

ナノバイオデバイスが拓く未来医療

馬場 嘉信

名古屋大学大学院工学研究科・医学系研究科

名古屋大学最先端研究開発支援プログラム(FIRST)・

革新ナノバイオデバイス研究センター

名古屋大学シンクロトロン光研究センター

名古屋大学リーディング大学院・PhDプロフェッショナル登竜門

名古屋大学リーディング大学院・グリーン自然科学国際教育研究プログラム

産業技術総合研究所 健康工学研究部門



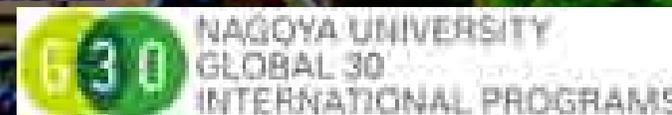
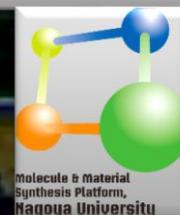
Nagoya University



FIRST Program



博士課程教育
リーディング
プログラム
Program for
Leading
Graduate Schools



医工連携セミナー

名古屋大学、2013年4月23日

医工連携セミナー

ナノバイオデバイスが拓く未来医療

馬場嘉信

レポート課題

講義内容で興味を持ったテーマについて

A4 1枚にまとめてレポート提出

専攻、学生番号、氏名を記載すること

提出〆切： 5月10日(金)

提出先： 1022号室 馬場研秘書宛

最先端研究開発支援プロジェクト

Funding Program for World-Leading Innovative R&D on Science and Technology (FIRST)

1分子解析技術を基盤とした革新ナノバイオデバイスの開発研究
Research and Development of Innovative Nanobiodevices
Based on Single-Molecule Analysis (2010-2014, 38 M\$)
Prof. T. Kawai (Osaka Univ.), Prof. Y. Baba (Nagoya Univ.)

Panasonic
ideas for life

TORAY

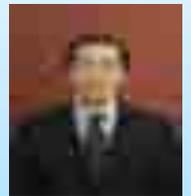
TOSHIBA

JMAC

名古屋大学革新ナノバイオデバイス研究センター

FIRST RESEARCH CENTER FOR
INNOVATIVE NANOBIODEVICES
NAGOYA UNIVERSITY

WWW.NANOBIO.NAGOYA-U.AC.JP/



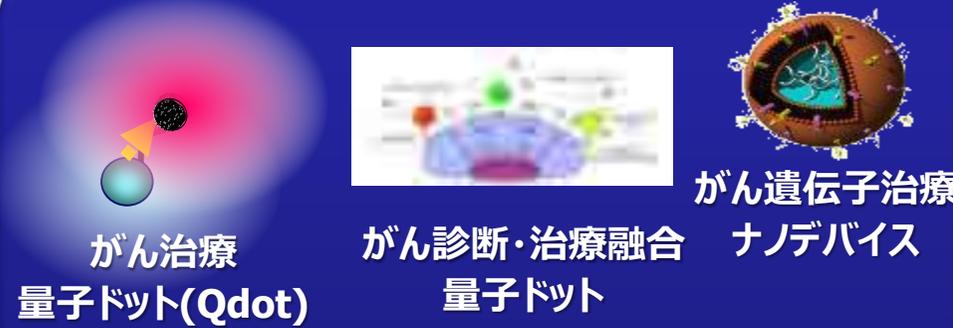
名古屋
大病院

がんの単一細胞診断 エクソソーム・miRNA診断



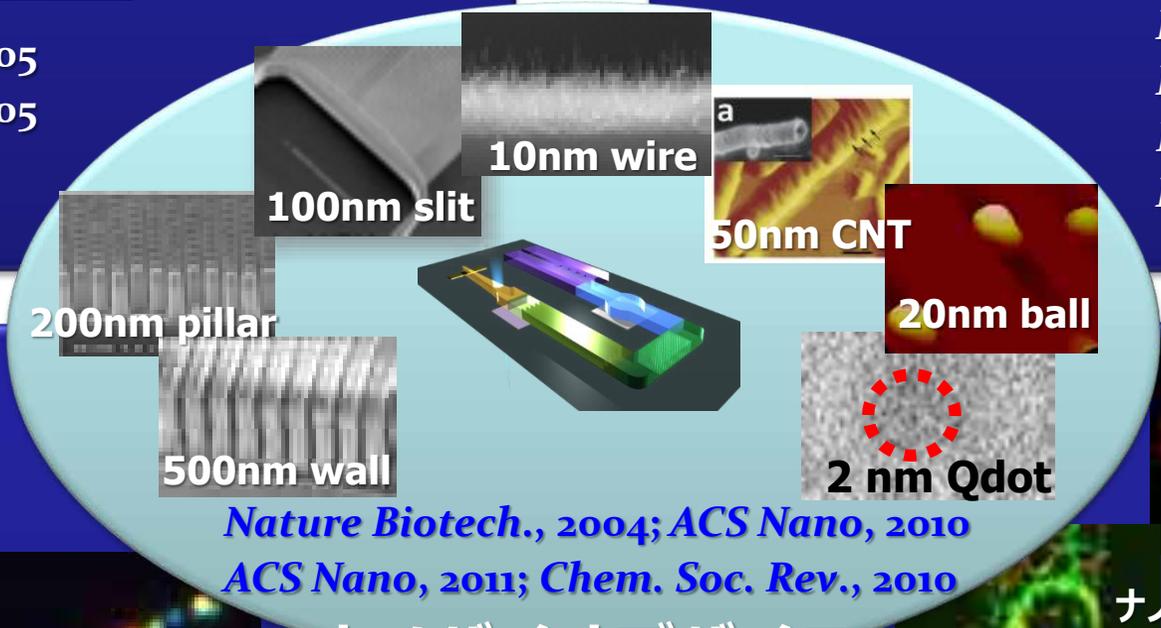
イムピラーがん診断
J. Am. Chem. Soc., 2005
J. Am. Chem. Soc., 2005
Lab on a Chip, 2010
ACS Nano, 2013

がん診断・治療融合



がん治療
量子ドット(Qdot)
 がん診断・治療融合
量子ドット
 がん遺伝子治療
ナノデバイス

Nature Biotech., 2004
Nano Lett., 2004
Biomaterials, 2011
Mol. Ther., 2011



Nature Biotech., 2004; *ACS Nano*, 2010
ACS Nano, 2011; *Chem. Soc. Rev.*, 2010

ナノバイオデバイス



ナノポア1分子ゲノム
DNAシーケンス
 1分子DNAメチル化検出
J. Am. Chem. Soc., 2006; *Anal. Chem.*, 2011
Nucleic Acid Res., 2012; *Nano Lett.*, 2013

1分子ゲノムDNA解析



1分子DNA
リアルタイム解析



カーボン
ナノチューブ(CNT)
細胞内精密制御
 細胞内1分子
イメージング
 iPS・幹細胞
イメージング再生医療
ACS Nano, 2011; *ACS Nano*, 2011
Nano Lett., 2012; *Biomaterials*, 2012

イメージング・iPS細胞再生医療

Contents

- **Single Cancer Cell Diagnosis for Cancer Metastasis Diagnosis :**
ミドリムシで単一がん細胞診断

ACS Nano, 2010; *Lab on a Chip*, 2011; *PLoS One*, 2012.

- **Nanobiodevices for Ultrafast Analysis of DNA and Nanopore Single DNA/microRNA Sequencing for Cancer Diagnosis:**
まばたきの瞬間にDNA解析

Nature Biotech., 2004; *Nano Lett.*, 2013; *ACS Nano*, 2013; *ACS Nano*, 2011; *Chem. Soc. Rev.*, 2010.
Kawai, et al., *Nature Nanotech.*, 2010 ; *Nature Commun.*, 2011; *Sci. Rep.*, 2011; *Sci. Rep.*, 2012.

- **Theranostic Nanobiodevice for Stem Cell Therapy and Gene Therapy of Cancer:**
量子ナノ構造でがんの診断・治療融合

Nature Biotech., 2004; *Nano Lett.*, 2012; *ACS Nano*, 2011; *Biomaterials*, 2010; *Biomaterials*, 2012.
ACS Nano, 2011; *Biomaterials*, 2011; *Mol. Therapy*, 2011; *RSC Adv.*, 2012; *Int. Biol.*, 2012.

Contents

- **Single Cancer Cell Diagnosis for Cancer Metastasis Diagnosis :**
ミドリムシで単一がん細胞診断

ACS Nano, 2010; Lab on a Chip, 2011; PLoS One, 2012.

- **Nanobiotechnology for Cancer Diagnosis and Therapy**
Single Cancer Cell Diagnosis for Cancer Metastasis Diagnosis
まは

Nature, 2010.
Kaw

- **The**
The
量子

Nature, 2012.
ACS

本日のキーワード

ミドリムシ/CTC

**ナノピラー/ナノポア/ナノワイヤ
幹細胞治療/量子ドット/CNT**

がんの診断を行うには？

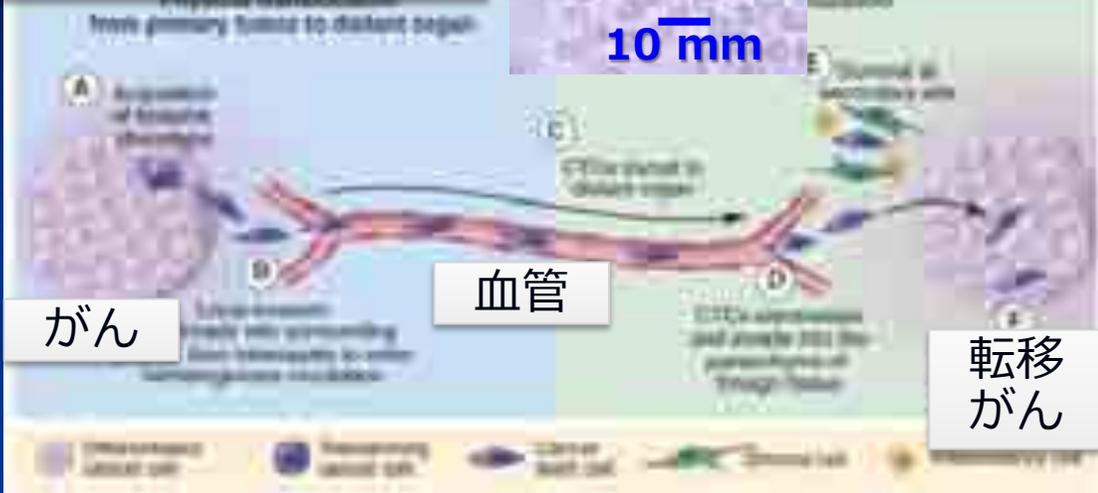
がん組織

がん細胞

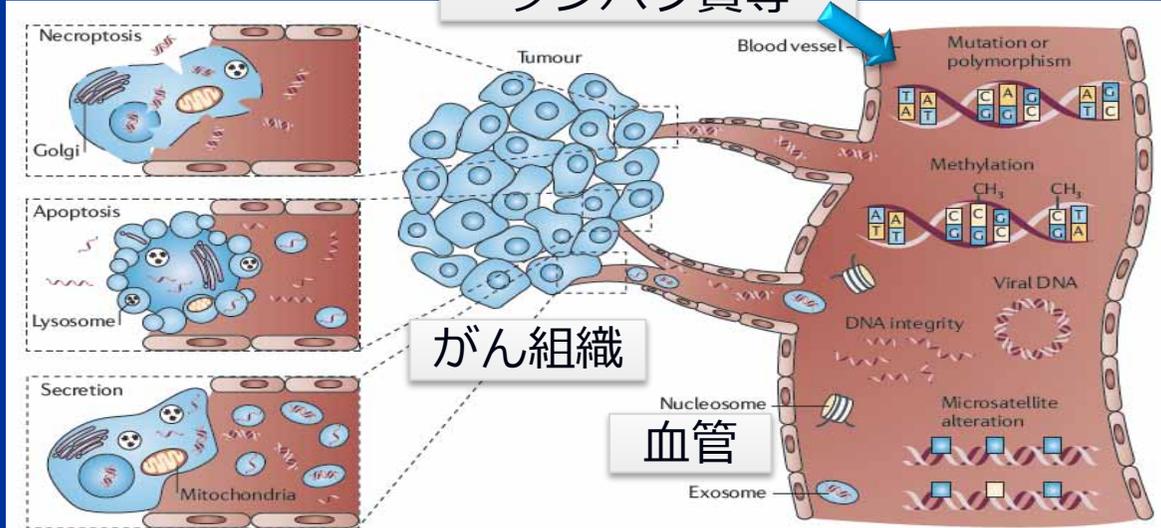
がん(PET+CT)



がん(内視鏡)



遺伝子、DNA
タンパク質等

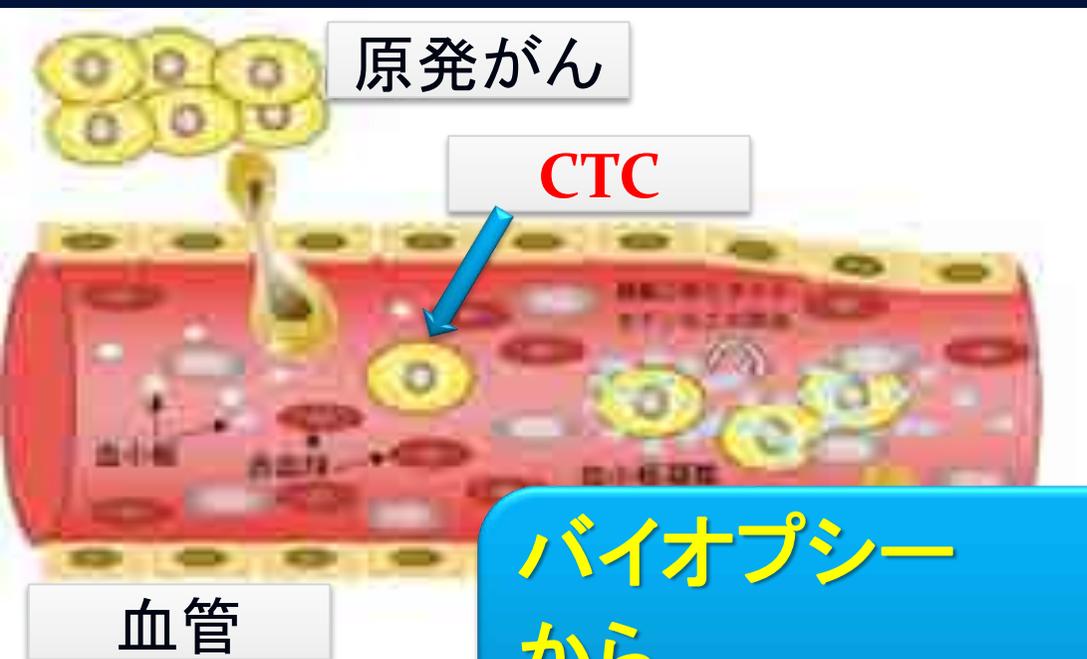


がん関連生体分子等
遺伝子, DNA, miRNA,
エクソソーム,
タンパク質, 代謝物など

Science, 2011, 331, 1559; Cell, 2012, 150, 12;
Science, 2013, 339, 1546; Nature, 2013, 494, 290.

Figure 1 | Cell-free nucleic acids in the blood. Mutations, methylation, DNA integrity, microsatellite alterations and

血中循環がん細胞(CTC)検出によるがん転移診断



<http://www.med-tohoku-antibody.com/history/podoplanin2.html>

血液10 mL中

CTC: 数個～数十個

半減期1-2時間

RBC: 400億～500億

WBC: 3千万～9千万

バイオプシー
から

リキッドバイオプシーへ

分離

細胞抽出

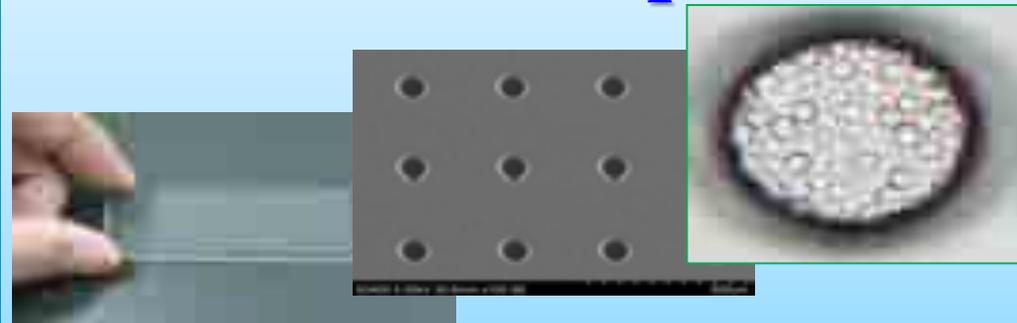
DNA配列、RNAなどの検出

乳がん、大腸がん、前立腺がん
などの転移性がんにおける予後
予測や治療効果判定

- 画像検査では発見できない転移診断
- 手術後の抗がん剤治療の必要性判断
- 採血のみで検査できるので低侵襲
- 治療経過を追って頻度多く検査可能

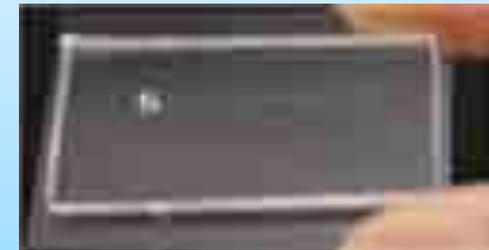
Microfluidic Devices for CTC detection

Cell Chip



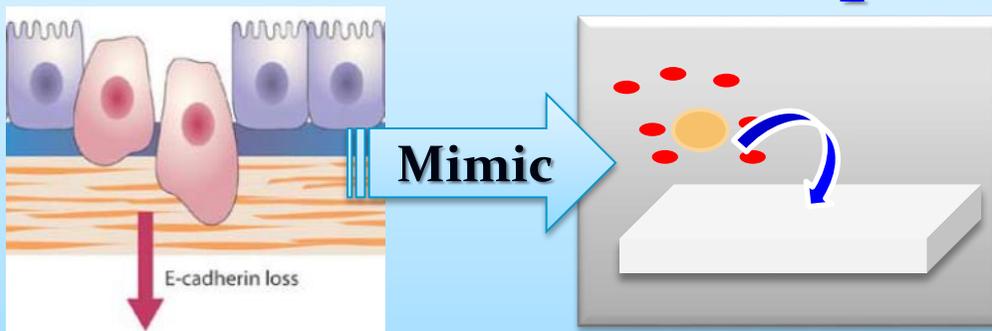
ACS Nano, 2010; *PLoS One*, 2012.

Euglena Chip



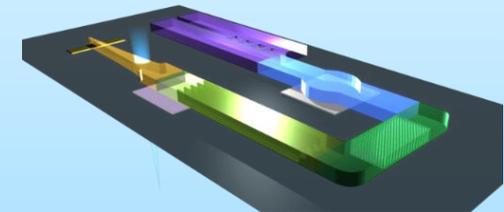
MicroTAS, 2012.

Cancer Invasion Chip



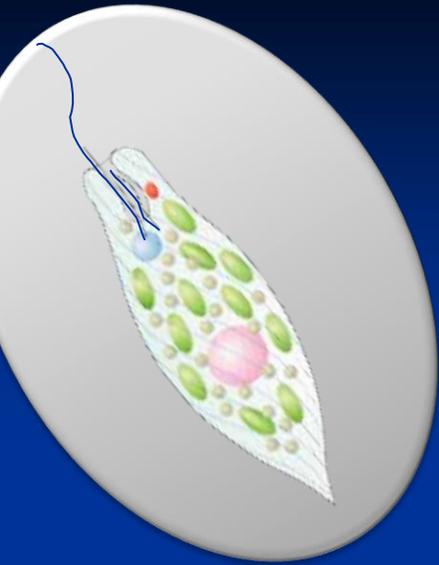
MicroTAS, 2012.

miRNA/Exosome Chip



Nature Biotech., 2004;
Nano Lett., 2013;
ACS Nano, 2013; *ACS Nano*, 2011

Separation of CTC by *Euglena*



<http://www.kenq.net/ill/index.html>

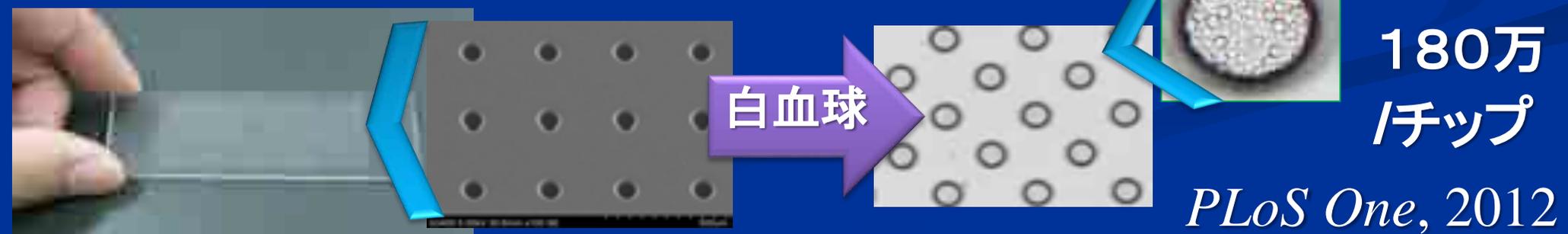
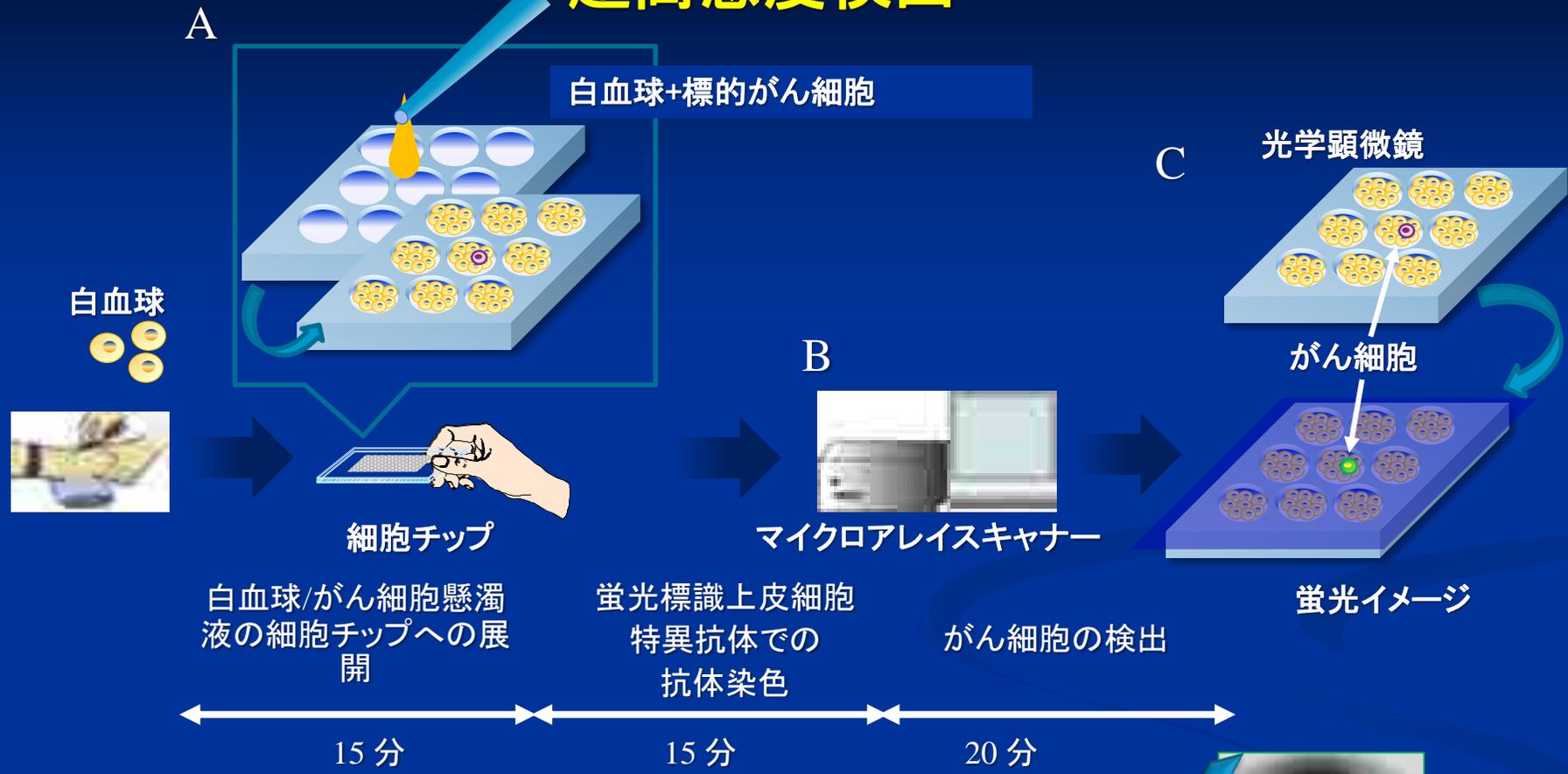
上記の図をもとに改変

—
30 μm

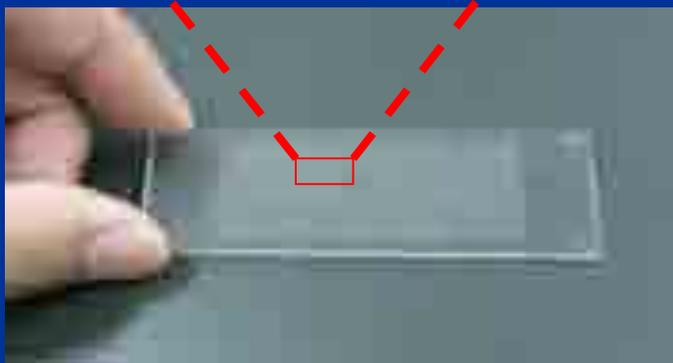
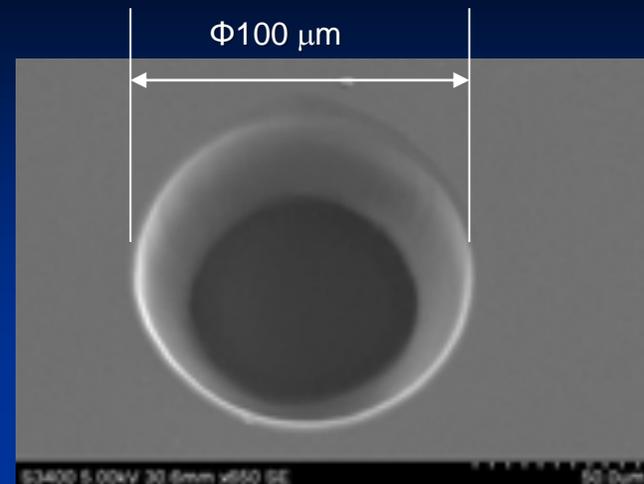
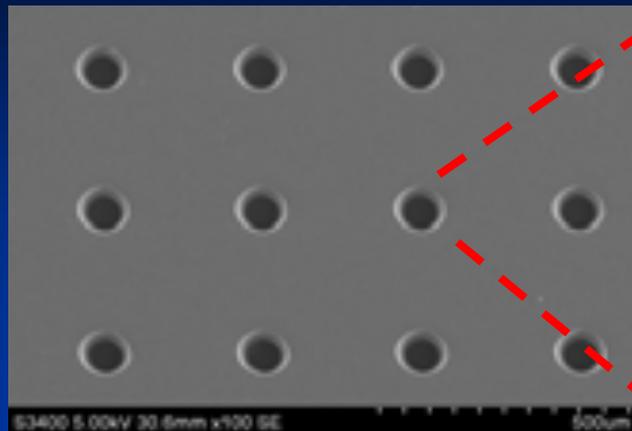
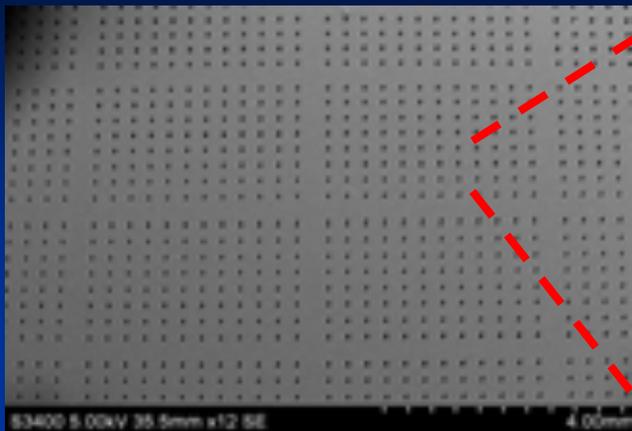
- Unicellular protists
(Less than 100 μm)
- Both plant and animal features
Move by using a large flagellum
Photosynthesis
- Phototaxis
100-150 $\mu\text{m/s}$

Euglena (eu=beautiful + glena=eye) are the organisms that Dutch microscope pioneer **Anton van Leeuwenhoek** saw in 1674 in a sample of pond water. They have chlorophyll to produce food from sunlight, for instance, and also can ingest food. They have a primitive “eye” and a long tail or flagellum that moves like a whip to propel them through the water.

細胞チップを用いたCTC(circulating tumor cell)の 超高感度検出



がん細胞検出チップ



ポリスチレンチップ(スターライト工業)

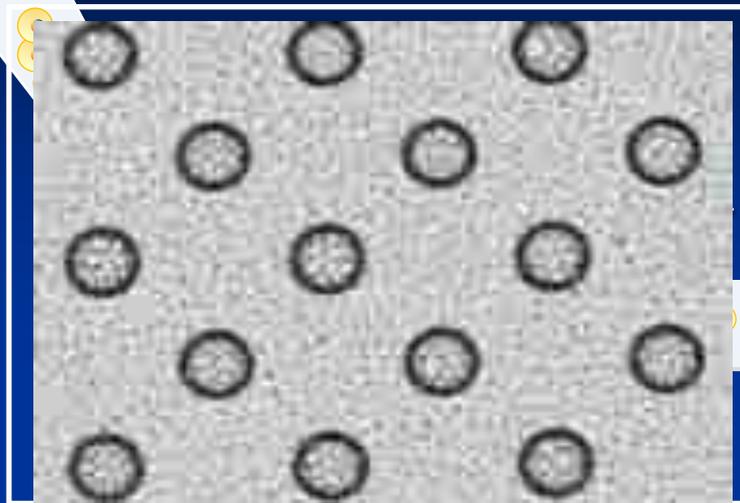
- ・ウエル: ϕ 100 μm , 深さ 50 μm
- ・ウエル間ピッチ: 300 μm
- ・1クラスター内のウエル: 12x8
- ・クラスター間隔: 400 μm
- ・クラスター配列: 14x8 ウエル総数: 20,944個

PLoS One, 2012

マイクロチャンバーの形状と細胞チップ表面全体のRIE処理

多数の細胞のマイクロチャンバー底での単層配列が可能

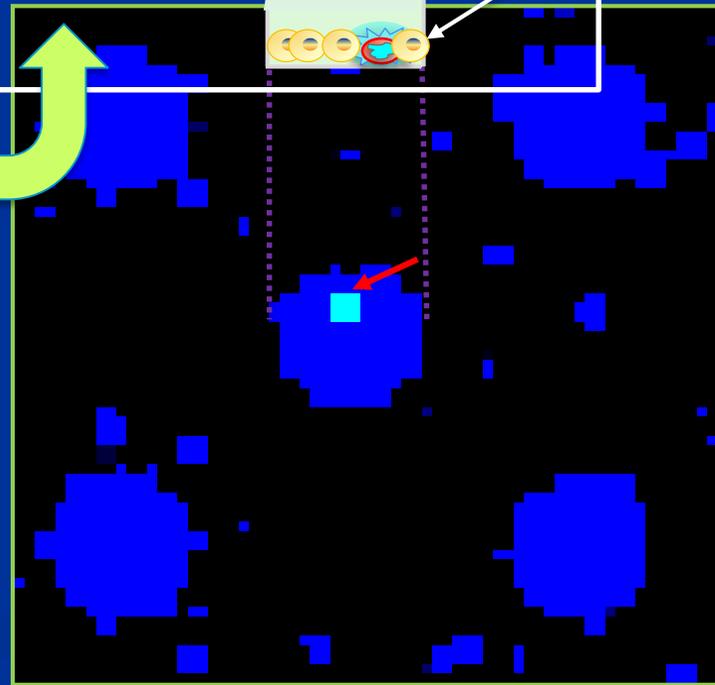
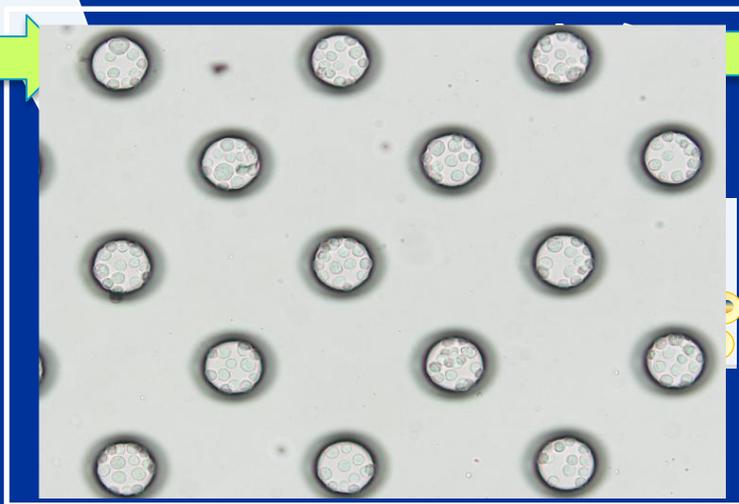
白血球中のがん細胞検出



抗体染色
15分
+
洗浄

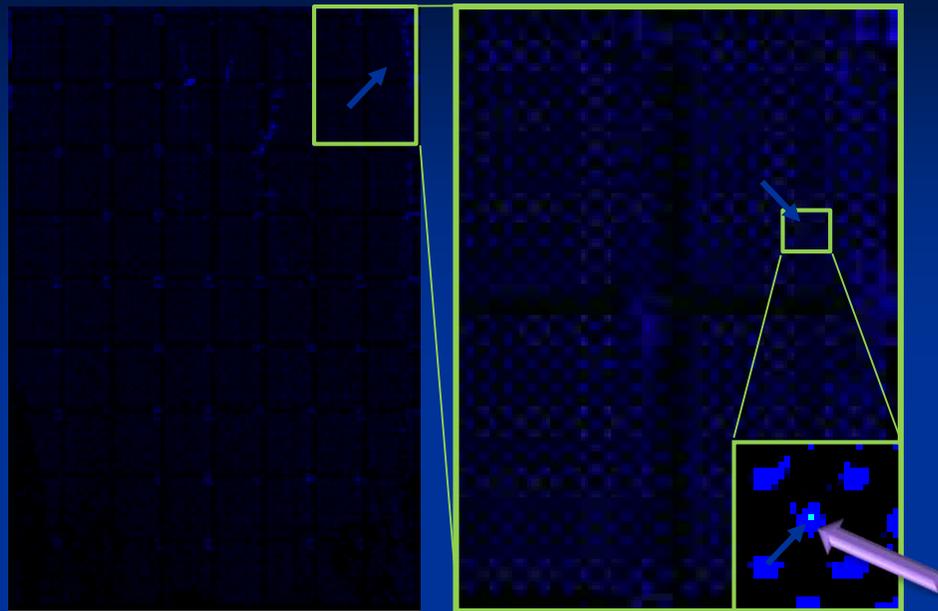
検出
20分

白血球を
単層配列



180万細胞/チップ

血液中のがん細胞検出



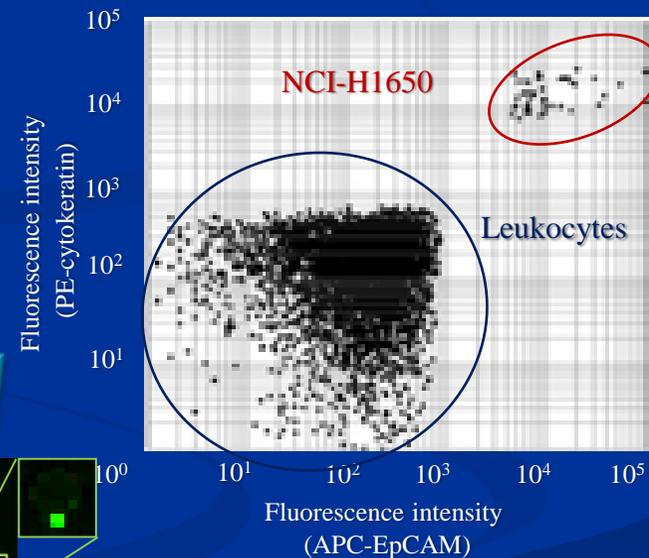
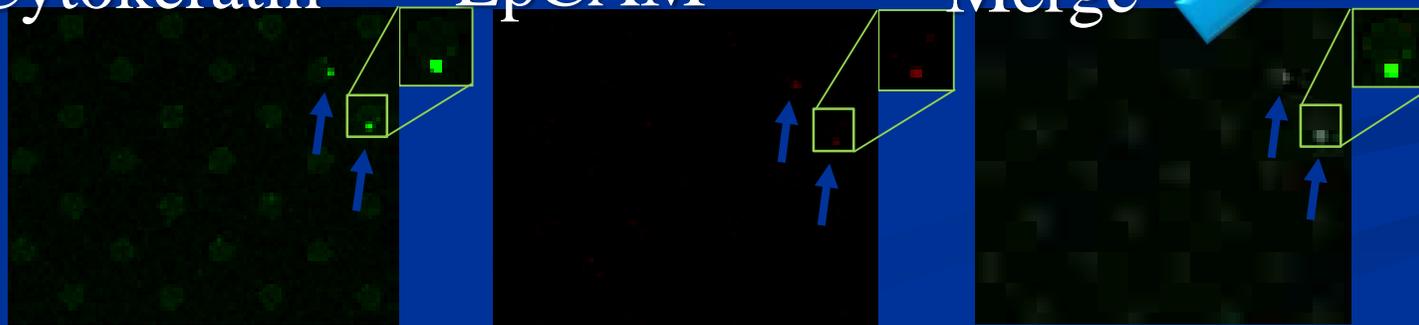
0.0001% (100万個に1個)
1個/997,832個 (184 clusters)

血液中のがん細胞

Cytokeratin

EpCAM

Merge



Contents

- **Single Cancer Cell Diagnosis for Cancer Metastasis Diagnosis :**
ミドリムシで単一がん細胞診断

ACS Nano, 2010; Lab on a Chip, 2011; PLoS One, 2012.

- **Nanobiotechnology for Cancer Diagnosis and Therapy**
Single Cancer Cell Diagnosis for Cancer Metastasis Diagnosis
まは

Nature, 2010.
Kaw

- **The**
The
量子

Nature, 2012.
ACS

本日のキーワード

ミドリムシ/CTC

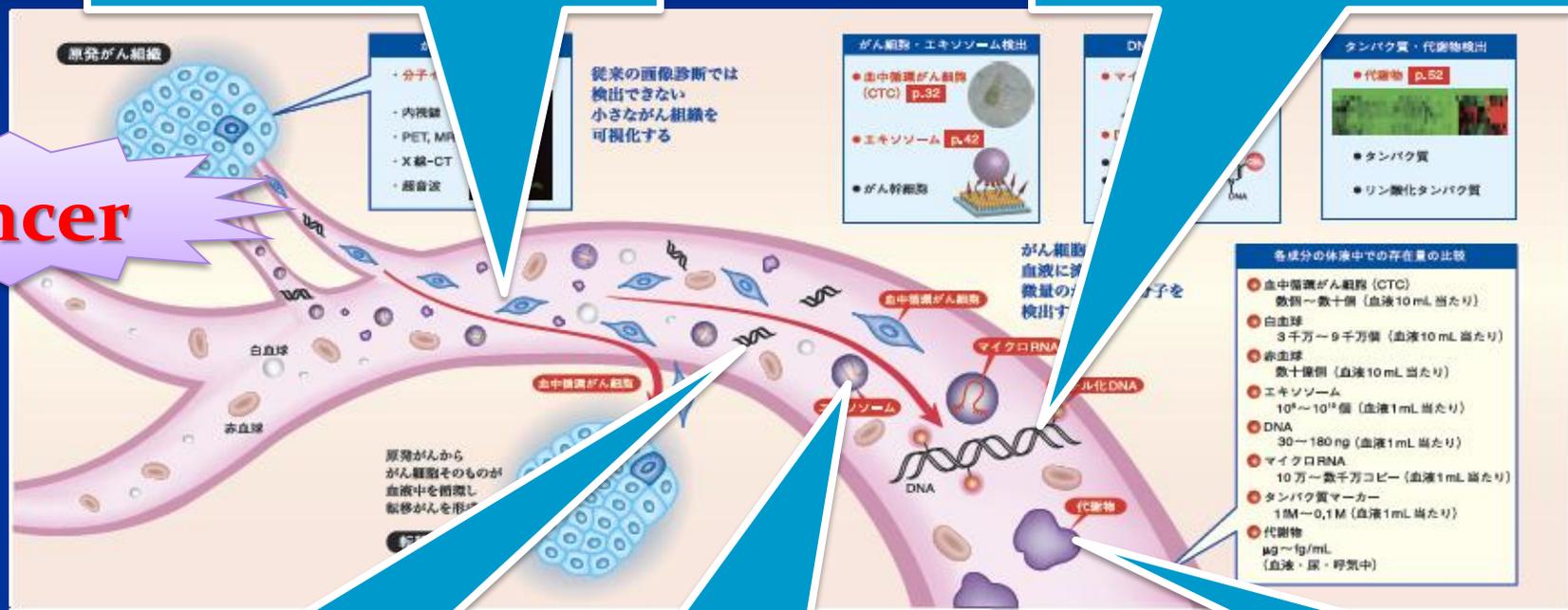
**ナノピラー/ナノポア/ナノワイヤ
幹細胞治療/量子ドット/CNT**

Analytical Challenges for Cancer Diagnosis

5-100 CTCs in
10 mL Blood

Methylated DNA
30-180 ng/mL Blood

Cancer



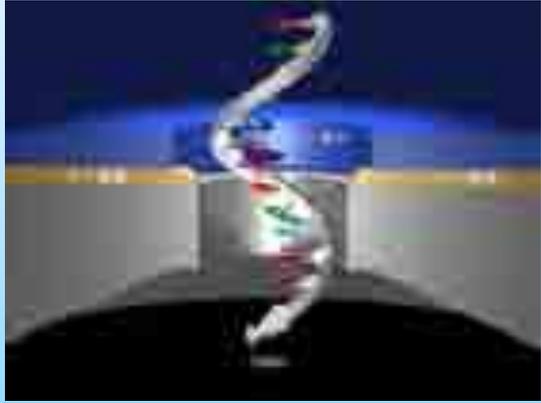
miRNA
100 k clones/mL

Exosomes
 $10^8/\text{mL}$ Blood

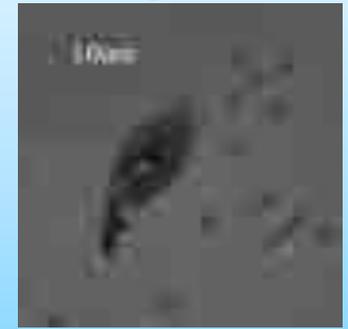
Metabolites
ng-fg/mL Blood

Nanopore-Nanopillar Integration

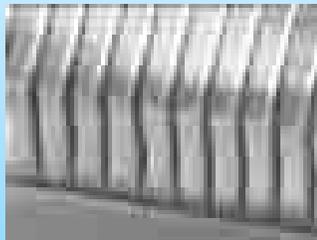
Nanopore



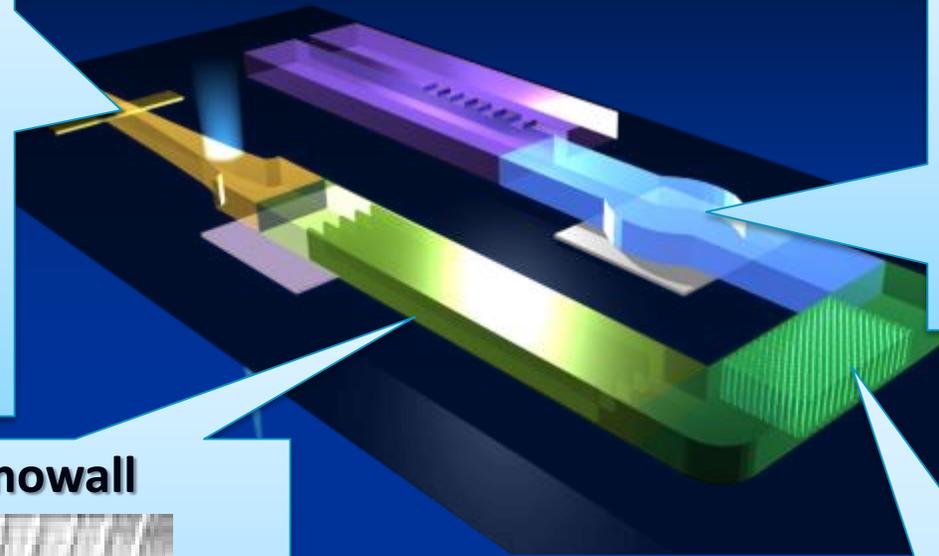
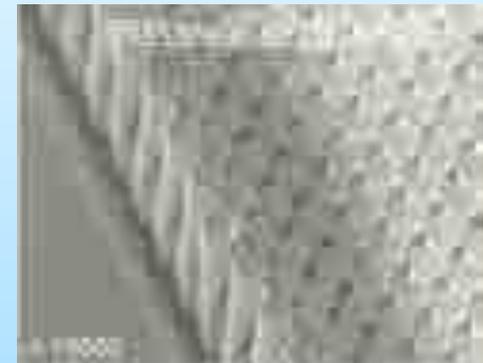
Euglena



Nanowall



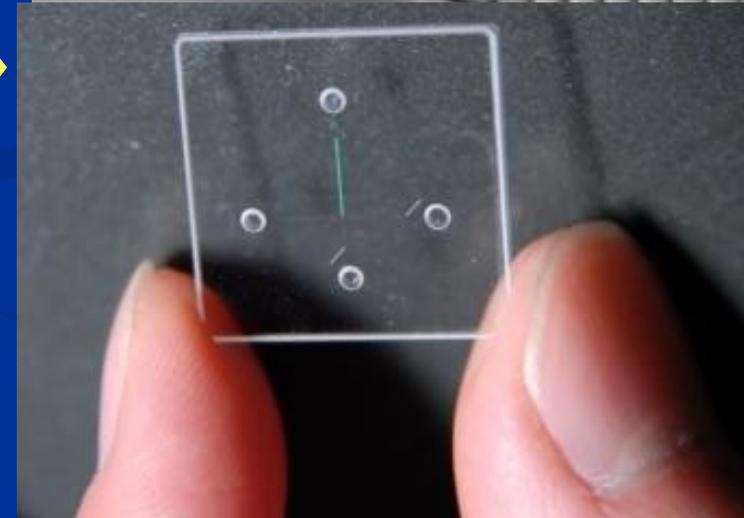
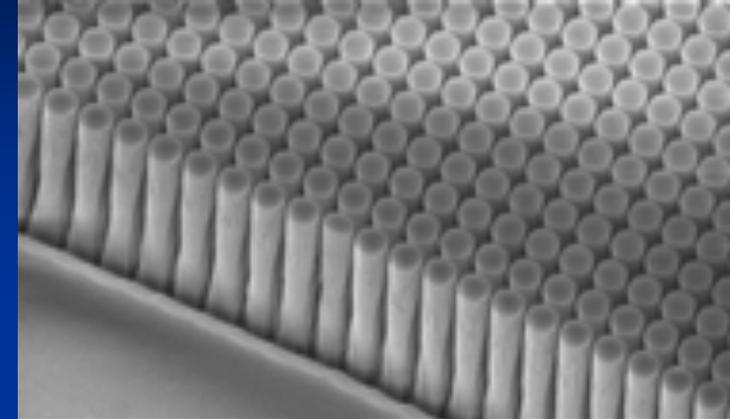
Nanopillar



Single Molecular Genome, miRNA, Proteins, and Other Biomolecules Sequencing and Quantitation

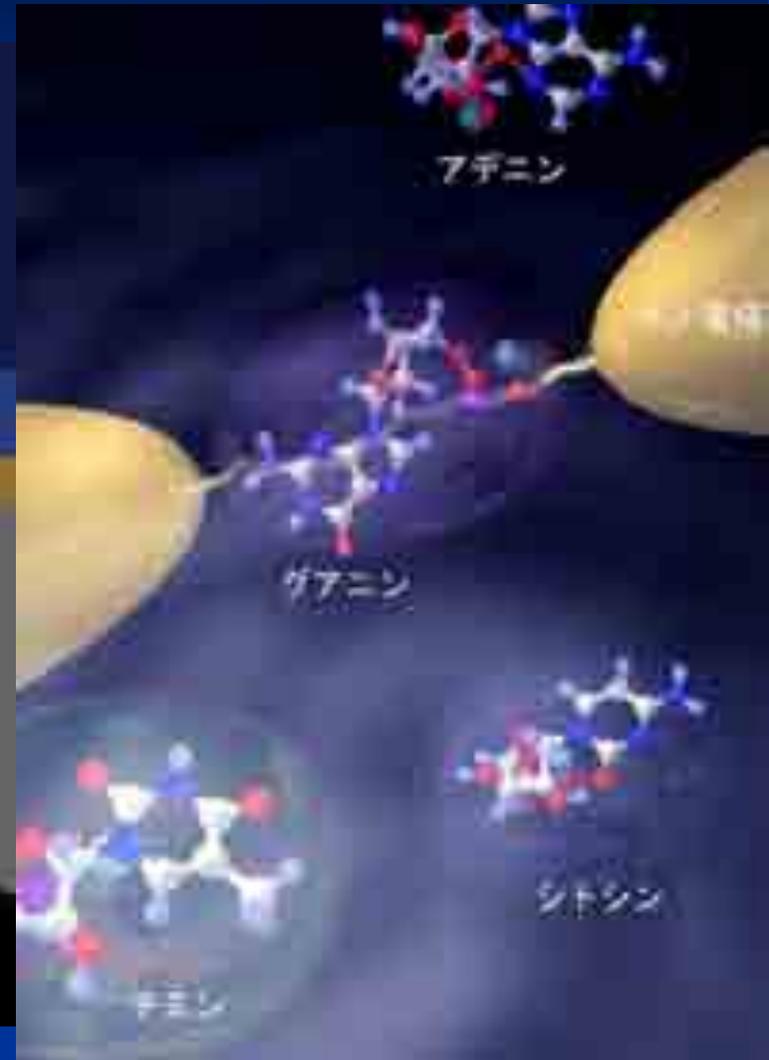
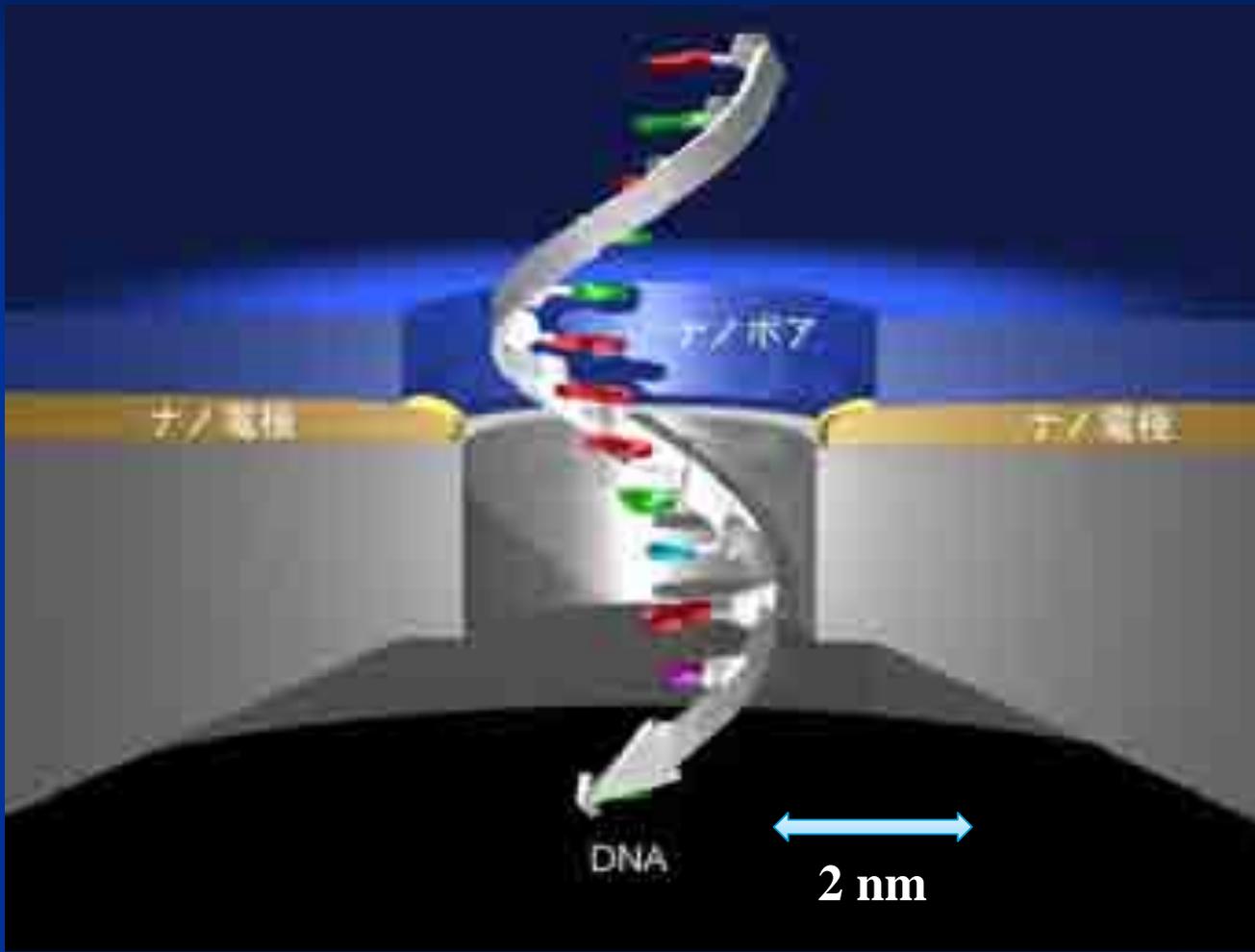
Nature Biotech. 2004; *Nano Lett.*, 2013; *ACS Nano*, 2013; *ACS Nano*, 2011

大型検査機器を手のひらに

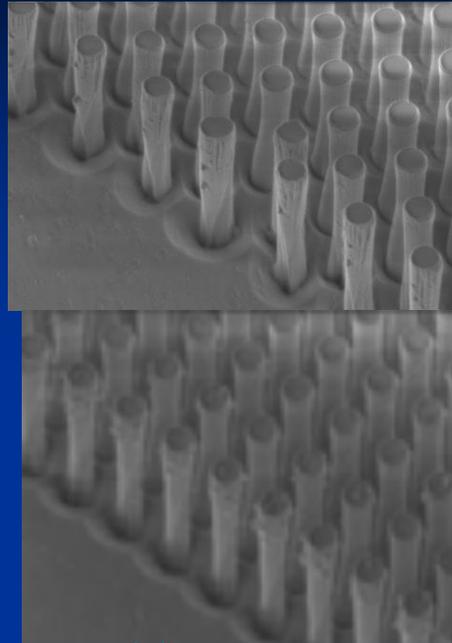


名大病院臨床検査室

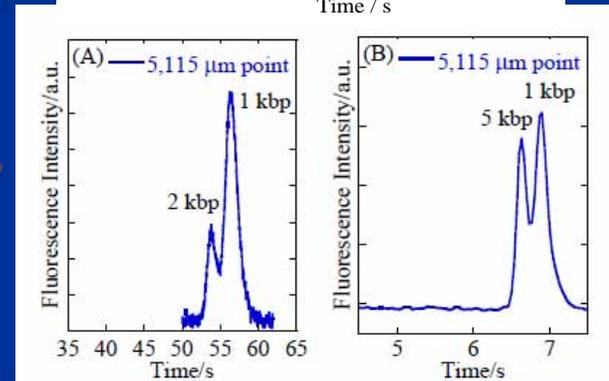
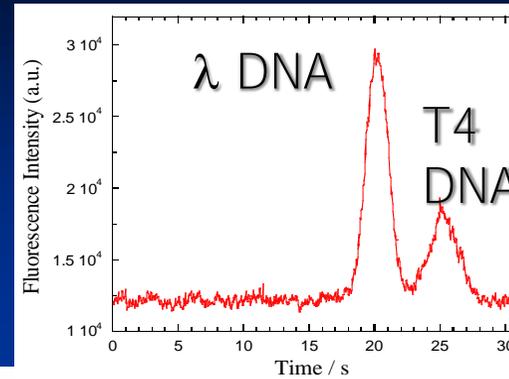
Nanopore DNA Sequencing (3.6 Gbp/h) Collaboration with Prof. Kawai



1G Nanopillar Based Separation of DNA



500 nm

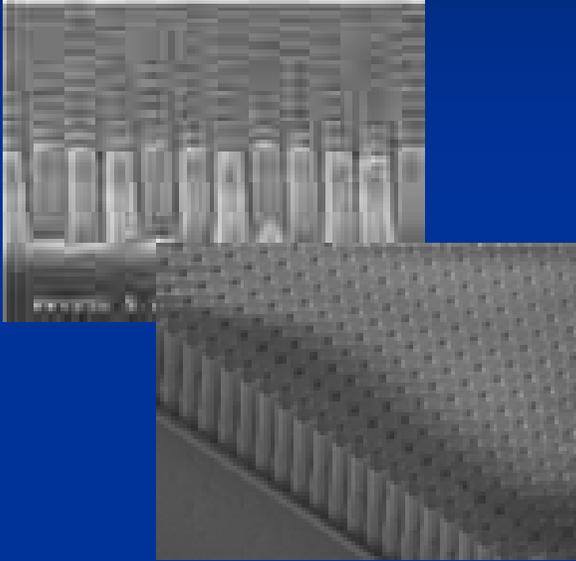


λ DNA (48.5 kbp)
520 nm

T4 DNA (165.6 kbp),
970 nm

Nature Biotech., 2004; *Anal. Chem.*, 2004

Molecular Sieving in Nanostructure



$$\ln \mu = \ln \mu_0 - c\lambda TN$$

$$\mu/\mu_0 = f = \exp [-\pi L' (r+Rg)^2 \times 10^{-14}]$$

$$L' = Tl' \times 10^{-2} \quad T: \text{gel concentration}$$

$$\ln \mu/\mu_0 = -\ln t/t_0 = -\pi l' (r+Rg)^2 T \times 10^{-16}$$

$$\langle Rg^2 \rangle = (1/3)pL [1 - p/L + (p/L)\exp(-L/p)]$$

$$\langle Rg^2 \rangle \doteq (1/3)pL = \lambda N$$

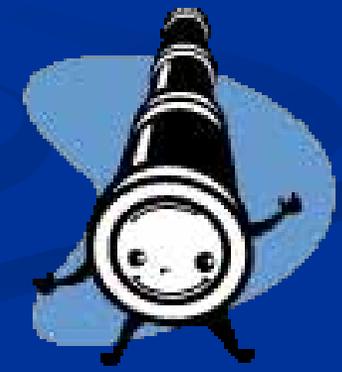
Rg: radius of gyration

まばたきの瞬間にがん遺伝子を測る

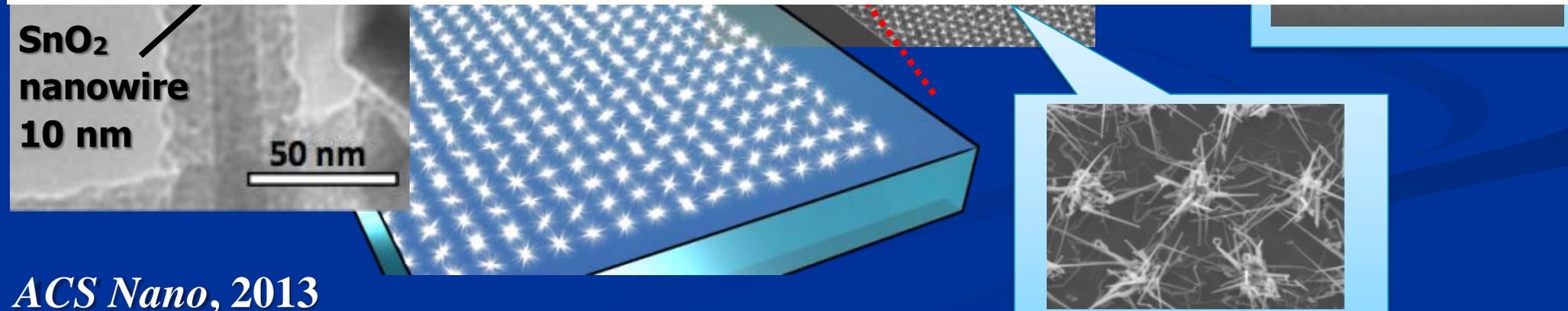
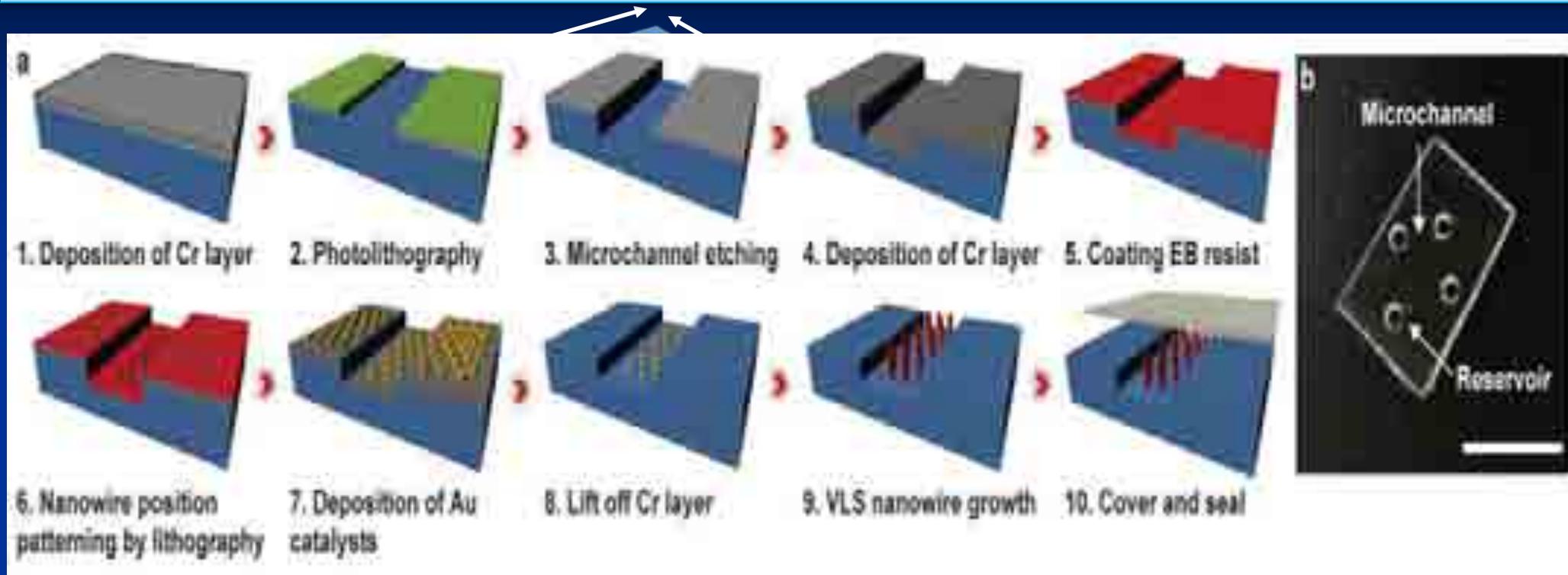
1960年代	ゲル	5時間	1倍
1990年代	キャピラリー	15分	20倍
2000年代	マイクロチップ	3分	100倍
2004年	第1世代ナノピラー	10秒	1800倍
2010年	第2世代ナノピラー	100ミリ秒	18万倍
2011年	第3世代ナノピラー	500 μ 秒	3600万倍
2012年	第3世代ナノピラー	64 μ 秒	2億8千万倍

まばたきの速さ

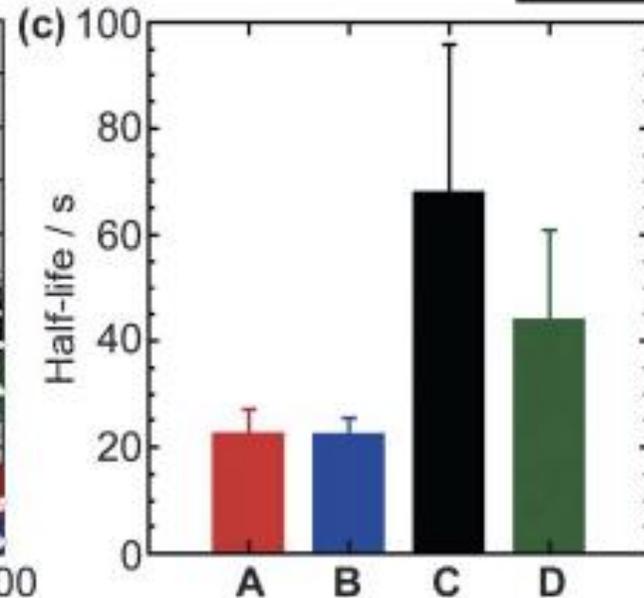
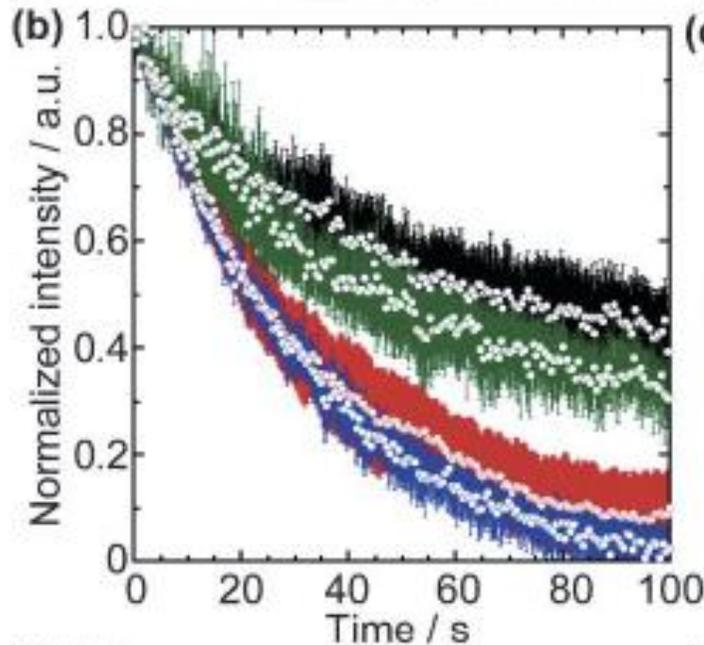
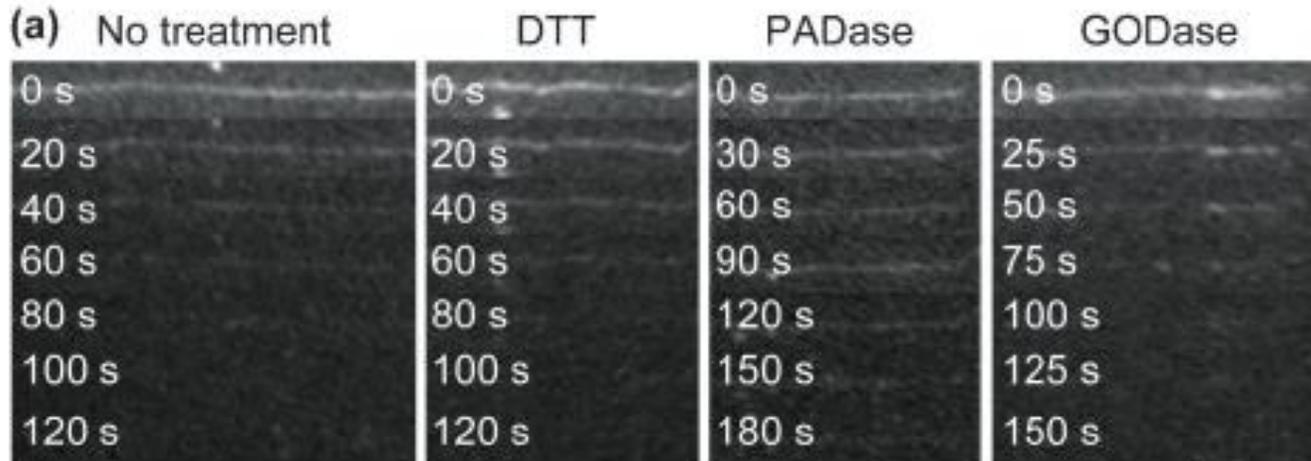
100~150ミリ秒



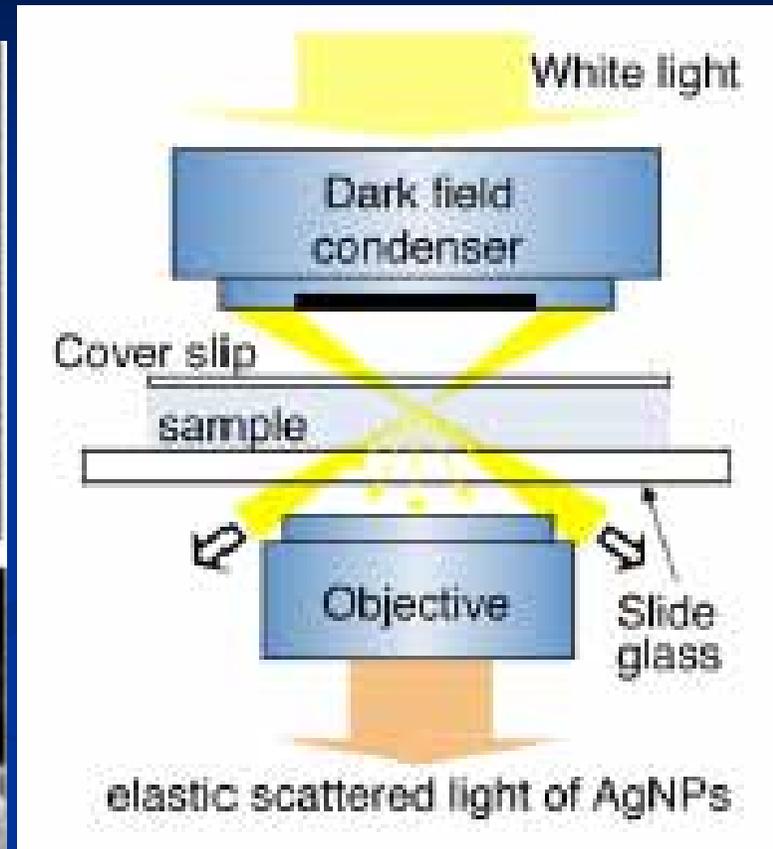
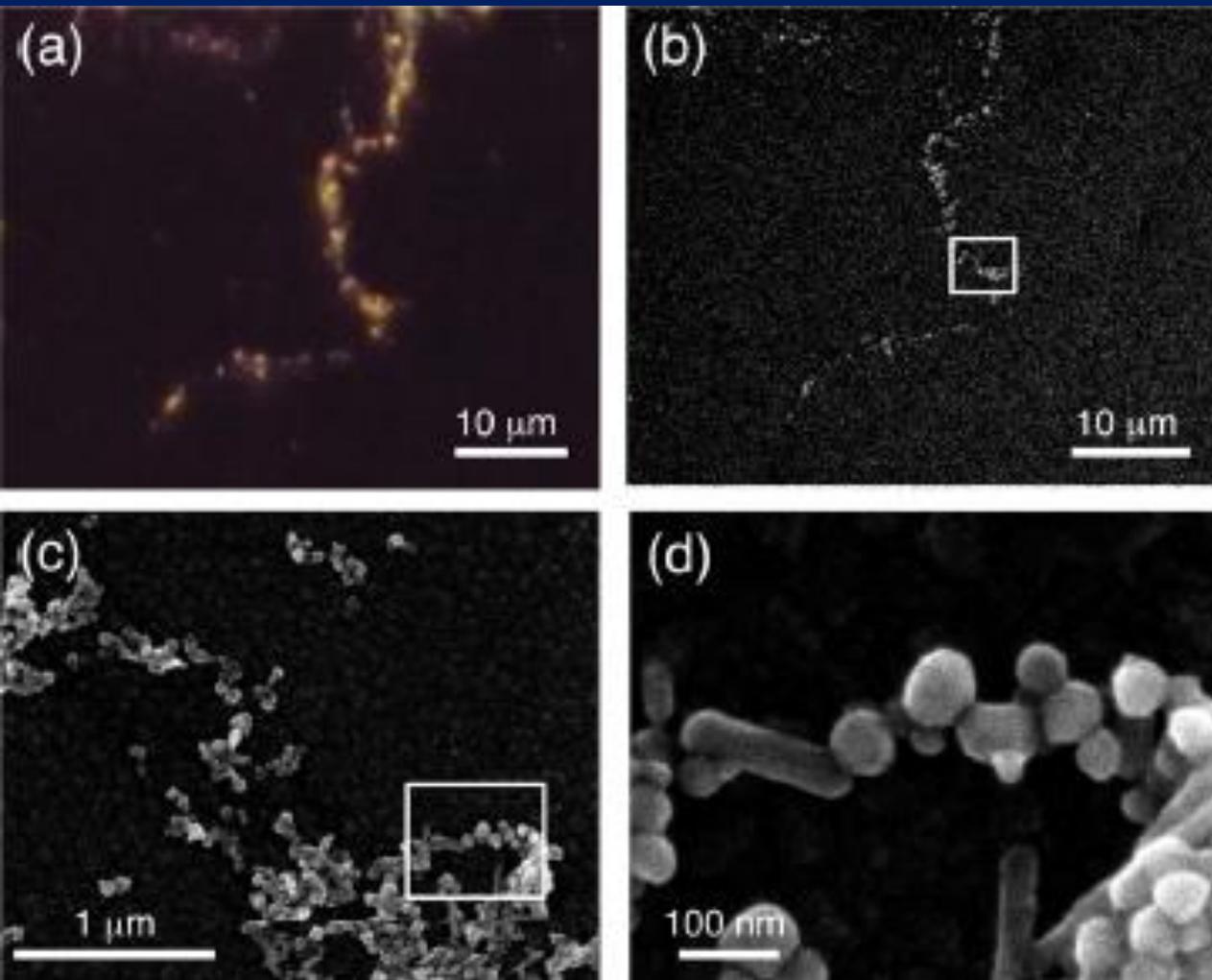
Nanowire Array Device



Single Molecule DNA Long-Term Fluorescent Observation

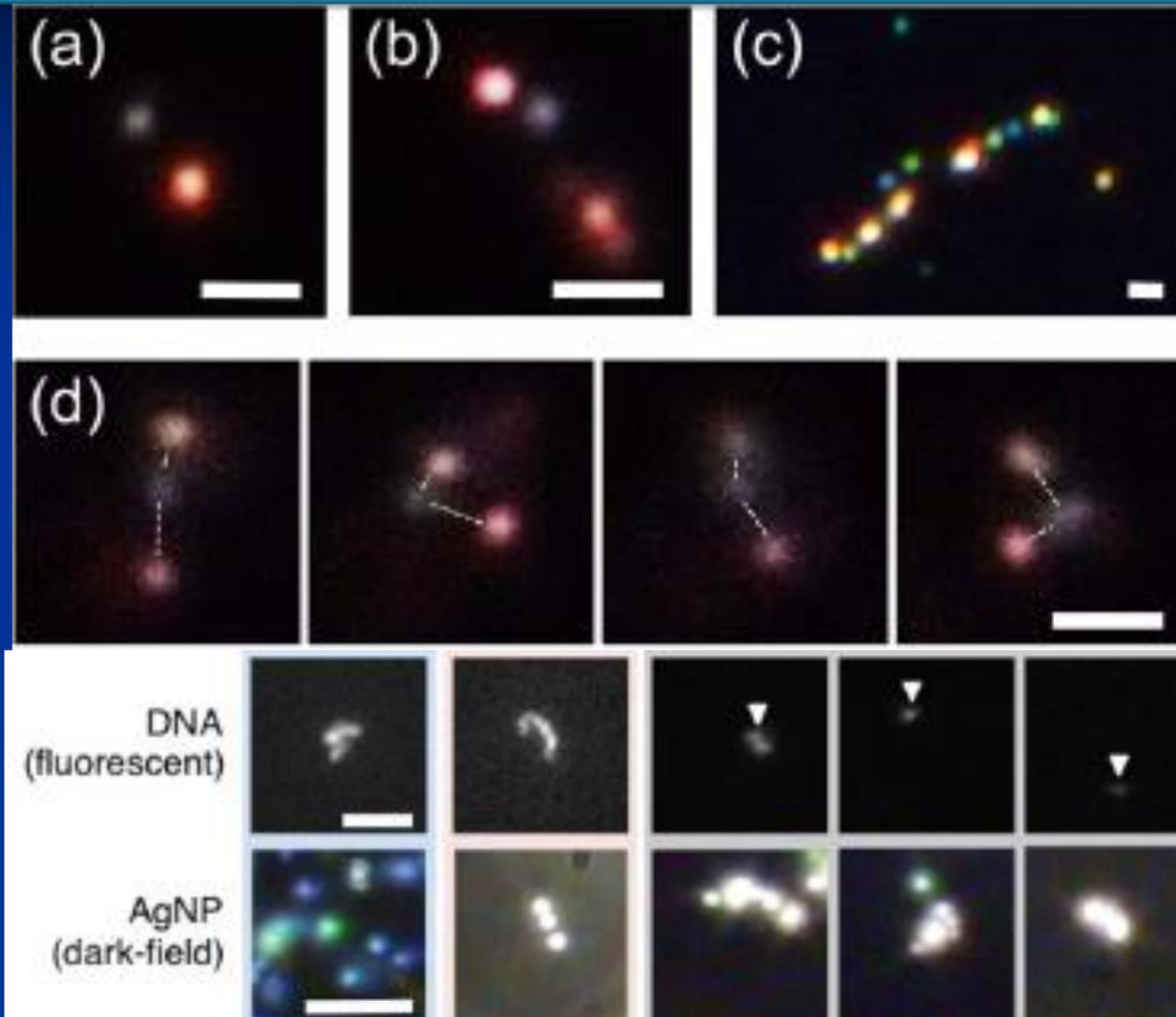


Single Molecule Imaging of Ag Nanoparticle Binding DNA



Over 7 min (420 s)

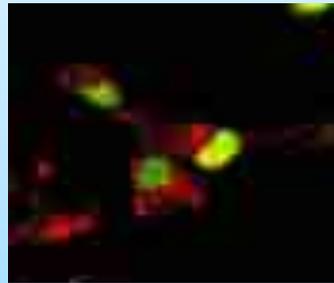
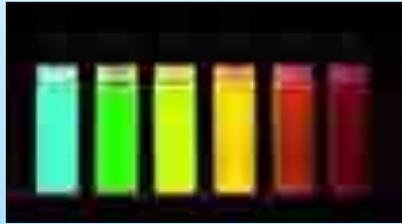
Single Molecule Imaging of Ag Nanoparticle Binding DNA



Nano Lett.,
2013.

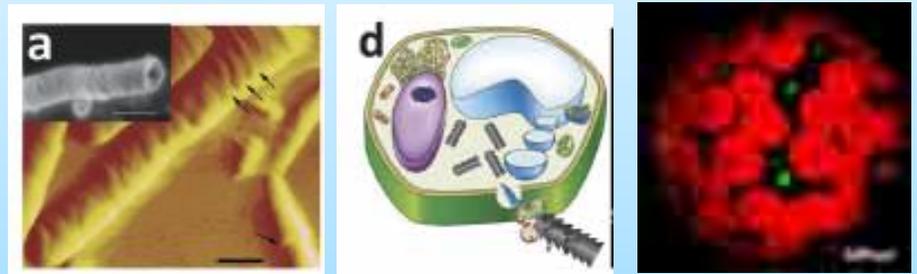
Single Cell Nanoimaging and *in vivo* Imaging

Quantum Dots



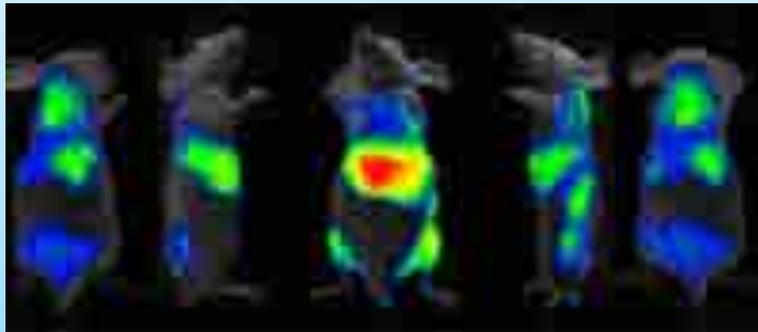
Nature Biotech., 2004; *Nano Lett.*, 2004; *JACS*, 2006; *ACS Nano*, 2010.

Carbon Nanotubes



Nano Lett., 2012; *ACS Nano*, 2011; .
ACS Nano, 2011.

In vivo Imaging



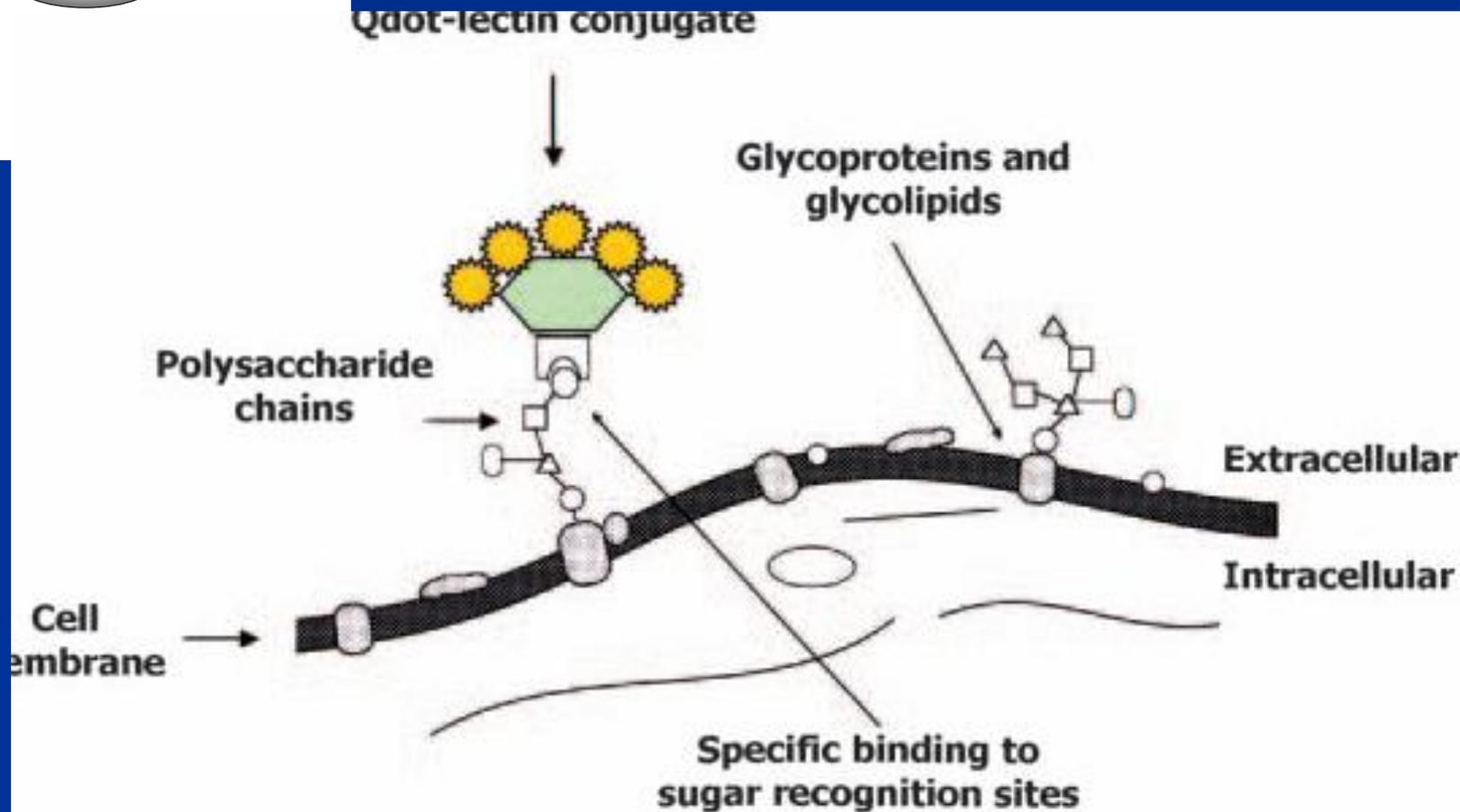
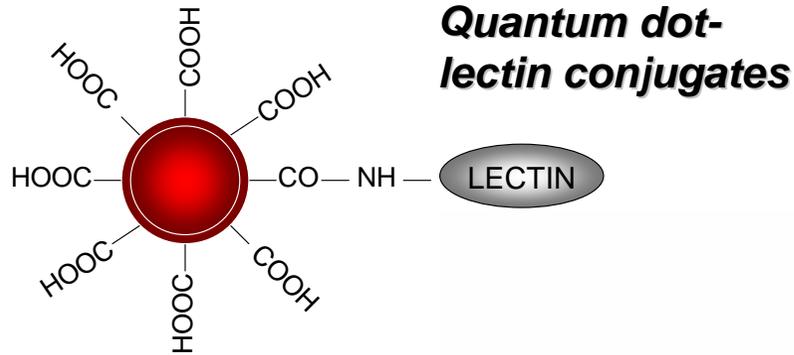
Biomaterial, 2010; *Biomaterial*, 2012.

MEND



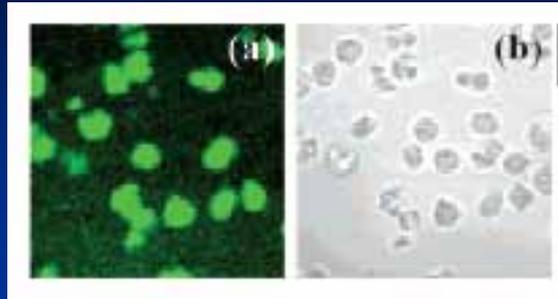
Biomaterial, 2011; *Mol. Ther.*, 2011.

Selective Detection of Cancer Cell by QD conjugated with Lectin

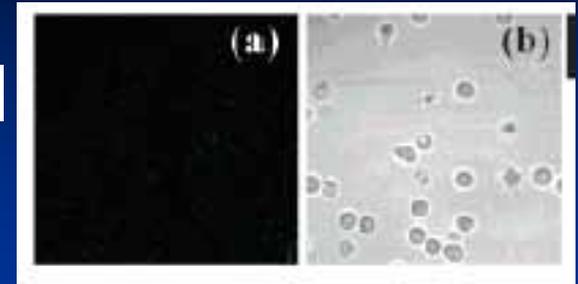


Selective Detection of Cancer Cell by QD conjugated with Lectin

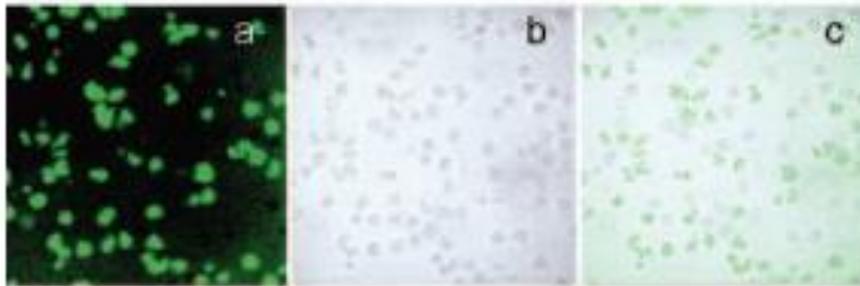
Cancer Cell



Normal Cell



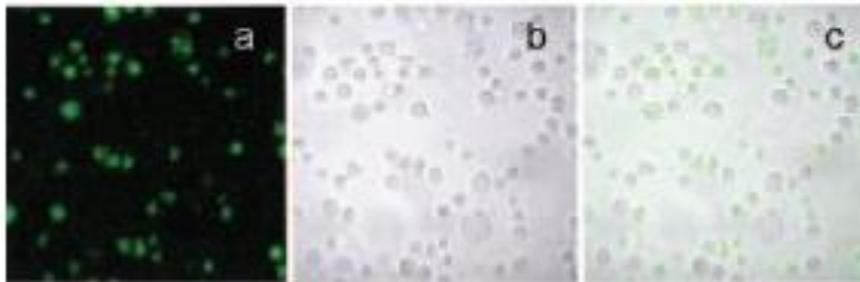
A. Leukemia cells (Jurkat) + QD-SBA



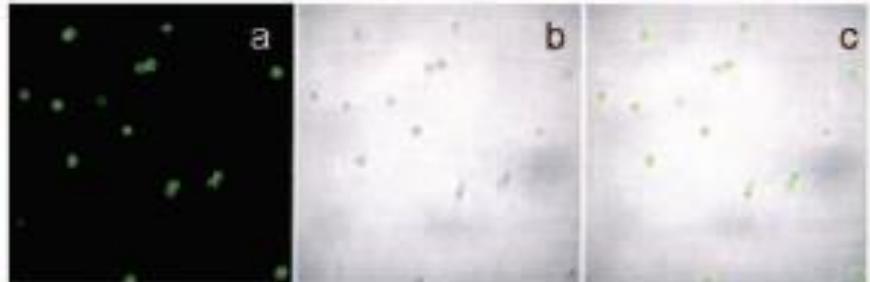
B. Normal lymphocytes + QD-SBA



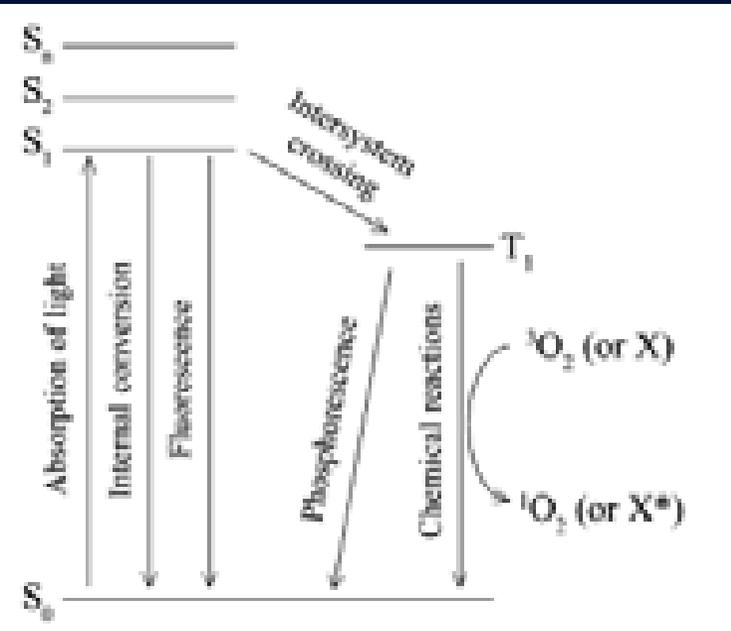
C. Leukemia cells (Jurkat) + FITC-SBA



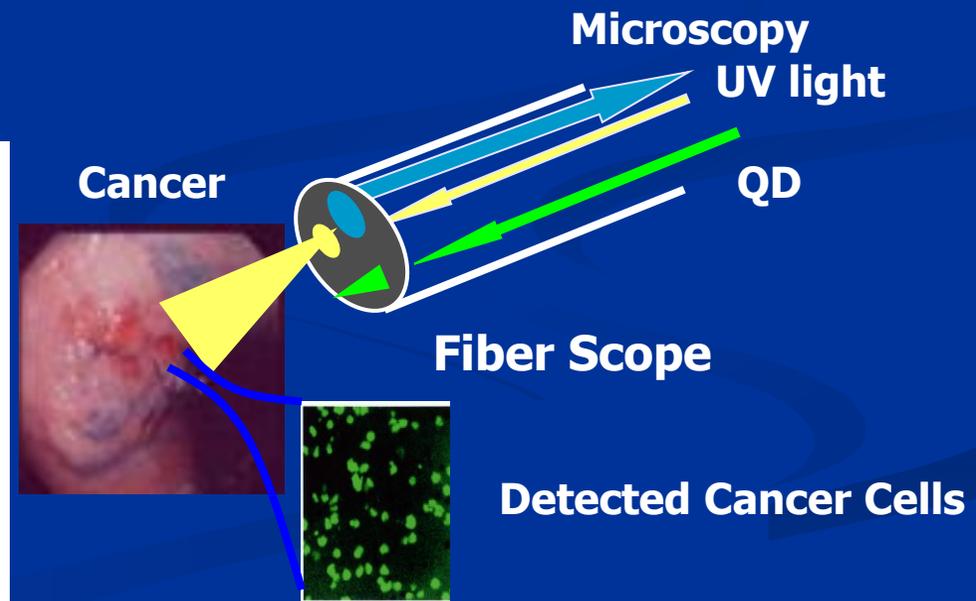
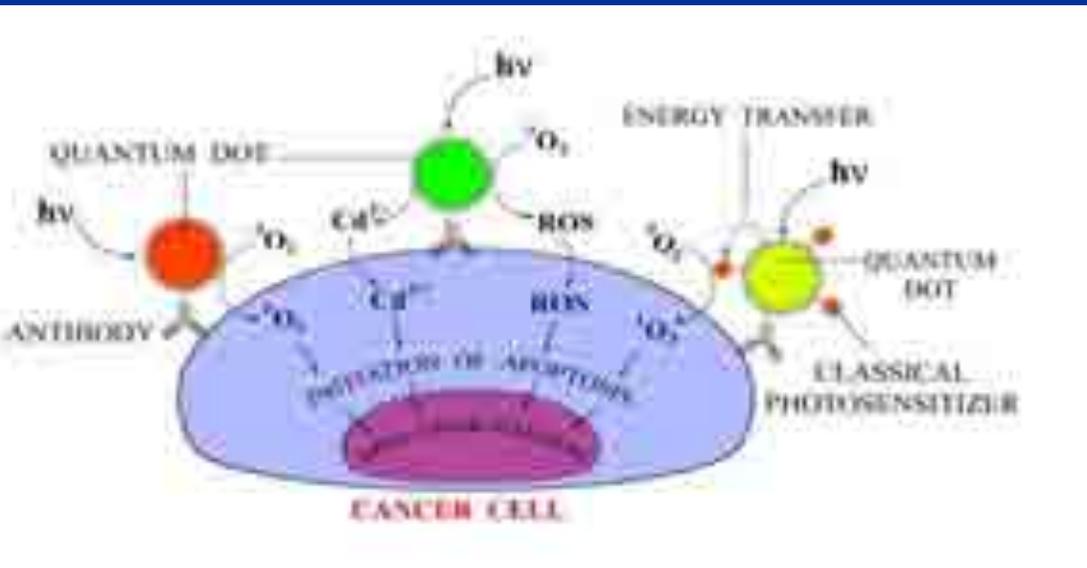
D. Normal lymphocytes + QD-WGA



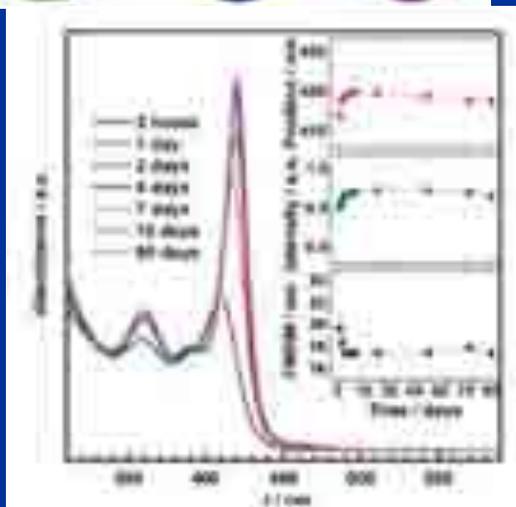
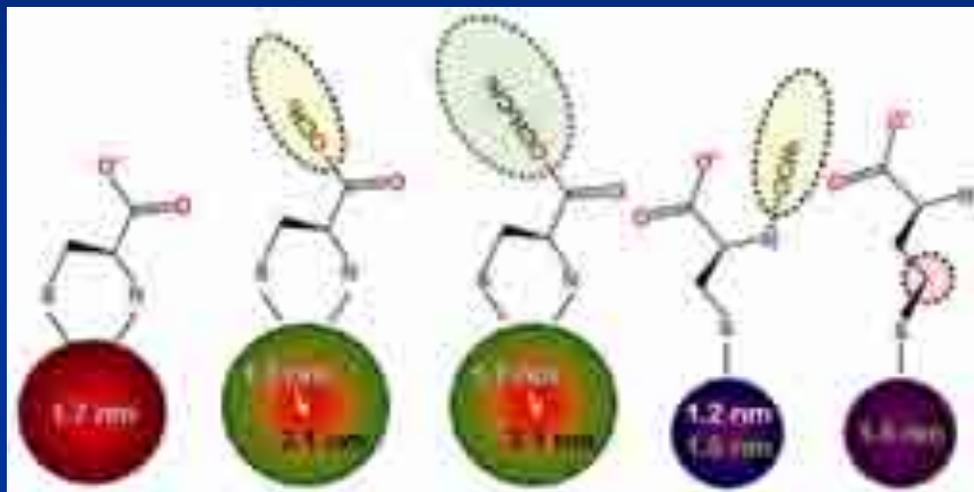
Integration of Diagnosis and Therapy by QD



Cell	Non-treated	+UV	+QD +UV	+QD+TF PZ+UV
normal	92 ± 4	86 ± 7	88 ± 6	89 ± 4
leukemia	84 ± 11	72 ± 12	64 ± 9	52 ± 10



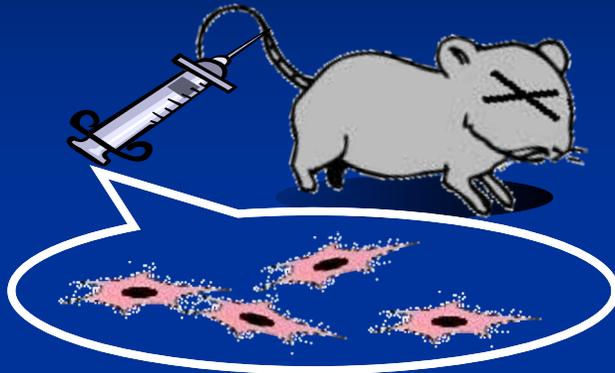
Capping Molecule-Based Control for Size and Stabilization of CdSe Qdot preparing in Aqueous Solution at Room Temperature



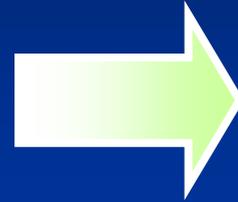
- The capping molecules should have at least one functional group with strong nucleophilicity as well as another free, charged group.
- Monodentate ligands were more effective than bidentate ligands for restricting size of the Qdots smaller, whereas less effective for getting a narrow size distribution
- The capping molecules having a relatively compact outermost spatial geometry led to Qdots with excellent long-term stability.

Optical/MR Imaging for Stem Cell Therapy

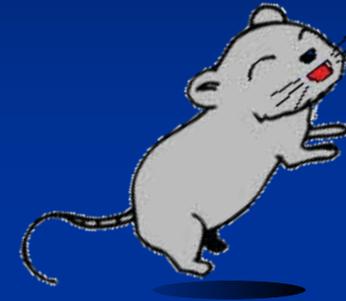
Acute Liver Failure
Mouse



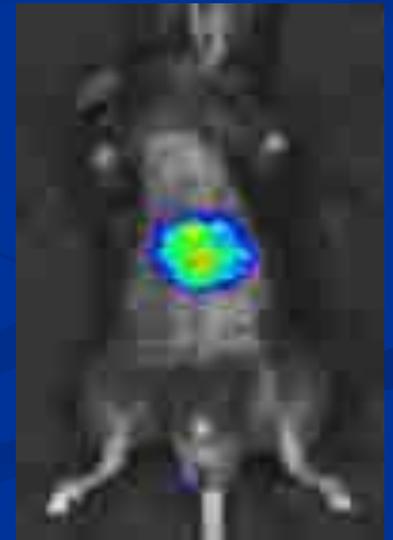
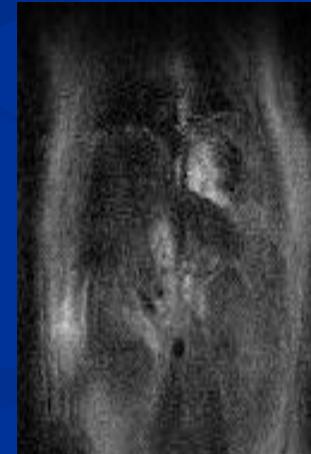
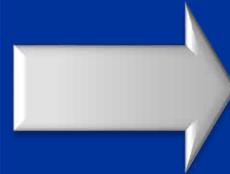
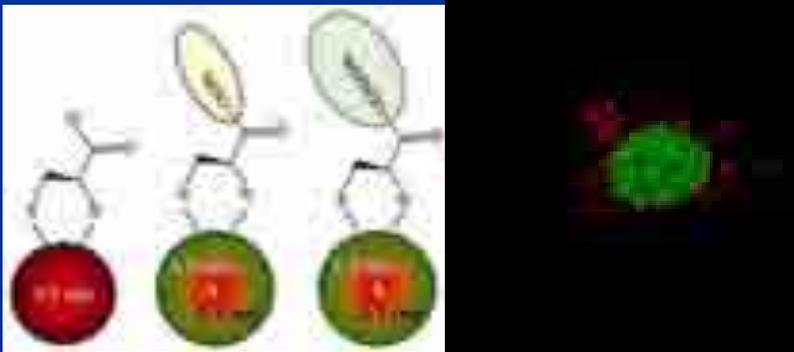
Stem cells with
some materials



Therapy of
Acute Liver Failure



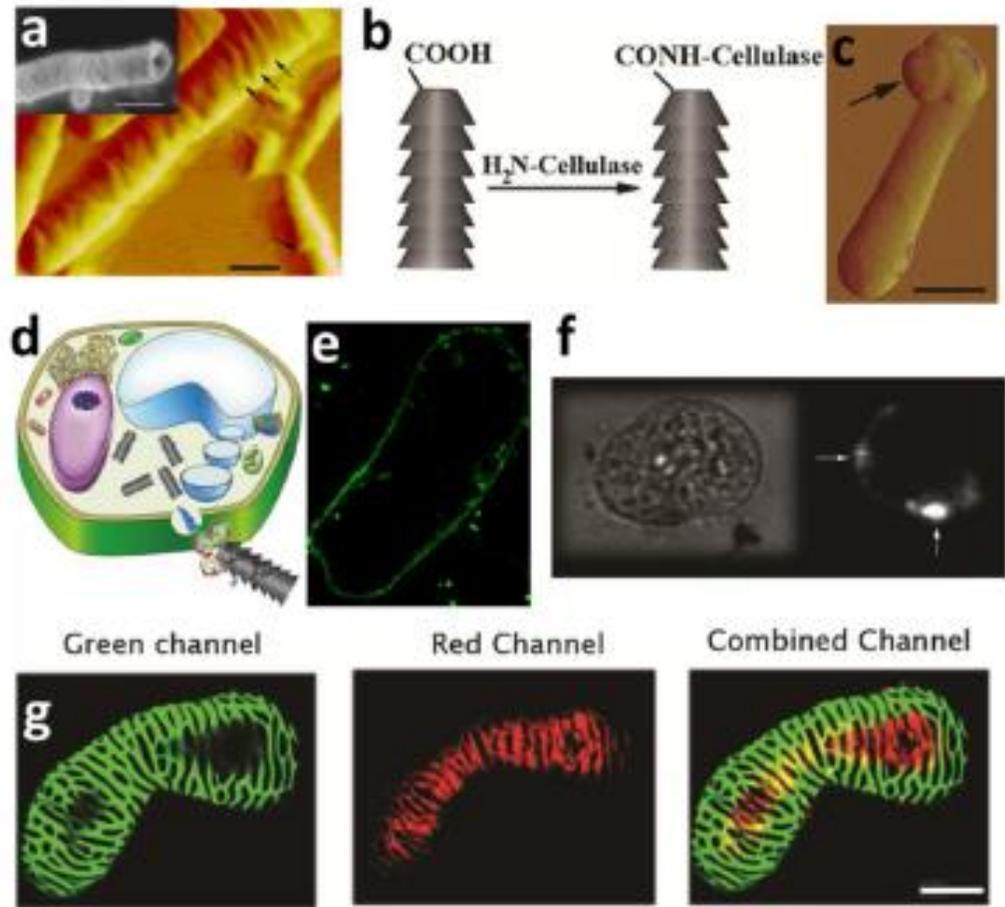
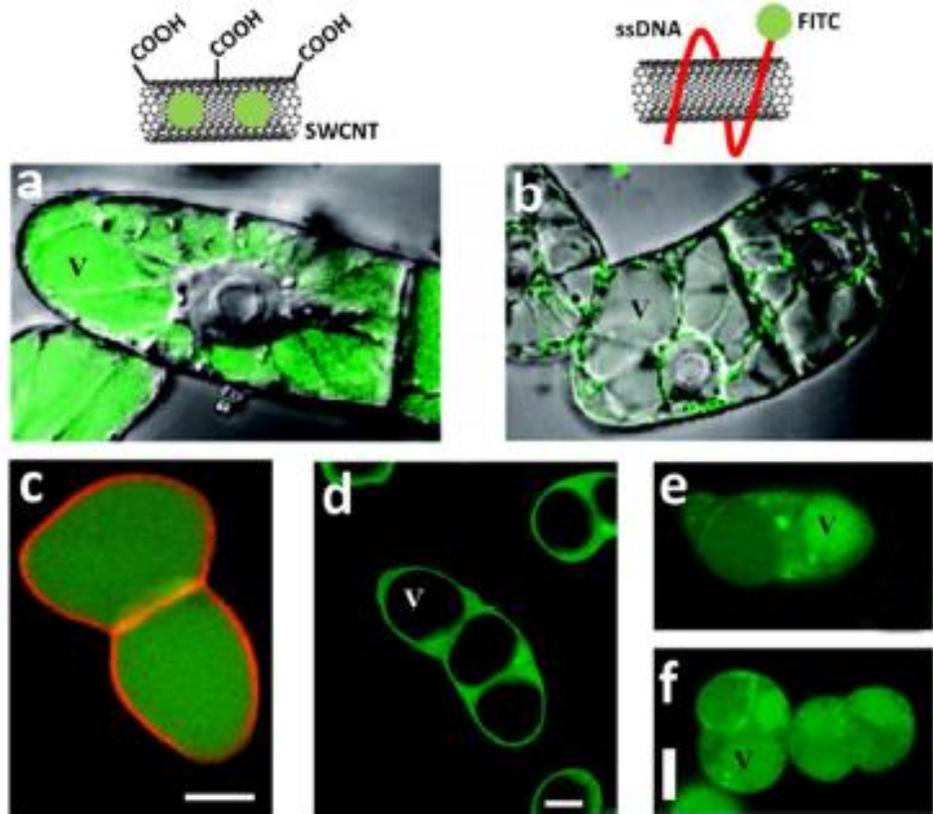
Survival rate: 100%



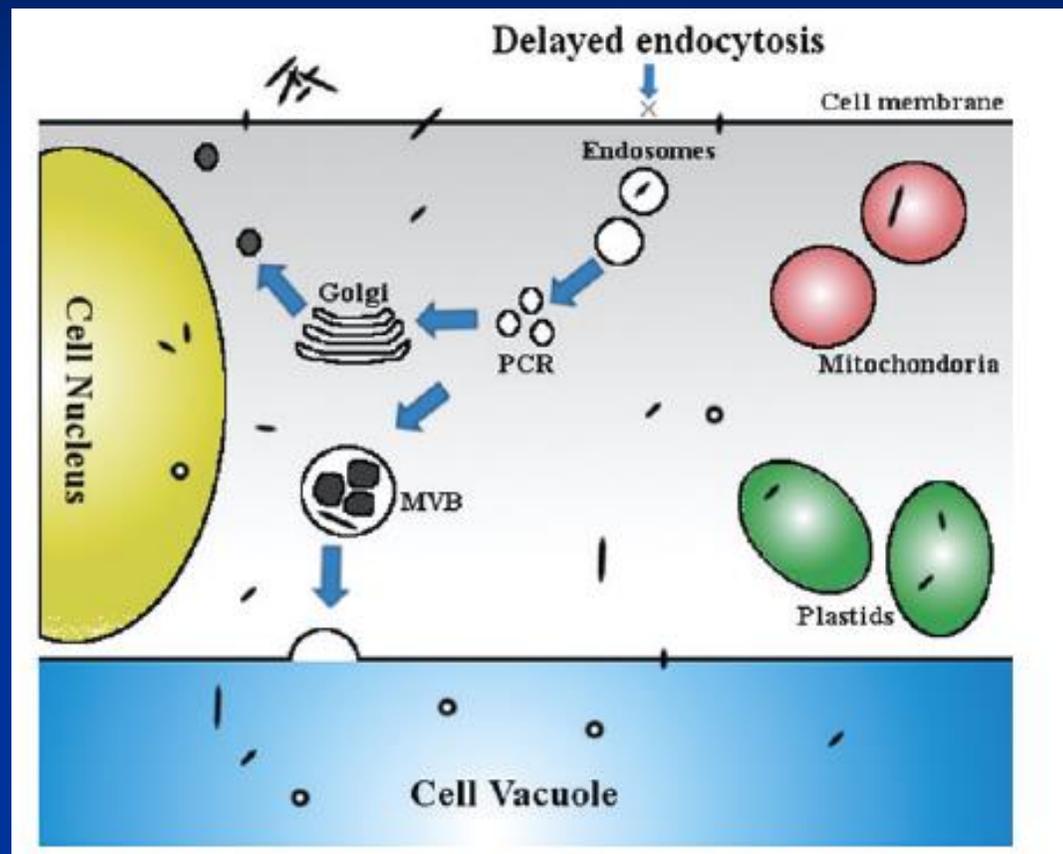
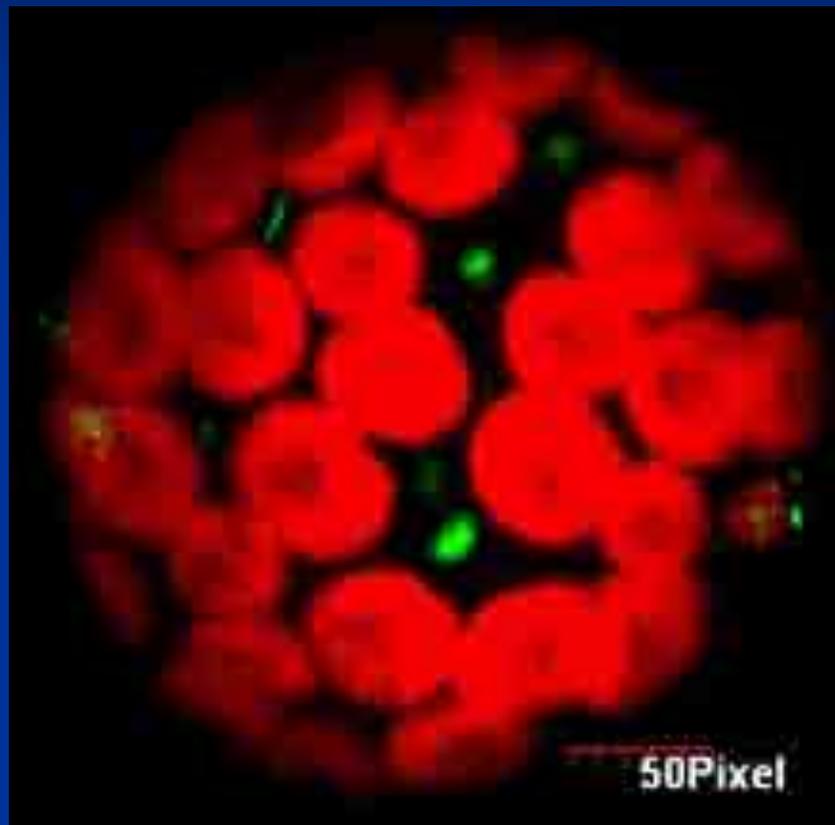
ACS Nano, 2010, Biomaterials, 2010, Biomaterials 2012.

Trafficking of CNT-cellulase inside a cell

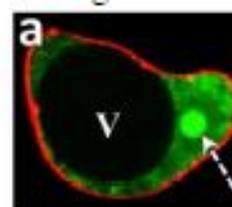
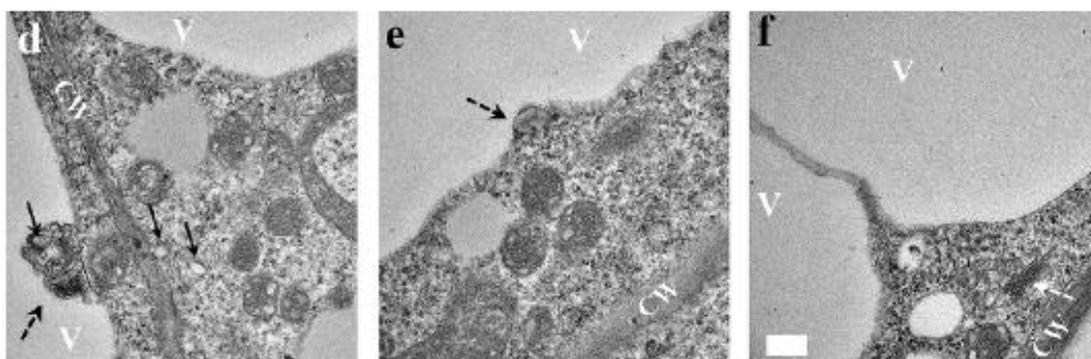
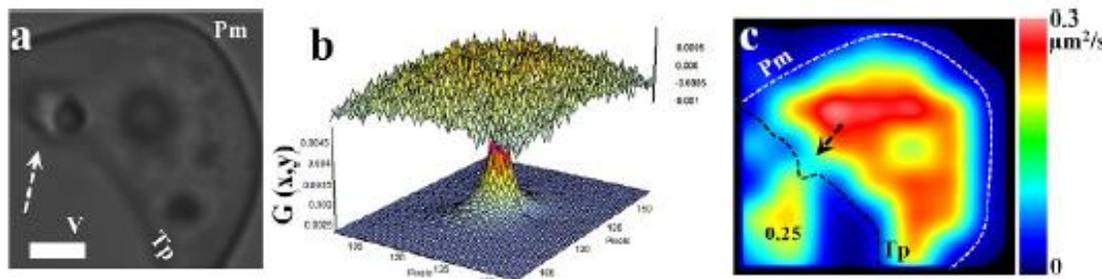
Cellular uptake and distribution of SWCNTs



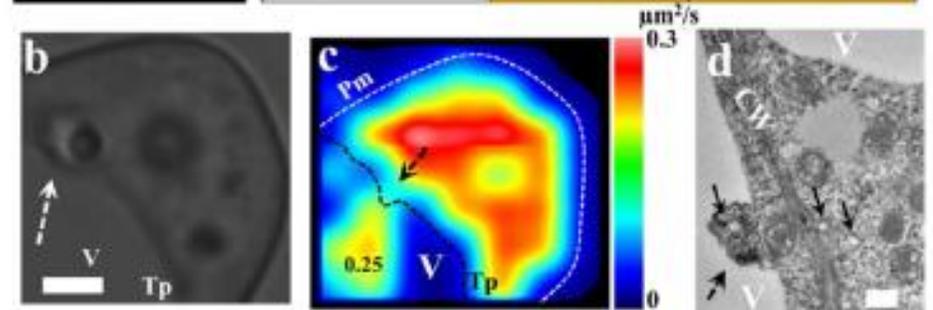
Trafficking and Subcellular Localization of CNT in Cells



Spatiotemporal Visualization of Subcellular Dynamics of Carbon Nanotubes

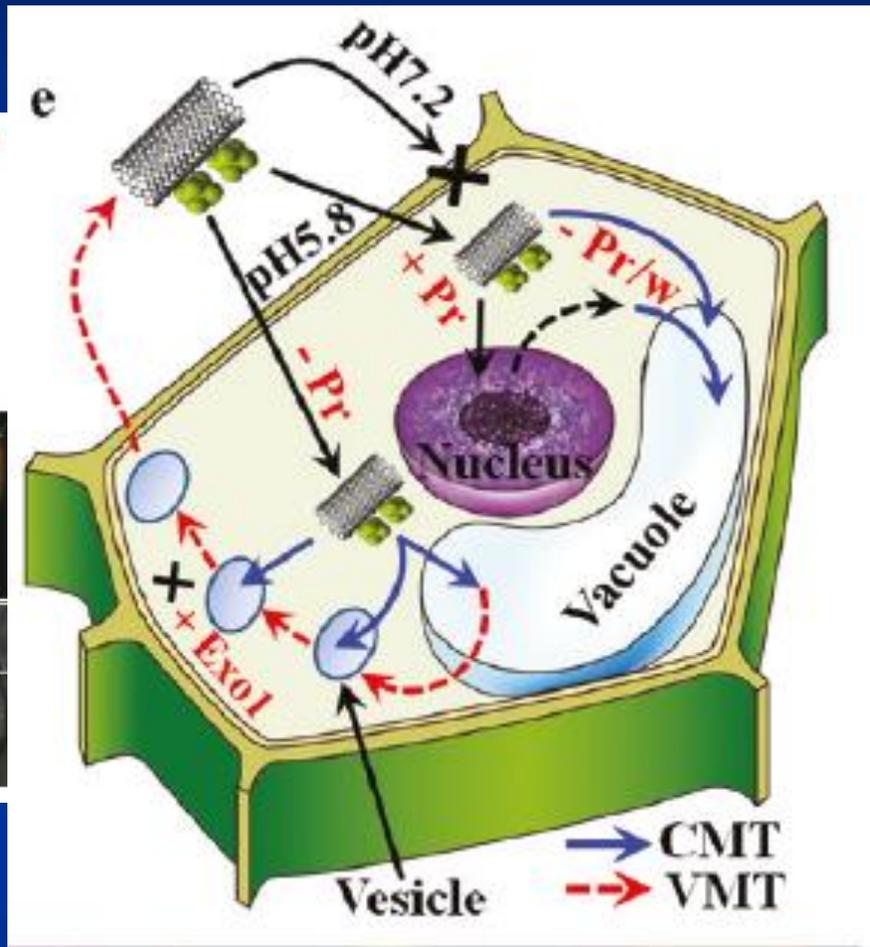
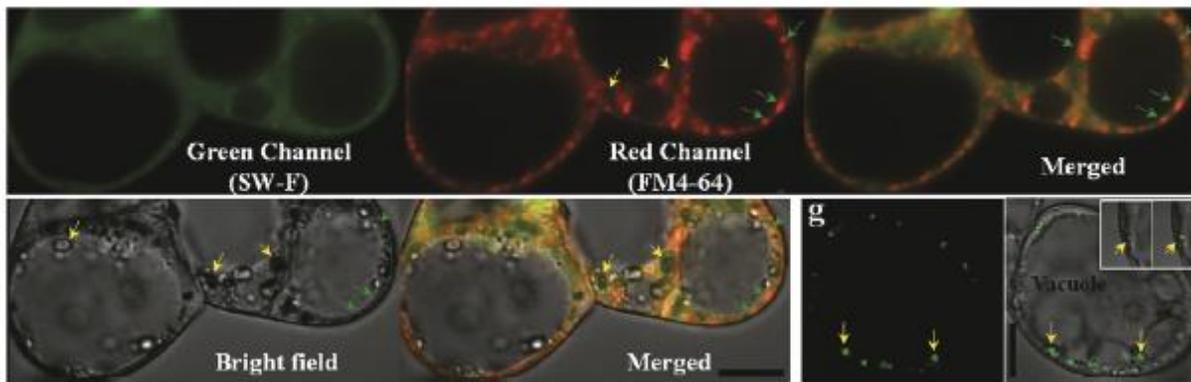
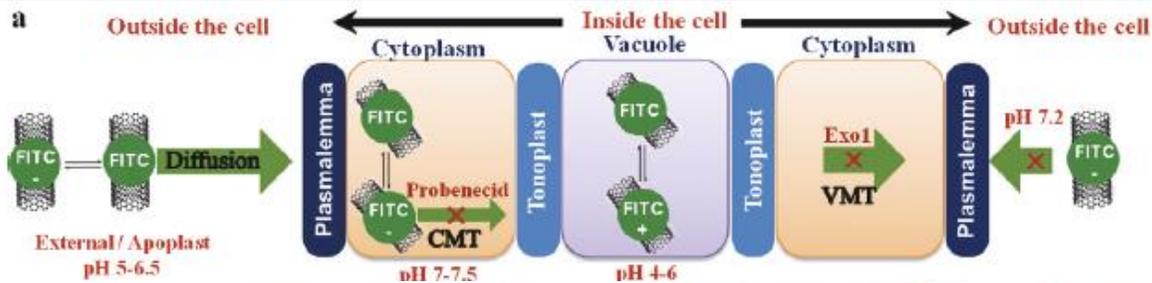


Subcellular location	Diffusion coefficient ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	
	Nucleoplasm	Nucleolus
FITC	0.35 ± 0.05	0.08 ± 0.01
SWCNT-FITC	0.13 ± 0.02	0.09 ± 0.03



Nano Lett., 2012, 12, 6145-6151.

Functional Platform Controlled Subcellular Distribution of CNT



名古屋大学革新ナノバイオデバイス研究センター

名古屋大学総長

- 文科省「橋渡し研究加速ネットワークプログラム」
- 厚労省「臨床研究中核病院」
- 名大関連病院ネットワーク(500床以上の34病院、計20,000床以上)
- 中部先端医療開発円環コンソーシアム

大阪大学

共同研究
連携・協力

名古屋大学
革新ナノバイオデバイス研究センター
センター長

研究
支援室

研究運営委員会

(副総長・病院長・総長補佐・先端医療・
臨床研究支援センター副センター長)

臨床研究

先端医療・臨床研究支援
センター

先端医療支援部門

臨床研究支援部門

臨床研究
コーディネーター

デバイス開発部門
部門長 産総研

医療デバイス研究部門
部門長 医学系研究科・附属病院

1分子ナノデバイス研究部門
部門長 工学研究科

共同研究部門

研究支援
産学連携・
知財支援

連携・装置
共同利用

共同
研究

共同企業等

Panasonic

東レ

東芝

バイオチップコンソーシアム(JMAC)

開発技術の国際
標準化

医療機器承認ガイ
ドライン策定

名古屋大学医学部
生命倫理委員会

本部事務・研究支援機構

研究協力部

産学官連携推進本部
知財本部

研究推進室

工学研究科

医学系研究科

大学病院

国内研究所等

産業技術総合研究所・
健康工学研究部門

北海道大学, 東北大学,
東京工業大学, 九州大学

Nagoya University

ACKNOWLEDGEMENT

HRI, AIST

FIRST PROJECT



Team Leader Mitsuru Isnikawa
Team Leader Takahiro Hirotsu
Team Leader Toshihiko Ooie
Team Leader Shinichi Wakida
Team Leader Masatoshi Kataoka
Team Leader Kenichi Nakayama
Funding
JSPS FIRST Program
MEXT, JST, METI, NEDO
Aichi Pref.

6 Research Assistants
Collaboration
U. Tokyo, NIMS
Kyoto U., Hokkaido U.
Uppsala U., Kalorinska I.
TORAY, Panasonic,
Toshiba, Tokai Rubber,
Takasago Elec., Cluster

**Aichi Pref. Funding
Program for
Priority Res. Area**

**Plasma Nano
Res. Center**

**Preventive
Med. Eng. Center**