

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：次世代型生殖発生毒性試験の開発

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 桑形麻樹子
帝京平成大学
健康医療スポーツ学部・医療スポーツ学科
教授

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
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
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。

バルプロ酸を用いた催奇形性モデルマウスを用い、胎児に奇形が発生するメカニズムを詳しく調査した。同じ用量のバルプロ酸を投与しても、すべての胎児に奇形が発生するわけではなく、一部の胎児にのみ奇形が見られることが確認された。そのため、奇形の有無を判別できる羊水中のエクソソーム RNA を網羅的に解析し、バイオマーカー探索を行った。その結果、本来は妊娠 15 日目には不活化される Hbb-y 遺伝子（胎児型グロビン遺伝子）が、奇形を示す胎児においてのみ活性化されていることを明らかにした。これは、バルプロ酸によるヒストン脱アセチル化阻害作用により、胎児型グロビンの発現が誘導される可能性を示唆している。

また、エピジェネティック異常が奇形を引き起こす主要な要因であると仮定し、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の一種であるトリコスタチン A (TSA) についても同様の影響を検証することとした。母動物に高用量の TSA を投与した結果、バルプロ酸投与で見られた神経管閉鎖不全や指形成不全、胎児および胎盤の成長遅延といった異常が観察された。この結果から、TSA もバルプロ酸と同様に強い催奇形性作用を持つ可能性が高いと考えられる。これらの胎児から採取した羊水を用い、次年度に Hbb-y 遺伝子の活性化を検証する計画である。

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ェ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、バルプソ

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）

・バルプロ酸投与による催奇形性に特異的なバイオマーカーとなるエクソソーム RNA の単離：

厚生労働科学研究費・化学物質リスク事業 (21KD1001) において、我々は、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 11 日目、15 日目、18 日目に、解剖を行い、胎児の外表奇形観察を行い、600 mg/kg において催奇形性が発現し、投与したバルプロ酸の濃度依存的に発現の誘導、もしくは抑制される羊水中のエクソソーム RNA が複数存在することを明らかにしている（Ono R. et al., *Fundamental Toxicological Sciences* 2024）。

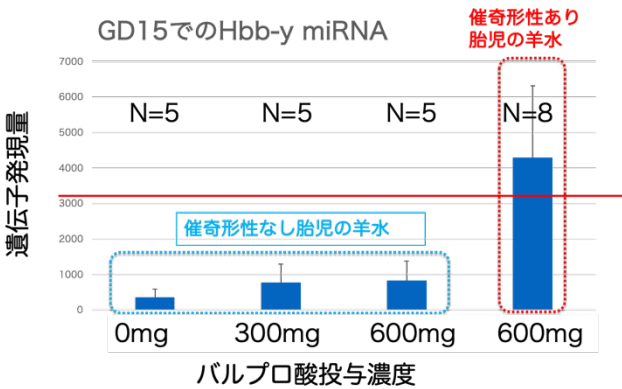
また、これらのエクソソーム RNA の中には、インプリンティング遺伝子が多く含まれていることから、これらの遺伝子発現誘導もしくは抑制には、エピジェネティック制御が関与している可能性が高い。

我々の研究で得られたバルプロ酸投与による催奇形性は、600 mg/kg 群において全ての胎児に観察されるものではなく、一部の胎児でのみ観察された。なお、妊娠 15 日目において確認された 8 匹の催奇形性の詳細は、以下の通りである。

fetus ID	neural tube closure defect	digit malformation
818	-	lack or short left 4th finger abnormal position on right 5th finger
819	meningoencephalocle	-
820	-	lack or short left 5th finger lack or short right 1st finger short right 5th finger abnormal position on right 5th finger
821	-	lack or short left 5th finger lack or short right 5th finger
822	-	lack or short left 5th finger
823	-	lack or short right 5th finger
824	-	extra right 5th finger abnormal position on right 1st toe
825	-	lack or short right 5th finger

表：厚生労働科学研究費・化学物質リスク事業 (21KD1001) において得られたバルプロ酸投与による催奇形性を発現した胎児個体とその表現型（妊娠 15 日目、600 mg/kg 群）

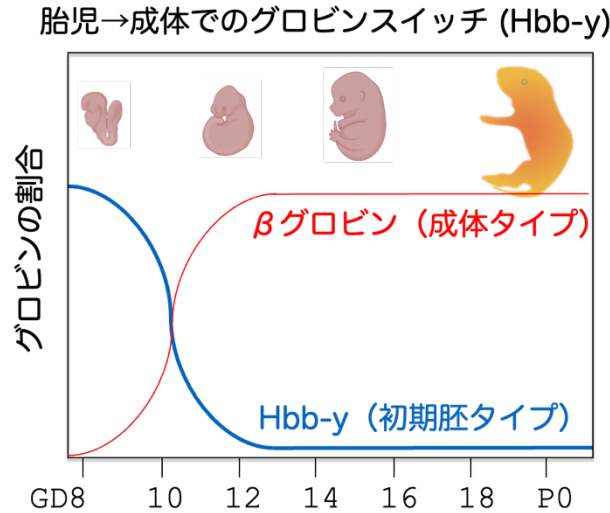
今年度は、妊娠 15 日目において催奇形性の出現しているバルプロ酸 600mg/kg 投与群において、催奇形性が見られていない胎児群と催奇形性の観察された胎児群の比較を行い、羊水中のエクソソームにおいて Hbb-y 遺伝子の発現が、奇形胎児でのみ発現が誘導されていることを明らかにした（下図）。



図：催奇形性ありの胎児の羊水に含まれるエクソソームでは、Hbb-y 遺伝子の発現が特異的に誘導されていた。

Hbb-y 遺伝子は、β グロビン遺伝子ファミリーに属する遺伝子で、マウスの胎生期に特異的に発現する胚性グロビン鎖（β-like globin chain）をコードしており、胎生期の酸素運搬に重要な役割を果たしている。

本来、Hbb-y 遺伝子は、妊娠 15 日目までには発現が抑制され、マウスの β グロビン遺伝子ファミリーの 1 つで、成人型 β グロビン（adult β-globin）鎖をコードする遺伝子である Hbb-b1 遺伝子へと発現がスイッチすることが知られている（下図）。



図：マウス胎児におけるグロビンスイッチの概略図

この遺伝子発現のスイッチ（グロビンスイッチ）は、LCR（Locus Control Region）により制御されていることが知られ、その制御の一部には、ヒストン修飾が関与することが報告されている。よって、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いることから、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。

そこで、Hbb-y が、エピジェネティック異常による催奇形性発現のバイオマーカーになりうるかを検討すべく、バルプロ酸と同様にヒストン脱アセチル化酵素として知られるトリコスタチン A を母動物に投与することで、トリコスタチン A にバルプロ酸と同様の発生毒性作用があるのか、また、Hbb-y がそのバイオマーカーとなりうるのかを検討することとした。

・トリコスタチン A 投与による催奇形性に特異的なバイオマーカーとなるエクソソーム RNA の単離：

トリコスタチン A (Trichostatin A, TSA) は、放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* から最初に単離され、クロマチン構造を変化させることによって遺伝子の発現を調節するという独特の作用機序を持っている。具体的には、HDAC を阻害することでヒストンのアセチル化を促進し、クロマチンを開いた状態にして特定の遺伝子を活性化する。このような機能により、トリコスタチン A はがん細胞に対して細胞周期を停止させたり、アポトーシスを誘導したり、細胞の分化を促進することができるため、乳がんや白血病、大腸がんをはじめとするさまざまな種類のがんの治療における可能性が示されている。

さらに、トリコスタチン A は抗炎症作用も有しており、炎症性サイトカインの産生を抑制することで炎症反応を抑える効果があります。そのため、がん研究だけでなく炎症性疾患の治療研究にも役立てられている。また、エピジェネティックな制御メカニズムを解明するためのツール化合物として、遺伝子発現調節に関する基礎研究でも広く活用されている。

既報によると、トリコスタチン A (TSA) の静脈内 (10、25、50 $\mu\text{g/kg}$ 体重) および経口 (20、50、100 $\mu\text{g/kg}$ 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 $\mu\text{g/kg}$ 、経口では 50 $\mu\text{g/kg}$ を NOAEL としている (Haritwal T. et al., *Drug and Chemical Toxicology* Volume 47, 2024 - Issue 6, 2024)。

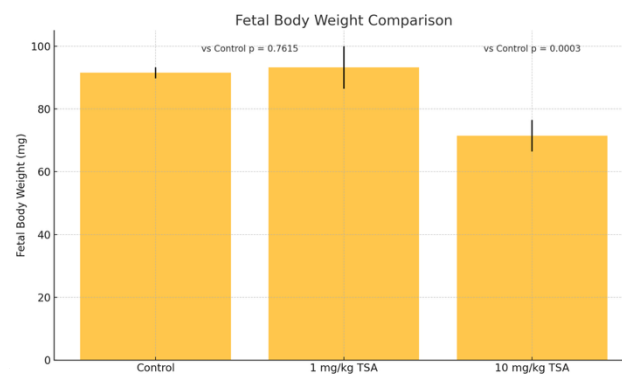
また、TSA の妊娠マウスへの投与については、妊娠 8 日に 0, 2, 4, 8, 16mg/kg で投与した報告があるが、着床部位数、死亡胎児数、および吸収胎児数、平均胎児体重、外表奇形は認められていない (Menegola E. et al.,

Birth Defects Research (Part B) Volume 74;392-398, 2005)。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 (Menegola E. et al., *Birth Defects Research (Part B)* Volume 74;392-398, 2005)。

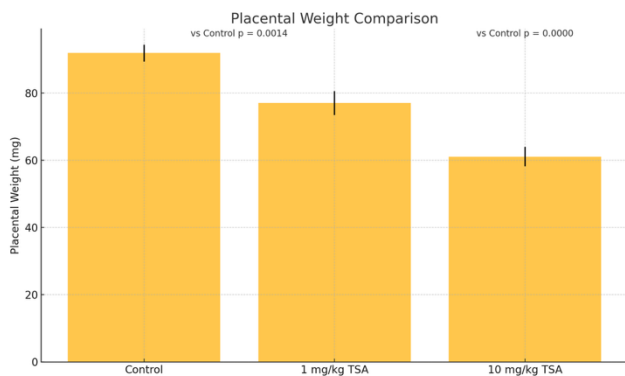
本研究においては、妊娠中に VPA を服用した場合や、妊娠マウスへの VPA 投与実験で見られる神経管閉鎖障害や指形成不全などの表原型が、同じ HDAC 阻害作用を持つ TSA の投与でも観察されるのかの条件検討を行うために、既報にあった妊娠 8 日目のみの単回投与ではなく、妊娠 8 日より 2 日間の反復投与を 10 mg/kg を最高用量とし、低用量として 1 mg/kg として行なうこととした。また、妊娠 8 日からの 2 日間の反復投与で表原型の見られない場合は、より投与期間の多い反復投与を行うこととした。

妊娠 8 日より 2 日間の反復投与において妊娠 12 日および妊娠 15 日目に解剖を行い、1 群 4 腹になる計画で交配を行った。

今年度は、十分な数の妊娠マウスを得られなかったため、妊娠 12 日目の、1mg/kg 投与群 (N=3)、10mg/kg 投与群 (N=3) の結果、および、非処置コントロール群 (N=3) のみを示す。残りの投与実験は、令和 8 年度に行う予定である。



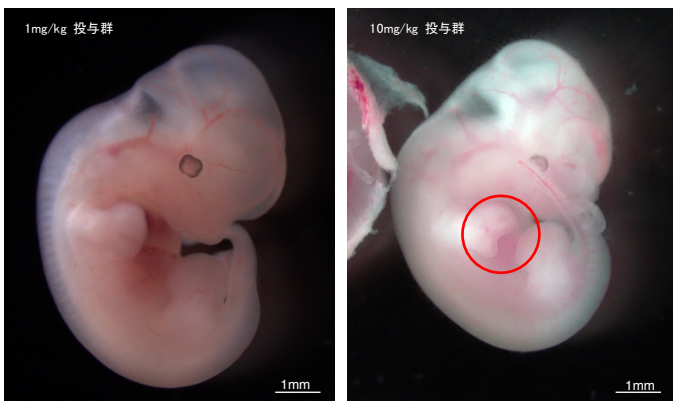
図：TSA を 1mg/kg (N=3) および 10mg/kg (N=3) で妊娠 8 日目、9 日目に経口投与を行い、妊娠 12 日目に胎児の重量測定を行なっている。
非処置コントロールの平均体重：92.1 mg
1 mg/kg TSA 群の平均体重：92.3 mg
10 mg/kg TSA 群の平均体重：71.4 mg
10 mg/kg TSA 群はコントロールと比較して、胎児体重を有意に減少させることが示された。



図：TSA を 1mg/kg (N=3) および 10mg/kg (N=3) で妊娠 8 日目、9 日目に経口投与を行い、妊娠 12 日目に胎盤の重量測定を行なっている。
非処置コントロールの平均体重：92.3 mg
1 mg/kg TSA 群の平均胎盤重量：76.9
10 mg/kg TSA 群の平均胎盤重量：61.4
1 mg/kg TSA 群、および、10 mg/kg TSA 群はともにコントロールと比較して、胎盤重量を有意に減少させることが示された。

このことから、妊娠 8 日目のみの TSA の単回投与の既報では胎児体重には影響しないとされていたが、妊娠 8 日目から 2 日間の 10mg/kg TSA の反復投与により、胎児体重、および、胎盤重量におよそ 20%、および、30% 減少の影響が出ることが明らかになった。

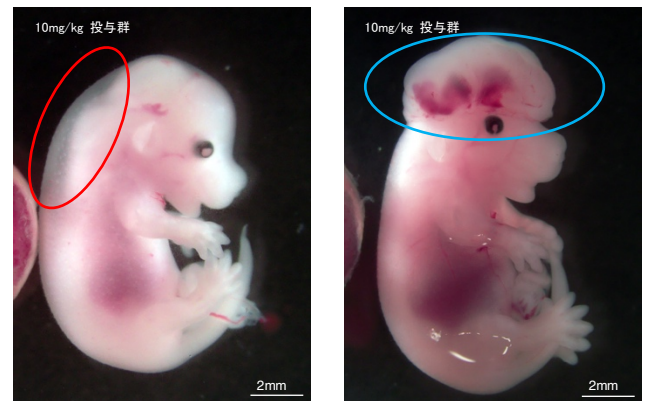
さらに、外表奇形観察を行ったところ、10mg/kg 群においては、VPA 投与と同様に、指形成異常が確認された。体重および胎盤重量の低下も VPA 投与でも観察されていたので、HDAC 阻害という共通のメカニズムが催奇形性の原因であると言える。



図：TSA を 1mg/kg (左)、および、10mg/kg (右) で妊娠 8 日目、9 日目に経口投与を行い、妊娠 12 日目に外表奇形観察を行なった。10mg/kg においては、指の異常 (赤丸部分) が確認されている。

また、VPA の投与およびヒトにおける VPA の服用により神経管閉鎖不全の表原型が見られているが、10mg/kg の TSA 投与 (妊娠 8 日、9 日) では見られなかった。そこで、投与日数を妊娠 7 日から 11 日に

広げて反復投与を行ったところ、VPA で見られていた神経管閉鎖不全や、浮腫などが観察された。



図：TSA を 10mg/kg で妊娠 7 日目から 11 日目に経口投与を行い、妊娠 12 日目に外表奇形観察を行なった。浮腫 (左：赤丸部分)、および、神経管閉鎖不全 (右：青丸部分) が観察された。

今年度の得られた結果より、エピジェネティックな阻害作用 (HDAC 阻害) は、催奇形性発現の大きな原因の一つである可能性が考えられる。

TSA 投与により、胎盤にも影響がでることを明らかにしたので、令和 8 年度には胎盤の病理解析を行う予定である。

また、他のエピジェネティック阻害剤での検証を行い、さらに、羊水中のエクソソームにおいて Hbb-y 遺伝子の発現が催奇形性のバイオマーカーになりうるのかを検証する。

D. 考察と結論

考察

本研究では、バルプロ酸（VPA）およびトリコスタチン A（TSA）というヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤を用いた妊娠マウスモデルにおいて、生殖発生毒性、とくに催奇形性のメカニズムとバイオマーカー探索を目的とした包括的な解析が実施された。特に注目すべきは、VPA により神経管閉鎖障害などの外表奇形が発現するモデルにおいて、羊水中エクソソーム RNA の発現解析から Hbb-y 遺伝子の発現誘導が奇形胎児でのみ確認された点であり、この遺伝子が催奇形性における新たなバイオマーカーとして浮上したことである。

Hbb-y は胎生期に一時的に発現する胚性グロビン遺伝子であり、通常は発生の進行とともに発現が抑制され、成人型グロビン遺伝子にスイッチする。この正常な発現制御には LCR を介したエピジェネティック制御、特にヒストン修飾が関与することが知られており、HDAC 阻害によりこの切り替えが破綻する可能性が高い。実際に、VPA 投与胎児の一部でのみ Hbb-y の異常発現が見られたことは、発生異常とエピジェネティック破綻との関連を示唆する強い証拠である。

さらに、TSA を用いた実験により、同様の HDAC 阻害作用が胎児体重や胎盤重量の減少、外表奇形（指形成異常、神経管閉鎖不全）を誘発することが確認された。特に、従来の単回投与では観察されなかった毒性影響が、反復投与や投与期間の延長によって明らかになった点は、曝露条件が発生毒性の発現に与える影響の重要性を強調している。

また、TSA 投与群では胎盤にも顕著な重量減少が認められ、胎盤形成や機能への影響も含めて HDAC 阻害の影響範囲が広いことが示された。これらの結果は、VPA と TSA の共通の作用機序としての HDAC 阻害が、胎児発生において極めて重要なエピジェネティック制御を攪乱し、催奇形性を誘導することを強く支持している。

結論

本研究により、HDAC 阻害剤であるバルプロ酸およびトリコスタチン A の投与が、胎児発生に対してエピジェネティック異常を介して深刻な毒性（催奇形性）をもたらすことが実証された。特に、羊水中のエクソソーム RNA における Hbb-y 遺伝子の異常発現は、外表奇形を呈する胎児に特異的に誘導されており、催奇形性の有望な非侵襲的バイオマーカーとしての可能性が示された。

また、TSA による反復投与実験では、外表奇形や胎児体重・胎盤重量の減少といった VPA と共通した表現型が確認され、エピジェネティック制御破綻が共通の病態基盤であることが明確となった。さらに、投与条件によって毒性の発現が大きく異なる点から、毒性試験の設計における曝露期間や用量設定の重要性も強調される。

今後は、Hbb-y 以外のエクソソーム RNA の網羅的解析や、他のエピジェネティック修飾阻害剤との比較研究を通じて、発生毒性のエピジェネティックメカニズムの解明と、信頼性の高いバイオマーカーの確立を進めていく予定である。本研究は、動物実験を補完・代替する次世代型毒性評価法の確立に向けて大きな一歩となる成果である。

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