

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16854

研究課題名（和文）エクソソームプロファイリングによるダウン症候群の肺高血圧症発症病態の解明

研究課題名（英文）Exosome profiling of Down syndrome associate pulmonary arterial hypertension

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） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：ダウン症候群は最も頻度の高い染色体疾患であり、肺高血圧症の合併が多い事も知られている。しかしこれまで、ダウン症候群における肺動脈の細胞生物学的解析は行われてこなかった。我々はダウン症候群患者からiPS細胞株を樹立し、その21番染色体トリソミーをダイソミーへと復元したiPS細胞株を作成、これらの比較を行うことでダウン症候群特異的な肺高血圧症の病態解明を行った。ダウン症候群iPS細胞由来血管内皮細胞では、RNA-seq解析により、その発現パターンが大きく変化していることを発見した。また、血管内皮細胞から分泌されるエクソソーム内のRNA-seqにおいても特徴的な発現パターンを示すことを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダウン症候群は、およそ700出生に1人の割合で発症する頻度の高い染色体異常である。ダウン症候群患者では、肺動脈性肺高血圧症の進展が早いことが以前から指摘されているが、肺血管細胞の生物学的特徴は明らかでなかった。本研究により、ダウン症候群患者由来iPS細胞から樹立した血管内皮細胞が分泌するエクソソームに含まれる各種RNAのプロファイルは、アイソジェニックな修復ダイソミーiPS細胞から樹立した血管内皮細胞が分泌するエクソソームとは異なることが明らかとなった。これらのエクソソームプロファイルが肺高血圧発症に果たす役割を解明することによって、ダウン症候群特異的な肺高血圧治療に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Down syndrome (DS) is the most prevalent chromosomal disorder associated with a higher incidence of pulmonary arterial hypertension (PAH). Various pathogenic factors are reported to be involved in the development of PAH, however details are unknown in the molecular pathogenesis of PAH in DS. We established several induced pluripotent stem (iPS) lines from DS patients harbouring trisomy 21 and its isogenic correction line with disomy 21. When we comparing the comprehensive expression profiles of DS-iPS and isogenic corrected iPS derived vascular endothelial cells by RNA-seq, we found that gene expression patterns were dramatically changed in DS. Finally, we analyzed the RNA-seq of vascular endothelial cell derived exosomes, we also found the significant changes of the RNA signature in DS-iPS derived vascular endothelial cell secreted exosomes.

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 エクソソーム

## 1．研究開始当初の背景

ダウン症候群は、およそ700出生に1人の割合で発症する頻度の高い染色体異常である。ダウン症候群はその40-50%に先天性心疾患を合併し、左右短絡を伴うダウン症候群患者では、同程度の左右短絡を持つ非ダウン症候群患者よりも、肺動脈性肺高血圧症の進展が早いことが以前から指摘されている (Clapp et al. J Thorac Cardiovasc Surg. 1990;100:115-21, Bush et al. J Pediatr. 2018;202:212-219)。その原因の一つとして、ダウン症候群患者においては気道狭窄や肺泡低形成など呼吸器系の異常を合併することが多いため、低換気状態が肺高血圧を増悪させる因子であると推測されているが、一方で、肺高血圧症合併ダウン症候群患者における肺組織の病理解析では、非ダウン症候群患者に比して、肺動脈中膜の菲薄化あるいは破断、そして内膜肥厚が顕著であることが示されている (Yamaki S et al. Am J Cardiol. 1983;51:1502-1506)。すなわち、ダウン症候群における肺高血圧の発症には呼吸器系の異常だけではなく、肺動脈を構成する血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の生物学的特性が、そもそも正常とは異なっているということも原因の一つになっていると考えている。しかし、これまでのところ、21番染色体トリソミーそのものが血管内皮細胞・平滑筋細胞にどのような影響・変化を与え、肺高血圧症の病態形成に寄与しているのかは全く分かっていない。

この分野での研究が進まない原因として、まず一つに、ダウン症候群における適切な動物モデルが存在しないことが挙げられる。従来からダウン症候群モデルとして用いられてきた Ts65Dn マウスは、マウス 16 番染色体トリソミーであり、ヒト 21 番染色体ホモログとしてのオーバーラップはあるものの完全ではなかった。そのため、動物モデルを用いた実験は正確性にかけてところがあった。次に、初代培養細胞を用いた実験系についても限界があり、特にヒト検体の採取が非常に困難であることや、継代回数の限られている初代培養細胞を用いた *in vitro* の実験系は、再現性を持って複数回にわたり遂行することは非常に困難である。

そこで我々は、ダウン症候群患者由来 iPS 細胞を用いて肺高血圧症病態解明の実験を行っている。出生時の臍帯血細胞にセンダイウイルスベクターを用いて山中4因子を発現させ樹立した iPS 細胞は、これまでの我々の研究で、トリソミー21を保持していること、3胚葉への分化能を有していることなどをすでに確認している (Banno et al. Cell Rep. 2016;15:1228-1241.)。これらダウン症候群 iPS 細胞については、3患者から樹立した3ラインをこれまでの研究では使用している。また、iPS 細胞を用いた研究においてしばしば問題になるのは、樹立した個人間での細胞表現型の差が認められることである。そこで我々は、ダウン症候群 iPS 細胞のうちの1ラインから、Cre/loxP システムを用いて、21番染色体をダイソミーに修正したラインを1つ作成し、これを対照群として用いている。これにより、個人間での表現型の差を除いた解析が可能となる。

さらに我々は、iPS 細胞から高い純度で血管内皮細胞と血管平滑筋細胞を分化誘導する方法を確立した。我々はこれまでに、ダウン症候群 iPS 細胞から分化誘導した血管平滑筋細胞および血管内皮細胞における細胞生物学的特性や、特有の細胞内シグナル経路に関する研究を行ってきた。

## 2．研究の目的

最近、肺動脈性肺高血圧症の病態形成において、肺血管内皮細胞が分泌するエクソソームの役

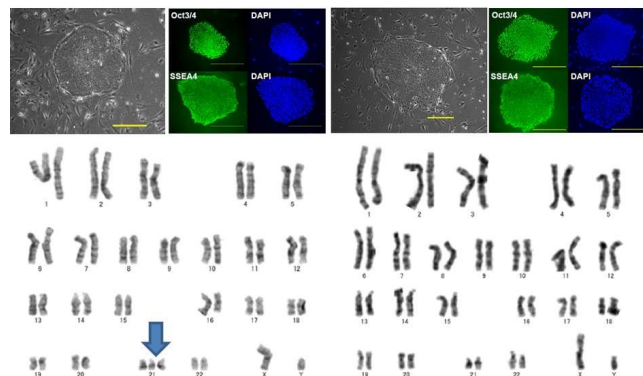
割が注目されている。エクソソームは、径50-150nmの分泌膜小胞で、内部に様々なタンパク質やmiRNAなどを含む。エクソソームに含まれる特定のmiRNAが、肺高血圧の病態形成に重要であるとともに、一方では治療応用にも有用であるという報告がある。(Zhao et al. *Cardiology* 2017;137:43-53, Zhang et al. *Cell Death and Disease*. 2018;9:1022, Hewes et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2019;316:L720-L722) さらに興味深いことに、ダウン症候群患者におけるアルツハイマー病の発症に神経細胞から分泌されるエクソソームが関与しているという報告がなされている(Hamlett et al. *Free Radic Biol Med*. 2018;114:110-121)。すなわち、ダウン症候群において、血管細胞間でのエクソソームを介した情報伝達が肺高血圧症の発症の病態に関与している可能性が十分ありうる。

そこで本研究では、ダウン症候群iPS細胞から分化誘導した血管内皮細胞、平滑筋細胞において分泌されるエクソソームを回収し、RNA-seqとNano-flow LC/FT-MSによって、ダウン症候群特異的なエクソソームパターンの網羅的プロファイリングを行い、ダウン症候群特異的な肺高血圧発症のより詳細な病態解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

ダウン症候群患者由来iPS細胞と健常iPS細胞は、我々の研究室で確立している複数のラインを使用する。これらは、当院で出生した新生児の皮膚線維芽細胞に対して山中4因子を発現するセンダイウイルスベクターを導入して作成したものである。またそのうち、ダウン症候群iPS細胞の1ラインについては、Cre/loxPシステムを用いて21番染色体のうち1本を削除したダイソミーコレクションラインを樹立し、患者間誤差を排した対照ラインとして用いた。(図1)

iPS細胞から血管平滑筋細胞への分化誘導については、既報の方法(Patsch et al. *Nat Cell Biol*. 2015;17:994-1003)を用いて行い、血管内皮細胞への分化誘導についてはTakara MiraCell® iPS Cell to Endothelial Cell Differentiation Kitを用いて行う。分化効率については、血管内皮はPECAM1、血管平滑筋はSmooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC)に対するフローサイトメトリーによって95%以上の純度であることを確認している。(図2)



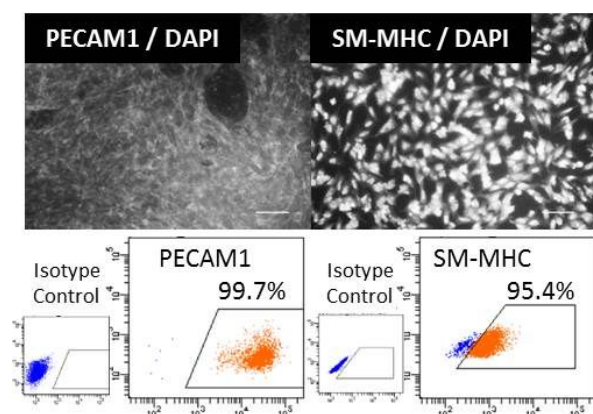
**図1. 当研究室で確立したダウン症候群患者由来 iPS 細胞(左)と健常児由来 iPS 細胞(右)**

免疫染色にて OCT3/4、SSEA4 の発現が確認できる。継代後の核型解析においても、21番染色体トリソミーが維持されていることを確認している。(矢印)(scale bar = 500 μm)

まず、通常培養条件下において、iPS細胞から分化誘導した血管内皮細胞と平滑筋細胞をサブコンフルエントまで増殖させ、その後エクソソームフリーの無血清培地に交換した。24時間後に培地を回収し、210,000Gで4、70分間、超遠心を行った。当施設で保有するフロア型超遠心機では一度に13.2ml x 6本しか処理できないため、残ったペレットに再度残りの培地を添加し超遠心を行う。これを計3回繰り返してトータル200mlの培地を処理した。最後にペレットにPBSを添加し、さらに洗浄のための超遠心を1回行った。

エクソソームの品質評価については、qNANOを用いたナノトラッキング解析によるサイズ分布

と数の確認に加え、CD63, Tsg101, Synteninなどのエクソソームマーカーをウエスタンブロットで確認した。そこからmiRNeasy mini kit (QUAGEN)を用いてmiRNAを含むsmall RNAと200nt以上のtotal RNAを分けて抽出した。回収したRNAは、本学の微生物病研究所内にある遺伝情報研究センターと共同し、Illumina HiSeq 3000次世代シーケンサーを用いてRNA-seq解析を行った。ここで得られたプロファイリングから、ダウン症候群において有意に上昇あるいは低下しているmiRNAやlncRNAについて同定を行った。



**図 2. iPS 細胞から誘導した血管内皮細胞と平滑筋細胞**

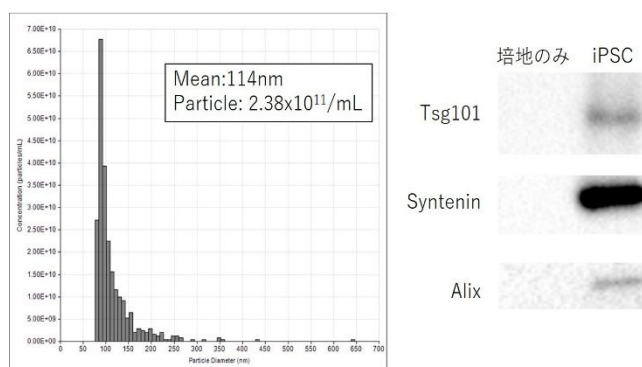
内皮細胞のマーカーである PECAM1 と平滑筋細胞のマーカーである Smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC) に対する免疫染色とフローサイトメトリー解析。Scale bar = 100  $\mu$ m

#### 4. 研究成果

まず、既報の方法によって、ダウン症候群患者由来 iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導を行った。これをサブコンフルエントまで増殖させたのち培地を serum free として、エクソソームの回収を行った。この方法によりタンパク量換算で 100-200  $\mu$ g のエクソソームが回収できたことを確認した。次に、エクソソームの品質評価として、qNANO を用いたナノトラッキング解析によるサイズ分布と数の確認に加え、CD63, Tsg101, Syntenin などのエクソソームマーカーをウエスタンブロットで確認した。(図 3)

次に、ダウン症候群患者 iPS 細胞に対して、Cre/loxP 系を用いて、21 番染色体の 1 本を削除した、アイソジェニックな修正 iPS 細胞ラインを作成し、その iPS 細胞ラインからも、血管内皮細胞を分化誘導した。上記と同様の方法にて、培地中のエクソソームを回収し品質評価にて、問題なくエクソソームが回収されていることを確認した。

その後、上記の方法にて採取したエクソソームに対して RNA-sequence を行った。アイソジェニックな修正ダイソ











**図 3. iPS 細胞の培養培地を用いたエクソソーム回収と品質評価**

超遠心を用いて回収したエクソソーム分画には、径 100nm 前後の小胞が多数含まれており、タンパク量としてトータル 100-200  $\mu$ g 回収できる(左)。ウエスタンブロットングにて、エクソソームマーカーの発現も確認できた(右)。

ミー21 iPS 細胞ライン由来の血管内皮細胞に比較して、ダウン症候群患者由来 iPS 細胞から分化誘導した血管内皮細胞から採取されたエクソソームにおいて、発現が上昇している RNA を絞り込むために、fold change が 200 倍以上であるものを抽出したところ 160 遺伝子が検出された。それらの遺伝子に関して pathway 解析を行うため、DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>)の Functional Annotation Tool を用い、Gene



















Ontology Analysis では以下の結果を得た。RNA プロセッシングや免疫反応、GPCR のシグナル、ミトコンドリアの電子伝達系が両サンプルで発現プロファイルが異なることが示唆された。

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">RNA processing</a>	RT		12	8.7	4.6E-6	1.8E-3
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">innate immune response in mucosa</a>	RT		3	2.2	4.5E-3	8.7E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">RNA phosphodiester bond hydrolysis, endonucleolytic</a>	RT		3	2.2	2.5E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">mitochondrial respiratory chain supercomplex assembly</a>	RT		2	1.4	3.9E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">G-protein coupled receptor signaling pathway</a>	RT		8	5.8	5.2E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">defense response to bacterium</a>	RT		4	2.9	5.4E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">positive regulation of inflammatory response</a>	RT		3	2.2	5.7E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">positive regulation of calcium ion transport</a>	RT		2	1.4	9.5E-2	1.0E0

特に、*DEFB108B*, *DEFB114*, *FAM83C-AS1*, *FOXC2-AS1*, *HIGD1C*, *KRTAP20-4*, *KRTAP23-1*, *LOC283352*, *MAFA-AS1*, *MIR513A2*, *MIR7851*, *P2RX6P*, *PFN3*, *RMRP*, *SCARNA11*, *SCARNA14*, *SCGB2B2*, *SCGB2B3P*, *SNAR-C3*, *SNHG9*, *SNORA12*, *SNORA45B*, *SNORA48*, *SNORA57*, *SNORA62*, *SNORA75*, *SNURF* といった遺伝子で発現が上昇していた。

一方で、アイソジェニックな修正ダイソミー21 iPS細胞ライン由来の血管内皮細胞に比較して、ダウン症候群患者由来 iPS 細胞から分化誘導した血管内皮細胞から採取されたエクソソームにおいて、発現が低下している RNA についても解析した。fold change が 200 倍以上であるものを抽出したところ 172 個検出された。RNA プロセッシングや免疫反応、GPCR のシグナル、cell-cell シグナルが両サンプルで発現量が異なることが示唆された。

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">RNA processing</a>	RT		15	10.6	5.2E-9	1.2E-6
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">innate immune response in mucosa</a>	RT		5	3.5	2.4E-6	2.8E-4
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">antibacterial humoral response</a>	RT		5	3.5	5.2E-5	4.1E-3
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">G-protein coupled receptor signaling pathway</a>	RT		12	8.5	3.4E-4	2.0E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">antimicrobial humoral immune response mediated by antimicrobial peptide</a>	RT		5	3.5	5.2E-4	2.5E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">detection of chemical stimulus involved in sensory perception of smell</a>	RT		8	5.7	6.6E-4	2.6E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">defense response to Gram-positive bacterium</a>	RT		5	3.5	1.0E-3	3.5E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">nucleosome assembly</a>	RT		5	3.5	1.8E-3	5.5E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">positive regulation of T cell apoptotic process</a>	RT		2	1.4	3.4E-2	8.9E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">cell-cell signaling</a>	RT		4	2.8	4.4E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">detoxification of copper ion</a>	RT		2	1.4	5.6E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">positive regulation of cAMP-mediated signaling</a>	RT		2	1.4	6.0E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">cellular response to tumor necrosis factor</a>	RT		3	2.1	8.0E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">cellular response to zinc ion</a>	RT		2	1.4	8.2E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">cellular response to copper ion</a>	RT		2	1.4	9.1E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">eosinophil chemotaxis</a>	RT		2	1.4	9.1E-2	1.0E0

*ABRACL*, *DEFB124*, *ELK2AP*, *HIST4H4*, *KRTAP20-1*, *KRTAP21-1*, *KRTAP22-1*, *LOC101928327*, *MIR1272*, *MIR1289-1*, *MIR54811*, *MIR6132*, *MIR765*, *MIR767*, *MYO16-AS1*, *QRFP*, *SCARNA10*, *SCARNA6*, *SFTA2*, *SNAR-C4*, *SNAR-E*, *SNORA17*, *SNORA46*, *SNORA51*, *SNORA52*, *SNORA58*, *SNORA61*, *SNORA66*, *SNORA70B*, *SNORA71B*, *SNORA71D*, *SNORA74A*, *SNORA77*, *SNORD17*, *XLOC\_007697*, といった RNA は発現が低下していることが明らかとなった。

今後、これらのエクソソームプロファイリングをもとに、ダウン症候群患者の肺血管内皮細胞から分泌されるエクソソームの特徴がどのように肺高血圧症発症に関与しているのかを解析していく予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------