

| | |
|----------------|--|
| ふ り が な 氏 名 | かんだ ともこ 神田 智子 |
| 学 位 の 種 類 | 博士（歯学） |
| 学 位 記 番 号 | 甲 第 1012 号 |
| 学位授与の日付 | 令和7年3月7日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項に該当 |
| 学 位 論 文 題 目 | Role of sodium-dependent vitamin C transporter 2 in human periodontal ligament fibroblasts (歯根膜線維芽細胞における sodium-dependent vitamin C transporter2 の役割) |
| 学 位 論 文 掲 載 誌 | Journal of Periodontal Research 第 60 巻 第 1 号 令和7年2月 |
| 論 文 調 査 委 員 | 主 査 梅田 誠 教授 副 査 前田 博史 教授 副 査 橋本 典也 教授 |

論文内容要旨

歯根膜はセメント質と歯槽骨をつなぐ線維性結合組織であり、常に咬合力による機械的なストレスにさらされている。歯根膜由来線維芽細胞(PDLF)は歯根膜において大多数を占める細胞種であり、I型コラーゲンを産生し、高い Alkaline phosphatase (ALP)活性を示すなどの特徴を持つことが知られている。また、アスコルビン酸(Ascorbic Acid: AA)は抗酸化作用やプロリン水酸化促進作用を有する水溶性のビタミンであり、PDLF のマトリクスの産生や骨芽細胞分化に関与すると考えられている。Sodium-dependent vitamin C transporter (SVCT)は AA の細胞内輸送を制御するトランスポーターであり I 型と II 型があることが知られている。しかしながら PDLF における SVCT の発現については全く検討されていない。本研究の目的は PDLF における SVCT の発現および機能について検討することである。

PDLF は Lonza 社より購入し実験に用いた。遺伝子発現の検討には RT-PCR 法、real time-PCR 法を用いた。SVCT のタンパク発現については免疫染色、フローサイトメトリー、Western blot 法を用いて検討した。コラーゲン産生にはシリウスレッドによる染色法を、ALP 活性には BCIP-NBT を基質とした ALP 活性染色法を用いた。SVCT2 の遺伝子発現は siRNA を用いてノックダウンを行った。さらに、SVCT2 が発現を抑制する遺伝子の網羅的な解析には RNA-sequence を用いた。

RT-PCR および real time-PCR の結果、PDLF では SVCT1 の発現は非常に低く、SVCT2 が主に発現することが明らかとなった。またタンパクレベルにおいても PDLF が SVCT2 を発現することが確認された。マウス歯周組織切片を用いて SVCT2 の免疫染色を行ったところ、歯根膜、歯髄、歯肉結合組織、上皮細胞において発現が検出された。また、AA は PDLF のコラーゲン産生および ALP 活性を増強したが、SVCT2 を siRNA でノックダウンすると、AA によるコラーゲン産生、ALP 活性の増強は著しく減弱した。PDLF において SVCT2 をノックダウンした際に変動する遺伝子について RNA-sequence を

用いて検討したところ、遺伝子発現が増加する遺伝子が 20 個、抑制される遺伝子が 57 個、同定された。さらに Gene Ontology 解析においては” DNA damage sensor activity” が上位に見られた。SVCT2 ノックダウンによって遺伝子発現が変動し、DNA damage 修復に関与する可能性のある MSH5、DMC1 に着目しさらに検討したところ、AA 刺激によって両遺伝子の発現が有意に増強することが明らかとなった。

本研究の結果、PDLF が SVCT2 を発現し、AA は SVCT2 を介して PDLF のコラーゲン産生および ALP 活性を増強することが示された。また RNA-sequence 解析から、DNA damage 修復に関与する可能性のある遺伝子である MSH5 や DMC1 が、SVCT2 を介した AA の新たな分子標的であることが初めて明らかとなった。結論として、SVCT2 は歯根膜における AA の細胞内取り込みを制御し、AA を介した歯根膜の生理的機能に重要な役割を担っている。

論文審査結果要旨

本論文は、歯根膜の生理機能を制御しているアスコルビン酸 (AA) に着目し、その細胞内への取り込みをコントロールする細胞膜上のトランスポーター、Sodium-dependent vitamin C transporter (SVCT) の役割について、主に培養歯根膜細胞を用いて検討したものである。

歯根膜は歯と骨の間に介在する線維性結合組織であり、歯に掛る咬合圧の緩衝の他、幹/前駆細胞を歯周組織に供給し歯周組織の恒常性維持に重要な役割を果たす。AA は歯根膜細胞のマトリクス産生や細胞分化を制御することが知られているが、歯根膜細胞における AA の作用機序については不明な点が多く残されている。本研究は、AA の細胞内への取り込みを司るトランスポーターである SVCT に焦点を絞り、培養歯根膜細胞を用いてその発現様式および機能を検討したものである。

結果として、培養歯根膜細胞がタンパクおよび遺伝子レベルで SVCT2 を発現しており、また、歯周組織においても歯根膜全体に SVCT2 が発現することが確認された。SVCT1 については歯根膜線維芽細胞での発現は非常に低いことも明らかとなった。さらに、AA によって増強される歯根膜細胞のアルカリフォスファターゼ活性および一型コラーゲン産生は、SVCT2 を siRNA によって発現抑制した条件下では有意に減弱し、この結果は AA が SVCT2 を介して歯根膜細胞に作用することを示している。また、歯根膜細胞における SVCT2 自体の発現が AA によって増強されており、この経路においても SVCT2 が AA の作用を制御していることも明らかとした。さらに、歯根膜細胞における SVCT2 のノックダウンによって変動する遺伝子の網羅的解析から、SVCT2 を介して DNA damage sensing にかかわる AA の新たな分子標的として MSH5 と DMC1 を同定した。

本研究の意義は、歯周組織の重要な結合組織である歯根膜の機能を AA とそのトランスポーターの役割から解明したことであり、これにより歯根膜の細胞分化、細胞外マトリクス産生の作用機序の一部が新たに明らかとなった。また、AA の歯根膜における新たな機能制御に関する実験結果も得られており、歯根膜細胞の生理機能の理解を進める可能性が示唆される。これらの知見は、歯周組織の理解や歯周病治療の発展に寄与する重要な学術的基盤となると考えられる。

以上より、本論文は博士（歯学）の学位を授与するに値するものと判定した。