

「ナノ界面技術の基盤構築」  
平成19年度採択研究代表者

由井 伸彦

北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス研究科・教授

## 分子運動操作を基盤とした多次元のバイオ界面

### § 1. 研究実施の概要

本年度は、参加4グループが基盤となるマテリアル設計をもとに生体との界面応答に関する基礎知見を集積し、由井グループを核とした研究連携を展開してきた。由井グループは、動的表面の基盤となるポリロタキサンおよび水溶性ポリマーの金基板上でのループあるいはグラフト形成に成功した。とりわけ、ポリロタキサン・ループ構造表面が血液凝固に重要な役割を演じるフィブリノーゲンの吸着を著しく抑制することを明らかにした。また、分子運動制御を目指して、ルーズフィット型ポリロタキサンの合成に成功し、環状分子と線状高分子鎖とのあいだの隙間に更なる高分子鎖を可逆的に包接することで環状分子の運動制御の可能性を示した。石原グループは、ポリマー表面近傍での水の運動性解析ならびにタンパク質の表面吸着力測定に成功し、生体との接触初期の表面における水の運動性とタンパク質吸着力との関係を明らかにした。これにより、初期の生体反応を定量評価する指針を確立した。山岡グループは、生体活性リガンドの分子運動性が培養細胞の挙動に与える影響について検討するとともに、動的バイオ界面と生体との接触に始まる炎症反応による遺伝子発現についての網羅解析を実施し、遺伝子レベルでの定量評価の指針を確立した。岸田グループは、ポリマーとコラーゲンとの相溶性に関する系統的な解析を実施し、ポリマー鎖の重心運動とコラーゲン接着との関係について考察した。

### § 2. 研究実施体制

#### (1)「由井」グループ

- ① 研究分担グループ長： 由井 伸彦（北陸先端科学技術大学院大学、教授）
- ② 研究項目： 超分子リガンド界面による細胞代謝制御  
・分子運動制御型ポリロタキサンの合成

- ・表面固定化用ポリロタキサンの合成ならびにポリロタキサン・ループ表面の調製
- ・ポリロタキサン・ループ表面の特性解析

(2)「石原」グループ

- ① 研究分担グループ長：石原 一彦（東京大学、教授）
- ② 研究項目：生体分子非認識界面創製
  - ・表面開始リビングラジカル重合法による種々のポリマーブラシ構造の作製
  - ・原子間力顕微鏡のフォースカーブ測定によるタンパク質吸着力解析
  - ・プロトン核磁気共鳴法による材料表面近傍の水分子の緩和時間測定

(3)「山岡」グループ

- ① 研究分担グループ長：山岡 哲二（国立循環器病センター研究所、部長）
- ② 研究項目：親水性鎖の動的特性と特異的リガンド導入による慢性炎症の抑制
  - ・形状因子をコントロールした多孔質テンプレートに対する生体応答の網羅的解析システム構築と炎症抑制性ペプチドの探索
  - ・動的バイオ界面が細胞分化に与える影響の検討
  - ・RGD 細胞接着リガンド分子の動的特性が細胞挙動に与える影響の解析

(4)「岸田」グループ

- ① 研究分担グループ長：岸田 晶夫（東京医科歯科大学、教授）
- ② 研究項目：コラーゲンと高分子の物理的複合化に関する研究
  - ・ナノ振動融着法による接着に及ぼす高分子表面官能基と有機溶媒添加の影響の検討
  - ・生体組織構造を目指したコラーゲン組織体の作製と特性検討

### § 3. 研究実施内容（文中、右肩の引用番号は(4-1)に対応する）

#### 1. 特異的リガンド導入のためのアジド化ポリロタキサンの合成

由井グループでは、クリック反応を利用した細胞特異的リガンドの導入を目指して、アジド化ポリロタキサンの合成方法を確立した。これは、予めモノ、ジ、あるいはトリアジド化した $\alpha$ -シクロデキストリン( $\alpha$ -CD)と種々の分子量のポリエチレングリコール(PEG)とを水:DMSO 混合溶媒(1:1)中で攪拌して包接錯体を調製し、そのままPEG 両末端に嵩高いストッパー分子(チロシン誘導体)を導入することによって一段階でポリロタキサンを合成するものであり、広範囲なPEG 分子量を用いてポリロタキサンの収率としてはかなり高い(30%程度)ものとして得ることができる特徴を有していることが明らかとなった。現在、アジド化ポリロタキサンを用いて細胞特異的リガンド(マンノース)を定量的に導入したポリロタキサンを合成しており、マンノースレセプター

として知られるレクチン(コンカナバリン A)を固定化した表面との相互作用を表面プラズモン共鳴分析によって解析中であり、これらの結果をまとめた論文を投稿準備中の段階である。

次年度には、これをベースとして非特異的相互作用を回避可能なリガンド(ホスホリルコリン基)を導入したポリロタキサンを石原グループと連携して合成し、非特異的相互作用を回避する動的表面の設計に用いる予定である。また、アジド化ポリロタキサンを用いて細胞接着因子であるトリペプチド(RGD)のポリロタキサンへの導入についても検討予定である。

## 2. ルーズフィット型ポリロタキサンによる第三成分包接と分子運動制御の可能性

由井グループでは、 $\gamma$ -シクロデキストリン( $\gamma$ -CD)空洞部にポリエチレングリコール(PEG)単鎖が貫通したルーズフィット型ポリロタキサンを設計し、その単離精製に成功し

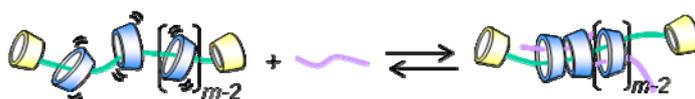


図 1. Additional inclusion complexation into loose-fit polyrotaxane.

た<sup>3)</sup>。また、このポリロタキサン中の $\gamma$ -CDとPEG単鎖との隙間に分子量の異なる種々のPEG鎖を更に包接-解離できることを確認した(図1)。 $\gamma$ -CDはPEG鎖を二本包接することが知られており、そのため $\gamma$ -CDとPEG単鎖とからなるポリロタキサンでは両者のあいだに空間的ミスマッチがある。したがって、このルーズフィット型ポリロタキサンでは $\gamma$ -CDとPEG単鎖との相対的な運動性が従来のポリロタキサンより高いものと推測され、それを第三成分の包接によって調節できる可能性がある。このことは、ポリロタキサンによる分子運動制御の新たな方向性を指し示すものと期待している。またPEG鎖が第三成分としてルーズフィット型ポリロタキサンに包接された事実は、ルーズフィット型ポリロタキサンと高分子鎖との組み合わせをもとに可逆的な超分子ネットワークを構築できる可能性があるものと期待している。

以上よりルーズフィット型ポリロタキサンは、分子運動性を制御したマテリアル設計の基盤技術として今後の研究展開に有用であると考えている。現在は、種々のゲスト分子(両親媒性分子や水溶性高分子鎖)のルーズフィット型ポリロタキサンへの包接挙動をNMR測定および滴定型熱量測定によって検討中であり、既にカチオン性高分子であるポリエチレンイミンが包接されることを確認した。こうした結果を次年度上半期の早い段階でまとめ、論文投稿する予定である。

## 3. 包接錯体を形成しない環状分子と線状高分子鎖との組み合わせからなるルーズフィット型ポリロタキサンの設計

由井グループでは、更にポリロタキサンを形成する環状分子と線状高分子鎖との組み合わせを広範に拡張してルーズフィット型ポリロタキサンを任意に設計できるようにするため、両末端にダンベル型分子を導入したPEGと $\beta$ -CD誘導体とからなるポリロタキサンの合成を検討し、これに成功した。PEGと $\beta$ -CDとは包接錯体形成をしない組み合わせとして知られており、これらからなるポリロタキサン合成は報告されていないが、PEG両末端に導入したダンベル型分子による速度論的包接錯体形成の安定化が水中での擬ポリロタキサン形成を可能にしたもの

と解釈される。現在、この成果をまとめた論文の投稿準備中である。更には、このルーズフィット型ポリロタキサンの特性を活かしたマテリアル設計として、 $\beta$ -CD 誘導体ダイマーとダンベル型分子導入 PEG とからなる包接錯体形成によるヒドロゲル化挙動の解析も併行して実施しており、それについても論文投稿準備中である。

#### 4. PEG 鎖およびポリロタキサンの表面固定化様式の違いによるタンパク吸着挙動の解析

由井グループでは、メチル化  $\alpha$ -CD と PEG とからなる水溶性ポリロタキサンの両末端を金基板上に固定化したポリロタキサン・ループ表面を設計した<sup>2)</sup>。ポリロタキサンのループ型固定化に際しては、両末端にアルカンチオール基を導入したポリロタキサン(1)を調製し、これとトリエチレングリコールアルカンチオール(2)との自己組織化(SAM)を利用して金表面に導入した(図2)。表面でのループ形成は1と2の2段階固定化により実現し、それを水晶子振動数変化による微量重量測定、エリプソメトリーによる膜厚変化、銀コロイドを用いた末端チオール基検出などを総合して確認した。動的接触角測定では、得られたポリロタキサン・ループ表面は対照として調製した PEG ループ表面よりも大きな接触角ヒステリシスを有していた。これは、周囲環境に応答して分子運動する表面であることを示唆している。またポリロタキサン・ループ表面は、対照である PEG ループ表面よりも有意にフィブリンノーゲン吸着性を抑制することが表面プラズモン共鳴分析によって確認された。

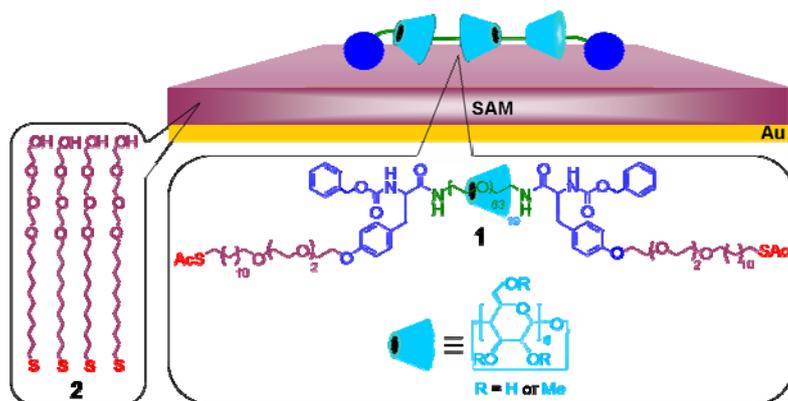


図 2. Polyrotaxane loop as dynamic surface.

そこで更に、ポリロタキサンおよび PEG の片末端にのみ 2 を導入して同様な SAM 形成を利用してグラフト表面を調製し、動的接触角およびフィブリンノーゲン吸着に着目して解析した。ポリロタキサン表面と PEG 表面とを比較すると、ループ・グラフトいずれにおいてもポリロタキサン表面でのフィブリンノーゲン吸着抑制が顕著であった。詳細にみると、PEG ではループ表面よりもグラフト表面においてフィブリンノーゲン吸着が抑制される傾向にあったが、ポリロタキサンでは逆にグラフト表面よりループ表面においてフィブリンノーゲン吸着が著しく抑制されることが明らかとなった。

近年では片末端を高密度に固定化した PEG ブラシ表面が低タンパク吸着性を示すことが注

目されている一方で、以前より PEG 鎖を繰り返し単位として含むセグメント化ポリウレタンやマルチブロック共重合体の表面における低い血液適合性が報告されていた。また PEG ループ表面のタンパク吸着性は、SAM 形成に用いた 2 の単独表面よりも著しく高かった。こうした挙動を考慮すると、PEG ループ表面での高いタンパク質吸着性は PEG 鎖の固定化様式の違い(両末端固定のループ型と片末端固定のグラフト型)を影響している可能性があるものと考えている。また、メチル化  $\alpha$ -CD にこの PEG ループが貫通した構造を有する表面(ポリロタキサン・ループ表面)ではタンパク吸着が著しく抑制されていたことから、メチル化  $\alpha$ -CD の PEG 鎖に沿った超分子的な分子運動がタンパク吸着抑制に寄与した可能性が高いものと考えている。

以上より、ポリロタキサンと PEG の分子鎖の違いおよびループとグラフトの表面固定様式の違いが動的マテリアル表面の界面応答を解析していく上で重要な知見を与えるものと期待され、今後の研究展開に有用な基盤技術であると認識している。現在は、これらポリロタキサンおよび PEG 固定化表面上でのフィブリノーゲン吸着力測定を石原グループと連携して、血小板粘着実験を実施してフィブリノーゲン吸着抑制との関連を山岡グループと連携して、それぞれ明らかにしつつあり、一連の成果をポリロタキサン合成から血小板粘着評価まで網羅した論文として投稿準備中の段階である。

#### 5. ポリロタキサンと疎水性高分子鎖からなるトリブロック共重合体の設計

由井グループでは、上述のポリロタキサン・ループ表面を種々の基板やデバイスへ適用して簡便に実現するため、ポリロタキサンと疎水性高分子鎖からなるトリブロック共重合体の設計を併行して推進した<sup>1,4)</sup>。これは、親水性化したポリロタキサンの両末端に疎水性高分子鎖を導入し、疎水性の基板あるいはデバイスにキャストした場合に、水中で親水性のポリロタキサン成分が最表層に濃縮されてループを形成することを目指している。具体的には、ポリロタキサン両末端に疎水性高分子鎖としてポリ乳酸をカップリングによって導入したものと、擬ポリロタキサン(包接錯体)の両末端から原子移動ラジカル重合(ATRP)によりポリ(*n*-ブチルメタクリレート)を導入したものを合成し、それらの構造解析を実施中である。

次年度は、ポリロタキサンと疎水性高分子鎖との比率や構造を任意に制御して表面ループ形成を検討する上で有利な ATRP 法を用いた合成に特化して研究を推進し、上述の SAM 形成を利用したポリロタキサン・ループ表面の表面特性との比較検討を実施予定である。

#### 6. マテリアル表面での水の構造解析および血漿タンパク吸着力の定量化

石原グループでは、タンパク質吸着量が  $1 \text{ pg/cm}^2$  以下の生体分子非認識界面の創製を最終目標とし、マテリアル表面の水の状態とタンパク質吸着挙動との関係を定量的に解析することを目的とした。まず、昨年度に確立した表面開始型リビングラジカル重合(SI-ATRP)法によるポリマーブラシ構造の作製および解析を双性イオン型モノマーユニットのみにとどまらず、疎水性、非イオン性およびイオン性モノマーユニットに展開し、種々の特性を有するポリマーブラシ構造を構築した。ポリマーブラシ層の特性解析として、原子間力顕微鏡(AFM)を用いてナノオーダーの摩擦力を評価し、水晶振動子マイクロバランス(QCM-D)法により評価された水の吸着性や水和したブラシ層の粘弾性との相関を解析した<sup>5)</sup>。メチルメタクリレート(MMA)、2-ヒド

ロキシエチルメタクリレート(HEMA)および 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)からなるポリマーブラシ表面の水中における摩擦係数はこの順で小さくなり、同時にポリマーブラシへの水の吸着性および水和したブラシ層の粘弾性はこの順に大きくなった。低摩擦表面の作製にはブラシ層と水との相互作用の制御が重要な要因であり、特に poly(MPC)ブラシは高潤滑表面を実現できることがわかった。次に、タンパク質を共有結合させたカンチレバーを作製し、これを用いて種々のポリマーブラシ表面に対して AFM のフォースカーブ測定を行うことで、ポリマーブラシ層とタンパク質との間に働くナニュートンオーダーの相互作用力(吸着力)を評価する手法を確立し解析した。これにより、poly(MPC)を含む双性イオン型ポリマーブラシ層で従来達成し得なかった低レベルのタンパク質吸着力を実現した。またマテリアル表面近傍の水和状態の評価として、ポリマーブラシ層で修飾されたマイクロビーズ間に閉じ込められた水分子の緩和時間を核磁気共鳴法で測定する手法を考案して解析した。双性イオン型ポリマーブラシ層近傍の水の緩和時間が非イオン型ポリマーブラシ層近傍の水の緩和時間より大きな値であったことから、双性イオン型ポリマーブラシ層近傍の水分子の運動性が高いことが示唆された。タンパク質吸着力は双性イオン型ポリマーブラシ層の方が小さいことから、ポリマーブラシ層近傍の水分子の高い運動性がタンパク質吸着力の軽減に影響を与えていることが示唆された。

一方、ATRP で合成した poly(MPC)鎖を1本だけタンパク質へ特異的に結合させる手法を確立し、このタンパク質の熱構造変化に対する効果について検討した<sup>7)</sup>。その結果、poly(MPC)鎖によりタンパク質の構造変化が抑制されることが確認できた。このことは、タンパク質周辺の水の構造規則性を制御することが、不可逆的な構造変化と吸着を阻止することを示唆する知見である。また、タンパク質の分布状態を制御できる表面を構築し、その後の細胞接着を制御できた<sup>6)</sup>。加えて、細胞接着に影響を与える分子を同定するため MPC ポリマーで修飾された分子インプリンティング表面を構築し、これによりフィブロネクチンが重要な分子であることがわかった<sup>8)</sup>。これらの結果により生体非認識界面創製における重要な知見を得た。

次年度は様々な種類の基板やタンパク質を用いたタンパク質吸着力の測定や、種々の粒子径またはグラフト鎖長で作製されたシリカビーズ間に封入された水分子の緩和時間測定を行うことで、材料表面の水和状態とタンパク質吸着挙動の関係を詳細に評価する予定である。特に由井グループと連携してポリロタキサン・ループ基板に対してタンパク質吸着力測定や水和状態の定量を行うことで、分子鎖運動性と水分子の運動性を同時に加味した新規マテリアル創製に着手する予定である。

## 7. マテリアル表面における細胞応答に関する評価

山岡グループでは、バイオマテリアル表面に存在する親水性高分子鎖の動的特性およびマテリアル表面に固定化された細胞接着や細胞増殖などの生理活性を有するリガンド分子の動的特性が生体応答に与える影響を *in vivo* において解析している<sup>9)</sup>。生体応答は極めて複雑であり、特にバイオマテリアルに対する生体応答を詳細かつ系統的に解析した研究はこれまでに稀少であるが、近年の分子生物学の進歩により様々な生体応答の定量的解析や網羅的解析が可能となってきた。一般的には、慢性炎症やカプセル化などの生体応答はマトリックスを用いた組織再生を抑制する傾向にあると考えられるが、治癒や組織再生にはある程度の炎症が不可欠であることも経験的には明らかである。

本年度は、組織再生マトリックスとして広く研究されており疎水性ゆえに表面の動的特性に乏しいポリ乳酸と、表面を豊富な動的 PEG 鎖により覆われているポリ乳酸-PEG マルチブロック共重合体を対照的表面として選択し、図3に示したさまざまな生体応答を定量化するシステム構築を行った。このことにより、材料に対する初期生体応答が組織再生あるいは組織再生阻害という方向性を決定づける要因であるか、またその方向性を予測するためのインジケータとなれば今後の再生医工学の進歩に寄与するところは大い。カプセル化層の厚さ、好中球・白血球・マクロファージの遊走量、さらに治癒や炎症に関連するマクロファージの分極特性について詳細に検討した結果、水溶性動的分子鎖は全ての生体応答を効果的に抑制し、その生体非刺激性を定量化することが可能となった。さらに、従来から検討されているインターロイキンや TGF などの炎症系遺伝子のみならず、我々の構築する動的界面において生体側で動く遺伝的フェノタイプを解明する目的で DNA チップによる網羅的解析を行い、1000 近い候補遺伝子を見いだした。これらの解析により、動的界面で起こる生体応答の確定が可能になると期待している。

リガンド分子の動的特性の検討に関しては、遺伝子発現タンパク質工学により作成した神経誘導活性リガンドを固定化した疎水界面上での効率よい欠損神経の再生を確認した<sup>10,11)</sup>。さらに、動的ソフト界面が幹細胞の分化挙動にも大きく影響することを見だし、特に自己拍動心筋細胞への分化について詳細に検討した<sup>12-14)</sup>。また、新たな炎症制御性シグナル分の探索を進めると共に、インテグリン介在性の細胞の接着斑形成の相互作用に関しても検討を進めており、刺激された細胞や組織が細胞内でいかなる応答を誘導しているかを画像解析的に評価

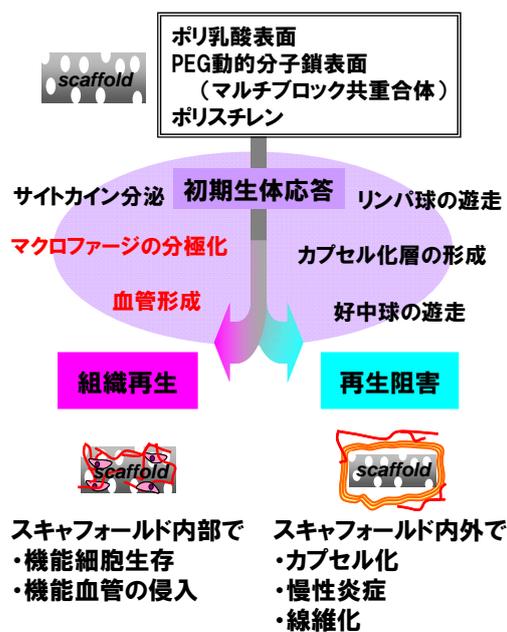


図3 Bioresponses against different surfaces

している。

## 8. マテリアルと生体との接合技術の創製と機構解析

岸田グループでは、最小の物理および化学エネルギーの付与による高分子マテリアルと生体との接合を目指して研究を実施した。本年度は、振動-熱-圧力による生体組織と高分子マテリアル間の接合について、高分子マテリアルの表面処理を用いて表面官能基の影響について検討した。その結果、水酸基等の極性成分の導入により接着強度は向上するものの、同じ極性成分量の材料が同じ接着強度を示さないことが明らかとなった。これより、熱振動圧着法による接合では、官能基間の相互作用だけでなく高分子マテリアルの分子鎖と生体組織のコラーゲンの分子鎖の混合が重要な因子であることが示唆された。また、化学エネルギーによる接合法として、アルコール・グリセリン・エチレングリコールを用いた接合を試みた。コラーゲン分子の2次構造はアルコール・グリセリン・エチレング

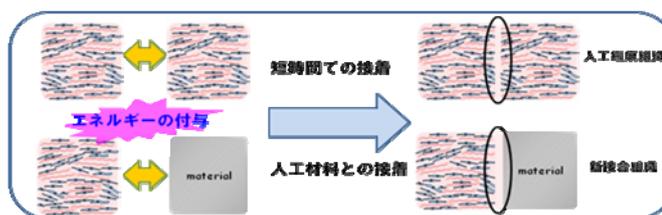


図 4. Adhesion between tissue-tissue and tissue-biomaterial

リコール環境では変化するものの、3次構造は安定すると報告されている。特にアルコールと水の混合溶媒では、コラーゲン3次構造は安定したまま2次構造の変化を調節することが可能であるため、膨潤度調節を行うことができる。

本研究グループでは、コラーゲンフィルムおよび生体組織とポリマーの架橋をアルコールと水の混合溶媒で行った結果、架橋率調節とともに物性制御が可能であることを報告した<sup>15-17)</sup>。これらに基づき、アルコール・グリセリン・エチレングリコール存在下でコラーゲン構造を膨潤させ、コラーゲン組織体と各種高分子マテリアルとの接合について、室温条件下および熱振動圧着法を用いて検討を行った。室温条件下では、いずれも接着が観察されなかった。一方、熱振動圧着法では、溶媒を用いない場合には接着が観察されないような短時間圧着においても接合が観察された。これらの結果から、溶媒使用は接合に必要な熱振動圧着のエネルギー量を減少させる効果があり、溶媒によるコラーゲン構造および高分子マテリアル構造の冗長性増加が相互の分子鎖の混合を促進していると考えられた。さらに、コラーゲン分子鎖と高分子鎖との混合について詳細に検討するため、開始剤濃度を变化させた表面開始リビングラジカル重合によって種々の密度の濃厚ブラシ表面を調製し、これとコラーゲン分子との相互作用についての検討を開始した。種々の密度の濃厚ブラシ表面の調製を行い、コラーゲンのコーティングについて条件設定を検討した。その結果、濃厚ブラシ表面へのコラーゲン吸着は観察されなかったが、ブラシ密度を減少すると吸着が観察された。分子運動の自由度の増加とタンパク質相互作用が関連していると考えられた。

次年度は、低エネルギー接着の条件探索の継続、濃厚ブラシ表面とコラーゲンとの相互作用の定量的評価、および接合界面を人工的に構築するためのコラーゲン組織体構築研究を行う。また、由井グループと連携し、ループ型表面のコラーゲンとの相互作用について検討す

る予定である。

## 9. チーム内で連携して現在進行中の研究内容

由井グループが調製したポリロタキサン・ループ表面におけるフィブリンノーゲン吸着抑制、PEG ループ表面における高いフィブリンノーゲン吸着性を更に解析するため、石原グループによるフィブリンノーゲン吸着力測定、山岡グループによる血漿存在下での血小板粘着評価、岸田グループによる表面接合評価を進行中である。また、これらループ表面の対照として調製したポリロタキサンおよび PEG のグラフト表面についても同様な解析をし、フィブリンノーゲン吸着における表面固定化様式の違いを比較検討している。更には、山岡グループが PEG ループあるいはグラフトを表面に形成することが期待される PEG を一成分とするマルチブロックおよびジブロック共重合体を別途調製して、そのフィブリンノーゲン吸着性を比較検討している。またポリロタキサン・ループ表面の低フィブリンノーゲン吸着性についても上記と同様に解析し、ポリロタキサン・グラフト表面や石原グループの双性イオン型ポリマーブラシ表面と比較検討している。岸田グループは、PEG ループ表面を用いてコラーゲンあるいは生体組織との接合に関する検討を行い、表面分子運動性と接合についての基礎的なデータ集積の準備中である。

由井グループが調製したポリロタキサン・ループ表面およびポリロタキサンヒドロゲル表面の CD へ細胞特異的リガンド (RGD ペプチドなどの細胞接着因子) を導入し、それら動的表面での細胞接着挙動の解析を石原・山岡グループを中心に開始している。特に山岡グループは、ポリロタキサン中の CD に導入したリガンドが細胞膜レセプター (インテグリン) に結合した際の細胞膜直下での接着斑形成や細胞骨格系の再配列に及ぼす影響に着目して解析することを主眼として、その評価系の確立を急いでいる。併行して、動的 RGD ペプチドを導入したロタキサン分子と培養細胞を用いて、リガンド分子の動的特性の与える影響について検討する予定である。石原グループは、由井グループが調製した各種ループおよびグラフト表面における水の構造およびタンパク質吸着力の解析を開始している。

また、次年度に予定している表面分子運動性解析のためのマテリアル設計として、ポリロタキサン中の CD に蛍光分子を導入する予備実験を開始している。

こうした検討をもとにして次年度上半期中に、表面分子運動による生体応答の違いの概要をタンパクレベルから細胞レベルにわたって確認し、次年度下半期の到達目標を明確化する。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ●論文詳細情報

(由井 G)

1. Y. Ohya, S. Takamido, K. Nagahama, T. Ouchi, R. Katoono, N. Yui, Polyrotaxane composed

2. D. H. Yang, R. Katoono, J. Yamaguchi, Y. Miura, N. Yui, Immobilization of Polyrotaxane on a Solid Substrate as The Design of Dynamic Surface, *Polym. J.* **41**, 952–953 (2009). Doi:10.1295/polymj.PJ2009137
3. A. Takahashi, R. Katoono, N. Yui, Loose-Fit Polyrotaxane Composed of  $\gamma$ -CD and Single PEG Chain: Making Room in  $\gamma$ -CD Cavity for Additional Inclusion Complexation, *Macromolecules* **42**, 8587–8589 (2009). Doi:10.1021/ma9022372
4. K. Nagahama, J. Ohmura, H. Sakaue, T. Ouchi, Y. Ohya, N. Yui, Preparation of Nanoaggregates through Self-assembly of Amphiphilic Polyrotaxane Composed of PLLA-PEG-PLLA Triblock Copolymer and  $\alpha$ -Cyclodextrins, *Chem. Lett.* **39**, 250–251 (2010). Doi:10.1246/cl.2010.250

(石原 G)

5. K. Kitano, Y. Inoue, R. Matsuno, M. Takai, K. Ishihara, Nanoscale evaluation of lubricity on well-defined polymer brush surfaces using QCM-D and AFM, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **74**, 350–357 (2009). Doi:10.1016/j.colsurfb.2009.08.004
6. J. H. Seo, R. Matsuno, M. Takai, K. Ishihara, Cell adhesion on phase-separated surface of block copolymer composed of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) and poly(dimethylsiloxane), *Biomaterials* **30**, 5330–5340 (2009). Doi:10.1016/j.biomaterials.2009.06.031
7. J. H. Seo, R. Matsuno, Y. Lee, M. Takai, K. Ishihara, Conformational recovery and preservation of protein nature from heat-induced denaturation by water-soluble phospholipid polymer conjugation, *Biomaterials* **30**, 4859–4867 (2009). Doi:10.1016/j.biomaterials.2009.05.080
8. K. Fukazawa, K. Ishihara, Fabrication of a cell-adhesive protein imprinting surface with an artificial cell membrane structure for cell capturing, *Biosensors and Bioelectronics* **25**, 609–614 (2009). Doi:10.1016/j.bios.2009.02.034

(山岡 G)

9. D. Ishii, T. Hui Ying, A. Mahara, S. Murakami, T. Yamaoka, W. Lee, T. Iwata, In Vivo Tissue Response and Degradation Behavior of PLLA and Stereocomplexed PLA Nanofibers, *Biomacromolecules* **10(2)**, 237–242 (2009). Doi:10.1021/bm8009363
10. S. Kakinoki, S. Uchida, T. Ehashi, A. Murakami, T. Yamaoka, Modification of PLA Scaffolds Using Bioactive Peptide-Oligo(Lactic Acid) Conjugates, *Pept. Sci. 2008* **45**, 449–450 (2009).
11. S. Kakinoki, T. Yamaoka, Stable modification of poly(lactic acid) surface with neurite

- outgrowth-promoting peptides via hydrophobic collagen-like sequence, *Acta Biomater.*  
Doi:10.1016/j.actbio.2009.12.001
12. A. Miskon, A. Mahara, H. Uyama, T. Yamaoka, A suspension induction for myocardial differentiation of rat mesenchymal stem cells on various ECM proteins, *Tissue Engineering.*  
Doi:10.1089/ten.tec.2009.0218
  13. A. Miskon, T. Yamaoka, S-H. Hyon, M. Kodama, H. Uyama, Preservation of Porcine Hepatocytes in 3D Bioreactor at Room Temperature using Epigallocatechin-3-gallate, *Tissue Engineering* **15(3)**, 345-353 (2009). Doi:10.1089/ten.tec.2008.0483
  14. A. Miskon, T. Ehashi, A. Mahara, H. Uyama, T. Yamaoka, Beating behavior of primary neonatal cardiomyocytes and cardiac-differentiated P19CL6 cells on different extramatrix components, *J. Artif. Organs* **12**, 111-117 (2009). Doi:10.1007/s10047-009-0449-4

(岸田 G)

15. K. Nam, A. Murakoshi, T. Kimura, T. Fujisato, S. Kitamura, A. Kishida, Study on the physical properties of tissue-engineered blood vessels made by chemical cross-linking and polymer-tissue cross-linking, *J. Artif. Organs* **12**, 47-54 (2009).  
Doi:10.1007/s10047-008-0443-2
16. K. Nam, T. Kimura, S. Funamoto, A. Kishida, Preparation of a collagen/polymer hybrid gel designed for tissue membranes. Part I: Controlling the polymer-collagen cross-linking process using an ethanol/water co-solvent, *Acta Biomater.* **6**, 403-408 (2010).  
Doi:10.1016/j.actbio.2009.06.021
17. K. Nam, T. Kimura, S. Funamoto, A. Kishida, Preparation of a collagen/polymer hybrid gel for tissue membranes. Part II: In vitro and in vivo biological properties of the collagen gels, *Acta Biomater.* **6**, 409-417 (2010). Doi:10.1016/j.actbio.2009.06.022

#### (4-2) 知財出願

- ① 平成21年度特許出願件数(国内 2件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 2件)