

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)

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つ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、新規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 (図1) を用いて臨床応用を主眼にヒト・サンプルでの評価を行い、再現性や保存安定性についての検討を行った。

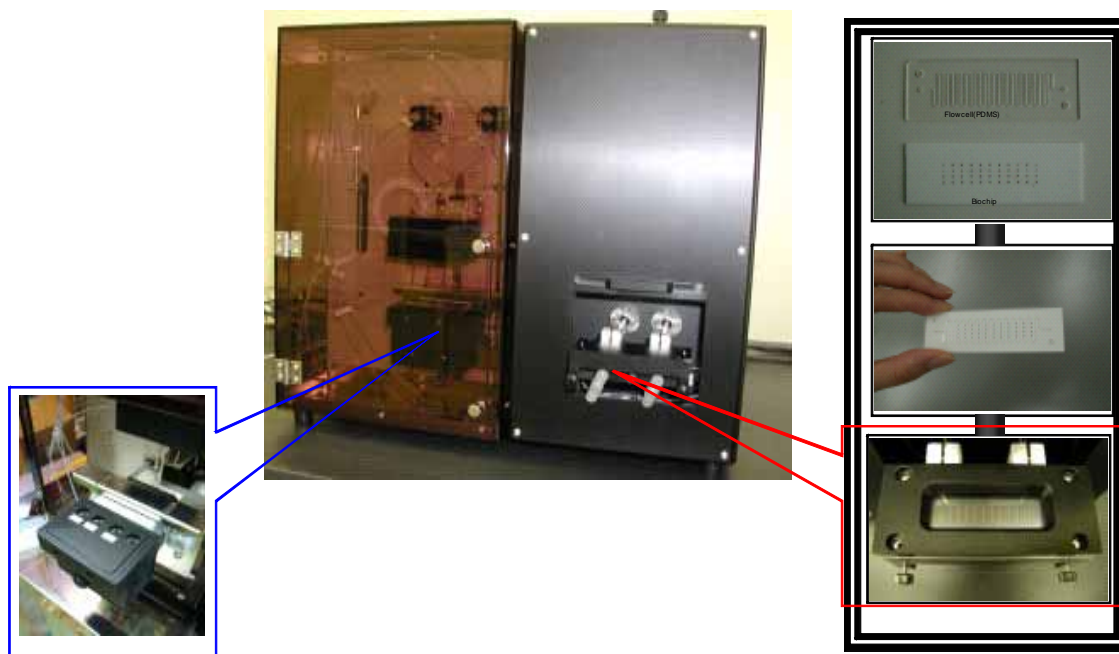


図1 微量サンプル、迅速、網羅的に測定可能な全自動マイクロアレイチップ測定機

(2) 生細胞内遺伝子および官能基検出法 (伊藤、阿部、柴田、実吉、木村)

DNAプローブに化学反応基を修飾することにより、鑄型配列特異的に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。本反応を用いて、遺伝シグナルの検出・増幅に成功し、細胞内イメージングのための新規蛍光化合物を様々な合成した。そして、遺伝子発現の異なる微生物分離に成功した。さらに、細胞内グルタチオンSトランスフェラーゼ検出のための新規蛍光化合物の合成に成功し、スウェーデンのカロリンスカ研究所との共同研究に発展した(図2)。

2. 治療用ナノ医学

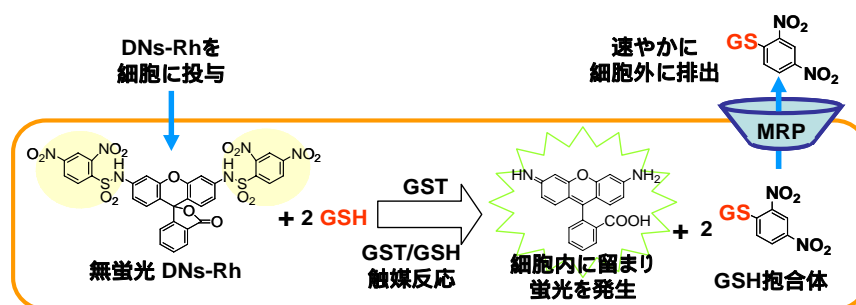


図2 細胞内グルタチオンSトランスフェラーゼ検出プローブ

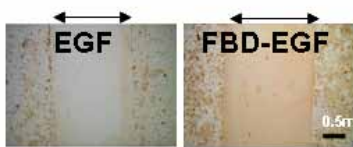
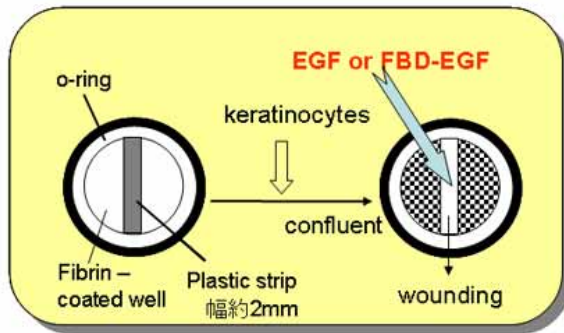
(1) 再生医療用幹細胞の調製 (伊藤、Gong、藤城)

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。具体的には、細胞融合法で作成される4倍体の体細胞由来ES様細胞からの脱核の方法を種々検討した。

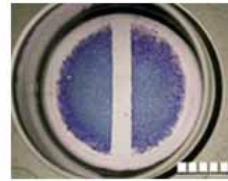
(2) 結合性成長因子の創成 (伊藤、阿部、和田、北嶋、櫻木、白井)

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(図3)。また、無機・金属材料表面に結合する成長因子の合成のために新しい有機合成法と遺伝子組み換え法を融合したタンパク質合成法の開発、材料表面の処理方法について検討を行った。

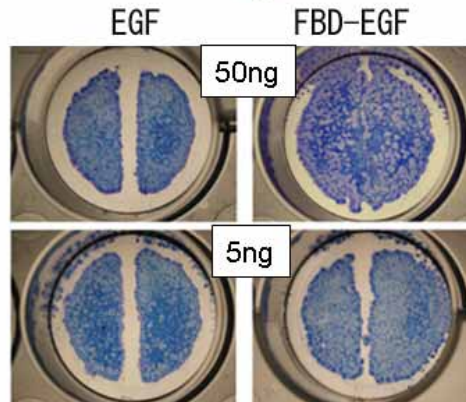
創傷治癒モデル



創傷
直後



7日後



ギムザ染色

図3 フィブリン結合性上皮細胞成長因子(FBD-EGF)による創傷治癒。底面全域にフィブリンを被覆したウエル内(通常のEGFに比べてFBD-EGFがフィブリン被覆面に吸着しやすいことを抗体染色で確認)にプラスチックストリップを置き、角質細胞を培養し細胞が全面を覆った後、ストリップをはがすことで創傷する。7日後に細胞の成長状態をギムザ染色して調べたところ、FBD-EGF処理上では成長促進がおこり治癒が促進されていることがわかった。

(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、その他の環状RNAの合成に成功し、新たな機能を観測することができた(図4)。一方、プロドラッグ型DDSについても検討を行った。

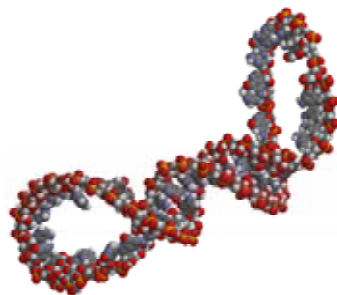


図4 ダンベルRNAの3次元モデル

(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。

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、阿部、和田、劉)

側鎖にアゾベンゼンをもつヌクレオチドを用いた進化分子工学の適用を可能にし、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合成に成功し、新しいシステムの開発にも着手した。

(2) 有機合成用触媒の開発 (伊藤、阿部、和田、劉)

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った。ポリエチレングリコール修飾抗体も有機溶媒可溶化でき、抗原-抗体反応が起こることが明らかとなった。

(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、和田、阿部、劉、白井)

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った。この方法論により、新しい可能性を検討した。進化分子工学手法を用いたテラ-メイド分子ロボットの実現にむけた方法論の検討を行った。

4. ソフトナノテクノロジーの基盤研究

(1) 生体不活性表面を創出する両性高分子の合成 (伊藤、櫻木)

両性イオンをもつビニルモノマーと光反応性基をもつビニルモノマーを共重合し、両性電解質で光反応性の高分子を合成した。合成した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。高分子で修飾した表面は、タンパク質吸着や細胞接着を阻害することができた (図5)。

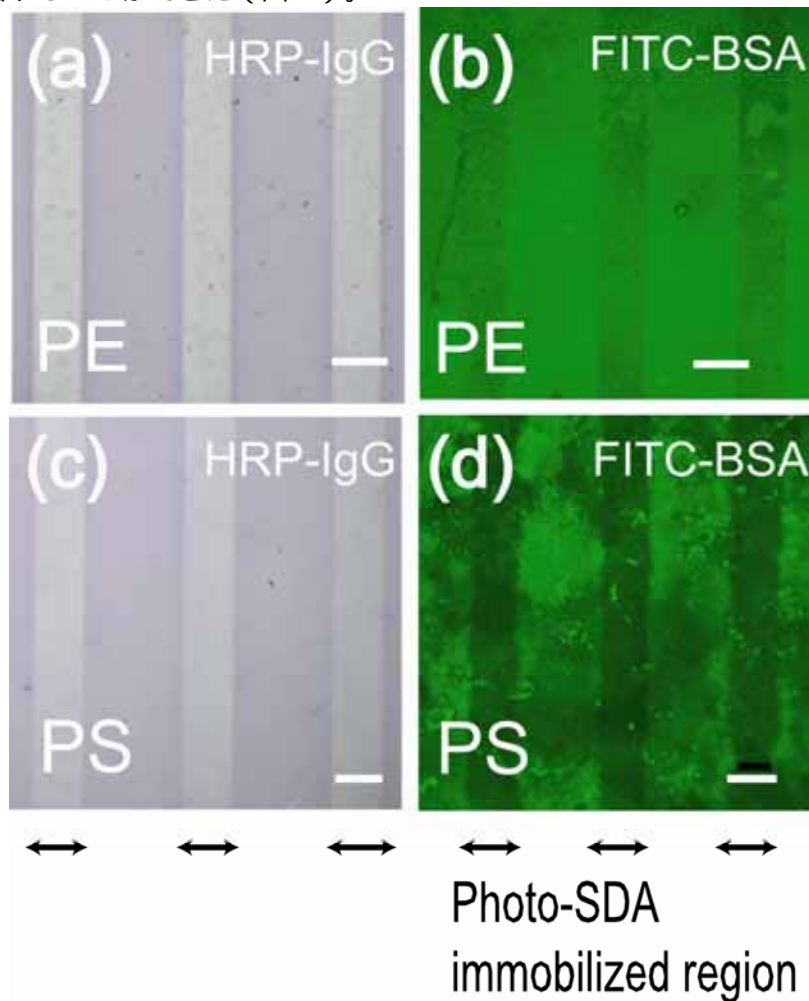


図5 光反応性のスルホベタイン基を側鎖にもつビニル高分子をマイクロパターンニングしてタンパク質の吸着を調べると、この高分子固定化表面でだけタンパク質の吸着が抑制された。HRP-IgGは西洋わさびペルオキシダーゼ標識免疫グロブリン(a,c)、FITC-BSAはフルオレセイン標識ウシ血清アルブミン(b,d)を示し、被覆された基材PEはポリエチレン(a,b)、PSはポリスチレン(c,d)を示す。スケールバー長さ = 200 μm 。

(2) 温度応答性高分子 (伊藤、櫻木)

温度応答性高分子を1ブロックとするブロック共重合体の材料表面への吸着性と表面性質の変化を検討するとともに幹細胞培養への応用を検討した(図6)。

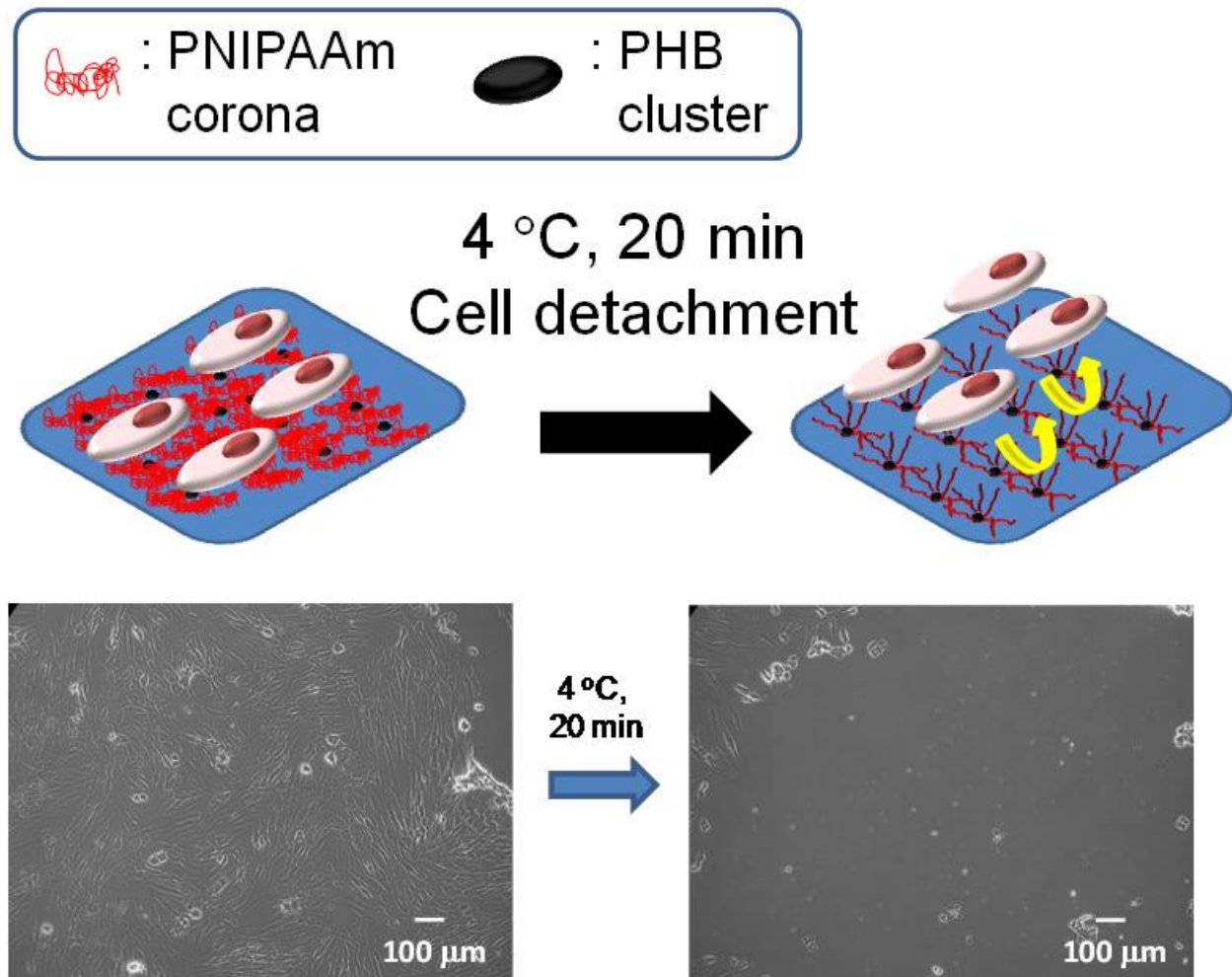


図6 温度応答性の PNIPAAm-PHB-PNIPAAm ブロック共重合体によるヒト間葉系幹細胞の温度に応答した細胞の吸脱着制御。

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

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 pho-immobilization method. By using this technology, allergens and auto-antigens were micro-arrayed for diagnosis of allergy and auto-immuno diseases, respectively. Automated measurement machine was also developed for the micro-array chips (Figure 1). For utilization in clinical analysis, the quality of chip and machine, such as reproductivity and stability, was investigated using human serum.

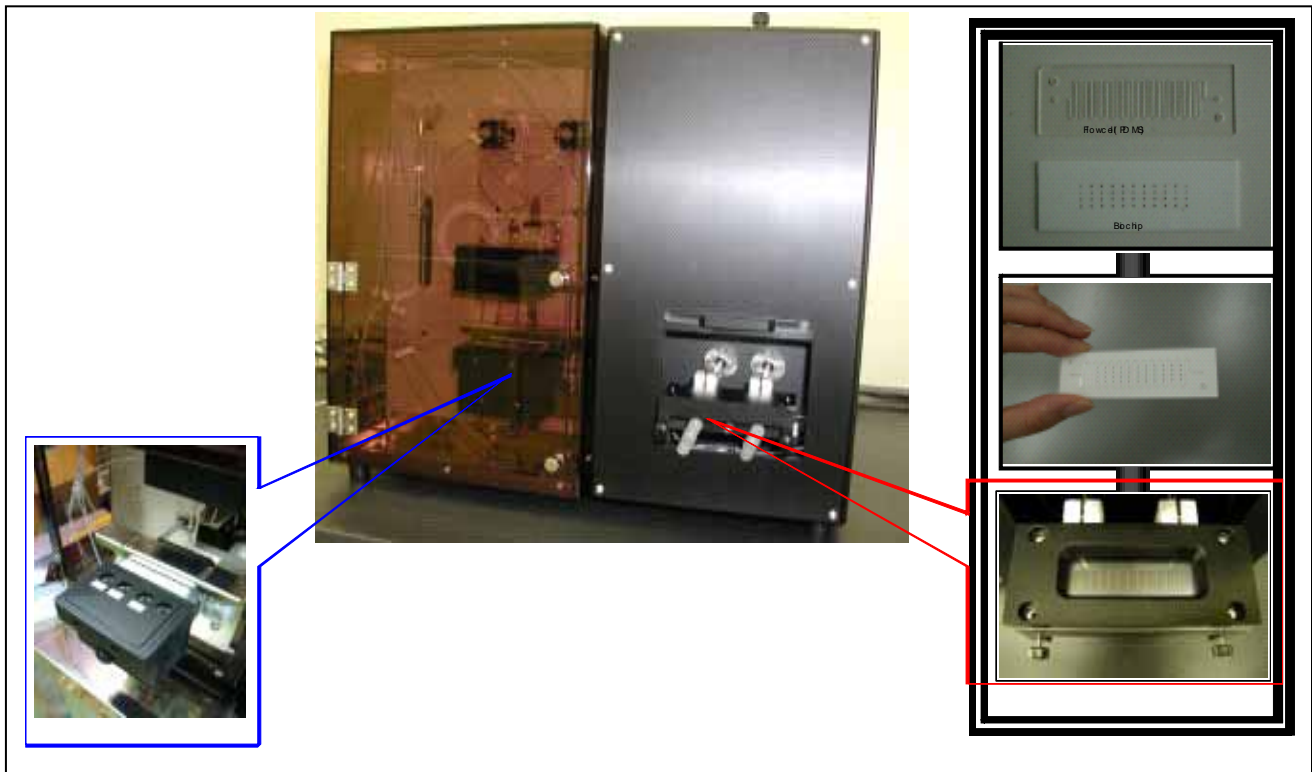


Figure 1 Automated microarray chip reader. Using a small amount of sample, rapid and all-inclusive diagnostic system.

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

DNA probes ligate in the presence of target oligonucleotide without any enzymes or reagent, where probes have reactive functional groups. DNA chemical ligation method for sensing and amplifying target oligonucleotide were developed. New fluorogenic compounds were designed and synthesized for imaging gene expression in living cells. In addition, a probe for detection of glutathione-S-transferase in living cells was also developed and the investigation is now collaborated with Kalorinska Institute of Sweden (Figure 2).

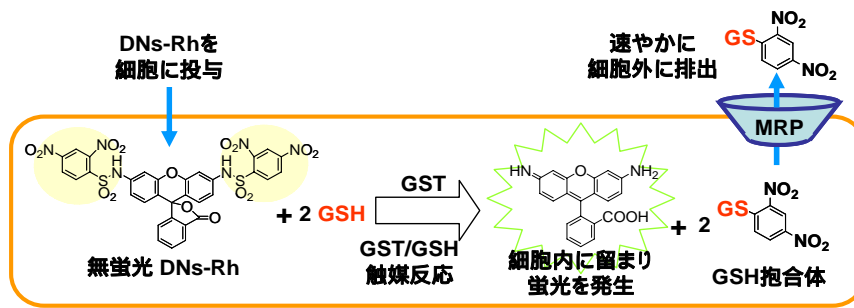


Figure 2 A prove for detection of cellular glutathione-S-transferases.

2. Therapy by nano medical engineering

(1) Preparation of stem cells for regenerative medicine (Ito, Gong, and Fujishiro)

In order to prepare stem cells derived from somatic cells, some methods were investigated using cell fusion of embryonic stem cells with somatic cells, without the methods using nuclear transfer or gene transfection.

(2) Synthesis of fusion protein for regenerative medicine (Ito, Abe, Wada, Kitajima, Sakuragi, and Shirai)

Extracellular matrix-adhesive or inorganic materials-adhesive growth factor proteins or cytokines were prepared by combination of protein engineering and organic synthesis (Figure 3). The activities of prepared proteins were investigated *in vitro* and *in vivo*.

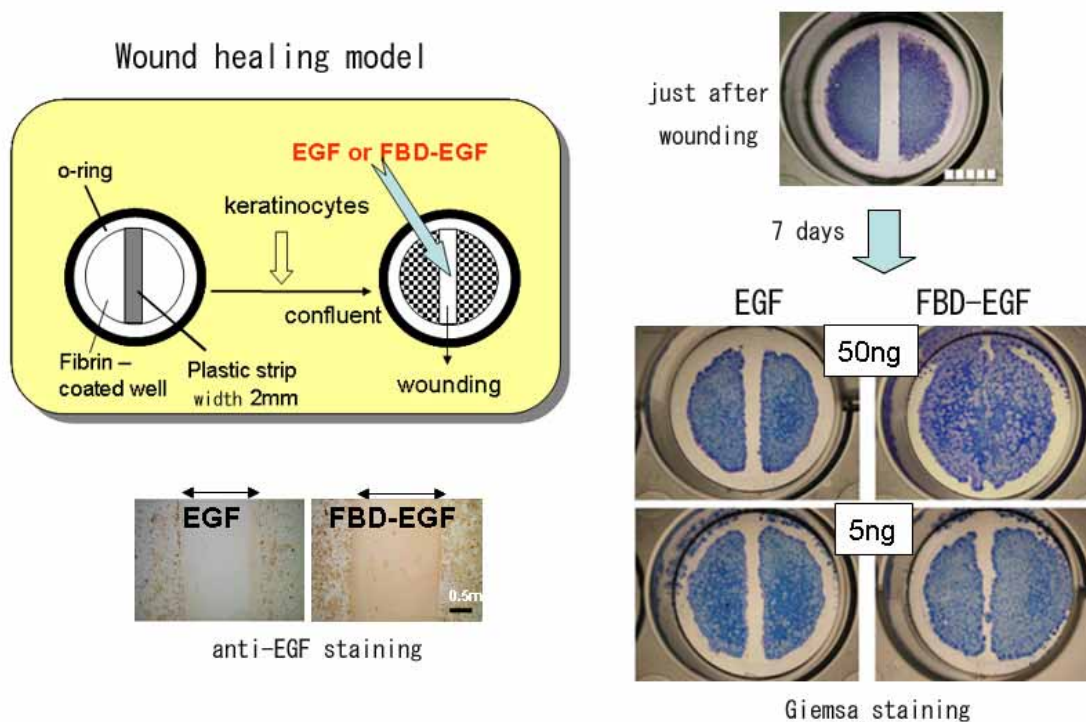


Figure 3 *In vitro* culture system of wound healing for characterization of fibrin binding domain-containing epidermal growth factor (FBD-EGF). A plastic strip (1.5-2 mm x 14 mm) was placed in the center of fibrin-coated wells and sample solution was added underneath the strip to bind to the fibrin coat. Keratinocytes were plated to the confluent and then the strip was removed to create the wound. Staining of the wound area with anti-EGF shows the binding of FBD-EGF onto fibrin coat

surface. Arrowheads indicate wound edges. Entire view of the keratinocyte sheet stained with Giemsa. FFBD-EGF significantly enhanced the growth of keratinocytes, comparing with natural EGF.

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

Dumbbell-shaped RNA molecule was synthesized to enhance the tolerance against enzymatic degradation (Figure 4). Some chemical modifications of the RNA molecules were investigated for enhancing the activity. Pro-drug sensing gene expression was also designed and investigated.

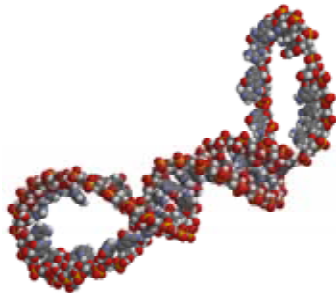


Figure 4 Molecular model of dumbbell-shaped RNA.

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

New bio-adhesives were developed by chemical modification of proteins or polysaccharides and the properties were investigated in detail.

3. Creation of functional molecules by synthetic biology

(1) Synthesis of photo-responsive aptamers (Ito, Abe, and Liu)

A nucleotide carrying azobenzene moiety was synthesized and it was employed for *in vitro* selection method. By this methodology, some oligonucleotides which bound to a target molecule in response to photo-irradiation were developed.

(2) Development of catalysis for organic synthesis (Ito, Abe, N. Abe, and Liu)

By using the combinatorial bioengineering tailor-made catalysis for site-specific or optically active organic synthesis was aimed. 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. It was also found that PEG-modified antibody was soluble in organic media and recognized the corresponding antigen.

(3) Development of novel *in vitro* selection system for creation of functional peptides (Ito, Wada, Abe, Liu, and Shirai)

In vitro selection system of functional peptides was investigated by ribosome display technology and combinatorial peptide libraries containing non-natural amino acids.

4. Fundamental investigation on soft nanotechnology

(1) Synthesis of polymer carrying zwitterions for anti-biofouling surface (Ito and Sakuragi)

By copolymerization of vinyl monomers containing zwitterion residues and photo-reactive moiety, photo-immobilizable polymers were synthesized. Photo-immobilization of the polymers reduced protein adsorption or cell adhesion onto modified materials.

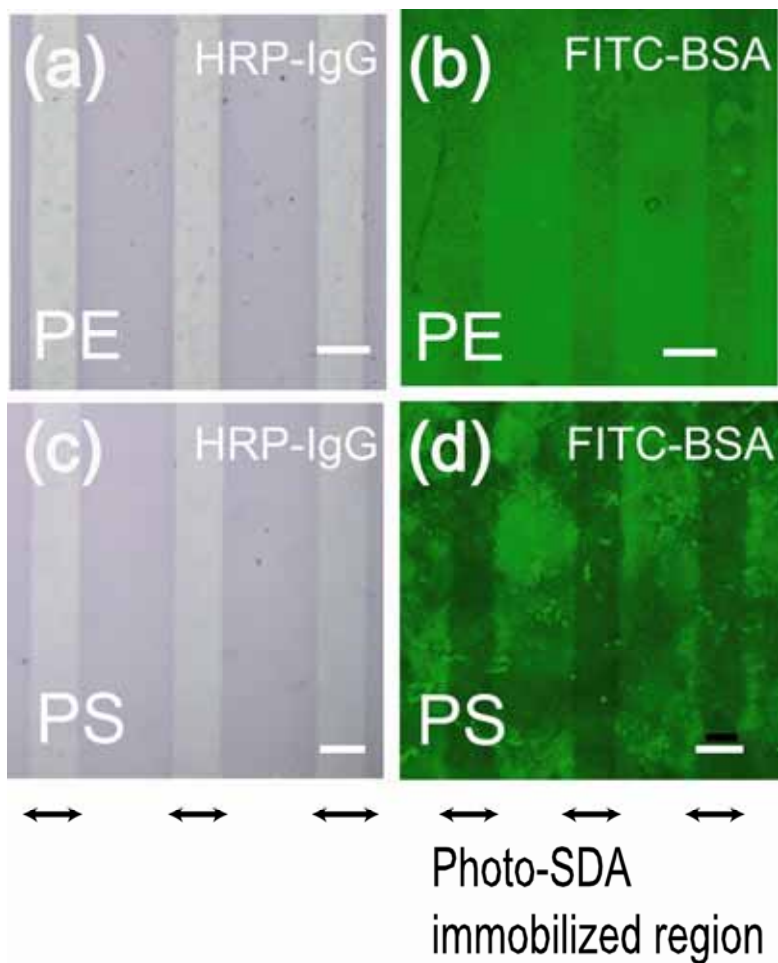


Figure 5 Phase contrast and fluorescent micrographs of HRP-IgG (a,c) and FITC-BSA (b,d) adsorbed onto a Photo-SDA micropatterned polyester (a,b) and polystyrene (c,d). The HRP conjugated protein was stained with a blue dye. Scale bars = 200 μm .

(2) Thermo-responsive surface (Ito and Sakuragi)

Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) having LCST around 30 °C was incorporated into a block copolymer PNIPAAm-PHB-PNIPAAm which adsorbable onto various types of surfaces. The polymer-coated materials were used for stem cell cultures.

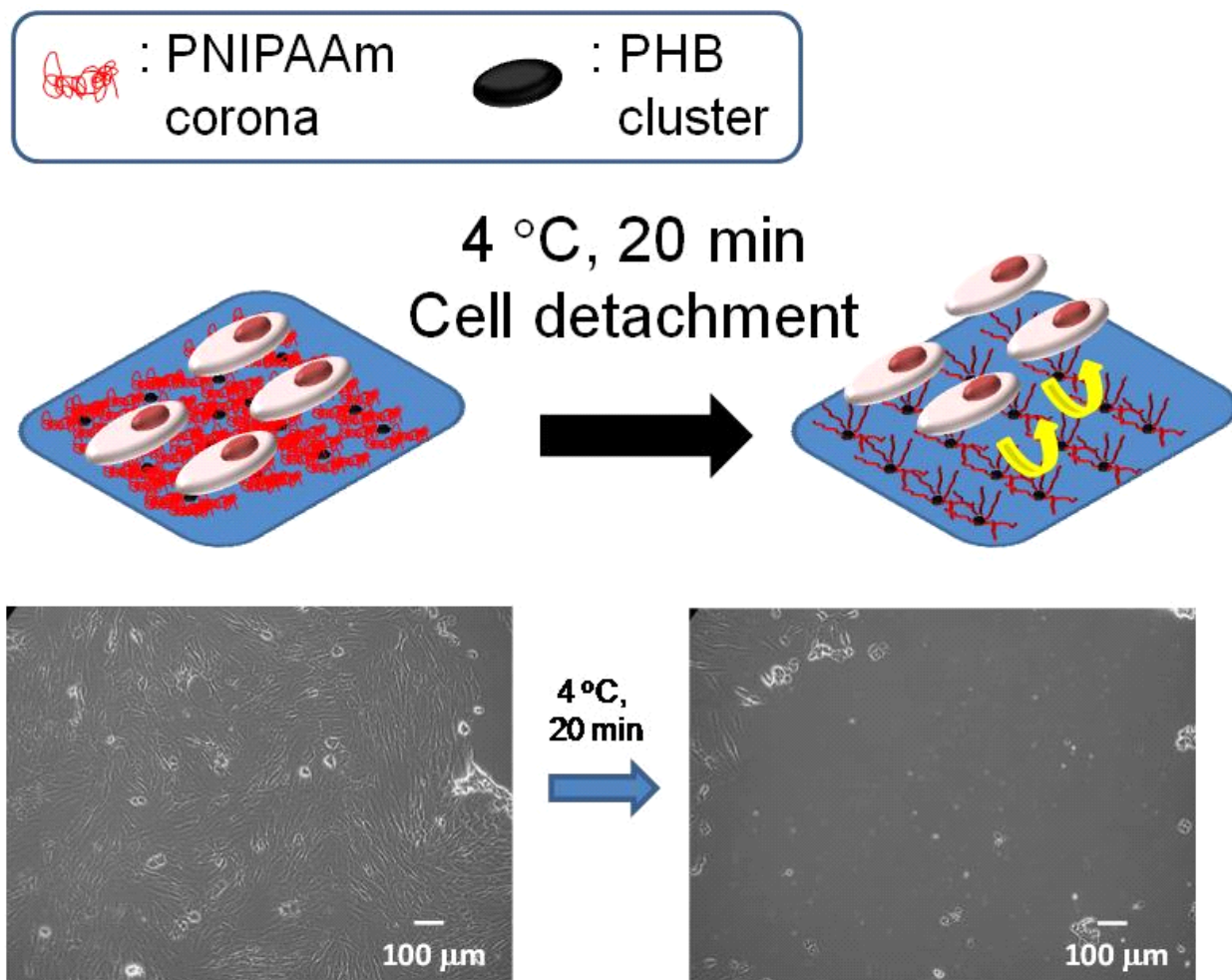


Figure 6. Temperature-induced hMSC detachment demonstrated on a PNIPAAm-PHB-PNIPAAm block copolymer-coated surface

Principal Investigator

伊藤 嘉浩 Yoshihiro Ito

Research Staff

阿部 洋 Hiroshi Abe
和田 章 Akira Wada
北嶋 隆 Takashi Kitajima
櫻木 誠 Makoto Sakuragi
劉 明哲 Mingzhe Liu
龔 建生 Jiansheng Gong
柴田 綾 Aya Shibata
實吉 尚郎 Hisao Saneyoshi

Students

中嶋 裕子 Yuko Nakashima
姜 延和 Jeonghwa Kang
伊藤 圭司 Keiji Ito
王 偉 Wei Wang
岳 曉珊 Xiaoshan Yue
烏田 美和子 Miwako Uda
原田 充 Mitsuru Harada
湯山 広崇 Hirotaka Yuyama
阿部 祥子 Shoko Abe
伊藤 美香 Mika Ito
高橋 佐和 Sawa Takahashi
原 秀太 Shuta Hara
許 牧野 Muye Xu
田村 泰嗣 Yasutsugu Tamura
間下 琢史 Takushi Mashimo
Pallavi Ananda Kadengodlu
Li Zha
金 光一 Kwang il Kim

Assistant and Part-timer

白井 晴奈 Haruna Shirai
西原 みづき Miduki Nishihara

小布施 聖 Sei Obuse
阿部 奈保子 Naoko Abe
能瀬 紹子 Akiko Nose
木村 晶子 Akiko Kimura
大崎 絵美 Emi Osaki
長野 圭子 Keiko Nagano

Visiting Members

宮本 寛治 Kanji Miyamoto
田代 英夫 Hideo Tashiro
相垣 敏郎 Toshiro Aigaki
常田 聡 Satoshi Tsuneda
原 雄介 Yusuke Hara
吉田 靖弘 Yasuhiro Yoshida
中村 真理子 Mariko Nakamura
孫 泰一 Tae il Son
古川 和寛 Kazuhiro Furukawa
松江 清美 Kiyomi Matsue
松江 登久 Takahisa Matsue