

京都大学若手人材海外派遣事業 ジョン万プログラム
研究者派遣プログラム

成果報告書

提出日：平成 30 年 1 月 17 日

【基本情報】

○申請者

採 択 年 度：平成 27 年度

部 局 名 等：ウイルス・再生医科学研究所 生命システム研究部門 組織恒常性システム分野

職 名：助教

氏 名：松村 繁

研究課題名：細胞分裂軸と乳腺幹細胞の動態

○渡航先

国 名：ベルギー王国

研究機関名：Université Libre de Bruxelles (ULB)

研究室名等：[研究室名] Laboratory of Stem Cells and Cancer

[職名等・氏名] Professor Cédric Blanpain

渡 航 期 間：平成 28 年 2 月 24 日～平成 29 年 12 月 14 日 (659 日)

○渡航期間中の出張

出 張 先：倉敷シーサイドホテル

目 的：平成 28 年度新学術研究領域「シリア・中心体による生体情報フローの制御」班
会議に参加し当研究課題に関する情報収集を行う為

期 間：平成 28 年 7 月 17 日～平成 28 年 7 月 22 日

出 張 先：

目 的：

期 間：

出 張 先：

目 的：

期 間：

京都大学若手人材海外派遣事業 ジョン万プログラム 研究者派遣プログラム

【成果】

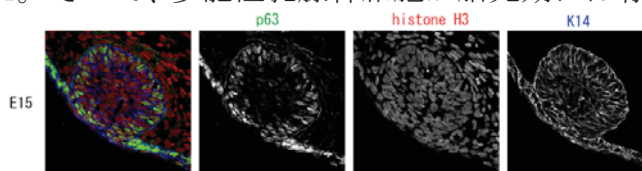
○プロジェクトの成果及び今後の展開

・研究概要

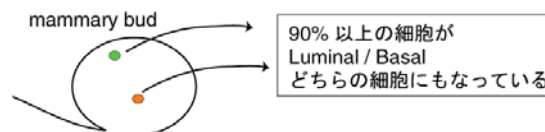
受け入れ研究室では、マウス個体を用いた細胞系譜追跡の手法によって、皮膚・心臓・乳腺・前立腺といった組織での組織幹細胞の動態を数多く明らかにしてきた。組織特異的プロモーターと誘導型 Cre を蛍光タンパク質発現の ON, OFF と組み合わせ、組織特異的に、任意のタイミングで数個程度の細胞のみを蛍光ラベルし、その後ラベルした細胞の子孫が組織にどのように寄与したかを調べる手法である。渡航者は乳腺組織の発達を研究対象とした研究計画に参加した。マウス乳腺の発生は胎児期の早い時期に、皮膚上皮細胞が乳腺原基を形成し真皮層へと陥入していくところから始まる。発生が進むにつれて真皮層を突き抜け、皮下組織に発達してくる脂肪組織へと枝分かれ構造をとりながらゆっくり浸潤していく。乳腺初期発生過程で、乳腺上皮は2層上皮構造からなる管腔構造を形成する（管腔細胞と基底細胞）。乳腺幹細胞は多能性かどうか、つまり2種類の細胞を生み出せるかどうか、近年のホットトピックである。当研究室では、出生後には、管腔幹細胞は管腔細胞のみを、基底幹細胞は基底細胞のみを産生すること、つまり両方の細胞系譜に分化できる多能性乳腺幹細胞はいないことを明らかにしてきた。そこで、多能性乳腺幹細胞が胎児期には存在するかを検証する研究を行った。細胞系譜追跡を行い、確かに胎児期の特定の時期までは多能性乳腺幹細胞が存在することを示した。

また、すでに得られていた遺伝子発現解析の結果を検証するため胎児期の乳腺切片の抗体蛍光染色を行い候補の絞り込みを行った。そして p63 を強制発現させるマウスを用いて解析を行い、多能性乳腺幹細胞の運命決定に転写因子 p63 が決定的にかかわることを見出した。この研究は論文としてまとめ、現在投稿中である（渡航者は第三共著者である）。

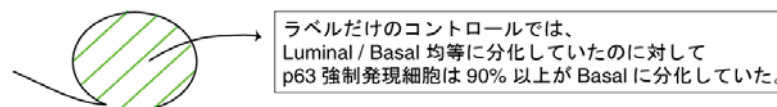
また、細胞増殖マーカーである Ki67 プロモーター-Cre、及び Ki67RFP マウスを用いた、細胞系譜追跡のプロジェクトにも加わり、マウスの管理、細胞系譜追跡の初期条件検討を主導で行った。これらの経験を通じて、マウスを用いた一連の実験手法やデータの捉え方、乳腺を扱う技術等多くを学ぶことができた。



内在性 p63 は bud の外側（将来の Basal 側）に発現が見られる。



bud 中の細胞どれでもラベルできる K14 プロモーターで 1-2 個の細胞のみを蛍光ラベル。出生後に増殖したラベル細胞の分化・運命を調べる。



bud 中の細胞全てを蛍光ラベル。同時に p63 を強制発現させる。出生後に増殖したラベル細胞の分化・運命を調べる。

・国際共同研究の立上げ・ネットワークの構築

上述した研究内容・研究結果を得るために研究室内のみならず、ベルギー内の他の研究室（特に数理・生物システムやバイオインフォマティクス）との交流があった。結局大きな学会には参加する機会は無かったが、ULB でいくつかの小さな学会レベルのミーティングがあり、それらに参加する機会があった。また、毎週トップジャーナルで成果を出し続けている第一線の研究者の発表があり、非常にいい刺激と勉強となった。残念ながら今後京都大学に残らないため、国際共同研究の計画を持つことはできなかったが、留学を通じて得られた人脈やネットワークは、次の名古屋大学での国際連携室での研究で確実に大きなメリットとなると思われる。

京都大学若手人材海外派遣事業 ジョン万プログラム 研究者派遣プログラム

・国際共著論文の投稿・発表等の状況、国際学会等での発表状況 [予定を含む]

上記研究は Nature 投稿に至り、そのリバイスに多くの時間を費やすこととなった。現在は、Nature Cell Biology へ投稿、再度リバイス中である。

Early lineage segregation of multipotent embryonic mammary gland progenitors.

Aline Wuidart, Alejandro Sifrim, Shigeru Matsumura, Marco Fioramonti, Audrey Brisebarre, Daniel Brown, Alessia Centonze, Anne Dannau, Christine Dubois, Alexandra Van Keymeulen, Thierry Voet, Cédric Blanpain (NCB 投稿中)

・在外研究経験によって習得した能力等

渡航者は、これまで培養細胞を用いた蛍光ライブイメージングの研究を中心に行ってきた。しかし、培養細胞と生体内での細胞の挙動には大きな差異があり、マウスを用いた生体研究へと発展させたいという願望を持っていた。マウスは透明ではないため、

ライブイメージングには限界があり、それを克服する技術として細胞系譜追跡があった。そこで、細胞系譜追跡で世界最先端の技術を持つ受け入れ研究室を選んだ。受け入れ研究室では大量のマウスラインを維持、研究に用いており、システムティックに管理していた。また、望む遺伝的組み合わせのマウスを得るには時間がかかるため、漫然と進めるのではなく、事前の研究目的・戦略のディスカッションの具体性がとても大事であり、そのレベルの高さにとても感銘を受けた。また同様に教授の情報収集能力も群を抜いて高かった。アメリカ、欧州の学会に日々でかけ、トップジャーナルの編集者と話、研究の方向性を見誤らないように気を付けていた。また、研究室には多くのテクニシャンがおりプロジェクト毎に配置され、日々のルーチン実験だけでなく、多くの実験をハイレベルでこなしていた。ポスドクは、実験結果の解析や整理に集中するシステムであった。また多くのテーマが2人でタッグを組み一つのテーマを進めていた。すべてがチーム戦であり、トップジャーナルへ掲載させるのに必要とされる仕事量をこなす術を持っていた。一方で、研究室には30人以上の人間がおり、研究室全体でのミーティングで共通理解と研究の方針検討や考え方を学ぶ場となっていた。渡航者の日本での研究経験とはかけ離れた研究システムに感銘と衝撃を受けた。マウスを主体とした研究技術の習得に加えて、研究室運営、研究推進体制、方法等多くの経験を得ることができた。

・在外研究経験を活かした今後の展開

残念ながら今後京都大学に残らないため、国際共同研究の計画を持つことはできなかったが、留学を通じて得られた人脈やネットワークは、次の研究で確実に大きなメリットとなると思われる。名古屋大学では、マウスを用いた癌治療研究に携わるが、癌治療における細胞系譜追跡を行う予定であり、留学で得られたすべてが役に立つと考えられる。

京都大学若手人材海外派遣事業 ジョン万プログラム
研究者派遣プログラム

英文成果報告書

○申請者情報

部 局 名 : Institute for Frontier Life and Medical Science

職 名 : Assistant professor

氏 名 : Shigeru Matsumura

研究課題名 : Regulation of cell division axis in stem cells for mammary gland development

渡 航 期 間 : 2016.2.24-2017.12.14 (659 days)

○渡航先情報

国 名 : Belgium

研究機関名 : Université Libre de Bruxelles (ULB)

研究室名等 : Laboratory of Stem Cells and Cancer

受入研究者名 : Professor Cédric Blanpain

○渡航報告

First of all, I really appreciate the sponsorship of the Jong Mung Program to have the great opportunity to learn and expand my research skill in Belgium. I visited Laboratory of Stem Cells and Cancer in Université Libre de Bruxelles (ULB) in Brussels for about 1 year and 10 months. Dr. Cédric Blanpain, my host researcher, is one of the leading researchers in the lineage tracing field, including stem cells and cancer stem cells. I joined to the breast team who are digging into the origin of stem cells in mammary gland and breast cancer. Soon after I joined the lab, the terrorism occurred in the metro and airport of Brussels. The metro was the one I was using and I was luckily not there. But the atmosphere surrounding Brussels went so down and everywhere were strictly guarded by the army with a machine gun. Ironically, this was one of the most impressive experiences during my stay. I also joined the lab retreat for the 10th anniversary of laboratory. We went to south France and enjoyed the interaction among lab members (photo).



In my lab, we use many lines of mice having Cre recombinase which is driven by certain gene specific promoter and mice having fluorescent protein with floxed stop codon. To take care and use living mice, I had to join the online experimental animal course to have the precise knowledge to take care of animals and reduce pain of them. After passing the exam, I was officially able to use them.

I mainly studied “Early lineage segregation of multipotent embryonic mammary gland progenitors”. We first examine whether mammary gland (MG) comes from early multipotent progenitors or from a mixture of different lineage restricted progenitors. To this aim, we did clonal analysis using lineage tracing experiments at the early embryonic stages of MG development. We crossed mice and generated K14rtTA/TetO-Cre/Rosa-Confetti mice and titrated the dose of doxycycline that lead to a clonal labelling of the MG. I mainly did this analysis by using whole mount staining method and confocal

京都大学若手人材海外派遣事業 ジョン万プログラム
研究者派遣プログラム

microscopy. It took a long time to get a conclusion. Finally, we conclude that in the early embryonic stages, there are multi potent progenitors and these progenitors are gradually restricted their cell fate and completely restricted just after birth. My colleague had done the microarray analysis of early MG before my coming. To confirm the results of microarray analysis, we chose several genes which seem to be interesting and tried to do staining by antibodies. Before getting the license of experimental animal, I mainly did these stainings and this lasts to the end of my stay.

I also had a project to identify proliferative stem cell populations and contribution of ductal morphology during puberty. I tried to launch the project by using Ki67 promoter mice (Ki67 is a marker gene for proliferative status of cells). I examined the dose of clonal analysis and also for FACS analysis. Unfortunately, I shortened my stay and I was not able to join to the main analysis after launch. However, I learned a series of techniques and way of thinking by this project.

Although I was not able to have an opportunity to join the international meeting, there were weekly meetings inviting a famous top researcher in each time and I had many great stimulations by them. It was a happy time to hear the discussions and learn the way of thinking of top scientists.

In the last, all the experiences I had and all the time shared with lab members are really precious for me. It is no doubt that it was special not only for my study but also my life. I would like to thank the sponsorship of the Jong Mung Program again for giving me this great opportunity.