

## 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) 実績報告書

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. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	120,000,000	120,000,000	0	120,000,000	120,000,000	0	0
間接経費	36,000,000	36,000,000	0	36,000,000	36,000,000	0	0
合計	156,000,000	156,000,000	0	156,000,000	156,000,000	0	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	250,490	72,847,812	16,384,212	14,199,000	103,681,514
旅費	0	712,058	1,039,850	1,253,009	3,004,917
謝金・人件費等	0	1,179,653	4,003,587	5,709,552	10,892,792
その他	6,300	1,103,687	572,351	738,439	2,420,777
直接経費計	256,790	75,843,210	22,000,000	21,900,000	120,000,000
間接経費計	90,000	22,740,000	6,600,000	6,570,000	36,000,000
合計	346,790	98,583,210	28,600,000	28,470,000	156,000,000

4. 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
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
Piezo Nano Positioning system	25μmCapセ ンサー搭載タ イプ	1	2,152,500	2,152,500	2011/9/7	東北大学
バイオクリーンベンチ	(株)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 ド(株)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 (株)製・FC4500- 50	1	1,050,000	1,050,000	2012/11/21	東北大学
冷却式モノクロカメラ	ライカマイクロ システム(株)製 DFC365FXキッ ト	1	1,470,000	1,470,000	2013/8/21	東北大学
スタンダード実体顕微鏡	(独)CarlZeiss 社製 Stemi2000	1	535,500	535,500	2013/12/3	東北大学
48.48ダイナミックアレイ10枚 キット	DNA Binding Dye用[10枚]	2	325,920	651,840	2013/12/12	東北大学

5. 研究成果の概要

細胞塊から1細胞を回収するプローブの開発: 2つの電極が集積化されたDBCP (double barrel carbon probe) を開発した。胚性幹細胞(ES)細胞から分化誘導して作製した心筋様組織に対し、電場破砕法で細胞を回収した。拍動領域と非拍動領域では心筋マーカ発現量に差が認められた。未分化マーカであるアルカリホスファターゼ活性の単一ES細胞イメージングに成功した。システムの自動化と組織モデルの網羅的機能解析: ES細胞の集合体である胚様体(EB)の呼吸活性と網羅的遺伝子発現の間に相関がみられた。膵島、癌細胞塊やマウス受精卵の解析も行った。これらの細胞回収・解析システムは再生医療や移植医療の現場で役立つ。

課題番号	LR005
------	-------

## 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) 研究成果報告書

本様式の内容は一般に公表されます
------------------

研究課題名 (下段英語表記)	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
	New instrument system to evaluate mammalian embryos and stem cells based on single-cell analysis
研究機関・部局・ 職名 (下段英語表記)	東北大学・大学院環境科学研究科・准教授
	Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University, Associate Professor
氏名 (下段英語表記)	珠玖 仁
	Hitoshi Shiku

### 研究成果の概要

(和文):本課題では、1細胞レベルで受精卵や胚性幹(ES)細胞の階層横断的機能解析を可能とする分析システムの開発を行った。電極集積化探針を開発し、走査型プローブ顕微鏡システムと連結した。ES細胞から作製した心筋様組織に対し、電場破碎法で細胞を回収した。拍動領域と非拍動領域では心筋マーカー発現量に差が認められた。未分化マーカーであるアルカリホスファターゼ活性の単一ES細胞イメージングに成功した。胚様体に対して階層の異なる機能(呼吸活性と遺伝子発現)を比較し、両者に相関を見出した。豚島、癌細胞塊やマウス受精卵の解析も行った。これらの細胞回収・解析システムは再生医療や移植医療の現場で役立つ。

(英文):We developed a platform for comprehensive single-cell gene-expression analysis and other omic spaces of early embryos, embryonic stem (ES) cells, and other cellular aggregates based on scanning probe microscopy (SMP). We prepared a double barrel carbon probe to electrically lyse single cells and collect mRNA. The cells were collected from the beating or non-beating areas of the ES-derived myocardium. The expression level of the myocardium marker Actc-1 at the beating area was significantly higher than that at non-beating area. The probe was also applied for high-resolution multi-functional SPM imaging. Alkaline phosphatase activity of single ES cell was electrochemically quantified. Respiration and comprehensive mRNA analysis of individual embryoid bodies were evaluated based on principal component analysis. Our analytical tool was widely applied for pancreatic islets, early embryos, and breast cancer spheroids and is possibly going to clarify multi-functional cellular information which contributes to the understanding of the practical fields including cell transplantation and regenerative medicine.

## 様式21

1. 執行金額 156,000,000 円  
(うち、直接経費 120,000,000 円、 間接経費 36,000,000 円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

### 3. 研究目的

少子化・高齢化の問題が大きく取り上げられており、不妊治療を目的とした生殖補助医療技術が急速に進歩をとげている。しかし、不妊治療の成功率は依然として低いのが現状である。本研究では、多機能ナノプローブと精密位置決め装置を組合せたシステムを構築し、1細胞レベルで[遺伝子-タンパク質-代謝]の階層横断的情報統合により、受精卵や幹細胞の複合的品質評価の指標を提供することを目標とする。これまで、受精卵の品質評価は形態観察に基づき行われてきた。申請者は、単一受精卵ごとの呼吸活性を指標とした客観的な受精卵の品質評価法を開発した。我々の特許をもとに「受精卵呼吸測定装置」が装置化・実用化され、ウシ・マウス・ヒトの受精卵移植試験実施に至っている。我々は SECM(走査型電気化学顕微鏡)を駆使して細胞・タンパク質の定量解析を試み、世界最高水準の測定技術を15年以上維持してきた。せん断応力やイオンコンダクタンスに基づく距離制御機構を組み込んだ自作の走査型プローブ顕微鏡(SPM)システムが、サンプルの回収・分析工程の自動化・製品化に大きく貢献することが期待できる。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。これにより、受精卵品質評価の判定精度が向上し、不妊治療や腓島移植・再生医療の基盤となる分子レベルの知見が得られることが期待できる。

### 4. 研究計画・方法

(1) 細胞塊から1細胞を回収するプローブの開発:単層培養細胞系から1細胞を回収する現行のシステムを、受精卵や胚様体(Embryoid body, EB)など細胞塊から1細胞を回収するシステムに進化させるために、新たな多機能プローブを開発する。同軸の2チャンネル流路の片方から油相液体を導入、もう一方を吸引することで、液滴内部にサンプルを回収する。

(2) 回収後並列・多項目分析を可能にするシステムの開発:液滴が等体積で分割される分岐型の流路を設計し、4～8項目の並列分析システムを構築する。

(3) システムのハイスループット化・自動化:ユニバーサルプライマーなど、プライマーの設計で取得遺伝子の数を増やす。デジタルPCRの導入により $10^3$  ウェルの網羅的解析が可能となる。セルソーターの導入により、マーカータンパク質を指標に  $7 \times 10^4$  cells/s のスループットが実現可能となる。

(4) 1細胞エピジェネティクス:DNA やヒストンの修飾(メチル化、アセチル化)状態が、胚発生や分化・リプログラミングのメカニズム解明に欠くべからざる情報となっている。クロマチン免疫沈降法(ChIP)、methylation specific PCR (MSP)を検討し、ビーズを担体とするイムノデバイスの技術を適

用することにより、分析に要する細胞数を減らすことを検討する。

## 5. 研究成果・波及効果

### (1) 細胞塊から1細胞を回収するプローブの開発

①三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( $\theta$ )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電圧パルスを加した。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。マウス胚性幹細胞(ES)細胞から分化誘導して作製した心筋様組織に対し、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について発現量に差が認められた。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(Nashimoto et al, Anal. Bioanal. Chem 2014)。

②ES 細胞から血管様組織への分化誘導を行い、低酸素・通常酸素各々の培養条件で血管分化が顕著な周辺部位と中心の細胞塊部位の局所遺伝子発現解析を行った。その結果、血管マーカー遺伝子の発現が周辺部位で顕著に増加していることが確認できた。

### (2) 回収後並列・多項目分析を可能にするシステムの開発

①イオンコンダクタンス(SICM)プローブと有機溶媒充填プローブを集積化した2チャンネル SICM プローブにより、高解像度の生細胞画像の取得と mRNA 回収・定量が可能となった。これにより、画像取得時の位置情報を反映させた網羅的遺伝子解析を可能とする画像情報・遺伝子発現解析の複合システムへの展開が拓けた。

②有機溶媒充填プローブ側に電位を印可し、油水界面の表面張力を制御することにより、1 pL 以下の水相試料を回収可能であることが示され、回収した核酸試料を PCR により増幅・検出することができた。逆側の水溶液充填側のプローブではイオン電流を信号として高解像度生細胞画像を取得した。類似の2チャンネル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)。当初の計画に記述した「同軸の2チャンネル流路」「液滴分岐型の流路」をそのままの仕様として探針に集積化するには至っていないが、油水界面2チャンネル SICM プローブでは個々の細胞に対し1細胞の容積よりも少量のサンプリングを複数回行えること、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)が検出可能なことから(Ino et al Anal.Chem 2013)、当初の4~8項目の並列分析の性能は本システムで達成できたと考える。

### (3) システムのハイスループット化・自動化

①階層的情報取得の実例として ES 細胞の集合体である胚様体 (EB)サンプル個々の呼吸計測の結果とハイスループット遺伝子発現解析装置 BioMark の結果を主成分解析により関連づけることに成功した。指標となる遺伝子も序列化できた(Shiku et al Mol Biosyst 2013.)。酸素濃度計測に

加えアルカリホスファターゼ(ALP)の電気化学的無侵襲活性評価法の確立した(Arai et al. Anal. Cham. 2014)。ES細胞からの心筋分化誘導系では拍動/非拍動サンプルの判別に関しては酸素濃度計測を上回る予見性が期待できる。

②未分化マーカーであるALPの活性に基づきES細胞1細胞レベルでの電気化学イメージングに成功した。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 (Matsumae et al Chem. Commun. 2013)。1細胞レベルのALP活性を検出できる為、将来移植医療現場で組織試料中に混入する未分化細胞を検知・除去することが可能になると期待できる。

③高性能FACSとハイスループット遺伝子発現解析を組合せた1細胞遺伝子定量解析の系では、nested PCR法を導入し1細胞解析の精度向上が見られた。FACSでソーティングした分化前後のHL60細胞に関し、1細胞遺伝子発現プロファイルの主成分解析から明瞭に2群に分割され、さらに微細なクラスタリング構造を構築していることが確認できた。同様にマウスES細胞の1細胞遺伝子発現プロファイルから分化状態の違いをクラスタリング解析可能であることが確認できた (2014年5月分析化学討論会で発表、2014年中に投稿予定)。胚様体のALP活性評価の効率化を図る電気化学イメージングや効率的培養法について多くの進展があった(K. Ino et al, Electrochem. 2013; K. Ino et al, Lab Chip 2014; M. Sen et al. Biosens. Bioelectron. 2013)。

④マウスES細胞から作成した胚様体に対し、FACSを用いて培養3日から6日目および8日目に中胚葉マーカーFlk1陽性細胞をソーティングし、増殖能、呼吸活性、拍動効率、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。

⑤豚島サンプル(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網羅的遺伝子解析結果がAnal. Biochem.に掲載された。マウス受精卵に対しても網羅的遺伝子発現解析から発生ステージによる遺伝子発現プロファイルの違いを確認した。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(Takahashi et al, PCCP 2011, Takahashi et al, Angew Chem Int Ed 2011, Takahashi et al, PNAS 2012)。

#### (4) 1細胞エピジェネティクス

①エピジェネティクス関連の研究計画としてChIPとMSPを検討したが、既存の感度を超えるまでには至らなかった。具体的には、抗体固定化磁気ビーズを利用したChIPによりHL60で発現する3種類の遺伝子のメチル化領域でのシグナルを検出した。

②階層横断的多項目分析の一環として、申請者の細胞回収技術とmicroRNAの定量法を組み合わせ一定の成功を修めたことにより、mRNA定量解析を補う結果が得られた。進捗に合わせて学会・国際学会でmicroRNA定量に関する研究についても発表した。本研究内で核酸解析の中ではmRNA解析が先に進行し、DNAのメチル化を含む核酸修飾やmicroRNA解析へ技術蓄積を展開することが可能となった。

【波及効果】

・SECM-SICM の高解像度化、高速イメージングをさらに推進し、細胞またはオルガネラ、細胞の一部を回収する機能を搭載した自動画像取得システムの高性能化を目指す。世界最先端の SECM - SICM の性能を最大限に活かすことにより他のグループには見られない回収機能搭載の自動画像取得システムの原型を提示できた。特に PCR は定量性に優れ、特定の1細胞、或は細胞内分の局所にける遺伝子発現分布の解析が可能となる。

・組織や細胞シート・細胞塊などの組織様試料を対象に、プローブ顕微鏡による微細構造の詳細解析、さらに電気化学イメージングによるバイアビリティや分化能の情報と得ると共に、注目部位の細胞や組織の採取と、採取試料の網羅的遺伝子解析を可能とする統合解析システムを提案していく。我々の方法では、呼吸活性、ALP 活性ともに、分化の方向がランダムな分化培養系では分化の方向性を予測するには至っていない。しかし、分化誘導の方向性が狭くなる培養条件(例えば心筋細胞含有率が高割合となる分化誘導条件)に絞り、組織様試料中に含まれる数パーセント以下の未分化細胞を無侵襲的に検出することは現在の技術水準でも十分可能と考える。

・マウス ES 細胞由来の Flk1 陽性細胞(および Flk1 陰性細胞)のみ(100パーセント)で作成した内胚葉スフェアを対象に、細胞塊を再分散した網羅的 1 細胞発現解析と、細胞塊の増殖能・呼吸活性・マーカートンパク質の免疫染色を含む多項目分析の結果が平成 26 年度中には集約できる目途が立っている。

・魅力的な生体試料を持つ研究者各位に優れた解析ツールを提供することで、共同研究を推進することができている。移植医療への応用を志向した細胞塊の評価やハイスループット1細胞アレイと組み合わせた胚性・体性幹細胞の分化過程の追跡・品質評価に活用できる。

## 6. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み－査読有り) 計 39 件
計 39 件	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 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)</li> <li>2. 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> 50, 9638-9642 (2011).</li> <li>3. 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).</li> <li>4. 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.</li> <li>5. 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).</li> <li>6. 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).</li> <li>7. 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).</li> <li>8. 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).</li> <li>9. 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).</li> <li>10. 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).</li> <li>11. 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).</li> <li>12. 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).</li> <li>13. 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).</li> <li>14. 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).</li> <li>15. 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).</li> <li>16. 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).</li> <li>17. 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).</li> <li>18. M. Koide, T. Yasukawa, Y. Horiguchi, K. Nagamine, H. Shiku, T. Matsue, T. Itayama, Microfluidic devices for electrochemical measurement of photosynthetic activity of cyanobacteria microcystis cells, <i>Analytical Sciences</i>, 28, 69-72 (2012).</li> <li>19. 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).</li> <li>20. H. Shiku*, T. Arai, Y. Zhou, N. Aoki, T. Nishijo, Y. Horiguchi, K. Ino, T. Matsue*. Noninvasive measurement of respiratory activity of mouse embryoid bodies and its correlation with mRNA levels of</li> </ol>

	<p>undifferentiation/differentiation markers. <i>Mol. BioSyst.</i>, 9, 2701-2711 (2013).</p> <p>21. Y. Matsumae, T. Arai, Y. Takahashi, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, Evaluation of the Differentiation Status of Single Embryonic Stem Cells by Using Scanning Electrochemical Microscopy. <i>Chem. Commun.</i>, 49(58), 6498-6500(2013).</p> <p>22. T. Arai, T. Nishijo, Y. Matsumae, Y. Zhou, K. Ino, H. Shiku*, T. Matsue*, Noninvasive Measurement of Alkaline Phosphatase Activity in Embryoid Bodies and Coculture Spheroids with Scanning Electrochemical Microscopy. <i>Anal. Chem.</i> 85 (20) 9647-9654 (2013).</p> <p>23. Y. Zhou, T. Arai, Y. Horiguchi, K. Ino, T. Matsue, H. Shiku *. Multi-parameter analyses of three dimensionally cultured tumor spheroids based on respiration activity and comprehensive gene expression profiles. <i>Anal. Biochem.</i>, 439(2), 187-193 (2013).</p> <p>24. J. Ramón-Azcón, S. Ahadian, M. Estili, X. Liang, S. Ostrovidov, H. Kaji, H. Shiku, Y. Sakka, K. Nakajima, M. Ramalingam. A. Khademhosseini, T. Matsue, Facile and rapid alignment of carbon nanotubes within a hydrogel using the dielectrophoresis technique and its application for fabricating skeletal muscle tissues. <i>Adv. Mater.</i> 25 (29), 4028-4034 (2013).</p> <p>25. F. Ozawa, K. Ino, T. Arai, J. Ramón-Azcón, Y. Takahashi, H. Shiku, T. Matsue, Alginate gel microwell arrays using electrodeposition for three-dimensional cell culture. <i>Lab Chip</i> 13(15), 3128-3135(2013).</p> <p>26. M. Şen, K. Ino, J. Ramón-Azcón, H. Shiku, T. Matsue, Cell pairing using dielectrophoresis-based device with IDA electrodes. <i>Lab Chip</i> 13 (18), 3650-3652 (2013).</p> <p>27. K. Ino, T. Nishijo, Y. Kanno, F. Ozawa, T. Arai, Y. Takahashi, H. Shiku, T. Matsue. Electrochemical device with interdigitated ring array electrodes for investigating the relationship between cardiomyocyte differentiation from embryonic stem cells and alkaline phosphatase activity. <i>Electrochemistry</i>, 81, 682-687 (2013).</p> <p>28. R. Obregón, S. Ahadian, J. Ramón-Azcón, L. Chen, S. Ostrovidov, G. Camci-Unal, T. Fujita, H. Kaji, K. Ino, H. Shiku, M. Chen, T. Matsue, Non-invasive measurement of glucose uptake of skeletal muscle tissue models using a glucose nanobiosensor. <i>Biosens. Bioelectron.</i> 50, 194-201 (2013).</p> <p>29. 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> 48, 12-18 (2013).</p> <p>30. 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</p> <p>31. 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).</p> <p>32. 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).</p> <p>33. 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).</p> <p>34. Y. Nashimoto, Y. Takahashi, R. Takano, K. Miyashita, S. Yamada, K. Ino, H. Shiku*, T. Matsue*. Isolation and quantification of messenger RNA from tissue models by using a double-barrel carbon probe. <i>Anal. Bioanal. Chem.</i> 406 (1), 275-282 (2014).</p> <p>35. R. Takahashi, Y. Zhou, Y. Horiguchi, H. Shiku, H. Sonoda, N. Itabashi, J. Yamamoto, T. Saito, T. Matsue, A. Hisada, Noninvasively Measuring Respiratory Activity of Rat Primary Hepatocyte Spheroids by Scanning Electrochemical Microscopy. <i>J. Biosci. Bioeng.</i> 17(1), 113-121(2014).</p> <p>36. K. Ino, T. Goto, Y. Kanno, K.Y. Inoue, Y. Takahashi, H. Shiku, T. Matsue. Droplet array on local redox cycling-based electrochemical (LRC-EC) chip device. <i>Lab Chip</i> 14(4), 787-794 (2014).</p> <p>37. Y. Kanno, T. Goto, K. Ino, K.Y. Inoue, Y. Takahashi, H. Shiku, T. Matsue, SU-8-based flexible amperometric device with IDA electrodes to regenerate redox species in small spaces. <i>Anal. Sci.</i> 30(2), 305-309 (2014).</p> <p>38. S. Ahadian, J. Ramón-Azcón, M. Estili, X. Liang, S. Ostrovidov, H. Shiku, M. Ramalingam, K. Nakajima, Y. Sakka, H. Bae, T. Matsue, A. Khademhosseini, Hybrid hydrogels containing vertically aligned carbon nanotubes with anisotropic electrical conductivity for muscle myofiber fabrication. <i>Scientific Reports</i> 4:4271. (2014). DOI:10.1038/srep04271</p> <p>39. Y. Takahashi, K. Ito, X. Wang, Y. Matsumae, H. Komaki, A. Kumatani, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue., Nanoscale Cell Surface Topography Imaging using Scanning Ion Conductance Microscopy. <i>Electrochemistry</i>, 82 (5), 331334 (2014).</p> <p>(未掲載一査読有り) 計 0 件</p>
--	---

会議発表	専門家向け 計 44 件
計 46 件	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. H. Shiku, G. Saito, T. Yamakawa, Y. Takahashi, K. Ino, T. Matsue, SINGLE-CELL MESSENGER RNA ANALYSIS FOR WOUND HEALING, University of Tokyo, The 5th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, Tokyo, March 03-04, 2011.</li> <li>2. 珠玖 仁, 伊藤小町, 松前義治, 伊野浩介, 末永智一, 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, 2011年電気化学秋季大会, 2011年9月9日.</li> <li>3. H. Shiku, J. Suzuki, K. Ino, T. Matsue, Electrochemical Gene Expression Analysis on Single-Cell Array Devices, ISE Conference Management of the 62nd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Niigata, Toki-Messe, September 15, 2011.</li> <li>4. H. Shiku, K. Ino, T. Matsue, Electrical cell lysis technique to collect mRNA from single-cells, the 220th ECS Meeting &amp; Electrochemical Energy Summit in Boston, Massachusetts, October 9-14, 2011.</li> <li>5. 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, Proceeding of The 7th International Forum On Post-Genome Technologies and China-Japan-Korea Joint Symposium on Natural Products" (7IFPT-CJK), pp. 343-344. Chongqing, China, October 28-29, 2011.</li> <li>6. 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. 第21回日本MRS学術シンポジウム, Yokohama, Dec. 19, 2011.</li> <li>7. 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.</li> <li>8. 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</li> <li>9. 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</li> <li>10. 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</li> <li>11. 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.</li> <li>12. 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.</li> <li>13. 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.</li> <li>14. 阿部志保美, 伊野浩介, 珠玖仁, 末永智一. 微小流体プローブ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</li> <li>15. Yuanshu Zhou, Toshiharu Arai, Yoshiko Horiguchi, Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Multi-parameter analysis of spheroids cultured by different 3D environment, Sendai symposium on analytical sciences 2012, WPI-AIMR Building, Tohoku University, Sendai, Nov 9-10, 2012.</li> <li>16. 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.</li> <li>17. 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.</li> <li>18. 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.</li> <li>19. 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.</li> <li>20. Y. Zhou, T. Arai, Y. Horiguchi, K. Ino, H. Shiku, T. 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.</li> <li>21. H. Shiku. Scanning electrochemical microscopy and other electrochemical imaging device to characterize</li> </ol>

	<p>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.</p> <p>22. Y. Matsumae, Y. Takahashi, K. Ino, H. Shiku, T. Nishijo, T. Arai, T. 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.</p> <p>23. Y. Zhou, T. Arai, S. Yamada, I. Fujisawa, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue. Sorting, culture and functional evaluation of mouse mesodermal embryoid bodies. CiRA international symposium 2013, Kyoto University clock tower, Japan, Mar 11-12, 2013.</p> <p>24. 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.</p> <p>25. 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.</p> <p>26. 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.</p> <p>27. 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> <p>28. 珠玖仁, 新井俊陽, 西條拓, 周縁殊, 伊野浩介, 末永智一. 電気化学的アルカリホスファターゼ活性測定法に基づくマウス ES 細胞の分化過程の評価. 電子情報通信学会技術研究報告 OME・SDM 研究会. 屋久島環境文化村センター, 鹿児島県 4.25-26. 2013.</p> <p>29. 珠玖仁(招待講演), 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. 「第45回プロセス設計技術講演会・見学会(主催:化学工学会東北支部)». 東北大学工学研究科総合研究棟 110 号室, 仙台 7.4. 2013.</p> <p>30. 藤澤生磨, 周縁殊, 伊野浩介, 珠玖仁, 末永智一, 細胞分化モデル系における FACS 解析および単一細胞レベルの網羅的遺伝子解析. 日本分析化学会第 62 回年会, 近畿大学, 大阪, 9.10-12.2013.</p> <p>31. H. Shiku, (Keynote Lecture) "Electrochemical Evaluation of Differentiation Status of Mouse Embryo Stem Cell", 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Santiago de Queretaro, Mexico, Sep 13, 2013.</p> <p>32. H. Shiku, Y. Nashimoto, K. Miyashita, K. Ino, Y. Takahashi, T. Matsue, "MULTI-FUNCTIONAL PROBES FOR MESSENGER- AND MICRO-RNA ANALYSIS OF TISSUE MODELS AT SINGLE CELL LEVEL", FRONTIERS OF SINGLE CELL ANALYSIS CONFERENCE, STANFORD UNIVERSITY, PALO ALTO, CA, USA, SEP. 5-7, 2013.</p> <p>33. 珠玖仁, 宮下 紘介, 梨本 裕司, 伊野 浩介, 末永 智一, 1細胞レベルの microRNA の定量, 2013 年電気化学会秋季大会, 東京工業大学, 9.28.2013.</p> <p>34. T. Arai, H. Shiku, Nana, Aoki, K. Ino, T. Matsue, Selection of highly-differentiated cardiomyocyte from mouse embryonic stem cells based on non-invasive electrochemical measuring. International Symposium for the 70<sup>th</sup> Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, Tohoku University, Sendai, 9.28-30. 2013.</p> <p>35. K. Miyashita, Y. Nashimoto, Y. Takahashi, K. Ino, T. Matsue, MicroRNA expression analysis of HUVEC at single-cell level. International Symposium for the 70<sup>th</sup> Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, Tohoku University, Sendai, 9.28-30. 2013.</p> <p>36. I. Fujisawa, Y. Zhou, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, Single-cell comprehensive gene expression analysis during cell differentiation. International Symposium for the 70<sup>th</sup> Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, Tohoku University, Sendai, 9.28-30. 2013.</p> <p>37. Y. Matsumae, T. Arai, Y. Takahashi, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, Single cell evaluation of differentiation status of the embryonic stem cell by using scanning electrochemical microscopy. International Symposium for the 70<sup>th</sup> Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, Tohoku University, Sendai, 9.28-30. 2013.</p> <p>38. S. Yamada, J. Ramon-Azcon, T. Arai, F. Ozawa, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, Three dimensional spatial assembly of stem cells by using dielectrophoresis in GelMA hydrogel. International Symposium for the 70<sup>th</sup> Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, Tohoku University, Sendai, 9.28-30. 2013.</p> <p>39. 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, 中胚葉スフェアの培養及び代謝機能評価, 第 35 回バイオマテリアル学会大会, タワーホール船掘, 東京,</p>
--	---

	<p>11.25.2013.</p> <p>40. 梨本祐司, 伊藤秀矩, 高橋康史, 伊野浩介, 珠玖 仁, 末永智一, マイクロ培養デバイスを持った血管管状構造の構築と制御, 第 35 回バイオマテリアル学会大会, タワーホール船掘, 東京, 11.25.2013.</p> <p>41. 新井俊陽, 珠玖 仁, 青木七菜, 伊野浩介, 末永智一, 非侵襲的電気化学的手法を用いたマウス ES 細胞の分化評価, 第 35 回バイオマテリアル学会大会, タワーホール船掘, 東京, 11.25.2013.</p> <p>42. 珠玖 仁, (受賞講演) 微小電極探針を用いる受精卵および細胞塊の機能探索に関する研究, 分析化学会東北支部平成 25 年度東北分析化学賞講演会、東北大学金属材料研究所講堂 12. 21. 2013.</p> <p>43. 珠玖 仁、青木七菜、新井俊陽、周 縁殊、伊野浩介、末永智一、マウス胚様体の呼吸、分化能に与える培地組成およびエネルギー源の影響、電気化学会第 81 回大会、関西大学、吹田市、3.29-31. 2014.</p> <p>44. 梨本祐司, 高橋康史, 伊野浩介, 珠玖 仁, 末永智一, 走査型イオンコンダクタンス顕微鏡を用いた血管内皮細胞分泌フォン・ヴィレブランド因子の形態観察, 電気化学会第 81 回大会、関西大学、吹田市、3.29-31. 2014.</p> <p><b>一般向け 計 2 件</b></p> <p>45. 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.</p> <p>46. 珠玖 仁(ポスター発表)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、「科学が拓く 2030 年」へのシナリオ、ベルサール新宿グランド、東京、2014.2.28</p>
<p><b>図 書</b></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><b>産業財産権 出 願・取得 状況</b></p> <p>計0件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(出願中) 計 0 件</p>
<p><b>Webページ (URL)</b></p>	
<p><b>国民との科 学・技術対 話の実施状 況</b></p>	<p><b>累計 10 件</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・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、<b>2011.7.27,28.</b> 一般対象、50 名程度、当該研究課題を含めた研究室の紹介。</li> <li>・片平祭りでの研究見学会、東北大学片平キャンパス、<b>2011.10.8,9.</b>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。</li> <li>・高校生の実習、東北大学青葉山キャンパス、<b>2011.8.20,27, 9.17,24.</b>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。</li> <li>・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、<b>2012.7.30,31.</b>一般対象、50 名程度、当該研究課題を含めた研究室の紹介。</li> <li>・高校生の実習、東北大学青葉山キャンパス、<b>2012.9.8~10.27.</b> 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。</li> <li>・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、<b>2012. 7. 14.</b> 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)</li> <li>・オープンキャンパス 50 名程度、当該研究課題を含めた研究室の紹介(2013.7.30-31) 東北大学青葉山キャンパス</li> <li>・中学生 (23 名) 見学と実習「幹細胞の培養パターンデザイン」(2013.10.22) 東北大学青葉山キ</li> </ul>

## 様式21

	キャンパス ・高校生(37名)講演と実習「酵素反応で幹細胞を染色する」(11.9.2013)仙台育英学園高校 ・高校生(4名)実習「幹細胞のパターン培養」(2013.11.30~2014.1.26) 東北大学青葉山キャンパス
新聞・一般 雑誌等掲載 計0件	
その他	

### 7. その他特記事項

該当なし