

Results : DUSP1 gene was significantly suppressed about 70% ( $p < 0.01$ ) by DUSP1 siRNA. While phosphorylation of MAPKs by IL-1 stimulation was transient in untransfected cells, enhanced and sustained phosphorylation was observed in DUSP1 knocked-down cells. In addition, NGF and MMPs expressions were exaggerated in the DUSP1 knocked-down cells.

Conclusions : DUSP1 was involved in dephosphorylation of MAPKs in intracellular signaling of IL-1 stimulation in IVD cells, and it was found to be an important molecule involved in NGF and MMPs regulation. DUSP1 can be a new target molecule in conservative therapy for discogenic low back pain.

### P1-13.

#### Regulation of endogenous interleukin (IL)-1 by exogenous IL-1 in human intervertebral disc

(社会人大学院博士課程 2 年整形外科学)

○小西 隆允

(整形外科)

澤地 恭昇、遠藤 健司、日下部拓哉

前川 麻人、山本 謙吾

Objective : Intervertebral disc (IVD) degeneration by matrix metalloproteinase (MMP) and nerve invasion by nerve growth factor (NGF) are involved in the development of discogenic low back pain (LBP). Interleukin (IL)-1 is a cytokine that induces various inflammatory proteins including NGF and MMPs in IVD cells, and is considered as a key molecule for the pathogenesis of discogenic LBP. However, the regulation of endogenous IL-1 in IVD cells are largely unknown. We investigated the regulation of endogenous IL-1 expression by exogenous IL-1 by focusing on mitogen-activated protein (MAP) kinases (ERK, p38, JNK) and their endogenous phosphatase, dual-specificity phosphatase (DUSP) 1.

Methods : Human IVD cells were isolated from IVD obtained during lumbar surgery. IVD cells were stimulated with IL-1 in the presence of MAP kinases inhibitors. DUSP1 was knocked-down by transfecting siRNA. Phosphorylation of MAP kinases was evaluated by Western blotting. The expression of endogenous

IL-1 and DUSP1 was analyzed by real time-PCR.

Results : Endogenous IL-1 expression was induced by exogenous IL-1. This expression was suppressed by JNK and ERK inhibitor, while it was enhanced by p38 inhibitor. Knocking down of DUSP1 resulted in exaggeration of the phosphorylation of the three MAP kinases compared to untransfected cells. The expression of endogenous IL-1 after IL-1 stimulation was significantly higher in the DUSP1 knock-down cells. Conclusion : Because the IVD tissue is avascular and composed solely of IVD cells, inflammatory cytokines are to be produced by the IVD cells. Our results demonstrated that exogenous IL-1 stimulates the induction of endogenous IL-1 which may stimulate the same or neighboring cells in an autocrine manner. This positive feedback may cause prolonged local inflammation in IVD tissue. DUSP1 would be a novel target molecule that could attenuate the positive feedback loop of IL-1.

### P1-14.

#### Analysis of testicular specific genes for autoimmune orchitis in mice

(社会人大学院博士課程 3 年人体構造学)

○永堀 健太

(人体構造学)

河田 晋一、表原 拓也、宮宗 秀伸

李 忠連、小川 夕輝、伊藤 正裕

Spermatozoa don't come into existence in the seminiferous epithelium until puberty, when immune tolerance has already been established. Therefore, there are various autoimmunogenic antigens in testicular germ cells (TGC) recognized as foreign by the self-immune system. However, the blood-testis barrier formed by Sertoli cells and the blood-epididymal barrier formed by epididymal epithelial cells protect autoimmunogenic spermatozoa from attack by the self-immune system. We previously showed that immunization of susceptible mice with TGC alone is sufficient to induce experimental autoimmune orchitis (EAO) without the use of any adjuvant. Various testicular autoantigens have been reported by many studies, but antigenic genes for EAO

have not yet been identified. Recently, we identified 24 genes among many candidate genes using the phage display method. However, these candidate genes are not yet well characterized. In the present study, we analyzed more detailed gene expressions of these autoantigens by real-time PCR. Additionally, we affirmed the reactivity of the candidate genes expressing target antigens with EAO serum.

This study was supported by a research grant for Tokyo Medical University in 2017.

## P2-15.

### ヒト臍帯血由来間葉系幹細胞による免疫調節とIL-27の関与

(医学総合研究所、メスキュージェナシス)

○大脇 敏之

(医学総合研究所)

溝口 出、長谷川英哲、折井 直子

善本 隆之

IL-27は、IL-6/IL-12ファミリーに属するサイトカインであり、免疫応答とともに抗炎症作用を有する。

我々は、IL-27が造血幹細胞の分化や増殖の誘導、骨髄でのミエロイド系造血の充進に重要な役割を持つことを明らかにしてきた。一方、IL-27はTh17分化誘導を抑制することや関節リウマチや多発性硬化症を改善させることが報告されている。間葉系幹細胞(MSC)もこれら自己免疫疾患に対して同様な作用を示すことから、IL-27がMSCによるこの免疫調節の発現に関与しているとの仮説に立ち、以下の検討を行った。

今回、ヒトMSCとして臍帯血由来MSC(UCB-MSC)を用い、各種実験を行った。UCB-MSCに各種サイトカインを含む培地にて培養した後、それらUCB-MSCの遺伝子発現を定量リアルタイムRT-PCRにて、また培養上清液中のIL-27をELISAにて測定した。その結果、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ といったサイトカイン刺激がIL-27サブユニットであるIL-27p28とEBI3の遺伝子発現とIL-27産生が有意に上昇させた。ヒトMSCの免疫調節には、ICAM-1、VCAM-1、PD-L1、IDO、TSG-6がその機能発現に重要な役割を示すことが報告されている。UCB-

MSCにおいても同様に、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ が、それら遺伝子発現を誘導したことに加えて、共刺激で更なる増強が認められた。この増強効果はIL-27関連遺伝子、並びにIL-27産生に相関関係がみられた。一方、IL-27はUCB-MSCに発現しているIL-27受容体を介して、細胞内シグナル伝達分子あるSTAT1, 3のリン酸化レベルを上昇させた。さらに、IL-27刺激により有意なIL-27分泌が認められただけでなく、IFN- $\gamma$ やTNF- $\alpha$ とは非依存的にICAM-1、PD-L1、IDO、TSG-6といった免疫調節因子が発現された。

以上より、これまでヒト骨髄や脂肪由来間葉系幹細胞で報告されている免疫調節因子の発現がUCB-MSCにおいても確認されたこと、そしてIL-27は、オートクラインによりUCB-MSCの免疫調節の持続性に寄与している可能性が示唆された。

## P2-16.

### 麻薬成分25D-NBOMeを用いた横紋筋融解症ゼブラフィッシュモデル

(病態生理学)

○川原 玄理、中屋敷真未、林 由起子

(法医学)

前田 秀将、吉田 謙一

N-Benzyl-substituted phenethylamines (NBOMes)は、幻覚・興奮作用の強いセロトニン2A受容体(5-HT<sub>2A</sub>)刺激薬である。以前、我々は、臭素誘導体25B-NBOMe服用後、セロトニン症候群と横紋筋融解症で死亡した事例を報告し25B-NBOMeによる横紋筋融解症モデルフィッシュの作成を行なった。本研究では、25B-NBOMeとは異なるメチル基を構造に有する25D-NBOMeを野生型ゼブラフィッシュに投与し、横紋筋融解症モデルフィッシュの作成および解析を行なった。

異なる濃度の25D-NBOMeを加えた飼育水で、孵化後4日目のゼブラフィッシュを24時間飼育し、筋構造を観察した。また、5-HT<sub>2</sub>受容体拮抗薬を25D-NBOMeとともに同時投与し、筋構造変化に対する影響を観察した。25D-NBOMe投与により生存率が低下するとともに、筋構造異常が観察された。これらの25D-NBOMe投与による生存率の低下と筋構造異常は、5-HT<sub>2A</sub>受容体または5-HT<sub>2C</sub>受容