

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、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。今回、芳香族求核置換反応を利用した蛍光プローブを合成し、高いシグナル

増幅能をもつことを示した。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を合成した(図2)。そして、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、これらの蛍光化合物は多くのGST類、特にGSTA1-1の良い基質になることを明らかとした。

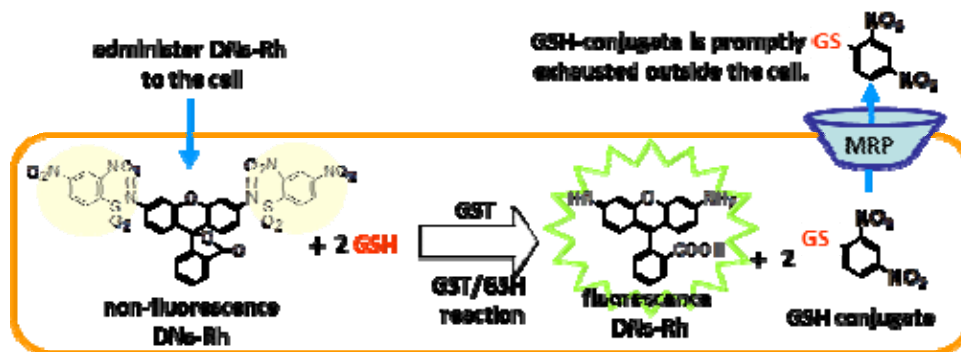


図2 DN5-Rhodamine を用いた細胞内 GST イメージング

## 2. 治療用ナノ工学

### (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。ヘマグルチニン・ウイルス殻を用いてES細胞と体細胞を融合させることにより体細胞の初期化が可能であることを明らかにした。初期化された体細胞が多能性をもつことをマウスへの移植実験により証明した(図3)。

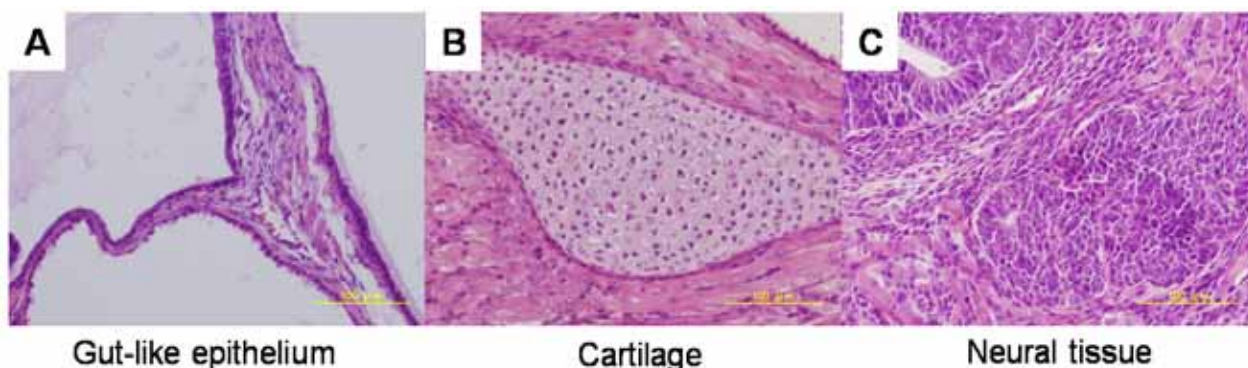


図3 マウス胚性幹細胞EB3とマウス胚性繊維芽細胞MEFの融合細胞で形成されたテラトーマのHE染色像。(A) 腸様上皮細胞(内胚葉)、(B) 軟骨(中胚葉)、(C) 神経組織(外胚葉)。スケール長は100μm。

### (2) 結合性成長因子の創成(伊藤、阿部、多田、北嶋、櫻木)

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。その一つとしてファイブロネクチン・コラーゲン結合性ドメインを連結したHepatocyte Growth Factor (HGF) 融合蛋白の皮膚の再生効果を見いだした(図4)。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、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に成功した。

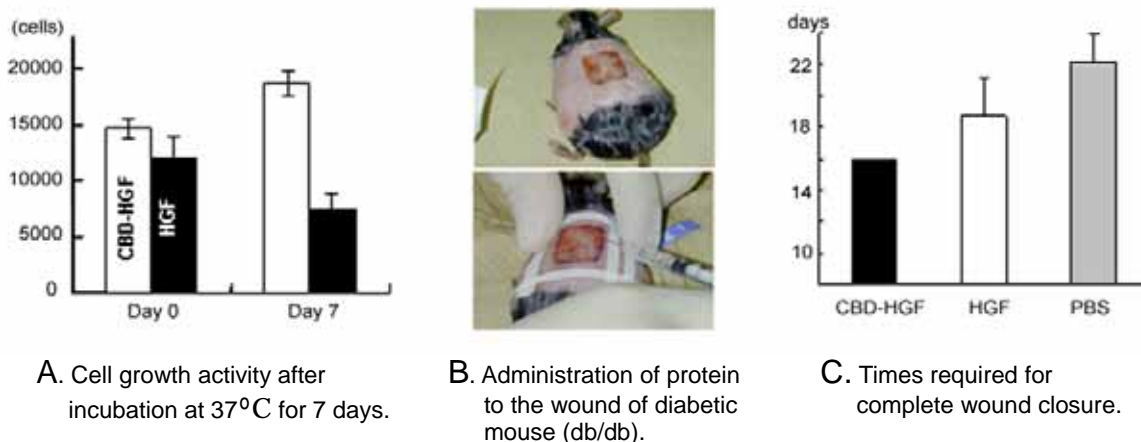


図4 CBD-HGFはフィブロネクチンコラーゲン結合性ドメインとHGFの融合蛋白である。この融合蛋白は、分子の安定性が向上しており(A)を難治性皮膚潰瘍モデルマウスに投与した(B)ところ、創の完全閉鎖に要する時間がnative HGFやPBSに比較して早まることを見いだした(C)。

(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。(図5)。

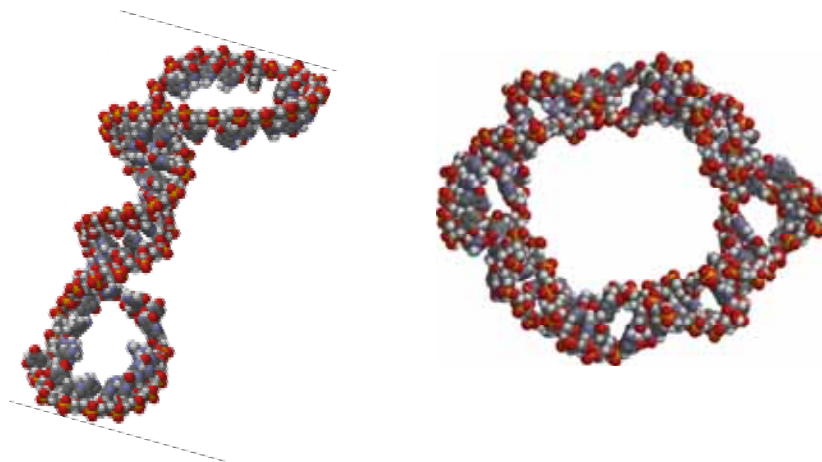


図5 RNA干渉効果を示す一本鎖環状RNAと二本鎖環状RNA

(4) バイオ接着材料の創成(伊藤、小布施)

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(図6に原理)医療応用を目指した研究開発を行った。今年度新たに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。

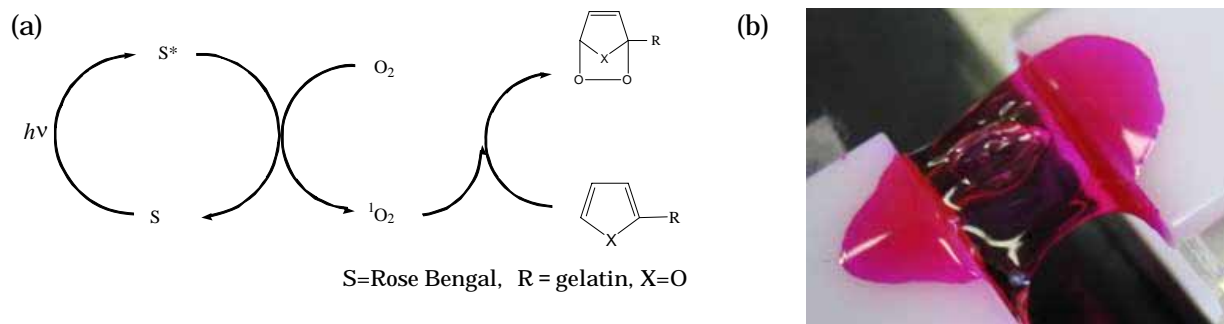


図6 フラン環導入ゼラチンの光照射による硬化原理(a)と接着の様子(b)。

(5) ドラッグ・デリバリー・システムの開発 (伊藤、阿部、劉、多田)

生分解性高分子からナノカプセルの調製を行い、蛍光性タンパク質の導入に成功した。得られたナノカプセルが細胞内に高効率で取り込まれることも明らかとなった。さらに生体高分子に疎水性分子を導入することで高分子ミセルを合成することができた。合成した高分子ミセルは、蛍光性タンパク質を取り込み、細胞内へのタンパク質の輸送を促進することができた。

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、劉)

側鎖にアゾベンゼンをもつアミノ酸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た。

(2) 有機合成用触媒の開発 (伊藤、阿部、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り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、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開始した。

4. ソフトナノテクノロジーの基盤研究

(1) 新しい光反応性生体高分子の合成 (伊藤、Joddar)

カルボキシレート化低分子量キトサン、ヒト配列をもったゼラチン、あるいはヒアルロン酸のような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。成長因子の固定化にも利用でき、新しい医療応用が期待できる。

**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 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.

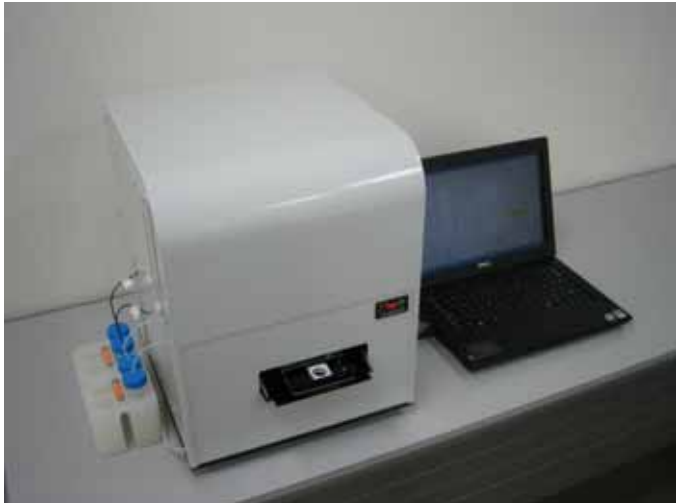


Figure 1 Automated microarray chip reader. Using a small amount of sample, rapid and all-inclusive diagnostic system.

**(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. We developed new fluorescence probe based on nucleophilic aromatic substitution reaction. The probe showed a rapid turn-on fluorescence signal. In addition, a probe for detection of glutathione-S-transferase in living cells was synthesized (Figure 2). And these

compounds turned out to be good substrates for GSTs, especially for GSTA1-1, by collaboration research with Kalorinska Institute of Sweden.

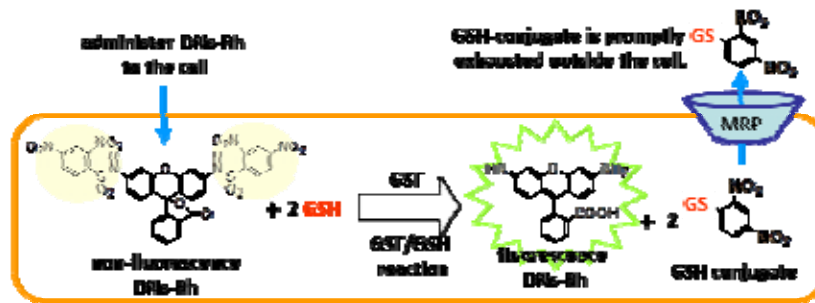


Figure 2 A prove for detection of cellular glutathione-S-tarnsferases.

## 2. Therapy by nano medical engineering

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

In order to prepare reprogrammed cells derived from somatic cells, some methods were investigated using cell fusion of embryonic stem cells with somatic cells. We found that hemagglutinin virus envelope can be employed for the reprogramming fusion. The pluripotency of fusion cells was confirmed by their expression of marker genes for all the three germ layers after differentiation induction, and by their ability to form teratoma which contained all the three primary layers as shown in Figure 4..

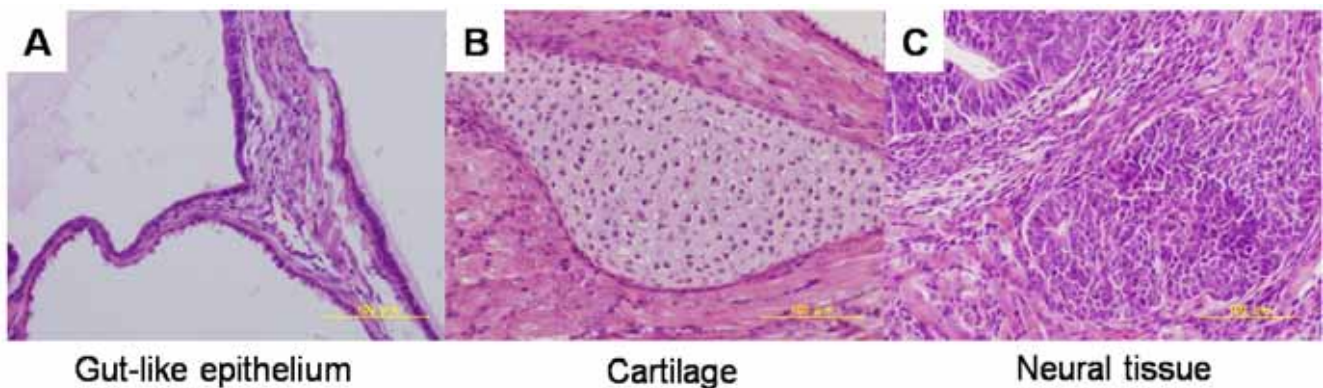


Figure 3 HE staining of teratoma sections of teratoma generated by EB3×MEF fusion cells implantation (A) Gut-like epithelium (endoderm); (B) Cartilage (mesoderm); (C) Neural tissue (ectoderm). Scale bar indicated 100 µm.

### (2) Synthesis of fusion protein for regenerative medicine (Ito, Abe, 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. One of such proteins, HGF fusion protein with collagen binding affinity (CBD-HGF) was more stable in culture medium at 37°C for a week as compared to native HGF. It promoted repair of intractable skin wounds of diabetic mice probably due to its thermal stability (Fig. 4). New surface treatment for titan or stainless steel was also investigated in detail. In addition, novel growth factors which has binding activity to hydroxyapatite or titan were synthesized by combination of organic chemical synthesis and gene-recombinant technology.

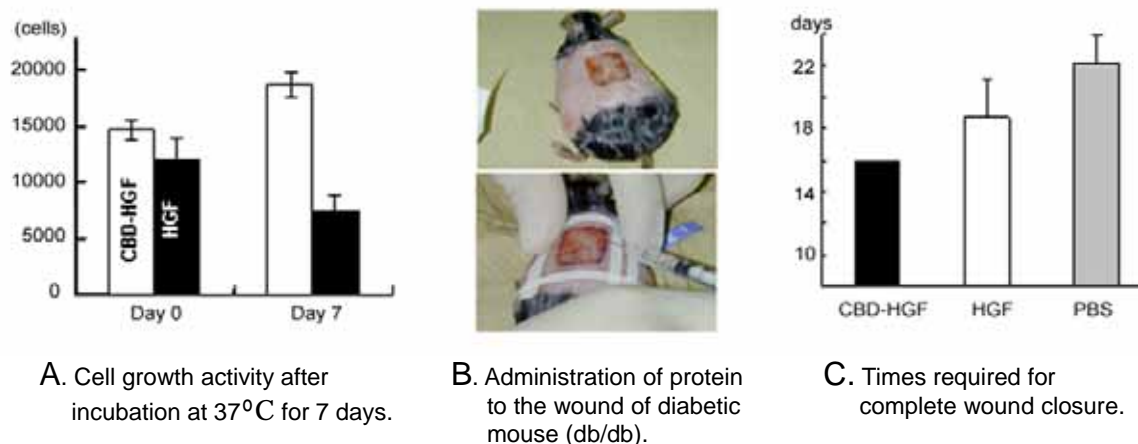


Figure 4 Collagen binding domain (CBD)-containing hepatocyte growth factor (HGF) was stable at 37 °C even after seven days (A). When it was injected in diabetic mouse (B), the recovery of injured site was enhanced by CD-HGF more than by HGF (C).

(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 5). Double-stranded nanocircular RNA were synthesized for the first time. We found that it has potent RNAi activity. This is a chief achievement of RNA nanotechnology.

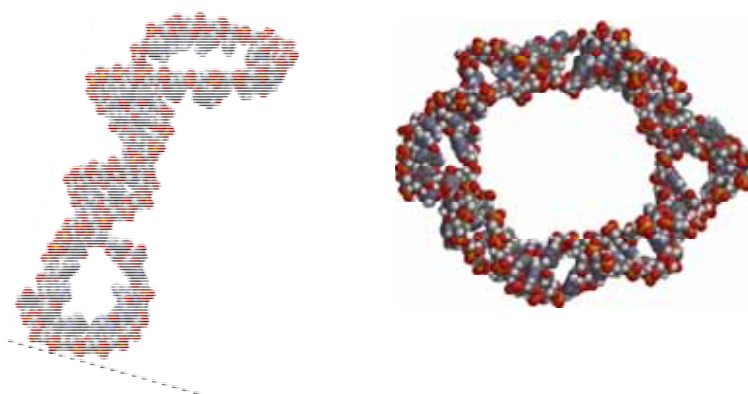


Figure 5 Synthetic nanocircular RNA for RNA interference.

(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 gelatin was mixed with rose Bengal which is employed food additive. The mixture was solidified by visible light irradiation as shown in Figure 6a. The material was investigated as a medical adhesive. In addition, it was demonstrated that by modification of preparation method the crosslinking time was shortened.

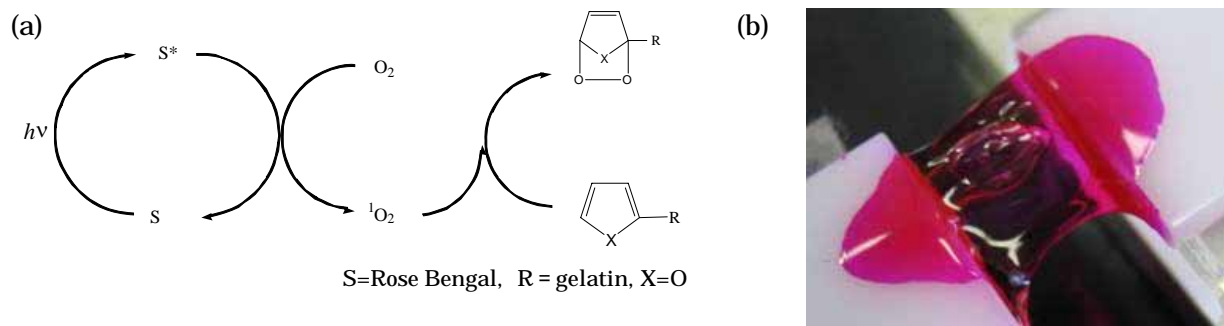


Figure 6 Principle of photo-sensitive crosslinking (a) and adhered gelatin on hydroxyapatite.

### 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, 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 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 materials and photo-lithography was possible by using them. Because growth factor proteins were also co-immobilized by using them, the materials can be used for medical applications.



***Principal Investigator***

伊藤 嘉浩 Yoshihiro ITO

白井 晴奈 Haruna SHIRAI  
西原 みづき Miduki NISHIHARA

貝塚 利恵 Toshie KAIZUKA

***Research Staff***

阿部 洋 Hiroshi ABE

小布施 聖 Sei OBUSE

北嶋 隆 Takashi KATAJIMA

阿部 奈保子 Naoko ABE

櫻木 誠 Makoto SAKURAGI

能瀬 紹子 Akiko NOSE

劉 明哲 Mingzhe LIU

木村 晶子 Akiko KIMURA

龔 建生 Jiansheng GONG

大崎 絵美 Emi OSAKI

柴田 綾 Aya SHIBATA

佐藤 祐子 Yuko SATO

實吉 尚郎 Hisao SANEYOSHI

Yujiao CHEN

Binata JODDAR

***Visiting Members***

多田 誠一 Seiichi TADA

田代 英夫 Hideo TASHIRO

***Students***

中嶋 裕子 Yuko NAKASHIMA

相垣 敏郎 Toshiro AIGAKI

姜 延和 Jeonghwa KANG

常田 聡 Satoshi TSUNEDA

伊藤 圭司 Keiji ITO

原 雄介 Yusuke HARA

王 偉 Wei WANG

吉田 靖弘 Yasuhiro YOSHIDA

岳 曉珊 Xiaoshan YUE

中村 真理子 Mariko NAKAMURA

伊藤 美香 Mika ITO

孫 泰一 Tae il SON

高橋 佐和 Sawa TAKAHASHI

章 培標 Peibiao ZHANG

原 秀太 Shuta HARA

松江 清美 Kiyomi MATSUE

許 牧野 Muye XU

松江 登久 Takahisa MATSUE

田村 泰嗣 Yasutsugu TAMURA

森次 望美 Nozomi MORITSUGU

間下 琢史 Takushi MASHIMO

Pallavi Ananda KADENGODLU

Zha LI

山田 亮 Ryo YAMADA

Farhima AKTER

Kwangil KIM

Siyoo SEO

Shinhye PARK

Youngmin CHO

***Assistant and Part-timer***