

論文内容の要旨

氏名：野田 一

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Immunohistochemical Localization of YAP and TAZ in Tongue Wound Healing

（舌創傷治癒における YAP および TAZ の免疫組織化学的局在）

YAP(yes-associated protein)およびTAZ(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif)は細胞内シグナル伝達経路の一つである Hippo シグナルの下流に存在する重要な転写共役因子である。Hippo シグナルは1995年にショウジョウバエにおいて発見され、上流に存在する4つの因子、Hippo, WW45, Warts, Mats の活性化を経て、下流に存在する Yorkie の制御を介して細胞増殖や細胞死など多彩な細胞応答を誘導する。2007年に哺乳動物においても、Hippo シグナルに関与する遺伝子が高度に保存されていることが確認された。Hippo, WW45, Warts, Mats およびYorkieに対する哺乳類相同遺伝子は、Mst1/2, Salvador, Lats1/2, Mob1a/1b および YAP/TAZ である。Hippo シグナルは器官サイズの決定、組織恒常性の維持および癌の進展などに関与することが明らかになっており、近年では下流標的因子である YAP および TAZ (以下、YAP/TAZ) に焦点を当てた様々な研究が行われている。

一方、創傷治癒は外傷による損傷や腫瘍などの組織を摘出あるいは切除した後の欠損部位に認められる修復過程であり、二次治癒過程では多量の肉芽組織形成を伴って修復は進行していく。創部の上皮細胞、線維芽細胞および血管内皮細胞の増殖には、EGF, FGF, VEGF などの成長因子が深く関与する。YAP および TAZ (以下 YAP/TAZ) も細胞増殖に関与する因子であり、近年、皮膚における創傷治癒において YAP/TAZ が重要な因子であるとの報告がなされているが、口腔組織の創傷治癒に着目した研究はみられない。従って本研究では、口腔の創傷治癒における YAP/TAZ の役割を明らかにするため、マウスの舌に欠損創を作製し、YAP/TAZ の発現について免疫組織学的手法を用いて経時的に検索した。

実験動物は、8週齢の ICR 系雄性マウス 40 匹を用いた。3種混合麻酔薬を腹腔内注射後、舌背中央部に直径 2mm、深さ 1mm の筋組織にまで及ぶ円形の欠損創を、生検トレパンを用いて作製した。創作製後 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 28 日目に灌流固定を行い、舌を切除した。その後、通法に従いパラフィンブロックを作製し、4 μ m の薄切切片を HE 重染色、YAP/TAZ に対する抗体を用い免疫組織化学染色を行い、組織学的に観察した。免疫染色の観察は、再生上皮の基底層細胞、有棘層細胞、顆粒層細胞および線維芽細胞、炎症性細胞、血管内皮細胞、再生筋を対象として行った。また、YAP/TAZ に対する免疫染色結果は染色細胞の割合および染色強度を数値化し評価した。染色割合についてはスコア 0：陽性なし、スコア 1：<10%、スコア 2：10%-50%、スコア 3：>50%とし、染色強度についてはスコア 0：染色なし、スコア 1：弱い染色強度、スコア 2：中程度の染色強度、スコア 3：強い染色強度とした。これらの数値の点数を合計し最終スコアとした。

肉眼所見では、0日目に作製した直径 2mm の円形な潰瘍は、日数を追うに連れて徐々に縮小し、7日目には上皮によって完全に被覆された。

HE 重染色および免疫組織化学染色による顕微鏡所見において、0日目では、上皮および上皮下組織に欠損がみられ、既存の上皮や線維芽細胞および筋組織に明らかな YAP/TAZ に陽性を示す細胞は認められなかった。1日目では、潰瘍内にフィブリンの析出および炎症性細胞の浸潤を認めた。免疫組織化学染色では、YAP/TAZ の陽性反応を潰瘍辺縁の上皮各層と炎症性細胞に強く認めた。3日目および5日目では、再生上皮の増殖および肉芽組織の形成により線維芽細胞、毛細血管および炎症性細胞を認めた。YAP/TAZ の強い陽性反応は、再生上皮各層および線維芽細胞、炎症性細胞に認められた。一方、血管内皮細胞は、YAP には強い染色強度を示したが、TAZ には弱い染色強度を示した。7日目では、再生上皮による創の被覆と、炎症性細胞の減少、線維芽細胞や血管、そしてコラーゲン線維形成を伴う肉芽組織の形成を認めた。TAZ 陽性上皮細胞は、各層均一に中程度の染色強度をもって認めたのに対して、YAP 陽性上皮細胞数は各層で異なり、染色強度も異なる結果を示した。線維芽細胞、血管内皮細胞の YAP/TAZ における陽性細胞の割合は、ほぼ同じであったが、異なる染色強度を示した。肉芽組織深部の再生筋は、多くの細胞に YAP/TAZ とともに強い染色強度を認めた。10日目および14日目では、創部の縮小を認め、上皮下では成熟した肉芽組織が観察され、細胞成分の減少、コラーゲンの増生を認めた。また、周囲には再生筋を認めた。上皮において陽性を示す細胞は YAP/TAZ とともに減少した。YAP の陽性細胞は有棘層に比較的多く認められ、核内染色を示す上皮細胞

も観察された。肉芽組織内の線維芽細胞および血管内皮細胞において YAP/TAZ に陽性を示す細胞は減少し、弱い染色強度を示した。肉芽組織周囲の再生筋は依然として YAP/TAZ とともに強い染色強度を示した。28 日目では、線維性結合組織に類似した組織像を示し、上皮細胞、線維芽細胞において、YAP/TAZ とともに陽性を示す細胞はほとんど認められなかった。

スコア結果に関しては、上皮および線維芽細胞では、YAP/TAZ とともに治癒早期から高いスコアを示し、7 日目以降は穏やかに減少していった。炎症性細胞は、YAP/TAZ とともに早期浸潤時から高いスコアを示し、その後は減少していった。血管内皮細胞では、YAP と TAZ でスコアに差が生じ、YAP よりも TAZ に対して低いスコア結果となった。再生筋は、YAP/TAZ とともに高いスコアを示した。

これらの結果から、上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞および再生筋の細胞増殖に YAP/TAZ が深く関与することが示唆され、炎症性細胞では、免疫応答に YAP/TAZ の発現が必要であることが考えられた。血管内皮細胞に対する YAP と TAZ の染色強度の相違は血管新生や細胞分化における機能の差異を示している可能性が考えられた。また 10 日目以降の上皮有棘層における YAP の染色結果から細胞の張力との関与が示唆された。線維芽細胞における YAP/TAZ の発現は、細胞増殖のみならずコラーゲン線維形成のために必要であることが考えられた。

以上の結果から、YAP/TAZ は舌創傷治癒過程における上皮細胞および線維芽細胞の増殖、炎症性細胞の免疫応答、毛細血管の新生および筋の再生に必要な因子であることが示唆された。