

平成 30 年 5 月 29 日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
平成 29 年度共同研究報告書

京都大学ウイルス・再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科（医）

職名：准教授

氏名：宝田剛志

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題： **PRRX1**⁺細胞の不均一性理解によるヒト骨格形成過程の分子理解
2. ウイルス・再生医科学研究所共同研究者： 戸口田 淳也
3. 研究期間：平成 29 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日
4. 研究経過及び研究成果：

骨格形成過程での幹細胞を頂点とした階層性の理解は不十分である。申請者は、マウス骨格形成過程が、**Prrx1**⁺**Sca1**⁺細胞を幹細胞とした **Prrx1**⁺細胞内の不均一性を起点として生じることを報告した。本研究では、ヒト iPS 細胞より **PRRX1**⁺細胞を誘導し、マウス研究で得られた知見を利用することで **PRRX1**⁺集団の不均一性を分子レベルで解明し、ヒト骨格形成過程での幹細胞系譜・階層性の分子理解へと繋げることを研究目的とする。本研究期間では **CRISPR/Cas9** システムを利用することで、**PRRX1** 遺伝子座に蛍光タンパク質をノックインした **PRRX1** レポーター iPS 細胞の樹立を行った。具体的には、iPS 細胞 (414C2 株) に、2 種類のベクター (ホモロジーアームと **IRES-tdTomato** カセットを有するターゲティングベクター、**Cas9/sgRNA** 発現ベクター) を **Electroporation** により遺伝子導入し、導入後シングルセルクローニングにより、ノックインクローンの選別を行った。ゲノム DNA を用いた **PCR** 解析の結果、選別した 54 クローンの内 23 クローンにて **IRES-tdTomato** の **PRRX1** 遺伝子座へのノックインが確認された (**Hetero**: 15 クローン、**Homo**: 8 クローン)。これらのクローンについて、**ActivinA/BMP4** 等の存在下にて胚様体形成させることで中胚葉系に分化誘導させたところ、**PRRX1** 遺伝子発

現と時期を同じくして tdTomato の発現が確認された。つまり、iPS 細胞での PRRX1 発現を tdTomato 蛍光タンパク質にて可視化することのできる PRRX1 レポーター iPS 細胞の樹立に成功した。今後は、樹立したレポーター細胞を利用して、PRRX1 陽性細胞への分化誘導条件の最適化や、誘導した PRRX1 陽性細胞内の不均一性を解析する予定である。

5. 研究成果の公表

※発表論文リスト（掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可）、学会発表、特許取得等

研究継続中のため、特になし