

## 論文審査の結果の要旨

氏名：岡田 優一郎

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 Mouse Molar Tooth Germ

（マウス臼歯歯胚における YAP と TAZ の免疫組織化学的局在）

審査委員：（主査） 教授 近藤 信太郎

（副査） 教授 岡田 裕之

教授 久山 佳代

Hippo シグナル伝達は、細胞増殖、アポトーシス、および幹細胞の自己複製の調節を通じて器官のサイズを制御する。この経路はショウジョウバエで発見され、哺乳類においても進化的に保存されている。2つの主要な下流エフェクター Yes-associated protein (YAP) と transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ) は、リン酸化依存的に YAP/TAZ の活性を制御するキナーゼのカスケードを介してシグナルを伝達する。哺乳類の Hippo 経路では MST および LATS の2つのキナーゼとそれぞれアダプター分子 SAV, MOB 1 の4つをコア構成分子とし、転写共役因子である YAP や TAZ がその下流で作動する。刺激を受けて活性化された MST キナーゼは LATS キナーゼをリン酸化し、活性化された LATS キナーゼは、主に細胞増殖に働く YAP/TAZ をリン酸化する。リン酸化された YAP/TAZ は細胞質内に保持あるいは核から細胞質へ排出され、一部はユビキチン・プロテアソーム系依存的に分解される。Hippo 経路の活性化は YAP/TAZ を負に制御し、細胞増殖抑制に働く。Hippo シグナルは器官のサイズの決定や組織恒常性の維持、また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・TAZ に焦点を当てた様々な研究が行われている。

一方、歯の発生は、上皮と移動してきた神経堤由来の間葉との相互作用を通して、時間的・空間的に正確な細胞の増殖やアポトーシスの調節が行われ細胞分化・形態形成が進行する。歯の発生メカニズムには様々な遺伝子やタンパクが関与しており、歯の位置や形態を制御するホメオボックス遺伝子として Msx が、細胞の増殖・分化、硬組織形成に関わる細胞増殖因子群として BMP や FGF など多くの関連する因子が、明らかになっている。

近年、歯胚における Hippo シグナルの発現に関しては YAP についての報告が散見され、歯胚の各ステージで発現し、細胞増殖との関連や咬頭形成や歯根の形成などに関与することが示唆されている。しかし、TAZ に関する報告はほとんどみられず、ラット臼歯における報告があるのみである。これまでマウス歯胚において YAP と TAZ をともに検索した報告はみられず、本研究では、歯の発生に関する YAP・TAZ の役割を明らかにすることを目的とし、マウスの歯胚における YAP・TAZ の発現について免疫組織化学的手法を用いて検索した。

本研究は、日本大学動物実験委員会にて承認済み (AP19MAS009-1) である。ICR 系妊娠マウスから胎生 12 日 (E12)、14 日 (E14) および 18 日 (E18) の胎仔を摘出後、頭部を切断し、4%パラホルムアルデヒドによる固定、E18 マウスに対しては 10% EDTA にて脱灰後、通法に従いパラフィンブロックを作製し、下顎第一大臼歯歯胚を前頭断方向に 4  $\mu\text{m}$  の連続切片を作製し、組織観察に用いた。組織染色はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および免疫組織化学的染色を行った。

免疫組織化学的染色は、一次抗体として抗 YAP 抗体 (abcam) および抗 TAZ 抗体 (abcam) を用い、切

片を脱パラフィン後、0.3%過酸化水素含有メタノールによる内因性ペルオキシダーゼ活性のブロックおよび熱処理（抗 YAP 抗体に対しては pH 9.0 の Tris-EDTA 緩衝液、抗 TAZ 抗体に対しては pH 6.0 のクエン酸緩衝液）により抗原賦活化を行った。一次抗体として抗 YAP 抗体、抗 TAZ 抗体ともに 1,000 倍希釈で使用し、ヒストファインキット（ニチレイバイオサイエンス）の試薬を用いた。発色は DAB で行い、対比染色にはマイヤーのヘマトキシリンを使用した。なお、皮膚および口腔粘膜上皮における局在を陽性コントロールとして用い、陰性コントロールとして一次抗体の代わりに正常血清を使用した。

E12 の歯胚は蕾状期の形態を示した。口腔粘膜上皮から連続して上皮組織が上皮下に嵌入し、上皮の周囲に間葉細胞の凝集を認めた。YAP タンパクは歯原性上皮に局在を示したが、上皮周囲の間葉組織には観察されなかった。歯原性上皮における YAP タンパクは、基底層の細胞で陽性、基底層以外の細胞で陰性であった。また、口腔粘膜上皮において YAP タンパクは陽性であった。TAZ タンパクは、歯原性上皮および間葉組織の一部の細胞で陽性を示したが、多くの細胞は陰性であった。口腔粘膜上皮において TAZ タンパクは陽性を示した。

E14 の歯胚は帽状期の形態を示した。歯胚の構成要素であるエナメル器、歯乳頭、および歯小嚢が認められた。また、内エナメル上皮の中央にはエナメル結節も観察された。YAP タンパクはエナメル器に陽性を示し、歯乳頭と歯小嚢においては一部の細胞に局在を認めた。また、歯堤および口腔粘膜上皮は陽性であった。エナメル器では、YAP タンパクは内エナメル上皮、外エナメル上皮と星状網に局在を認めた。TAZ タンパクはエナメル器に観察され、歯乳頭および歯小嚢ではごく一部の細胞に局在を示した。エナメル器では星状網に TAZ タンパクの局在を認めた。

E18 の歯胚は鐘状期の形態を示した。将来の咬頭に位置する部位には、高円柱状で核の極性を示す前エナメル芽細胞とそれに面する一層の象牙芽細胞が観察され、象牙質の形成も観察された。YAP タンパクは、内エナメル上皮、外エナメル上皮、星状網において陽性であり、特に中間層においては強陽性であった。また、前エナメル芽細胞で強い局在が観察された。歯乳頭および歯小嚢では、YAP タンパクは部分的に陽性を示したが、多くの細胞が陰性であった。一方、TAZ タンパクの局在は一部の限られた部位にしか認められなかった。歯胚の歯原性上皮および間葉組織の大部分において、TAZ タンパクの陽性所見は見られなかった。TAZ タンパクの局在は、象牙質形成部位の前エナメル芽細胞と象牙芽細胞で観察された。

YAP タンパクは、歯胚の初期ステージから歯原性上皮に局在していたが、間葉組織にはほとんど発現を認めなかった。また、象牙質形成部位に対向する前エナメル芽細胞に陽性であった。一方、TAZ タンパクは歯胚の初期ステージでは上皮・間葉ともにほとんど局在を示さなかったが、硬組織形成時期の象牙芽細胞および前エナメル芽細胞に陽性であった。これらの結果から、YAP タンパクは歯の発生初期から発現しており、歯原性上皮の増殖や分化を制御する可能性が示唆された。また、鐘状期の前エナメル芽細胞における発現から、YAP タンパクは歯の硬組織形成、特にエナメル質形成と関係することが考えられた。一方、TAZ タンパクはその局在から、象牙質形成およびエナメル質形成に深く関わる可能性が考えられた。

本研究結果から、YAP と TAZ タンパクの発現には差異がみられ、YAP は歯の発生初期の蕾状期から歯原性上皮の増殖や分化を制御するとともに、その後のエナメル芽細胞への分化や硬組織形成に関与することが示唆された。一方、TAZ は歯の発生初期にはほとんど発現せず、鐘状期の象牙芽細胞および前エナメル芽細胞に局在し、歯の硬組織形成に重要であることが考えられた。

本論文は、マウス臼歯歯胚における YAP および TAZ タンパクの免疫組織化学的局在を示すことで歯の発生に関する新たな知見を提供したものであり、口腔組織・発生学および歯科臨床研究への寄与が大いに期待できる。

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

5 年 2 月 22 日