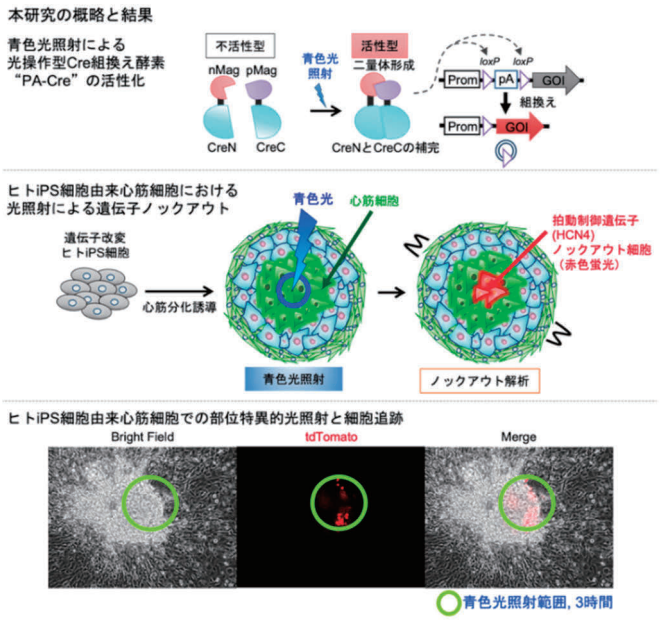
154　光操作によるiPS細胞由来心臓不整脈モデルの確立	森川　久未

【目的】ヒト iPS 細胞を用いたオルガノイド形成の報告が相次ぎ、*in vitro* で各種臓器形成、あるいは分化誘導した組織細胞を使ったヒト生理機能解析などが広く行われるようになってきている。一方、Cre-*loxP* 遺伝子組換えシステムは、DNA 組換え酵素 Cre が loxP 配列を認識し、遺伝子の部位特異的組換えを起こす反応である。近年、青色光照射でスイッチがオンになる光受容体と Cre 酵素との融合体（Photoactivatable Cre：PA-Cre）が開発され、青色光照射時にのみ Cre 組換え酵素を活性化することができるようになった。従って、PA-Cre を使用することで、光によりオルガネラレベルで時空間（時間と場所）自在に遺伝子組換えの制御が可能である。ヒト心臓の拍動は、右心房上部に局在するペースメーカ細胞によって司られ、特異的に発現する HCN4 イオンチャネルが制御する。この細胞の障害は、加齢性の徐脈性不整脈の発症に繋がるが、そのメカニムズの詳細は不明である。そこで本研究では、ヒト心臓を模した心臓オルガノイドを作製し、PA-Cre による光操作技術により、局在するペースメーカ細胞の一部において、心拍制御遺伝子 *HCN4* をノックアウトし、徐脈性不整脈の再現と病態解析を目的とした。

【方法】1. PA-Cre 発現 iPS 細胞株の樹立と細胞系譜追跡：PA-Cre を恒常発現する piggy BAC ベクターを hiPS 細胞（409B2 株）へ遺伝子導入し、計 33 株を樹立した。青色光照射を行い、照射時の組換え効率が最も高く、レポーターの赤色蛍光タンパク質を恒常的に発現する iPS 細胞株（PA-Cre_iPS 細胞株）をスクリーニングにより選別した。2. flox-HCN4_iPS 細胞株の樹立と青色光照射による遺伝子ノックアウト：PA-Cre_iPS 細胞株において、*HCN4* 遺伝子のエクソン 2 の両側に loxP 変異配列を導入した細胞株（PA-Cre/flox-HCN4_iPS 細胞株）を樹立した。心筋分化誘導後青色光照射し、赤色蛍光の発現を蛍光顕微鏡で観察するとともに、ゲノム PCR により *HCN4* 遺伝子ノックアウトを調べた。

【結果】PA-Cre を恒常発現するヒト iPS 細胞株の樹立に成功した。この PA-Cre_iPS 細胞株では、①青色光照射時にのみ、PA-Cre が活性化され、PA-Cre による Cre-*loxP* 組換えにより、②レポーターの赤色蛍光タンパク質の発現が、恒常的に誘導され、組換え細胞の追跡が可能となった。さらに、この PA-Cre_iPS 細胞株を用いて、*HCN4* 遺伝子の片遺伝子座を flox 化した PA-Cre/flox-HCN4_iPS 細胞株を樹立し、③青色光照射時にのみ遺伝子の *HCN4* ノックアウトが起こることを確認した。

本研究の概略とヒト iPS 細胞株における青色光照射による Cre-*loxP* 組換えの誘導



154. 光操作による iPS 細胞由来心臓不整脈モデルの確立

森川　久未

*産業技術総合研究所 健康医工学研究部門 生体材料研究グループ

Key words：光遺伝学，Cre-*loxP*組換え，iPS 細胞，Photoactivatable Cre recombinase，心臓

緒　言

心臓は、右心房上部に局在する洞結節ペースメーカ細胞が刻むリズムによって規則正しく拍動する。そのリズムの生成（自動能）は、特異的に発現する HCN4 イオンチャネルの機能によることが知られている。しかし、ヒト心臓を解析のサンプルとして使用することは難しく、加齢に伴うペースメーカ細胞の機能低下や細胞数の減少により発症すると考えられている徐脈性不整脈などの正確な病態・疾患メカニズムは解明されていない。近年、ヒト iPS 細胞を用いたオルガノイド形成の報告が相次ぎ、*in vitro* で各種臓器形成、あるいは分化誘導した組織細胞を使ったヒト生理機能解析、創薬や疾患メカニズムの解明等の臨床応用が広く行われるようになってきている［1］。

遺伝子の機能解析、疾患メカニズムの解明や治療法の開発には、モデル動物の利用、特に原因遺伝子の破壊によるノックアウトマウスを用いた方法が多用されてきた。Cre-*loxP* システムは、DNA 組換え酵素 Cre が loxP 配列を認識し、部位特異的組換えを起こす反応であり、細胞種や薬剤投与時間で遺伝子発現を制御したコンディショナルノックアウトマウスを作製することができる［2］。しかし、既存の Cre-*loxP*組換えマウスでは、遺伝子ノックアウトの時間と部位を、単一細胞レベルでピンポイントに制御することは難しい。近年、青色光照射でスイッチがオンになる光受容体と Cre 酵素との融合体（Photoactivatable Cre recombinase：PA-Cre）が開発され、青色光照射細胞のみで高効率に Cre 組換え酵素を活性化させることができるようになった［3］。光は、ピンポイントに照射時期・時間・部位を決めることができるため、PA-Cre により、オルガネラレベルで時空間（時間と場所）自在に非侵襲的に遺伝子組換え（Cre-*loxP*組換え）を引き起こすことが可能となった。

そこで本研究では、ヒト心臓を模した心臓オルガノイドを作製し、PA-Cre を用いた光操作技術により、ペースメーカ細胞の一部の細胞において *HCN4* 遺伝子をノックアウト（Knock-Out：KO）して、ヒトの徐脈性不整脈の再現と病態解析を目的とした。

方　法

1. PA-Cre 恒常発現 iPS 細胞株（PA-Cre_iPS 細胞株）の樹立と細胞系譜追跡

PA-Cre を恒常発現する piggyBAC ベクター（図 1A）を Nucleofection により hiPS 細胞（409B2 株）へ遺伝子導入し、G418 による薬剤選択後に計 33 株を樹立した。この 33 株に対して青色光照射を行い、照射時の組換え効率が最も高い細胞株をスクリーニングにより選別した。樹立した PA-Cre_iPS 細胞株に Flp レンチウイルスを感染させ、72 時間後から青色光の照射を行なった（24 時間、2 W/m^2）。照射後の細胞で赤色蛍光の発現を蛍光顕微鏡で観察した。

2. flox-HCN4 iPS 細胞株の樹立と青色光照射による遺伝子ノックアウト

HCN4 遺伝子のエクソン 2 の両側に loxP 変異配列を導入したターゲティングベクターを 2 種類（lox2272 と vlox2272）［4］作製し、Nucleofection により PA-Cre_iPS 細胞株へ遺伝子導入した。Puromycin による薬剤選

*現在の所属：産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門 ステムセルバイオテクノロジー研究グループ

択後に細胞株のクローニングを行い、PCR により、変異 loxP 配列の挿入を確認した。樹立したヒト iPS 細胞の心筋分化誘導は Yamauchi らの方法に従って行なった［5］。分化誘導後 4～5 日目で青色光の照射を行った（24 時間、2 W/m^2）。照射後の細胞で赤色蛍光の発現を蛍光顕微鏡で観察するとともに、ゲノム DNA を回収し、PCR により *HCN4* 遺伝子座の PCR を行なった。

結果および考察

1. PA-Cre 発現ベクターのデザインと作製

本研究では、PA-Cre のオリジナル配列［3］をベースに、コドンを改変した PA-Cre3.0 を用いた［6］。この改良型 PA-Cre3.0 のコンディショナル発現ベクターに、核局在シグナルを付加した赤色蛍光タンパク質レポーター NLS-tdTomat-pA を搭載し、PA-Cre3.0 の安定発現と組換え酵素活性の検出が同時に可能なベクターPA-Cre3.0-All in One ベクターを構築した（図 1A）。なお、このベクターでは、FRT 配列に挟まれた pA-stop 配列を CAG プロモーター下流に配置してあるので、通常、PA-Cre3.0 酵素の発現は抑制されている。さらに、ヒト iPS 細胞での安定発現株の樹立の高効率化のため、PA-Cre3.0-All in One 発現ベクターのバックボーンには、piggy BAC トランスポゾンを利用した（PB_PA-Cre3.0-All in One）。

PB_PA-Cre3.0-All in One 発現ベクターでは、Flp 酵素処理による FRT 組換えによって、pA-stop 配列が除去されると、CAG プロモーター下の PA-Cre3.0 の発現が起こる。そして青色光によって PA-Cre3.0 が二量体化し活性化すると、loxP 間での自己組換えにより PA-Cre3.0 カセット本体が除去され、下流に位置する赤色蛍光タンパク質レポーターの発現が誘導される。つまり、この PA-Cre3.0 ベクターを導入したヒト iPS 細胞では、tdTomato の赤色蛍光をモニターすることによって、PA-Cre3.0 の組換え活性を調べると同時に光照射の起こった細胞を赤色蛍光でラベルすることができる。

2. 発現ベクターの機能検証

HEK293T 細胞に PA-Cre ベクターとレポーター用のルシフェラーゼ遺伝子（Double-floxed inverted FLuc）を一過性に導入し、青色光の照射によって PA-Cre による組換えが起こるかどうか、ルシフェラーゼアッセイにより検証した。青色光照射により、ルシフェラーゼ活性の上昇がみられ、有意に Cre-*loxP* 組換えが起こることが判明した。さらに、細胞追跡カセットの機能検証では、青色光照射時に Cre-*loxP* 組換えによる赤色蛍光（tdTomato）の核局在を確認することができた。なお、Flp 処理による stop コドン除去がない状態では、ルシフェラーゼ活性は検出されず、安定発現ベクターからのバックグランドのリーク発現はほとんど見られないことが分かった。以上の結果から、作製したベクターは予定通りの機能を示すことが分かった。

3. PA-Cre 発現 iPS 細胞の樹立と細胞系譜追跡

PA-Cre3.0 を安定発現するヒト iPS 細胞株（PA-Cre_iPS 細胞株）の樹立を試みた。PB_PA-Cre3.0-All in One を導入した細胞株を 33 株取得し、青色光照射による Cre-*loxP* 組換えのスクリーニングを行い、暗所時での自発的 Cre-*loxP* 組換え（Dark leak）がほとんど見られず、青色光照射時の組換え効率が最も高かった #31 株を見いだした（図 1B）。

続いて、PA-Cre_iPS 細胞株 #31 を用いて、心筋細胞への分化誘導過程において、PA-Cre3.0 による遺伝子組換えが起こるか否かを検証した。分化誘導の初期過程で day－1～1 までの 48 時間、Flp レンチウイルスで処理を行い、PA-Cre3.0 を発現可能状態に導き、その後、day4 から 24 時間光照射を行った。光照射直後（day5）と、心筋細胞への分化が起こり、心筋拍動が観察される day17 において、tdTomato の発現を調べた。青色光非照射群では、tdTomato の発現はほぼ観察されないのに対して、照射群では、直後の day5 および day17 において、一部の細胞で tdTomato の発現が認められた。このように、ヒト iPS 細胞を用いた心筋分化誘導過程において、ある特定の期間のみを対象に青色光照射によって、PA-Cre3.0 発現が誘導できること、それによって Cre-*loxP* 組

換えが惹起され tdTomato の発現が誘導されることが分かった。

以上の結果から、PA-Cre がヒト iPS 細胞内でもデザイン通りに機能し、青色光照射によって Cre-*loxP* 組換えが起こることが確認できた。これより、PA-Cre_iPS 細胞株は、細胞系譜追跡実験に利用可能であることが判明した。

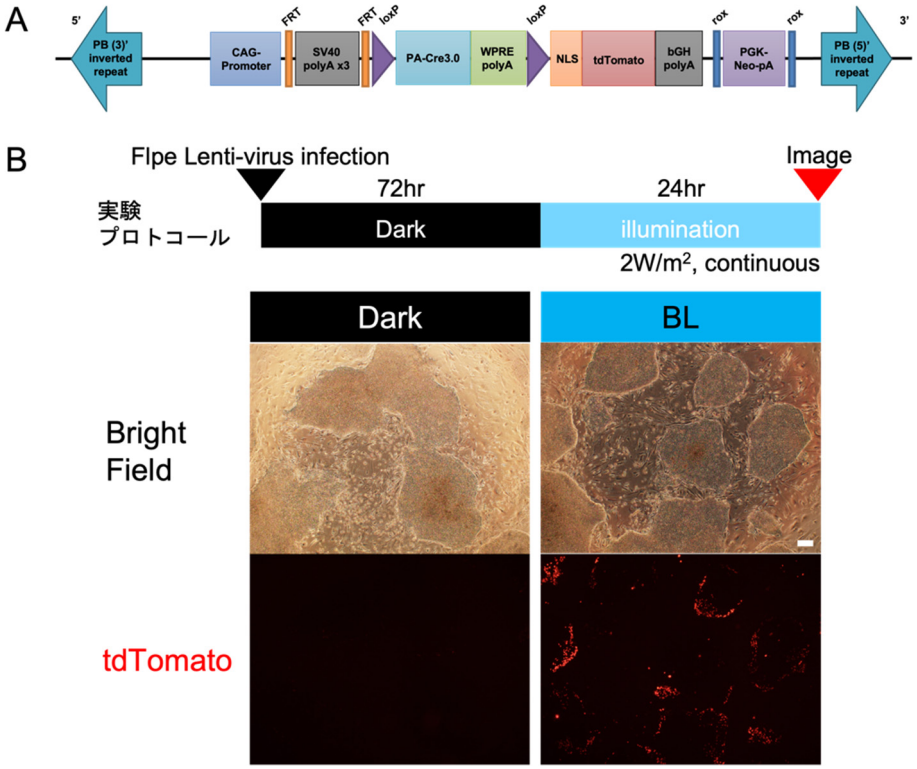


図 1. PA-Cre 発現 iPS 細胞の樹立

A) PA-Cre_iPS 細胞株の樹立に使用した PA-Cre3.0-All in One 恒常発現ベクターの模式図。

B) 樹立した iPS 細胞への光照射実験プロトコールと光照射後の細胞写真。青色光照射群では Cre-*loxP* 組換えの結果として、核局在する赤色蛍光（tdTomato）の発現を確認できた。スケールバー：200 μm。

4. 心筋拍動制御チャネル HCN4 ノックアウトのための flox-HCN4 ターゲティングベクターの作製と flox-HCN4 iPS 細胞株の樹立

ヒト心臓の発生や拍動制御機構についての解明と、心疾患（徐脈性不整脈）の病態モデル作製のために、心筋細胞の拍動を制御するイオンチャネル HCN4 の発現を時空間特異的にノックアウトできるヒト iPS 細胞株の樹立を試みた。まず、*HCN4* 遺伝子のエクソン 2 の両端に lox 配列をノックインするための flox 化ターゲティングベクターを、両アレル用に 2 種類作製した（それぞれ lox2272、vlox2272 配列を使用した）（図 2B）。作製したベクターを PA-Cre_iPS 細胞株 #31 に導入し、CRISPR/Cas9 ゲノム編集法により、計 24 株をクローニングし、4 株において *HCN4* 片アレルの flox 化に成功した（PA-Cre/flox-HCN4 iPS 細胞 #31-9 株など）。

続いて、#31-9 株を用いて、青色光照射によって、*HCN4* 遺伝子ノックアウトが可能かどうかの検証を行った。青色光を照射後 24 時間で細胞を観察したところ、Cre-*loxP* 組換えの結果として、tdTomato 陽性細胞を検出することができ（図 2A）、flox-HCN4 アレルでのエクソン 2 の除去をゲノム PCR で確認できた（図 2B）。このように、青色照射によって、*HCN4* のノックアウトができることがわかった。

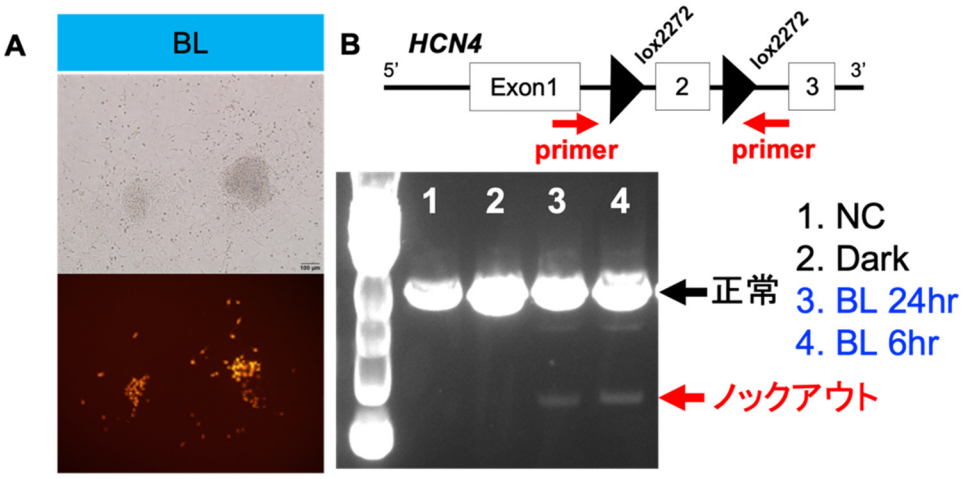


図 2. 青色光照射による *HCN4* 遺伝子のノックアウト

A) PA-Cre/flox-HCN4 iPS 細胞 #31-9 株を心筋分化誘導後に青色光照射を行った。
Cre-*loxP*組換えにより照射細胞を赤色蛍光で追跡できた。
スケールバー：100 μ m。

B) PA-Cre/flox-HCN4 iPS 細胞 #31-9 株で心筋分化誘導後に青色光照射を行い、
細胞を回収、PCR で *HCN4* 遺伝子ノックアウトの確認をおこなった。
3 青色光照射群でノックアウトのバンドを確認できた（レーン 3、4）。

本研究で用いた PA-Cre3.0-All in One 恒常発現ベクターには、以下の 2 つの特徴がある。①PA-Cre の発現を司る CAG プロモーターと PA-Cre 酵素との間に、SV-40 の polyA シグナルからなるストップ配列が挿入されていること、②PA-Cre 酵素自体が、loxP 配列によって挟まれていることである。ストップ配列が挟まれていることにより、PA-Cre のリーク発現が最小限に抑えられている。ストップ配列は、flippase（Flp）処理したときにのみ除去されるので、通常の培養下では、光照射とは無関係な Cre-*loxP*組換えが起こらず、非特異的赤色レポーターの発現が抑制される［6］。この様な Flp-*frt* 組換えと青色光による二重の制御が働くため、より厳密に照射細胞でのみレポーターが発現し、かつ Cre-*loxP* 遺伝子組換えが生ずると考えられ、リークの少ない細胞系譜の解析や機能解析が期待できる。

また、Cre 組換え酵素の活性が細胞や組織に毒性を及ぼす可能性があることを示す証拠が蓄積されている［7］。この点でも、リークの少ない本システムでは、Cre 酵素毒性の低減化が期待できる。さらに、PA-Cre3.0 は loxP 配列で挟まれている。このため、PA-Cre3.0 が活性化すると、loxP 配列間での自己組換えが起こり、PA-Cre3.0 自身が除去される。このため、PA-Cre の酵素作用は一過性に限定され、より精密な Cre-*loxP*組換えの時空間制御と、毒性の低減化が期待できる。実際、青色光照射後、赤色蛍光発現細胞において細胞死等の異常は観察されていない。

本研究の成果から、ヒト iPS 細胞において PA-Cre3.0 を用いることによって、Cre-*loxP*組換えの光操作が可能となることを実証することができた。今後、これらの資材を用いて、ヒト iPS 細胞に由来するオルガノイドへと応用できれば、ヒト発生プロセスの検証研究、疾患研究など、ヒト生物学を大きく進めていくことができると期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門の長崎晃博士、健康医工学研究部門の孫略博士、細胞分子工学研究部門の須丸公雄博士、京都大学医生物学研究所附属ヒト ES 細胞研究センター臨床基盤分野の川瀬栄八郎博士、そして、鳥取大学医学部再生医療学部門の白吉安昭博士である。この場を借りて厚く御礼申し上げる。

文　献

1） Hoang P, Wang J, Conklin BR, Healy KE, Ma Z. Generation of spatial-patterned early-developing cardiac organoids using human pluripotent stem cells. Nat Protoc. 2018 Apr;13(4):723-737. Epub 2018 Mar 15. DOI: 10.1038/nprot.2018.006. PMID: 29543795

2） Lewandoski M. Conditional control of gene expression in the mouse. Nat Rev Genet. 2001 Oct;2(10):743-55. DOI: 10.1038/35093537. PMID: 11584291

3） Kawano F, Okazaki R, Yazawa M, Sato M. A photoactivatable Cre-loxP recombination system for optogenetic genome engineering. Nat Chem Biol. 2016 Dec;12(12):1059-1064. Epub 2016 Oct 10. DOI: 10.1038/nchembio.2205. PMID: 27723747

4） Minorikawa S, Nakayama M. Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) and BAC engineering via VCre/VloxP and SCre/SloxP systems. Biotechniques. 2011 Apr;50(4):235-46. DOI: 10.2144/000113649. PMID: 21548907

5） Yamauchi K, Li J, Morikawa K, Liu L, Shirayoshi Y, Nakatsuji N, Elliott DA, Hisatome I, Suemori H. Isolation and characterization of ventricular-like cells derived from NKX2-5eGFP/w and MLC2vmCherry/w double knock-in human pluripotent stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2018 Jan 1;495(1):1278-1284. Epub 2017 Nov 22. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.11.133. PMID: 29175323

6） Morikawa K, Furuhashi K, de Sena-Tomas C, Garcia-Garcia AL, Bekdash R, Klein AD, Gallerani N, Yamamoto HE, Park SE, Collins GS, Kawano F, Sato M, Lin CS, Targoff KL, Au E, Salling MC, Yazawa M. Photoactivatable Cre recombinase 3.0 for in vivo mouse applications. Nat Commun. 2020 May 1;11(1):2141. DOI: 10.1038/s41467-020-16030-0. PMID: 32358538

7） Rashbrook, V. S., Brash, J. T., and Ruhrberg, C.: Cre toxicity in mouse models of cardiovascular physiology and disease. Nat Cardiovascular Res, 1, 806-816 (2022). DOI:10.1038/s44161-022-00125-6