

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)

光反応性基を用いた固定化材料を開発し、特にアレルギーの原因解明のための測定系の開発と再現性高くマイクロアレイ・チップができる条件が整ってきたので理研ベンチャーの設立を検討した。

(2) 生体分子検出法 (鵜澤・植木・多田)

病原マーカータンパク質、ウィルスを構成するタンパク質、生体機能分子等をターゲット分子として、それらに結合するペプチドプローブを進化分子工学的手法にて選出した。

(3) 細胞ライセートアレイによる細胞ストレス評価法の開発 (森島)

細胞中の特定タンパク質群を精密定量することにより細胞ストレスを定量的に評価する手法の開発を行っている。開発は装置製作、ライセート調製実験条件の検討、統計学的手法によるデータ処理の三つのパートから成る。今年度はライセートアレイヤー試作機の改良を進め、均一なスポットティングを再現的に行えるようになった。

2. 治療用ナノ医工学

(1) 再生医療用幹細胞の調製 (Mao・伊藤)

ヒト間葉系幹細胞の無血清培養の検討をすすめ、3種類の成長因子塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF)、トランスフォーミング成長因子-β (TGF-β)、血小板由来成長因子 (PDGF) を固定化した材料上で行えることが明らかとなった。固定化することにより保存安定性が高まり、再利用も可能になった。

(2) 生物模倣設計による、成長因子固定化技術の開発 (宮武)

ムール貝の水中接着機構を模倣し、成長因子を医療用素材に細胞無毒性な方法で固定化する技術の検討を行った。ムール貝の水中接着タンパク質をもとに、L-DOPAを含む接着性ペプチド(X=L-DOPA; XKXXK)を設計した。インスリン様成長因子-1 (IGF-1) のC末端に、遺伝子組み換え技術により接着性ペプチドの前駆体である、YKYKYを導入しIGF-1-YKYKYを調製後、酵素反応によってY→Xに変換

し、IGF-1-XKXKXを得た。このチタン表面への吸着性を調べたところ、野生型と比較して、5倍程度吸着性が向上した。さらに、IGF-1-XKXKXを表面に固定化したチタン材料は、固定しない場合と比較して、細胞増殖を2倍程度増加させたことから、本手法の安全性と有効性が確認できた。

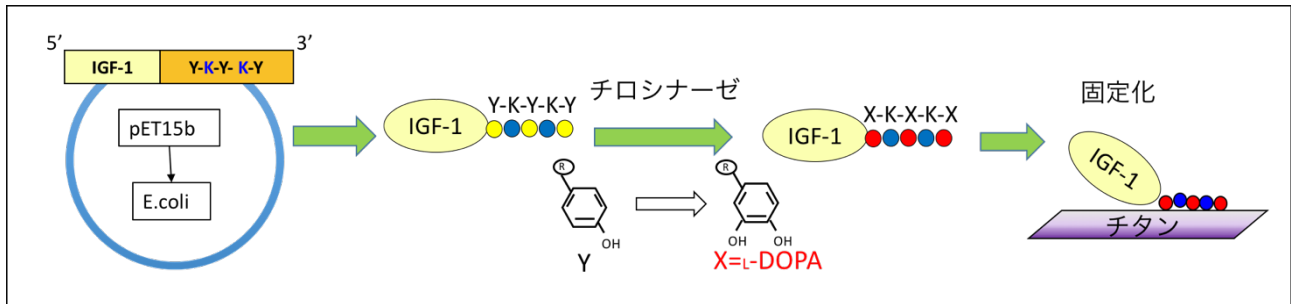
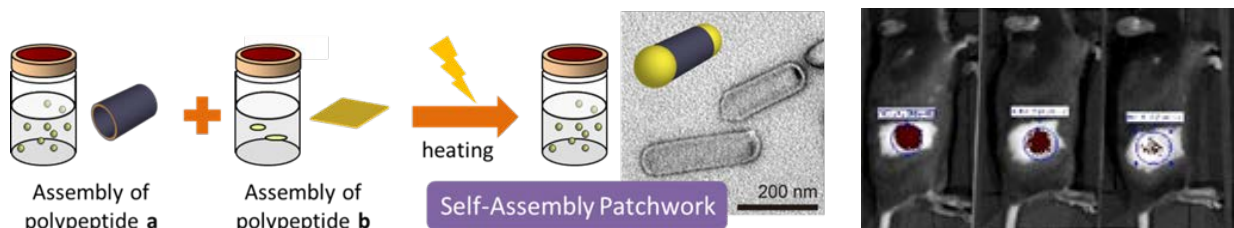


図1 IGF-1のチタン表面への固定。大腸菌でIGF-YKYKYを発現し、精製後、チロシナーゼによる酵素反応によりIGF-1-XKXKXを調製した。得られたIGF-1-XKXKXは、チタン表面上に活性を保ったまま、強固に吸着させることができた。

(3) ドラッグ・デリバリー・システムの開発 (上田)

親水性薬剤キャリアとして中空のチューブ状ペプチド集合体に注目し、その形状制御の検討を行った。球状のペプチド集合体を作用させることによりチューブの開口部を塞ぐことに成功し、DDSキャリアとしての応用研究を行っている。本キャリアをインドシアニングリーンで標識し、担癌マウスに静脈注射投与した。近赤外蛍光イメージングから投与後2時間という短時間において腫瘍への集積を確認し、従来の球状キャリアと比較したところより素早い集積であることが明らかとなった。さらに実際、親水性抗がん剤であるシスプラチンおよびドキシソルビシンを内水相に内包し、担癌マウスに投与したところ、腫瘍細胞の成長を抑制する結果が得られた。カプセル状キャリアを用いた場合の腫瘍抑制効果はシスプラチン単独や球状キャリアを用いたものよりも早く、優れた薬理効果が見られた。



図X 中空ペプチド集合体キャリアの概略図と TEM 画像 (ネガティブ染色像) および近赤外腫瘍イメージング

(4) ナノ粒子を利用した小胞体ストレス誘導による細胞死誘導システム (秋元)

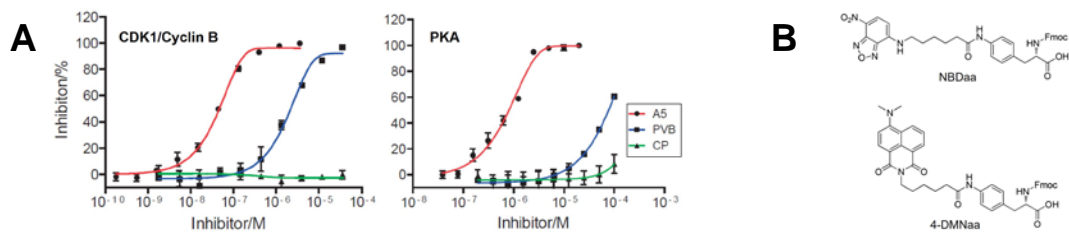
細胞内タンパク質と反応性を有する化合物の細胞内デリバリーにより細胞死を誘導するシステムを構築した。クロロメチル基を有する化合物は、ナノ粒子に内包することにより、細胞死を効率的に誘導することに成功した。また、細胞死誘導効率は、クロロメチル基の数と隣接する結合の種類に影響することがわかり、アルキル鎖に結合されたクロロメチル化合物は、低分子単体では極めて低い細胞毒性を示すのに対し、ナノ粒子に内包することにより細胞死を効率的に誘導できることが明らかとなった。

3. 合成生物学手法による機能性分子の創製研究

(1) 新しい機能性ペプチドアダプターの開発に向けたペプチド選別法の改良 (鶴澤、多田)

非天然アミノ酸を導入したペプチドアダプターの選別によるスーパー阻害剤、センシング分子、触媒分子等の新規機能性分子の開発を目指した。例えば、キナーゼの阻害剤を導入したペプチドアダプターを選出し、このペプチドアダプターは阻害剤のみの場合よりも10から100倍の阻害活性を示すことを明らかとした。また、先に選出したカルモジュリンに結合すると蛍光を発するようになるペプチドアダプターの蛍光色素部分を他の蛍光色素に置き換えることで、蛍光強度変化を10倍から100倍に増強することに成功した。更に、効率よくペプチドアダプターを選別する手法として、リポソーム内におけるペプチド翻訳と機能評価法の検討およびマイクロビーズディスプレイ法によるペプチド選別法の検討を行

った。

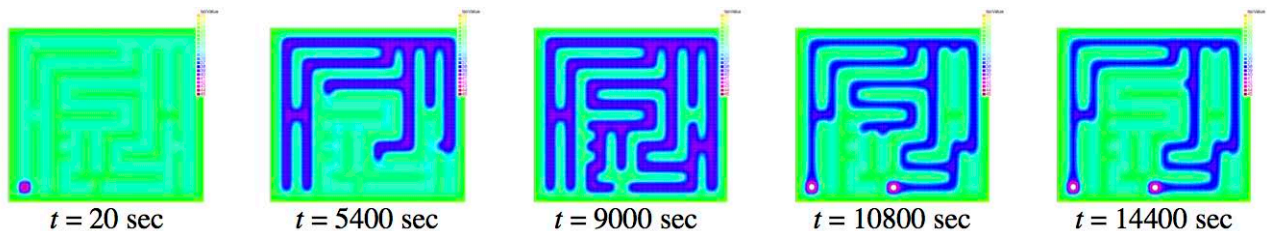


図X (A)選出した阻害剤(PVB)を含むA5ペプチドはPVB単体よりもキナーゼ類に対して高い阻害活性を示した。(B)NBDaaを4-DMNaaに替えることでカルモジュリンに結合した際の蛍光強度変化を10倍から100倍に増強することに成功した。

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 (礒島)

2次元光双安定素子における状態遷移領域の伝播 (波面伝播) 現象を用いて、迷路探索が実現可能であることを数値シミュレーションで実証した。動作条件によって行き止まり経路からの撤退動作 (縮退モード) が可能であることを明らかにするとともに、素子を作製し迷路探索実験を行なった。また微細構造を表面に形成した寒天培地で、表面構造の形状やサイズによって微生物の培養制御を試みた。



図x 熱伝播型2次元光双安定素子における波面伝播を用いた迷路探索のシミュレーション。t = 9000 secまでは伸長モード、それ以降は縮退モードで行き止まり経路からの撤退を行っている。右端のt = 14400 secで探索終了であり、始点と終点を結ぶ全経路が表示されている。

(2) フラーレンナノ粒子を用いた単層型カーボンナノチューブの水中分散性 (Li, He, 伊藤, 川本)

フルラーレンナノ粒子がカーボンナノチューブの水中分散剤として機能することを明らかにした。水中への分散性は、ナノ粒子がカーボンナノチューブ側面に付着することで誘起することがわかった。得られた水分散溶液を用い、フレキシブル基板へのフルラーレンナノ粒子-カーボンナノチューブ複合体膜の成膜に成功し、この複合体膜が熱電変換能を有することを明らかにした。また、フルラーレンナノ粒子-SWCNT 複合体へ水溶性ポリチオフェンを加えると、三元系ナノコンポジットを水中で自発的に形成した。得られたナノコンポジットのキャスト膜を作製し疑似太陽光を照射したところ、光電変換能を示すことがわかった。

(3) 多刺激クロミズムを示すポリチオフェンナノ粒子の開発 (Salikolimi, 伊藤, 川本)

水中で自発的にナノ粒子を形成するポリチオフェンを開発し、様々な外場刺激に対してクロミズム応答を示すことがわかった。ポリマー溶液へ徐々に水を加えると、溶液の色が黄色から紫色へと変化した。この溶液を加熱すると粒子の色が可逆的に変化する事がわかった。さらに、酸、塩基を加えても粒子の色の变化を生じることを明らかにした。

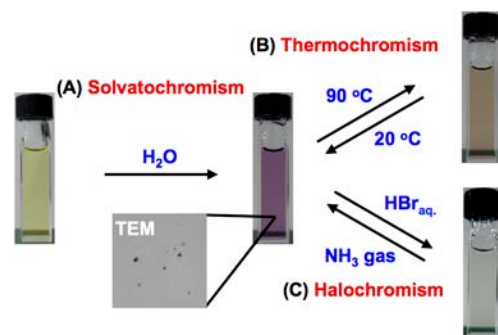


図4 水分散性ポリチオフェンナノ粒子の多刺激クロミズム応答。(A) ソルバトクロミズム, (B) サーモクロミズム (C) ハロクロミズム

(4) 固相熱脱離反応を示す導電性ポリマーの開発 (He, Salikolimi, 伊藤, 川本)

側鎖に熱脱離基を導入した親水・疎水性を示す導電性ポリマーを合成した。得られたポリマーは汎用溶媒に可溶であり、基板への成膜が可能であった。得られたフィルムを加熱すると溶媒に不溶な膜へ変化した。熱重量分析, 赤外吸収スペクトルの結果より, 不溶化は固相中で側鎖の熱脱離反応を生じ, 溶解性が変化したためであることがわかった。また合成したポリマーが, エタノール中でカーボンナノチューブの分散剤として機能することを明らかにした。透過型電子顕微鏡観察の結果, ポリマーがナノチューブ表面に付着し, 分散性を誘起することがわかった。

Key Sentences :

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

Keywords :

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. Medical Engineering for Diagnosis

(1) Development of microarray biochip (Ito)

A new diagnostic system using micro-array biochip was developed using photo-immobilizable polymers. By the development, a new RIKEN Venture company was planned.

(2) Biomolecule sensing (Uzawa, Ueki, Tada)

We selected peptide aptamers using in vitro selection technique. Those peptide aptamers were targeted to biomolecules including disease marker proteins and functional biomolecules.

(3) Development of a lysate array method for the evaluation of cellular stress (Morishima)

We develop a method of precise measurement of cellular proteins for analysis and evaluation of cellular stress. Our R & D activities include developing a semi-micro arrayer, optimizing conditions for cell lysate preparation, and analyzing data with statistical methods. We improved an arrayer prototype and achieved uniform and reproducible spotting of lysates on membranes that is appropriate for precise determination of protein levels.

2. Therapy by nano medical engineering

(1) Preparation of stem cells for regenerative medicine (Mao, Ito)

For non-serum culture of human mesenchymal stem cell, growth factors-immobilization technique was developed. Growth factors, basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor- β (TGF- β), and platelet-derived growth factor (PDGF) were co-immobilized for the culture. By immobilization storage stability was increased and repeated utilization was enabled.

(2) Biomimetic-inspired adhesion of growth factor proteins (Miyatake)

We investigated the fixation method of growth factor on the medical materials without cytotoxicity, which is inspired by the blue-mussel adhesion in water. In the wettable glue of blue-mussel, the adhesive peptides rich in L-DOPA(X) and lysine(K) are directly involved in the adhesion process. We, therefore, introduced an artificial adhesive peptide sequence (XKXXKX) into the IGF-1 at the C-terminal by the genetic recombinant technology. The obtained IGF-1-XKXXKX protein was further treated with an enzyme to converting to the activated form. IGF-AP protein successfully bound on the titanium surface in five times larger amount comparing to the wild-type. In addition, the IGF-1-AP promoted the cell growth ratio about two times higher, that proved it is effective without any cytotoxicity.

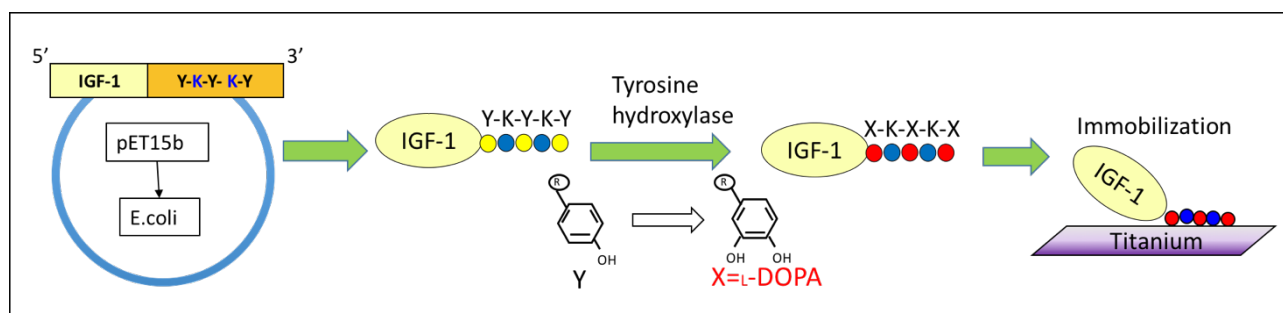


Figure 1 Adhesion of IGF-1-XKXXKX on titanium surface. After the expression of IGF-1-YKYKY protein by *E.coli* and purification, it was further activated the treatment of tyrosinase. The IGF-1-XKXXKX protein obtained was found to be tightly bound on the titanium surface keeping the bioactivity for cell growth.

(3) Drug delivery system (Ueda)

The hollow molecular assembly is a promising tool for a nanocarrier of hydrophilic and hydrophobic drugs in a drug delivery system. We prepared successfully a tubular-shaped peptidic molecular assemblies whose open mouth were capped by another peptidic assemblies from a combination of some amphiphilic polypeptides (Figure 2). In vivo near-infrared fluorescence (NIRF) imaging showed that this tubular nanocarrier can accumulate into tumor site during only 2 hours after dose (Figure 2). This is quicker accumulation, compared with general spherical carrier such as liposome. In addition, we checked this nanocarrier encapsulating antitumor drug, cisplatin, also had stronger and quicker antitumor effect than spherical carrier encapsulating cisplatin and cisplatin only.

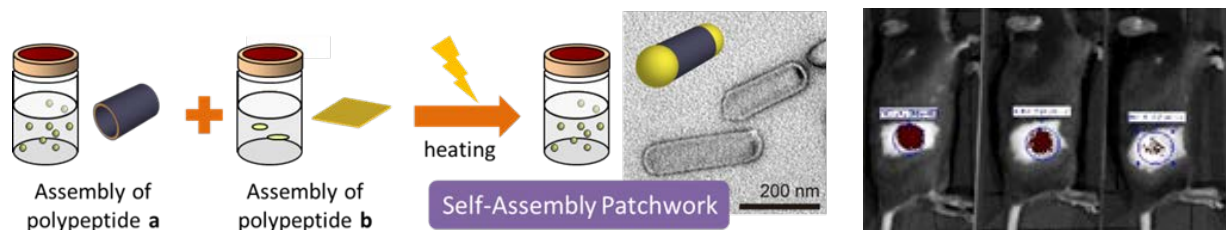


Figure 2. Schematic illustration and TEM image (negative staining image) of hollow peptide assembly and near-infrared fluorescence imaging of tumor

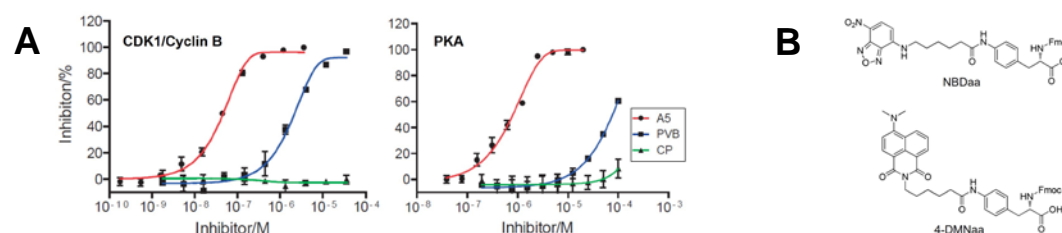
(4) Development of endoplasmic reticulum stress inducible nanoparticles (Akimoto)

The study developed endoplasmic reticulum stress-related cell death inducing system by the intracellular delivery of intracellular protein reactive chemicals. Chemicals having a chloromethyl group successfully induced cell death by encapsulating them in nanoparticles. It was cleared that the number of chloromethyl groups and the kind of adjacent bonds were influenced on the cytotoxicity of chemicals. In particular, the chloromethyl chemicals bonded to the alkyl chain exhibited extremely low cytotoxicity, while cell death can be efficiently induced by encapsulating this chemical in nanoparticles.

3. Creation of functional molecules by synthetic biology

(1) Development of a novel in vitro selection system for creation of functional peptides (Uzawa, Tada)

We explored to develop novel functional peptide aptamers including super-inhibitors, sensing molecular probes and molecular catalysts, based on evolutionary molecular engineering. For example, we selected a peptide aptamer which contains kinase inhibitor as a non-natural amino acid and found that this peptide aptamer exhibited 10- to 1000-fold higher inhibitory activity than the inhibitor itself. We also found that the fluorescence activity of a peptide aptamer which we have selected before using fluorogenic probe as a non-natural amino acid can be improved by changing the fluorophore to other dye. We also explored better selection methods; we investigated peptide translation and its functional analysis inside liposomes and microbead display method.



⊗ X (A) A selected peptide, A5, which contains inhibitor (PVB) exhibited 10- to 100-fold higher inhibitory activity than PVB itself. (B) We found that the fluorescence activity of a calmodulin-binding peptide aptamer which we have selected before using NBDaa as a non-natural amino acid can be improved by changing NBDaa to 4-DMNaa.

4. Fundamental investigation on soft nanotechnology

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

Two-dimensional optical bistable devices were investigated in terms of propagation of state-transition area ("wavefront"), and maze exploration utilizing wavefront propagation has been demonstrated by numerical simulation. A device was fabricated, and maze exploration experiment has been performed.

Agar medium with micro-patterned surface has been fabricated, and cultivation control of microbes by the surface structure was examined.

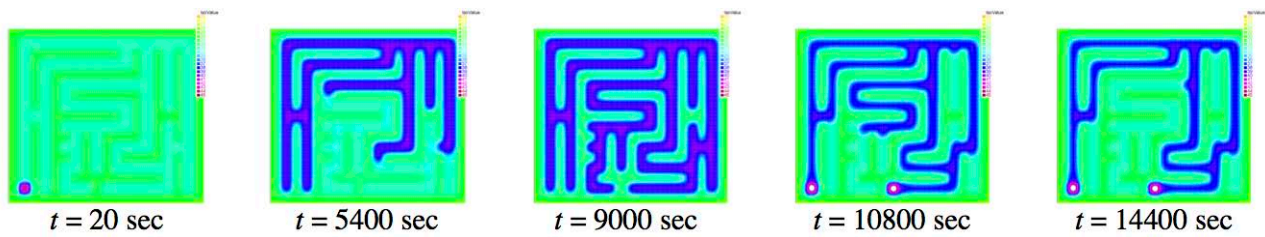


Figure x Numerical simulation of a thermo-optical two-dimensional optical bistable device for maze exploration. Until $t = 9000$ sec, the device operated in extension mode, and after that in reduction mode where the “on” region (blue) retreated from the dead-end paths. At $t = 14000$, sec, exploration has been completed and the solution of the maze, that is, all paths connecting the start and goal of the maze, is displayed.

(2) Aqueous dispersion of single-wall carbon nanotubes using fullerene nanoparticles (Li, He, Ito, Kawamoto)

We found that fullerene nanoparticle acts as a dispersant of single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) in water. Aqueous dispersion properties were induced by adsorption of the nanoparticles with the sidewall of SWCNTs. The fullerene nanoparticle-SWCNT composite film on a flexible substrate was obtained using the dispersed solution and showed thermoelectric behavior. Furthermore, self-assembled formation of ternary nanocomposites was obtained in water when the water-soluble polythiophene was added to the binary composites of fullerene nanoparticles and SWCNTs. The drop-casting film of the ternary composites exhibited photoelectric conversion behavior using a solar simulator.

(3) Development of multichromic polythiophene nanoparticles (Salikolimi, Ito, Kawamoto)

We investigated multichromic behavior of nanoparticles composed of polythiophene in organic solvent-water mixtures. Change in color of the nanoparticles occurred from yellow to purple if amount of water increased. The resulting purple solution also exhibited reversible change in color by heat. Furthermore, the nanoparticles in the solution showed change in color, resulting from acid and base reactions of the conducting polymer.

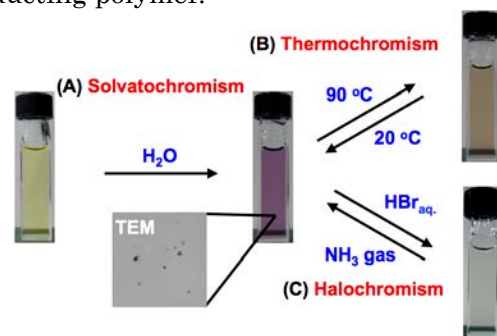


Figure 4 Multichromic behavior of aqueous dispersed polythiophene nanoparticles. (A) Solvatochromism, (B) thermochromism, and (C) halochromism.

(4) Development of conducting polymers showing thermal cleavage reactions in the solid state (He, Salikolimi, Ito, Kawamoto)

Synthesis of hydrophilic and hydrophobic conducting polymers containing thermal cleavage segments was investigated. The polymers exhibited good solubility in common solvents and film-formation properties on substrates. When the polymer films were heated, the resultant film was insoluble in any solvents. From the results of thermogravimetric analysis and infrared spectroscopy, origin of change in the solubility was due to removal of the terminal groups by the thermal cleavage reaction in the solid state. The obtained polymer showed a dispersant of SWCNTs in ethanol. The dispersion properties were observed by adsorption of the polymer at the surface of SWCNTs using transmission electron microscope.

Principal Investigator

伊藤 嘉浩 Yoshihiro ITO

常田 聡 Satoshi TSUNEDA

吉田 靖弘 Yasuhiro YOSHIDA

居城 邦治 Kuniharu IJIRO

山村 雅幸 Masayuki YAMAMURA

Research Staff

森島 信裕 Nobuhiro MORISHIMA

小畠 英理 Eiry KOBATAKE

磯島 隆史 Takashi ISOSHIMA

木賀 大介 Daisuke KIGA

宮武 秀行 Hideyuki MIYATAKE

阿部 洋 Hiroshi ABE

植木 雅志 Masashi UEKI

中村 真理子 Mariko NAKAMURA

川本 益揮 Masuki KAWAMOTO

孫 泰一 Tae il SON

鵜澤 尊規 Takanori UZAWA

章 培標 Peibiao ZHANG

上田 一樹 Motoki UEDA

劉 明哲 Mingzhe LIU

Liping ZHU

江上 舞 Mai EGAMI

Baiju Govindan NAIR

Binata JODDAR

秋元 淳 Jun AKIMOTO

樋口 亜紺 Akon HIGUCHI

毛 宏理 Hongli MAO

加藤 好一 Yoshikazu KATO

Nandakumar AVANASHIAPPAN

金子 晃 Akira KANEKO

Shin Hye PARK

Jonathan HEDDLE

植村 健二 Kenji UEMURA

Students

Marziyeh KARIMIAVARGANI

Seong Min KIM

Roopa DHARMATTI

Morteza MAHMOUDISABER

孫 健 Kon SON

Technical Staff

森田 直子 Naoko MORITA

Assistant and Part-timer

山中 恭子 Kyoko YAMANAKA

緒方 直美 Naomi OGATA

Visiting Members

長田 義仁 Yoshihito OSADA

田代 英夫 Hideo TASHIRO

相垣 敏郎 Toshiro AIGAKI