

別添 4

II. 分担研究報告書

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

令和 3 年度 分担研究報告書

分担研究課題：エクソソーム解析と毒性バイオマーカー探索

研究分担者 小野 竜一
国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター・毒性部
第五室・室長

研究分担者 落谷 孝広
東京医科大学
医学総合研究所・分子細胞治療研究部門
教授

研究協力者

北嶋聡 国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・部長
相崎健一 国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・第一室長
高橋祐次 国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・動物管理室長

研究要旨

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

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

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

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

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

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

令和3年度研究（3年計画の1年目）は、計画通りに進捗している。

A. 研究目的

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

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

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

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

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

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

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

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

B. 研究方法

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

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

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

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

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

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センターにおいては、化学物質のマウスへの投与実験および採血および胎児観察（桑形）、化学物質の用量設定実験および病理組織学的検査・生化学検査（平林）、エクソソームの抽出およびエクソソームRNAの次世代シーケンサーによる網羅的解析（小野）を行い、東京医科大学・医学総合研究所・分子細胞治療研究部門においては、催奇形性のバイオマーカー候補の探索およびその詳細の解析（落谷）を行い、大阪大学・微生物病研究所（伊川）においては、本研究にお

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

・発生ステージに特異的なエクソソーム RNA の同定

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

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

・マウス血液からのエクソソーム RNA 単離

国立医薬品食品衛生研究所において採取された血液サンプルを用いて、国立医薬品食品衛生研究所および東京医科大学・分子細胞治療研究部門においてエクソソームの単離を行う。具体的には、超遠心ペレットダウン法を行い、エクソソーム単離後は、Nanosight またはエクソソームの表面抗原に対するウエスタンブロットティングやエクソスクリーン法により、単離されたエクソソームの大きさと分布、数のカウントを行い、エクソソーム単離効率の評価を行う。

・エクソソーム RNA 網羅的遺伝子発現解析

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

Kit (Life Technologies, CA, USA) によって、濃度測定を行った上で、2.0 pM のライブラリーを、毒性部で所有する Illumina 社 Nextseq500 および国立医薬品食品衛生研究所の共通機器である Illumina 社 Nextseq2000 を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行う。

・エクソソーム RNA の RNA-seq データ解析

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

これらの処理を行ったシーケンスデータは、マウスゲノム (mm10) に対し TopHat program を用いてマッピング作業を行い、BAM ファイルを生成した。BAM ファイルは、Cufflinks and Cuffnorm programs を用いて、転写産物の定量化および、サンプル間のノーマライゼーションを行う。マウス miRNA のリファレンスシーケンスは、miRbase (<http://mirbase.org>) を利用した。

(倫理面の配慮)

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

C. 研究結果

・発生ステージに特異的なエクソソーム RNA の同定 (小野、落谷)

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

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

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

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

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

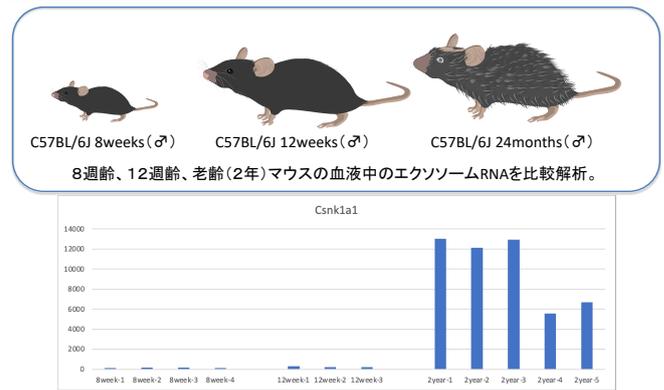


図: 8週齢 (左)、12週齢 (中央)、24ヶ月齢 (右) マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Csn1a1 (casein kinase 1, alpha 1) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

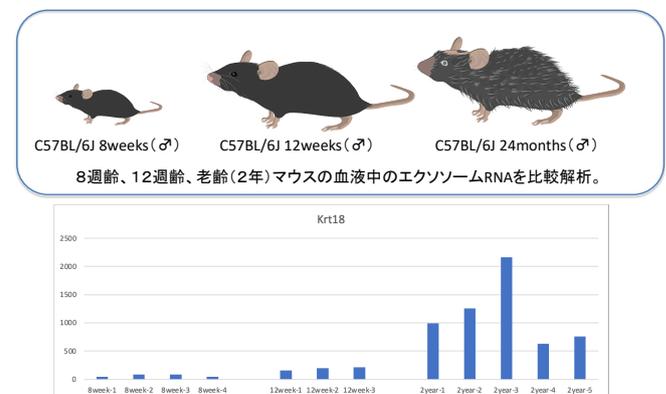


図: 8週齢 (左)、12週齢 (中央)、24ヶ月齢 (右) マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Krt18 (keratin 18) 遺伝子中に存在する新規 small RNA

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

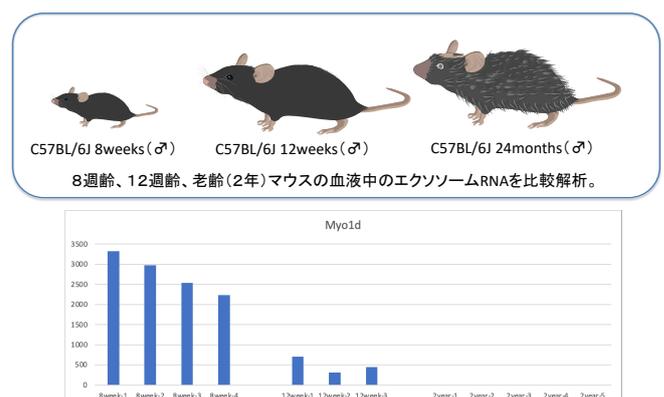


図: 8週齢(左)、12週齢(中央)、24ヶ月齢(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Myo1d (myosin ID) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

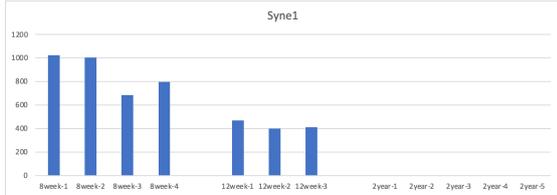
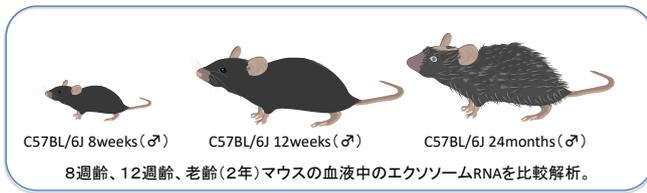


図: 8週齢(左)、12週齢(中央)、24ヶ月齢(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Syne1 (spectrin repeat containing, nuclear envelope 1) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

・性別に特異的なエクソソーム RNA の同定 (小野、落谷)

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

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

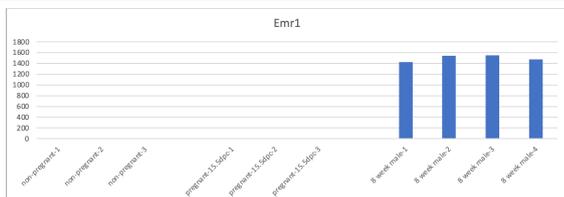
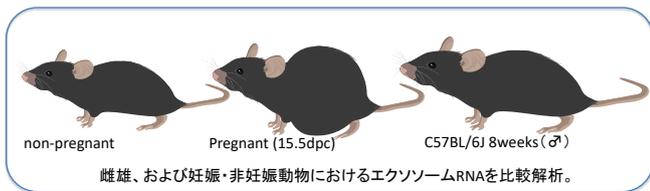


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Emr1 (EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

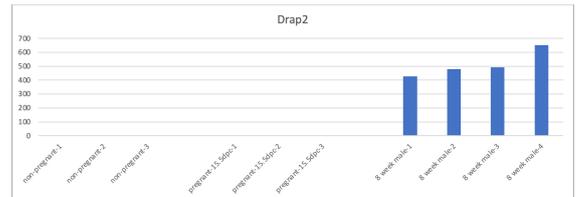
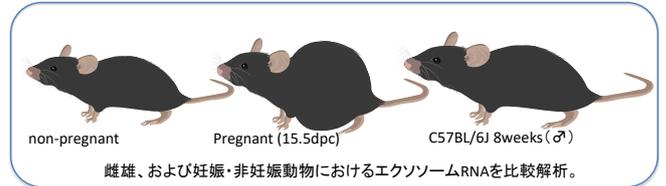


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Dpf3 (D4, zinc and double PHD fingers, family 3) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

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

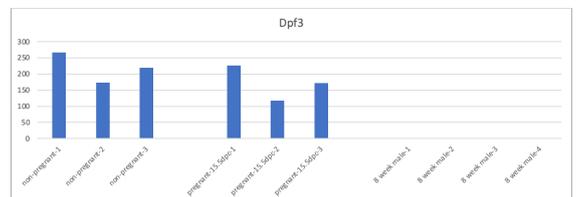
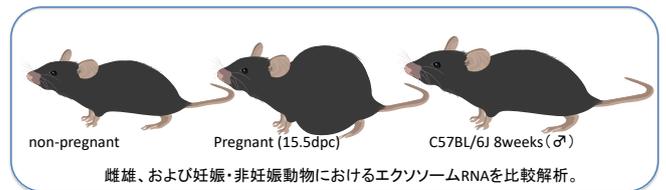
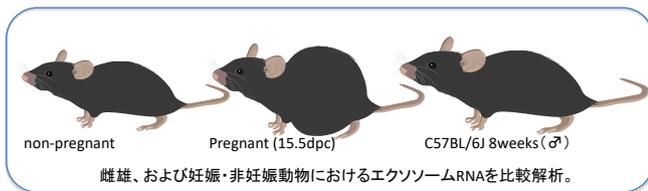


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Dpf3 (D4, zinc and double PHD fingers, family 3) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。



雌雄、および妊娠・非妊娠動物におけるエクソソームRNAを比較解析。

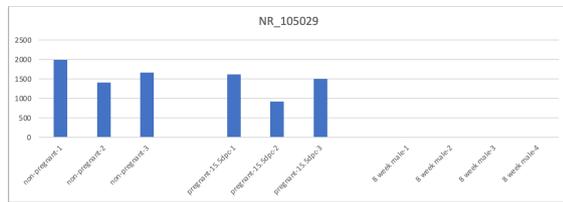
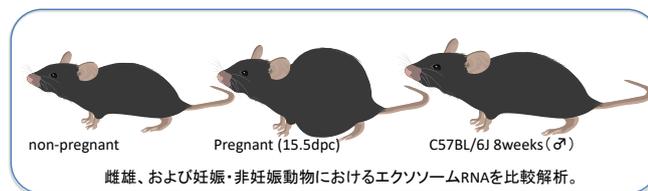


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : NR_105029 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

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

これらの中で代表的なものを2個に関して、その詳細を以下に示す。



雌雄、および妊娠・非妊娠動物におけるエクソソームRNAを比較解析。

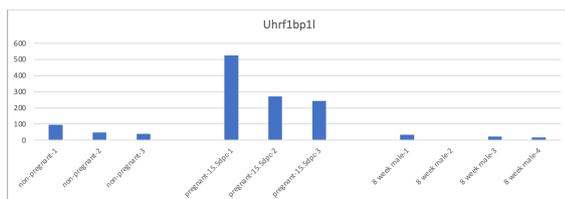
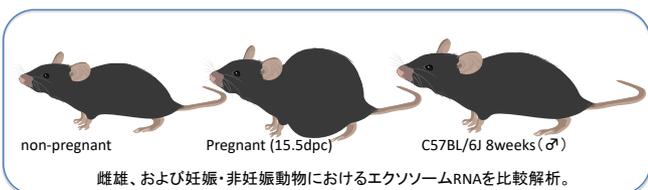


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : UHRF1 (ICBP90) binding protein 1-like 遺伝子中に存在する新規 small RNA



雌雄、および妊娠・非妊娠動物におけるエクソソームRNAを比較解析。

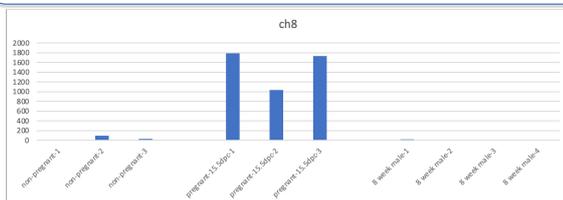


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : 8番染色体に位置する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

・炎症に特異的なエクソソーム RNA の同定 (小野、落谷)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

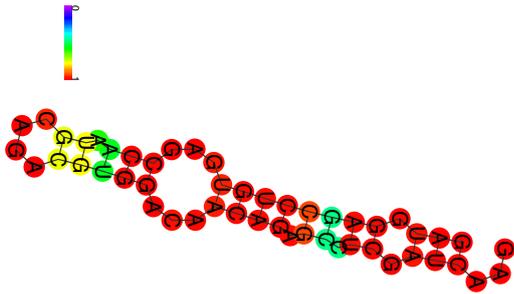


図: Abtb2 (ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2) 遺伝子中に存在する新規 small RNA の二次元構造予測

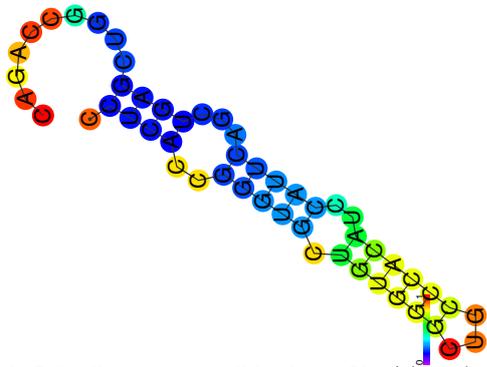


図: Col4a2 (collagen, type IV, alpha 2) 遺伝子中に存在する新規 small RNA の二次元構造予測



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

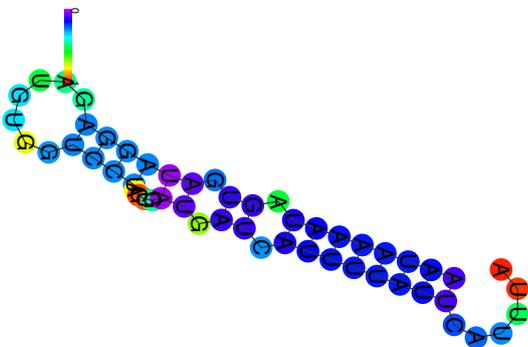


図: Rabgap11 (RAB GTPase activating protein 1-like) 遺伝子中に存在する新規 small RNA の二次元構造予測

D. 考察

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

E. 結論

本研究は、R3 年度の研究計画通りに進捗した。

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

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

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

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

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

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

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

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

(3) 化学物質投与により催奇形性を発現する動物実験の条件検討を行った。

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

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

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

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

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

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

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

F. 研究発表

1. 論文発表

(令和3年度)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

○ **Naruse M**, Ishigamori R, Imai T.

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

Front Genet. 2021 Nov 29;12:765131.

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

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

Front Genet 2021 Nov 18;12: 768781.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cell Rep. 2022 Jan 5:110226.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. 学会発表

(令和3年度)

小野竜一

哺乳類のレトロトランスポゾン研究から解き明かす多様な生命機能

第92回日本遺伝学会学術年会 (2020.9.17.)

(招待講演)

○Ryuichi Ono

Identification of novel EV-associated miRNAs as toxic biomarkers in mouse

International Society for Extracellular Vesicles annual meeting 2020 (2020.7.22.)

○小野竜一

リキッドバイオプシーによる毒性評価

第48回日本毒性学会学術年会 (2021.7.1.)

(招待講演)

小野竜一、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純

化学物質の反復投与によるゲノムワイドなヒストン修飾の変化

第48回日本毒性学会学術年会 (2020.6.30.)

(招待講演)

○小野竜一

エクソソームが媒介したレトロトランスポゾンの水平遺伝による哺乳類の誕生

第21回 AB Conference (2021.8.21.)

(招待講演)

○小野竜一

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

第93回日本遺伝学会学術年会 (2021.9.8.)

(招待講演)

○Ryuichi Ono

Novel hepatotoxicity biomarkers of exosomal miRNAs acutely induced by CCl4

アジア毒性学会学術年会 (2021.11.2.)

(招待講演)

○Ryuichi Ono

Liquid Biopsy for the Early Detection of Toxicity

韓国毒性学会学術年会 (2021.11.2.)

(招待講演)

小野竜一

ゲノム編集技術の安全性評価

第50回日本環境変異原ゲノム学会 (2021.11.1.)

(招待講演)

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

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

Chemicals - Percellome Project 2022 update -

米国毒性学会学術年会 (2022.3.27.)

○成瀬美衣

Gene expression profiles in CAFs exhibited individual

variations by the co-culture with CRC organoids

第80回日本癌学会学術総会 (2021.9.30.)

○桑形 麻樹子、高島 宏昌、長谷川 拓郎、山崎 浩

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

第48回日本毒性学会学術年会(神戸(ハイブリット))2021年7月

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

ウサギを用いたサリドマイド経口投与による催奇形作用確認試験

第61回日本先天異常学会学術集会(東京(オンライン))2021年8月

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。
3. その他
なし。