

II. 分担研究報告書

エクソソーム RNA を毒性指標とした
次世代型生殖発生毒性評価法の開発に資する研究
(24KD1004)

令和 6 年度 分担研究報告書

分担研究課題：次世代型毒性試験の in vitro モデル開発

研究分担者 成瀬 美衣
国立感染症研究所・ウイルス第一部
主任研究官

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・
特任教授

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

研究協力者

吉岡祐亮 医学総合研究所・分子細胞治療研究部門・講師
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
野崎弘枝 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

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催奇形性を判断するには莫大な時間や労力以外に、観察者の経験に依存する部分や、基準が必ずしも一定とは言えない部分がある。

近年、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、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2・R3-R5 年度、代表：小野竜一）にて、エクソソーム RNA を毒性指標とすることで、成獣の血液 1 滴から全身の病理組織学的診断が可能な次世代型毒性試験法の開発、および、妊娠動物の母体血および羊水から胎児の催奇形性を検出する高感度な系の開発に世界にさきがけて成功した（Ono R. et al., *Toxicology Reports* 2020、Ono R. et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024）。

しかし、毒性指標となる体液由来エクソソームが本当に標的とする臓器より分泌されたのかという疑問があった。我々は、目的の細胞・臓器が分泌するエクソソームのみを可視化および単離可能な“エクソソーム可視化マウス”の作製に成功し、世界で初めて、肝臓由来のエクソソームを可視化し、肝毒性バイオマーカーが確かに肝臓に由来するエクソソームに由来することの証明に成功している（論文投稿準備中）。

そこで、本研究は、我々が開発した母体血および羊水中のエクソソームを指標にした新規生殖発生毒性評価法に新たに開発に成功した“エクソソーム可視化マウス”を活用することで、毒性機序に基づいた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生殖発生毒性評価法を開発することを目的としている。

3年計画の1年目にあたる令和6年度の進捗は以下の通りである。

動物実験に代わる次世代型の評価法を目指し、*in vivo* の特性を高度に保持する *in vitro* モデルとして注目されるオルガノイド 3D 培養系の上清中に含まれるエクソソームを毒性指標として利用する可能性についても検討した。今年度は、肝臓特異的（アルブミン陽性細胞特異的）にヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現する肝臓オルガノイドを樹立することに成功した。また、超解像度共焦点顕微鏡による観察およびシングルエクソソーム解析を行い、培養中の肝臓オルガノイドではアルブミン陽性の分化した肝細胞が一部しか存在しないことを確認した。

令和6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催奇形性を判断するには莫大な時間や労力以外に、観察者の経験に依存する部分や、基準が必ずしも一定とは言えない部分がある。

近年、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、厚労科研・化学物質リスク事業（H30-R2・R3-R5 年度、代表：小野竜一）にて、エクソソーム RNA を毒性指標とすることで、成獣の血液1滴から全身の病理組織学的診断が可能な次世代型毒性試験法の開発、および、妊娠動物の母体血および羊水から胎児の催奇形性を検出する高感度な系の開発に世界にさがけて成功した (Ono R. et al., *Toxicology Reports* 2020、Ono R. et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024)。

しかし、毒性指標となる体液由来エクソソームが本当に標的とする臓器より分泌されたのかという疑問があった。我々は、目的の細胞・臓器が分泌するエクソソームのみを可視化および単離可能な“エクソソーム可視化マウス”の作製に成功し、世界で初めて、肝臓由来のエクソソームを可視化し、肝毒性バイオマーカーが確かに肝臓に由来することを証明することに成功している（論文投稿準備中）。

そこで、本研究は、我々が開発した母体血および羊水中のエクソソームを指標にした新規生殖発生毒性評価法に新たに開発に成功した“エクソソーム可視化マウス”を活用することで、毒性機序に基づいた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生殖発生毒性評価法を開発することを目的としている。

＜各年度の目標＞ 令和6年度・先行研究で得られた母体血および羊水中のエクソソーム RNA を生殖発生毒性物質によるマウスモデル動物の作成およびマイクロサンプリングを行う。

令和7年度・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解析を行う。妊娠動物において、胎児のみを“エクソソーム可視化マウス”を利用することで、胎児由来のエクソソームのみを可視化、および単離を行ない、毒性機序に基づいた次世代型生殖発生毒性評価法の高度化を行う。

令和8年度・次世代型生殖発生毒性評価法のバリデーションおよびガイドライン化に向けての施策検討

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。

●次世代型生殖発生毒性試験の開発（研究代表者：小野、研究分担者：桑形、平林）

エクソソーム RNA を腹単位の毒性指標とする次世代型生殖発生毒性試験を開発するために、妊娠マウスに既知の生殖発生毒性物質を経口投与し、母動物の毒性検出、および、胎児に発現する形態変化から毒性指標となる母体血および羊水中のエクソソーム RNA の同定を次世代シーケンス解析により行う。

●次世代型生殖発生毒性試験の高度化（研究分担者：落谷、伊川、研究代表者：小野）

我々は既に、様々な毒性バイオマーカーとなるエクソソーム RNA の報告をしているが、それらが実際にどの細胞・臓器に由来したのかは確定できていなかった。そこで、任意の臓器（細胞）に由来したエクソソームの表面にのみ特異的にヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現させる遺伝子改変マウス（エクソソーム可視化マウス）を作製し、目的臓器由来のエクソソームのみを検出・単離することに成功した。この“エクソソーム可視化マウス”を用いることで、母体血中のエクソソームを母体に由来するもの、胎児に由来するものに完全に分けての検出が可能になり、評価法の高度化に大きく寄与する。また、毒性バイオマーカーとなるエクソソーム RNA の遺伝子改変マウスを作成することにより、毒性メカニズムへの関与について検証を行う。

●次世代型毒性試験の *in vitro* モデル開発（研究分担者：成瀬、研究代表者：小野）

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評価を行う。

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、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。

・マウス血液からのエクソソーム RNA 単離（

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、エクソソームの表面タンパクに対する抗体をコーティングしたチップ上でエクソソームを捕捉して特定のエクソソームを単離可能な EXOVIEW を利用することで単離されたエクソソームの大きさと分布、数のカウント、および、シングルエクソソーム上に存在するタンパクの同定を行うことで、エクソソームが由来した細胞の同定が可能になる。

・マウスを用いたトリコスタチン A 経口投与による母動物血清中並びに胎児及び羊水中エクソソームの解析のための試料採取法

二分脊椎や無脳症、脳瘤などの神経管閉鎖障害を誘発するバルプロ酸を催奇形性陽性対照物質として、マウスの神経管閉鎖時期である妊娠 9 日から 11 日にバルプロ酸を 0、300、600 mg/kg の 3 用量経口投与し、妊娠 15 日目に、母動物血清および羊水（胎盤、卵黄嚢膜、胎児）をエクソソーム解析用に採取し、胎児の外表面奇形の観察を行なっている。そこで、外表面奇形の有無を検出するエクソソーム RNA を毒性指標としてバイオマーカーの単離を行なった。

得られたバイオマーカーは、Hbb-y 遺伝子の RNA 断片であった。

この遺伝子は、本来、妊娠 15 日目には不活化される Hbb-y 遺伝子の発現が、奇形胎児でのみ発現が誘導されているものである。

投与物質であるバルプロ酸は、ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC の活性を阻害することが知られており、本来、エピジェネティック制御により不活性化される Hbb-y 遺伝子の発現がエピジェネティック異常により発現が誘導されているものと考えられる。このことから、バルプロ酸と同様に HDAC 阻害作用を持つトリコスタチン A（TSA）を投与し、バルプロ

酸と同様に催奇形性作用があるのかを観察し、また、母体血および羊水中のエクソソーム RNA を毒性バイオマーカーとしてスクリーニングを行う。

投与物質：トリコスタチン A
製造元：東京化成工業株式会社
CAS 番号：58880-19-6
分子量：302.37 g/mol

ロット番号：WXBD4552V
純度：>98.0%(HPLC)
性状：白色、粉末
保管条件：密栓、冷暗所

1-2. 媒体

名称：0.5 w/v%メチルセルロース溶液（略称：0.5% MC溶液）
製造元：富士フィルム和光純薬株式会社
ロット番号：CAE0466

媒体の調製

必要量のトリコスタチン A を秤取し、0.5%MC 溶液に徐々に加えて分散させた。調製後、遮光し、冷蔵保存した。

使用動物

動物種：マウス（SPF）
系統：C57BL/6J
供給源：ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社、厚木飼育センター
入荷時週齢：雌 10 週齢、雄 11 週齢
匹数：交配用雄 12 匹、雌 24 匹
使用した妊娠動物：4 匹

入荷後 1 週間の検疫・馴化期間を経て、一般状態及び体重推移に異常のない動物を用いた。

交配：11 週齢以上の雌 1 匹に 12 週齢以上の雄 1 匹を終夜同居させた。翌朝、膈内に膈栓が確認された雌を交尾成立動物とし、その日を妊娠 0 日とした。

群分け：交尾成立日（妊娠 0 日）ごとに行い、妊娠 0 日の体重を基に各群の体重が可能な限り均等となるようにした。

2. エクソソーム解析用試料採取試験

2-1. 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

投与経路は臨床適用経路である経口投与を選択し、投与期間は妊娠 8 日より 9 日までの 2 日間、および、7 日より 11 日までの 5 日間とした。

2-2. 投与方法

投与方法は、げっ歯類の経口投与方法に際して一般的な強制経口投与とした。

トリコスタチン A 溶液を胃ゾンデを用いて胃内に強制経口投与した（8:00~11:00 の間）。動物ごとの投与液量（表示単位：0.01 mL）は投与当日の体重を基準に算出した。

2-3. 投与量及び群構成

投与量は 0、1 及び 10 mg/kg の 3 用量とし、媒体対照群を含め試料採取時点を考慮した 6 群構成とした。すなわち、媒体対照群、1 及び 10 mg/kg 群に妊娠 12 日剖検群、妊娠 15 日剖検群をそれぞれ設けた。剖検群ごとの交尾成立雌動物数を 4 匹とした。

投与量設定根拠

既報によると、トリコスタチン A(TSA) の静脈内(10、25、50 µg/kg 体重)および経口(20、50、100 µg/kg 体重)の 14 日間反復投与毒性試験を *Swiss albino mice* で実施し、死亡例や体重、食物摂取量、血液・尿検査、臓器重量に有意な変化は見られなかったが、高用量群では腎臓の腫大、充血、変色が認められ、組織学的には糸球体および尿細管の変性が確認されている一方、遺伝毒性試験ではいずれの用量でも有意な変化は見られていない。この結果から、静脈内では 25 µg/kg、経口では 50 µg/kg を NOAEL としている(Haritwal T. et al., *Drug and Chemical Toxicology* Volume 47, 2024 - Issue 6, 2024)。

また、TSA の妊娠マウスへの投与については、妊娠 8 日に 0, 2, 4, 8, 16mg/kg で投与した報告があるが、着床部位数、死亡胎児数、および吸収胎児数、平均胎児体重、外表奇形は認められていない。しかし、骨格を解析すると、TSA 曝露群の胎児では、特異的かつ用量依存的な椎骨または肋骨の癒合、椎体セグメントの重複などの体軸の異常が観察されている。

本研究においては、妊娠中に VPA を服用した場合や、妊娠マウスへの VPA 投与実験で見られる神経管閉鎖障害や指形成不全が見られる条件検討を行うために、妊娠 8 日より 2 日間の反復投与、および、妊娠 7 日より 5 日間の反復投与を 10 mg/kg を最高用量とし、低用量として 1 mg/kg として行なった。

2-5. 剖検

妊娠 12 日剖検群、妊娠 15 日剖検群において、イソフルラン吸入麻酔下で心採血した後、体外表、胸腔内及び腹腔内の主要器官/組織を詳細に観察した。また、肝臓、腎臓、脾臓の重量を測定し、肝臓、腎臓についてはその後の遺伝子発現解析およびタンパク解析用の採材を行い、肝臓、腎臓、脾臓は病理解析を行う。

2-6. 帝王切開及び母血清中エクソソーム解析用試料採取

剖検時に、着床の有無を肉眼的に観察して、妊娠の成否を確認した。妊娠が認められた母動物については、子宮内の生存胎児数、死亡胚・胎児数を判定・記録した。生存胎児と死亡胚・胎児の総数を着床数とした。

2-7. 母動物血清中エクソソーム解析用試料の処理

血液をポリプロピレン製容器（タンパク低吸着）に移し、室温で30分以上放置した後、遠心分離（4℃、3000 ×g、10 分間）により血清を得た。得られた血清試料は試験番号、試料採取時点、動物番号、試料番号、採血年月日、試料名を明記したラベルを貼付したタンパク低吸着チューブに入れ、測定時まで-80℃の冷凍庫（許容値：-70℃以下）に保存する。

2-8. 羊水、胎児、胎盤の採取

1) 採取日及び採取時点

妊娠 12 日剖検群：各群 4 例

最終投与 1 時間後（09:00~12:00 の間）

妊娠 15 日剖検群：各群 4 例、

妊娠 12 日帝王切開とほぼ同じ時刻
（09:00~12:00 の間）

2) 対象部位（サンプル）の採取

妊娠動物の子宮壁を切開後、卵黄囊膜の外側から切開し、バリアチップで羊水をポリプロピレン製容器（タンパク低吸着）に採取した。羊水を採取した後、卵黄囊膜に被包された胎児及び胎盤を摘出した。胎児と胎盤を分離し、個別に重量を記録した。胎盤はほぼ均等に 2 分割し、それぞれ RNA later と 10%リン酸緩衝ホルマリン液を満たした 15 mL のコニカルチューブに保管した。羊水は遠心分離（4℃、6000 ×g、2 分間）後、上清をバリアチップでタンパク低吸着チューブに移した。胎児は 10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、特に神経管の閉鎖状態に注目し、形態観察を実施した。

・エクソソーム RNA 網羅的遺伝子発現解析

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

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。

・生化学検査

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。

・遺伝子改変マウスを利用したエクソソームの由来した臓器の特定

エクソソームの表面には CD9, CD63, CD81 などのテトラスパニンが存在する。そこで、臓器、細胞特異的に CD9-EGFP 融合タンパクを発現させることで、特定の細胞から分泌されるエクソソームのみが CD9-EGFP 融合タンパクを持つことで、エクソソームがどの臓器に由来したのかを検出することが可能にな

る。本研究で利用するマウス系統は以下の通りである。

CD9-EGFP ノックイン (KI) マウス (エクソソーム可視化マウス)

エクソソームはすべての臓器および細胞から分泌される細胞小胞であり、その表面には CD9、CD63、CD81 などが多く存在する。本マウスは、ROSA26 領域にチキン β アクチンプロモーターを配置し、Cre-loxP システムを利用することで臓器特異的にヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現するよう設計されたノックインマウスである。

Alb-Cre トランスジェニックマウス

肝細胞に特異的に Cre 酵素を発現するトランスジェニックマウスであり、肝臓特異的な遺伝子発現制御の研究に利用される。

Sox2-Cre トランスジェニックマウス

胚盤葉上層 (epiblast) および卵に特異的に Cre 酵素を発現するトランスジェニックマウスであり、初期発生過程の解析や遺伝子操作に用いられる。

・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

CD9-EGFP KI マウス (flox マウス) と Alb-Cre トランスジェニックマウスを交配して作成した flox/Alb-Cre マウスの肝臓を採取する。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。その後に 40 μ m 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砕した後、MBOC (Matrigel Bilayer Organoid Culture) 法を用いて細胞をマトリゲルに包埋し、至適培地を添加し培養することでオルガノイドを樹立する。

樹立に成功した肝臓オルガノイドを超解像度共焦点顕微鏡で観察することで、エクソソームの可視化を行う。

(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

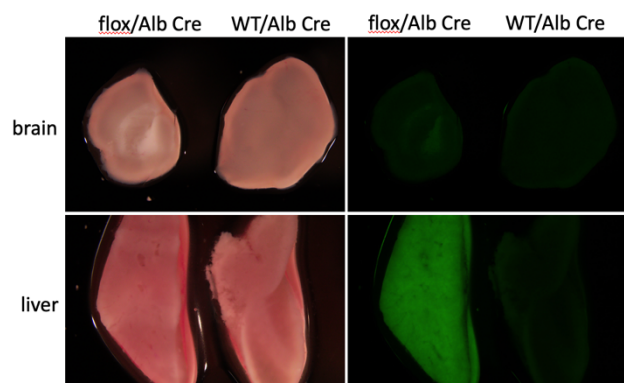
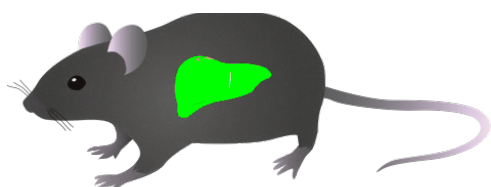
●次世代型毒性試験の *in vitro* モデル開発（研究分担者：成瀬、落谷、研究代表者：小野）

将来的な動物実験によらない安全性評価法の確立が多方面より求められており、生殖発生毒性評価法の開発と並行して、我々が既に単離した肝障害のバイオマーカーとなるエクソソーム RNA が、肝臓オルガノイドの培養上清中のエクソソームでも同様に検出されるものなのかを検討するために行なっている。

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評価を行う。

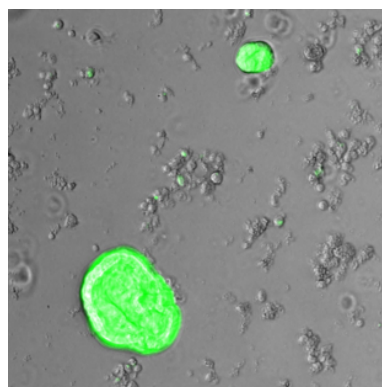
本研究では、成熟した hepatocyte に分化した細胞でのみ CD9-EGFP 陽性となる系なので、オルガノイド研究の最大懸案である臓器を反映したオルガノイドの分化条件を、EGFP 陽性細胞を指標とすることで最適化することが可能な優れたアッセイ系を確立できると考えている。

今年度は、CD9-EGFP Knock-in (KI) マウス (flox) マウス (♂) と肝臓特異的に Cre を発現する Alb Cre トランスジェニックマウスを交配することで、肝臓特異的にヒト CD9-EGFP を分泌するマウスを作製し、その肝臓よりオルガノイドの樹立を行なった。



図：肝臓特異的にヒト CD9-EGFP を発現する flox/Alb Cre マウスの臓器を蛍光観察すると、一例として、脳では EGFP が陰性であるが、肝臓では、EGFP の発現が誘導されている。

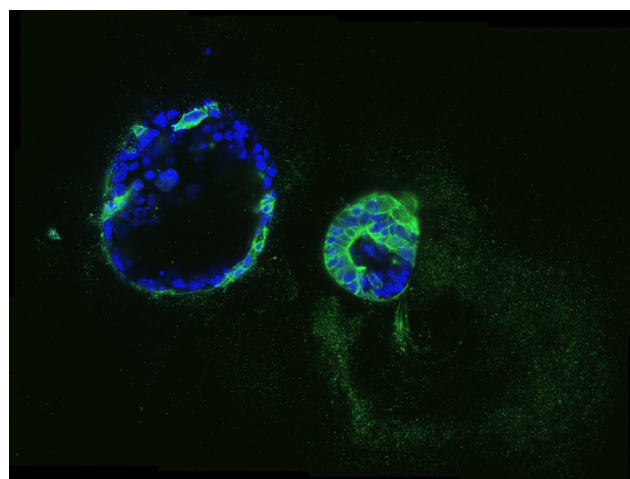
その結果、下図の通り、EGFP 陽性の肝臓オルガノイドの樹立に成功した。



図：肝臓特異的にヒト CD9-EGFP を発現する flox/Alb Cre マウスの肝臓より樹立したオルガノイドは、蛍光観察すると、EGFP 陽性になっている。

さらに、超解像度共焦点顕微鏡を利用して flox/Alb Cre 肝臓オルガノイドを観察したところ、下図の通り、肝臓オルガノイドの全体で EGFP 陽性になっているわけではなく、一部の細胞は EGFP 陰性になっていることがわかった。これは、肝臓のオルガノイドは、hepatic stem cell が未分化な状態で細胞増殖し、それらが分化して hepatocyte になることで、初めてアルブミンを分泌するようになり、それにより、Alb Cre の発現が誘導されることで、Cre-loxP システムが働きヒト CD9-EGFP の発現が誘導されるようになるからである。

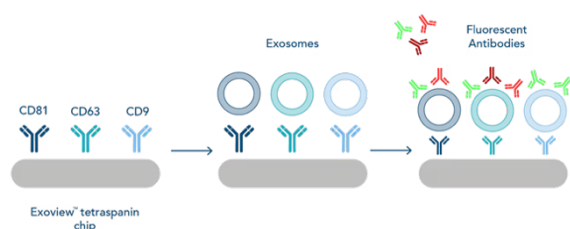
また、超解像度共焦点顕微鏡像からは、EGFP 陽性細胞から、単一エクソソームが多数分泌されている様子が下図の通りに検出できている。



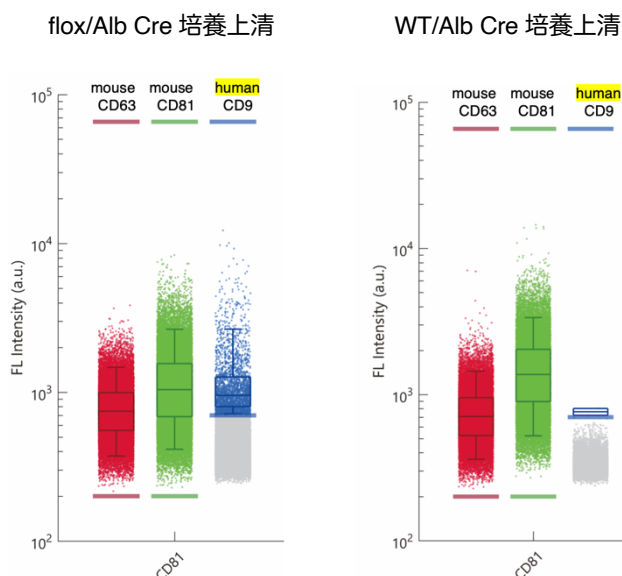
図：肝臓特異的にヒト CD9-EGFP を発現する flox/Alb Cre マウスの肝臓より樹立したオルガノイドを超解像度共焦点顕微鏡で観察すると、オルガノイドが hepatocyte に分化した細胞でのみ EGFP 陽性になっている様子が検出され、また、それらの陽性細胞からは、エクソソームの粒子が分泌される様子が観察されている。

ここで、**flox/Alb Cre** 肝臓オルガノイドから、培養液中にエクソソームが多数分泌されていることが検出できたので、培養液中に分泌されたエクソソームのシングルエクソソーム解析を行うことで、培養液中に存在するエクソソームのうち、どれくらいが **EGFP** 陽性細胞より分泌されているのかを検出することとした。

シングルエクソソーム解析には、**Exoview imager** を利用することとした。**Exoview** は、下図にある様に、チップ上にプリントされた抗テトラスパニン抗体により、エクソソームを捕捉し、その捕捉されたエクソソームを他のエクソソームタンパクに対する最大3種類の蛍光抗体によりシングルエクソソーム解析を可能にする。本研究においては、ヒト **CD9** 抗体、マウス **CD63** 抗体、マウス **CD81** 抗体を用いて解析を行うことにより、エクソソーム上に存在するヒト **CD9-EGFP** をシングルエクソソーム単位で検出し、カウントすることが可能になる。



図：Exoviewの概略。ExoViewは、チップ上にプリントされた抗体上に単一のエクソソームを捕捉し、蛍光抗体を用いることでエクソソームの表面タンパク質をカウントおよび識別することが可能になる。（図引用：<https://www.ptglab.co.jp/news/blog/new-ways-to-study-the-elusive-exosome/>）



図：Exoviewを利用した **flox/Alb Cre** 肝臓オルガノイド（左）および **WT/Alb Cre** 肝臓オルガノイド（右）の培養上清のシングルエクソソーム解析。エクソソームを検出するための蛍光抗体には、マウス **CD63**（赤点）、マウス **CD81**（青点）、ヒト **CD9**（緑点）抗体を用いており、ヒト **CD9** 抗体では、ヒト **CD9-**

EGFP 陽性エクソソームのみを検出している。

シングルエクソソーム解析の結果、**flox/Alb Cre** 肝臓オルガノイドの培養上清でのみ、ヒト **CD9** 陽性エクソソームが検出された。このことから、我々の作製したシングルエクソソーム解析系が機能していることを示すことができた。

D. 考察と結論

考察

本研究は、動物実験に依存しない次世代型毒性評価法の確立を目指し、肝オルガノイドを用いた *in vitro* モデルの開発を行ったものである。特に、肝障害時に放出されることが知られているエクソソーム RNA バイオマーカーが、肝オルガノイドの分泌するエクソソームにも反映されるかどうかを検証する点に特徴がある。

CD9-EGFP KI マウスと Alb-Cre マウスを交配することで、肝臓特異的に EGFP 標識されたエクソソームを分泌するオルガノイドを樹立し、EGFP 発現が分化した hepatocyte に限定されるという特性を活かして、オルガノイドの成熟度を可視化・定量化できるアッセイ系を構築した。さらに、超解像度共焦点顕微鏡および Exoview によるシングルエクソソーム解析を組み合わせることで、EGFP 陽性細胞に由来するエクソソームの可視化および定量が可能であることを示した。

この成果により、分化の指標を内在的に持つオルガノイドモデルが確立され、細胞の分化段階とエクソソーム分泌の関係性の検討や、毒性による分泌変化の評価に応用できる可能性が見出された。

結論

本研究により、肝臓特異的に CD9-EGFP を発現するマウス由来の肝オルガノイドを用いて、成熟した hepatocyte に由来するエクソソームを選択的に検出・解析できるアッセイ系を確立した。このシステムを用いることで、毒性物質曝露に対するエクソソーム応答の評価が動物実験を用いずに可能となるだけでなく、オルガノイド分化の最適化にも寄与する。以上より、本モデルは将来的な動物実験代替法として有望な *in vitro* 毒性評価プラットフォームとなることが期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

●Ryuichi Ono, Makiko Kuwagata, Mie Naruse, Akihito Watanabe, Masao Takano, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(1): 37-56. [doi.org/10.2131/fts.11.37]

Fujioka T, Shiura H, Ishii M, Ono R, Endo T, Kiyonari H, Hirate Y, Ito H, Kanai-Azuma M, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F
Targeting of retrovirus-derived Rtl8a/8b reduces social response and increases apathy-like behavior associated with GABRB2 reduction
OPEN BIOLOGY 2025 Jan;15(1):240279. [doi: 10.1098/rsob.240279].

●小野 竜一
非臨床安全性評価における New approach methods としての細胞外小胞の活用
医学のあゆみ Vol.291 No.9 2024. 11. 30

Makiko Kuwagata, Yuko Doi, Hirokatsu Saito, Mariko Tsurumoto, Toshime Igarashi, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(4): 169-181. [doi.org/10.2131/fts.11.169]

Toshio Imai, Rikako Ishigamori, Mie Naruse, Masako Ochiai, Yoshiaki Maru, Yoshitaka Hippo, Yukari Totsuka
Bridging toxicological properties of environmental chemicals between animals and humans using healthy organoid systems
J Toxicol Sci. 2024;49(10):425-434. doi: 10.2131/jts.49.425.

●Yamamoto T, Nakayama J, Urabe F, Ito K, Nishida-Aoki N, Kitagawa M, Yokoi A, Kuroda M, Hattori Y, Yamamoto Y, Ochiya T.
Aberrant regulation of serine metabolism drives extracellular vesicle release and cancer progression. *Cell Rep.* 2024 Aug 27;43(8):114517.

Age-associated aberrations of the cumulus-oocyte interaction and in the zona pellucida structure reduce fertility in female mice.
Ishikawa-Yamauchi Y, Emori C, Mori H, Endo T, Kobayashi K, Watanabe Y, Sagara H, Nagata T, Motooka D, Ninomiya A, Ozawa M, Ikawa M.

Commun Biol. 2024 Dec 24;7(1):1692. doi: 10.1038/s42003-024-07305-z.

TEX38 localizes ZDHHC19 to the plasma membrane and regulates sperm head morphogenesis in mice.
Kaneda Y, Lu Y, Sun J, Shimada K, Emori C, Noda T, Koyano T, Matsuyama M, Miyata H, Ikawa M.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2025 Mar 11;122(10):e2417943122. doi: 10.1073/pnas.2417943122. Epub 2025 Mar 3.

2. 学会発表 (抜粋)

●Ryuichi Ono, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Yusuke Yoshioka, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima
Detection of EVs in Hepatotoxicity Using CD9-mEmerald Reporter Mouse
INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXTRACELLULAR VESICLES ANNUAL MEETING 2024, (2024.5.12, Melbourne, Australia) 、口頭

五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋 雄、桑形麻樹子、北嶋 聡：ゲノム編集によるノックインマウス作製時に生じた、オンターゲット部位の多様な変異とその次世代伝達、第 71 回日本実験動物学会総会、京都、2024 年 5 月 29 日、ポスター

●Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S
バルプロ酸 (VPA) の妊娠マウスへの反復投与により誘導される羊水由来の細胞外小胞 Small RNA
第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.6.21 福岡) 、口頭

●Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S
Extracellular Vesicle Small RNAs Secreted from Mouse Amniotic Fluid Induced by Repeated Oral Administration of VPA to Pregnant Mice
Annual Conference of the International Federation of Placenta Associations (IFPA 2024) (2024.9.4., Montreal, Canada)

●Ryuichi Ono, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Yusuke Yoshioka, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima
Detection of extracellular vesicles (EVs) in Hepatotoxicity Using CD9-EGFP Reporter Mouse
58th Congress of the European Societies of Toxicology (2024.9.20., Copenhagen, Denmark)

●Ryuichi Ono, Mie Naruse, Yoko Hirabayashi, Takahiro

Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima: Evaluation of CD9-EGFP Reporter Mice for Organ-Specific EV Detection、ANNUAL MEETING of Society of Toxicology, 2024.3.17, Orlando、口頭

F. 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