

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4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、高感度化した評価を可能とすることを目的としている。

また、本研究においては、胎盤形成異常や、神経形成異常、代謝異常、免疫異常などの表現型を持つ遺伝子改変マウスを利用することで、催奇形性に関連する各表現型に対応したバイオマーカーとなるエクソソーム RNA を単離することも目的としている。そこから得られたバイオマーカーにより、未知の催奇形性物質に対しても、催奇形性を評価することが可能になる。さらに、エクソソーム RNA を毒性指標とする評価法がオルガノイド 3D 培養法における培養上清中のエクソソームにも応用が可能なかの検証を行なうことで、将来的な新規の動物実験代替法の開発に資する研究も行う。

3年計画の初年目にあたる令和3年度の本分担研究の進捗は以下の通りである。

・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。

3年計画の2年目にあたる令和4年度の進捗は以下の通りである。

・次世代型催奇形性評価法のパイロットスタディとして、ウィルソン病モデルマウスを用いて、母動物の体内にいる Atp7b KO マウス胎児が分泌するエクソソーム RNA を母体血で検出できるかを検証することとした。今年度においては、Atp7b 変異マウスの解析結果から、銅代謝異常により肝臓などに銅毒性の表現型が生じることを確認した。さらに、野生型および Atp7b 変異 (F0 世代) マウスの血中のエクソソーム RNA の遺伝子発現解析に成功し、銅代謝異常のバイオマーカー候補となるエクソソーム RNA の単離に成功した。

令和4年度研究(3年計画の2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。

昨年度(令和3年度)に確立した試料採取法に基づいて、今年度は催奇形性陽性対照物質であるバルプロ酸投与後の母動物血清および子宮内容物(胎盤、卵黄嚢膜、胎児)をエクソソーム解析用に採取することを目的とした。

また、胎盤形成異常や、神経形成異常、代謝異常、免疫異常などの表現型を持つ遺伝子改変マウスを利用することで、催奇形性に関連する各表現型に対応したバイオマーカーとなるエクソソーム RNA を単離することも目的としている。そこから得られたバイオマーカーにより、未知の催奇形性物質に対しても、催奇形性を評価することが可能になる。

さらに、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。

そこで、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も目的としている。これは、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。

● 次世代型催奇形性評価法のパイロットスタディとして、ウィルソン病モデルマウスを用いて、母動

物の体内にいる *Atp7b* KO マウス胎児が分泌するエクソソーム RNA を母体血で検出できるかを検証する。

● *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 (R3 年度)

国立医薬品食品衛生研究所・動物室において C57BL/6J ♂および♀（8 週齢、12 週齢、2 4 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ァイ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 (R3-4 年度)

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。

#### ・マウスを用いた生体臓器中の銅濃度測定 (R4 年度)

ICP (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: ICP-MS) 質量分析法により、マウス肝臓中に含まれる銅の定量試験を行った。

なお、分析は一般財団法人日本食品分析センターに委託した。

測定対象物質：銅

標準物質：ICP-MS 用 17 元素混合標準液 (銅 250 mg/L) [SCP SCIENCE]

内標準物質：ガリウム・インジウム・テルル・タリウム混合標準液(ガリウム・テルル500 mg/L, インジウム・タリウム50 mg/L)[SCP SCIENCE]

およびロジウム標準液(1000 mg/L) [Sigma-Aldrich]

ICP質量分析装置：Agilent 8800 [アジレント・テクノロジーズ株式会社]

コリジョン・リアクションセル導入ガス：ヘリウム

R4 年度に測定を行う *Atp7b* 変異マウス (F0 世代・11 ヶ月齢) は、BDF1 マウス (C57BL/6J ♀ と DBA/2 ♂ を交配して作製した F1 マウス) ♀ と C57BL/6J ♂ を交配して作製した受精卵をゲノム編集によって作製したものである。

今回は、野生型コントロールとして、C57BL/6J ♂ (12 ヶ月齢) 3 匹の肝臓中の銅濃度を測定している。

#### ・エクソソーム RNA 網羅的遺伝子発現解析 (R3-4 年度)

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 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 (R3-4年度)

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、C57BL/6J ♂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、C57BL/6J ♂ (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。

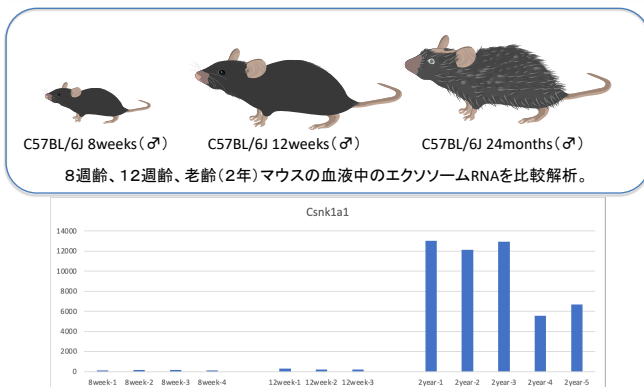


図: 8週齢 (左)、12週齢 (中央)、24ヶ月齢 (右) マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Csn1a1 (casein kinase 1, alpha 1) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

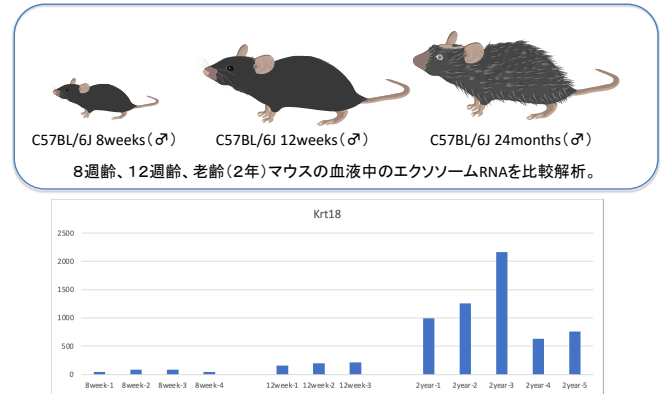


図: 8週齢 (左)、12週齢 (中央)、24ヶ月齢 (右) マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Krt18 (keratin 18) 遺伝子中に存在する新規 small RNA

また、Myo1d (myosin ID) 遺伝子および Syne1 (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。

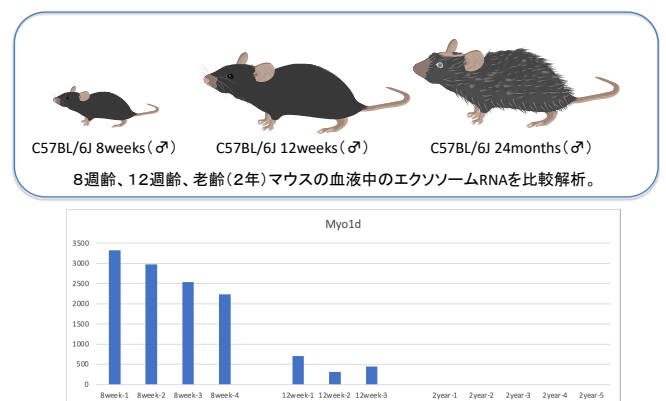


図: 8週齢 (左)、12週齢 (中央)、24ヶ月齢 (右) マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Myo1d (myosin ID) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

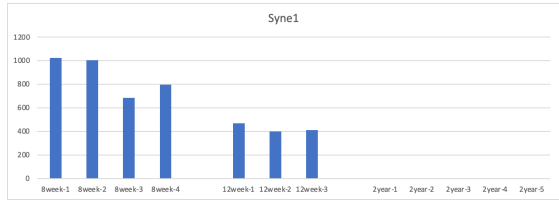
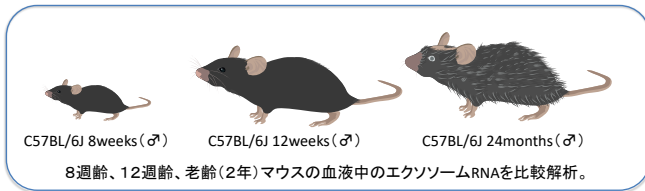


図: 8週齢(左)、12週齢(中央)、24ヶ月齢(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Syne1 (spectrin repeat containing, nuclear envelope 1) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

・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。

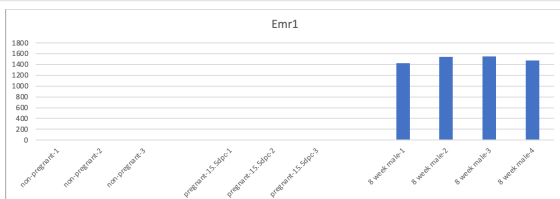


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Emr1 (EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

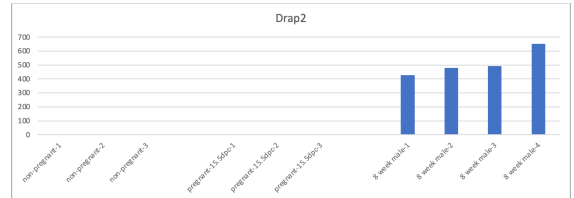
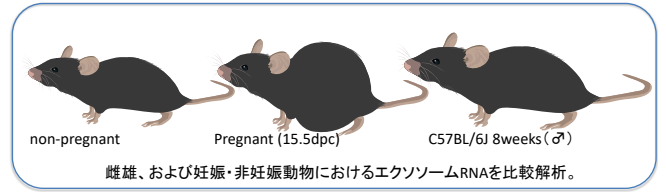


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Dpf3 (D4, zinc and double PHD fingers, family 3) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

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。

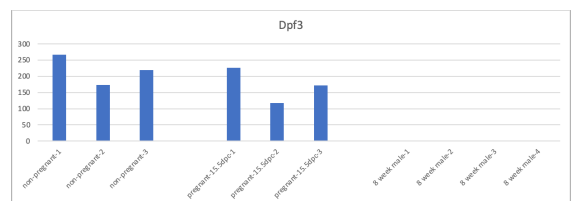
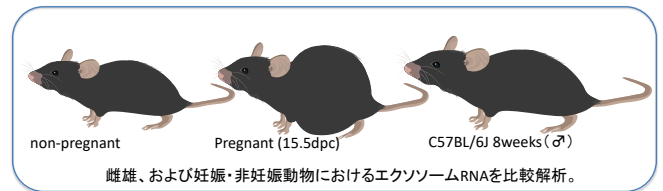


図: 非妊娠雌(左)、妊娠15.5日目雌(中央)、8週齢雄(右)マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : Dpf3 (D4, zinc and double PHD fingers, family 3) 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。



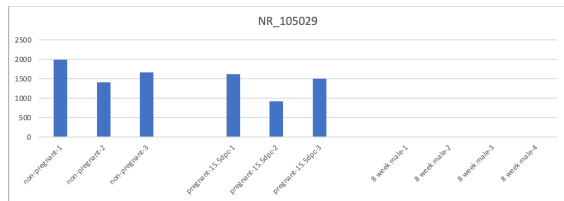
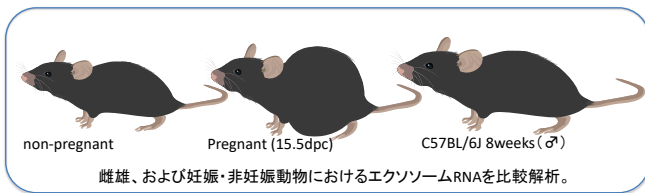


図: 非妊娠雌 (左)、妊娠15.5日目雌 (中央)、8週齢雄 (右) マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : NR\_105029 遺伝子中に存在する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

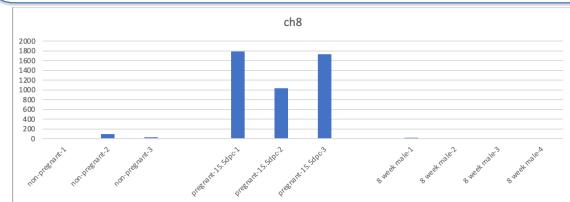
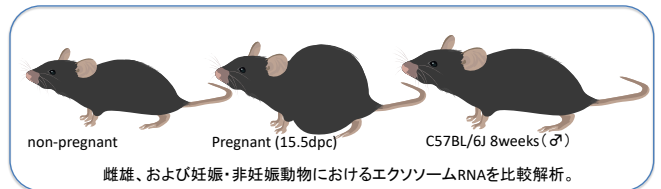


図: 非妊娠雌 (左)、妊娠15.5日目雌 (中央)、8週齢雄 (右) マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : 8番染色体に位置する新規 small RNA。グラフは、個体ごとのデータを示しており、1つの棒グラフが1個体を表している。

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。

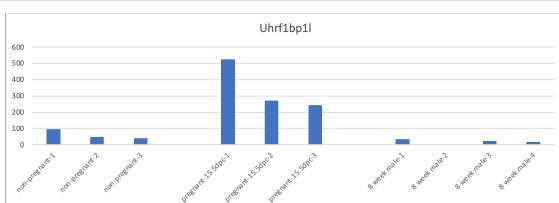
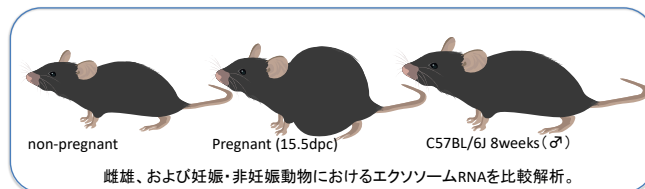


図: 非妊娠雌 (左)、妊娠15.5日目雌 (中央)、8週齢雄 (右) マウスの血液中のエクソソーム RNA の遺伝子発現量の比較 (Y軸: read数) : UHRF1 (ICBP90) binding protein 1-like 遺伝子中に存在する新規 small RNA

・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。

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

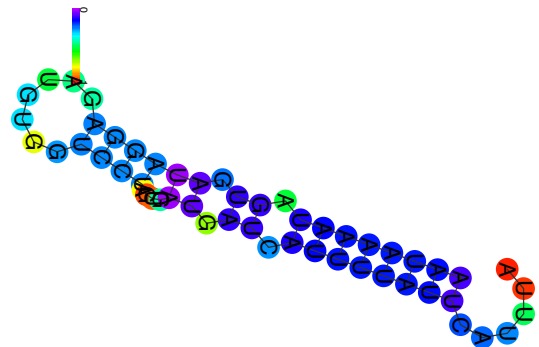


図: Rabgap11 (RAB GTPase activating protein 1-like) 遺伝子中に存在する新規 small RNA の二次元構造予測

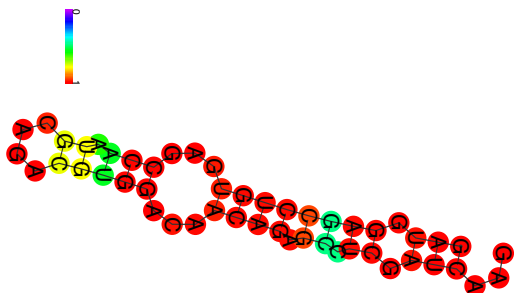


図: Abtb2 (ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2) 遺伝子中に存在する新規 small RNA の二次元構造予測

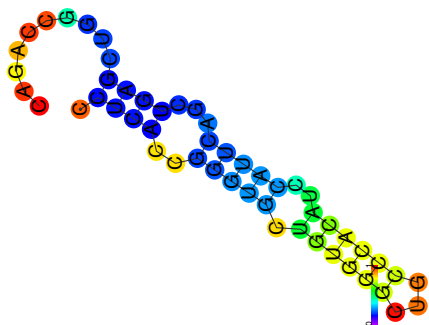


図: Col4a2 (collagen, type IV, alpha 2) 遺伝子中に存在す



## ・各種毒性に特異的なエクソソーム RNA の同定 (小野、落谷、平林：R4 年度)

申請者らが確立したマウス血液中のエクソソーム RNA の次世代シーケンスを利用した網羅的遺伝子発現解析法を利用して、各種毒性に特異的なエクソソーム RNA の単離を行った。

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  $n=3\sim 5$ 、個体毎に単回測定としている。

前年度 (R3 年度) においては、背景データとして、発生ステージに特異的なエクソソーム RNA の同定を行い、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 の単離に成功している。さらに、同様の手法で、性差に特異的なエクソソーム RNA や、妊娠マウスおよび非妊娠マウスに特異的なエクソソーム RNA の単離にも成功している。

さらに、遺伝子改変マウスを各種毒性のモデルマウスとして利用することで、各種毒性に特異的なエクソソーム RNA の単離にも成功している。

Irf2 遺伝子は、ウイルス感染や細菌感染の際、宿主に抵抗性を付与する重要なサイトカインとして知られている I 型インターフェロンのシグナルを負に制御することが知られる転写因子である。Irf2 欠損マウスは、自己炎症疾患のマウスモデルとして知られ、Irf2 欠損マウスに特異的なエクソソーム RNA、すなわち、炎症に特異的なエクソソーム RNA の単離に成功している。

今年度 (R4 年度) においては、伊川 (分担) の作製した Atp7b 遺伝子の変異マウスの表現型解析および銅代謝異常のバイオマーカーとなる血中のエクソソーム RNA の同定を行った。

Atp7b 遺伝子の機能不全は、自然発生マウス (Toxic milk) やヒト遺伝病 (ウィルソン病) などで知られ、銅の胆汁中への排泄が阻害され、全身臓器に銅が沈着して組織障害を起こす銅毒性の表現型を持つことが報告されている。

## (銅毒性モデルマウス (Atp7b 変異マウス (F0 世代)) の解析 (小野：R4 年度))

伊川 (分担) により作製された Atp7b 変異マウスを国立医薬品食品衛生研究所に導入し、その評価を行なった。最初に、Atp7b のエクソン 8 に変異を導入した F0 マウス 21 匹、および、エクソン 11 に変異を導入した F0 マウス 14 匹を、それぞれ、C57BL6/J マウスと交配を行い、F1 マウスの作製を行った。Atp7b 変異マウス (F0) では、受精卵におけるゲノム編集により変異を導入しているため、いくつかの変異アレルのキメラ状態となっている。

伊川 (分担) によるゲノム編集効率は非常に高く、F0 世代の動物においても、すでに遺伝子欠損動物相当になっている可能性があり、F0 世代の動物から注意深く、その表現型の解析を行った。下図にあるように、雄より変異が伝わった場合は、正常に産子が得られるが、雌より変異が伝わった場合は、新生児期致死になることが判明した。

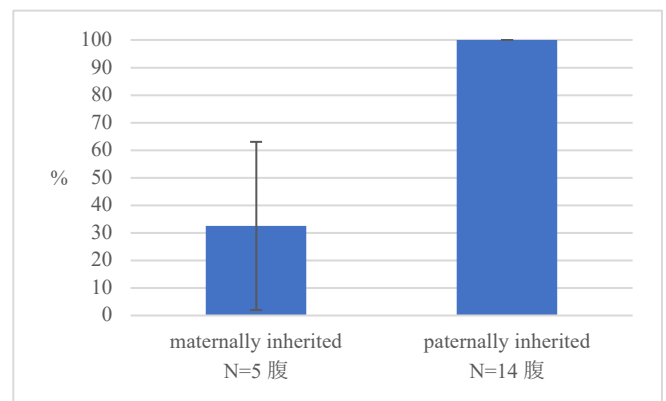


図: Atp7b 変異マウス (F0 世代) ♀ と C57BL6/J ♂ と交配した際の F1 世代の離乳率 (N = 5 腹) および Atp7b 変異マウス (F0 世代) ♂ と C57BL6/J ♀ と交配した際の F1 世代の離乳率 (N = 14 腹)

Atp7b 遺伝子に変異を持つ自然発生マウス (toxic milk) では、母親がホモの変異体の場合に、その産子は、遺伝子変異の有無に関わらず、新生児期において致死になることが知られている。

よって、今回、伊川 (分担) の作製した Atp7b 変異マウス (F0) は、変異はキメラ状態であるものの、ホモに近い状態であり、雌より変異が伝わった場合に新生児期において、Toxic milk と同様に、母体中および母乳中の銅の欠乏による神経障害による致死性であると考えられる。

また、下図に 1 例ずつ示したが、エクソン 8 変異マウスの肝臓は、解剖時の所見では異常は観察されなかったが、エクソン 11 変異マウスの肝臓は、明らかな形

態異常が観察された。

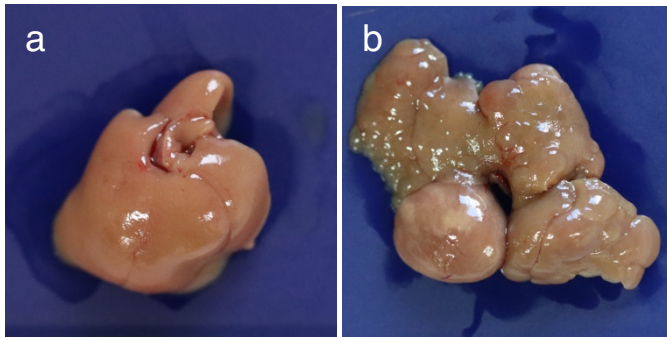


図: a) Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢) の肝臓の写真。正常な形態が確認できている。b) Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢) の肝臓の写真。肝臓のほとんど全ての部位において多くの隆起が確認できる。

実際にこのマウスが銅代謝異常の表現型を持つのかの確認を行った。11ヶ月齢において、肝臓を採取しての銅濃度の測定を行った。肝臓の銅濃度は、野生型に比較して4.7倍 (エクソン8変異マウス)、3.5倍 (エクソン11変異マウス) の高値を示した。

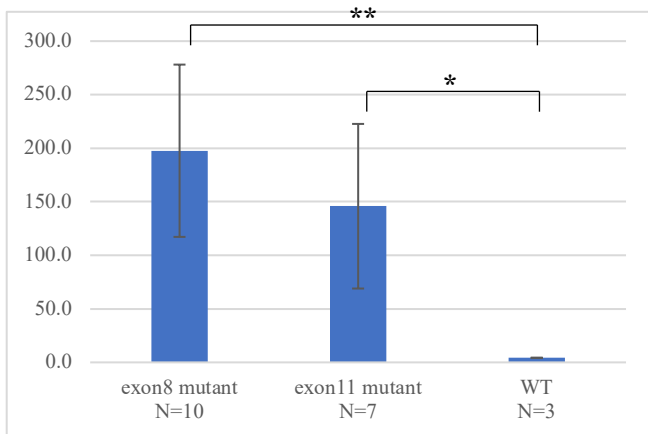


図: Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢・N = 10)、Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢・N = 7)、および、野生型 (12ヶ月齢・N = 3) の肝臓に含まれる銅濃度 (μg/g)。

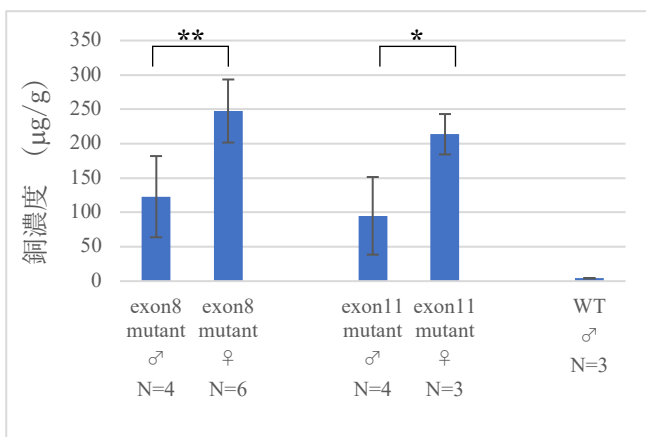


図: Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢) の♂ (N=4)、

♀ (N=6)、Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢) の♂ (N=4)、♀ (N=3)、および野生型 (12ヶ月齢) の♂ (N=3) の肝臓に含まれる銅濃度 (μg/g)。\*\* P < 0.01, \* P < 0.05

Atp7b エクソン8変異体および Atp7b エクソン11変異体は、ともに、肝臓中の銅濃度は雌の方が雄のおよそ2倍の高値となっている。

銅代謝においては、雌雄差が存在すると考えられる。

・銅代謝異常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：R4 年度)

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4年度においては、野生型においては遺伝子発現しているが、Atp7b 変異マウスにおいては遺伝子発現が抑制されるエクソソームRNA、および、野生型において遺伝子発現が抑制されているが、Atp7b 変異マウスにおいてのみで発現が誘導されているエクソソーム RNA の単離を行った。

R4 年度においては、野生型 (N=3) と Atp7b エクソン8変異マウス (N=9) 間で、student t-test < 0.05 かつ、発現量の多い方のグループで、マッピングされた次世代シーケンサーRead 数が10以上のものを抽出し、103 個の small RNA が同定された。

野生型で発現量が多い上位 2 個のエクソソーム RNA の詳細な遺伝子発現量を下図に示している。

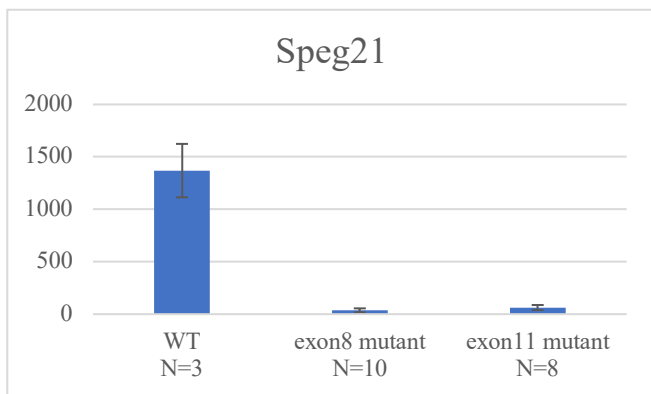


図: 野生型 (10-12ヶ月齢・N = 3)、Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢・N = 10)、Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢・N = 8) におけるエクソソームRNAの発現量。

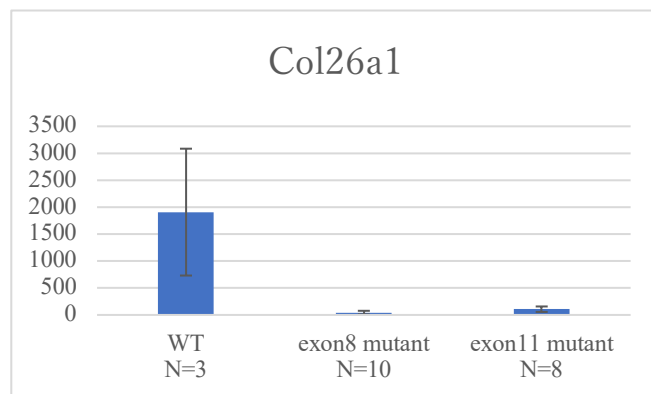


図: 野生型 (10-12ヶ月齢・N = 3)、Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢・N = 10)、Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢・N = 8) におけるエクソソームRNAの発現量。

次に、Atp7b エクソン8変異マウスにおいて遺伝子発現が大量に誘導されるエクソソーム RNA について、上位 2 個を下図に示した。

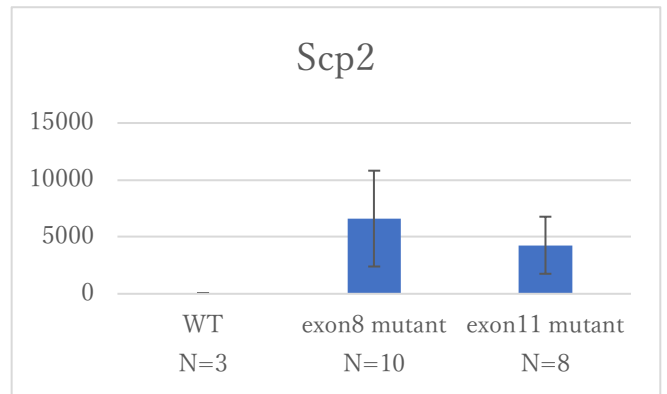


図: 野生型 (10-12ヶ月齢・N = 3)、Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢・N = 10)、Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢・N = 8) におけるエクソソームRNAの発現量。

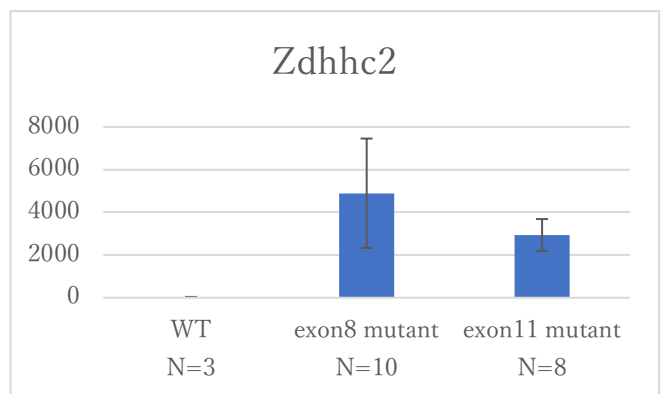


図: 野生型 (10-12ヶ月齢・N = 3)、Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢・N = 10)、Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢・N = 8) におけるエクソソームRNAの発現量。

今年度に単離に成功した銅毒性のバイオマーカー候補となりうるエクソソームRNAについては、来年度 (R5年度) に、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うるかの検証を行ない、miRNA であるのならば、遺伝子発現調節を行うであろうターゲット遺伝子を明らかにする。

## D. 考察

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、昨年度（令和3年度）に試料採取法に基づいて、今年度は催奇形性陽性対照物質であるバルプロ酸を妊娠9～11日のマウスに経口投与し、妊娠11日、15日および18日に母動物血清および子宮内容物（胎盤、卵黄嚢膜、胎児）をエクソソーム解析用（R5年度に解析予定）に採取した。なお、バルプロ酸の投与量は0（媒体、0.5%メチルセルロース溶液）、300、600、800 mg/kgとし、投与容量は16 mL/kgとした。また、経口投与による曝露状態を確認するために、母動物および胎児中のバルプロ酸濃度を確認した。その結果、600 mg/kg群で胎児1例に神経管閉鎖不全が観察され、800 mg/kg群ではほとんどの胎児が死亡した。両群ともに胎児には母動物血漿中濃度の約30～60%のバルプロ酸が確認され、子宮内位置による影響はなかった。この試料を用いて、次年度にエクソソーム解析を行う予定である。

また、前年度（令和3年度）より、催奇形性のバイオマーカーの効率的な探索のために、パイロットスタディとして、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でいる。胎盤形成異常や、神経形成異常、代謝異常、免疫異常などの表現型を持つ遺伝子改変マウスを利用することで、催奇形性に関連する各表現型に対応したバイオマーカーとなるエクソソーム RNA を単離することを計画している。そこから得られたバイオマーカーにより、未知の催奇形性物質に対しても、催奇形性を評価することが可能になる。

令和3年度には、Irf2 遺伝子の欠損マウスに特異的に発現するエクソソーム RNA の単離に成功している。Irf2 遺伝子は、ウイルス感染や細菌感染の際、宿主に抵抗性を付与する重要なサイトカインとして知られているI型インターフェロンのシグナルを負に制御することが知られる転写因子であり、Irf2 欠損マウスは、自己炎症疾患のマウスモデルとなる。Irf2 欠損マウスに特異的なエクソソーム RNA、すなわち、炎症に特異的なエクソソーム RNA の単離に成功している。

今年度（R4年度）においては、伊川（分担）の作製した Atp7b 遺伝子の変異マウスの表現型解析および、Atp7b 遺伝子の変異により惹起される銅代謝異常のバイオマーカーとなる血中のエクソソーム RNA の同定を行った。（小野、落谷）

Atp7b 遺伝子の機能不全は、自然発生マウス（Toxic milk）やヒト遺伝病（ウィルソン病）などで知られ、銅の胆汁中への排泄が阻害され、全身臓器に銅が沈着して組織障害を起こす銅毒性の表現型を持つことが報告されている。

本研究では、ゲノム編集技術を利用して Atp7b 遺伝子のエクソン8およびエクソン11に遺伝子変異を導入した。ゲノム編集技術による遺伝子変異導入効率は高く、近年では、マウス受精卵においてゲノム編集を行った F0 マウスがほぼホモの変異を有することで、交配を経てホモマウスを得ずに表現型を解析できることが報告されている。

具体的には、毛色決定を司る遺伝子で、両アリルともに欠損するとアルビノ個体になることが知られている Tyrosinase 遺伝子をマウスやラット受精卵においてゲノム編集により遺伝子変異体を作製するとアルビノ個体が数多く産まれることが報告されている。

このことから、本研究においては、Atp7b 変異マウスを F0 世代から、その表現型の解析を行うこととした。実際に、Atp7b 変異マウス F0 世代の♀を野生型 C57BL/6J♂と交配した場合に、新生児は新生児期致死の表現型を示した。これは、母体における銅代謝異常により、胎児は銅欠乏症による神経障害を発症し、新生児期致死となる自然発生マウスである toxic milk の表現型と同様の表現型を示すことから、Atp7b 変異マウスは、F0 世代であっても解析対象とした。

Atp7b エクソン8変異マウスは、解剖時に肝臓に肉眼所見は見られない一方、Atp7b エクソン11変異マウスは、肝臓に形態異常が高頻度で見られた。どちらの変異マウスも、肝臓中の銅濃度に大幅な上昇が見られた。（小野）

さらに、血液生化学試験で、肝臓の逸脱酵素の上昇が確認され、病理学的解析から、肝細胞肥大、核の巨核化およびネクロシス像が見られた。（平林）

このことから、Atp7b 変異マウス F0 世代は、銅代謝異常の表現型を持つことから、これらのマウスの血液中のエクソソーム RNA の網羅的遺伝子発現を行った。Atp7b エクソン8変異マウスおよび Atp7b エクソン11変異マウスともに共通したエクソソーム RNA が発現誘導されることが明らかになった。（小野、落谷）

今年度（令和4年度）においては、銅代謝異常のバイオマーカー候補となるエクソソーム RNA の単離に成功した。Atp7b 変異マウスでは、母動物が Atp7b 変異体である場合に、母動物中に存在する銅が母動物の肝臓などに蓄積し、逆に、胎内の子供は銅が欠乏した状態になってしまう。

よって、来年度（令和5年度）においては、今年度に単離した銅代謝異常のバイオマーカー候補が、銅欠乏状態の検出にも利用できるのか、また、それを妊娠中の母動物の血液のみで検出するののかの検証を行う。（小野、落谷）

## E. 結論

今年度（令和4年度：3年計画の2年目）の研究は計画通りに進捗した。

今年度研究において、以下において進捗が見られた。

・次世代型催奇形性評価法のパイロットスタディとして、R3年度には、自己炎症疾患のマウスモデルとなる *Irf2* 欠損マウスを用いて、自己炎症反応のバイオマーカー候補となるエクソソーム RNA の単離に成功している。令和4年度においては、伊川（大阪大学）の作製した胎盤形成不全の表現型を持つ *Peg10 KO* マウス、および、銅代謝異常の表現型を持つウィルソン病のモデルマウスである *Atp7b KO* マウスを材料にした解析を開始した。*Peg10 KO* マウスにおいては、既報と同様に、胎盤形成不全により初期胚致死となることが確認された。

今年度においては、*Atp7b* 変異マウスの解析結果から、銅代謝異常により肝臓などに銅毒性の表現型が生じることを確認した。さらに、野生型および *Atp7b* 変異 (F0 世代) マウスの血中のエクソソーム RNA の遺伝子発現解析に成功し、銅代謝異常のバイオマーカー候補となるエクソソーム RNA の単離に成功した。

本研究において様々な表現型のバイオマーカーを単離し、それらが母動物の体内にいる場合に、胎児が分泌するエクソソーム RNA を母体血で検出できるかを検証する予定である。

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4年度)

- 1) Tanabe S, Quader S, **Ono R**, Cabral H, Aoyagi K, Hirose A, Yokozaki H, Sasaki H.  
Molecular network analysis of RNA viral infection pathway in diffuse- and intestinal-type gastric cancer  
Fundamental Toxicological Sciences 9 (2) 37-46, 2022
- 2) Tanabe S, Quader S, **Ono R**, Cabral H, Aoyagi K, Hirose A, Perkins E, Yokozaki H, Sasaki H.  
Regulation of Epithelial–Mesenchymal Transition Pathway and Artificial Intelligence-Based Modeling for Pathway Activity Prediction  
Onco 2023, 3(1), 13-25
- 3) **Kuwagata M**, Sato A, Izumi Y, Chihara K, Yamasaki H, Katsumata Y, Ooshima Y, Buschmann J, Fujiwara M:  
Current activities between the DevTox Berlin workshops and the Japanese Teratology Society Terminology Committee in harmonizing the terminology for classifying anomalies in laboratory animals in developmental toxicity studies: Report from the Satellite Workshop of the 60th Annual Meeting of the Japanese Teratology Society; Congenic Anom (Kyoto). 2022; 62: 198-202
- 4) Yuda M., Aizawa S., Tsuboi I., **Hirabavashi Y.**, Harada T., Hino H.,  
Hirai S., Imbalanced M1 and M2 Macrophage Polarization in Bone Marrow  
Provokes Impairment of the Hematopoietic Microenvironment in a Mouse  
Model of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. Biol Pharm Bull. 45(2022),  
1602-1608.
- 5) JPMA 課題対応チーム(13名), ICH S6 対応研究班(5名).  
核酸医薬品の非臨床安全性評価における疑問と考え方について 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、2022;53  
(3), 211-218.
- 6) Okamura A, **Yoshioka Y**, Saito Y, **Ochiya T**.  
Can Extracellular Vesicles as Drug Delivery Systems Be a Game Changer in Cardiac Disease?  
Pharm Res. 2022 Dec 28. Review.
- 7) Naito Y, **Yoshioka Y**, **Ochiya T**.  
Intercellular crosstalk between cancer cells and cancer-associated fibroblasts via extracellular vesicles.  
Cancer Cell Int. 2022 Nov 24;22(1):367. Review.
- 8) Kobayashi M, Fujiwara K, Takahashi K, **Yoshioka Y**, **Ochiya T**, Podyma-Inoue KA, Watabe T.  
Transforming growth factor- $\beta$ -induced secretion of extracellular vesicles from oral cancer cells evokes endothelial barrier instability via endothelial-mesenchymal transition.  
Inflamm Regen. 2022 Sep 4;42(1):38.
- 9) Tamura T, **Yoshioka Y**, Sakamoto S, Ichikawa T, **Ochiya T**.  
Extracellular vesicles in bone homeostasis: key roles of physiological and pathological conditions.  
J Bone Miner Metab. 2022 Aug 9. Review.
- 10) **Yoshioka Y**, Shimomura M, Saito K, Ishii H, Doki Y, Eguchi H, Nakatsura T, Itoi T, Kuroda M, Mori M, **Ochiya T**.  
Circulating cancer-associated extracellular vesicles as early detection and recurrence biomarkers for pancreatic cancer.  
Cancer Sci. 2022 Oct;113(10):3498-3509.
- 11) Ishigamori, R., **Naruse, M.**, Hirata, A., Maru, Y., Hippo, Y., Imai, T.: Featured Article : The Potential of Organoids in Toxicologic Pathology. Histopathological and immunohistochemical evaluation of a mouse normal tissue-derived organoid-based carcinogenesis model. J. Toxicol. Pathol. 35 (3) 211–223 (2022)
- 12) Imai, T., **Naruse, M.**, Ochiai, M., Matsumoto, K., Ikeda, S., Kani, M., Kato, Y., Hirayama, A., Soga, T., Hori, Y., Yokoi, A., Ochiai, A: Different types of reactions to E7386 among colorectal cancer patient-derived organoids and corresponding CAFs. Oncol Lett 24, 221 (2022)
- 13) Imai, T., **Naruse, M.**, Machida, Y., Fujii, G., Mutoh, M., Ochiai, M., Takahashi, M., Nakagama, H.: Feeding a high-fat diet for a limited duration increases cancer incidence in a breast cancer model. Nutr. and Cancer 2022 Oct 20;1-13
- 14) Kaneda Y, Miyata H, Shimada K, Oura S, **Ikawa M**.  
Testis-specific proteins, TSNAXIP1 and 1700010I14RIK, are important for sperm motility and male fertility in mice.  
Andrology. 2023 Jan 4. doi: 10.1111/andr.13378. Epub ahead of print. PMID: 36598146.
- 15) Oura S, Ninomiya A, Sugihara F, Matzuk MM, **Ikawa M**.  
Proximity-dependent biotin labeling in testicular germ cells identified TESMIN-associated proteins. Sci Rep. 2022 Dec 23;12(1):22198. doi: 10.1038/s41598-022-26501-7. PMID: 36564444; PMCID: PMC9789103.
- 16) Ozawa M, Taguchi J, Katsuma K, Ishikawa-Yamauchi Y, Kikuchi M, Sakamoto R, Yamada Y, **Ikawa M**.  
Efficient simultaneous double DNA knock-in in murine embryonic stem cells by CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein-mediated circular plasmid targeting for generating gene-manipulated mice. Sci Rep. 2022 Dec 13;12(1):21558. doi: 10.1038/s41598-022-26107-z. PMID: 36513736; PMCID: PMC9748034.
- 17) Ozawa M, Emori C, **Ikawa M**.  
CRISPR/Cas9-Mediated Highly Efficient Gene Targeting in Embryonic



Stem Cells for Developing Gene-Manipulated Mouse Models. J Vis Exp. 2022 Aug 24;(186). doi: 10.3791/64385. PMID: 36094255.

18) Oura S, Hino T, Satoh T, Noda T, Koyano T, Isotani A, Matsuyama M, Akira S, Ishiguro KI, **Ikawa M**. Trim41 is required to regulate chromosome axis protein dynamics and meiosis in male mice. PLoS Genet. 2022 Jun 1;18(6):e1010241. doi: 10.1371/journal.pgen.1010241. PMID: 35648791; PMCID: PMC9191731.

19) Oyama Y, Miyata H, Shimada K, Larasati T, Fujihara Y, **Ikawa M**. TULP2 deletion mice exhibit abnormal outer dense fiber structure and male infertility. Reprod Med Biol. 2022 May 23;21(1):e12467. doi: 10.1002/rmb2.12467. PMID: 35619658; PMCID: PMC9126596.

## 2. 学会発表

(令和4年度)

1) **小野竜一**, 山本 雄介, **成瀬 美衣**, 田邊 思帆里, **吉岡 祐亮**, 相崎 健一, 広瀬 明彦, **落谷 孝広**, **平林 容子**, **北嶋 聡**  
cfDNA による毒性評価  
第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.29.)  
(口頭発表)

2) **Ryuichi Ono**.  
Horizontal Gene transfer mediated by exosomes: a possible new risk for genome editing.  
International Congress of Toxicology, Maastricht, October, 2022 (口頭発表; シンポジウムオーガナイザー)

3) **小野 竜一**, 田埜 慶子, 安田 智, 佐藤 陽治, 内田 恵理子, **平林 容子**, **北嶋 聡**  
ゲノム編集技術を利用した際の、オンターゲット部位における非意図配列の挿入と、その検出方法の確立  
日本食品衛生学会第 118 回学術講演会 2022.11.11  
長崎 (口頭発表)

4) **Ryuichi Ono**.  
Toxicity Concerns of Exosome Products.  
American College of Toxicology, Denver, Novembr, 2022  
(招待講演)

5) **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)

6) **桑形麻樹子**, 種村健太郎  
周産期の甲状腺機能低下による次世代影響  
第 49 回日本毒性学会、シンポジウム、2022. 6/30-7/2、  
札幌 (口頭発表)

7) **桑形麻樹子**  
ウサギを用いたサリドマイドの発生毒性; 雄精漿移行  
による催奇形性発現の可能性  
第 49 回日本毒性学会、シンポジウム、2022. 6/30-7/2、  
札幌 (口頭発表)

8) 高島宏昌、田中加奈子、羽田亮、長谷川拓郎、山崎  
浩史、**北嶋聡**、**桑形麻樹子**  
サリドマイドに係る雄性生殖を介した発生毒性  
第 62 回日本先天異常学会学術集会、2022. 7/29-7/31、  
金沢 (ポスター)

9) 五十嵐智女、藤井咲子、釣本真理子、相田麻子、高  
橋祐次、**北嶋聡**、**桑形麻樹子**  
ビスフェノール類 4,4'-(1,3-  
Dimethylbutylidene)diphenol の卵巣摘出マウスにおけ  
る皮下および経口投与による子宮肥大試験  
第 49 回日本毒性学会、2022. 6/30-7/2、札幌 (ポス  
ター)

10) 五十嵐智女、松村万里、小川いずみ、矢川千織、  
早川孝彦、越智美代子、齊藤 洋克、**桑形麻樹子**、**北  
嶋聡**  
「新規の食品」の安全史枝を確保するための諸外国の  
精度比較  
第 49 回日本毒性学会、2022. 6/30-7/2、札幌 (ポス  
ター)

11) **平林容子**: 核酸医薬品の非臨床安全性評価におけ  
る ICH  
S6 対応研究班の取組、日本核酸医薬学会 第 7 回年  
会、東京、2022 年 8 月 3 日、招聘講演

12) **平林容子**: 安全性評価の課題と展望、令和 4 年度  
国立医薬品食品衛生研究所シンポジウム、川崎、2022  
年 8 月 9 日

13) **平林容子**: JaCVAM における New Approach  
Methods への取組、2022 年度 日化協 LRI 研究報告  
会、オンライン、2022 年 8 月 26 日、招聘講演

14) **平林容子**: 核酸医薬品の非臨床安全性試験ガイド  
ラインについて、第 12 回レギュラトリーサイエンス  
学会学術大会、東京、2022 年 9 月 10 日、招聘講演

15) **平林容子**: 稀少疾患への核酸医薬品適用における  
安全性評価の考え方、BioJapan2022、横浜、2022 年 10  
月 12 日、招聘講演

16) **HIRABAYASHI, Yoko**: Initiatives for Safety  
Assessment of Nanomaterials  
at Center for Biological Safety and Research, National  
Institute of  
Health Sciences, the 12th Global Summit on Regulatory  
Science (GSRS)  
2022 Conference, Singapore, 19 Oct., 2022 (招待講演)

17) 大久保佑亮, 菅野聖世, 北嶋聡, 平林容子,  
福田淳二: ヒト iPS 細胞を用いたシグナル伝達かく乱

作用のダイナミクスに基づく高精度かつ網羅的ヒト  
発生毒性試験法の開発、第 49 回日本毒性学会学術年  
会、札幌、2022 年 7 月 1 日（口頭発表）

#### 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。