

## 論文審査の結果の要旨

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)

審査委員：（主査） 教授 佐藤 秀一

（副査） 教授 小木曾 文内

教授 浅野 正岳

教授 川戸 貴行

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。また、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、resveratrol は、SIRT1 発現を上昇させることが判明しているが、sirtinol は SIRT1 発現を抑制することで NF- $\kappa$ B 活性化による炎症増悪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検討した。

実験 1 では、ヒト単芽球細胞株である U-937 を用いた。すなわち、lipopolysaccharide (LPS, *E.coli* 0111:B4 由来)、resveratrol および sirtinol による単独あるいは共刺激下で U-937 を一定期間培養し、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。実験 2 では、実験 1 と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。実験 3 では、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歯根肉芽腫を凍結切片化して実験に用いた。また、健常歯肉組織をコントロールとした。切片に対する蛍光二重染色法は、実験 2 と同様の抗体を用い、発現細胞を検出した。

その結果、以下の結論が得られた。

1. 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。
2. 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が LPS と sirtinol で共刺激した条件下ではコントロールと同程度であった。陽性細胞率を計測した結果、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 陽性率となった。
3. 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。

以上のことから、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、歯内療法学ならびに関連歯科臨床分野に寄与するところが大きいものと考えられた。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成30年3月7日