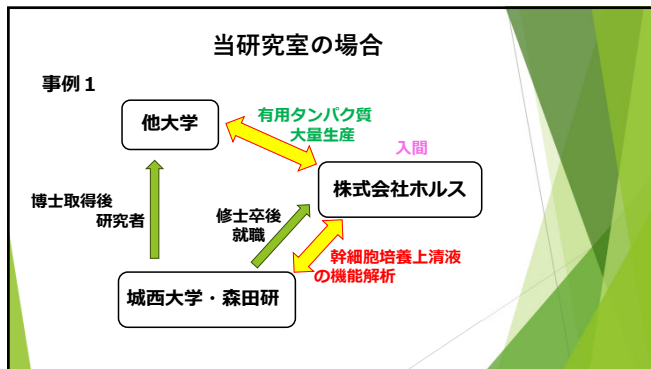
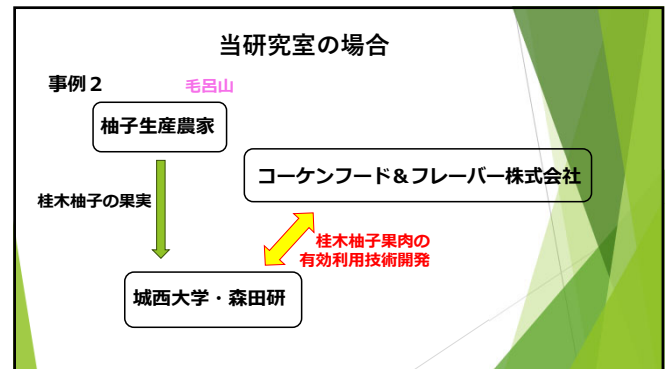
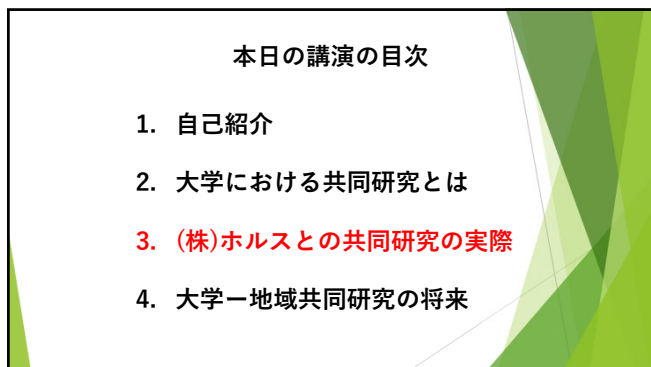




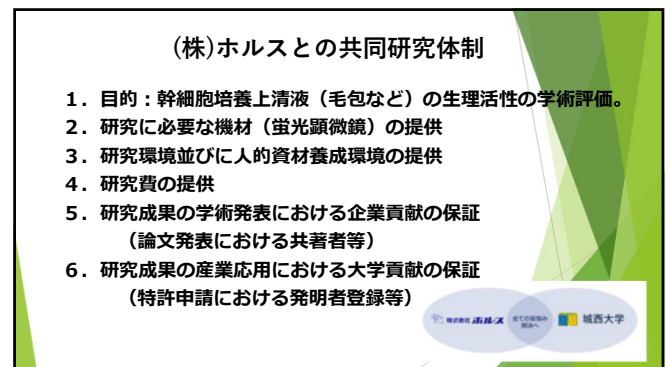
7



8



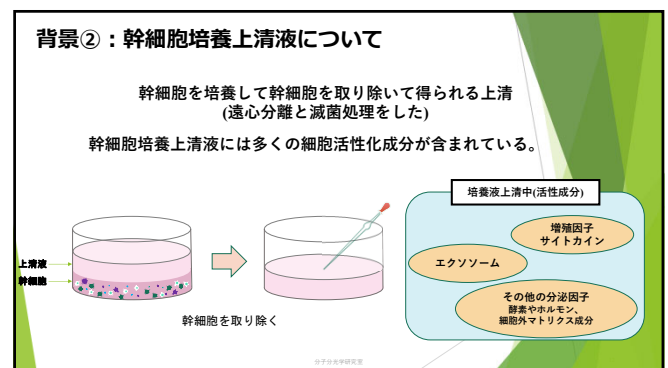
9



10

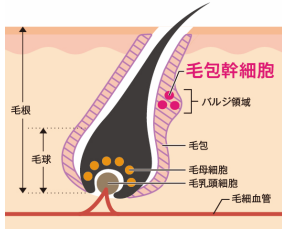


11



12

背景③：毛包幹細胞について



毛包幹細胞の役割

- ・ 毛髪 の 成長 と 再生
- ・ 自己複製と多分化
- ・ 毛根組織の修復
- ・ 増殖因子やホルモンの分泌

→ AGAの予防・改善に関わる

男性型脱毛症(AGA)：成人男性特有の進行性の脱毛症。
生え際や頭頂部の毛髪が薄くなったりする

分子生物学研究室

13

【目的】

「幹細胞培養上清液」による毛包幹細胞の活性化の評価を
生細胞イメージング法を用いて生化学的に検証する。



細胞のミトコンドリア活性を誘導し、
ミトコンドリア膜電位を指標とした蛍光強度の定量解析を行う。

分子生物学研究室

14

毛包幹細胞の活性評価

酸化的エネルギー産生を行うミトコンドリア膜電位を評価
ミトコンドリアは、細胞の中でATP産生の機能を持つ

膜電位差が大きいミトコンドリア

酸化的エネルギー産生UP



蛍光強度が高い

分子生物学研究室

膜電位差が小さいミトコンドリア

酸化的エネルギー産生DOWN



蛍光強度が低い

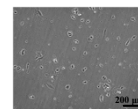
15

15

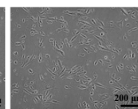
【実験方法】

①幹細胞培養

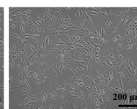
毛包幹細胞は共同研究機関（株式会社 ホルス）から提供
接着細胞用の細胞培養プレート(9.6 cm²×6ウェル：WATSON)を用いて培養



0hr



20hr



40hr

毛包幹細胞の生育 (37 °C、5% CO₂)

分子生物学研究室

培地成分
・ KBM ADSD-2
・ KOHJIN BIO
・ UltraGRO™-Advance
・ HELIOS
・ Penicillin-Streptomycin Solution
FUJIFILM

撮影：All-in-one fluorescence microscope (BZ-X800, KEYENCE)
Plan Fluorite 4x PH (NA0.13, BZ-PF04P, KEYENCE)

16

16

【実験方法】

②幹細胞の植え継ぎ

- ・ PBSを用いて洗浄

- ・ Trypsinを500μl添加 (細胞を解離)

5分後

- ・ 培地を加え、チューブに回収



- ・ PBS(-) (FUJIFILM)
細胞の洗浄や希釈等に使用する
- ・ KBM Trypsin AOF (KOHJIN BIO)
組織及び細胞単層の解離に使用する

分子生物学研究室

17

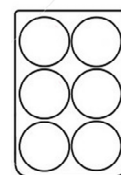
17

【実験方法】

③培養条件の制御

- ・ 遠心分離後上澄みを取り除く

- ・ 培地を加えたプレートに細胞を撒く



培地のみ

培地と
自家細胞培養液上清

培地と
他家細胞培養液上清

自家細胞培養液上清

添加対象の幹細胞を培養して得られた細胞培養液の上清細胞を培養して得られた上清

他家細胞培養液上清

添加対象の幹細胞とは異なるドナー由来の幹細胞を培養して得られた培養液の上清

18

18

幹細胞培養上清液の添加条件

細胞世代	4th(単回投与)		15th(単回投与)		15th(5thから連続投与)	
幹細胞培養上清液	自家細胞	他家細胞	自家細胞	他家細胞	自家細胞	他家細胞
濃度	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	2.5%	2.5%	2.5%	2.5%	2.5%	2.5%
	5%	5%	5%	5%	5%	5%
	10%	10%	10%	10%	10%	10%

分子生物学研究室

19

19

【実験方法】 ミトコンドリアの活性評価

- Cell Count Normalization Kit
200μlで蛍光染色

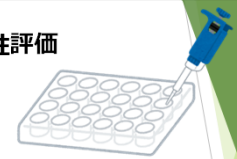
30分後

- MT-1 MitoMP Detection Kit
200μlで蛍光染色

30分後

- 培地を用いて洗浄

- Imaging Buffer で蛍光撮影



統計的処理を増やすために24 wellで染色

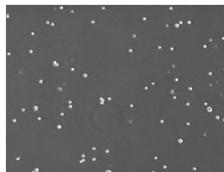
- Cell Count Normalization Kit (DOJINDO)
核染色 (生細胞数の選別)
- MT-1 MitoMP Detection Kit (DOJINDO)
ミトコンドリア膜電位を染色

分子生物学研究室

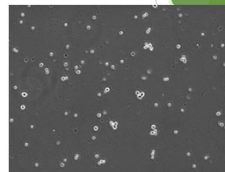
20

20

【実験結果】 幹細胞培養上清液添加による細胞増殖の活性評価



15th 未添加



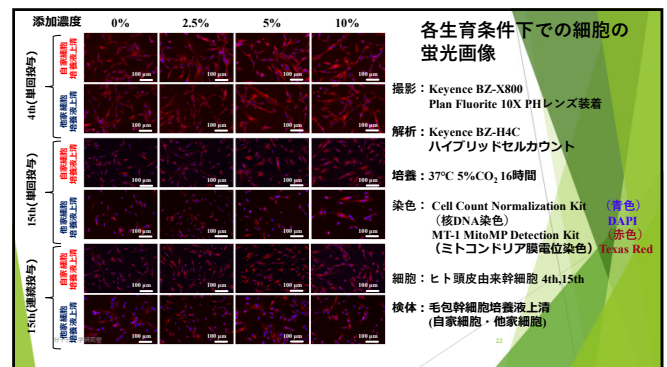
15th 10% (5thから連続投与)

植え継ぎから60時間後までタイムラプス撮影

分子生物学研究室

21

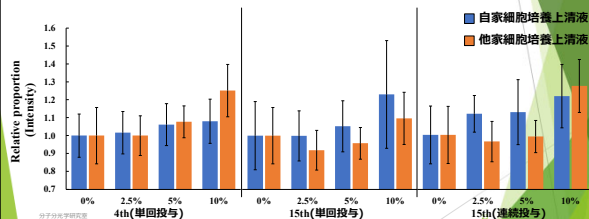
21



22

1細胞あたりのミトコンドリア蛍光強度の相対比較

各条件における0%を1としたときの相対値を示している。



分子生物学研究室

23

【まとめ】

- “幹細胞培養上清液”の添加濃度の上昇とともに、蛍光強度の上昇（ミトコンドリア膜電位上昇）が確認できた。
- この効果は、第4世代、第15世代の継代細胞いずれの場合でも確認できたことから、“幹細胞培養上清液”の添加を継続することで、高い細胞の代謝活性が維持できると結論した。

分子生物学研究室

24

24

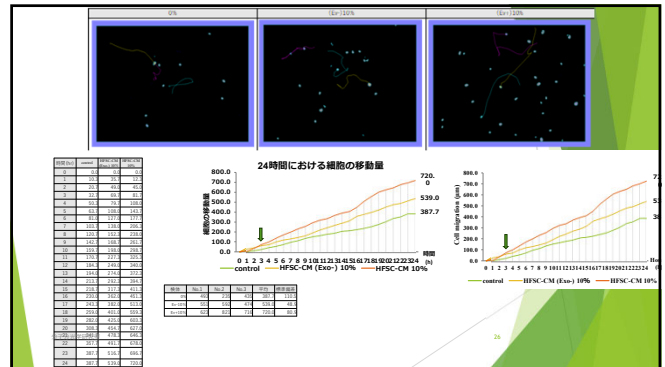
【今後】

“幹細胞培養上清液”の継続的添加が、老化の進行を遅らせるかについて、複数の観点（テロメア長、ゲノムDNAへのダメージの蓄積等）から解析することを検討している。

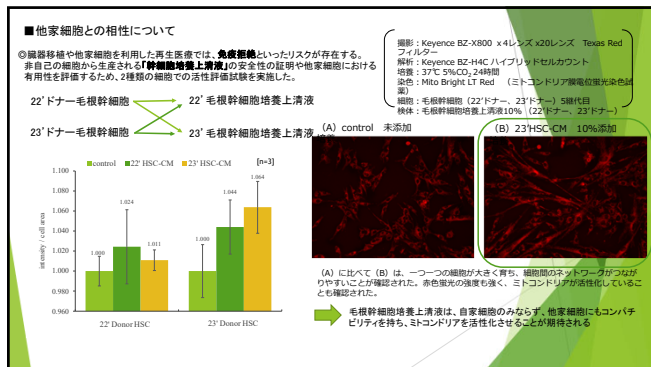
分子生物学研究

25

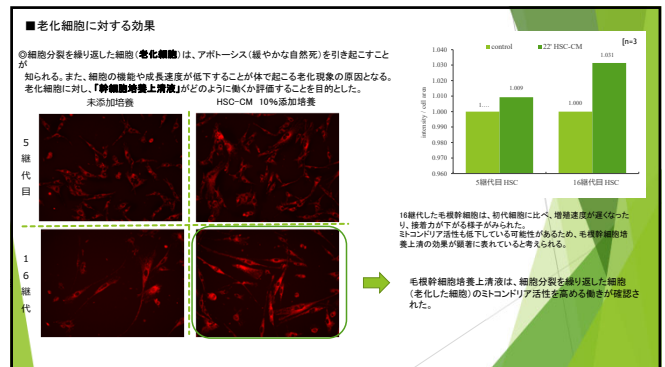
25



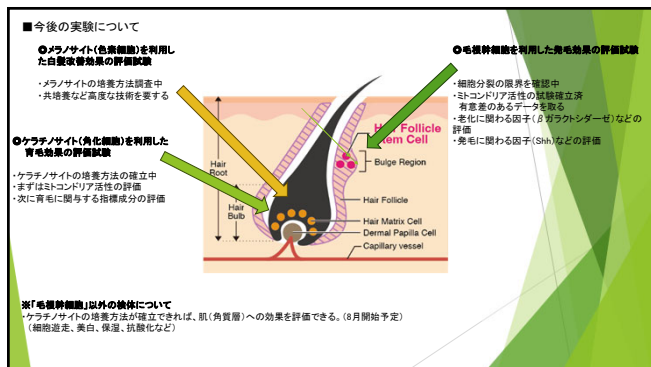
26



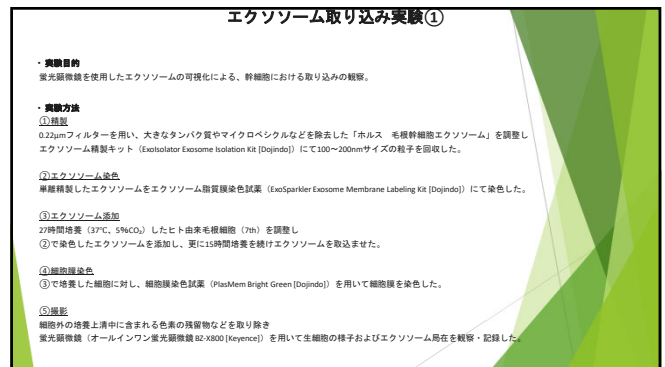
27



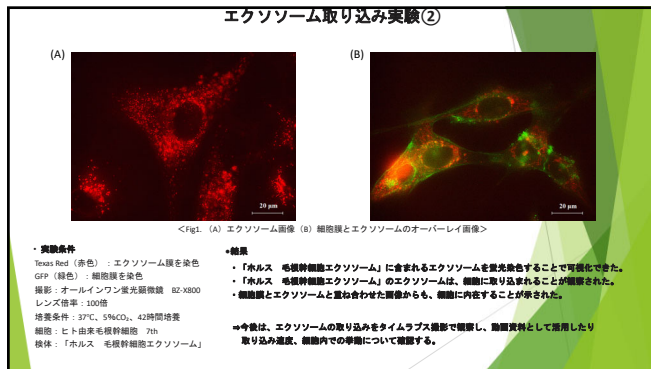
28



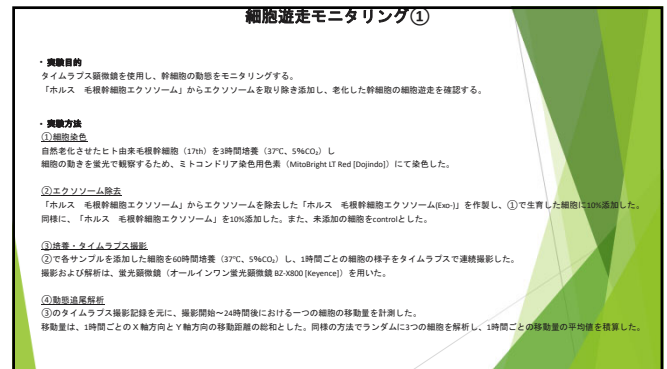
29



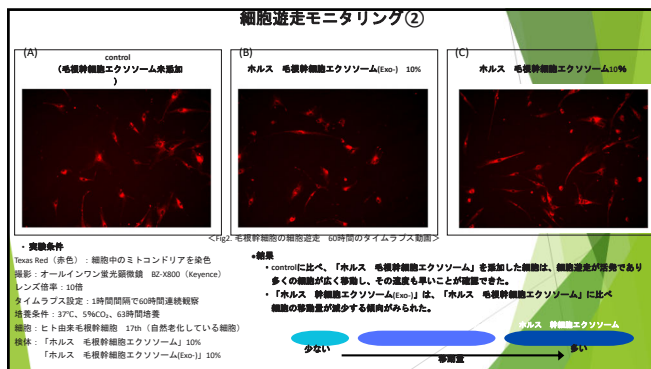
30



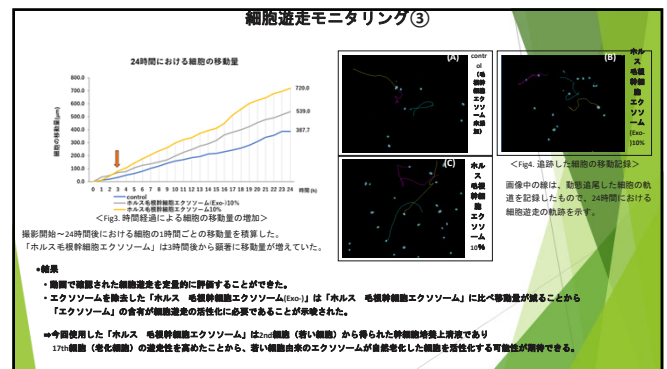
31



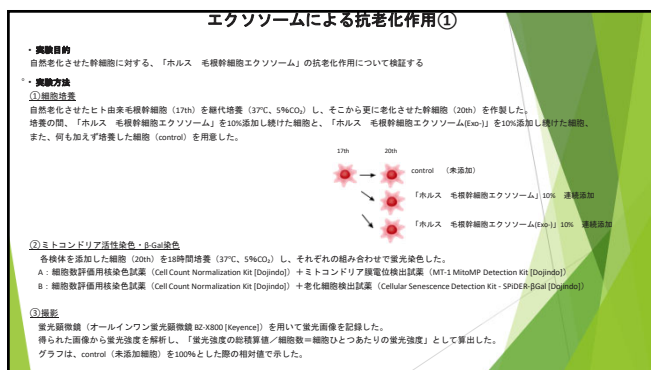
32



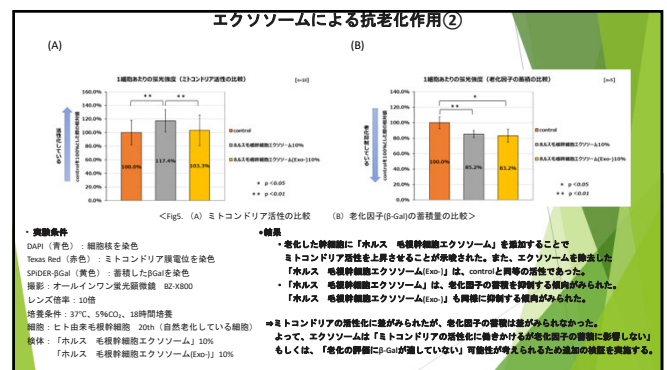
33



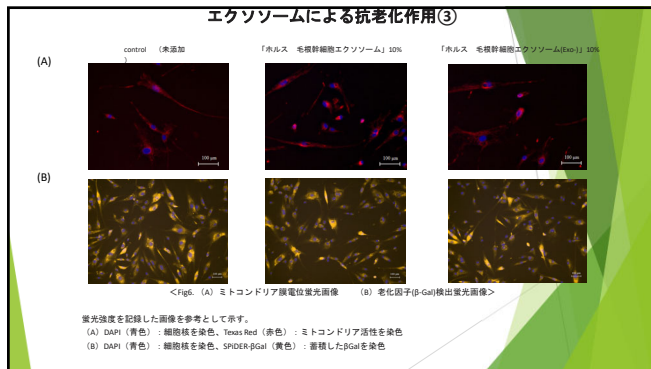
34



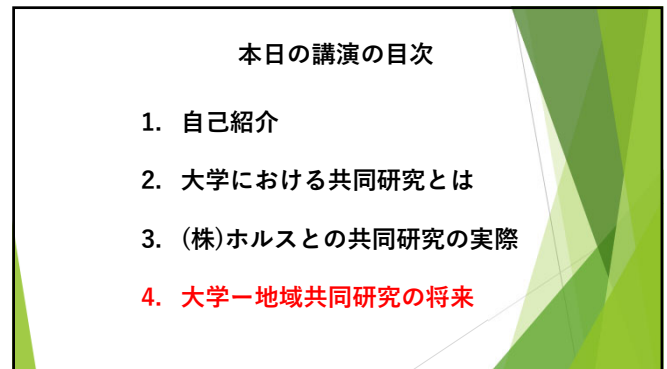
35



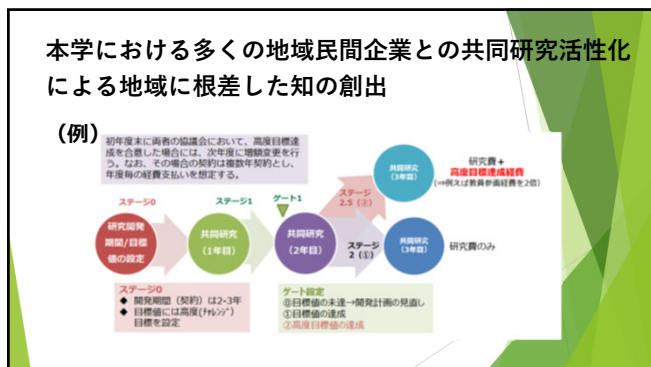
36



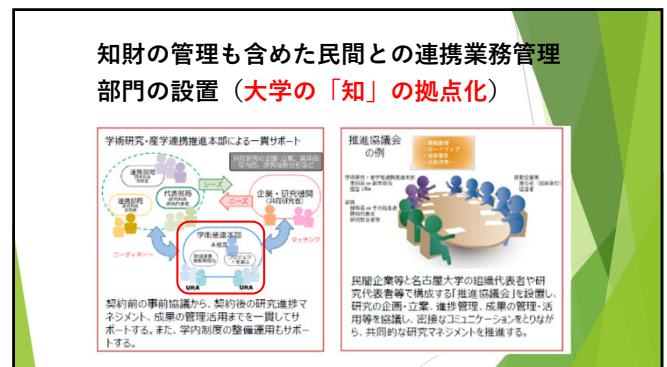
37



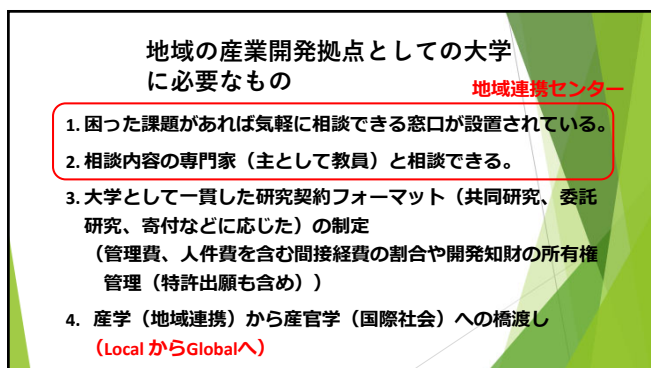
38



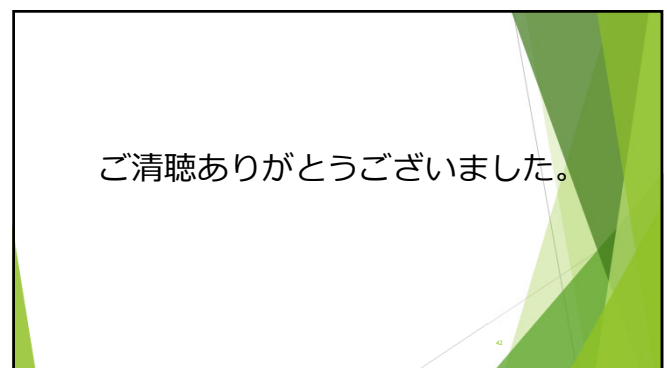
39



40



41



42