

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：オルガノイド由来エクソソームによる毒性評価

研究分担者 成瀬美衣

国立がん研究センター・研究所・動物実験施設・研究員

研究協力者：野崎弘枝 国立がん研究センター・研究所・動物実験施設

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、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。

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。

● *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。

・オルガノイドの培養上清中に含まれるエクソソーム RNA をバイオマーカーに用いた代替法の検討

C57BL6/J ♂マウス（5 週齢）および F1（C57BL6/J ♂ x JF1）（5 週齢）マウスを解剖し、肝臓、肺、大腸を採取する。これらをハサミにて 1mm 角に刻み、PBS にて洗浄後に collagenase 処理を行う。その後 40 μm セルストレーナーを通し、酵素的および物理的に組織を破碎した後、MBOC（Matrigel Bilayer Organoid Culture）法を用いて細胞をマトリゲルに包埋し、各臓器毎の至適培地を添加し培養を行った。

（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

・オルガノイドの培養上清中に含まれるエクソソーム RNA をバイオマーカーに用いた代替法の検討 (成瀬)

近年開発されたオルガノイド 3D 培養法は、*in vivo* の特性を高度に保存した *in vitro* モデルとなっている。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ものと考えられる。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。

血液中のエクソソーム RNA を毒性指標とした我々の次世代型毒性評価法は、迅速かつ高感度に評価可能な方法になっている。しかしながら、動物愛護の観点から、今後において、動物実験によらない毒性評価が必要となる可能性を考慮し、我々が既に単離している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を行う。

R3 年度においては、C57BL6/J 雄マウス (5 週齢) の肝臓、肺、大腸よりオルガノイドの作製を行った。具体的には、C57BL6/J 雄マウス (5 週齢) の解剖を行い、肝臓、肺、大腸の採取を行なった。全ての解剖用具は、乾熱滅菌済みのものを使用した。

大腸については、腸管を切開し、腸管の内容物を取り除く作業を行う。その後、肝臓、肺、大腸を PBS にて、3 回洗浄を行った。

当該臓器を滅菌消毒済みのハサミにて 1mm 角に刻み、PBS にて洗浄後に collagenase 処理を行った。その後、40 μm 幅のセルストレーナーにて、フィルトレーションを行い、酵素的および物理的に組織を破碎した後に、MBOC (Matrigel Bilayer Organoid Culture) 法を用いて細胞をマトリゲルに包埋し、各臓器毎の至適培地を添加し培養を行った。

その後、数回のパッセージを経て、オルガノイド 3D 培養法を利用した代替法の検討のためのマウスの肺、肝臓、大腸由来のオルガノイドを樹立することに成功した。

樹立したオルガノイドは、以下の 3 種類である。

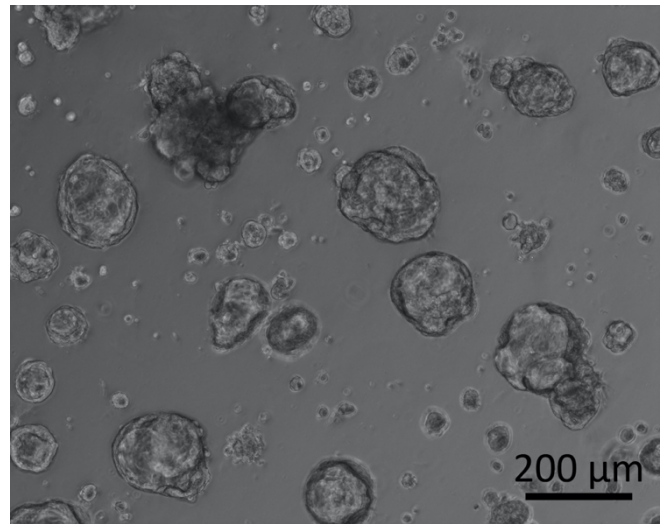


図: C57BL6/J の肺から樹立したオルガノイドの位相差顕微鏡像。(スケールバー=200 μm)

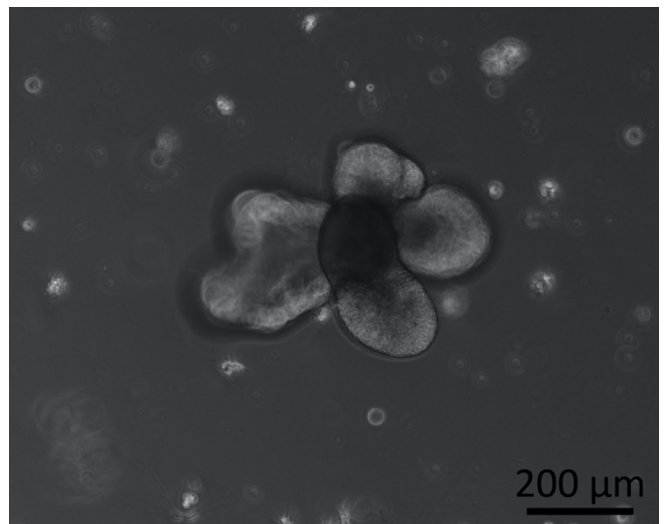


図: C57BL6/J の肝臓から樹立したオルガノイドの位相差顕微鏡像。(スケールバー=200 μm)

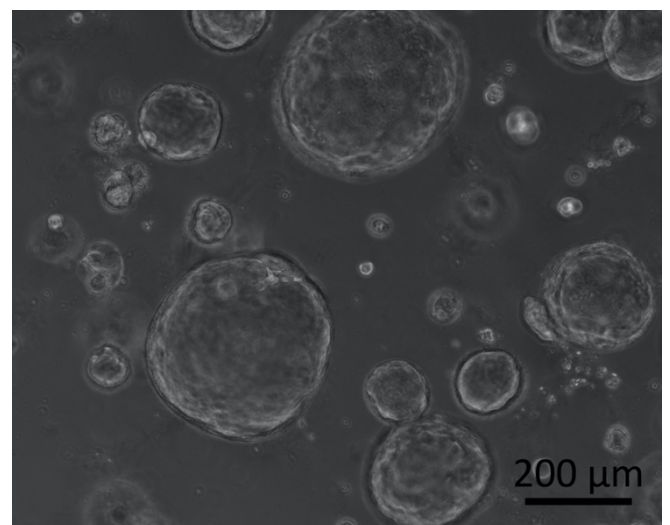


図: C57BL6/J の大腸から樹立したオルガノイドの位相差顕微鏡像。(スケールバー=200 μm)

R4年度において、オルガノイドの培養上清中のエクソソームによる毒性評価が可能であるかを検証するために、本年度においては、樹立に成功したオルガノイドの培養上清を10 ml 採取することをを行った。

採取した培養上清は、コニカルチューブに移し、冷凍保存し、エクソソームの超遠心ペレットダウン法による抽出を行うために、研究代表者である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・小野に送った。R4年度の解析に備え、現在、デュープフリーザーの中に凍結保存中である。

R4年度において、これらの培養上清が、*in vivo* を反映しうるのかの評価を行う予定である。

D. 考察

近年、血液中には、身体中の様々な細胞より分泌される数十から百ナノメートル程度の脂質二重膜の小胞であるエクソソームが存在することが明らかになっている。エクソソームの中に含まれる RNA, DNA, タンパク質には、細胞特異的なものが含まれ、例えば、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 %を超える診断精度が謳われていることから、我々は化学物質による毒性や医薬品の副作用により障害を受けた細胞より特異的なエクソソームが放出されることが明らかにするなど、これらの指標は、発がんや、様々な疾患、毒性などの様々な評価の為に新規バイオマーカーとしての有効である、すなわちリキッドバイオプシーが有効であることを証明してきた。

エクソソームは、あらゆる細胞から体液中に分泌されるものであり、血液中のエクソソームだけでなく、尿中、唾液中のエクソソームをバイオマーカーとした早期発がん診断系の開発が進められている。

また、培養細胞においては、培養上清中へとエクソソームが分泌されることが知られており、培養上清中のエクソソームも発がんや毒性の良い指標となり得ると考えられてきた。

しかしながら、実際は、通常の培養条件においては、培養細胞は *in vivo* の特徴を反映しておらず、その培養上清中のエクソソームは、高度な毒性指標とは成り得ない問題があった。

しかしながら、3D 培養法を利用したオルガノイドは、高度に *in vivo* の特徴を反映しており、その培養上清は、毒性指標としての利用も行える可能性が高かった。

そこで、本分担研究では、オルガノイドの 3D 培養上清中のエクソソーム RNA を毒性指標とした動物実験に依存しない次世代型代替法の開発の可能性を検証することであった。

R3 年度は、C57BL6/J ♂マウス（5 週齢）の解剖を行い、肺、肝臓および大腸を採取し、それらから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ために、今年度樹立に成功したオルガノイドの培養上清を採取

し、凍結を行った。また、R4 年度には、オルガノイドに化学物質を添加し、*in vivo* と同様の挙動を示すのかを検証する予定である。

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、以下の項目において進捗が見られた。

- ・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げられると考えられ、厚生労働行政に貢献しうる研究開発となっている。

F. 研究発表

1. 論文発表

(令和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-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

○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

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。