

I. 総括研究報告書

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)

研究代表者 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 1 3 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。

● 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）

令和 6 年度の研究では、バルプロ酸（VPA）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）座の small RNA（Hbb-y miRNA）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酵素（HDAC）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た。

そこで、VPA と同様に HDAC 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 を反復投与した結果、VPA 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。

令和7年度の研究では、TSAを投与した胎児から採取した羊水中のエクソソームRNAの網羅的遺伝子発現解析を行ない、VPAの結果と同様に、催奇形性の発現している個体で有意にHbb-y miRNAの遺伝子発現が活性化していることを明らかにした。

これは、VPA、および、TSAの母動物への投与が催奇形性を引き起こす原因が、HDAC阻害によるエピジェネティック異常であることを強く示唆している。これに伴い、令和8年度研究では、HDAC阻害活性を持たないバルプロ酸アナログであるバルプロミドをHDAC阻害の陰性コントロールとして、母動物への投与実験および解析を行う予定である。

また、TSA投与した胎盤の病理学的解析を行なったところ、TSAの濃度依存的に胎盤の分化異常が明らかになった。この異常は、胎児の催奇形性の様に一部の個体だけに発現するわけではなく、全ての個体の胎盤に見られたことから、胎盤の分化という指標は、催奇形性の鋭敏なバイオマーカーになる可能性がある。

● 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）

これまで単離してきたエクソソームRNAがどの細胞・臓器に由来するかを確定するため、特定の臓器に由来するエクソソームのみを検出・単離できる“エクソソーム可視化マウス”の作製に成功している。このマウスでは、特定臓器から分泌されるエクソソーム表面にヒトCD9-EGFP融合タンパクを発現させることに成功している。この解析系を利用することで、母体血中のエクソソームを母体由来と胎児由来に完全に分離して検出する技術を確認した。令和6年度の研究は、胎児由来のエクソソームのみがヒトCD9-EGFP融合タンパクでラベルされるようにしたマウスを用い、超解像度共焦点顕微鏡で胎盤を観察することで、胎児由来エクソソームの母体側への移行を検出することに成功している。

令和7年度の研究では、マウス血液中のヒトCD9-EGFP陽性エクソソームのみを免疫沈降を行うことで、臓器特異的エクソソームを単離する系の開発を行なった。パイロット実験として、肝臓特異的にヒトCD9-EGFP融合タンパクを発現するマウスに肝障害物質である四塩化炭素を投与し、肝障害時に肝臓から分泌されるエクソソームの単離、および、そのエクソソームRNAの網羅的遺伝子発現解析を行うことで、肝障害のバイオマーカーとなるエクソソームRNAとしてliver-derived EV RNA1 (Levr1)の単離に成功した。

● 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）

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。令和6年度の研究では、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し、さらに、超解像度共焦点顕微鏡によるエクソソーム粒子の観察、および、シングルクソソーム解析に成功した。

令和7年度研究においては、前項の「次世代型生殖発生毒性試験の高度化」において単離した、肝障害時に肝臓から分泌されることが証明された新規の肝障害バイオマーカーであるLevr1、および、既に肝障害のバイオマーカーとして応用が検討されているmiR-122が、肝臓オルガノイドの培養上清中のエクソソームにおいて、in vivoと同様に毒性バイオマーカーとして機能するかを検証した。その結果、miR-122は恒常的にエクソソームで高発現しており、四塩化炭素添加による障害により遺伝子発現の誘導は起こらないが、Levr1は、四塩化炭素の濃度依存的に発現誘導が検出された。

● 得られた成果のまとめと今後の展望

令和7年度の研究成果により、エピジェネティック制御阻害が催奇形性の主な原因になることの証明に成功し、羊水中エクソソームにおいてはHbb-y miRNAが催奇形性バイオマーカーとして機能すること、胎盤の分化異常が生殖発生毒性の有効な評価基準となることを明らかにした。また、in vivoにおいてもin vitroにおいても、新規に単離した肝臓から分泌される肝障害特異的エクソソームRNAであるLevr1が機能することを明らかにした。

令和8年度研究計画においては、令和7年度までに単離に成功した毒性バイオマーカーの有害発現経路(AOP)に立脚した試験法の開発、標準化プロトコルの作製を行う。さらに、今年度新たに開発に至った胎盤の分化異常を指標とした生殖発生毒性試験法の有効性を検証する。本研究計画は、生殖発生毒性評価において厚生労働行政に大きく貢献するものとなっている。

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
成瀬美衣	国立感染症研究所 ウイルス第一部・主任研究官
伊川正人	大阪大学・微生物病研究所 動物実験施設・教授
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・教授
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 安全性予測評価部・主任研究官
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
吉岡祐亮	東京医科大学・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

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、胎児由来のエクソソームのみを可視化、および、単離するために、“エクソソーム可視化マウス”を利用することで胎児をはじめとした特定の組織由来のエクソソームのみを可視化、および単離する解析系の開発を行ない、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 遺伝子座に位置する small RNA (Hbb-y miRNA) であった。

Hbb-y 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。

1. 共通事項

1-1. 投与物質

名称：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%M C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、16 mg/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

こ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) および卵子に特異的に 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：

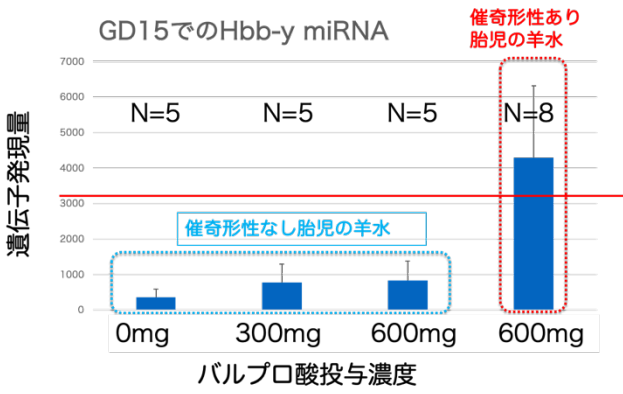
厚生労働科学研究費・化学物質リスク事業 (21KD1001) において、我々は、二分脊椎、無脳症、脳瘤などの神経管閉鎖障害を誘発するバルプロ酸（VPA）を催奇形性の陽性対照物質として用いた。マウスの神経管閉鎖時期である妊娠 9 日から 11 日に VPA を 0、300、600 mg/kg の 3 用量で経口投与し、妊娠 11 日目、15 日目、18 日目に解剖して胎児の外表奇形観察を行った。その結果、600 mg/kg で催奇形性が発現し、VPA 濃度に依存して発現が誘導または抑制される羊水中エクソソーム RNA が複数存在することを明らかにした（Ono R. et al., *Fundamental Toxicological Sciences*, 2024）。

これらの候補エクソソーム RNA にはインプリンティング遺伝子が多く含まれており、VPA による発現変動にはエピジェネティック制御が関与する可能性が高いと考えられた。なお、600 mg/kg 群で観察される催奇形性は全胎児に一樣に出現するものではなく、一部胎児に局限して観察された。妊娠 15 日目に確認された 8 個体の催奇形性の詳細は下表に示す。

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

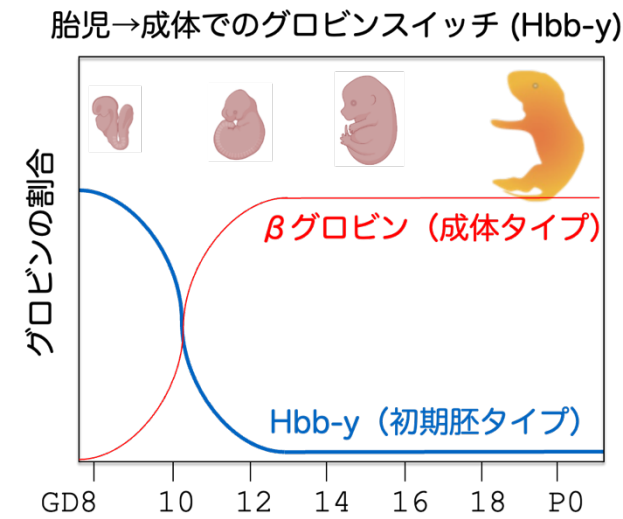
表：厚生労働科学研究費・化学物質リスク事業（21KD1001）において得られたバルプロ酸投与による催奇形性を発現した胎児個体とその表現型（妊娠 15 日目、600 mg/kg 群）

令和 6 年度は、妊娠 15 日目の VPA 600 mg/kg 群において、催奇形性が認められない胎児と催奇形性が認められる胎児を比較し、羊水エクソソーム中で Hbb-y 遺伝子座に位置する small RNA (Hbb-y miRNA) の発現が奇形胎児でのみ誘導されることを見いだした(下図)。



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

Hbb-y は β グロビン遺伝子ファミリーに属し、マウス胎生期に特異的に発現する胚性 β 様グロビン鎖をコードし、胎生期の酸素運搬に重要な役割を担う。通常、Hbb-y は妊娠 15 日目までに発現が抑制され、成人型 β グロビン鎖をコードする Hbb-b1 へと発現が切り替わる（グロビンスイッチ；下図）。



図：マウス胎児におけるグロビンスイッチの概略図

このスイッチは LCR (Locus Control Region) により制御され、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。VPA はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 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べき Hbb-y が、エピジェネティック異常により再活性化された可能性が考えられる。

そこで、Hbb-y miRNA が「エピジェネティック異常に基づく催奇形性発現」のバイオマーカーとなり得るかを検討するため、VPA と同様に HDAC 阻害作用を有するトリコスタチン A (TSA) を妊娠マウスへ投与し、VPA と共通する発生毒性が誘発されるか、さらに Hbb-y miRNA が共通バイオマーカーとして機能するかを検証することとした。

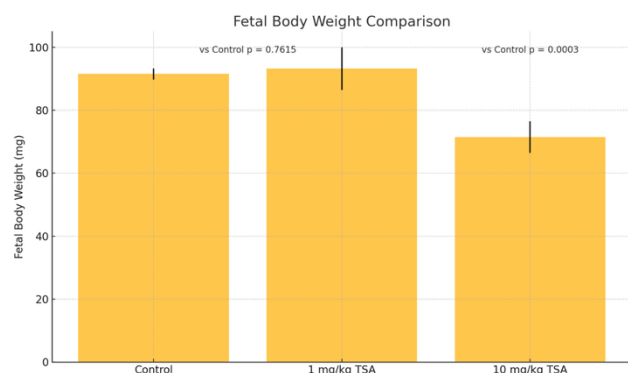
・トリコスタチン A 投与による催奇形性に特異的なバイオマーカーとなるエクソソーム RNA の単離：

TSA は放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* から単離された HDAC 阻害剤であり、ヒストンのアセチル化を促進してクロマチンを開き、特定遺伝子の発現を変化させることが知られている。

既報では、TSA の 14 日間反復投与毒性試験 (Swiss albino mice) において明確な全身毒性は限定的である一方、高用量群で腎臓の変化が報告され、静脈内 25 $\mu\text{g/kg}$ 、経口 50 $\mu\text{g/kg}$ が NOAEL とされている (Haritwal T. et al., Drug and Chemical Toxicology, 2024)。また、妊娠マウスへの単回投与 (妊娠 8 日、0-16 mg/kg) では外表奇形等は報告されないが、骨格解析では用量依存的な体軸異常 (椎骨/肋骨癒合など) が報告されている (Menegola E. et al., Birth Defects Research Part B, 2005)。

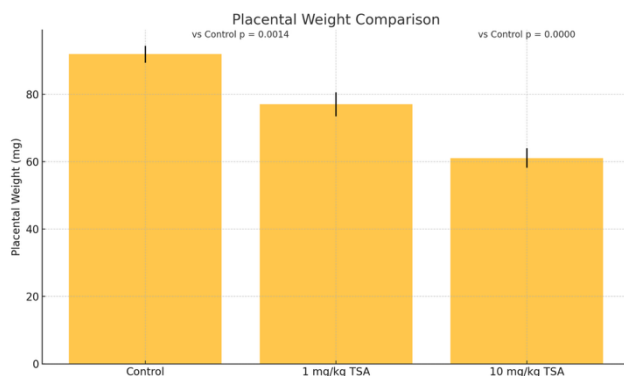
令和 6 年度研究では、VPA で典型的に観察される神経管閉鎖障害や指形成不全などの表現型が、同じ HDAC 阻害作用を持つ TSA 投与でも再現されるかを評価するため、既報の妊娠 8 日単回投与ではなく、妊娠 8 日・9 日の 2 日間反復投与を行った。最高用量を 10 mg/kg 、低用量を 1 mg/kg とし、妊娠 12 日および 15 日目に解剖する計画で各群 3 腹の交配を行った。

妊娠 12 日目の解析では、10 mg/kg TSA 群において胎児体重が対照群より有意に低下した (下図)。



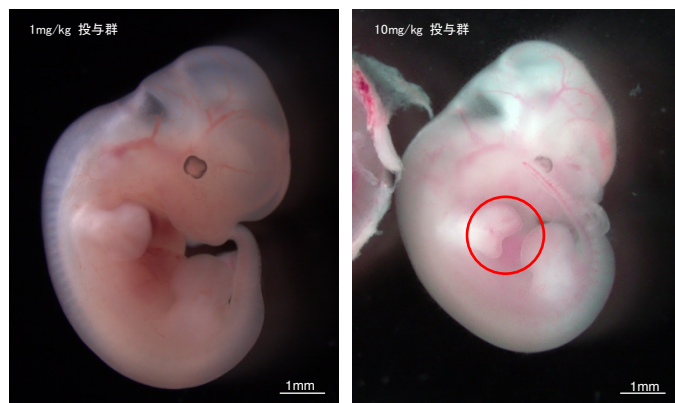
図：TSA を 1 mg/kg (N=3) および 10 mg/kg (N=3) で妊娠 8 日目、9 日目に経口投与を行い、妊娠 12 日目に胎児の重量測定を行なっている。
 非処置コントロールの平均体重：92.1 mg
 1 mg/kg TSA 群の平均体重：92.3 mg
 10 mg/kg TSA 群の平均体重：71.4 mg
 10 mg/kg TSA 群はコントロールと比較して、胎児体重を有意に減少させることが示された。

また胎盤重量は、1 mg/kg および 10 mg/kg の両群で有意に低下した (下図)。



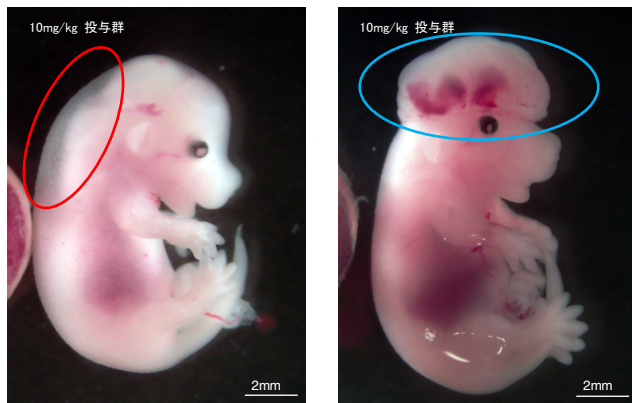
図：TSA を 1 mg/kg (N=3) および 10 mg/kg (N=3) で妊娠 8 日目、9 日目に経口投与を行い、妊娠 12 日目に胎盤の重量測定を行なっている。
 非処置コントロールの平均体重：92.3 mg
 1 mg/kg TSA 群の平均胎盤重量：76.9 mg
 10 mg/kg TSA 群の平均胎盤重量：61.4 mg
 1 mg/kg TSA 群、および、10 mg/kg TSA 群はともにコントロールと比較して、胎盤重量を有意に減少させることが示された。

すなわち、妊娠 8 日単回投与では胎児体重への影響が乏しいとされた既報に対し、本研究条件 (妊娠 8-9 日の反復投与) では、10 mg/kg 投与により胎児体重が約 20%、胎盤重量が約 30%低下することが明らかとなった。さらに外表観察では、10 mg/kg 群で指形成異常を確認し、VPA でみられる体重・胎盤重量低下と整合する所見が得られた (下図)。



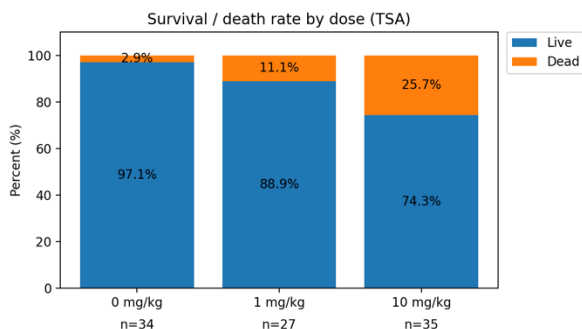
図：TSA を 1 mg/kg (左)、および、10 mg/kg (右) で妊娠 8 日目、9 日目に経口投与を行い、妊娠 12 日目に外表奇形観察を行なった。10 mg/kg においては、指の異常 (赤丸部分) が確認されている。

一方、VPA 投与やヒトでの VPA 服用で問題となる神経管閉鎖不全は、妊娠 8-9 日の 10 mg/kg TSA 投与では明確に確認できなかった。そこで、投与期間を妊娠 7 日から 11 日に拡張して反復投与し、妊娠 15 日目に解剖して外表奇形観察、胎盤病理解析、羊水採取を行った。その結果、10 mg/kg TSA 群で浮腫および神経管閉鎖不全が観察された。これらの結果は、HDAC 阻害に代表されるエピジェネティック阻害が、催奇形性発現の重要な要因となり得ることを支持する (下図)。

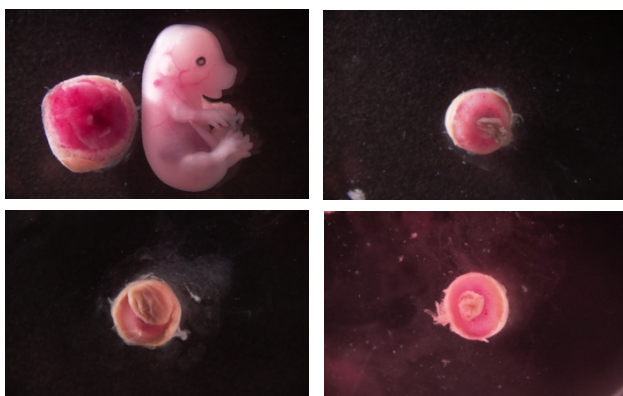


図：TSA を 10mg/kg で妊娠 7 日目から 11 日目に経口投与を行い、妊娠 15 日目に外表奇形観察を行なった。浮腫（左：赤丸部分）、および、神経管閉鎖不全（右：青丸部分）が観察された。

また、妊娠 7–11 日の TSA 反復投与では初期胚致死個体が濃度依存的に増加し、特に 10 mg/kg 群では 25.7% (N=35) が初期胚致死であった（下図）。



図：TSA を妊娠 7 日目から 11 日目に経口投与を行い、妊娠 15 日目に帝王切開したところ、初期胚致死個体が TSA の濃度依存的に増加している。



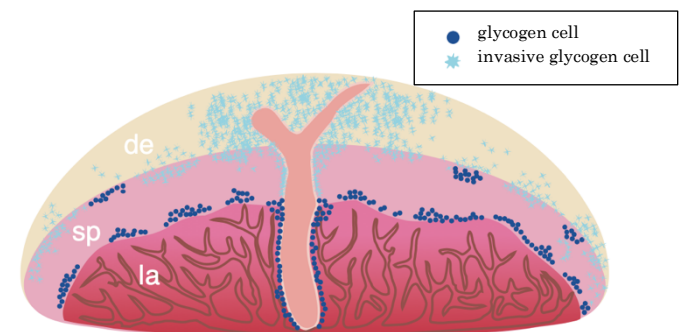
図：TSA を妊娠 7 日目から 11 日目に経口投与を行い、妊娠 15 日目に帝王切開したところ、10mg/kg 投与群においては、25.7% の個体 (N=35) が初期胚致死となり、それらは、胎盤はある程度発生しているが、胎児が吸収されている。（左上のみ生存個体。その他は胎児が吸収されている。）

これらの個体では胎盤形成は一定程度進行している一方、胎児が吸収されており、胎盤切片観察では分化

異常が確認された。

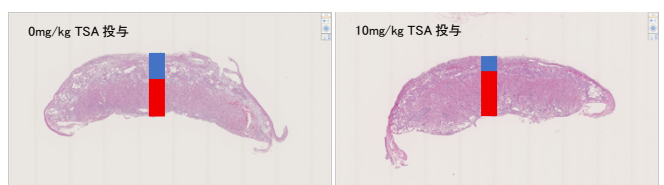
15.5dpc 相当のマウス胎盤は、下図のように、母体組織である脱落膜 (decidua)、胎児側胎盤組織である spongiotrophoblast cell、glycogen cell などから構成される接合帯 (Junctional zone; JZ) および、母子間の栄養・ガス交換の場である迷路層 (Labyrinth layer) から構成されており、通常の病理染色で利用される H&E 染色においては、迷路層およびそれ以外を簡便に見分けることができる。

そこで、胎盤の中心部において、迷路層の長さ(高さ)、および、それ以外の部分の長さ（ここでは spongiotrophoblast と記載。）の長さの比率を求めることで、胎盤分化異常を定量的に評価した。



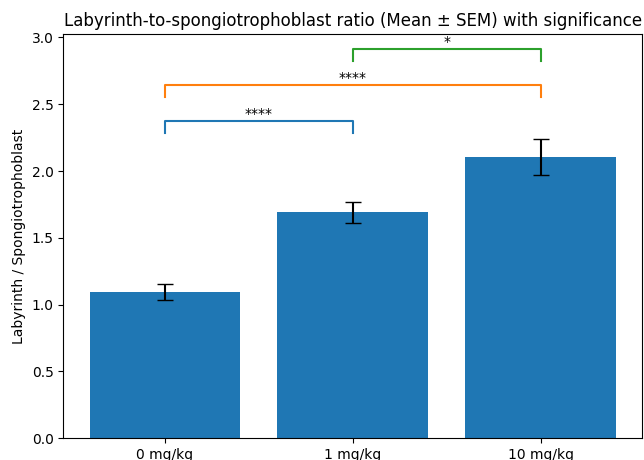
図：妊娠 15 日目 (15.5 dpc) 相当の胎盤の模式図。胎盤は胎仔側の labyrinth layer (la；迷路層) と、その上層の spongiotrophoblast (sp) と glycogen cell を主体とした junctional zone、および、母体側組織である decidua (de；脱落膜) から構成される。decidua には、glycogen cell が浸潤しており、H&E 染色で junctional zone と decidua を区別するのは難しい。

その結果、溶媒投与群および 1 mg/kg TSA 群では正常な胎盤構築が観察されたのに対し、10 mg/kg TSA 群では迷路層は概ね保たれる一方で、JZ+decidua 相当領域の形成が約 50%に抑制されていた（下図）。



図：TSA を妊娠 7 日目から 11 日目に経口投与を行い、妊娠 15 日目に帝王切開したところ、0mg/kg 投与群（溶媒コントロール：左写真）では、正常な胎盤組織像が見られた一方、10mg/kg 投与群（右写真）においては、labyrinth layer（赤線部）は正常であるものの、junctional zone + decidua（青線部）の形成がおよそ 50%に抑制されていた。

実際に labyrinth / (JZ+decidua) の比を算出すると、TSA 濃度依存的に JZ+decidua 側が形成不全となることが明らかとなった（下図）。

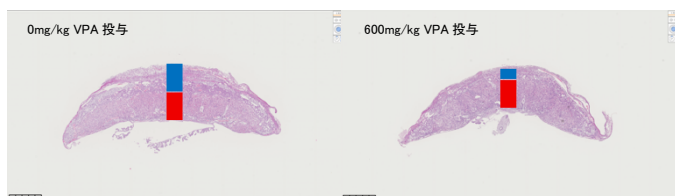


図：TSA を妊娠 7 日目から 11 日目に経口投与を行い、妊娠 15 日目に帝王切開したところ、0mg/kg 投与群（溶媒コントロール）では、正常な胎盤組織像が見られた一方、10mg/kg 投与群においては、labyrinth layer（赤線部）は正常であるものの、spongiotrophoblast 層（青線部）の形成がおおよそ 50%に抑制されていた。

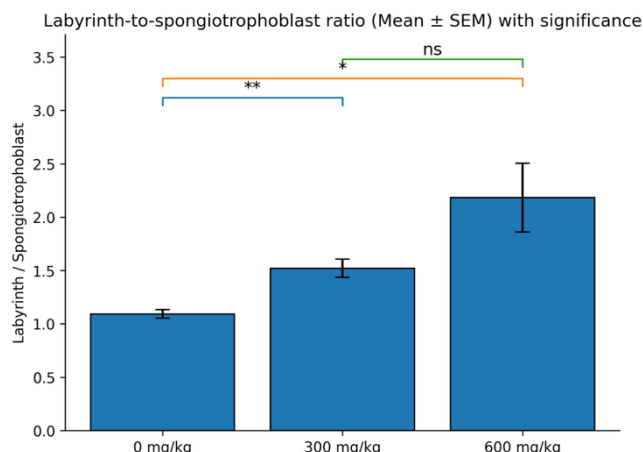
胎児外表奇形は一部胎児に局限する一方、胎盤異常は全胎盤で検出可能であったことから、胎盤形態解析は生殖発生毒性を鋭敏に捉えるバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

そこで、既に投与実験及び母体血および羊水のエクソソーム RNA 解析を終えている VPA 投与を行なった胎児の胎盤についても解析を行なった。

VPA 投与胎盤においても labyrinth / (JZ+decidua) の計算をすると、TSA と同様に JZ+decidua の形成が抑制されることが明らかになった。このことから、胎盤は生殖発生毒性の鋭敏なバイオマーカーとなる可能性が強く示唆された。（N=4 の値なので、令和 8 年度により詳細な解析を行う。）

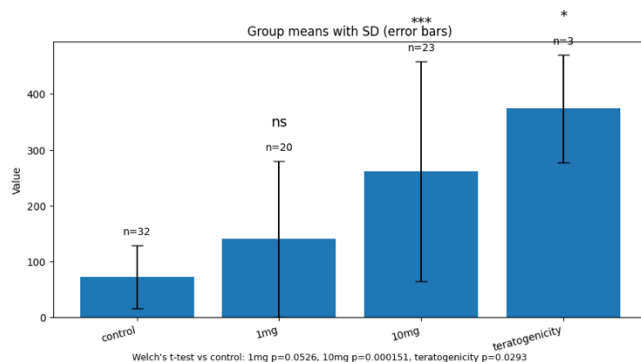


図：TSA を妊娠 7 日目から 11 日目に経口投与を行い、妊娠 15 日目に帝王切開したところ、0mg/kg 投与群（溶媒コントロール：左写真）では、正常な胎盤組織像が見られた一方、10mg/kg 投与群（右写真）においては、labyrinth layer（赤線部）は正常であるものの、junctional zone + decidua（青線部）の形成がおおよそ 50%に抑制されていた。



図：VPA を妊娠 9 日目から 11 日目に経口投与を行い、妊娠 15 日目に帝王切開したところ、0mg/kg 投与群（溶媒コントロール）では、正常な胎盤組織像が見られた一方、600mg/kg 投与群においては、labyrinth layer（赤線部）は正常であるものの、spongiotrophoblast 層（青線部）の形成がおおよそ 50%に抑制されていた。

さらに令和 7 年度研究では、VPA 投与実験で同定したバイオマーカー候補 Hbb-y miRNA が、TSA 投与でも同様に機能するかを検証した。妊娠 7-11 日に溶媒、1 mg/kg TSA、10 mg/kg TSA を投与した 3 群で、妊娠 15 日目に解剖し、外表奇形解析および胎盤病理解析を実施した個体から羊水を採取しエクソソームを抽出した。羊水エクソソームから RNA を抽出して次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行った結果、VPA 投与実験と同様に、Hbb-y miRNA の発現が濃度依存的かつ催奇形性依存的に上昇することが明らかとなった。



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 miRNA の発現が特異的に誘導されていた。

以上より、HDAC 阻害剤によるエピジェネティック異常が Hbb-y miRNA の活性化と催奇形性に関与する可能性が高いことが示された。

●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)

・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：

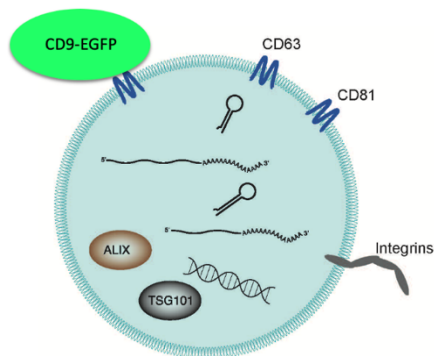
我々はこれまで、化学物質による臓器障害や遺伝子改変に起因する病変のバイオマーカーとなり得る体液中エクソソーム RNA の単離を行ってきた (Ono R. et al., Toxicology Reports, 2020 ; Ono R. et al., Fundamental Toxicological Sciences, 2024)。

また、発生ステージ特異的、雌雄差を示すエクソソーム RNA の同定にも成功している。

しかし、体液中で検出されるエクソソーム RNA が「どの臓器・細胞由来か」を厳密に証明することは従来困難であった。

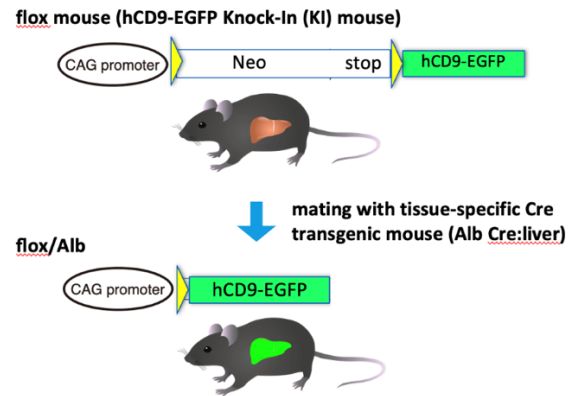
そこで我々は、エクソソーム由来臓器の特定を可能とする遺伝子改変マウス CD9-EGFP Knock-in (KI) マウス (エクソソーム可視化マウス) を作製した。

エクソソーム表面には CD9、CD63、CD81 などのテラスパニンが存在することから、特定細胞でヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現させることで、その細胞由来エクソソームのみを EGFP 蛍光および抗ヒト CD9 抗体により検出・回収可能とした。



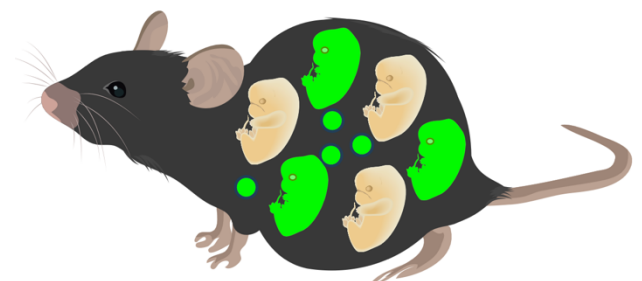
図：エクソソームの模式図。表面には CD9、CD63、CD81 などのテラスパニンが存在している。mRNA や miRNA などエクソソームに内包されることが知られている。

具体的には、ヒト CD9-EGFP カセットを ROSA26 領域にノックインし、Cre-loxP 系により条件的に発現誘導できる系を構築した (下図)。



図：通常は Neomycin 耐性遺伝子を発現しているが、特定の臓器で発現する Cre トランスジェニックマウスと交配することで、特定の臓器でのみヒト CD9-EGFP 融合タンパクを発現するようになる。ここでは、一例として、その結果、特定の臓器から分泌されたエクソソームが EGFP でラベルされ、蛍光観察が可能になる。また、ヒト CD9 に対する抗体を用いることで、特定の臓器由来のエクソソームを捕捉し、検出することや、特異的に RNA やタンパクの解析を行うこともできる。

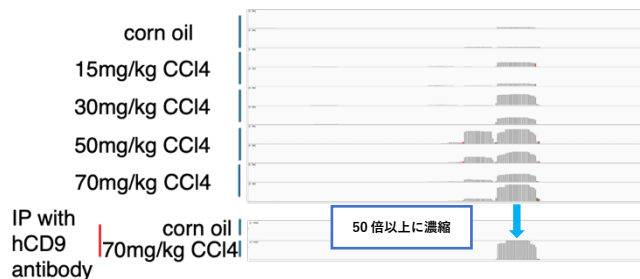
令和 6 年度研究においては、母子間エクソソーム交換の検出可能性を検証するため、CD9-EGFP KI (flox) 雌と、epiblast 由来組織で Cre を発現する Sox2-Cre 雄を交配して flox/Sox2-Cre 雄を得た。これを WT 雌と交配すると、胎内の胎児の半数が CD9-EGFP アレルを持ち、全身細胞から EGFP 標識エクソソームを分泌する (下図)。



図：CD9-EGFP allele をヘテロで持つ flox/Sox2 Cre マウス (♂) と野生型 C57BL/6J ♀ の交配で得られる妊娠マウスの概念図。胎内の半数の胎児は CD9-EGFP allele を持つことで、全身の細胞よりヒト CD9-EGFP でラベルされたエクソソームを分泌する。EGFP を検出することで、胎児由来のエクソソームがどのくらい母動物の血液中に循環しているのかを明らかにできる。

妊娠マウスを解剖し超解像度共焦点顕微鏡で観察したところ、CD9-EGFP アレルを持つ胎児の胎盤では胎児側胎盤組織が強く EGFP 陽性であり、母体側胎盤 (脱落膜) でも弱い EGFP シグナルが観察された。これは胎児由来 EGFP 陽性エクソソームを母体側が取り込んだ結果と考えられる (下図)。

さらに、新規候補として同定した liver-derived EV RNA1 (Levr1) は免疫沈降により約 50 倍に濃縮され、恒常的に分泌される miR-122 (濃縮率 1 倍) と対照的に、肝障害により初めてエクソソームに搭載される“動的”バイオマーカーである可能性が示唆された。



図：四塩化炭素投与マウスモデルの血液中のエクソソーム RNA の発現量。上段は、0mg/kg, 15mg/kg, 30mg/kg, 50mg/kg, 70mg/kg CCl4 を投与し、24 時間後に血液を採取し、エクソソーム RNA を RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析し、liver-derived EV RNA1 の遺伝子発現を定量した結果。下段は、flox/Alb Cre マウスに 70mg/kg CCl4 を投与し、24 時間後に採血した後に、ヒト CD9 抗体で免疫沈降を行い、肝臓由来のみのエクソソームを採取し、そのエクソソーム RNA を RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析し、liver-derived EV RNA1 (Levr1) の遺伝子発現を定量した結果。

以上より、臓器特異的エクソソーム単離系により、従来の全血清エクソソーム解析では捉えにくかった有効なバイオマーカー候補の単離が可能となった。

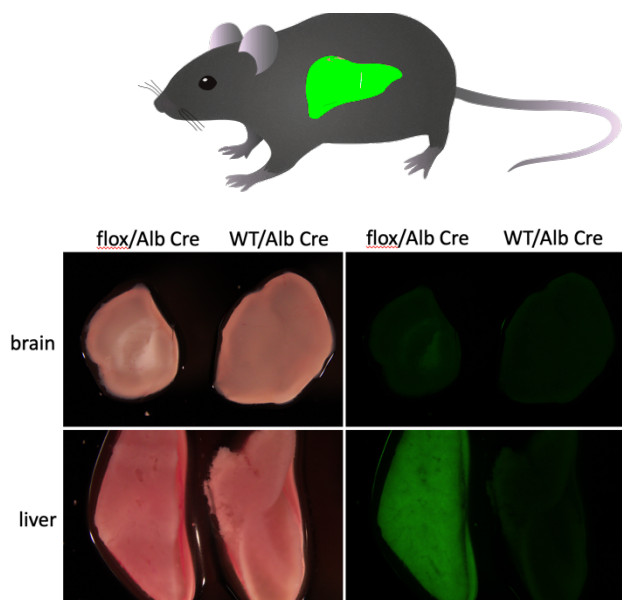
●次世代型毒性試験の in vitro モデル開発（研究分担者：成瀬、落谷、研究代表者：小野）

・肝臓オルガノイドの樹立と解析：

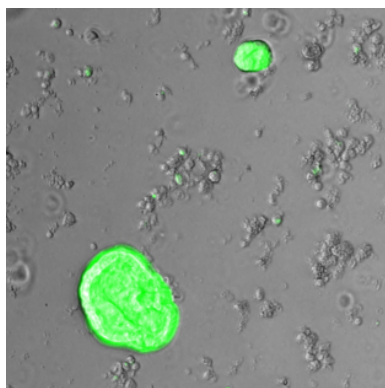
将来的な動物実験に依存しない安全性評価法が求められていることから、生殖発生毒性評価法の開発と並行して、単離した臓器毒性バイオマーカー候補が in vitro でも機能するかを検証した。

本研究では、成熟 hepatocyte へ分化した細胞でのみ CD9-EGFP 陽性となる系を利用できるため、オルガノイド分化条件の最適化を EGFP 陽性細胞を指標に行える利点がある。

令和 6 年度には、flox (CD9-EGFPKI) 雄と Alb-Cre を交配して肝臓特異的にヒト CD9-EGFP を発現するマウスを作製し、その肝臓からオルガノイドを樹立した（下図）。

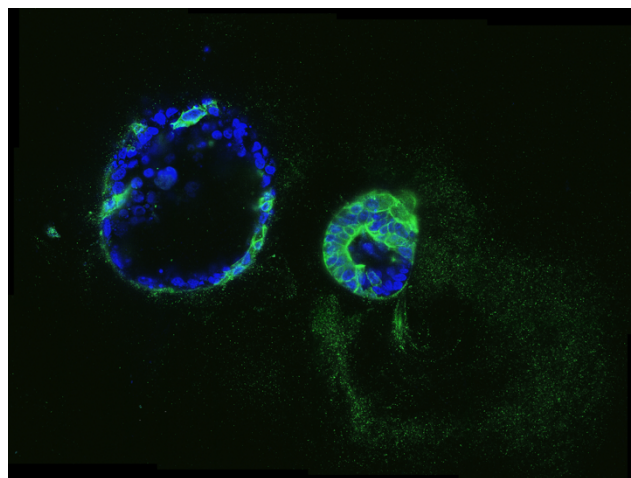


図：肝臓特異的にヒト CD9-EGFP を発現する flox/Alb Cre マウスの臓器を蛍光観察すると、一例として、脳では EGFP が陰性であるが、肝臓では、EGFP の発現が誘導されている。



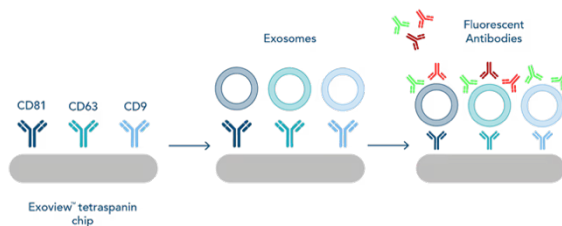
図：肝臓特異的にヒト CD9-EGFP を発現する flox/Alb Cre マウスの肝臓より樹立したオルガノイドは、蛍光観察すると、EGFP 陽性になっている。

EGFP 陽性オルガノイドの樹立に成功し、超解像度共焦点顕微鏡観察では EGFP 陽性細胞がモザイク状に存在し、蛍光標識された単一エクソソーム粒子が観察された（下図）。

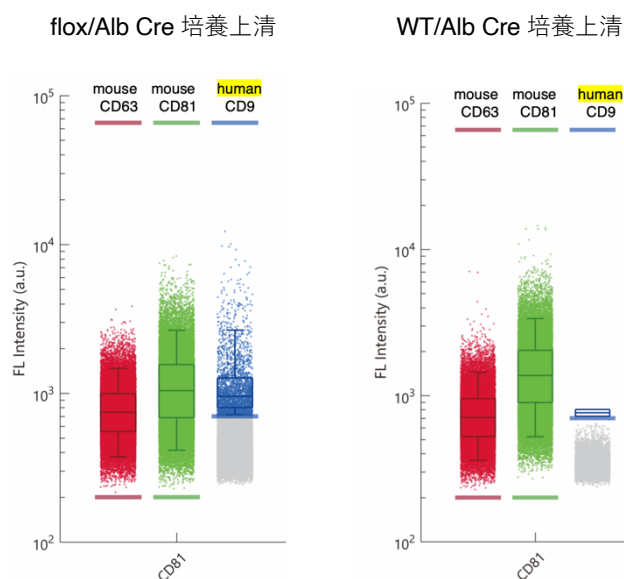


図：肝臓特異的にヒト CD9-EGFP を発現する flox/Alb Cre マウスの肝臓より樹立したオルガノイドを超解像度共焦点顕微鏡で観察すると、オルガノイドが hepatocyte に分化した細胞でのみ EGFP 陽性になっている様子が検出され、また、それらの陽性細胞からは、エクソソームの粒子が分泌される様子が観察されている。

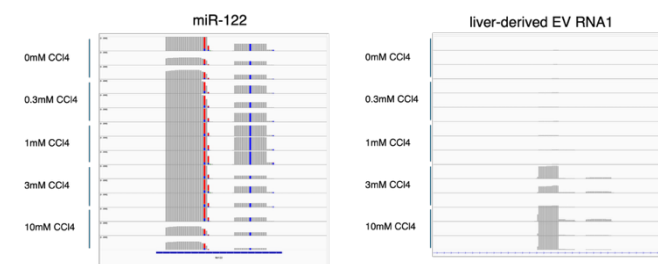
さらに、培養上清中のエクソソームをシングル粒子レベルで解析するため、ExoView imager を用いた。チップ上の抗テトラスパンin抗体で捕捉したエクソソームを、ヒト CD9、マウス CD63、マウス CD81 抗体で蛍光検出したところ、flox/Alb-Cre オルガノイド培養上清でのみヒト CD9 陽性エクソソームが検出され、システムが機能していることを確認した（下図）。



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。



図：肝臓オルガノイドに四塩化炭素を投与し、培養液中のエクソソームに含まれる miR-122 (左)、および、Levr1 (右) の遺伝子発現量を定量した。miR-122 は恒常的に高発現している一方、Levr1 は、四塩化炭素の濃度依存的に発現が誘導された。

以上より、臓器特異的エクソソーム単離系とオルガノイド・シングルエクソソーム解析系を組み合わせることで、真の臓器毒性を反映した毒性バイオマーカーの探索と *in vitro* 検証を一貫して実施できる基盤を確立した。

・肝障害バイオマーカー候補の *in vitro* 系での検証：

令和 7 年度の研究として、肝障害バイオマーカー候補の *in vitro* 系の検証を行なった。具体的には、肝臓オルガノイドの培養液に四塩化炭素を添加することで肝障害を誘導し、その培養液中のエクソソームに含まれる miR-122 および Levr1 の遺伝子発現の定量を行なった。

その結果、miR-122 は四塩化炭素添加による濃度依存的上昇が確認できなかった。

0 mM 条件のネガコンにおいても miR-122 は高発現であることから、miR-122 を含むエクソソームは恒常的に分泌されることが明らかになった。

その一方、*in vivo* では肝障害に伴い血中への miR-122 を含んだエクソソームの放出される割合が変化する可能性がある。

これに対し、Levr1 は肝臓オルガノイドにおいて CCl₄ 濃度依存的にエクソソーム中発現が上昇し、*in vitro* でも毒性応答を反映するバイオマーカー候補として有望であることが示された。

D. 考察と結論

考察

令和7年度研究より、次世代型生殖発生毒性試験の高度化に向けて、従来の胎児奇形観察に加え、「体液中エクソソーム RNA」と、新たに「胎盤形態」という2つの鋭敏な指標を提案し、さらに臓器特異的エクソソームを回収できる遺伝子改変マウス系を組み合わせることで、毒性の機序(MOA)に踏み込んだ評価基盤を構築した。

第一に、令和6年度研究より、VPA投与モデルで、羊水中エクソソーム RNA が用量依存的に誘導・抑制されること、かつインプリンティング遺伝子が多く含まれることから、VPA誘発催奇形性にエピジェネティック制御異常が関与する可能性が示唆された。実際に、催奇形性が一部胎児に局限して観察される条件下でも、奇形胎児の羊水エクソソームでは Hbb-y miRNA の発現が特異的に上昇しており、表現型の“有無”に対応する分子指標になりうる事が明らかとなった。Hbb-y は本来 E15 頃までに抑制され、成人型βグロビン(Hbb-b1)へスイッチすることが知られていることから、Hbb-y の再活性化は発生時期に不適切な遺伝子発現(=プログラムの破綻)を反映している可能性が高い。さらに、このスイッチングにはヒストン修飾を含むエピジェネティック制御が関与するとされ、HDAC 阻害作用を持つ VPA の作用機序とも整合する。

第二に、VPA と同様に HDAC 阻害作用を有する TSA 投与により、投与条件の最適化の結果、胎児体重・胎盤重量の低下、指形成異常に加え、投与期間を拡張すると神経管閉鎖不全や浮腫など VPA と共通性の高い表現型が観察された。これは、HDAC 阻害という共通機序が発生毒性表現型の一部を規定しうることを支持する。加えて、TSA では初期胚致死(吸収胚)の増加が顕著であり、胎盤は一定程度形成されているにもかかわらず胎仔が吸収される個体が増加したことから、胚側そのものの致死に加え、胎盤形成・機能不全が早期の生存性に影響している可能性が考えられる。

第三に、胎盤病理においては、H&E 染色で迷路層とそれ以外を簡便に識別できる特性を活かし、中心部の「迷路層の長さ」と「JZ+脱落膜側の長さ」の比を定量指標として導入した。その結果、10 mg/kg TSA 群で JZ+脱落膜側の形成不全が濃度依存的に顕著であり、胎児奇形が一部個体に局限していても胎盤形態異常は全胎盤で検出できた。これは、胎盤形態が発生毒性の“より早期・より普遍的”な影響を反映し、鋭敏なバイオマーカーとなる可能性を示す。さらに、羊水エクソソーム RNA の網羅解析において、Hbb-y miRNA が濃度依存的かつ催奇形性依存的に

上昇したことは、分子指標(エクソソーム RNA)と形態指標(胎盤分化)の双方が、HDAC 阻害に起因するエピジェネティック攪乱という共通軸で説明できることを示唆する。

第四に、バイオマーカーの由来臓器同定という課題に対して、CD9-EGFP KI (ROSA26 ノックイン×Cre 誘導)を用いたエクソソーム可視化・捕捉系を構築した。Sox2-Cre を用いた胎児由来エクソソームの追跡では、胎児側胎盤が強陽性、母体側胎盤に弱い EGFP シグナルが観察され、胎児由来エクソソームの母体側取り込みを示唆する所見が得られた。また、EGFP アレルを持たない胎児の胎盤にも局所的な EGFP 陽性が見られ、胎児間あるいは母体循環を介したエクソソーム移行の可能性が示された。さらに、Alb-Cre を用いた肝臓特異的エクソソーム回収では、抗ヒト CD9 抗体免疫沈降により真の肝由来エクソソーム RNA プロファイルが得られ、既知の miR-122 は高発現である一方、miR-192 は濃縮が限定的で非肝臓由来寄与が大きい可能性が示された。特に新規候補 Levr1 は免疫沈降で大きく濃縮され、肝障害時に初めてエクソソームに搭載される“状態依存的”指標であることが示唆された。従来の全血清エクソソーム解析では、臓器非特異的・恒常的分泌の影響が混在し、真の毒性由来シグナルが埋もれることがあるが、本系はその限界を克服しうる。

最後に、in vitro 代替法の観点では、Alb-Cre 系オルガノイドで EGFP 陽性細胞がモザイク状に存在することから、成熟 hepatocyte 分化の指標として EGFP を利用でき、オルガノイド分化条件の最適化に資する。ExoView によるシングルエクソソーム解析でヒト CD9 陽性粒子を検出できたことは、培養上清中の“臓器由来エクソソーム”を定量し、毒性バイオマーカーを in vitro で検証する技術的基盤が整ったことを意味する。実際に、miR-122 は in vitro で濃度依存的変化を示しにくい一方、Levr1 は CCl₄濃度依存的に上昇し、臓器毒性を反映する“動的バイオマーカー”として有望であることが示された。

結論

令和6年度研究成果では、VPA の母動物への反復投与による催奇形性モデルにおいて、羊水エクソソーム RNA は用量依存的に変動し、奇形胎児で特異的に誘導される Hbb-y miRNA を同定した。Hbb-y は発生期特異的なグロビンスイッチの破綻を反映し、エピジェネティック異常に基づく催奇形性のバイオマーカー候補となりうる。

令和7年度研究成果では、HDAC 阻害剤 TSA の母動物への反復投与により、VPA と共通する発生毒性表現型(指形成異常、神経管閉鎖不全等)および初期

胚致死の増加が確認され、HDAC 阻害が催奇形性発現の主要因となりうることが示唆された。

さらに、令和 7 年度の研究成果として、胎盤形態指標（labyrinth / JZ+脱落膜の比）を導入することで、TSA 曝露による胎盤分化異常を濃度依存的に定量できた。胎児奇形が一部個体に限局する条件でも、胎盤異常は全胎盤で検出され得たことから、胎盤形態解析は鋭敏な生殖発生毒性バイオマーカーとなる可能性が高い。

CD9-EGFP KI×Cre 系により、エクソソームの由来臓器同定と母子間移行の可視化・検出が可能であることを示した。さらに、抗ヒト CD9 免疫沈降と RNA-seq により臓器特異的エクソソーム RNA プロファイルを得て、新規候補 *Levr1* のような“状態依存的”真の毒性バイオマーカーを単離できた。

オルガノイドとシングルエクソソーム解析（ExoView）を組み合わせることで、臓器由来エクソソーム RNA バイオマーカーの *in vitro* 検証系を確立した。これにより、動物実験に依存しない次世代型毒性評価法の実装に向けた重要な技術基盤が整った。

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]

Ohya K, Hirose S, Nishikaku K, Ohnishi T, Lee K, Iyoda S, Kubomura A, Akeda Y, Mizukami K, Suzuki T, Takinami K, Taquahashi Y, Kuwagata M, Kitajima S, Inoue T, Hara-Kudo Y.
Genomic features and pathogenicity of atypical diarrheagenic *Escherichia coli* from a large foodborne outbreak.

Int J Food Microbiol. 2025 Apr 16;434:111134. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111134. Epub 2025 Feb 26.

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.

Tsubaki S, Nashimoto S, Tanaka R, Toyomoto T, Tsutsuki H, Kato K, Nakayama J, Kimura K, Oshima K, Yamamoto Y, Okusaka T, Esaki M, Kawai N, Ota N, Yoshioka Y, Ochiya T, Saito Y, Sawa T, Hozumi K, Matsuzaki J, Tsugawa H.

Gut Commensal *Klebsiella pneumoniae* Extracellular Vesicles Shape a Liver Microenvironment Conducive to Gut-Liver Bacterial Translocation and Pro-Tumorigenic Processes.

J Extracell Vesicles. 2026 Apr;15(4):e70262. doi: 10.1002/jev2.70262.

Nagamatsu Y, Umezu T, Hong T, Niijima T, Ohno SI, Harada Y, Kanekura K, Ochiya T, Kuroda M.
Exosome-like nanovesicles from acerola for CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery to the central nervous system.

Mol Ther Nucleic Acids. 2026 Mar 12;37(2):102896. doi: 10.1016/j.omtn.2026.102896. eCollection 2026 Jun 16.

Yamaguchi T, Matsuzaki J, Katsuda T, Kimura K; hCLiP-EV Project Group; Saito Y, Ochiya T.

Small Extracellular Vesicles Released From Human Chemically Induced Liver Progenitors Have the Potential to Improve Liver Fibrosis in Mice.

Gastro Hep Adv. 2026 Mar 3;5(5):100910. doi: 10.1016/j.gastha.2026.100910. eCollection 2026.

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.

Age-associated aberrations of the cumulus-oocyte interaction and in the zona pellucida structure reduce fertility in female mice.

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

Kaneda Y, Lu Y, Sun J, Shimada K, Emori C, Noda T, Koyano T, Matsuyama M, Miyata H, Ikawa M.

TEX38 localizes ZDHHC19 to the plasma membrane and regulates sperm head morphogenesis in mice.

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

小野竜一 (招待講演)

遺伝子改変マウスを用いた肝由来エクソソームの同定と肝毒性バイオマーカーの同定、医薬品毒性機序研究部会シンポジウム：医薬品毒性の機序を解き明かすモデル動物たち
第 52 回 日本毒性学会学術年会、2025 年 7 月 2 日、沖縄

小野竜一、成瀬美衣 (招待講演)

エピゲノム変異によるシスプラチン治療抵抗性の獲得、付加体科学部会シンポジウム：環境化学物質はどのようにエピゲノムを制御しているのか？

第 52 回 日本毒性学会学術年会、2025 年 7 月 2 日、沖縄

相崎 健一、森山 紀子、辻 昌貴、森田 紘一、小野竜一、菅野 純、北嶋 聡 (シンポジウム)

Percellome Project による反復投与毒性の予測、Systems Toxicology 開発への AI 導入の近未来-実験室、病棟と電腦-

第 52 回 日本毒性学会学術年会、2025 年 7 月 4 日、沖縄

菅野 純、森山 紀子、辻 昌貴、森田 紘一、小野竜一、相崎 健一、北嶋 聡 (シンポジウム)

PFOA の遺伝子発現解析と PFAS Percellome プロジェクトの進捗、有機フッ素化合物 PFAS による環境汚染と人体影響
第 52 回 日本毒性学会学術年会、2025 年 7 月 4 日、沖縄

R. Ono, M. Naruse, M. Kuwagata, Y. Yoshioka, T. Yamamoto, A. Ishii, T. Yamada, Y. Hirabayashi, T. Ochiya, M. Ikawa, S. Kitajima (ポスター)

Identification of Organ-Specific Extracellular Vesicle (EV) RNAs as Toxicity Biomarkers Using CD9-EGFP Reporter Mice、EUROTOX2025 (欧州毒性学会)、2025 年 9 月 15 日、ギリシャ

成瀬美衣、伊川正人、吉岡祐亮、山元智史、山田隆志、北嶋聡、落谷孝広

平林容子、小野竜一

肝臓オルガノイド由来 EV を利用した毒性評価法の開発

第 12 回 日本細胞外小胞学会学術集会、2025 年 10 月 14 日

小野竜一、成瀬美衣、伊川正人、吉岡祐亮、森山紀子、立原江利加、野崎弘枝、三原大輝、山田隆志、北嶋聡、落谷孝広、平林容子

臓器特異的エクソソームの単離方法の開発

第 5 回国立衛研・島津技術交流会、2025 年 12 月 18 日、Shimadzu Tokyo Innovation Plaza

R. Ono, M. Naruse, M. Kuwagata, Y. Yoshioka, S. Kitajima, Y. Hirabayashi, T. Ochiya, M. Ikawa, and T. Yamada

Identification of Liver-Specific Extracellular Vesicle (EV) RNAs as Biomarkers of Hepatotoxicity in CD9-EGFP Reporter Mice

SOT2026 (米国毒性学会)、2026 年 3 月 24 日、サンディエゴ

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