

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 皆川 高嘉  
学位 博士 (歯学)  
学位記番号 新大院博 (歯) 第323号  
学位授与の日付 平成27年3月23日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
博士論文名 Resveratrol suppresses the inflammatory responses of human gingival epithelial cells in a SIRT1 independent manner  
(Resveratrol はSIRT1 非依存的に歯肉上皮細胞の炎症性応答を抑制する)

論文審査委員 主査 教授 山崎 和久  
副査 教授 吉江 弘正  
副査 教授 織田 公光

博士論文の要旨

【背景および目的】

ブドウや赤ワインに多く含まれる Resveratrol は、SIRT1 の活性化を介して老化関連性疾患の発症を遅らせることが報告されている。また Resveratrol には抗炎症性作用があることも報告されているが、詳細な作用メカニズムはわかっていない。歯周炎は歯周病原細菌に対する宿主の炎症性応答により、歯周組織が破壊される慢性炎症性疾患である。病原細菌に最初に接する歯肉上皮細胞は物理的なバリアとして働くだけでなく、炎症性サイトカインやケモカインを産生することにより病態形成に深く関与する。本研究では Resveratrol が歯肉上皮細胞の炎症性応答に与える影響およびそのシグナル経路を解析する。

【材料および方法】

ヒト歯肉不死化細胞株 epi4 (大阪大学 村上伸也教授より供与) を以下の全ての実験で用いた。epi4 を *Porphyromonas gingivalis* 菌体 (Live または Heat-killed) で刺激した場合の炎症性サイトカイン (IL-8, MCP-1, IL-1 $\beta$ ) の遺伝子発現に対する Resveratrol の影響を Real-time PCR 法にて解析した。その場合の Resveratrol の作用メカニズムを解析するため、Sirtinol にて SIRT1 を阻害、または SIRT1 をノックダウンした場合の影響を解析した。さらに AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) や NF- $\kappa$ B の活性化レベルを Western blotting 法にて、および活性酸素種 (ROS) の産生レベルをフローサイトメトリー法にて解析した。

【結果・考察】

Resveratrol は epi4 において炎症性サイトカイン発現を抑制し、SIRT1 遺伝子発現をわずかに上昇させた。しかしながら、SIRT1 の阻害やノックダウンにより Resveratrol の抗炎症作用は阻害されなかった。また、Resveratrol は AMPK 活性や ROS 産生にも影響を及ぼさなかった。その一方で、Resveratrol は Heat-killed *P. gingivalis* で刺激した場合の NF- $\kappa$ B p65 の核内移動を抑制した。以上より、Resveratrol は SIRT1 非依存的にヒト歯肉上皮細胞の炎症性応答を抑制することが示唆された。

【結論】

Resveratrol は SIRT1 非依存的に NF- $\kappa$ B シグナリングを抑制することにより、ヒト歯肉上皮細胞の炎症性応答を抑制した。

## 審査結果の要旨

歯周疾患は代謝性疾患や自己免疫疾患など様々な疾患のリスクを高めることが報告されているが、因果関係や生物学的メカニズムには不明の点が多く残されている。申請者の所属する研究グループではこれまで歯周炎患者を対照とした臨床研究や歯周病原細菌 *P. gingivalis* 口腔感染マウスモデルを用いた実験的歯周炎の解析から歯周炎あるいは歯周病原細菌感染が生体に影響を及ぼすことを報告してきた。また、サプリメントとして広く用いられている Resveratrol が SIRT1 を活性化し、NF-κB を制御するとの報告がされているが、その詳細なメカニズムはわかっていなかった。これらの研究を基盤として、申請者は Resveratrol が SIRT1 を活性化し、様々な代謝システムの影響を受けて NF-κB を制御することで歯肉上皮細胞の炎症性応答反応を抑制するとの仮説を立てた。これを実証するため、*epi4* を *P. gingivalis* 菌体 (Live または Heat-killed) で刺激した場合の炎症性サイトカイン (IL-8, MCP-1, IL-1β)・SIRT1 の遺伝子発現、AMPK、ROS、NF-κB の活性化レベルの測定をし、Resveratrol が歯肉上皮細胞の炎症性応答に与える影響およびそのシグナル経路の解析を行った。結果は仮説の通り Resveratrol が歯肉上皮細胞において *P. gingivalis* による NF-κB 活性を有意に抑制したという結果を示した一方、SIRT1 活性については明確な関連を示さなかったが、生物学的メカニズムの解明につながる研究の先駆けとなった。

歯肉上皮細胞における Resveratrol の炎症性応答抑制を示した初めての報告であり、その学術的意義はきわめて大きいと判断する。

学位論文に関して主査、副査による下記内容に関する質疑応答を行った。

- ① Heat-killed P.g 処理法について
- ② 炎症性サイトカイン遺伝子発現で Heat-killed P.g が Live P.g より発現しているのはなぜか。
- ③ TLR2 は何を認識しているか
- ④ 何が SIRT1 を活性化しているか。
- ⑤ SIRT1 の標的・作用は。
- ⑥ Western blotting 法で核の p65 は 2 本バンドに見えるが、分子量でみていないのか。
- ⑦ NF-κB の活性化について、核内に入るものは分子量が小さくなっているのでは。
- ⑧ 炎症性サイトカイン遺伝子発現、NF-κB p65 タンパク発現で Heat-killed P.g が Live P.g より発現が高いのはなぜか。
- ⑨ Resveratrol の上皮に対する作用メカニズムについて。
- ⑩ IL-8 の遺伝子発現 (Fig. 1) では Resveratrol の抑制作用が認められるのに、タンパク発現 (Fig. 3) では Resveratrol の抑制作用が認められない点について。また、IL-1β タンパク発現 (Fig. 3) において検出限界以下であった点について。
- ⑪ SIRT1 ノックダウンの程度について。
- ⑫ Resveratrol の NF-κB p65 の抑制メカニズムについて。
- ⑬ 今後すべきこと。

本研究は、歯周炎の予防・治療に寄与するものであり、学位論文として十分な価値を認める。論文内容に関する試問に対しても十分な回答を得ることができた。よって、博士 (歯学) の学位を授与するにふさわしいと判断した。