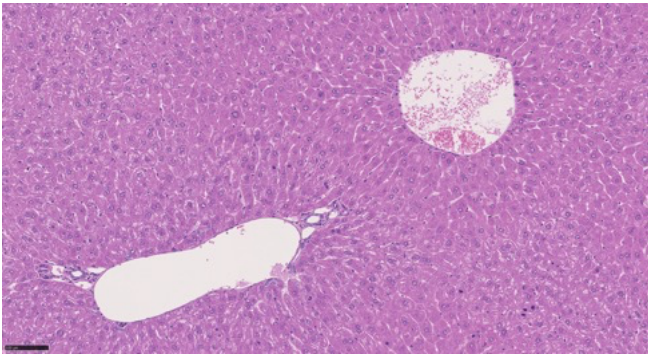
a) ベンゾトリアゾール (CAS#3846-71-7) 投与後 8時間後の肝臓の H & E 染色像



b) ベンゾトリアゾール (CAS#3846-71-7) 投与後 24 時間後の肝臓の H & E 染色像



c) ベンゾトリアゾール (CAS#3846-71-7) 投与後 96 時間後の肝臓の H & E 染色像



d) ベンゾトリアゾール (CAS#3846-71-7) 投与後 168 時間後の肝臓の H & E 染色像



ここで確認された hypertrophy は、肝臓重量の増加という表現型と一致している (図 3, 4)。一方、四塩化炭素 (70mg/kg) を投与後 24 時間のマウスの肝臓で見られた肝細胞のネクロシス像は全く見られなかった。このことから、ベンゾトリアゾール (CAS#3846-71-7) の投与で見られた肝臓重量の増加は、肝細胞の hypertrophy により生じていると結論できる。

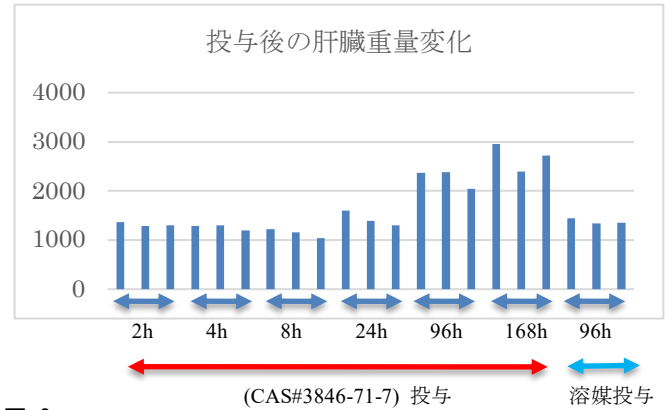


図 3

2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phenol (CAS:3846-71-7) を 1000g/Kg で経口投与を行い、2、4、8、24、96、168 時間後における肝臓重量 (mg) をグラフ化

	2時間後	4時間後	8時間後	24時間後	96時間後	168時間後
肝臓重量	変化なし	変化なし	変化なし	+	++	+++
hypertrophy	変化なし	変化なし	変化なし	+	++	+++
Mitosis 細胞	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし	+	++

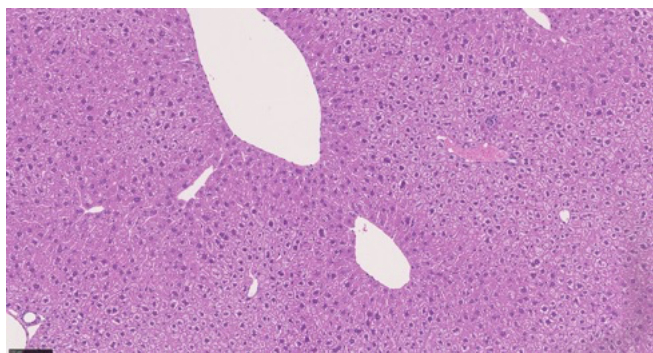
図 4

2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phenol (CAS:3846-71-7) を 1000g/Kg で経口投与を行い、2、4、8、24、96、168 時間後における肝臓重量 (mg) および肝臓の H & E 染色像をまとめた表

C-3-3 : ベンゾトリアゾール (CAS#2440-22-4) 投与

ベンゾトリアゾール (CAS#2440-22-4) 投与群 (1000 mg / kg) の H&E 染色像では、ベンゾトリアゾール (CAS#2440-22-4) によって誘発された肝臓の組織病理学的変化が見られた (図 5)。門脈周囲の肝細胞が空胞化を起している。

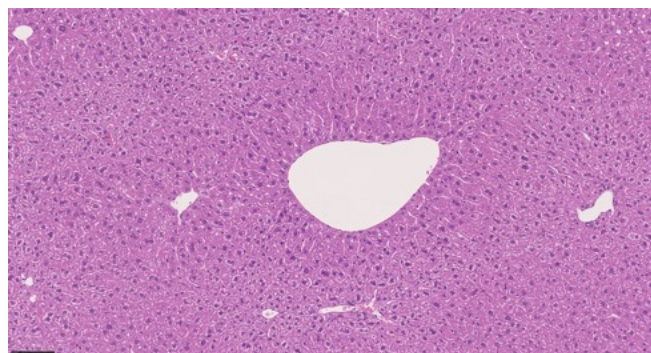
図 5 ベンゾトリアゾール (CAS#2440-22-4) 投与後 24 時間後の肝臓の H & E 染色像



C-3-5 : ベンゾトリアゾール (CAS#70321-86-7) 投与

ベンゾトリアゾール (CAS#70321-86-7) 投与群 (1000 mg / kg) の H&E 染色像では、ベンゾトリアゾール (CAS#70321-86-7) によって誘発された肝臓の組織病理学的変化が見られなかった (図 7)。

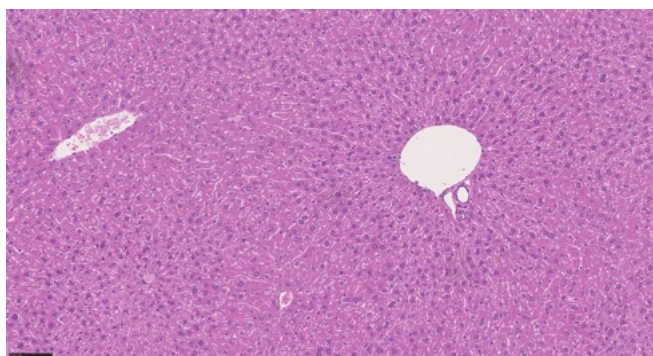
図 7 ベンゾトリアゾール (CAS#70321-86-7)投与後 24 時間後の肝臓の H & E 染色像



C-3-4 : ベンゾトリアゾール (CAS#3864-99-1) 投与

ベンゾトリアゾール (CAS#3864-99-1) 投与群 (1000 mg / kg) の H&E 染色像では、ベンゾトリアゾール (CAS#3864-99-1) によって誘発された肝臓の組織病理学的変化が見られなかった (図 6)。

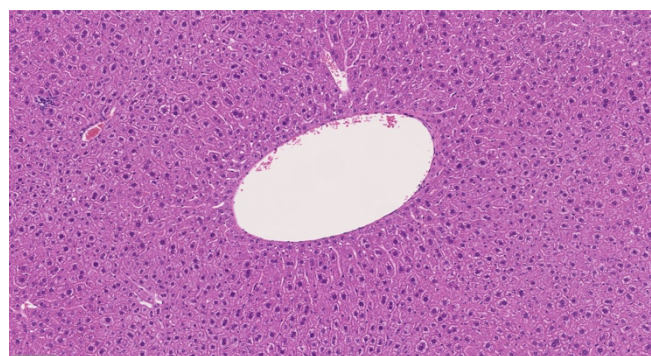
図 6 ベンゾトリアゾール (CAS#3864-99-1)投与後 24 時間後の肝臓の H & E 染色像



C-3-6 : ベンゾトリアゾール (CAS#3147-75-9) 投与

ベンゾトリアゾール (CAS#3147-75-9) 投与群 (1000 mg / kg) の H&E 染色像では、ベンゾトリアゾール (CAS#3147-75-9) によって誘発された肝臓の組織病理学的変化が見られなかった (図 8)。

図 8 ベンゾトリアゾール (CAS#3147-75-9)投与後 24 時間後の肝臓の H & E 染色像



C-3-6 : ベンゾトリアゾール 類5種類の投与後24時間後の肝臓の病理所見のまとめ

ベンゾトリアゾール類4種類（1000 mg / kg）の投与後24時間後の肝臓における H&E 染色像では、(2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phenol) (CAS#3846-71-7)において、肝臓の hypertrophy および Mitosis 細胞の増加が見られたが、他の4種類においては同様の病理所見は見られなかった。ベンゾトリアゾール (CAS#2440-22-4) においては、肝細胞の空胞化が見られる一方、残り3種類に関してはベンゾトリアゾール類によって誘発された肝臓の病理組織学的変化が見られなかった (図 9)。

図 9 ベンゾトリアゾール投与による肝臓における病理組織所見のまとめ

CAS	3846-71-7	2440-22-4	3864-99-1	70321-86-7	3147-75-9
Name	2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phenol	2-(benzotriazol-2-yl)-4-methylphenol	2,4-di-tert-butyl-6-(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)phenol	2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-phenylpropan-2-yl)phenol	2-(benzotriazol-2-yl)-4-(2,4,4-trimethylpentan-2-yl)phenol
肝臓重量	+	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし
hypertrophy	+	-	-	-	-
Mitosis 細胞	+	-	-	-	-
細胞の空胞化	-	+	-	-	-

C-4 : 四塩化炭素ばく露およびベンゾトリアゾール類ばく露に特異的なバイオマーカーの探索 (小野、落谷) :

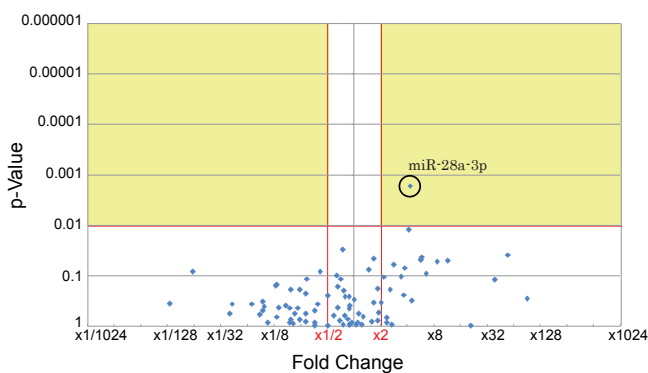
C-4-1 : 四塩化炭素ばく露に特異的なバイオマーカーの探索 :

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

令和元年度は、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、学术论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 10, 12)。

a) 7 mg/kg CCl4



b) 70 mg/kg CCl4

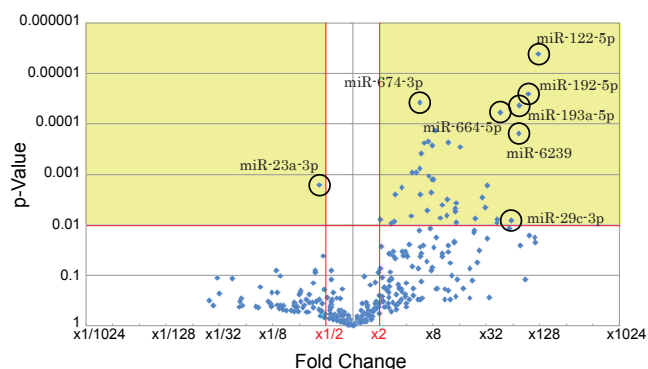


図 10 四塩化炭素投与により誘導されるエクソソーム RNA の単離 (a)コーンオイル経口投与 (n = 12) および 7 mg / kg 四塩化炭素経口投与 (n = 3) のエクソソーム RNA 網羅的遺伝子発現解析結果を表すボルケーノプロット。(b)コーンオイル経口投与 (n = 12) および 70 mg / kg 四塩化炭素経口投与 (n = 9) のエクソソーム RNA 網羅的遺伝子発現解析結果を表すボルケーノプロット。y 軸(P 値)

ページ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の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 10)。

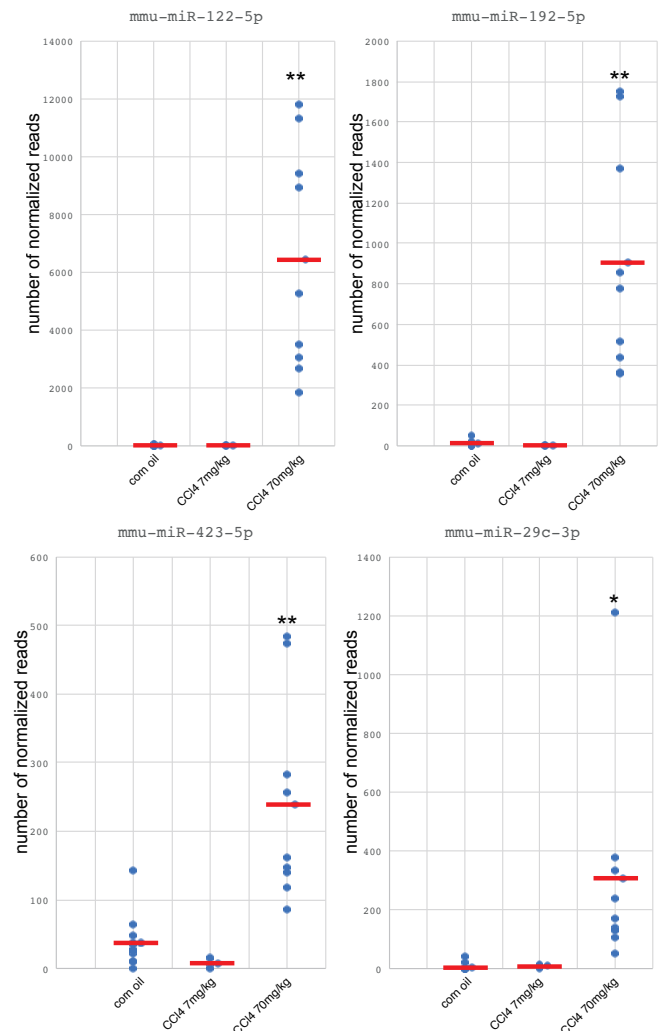


図 11 4 つの EV-associated miRNA (miR-122, miR-192, miR-423, miR-29c) の実際のシーケンスのリード数のプロット図。プロット上の赤いバーは、各サンプルの平均を表す。\*\* P < 0.001, \* P < 0.01 (コーンオイル投与群との比較)

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 12 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。

### C-4-2 : ベンゾトリアゾール類ばく露に特異的なバイオマーカーの探索 :

令和元年度においては、さらに、ベンゾトリアゾール類 5 種類の単回投与実験を行なったマウスのエクソソーム RNA の遺伝子発現の比較解析を行なった。

C-4-1 では、既知の miRNA のみを研究対象にしていたが、本項では、次世代シーケンスで検出されるすべての small RNA を解析対象とした。

四塩化炭素投与群、ベンゾトリアゾール類 4 種類の投与群、溶媒投与群のエクソソーム RNA の遺伝子発現の比較解析を行うことで、四塩化炭素ばく露のみで誘導される新たな small RNA や、各種ベンゾトリアゾールばく露に特異的な small RNA の単離に成功した。

- ・四塩化炭素ばく露のみで誘導される新たな small RNA

既知の肝臓障害のバイオマーカーである miR-122 および miR-192 は、図 13 のように、ベンゾトリアゾール類のばく露においては、発現誘導がされなかった。

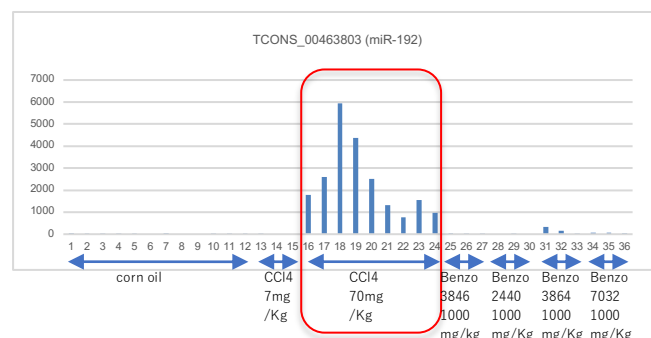
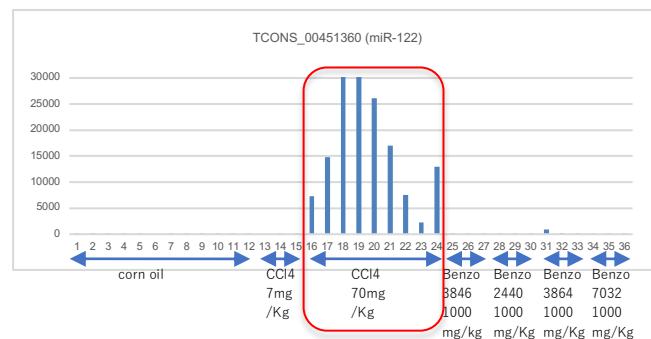


図 13 コーンオイル、四塩化炭素 (7mg/Kg、70mg/Kg)、ベンゾトリアゾール 4 種類 (ベンゾトリアゾール (CAS:3846)、ベンゾトリアゾール (CAS:2440)、ベンゾトリアゾール (CAS:3864)、ベンゾトリアゾール (CAS:7032))、ばく露後 24 時間後における既知の肝臓障害バイオマーカーである miR-122 および miR-192 の発現変化。

しかし、我々が報告した新規の肝臓障害バイオマーカーである miR-29c は、ベンゾトリアゾール (CAS#7032) においても発現誘導が確認された (図 14)。

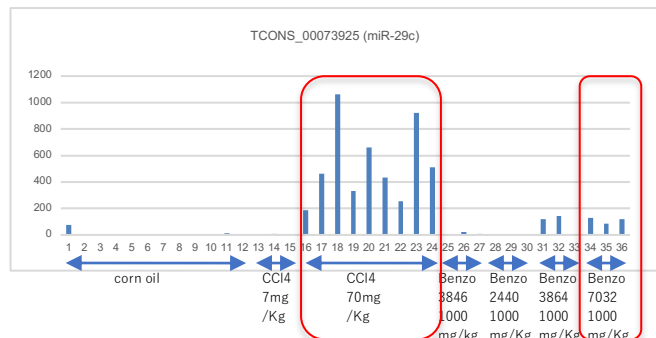


図 14 コーンオイル、四塩化炭素 (7mg/Kg、70mg/Kg)、ベンゾトリアゾール4種類のみばく露後24時間後における新規の肝臓障害バイオマーカーである miR-29c の発現変化。

解析対象を既知の miRNA から、small RNA にすることで、miR-122 や miR192 と同様の挙動を示す small RNA の単離にも成功している (図 15)。

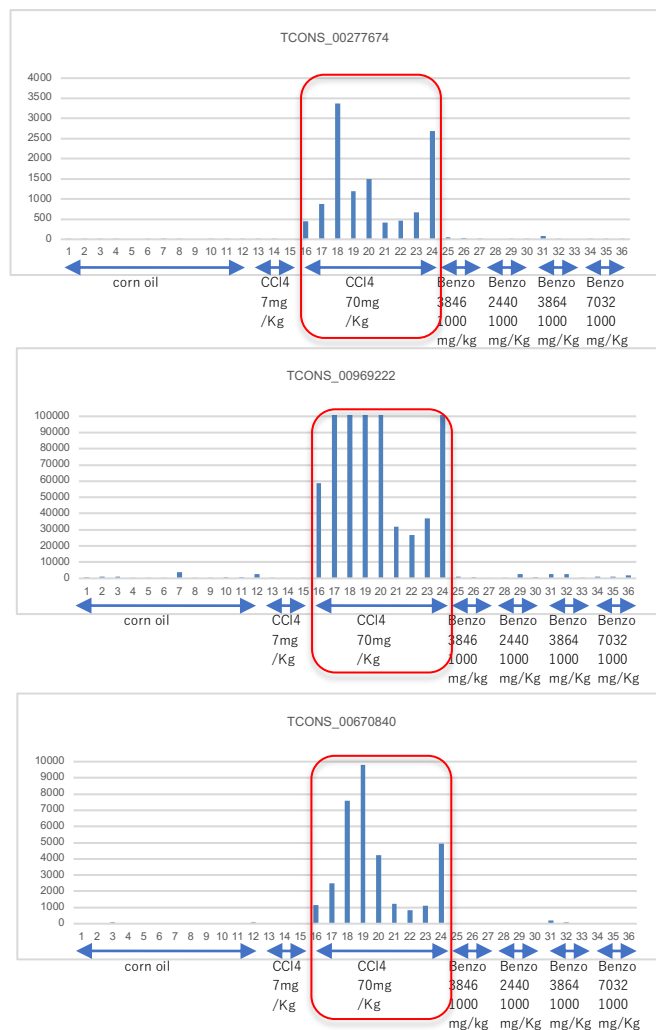


図 15 コーンオイル、四塩化炭素 (7mg/Kg、70mg/Kg)、ベンゾトリアゾール4種類のみばく露後24時間後における四塩化炭素 (70mg/kg) に特異的に発現誘導される新

規 small RNA。

ここで示す様な新規 small RNA の多くは通常のマイクロ RNA 同様にヘアピン構造が予測されるので、これらは新規マイクロ RNA である可能性が高い (図 16)。

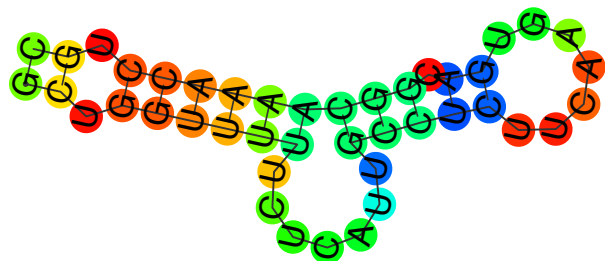


図 16 四塩化炭素ばく露でのみ誘導される新規 small RNA の RNA の二次構造を予測させた一例。ヘアピン構造をとることから、新規の microRNA と考えられる。

・ベンゾトリアゾール類ばく露のみで誘導される新たな small RNA

さらに、ベンゾトリアゾール類に特異的に誘導されるバイオマーカーのスクリーニングを行なった結果、ベンゾトリアゾール1種類のみばく露によって誘導されるバイオマーカーおよび複数のベンゾトリアゾール類に共通して誘導されるバイオマーカーの検出にも成功した。化学物質の類似した分子構造を認識してエクソソーム RNA が血中に放出されている可能性も考えられる (図 17, 18, 19, 20)。

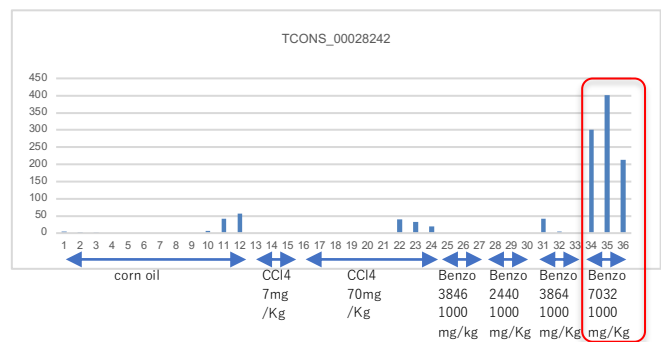


図 17 コーンオイル、四塩化炭素 (7mg/Kg、70mg/Kg)、ベンゾトリアゾール4種類のみばく露後24時間後においてベンゾチリアゾール1種類 (CAS#70321-86-7) に特異的に発現誘導される新規 small RNA (赤線四角部分)。

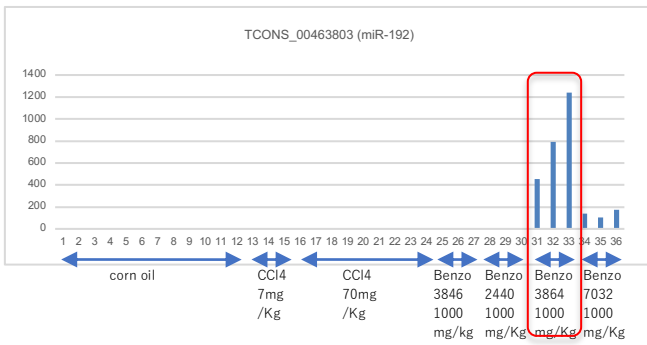


図 18 コーンオイル、四塩化炭素 (7mg/Kg、70mg/Kg)、ベンゾトリアゾール4種類のみ曝後24時間後においてベンゾチリアゾール1種類 (CAS#3864-99-1) に特異的に発現誘導される新規 small RNA (赤線四角部分)。

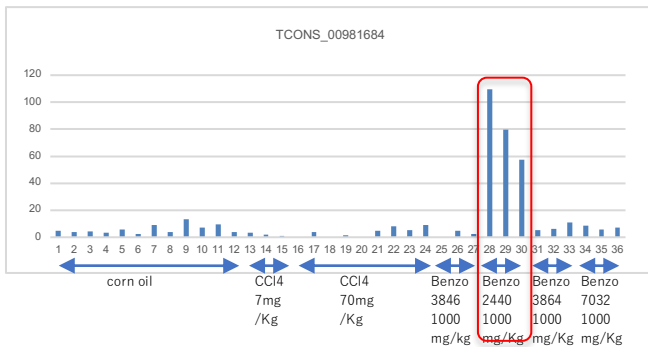


図 19 コーンオイル、四塩化炭素 (7mg/Kg、70mg/Kg)、ベンゾトリアゾール4種類のみ曝後24時間後においてベンゾチリアゾール1種類 (CAS#2440-22-4) に特異的に発現誘導される新規 small RNA (赤線四角部分)。

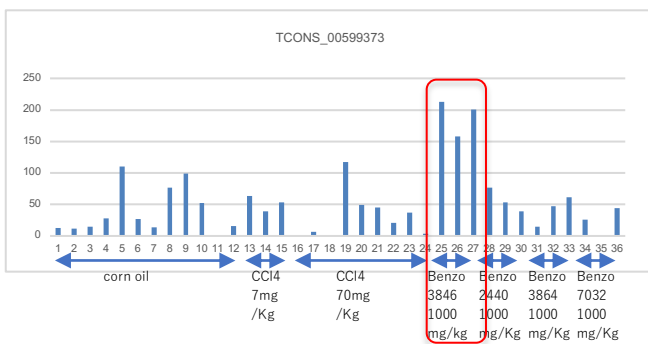


図 20 コーンオイル、四塩化炭素 (7mg/Kg、70mg/Kg)、ベンゾトリアゾール4種類のみ曝後24時間後においてベンゾチリアゾール1種類 (CAS#3864-71-7) に特異的に発現誘導される新規 small RNA (赤線四角部分)。

令和元年度に解析を行った4種類のベンゾトリアゾールに関しては、それぞれに特異的な small RNA が多く存在する。

また、ベンゾトリアゾール類の一部に共通する small RNA も存在する (図 21)。

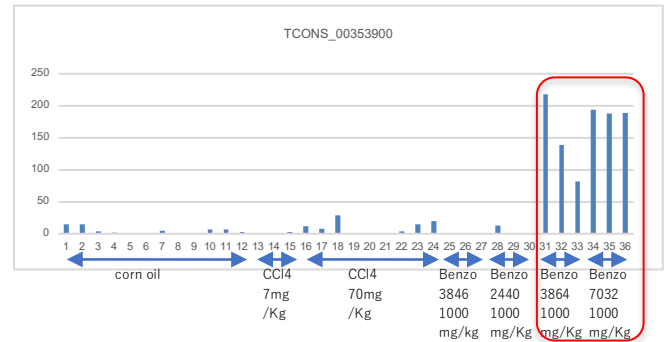
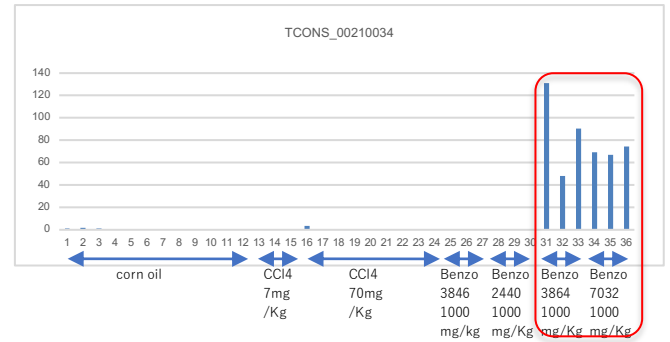


図 21 ベンゾトリアゾール類2種類のみ曝に共通して誘導される新規 small RNA の一例

コーンオイル、四塩化炭素 (7mg/Kg、70mg/Kg)、ベンゾトリアゾール4種類のみ曝後24時間後においてベンゾチリアゾール2種類 (CAS#3864-99-1 および CAS#70321-86-7) に特異的に発現誘導される新規 small RNA (赤線四角部分)。

令和2年度においては、四塩化炭素のみ曝により誘導されるエクソソーム中の small RNA の網羅的単離を行なった。その結果、1318個の新規バイオマーカー候補の単離に至った。これらの small RNA は、図14に例がある様に、非常に高感度な四塩化炭素のみ曝によるバイオマーカーとなっている。

さらに、ベンゾトリアゾール(CAS#3147-75-9)の単回投与実験を行なったマウスのエクソソーム RNA の遺伝子発現の比較解析を行なった。

その結果、総計477個の small RNA がベンゾトリアゾール類に特異的なバイオマーカー候補として単離

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

その他の 466 個は、新規の small RNA であった。ベンゾトリアゾール類 5 種類の結果を比較すると、下図の様に、ベンゾトリアゾール(CAS#3846-71-7)とベンゾトリアゾール(CAS#2440-22-4)の単回投与時に遺伝子発現が誘導されるエクソソーム RNA は、非常に共通性が高く、ベンゾトリアゾール (CAS#70321-86-7)、ベンゾトリアゾール (CAS#3147-75-9)、および、ベンゾトリアゾール (CAS#3864-99-1)の単回投与時に遺伝子発現が誘導されるエクソソーム RNA にも非常に共通性が高いことが明らかになった。この結果は、エクソソーム RNA のクラスタリングの結果からも明らかになっている (図 23)。

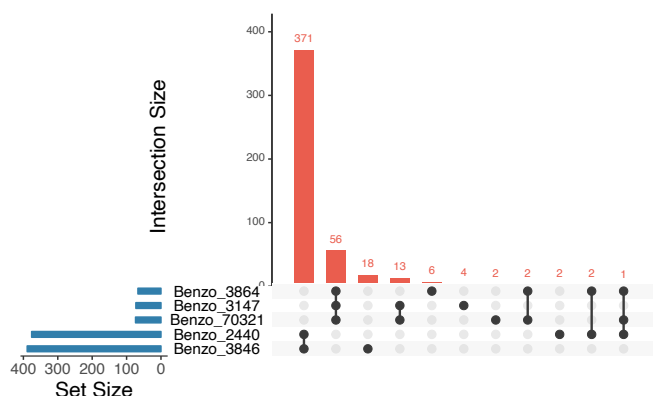


図 22 ベンゾトリアゾール類5種類のマウスへの投与により誘導されるエクソソーム RNA のリストを比較した棒グラフ。

C-5 : 次世代有害性評価系の政策提言に向けた化学物質の有害性予測の向上のためのカテゴリーアプローチ (広瀬) :

C-5-1 : ベンゾトリアゾール類の投与により肝臓で誘導される遺伝子発現パスウェイの同定 :

ベンゾトリアゾール類 5 種類について、投与後 2 4 時間後の肝臓における網羅的遺伝子発現データであるトキシコゲノミクスデータを参照した。

主要な異物 (薬物) 代謝における主要な第一相酵素である Cytochrome P450 関連遺伝子発現パスウェイネットワークとして、AhR-Cyp1 (arylhydrocarbon receptor: AhR 依存的 Cyp1 の活性化), CAR-Cyp2 (Constitutive androstane receptor: CAR 依存的 Cyp2 の活性化), SXR/PXR-Cyp3 (pregnane X receptor: SXR/PXR 依存的 Cyp3 の活性化), PPAR-Cyp4 (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: PPAR 依存的 Cyp4 の活性化), および、第二相酵素関連遺伝子発現パスウェイネットワークとして、Nrf2-phase II enzymes (Nuclear factor erythroid 2 related factor 2/Kelch-like ECH associated protein 1: Nrf2 依存的 第二相酵素の活性化), Nrf2/Keap1 (Nuclear factor erythroid 2 related factor 2//Kelch-like ECH associated protein 1: Nrf2/Keap1 依存的 第二相酵素の活性化) について解析を行なった (図 24)。

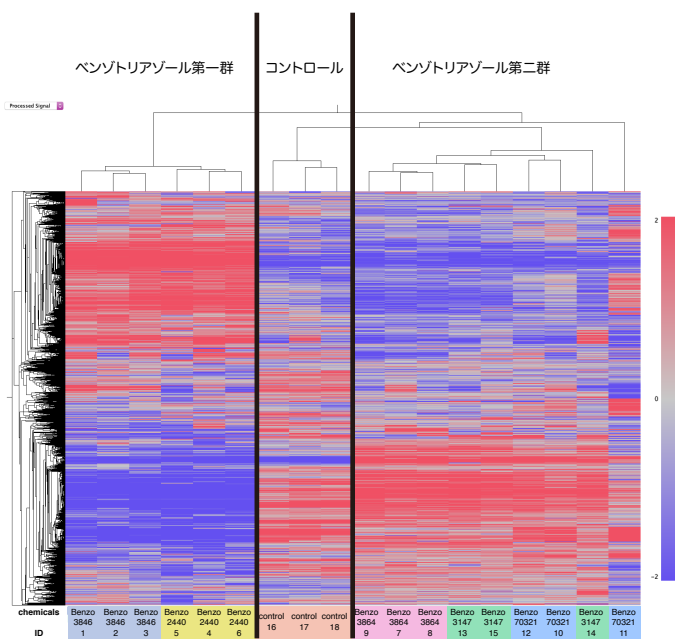


図 23 ベンゾトリアゾール類5種類のエクソソーム RNA の発現データのクラスタリングを行なった。その結果、ベンゾトリアゾール類の第一群、および第二群に層別化されることが判明した。

CAS		3846-71-7	2440-22-4	3864-99-1	70321-86-7	3147-75-9
Name		2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phenol	2-(benzotriazol-2-yl)-4-methylphenol	2,4-di-tert-butyl-6-(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)phenol	2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-phenylpropan-2-yl)phenol	2-(benzotriazol-2-yl)-4-(2,4,4-trimethylpentan-2-yl)phenol
Transcriptomic profile (*semiquantitative relative degree of induction)	Up probesets	5480	150	3230	370	250
	AhR-Cyp1*	0	0	0	0	0
	CAR-Cyp2*	100	0	50	0	40
	SXR/PXR-Cyp3*	100	0	80	0	0
	PPAR-Cyp4*	100	0	100	30	40
	Nrf2-phase II enzymes*	100	10	50	5	0
Nrf2/Keap1*	100	0	80	0	0	

図 24 ベンゾトリアゾール類5種類のマウスへの投与により誘導される第1相酵素および第2相酵素に関連した共通して誘導される遺伝子発現解析。Up probesets: 遺伝子発現が誘導された遺伝子 probe set の数。

\*: 最も多くの遺伝子発現が誘導されたベンゾトリアゾール (CAS#3826-71-7) によって活性化した CAR-Cyp2, SXR/PXR-Cyp3, PPAR-Cyp4, Nrf2-phase II enzymes, Nrf2/Keap1 を 100 とし、活性化しなかった AhR-Cyp1 を 0 とした場合の、活性化の相対値。

C-5-2 : ベンゾトリアゾール類の投与により発現誘導される small RNA 遺伝子発現パスウェイの同定 :



令和2年度において、ベンゾトリアゾール(CAS#3147-75-9)の単回投与に特異的でエクソソームRNAのスクリーニングを終え、さらに、ベンゾトリアゾール類5種類のばく露実験において、特異的に誘導されるバイオマーカーのスクリーニングをc-4-2項で行なった。その結果より、ベンゾトリアゾール(CAS#3846-71-7)とベンゾトリアゾール(CAS#2440-22-4)の単回投与時に遺伝子発現が誘導されるエクソソームRNAは、非常に共通性が高く、ベンゾトリアゾール(CAS#70321-86-7)、ベンゾトリアゾール(CAS#3147-75-9)、および、ベンゾトリアゾール(CAS#3864-99-1)の単回投与時に遺伝子発現が誘導されるエクソソームRNAにも非常に共通性が高いことが明らかになっている(図23)。

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

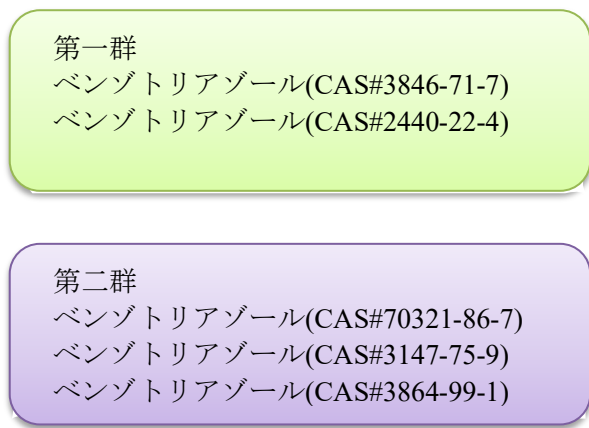


図25 ベンゾトリアゾールのばく露に伴い誘導されるバイオマーカーで層別化すると、第一群と第二群に分けることができる。

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

また、ベンゾトリアゾール類のラットへの反復投与の毒性試験(GLP)のデータでは、第一群のみ、腎臓に障害が見られる(図26)。

この様に、第一群と第二群のベンゾトリアゾールでは、病理組織学的に違いが存在している。

CAS	3846-71-7	2440-22-4	3864-99-1	70321-86-7	3147-75-9
Name	2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phenol	2-(benzotriazol-2-yl)-4-methylphenol	2,4-di-tert-butyl-6-(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)phenol	2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-phenylpropan-2-yl)phenol	2-(benzotriazol-2-yl)-4-(2,4,4-trimethylpentan-2-yl)phenol
Experimental result (GLP)	NOAEL=0.1 mg/kg bw/day (0.0093 mmol/kg/day) Liver: weight increase, hypertrophy of hepatocyte (0.5 mg/kg bw/day in male, 12.5 mg/kg bw/day in female), altered hepatocellular foci (0.5 mg/kg bw/day in male), cystic degeneration and lipofuscin deposition in hepatocyte (2.5 mg/kg bw/day in male) Hematological effects (0.5 mg/kg bw/day in male), Rats, 0, 0.1, 0.5, 2.5 mg/kg bw/day (male), 0, 0.5, 2.5, 12.5 mg/kg bw/day (female) 52-week, Gavage (Hirata-Koizumi et al., 2008) [key study]	NOEL= <30 mg/kg bw/day (<0.133 mmol/kg/day) Liver: weight increase, hypertrophy of hepatocyte (0.5 mg/kg bw/day in male, 100 mg/kg bw/day in female), Kidney: degeneration and regeneration in proximal tubules (100 mg/kg bw/day in female), Rats, 0, 30, 100, 300 mg/kg bw/day, 42-day (male), 42-53-day (female), Gavage (METI, 2007) [key study]	NOEL=2.5 mg/kg bw/day (0.007 mmol/kg/day) Alb, A/G ratio increase (25 mg/kg bw/day in male), Liver: weight increase (25 mg/kg bw/day in male), Rats, 0, 2.5, 25, 250 mg/kg bw/day, 56-57-day for male, 55-69-day for female, Gavage (Ema et al., 2008) [key study]	NOAEL=50 ppm (ca. 2.5 mg/kg bw/day (0.0056 mmol/kg bw/day), female), 300 ppm (ca. 15 mg/kg bw/day (0.0335 mmol/kg bw/day), male) Liver: weight increase, hypertrophy and/or cytoplasmic vacuolation of hepatocyte (2000 ppm in male, 300 ppm in female), Rats, 0, 50, 300, 2000, 10000 ppm, 90-day, Feeding (Basler et al., 1987)	No data
Experimental result (GLP)	NOAEL=<0.5 mg/kg bw/day (0.0015 mmol/kg/day) Liver: vacuolar degeneration, hypertrophy of hepatocyte, bile duct proliferation (0.5 mg/kg bw/day in male), focal necrosis (2.5 mg/kg bw/day in male) Hematological effects (2.5 mg/kg bw/day in male), Heart: degeneration and hypertrophy of myocardium and cell infiltration (0.5 mg/kg bw/day in male and 12.5 mg/kg bw/day in female) Kidney: hypertrophy of tubular epithelium (62.5 mg/kg bw/day in male and female), Thyroid: follicular cell hyperplasia (62.5 mg/kg bw/day in male and female) Rats, 0, 0.5, 2.5, 12.5, 62.5 mg/kg bw/day, 28-day, Gavage (Hirata-Koizumi et al., 2007) [key study]	No data	No data	No data	No data

図26 GLP試験で既に報告されているラットにおける反復投与によるベンゾトリアゾール類5種類の毒性所見のまとめ。

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

そこで、マイクロアレイやメタボロミクス、プロテオミクス、RNA-Seqなどの実験より得られたデータをもとにして生物学的な機能の解釈やパスウェイ解析を行うことができるIngenuity Pathways Analysis (IPA)解析を肝臓におけるトキシコゲノミクスデータに対して行なった。

その結果、ベンゾトリアゾール類の第二群は、肝臓で非常に強いPPARA活性を示しており、PPARAシグナルパスウェイをバイオマーカーが反映している可能性がある(図27)。

CAS	3846-71-7	2440-22-4	3864-99-1	70321-86-7	3147-75-9
Name	2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-methylbutan-2-yl)phenol	2-(benzotriazol-2-yl)-4-methylphenol	2,4-di-tert-butyl-6-(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)phenol	2-(benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(2-phenylpropan-2-yl)phenol	2-(benzotriazol-2-yl)-4-(2,4,4-trimethylpentan-2-yl)phenol
RICTOR	+++		+++		
CD 437	+++		+++		
NFE2L2	+++	+	+++	+	
MYC	+++		+++		
MYCN	+++		+++		
PPARA	++		+++	+++	+++

図 27 ベンゾトリアゾール類5種類のマウスへの投与により誘導される遺伝子群に関して、IPA 解析を行なった結果のまとめ。

1x10<sup>-11</sup>~1x10<sup>-20</sup> : +

1x10<sup>-21</sup>~1x10<sup>-30</sup> : ++

1x10<sup>-31</sup>~ : +++ (赤色でマーク)

#### 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ールの作成に成功し、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ー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ールは非常に感度の高い系になっているといえる。

さらに、四塩化炭素による肝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。

また、ベンゾトリアゾール類5種類の投与実験を行なったマウスのエクソソーム RNA の網羅的遺伝子発現結果を比較することで、新たに、総計477個の small RNA がベンゾトリアゾール類に特異的なバイオマーカー候補として単離された。このうち、1個は、既知の miRNA である miRNA-301 であった。

その他の466個は、新規の small RNA であった。ベンゾトリアゾール類5種類のエクソソーム RNA の

網羅的発現データをクラスタリングすることにより、第一群と第二群に層別化することができた(図23)。

今回、ベンゾトリアゾールを第一群と第二群に分けた訳だが、これらは、ベンゾトリアゾール類のばく露実験によって見られた肝臓における病理所見と一致していた。

第一群でのみ肝臓で障害が確認され、第二群では病理所見が確認されなかった。

このことから、ベンゾトリアゾールによる肝臓障害のバイオマーカーである可能性が高い。ただし、四塩化炭素による肝臓障害のマーカーとは重複が少ないことから、肝臓障害を起こす機序に違いがあると考えられる。

また、ベンゾトリアゾール類のラットへの反復投与の毒性試験 (GLP) のデータでは、第一群のみ、腎臓に障害が見られる (図26)。今回のばく露実験は、単回投与であることで、腎臓に病理所見は見られなかったのだが、本来、反復投与で生じる腎臓障害を単回投与にて検出できた可能性もあると考えられる。

また、分子構造の共通性とは関係なく、化学物質投与により活性化されたシグナルパスウェイを反映した結果とも考えられる。ベンゾトリアゾールの第二群は、IPA 解析より、PPARA シグナルパスウェイが活性化していることを明らかにした。よって、化学物質投与により活性化したシグナルパスウェイを反映するエクソソーム RNA をバイオマーカーとすることで検出できると考えられる。また、第一群、および第二群においても、主要な異物(薬物)代謝酵素関連においては、強い相関が見られていない。

本研究計画は、3年計画の最終年度である令和2年度まで計画通りに順調に進捗しており、既に血液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(図 11)。

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

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

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

その結果、四塩化炭素特異的なバイオマーカー (エクソソーム RNA)、ベンゾトリアゾール類 3 種類に共通するバイオマーカー、2 種類に共通するバイオマーカー、1 種類にのみ共通するバイオマーカーの単離に成功した。

これらの結果から、ベンゾトリアゾール類は、2 群に分けることが可能になった。第一群は、ベンゾトリアゾール投与による肝臓障害のバイオマーカーとなっており、第二群は、ベンゾトリアゾール類ばく露によって活性化された PPARα シグナルパスウェイのバイオマーカーとなっている可能性が考えられる。

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

また、既存の安全性評価法と比較しても、短期、小規模動物試験で可能であり、高いスループット性を発揮するものであり、今後の化学物質の毒性データの集積に大きく貢献すると考えられる。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 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 CCl<sub>4</sub>.

*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-1 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/jcbn.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

Percellome プロジェクトから見えてきたエピジェネティクス影響

第46回日本毒性学会学術年会 (2019.7.19.)

○ **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

#### H. 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