

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 24 年度)

本様式の内容は一般に公表されません

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 24 年度の研究目的は以下のとおりである。

I. 電場破碎プローブ、流体プローブを細胞塊の1細胞分析に適用し、個々のサンプルから48種類の遺伝子定量を並列で行う(テーマ①②); II. 精密位置決めマニピュレータシステムを自作の走査型プローブ顕微鏡システムに搭載し、さらに本研究で開発した1細胞分析システムを組み込む。イオンコンダクタンス顕微鏡による生細胞のイメージングに取り組む(テーマ②③); III. マウス受精卵、マウス胚様体、およびマウス臍島を用いて、細胞塊のサイズ、呼吸活性と遺伝子発現の相関を調査する(テーマ③④); IV. ChIP (免疫クロマチン沈降法) 工程のさらなる改善に取り組む。組織モデルの機能解析を試みる(テーマ④)。

2. 研究の実施状況

I マウス ES 細胞から分化誘導して作成した心筋様組織に対し、昨年度開発した DBCNP (double barrel carbon nanoprobe)により電場破碎法で細胞を回収した。拍動領域および非拍動領域の心筋マーカー遺伝子の発現量に有意な差が認められた。血管形成組織様モデルに対し同様の遺伝子発現解析を行った(Nasimoto et al. International Joint Symposium on Single-Cell Analysis 2012)。mRNA 回収に使用していた流体プローブでタンパク質の回収・電気化学検出に成功した(阿部ら, 日本分析化学会第 61 年会)。液滴に隔離した1細胞由来の応答(アルカリホスファターゼ)の検出に成功し、結果が Anal.Chem.に掲載された。

II 未分化マーカーであるアルカリホスファターゼ(ALP)活性に基づき単一 ES 細胞の電気化学イメージングに成功した。ES 細胞由来の分化誘導細胞を同様に評価したところ ALP 活性が著しく低下していることが確認できた。さらに未分化マーカー遺伝子 Oct-3/4 の mRNA を1細胞ごとに定量して未分化/分化状態を評価した(松前ら, 電気化学会創立 80 周年記念大会 2013)。昨年度に引き続き DBCNP を用いて形状と電気化学の同時イメージングを検討した。

III マウス ES 細胞から作成した胚様体に対し、FACS-セルソーターを用いて培養 3 日および 8 日目に中胚葉マーカーFlk1 陽性細胞をソーティングし網羅的遺伝子発現解析を行った。Flk1 陽性細胞のみで形成した中胚葉スフェアは、通常の胚様体と比べ中胚葉以外の分化マーカーの発現が著しく低く、呼吸活性が高いことが分かった。また Flk1 発現の時期が異なると分化の方向が異なることも確認できた(Zhou et al. CiRA International Symposium 2013)。昨年度に引き続き胚様体の無侵襲的呼吸活性および ALP 活性測定が未分化・分化状態の指標となる可能性について検討した。東北大学後藤昌史教授の協力を得て、臍島サンプル(マウス)の遺伝子解析の結果が PLoS One に掲載された。乳癌細胞スフェロイドの遺伝子解析結果が Anal. Biochem.に受理された。走査プローブ顕微鏡の自動化に関しハードウェアの性能向上を達成した(PNAS2012)。

IV 昨年度に引き続き、抗体固定化磁気ビーズを利用した ChIP (免疫クロマチン沈降法) を検討した。階層横断的多項目分析の一環として、microRNA の1細胞定量に成功した(未発表)。

様式19 別紙1

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 18 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 16 件</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ R. Nishimura, S. Nishioka, I. Fujisawa, H. Shiku, M. Shimada, S. Sekiguchi, K. Fujimori, A. Ushiyama, T. Matsue, S. Satomi, M. Goto. Tacrolimus inhibits the revascularization of isolated pancreatic islets. <i>PLoS One</i>, 8(4):e56799 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0056799 ・ K. Ino, K. Ono, T. Arai, Y. Takahashi, H. Shiku, T. Matsue, Carbon-Ag/AgCl probes for detection of cell activity in droplets. <i>Anal. Chem.</i> 85 (8), 3832–3835(2013). ・ S. Ahadian, J. Ramón-Azcón, S. Ostrovidov, G. Camci-Unal, H. Kaji, K. Ino, H. Shiku, A. Khademhosseini, T. Matsue, A contactless electrical stimulator: Application to fabricate functional skeletal muscle tissue. <i>Biomedical Microdevices</i>, 15(1)109-115 (2013). ・ F. Ozawa, K. Ino, Y. Takahashi, H. Shiku, T. Matsue, Electrodeposition of alginate gels for construction of vascular-like structures. <i>Journal of Bioscience and Bioengineering</i>, 115 (4), 459-461 (2013). ・ 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> 109 (29), 11540-11545 (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> 51(27), 6648-6652 (2012). ・ J. Ramón-Azcón, S. Ahadian, R. Obregón, 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> 12, 2959-2969 (2012). ・ S. Ahadian, J. Ramón-Azcón, S. Ostrovidov, G. Camci-Unal, V. Hosseini, H. Kaji, K. Ino, H. Shiku, A. Khademhosseini, T. Matsue. Interdigitated array of Pt electrodes for electrical stimulation and engineering of aligned muscle tissue. <i>Lab Chip</i> 12, 3491-3503 (2012). ・ M. Şen, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, Concentration and detection of secreted proteins from single cells for reporter gene assays using a local redox cycling-based electrochemical (LRC-EC) chip device. <i>Lab Chip</i> 12, 4328-4335 (2012). ・ K. Ino, Y. Kanno, T. Arai, K. Y. Inoue, Y. Takahashi, H. Shiku, T. Matsue, A novel electrochemical methodology for activity estimation of alkaline phosphatase based on solubility difference. <i>Anal. Chem.</i> 84, 7593-7598 (2012). ・ K. Ino, Y. Kanno, T. Nishijo, T. Goto, T. Arai, Y. Takahashi, H. Shiku, T. Matsue, Electrochemical detection for dynamic analyses of a redox component in droplets using a local redox cycling-based electrochemical (LRC-EC) chip device. <i>Chem. Commun.</i> 48, 8505-8507 (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). ・ 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> 109 (8), 2163-2167 (2012). ・ R. Obregón, 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). ・ 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>, 82, 35-42 (2012). ・ 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>, 8, 511-518 (2012). <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件 (未掲載一査読有り) 計 2 件</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ M. Şen, K. Ino, K. Y. Inoue, T. Arai, T. Nishijo, A. Suda, R. Kunikata, H. Shiku, T. Matsue. LSI-based amperometric sensor for real-time monitoring of embryoid bodies. <i>Biosens. Bioelectron.</i> (2013). Accepted. Doi: 10.1016/j.bios.2013.03.069 ・ Y. Zhou, T. Arai, Y. Horiguchi, K. Ino, T. Matsue*, H. Shiku*. Multi-parameter analysis of three dimensionally cultured tumor spheroids based on respiration activity and comprehensive gene expression profiles. <i>Anal. Biochem.</i>, (2013). Accepted. Doi: 10.1016/j.ab.2013.04.020
<p>会議発表 計 20 件</p>	<p>専門家向け 計 19 件</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 珠玖 仁, (招待講演)電気化学マイクロデバイスによる単一細胞・単一細胞塊の評価.化学工学会 マイクロ化学プロセス分科会 討論・交流会、宮城県松島町ホテル松島大観荘、2012.9.22 ・ 珠玖 仁, (招待講演)細胞内および表面反応の1細胞分析システム. 新学術領域研究「ソフトインターフェースの分子科学」第8回公開シンポジウム、置賜文化ホール、米沢市、2012.7.26 ・ H. Shiku, (招待講演)“Multi-parameter analysis based on scanning probes and microfluidic qPCR”, Sendai Symposium on Analytical Sciences 2012, WPI-AIMR Building, Tohoku University, Sendai, Nov 9-10, 2012. ・ H. Shiku, K. Ino, T. Nishijo, T. Arai, Y. Zhou, Y. Takahashi, T. Matsue, Electrochemical imaging device to characterize developmental potential of mouse embryo bodies. C-7-25-010, IUMRS-ICEM 2012, Pacifico Yokohama, Sept. 23-28, 2012. ・ H. Shiku, Y. Takahashi, R. Takano, I. Fujisawa, J. R-Azcon, K. Y. Inoue, Y. Horiguchi, Y. Nashimoto, K. Ino, T. Matsue, Single-cell analysis combined with scanning ionconductance microscopy system. D-1-P26-026, IUMRS-ICEM 2012, Pacifico Yokohama, Sept. 23-28, 2012. ・ 阿部志保美, 伊野浩介, 珠玖仁, 末永智一.微小流体プロープによる細胞回収及び電気化学的細胞活性評価.C2002, 日本分析化学会第61年会, 金沢大学角間キャンパス, 2012.9.19-21 ・ Yuanshu Zhou, Toshiharu Arai, Yoshiko Horiguchi, Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Multi-parameter analysis of spheroids

様式19 別紙1

	<p>cultured by different 3D environment, Sendai symposium on analytical sciences 2012, WPI-AIMR Building, Tohoku University, Sendai, Nov 9-10, 2012.</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Yuji Nashimoto, Ryosuke Takano, K. Miyashita, Y. Takahashi, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, Evaluation of single-cell function in tissue model using double barrel carbone probe. Sendai symposium on analytical sciences 2012, WPI-AIMR Building, Tohoku University, Sendai, Nov 9-10, 2012. ・H. Shiku, T. Arai, Y. Zhou, T. Nishijo, K. Ino, T. Matsue, Multi-parameter analysis of mouse embryoid body based on respiration and gene expression profiling. International Joint Symposium on Single-Cell Analysis. Kyoto Research Park Building No.1 Science Hall, Nov. 27-28, 2012. ・Y. Nashimoto, R. Takano, K. Miyashita, Y. Takahashi, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, Collection and quantification of messenger RNA in single cell by double barrel carbon probe. International Joint Symposium on Single-Cell Analysis. Kyoto Research Park Building No.1 Science Hall, Nov. 27-28, 2012. ・J. Ramon-Azcon, S. Ahadian, R. Obregon, G. Camci-Unal, S. Ostrovidov, V. Hosseini, K. Ino, H. Shiku, A. Khademhosseini, T. Matsue, Toward functional engineered tissues as bioactuators using dielectrophoretic technique. International Joint Symposium on Single-Cell Analysis. Kyoto Research Park Building No.1 Science Hall, Nov. 27-28, 2012. ・Yuanshu Zhou, Toshiharu Arai, Yoshiko Horiguchi, Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Metabolism feature of multicellular tumor spheroids assessed by a comprehensive system, Pacific Rim Meeting on electrochemical and solid-state science 2012, Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii. Oct 7-12, 2012. ・H. Shiku. Scanning electrochemical microscopy and other electrochemical imaging device to characterize mouse embryo bodies. 7th workshop on Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) and Related Techniques. Kibbutz Ein Gedi Country Hotel, Ein Gedi, Israel on February 17-21, 2013. ・Yoshiharu Matsumae, Yasufumi Takahashi, Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Taku Nishijo, Toshiharu Arai, Tomokazu Matsue. Electrochemical Evaluation of Differentiation State of a Single Embryonic Stem cell by SECM. 7th workshop on Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) and Related Techniques. Kibbutz Ein Gedi Country Hotel, Ein Gedi, Israel on February 17-21, 2013. ・Yuanshu Zhou, Toshiharu Arai, Shukuyo Yamada, Ikuma Fujisawa, Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue. Sorting, culture and functional evaluation of mouse mesodermal embryoid bodies. <u>CiRA international symposium 2013</u>, Kyoto University clock tower, Japan, Mar 11-12, 2013. ・周縁殊, 新井俊陽, 山田淑代, 藤澤生磨, 伊野浩介, 珠玖仁, 末永智一, 中胚葉系マウス胚様体の分選・培養及び機能評価, 電気化学会創立 80 周年記念大会, 東北大学川内キャンパス, 2013.03.29-31. ・藤澤生磨, 周縁殊, 伊野浩介, 珠玖仁, 末永智一, 前骨髄性白血病細胞における単一細胞の網羅的遺伝子解析, 電気化学会創立 80 周年記念大会, 東北大学川内キャンパス, 2013.03.29-31. ・松前義治, 高橋康史, 新井俊陽, 珠玖仁, 伊野浩介, 末永智一, 走査型電気化学顕微鏡による単一 ES 細胞の未分化状態評価, 電気化学会創立 80 周年記念大会, 東北大学川内キャンパス, 2013.03.29-31. ・新井俊陽, 西條拓, 周縁殊, 伊野浩介, 珠玖仁, 末永智一, SECM を用いた ES 細胞胚様体におけるアルカリホスファターゼ活性の測定と評価, 電気化学会創立 80 周年記念大会, 東北大学川内キャンパス, 2013.03.29-31. <p>一般向け 計 1 件</p> <ul style="list-style-type: none"> ・珠玖仁, (招待講演) (一般公開) 受精卵・幹細胞の品質評価に資する 1 細胞分析システム. 平成 24 年度産学官フォーラム講演会 in 名古屋「バイオセンシングの現状と今後の課題」、名古屋大学 ES 総合会館 ES ホール, 2012. 7. 14.
図書 計0件	
産業財産権 出願・取得状況 計0件	(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件
Webページ (URL)	
国民との科 学・技術対話 の実施状況	<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、7/30,31、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高校生の実習、東北大学青葉山キャンパス、9/8~10/27、高校生対象 4 名、ES細胞を含む動物細胞のパターン培養の実習。③平成 24 年度産学官フォーラム講演会 in 名古屋「バイオセンシングの現状と今後の課題」、名古屋大学 ES 総合会館 ES ホール, 2012. 7. 14. 参加者数: 62 人; 内容: 生物機能の理解につながる革新的なバイオセンシングツール・バイオデバイスの開発に関する研究紹介の演者の一人として参加(主催: 電気化学会, 世話人: 大河内美奈(名古屋大)(次世代最先端研究代表)^(ほか))</p>
新聞・一般雑 誌等掲載 計0件	
その他	

4. その他特記事項

なし

実施状況報告書(平成24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	22,000,000	21,900,000	0
間接経費	36,000,000	22,830,000	6,600,000	6,570,000	0
合計	156,000,000	98,930,000	28,600,000	28,470,000	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	0	22,000,000	0	22,000,000	22,000,000	0	0
間接経費	0	6,600,000	0	6,600,000	6,600,000	0	0
合計	0	28,600,000	0	28,600,000	28,600,000	0	0

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	16,384,212	バイオクリーンベンチ,マイクロ天秤,実験試薬,窒素ガス等
旅費	1,039,850	研究成果発表旅費(SECM)等
謝金・人件費等	4,003,587	研究支援者人件費 学生アルバイト等
その他	572,351	学会参加費, 英文校正費等
直接経費計	22,000,000	
間接経費計	6,600,000	
合計	28,600,000	

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
バイオクリーンベンチ	㈱アステック製・AH-130	1	971,250	971,250	2012/10/3	東北大学
マイクロ天秤	メトラー・トレード㈱製・XP6V	1	1,499,400	1,499,400	2012/10/25	東北大学
A2フラットカッティングプロッタ	グラフテック㈱製・FC4500-50	1	1,050,000	1,050,000	2012/11/21	東北大学