

学生と共に歩んだ研究生生活

リハビリテーション療法学専攻

理学療法学講座

鳥橋 茂子

2014.3.21 最終講義

平成18年に保健学科へ移って考え、決めたこと

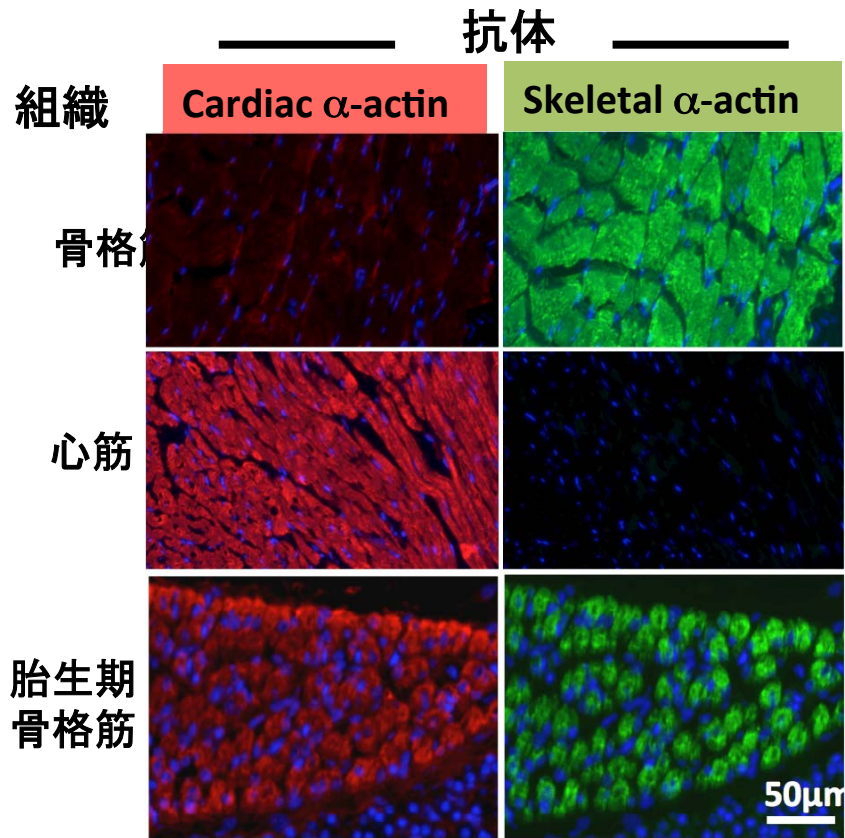
- 実験器機が足りない 獲得研究費で**まず器機を購入**
- 理学療法学専攻で行っていた実験手技が少なく未熟 **大学院ベーシックトレーニング**
- 研究を行えるのは自分と学生しかいない **自分も実験に参加し、共に考える**
- 論文を書けるのは自分しかいない **学生のやり残しを補い論文にまとめる**

学生は優秀で、熱心、体力も充分

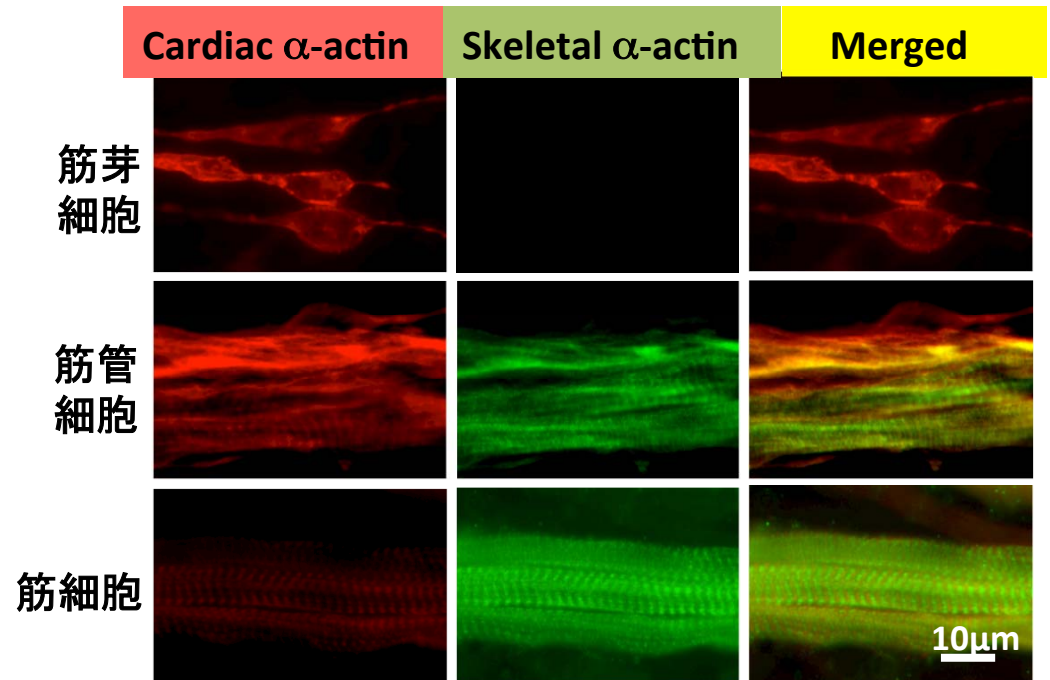
消化管の研究よりもES細胞を用いて、学生の希望を取り入れたテーマ考える
学生を育てることを第一にした

1. 骨格筋分化 : 水野、鈴木(松尾) actin isoform
2. 間葉系幹細胞 : MSCs 蜷川(竹中)、八木、中川、村神、磯部、
TSG6 (平山、小松、永井、帆、川窪)
ラットiPSCs (蜷川-竹中)
3. 脈管形成 : 田中、山本、細江(谷井)
3次元培養
4. 神経系細胞分化 : 河村、小玉、小林、川端、田口
神経-グリアの分化、直流電気刺激、共培養法

1. 骨格筋の研究

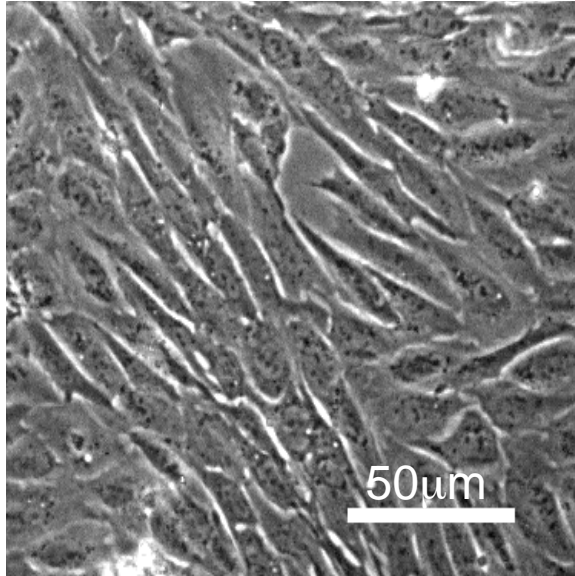


竹中さん 八木くん 松尾さん 水野くん

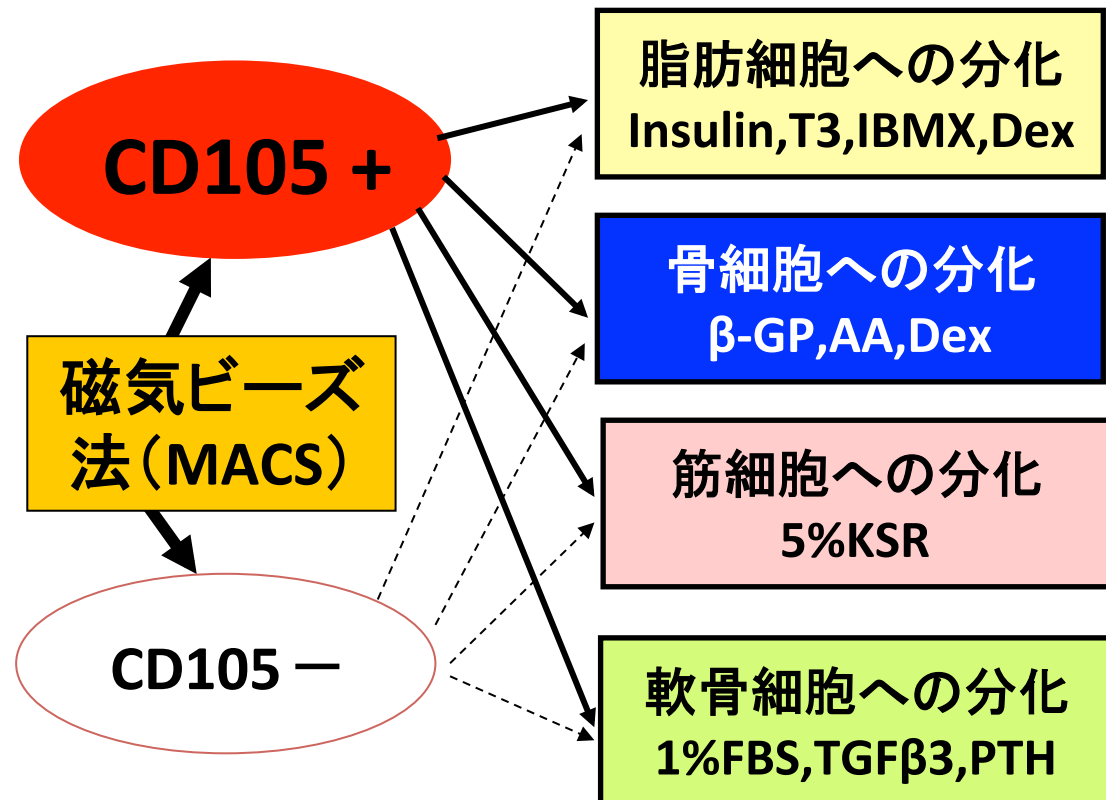


2. 間葉系幹細胞の研究

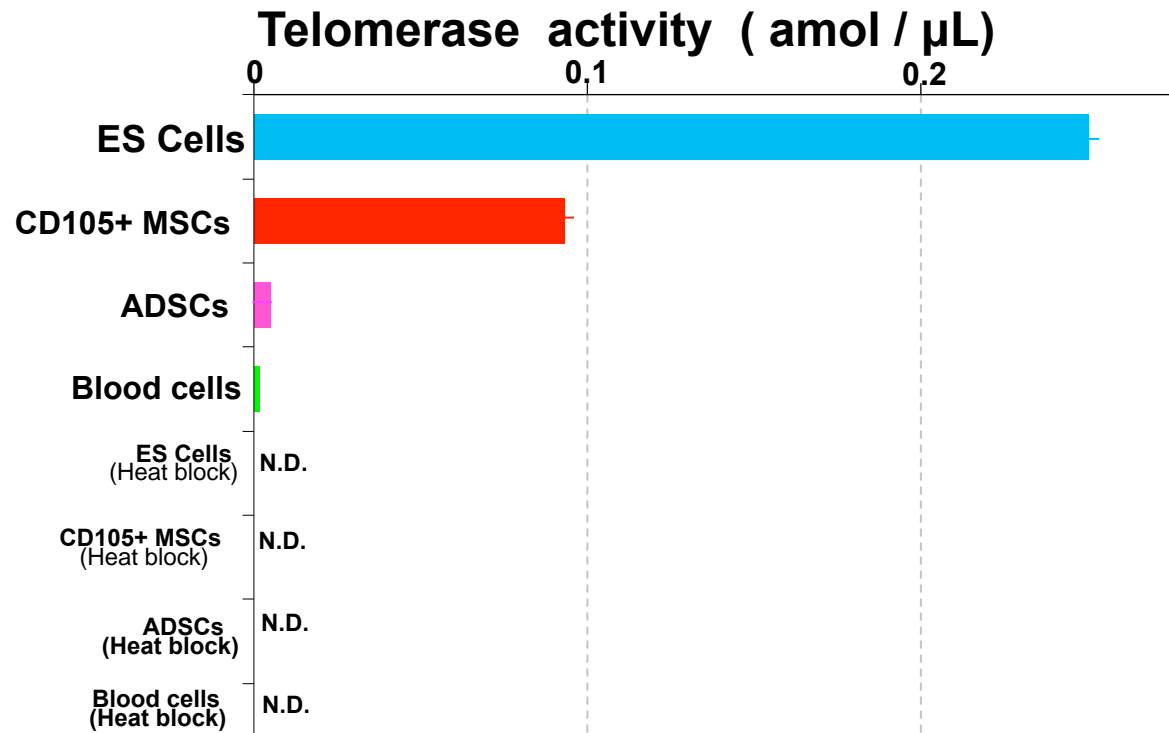
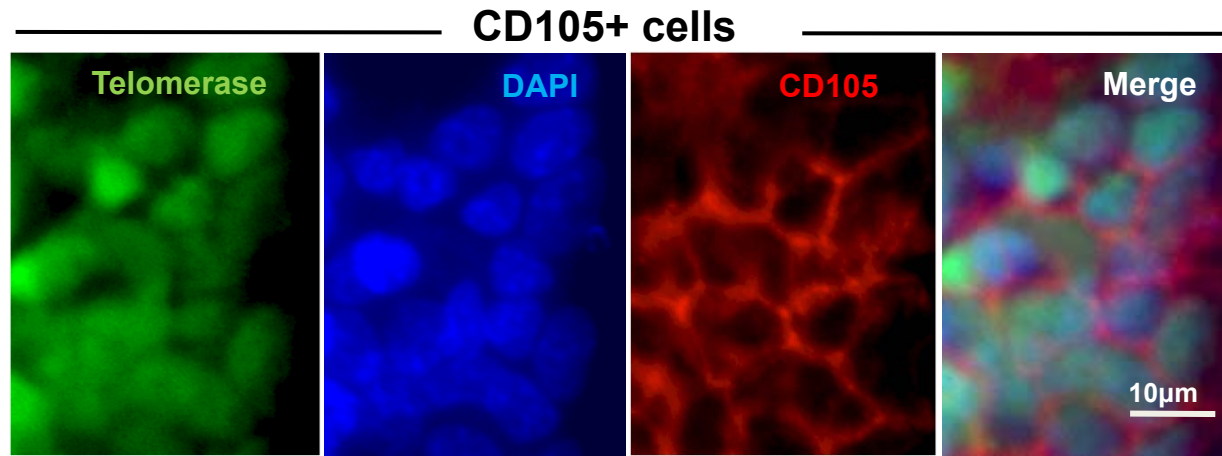
ES細胞から間葉系幹細胞を作る



脂肪細胞への分化誘導
ES cells



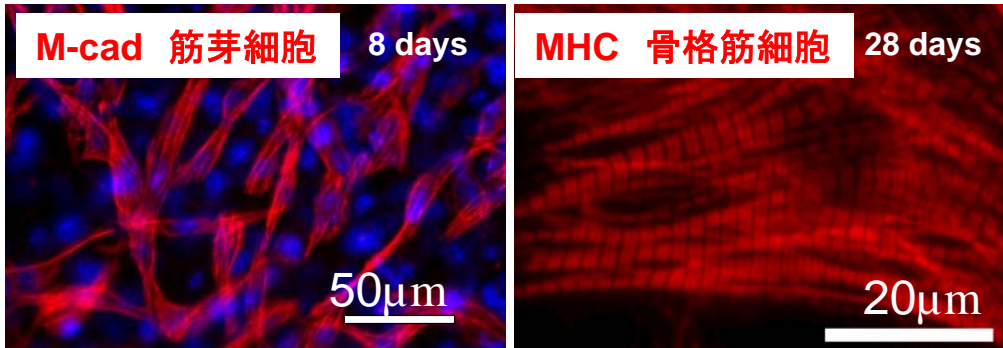
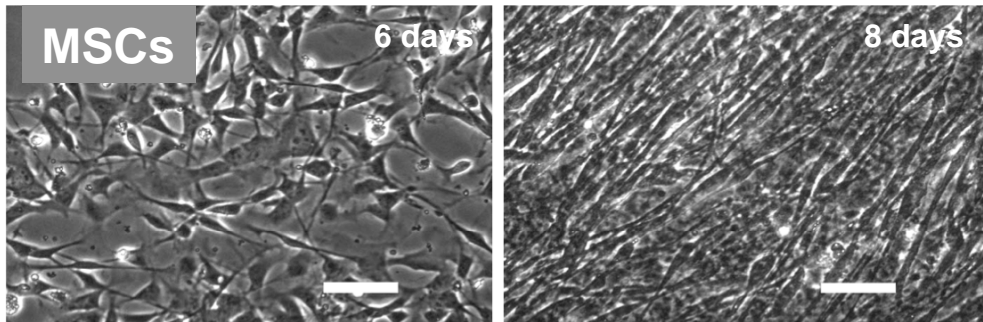
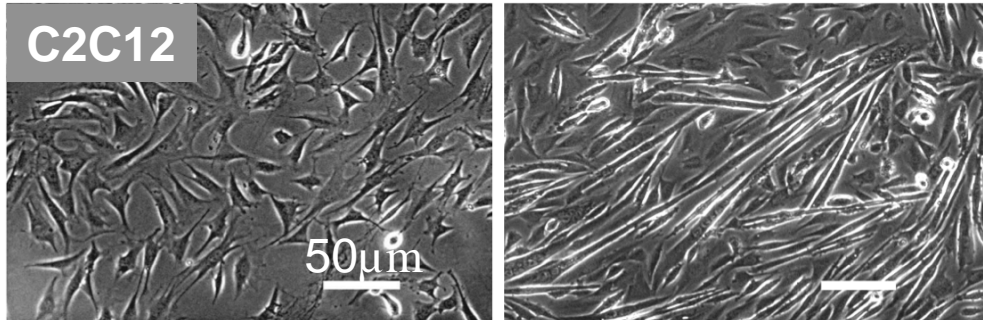
MSCsはTelomerase 活性が高い



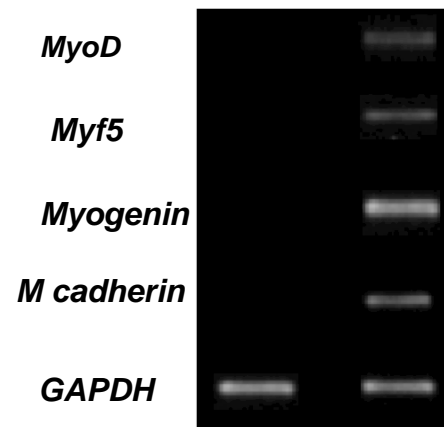
Differentiation 2011年 132巻 6号 669-672p Nana Ninagawa他

Mesenchymal stem cells originating from ES cells show high telomerase activity and therapeutic benefits

間葉系幹細胞の骨格筋分化能



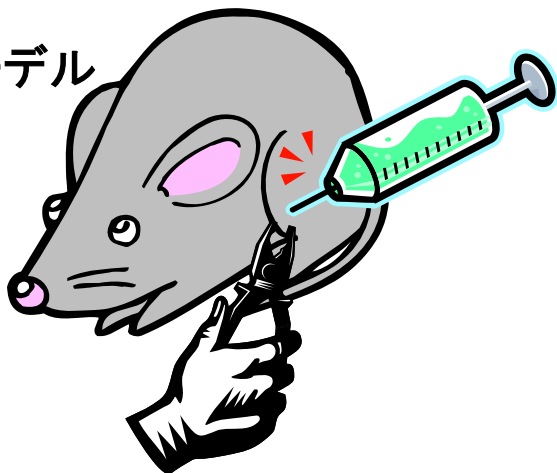
RT-PCR



ES cells Skeletal muscle cells from MSCs

間葉系幹細胞を損傷筋に移植する

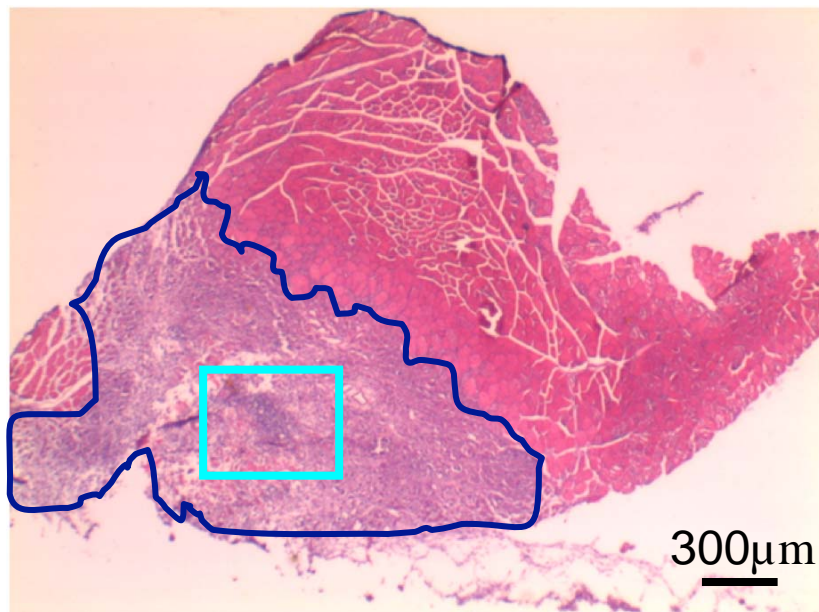
筋損傷モデル
マウス



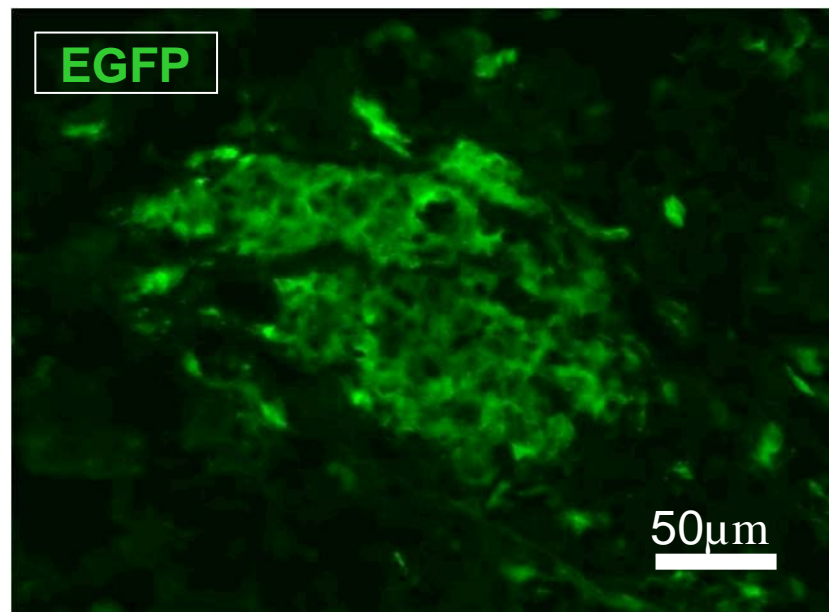
村神さん

竹中さん

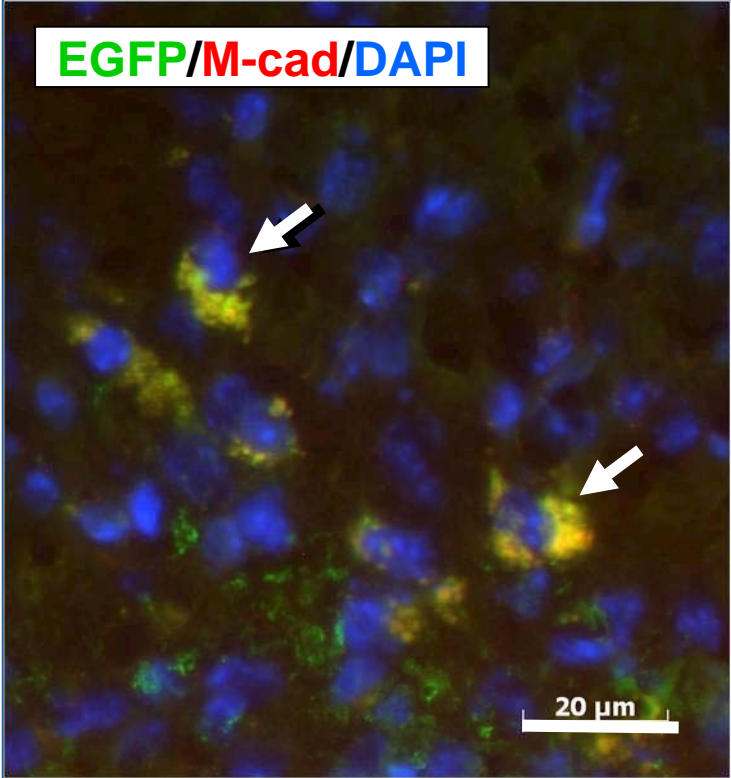
HE 染色
(損傷前脛骨筋の横断切片)



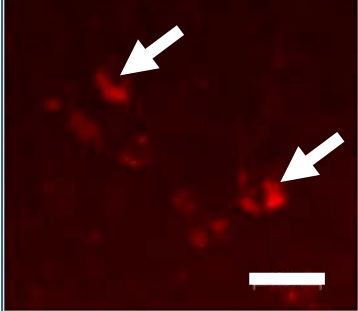
移植後1 週間



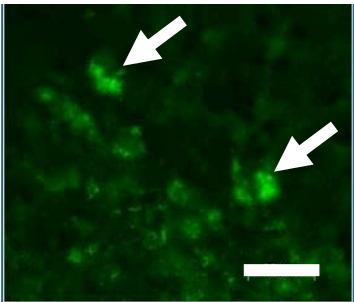
M-cadherin (筋芽細胞)



M-cad 筋芽細胞

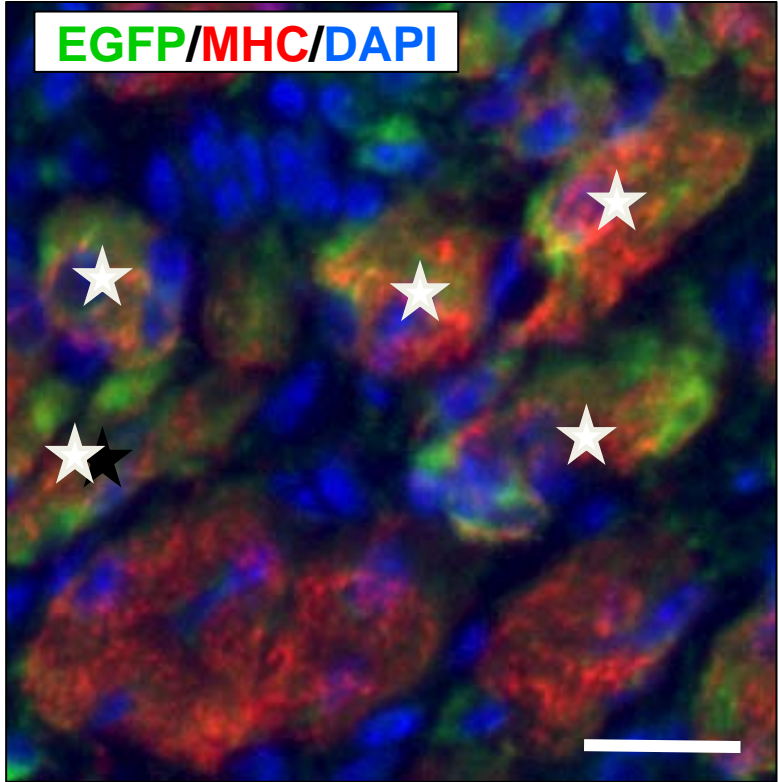


EGFP 移植細胞

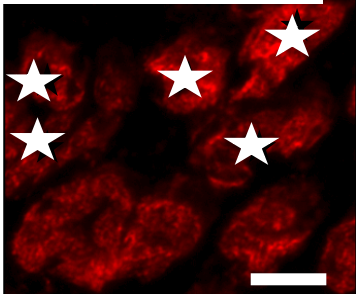


MHC (筋細胞)

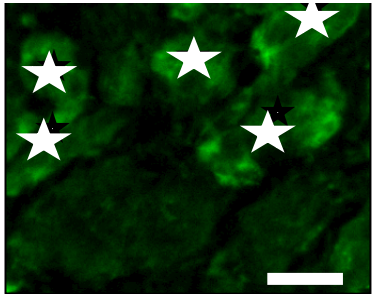
移植後1週間



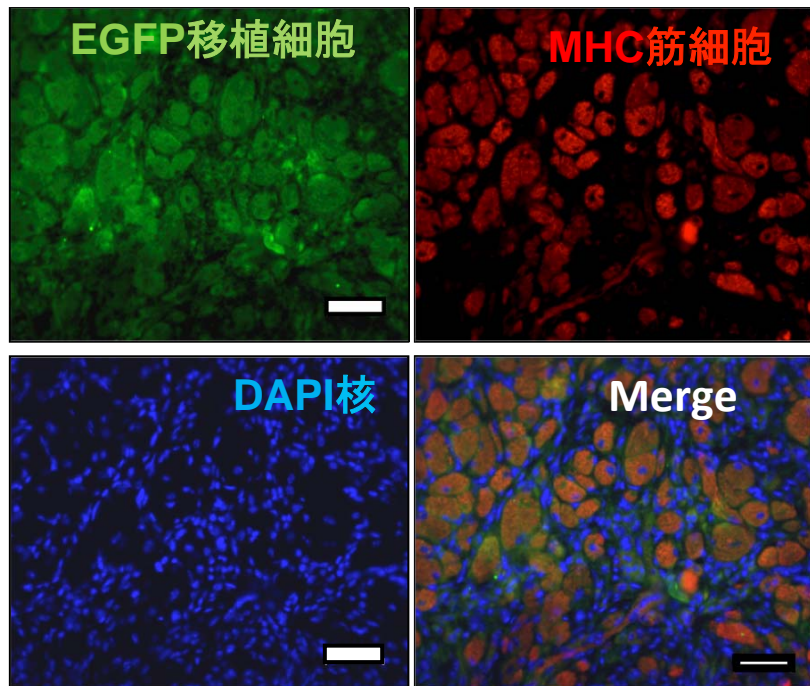
MHC 筋細胞



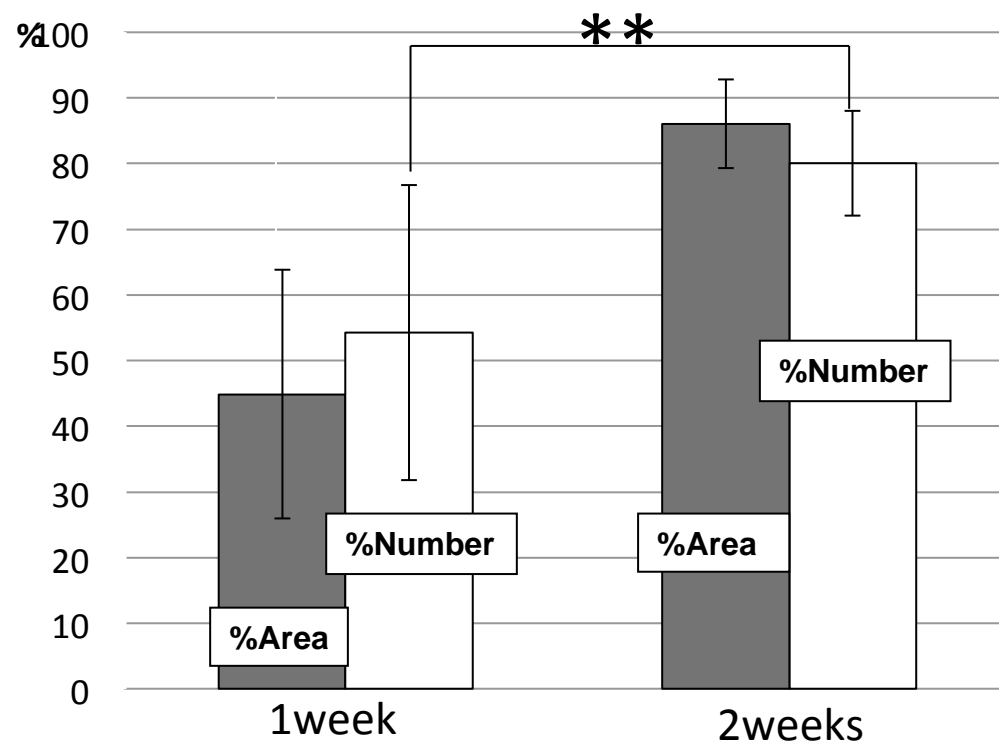
EGFP 移植細胞



間葉系幹細胞移植による筋再生

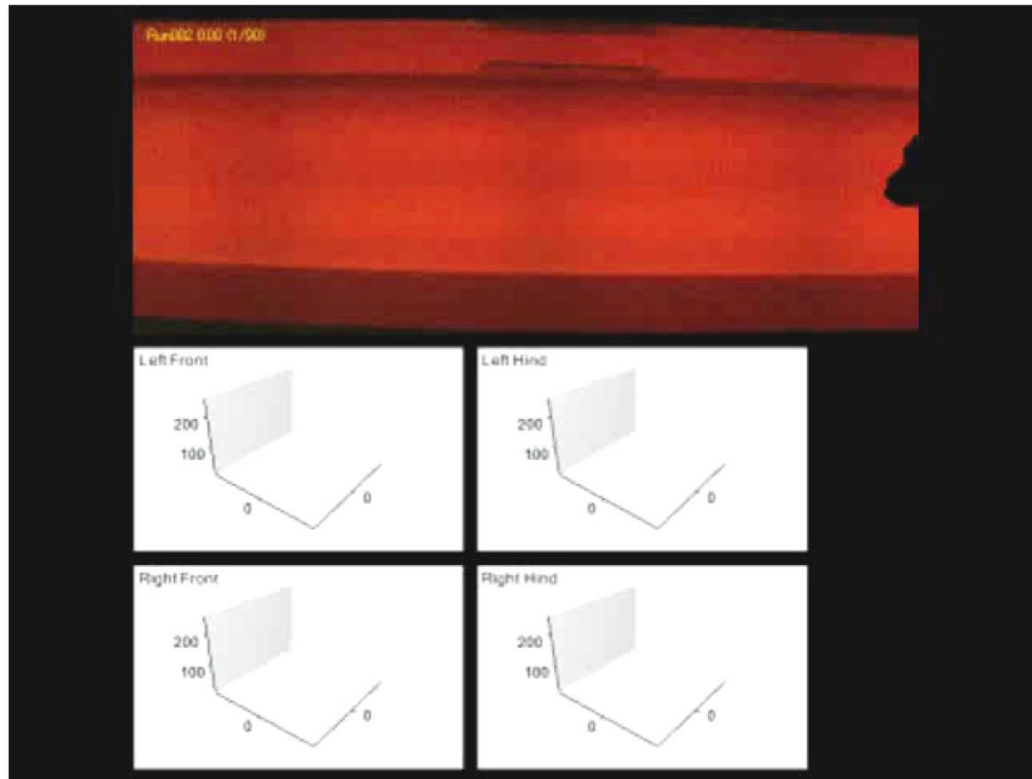


2weeks

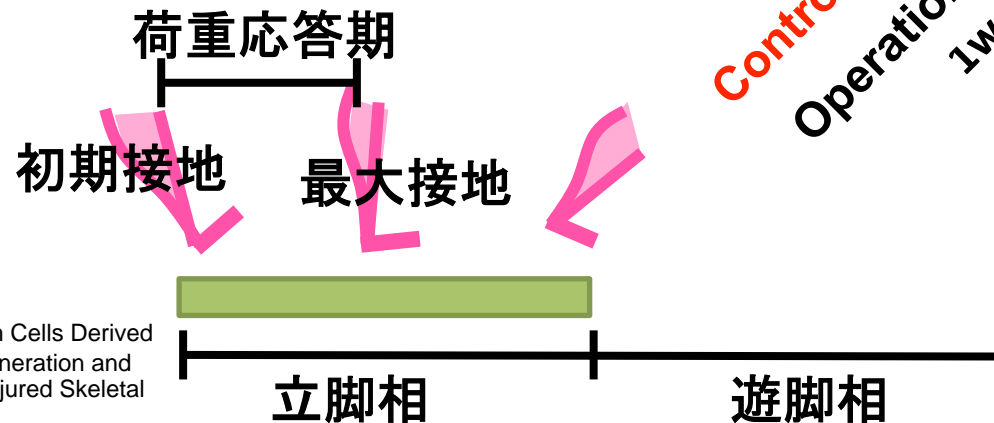
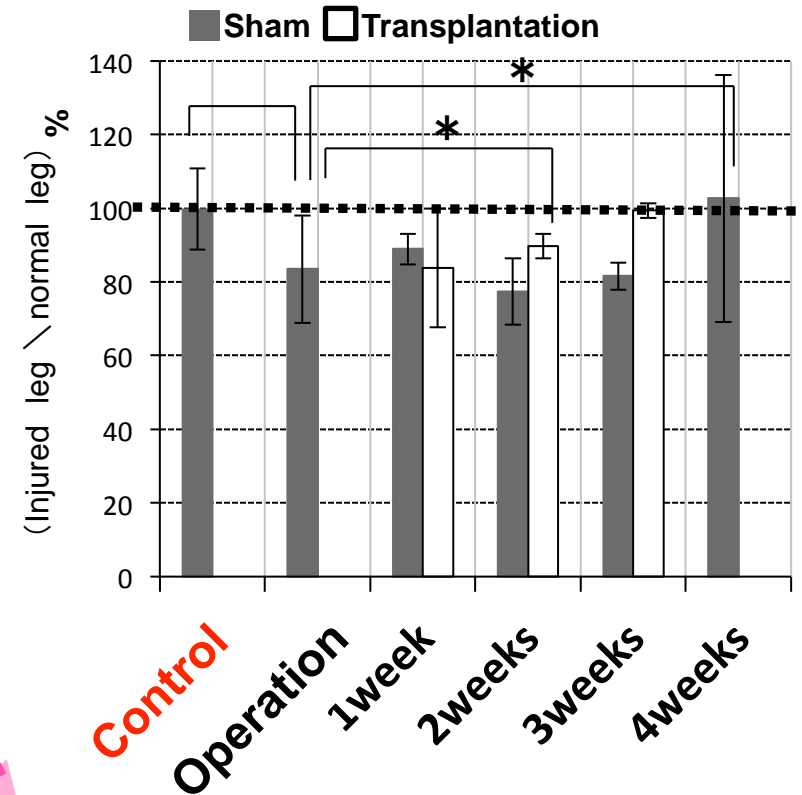


間葉系幹細胞移植による機能回復効果の検証

平田研究室 (手の外科)



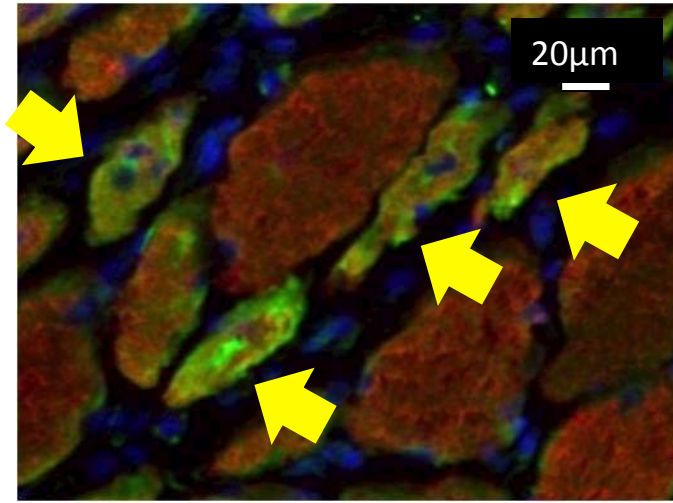
Percentage of load response phase



BioReseach Open Access
 2013年8月14日 2巻4号 295-306p
 Nana Takenaka-Ninagawa他
 Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Derived from ES Cells Promotes Muscle Regeneration and Accelerates Functional Recovery of Injured Skeletal Muscle

移植間葉系幹細胞の接着に必要な足場形成

損傷筋に移植すると生着する



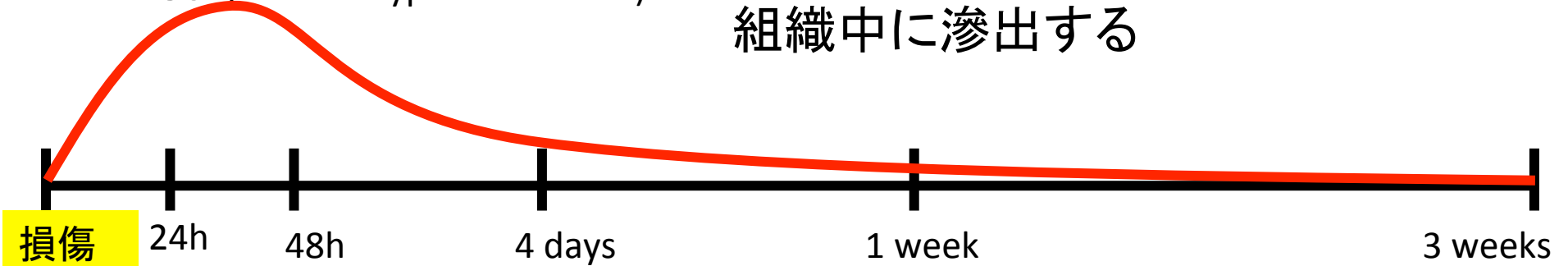
木全教授(愛知医大)
生化学工業 との
共同研究

正常筋に移植しても生着できない

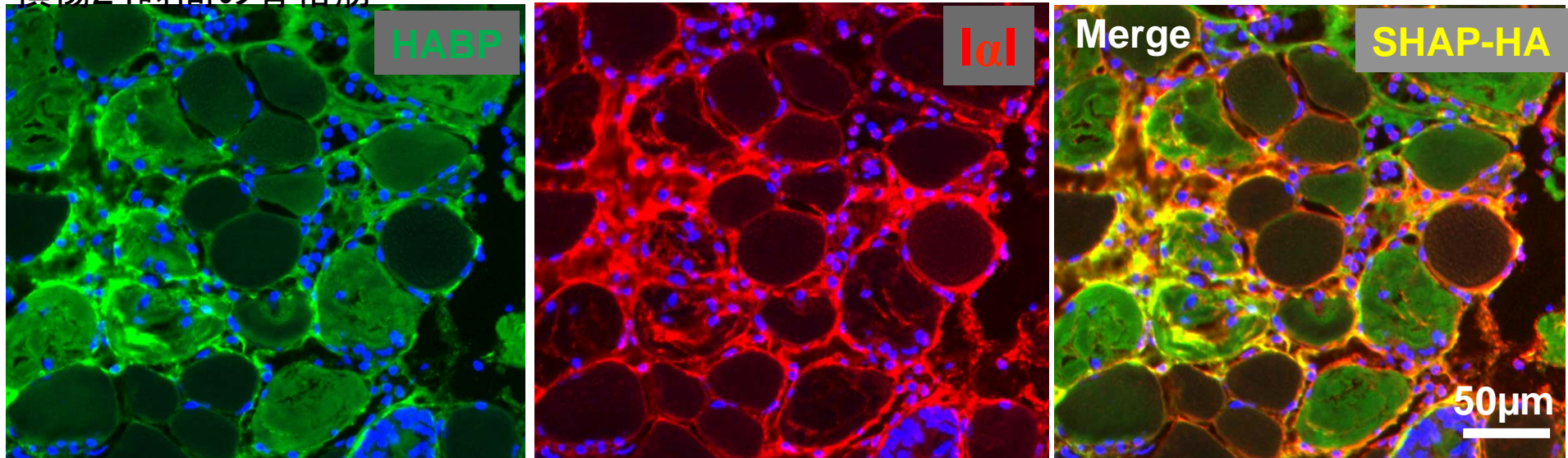


I α I (Inter- α -trypsin inhibitor)

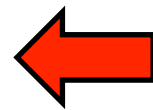
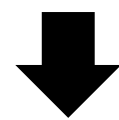
血液中に存在し、炎症時、損傷時に
組織中に滲出する



損傷24時間の骨格筋



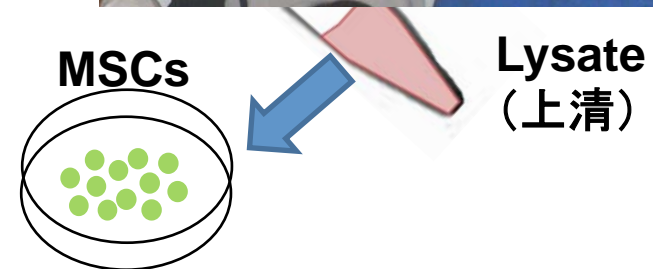
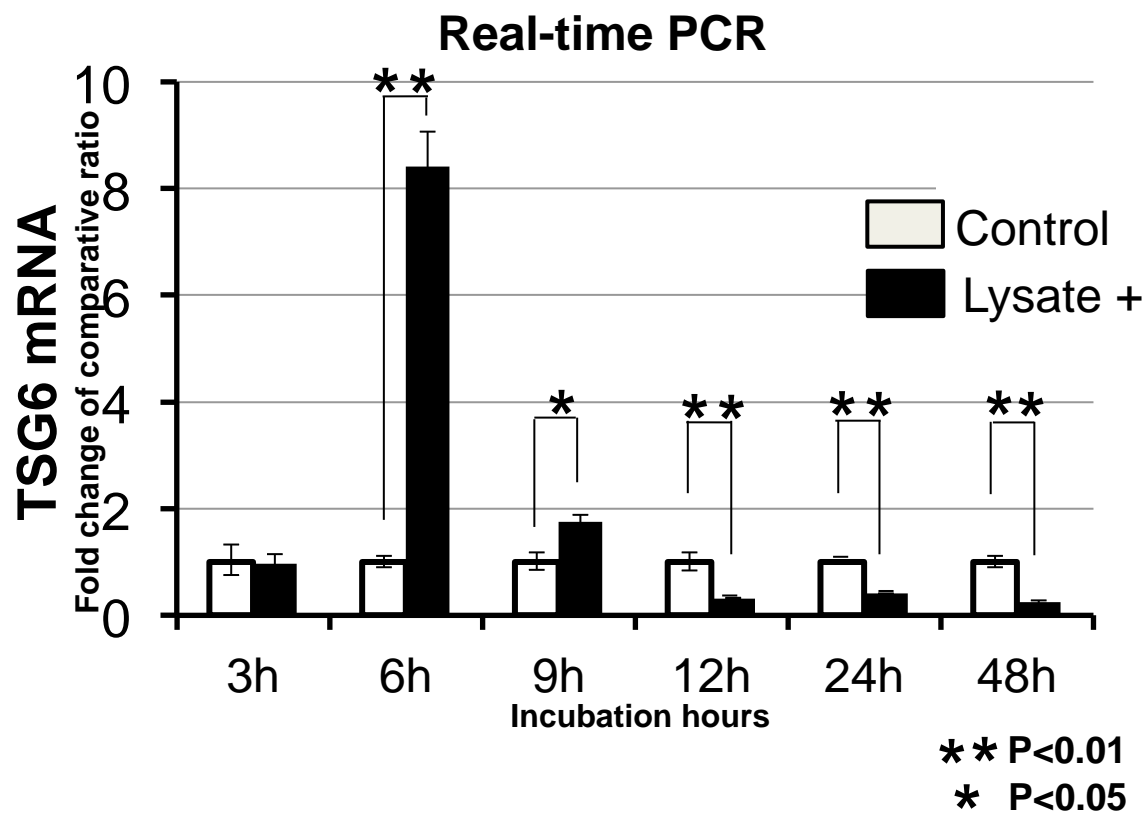
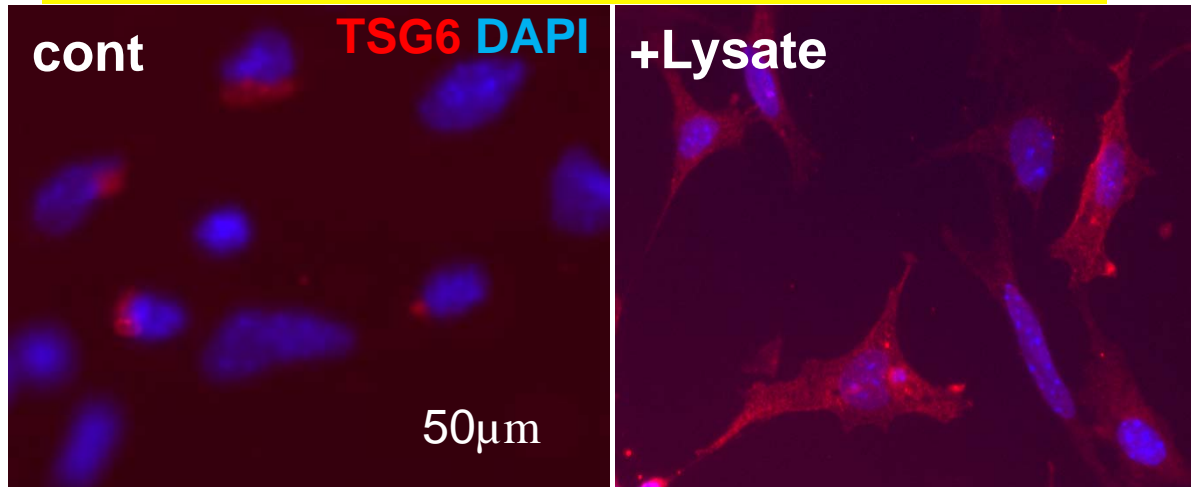
損傷筋では I α I は Hyaluronan-binding protein (HABP)と分布がほぼ一致する



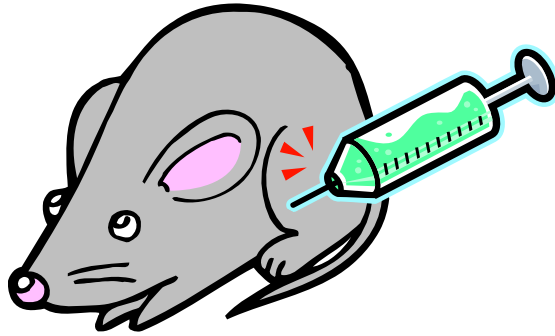
TSG6 (TNF-stimulated gene 6 product)が関わっている

Serum-derived hyaluronan-associated protein (SHAP-HA)の形成

Lysateによる間葉系幹細胞の活性化

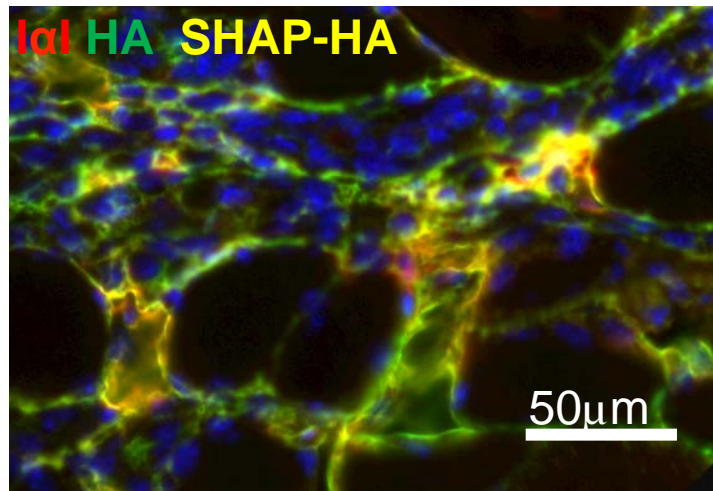


TSG6の重要な役目

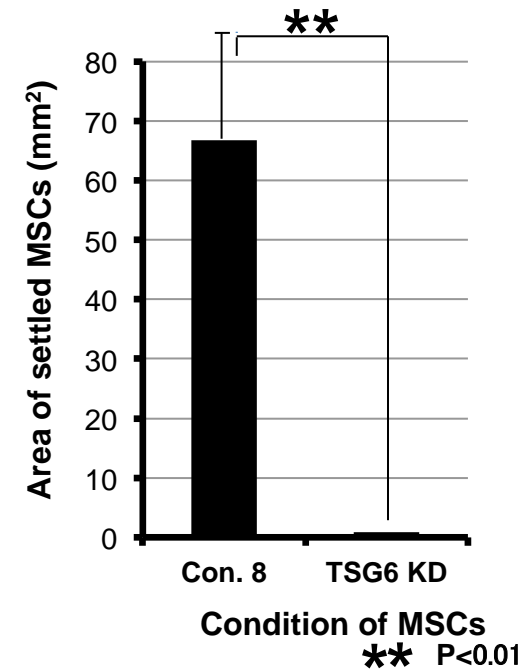
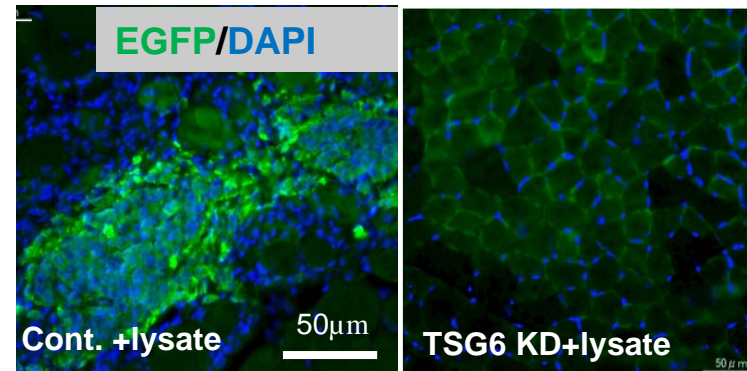


MSCsを正常な骨格筋へ移植し、生着できたのは

1. TSG6と共に移植した時
2. Myotubesの lysateと共に移植した時
3. Lysateで活性化したMSCsを移植した時



TSG6 knockdown (sh mRNA)



MSCsはTSG6を産生、分泌し、SHAP-HAを形成し、これを足場として生着する

ヒトのメタボモデルラットからiPS細胞を作る

永田教授(医療技術学専攻)との共同研究

多能性幹細胞

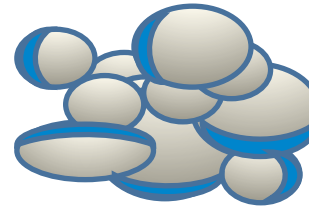
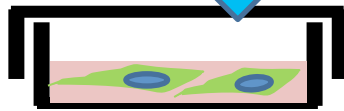
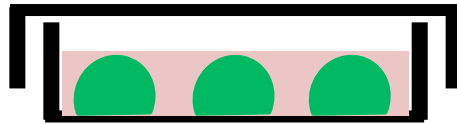
ES細胞

iPS細胞

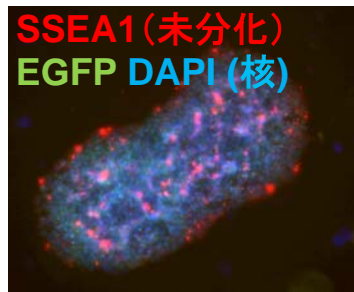
組織幹細胞

間葉系幹細胞 (MSCs)

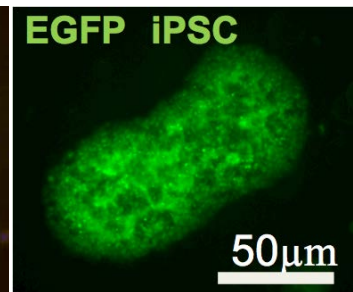
Transfection of
lentivirus
(Oct4, Klf4, Sox2, EGFP)



竹中さん

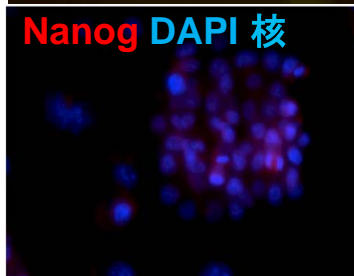


SSEA1 (未分化)
EGFP DAPI (核)

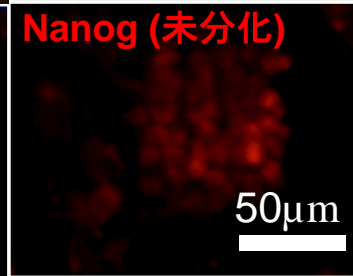


EGFP iPSC

50µm

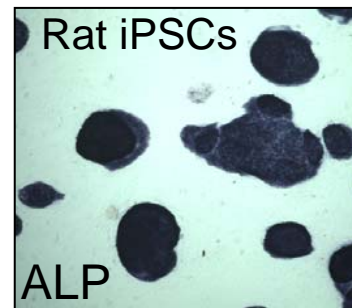


Nanog DAPI 核



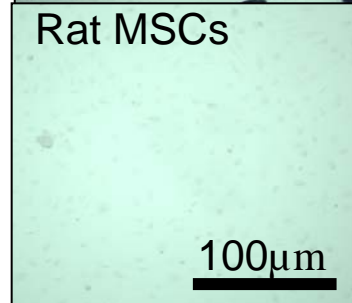
Nanog (未分化)

50µm



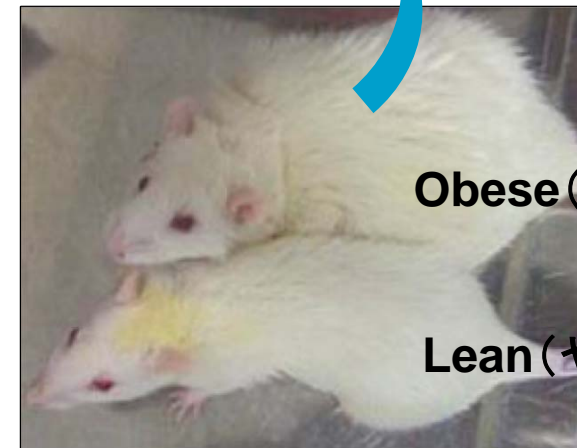
Rat iPSCs

ALP



Rat MSCs

100µm



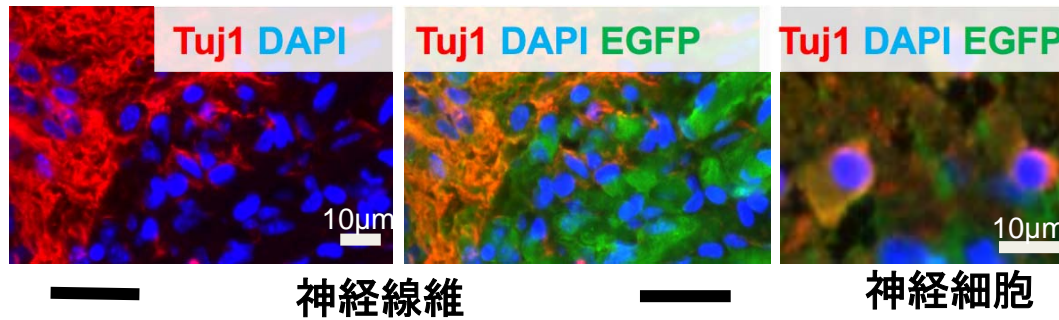
Obese (肥満)

Lean (やせ)

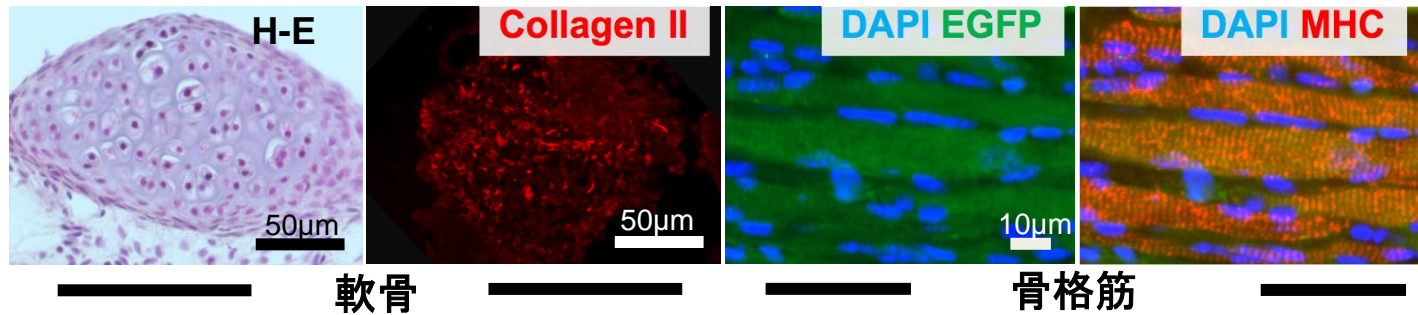
Leptin r 変異、食塩感受性

奇形腫形成能

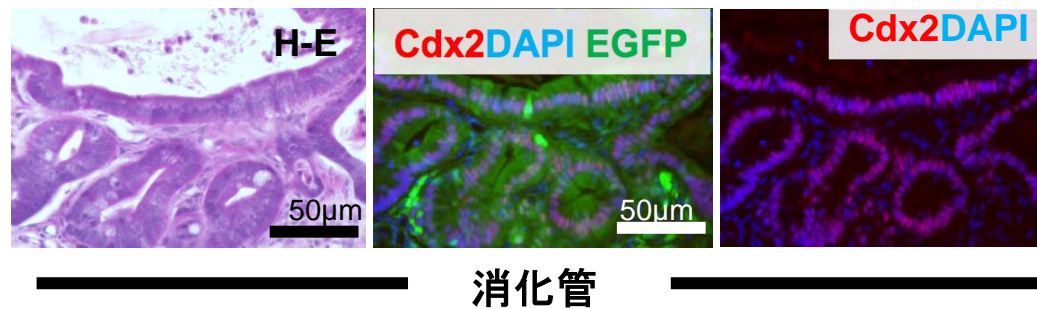
Nervous tissues
(神經、外胚葉)



Mesenchymal tissues
(間葉系細胞、中胚葉)



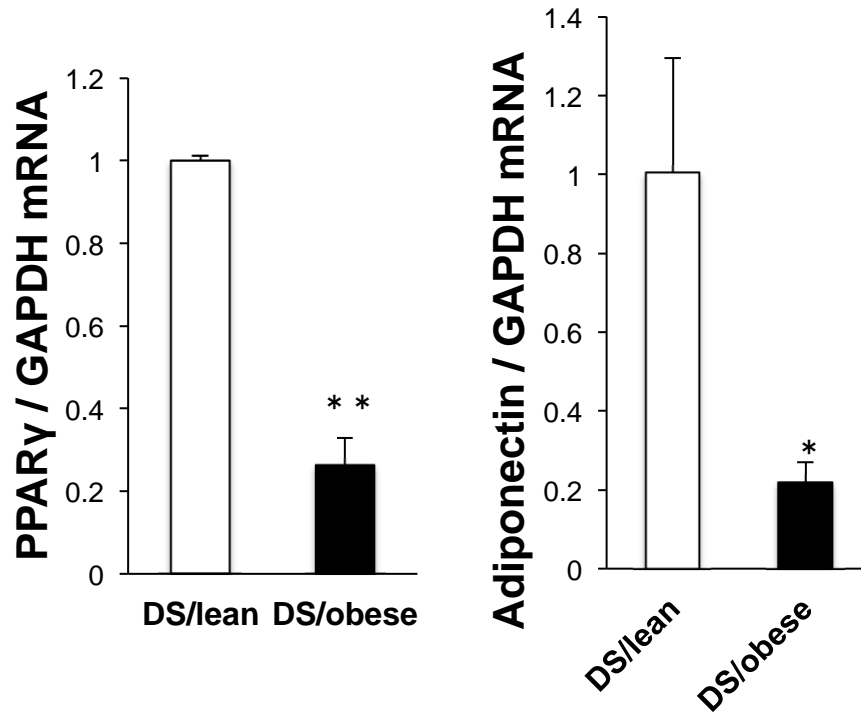
Endoderm tissues
(内胚葉)



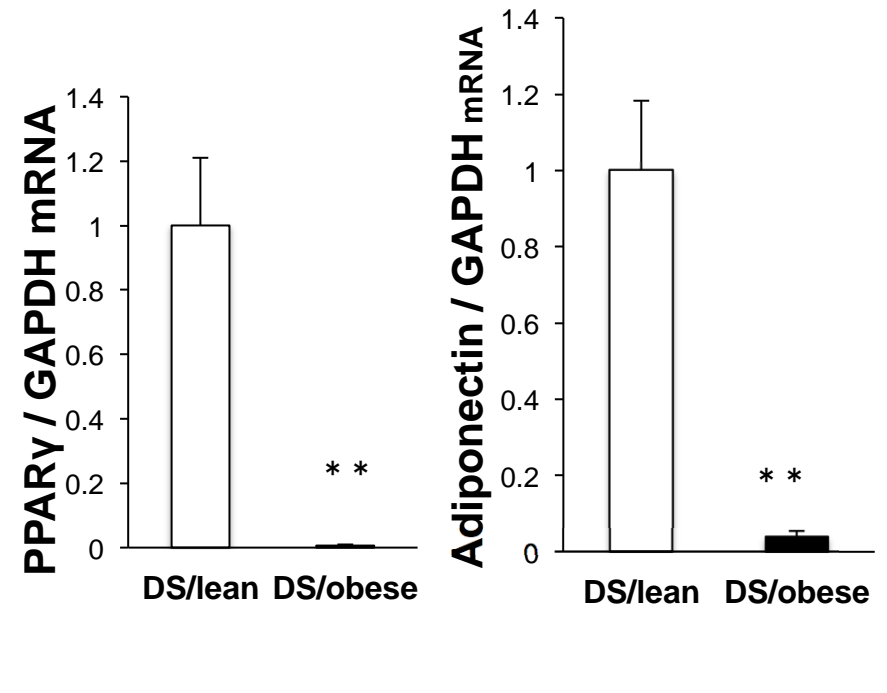
脂肪細胞の特性を示す mRNA 発現は皮下脂肪細胞と類似

永田先生、渡邊先生との共同研究

iPS細胞由来脂肪細胞



ラット皮下組織脂肪細胞



iPSCs

adipose tissue

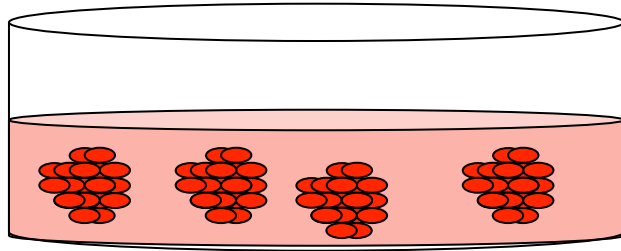
Real-time PCR

Lean(やせ)

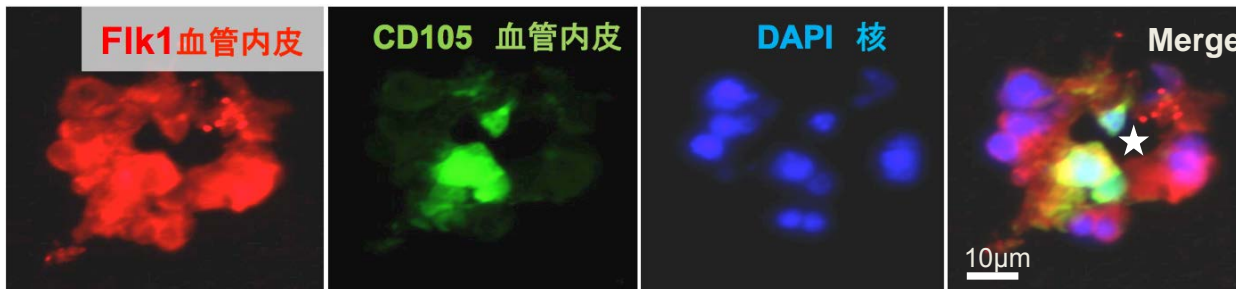
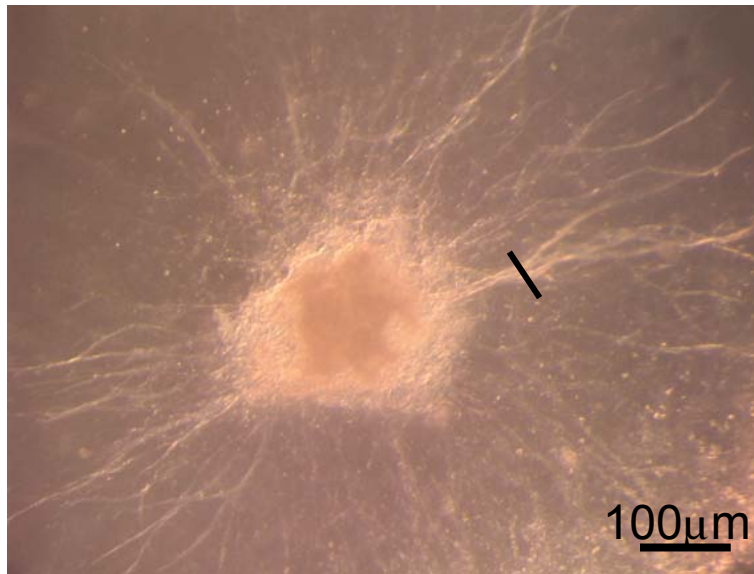
Obese(肥満)

3. ES細胞を用いた脈管形成の研究

三次元培養法の確立

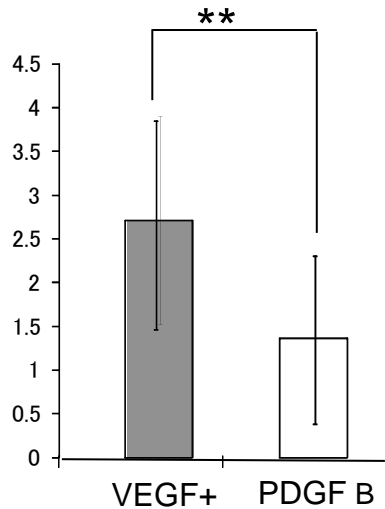


AteloCell
(Collagen gel)
2.5~4mm

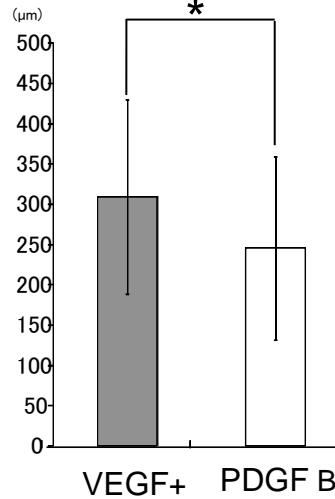


VEGFとPDGF-Bの脈管形成作用

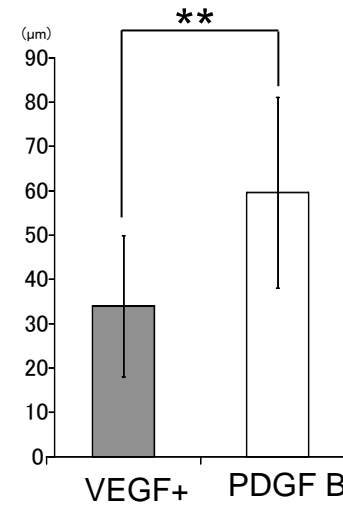
脈管の枝分かれ



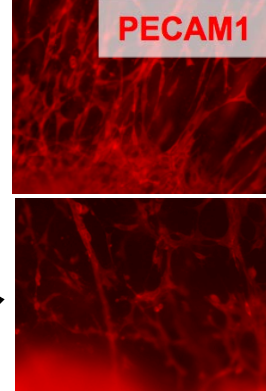
脈管の長さ



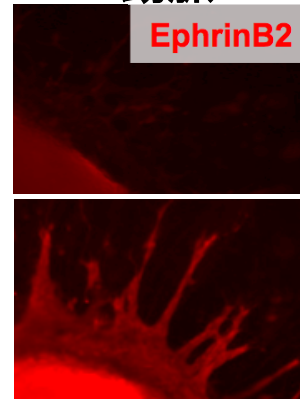
壁の厚さ



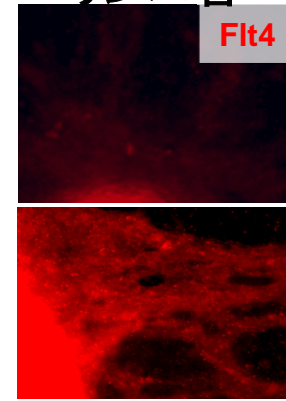
血管内皮共通



動脈



リンパ管



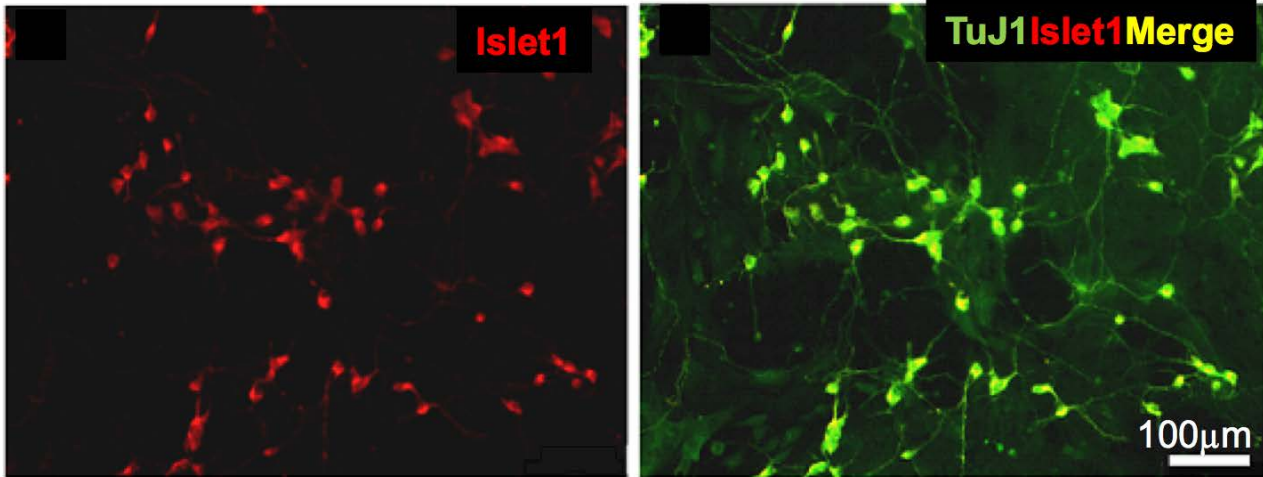
VEGFは主に血管新生に、PDGF-Bは血管の分化に関わる

Stem Cell Discovery 2012年2巻2号 70-77p Hitomi Hosoe他

Investigation of VEGF and PDGF signals in vascular formation by 3D culture models using mouse ES cells

4. ES細胞を用いた神経系細胞分化の研究

MACS(磁気ビーズ法)による神経幹細胞の分離と運動神経への分化誘導法の確立

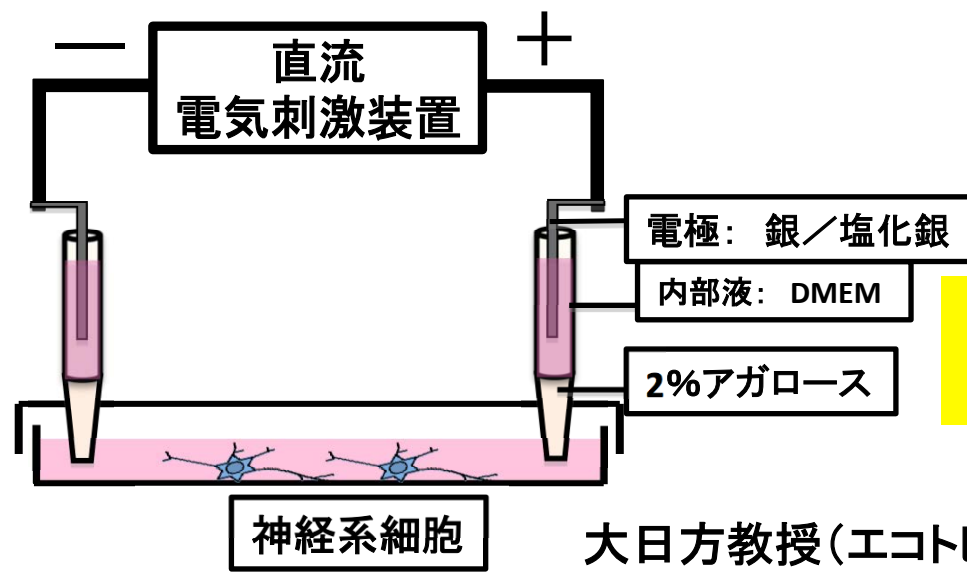


河村さん



小玉くん

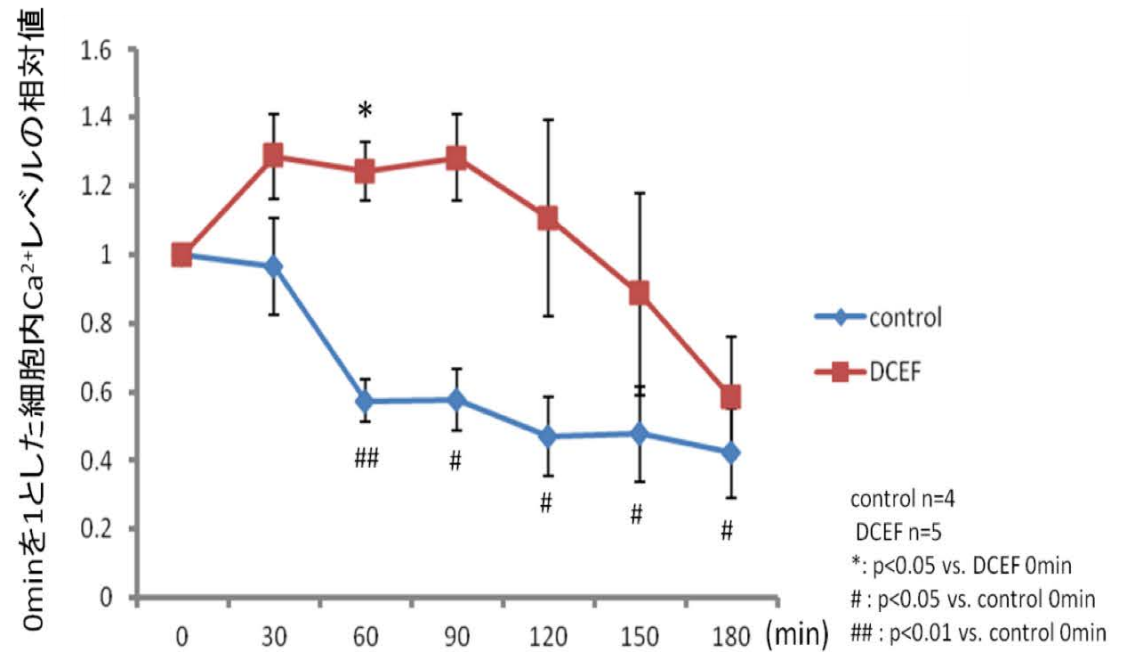
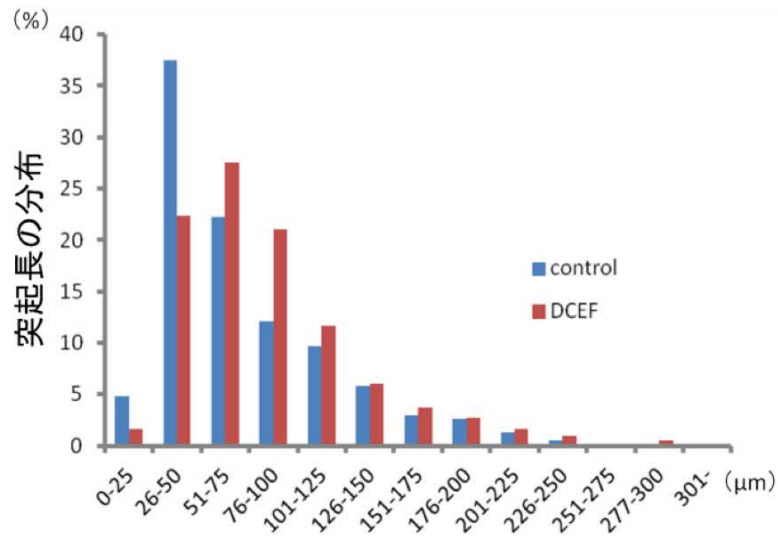
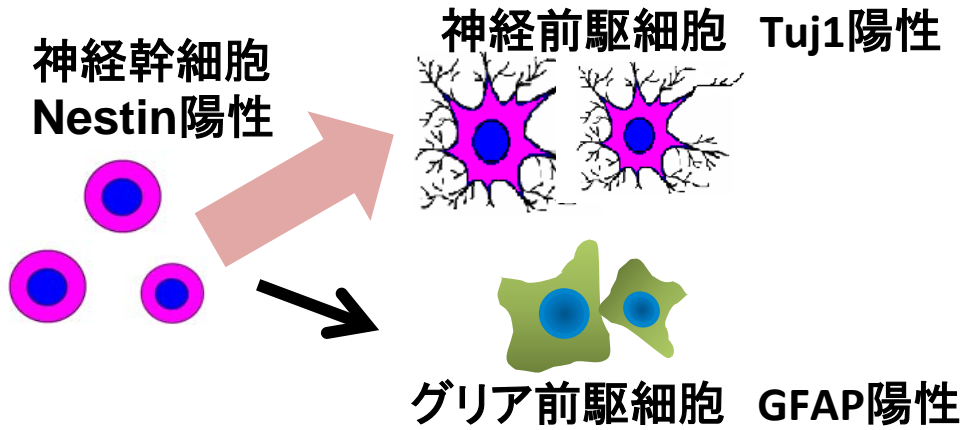
小林さん



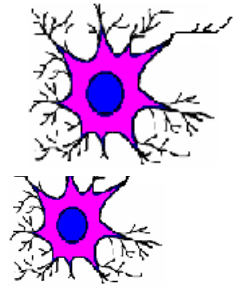
細胞外直流電流負荷が神経系細胞の分化に与える影響

大日方教授(エコトピア)のご指導

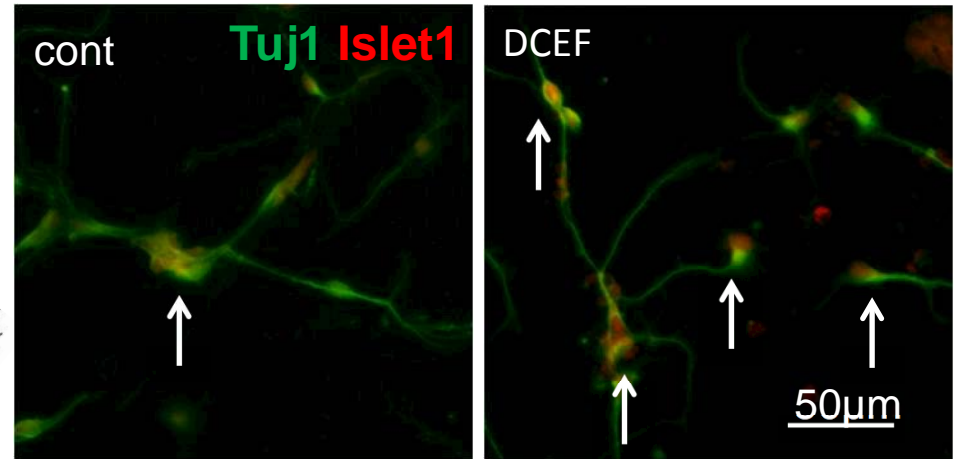
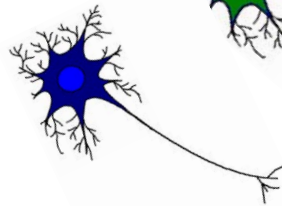
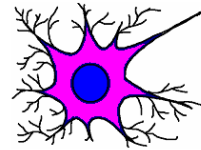
DCEF : 0.2mA 3hours/day



神経前駆細胞
Tuj1陽性



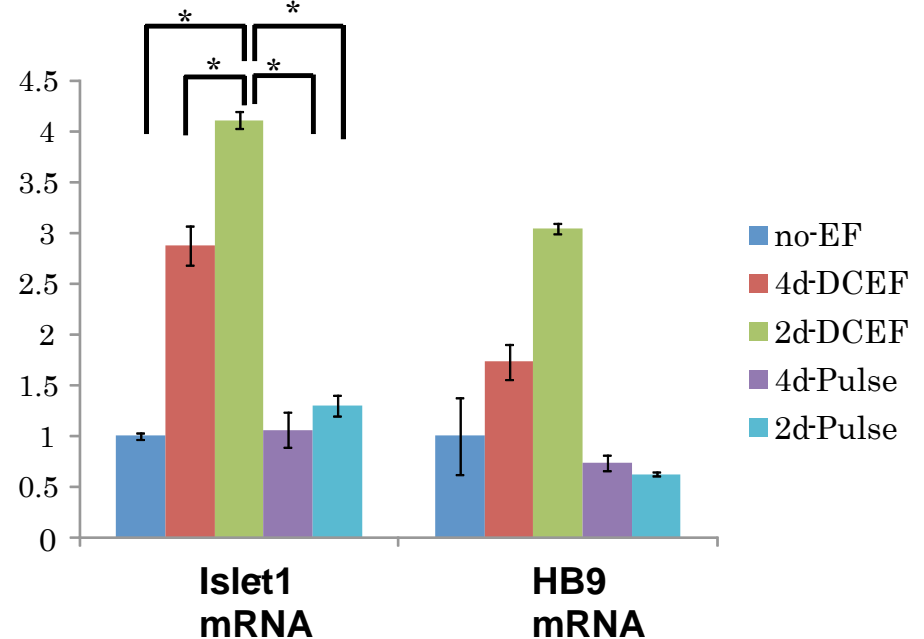
運動神経細胞
Islet1陽性



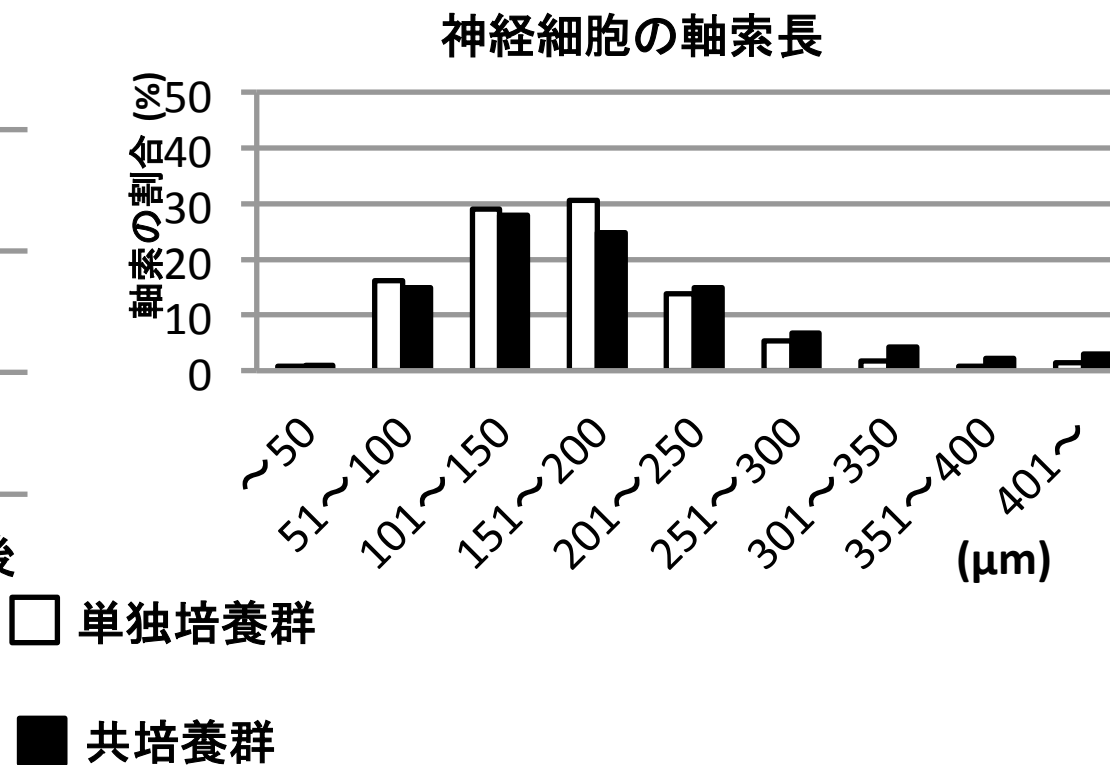
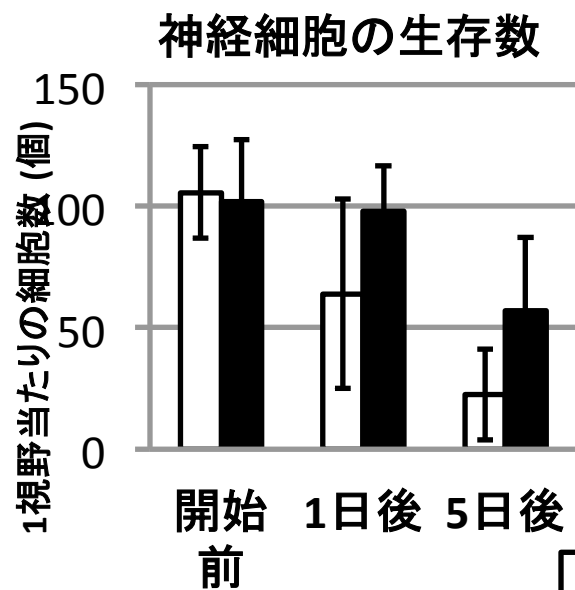
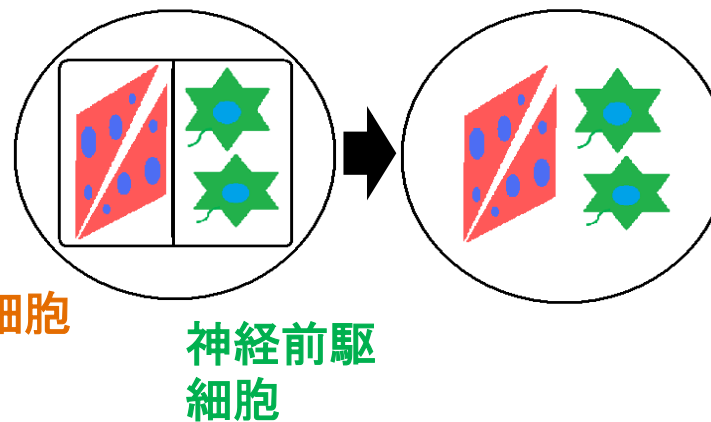
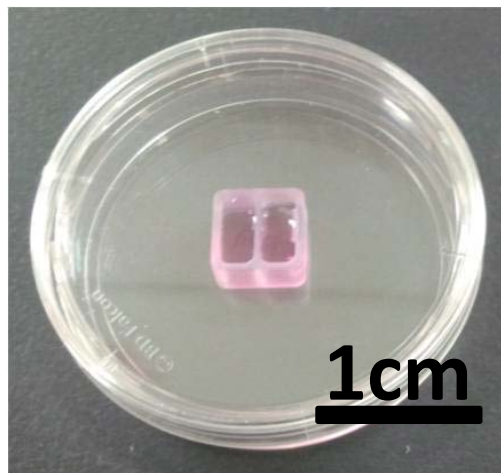
細胞外直流電流負荷は神経幹細胞、
神経前駆細胞の分化に影響する

細胞内カルシウムシグナルの関与が
考えられる

Real-time PCR



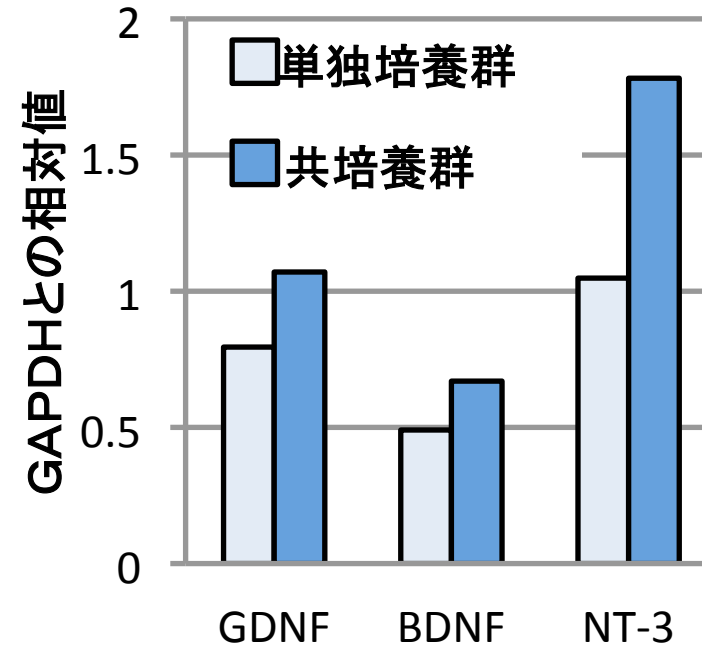
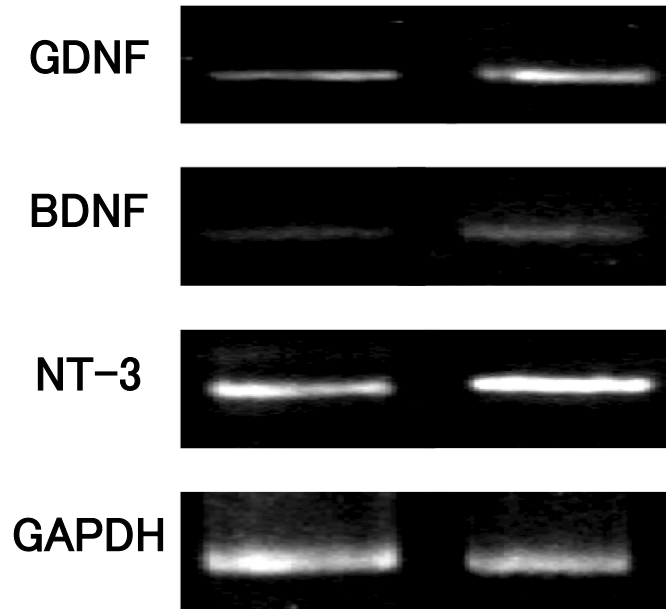
運動神経細胞と骨格筋細胞の分化過程における相互作用



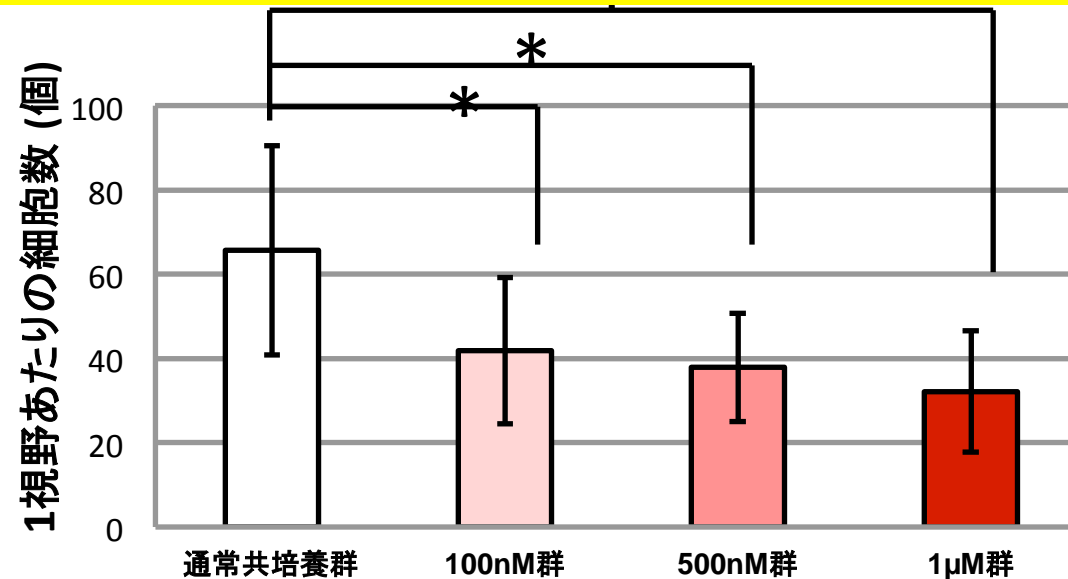
骨格筋細胞が産生する神経栄養因子は共培養で増加する

PCR

単独培養群 共培養群



受容体の阻害剤(K252a)は神経細胞の生存数を減少させる



* P<0.05



ありがとう!!

