

## 論文審査の結果の要旨

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）

審査委員：（主 査） 教授 牧山 康秀  
（副 査） 教授 金田 隆  
教授 岡田 裕之  
教授 小宮 正道

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の活性化の調節を経て、下流に存在する標的分子Yokieの制御を介し、細胞増殖、細胞分化および細胞死を含む多彩な細胞応答を誘導する。Hippo シグナルは、哺乳動物においてもまた、同様に保存されていることが2007年に同定された。Hippo, WW45, Warts および Mats に対する哺乳類相同遺伝子は、Mst1/2, Salvador, Lat1/2 および Mob1a/1b である。また、Yokie に対する相同遺伝子は、YAP および TAZ である。YAP および TAZ は、生体における細胞数の調節を介して、器官サイズの決定、組織恒常性の維持およびがん抑制に作用することが知られており、生化学的および組織学的研究が行われている。一方で、創傷治癒は外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る。二次治癒の場合では、多量の肉芽組織形成を伴って創傷治癒は進行していく。創部の上皮細胞、線維芽細胞および血管内皮細胞は、それぞれの成長因子である EGF, FGF および VEGF が、Ras/MAPK 経路や PI3K/Ark 経路を介して、細胞増殖の進行に関与する。YAP および TAZ は、Hippo シグナルを介して、細胞増殖に関与する因子であることが示されているため、創傷治癒過程において必要な因子であると仮定した。事実、皮膚の創傷治癒に関する YAP および TAZ に対する研究は散見されるものの、口腔組織の創傷治癒に関する YAP および TAZ に対する研究はみられない。したがって本研究では、舌の創傷治癒過程における YAP および TAZ の発現およびその局在を観察し、治癒に関連するそれぞれの役割について検討した。

実験動物には、8週齢のICR系雄性マウスを40匹用いた。三種混合麻酔薬を用いて腹腔内注射後、舌背中央部に直径2mm、深さ1mmの筋組織にまで及ぶ欠損創を、生検トレパンを用いて作製した。欠損創作製後、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 $\mu$ mの薄切切片をヘマトキシリン・エオジン(HE)重染色、YAPおよびTAZに対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、舌創傷治癒経過とYAPおよびTAZの局在を組織学的に観察した。観察部位は、創辺縁の既存上皮および再生上皮の基底層細胞、有棘層細胞、顆粒層細胞、線維芽細胞、炎症性細胞、血管内皮細胞、再生筋を対象とした。また、YAPおよびTAZに対する免疫染色結果は、それぞれの細胞ごとに陽性細胞数の割合および染色強度をスコア化して得た点数を合計し、最終スコアとした。陽性細胞割合のスコア区分は、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、染色強度のスコア区分は、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。

肉眼所見では、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重染色による舌創傷治癒の経時的変化において、再生上皮は3日目から肥厚および伸展し7日目には創を被覆した。上皮下組織は、1日目からフィブリンの析出および炎症性細胞の浸潤を認めた潰瘍を形成

した。3日目以降から肉芽組織形成とともに線維芽細胞および毛細血管が増殖した。7日目以降、肉芽組織は細胞成分の減少に伴い成熟および縮小し、28日目では既存の線維性結合組織に類似した組織像を示した。再生筋は、5日目以降から肉芽組織周囲に常に観察された。

YAP および TAZ の経時的な免疫染色結果において、上皮細胞は増殖時に YAP および TAZ は各層で強い発現を示し、創被覆後は穏やかに発現が減少した。10日目および14日目の有棘層細胞では、YAP において核内染色がみられた。炎症性細胞は1日目から YAP および TAZ は強い発現を示したが、その後は細胞数の減少とともに発現も減少していき、10日目に炎症性細胞は消失した。線維芽細胞は、3日目から YAP および TAZ とともに強く発現し、10日目以降、YAP および TAZ とともに発現は穏やかに減少した。幼若肉芽組織内の血管内皮細胞について、YAP および TAZ の陽性割合は同等だが、染色強度に差が生じ、YAP では強く、TAZ では弱い染色強度を示した。肉芽組織周囲にみられた再生筋は、YAP および TAZ とともに常に発現を示した。

それぞれの細胞の最終スコア結果に関して、上皮の全ての層は YAP および TAZ とともに増殖時に高いスコアを示し、創被覆後は穏やかに減少していった。炎症性細胞は YAP および TAZ とともに早期浸潤時に最も高いスコアを示し、その後減少した。線維芽細胞において、YAP の最終スコアは7日目に最も高い値であったのに対し、TAZ では3日目に最も高い値を示した。血管内皮細胞の最終スコアは、YAP では、血管新生時に最も高いスコアを示しその後は減少したのに対し、TAZ では血管新生時から常に一定のスコアを保った。再生筋は、YAP および TAZ とともに高い値を示した。

これらの結果から、上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、再生筋の細胞増殖および炎症性細胞の免疫応答に YAP および TAZ が関連していると思われた。YAP における上皮有棘層細胞でみられた核内染色結果は、細胞の張力との関連によって示されたと考えられた。肉芽組織成熟後の線維芽細胞の YAP および 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と推察された。血管内皮細胞に対する YAP および 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推論された。

本研究から、YAP および TAZ が、舌の創傷治癒過程にて上皮細胞、線維芽細胞、炎症性細胞、血管内皮細胞および再生筋に高度に発現し、細胞増殖および免疫応答に深く関与することが示唆された。加えて、本研究は YAP および TAZ の免疫組織化学的局在を示すことで、舌創傷治癒に関する基礎的な新たな知見を提供し、歯科医学ならびに口腔外科学に今後一層の発展が望めるものである。

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31年2月21日