

【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ー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、そのメカニズム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ー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

