

論文の内容の要旨

氏名：工 藤 洋

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Functional role of the silent information regulator 2 homolog 1 (SIRT1) in periapical granulomas
(歯根肉芽腫における SIRT1 の機能的役割)

Silent information regulator 2 homolog 1 (SIRT1) は nicotinamide adenine dinucleotide 依存性ヒストン脱アセチル化酵素である。SIRT1 を含む Sirtuin family は哺乳類で7種類発見されており、特に SIRT1 の生体に対する機能は明らかにされつつある。SIRT1 は p53 タンパクを脱アセチル化することで、その活性を低下させる働きがあるため、p53 依存性細胞死を抑制することにより細胞増殖を促進する。また、SIRT1 は細胞内活性酸素抑制やアポトーシスの抑制に関与する。すなわち、SIRT1 は生体組織内での酸化ストレスを抑制し、細胞の新生や創傷治癒に有効な役割を果たしていると考えられている。

SIRT1 活性を調整する物質の研究もされており、ぶどうに含まれるポリフェノールの一種である resveratrol は、SIRT1 発現を上昇させることで①酸化ストレスによる細胞内活性酸素増加の抑制、②内皮細胞における ICAM-1 の発現抑制、③肥満細胞における Th2 サイトカイン発現抑制などを誘導するとされている。

一方、sirtinol はヒストン脱アセチル化酵素の選択的な阻害剤であり、SIRT1 発現を抑制することで NF- κ B 活性化による炎症増悪や p53 介在性アポトーシスを促進させることが明らかにされている。

そこで著者は、SIRT1 が創傷治癒に深く関与していることを鑑み、幼若毛細血管形成ならびに炎症性細胞浸潤を伴った炎症性疾患である歯根肉芽腫の治癒課程における SIRT1、resveratrol ならびに sirtinol の炎症性細胞への作用、SIRT1 の創傷治癒への関与を細胞培養系および採取した歯根肉芽腫試料を用いて検討した。

まず、SIRT1 が細胞増殖および炎症に伴う酸化ストレスに及ぼす影響を検索する目的で、ヒト単芽球細胞株である U-937 を用いて研究を実施した。すなわち、lipopolysaccharide (LPS, *E.coli* 0111:B4 由来)、resveratrol (SIRT1 activator) および sirtinol (SIRT1 inhibitor) による単独あるいは共刺激下で U-937 を一定期間 (0~24 時間) 培養し、上記物質の添加濃度および刺激時間を変化させた際の SIRT1 発現を観察した。その結果、LPS および resveratrol の単独刺激では、培養 6 時間後に SIRT1 mRNA の発現量はピークに達したが、培養 24 時間後には無刺激(コントロール)と同程度に低下した。しかし、LPS と resveratrol による共刺激においては培養 6 時間後に最も高い SIRT1 mRNA 発現を示し、培養 12 および 24 時間後も発現増加が認められた。同実験条件に sirtinol を添加したところ、LPS と resveratrol の共刺激による SIRT1 mRNA 発現増加は抑制され、コントロールと同程度となった。さらに、同様の刺激条件下で U-937 を培養した後、サイトスピン標本を作製し、蛍光二重染色法を用いて SIRT1、細胞増殖マーカーである Ki-67、酸化ストレスマーカーである 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) の発現を検索した。標本の染色は 1 次抗体に抗ヒト SIRT1 ウサギモノクローナル抗体および抗ヒト Ki-67 マウスモノクローナル抗体または抗ヒト 8-OHdG マウスモノクローナル抗体を用いた。次いで 2 次抗体として fluorescent isothiocyanate (FITC) 標識抗ウサギ抗体または rhodamine isothiocyanate (RITC) 標識抗マウス抗体を用いた。核は 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で染色した。その結果、SIRT1 および Ki-67 は、LPS と resveratrol で共刺激した際に最も高いタンパク発現を示した。一方、LPS と sirtinol で共刺激した条件下では、SIRT1 および Ki-67 タンパク発現はコントロールと同程度を示し、SIRT1 活性の抑制が観察された。8-OHdG タンパクの発現に関しては、resveratrol で刺激してもその発現は認められず、コントロールと同様のレベルであった。DAPI 陽性細胞に対する FITC または RITC 陽性細胞の割合を算定して陽性細胞率とした。その結果、LPS 刺激に比べて resveratrol 刺激で有意に高い SIRT1 陽性率を示した。また、LPS 単独刺激に比べて LPS と sirtinol の共刺激で有意に高い 8-OHdG 陽性率を示したことから sirtinol により SIRT1 発現が抑制されたことで 8-OHdG 発現が増加したと推察された。

次に、歯根肉芽腫における SIRT1 タンパクの発現について検索した。外科的歯内療法または抜歯術により採取された根尖病巣組織を OCT コンパウンドに包埋、凍結後、クリオスタットを用いて 5 μm の凍結切片を作製した。凍結切片は H&E 染色を施したのち、病理組織学的に歯根肉芽腫と判定されたサンプル (n = 7, 男:女 = 3:4, 20-74 歳) のみを実験に用いた。また、完全水平埋伏歯の抜去の際に採取した健常歯肉組織 (n=5, 男:女 = 3:2, 20-57 歳) をコントロールとした。採取した試料の凍結標本に対する蛍光二重染色法は、1 次抗体として抗ヒト SIRT1 ウサギモノクローナル抗体、抗ヒト 8-OHdG マウスモノクローナル抗体を作用させ、次いで 2 次抗体として FITC 標識抗ウサギ抗体または RITC 標識抗マウス抗体を用いて発現細胞を検出した。その結果、歯根肉芽腫中の円形細胞に SIRT1 タンパクと 8-OHdG タンパクの共発現が認められたが、健常歯肉組織では SIRT1 および 8-OHdG タンパクは確認されなかった。

U-937 を用いた分子生物学的ならびに免疫組織化学的解析により、LPS や resveratrol の添加が SIRT1 mRNA およびタンパク発現量を上昇させること、SIRT1 タンパクと Ki-67 タンパクが共発現すること、sirtinol 添加が SIRT1 発現を抑制して 8-OHdG タンパク発現増加を促すことが明らかとなった。さらに、歯根肉芽腫中の SIRT1 タンパク発現細胞は 8-OHdG タンパクを共発現していることが免疫組織化学的検索により確認された。

以上の研究結果より、慢性炎症性疾患である歯根肉芽腫において SIRT1 は細胞増殖の促進や酸化ストレスの軽減・抑制を介して治癒促進に深く関与している可能性が示唆された。