

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 実施状況報告書(平成 23 年度)

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	1細胞分析法が拓く受精卵および幹細胞の新規品質評価システムの開発
研究機関・ 部局・職名	東北大学・大学院環境科学研究科・准教授
氏名	珠玖 仁

1. 当該年度の研究目的

本研究では、これまで我々が開発してきた1細胞分析システムを、受精卵および幹細胞の品質評価に応用する。①細胞塊から1細胞を回収するプローブの開発②回収後並列・多項目分析を可能にするシステムの開発③システムのハイスループット化・自動化④1細胞エピジェネティクスの4つの小課題ごとに研究を推進する。平成 23 年度の研究目的は以下のとおりである。

- I. マウス ES 細胞から胚様体 EB を作製し、呼吸活性と遺伝子発現の相関を調査する。(①)
- II. 液滴流路デバイスにより核酸、タンパク質の定量を行う。プライマーの設計により複数種類の mRNA とタンパク質の定量を実施する(②)
- III. 新規細胞回収プローブ、多項目並列分析システムを連結し、ハイスループットな1細胞分析システムを構築する(③)
- IV. セルソーターやデジタルPCRに接続するインターフェースを開発する。(③)
- V. ラット臍島のモデルとなる培養細胞系を用いて、3次元培養を行い細胞塊(スフェロイド)を作製し、エピゲノム、遺伝子、タンパク質、代謝の階層横断的分析を行う。

2. 研究の実施状況

- I. 胚性幹細胞(ES 細胞: *embryonic stem cells*)は創薬研究や再生医療への応用が注目されている。ES 細胞を目的細胞に分化誘導する際、まず ES 細胞の集合体である胚様体(EB: *embryoid body*)を形成させる手法が多く用いられており、分化誘導効率化の観点から EB の機能解析は重要である。EB の培養日数による遺伝子発現変化を調べた。呼吸活性が増加するほど未分化マーカー遺伝子の発現は減少するが、中胚葉系である心筋マーカー遺伝子の発現は増加した。EB の呼吸活性と遺伝子発現には相関性が見られ、また呼吸活性が未分化・分化の指標となる可能性が示唆された。
- II. 液滴中に分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)を発現するヒト子宮頸癌細胞 HeLa(SEAP-HeLa)を1細胞レベルで隔離するデバイスを作製した。Fluidigm社のBioMarkシステムにより1度の測定で48遺伝子、48 サンプル、2,304 アッセイを同時に行うハイスループット定量 PCR(qPCR)により、マウス受精卵、マウス ES 細胞の遺伝子発現解析を行った。
- III&VI. 三次元組織モデル中の1細胞回収・解析システムの開発に取り組んだ。2台のマニピュレーター各々に電極探針を搭載し、2探針系のマイクロシステムを検討した。プローブとしてシータ(θ)型2チャンネルガラスキャピラリを採用し、1本の探針に2つの電極が集積化された DBCNP (double barrel carbon nanoprobe) を開発した。MCF-7 細胞塊に探針を近接させの電圧パルスを印加した。細胞の破碎を確認した後、周辺の溶液とともに細胞破碎液を回収し、RT-qPCR により1細胞中に含まれる mRNA を定量した。現在 Fluidigm 社の集積化マイクロ流路デバイスと連結し、48 遺伝子の並列定量解析を検討している。
- V. マウス臍島細胞(東北大学 後藤昌史教授と共同研究: 先進外科学分野)のハイスループット遺伝子発現解析を実施した。HL60 の分化過程をモデルとして、ハイスループット遺伝子発現解析とクロマチン免疫沈降法(ChIP)を検討した。高性能 FACS(MoFlo XDP)とハイスループット遺伝子発現解析法を組合せ1細胞遺伝子定量解析を検討した。

様式19 別紙1

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 15 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 9 件</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ Y. Takahashi, T. Miyamoto, H. Shiku, K. Ino, T. Yasukawa, R. Asano, I. Kumagai, T. Matsue, Electrochemical Detection of Receptor-Mediated Endocytosis by Scanning Electrochemical Microscopy. <i>Phys. Chem. Chem. Phys.</i> 13, 16569-16573 (2011) ・ Y. Takahashi, A. I. Shevchuk, P. Novak, Y. Zhang, E. Neil, J. V. Macpherson, P. R. Unwin, A. Pollard D. Roy, C. A. Clifford, H. Shiku, T. Matsue, D. Klenerman, Y. E. Korchev, Fabrication of the Double-Barrel Carbon SECM-SICM Nanoprobe for Simultaneous nanoscale Electrochemical and Topographical Imaging. <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> 2011. ・ Y. Date, S. Takano, H. Shiku, K. Ino, T. Ito-Sasaki, M. Yokoo, H. Abe, T. Matsue, Monitoring oxygen consumption of single mouse embryos using an integrated electrochemical microdevice. <i>Biosens. Bioelectron.</i> 30, 100-106 (2011). ・ X. Zhu, K. Ino, Z. Lin, H. Shiku, G. Chen, T. Matsue, Amperometric detection of DNA Hybridization using a multi-point, addressable electrochemical device, <i>Sens. Actuat B</i>, 160 (1), 923-928 2011. ・ M. Takeda, H. Shiku, K. Ino, T. Matsue, Electrochemical Chip Integrating Scalable Ring-Ring Electrode Array to Detect Secreted Alkaline Phosphatase. <i>Analyst</i>, 136 (23), 4991 – 4996 (2011). ・ M. Koide, T. Yasukawa, Y. Horiguchi, K. Nagamine, H. Shiku, T. Matsue, T. Itayama, Microfluidic devices for electrochemical measurement of photosynthetic activity of cyanobacteria <i>microcystis</i> cells, <i>Analytical Sciences</i>, 28, 69-72 (2012). ・ Y. Hirano, T. Yasukawa, Y. Mase, D. Oyamatsu, H. Shiku, F. Mizutani, T. Matsue, Improvement of detectable sensitivity for enzyme reaction by scanning electrochemical microscopy with distance control system for immunosensing. <i>Electrochemistry</i> 80, 30-32 (2012). ・ Y. Date, S. Terakado, K. Sasaki, A. Aota, N. Matsumoto, H. Shiku, K. Ino, Y. Watanabe, T. Matsue, N. Ohmura, Microfluidic heavy metal immunoassay based on absorbance measurement. <i>Biosens. Bioelectron.</i> 33(1):106-112 (2012). ・ R. Obregon, Y. Horiguchi, T. Arai, S. Abe, Y. Zhou, R. Takahashi, A. Hisada, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue. A Pt layer/ Pt disk microelectrode configuration to evaluate respiration and alkaline phosphatase activities of mouse embryoid bodies, <i>Talanta</i>, 94, 30-35 (2012) <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載一査読有り) 計 6 件</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ M. ŞEN, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, A New Electrochemical Assay Method for Gene Expression Using HeLa Cells with a Secreted Alkaline Phosphatase (SEAP) Reporter System. <i>Biotechnol. Bioeng.</i> Accepted. doi: 10.1002/bit.24461 (2012). ・ M. Yamamoto, T. Yasukawa, M. Suzuki, S. Kosuge, H. Shiku, T. Matsue, F. Mizutani, Patterning with particles using three-dimensional interdigitated array electrodes with negative dielectrophoresis and its application to simple immunosensing. <i>Electrochimica Acta</i> Accepted. doi:10.1016/j.electacta.2012.02.109 (2012) ・ Y. Takahashi, A. I. Shevchuk, P. Novak, B. Babakinejad, J. V. Macpherson, P. R. Unwin, H. Shiku, J. Geolick, D. Klenerman, Y. E. Korchev, T. Matsue. Topographical and Electrochemical Nanoscale Imaging of Living Cells using Voltage Switching Mode Scanning Electrochemical Microscopy. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> Accepted. doi: 10.1073/pnas.1203570109 (2012). ・ K. Ino, T. Nishijo, T. Arai, Y. Kanno, Y. Takahashi, H. Shiku, T. Matsue, Local redox cycling-based electrochemical chip device with deep microwells for evaluation of embryoid bodies. <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> Accepted. doi: 10.1002 / anie. 201201602 (2012). ・ J. Ramón-Azcón, S. Ahadian, R. Obregon, G. Camci-Unal, S. Ostrovidov, V. Hosseini, H. Kaji, K. Ino, H. Shiku, A. Khademhosseini, T. Matsue. Gelatin methacrylate as a promising hydrogel to establish 3D microscale organization and proliferation of dielectrophoretic patterned cells. <i>Lab Chip</i>, (2012). Accepted. doi:10.1039/C2LC40213K ・ S. H. Lee, H. J. Lee, H. Shiku, T. Yao, T. Matsue, A Facile Method for Patterned Growth of ZnO Nanowires Using a Black Ink. <i>Electronic Materials Letters</i>, Accepted. (2012).
<p>会議発表 計 7 件</p>	<p>専門家向け 計 7 件</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 珠玖 仁、伊藤 小町、松前 義治、伊野 浩介、末永 智一²、山田 弘. PDMS基板上で培養した細胞の呼吸活性と酸素透過性の評価. <i>2011 年電気化学秋季大会</i>, 2011 年 9 月 9 日. ・ H. Shiku, J. Suzuki, K. Ino, T. Matsue, Electrochemical Gene Expression Analysis on Single-Cell Array Devices, <i>ISE Conference Management of the 62nd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Niigata, Toki-Messe</i>, September 15, 2011. ・ H. Shiku, K. Ino, T. Matsue, Electrical cell lysis technique to collect mRNA from single-cells, <i>the 220th ECS Meeting & Electrochemical Energy Summit in Boston, Massachusetts</i>, October 9-14, 2011. ・ H. Shiku, G. Saito, Y. Zhou, Y. Horiguchi, R. Takano, K. Ino, T. Matsue. mRNA analysis of multicellular spheroid with a scanning probe microscopy system, <i>Proceeding of The 7th International Forum On Post-Genome Technologies and China-Japan-Korea Joint Symposium on Natural Products" (7IFPT-CJK)</i>, pp. 343-344. Chongqing, China, October 28-29, 2011. ・ 珠玖 仁, マウス胚様体の遺伝子発現と代謝活性の階層的評価. <i>第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム</i>,

様式19 別紙1

	<p>Yokohama, Dec. 19, 2011.</p> <p>・珠玖 仁, (依頼講演)CNTを含む多機能ナノ探針による細胞操作と細胞解析. 第2回プラズマプロセスナノカーボンのバイオ医療応用研究会, 東北大学大学院工学研究科青葉記念会館, 仙台 2012. 01. 20.</p> <p>・珠玖 仁, 新井 俊陽, 周 縁殊, 西條 拓, 堀口 佳子, 伊野 浩介, 末永 智一. マウス ES 細胞分化過程における呼吸活性と網羅的遺伝子解析の照合. 電気化学会第79回大会.アクトシティ浜松.2012 年 3 月 29 日</p> <p>一般向け 計 0 件</p>
<p>図書</p> <p>計1件</p>	<p>・珠玖 仁, 末永智一, 電気化学ナノイメージング、(第4章3節PP.156-162 (7ページ)), in監修 民谷栄一, “ナノ融合による先進バイオデバイス”, シーエムシー出版, 東京 2011年11月30日発行</p>
<p>産業財産権 出願・取得状 況</p> <p>計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>なし</p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>①オープンキャンパスでの研究見学会、東北大学青葉山キャンパス、7/27,28、一般対象、50名程度、当該研究課題を含めた研究室の紹介。②片平祭りでの研究見学会、東北大学片平キャンパス、10/8,9、一般対象、50名程度、当該研究課題を含めた研究施設の紹介と研究材料の展示。③高校生の実習、東北大学青葉山キャンパス、8/20,27, 9/17,24、高校生対象3名、細胞塊から遺伝子の抽出方法と逆転写リアルタイムPCRの実習。</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載</p> <p>計0件</p>	
<p>その他</p>	<p>なし</p>

4. その他特記事項

なし

実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	120,000,000	76,100,000	0	43,900,000	0
間接経費	36,000,000	22,830,000	0	13,170,000	0
合計	156,000,000	98,930,000	0	57,070,000	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	75,843,210	0	0	75,843,210	75,843,210	0	0
間接経費	22,740,000	0	0	22,740,000	22,740,000	0	0
合計	98,583,210	0	0	98,583,210	98,583,210	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	72,847,812	実験用消耗品
旅費	712,058	研究成果発表旅費ほか
謝金・人件費等	1,179,653	実験補助謝金ほか
その他	1,103,687	機器修理、学会参加費、英文校正、輸送費用
直接経費計	75,843,210	
間接経費計	22,740,000	
合計	98,583,210	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
単一細胞システム	ナノスケール遺伝子解析 システム・高速型自動細 胞解析分取装置	1	63,682,500	63,682,500	2011/6/29	東北大学
Piezo Nano Positioning system	25 μmCapセン サー搭載タイプ	1	2,152,500	2,152,500	2011/9/7	東北大学
共焦点顕微鏡シス テム用488nmレーザー ユニット	LZ488-KSP1	1	1,832,670	1,832,670	2011/9/2	東北大学