

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4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。

- ・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。

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。

- ・肝臓オルガノイドを細胞培養プレートに播種し、5日間培養した後、アセトアミノフェン（0mM、5mM、10mM、20mM、40mM）を添加した。アセトアミノフェン添加後の2日目に培養上清と肝臓オルガノイドを回収した。

24時間までの観察では、5mM および 10mM のアセトアミノフェン添加では、細胞の生存性は溶媒コントロールや無添加コントロール群と変化しなかった。しかし、48時間後には 5mM 投与群でも細胞の生存性が著しく低下していることが観察されました。

また、肝臓障害の指標である血液中の逸脱酵素（AST および ALT）もアセトアミノフェン添加後の48時間の培養上清で測定し、動物実験と同様の傾向が確認された。

## 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。

・オルガノイドの培養上清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（R3-4年度）

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。

樹立に成功した肝臓オルガノイド  $1 \times 10^5$  個を細胞培養プレートに播種し、5日間培養を行い、アセトアミノフェン（0mM, 5mM, 10mM, 20mM, 40mM）を添加後 2日目に培養上清および、肝臓オルガノイドの回収を行った。

令和4年度においては、回収した培養液上清（1ml）より、500μl を使用して、エクソソーム RNA の網羅的遺伝子発現解析を行う。

（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 (R3 年度)

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 ♂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 ♂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  $\mu\text{m}$  幅のセルストレーナーにて、フィльтра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。

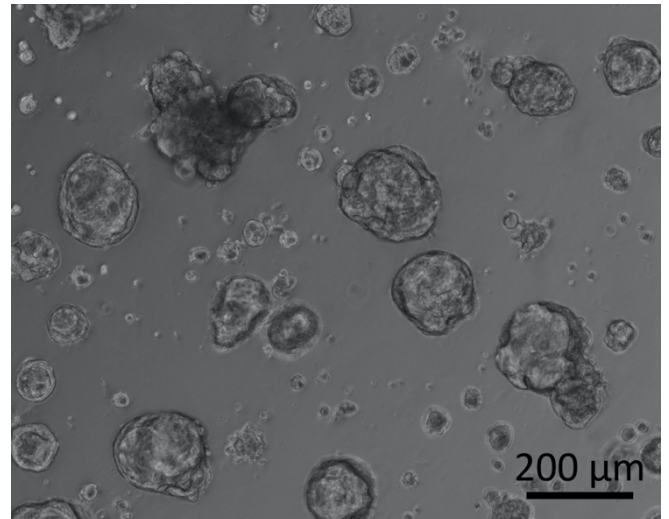


図: C57BL6/Jの肺から樹立したオルガノイドの位相差顕微鏡像。(スケールバー=200 $\mu\text{m}$ )

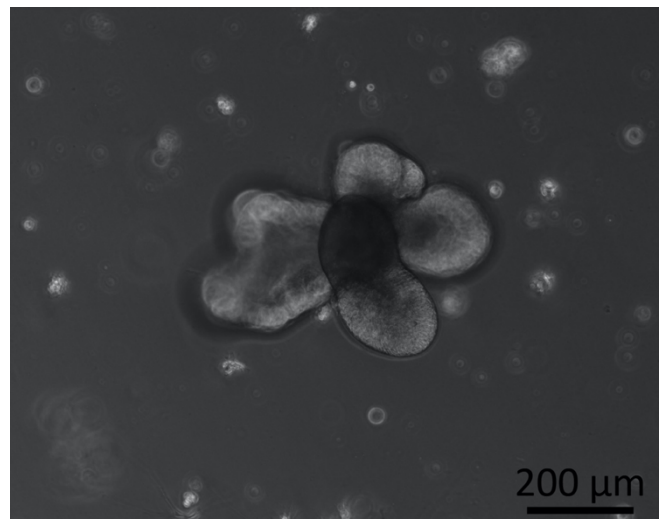


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイドの位相差顕微鏡像。(スケールバー=200 $\mu\text{m}$ )

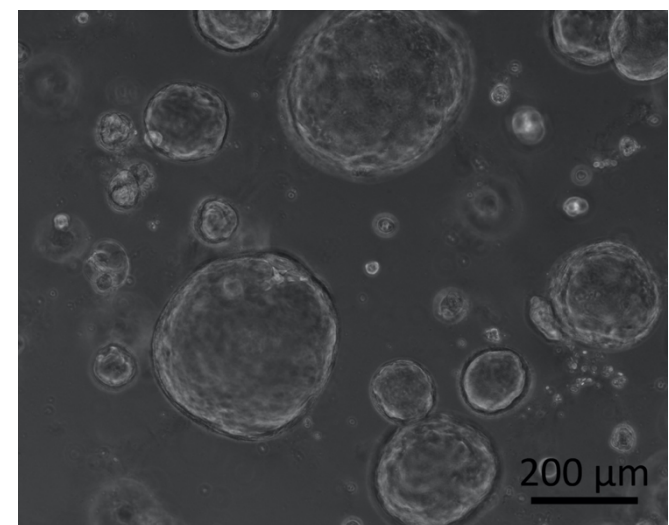


図: C57BL6/Jの大腸から樹立したオルガノイドの位相差顕微鏡像。(スケールバー=200 $\mu\text{m}$ )

・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 (R4 年度)

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樹立に成功した

今年度 (R4 年度) においては、マウスの肝臓より樹立したオルガノイドに対して、肝臓障害を起こすことが知られるアセトアミノフェンを添加するばく露実験を行い、細胞の増殖活性、および肝臓の逸脱酵素である AST および ALT の測定を行った。また、細胞の培養上清の残りは、R5 年度において、エクソソームを抽出し、動物実験で今までに得られている肝臓障害のバイオマーカーとなるエクソソーム RNA が、細胞培養液中へ分泌されるのかの検証を行う予定である。

アセトアミノフェンは、常用量では大半が肝臓でグルクロン酸抱合や硫酸抱合で代謝され、排泄される。一部は、チトクローム P450 で酸化され、活性代謝物 N-アセチル-p-ベンズキノニンイミン (NAPQI) を生成する。NAPQI はさらに、肝細胞内でグルタチオン抱合を受けた後、メルカプトツール酸として尿中に排泄される。

しかし、アセトアミノフェンが過剰量となりグルクロン酸抱合や硫酸抱合の処理能力を超えるとチトクローム P450 を介して代謝される。さらに NAPQI の解毒にかかわるグルタチオン抱合能力も限界に達すると、肝内に NAPQI が蓄積し、肝細胞構成蛋白と共有結合して肝細胞障害が惹起される。

本研究 (R4 年度) においては、下図にある様に、樹

立に成功した肝臓オルガノイド  $1 \times 10^5$  個を細胞培養プレートに播種し、5 日間培養を行い、アセトアミノフェン (0mM, 5mM, 10mM, 20mM, 40mM) を添加後 2 日目に培養上清および、肝臓オルガノイドの回収を行った。

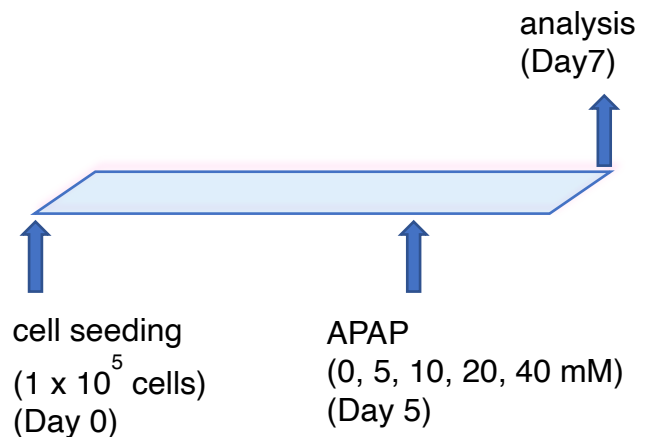


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイドにアセトアミノフェン (APAP) をばく露および解析する概略図。

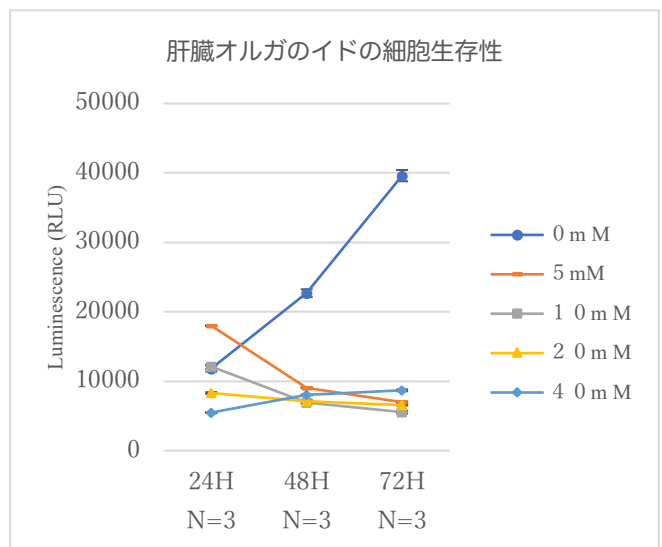


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイドにアセトアミノフェン (APAP) を 0mM, 5mM, 10mM, 20mM, 40mMの濃度で添加し、24時間後、および48時間後に細胞生存性の指標として実績の多い還元力を測定している (N=3)。

24時間後までにおいては、5mM および 10mM のアセトアミノフェン添加により、細胞の生存性は、溶媒コントロールおよび無添加コントロール群と変化はない。しかしながら、48時間後においては 5mM 投与群においても細胞の生存性に著しい低下が見られた。

一方、肝臓障害の指標として利用される血液中の逸脱酵素 (AST および ALT) についても、アセトアミノフェン添加後 48 時間における培養上清において測定し、結果は下図の通りである。



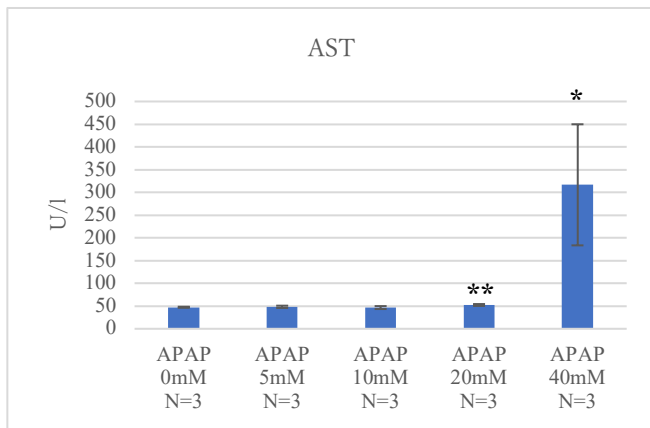


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイドにアセトアミノフェン (APAP) を0mM, 5mM, 10mM, 20mM, 40mMの濃度で添加し、48時間後に細胞培養上清の生化学検査によるAST濃度を測定している。

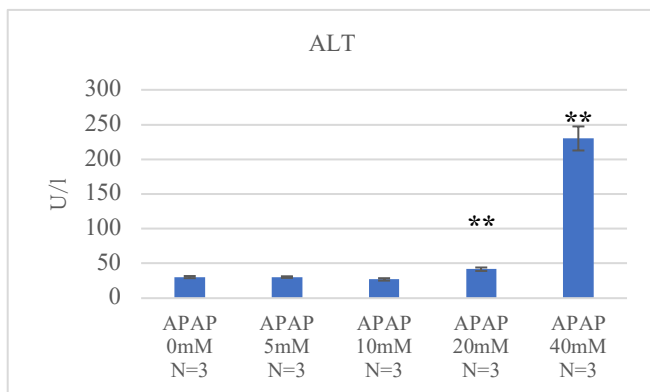


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイドにアセトアミノフェン (APAP) を0mM, 5mM, 10mM, 20mM, 40mMの濃度で添加し、48時間後に細胞培養上清の生化学検査によるALT濃度を測定している。

また、アセトアミノフェン添加による肝臓オルガノイドへの形態を確認するために、アセトアミノフェン添加前、および2日後の細胞像の定点写真撮影を行っている (下図)。

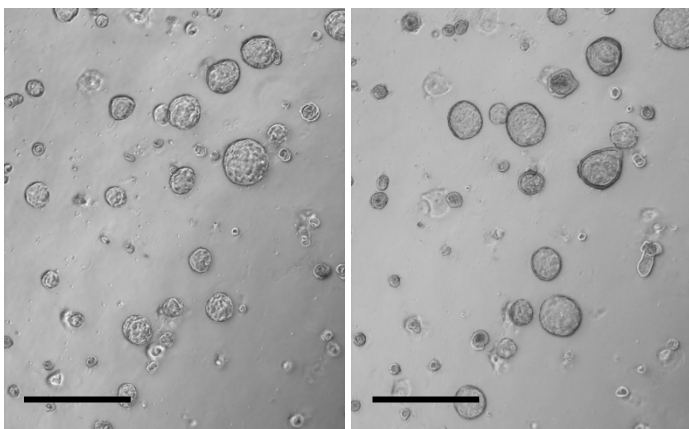


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイド (左写真) に溶媒 (コントロール) を添加し、2日目のオルガノイド (右写真)。ほぼ全てのオルガノイドが増殖していることが確認で

きる。(スケールバー=800μm)

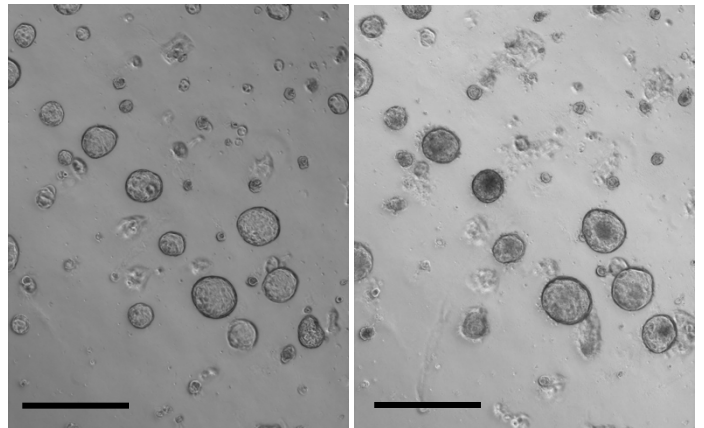


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイド (左写真) に5mMアセトアミノフェンを添加し、2日目のオルガノイド (右写真)。溶媒コントロールと同様に、ほぼ全てのオルガノイドが増殖していることが確認できる。(スケールバー=800μm)

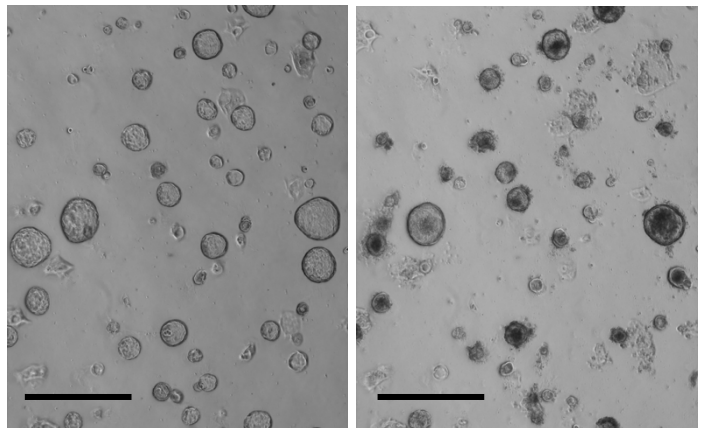


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイド (左写真) に10mMアセトアミノフェンを添加し、2日目のオルガノイド (右写真)。溶媒コントロールおよび5mM添加群と比較して、オルガノイドが増殖していない。(スケールバー=800μm)

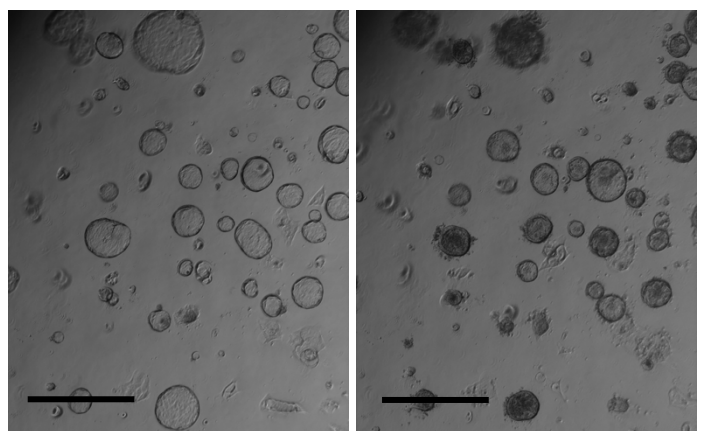


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイド (左写真) に20mMアセトアミノフェンを添加し、2日目のオルガノイド (右写真)。10mM投与群と同様に、オルガノイドが増殖していない (スケールバー=800μm)

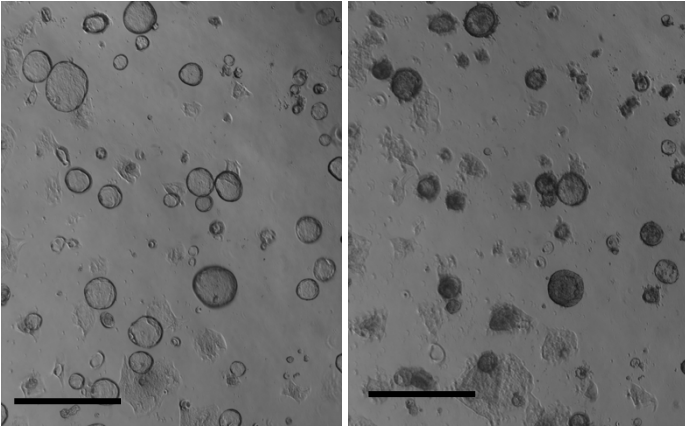


図: C57BL6/Jの肝臓から樹立したオルガノイド(左写真)に40mMアセトアミノフェンを添加し、2日目のオルガノイド(右写真)。10mM投与群および20mM投与群と同様に、オルガノイドが増殖していない(スケールバー=800 $\mu$ m)

今年度(R4年度)の研究結果より、肝臓オルガノイドは、アセトアミノフェンの添加により、用量依存的に肝臓の逸脱酵素を分泌し、細胞生存性の活性も低下するなど、動物実験と同様の傾向が確認できた。

来年度(R5年度)研究において、オルガノイドの培養上清中のエクソソームRNAが、動物実験と同様に肝臓障害のバイオマーカーとなりうるのかを検証する。また、肝障害モデル化学物質として、アセトアミノフェンの他に四塩化炭素へのばく露実験も予定している。

## 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の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 年度は、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、昨年度 (令和 3 年度) に樹立することに成功した肝臓オルガノイドに対して、過剰投与により、肝障害を起こすことが知られるアセトアミノフェンをばく露し、肝障害が実験動物と同様に肝障害を起こし得るのかの検証を行った。

アセトアミノフェンの濃度依存的に、肝臓オルガノイドの細胞生存性が低下した。さらに、肝臓オルガノイドを培養していた培養上清を利用して、生化学検査を行ったところ、肝臓の逸脱酵素として知られる AST, ALT の上昇が観察された。(成瀬)

今年度の結果からは、肝臓オルガノイドは、動物実験と同様の挙動をする可能性を示しており、来年度 (令和 5 年度) において、肝臓オルガノイドの培養上清中のエクソソーム RNA を指標とした毒性評価が可能かについて、検証する予定である。(成瀬)

## E. 結論

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。

そこで、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、昨年度 (令和 3 年度) にマウスの肝臓より樹立に成功したオルガノイドに対して、過剰投与により肝臓障害を起こすことが知られるアセトアミノフェンを添加した。

その培養上清中には、アセトアミノフェンの濃度依存的に肝臓オルガノイドより逸脱酵素が分泌され、細胞生存性が低下するなど、*in vivo* の挙動に近い特徴を明らかにした。

今年度見られた結果が、*in vivo* を本当に反映しているのかは結論できないので、来年度研究において、分泌しているエクソソーム RNA に *in vivo* と違いはないのか、肝臓オルガノイド自身の遺伝子発現に *in vivo* と違いはないのかを検証する。

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, November, 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, 小川いづみ, 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。