

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16261

研究課題名(和文) ダウン症候群患者由来iPS細胞を用いた肺血管病変発症機序の解明

研究課題名(英文) The mechanisms of pulmonary hypertension in Down syndrome by iPSC technology

研究代表者

杉辺 英世 (Suginobe, Hidehiro)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30791595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：先天性心疾患を伴うダウン症候群では肺高血圧が進展しやすいことが知られているが、その原因は不明であった。本研究では、ダウン症候群患者から樹立したiPS細胞を用いて、それらを血管内皮細胞と血管平滑筋細胞に分化誘導し、その細胞生理学的特性と網羅的発現プロファイル解析を行った。ダウン症候群患者iPS細胞由来の平滑筋細胞では細胞増殖能の亢進が見られた。ダウン症候群患者iPS細胞由来内皮細胞では、アポトーシスの亢進とミトコンドリア機能の低下、発現プロファイルの変化が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、ダウン症候群患者において肺高血圧が多くなる要因として、血管細胞機能が変化していることが判明した。特に内皮細胞におけるミトコンドリア機能障害が大きく寄与している可能性がある。さらに、内皮細胞の発現プロファイル解析から、21染色体以外の遺伝子においても特徴的な発現パターンを示している遺伝子が見つかった。これらの遺伝子の機能を解析することにより、新たな治療法の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is well known that Down syndrome patients with congenital heart defects tend to progress pulmonary hypertension, however the molecular mechanisms are unclarified until now. In this study, we established iPSCs from Down syndrome patients and differentiated them into vascular endothelial cells and vascular smooth muscle cells. Then we analyzed the cellular physiology and comprehensive gene expression profiling of these cells. We found that vascular smooth muscle cells of Down syndrome showed higher proliferative ability. We also found that endothelial dysfunction with dysregulation of mitochondrial function, and gene expression patterns were significantly different in Down syndrome endothelial cells as compared to wild type controls.

研究分野：小児循環器学

キーワード：ダウン症候群 肺高血圧 iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群 (DS) は毎年 700 あたり 1 の割合で出生する最も頻度の高い染色体疾患である。肺高血圧症 (PH) を合併する率は 28% と高く、DS の合併症である先天性心疾患や気道狭窄、肺低形成、胃食道逆流症などとの関連が臨床研究から示唆されてきた。その一方で肺血管の発現プロファイルや vasoreactivity が健常群と異なるなどの肺血管自体の機能異常も多数報告されており、これが PH の進展に寄与している可能性が示唆されてきたがその細胞分子メカニズムは未だ不明である。DS 患者由来の肺血管を採取して初代培養を得るには現実的には困難であること、knock-in 系などの人工 21 トリソミー細胞を用いた実験は得られるサンプル量や技術的な面で困難さを伴うこと、また DS のモデル動物として最も使用されている Ts65Dn は DS における PH のモデルとしては不適切であることから、基礎研究からの病態解明には限界があった。近年様々な疾患において患者由来 iPS 細胞を目的の細胞に分化させ、その細胞機能、発現プロファイル等を解析することで病態メカニズムの解明、新たな治療法の探索が可能となった。

## 2. 研究の目的

DS 患者由来 iPS 細胞から肺血管を主に構成する血管平滑筋細胞 (VSMC) および内皮細胞 (EC) に分化させ、これまでの PH 研究において機能異常が報告されていた基本的な細胞機能 (増殖能、細胞死、遊走能、接着能)、ミトコンドリア機能 (ミトコンドリア ROS (mROS)、膜電位 ( )、酸素消費速度 (OCR)) について明らかにする。またトランスクリプトーム解析として RNAseq を行い細胞機能、ミトコンドリア機能の異常がどのシグナルや遺伝子に起因するかを同定し、DS 特異的な PH 進展のメカニズムの解明および特異的な治療法の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

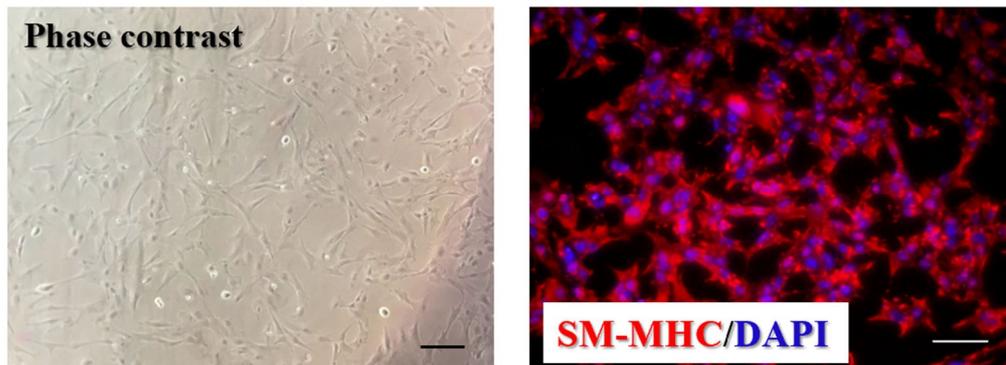
当グループですでに所有していた健常コントロール (WT) 3 サンプル、DS3 サンプル、および DS サンプルのうち 1 つを cre/loxP システムを用いて正常核型に戻した iPS 細胞 (cDi21) の 1 サンプルの計 7 サンプルを用いて実験を行った。それら iPS 細胞を既報に従い VSMC および EC に分化させ、それぞれに特異性の高い smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC) および CD31 での免疫染色像の観察、フローサイトメトリーを行い目的の細胞群が高い純度で得られていることを確認した。細胞およびミトコンドリアの機能に関しては、EdU (増殖能)、Annexin V (細胞死)、wound scratch (遊走能)、adhesion (接着能)、MitoSOX® (mROS)、JC-1 ( )、細胞外フラックスアナライザー XFe96 (OCR) でアッセイを行った。RNAseq に関しては、最新の次世代シーケンサーを有し、これまで多くの遺伝子解析技術支援の経験のある学内の微生物研究所遺伝実験情報センターにアッセイおよび一部解析を依頼した。

## 4. 研究成果

### (1) VSMC について

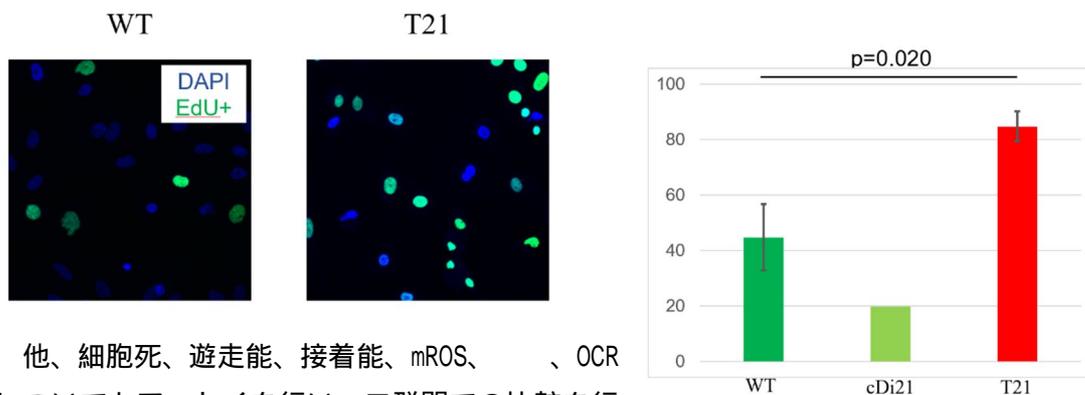
全ての iPS 細胞株から純度の高い VSMC に分化させることができた。

既報に従い iPS 細胞から VSMC に分化させたところ、位相差顕微鏡では特徴的な spindle 様の形態を示し、VSMC に特異性の高い SMMHC で染色された（下図）。IntraStain®(DAKO, Denmark)を用いて SMMHC で染色された細胞の割合をフローサイトメトリーで調べたところ、WT;  $95.1 \pm 1.1\%$ （平均  $\pm$  標準偏差、以下同じ）、DS;  $96.9 \pm 1.0\%$  と両群共に非常に高い純度で目的の細胞が得られていることを確認できた。



DS 由来の VSMC は増殖能が高い。

次に増殖能をみるために EdU アッセイを行った。細胞増殖している細胞の割合は、WT;  $44.8 \pm 16.9\%$ 、DS;  $84.5 \pm 7.7\%$  ( $p=0.020$ ) と DS 由来の VSMC は WT に比べて増殖能が高いことが示された。PH 患者の肺血管病理では VSMC は異常増殖しており、これを単離培養すると増殖能が高いことから PH の病態に関連性があることが示唆されている。この実験から DS においても VSMC の増殖能の高さが DS の PH の病態に影響を与えている可能性が示された。



他、細胞死、遊走能、接着能、mROS、OCR についてもアッセイを行い、二群間での比較を行ったが群間での有意な差は認められなかった。

RNAseq における pathway 解析では細胞増殖シグナルに関する

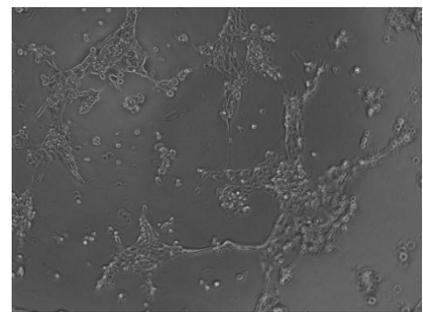
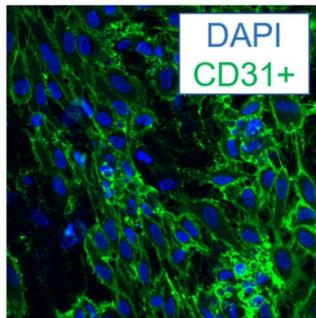
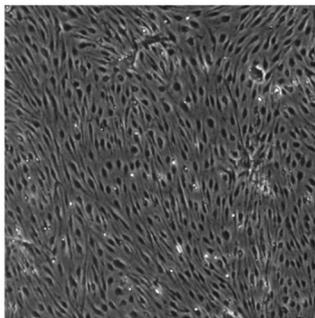
1 つの DS サンプルと、それを正常核型に戻した cDi21 サンプル 1 つの発現プロファイルの差が重要であると考え、その 2 サンプルで RNAseq の解析を行った。pathway 解析では発現変動遺伝子群が多い pathway として下図赤枠の "Cell cycle"、"p53 signaling pathway"、"DNA replication" など細胞増殖シグナルに関する pathway が多数同定された。今後は DS の VSMC における細胞増殖能がどのシグナルに起因するかを検討し、既存の compoundなどを投与して細胞増殖を抑制するか検討する予定である。

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Cell cycle</a>	RT		21	1.8	2.4E-6	6.1E-4
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Biosynthesis of unsaturated fatty acids</a>	RT		8	0.7	8.5E-5	1.1E-2
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">ECM-receptor interaction</a>	RT		13	1.1	1.1E-3	8.9E-2
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Complement and coagulation cascades</a>	RT		11	0.9	2.0E-3	1.2E-1
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Glycine, serine and threonine metabolism</a>	RT		8	0.7	2.7E-3	1.3E-1
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Oocyte meiosis</a>	RT		14	1.2	3.2E-3	1.2E-1
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Progesterone-mediated oocyte maturation</a>	RT		12	1.0	3.6E-3	1.2E-1
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Terpenoid backbone biosynthesis</a>	RT		6	0.5	3.8E-3	1.1E-1
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Fatty acid metabolism</a>	RT		8	0.7	8.8E-3	2.2E-1
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">p53 signaling pathway</a>	RT		9	0.8	1.7E-2	3.5E-1
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Biosynthesis of antibiotics</a>	RT		19	1.6	1.8E-2	3.3E-1
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">PI3K-Akt signaling pathway</a>	RT		27	2.3	2.1E-2	3.5E-1
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Axon guidance</a>	RT		13	1.1	2.3E-2	3.6E-1
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Focal adhesion</a>	RT		18	1.5	2.6E-2	3.8E-1
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Protein digestion and absorption</a>	RT		10	0.8	3.0E-2	3.9E-1
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Vascular smooth muscle contraction</a>	RT		12	1.0	3.0E-2	3.8E-1
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">DNA replication</a>	RT		6	0.5	3.1E-2	3.7E-1
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	<a href="#">Fatty acid biosynthesis</a>	RT		5	0.4	3.2E-2	3.7E-1

## (2) EC について

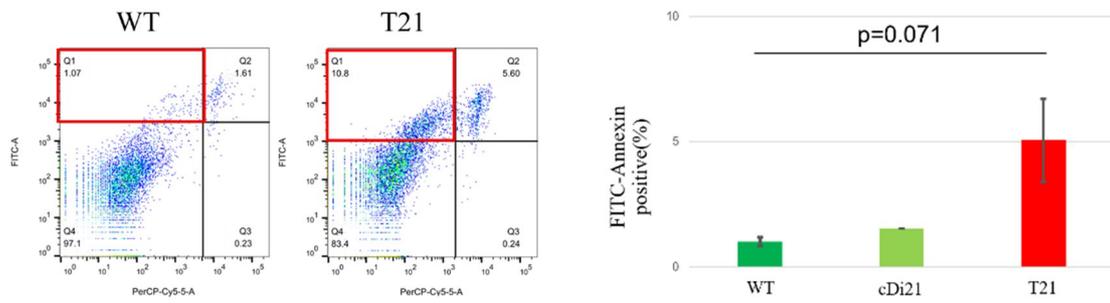
全ての iPS 細胞株から純度の高い EC に分化させることができた。

既報に従い iPS 細胞から EC に分化させたところ、位相差顕微鏡では cobble stone 様の特徴的な形態を示し、tube formation assay では capillary-like tube を形成した。EC に特異性の高い CD31 で免疫染色を行ったところ、ほとんど全ての細胞が染色された。CD31 で染色された細胞の割合をフローサイトメトリーで調べたところ、WT;  $95.9 \pm 1.1\%$ 、DS;  $97.3 \pm 2.4\%$ と両群共に非常に高い純度で目的の細胞が得られていることを確認できた。



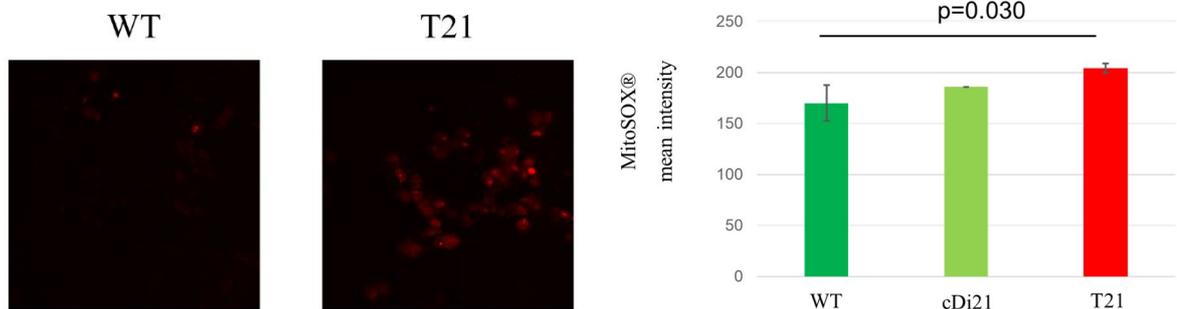
DS 患者由来の EC はアポトーシス亢進の傾向がみられる。

アポトーシス前段階の細胞の割合をみるために、FITC-Annexin V を用いたフローサイトメトリーを行ったところ、WT;  $1.63 \pm 0.49\%$ 、DS;  $6.50 \pm 3.7\%$ と DS 群でアポトーシス前段階の細胞が多いことが示唆された(下図)。



DS 患者由来の EC は mROS が有意に高い。

次に MitoSOX® を用いた mROS の評価を行ったところ、mean intensity は WT;  $170.0 \pm 17.3$ 、DS;  $204.1 \pm 4.60$  ( $p=0.030$ )と DS 群で有意に mROS 産生が高いことが示された。



他、増殖能、遊走能、接着能についてアッセイを行ったが群間での有意な差は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石田秀和, 小垣滋豊, 那波伸敏, 杉辺英世, 桂木慎一, 馬殿洋樹, 石井 良, 鳥越史子, 成田淳, 北畠康司, 大園恵一.
2. 発表標題 iPS細胞を用いたダウン症候群特異的肺高血圧症発症機序の解明
3. 学会等名 第53回日本小児循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉辺英世, 石田秀和, 水流宏文, 桂木慎一, 石井良, 成田淳, 石井陽一郎, 小垣滋豊, 北畠康司, 大園恵一
2. 発表標題 iPS細胞から分化させた血管内皮細胞および平滑筋細胞は21トリソミーにおける肺動脈性肺高血圧症の細胞、分子レベルでの病態を明らかにする
3. 学会等名 第55回日本小児循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考