

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：ノックアウトマウスの作製

研究分担者：伊川正人

大阪大学・微生物病研究所・動物実験施設・教授

研究協力者：江森 千紘 大阪大学・微生物病研究所・動物実験施設・助教

Yonggang Lu 大阪大学・微生物病研究所・動物実験施設・特任助教

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、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。

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

本分担研究においては、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。

● 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。

● 催奇形性解析に適したモデルマウスの作製を行う。

・遺伝子改変マウスを利用した発生異常および形態形成異常に特異的なバイオマーカーの単離

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を行う。

遺伝子改変マウスの作製には、エレクトロポレーションによるCRISPR/Cas9 RNP導入法を利用する。その手順は、以下の通りである。

ガイド(g) RNA の調整

crRNA 溶液 (100 μ M)、tracrRNA 溶液 (100 μ M)、をRNase free waterにより10 μ Mに希釈し、95°Cで1分間インキュベート後に室温に1時間ほど静置。

10 μ MのgRNAをOPTI-MEMで200 ng/ μ lに希釈する。

エレクトロポレーション用の溶液の調整

• Cas9 溶液(1 μ g/ μ l)	4 μ l
• gRNA 溶液(200 ng/ μ l)	8 μ l
• oligoDNA (2 μ g/ μ l)	4 μ l
• OPTI-MEM	24 μ l

利用するtracrRNA および Cas9 タンパクは、以下を使用。

tracrRNA (Sigma)

cat no. TRACRRNA05N

Cas9 (Thermo Fisher Scientific)

TrueCut Cas9 Protein V2

cat no. A36497 (25 μ g)

37°Cで5分間インキュベート後に oligoDNA (ssODN or dsDNA, final: 200 ng/ μ l)を添加し、Nepagene 製エレクトロポレーターにて、マウス受精卵にエレクトロポレーションを行う。エレクトロポレーションの設定値は、以下の通りである。

（上段：Poring Pulse, 下段：Transfer Pulse）

項目：Voltage [V], Pulse Length [msec], Pulse Interval [msec], Number of pulses, Decay Rate [%]

上段：225 V、2 msec、50 msec、4 pulses、10 rate、+

下段：20 V、50 msec、50 msec、5 pulses、40 rate、+
/-

(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

・遺伝子改変動物作製による催奇形性モデルの作出 (伊川)

効率よく催奇形性を発現させるモデルを作出するために、遺伝子改変動物の導入および作出を行う。父性発現インプリンティング遺伝子 *Peg10* および母性発現インプリンティング遺伝子 *Mash2* は、胎盤形成に必須な遺伝子であり、その欠損マウスにおいては、胎盤形成不全により致死になることが報告されている。

これらの遺伝子は、インプリンティング遺伝子あるので、子宮内において、野生型:KO=1:1の比率で存在する。よって、効率よくKO個体を得ることができる特徴がある。

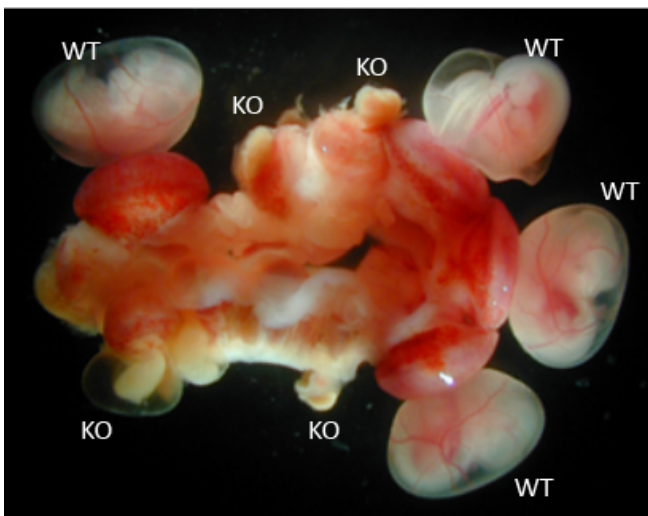


図: 野生型♀マウスと*Peg10* KO マウスを交配し、受精後1日目での解剖像。野生型 (WT) と *Peg10* 欠損 (KO) の個体が 1:1 の比率で確認できる。

そこで、これらの遺伝子欠損マウスの導入および作出を行った。*Mash2* 欠損マウスについては、国立医薬品食品衛生研究所で既に維持していた系統を繁殖させ、催奇形性のモデルマウスとして利用する準備が完了した。*Peg10* 欠損マウスについては、大阪大学において、CRISPR/Cas9 システムを用いて、*Peg10* 欠損マウスの作製を行ない、1匹の遺伝子改変動物を得られた。

また、エクソソーム RNA は、形態形成異常以外にも、*Irf2* KO マウスの解析結果より、炎症反応などのバイオマーカーとなりうる事が本研究において明らかになったことから、胎児の代謝異常などの検出も可能になるかの検討を行うこととした。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い、複数のラインの *Atp7b* 変異マウスの作製に成功している。

Atp7b 遺伝子のエクソン8およびエクソン11をターゲットとして受精卵においてゲノム編集を行い、産まれた変異マウスのオンターゲット部位のゲノム

編集結果を下記に示した。

マウス名前	雌雄	アレル1	アレル2
Atp7b-ex8-01	♂	8bp deletion	2bp insertion
Atp7b-ex8-02	♂	逆位挿入	
Atp7b-ex8-03	♂		
Atp7b-ex8-04	♂	2bp insertion	1bp insertion
Atp7b-ex8-12	♂	6bp deletion	
Atp7b-ex8-13	♂	Large deletion	
Atp7b-ex8-14	♂		
Atp7b-ex8-15	♂		
Atp7b-ex8-16	♂	1bp deletion	

図: *Atp7b* (ATPase Copper Transporting Beta) 遺伝子エクソン8に対するゲノム編集により産まれてきた雄マウスのジェノタイプ。空欄は、複雑なゲノム編集により、変異配列を特定できていない。

マウス名前	雌雄	アレル1	アレル2
Atp7b-ex8-05	♀	10bp deletion	3bp deletion
Atp7b-ex8-06	♀		
Atp7b-ex8-07	♀	10 bp deletion homo	
Atp7b-ex8-08	♀		1bp insertion
Atp7b-ex8-09	♀		
Atp7b-ex8-10	♀	10 bp deletion homo	
Atp7b-ex8-11	♀		
Atp7b-ex8-17	♀	5bp deletion	
Atp7b-ex8-18	♀	4bp insertion	
Atp7b-ex8-19	♀		
Atp7b-ex8-20	♀		
Atp7b-ex8-21	♀	4bp insertion	

図: *Atp7b* (ATPase Copper Transporting Beta) 遺伝子エクソン8に対するゲノム編集により産まれてきた雌マウスのジェノタイプ。空欄は、複雑なゲノム編集により、変異配列を特定できていない。

マウス名前	雌雄	アレル1	アレル2
Atp7b-ex11-01	♂	9bp insert homo CATTAAGCT	3bp deletion
Atp7b-ex11-02	♂	2bp deletion homo CC	
Atp7b-ex11-03	♂	1bp deletion homo CCC>TT	
Atp7b-ex11-04	♂	2bp insert homo CC	1bp insertion
Atp7b-ex11-05	♂	1bp deletion homo C	
Atp7b-ex11-12	♂		

図: *Atp7b* (ATPase Copper Transporting Beta) 遺伝子エクソン11に対するゲノム編集により産まれてきた雄マウスのジェノタイプ。空欄は、複雑なゲノム編集により、変異配列

列を特定できていない。

マウス名前	雌雄	アレル 1	アレル 2
Atp7b-ex11-06	♀	1bp deletion homo A	
Atp7b-ex11-07	♀	human type	
Atp7b-ex11-08	♀	deletion	1bp insert C
Atp7b-ex11-09	♀	2bp deletion homo CC	
Atp7b-ex11-10	♀		
Atp7b-ex11-11	♀	1bp deletion	
Atp7b-ex11-13	♀		
Atp7b-ex11-14	♀	1bp deletion homo C	

図: Atp7b (ATPase Copper Transporting Beta) 遺伝子エクソン 11 に対するゲノム編集により産まれてきた雄マウスのジェノタイプ。空欄は、複雑なゲノム編集により、変異配列を特定できていない。

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。

また、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プ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。

E. 結論

本分担研究は、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、以下の進捗が見られた。

（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、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。

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., Iimura 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 CatSper 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

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。