

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26249127

研究課題名（和文）ナノニードルを用いた核輸送による高効率ゲノム編集

研究課題名（英文）Genome editing technology with efficient transfer to nucleus using nanoneedle

研究代表者

中村 史（Nakamura, Chikashi）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：40357661

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 31,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、Zincフィンガーヌクレアーゼ、CRISPRといった近年急速に開発が進みつつある人工ヌクレアーゼを用いて、目的遺伝子以外に損傷を与えない安全で確実、高効率なゲノム編集技術を開発することを目的とした。現在、人工ヌクレアーゼの利用において目的遺伝子以外の箇所と作用するオフターゲット効果と切断効率が問題となっている。この問題を解決するために、細胞核に物質を直接送達するナノニードル技術とアプタマーを用いた制御放出技術を組合せ、人工ヌクレアーゼを効果的に作用させる技術を開発した。取得されたFokIアプタマー及びCas9アプタマーの性能を評価し、細胞への導入が可能であることを実証した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop safe and high efficient genome editing technology using artificial nuclease, zinc finger nuclease (ZFN) and CRISPR/Cas9, which have been developed rapidly in the last five years. However, there is a serious problem to digest sequence of not interest, so called off target effect. To overcome this problem, we developed a new technology to deliver the artificial nuclease combining the nanoneedle technology to transfer molecules to nucleus directly and the aptamer technology for controlled release of molecules. We obtained several aptamer sequences binding FokI or Cas9 specifically and we succeeded in the transfer of ZFN to cells using the aptamer-modified nanoneedle.

研究分野：ナノ細胞工学

キーワード：ゲノム編集 ナノニードル アプタマー オフターゲット効果 細胞操作 制御放出

### 1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集技術は様々な生物種のゲノム上の標的遺伝子を自在に改変できることから、農作物の品種改良から臨床まで様々な応用が期待されている。しかし、標的外の遺伝子配列に変異導入が起こるオフターゲット効果が問題となっており、技術の安全性を担保するためにはオフターゲット効果の低減が不可欠である。

オフターゲット効果を低減させる方法として、ゲノム編集技術で利用する人工ヌクレアーゼを蛋白質の状態を導入する手法が注目を集めている。これにより細胞内の人工ヌクレアーゼの量及び効果持続時間を制御することが期待される。本研究では人工ヌクレアーゼを蛋白質の状態で細胞内あるいは核内へ直接導入する技術を開発することを目的とした。我々は、細胞に対して挿入ダメージが極めて小さい細い針、ナノニードルを作製し、これを用いた細胞操作技術を開発してきた。これまでの研究によりナノニードルが細胞に効率よく挿入できること (Nano Lett., 5, 27-30 (2005)) やプラスミド DNA の導入が可能であること (Nanomedicine, 4, 215-225 (2008)) を実証してきた。さらに我々は MEMS の微細加工技術を応用し、直径 200 nm、長さ 25  $\mu\text{m}$  の高アスペクト比のナノニードルを数万本配列させたナノニードルアレイを作製することに成功した。ナノニードルアレイを用いることで、多数の細胞に対して同時に物質導入を行うことが可能であると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、ナノニードルアレイを用い、多数の細胞に対して、細胞内、核内へ人工ヌクレアーゼ蛋白質を直接導入する安全で高効率なゲノム編集技術を開発することを目的とした。

まず、ナノニードルアレイを用いて物理的に人工ヌクレアーゼを輸送する手法を開発した。ナノニードルアレイを動作する装置は数 nm の分解能で動作可能であり、また高周波による振動を行うことが出来る。このような物理的動作を利用した物質輸送について検討した。

また、アプタマーを介して人工ヌクレアーゼをナノニードルアレイ表面に担持し、細胞内で特異的に放出する制御放出による輸送を検討した。ATP アプタマーの利用と、新規 FokI アプタマー、Cas9 アプタマーのスクリーニングを検討した。ATP 濃度は細胞内では数 mM、細胞外では数  $\mu\text{M}$  と大きな濃度差がある。ATP と結合しアプタマーの構造が変化することで、人工ヌクレアーゼが放出される系を設計した。また新規アプタマースクリーニングでは、細胞内外のカリウムイオン濃度差に注目し、カリウム濃度が高い溶液中で脱離するアプタマーの取得を試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞

本研究では、人工ヌクレアーゼを導入する細胞としてヒト子宮頸癌細胞 HeLa、ヒト胎児腎細胞 HEK293、マウス線維芽細胞 NIH3T3 を用いた。これらの細胞は 10%FBS (GIBCO)、Gentamycin/Amphotericin (invitrogen)、2 mM Gltamax (invitrogen) を含む DMEM (Sigma) で培養した。

#### (2) ナノニードルアレイの作製

ナノニードルアレイは 4 インチシリコンウエハを材料とし MEMS 微細加工により作製した。直径数  $\mu\text{m}$  のドット状のマスクが 3 mm 角のエリア内に格子状に 10  $\mu\text{m}$  あるいは 30  $\mu\text{m}$  間隔で配列したフォトマスクを用い、ウエハ上にポジ型レジストのパターニングを行った。さらに誘導結合プラズマエッチングによりこれをドライエッチングし、長さ 20~30  $\mu\text{m}$  のマイクロピラーを作製した。作製されたマイクロピラーアレイに対して、1100°C の湿式熱酸化により厚さ 1  $\mu\text{m}$  以上の酸化膜を形成させた。これに対しフッ酸による酸化膜除去を行い、ナノニードルアレイを得た。5 mm 角のチップとして裁断した後に、アレイ動作装置を用いて細胞の挿入操作を行った。

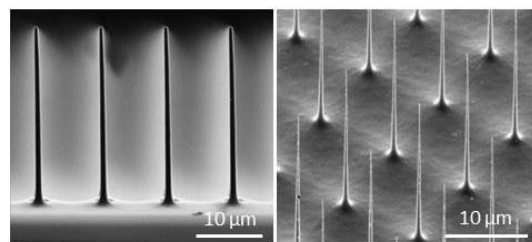


図1 ナノニードルアレイ

#### (3) 吸着加振法による蛋白質導入

物理吸着による固定と高周波振動による脱離による蛋白質導入を、Cre リコンビナーゼを用いて試験した (図2)。疎水化処理を行ったナノニードル表面に Cre を吸着させ、2.5  $\mu\text{m}/\text{sec}$  の速度で細胞へと接近させ、基板に接触後、2.5  $\mu\text{m}/\text{sec}$  で1秒間上昇させ、振幅 1.0  $\mu\text{m}$ 、周波数約 5 kHz で 60 秒間加振した。細胞は HEK293 をベースとしたレポーター細胞を利用した。この細胞は、染色体上に RFP および GFP 遺伝子を有しており、Cre リコンビナーゼによる組換えにより、RFP から GFP に発現が転換する。導入操作後、48 時間培養した後、蛍光顕微鏡を用いて蛍光観察および画像解析を行い、遺伝子組換え効率を求めた。

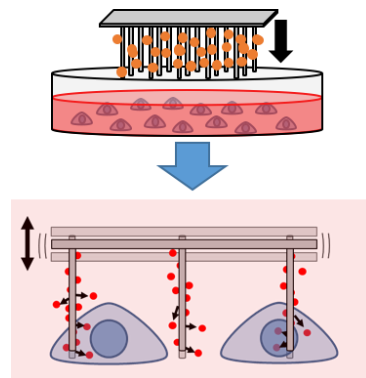


図2 吸着加振法による導入

また、人工ヌクレアーゼの1つ

である Cas9 と single guide RNA (sgRNA) の複合体の導入を行った。EGFP を発現する HeLa 細胞をレポーター細胞に対して、EGFP 遺伝子を標的とした sgRNA を用いて、導入試験を行った。導入操作後、48 時間培養した後に、蛍光顕微鏡を用いて蛍光観察および画像解析を行い、ゲノム編集効率を求めた。

#### (4) 機械的膜穿孔法による導入

ナノニードルアレイを用いて強制的、機械的に膜を穿孔する物質導入法を検討した。本試験では、模擬物質として 70 kDa の FITC 標識デキストランを用いた。培養中の

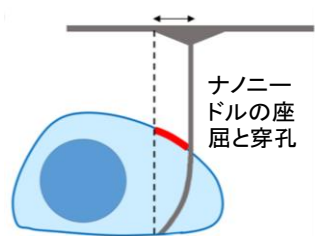


図3 機械的膜穿孔による物質導入

NIH3T3 の培地中に FITC デキストランを 0.5 mg/ml の濃度で加え、ナノニードルアレイで穿孔操作を行った。挿入後、ナノニードルの座屈を顕微鏡下で確認し、周波数約 5 kHz で加振操作を行うことで膜穿孔を行った(図3)。

ナノニードルアレイの抜去後、処理を行った細胞を 30 分間静置し、PBS 洗浄後に DAPI による死細胞判定と FITC デキストランの蛍光観察を行った。FITC 蛍光を発する細胞のうち、DAPI で染色されなかった細胞を導入成功細胞とし、導入効率を算出した。

#### (5) ATP アプタマーによる ZFN 導入

ATP アプタマーによる制御放出では、人工ヌクレアーゼの1つであるジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) の導入を試みた。標的遺伝子 CCR5 の配列を有する ATP アプタマーを設計した(図4)。ATP アプタマーの 5'末端は

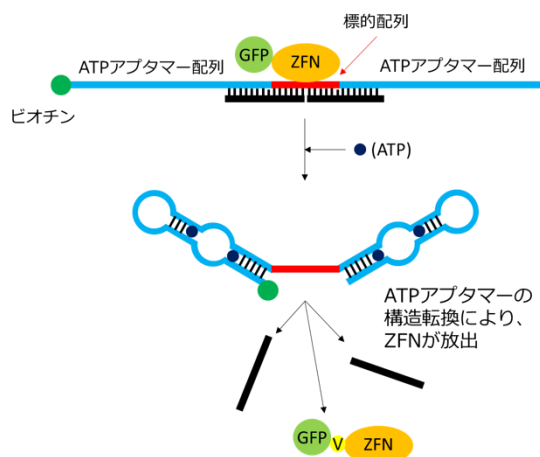


図4 ATP アプタマーの構造

ビオチン化されており、ストレプトアビジンを介してナノニードル表面への固定化が可能である。シリコン表面のストレプトアビジン修飾には東京大学の石原一彦教授より分与頂いた MPC ポリマーを用いた。核酸分子スイッチの持つ標的配列に ZF 蛋白質を結合させ、ニードル表面上に担持させた。

放出の確認には ZF 蛋白質に緑色蛍光蛋白質 Emerald を融合させた ZF-mEm を利用した。核外排出シグナルを有する赤色蛍光蛋白質 (DsRed-NES) を発現させた HeLa に対して、ZF-mEm を担持させたナノニードルアレイの挿入操作を行った。挿入を確認した後に共焦点蛍光顕微鏡を用いて、挿入 30 分後まで撮影を行った。ImageJ による画像解析からナノニードル表面の平均蛍光強度を解析し、相対蛍光強度の経時変化を解析した。

#### (6) FokI アプタマーの探索と評価

ニトロセルロース膜に非特異的に吸着する配列を除去した ssDNA ライブラリと FokI を固定化したニトロセルロース膜を用いて結合配列を探索した。TBST 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05%(v/v) Tween 20, pH7.4) で洗浄後、FokI を固定化した領域を切り出し、フェノールクロロホルム抽出及びエタノール沈殿により FokI に結合した ssDNA を回収した。回収した ssDNA 量は定量 PCR により算出した。定量 PCR の結果から最適 PCR サイクル数を決定し、そのサイクル数で増幅したライブラリを一本鎖調製し用いた。ニトロセルロース膜に FokI を 20 pmol 固定し、200 nM のビオチン修飾アプタマー水溶液中で 1 時間振盪し反応させた。次に NeutrAvidin HRP を含んだ水溶液中で 1 時間反応後、化学発光を観察し結合を評価した。

取得された FokI アプタマーは、ATP アプタマーと同様に MPC ポリマーを介してナノニードルアレイ上に修飾されたストレプトアビジンと結合させた。これに対してジンクフィンガーヌクレアーゼに GFP を融合させた GFP-ZFN を担持させ、DsRed-NES 発現 HEK293 細胞に挿入操作を行い、上記同様、共焦点蛍光顕微鏡による観察から、GFP-ZFN の細胞導入を評価した。

#### (7) Cas9 アプタマーの探索と評価

上記 FokI アプタマーのスクリーニングと同様にニトロセルロース膜を用いて、Cas9 アプタマーの探索を行った。150 mM NaCl を含む Tris 緩衝液で ssDNA ライブラリを Cas9 固定化膜に反応させ、150 mM KCl を含む Tris 緩衝液を用いて DNA を回収することで、細胞内と同様の高濃度カリウムイオン存在下で、Cas9 から脱離するアプタマーを探索した。

取得されたアプタマーに関して、酵素標識抗体を用いた化学発光測定による Cas9 放出量の評価と CD スペクトル解析による構造解析を行った。また、上記同様に、Cas9 アプタマーを介してナノニードルアレイに Cas9-GFP を固定化し、細胞への導入を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) 吸着加振法による導入の結果

ナノニードルアレイ上に Cre リコンビナーゼを物理吸着により固定化し、細胞内で加振することによる導入法を検討した。その結果、導入から 48 時間後において明瞭な GFP の発

現が確認され、RFP 発現細胞に対する GFP 発現細胞の割合から Cre 導入による組換え効率を算出した。加振を行うことで、組換え効率は2倍以上の約 42%に上昇した (図 5、論文リスト⑨)。

この結果から、活性を保った状態で遺伝子組換えに関わる蛋白質を細胞内へ導入することが可能であることが示された。

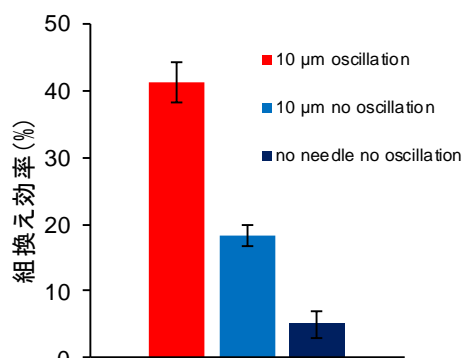


図 5 吸着加振法による Cre リコンビナーゼ導入の組換え効率

また、同様に吸着加振法により Cas9/sgRNA 複合体を EFGP 発現細胞に導入し、遺伝子破壊を試みた結果、破壊効率は 32%であった。既に報告されているリポフェクションを用いた Cas9/sgRNA 導入では 58%を達成した報告もあるため (Nat. Biotechnol. 33, 73-80 (2015))、ナノニードルアレイを用いた吸着加振法にはさらなる改善が必要である。Cas9 は細胞膜に吸着する性質があるため、複合体形成の方法も検討が必要である。

#### (2) 機械的膜穿孔法による導入の結果

培養細胞ディッシュ中に FITC デキストランを添加し、その後ナノニードルアレイの挿入、及び加振操作を行うことにより、最大で 45%の導入効率で、FITC デキストランを細胞内に導入できた。また、この操作時間は 5 分以内の短時間の処理が可能である。また、さらに、連続導入操作によって 3 mm 四方のナノニードル存在領域のみで位置選択的に物質を導入できることを示した (図 6、論文リスト④)。より多数の細胞への人工ヌクレアーゼ導入や細胞内へのプローブ分子の直接導入による細胞内分子のリアルタイム解析へ応用できる可能性が示唆された。

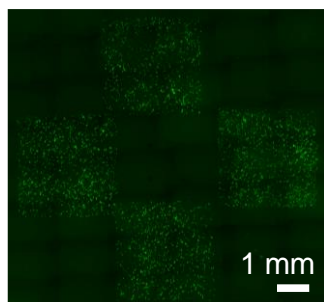


図 6 機械的膜穿孔法による FITC デキストラン導入細胞のパターニング

#### (3) ATP アプタマーによる導入の結果

まず、シリコンウエハ上に固定化した ATP アプタマーと ZF-mEm に対して 5 mM ATP を含む緩衝液中での放出を観察した結果、時間

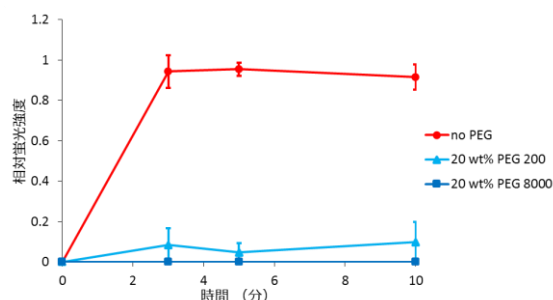


図 7 *in vitro* での ZF-mEm 放出試験

経過に伴う放出が確認された (図 7、論文リスト⑤)。このことから、高濃度 ATP 存在下における ZF-mEm の制御放出が可能であることが示唆された。

DsRed-NES 発現 HeLa に対して ZF-mEm を担持したナノニードルアレイの挿入を行ったところ、30 分後に細胞外のナノニードルと比較して、細胞内に挿入されたナノニードルの蛍光強度の減少が確認された (図 8)。一方で、ATP 合成阻害剤の 2-DG や KCN を添加した場合は、その差は見られなかった。この結果、細胞内の ATP と反応することでアプタマーから ZF-mEm が放出されたものと推察された。

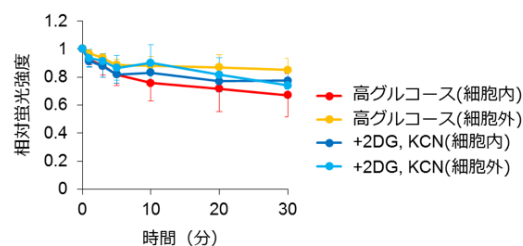


図 8 細胞内での ZF-mEm 放出試験

しかし、その放出量は 30 分間の挿入で固定化全量の 20%であり、多くないことが分かった。図 7 に示すように、細胞内の高分子クラウディング環境を模擬するために、20 wt%の濃度で分子量の異なる PEG を加えた緩衝液中で放出を観察した結果、蛍光強度の増加がほとんど確認されなかった。この結果は、細胞内高分子クラウディング環境で、ZF 蛋白質と DNA との親和性が増大することで ATP アプタマーの構造転換が妨げられていることを示唆する。細胞内の分子クラウディング環境においても同様の効果により放出量が小さいと推察され、細胞内環境を精緻に模擬した設計が必要であることが示唆された。

#### (4) FokI アプタマーによる導入の結果

まず、FokI アプタマーとして 7 本の候補配列を取得した (論文リスト①)。その中でも最も結合性能が高い配列 F6#8、F6#71 の 2 種のアプタマーを取得した。ナノニードルに修飾し、ZFN-GFP の細胞への導入を試みた結果、導入が可能であることを確認した (図 9)。ただし、細胞外分泌物による脱離促進効果が確認され、迅速な挿入動作が必要であることが明らかとなった。

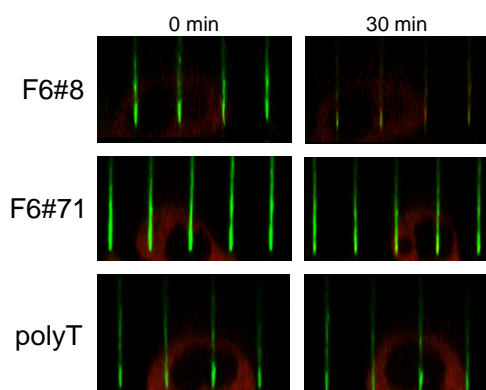


図9 FokI アプタマー修飾ナノニードルアレイによる ZFN-GFP の細胞への導入

#### (5) Cas9 アプタマーによる導入の結果

150 mM NaCl から 150 mM KCl へ変更することにより、30%脱離する 7K16 及び 60%脱離する 7K27 の 2 種が取得された。CD スペクトル解析の結果、7K16 はパラレル型とアンチパラレル型のグアニン四重鎖構造 (G4) の混合物、もしくはハイブリッド型の G4 を形成し、カリウムイオン存在下では、アンチパラレル型に移行することが示唆され、カリウムイオンの有無で Cas9 の脱離が制御できることを支持する結果を得た。Cas9 アプタマーを修飾したナノニードルを作製し、Cas9 もしくは Cas9-sgRNA 複合体を固定化し、150 mM KCl 条件での放出量を評価したところ、いずれのアプタマーでも Cas9-sgRNA においては固定化量、放出量が著しく低下し、sgRNA 結合サイトとアプタマー結合サイトが競合している可能性が示唆された。また Cas9 アプタマーを介して Cas9-GFP をナノニードル表面へ結合し細胞への導入を検討した結果、細胞内での放出は確認されたものの細胞膜への Cas9-GFP の吸着が観察され、Cas9 の正電荷の集中する領域が細胞膜と静電的相互作用すると推察された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件、うち査読有 12 件のみ記載)

①M. Nishio, D. Matsumoto, Y. Kato, K. Abe, J. Lee, K. Tsukakoshi, C. Nakamura and K. Ikebukuro, DNA aptamers against FokI nuclease domain for genome editing applications, *Biosensors & Bioelectronics*, 93, 26–31, 2017, 査読有

②R. Kawamura, K. Shimizu, Y. Matsumoto, A. Yamagishi, Y. R. Silberberg, M. Iijima, S. Kuroda, K. Fukazawa, K. Ishihara and C. Nakamura, High efficiency penetration of antibody-immobilized nanoneedle thorough plasma membrane for in situ detection of cytoskeletal proteins in living cells, *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1), 74, 2016,

査読有

③D. Matsumoto, A. Yamagishi, M. Saito, R. R. Sathuluri, Y. R. Silberberg, F. Iwata, T. Kobayashi and C. Nakamura, Mechanoporation of living cells for delivery of macromolecules using nanoneedle array, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122(6), 748-752, 2016, 査読有

④D. Matsumoto, M. Nishio, Y. Kato, W. Yoshida, K. Abe, K. Fukazawa, K. Ishihara, F. Iwata, K. Ikebukuro and C. Nakamura, ATP-mediated Release of a DNA-binding Protein from a Silicon Nanoneedle Array, *Electrochemistry*, 84(5), 305-307, 2016, 査読有

⑤Y. Yu, R. Gao, Z. Kaul, L. Li, Y. Kato, Z. Zhang, J. Groden, S. C. Kaul and R. Wadhwa, Loss-of-function screening to identify miRNAs involved in senescence: tumor suppressor activity of miRNA-335 and its new target CARF, *Scientific Reports*, 6, 30185, 2016, 査読有

⑥J. H. Lee, W. Yoshida, K. Abe, K. Nakabayashi, H. Wakeda, K. Hata, C. A. Marguette, L. Blum, K. Sode, K. Ikebukuro, Development of an electrochemical detection system for measuring DNA methylation levels using methyl CpG-binding protein and glucose dehydrogenase-fused zinc finger protein, *Biosensors & Bioelectronics*, S0956-5663(16), 30944-30947, 2016, 査読有

⑦H. Hasegawa, N. Savory, K. Abe, K. Ikebukuro, Methods for Improving Aptamer Binding Affinity, *Molecules*, 21(4), E421, 2016, 査読有

⑧D. Matsumoto, R. Sathuluri, Y. Kato, Y. R. Silberberg, R. Kawamura, F. Iwata, T. Kobayashi and C. Nakamura, Oscillating high-aspect-ratio monolithic silicon nanoneedle array enables efficient delivery of functional biomacromolecules into living cells, *Scientific Reports*, 5, 15325, 2015, 査読有

⑨T. Kumagai, K. Abe, W. Yoshida and K. Ikebukuro, DNA detection technology using zinc finger protein, *J. Microb. Biochem. Technol.*, 7(5), 278-281, 2015, 査読有

⑩K. Abe, Y. Murakami, A. Tatsumi, K. Sumida, A. Kezuka, T. Fukaya, T. Kumagai, Y. Osawa, K. Sode and K. Ikebukuro, Enzyme linking to DNA aptamers via a zinc finger as a bridge, *Chem Commun (Camb)*, 51(57), 11467-11469, 2015, 査読有

⑪R. Wadhwa, Y. Kato, R. Gao and S. C. Kaul, Non-coding RNAs as molecular tools, *Post-genomic Approached in Cancer and Nano Medicine*, 2, 25-60, 2015, 査読有

⑫K. Ogihara, N. Savory, K. Abe, W. Yoshida, M. Asahi, S. Kamohara, K. Ikebukuro, DNA aptamers against the Cry j 2 allergen of Japanese cedar pollen for biosensing applications, *Biosensors & Bioelectronics*, 63, 159-165, 2015, 査読有

[学会発表] (計 44 件、うち代表的な 9 件を記載)

①高野 勇太、山岸 彩奈、西尾 真初、塚越 か

おり、池袋 一典、加藤 義雄、中村 史、グアニン四重鎖形成を利用した Cas9-sgRNA 複合体の制御放出、日本化学会第 97 春季年会 (2017)、慶應義塾大学日吉キャンパス、神奈川県横浜市、2017 年 3 月 17 日

②西尾 真初、阿部 公一、松本 大亮、塚越 かおり、加藤 義雄、中村 史、池袋 一典、Development of DNA aptamers against FokI nuclease domain for genome editing, The 43 rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 熊本大学工学部百周年記念館、熊本県熊本市、2016 年 9 月 27 日

③加藤 義雄、松本大亮、小林 健、岩田 太、中村 史、ナノニードルアレイを用いた Cas9-sgRNA の直接導入による標的遺伝子破壊、第 1 回日本ゲノム編集学会、広島国際会議場、広島県広島市、2016 年 9 月 6 日

④西尾真初、阿部公一、松本大亮、加藤 義雄、中村 史、池袋 一典、Selection and characterization of DNA aptamers against FokI nuclease domain for genome editing, Biosensors 2016, Swedish Exhibition and Congress Centre, Gothenburg, Sweden, 2016 年 5 月 27 日

⑤松本大亮、齋藤 恵、Sathuluri Ramachandra Rao、Yaron R. Silberberg、岩田 太、小林 健、中村 史、Macromolecule transfer by mechanoperforation using nanoneedle array for single cell analysis, Biosensors2016, Congress Centre in Gothenburg, Gothenburg, Sweden, 2016 年 5 月 25 日

⑥西尾 真初、阿部 公一、松本 大亮、加藤 義雄、中村 史、池袋 一典、FokI スクレアーゼドメインに対するアプタマーの探索、電気化学会第 83 回大会、大阪大学工学部、大阪府吹田市、2016 年 3 月 29 日

⑦松本 大亮、加藤 義雄、川村 隆三、小林 健、岩田 太、中村 史、Oscillation-assisted controlled release of biomolecules for high-efficient delivery to living cells using silicon nanoneedle array, Pacificchem2015, Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, 2015 年 12 月 18 日

⑧西尾 真初、阿部 公一、松本 大亮、加藤 義雄、中村 史、池袋 一典、ゲノム編集技術への応用を目指した FokI スクレアーゼドメインに結合する DNA アプタマーの探索及び特性評価、BMB2015 (第 38 回 日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市、2015 年 12 月 1 日

⑨加藤 義雄、松本大亮、中村 史、Targeted genome manipulation by protein delivery, Conference on Transposition and Genome Engineering 2015, 豊国際フォーラム、奈良県奈良市、2015 年 11 月 19 日

[図書] (計 2 件)

① K. Abe, W. Yoshida, K. Ikebukuro, Adv Biochem Eng Biotechnol (Biosensors Based on Aptamers and Enzymes), Springer, 331(183-202), 2014

②池袋一典、セーボレー那沙、阿部公一、高分子 10 月号、公益社団法人高分子学会、63(10)、78(4)、2014

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：FokI スクレアーゼドメイン結合性核酸アプタマー

発明者：池袋一典、西尾真初、中村 史、加藤 義雄

権利者：東京農工大学、産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2016-158837

出願年月日：2016 年 8 月 12 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 2 件)

①名称：ナノニードルアレイを用いた細胞への物質導入法

発明者：中村 史、松本大亮、加藤 義雄、岩田 太

権利者：産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2015-047439

取得年月日：2016 年 9 月 15 日

国内外の別：国内

②名称：アミノ酸修飾核酸とその利用

発明者：加藤 義雄、小島直

権利者：産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2015-116992

取得年月日：2016 年 12 月 15 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/bmd/biomed-cme/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 史 (NAKAMURA, Chikashi)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：40357661

### (2) 研究分担者

加藤 義雄 (KATO, Yoshio)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：20415657

### (3) 研究分担者

小林 健 (KOBAYASHI, Takeshi)

産業技術総合研究所・集積マイクロシステム研究センター・研究チーム長

研究者番号：20415681

### (4) 研究分担者

池袋 一典 (IKEBUKURO, Kazunori)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：70251494