

## 6-9.

**Functional analysis using iPS cells for diseases derived from lipodystrophic / mitochondrial diabetes**

(社会人大学院博士課程 4年糖尿病・代謝・内分泌内科)

○田丸 新一

(東京医科大学病院 糖尿病・代謝・内分泌内科)

諏訪内浩紹、小田原雅人、鈴木 亮

(秋田大学大学院医学系研究科 医学専攻 病態制御医学系内分泌・代謝・老年内科学講座)

脇 裕典

(東京大学大学院医学系研究科 糖尿病・代謝内科)

山内 敏正

Congenital lipodystrophic diabetes is an intractable rare disease that causes insulin-resistant diabetes mellitus and fatty liver due to lack of systemic adipose tissue. We established iPS cells from the peripheral blood of patients with lipodystrophic diabetes who carry the BSCL2 gene mutation. As a result of differentiating iPS cells into adipocytes, a decrease in the number of lipid droplets, the presence of giant lipid droplets, and a decrease in PPAR $\gamma$  expression were observed in patient-derived adipocytes as compared with healthy human-derived cells.

Mitochondrial diabetes is caused by mutations in mitochondrial DNA, and is the most common type of diabetes caused by single gene mutations.

We established iPS cells from the peripheral blood of two mitochondrial diabetic patients with A3243G mutation in mitochondrial DNA and complicated cardiomyopathy and sensorineural deafness. As a result of analyzing the mutation rate of mitochondrial DNA of iPS cells by the ddPCR method, the mutation rate of heteroplasmy varies from clone to clone, and is widely distributed from cell lines with almost no mutation to cell lines with a mutation rate of about 95%. In addition, the cell proliferation ability was decreased in clones with a high mutation rate, and in clones with a mutation rate exceeding 90%, a significant decrease in ATP content and an increase in ROS were observed. In the future, it is expected that these cells will be used as tools to elucidate

the impaired mechanism of this disease.

## 6-10.

**Functional Analysis of Human Variant (c.-137C > T) in Specificity Protein 1 Binding Site of Low Density Lipoprotein Receptor Promoter With familial hypercholesterolemia**

(大学院博士課程 4年糖尿病代謝内分泌内科、東京医科大学 糖尿病代謝内分泌内科学分野)

○伊藤真理子

(東京医科大学 糖尿病代謝内分泌内科学分野)

諏訪内浩紹、石井慶太郎、岩崎 源、

原 菜津子、マルハバアルキン、李 国姣、

谷古宇史芳、石川 卓也、佐々木順子、

田丸 新一、三輪 隆、小田原雅人、

鈴木 亮

(東京医科大学 循環器内科学分野)

中野 宏己

(東京医科大学 循環器内科学分野・遺伝子診療センター)

稲垣 夏子

Familial hypercholesterolemia (FH) is a hereditary metabolic disease known to be caused by the mutation of low density lipoprotein receptor (LDLR) protein, convertase subtilisin/kexin type 9, apolipoprotein B, and low density lipoprotein receptor adaptor protein1. Among them, FH deriving from the mutation of LDLR is the most frequent. Although many mutations have been reported on the database concerning causative mutation of FH, their functional analyses are few. The aim of this study was functional characterization of the promoter mutation in the LDLR.

We identified the c.-137C>T mutation of LDLR promoter gene in the patient with familial hypercholesterolemia. The functional analysis has not been carried out on c.-137C>T which is located at the binding site of the specificity protein 1 (SP1) transcription factor. We conducted luciferase assay and electrophoresis mobility shift assays to analyze its functional activity. In the mutation what was seen was a significant decrease in promoter activity and binding activity to the SP1 transcription factor. In conclusion,

the mutation of the SP1 binding site in the LDLR promoter region (c.-137C>T) contributes to FH.

### 7-1.

#### 腹部大動脈瘤におけるシグナル伝達経路間クロストークによる炎症増幅機構

(医学部医学科3年)

○長内 未来

(細胞生理学)

中村 隆、廣見 太郎、井上 華、  
横山 詩子

**【背景】** 腹部大動脈瘤の進行には慢性炎症が関与しているが、細菌感染を伴うと破裂頻度が増加する。炎症性ホルモンであるプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) の受容体 EP4 は IL-6 の産生により大動脈瘤を進行させる。また、細菌由来の lipopolysaccharide (LPS) が toll-like receptor 4 (TLR4) を介して interleukin-6 (IL-6) を産生し、血管壁内の炎症を増悪することが報告されている。これらの背景より、腹部大動脈瘤において PGE<sub>2</sub>-EP4 シグナルと LPS-TLR4 シグナルのクロストークが血管炎症を増幅し、疾患進行に主要な役割を果たしているとの仮説を立て、IL-6 産生に焦点を当てて検討した。

**【方法】** EP4 過大発現 (EP4-Tg) マウスおよびノントランスジェニック (non-Tg) マウスより血管平滑筋を単離した。これらの細胞を EP4 agonist (ONO-AE1-329)、LPS で刺激し、IL-6 の mRNA の発現量を定量的 PCR で評価した。

**【結果】** ONO-AE1-329 または LPS の刺激により、IL-6 の mRNA の発現量は無刺激に比べ、それぞれ  $53 \pm 4$  倍、 $124 \pm 8$  倍に増加した ( $n = 5$ )。さらに、両薬剤の同時投与では  $2632 \pm 257$  倍と著明に増加し ( $n = 5, p < 0.05$ )、両薬剤による相乗的な発現量増加が認められた。non-Tg VSMC においても EP4 の発現量に応じた両薬剤による相乗的な IL-6 の mRNA 発現量の増加が確認された ( $n = 5, p < 0.05$ )。

**【結論】** 血管平滑筋において EP4 と TLR4 シグナルのクロストークによる IL-6 産生増幅機構の存在が示唆された。今後これらシグナルの下流にて共通する transforming-growth factor- $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1) に注目し、研究を進めていく。

### 7-2.

#### ヒト PD-1/PD-L1 抗体の T 細胞疲弊解除機能を評価する分子イメージングシステムの確立

(研究生：東京医科大学免疫学分野、熊本大学医学部呼吸器外科)

○西 航、松島 遼平

(研究生：東京医科大学免疫学分野)

若松 英、豊田 博子、古畑 昌枝、  
町山 裕亮、西嶋 仁、竹内 新、  
横須賀 忠

(研究生：東京医科大学免疫学分野、東京医科大学皮膚科学分野)

西川 哲史

(熊本大学医学部呼吸器外科)

鈴木 実

免疫チェックポイント阻害療法の登場により、がん免疫療法はがん標準治療の1つとして確立するに至った。CTLA-4、PD-1療法に続く新たな免疫チェックポイント阻害薬が研究・開発されていると同時に、抗PD-1抗体と他のがん治療との併用療法も多数検討されている。ヒト型抗PD-1 (CD279)/PD-L1 (B7-H1, CD274) 抗体は、本邦でも現在5種類が承認されているが、実際の臨床の場でどれを選択するかは、適応基準と臨床医の判断に委ねられており、決定打がない。今回我々は、ヒトPD-1/PD-L1/2を可視化できるイメージングシステムを新たに構築し、市販されている抗体の阻害効果の直接的な比較を試みた。ヒトPD-1を導入したT細胞腫瘍株およびマウスプライマリーT細胞を、ヒトPD-L1/2を導入した抗原提示人工脂質二重膜を用いて観察したところ、リガンド結合依存的にPD-1のクラスター形成「PD-1マイクロクラスター」と脱リン酸化酵素の共局在を観察した。抗PD-1/PD-L1/2抗体は特異的にそれぞれのPD-1マイクロクラスター形成を阻害し、また同条件で行った生化学的・生理学的解析と相関する結果を得た。さらに、市販抗体では必要とする抗体濃度に1オーダーの差があることが明らかとなった。動物実験によるin vivoの実験を進めると共に、PD-1マイクロクラスターを可視化することでT細胞の活性化および抗PD-1/PD-L1抗体の機能評価ができる新たな評価系の確立を目指している。