

博士論文

ヘッジホッグシグナル伝達経路を標的とした神経分化の光制御

Optical control of Hedgehog signaling pathway for neural differentiation

三澤 龍志

1. 緒言

発生過程において、適切な時期に適切な場所で細胞が増殖や分化をおこなうことで、組織は非対称で複雑な形を獲得する。細胞は外部の環境に対して適切な応答（増殖・分化など）をするために、様々な細胞内シグナル伝達経路を利用している。シグナル伝達経路の活性化は、リガンドの受容体への結合から始まり、最終的には細胞内の転写因子が特定の遺伝子の発現を制御する。形態形成が正しく行われるために、様々なシグナル伝達経路のリガンドは、時空間的な分布が精密に制御されている。

ヘッジホッグシグナル伝達経路（Hh 経路）は、細胞の分化や増殖など細胞の多様な機能を制御する主要なシグナル伝達経路の一つである¹。Hh 経路の活性の時空間的な制御は、発生段階から成人に至るまでの間、様々な文脈において重要であることが知られている（Figure 1）。例えば、神経系の発生過程において、神経管の腹側から背側に向かって Hh シグナルの濃度勾配が作られ、背腹軸が決定される。また、Hh 経路の活性化は軸索誘導や幹細胞の増殖制御にも関わっている。

Hh 経路の異常は様々な疾患に関連している²。発生の過程で大脳半球が左右に分かれない全前脳胞症のような重篤な疾患は、Hh 経路の阻害によって引き起こされる。一方で、成人以降は、基底細胞がん、脳腫瘍、肺がん、乳がんなどの多様なガンにおいて Hh 経路の過剰な活性化がみられ、様々な Hh 経路阻害分子が抗がん剤として開発されてきた。このように、Hh 経路は広い時間スケールの中で様々な場所で活性が精密に制御されている必要があるため、もし Hh 経路を時空間的に自在に制御できたら、関連疾患の原因解明や、局所的に薬剤を作用させることで副作用の少ない治療に役立つのではないかと考えた。

光のような外部刺激に応答しその活性を発揮する生理活性分子は「ケージド化合物」と呼ばれている³。ケージド化合物を用いることで、生理活性物質のはたらく場所と時間を、光を照射する場所と時間で制御することができる。Hh 経路は発生過程から成人に至るまで働き、様々な疾患を引き起こすほど重要であるにもかかわらず、Hh 経路をターゲットにしたケージド化合物はこれまでに開発されてこなかった。そこで本論文では、Hh 経路を光制御する手法を開発し、その応用として光照射によって神経細胞の分化を制御することを目的とした。

2. 光活性化ヘッジホッグシグナル伝達経路アゴニストの開発とその特性評価

Hh 経路を制御する既存の小分子に着目した。Smoothened agonist (SAG) はもっとも広く研究に用いられている Hh 経路を制御する分子である。一般に、ある生理活性物質のケージド化合物を設計する際には、分子の活性に重要な部位に光分解性保護基を導入することが重要である。既存の報告によると、SAG の *N*-メチル基が *N*-プロピル基に置換された場合 SANT-75 というアンタゴニス

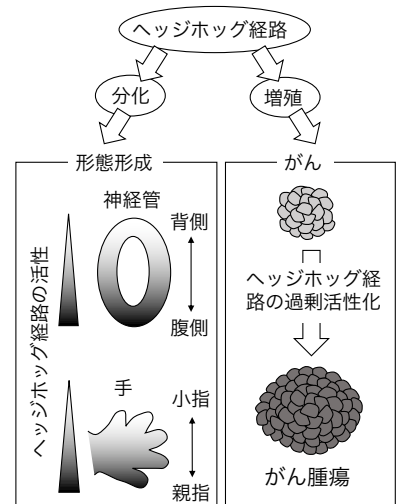


Figure 1. ヘッジホッグ経路の生体内の役割

トになり、置換基がシクロヘキサンのように嵩高い場合、活性が全く見られないことが知られている (Figure 2A) ⁴。したがって、これらの化合物群の *N*-アルキル付近の構造が活性に重要であると考え、SAG のアミノ基に、紫外光によって分解する 6-nitroveratryl carbonyl 基 (NVOC) 誘導体を結合させた NVOC-SAG を合成した。(Figure 2B)

NVOC-SAG の光学的な特性評価を行なった。NVOC-SAG の PBS/DMSO 10% (v/v) 溶液の吸収スペクトルを測定したところ、SAG のもつピークトップ (270 nm) に加え、NVOC のピークトップ (365 nm) も同時に見られた (Figure 2A)。NVOC-SAG に紫外光を照射し、吸収スペクトルの測定を行なったところ、365 nm 付近の吸収の減少を含む NVOC の分解に特徴的なスペクトル変化が見られた (Figure 3B)。光照射したサンプルを HPLC によって分析したところ、光照射依存的な NVOC-SAG のピークの減少と SAG のピークの上昇が見られた (Figure 3CD)。

続いて、NVOC-SAG の NIH3T3 細胞に対する効果を評価した。NIH3T3 細胞に NVOC-SAG 及び SAG を加え光を照射を行った。そして、6 時間後に RT-PCR によって Hh 経路の下流遺伝子である Gli1 の転写量を定量した。その結果、光照射依存的に Gli1 の発現量が上昇することがわかった (Figure 3EF)。また、光照射していないとき Control と同等の Gli1 発現量が見られたので、

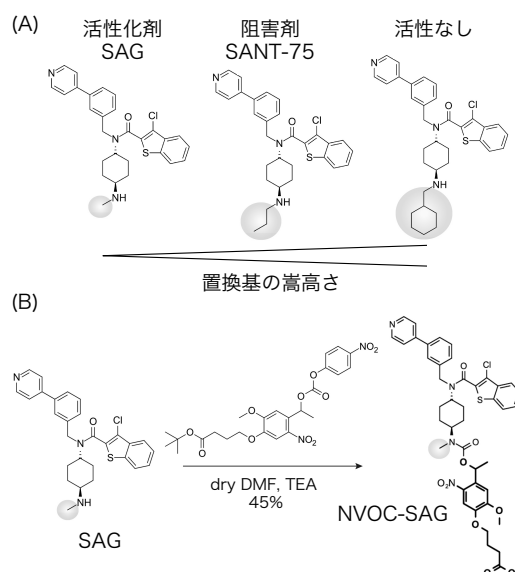


Figure 2. (A) ヘッジホッグ制御剤の誘導体の構造。(B) NVOC-SAG の合成反応。

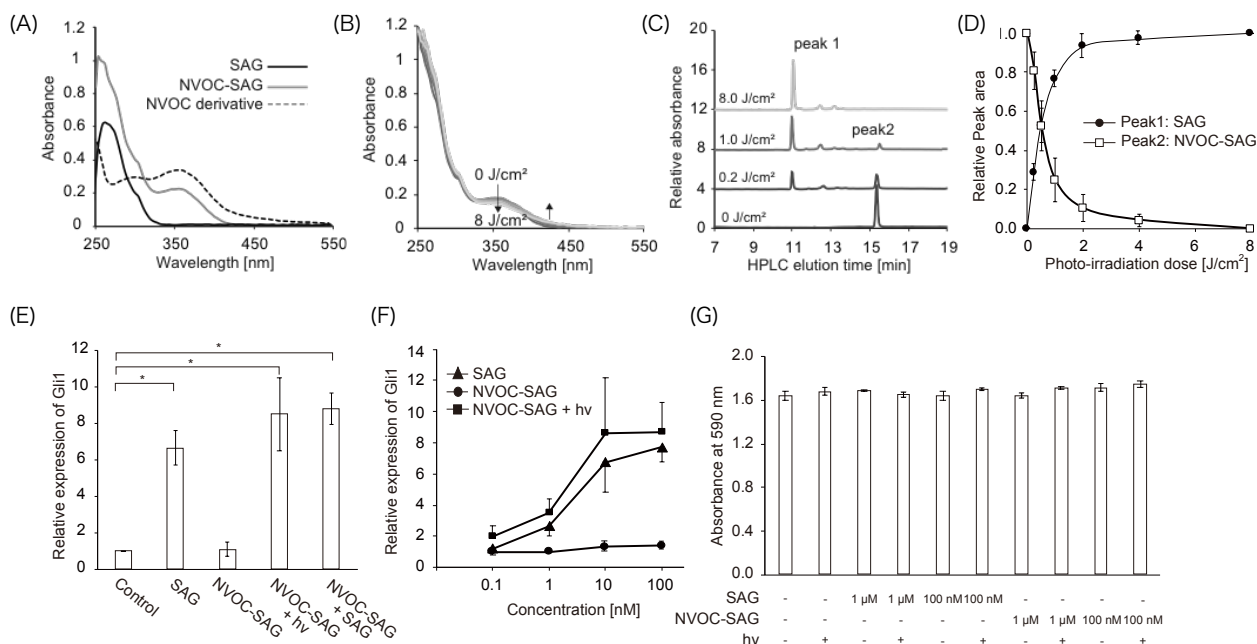


Figure 3. (A) SAG、NVOC-SAG 及び NVOC 誘導体の吸収スペクトル。(B) 光照射に伴う NVOC-SAG の吸収スペクトル変化。(C) 光照射に伴う HPLC チャートの変化と (D) ピーク面積の相対値。(E) NIH3T3 細胞における Gli1 発現量。(F) SAG 及び NVOC-SAG の濃度依存性。* $p < 0.05$ (G) MTT アッセイによる SAG、NVOC-SAG 及び光照射の細胞毒性定量。

NVOC の結合により活性が抑えられていることがわかった。MTT アッセイにより、SAG、NVOC-SAG 及び光照射の細胞への影響を評価したが、毒性は見られなかった。(Figure 3G)

3. NVOC-SAG を用いた小脳顆粒前駆細胞の増殖及び分化の制御

小脳において、新生児期に小脳顆粒前駆細胞の急速な増殖が起こり、小脳の大部分のニューロンを生成する⁵。この過程において、Hh 経路のリガンドである SHH がプルキンエ細胞から分泌され、小脳顆粒神経細胞前駆体の増殖と分化は Hh 経路依存的に制御されることが知られている。そこで、NVOC-SAG を用いて小脳顆粒前駆細胞の増殖と分化を制御した。

出生後 6 日目のマウスからの小脳細胞の初代培養を行った。播種された細胞には、小脳顆粒細胞と前駆細胞の両方が含まれている。神経幹細胞（前駆細胞）は、細胞周期マーカー Ki67 を免疫染色することで特定でき、細胞が増殖を停止し Ki67 陰性になると細い突起

を持つ小脳顆粒細胞に分化する。細胞播種直後に SAG で刺激し、24 時間後と 48 時間後に、小脳顆粒細胞・前駆細胞を Ki67 とニューロンのマーカーである Tubulin beta3 で染色した。播種後 24 時間で、60%以上の細胞が Ki67 で染色されており、初代培養細胞が相当数の神経前駆細胞を含んでいることを示された (Figure 4A)。24 時間後では SAG で処理することによって Ki67 陽性細胞の割合に有意な差がなかった。一方、48 時間後に Ki67 陽性細胞の有意な差を観察された。次に、小脳顆粒細胞・前駆細胞を NVOC-SAG と光で処理し、48 時間後に Ki67 と Tubulin beta3 で染色した。NVOC-SAG と光で処理した場合、光なしの場合よりも Ki67 陽性細胞の割合が大幅に増加した (Figure 4B)。分化したニューロンに対する影響を明らかにするために、神経突起を持つ細胞の割合を調べたところ、すべての条件で Ki67 陽性細胞よりも Ki67 陰性細胞が神経突起を伸ばすことが観察され (Figure 4C)、細胞集団において Ki67 陰性細胞は Ki67 陽性細胞よりも分化していることが示された。また、神経突起の長さの平均はすべての条件で Ki67 陽性細胞よりも Ki67 陰性細胞で長く (Figure 4D)、NVOC-SAG と光処理によって細胞の状態や分化に影響がなかったことが示された。以上より、NVOC-SAG に明らかな毒性などがなく、光照射依存的に小脳顆粒前駆細胞の運命決定を制御できることが示された。

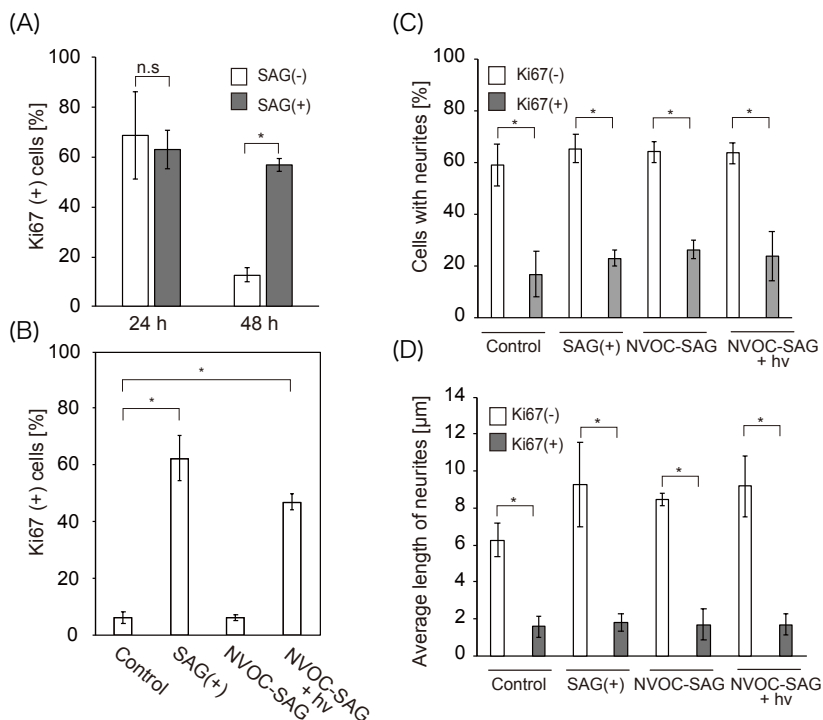


Figure 4. (A) 24 時間後及び 48 時間後における Ki67 陽性細胞の割合。(B) 48 時間後における Ki67 陽性細胞の割合。(C) 各条件における突起を持つ細胞の割合。(D) 各条件における突起の長さの平均。* $p < 0.05$

4. NVOC-SAG を用いた大脳オルガノイドの分化制御

Hh 経路の活性の濃度勾配によって神経管の背腹軸が決定された後、大脳の腹側で発生する抑制性神経は遊走し背側の興奮性神経と混じり合い、大脳の神経回路における興奮性/抑制性のバランスを決定することが知られている。興奮性/抑制性バランスの異常は、てんかん、統合失調症のような疾患の原因仮説の一つにもあげられている⁶。近年、ヒト幹細胞を凝集体として神経分化培地で培養して作成した人工大脳組織を、試験管内のヒトの脳疾患モデルとして利用する試みが盛んである⁷。しかし、既存の報告で用いられる均一な培養液中で得られる人工脳組織は、背腹軸を規定することができないため、様々な脳の部位が無秩序に形成され興奮性/抑制性バランスが調節できないことが、疾患モデルとしての実用化への課題である。そこで、NVOC-SAG によって、光照射依存的に大脳オルガノイドの背側および腹側への分化の方向性を制御した。

既存の手法に従って大脳オルガノイドを作製し、6 日目に SAG 及び NVOC-SAG を加え光を照射した。11 日目以降は SAG 及び NVOC-SAG を含まない培地で培養し、18 日目に回収したサンプルから抽出した RNA を用いて RT-PCR を行なった (Figure 5AB)。その結果、大脳腹側に発現する NKX2.1 と MASH1 の発現量が光照射依存的に増加している様子が見られた (Figure 5CD)。また免疫染色した結果からも NVOC-SAG に光照射を行うことで大脳の腹側への分化を誘導できたことがわかった (Figure 5E)。続いて、NVOC-SAG を用いて局所的に分化を制御できることを示すために、一つのディッシュに二つのスフェロイドを配置し、NVOC-SAG で処理した (Figure 6AB)。そして、片側のオルガノイドのみに光を照射し免疫染色によって分化を確認した。その結果、光を

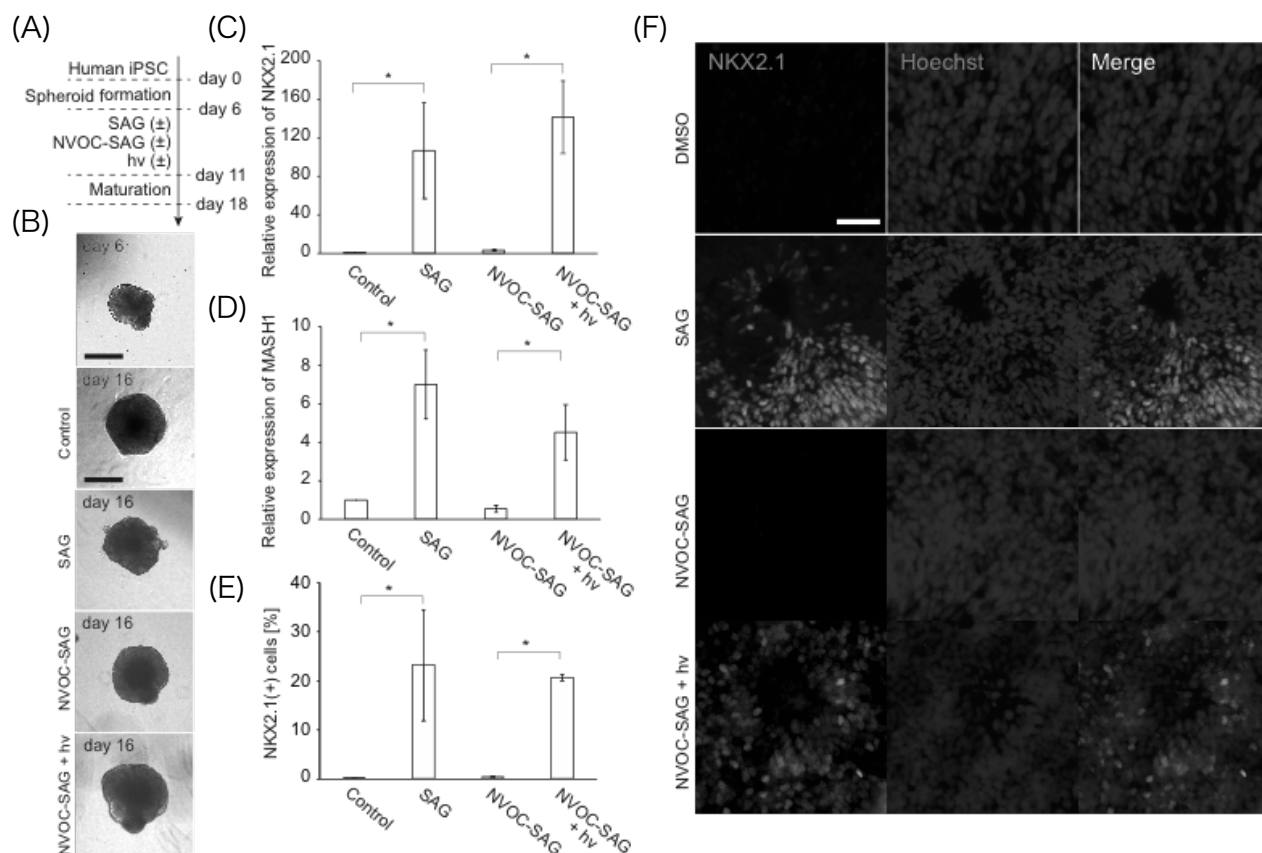


Figure 5. (A) 大脳オルガノイドの培養スキーム。(B) 各時点における組織の明視野画像。(C) 18 日目における NKX2.1 の発現量。(D) 18 日目における MASH1 の発現量。(E) 18 日目における NKX2.1 陽性細胞の割合。(F) NKX2.1 の免疫染色画像。* $p < 0.05$

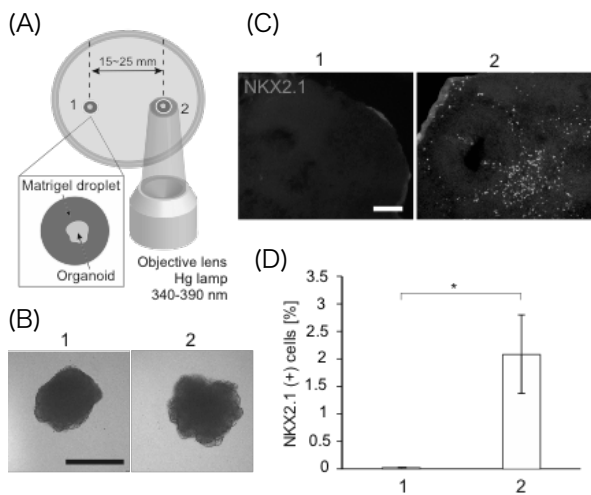


Figure 6. (A) 大脳オルガノイドの局所的な分化誘導のスキーム。(B)各オルガノイドの明視野画像。(C) NKX2.1の免疫染色画像。(D) NKX2.1陽性細胞の割合。* $p < 0.05$

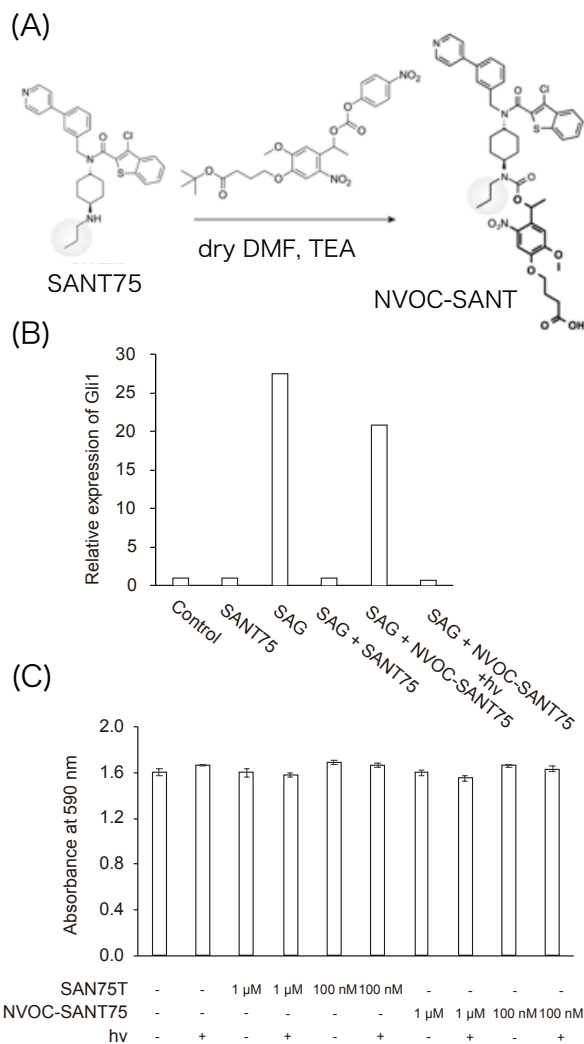


Figure 7. (A) NVOC-SANT75の合成反応。(B) NIH3T3細胞における Gli1の発現量。(C) MTTアッセイによる SNAT75、NVOC-SANT75及び光照射の毒性評価。

照射したオルガノイドで NKX2.1 陽性細胞が観察された (Figure 6CD)。この結果、大脳の腹側への分化を局所的に制御することができた。

5. 光活性化型ヘッジホッグシグナル伝達経路アンタゴニストの合成と特性評価

骨芽腫、横紋筋肉腫脳腫瘍、基底細胞がん、肺がんおよび乳がんなどのガンの一部において Hh 経路が過剰に活性化されていることが知られている。そのため、Hh 経路阻害剤は、抗がん剤の候補としての使用が期待され、多くの阻害剤が報告されている。そこで、光照射依存的に Hh 経路を阻害できれば、患部にのみ光を照射し、副作用の少ないガン治療が実現できると考えた。

SANT-75のアミノ基に NVOC 誘導体を結合させることで NVOC-SANT75 を合成した (Figure 6A)。NIH3T3 細胞を用いて、SAG と SANT-75 を競合させることで NVOC-SANT75 の光依存的な Hh 経路を阻害を定量することを試みた。SAG と 10 倍量の SANT-75 で NIH3T3 細胞を処理すると Gli1 の発現量が抑えられることがわかった。そこで、SAG と 10 倍量の NVOC-SANT75 で処理し、光を照射したところ、光照射依存的に Gli1 の発現量が減少することがわかった (Figure 6B)。さらに MTT アッセイにより NVOC-SANT75 の毒性を調べたが、毒性は見られなかった (Figure 6C)。

6. まとめと展望

本論文では、Hh 経路の時空間的な制御のために、ケージド Hh 経路活性化分子 NVOC-SAG、及び阻害分子 NVOC-SANT75 を合成した。両方の分子において NIH3T3 細胞を用いてその特性評価と細胞毒性検証を行った。NVOC-SAG を用いてマウス小脳顆粒細胞の分化と増殖を制御できることを示した。最後に、NVOC-SAG を用いて大脳オルガノイドの背側及び腹側への分化を制御し、光照射によって大脳オルガノイドの腹側への分化を局所的に誘導できることも示した。

今回、一つの培養皿の中で光照射した大脳オルガノイドのみで局所的に腹側分化を誘導することに成功した。しかし、オルガノイドの興奮性/抑制性バランスを制御するためには、本来は一つの組織の中で腹背軸が規定される必要があり、それを達成することが今後の課題である。今後、分子を拡散を抑えるために、疎水性部位を分子に結合させ細胞に取り込ませるなどの工夫が必要であると考えられる。

光応答性 Hh 経路阻害剤をガン治療に応用するためには、まずヘッジホッグ依存的ながん細胞株において本化合物が効果を示すことを確認する必要がある。さらに、生体への応用を考えると、生体毒性が低くより深部まで届く赤外のような長波長の光で切断できる保護基が必要である。

本論文は、これまでにケージド化合物のターゲットとしてあまり注目されてこなかった、形態形成に重要なシグナル伝達経路である Hh 経路の光制御を実現した。形態形成に重要なシグナル伝達経路を制御するケージド化合物はレチノイン酸以外は報告がなく⁸、BMP、Wnt、FGF などのシグナルはまだ光制御されていない。本アプローチを応用することでその他のシグナル伝達経路の光制御が可能になれば、近年注目を集めている幹細胞の三次元培養技術と組み合わせにより複雑な人工組織を作成できるようになり、疾患の原因究明や治療薬の探索に応用できるであろう。

7. 参考文献

1. Varjosalo, M *et al.* Hedgehog: Functions and Mechanisms. *Genes Dev.* **2008**, *22* (18), 2454–2472.
2. Briscoe, J. *et al.* The Mechanisms of Hedgehog Signalling and Its Roles in Development and Disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *14* (7), 418–431.
3. Ellis-Davies, G. C. R. Caged Compounds: Photorelease Technology for Control of Cellular Chemistry and Physiology. *Nat. Methods.* **2009**, *4* (8), 619–628.
4. Yang, H. *et al.* Converse Conformational Control of Smoothed Activity by Structurally Related Small Molecules. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (31), 20876–20884.
5. Palam, V. *et al.* Sonic Hedgehog Controls Stem Cells Behavior in the Postnatal and Adult Brain. *Development.* **2005**, *132* (2), 335–344.
6. Ramamoorthi, K. *et al.* The Contribution of GABAergic Dysfunction to Neurodevelopmental Disorders. *Trends Mol. Med.* **2011**, *17* (8), 452–462.
7. Lancaster, M. A. *et al.* Disease Modelling in Human Organoids. *Dis. Model. Mech.* **2019**, *12* (7),
8. Neveu, P. *et al.* A Caged Retinoic Acid for One- and Two-Photon Excitation in Zebrafish Embryos. *Angew. Chemie. Int. Ed.* **2008**, *47* (20), 3744–3746.

8. 発表状況

論文 “A light-inducible Hedgehog signaling activator modulates proliferation and differentiation of neural cells” submitted.

特許 日本国特許出願「光応答性 Smoothed リガンド」池内与志穂、○三澤龍志 2018-009258
PCT 出願「光応答性 Smoothed リガンド」池内与志穂、○三澤龍志 PCT/JP2019/002189