

論文審査の結果の要旨

氏名：杉崎 哲也

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 Incisor Tooth Germ

（マウス切歯歯胚における YAP と TAZ の免疫組織化学的局在）

審査委員：（主 査） 教授 清水 武彦

（副 査） 教授 岡田 裕之

教授 久山 佳代

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。

Hippo 経路は細胞接触や機械刺激を感知するユニークな経路で、器官のサイズ制御に関与すること、細胞分化に関与すること、強力ながん抑制遺伝子として作用することなどが明らかとなっている。器官のサイズは、構成する「細胞の数」と「個々の細胞の大きさ」によって規定されており、Hippo 経路が器官における「細胞数」の制御を担う。一方、「個々の細胞の大きさ」は栄養状態を感知する mTOR 経路により制御されていることが知られているが、多くの場合、器官のサイズ制御は「細胞の数」に依存している。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 および 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。この伝達経路が活性化状態である場合では、核移行タンパクで転写補助因子である Yorkie が Hippo・Salvador 複合体により活性化された Mats・Warts 複合体にリン酸化されることにより、Yorkie の核移行が阻害され、細胞増殖を抑制的に制御する。これらのホモログは下等生物から哺乳類まで保存され、ほぼ全ての器官に発現している。Hippo, WW45, Warts, Mats および Yorkie に対する哺乳類の相同遺伝子は、MST, Salvador, Lats, Mob および YAP/ TAZ である。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。

近年、歯胚における Hippo シグナルの発現に関してはいくつかの報告が散見され、歯胚の各ステージで発現し歯冠の形態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。これまでマウス切歯歯胚において YAP と TAZ をともに検索した報告はみられず、本研究は、歯の発生に関する YAP および 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これらタンパク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（AP19MAS009-3）である。ICR 系妊娠マウスから胎生 14 日（E14）および 18 日（E18）の胎仔を採取後、頭部を切断し、4 %パラホルムアルデヒドによる固定、10 % EDTA にて脱灰後、通常に従いパラフィンブロックを作製し、下顎切歯歯胚を矢状断方向に 4 μ 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。

E14 の歯胚は帽状期の形態を示した。YAP の陽性反応はエナメル器と歯乳頭に観察され、歯小嚢には弱い局在が認められた。YAP 陽性所見は歯堤にも観察された。エナメル器では、内外エナメル上皮に YAP の強い発現がみられ、星状網も陽性であった。E18 の歯胚は鐘状期の形態を示し、象牙質とエナメル質の形成が観察された。YAP はエナメル芽細胞と象牙芽細胞に強い局在が認められた。また歯乳頭でも YAP の発現が観察された。TAZ は E14 の歯胚においては、上皮および間葉ともに陰性であった。E18 の鐘状期歯胚においてはエナメル芽細胞に TAZ の強い発現を認めた。間葉において TAZ は象牙芽細胞に局在が認められ、一部の歯乳頭の細胞も陽性であった。

YAP と TAZ は歯の発生過程で異なる局在を示した。YAP は帽状期から歯原性上皮と間葉に局在したが、TAZ は帽状期には局在を認めなかった。鐘状期では、YAP と TAZ は同様の発現パターンを示し、エナメル芽細胞と象牙芽細胞の両方にその局在を認めた。これらの結果から、YAP は歯原性上皮および間葉の増殖に関与する可能性が示唆された。また、YAP と TAZ タンパクは、エナメル芽細胞および象牙芽細胞の分化に関係し、さらに基質産生と石灰化に関与することが示唆された。

本論文は、マウス切歯歯胚における 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

令和 年 月 日