

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：化学物質ばく露影響の病理学的解析

研究分担者：平林 容子

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・センター長

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

高橋裕次 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・第三室・室長

立原 江利加 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

内山 美樹 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

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。

・自然免疫として知られるI型インターフェロンの負の制御転写因子である Irf2 の欠損マウスにおいて誘導される種々の炎症反応に特異的に誘導されるエクソソーム RNA の同定する計画において、どのような炎症反応が見られるのか、病理組織学的検査および生化学検査病理組織学的検査および生化学検査を行うことを目的とした。Irf2 欠損マウスが、肝臓および腎臓において野生型には見られない髄外造血および肝細胞壊死が確認され、腎臓においては毛細血管が拡張した異常な糸球体像検出に成功した。

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となる 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。

本研究計画は、化学物質ばく露により生じる発生毒性に加えて、遺伝子改変により毒性を生じるモデルマウスを利用することで、様々な毒性のバイオマーカーを単離し、安全性が未知の化学物質に対しても、血液一滴より我々が単離した様々な毒性のバイオマーカーを検出することで、高精度にその毒性を予測することを可能にする独創的な研究である。

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

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。

・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。

・病理組織学検査 (R3-4 年度)

エクソソーム RNA の解析のために採血を行ったマウス個体より、肝臓および腎臓の採取を行い、10% neutral buffered formalin で臓器・器官の固定を行う。常法に従って、パラフィンブロック標本を作製し、薄切を行い、hematoxylin and eosin (H&E) 染色を行う。病理組織学的検査結果とエクソソーム RNA の解析の結果の比較を行い、エクソソーム RNA をバイオマーカーとした次世代有害性評価法の有効性を検証する。

・生化学検査 (R3-4 年度)

エクソソーム RNA を毒性指標としたバイオマーカーのバリデーションの一つとして、病理組織学検査に加えて、血清生化学検査を行う。

aspartate aminotransferase (AST) および alanine aminotransferase (ALT) の項目について、automatic blood chemistry analyzer Dry-Chem NX 500V (Fuji Film Co. Ltd, Tokyo, Japan) を利用して測定する。

R4 年度に測定を行う Atp7b 変異マウス (F0 世代・11 ヶ月齢) は、C57BL/6J ♀ と DBA/2 ♂ を交配して作製した F1 マウス由来の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、野生型のコントロールとして、C57BL/6J ♂、♀、129 SV/EV ♂、♀、および C3H/HeJ ♂、♀ マウス (各 10-12 ヶ月齢) の文献値 (Mazzaccara C., et al, PLoS ONE 2008) の平均を便宜上利用している。

(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

・炎症に特異的なエクソソーム RNA の同定 (小野、落谷、平林)

現在までに、エクソソーム RNA を発がんバイオマーカーの指標として利用した早期がん診断が行われ、さらに、我々は、化学物質投与による肝毒性評価の指標として、エクソソーム RNA を利用可能なことを証明してきた。本研究においては、催奇形性のバイオマーカーとなりうるエクソソーム RNA の同定を目的としているが、成体における骨格異常や、発達障害などの各種障害のバイオマーカーとしても利用可能と考えられる。

そこで、様々な表現型を持つ遺伝子変異を、発達障害などのモデルとして利用することとした。最初に、自己免疫疾患マウスモデルとして知られる *Irf2* 欠損マウスに特異的なエクソソーム RNA が存在するのかの解析を行った。

同腹由来の6匹の雌(5ヶ月齢:野生型4匹、*Irf2* hetero 1匹、*Irf2* KO 1匹)の解剖を行い、肝臓および腎臓の病理解析、採血を行い、血液生化学検査およびエクソソームRNAの網羅的解析を行った。

Irf2 KO マウスにおいては、体重は野生型と変わらないが、肝臓が野生型の1.8倍、腎臓が1.5倍の重量があった。*Irf2* KO マウスの肝臓における H&E 像では、肝細胞の壊死、および、肥大が確認された。

また、野生型では見られない髄外造血像も確認された。肝臓の重量増加は、これらが原因であると考えられる。

一方、腎臓における H&E 像では、野生型では、糸球体にしっかりと内皮細胞が確認され、毛細血管も正常な形態を維持しているが、*Irf2* KO マウスの糸球体においては、正常な内皮細胞の欠落、および毛細血管の拡張が確認された。

このように、自己免疫疾患を起こすことにより、様々な病変を持つ *Irf2* KO マウスに特異的なエクソソーム RNA を同定し、その詳細を解析することで、様々な病変に対するバイオマーカーの同定につながる。

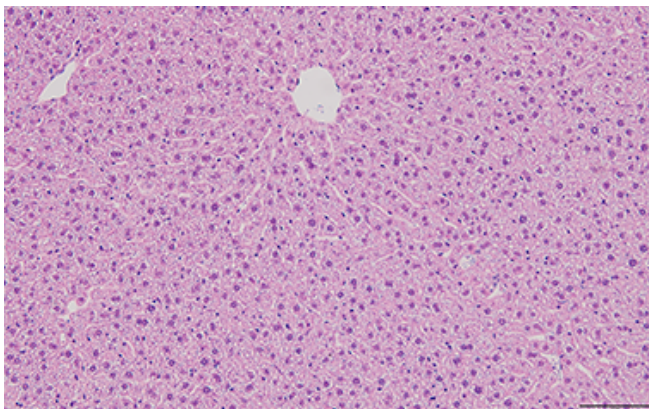


図: 野生型マウス (5ヶ月齢) の肝臓におけるH&E染色像。

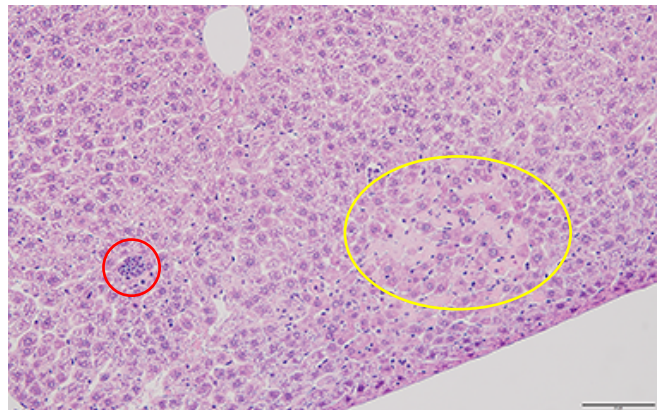


図: *Irf2* KO マウス(5ヶ月齢)の肝臓におけるH&E染色像。野生型には見られていない髄外造血像(赤丸)、および肝細胞壊死(黄色丸)が確認された。

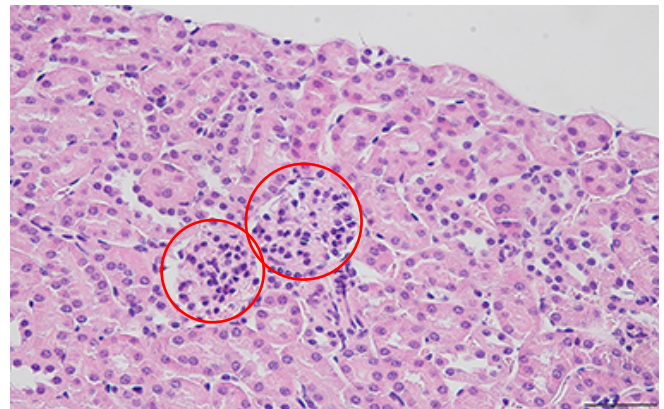


図: 野生型マウス(5ヶ月齢)の腎臓におけるH&E染色像。正常な糸球体像(赤丸)が確認できる。

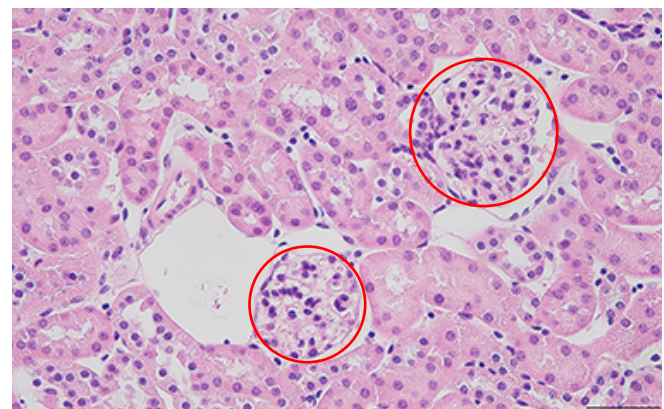


図: *Irf2* KO マウス(5ヶ月齢)の腎臓におけるH&E染色像。内皮細胞を欠き、毛細血管が拡張した異常な糸球体像(赤丸)が確認できる。

・血液生化学

H&E 染色像の解析を行った、野生型、Irf2 hetero マウス、Irf2 KO マウスの血液を採取し、血清成分の抽出を行い、血液生化学解析を行った。

その結果、肝臓障害のマーカーである AST および ALT については、野生型と比較して高い値を示した。また、腎臓障害のマーカーである BUN および CRE については、BUN では変化がないが、CRE が高い値になっており、肝臓、腎臓ともに、病理切片から予想された通りに、野生型と比較して機能低下が確認された。

	AST(U/l)	ALT(U/l)	BUN(mg/dl)	CRE(mg/dl)
WT1	75	18	20.9	0.23
WT2	87	23	26.2	0.17
WT3	78	25	32.8	0.27
WT4	83	19	27.2	0.17
KO	127	74	24.9	0.70
hetero	52	25	27.8	0.19

図: 野生型、Irf2 KO マウスにおける血液生化学解析の結果

・銅毒性モデルマウス (Atp7b 変異マウス (F0 世代)) の病理学的解析 (R4 年度)

H&E 染色標本作製による解析では、エクソン 8 変異マウスおよびエクソン 11 変異マウスの肝臓では、共に部分的に肝細胞の肥大およびネクローシス像が観察された。

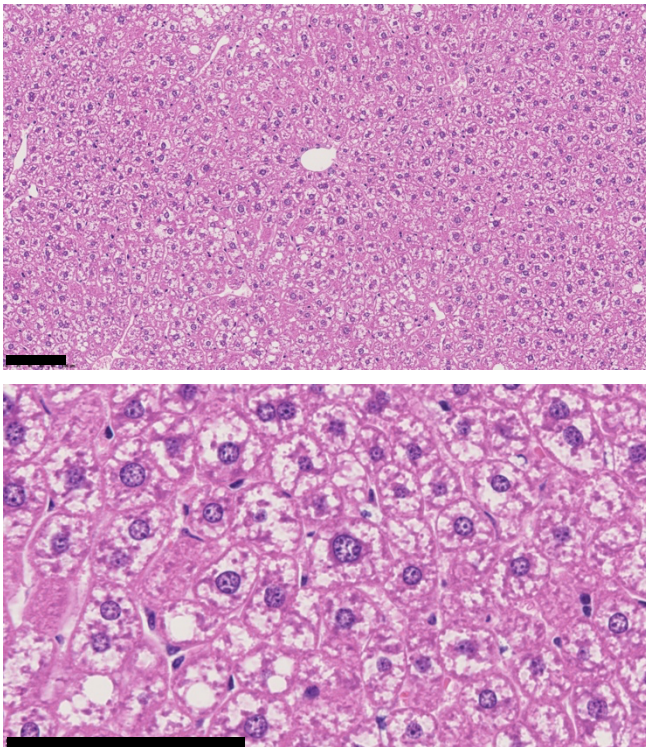


図: 野生型 (12ヶ月齢) の肝臓におけるH&E染色像。下写真は、上写真を拡大。スケールバー; 100µm

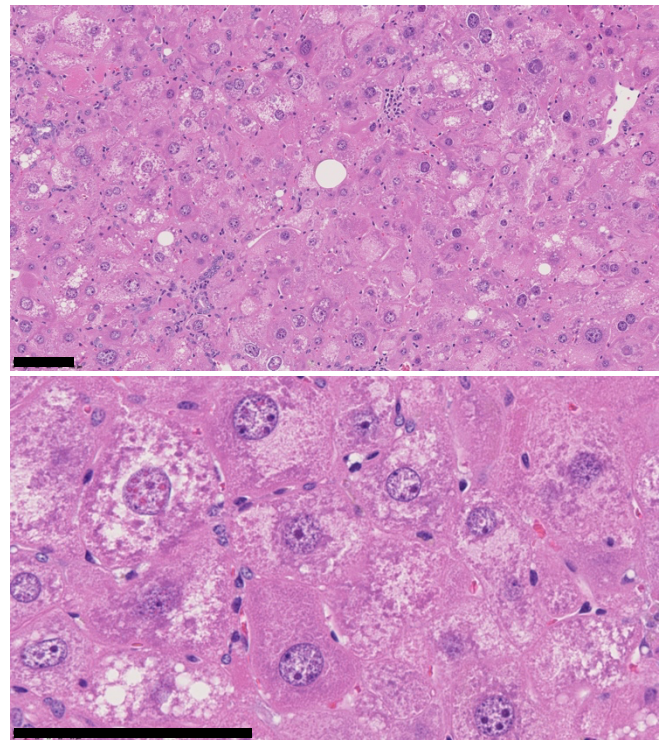


図: Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢) の肝臓におけるH&E染色像。野生型と比較して、巨核となっており、また肝細胞に肥大およびネクローシスが観察される。

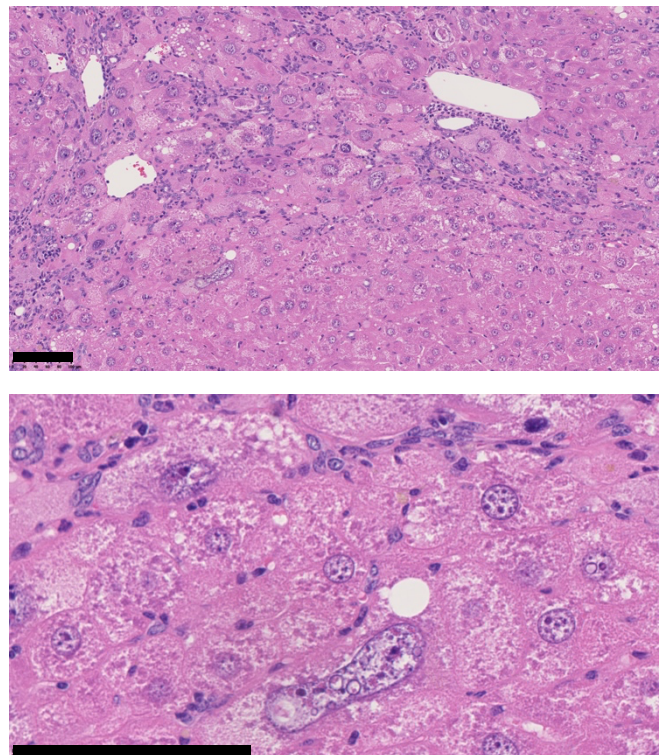


図: Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢) の肝臓におけるH&E染色像。野生型と比較して、巨核となっており、また肝細胞に肥大およびネクローシスが観察される。

・銅毒性モデルマウス (Atp7b 変異マウス (F0 世代))
の血液生化学 (R4 年度)

H&E 染色像の解析および銅濃測定を行ったエクソン8変異マウス、エクソン11変異マウス、および、野生型マウスの血液を採取し、血清成分の抽出を行い、血液生化学解析を行った。

その結果、肝臓障害のマーカーである AST および ALT については、野生型と比較して高い値を示した。

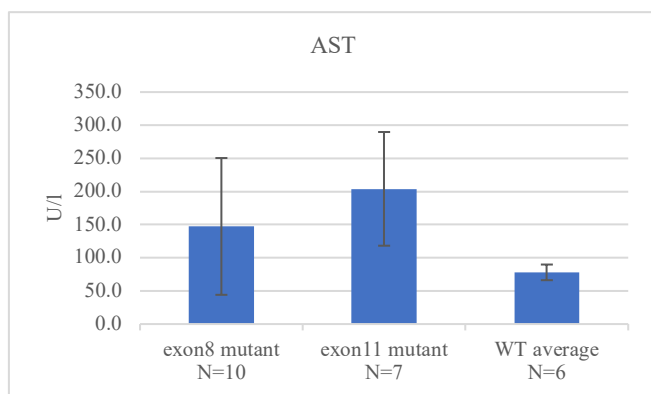


図: Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢・N = 10)、Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢・N = 7)、および、野生型 (10-12ヶ月齢) の血清中のASTの値 (U/l)。

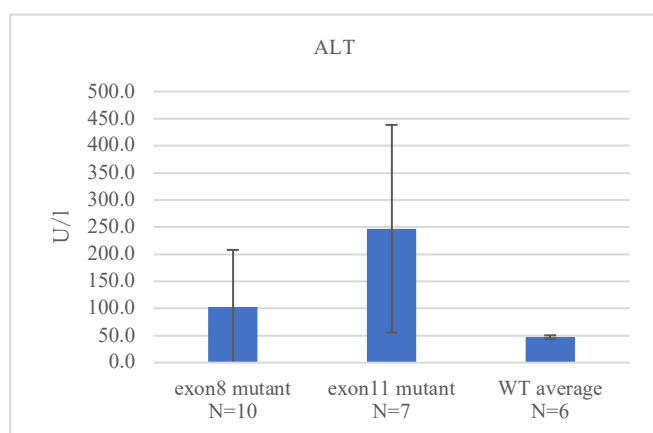


図: Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢・N = 10)、Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢・N = 7)、および、野生型 (10-12ヶ月齢) の血清中のALTの値 (U/l)。

また、腎臓障害のマーカーである BUN および CRE については、BUN では変化がないが、CRE が高い値になっており、腎臓においても毒性があると想定される。R5 年度において腎臓の病理切片の解析を行う予定である。

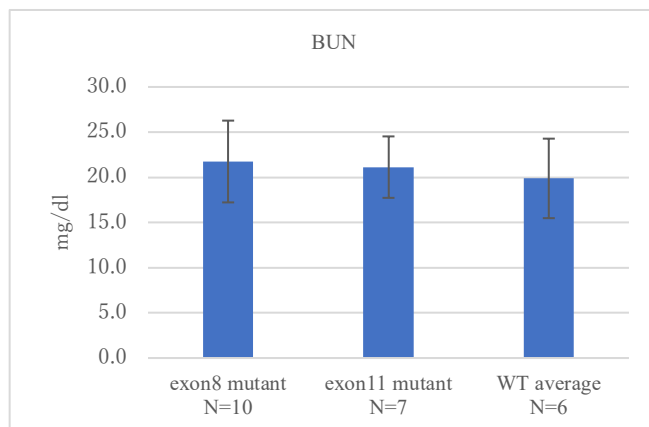


図: Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢・N = 10)、Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢・N = 7)、および、野生型 (10-12ヶ月齢) の血清中のBUNの値 (U/l)。

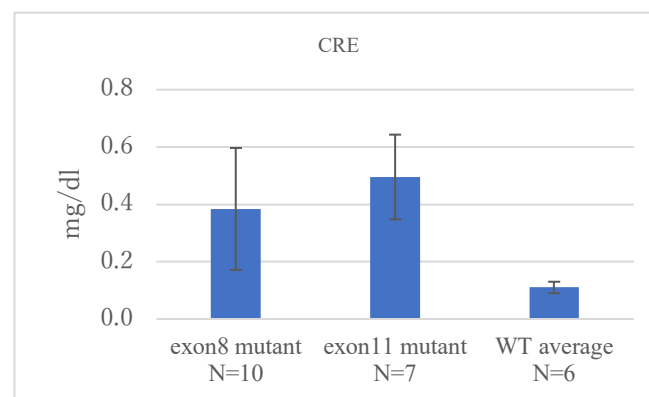


図: Atp7b エクソン8変異マウス (11ヶ月齢・N = 10)、Atp7b エクソン11変異マウス (11ヶ月齢・N = 7)、および、野生型 (10-12ヶ月齢) の血清中のCREの値 (U/l)。

D. 考察

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が、病理解析によっても炎症反応を確認している。

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。

本分担研究においては、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 Atp7b 変異マウスの血液生化学試験で、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ーシス像が見られた。

E. 結論

次世代型催奇形性評価法のパイロットスタディとして、遺伝子改変マウスの各種表現型のモデルとして利用することで、効率的に各種表現型のバイオマーカーを単離することを目指している。R3年度には、自己炎症疾患のマウスモデルとなる Irf2 欠損マウスの炎症反応像を検出している。令和4年度においては、Atp7b 変異マウスの病理解析結果から、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。

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- β -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。