

由井 伸彦

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所・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

異なる分子運動性が期待される基盤表面の設計をほぼ終了し、これら表面での生体応答の基礎となるタンパク質・細胞および組織レベルでの相互作用の解析手法を確立した。これをもとに、動的表面における生体の非特異的応答を平成 22 年度末までに明らかにした。

由井Gでは、リガンド導入のためのアジド化ポリロタキサン、キャストによる表面ループ形成のためのポリロタキサン・ブロック共重合体など、今後の基盤となる分子設計を完了した。また、アジド化ポリロタキサンをベースとしてリガンド導入ポリロタキサンのレセプタータンパク質との多価相互作用を解析し、リガンド可動性の効果を熱力学および分光学的に示した。石原Gでは、材料表面に対するタンパク質の相互作用力測定および材料表面の水和状態の解析方法を確立した。また、生体反応の初期過程であるタンパク質吸着から細胞接着に至るプロセス解明のため、水晶振動子マイクロバランスを利用した連続解析法を提案した。これらの測定法を他の研究 G に提供し、ポリロタキサン表面、両親媒性のブロック型ポリマー表面あるいは親水性ポリマーブラシ表面でのタンパク質吸着挙動の解析に利用し、表面の運動性との関連性について議論を始めた。山岡Gでは、動的界面に対する生体応答と組織再生現象を分子生物学的あるいは細胞生物学的手法により検討するための評価指標軸として、血小板の粘着挙動、血小板膜タンパク質 GPIIb/IIIa の活性化挙動、心筋分化を主体とした幹細胞分化挙動、慢性炎症反応のメルクマールとしての炎症性サイトカイン発現定量、*in vivo* 遺伝子網羅解析、血管系・神経系を標的組織とした組織再生挙動を選定し、その解析手法を確立した。生体との動的界面として、由井 G のポリロタキサン表面、石原 G のリン脂質ポリマー表面、岸田 G のポリマーブラシ表面に加えて、PEG 修飾ポリ乳酸スキャホールド表面、および組織再生リガンドを導入したスキャホールド表面を独自に構築し評価を開始した。岸田Gでは、各種表面と生体組織との接合を系統的に解析する手法を確立した。とくに、生体組織としてのコラーゲンの高分子表面との化学的および物理的接合を定量的に評価する手法を確立し、組織接合に必要な表面特性の分類に成功した。

以上、由井を中心としたチーム内4G の強力な連携により、表面分子運動性と各種生体応答との関係を明らかにするための基盤技術を確立できた。

§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 (東京医科歯科大学生体材料工学研究所、教授)

② 研究項目

- ・ポリロタキサン表面の設計
- ・ON-OFF 制御可能なポリロタキサン合成およびリガンド導入の検討
- ・リン脂質極性基導入ポリロタキサンの合成と二次元化
- ・動的表面での非特異的生体応答の解析

(2)「石原」グループ

① 研究分担グループ長: 石原 一彦 (東京大学大学院工学系研究科、教授)

② 研究項目

- ・表面開始型リビングラジカル重合法による種々の特性を持つ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
- ・タンパク質吸着および細胞接着の水晶振動子マイクロバランスによる連続解析
- ・水晶振動子マイクロバランスによる表面分子運動性の評価

(3)「山岡」グループ

① 研究分担グループ長: 山岡 哲二 (国立循環器病研究センター研究所、部長)

② 研究項目

- ・血小板・幹細胞等機能性細胞の動的表面に対する非特異的・特異的応答の解析
- ・動的表面に対する *in vivo* 生体応答の網羅的解析
- ・生理活性界面上での細胞・組織の機能性制御

(4)「岸田」グループ

① 研究分担グループ長: 岸田 晶夫 (東京医科歯科大学生体材料工学研究所、教授)

② 研究項目

- ・物理エネルギー付加による生体-生体及び生体-高分子材料間接着に及ぼす因子の検討
- ・動的表面へのタンパク質相互作用の検討
- ・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

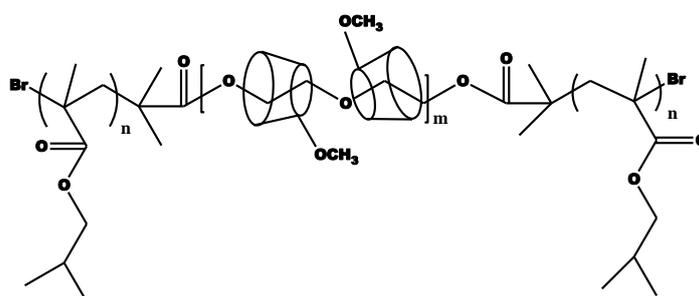
(文中右肩の番号は(4-1)に対応する)

由井グループ

1. ポリロタキサンを一成分とするブロック共重合体の合成による動的表面の設計

ポリロタキサンの CD 運動性制御を目指して、PEG と β -CD とからなる新たなルーズフィット型ポリロタキサン設計法を確立した¹⁾。また、それをもとに温度制御可能な超分子ネットワーク形成を提案した³⁾。更には、ポリロタキサン・ループ表面を種々の基板やデバイスへ簡便に適用して次年度以降の動的

表面設計に用いるため、PEG とメチル化 α -CD とからなる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。これは、親水性化したポリロタキサン (PRX) の両末端に疎水性



Scheme 1. Polyrotaxane-poly(*i*-butylmethacrylate) triblock-copolymer.

高分子鎖を導入し、疎水性器材にキャストした際、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期待している。具体的には、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(*i*-ブチルメタクリレート)(PiBMA)鎖を導入したもの(スキーム1)を合成し、構造を解析した。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、これまで検討してきた SAM 形成を利用したポリロタキサン・ループ表面²⁾とほぼ同様な表面特性(大きな接触角ヒステリシスと低フィブリノーゲン吸着性)を実現することに成功した。また、石原 G と連携してこれら表面におけるエネルギー損失をキャスト前後での水中における $\Delta D/\Delta f$ 値から見積もり、ブロック共重合体表面では PEG 鎖の方が PRX 鎖よりも $\Delta D/\Delta f$ 値が大きく、PEG 鎖の溶液中における柔軟性が裏付けられるとともにポリロタキサン鎖の超分子構造的特徴が示された(後述図6参照)

2. 動的表面における非特異的生体応答の解析

上述の PRX ブロック共重合体表面における血漿タンパク質の非特異的応答を解析するため、これらを細胞培養用マイクロプレート(住友ベークライト社ポリエステル製)にキャストした表面に吸着したフィブリノーゲンのコンフォーメーション変化を血小板膜タンパク GPIIb/IIIa との結合部位の表面露出に着目して解析した。具体的には、フィブリノーゲン α 鎖中に含まれる2つの RGD 連鎖および γ 鎖中のドデカペプチドが血小板膜タンパク質レセプターである

GPIIb/IIIa と結合して血小板凝集を生起することから、吸着したフィブリノーゲン中の α 鎖と γ 鎖の表面露出の程度をそれぞれに特異的なモノクローナル抗体を用いた ELISA 解析により見積もった。

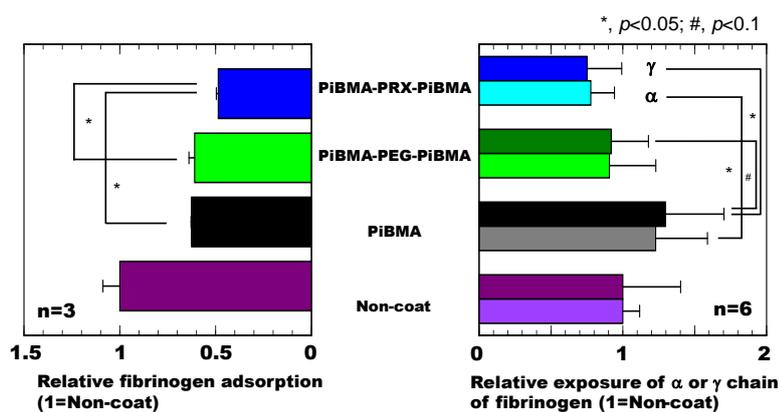
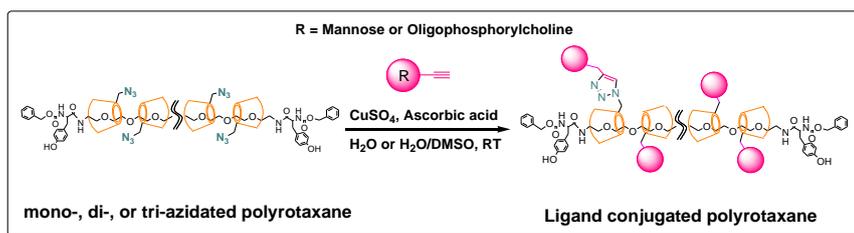


Fig. 1 Surface exposure of α or γ chain of fibrinogen adsorbed on dynamic surfaces.

PEG ブロック共重合体表面と PiBMA 表面は同様なフィブリノーゲン吸着性ながら、PEG ブロック共重合体表面において α 鎖と γ 鎖の表面露出が少ない傾向を示した。また、フィブリノーゲン吸着性の最も低かった PRX ブロック共重合体表面が α 鎖と γ 鎖の表面露出も最少となっていた(図1)。更に α 鎖と γ 鎖の表面露出を比較すると、 γ 鎖において表面間での差が有意であった。また、これら表面での血小板活性化挙動を山岡Gと連携して検討したところ、PRX ブロック共重合体表面で血小板の活性化が回避されていたことが明らかとなった(山岡グループの項を参照)。この結果は、血小板粘着には吸着フィブリノーゲンの γ 鎖露出がより深く関与しており、PRX ブロック表面がその γ 鎖露出を回避する特性を有していることを示していると考えられる。以上より、表面分子運動性は材料表面と血液との接触に始まる一連の非特異的生体応答を回避するうえで重要な因子である可能性を強く示唆しているものと結論される。

3. アジド化ポリロタキサンを用いた生体との特異的相互作用の解析

既に確立した方法で合成したアジド化ポリロタキサンにクリック反応を利用して細胞特異的リガンドを導入し(スキーム2)⁴⁾、そのレセプターたんぱく質との多価相互作用に及ぼす分子運動性の効果の検討を開始した。具体的には、アジド化ポリロタキサンへ細胞特異的リガンドであるマンノースを定量的に導入し、マンノースレセプターであるコンカナバリン A を固定化した表面との多価相互作用を表面プラズモン共鳴分光によって解析した⁵⁾。その結果、マンノース導入ポリロタキサンは、比較対象であるマンナン、マンノース導入 α -CD、マンノース導入ポリアクリルアミドよりも高い



Scheme 2. Preparation of mannose-conjugated polyrotaxane via click reaction.

比較対象であるマンナン、マンノース導入 α -CD、マンノース導入ポリアクリルアミドよりも高い

結合定数が有意に認められ、それが結合速度定数の増大によるものであることを明らかにした。更に、異なる蛍光分子を導入した2種のコンカナバリン A を用いたリガンド-レセプター結合の FRET 解析により、マンノース導入ポリロタキサンがマンノース導入ポリアクリルアミドより顕著にコンカナバリン A と結合することが確認され、ポリロタキサンの構造的特徴である CD 可動性による効果が裏付けられた (図2)。また、マンノース導入ポリロタキサンと炎症担当細胞であるマクロファージとの相互作用を、マンノースレセプター介在性エンドサイトーシスおよびサイトカイン産生挙動に着目して解析した。マンノース導入ポリロタキサンはエンドサイトーシスが効率的であるだけでなく、従来からのポリマー系 (マンノース導入ポリアクリルアミド) を用いた場合には炎症性サイトカインである組織壊死因子 (TNF- α) が有意に産生されるのとは対称的に抗炎症性サイトカインである変換成長因子 (TGF- β 1) を産生することが明らかになった⁶⁾。詳細な機序は不明ながら、生体との特異的応答に及ぼす動的構造の新たなバイオイナート効果と考えている。これと併行して、非特異的相互作用を回避可能なリガンドとして、石原Gで調製したホスホリルコリン (PC) 基を導入したポリロタキサンを合成した⁴⁾。

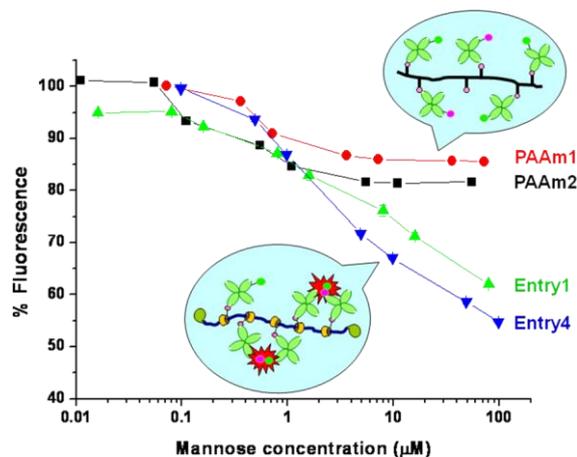


Fig. 2 FRET analysis on multivalent interaction of mannose-conjugated polyrotaxane (Entry 1 & 4) with concanavalin A. PAAm1 & PAAm2 are mannose-conjugated polyacrylamides used as a reference sample.

石原グループ

1. 精密表面を有する高密度ポリマーブラシ構造の構築とタンパク質吸着抑制効果

種々の特性を有するモノマーユニットからなるポリマーブラシ構造を表面開始型原子移動ラジカル重合 (SI-ATRP) 法により作製し、その表面の精密構造およびタンパク質吸着抑制能について評価した^{7, 8, 9, 10, 12)}。現在までに、メタクリル酸骨格を有し、側鎖が双性イオン型 (ホスホベタイン (PMPC)、スルホベタイン (PSBMA) およびカルボキシベタイン (PCBMA))、イオン型 (カチオン性 (PTMAEMA) およびアニオン性 (PMPS))、非イオン型 (ヒドロキシル基

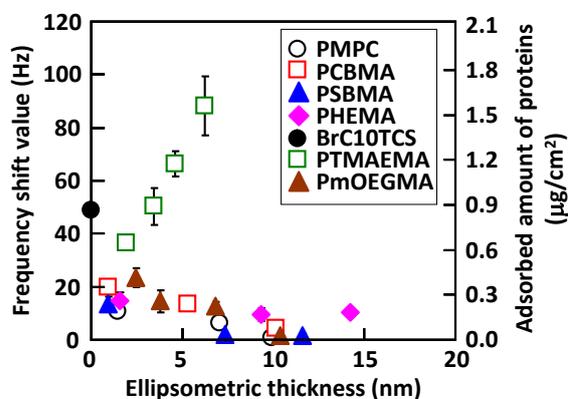


Fig. 3. Amount of adsorbed proteins from 100% fetal bovine serum on polymer brush layers quantified by using QCM-D.

(PHEMA)およびオリゴエチレングリコール鎖(P(m)OEGMA)および疎水型(フルオロカーボン(PTFEMA))のポリマーブラシ構造を構築した^{8, 9, 12})。特に、ホスホリルコリン基を有するブロック、グラフト型あるいはブラシ構造については、ポリマーの後期生体反応となる生体親和性に関連した知見も集積した^{13, 14, 15, 16})。エリプソメーターによるグラフト層の厚さから算出されるグラフト密度およびグラフト鎖による表面被覆率から、作製されたポリマーブラシ構造は高密度領域に達していることがわかった。一方でホスホベタイン型の PMPC ブラシ層のグラフト密度(0.26 chains/nm^2)および表面被覆率(39%)は他のポリマーブラシ層と比較してそれほど高くなかった。コンピューターシミュレーションから、 0.4 chains/nm^2 の最大グラフト密度を有する PMPC ブラシ層では、グラフト鎖・水分子とも運動性が低く抑えられており、両者の運動性が上昇するのは $0.2 - 0.3 \text{ chains/nm}^2$ までグラフト密度が低減した構造であることが示された。この点で、本研究において作製された PMPC ブラシ層は分子鎖運動性および水分子の運動性が非常に高い表面構造を持つと考えられた。実際、 10 nm 程度の膜厚を有する PMPC ブラシ層は 100%の仔ウシ血清(FBS)からのタンパク質吸着量が 20 ng/cm^2 程度であり、極めて高いタンパク質吸着抑制能を示した(図 3)。

2. 材料表面とタンパク質との直接的な相互作用力の評価

タンパク質吸着挙動を明確にする上での新たな指標を確立するため、材料表面とタンパク質との間に作用する相互作用力(タンパク質吸着力)を高い分解能で直接評価した^{10, 12})。具体的には、各ポリマーブラシ表面に、ウシ血清アルブミン(BSA)を化学的に固定化させたカンチレバーを接近・接触させその後引き離す際の 100 箇所ほどのフォースカーブからタンパク質吸着力を算出した(図 4)。タンパク質吸着力は、双性イオン型ポリマーブラシ層に対しては膜厚の増加とともに低下し、非イオン型ポリマーブラシ層に対しては非依存的であった。また、同程度の膜厚であってもモノマーユニットの特性によりタンパク質吸着力は異なった。特に PMPC を含む双性イオン型ポリマーブラシ層では、従来達成し得なかった低レベルのタンパク質吸着力($0.1-0.2\text{nN}$)を実現した。親水性ポリマーブラシ層の化学的もしくは3次元物理的構造がタンパク質吸着力に多大な影響を及ぼし、ポリマーブラシ層の構造を選定することにより材料表面のタンパク質吸着挙動を制御できることがわかった¹²)。

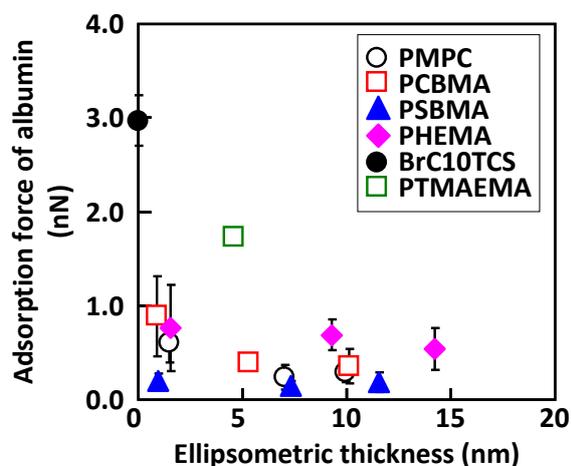


Fig. 4. Adsorption force of albumin against polymer brush layers with different chemical structure and ellipsometric thickness.

3. 材料表面近傍の水分子運動性の解析

表面近傍の水分子の運動性を高い時間分解能で評価するため、ガラスビーズの間隙に封入された水分子を対象とし、核磁気共鳴 ($^1\text{H-NMR}$) 法を用いて磁気緩和時間 (T_1) を測定した^{7, 11)}。すなわち、 $10\ \mu\text{m}$ 程度のガラスビーズ表面に種々の構造を有するポリマーブラシ層を構築し、 37°C の高湿度下で T_1 値を測定することにより、ポリマーブラシ層の近傍の水分子の運動性を評価した。図 5 に $5\ \text{nm}$ 程度の膜厚を有する各ポリマーブラシ層で修飾されたシリカビーズ間に封入された水の T_1 値を示す。上記の測定条件では、カチオン性ポリマーブラシ (PTMAEMA) 層近傍の水分子はその T_1 値が小さく、それ以外のポリマーブラシ層近傍の水分子の運動性に有意な差はなかった。すなわち、タンパク質吸着量や吸着力が極めて高い PTMAEMA ブラシ層近傍の水分子は、ポリマー鎖と強く相互作用し運動性が抑制されていることがわかった。一方、いずれのポリマーブラシ層についても、湿度や温度などの測定環境を変化させたり、ポリマーブラシ層の三次元構造などを制御したりして検討することで、水分子運動性の動的変化が生じることが示唆された。

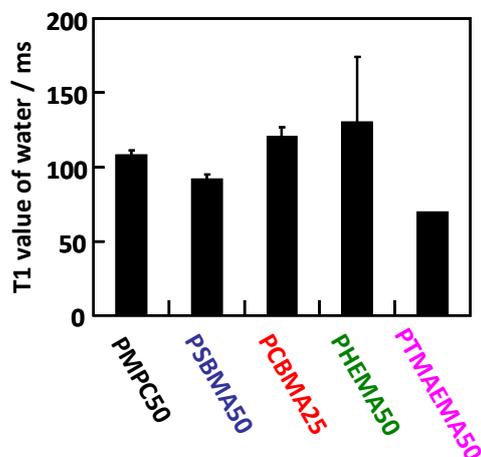


Fig. 5. T_1 value of water interacting with polymer chains fixed on surface.

4. 動的界面の設計とその評価

由井グループのポリロタキサンまたは PEG と疎水性高分子鎖からなるトリブロックコポリマーに加え、可逆的付加-開裂連鎖移動 (RAFT) 型ラジカル重合法により合成された PMPC 鎖と疎水性高分子鎖からなるブロックコポリマー (PMB-block) を用いて異なる化学構造を有するループ型基板を作製した。種々の条件下での水中安定性や濡れ性の変化について岸田グループと連携して評価し、さらに由井グループとの連携の下、これらの表面が乾燥状態から湿潤状態へ変化する際の損失エネルギー変化を水晶振動子マイクロバランス (QCM-D) により解析することで、表面分子鎖の運

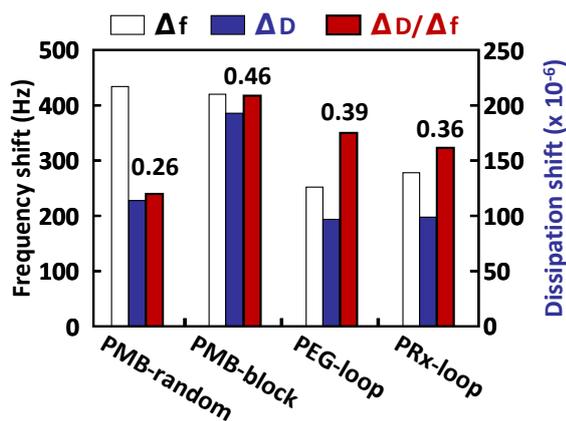


Fig. 6. Shifts of frequency (Δf) and dissipation (ΔD) and $\Delta D / \Delta f$ values in contact with water on loop-type surface.

動性を解析した(図 6)。それぞれの基板に純水を接触させた際の損失エネルギー変化を水和量に対応する振動数変化で規格化することで、ループ型の構造を有する表面が親水性ユニットと疎水性ユニットがランダムに配列する基板よ(PMB-random)り大きな運動性を有することが示唆された。加えて、岸田グループと連携して、これら形態の異なる動的表面でコラーゲンをフィブリル化させ、その過程を QCM-D を用いて解析することにより表面上および溶液中の高分子鎖の相互作用を解析した。その結果、ループ型の構造を有する基板の中でも特に PMPC 鎖からなる表面で大きな相互作用があることが明らかとなった。

山岡グループ

1. 動的特性の異なる表面に対する血小板反応の解析

由井 G で得られた血漿タンパク質の非特異的応答の解析結果と、それに基づくと考えられる血小板反応の相関を明確にすることを目的として、固定化様式の異なるポリロタキサンもしくは PEG 鎖を有する SAM 表面に対するヒト血小板反応について評価した。由井 G で調製されたメチル化 α -CD と PEG とからなる水溶性ポリロタキサン (PRx) あるいは PEG の片末端もしくは両末端をチオール基を介して金基板上に固定化することで、ループ状ならびにグラフト状に親水性が固定化された表面を構築した。まず、ヒト全血(クエン酸血)より回収した多血小板血漿 (PRP) を各 SAM 表面に播種

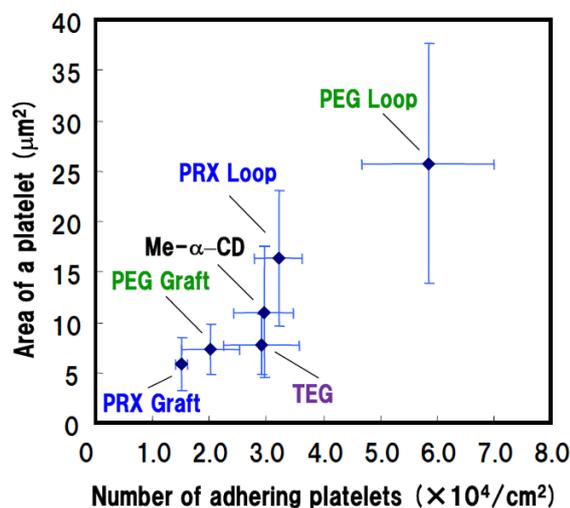


Fig. 7 Correlation between number and are of adhering platelets on PEG or PRx-immobilized SAM.

し、血小板接着数および接着形態(接着面積)の評価を行った。その結果、血小板の粘着数とその面積には強い相関があり、その傾向は PRX < PEG であつグラフト < ループとなった(図7)。これは、由井Gによって明らかにされた各表面に対する吸着フィブリノーゲンの γ 鎖の露出と相関しており、表面の動的特性によって GPIIb/IIIa を介した血小板粘着を制御できることが明らかとなった。さらに、SAM 基材に接着しなかった浮遊血小板を PAC-1 モノクローナル抗体で処理した後に FACS 解析することで、浮遊血小板の GPIIb/IIIa 活性化について検討したところ、PRx 固定化表面に接触では浮遊血小板の活性化も有為に抑制されていることも明らかとなった。

2. 動的特性の異なる表面を有する高分子多孔体に対する生体応答の遺伝子網羅解析

昨年度に引き続き、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* において系統的に解析することを目的とし、各表面が生体内で誘導する遺伝子フェノタイプの変化を遺伝子網羅解析により評価した。具体的には、石原Gで調整されたMPC、動物由来のコラーゲン、由井Gで調整されたPiBMA-PEG-PiBMA ブロック共重合体(PEGループ表面を構築)をコーティングしたポリエチレン多孔体をマウス皮下に移植し、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、多孔体に浸潤した細胞が発現する遺伝子フェノタイプの網羅解析を行った¹⁷⁾。サンプル間で発現強度に2倍以上の差があった 2928 遺伝子のクラスタリング解析の結果、MPCとPEGループは遺伝子フェノタイプに相同性があることが明らかとなり、以前より知られている生体親和性の傾向を遺伝子レベルで支持する結果であった(図 8)。さらに、各サンプル間において発現量が顕著に異なる遺伝子群を抽出したところ、MPC では血管新生抑制性遺伝子の発現が亢進していることが見出された。このことは、MPC コートサンプル周囲で血管新生が極めて起こりにくいという組織観察と一致した。すなわち、生体内でバイオイナートとされる MPC ポリマーが、能動的に血管新生を抑制する可能性(能動的なバイオイナート性)があることは新たな知見であり極めて興味深い。

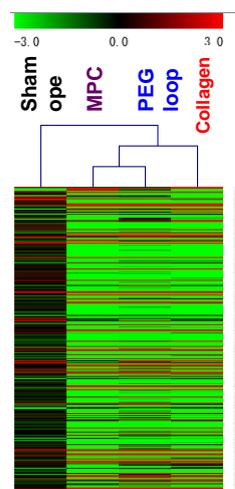


Fig. 8 Clustering analysis of genes differentially expressed between surfaces.

3. 生理活性界面上での細胞・組織の機能性制御

近年、様々な培養基材の特性が細胞機能発現や幹細胞分化挙動に影響を与えることが明らかにされている。これまでに、細胞接着活性や神経誘導活性を有するシグナル分子により修飾した界面による組織再生を見いだしてきた¹⁷⁻¹⁹⁾。一方、組織再生が困難とされている心筋組織の再生法開発においても、自己拍動する心筋細胞の大量培養と機能維持ができれば、心筋梗塞や拡張型心筋症の治療に有効である。そこで、これまでに構築した動的界面を用いて、幹細胞から心筋細胞への分化効率の向上と長期機能維持を目指した。細胞の分化特性と移植後の運命を詳細に把握できれば幹細胞移植医療の大きな一助となる²⁰⁾。マウス胎児の癌腫由来細

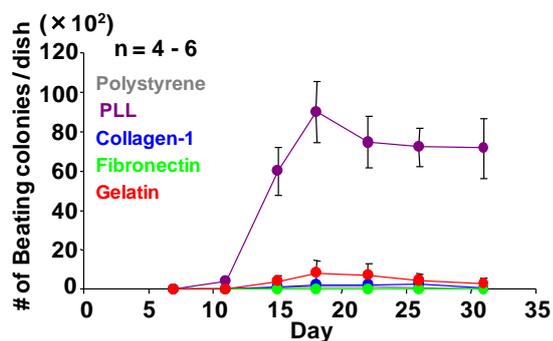


Fig. 9 Cardiac differentiation of P19CL6 stem cells on different surfaces.

胞株である P19CL6 細胞を、様々な培養基材上に播種し、心筋細胞への分化誘導因子である DMSO (1%) 含有培地 (10% FBS in DMEM) にて 4 日間培養し、その後、約1ヶ月間 DMSO 不含培地 (10% FBS in DMEM) にて培養して、自己拍動コロニー数を位相差顕微鏡下にて経時的に計測した。また、心筋分化マーカータンパク質である GATA binding protein4 (GATA-4) および NK2 transcription factor related, locus 5 (Nkx2-5), Hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4 (HCN4), α -Myosin heavy chain (α -MHC)などの遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により測定した。心筋分化の初期段階に発現が上昇する転写因子 GATA4 の mRNA 量を測定した結果、ポリスチレンに比して I 型コラーゲンおよびゼラチン、ポリリジン上において著しい発現量の増加が見られた。一方、フィブロネクチン上では、著しい発現量の増加は見られなかったことから、培養基板表面にコートされたマトリクスタンパク質の組成により、心筋細胞への分化挙動が著しく異なることが明らかとなった。一方、拍動コロニー数は、ポリリジン基盤上で顕著であり、細胞播種 10 日前後において拍動コロニー数は急激に増加して 17 日頃にピークとなり、その後は緩やかに減少する傾向が見られた (図 9)。ポリリジン上において、心筋の拍動と深く関わるタンパク質として知られる α -MHC の mRNA 発現量が著しく増加しており、細胞機能に大きな影響を与えたことは明らかである。しかしながら、コラーゲンやフィブロネクチンといった生物学的な活性を有する細胞外マトリクスタンパクよりも、生物学的に非活性なポリリジンでこのような著しい活性の向上が見られたことは有用な機能細胞の作成技術として極めて重要である。また、この一因は、PLL のヘリックス構造に由来する動的特性に基づく物理化学的要因(メカノキュー)であると考えている。

岸田グループ

1. 物理エネルギー付加による生体-生体及び生体-高分子材料間接着に及ぼす因子の検討

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材料と生体との接合を目指して研究を実施した。昨年度までに、振動-熱-圧力による生体組織同士および生体組織と高分子材料間の接合について検討した²⁶⁾。その結果、熱、振動、圧力のエネルギーを付与することで、目的の接着は可能であるが、過剰なエネルギーによる組織損傷や高分子材料の破断を確認した。また周辺組織の細胞への影響の可能性も示された²⁷⁾。そこで、本研究では振動、熱、圧力のエネルギー制御を行い、生体組織を構成するコラーゲンと高分子材



Fig. 10 Cross-sectional view of the adhesive site between pericardium and aorta (EVG staining) .

料を接着させ、微小振動融着法による生体組織－高分子材料間の短時間接着について検討を行った。新規に装置を製作し、従来の1/10程度のエネルギーによる接着について検討した。結果の一例を図10に示す。上部が心膜、下部が大動脈である。本装置を使用し、低エネルギーで振動・熱・圧着力を付与することで、組織損傷を引き起こすことなく生体接着が実現可能であった。また、本装置は、生体－高分子マテリアル間の接着にも有効であった。

2. 動的表面へのタンパク質相互作用の検討

コラーゲンと高分子マテリアル間の相互作用について、それらを溶液状態で混合し、コラーゲンのフィブリル形成を観察することで知見を集積してきた^{24,30,31}。本研究では、高分子マテリアルを水晶振動子表面に形成し、これにコラーゲンを相互作用させてフィブリル形成を行わせた場合について、QCM-Dを用いて検討を行った。結果を図 11 に示す。本年度は予備的な検討であるが、動的表面の性状によって、コラーゲン分子の相互作用が異なり、吸着量だけでは不明であった、表面の高分子マテリアル鎖との相互作用が観察可能であることが示された。

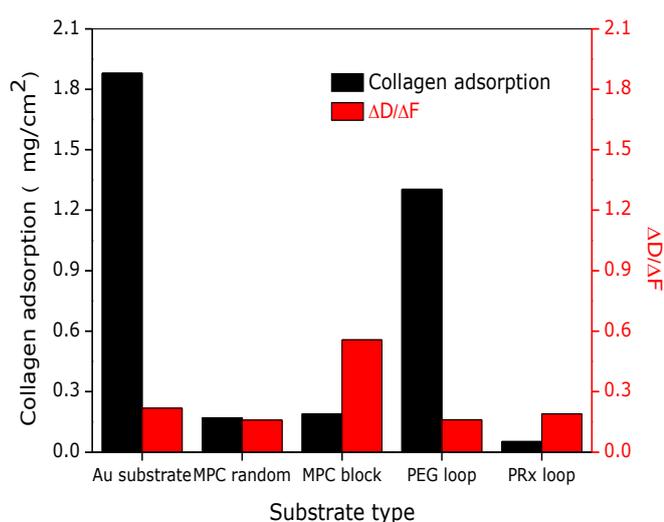


Fig. 11 Collagen adsorption and fibrillization on various surfaces.

3. 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

生体軟組織構造を再構築する基盤技術として、密度勾配型コラーゲンマトリクスの作製を試みた²⁸。コラーゲンマトリクスの構築の機構を知ることで、高分子マテリアルとの複合化に必要な因子を知ることができ

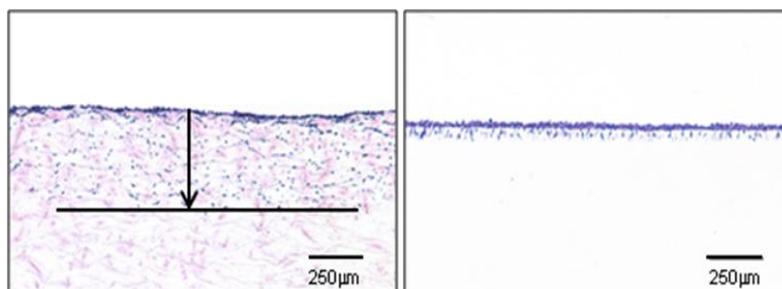


Fig. 12 H&E staining of L929 on 3LCM (Left) upper part (Right) below part.

きると期待できる。ここでは、コラーゲンマトリクス同士の接着を可能にするとともに細胞の浸潤制御や第二成分の付加を可能とした新規コラーゲンマトリクスの開発を目的とした。セルカルチャーインサートに濃度の異なるコラーゲン水溶液を加え NaCl/Na₂HPO₄ 溶液で透析した。こ

れによりフィブリル化を引き起こすことにより密度勾配を有するコラーゲンマトリックスを作製した。コラーゲン染色の結果より、密度勾配を有するマトリックスが得られた。これはコラーゲン分子の分散速度がNaClの拡散速度に比べて遅いことによるものだと考えられた。SEMによる観察により、このマトリックスはフィブリル化していることが明らかとなった。吸水率はコラーゲン濃度の違いによって、短時間で平衡に達するスポンジ様の性質を示すものから、徐々に給水するゲル様の性質を示すものまでが得られた。生物学的評価では、細胞は密度の低い上層ではマトリックス内部に浸潤が見られるのに対し、下層では浸潤は見られず、単層を形成していた(Fig. 12)。これにより、マトリックスの密度を調整することで細胞の浸潤を制御することが可能であることが示された。本研究で得られたマトリックスは、生体組織の微細構造の生物活性^{21-23,25,29}との関連および生体—高分子マテリアル間の接着を検討する標準材料として有用である。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Ryo Katoono, Yuiochiro Kobayashi, Nobuhiko Yui, “Preparation of loose-fit polyrotaxane composed of β -cyclodextrin and poly(ethylene glycol) derivatives through the slipping-expanding protocol“, *Chem. Lett.* **39**, 892-893 (2010). (doi:10.1246/cl.2010.892)
2. Nobuhiko Yui, “Supramolecular Surfaces Modulating Cellular Response“, *Adv. Sci. Tech.* **76**, 10-15 (2010). (doi:10.4028/www.scientific.net/AST.76.10)
3. Ryo Katoono, Yuichiro Kobayashi, Masayuki Yamaguchi, Nobuhiko Yui, “Heat-induced supramolecular crosslinking of dumbbell-shaped PEG with α -CD dimer based on reversible loose-fit rotaxanation“, *Macromol. Chem. Phys.* **212**, 211-215 (2011). (doi:10.1002/macp.201000548)
4. Hoon Hyun, Nobuhiko Yui, “Mono-, di-, or triazidated cyclodextrin-based polyrotaxanes for facile and efficient functionalization via click chemistry“, *Macromol. Rapid Commun.* **32**, 326-331 (2011). (doi:10.1002/marc.201000631)
5. Hoon Hyun, Nobuhiko Yui, “Ligand accessibility to receptor binding sites enhanced by movable polyrotaxanes“, *Macromol. Biosci.* **11**, published online (2011). (doi:10.1002/mabi.201000507)
6. Tomo Ehashi, Hoon Hyun, Nobuhiko Yui, “Anti-inflammatory response of mannose-conjugated polyrotaxane endocytosed by macrophage“, *Macromol. Res.* **19**, in press (2011). (doi:10.1007/s13233-011-)
7. Kazuhiko Ishihara, Yuuki Inoue, “Essential factors to make excellent biocompatibility of phospholipid polymer materials“, *Adv. Sci. Technol.*, **76**, 1-9

- (2010). (doi:10.4028/www.scientific.net/AST.76.1)
8. Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Reduction of protein adsorption on well-characterized polymer brush layers with varying chemical structures", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **81**, 350-357 (2010). (doi:10.1016/j.colsurfb.2010.07.030)
 9. Tomomi Kitagawa, Yuuki Inoue, Madoka Takai, Kazuhiko Ishihara, "Monitoring of initial cell adhesion process on nanometer-scaled and organized surfaces", *Eur. Cell. Mater.* **20**, Suppl. 3, 138-139 (2010).
 10. Kazuhiko Ishihara, Tomoaki Nakanishi, Madoka Takai, Yuuki Inoue, "Nanoforce measurement during protein adsorption by well-controlled polymer brush surfaces", *Eur. Cell. Mater.* **20** Suppl. 3, 123-124 (2010).
 11. Kyoko Fukazawa, Qiang Li, Stefan Seeger, Kazuhiko Ishihara, "Molecular-nanointegrated surface for selective protein recognition by molecular imprinting concept", *Eur. Cell. Mater.* **20** Suppl. 3 86-87 (2010).
 12. Yuuki Inoue, Tomoaki Nakanishi, Kazuhiko Ishihara, "Adsorption force of proteins against hydrophilic polymer brush surfaces", *React. Funct. Polym.* **71**, 350-355 (2011). (doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2010.11.017)
 13. Kimiaki Takami, Junji Watanabe, Madoka Takai, Kazuhiko Ishihara, "Spontaneous formation of a hydrogel composed of water-soluble phospholipid polymer grafted with enantiomeric oligo(lactic acid) chains", *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* **22**, 77-89 (2011). (doi: 10.1163/092050609X12578498967995)
 14. Ji-Hun Seo, Ryosuke Matsuno, Yan Lee, Tomohiro Konno, Madoka Takai, Kazuhiko Ishihara, "Effect of hydrophilic polymer conjugation on heat-induced conformational changes in a protein", *Acta. Biomaterialia.* **7**(4), 1477-1484 (2011). (doi:10.1016/j.actbio.2010.11.027)
 15. Hyung Il Kim, Kazuhiko Ishihara, Seungbok Lee, Hye Young Kim, Dongwhan Suh, Min Uk Kim, Jeong-Sun Seo, "Enhanced tissue compatibility of poly(L-lactic acid)-based polymer blend with phospholipid polymer for temporary cardiovascular stent device", *Biomaterials* **32**(9), 2241-2247 (2011). (doi:10.1016/j.biomaterials.2010.11.067)
 16. Ji-Hun Seo, Takashi Shibayama, Ryosuke Matsuno, Madoka Takai, Kazuhiko Ishihara, "Characterization of poly(dimethylsiloxane) surface physically treated with random/block-type phospholipid copolymers for optimizing surface modification", *Soft Matter* **7**(6), 2968-2976 (2011). (doi:10.1039/c0sm01292k)
 17. Tomo Ehashi, Asami Nishigaito, Toshiya Fujisato, Yoshiyuki Moritan, Tetsuji Yamaoka, "Peripheral nerve regeneration and electrophysiological recovery with

- CIP-treated allogeneic acellular nerve”, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, in press (2010). (doi:10.1163/092050610X488250)
18. Sachiro Kakinoki, Sho Uchida, Tomo Ehashi, Akira Murakami, and Tttsuji Yamaoka, “Preipheral nerve regeneration using PLA nanofiber conduit modified with neurite outgrowth promoting peptide-oligo(lactic acid)conjugates in the rat”, *Peptide Science* **2009**, 409-410 (2010).
 19. Sachiro Kakinoki, Sho Uchida, Tomo Ehashi, Akira Murakami, Tetsuji Yamaoka, “Surface modification of poly(L-lactic acid) nanofiber with oligo(D-lactic acid)–bioactive-peptide conjugates for peripheral nerve regeneration”, *Polymers*, in press (2011).
 20. Carlos A. Agudelo, Yoichi Tachibana, Teramoto Noboru, Hidehiro Iida, Tetsuji Yamaoka, “Long term in vivo MRI tracking of endothelial progenitor cells transplanted in rat ischemic limbs and their angiogenic potential”, *Tissue Engineering; Parts A*, in press (2011).
 21. Seiichi Funamoto, Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Ayako Murakoshi, Yoshihide Hashimoto, Kazuo Niwaya, Spichiro Kitamura, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, “The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels”, *Biomaterials*, **31**, 3590–3595 (2010). (doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.073)
 22. Yoshihide Hashimoto, Seiichi Funamoto, Shuuji Sasaki, Takako Honda, Shinya Hattori, Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Manabu Mochizuki, Hisatoshi Kobayashi, Akio Kishida, “Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering”, *Biomaterials*, **31**, 3941–3948 (2010). (doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.122)
 23. Akio Kishida, Seiichi Funamoto, Jun Negishi, Yoshihide Hashimoto, Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Toshiya Fujisato, Hisatoshi Kobayashi, “Tissue engineering with natural tissue matrices”, *Adv. Sci. Technol.* **76**, 125-132 (2010). (doi: 10.4028/ www.scientific.net/ AST.76.125)
 24. Kwangwoo Nam, Rie Fukaya, Yoshihide Hashimoto, Yukiko Ito, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, “Human mesenchymal stem cell behavior on concentrated polymer brushes presenting different surface stiffness”, *Chem. Lett.*, **39**, 1164-1165 (2010). (doi: 10.1246/cl.2010.1164)
 25. Jun Negishi, Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, “High hydrostatic pressure technique is an effective method for the preparation of PVA-heparin hybrid gel”, *Eur. J. Pharma. Sci.*, **41**, 617–622 (2010). (doi:10.1016/j.ejps.2010.09.001)

26. Kenji Yamamoto, Tsuyoshi Kimura, Kwangwoo Nam, Seiichi Funamoto, Yukiko Ito, Kumiko Shiba, Ayako Kato, Shigeru Shimizu, Kimio Kurita, Tetsuya Higami, Tooru Masuzawa, Akio Kishida, “Synthetic polymer-tissue adhesion using ultrasonic scalpel”, *Surg. Endosc.*, **25**, 1270-1275 (2011). (doi: 10.1007/s00464-010-1357-7).
27. Yukiko Ito, Tsuyoshi Kimura, Kwangwoo Nam, Ayako Kato, Tooru Masuzawa, Akio Kishida. “Effects of vibration on differentiation in cultured PC12 cells”, *Biotech. Bioeng.*, **108**, 592-588 (2011). (doi: 10.1002/bit.22961)
28. Kwangwoo Nam, Yuuki Sakai, Seiichi Funamoto, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, “Engineering a collagen matrix that replicates the biological properties of native extracellular matrix”, *J. Biomater. Sci., Polym. Edn.*, in press (2010). (doi:10.1163/092050610X529182)
29. Jun Negishi, Seiichi Funamoto, Tsuyoshi Kimura, Kwangwoo Nam, Tetsuya Higami, Akio Kishida, “Preparation of decellularized small-diameter vessels using high-hydrostatic pressure method”, *J. Artif. Organs*, in press (2011)
30. Tsuyoshi Kimura, Youichi Nibe, Seiichi Funamoto, Masahiro Okada, Tsutomu Furuzono, Tsutomu Ono, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Kwangwoo Nam, Akio Kishida. “Preparation of a nano-scaled poly (vinyl alcohol)/hydroxyapatite/DNA complex using high hydrostatic pressure technology for in vitro and in vivo gene delivery”, *J. Drug Deliv.*, in press (2011).
31. Kwangwoo Nam, Yuusuke Tsutsumi, Chiaki Yoshikawa, Yuuko Tanaka, Rie Fukaya, Tsuyoshi Kimura, Hisatoshi Kobayashi, Takao Hanawa, Akio Kishida. “Preparation of novel polymer-metal oxide nanocomposites with nanophase separated hierarchical structure”, *Bull. Mater. Sci.*, in press (2011).

(4-2) 知財出願

①平成22年度特許出願件数(国内 0件)

②CREST 研究期間累積件数(国内 0件)