

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. 先進「バイオものづくり」基盤技術の確立
4. 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
5. ソフトナノテクノロジーの基盤研究

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、田代、Ponnurengam、Zhou）

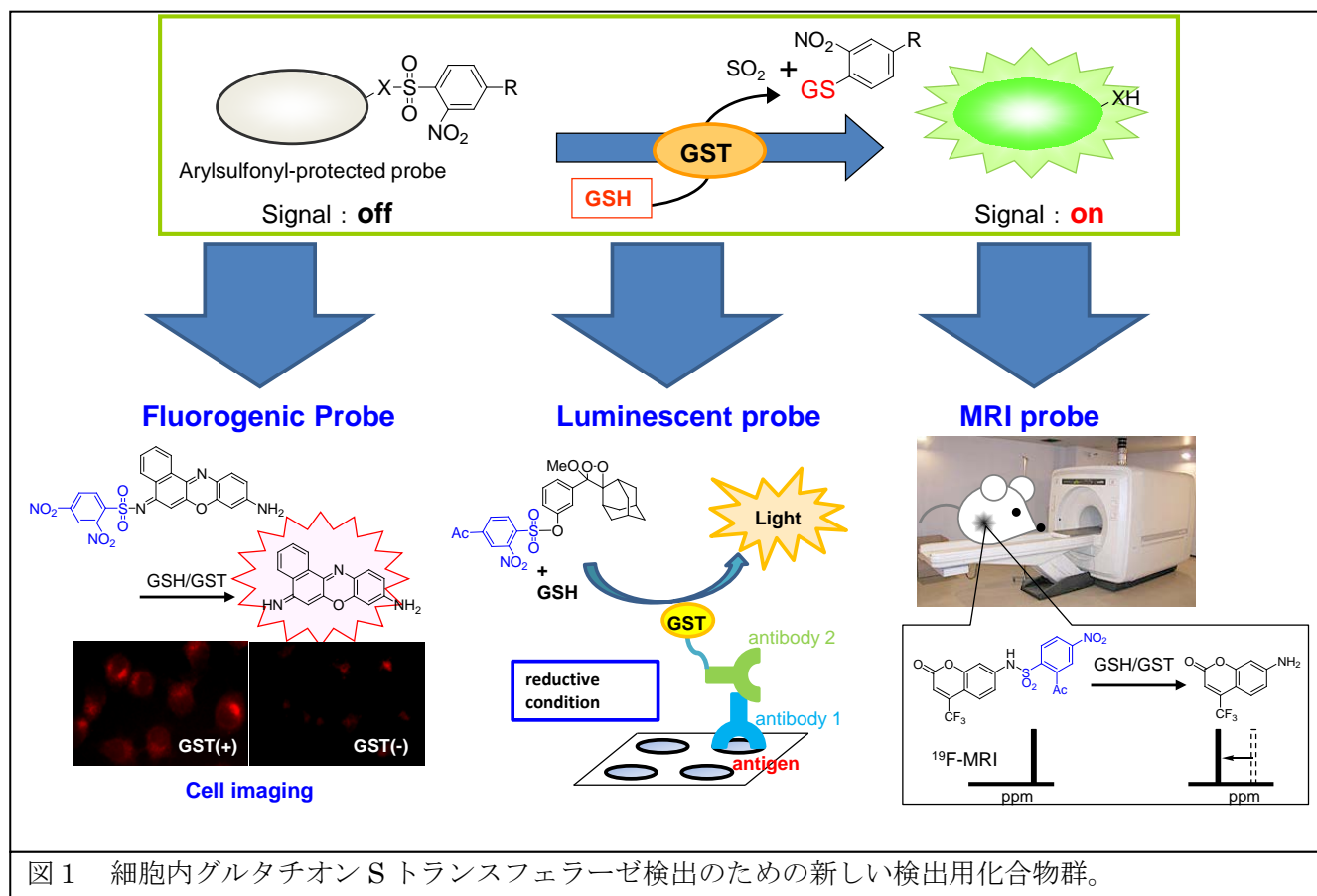
様々な生体高分子をマイクロアレイ固定化できる技術を開発し、その技術を用いてバイオチップの作成を行い、疾患診断用として役立てることを目標に研究を進めた。具体的には、アレルギー疾患、自己免疫疾患、感染症診断用としての性能の評価を従来の測定法との比較を行い、高い相関性を明らかにした。マイクロチップの小型化や量産化を図るとともに、多サンプル並行処理のための自動化学発光測定器を設計・製作した装置に改良を加えながら、引き続き臨床応用を主眼にヒト・サンプルでの評価を行った。また、新規なタンパク質光固定化剤も合成し、その性能評価を行った。

(2) 細胞内タンパク質検出法（伊藤、阿部、柴田、実吉）

スウェーデンのカロリンスカ研究所との共同研究により、細胞内グルタチオンSトランスフェラーゼ検出のために新しい発光検出用、MRI検出用のプローブを合成した（図1）。

(3) 細胞内遺伝子検出法（伊藤、阿部、柴田、実吉）

DNAプローブに化学反応基を修飾することにより、鋳型配列特異的に2つのDNAプローブの化学的連結反応を起こすことができる。今回、希土類元素を用いた長寿命蛍光プローブを合成し、自家蛍光を減じ、高いシグナル検出能を実現できた。



## 2. 治療用ナノ医工学

### (1) 再生医療用幹細胞の調製 (伊藤)

核移植法や遺伝子導入法による作成以外の方法論で体細胞クローン化ES様細胞の調製を目指して検討を行った。特に前田バイオ工学研究室の細川専任研究員、和田協力研究員とともに、マイクロ流路を用いた細胞融合法の開発を行った。また、マウスiPS細胞を化学固定化フィーダー細胞上で培養できることを明らかにした(図2)。

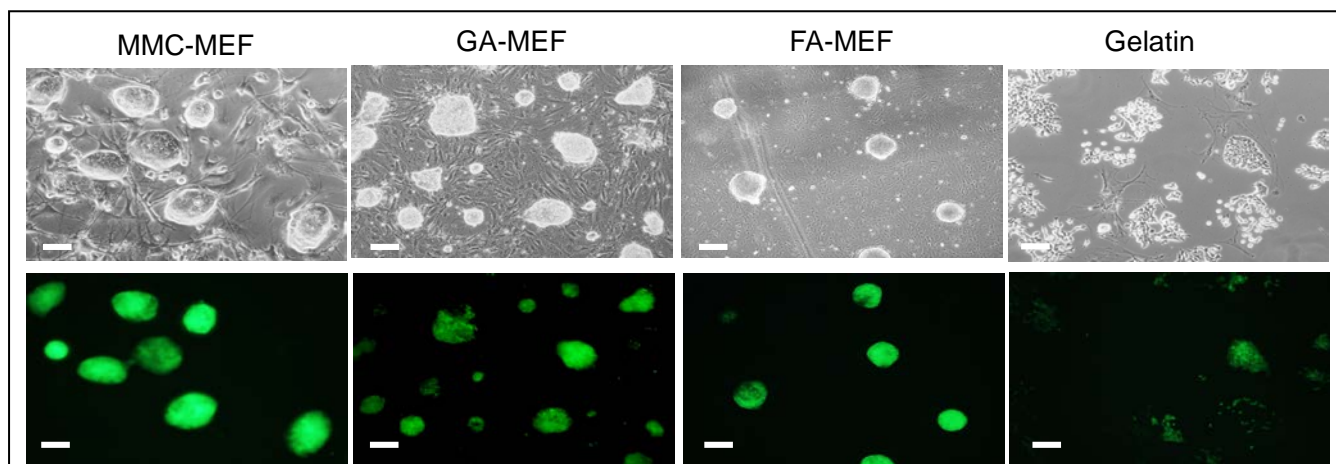


図2 化学固定化マウス胚性繊維芽細胞 (MEF) 上でのマウス iPS 細胞の培養。上段は、位相差顕微鏡像、下段は、nanog-GFP の蛍光顕微鏡像。MMC、マイトマイシン処理、GA はグルタルアデヒド処理、FA はフォルムアルデヒド処理を示す。

## (2) 結合性成長因子の創成 (伊藤、多田、北嶋)

組織接着性の成長因子、サイトカインを合成し、その組織接着性の評価を行うとともに細胞増幅の促進を評価した。チタンやステンレス鋼の新しい表面処理方法について検討を行い、上皮細胞成長因子や骨形成タンパク質の固定化を行い、材料表面の生体機能化を図った。また、ヒドロキシアパタイトやチタンのような無機・金属材料表面に結合する成長因子の合成のために、有機合成法と遺伝子組み換え法、さらにリガーゼ酵素を用いた新しいタンパク質合成法の開発に成功し、得られたキメラタンパク質の活性評価を行った。

## (3) 新しい機能性核酸の合成 (伊藤、阿部、柴田、実吉、阿部奈保子、西原)

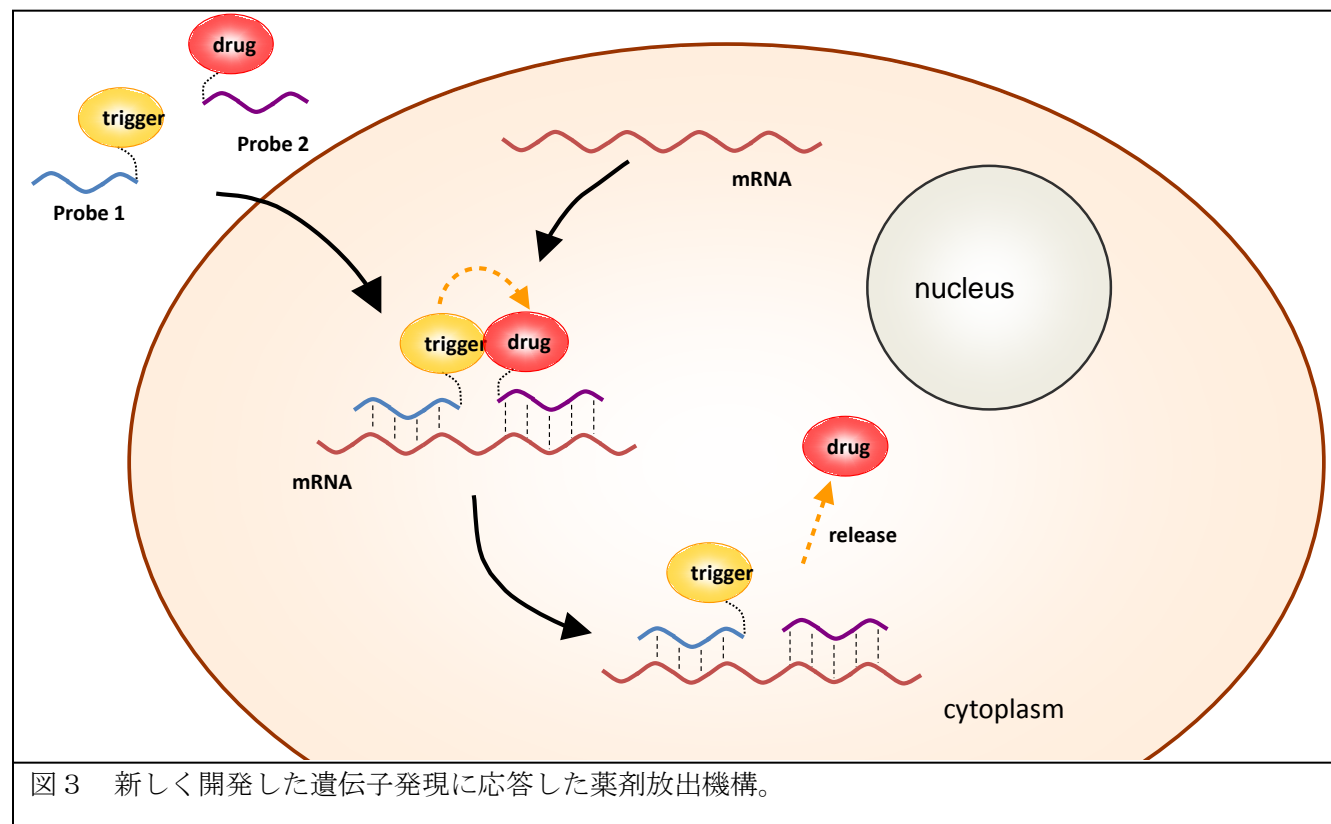
ダンベル型の生体内安定性の高いRNA分子の合成に成功し、さらにRNA干渉効果の最適化を検討した。また、天然には存在しなかった二本鎖環状RNA及び分岐型RNAの合成に成功し、そのものがRNA干渉効果を示すことを明らかにした。また、ペプチド修飾により膜透過性を向上させたダンベル型RNAを開発した。

## (4) バイオ接着材料の創成 (伊藤)

タンパク質や多糖のような生体高分子を主成分とする誘導体を合成し、その接着剤としての性能評価を行った。フラン環導入ゼラチンと食紅であるローズベンガルを混合した材料は、可視光照射により硬化させることができ、ゼラチンへのフラン環の結合様式によって硬化時間を短縮できることがわかった。その詳細な解析を行うとともに幹細胞を内包させて軟骨へ移植できることをなどが明らかになった。

## (5) ドラッグ・デリバリー・システムの開発 (伊藤、阿部、柴田、Ananda)

ゼラチン誘導体に疎水性のコレステロールを導入することにより高分子ミセルの調製を行い、siRNAの導入に成功した。得られた高分子ミセルが細胞内に高効率で取り込まれ、遺伝子ノックダウン効果があることを細胞培養系で明らかにした。遺伝子依存型ドラッグ・デリバリー・システムの構築にも成功した (図3)。



### 3. シンセチック・バイオロジー手法による機能性分子の創製研究

#### (1) 光応答性分子認識核酸アプタマーの合成 (伊藤、多田)

新たに側鎖にアゾベンゼンをもつアミノフェニルアラニン誘導体を用いた進化分子工学により、ターゲット分子に結合し、光に応答して吸脱着するアプタマーの探索に成功し、ターゲットへの吸脱着を光制御できることが明らかとなった。

#### (2) 有機合成用触媒の開発 (伊藤、阿部)

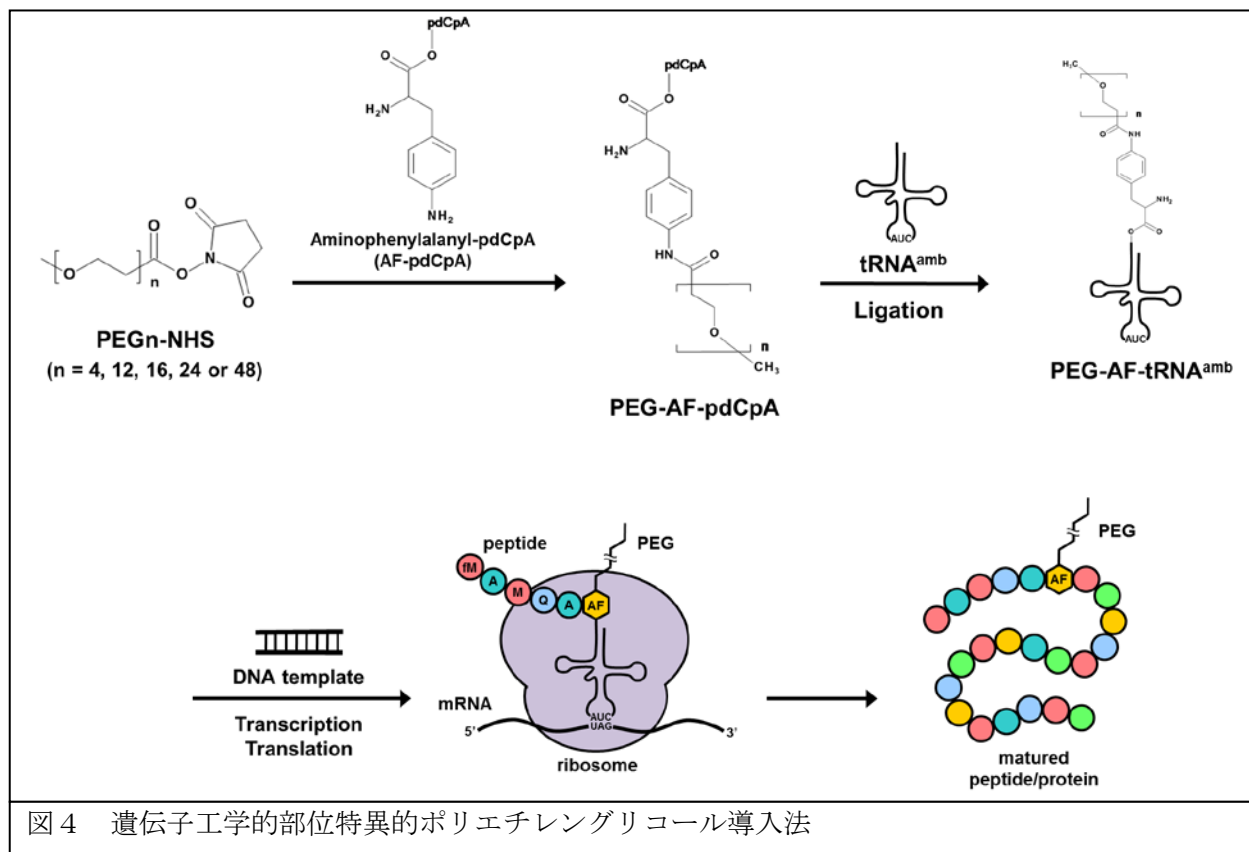
オリゴ核酸をポリエチレングリコールで修飾すると有機溶媒に可溶化して、有機溶媒中で水中とは異なるコンフォメーションを形成することが明らかとなり、触媒活性をもつことがわかり、その詳細な検討を行った。

#### (3) ディスプレイ法を用いた新しいペプチドアプタマーの開発 (伊藤、阿部、鶴澤、多田、Wang)

非天然アミノ酸を導入したペプチドアプタマーを、リボソーム・ディスプレイ法を用いて作成することができるようになり、新しい可能性としてスーパー阻害剤、センシング分子、触媒分子について検討を行った。

#### (4) 遺伝子工学的PEGylationの開発 (伊藤、多田)

ポリエチレングリコール (PEG) をtRNAに担持させ、無細胞翻訳系でタンパク質へ部位特異的に導入する方法に成功した(図4)。ただし、その導入効率はPEGの分子量に著しく依存した。



### 4. ソフトナノテクノロジーの基盤研究

#### (1) 新しい結合性生体高分子の合成とそれを用いた細胞機能制御 (伊藤、Joddar)

生体高分子にフェニルアジド基を導入することで、光反応性を付与することができた。合成した光反応性生体高分子は様々な基材表面へ共有結合固定化が可能で、光リソグラフィ法でマイクロパターンニングを行うことができた。マイクロパターンニングを応用した固定化濃度傾斜表面を調製し、その上での神経細胞の突起の形成が制御されることが明らかとなった。

**Key Sentence :**

1. Development of Nano Diagnostic Systems
2. Development of Nano Therapeutic Systems
3. Methodology for Advanced Bio-Fabrication
4. Creation of Functional Molecules by Synthetic Biology and Molecular Evolutionary Engineering
5. Fundamental Investigation on Soft Nanotechnology

**Key Word :**

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. Diagnosis by nano medical engineering****(1) Development of microarray biochip (Ito, Tashiro)**

In order to develop a new diagnostic system using micro-array biochip, we devised a photo-immobilization method. By using this technology, allergens and auto-antigens were micro-arrayed for diagnosis of allergy and auto-immune diseases, respectively. Automated measurement machine was also developed for the micro-array chips. For utilization in clinical analysis, the quality of chip and machine, such as reproducibility and stability, was continuously investigated using human sera. In addition, new photo-immobilizable polymers were synthesized and evaluated.

**(2) Development of molecular sensors working in living cells (Ito, Abe, Shibata, Saneyoshi)**

Luminescent and MRI probes for detection of glutathione-S-transferase in living cells was synthesized in addition to fluorogenic probe (Figure 1). And these compounds turned out to be good substrates for GSTs, especially for GSTA1-1, by collaboration research with Kalorinska Institute of Sweden.

**(3) Nucleic acid sensing in living cells (Ito, Abe, Shibata, Saneyoshi)**

DNA probes ligate in the presence of target oligonucleotide without any enzymes or reagent, where probes have reactive functional groups. We developed a new long-lived fluorescence probe based on lanthanide elements complex. The probe showed high signal detection by decreasing the auto-fluorescences.



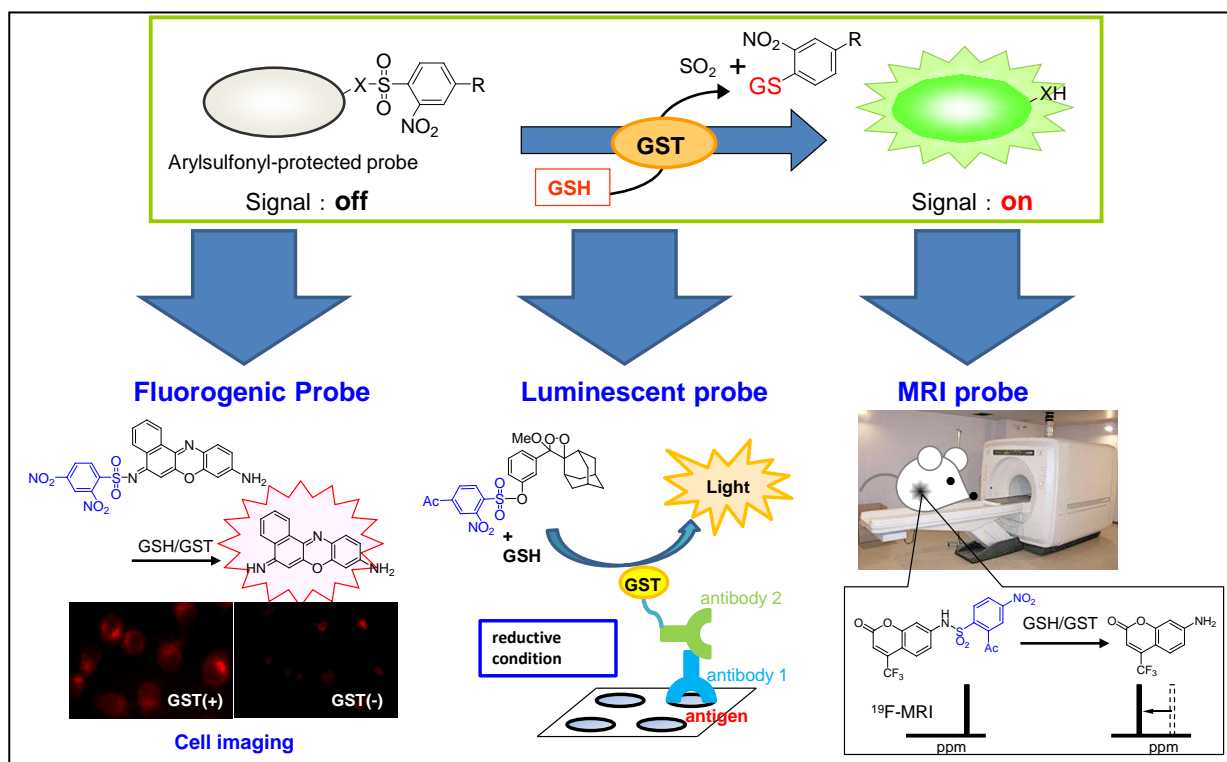


Figure 1 Several probes for detection of glutathione-S-transferases.

## 2. Therapy by nano medical engineering

### (1) Preparation of stem cells for regenerative medicine (Ito)

In order to prepare reprogrammed cells derived from somatic cells, some methods were investigated using cell fusion of embryonic stem cells with somatic cells. Microfluid system was developed for cell fusion with Drs. K. Hosokawa and K. Wada at Bioengineering Laboratory of RIKEN Advanced Science Institute. It was also indicated that chemically fixed feeder cells supported the growth of mouse iPS cells with keeping undifferentiated state.

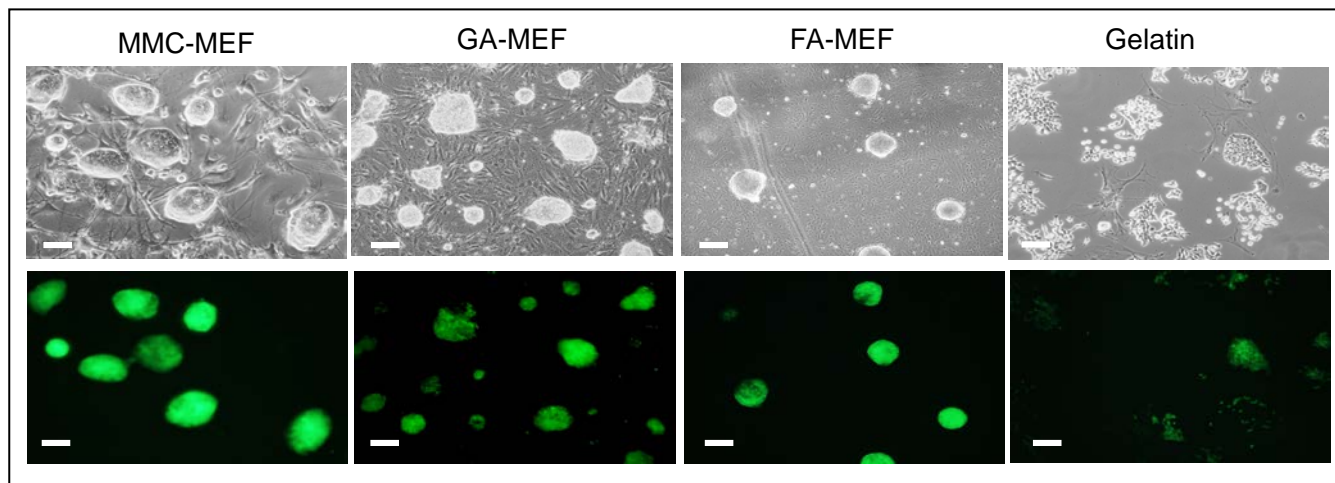


Figure 2 Culture of mouse iPS cells on chemically fixed mouse embryonic fibroblast (MEF). Above; phase contrast microscopic photos; below, fluorescence-microscopic photos of nanog-GFP. MMC; mitomycin treatment, GA; glutaraldehyde-treatment, FA; formaldehyde-treatment.

(2) Synthesis of fusion protein for regenerative medicine (Ito, Tada , Kitajima)

Extracellular matrix-adhesive or inorganic materials-adhesive growth factor proteins or cytokines were prepared by combination of protein engineering and organic synthesis. Surface modification method on titanium and stainless steel was investigated and epidermal growth factor or bone morphogenic protein was immobilized on the modified surface for preparation of bioactive surface on the metals. In addition, chimera proteins which has binding affinity to hydroxyapatite or titanium was prepared by combination method using gene technology and enzymatic treatment.

(3) RNA interference method using chemically modified RNA molecule (Ito, Abe, Shibata, Saneyoshi, N. Abe, Nishihara)

Dumbbell-shape RNA molecule was synthesized to enhance the tolerance against enzymatic degradation. Artificial double-stranded nanocircular and branched RNAs were synthesized and it was shown that they had RNA interference activity. Modification with cell permeable peptide on these artificial RNAs was also performed.

(4) Bio-adhesive derived from biopolymers (Ito, Obuse)

New bio-adhesives were developed by chemical modification of proteins or polysaccharides and the properties were investigated in detail. First furan was coupled to gelatin. The modified gelatin was mixed with Rose Bengal which is employed as a food additive. The mixture was solidified by visible light irradiation. The material was investigated as a medical adhesive. In addition, it was demonstrated that by modification of preparation method the crosslinking time was shorten. The properties were characterized in detail. In addition, mesenchymal stem cells were encapsulated and implanted with the photo-reactive polymer.

(5) Drug delivery system (Ito, Abe, Shibata, Ananda)

Modification of gelatin was performed for development of vaccine or siRNA carriers. Recombinant human gelatin was modified with cholesterol and the derivatives formed polymeric micelle. It was demonstrated that the micelle efficiently delivered siRNA into cultured cells. Gene-dependent drug release was also performed (Figure 3).

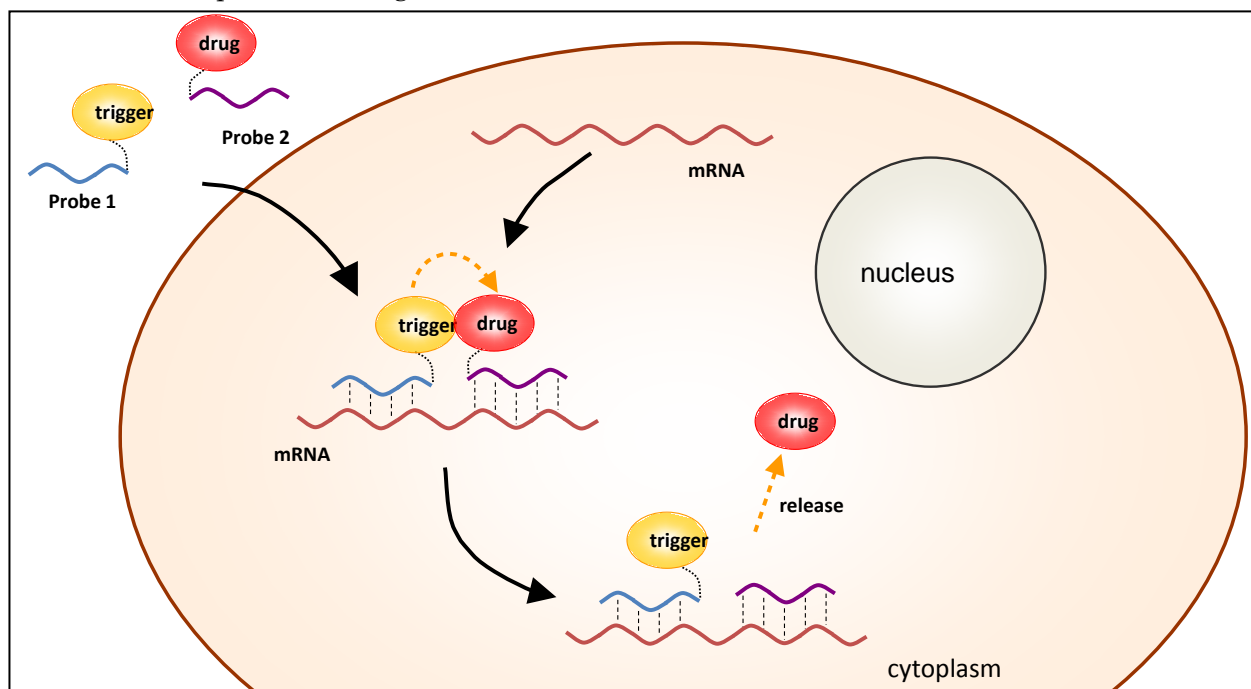


Figure 3 Gene expression-dependent drug release system.

### 3. Creation of functional molecules by synthetic biology

#### (1) Synthesis of photo-responsive aptamers (Ito, Tada)

A peptide aptamer carrying azobenzene moiety was obtained by *in vitro* selection method using ribosomal display. The selected and prepared peptide aptamers actually bound to a target molecule in response to photo-irradiation.

#### (2) Development of catalysis for organic synthesis (Ito, Abe)

It was found that oligonucleotide conjugated with polyethylene glycol (PEG) was soluble in organic media and have a specific conformation, which is different from that in water. The PEG-modified oligonucleotides had catalytic activity in organic media.

#### (3) Development of novel *in vitro* selection system for creation of functional peptides (Ito, Uzawa, Tada, Wang))

*In vitro* selection system of functional peptides was investigated by ribosome display technology and combinatorial peptide libraries containing non-natural amino acids. By this method, new super-inhibitor, sensing molecular probe, and molecular catalyst were being developed.

#### (4) Genetic PEGylation (Ito, Tada)

PEG was site-specifically incorporated into peptide or proteins by cell-free translation system as shown in Figure 4. The incorporation ratio was significantly dependent of the molecular weight of PEG..

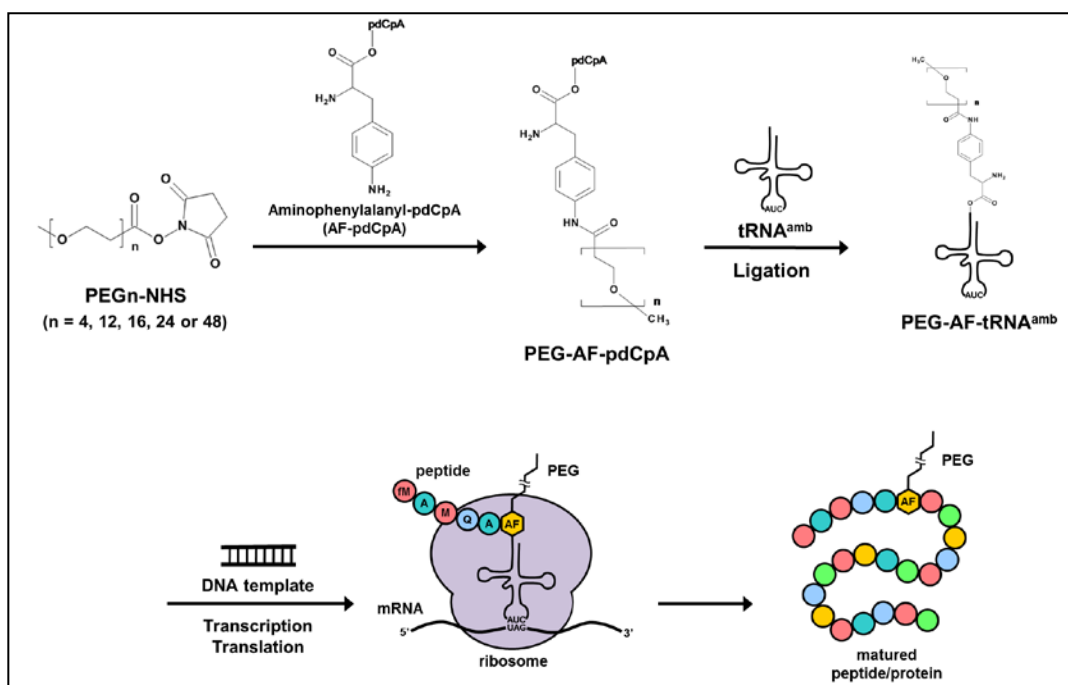


Figure 4 Protocol of genetic PEGylation

### 4. Fundamental investigation on soft nanotechnology

#### (1) Synthesis of new photo-reactive biopolymers (Ito, Kitajima, and Joddar)

Carboxylated low molecular weight chitosan, human gelatin, or hyaluronic acid was modified with phenylazido groups and thus photo-reactive biopolymers were synthesized. The synthesized products can be covalently immobilized on various types of materials and photo-lithography was possible by using them. Using the micropatterning method, gradient surfaces were prepared and the behavior of neural cells on the gradient surface was investigated.



***Principal Investigator***

伊藤 嘉浩 Yoshihiro ITO

***Research Staff***

阿部 洋 Hiroshi ABE  
鵜澤 尊規 Takanori UZAWA  
北嶋 隆 Takashi KATAJIMA  
柴田 綾 Aya SHIBATA  
中嶋 裕子 Yuko NAKASHIMA  
Binata JODDAR  
周 弟 Di ZHOU  
Sivakumar Maliapan PONNURENGAM  
實吉 尚郎 Hisao SANEYOSHI  
多田 誠一 Seiichi TADA  
王 偉 Wei WANG  
何 盼 Pan HE  
中野 佑妃子 Yukiko NAKANO  
萩原 恭二 Kyoji HAGIWARA  
小林 謙也 Kenya KOBAYASHI  
Baiju Govindan NAIR  
鬼塚 和光 Kazumitsu ONIZUKA

***Students***

姜 延和 Jeonghwa KANG  
Pallavi Ananda KADENGODLU  
Zha LI  
丸山 豪斗 Hideto MARUYAMA  
Yasodha MANANDHAR  
Kwangil KIM  
伊藤 美香 Mika ITO  
周 小越 Xiaoyue ZHOU  
Xi YANG  
Qingmin ZANG  
河合 祐人 Yuto KAWAI  
荒木 美香 Mika ARAKI

星野 友美 Tomomi HOSHINO

Thoa Thi Thanh TRAN

Yun HEO

Jae Hyun SHIM

***Assistant and Part-timer***

西原 みづき Miduki NISHIHARA  
倉林 克枝 Katsue KURABAYASHI  
岩下 美千瑠 Michiru IWASHITA  
皆川 倫子 Noriko MINAGAWA  
落久保 辰弥 Tatsuya OCHIKUBO  
小布施 聖 Sei OBUSE  
阿部 奈保子 Naoko ABE  
木村 晶子 Akiko KIMURA  
森次 望美 Nozomi MORITSUGU  
菊地 早恵子 Saeko KIKUCHI  
吉田 望美 Nozomi YOSHIDA  
湯本 晶子 Akiko YUMOTO  
信太 知永子 Chieko SHIDA  
佐藤 祐子 Yuko SATO  
能瀬 紹子 Akiko NOSE

***Visiting Members***

長田 義仁 Yoshihito OSADA  
田代 英夫 Hideo TASHIRO  
相垣 敏郎 Toshiro AIGAKI  
常田 聡 Satoshi TSUNEDA  
吉田 靖弘 Yasuhiro YOSHIDA  
居城 邦治 Kuniharu Ijro  
重原 淳孝 Kiyotaka SHIGEHARA  
原 雄介 Yusuke HARA  
中村 真理子 Mariko NAKAMURA  
孫 泰一 Tae il SON  
章 培標 Peibiao ZHANG  
劉 明哲 Mingzhe LIU  
河村 賢一 Kenichi KAWAMURA

増田	安司	Yasushi MASUDA
佐野	健一	Kenichi SANO
敷中	一洋	Kazuhiro SHIKINAKA
三友	秀之	Hideyuki MITOMO
新倉	謙一	Kenichi NIIKURA

Shin Hye PARK