

## 審査の結果の要旨

氏名 三澤 龍志

発生の過程において、細胞はシグナル伝達経路を介して外部からの刺激に応じて変化し、体内の様々な組織を作る。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を制御する主要なシグナル伝達経路であるが、神経系の発生過程においては腹側から背側に向かう軸 (背腹軸) の決定や、小脳の形成に重要な役割を果たす。本論文は、幹細胞から神経細胞への分化を自在に制御することを目指し、ヘッジホッグシグナル伝達経路を制御するケージド化合物を開発し、これを用いて光照射によって神経細胞の分化を制御することを目指した研究である。

第一章では、はじめに発生などにおけるヘッジホッグシグナル伝達経路の役割を述べている。次に、細胞分化の制御手法について過去の研究を概説し、問題点を述べている。また、ケージド化合物について概説し、これまで細胞分化に応用されていないことを指摘し、その可能性を議論している。

第二章では、Hh 経路を制御するケージド化合物の合成と評価について記述している。Hh 経路を制御する既存の小分子群から、光分解性保護基を導入するのに適した Smoothed agonist (SAG) を選び、ケージド化合物 (Caged SAG) を作製した。つぎに、Hh 経路の応答性が知られている NIH3T3 細胞に対するこの化合物の効果を評価した。その結果、光照射依存的に Caged SAG が Hh 経路を活性化することがわかった。毒性試験を行い、Caged 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ことが記述されている。

第三章では、小脳顆粒細胞への作用を評価している。小脳の発生において、新生児期に Hh 経路が小脳顆粒細胞を制御することが知られている。マウスから取り出した小脳顆粒細胞を用いて、Caged SAG 及び光照射の細胞への影響を調べたところ、小脳顆粒細胞の増殖および分化を光依存的に調節できることができた。またこのとき、光や化合物による毒性は認められなかった。Hh 経路を活性化すると細胞は増殖し、不活性化すると細胞は神経細胞に分化した。一方で、

Hh 経路の光による調節は分化後の神経細胞の形態には影響を及ぼさなかったことから、細胞分化の運命のみを光によって操作できたと結論づけられた。

第四章では、ヒト iPS 細胞を用いて作成した大脳様組織（大脳オルガノイド）への作用を評価している。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。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てしまう。この様な背景から、Caged SAG 及び光照射を用いた大脳オルガノイドの分化制御を試みている。この結果、光照射依存的に腹側への分化制御を行うことができた。

第五章では、光活性化型 Hh 経路アンタゴニストの合成と評価をおこなっている。第二章の結果を応用し、SAG の派生物質である SANT75 に光分解性保護基を結合させ、光活性化型 Hh 経路アンタゴニストを合成した (Caged SANT75)。NIH3T3 細胞を用いて SAG との競合アッセイをおこなうことにより、Caged SANT75 が光依存的に Hh 経路を阻害することを示している。

第六章には、成果がまとめられ、今後活用が期待される用途と、改善すべき点などが議論されている。ケージド化合物を用いて細胞の分化を制御する試みが明らかにした問題点や発展性などについて記述されている。

以上、本論文は、これまでになされてこなかった光による細胞の分化制御について先駆的な研究を分子の合成から細胞の分化まで一貫して行った。本研究を通じて分化制御のための細胞と分子の空間的および時間的な制御の指針が示されたことにより、今後は様々なシグナル伝達経路へ応用されることが期待される。よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。