

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

エクソソーム RNA を毒性指標とした
次世代型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：妊娠母動物の毒性評価と胎仔の催奇形性評価

研究分担者 桑形麻樹子
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・室長

研究協力者：高島 宏昌（株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所）
長谷川 拓郎（株式会社ボゾリサーチセンターつくば研究所）

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、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のために、マウス母動物血清中並びに胎児及びその附属物中エクソソームの解析のための試料採取法を検討し確立した。また、催奇形性陽性対照物質として、C57BL マウスに外脳症を誘発するバルプロ酸ナトリウムを選択した。バルプロ酸ナトリウムを妊娠マウスに経口投与して母動物血漿中および子宮内容物（胎盤、卵黄嚢膜、羊膜、胎児）中の薬物動態を確認し、エクソソーム解析の補助とすることとした。今年度は、母動物血漿中および子宮内容物（胎盤、卵黄嚢膜、羊膜、胎児）中における分析バリデーション試験を実施し、分析法を各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。

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。

エクソソーム解析候補時期の1つである妊娠15日マウスを用いて、解剖および子宮内容物採取方法を確立する。また、薬物投与後のエクソソーム解析の補助として母動物血漿および子宮内容物の薬物動態を確認することとし、催奇形性物質としてバルプロ酸ナトリウムによる分析法を検討する。

・マウスを用いたバルプロ酸ナトリウム経口投与による母動物血清中並びに胎児及びその附属物中エクソソームの解析のための試料採取法

1. 使用動物

動物種：マウス（SPF）

系統：C57BL/6J

供給源：日本チャールス・リバー株式会社

匹数：7匹（妊娠15日）

2. 帝王切開

妊娠15日相当日（膣栓確認日=妊娠0日）の午前中にイソフルランにて母動物を吸入麻酔後、採血（採血候補部位：心採血あるいは腹大動脈）した。

着床の有無により妊娠の成否を確認した。

妊娠が認められた母動物は卵巣および子宮を摘出し、子宮壁を切開後、左右子宮角の着床数を確認した。

卵黄囊膜に覆われた状態で胚及び胎盤を摘出し、各子宮内容物体ごとに卵黄囊膜、羊水、胚、胎盤を評価できる試料採取法を検討した。

3. マウス血漿および子宮内容物（卵黄囊膜、羊水、胚、胎盤）のバルプロ酸ナトリウム濃度測定

上記、2.にて得られた無処置妊娠マウス血漿および妊娠15日の子宮内容物中のバルプロ酸ナトリウム濃度測定のために、LC-MS/MSによる簡易バリデーション試験を実施した。

なお、分析は株式会社ボゾリサーチセンターつくば研究所に委託した。

測定対象物質：バルプロ酸

標準物質：valproic acid sodium slt

ロット番号：WXBD4552V

塩換算係数：0.8677 (=144.21/166.19)

動物実験
内標準物質：Diclofenac sodium salt

ロット番号：P7E3B

（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

1. 帝王切開

本研究における妊娠期エクソソーム解析は妊娠9日、妊娠15日および妊娠18日を予定している。

研究代表者の先行研究により妊娠15日のエクソソーム解析予備データがあることから、今年度は妊娠15日にて試料を採取した。

2日間にわたり、解剖を実施した。7例いずれも妊娠していた。

2. 母動物採血

麻酔後、心採血および腹大動脈からの採血を試みたが、薬物動態を調べることから血液成分を一定にするために腹大動脈から採血することにした。

ヘパリンNa入りの1mLシリンジにて採血し、1.5 mLチューブに採取して、1000Gにて3分間、遠心し、血漿を分離した。血漿はタンパク低吸着の1.5 mLチューブにいれ、-80°Cの冷凍庫に保管した。

3. 子宮内容物の採取

着床位置に合わせて子宮内容物番号をふり、PBS入り滅菌シャーレ(110x10 mm)中にて子宮壁を両鈍眼科ハサミおよび先鋭ピンセットにて子宮広間膜側を切開し、1個体づつ子宮壁から先曲がりピンセット(NO.7)を用いて子宮壁から剥離させ、PBS入りのペトリディッシュ(35 x10 mm、sterile、Falcon)にいれた。

PBSが入っていない別のペトリディッシュ内で卵黄囊膜の一部マクロスプリング剪刀にて切れ込みをいれ、250 μ Lのエッペンドルフチューブを卵黄囊内に挿入し、羊水を採取した。

羊水採取後、卵黄囊膜を切開し、胚、卵黄囊膜および胎盤に分け、それぞれ2.5 mLのポリプロピレンチューブに入れた。

なお、全てのチューブは試料保管前に重量を測定し、試料保管後に再度重量を測定し、その差を求めて試料重量として記録した。

4. マウス血漿および子宮内容物(卵黄囊膜、羊水、胚、胎盤)のバルプロ酸ナトリウム濃度測定法の分析バリデーション

血漿、羊水、胚、胎盤、卵黄囊膜の検量線の各濃度(血漿、羊水:1.00~2.00 μ g/mL、胎児、胎盤、卵黄囊膜:2.00~4.00 μ g/mL)における真度はそれぞれ、92.5~114.0%、94.5~105.0%、93.5~110%、88.0~105.5%及び85.7~114.5%となり、いずれも判定基準を満たした。従って、検量線の直線性は良好であると判断した。

バリデーション項目(選択性、検量線の直線性)が判定基準を満たしたため、本測定法はマウス血漿、羊水:1.00~2.00 μ g/mL、子宮内容物:2.00~4.00 μ g/mLの範囲にてバルプロ酸濃度測定に適用できると判断した。

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、妊娠15日目にある雌マウスを対象とした、採血方法の検討、血清单離法の検討、胎児由来の羊水の採取方法の検討、用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る。

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。

E. 結論

今年度はエクソソーム解析候補時期の1つである妊娠15日マウスを用いて、解剖および子宮内容物採取の流れを確立した。また、来年度実施予定のVPA動物実験における分析法も確立した。

この手法を基に、その他の妊娠ステージについても検討し、それぞれのステージでの試料採取法に応用する予定である。また、令和4年度に実施する、マウスを用いたVPA経口投与による母動物血清中並びに胎児及びその附属物中エクソソームの解析のための試料採取、および薬物動態を検討するための動物実験の立案に繋げた。

なお、VPA動物実験は、株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所に委託する予定である。

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。