

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)
実施状況報告書(平成 25 年度)**

本様式の内容は一般に公表されず

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。前年度までに、網羅的定量的遺伝子解析システムおよびセルソーターの装置を立ち上げ、マウス受精卵、マウス胚様体、マウス臍島、ヒト血球細胞株のいずれにおいても1細胞レベルの計測が可能であることがほぼ確かめられた。細胞塊から細胞懸濁液を経てセルソーターで仕分け後、網羅的遺伝子解析システムへ連結するシステムも確立しつつある。本年度も4つの小課題ごとにプログラムを推進する。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。
最終年度に当たる平成 25 年度には、これら要素技術を集約していく。

2. 研究の実施状況

I EBから血管用組織への分化誘導を行い、低酸素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。

II プローブ顕微鏡探針の尖線化キャピラリーに有機溶媒を充填し、界面電位を制御することにより1細胞由来 mRNA の回収・定量が可能であることを確認した。

III マウス胚様体の無侵襲的呼吸活性と網羅的遺伝子発現解析および 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報告した。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の培養法について多くの進展があった。網羅的遺伝子発現解析装置 BioMark の感度向上のため、nested PCR 法を導入したところ 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についてクラスタリング解析が可能であることを確認した。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。

IV 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)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。昨年度に引き続き階層横断的多項目分析の一環として、microRNA の定量を実施した。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 16 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 16 件</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 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). ・ 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). ・ 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). ・ 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). ・ 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 ・ 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). ・ 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 undifferentiation/differentiation markers. <i>Mol. Biosyst.</i>, 9, 2701-2711 (2013). ・ 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). ・ 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). ・ 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). ・ 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). ・ 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). ・ 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). ・ 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). ・ 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). ・ 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>(掲載済み一査読無し) 計 0 件 (未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 18 件</p>	<p>専門家向け 計 17 件</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 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. ・ 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. ・ 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. ・ H. Shiku, (Keynote Lecture) "Electrochemical Evaluation of Differentiation Status of Mouse Embryo Stem Cell", 64th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Santiago de Queretaro, Mexico, Sep 13, 2013. ・ 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 UNICERSITY, PALO ALTO, CA, USA, SEP. 5-7, 2013.

様式19 別紙1

	<p>・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>・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 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, Tohoku University, Sendai, 9.28-30. 2013.</p> <p>・K. Miyashita, Y. Nashimoto, Y. Takahashi, K. Ino, T. Matsue, MiroRNA exprwssion analysis of HUVEC at single-cell level. International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, Tohoku University, Sendai, 9.28-30. 2013.</p> <p>・I. Fujisawa, Y. Zhou, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, Single-cell comprehensive gene expression analysis during cell differentiation. International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, Tohoku University, Sendai, 9.28-30. 2013.</p> <p>・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 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, Tohoku University, Sendai, 9.28-30. 2013.</p> <p>・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 GeIMA hydrogel. International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, Tohoku University, Sendai, 9.28-30. 2013.</p> <p>・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，東京，11.25.2013.</p> <p>・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>・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>・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>・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>・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ヴォン・ヴィレブラント因子の形態観察，電気化学会第81回大会、関西大学、吹田市、3.29-31. 2014.</p> <p>一般向け 計1件</p> <p>・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>図書</p> <p>計0件</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>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 50名程度、当該研究課題を含めた研究室の紹介(2013.7.30-31)青葉山キャンパス</p> <p>② 中学生(23名)見学と実習「幹細胞の培養パターンのデザイン」(2013.10.22)青葉山キャンパス</p> <p>③ 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</p> <p>④ 高校生(4名)実習「幹細胞のパターン培養」(2013.11.30~2014.1.26)青葉山キャンパス</p>

様式19 別紙1

新聞・一般雑 誌等掲載 計0件	
その他	

4. その他特記事項

特に該当なし

実施状況報告書(平成25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	98,100,000	21,900,000	0	0
間接経費	36,000,000	29,430,000	6,570,000	0	0
合計	156,000,000	127,530,000	28,470,000	0	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	21,900,000	0	21,900,000	21,900,000	0	0
間接経費	0	6,570,000	0	6,570,000	6,570,000	0	0
合計	0	28,470,000	0	28,470,000	28,470,000	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	14,199,000	冷却式モノクロカメラ、実体顕微鏡、実験試薬等
旅費	1,253,009	研究成果発表旅費等
謝金・人件費等	5,709,552	研究支援者人件費、学生アルバイト等
その他	738,439	学会参加費、英文校正費、送料等
直接経費計	21,900,000	
間接経費計	6,570,000	
合計	28,470,000	

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
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