

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

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、Zhou)
新しい光反応性基を用いた固定化材料を開発し、その性能評価を行った。

(2) 細胞内遺伝子検出法 (阿部、伊藤)

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。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ることを論文発表した。さらに、新しい高効率鋳型反応が可能な化学反応プローブの合成に成功し、信号サイクルを増幅することで高感度化に成功し論文発表した(図1)。

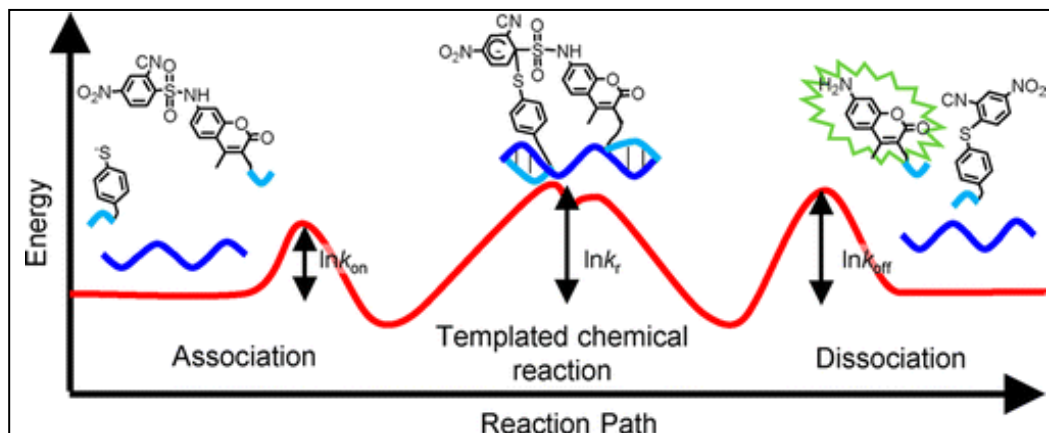


図1 求核芳香族置換反応で鋳型無の場合に比較して30秒後の蛍光を223倍に増強。

2. 治療用ナノ医工学

(1) 再生医療用幹細胞の調製 (和田、Joddar、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(図2)。また、ヒト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。

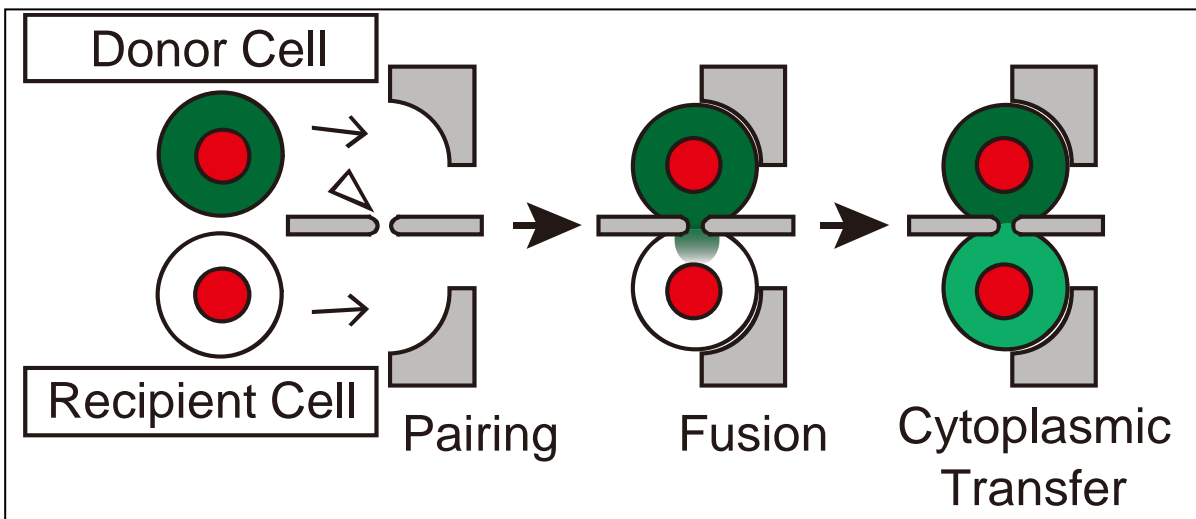


図2 ドナー細胞と受容細胞を、狭いマイクロスリットを介して対峙させ、融合させることで、核移動の伴わない細胞質移動を可能にした。

(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)

ダンベル型、分岐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。さらに、低分子化したsiRNAを合成し、膜透過性を向上させ、細胞内でRNA干渉発現する系を開発した(図3)。

(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。コラーゲン結合性骨形成タンパク質との併用で新しいティッシュ・エンジニアリング系を開発した。

(5) ドラッグ・デリバリー・システムの開発 (多田、He、小林、萩原、伊藤)

炭酸アパタイト粒子を用いた新しいドラッグ・デリバリー・システムの構築を行った。DNAワクチンのデリバリーへの応用を行った。また回転分子や、折れたたみ分子で修飾した金ナノ粒子を開発し、細胞内への取り込みなどについて検討を行った。

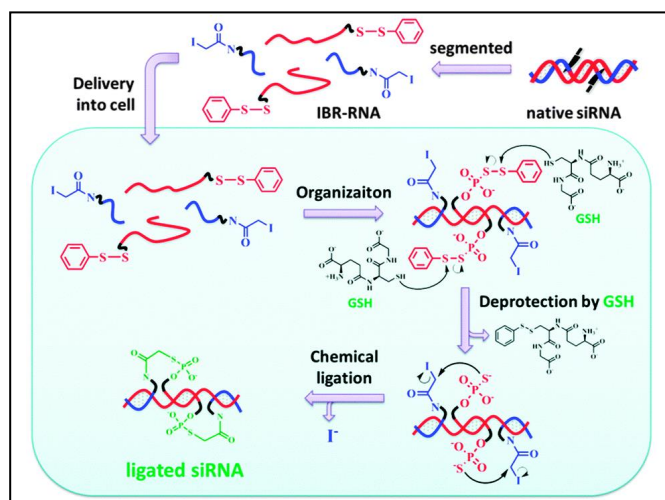


図3 低分子化したsiRNAが細胞内に取り込まれてから組織化し、RNA干渉作用を引き起こすsiRNAになるよう設計。

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り、その詳細を検討した。

(2) インターロックDNAロタクサンの調製 (鬼塚、阿部、伊藤)

核酸のハイブリダイゼーションとクリック反応を用いたシュード・ロタクサン形成に成功した。反応は37°C、pH7.2で速やかに進行し、環状化も可能となった。

(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、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) リボソーム高分子合成の開発 (伊藤、阿部、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、詳細な検討を行った。さらに環状RNAを用いた長鎖繰り返しのポリペプチドの合成に成功した (図4)。

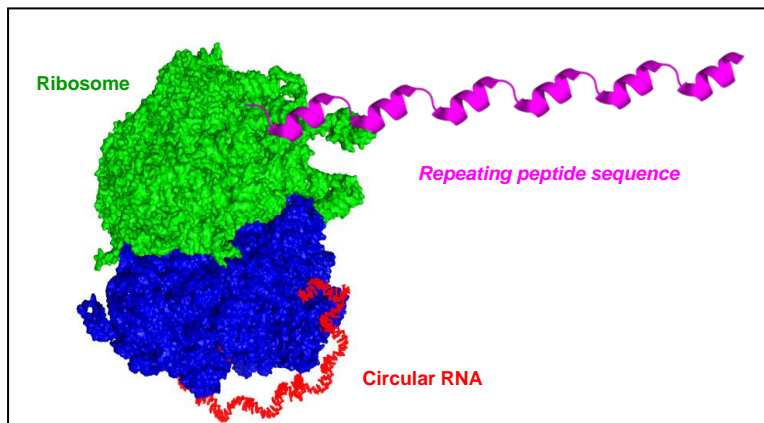


図4 ストップコドン を消去した小さな環状RNAをリボソームが認識して結合し、翻訳を始めると、RNA上をリボソームが回転し、繰り返し配列のポリペプチドを生み出す。

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、伊藤)

有機低分子の真空蒸着膜中で分子がアモルファスでありながら自発的分極配向を示す現象について、分子構造により配向の極性および大きさの制御が可能であることを明らかにし、その発現機構として分子形状に起因する「非対称サイコロモデル」を提案した。また2次元光双安定素子における状態遷移領域の伝播現象について、外部フィードバックによりパルス、振動、カオスの挙動など多様なダイナミクスが発現することを見出した。

(2) 多孔質高分子半導体ネットワークの開発 (川本、伊藤)

多孔質構造を有する高分子半導体ネットワークを合成し、その諸物性に関する検討をおこなった。得られた材料は可視光を捕集する有機半導体であり、多孔質構造を有することがわかった。多孔質構造を評価するために77 Kにおける窒素吸脱着に関する検討をおこなったところ、Brunauer-Emmertt-Teller比表面積は722 m²g⁻¹であった。また、熱重量分析の結果より、ポリマーネットワークは500度以上で多孔質構造を維持す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. Creation of Functional Molecules by Synthetic Biology and Molecular Evolutionary Engineering
4. Fundamental Investigation on 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, Zhou)

In order to develop a new diagnostic system using micro-array biochip, we synthesized new photo-immobilizable polymers and evaluated the performance as an immobilizing matrix.

(2) Nucleic acid sensing in living cells (Ito, Abe)

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 and reported the results as discussion. A new chemical probe showing high signal detection by efficient template reaction was reported.

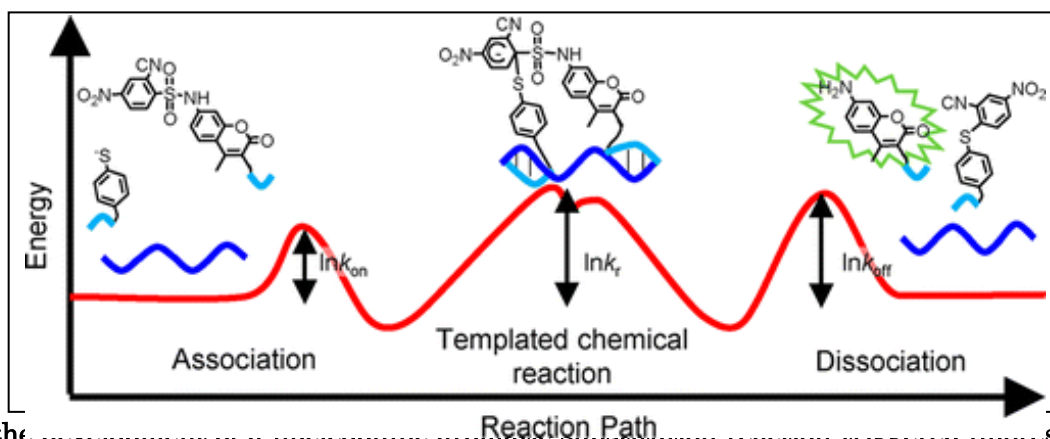


Figure 1 the development of a macrocyclic aromatic substitution reaction triggered fluorescent probe. The probe underwent a rapid templated reaction without any of the undesired background reactions. The fluorogenic reaction conducted in the presence of a template provided a 223-fold increase in fluorescence after 30 s compared with the nontemplated reaction.

2. Therapy by nano medical engineering

(1) Preparation of stem cells for regenerative medicine (Wada, Joddar, 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 at Bioengineering Laboratory of RIKEN as shown in Figure 2. It was also indicated that chemically fixed feeder cells supported the growth of human iPS cells with keeping undifferentiated state.

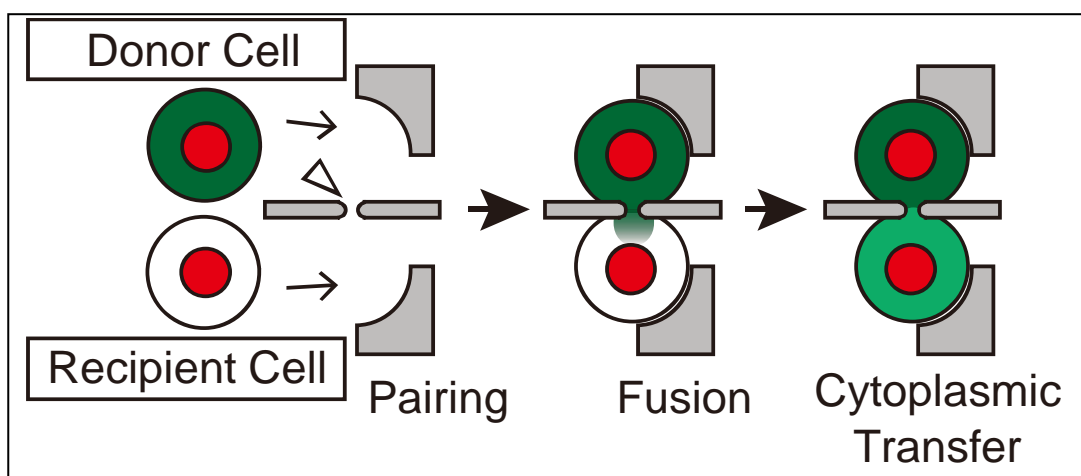


Figure 2 Cytosol fusion between donor and recipient cells through narrow microslit which inhibits nucleus movement.

(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.

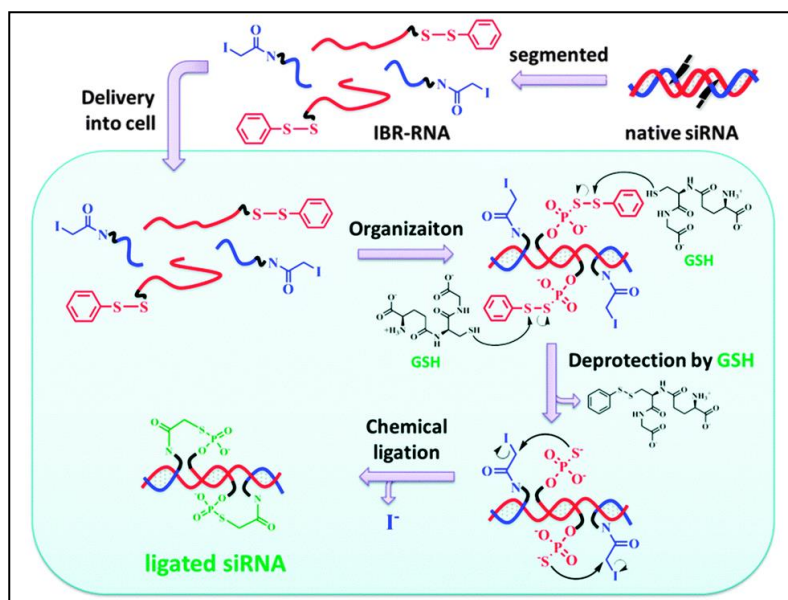


Figure 3 Proposed mechanism of the intracellular buildup reaction of active siRNA (IBR).

(3) RNA interference method using chemically modified RNA molecule (Ito, Abe)

Dumbbell-shape or branched RNA molecules were synthesized to enhance the tolerance against enzymatic degradation. Truncated siRNA with high cell permeability was synthesized and the reconstruction in cell was evaluated.

(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. 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 shortened. The properties were characterized in detail. In addition, mesenchymal stem cells were encapsulated and implanted with the photo-reactive polymer in the presence of collagen binding bone morphogenetic protein.

(5) Drug delivery system (Tada, He, Kobayashi, Hagiwara, Ito)

Drug delivery using carbonate apatite nanoparticle was developed. The system was applied for DNA vaccine delivery. Gold nanoparticles modified with functional organic molecules were prepared and cellular uptakes of these particles were investigated.

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. The mechanism was investigated in detail.

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

We report a novel method to form a pseudorotaxane architecture using only a pair of reactive oligodeoxyribonucleotides (ODNs), which we designed and synthesized, and then performed the pseudorotaxane formation reaction with both unmodified DNA and RNA oligonucleotides. The reaction proceeded smoothly at 37°C and pH 7.2, leading to the formation of a stable complex on a denaturing polyacrylamide gel. Interestingly, the pseudorotaxane was formed with the cyclized ODN reversibly by

the slipping process.

(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) Ribosomal synthesis of polymers (Ito, Tada, Abe)

PEG was site-specifically incorporated into peptide or proteins by cell-free translation system. The incorporation ratio was significantly dependent of the molecular weight of PEG. Small circular RNA molecules containing an infinite open reading frame were synthesized and tested in an *E. coli* cell-free translation system. A circular RNA 126 nucleotides in length was found to produce more product than its linear counterpart by two orders of magnitude, because a ribosome can work more effectively towards the elongation on circular RNA than it can on linear RNA in this continuous peptide synthesis.

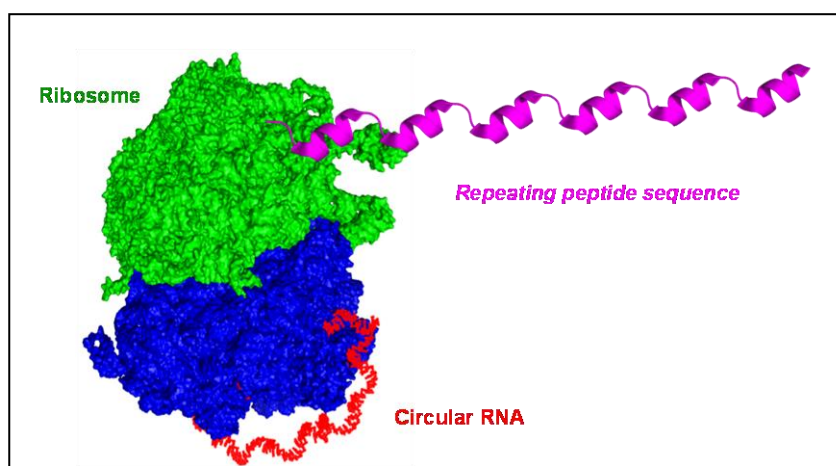


Figure 4 ribosome bound the small cyclic RNA and translated the codon to repeating peptide sequence without stopping

4. Fundamental investigation on soft nanotechnology

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

Spontaneous polar molecular orientation in vacuum-evaporated organic thin films was investigated, and it was found that polarity and magnitude of molecular orientation can be controlled by molecular structure. “Asymmetric dice model” has been proposed to elucidate this spontaneous polar molecular orientation.

Two-dimensional optical bistable devices were investigated in terms of propagation of state-transition area, and it was shown that pulse, oscillation, and chaotic behaviors can be realized by external feedback on the device.

(2) Development of semiconducting porous organic polymer networks (Kawamoto, Ito)

Synthesis and characterization of semiconducting porous organic polymer networks were investigated. The resultant materials exhibited porous structures showing visible-light harvesting properties. The porous structure was evaluated by nitrogen sorption isotherm measurement at 77K. The Brunauer-Emmertt-Teller surface area was estimated to be 722 m²g⁻¹. Furthermore, Thermogravimetric analysis showed the polymer networks were stable over 500 °C with 10% weight loss.

Principal Investigator

伊藤 嘉浩 Yoshihiro ITO

中山 典久 Norihisa NAKAYAMA

Research Staff

磯島 隆史 Takashi ISOSHIMA
鵜澤 尊規 Takanori UZAWA
川本 益揮 Masuki KAWAMOTO
北嶋 隆 Takashi KATAJIMA
萩原 恭二 Kyoji HAGIWARA
和田 健一 Ken-ichi WADA
Sivakumar Maliapan PONNURENGAM
中嶋 裕子 Yuko NAKASHIMA
多田 誠一 Seiichi TADA
Binata JODDAR
王 偉 Wei WANG
何 盼 Pan HE
中野 佑妃子 Yukiko NAKANO
小林 謙也 Kenya KOBAYASHI
Baiju Govindan NAIR
鬼塚 和光 Kazumitsu ONIZUKA
伊藤 美香 Mika ITO

Students

丸山 豪斗 Hideto MARUYAMA
Yasodha MANANDHAR
Thoa Thi Thanh TRAN
SiYoon SEO
ShinHye PARK
周 小越 Xiaoyue ZHOU
Xi YANG
Qingmin ZANG
Yue ZHOU
河合 祐人 Yuto KAWAI
荒木 美香 Mika ARAKI
日向 裕人 Yuto HINATA
神野 大 Masaru JINNO

Assistant and Part-timer

西原 みづき Miduki NISHIHARA
阿部 奈保子 Naoko ABE
Liping ZHU
小布施 聖 Sei OBUSE
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

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
山村 雅幸 Masayuki YAMAMURA
小畠 英理 Eiry KOBATAKE
木賀 大介 Daisuke KIGA
阿部 洋 Hiroshi ABE
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
増田 安司 Yasushi MASUDA
佐野 健一 Kenichi SANO
三友 秀之 Hideyuki MITOMO
新倉 謙一 Kenichi NIIKURA
周 弟 Di ZHOU
畠田 昌至 Masashi HATADA
江上 舞 Mai EGAMI