

伊藤ナノ医工学研究室
Nano Medical Engineering Laboratory

主任研究員 伊藤嘉浩 (工学博士)
ITO, Yoshihiro (Dr. Eng.)



キーセンテンス：

1. ナノ診断システムの構築
2. ナノ治療システムの構築
3. 合成生物学、進化分子工学手法による機能性分子の創製研究
4. ナノテクノロジーの基盤研究
5. ヒトiPS細胞の分化誘導培養装置の研究

キーワード：

人工臓器工学、医用材料、生体材料、生体機能材料、再生医工学、薬物伝達システム、ナノ表面界面、分子デバイス、生体機能関連物質、生物活性分子の設計・合成、分子イメージング、核酸医薬、遺伝子検出、核酸化学、分子センサー、マイクロアレイ・バイオチップ、ソフトナノテクノロジー、高分子科学、細胞工学、タンパク質工学、進化分子工学、コンビナトリアル・バイオエンジニアリング、微細加工、合成生物学

研究概要

当研究室では、化学的手法と生物工学的手法を融合させた「バイオものづくり」の方法論の確立と、それによる機能性材料の開発を目指している。方法論として、コンビナトリアル・ケミストリー、進化分子工学、高分子工学、有機合成化学、核酸科学、ハイブリッド材料工学、遺伝子・タンパク質工学、微細加工工学、ナノテクノロジーなどの手法を駆使して新しい材料、方法論を生み出し、その性能を評価するとともに、再生医療、遺伝子診断、遺伝子治療、ナノメディシン、バイオチップ、バイオエレクトロニクス、人工酵素、人工抗体、バイオマテリアルへの応用展開を図っている。

1. 診断用ナノ医工学

(1) マイクロアレイ・バイオチップの開発 (伊藤)

光反応性基を用いた固定化材料を開発し、特にアレルギーの原因解明のための測定系の開発と再現性高くマイクロアレイ・チップができる条件が整ってきたので理研ベンチャーを設立した。

(2) 生体分子検出法 (鶴澤・植木・多田)

病原マーカータンパク質、ウイルスを構成するタンパク質、生体機能分子等をターゲット分子として、それらに結合するペプチドプローブを進化分子工学的手法にて選出した。

(3) 細胞ライセートアレイによる細胞ストレス評価法の開発 (森島)

細胞中の特定タンパク質群の精密定量に向けて、スタンプ型アレイ作製装置製作、ライセート調製実験条件の検討、統計学的手法によるデータ処理法の開発を行っている。今年度はアレイ作製用スポッティングピンの精密研磨及びアレイ作製装置スポッティング動作部の改良を行ってスポット性能の安定化をはかるとともに、タンパク質定量データの外れ値処理について検討した。

(4) ウイルス感染性の可視化技術の開発 (佐藤・間)

牛白血病ウイルス (BLV) 感染により蛍光シンシチウムを形成する高感度 BLV 転写活性化因子 Tax 応答性レポーター細胞を樹立し、これまで不可能であった BLV 感染牛の乳汁の感染性の可視化に世界で初めて成功した。

2. 治療用ナノ医工学

(1) コラーゲン結合性内皮細胞成長因子の調製 (鶴澤・伊藤)

血管内皮細胞成長因子 (VEGF) の末端にランダム配列ペプチド・ライブラリーを付加し、進化分子工学の手法でコラーゲン結合性 VEGF を調製し、テーラーメイドの結合性成長因子の調製法を確立し、調製した VEGF が心筋梗塞モデルや皮膚潰瘍モデルで有効に働くことを明らかにした。

(2) 生物模倣設計による、成長因子固定化技術の開発 (宮武)

ムール貝の水中接着機構を模倣し、成長因子を医療用素材に細胞無毒性な方法で固定化する技術の検討を行った。ムール貝の水中接着タンパク質をもとに、L-DOPAを含む接着性ペプチド(X= L-DOPA; XKXXKX)を設計した。成長因子タンパク質 (インスリン様成長因子-1 (IGF-1) および骨形成因子2 (BMP-2)) のC末端に、遺伝子組み換え技術により接着性ペプチドの前駆体である、YKYKYを導入後、発現・精製した。これを、酵素反応によってY→Xに変換し、接着性成長因子タンパク質を得た。このチタン表面への吸着性を調べたところ、野生型と比較して、2~5倍程度吸着性が向上した。さらに、接着性IGF-1を表面に固定化したチタン材料は、固定しない場合と比較して、細胞増殖を2倍程度増加させた。さらに、接着性BMP-2をチタン足場に固定してマウスに移植したところ、骨形成を誘導しチタンの生着性が向上した (図1)。

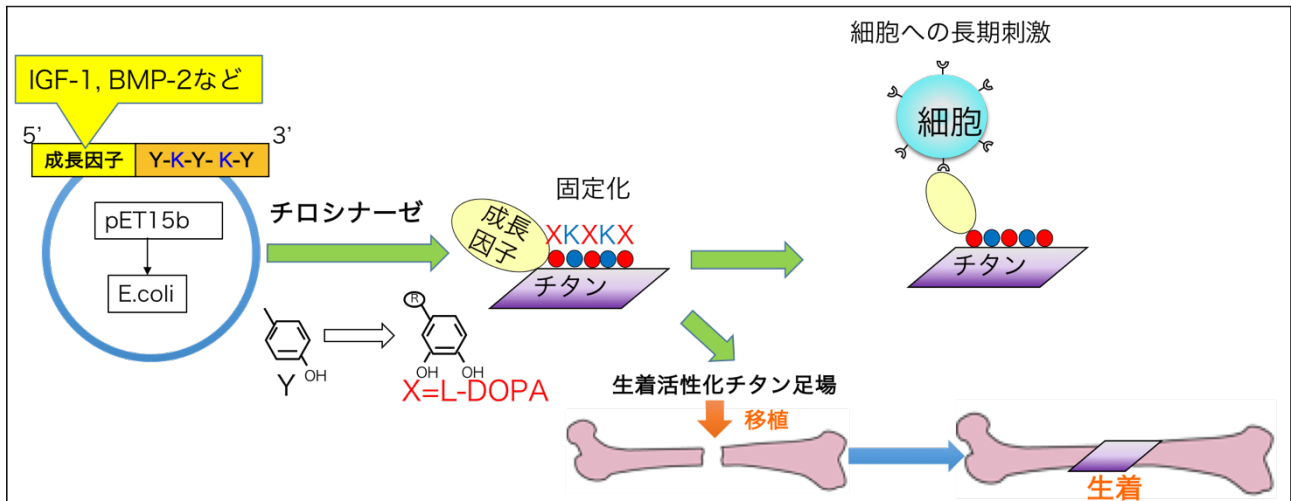


図1 接着性成長因子タンパク質のチタン表面への固定。大腸菌でIGF-YKYKYおよびBMP-2-YKYKYを発現し、精製後、チロシナーゼによる酵素反応によりIGF-1-XKXXKXおよびBMP-2-XKXXKXを調製した。得られた接着性成長因子タンパク質は、チタン表面上に活性を保ったまま吸着した。活性化チタンは、細胞増殖を促進し、骨中の生着性も向上した。

(3) ドラッグ・デリバリー・システムの開発 (上田)

親水性薬剤キャリアとして魚雷型ペプチドキャリアに注目している。シート状集合体を筒状集合体に作用させることにより筒の開口部を塞ぎ魚雷型カプセルが得られ、DDSキャリアとしての応用研究を行っている (図2)。筒部位は加熱温度と加熱時間の最適化によって長さの調節が可能であり、様々な長さのカプセルの調製に成功し、特許化した。また、分子設計を工夫することで収率を向上させることにも成功した。

さらに、魚雷型カプセルの膜分裂の研究を開始した。カチオン性ペプチドの混合により、加熱時間に応じて膜分裂が促進されることが明らかとなった (図2)。

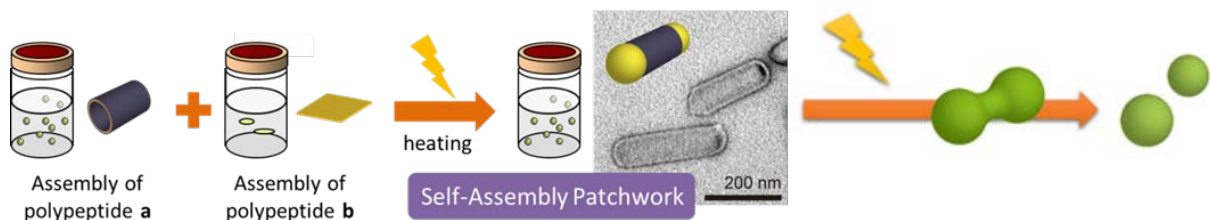


図2 魚雷型ペプチドカプセルと温度によるその膜分裂の概略図

(4) 負電荷を導入した温度応答性ナノ粒子によるカチオン性タンパク質の分離 (秋元)

温度応答性ナノ粒子に負電荷を有する高分子を導入して、温度変化によるナノ粒子の分散安定性を評価した。この温度応答性ミセルの温度応答性外殻は、温度上昇により疎水性に変化するが、負電荷を有するセグメントの導入によりナノ粒子間の相互作用が抑制され、分散性が維持できることが明らかにな

った。また、温度変化によるナノ粒子の構造変化により、粒子のゼータ電位を制御することも可能となり、これを利用して温度変化によりカチオン性タンパク質との相互作用が制御を実現した。

(5) ワクチン開発 (大附、竹嶋、間)

ナノ粒子固定化ペプチドワクチンにより BLV のプロウイルス量の減少に成功した。さらにワクチンの抗原性を高めるために、ウイルス様粒子 (VLP) に着目し、BLV-Gag および Env を含有した新規 BLV-VLP の作製に成功し、その免疫原性をマウスおよび牛で確認した。最終的に牛白血病感受性牛に用いてプロウイルス量上昇抑制効果を認めた。

3. 合成生物学手法による機能性分子の創製研究

(1) 新しい機能性ペプチドアダプターの開発に向けたペプチド選別法の改良 (鶴澤、多田)

非天然アミノ酸を導入したペプチドアダプターを効率よく選別する手法として、エマルジョン中での転写・翻訳およびマイクロビーズディスプレイ法を使った方法の検討を行った。

4. ナノテクノロジーの基盤研究

(1) 有機分子や光デバイスにおける自己組織的秩序構造形成 (磯島)

2次元光双安定素子における状態遷移領域の伝播 (波面伝播) 現象を用いて、迷路探索が実現可能であることを数値シミュレーションで実証した。様々な迷路探索動作の検討を行い、動作条件空間における動作モードマッピングを行なった (図4)。実際に素子を作製し迷路探索動作の検証実験を行なった。また微細構造を表面に形成した寒天培地で、表面構造の形状やサイズによって微生物の培養制御を試み、等間隔なライン&スペース構造ではコロニー形状の異方性が、二次元的市松模様ではサイズによりコロニー成長の抑制傾向が見られることを明らかにした。

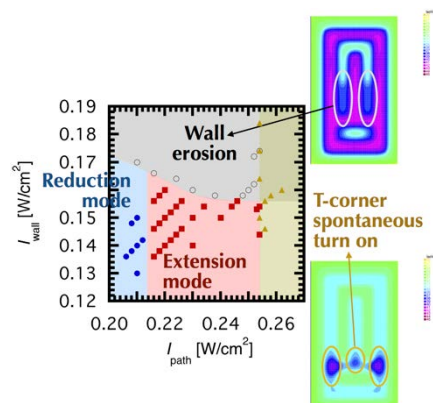
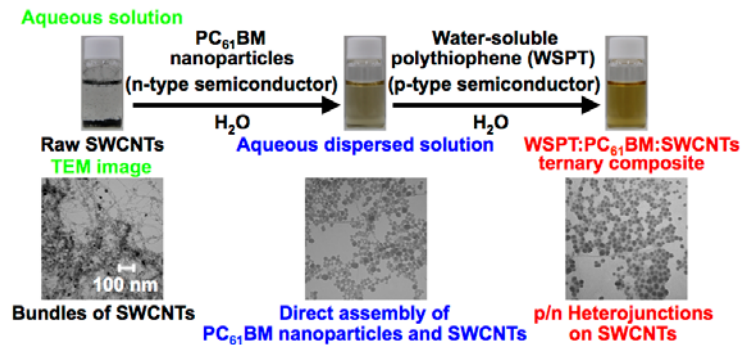


図4 有限要素法数値シミュレーションにより求めた熱伝播型2次元光双安定素子の迷路探索動作モードマッピング。横軸は迷路経路部の照射光強度、縦軸は経路間の壁部分の照射光強度。青はOn領域が行き止まり経路から撤退する縮退モード、赤は伸長モード、黄はT字型交差点で近隣にOn領域がないのにOnになる自発turn-onモード、灰色は壁部分もOnになる壁侵食モード。前2者が正常な迷路探索モードであり、後2者は迷路探索には使用できない動作モードである。

(2) フラーレンナノ粒子を用いた単層型カーボンナノチューブの水中分散性 (Li, He, 伊藤, 川本)

フルーレン (PC₆₁BM) からなるナノ粒子がカーボンナノチューブの水中分散剤として機能することを明らかにした。水中への分散性は、PC₆₁BM ナノ粒子がカーボンナノチューブの側面に付着することで誘起することがわかった。得られた水分散溶液を用い、フレキシブル基板への PC₆₁BM ナノ粒子-カーボンナノチューブ複合体膜の成膜に成功し、この複合体膜が熱電変換能を有することを明らかにした。また、PC₆₁BM ナノ粒子-SWCNT 複合体へ水溶性ポリチオフェン (WSPT) を加えると、SWCNT 上に p/n 接合を自発的に形成した。得られたナノコンジットのキャスト膜を作製し疑似太陽光を照射したところ、光電変換能を示すことがわかった。



(3) 固相熱脱離反応を示す導電性ポリマーの開発 (He, Salikolimi, 伊藤, 川本)

側鎖に熱脱離基を導入した親水・疎水性を示す導電性ポリマーを合成した。得られたポリマーは汎用溶媒に可溶であり、基板への成膜が可能であった。得られたフィルムを加熱すると溶媒に不溶な膜へ変化した。熱重量分析、赤外吸収スペクトルの結果より、不溶化は固相中で側鎖の熱脱離反応を生じ、溶解性が変化したためであることがわかった。また合成したポリマーが、エタノール中でカーボンナノチューブの分散剤として機能することを明らかにした。透過型電子顕微鏡観察の結果、ポリマーがナノチューブ表面に付着し、分散性を誘起することがわかった。

(4) 閉環反応による多環芳香族化合物の高効率合成 (Hassan, Salikolimi, 伊藤, 川本)

1,1'-bi-2-naphthol の一段階閉環反応によって、多環芳香族化合物である 7*H*-dibenzo[*c,g*]carbazole (DBC) を反応収率 99% で合成する手法を開発した。また本手法を用いると、高い単離収率 (96%) とグラムスケール合成が可能であることを見いだした。オプトエレクトロニクス材料としての可能性を検討するために、DBC の *N* 位をアルキル化、またはアリル化した化合物を合成した。これらの化合物は、優れた熱安定性と高い蛍光量子収率、半導体特性を示すことがわかった。また、結晶学的解析の結果、DBC 誘導体はアモルファス性、あるいは結晶性を示すことから、これらの分子機能は、薄膜デバイスや単結晶デバイスへの応用に適している。本合成法を活用することで、オプトエレクトロニクスの様々な分野で、新しい半導体材料の開発が期待できる。

(5) 光応答性アトロップポリマーの分子スイッチング挙動 (Hassan, 伊藤, 川本)

アゾ部位、ビナフチル部位の共役構造からなるアトロップポリマーを合成し、光駆動分子スイッチへの応用を検討した。得られたポリマーは、アモルファス性を示し、高い熱安定性を有することがわかった。また、このアモルファス性を利用することで、結晶粒界のない均一なフィルムの作製に成功した。アゾ部位のトランス-シス光異性化反応によって、分子のねじれ運動に伴う光学活性変化を誘起した。この動的な分子応答を利用し、フィルム中における光学活性の光スイッチングを達成した。また、アトロップポリマーが光異性化反応によって光で蛍光強度を制御できることを明らかにした。さらにフィルムへの偏光照射によって、ポリマーの選択的励起が生じ、異方的な分子配向変化を引き起こすことがわかった。

5. ヒトiPS細胞の分化誘導装置の研究

(1) ヒトiPS細胞の分化誘導培養装置の研究開発 (植木, 森田)

佐竹化学機械工業 (株) との共同研究で、200~500 mLの上下動培養装置を用いて、3D浮遊でのヒトiPS細胞の外胚葉系への分化誘導条件 (通気、攪拌速度など) の最適化を行っている。分化誘導後に2D培養に移行すると、神経突起伸長が観察され、未分化の指標となる遺伝子の発現消失が見られた。

Key Sentences:

1. Development of Nano Diagnostic Systems
2. Development of Nano Therapeutic Systems
3. Creation of Functional Molecules by Synthetic Biology and Molecular Evolutionary Engineering
4. Fundamental Investigation on Nanotechnology
5. Development of bioreactor for differentiation of human iPS cells.

Keywords:

Artificial Organ Engineering, Medical Materials, Biomaterials, Biofunctional Materials, Regenerative Medical Engineering, Drug Delivery System, Nano Surface and Interface, Molecular Device, Bio-Related Compounds, Design and Synthesis of Bioactive Molecules, Molecular Imaging, Nucleic Acid Drugs, Gene Detection, Nucleic Acid Chemistry, Molecular Sensor, Microarray Biochips, Soft-Nano Technology, Polymer Science, Cell Engineering, Protein Engineering, Molecular Evolutionary Engineering, Combinatorial Bioengineering, micro-Fabrication, Synthetic Biology

Outline

In this laboratory the aim is to create new functional materials by a new method which will be developed by combination of chemical and biotechnological methodology. We use combinatorial chemistry, molecular engineering, polymer engineering, hybrid materials engineering, gene and protein engineering, micro-fabrication technology, and nanotechnology to synthesize new materials and the systems for development of regenerative medicine, artificial organs, drug delivery systems, nano-medicine, biochips, bioelectronics, artificial enzymes, and artificial antibodies.

1. Medical Engineering for Diagnosis**(1) Development of microarray biochip (Ito)**

A new diagnostic system using micro-array biochip was developed using photo-immobilizable polymers. By the development, a new RIKEN Venture company was established.

(2) Biomolecule sensing (Uzawa, Ueki, Tada)

We selected peptide aptamers using in vitro selection technique. Those peptide aptamers were targeted to biomolecules including disease marker proteins and functional biomolecules.

(3) Development of a lysate array method for the evaluation of cellular stress (Morishima)

We develop a method of precise measurement of cellular proteins for analysis and evaluation of cellular stress. Our R & D activities include developing a multipin type stamp arrayer, optimizing conditions for cell lysate preparation, and analyzing data with statistical methods. We ground the tips of the spot pins, and modified the array cassette holder to achieve uniform contact between the pins and the array base material. For protein data analysis, we adopted several methods to automatically detect and remove outlier data.

(4) Development of assay for visualizing viral infectivity (Sato, Aida)

We established a new reporter cell line which expresses the enhanced green fluorescent protein (EGFP) response to bovine leukemia virus (BLV) Tax expression specifically and forms fluorescing syncytia when infected with BLV, and succeeded to visualize the infectivity of milk from BLV-infected cow.

2. Therapy by nano medical engineering**(1) Preparation of collagen-binding vascular endothelial growth factor (Uzawa, Ito)**

A new molecular evolution strategy, "all-in-one" in vitro selection, in which a collagen-binding VEGF (CB-VEGF) was developed for direct identification from a random library consisting of random and VEGF sequences. The selected CB-VEGF enhanced angiogenesis at skin wounds and infarcted myocardium.

(2) Biomimetic-inspired adhesion of growth factor proteins (Miyatake)

We investigated the fixation method of growth factor on the medical materials without cytotoxicity, which is inspired by the blue-mussel adhesion in water. In the wettable glue of blue-mussel, the adhesive peptides rich in L-DOPA(X) and lysine(K) are directly involved in the adhesion process. We, therefore, introduced an artificial adhesive peptide sequence (XKXKX) into the IGF-1 and BMP-2 at the C-terminal by the genetic recombinant technology. The prepared growth factor proteins were further treated with an enzyme to converting to the adhesive forms. The adhesive proteins successfully bound on the titanium surface in 2-5 times larger amount comparing to the

wild-type. The adhesive IGF-1 promoted the cell growth ratio about two times higher. In addition, Ti-plates immobilized with the adhesive BMP-2 was implanted into bones of mice, with increasing bone-formation. These results show that the adhesive growth factor proteins promote cell growth *in vivo* without any toxicity (Fig. X).

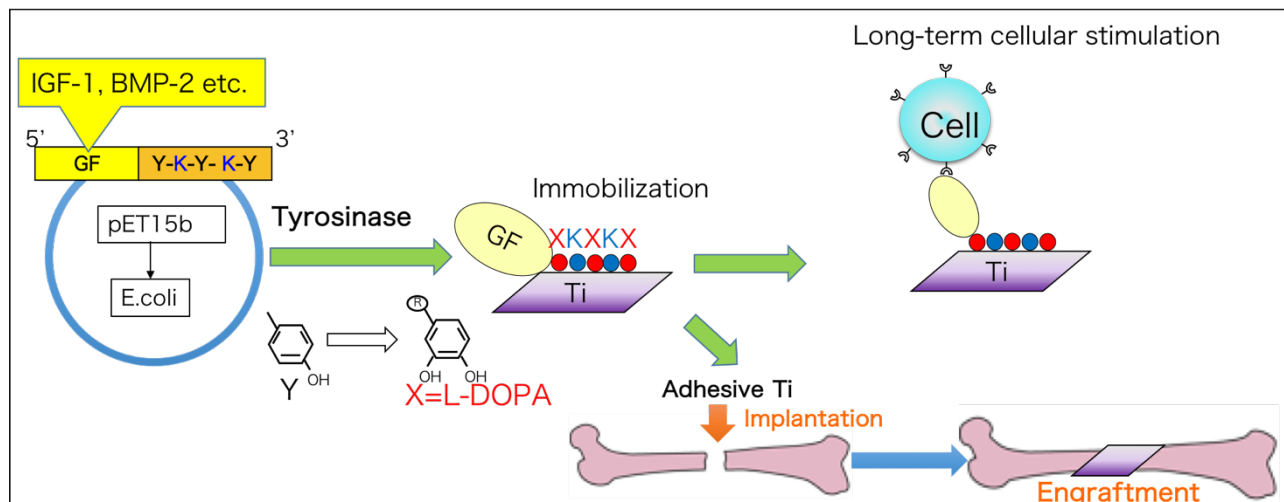


Figure X Immobilization of adhesive growth factors on titanium surface. After the expression of the proteins with YKYKY sequence at the C-terminal by *E. coli*, it was further activated the treatment of tyrosinase. The GF-XKXXKX proteins obtained were found to be tightly bound on the titanium surface keeping the bioactivity for cell growth and promotion of bone-formation.

(3) Drug delivery system (Ueda)

The torpedo-shaped peptide capsule is a promising tool for a nanocarrier of hydrophilic and hydrophobic drugs in a drug delivery system. This torpedo-shaped nanocapsule was composed of a tubular assemblies whose open mouth were capped by sheet-shaped assemblies (Figure 2). This length of tubular assembly was controlled by optimization of heat treatment condition. With using various length nanotube as a unit of nanocapsule, we could obtained various length of torpedo peptide nanocapsule. Furthermore, a yield of nanocapsule was drastically improved by optimizing a design of amphiphilic polypeptide.

Newly, it was found that torpedo-shaped nanocapsule has an ability of fission. By mixing cationic peptide into this membrane of nanocapsule, the membrane fission was induced (Figure 2).

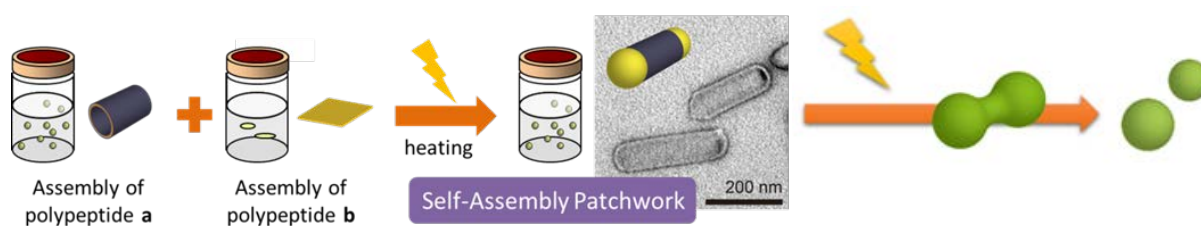


Figure 2 Schematic illustration of torpedo-shaped peptide capsule and its fission.

(4) Separation of cationic proteins using anionic thermoresponsive polymeric micelles (Akimoto)

Anionic polymer segment was introduced into thermoresponsive polymeric micelles to increase the dispersion ability of nanoparticles above the phase transition temperature of thermoresponsive polymer. By introducing anionic segment into thermoresponsive corona, anionic thermoresponsive polymer showed high dispersibility even after the hydrophobization of thermoresponsive polymers above the phase transition temperature. In addition, the micelles changed zeta potential of the particles in response to temperature change, and interaction with cationic protein can be controlled utilizing thermoresponsive physicochemical property change of nanoparticles

(5) Development of a bovine leukemia virus (BLV) vaccine (Otsuki, Takeshima, Aida)

We have shown previously that carbonate apatite fixed BLV peptide vaccine suppress BLV disease

progression in susceptible cattle. To resolve low effect by the short-chain peptide vaccine, we produced BLV-virus like particle (VLP) containing Gag and SU subunit of Env (Gag-SU) in insect cells, as a novel vaccine candidate, and demonstrated its antigenicity in mice and cattle. Finally, BLV-VLP vaccine succeeded in reducing proviral load and BLV disease progression in susceptible cattle.

3. Creation of functional molecules by synthetic biology

Development of a novel in vitro selection system for creation of functional peptides (Uzawa, Tada) We explored another selection method which is based on the aptamers' function. To the end, we investigated transcription and translation in emulsions and microbead display method.

4. Fundamental investigation on soft nanotechnology

(1) Self-organization phenomena in organic molecular films and optical devices (Isoshima, Ito)

Two-dimensional optical bistable devices were investigated in terms of propagation of state-transition area ("wavefront"), and conditions of various operational modes for maze exploration utilizing wavefront propagation has been investigated (Fig.4). A device was fabricated to demonstrate maze exploration experimentally.

Agar medium with micro-patterned surface has been fabricated, and cultivation control of microbes by the surface structure was examined. Line&space patterns induced anisotropic colony shape and 2-dimensional check patterns were found to suppress growth of colony.

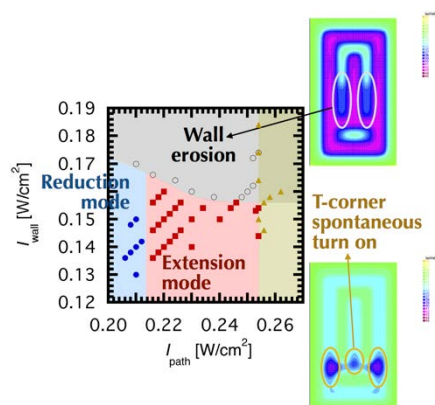
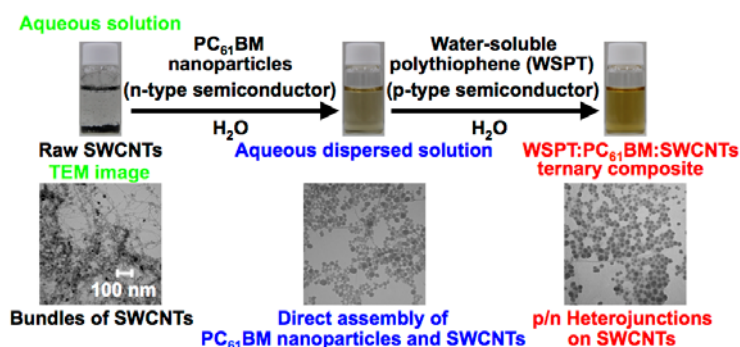


Figure 4 Operational mode map of maze exploration in a two-dimensional thermo-optical bistable device obtained by numerical simulation. x axis is the light intensity at the maze paths, and y axis that at the wall area of the maze. Blue area stands for reduction mode where the On-state area retreats from dead-end paths, red area for extension mode, yellow area for T-corner spontaneous turn-on mode, and grey area for wall erosion mode where the wall area of the maze also turns on. The former two modes are used for maze exploration, while the latter two are not suitable for it..

(2) Aqueous dispersion of single-wall carbon nanotubes using fullerene nanoparticles (Li, He, Ito, Kawamoto)

We found that the fullerene (PC₆₁BM) nanoparticle acts as a dispersant of single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) in water. Aqueous dispersion properties were induced by adsorption of the PC₆₁BM nanoparticles with the sidewall of SWCNTs. The PC₆₁BM nanoparticle-SWCNT composite film on a flexible substrate was obtained using the dispersed solution and showed thermoelectric behavior. Furthermore, p/n heterojunctions on SWCNTs was obtained in water when the water-soluble polythiophene (WSPT) was added to the binary composites of PC₆₁BM nanoparticles and SWCNTs. The drop-casting film of the ternary composites exhibited photoelectric conversion behavior using a solar simulator.



(3) Development of conducting polymers showing thermal cleavage reactions in the solid state (He, Salikolimi, Ito, Kawamoto)

Synthesis of hydrophilic and hydrophobic conducting polymers containing thermal cleavage segments was investigated. The polymers exhibited good solubility in common solvents and film-formation properties on substrates. When the polymer films were heated, the resultant film was insoluble in any solvents. From the results of thermogravimetric analysis and infrared spectroscopy, origin of change in the solubility was due to removal of the terminal groups by the thermal cleavage reaction in the solid state. The obtained polymer showed a dispersant of SWCNTs in ethanol. The dispersion properties were observed by adsorption of the polymer at the surface of SWCNTs using transmission electron microscope.

(4) Highly efficient synthesis of polycyclic aromatic compounds using the ring-closure reaction. (Hassan, Salikolimi, Ito, Kawamoto)

The polycyclic aromatic compound, 7*H*-dibenzo[*c,g*]carbazole (DBC), was obtained by one-step ring closure of 1,1'-bi-2-naphthol with a 99% conversion. This one-pot method, with an isolated yield of 96%, could be applicable for gram-scale synthesis. In order to evaluate their potential use as optoelectronic materials, *N*-alkylated and *N*-arylated DBCs were synthesized. These materials showed good thermal stabilities, relatively high fluorescence quantum yields, and semiconducting nature. Furthermore, crystallographic analyses exhibited amorphous or crystalline state, indicating that the molecular functions of the DBC derivatives are suitable for thin-film devices and single-crystalline devices. The facile synthesis of DBC enables the development of new semiconductors for diverse applications in optoelectronics.

(5) Molecular switching behavior of light-driven atropisomeric polymers (Hassan, Ito, Kawamoto)

Atropisomeric polymers including conjugated structures of azo and binaphthyl units were synthesized for light-driven molecular switches. The polymers showed amorphous properties with good thermal stability. This amorphous nature gave rise to formation of uniform films without grain boundaries. *trans-cis* Photoisomerization of the azo unit led to molecular twisting motion of the binaphthyl unit, yielding chiroptical switching in the neat film. The atropisomeric polymers also displayed photoswitchable fluorescence by *trans-cis* photoisomerization. Furthermore, irradiation of the neat film with linearly polarized light caused selective excitation of the atropisomeric polymer, leading to anisotropic molecular orientation.

5. Development of bioreactor for differentiation of human iPS cells.

(1) Development of bioreactor with reciprocal mixing for differentiation of human iPS cells (Ueki, Morita)

In collaboration research with Satake Chemical Equipment Mfg. Ltd, we are trying to optimize the condition for differentiation of human iPS cells toward ectodermal (neural stem) cells in 200 ~ 500 mL of bioreactor with reciprocal mixing. After induction of differentiation in the bioreactor, spheres formed in the bioreactor were spread onto 2D dishes to observe the growth of neurite filaments and the repression of pluripotency marker.

Principal Investigator

伊藤 嘉浩 Yoshihiro ITO

Research Staff

森島 信裕 Nobuhiro MORISHIMA

磯島 隆史 Takashi ISOSHIMA

宮武 秀行 Hideyuki MIYATAKE

植木 雅志 Masashi UEKI

川本 益揮 Masuki KAWAMOTO

鵜澤 尊規 Takanori UZAWA

上田 一樹 Motoki UEDA

間 陽子 Yoko AIDA

竹嶋 伸之輔 Shin-nosuke TAKESHIMA

佐藤 洋隆 Hirotaka SATO

秋元 淳 Jun AKIMOTO

Liping ZHU

Lanlan BAI

Nandakumar AVANASHIAPPAN

Shin Hye PARK

大附 寛幸 Hiroyuki OTSUKI

Liushiqi

Students

Roopa DHARMATTI

Marziyeh KARIMI AVARGANI

Seong Min KIM

Eun Hye KIM

孫 健 Kon SON

Boyang NING

綿貫 園子 Sonoko WATANUKI

Hao CHANG

広瀬 智哉 Tomoya HIROSE

Wlaa ASSI

Technical Staff

森田 直子 Naoko MORITA

Assistant and Part-timer

内田 紀美子 Kimiko UCHIDA

Palati MAIREPATI

斎藤 督 Susumu SAITO

若松 敏枝 Toshie WAKAMATSU

橋本 容子 Yoko HASHIMOTO

松本 京子 Kyoko MATSUMOTO

三浦 美香 Mika MIURA

緒方 直美 Naomi OGATA

Visiting Members

長田 義仁 Yoshihito OSADA

相垣 敏郎 Toshiro AIGAKI

牛田 多加志 Takashi USHIDA

吉田 靖弘 Yasuhiro YOSHIDA

居城 邦治 Kuniharu IJIRO

山村 雅幸 Masayuki YAMAMURA

小畠 英理 Eiry KOBATAKE

木賀 大介 Daisuke KIGA

阿部 洋 Hiroshi ABE

中村 真理子 Mariko NAKAMURA

孫 泰一 Tae il SON

章 培標 Peibiao ZHANG

劉 明哲 Mingzhe LIU

江上 舞 Mai EGAMI

Binata JODDAR

樋口 亜紺 Akon HIGUCHI

加藤 好一 Yoshikazu KATO

金子 晃 Akira KANEKO

Jonathan HEDDLE

植村 健二 Kenji UEMURA