

る。一方、心筋や横隔膜（不随意筋）の変性には他の因子が大きく関与している可能性があると言える。本研究結果から抗 IL-6 受容体抗体は筋ジストロフィー骨格筋に対する有効な候補治療薬であると期待できる。

### P1-13.

#### クロマチン制御因子 HP1 $\gamma$ のアザシチジン耐性白血病細胞における役割の解明

(医学総合研究所)

○今西 哲、大屋敷純子

(血液内科)

梅津 知宏、小林 千晶、大屋敷一馬

【背景・目的】 アザシチジン (AZA) は骨髄異形成症候群をはじめとする骨髄系腫瘍に用いられるが、治療抵抗例や耐性獲得例が存在し、臨床上的の問題となっている。当研究部門では、ヒト白血病細胞株 U937、HL-60 で AZA 処理後にみられるクロマチン制御因子 heterochromatin protein 1 $\gamma$  (HP1 $\gamma$ ) タンパク質の減少が、AZA 耐性亜株 R-U937、R-HL-60 ではみられないことを報告した。そこで、HP1 $\gamma$  が AZA 耐性白血病の治療標的となるか検討するために、shRNA を用いて、HP1 $\gamma$  の発現抑制が AZA 耐性細胞に及ぼす効果を調べた。

【方法】 Tet-on システムで HP1 $\gamma$  特異的 shRNA (shHP1 $\gamma$ ) を発現するプラスミド (聖マリアンナ医科大学 太田智彦教授より供与)、またはコントロールプラスミドをレトロウイルスで U937、HL-60、RU937、R-HL-60 の各細胞に導入した。薬剤選択後、得られた細胞を 1  $\mu$ g/ml のドキシサイクリン (DOX) で 96 時間処理して、定量的 RT-PCR 法による HP1 $\gamma$  mRNA の相対定量、WST-8 法による増殖能の測定、Annexin V/PI 二重染色によるアポトーシス誘導の FACS 解析を実施した。統計処理は 2-way ANOVA を行った後、T-test を行った。

【結果】 DOX 処理後の shHP1 $\gamma$  導入細胞での HP1 $\gamma$  mRNA 発現量は、無処理群の約 18%~40% に減少していた。コントロールでは DOX 処理は HP1 $\gamma$  mRNA 発現量に影響せず、shHP1 $\gamma$  による HP1 $\gamma$  の発現抑制が確認できた。shHP1 $\gamma$  導入 R-U937 細胞と shHP1 $\gamma$  導入 R-HL-60 細胞の増殖は DOX 処理によって、それぞれ  $52.5 \pm 2.2\%$  ( $p =$

$0.0093$ )、 $51.6 \pm 4.0\%$  ( $p = 0.0093$ ) に低下した。また、shHP1 $\gamma$  導入 R-U937 細胞では DOX 処理により Annexin V 陽性/PI 陰性細胞や Annexin V 陽性/PI 陽性細胞の増加 (それぞれ 3.9%  $\rightarrow$  9.6%、6.1%  $\rightarrow$  19.4%) がみられた。shHP1 $\gamma$  導入 R-HL-60 細胞でも、DOX 処理は Annexin V 陽性/PI 陰性細胞や Annexin V 陽性/PI 陽性細胞を増加させた (それぞれ 6.8%  $\rightarrow$  8.4%、7.3%  $\rightarrow$  18.0%)。しかし shHP1 $\gamma$  導入 U937 細胞と shHP1 $\gamma$  導入 HL-60 細胞の、増殖能や Annexin V 陽性率、PI 陽性率は DOX 処理の影響を受けなかった。

【考察】 HP1 $\gamma$  は、AZA 耐性細胞特異的に重要な機能を果たしていることが示された。HP1 $\gamma$  が AZA 耐性を獲得した骨髄系腫瘍の新たな治療標的となる可能性が考えられる。

### P1-14.

#### Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activates nephronectin expression in osteoblasts

(大学院博士課程 3 年口腔外科学)

○池畑美紀子

(歯科口腔外科・矯正歯科)

近津 大地

Nephronectin (Npnt) is an extracellular matrix protein that plays crucial roles as an adhesion molecule in functions of various organs, such as the kidneys and bones. Furthermore, a high level of Npnt expression is observed in osteoblasts. Thus, clarification of the regulation mechanism of Npnt expression is important for understanding the association between bone development and cell adhesion. Previous studies have suggested that Wnt3a induces Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, which promotes the proliferation of pre-osteoblasts, and also plays an important role in the control of bone mass. Wnt proteins are secreted glycoproteins that play a variety of crucial roles in early development and morphogenesis, as well as cell growth and differentiation, and are known to be essential for tissue regeneration. In the present study, we first examined the regulation of Npnt expression by Wnt family proteins using MC3T3-E1 cells. We found that Wnt3a, an activator of the canonical Wnt signaling pathway, upregulates the expression of Npnt in both a time- and dose-dependent

manner. Next, to investigate the regulatory mechanism of Npnt expression by Wnt3a in osteoblasts, we analyzed the effects of inhibition of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway using inhibitors and a small interfering RNA targeting  $\beta$ -catenin. In conclusion, we found that Wnt3a promotes Npnt gene expression via the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. Our results suggest that Wnt3a induces various mechanisms that are involved in osteoblast proliferation and cell survival via Npnt gene expression.

#### P1-15.

#### Highly efficient osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells by a helioxanthin-derivative (TH)

(大学院博士課程 3 年口腔外科学)

○藤居 泰行

(歯科口腔外科・矯正歯科)

古賀 陽子、近津 大地

Recently, human dental pulp stem cells (hDPSCs) were identified, and could differentiate into multilineage cell types. hDPSCs are now considered a type of mesenchymal stem cells and exhibit higher clonogenic and proliferative potential than bone marrow stem cells. Meanwhile, the treatment of severe bone defects remains a great challenge, and novel bone regenerative medicine has been required. Several studies have shown that a helioxanthin derivative (TH) induces osteogenic differentiation of preosteoblastic and mesenchymal cells. However, the osteogenic differentiation activities of TH were showed only in specific cell lines. Therefore, the effects of TH for human primary cells remain unknown. In this study, we explored to induce osteogenic differentiation of hDPSCs efficiently using TH. Furthermore, we investigated the ability of osteogenesis of TH induced hDPSCs sheets *in vivo*.

hDPSCs were obtained from dental pulp of third molars from 16-22 year old patients and cultured in osteogenic condition with or without TH ( $10^{-5}$  to  $10^{-8}$  M). TH at  $10^{-6}$  M induced matrix mineralization of hDPSCs more intensively than the other concentrations of TH as evidenced by Alizarin red staining. RT-qPCR

showed that osteogenic condition with TH significantly upregulated the gene expression levels of *Alp*, *colla1*, and *osteocalcin*. Furthermore, cell-sheets generated by culturing hDPSCs with TH on temperature-responsive dishes achieved bone healing in mouse calvaria defect models.

We demonstrated that osteogenic condition with TH induces the osteogenic differentiation of hDPSCs more efficiently. Moreover, we succeeded in bone regeneration *in vivo* by hDPSCs-sheets with TH. TH induced hDPSCs may be a useful cell source of bone regenerative medicine.

#### P1-16.

#### 特別養護老人ホーム入所者におけるサルコペニアと認知機能の関連

(高齢総合医学分野)

○都河 明人、清水聡一郎、佐藤 友彦

廣瀬 大輔、渡邊 亮、羽生 春夫

【目的】 要介護状態患者に 12 ヶ月間の運動介入を行い、筋力、筋肉量、認知機能の変化を検討した。

【方法】 要介護状態の特別養護老人ホームに入居中の 37 例（要介護度： $3.3 \pm 1.0$ 、Barthel Index： $44.2 \pm 18.9$ 、サルコペニアの有病率 68%）を対象とした。無作為に運動介入群 19 例、非介入群 18 例に振り分けた。運動介入群には、週 2 回 40 分程度の運動介入を 8 人程度のグループに分け、12 ヶ月施行した。

サルコペニアはアジア基準（一部改編）を用いて評価した。筋力・筋量評価項目として Skeletal Mass Index (SMI)、握力、認知機能評価として MMSE、Trail Making Test Part A、抑うつ気分の評価として GDS-15 を施行し、その変化を検討した。

【結果】 介入前と 12 ヶ月後間では、MMSE、握力で運動介入群が非介入群に対して有意な改善を認めた。

【考察】 要介護状態の特別養護老人ホーム入居者への 12 ヶ月間の運動介入では、運動介入群において認知機能の改善を認めた。要介護状態においても、運動介入の効果があることが示唆された。以上より、今後要介護状態の患者に対して、積極的に運動介入を行う有用性が示唆された。運動介入の方法に関しては、要介護状態の患者に対しては従来の運動介入