

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：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。

・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、Atp7b 変異マウスおよび Peg10 KO マウスの作成を行った。

3年計画の2年目にあたる令和4年度の本分担研究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、昨年度に作成したウィルソン病モデルマウスの管理、および国立医薬品食品衛生研究所への導入を行い、また、Peg10 KO マウスが既報と同様に父親由来でヘテロアレルが子供に伝わると致死になることを確認した。

### 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で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。

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ブロン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。

#### ・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  $\mu$ M)、tracrRNA 溶液(100  $\mu$ M)、をRNase free waterにより10  $\mu$ 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  $\mu$ MのgRNAをOPTI-MEMで200 ng/ $\mu$ 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 $\mu$ g/ $\mu$ l)	4 $\mu$ l
・ gRNA 溶液(200 ng/ $\mu$ l)	8 $\mu$ l
・ oligoDNA (2 $\mu$ g/ $\mu$ l)	4 $\mu$ l
・ OPTI-MEM	24 $\mu$ 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  $\mu$ g)

37°Cで5分間インキュベート後に oligoDNA (ssODN or dsDNA, final: 200 ng/ $\mu$ 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, + / -

Atp7b 変異マウス、Peg10 KOマウスの作製においては、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使用する。

Atp7b エクソン8 変異マウス作製用 gRNA: #988 (CATGGGGGGCGTGTCAAAGA)、gRNA: #989 (GCGTGTCAAAGAAGGTCACG)

Atp7b エクソン8 変異マウス作製用 oligoDNA: CTGGTCATCCTGGTGGTGTGCTGTGGCTGAGAA GGCGGAGAGGAGCCCTGTGACATTCTTCGAC ATGCCCCCATGCTCTTTGTGTTTCATTGCCCT GGGCCGGTGGCTGGAACACTTGGCAAAGGTA ACAGCAGCTTCA

Atp7b エクソン11 変異マウス作製用 gRNA: #991 (GCTCCTTAAAGCTACCCATG)、gRNA: #992 (CTCCTTAAAGCTACCCATGT)

Atp7b エクソン11 変異マウス作製用 oligoDNA: GTCACCTAAGAAACCCGGAAGCACTGTAATTGC GGGGTCTATAAATGCACATGGCTCTGTGCTCA TTAAA\*CTACCCACGTGGGCAATGACACCACT TTGGCTCAGATTGTGAAACTGGTGGAAAGAG CTCAGATGTCAAAGGTAATGA

Peg10 KO マウス 作製用 gRNA: #1002 (GATGGCAACCCTGGCACGCT)、gRNA: #1003 (TGCTGAGACGAATGGGCGAT)

(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：R3-4 年度)

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。

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 (*Peg10* KO) マウスについては、CRISPR/Cas9 システムを用いて作製を行ない、1匹の遺伝子改変動物を得られた。

R4年度においては、*Peg10* KO マウスヘテロ♂と野生型マウス♀を交配させた場合、ヘテロアレルを持った胎児は全て初期胚致死となる一方、*Peg10* KOマウスヘテロ♀と野生型マウス♂を交配した場合には、ヘテロアレルを持ったF1マウスは全て正常に発生をした。この表現型は既報と同様であり、*Peg10* KOマウス作製に成功していると想定される。

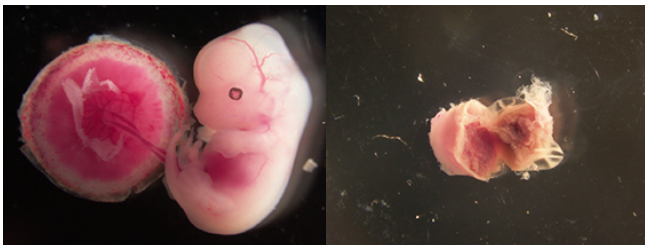


図: *Peg10* KO マウスヘテロ♂と野生型マウス♀を交配させた胎児 (12.5dpc)。野生型は正常な胎児発生と胎盤発生が見られる (左写真)。一方、*Peg10* KOマウスヘテロ (右写真) は、胎盤形成不全により初期胚致死となっていることがわかる。

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ということ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。

次世代型催奇形性評価法のパイロットスタディとして、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計画した。

*Atp7b* 遺伝子は、8回膜貫通型の銅輸送 ATPase であり、21個のエクソンより構成される。本研究においては、*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

CRISPR/Cas9 システムを利用したゲノム編集を行うことで、*Atp7b* 変異マウスを作製した。

産まれた変異マウス (F0 世代) のオンターゲット部位のゲノム編集結果が明らかになったものについては、変異アレル情報を記載した。

マウス名前	雌雄	アレル1	アレル2
Atp7b-ex8-01	♂	8bp deletion het	human type
Atp7b-ex8-02	♂	逆位配列の挿入	
Atp7b-ex8-03	♂		
Atp7b-ex8-04	♂	human type	1bp insertion
Atp7b-ex8-05	♀	10bp deletion	3bp deletion
Atp7b-ex8-06	♀		
Atp7b-ex8-07	♀	10 bp deletion homo	
Atp7b-ex8-08	♀		
Atp7b-ex8-09	♀		
Atp7b-ex8-10	♀	10 bp deletion homo	
Atp7b-ex8-11	♀		
Atp7b-ex8-12	♂	6bp deletion	
Atp7b-ex8-13	♂	large deletion	
Atp7b-ex8-14	♂		
Atp7b-ex8-15	♂		
Atp7b-ex8-16	♂	1bp deletion	
Atp7b-ex8-17	♀	5bp deletion	
Atp7b-ex8-18	♀	cand	
Atp7b-ex8-19	♀		
Atp7b-ex8-20	♀		
Atp7b-ex8-21	♀	human type	
Atp7b-ex8-22	♀	large deletion	
Atp7b-ex8-23	♀		

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変異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	
Atp7b-ex11-02	♂	2bp deletion homo	
Atp7b-ex11-03	♂	1bp deletion homo	

Atp7b-ex11-04	♂	2bp insert homo CC	
Atp7b-ex11-05	♂	1bp deletion homo C	
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-ex11-12	♂		
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変異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、昨年度に作製した Atp7b 遺伝子の変異マウスを詳細な解析のために、国立医薬品食品衛生研究所へと移送した。また、同様に、昨年度に作成した Peg10 KO マウスが、KO アレルが父親由来で伝わると全て致死となるが、母親由来で伝わると正常に生まれることを確認した。この結果、Peg10 KO マウスの雌個体を繁殖用にご利用することとし、国立医薬品食品衛生研究所へと移送した。

#### E. 結論

本分担研究は、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。

- ・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。

本分担研究は、R4 年度研究 (3 年計画の 2 年目) 研究において、以下の進捗が見られた。

- ・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 年度においては、作製した胎盤形成不全の表現型を持つ Peg10 KO マウスが、既報と同様に、KO アレルが父親由来で伝わると全て致死となるが、母親由来で伝わると正常に生まれることを確認した。

## 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。