

由井 伸彦

東京医科歯科大学生体材料研究所・教授

分子運動操作を基盤とした多次元のバイオ界面

§1. 研究実施体制

(1) 由井グループ

① 研究代表者: 由井 伸彦 (東京医科歯科大学生体材料研究所、教授)

② 研究項目

- ・生体非認識・非特異的認識動的表面のためのポリロタキサン・ブロック共重合体の合成
- ・特異的生体認識動的表面のためのアジド化ポリロタキサン・ブロック共重合体の合成
- ・動的表面における接触角測定・QCM-D によるエネルギー散逸量測定・誘電緩和測定をもとにした表面分子運動性の解析
- ・血漿タンパク質吸着の吸着量定量ならびに吸着コンフォーメーション変化に関する ELISA 解析
- ・動的表面における繊維芽細胞粘着挙動の解析

(2) 石原グループ

① 主たる共同研究者: 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および官能基の相互作用力解析
- ・プロトン核磁気共鳴法による材料表面近傍の水和構造の定量的評価
- ・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
- ・生理活性分子固定化ポリマーブラシ表面による後期生体応答の解析
- ・ナノ界面創製法の開拓と医療デバイスの表面機能化

(3) 山岡グループ

① 主たる共同研究者: 山岡 哲二 (国立循環器病研究センター研究所生体医工学部、部長)

② 研究項目

- ・動的ポリロタキサン界面上での血小板および内皮細胞の挙動解明
- ・特異的認識ペプチド配列の合成と、これを動的に固定化したポリロタキサン界面に対する内皮細胞の接着挙動解析
- ・動的特性を有するポリロタキサン界面における P19CL6 細胞の拍動心筋細胞への分化解析
- ・表面特性の異なる多孔質材料への生体応答・組織浸潤挙動の遺伝子網羅解析
- ・界面の動的特性が上述した細胞挙動や生体応答に与える影響の定量的解析

(4) 岸田グループ

① 主たる共同研究者: 岸田 晶夫 (東京医科歯科大学生体材料研究所、教授)

② 研究項目

- ・コラーゲン組織体再構成時における共存高分子の組織体構造に及ぼす影響評価
- ・精密制御表面におけるコラーゲン繊維形成におよぼす表面分子の影響評価
- ・生体組織と高分子材料の複合化に関する研究
- ・エネルギー付与による生体-高分子材料間接着の解析評価
- ・動的特性を有するポリロタキサン界面におけるヒト間葉系幹細胞の分化挙動の解析

§ 2. 研究実施内容

(文中右肩の番号は § 3(3-1) 原著論文リストの文献番号に対応する)

本研究では、動的表面プラットフォームを基盤とした各種表面における生体応答の特異的挙動の系統的な解析をもとにして、動的表面における生体応答の特異性の本質を明らかにし、表面分子運動性による生体制御を目指している。これにより最終的には、表面における分子運動性パラメーターを整理して、各種生体反応を理解する学理を構築することを目的としている。

昨年度までに由井グループでは、ポリロタキサンおよび水溶性ポリマーのループあるいはグラフト状表面を作製し、ポリロタキサン・ループ表面が血液凝固に重要な役割を演じるフィブリンノーゲンの吸着を著しく抑制することを明らかにしてきた。また簡便にポリロタキサン・ループ構造を構築する方法として、ポリロタキサン・ブロック共重合体の合成とそのキャストについて検討してきた。石原グループでは、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てきた。山岡グループでは、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てきた。岸田グループでは、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てきた。

こうした研究成果をもとにして本年度は、各グループが確立した研究基盤を活かした連携を強力に推進し、最終年度である次年度にむけて目的達成のためのフレームワークをほぼ完了するとともに、表面分子運動性と非特異的生体認識との関係を明らかにすることができた。以下には、その概略を説明する。

由井グループでは、ポリロタキサンを基盤とした動的表面の生体非認識・非特異的および特異的認識ラインナップの構築を完了した¹⁻⁶⁾。非認識・非特異的認識ラインナップについては OMe 基を導入したポリロタキサン・ブロック共重合体から調製した表面、特異的認識ラインナップについてはアジド化ポリロタキサン・ブロック共重合体にクリック反応により RGD ペプチドを導入して調製した表面に関するプロトコルを完成し、それらのタンパク質および細胞レベルでの生体応答について山岡グループと連携して解析した。とりわけ、OMe 化ポリロタキサンでは 50% 程度の低 OMe 化によりフィブリノーゲン吸着を著しく抑制する生体非認識表面の構築が可能であり^{5,6)}、90% 以上の高 OMe 化によって非特異的生体認識表面の構築が可能であることを示した⁷⁾。すなわち、高 OMe 化ポリロタキサンの表面は動的な環境を構築することで従来の非特異的相互作用による生体認識表面とは異なり、表面吸着タンパク質のコンフォーメーション変化を著しく低減し、生体防御反応(血液凝固反応に至るフィブリノーゲン変性や血小板粘着)を回避しつつ組織再生及び細胞分化に相応しい環境を提供できることが認められた⁷⁾。また、石原グループと連携して、水中と空気中での接触角の差(接触角ヒステリシス)が QCM-D 測定における質量増加に対するエネルギー損失量の割合($\Delta D / \Delta f$)より求めた分子運動因子(Mf)と相関することがわかった^{5,7)}。こうした検討により、表面分子運動性と吸着タンパク質のコンフォーメーション変化の低減とのあいだに良好な相関性を見だし、バイオマテリアル表面での非特異的生体認識を制御する上で分子運動性が重要なパラメーターであることを定量的に明らかにすることに世界で初めて成功した。更には、高原 ERATO グループとの連携によってポリロタキサン表面の誘電緩和測定を実施して上記の Mf との関連性を検討し、表面の分子運動性をより多角的に解析する方法論の確立を目指した。一方では、CD 数や OMe 化度の異なるポリロタキサン・ブロック共重合体を種々合成して表面分子運動性と非特異的生体認識とを詳細に解析し、表面分子運動性および生体応答を規定するバイオマテリアル表面の分子運動性を規定する構造パラメーターに関する検討を継続した。

石原グループでは、ポリマーのナノ構造制御と分子ナノ構築を基盤として表面の創製と解析を行い、タンパク質吸着と細胞の初期接着に関連した研究を実施した^{8, 9, 13, 14)}。界面におけるナノ構造解析法として、ポリマー鎖近傍の水の動きに関して、核磁気共鳴法を利用して解析手法を確立した。これにより、ポリマーブラシ近傍の水和層の厚さと水の拡散係数が、ポリマー鎖の化学構造に依存することを見いだした。また、ポリマーブラシ表面でのタンパク質の吸着力を、原子間力顕微鏡を利用して直接測定に成功し、先の水和層での水の拡散係数との間に相関があることを見いだした。これは、タンパク質の初期吸着に水の構造が関与していることを明確に示した世界初の成果である。また、タンパク質が吸着する表面において、タンパク質の構造変化が進行すると、劇的にタンパク質吸着力が高まることを見いだした。すなわち、従来提唱していた表面近傍の水の運動性に関連したタンパク質の接触、吸着過程に与える表面の水和状態、タンパク質の構造変化に伴う

接着促進という一連のタンパク質吸着の過程を実証することができた^{8, 13, 14}。この知見に関連して、高原 ERATO グループとの共同研究で、ポリマーブラシ鎖の水和状態の解析を行い、ホスホリルコリン基を有するポリマーブラシ鎖の水中への伸張状態は、他と異なり生体環境のイオン強度の影響を受けないことを実証した¹⁵。さらに、タンパク質の官能基が形成するドメイン構造に着目し、各種官能基とポリマーブラシ表面との間に作用する相互作用力を定量的に評価することで、ポリマーブラシ表面の有する高いタンパク質吸着抑制効果が、官能基との非常に弱い相互作用力に起因することを明らかとした。また、表面に露出する官能基の効果を検証し、初期生体反応に与える効果を詳細に検討した^{10, 11, 12, 16}。これらを総合して、先端医療や細胞工学に利用するデバイスの表面に求められる性質を示すとともに、これを得るための方法論の提案に結びつけた^{11, 13, 14, 16}。

山岡グループでは、由井・石原グループにより構築された動的表面の生体非認識・非特異的認識ラインナップ上での生体応答に関する研究を推進した。ヒト血漿タンパク質を変性させることなく多く吸着する高 OMe 化ポリロタキサン表面に対しては、ヒト血小板粘着の顕著な抑制が確認され、新たな抗血栓性発現システムの構築が可能となった。また、動的な非特異的界面上で培養されたヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) は、柔軟なヒドロゲル上で確認されている細胞骨格と酷似した形態を呈し、バイオマテリアル表面の動的特性により細胞の機能を制御出来ることが示された¹⁷。近年、材料の弾性率が細胞機能と分化に与えるメカニカルキューが注目されているが、マテリアルと細胞との界面の動的特性こそが、本質的なパラメーターであると考えられる。更に、細胞の動的挙動に追従できるこれらの界面は、自己拍動心筋細胞に分化することが知られている P19CL6 の分化効率を飛躍的に向上させることも明らかにした。また、従来バイオイナートとして検討が進められてきた材料群に対するラット皮下での生体応答について遺伝子チップを用いた網羅的解析を進め、特定の遺伝子を活性化することで生体応答を能動的に抑制している可能性を見出した。一方で、さまざまなペプチド配列による機能性発現も確認された^{18, 19}。由井グループで作製した細胞接着ドメインを動的に固定化した RGD 導入ポリロタキサン表面は、血清無添加の培養系であっても、天然のコラーゲンと同様の細胞接着性と細胞骨格形成性を示すことを明らかにした。このように、動的界面に対する血小板・血管内皮細胞・心筋細胞・炎症系細胞の応答を *in vitro*・*in vivo* で解析するシステムを構築した。

岸田グループでは、高分子と生体組織の接合について系統的な検討を実施した。生体組織を構成するコラーゲン分子の集合化を制御する技術の構築を行い、コラーゲン溶液の濃度、pH、塩強度等の因子を連続的に変化させることで、生体組織に類似した繊維製マトリクスを得ることができた^{20, 22}。この際の条件を用いて、ポリロタキサンで構成された動的界面上でコラーゲン繊維形成挙動を原子間力顕微鏡および QCM-D で観察し、コラーゲン分子と動的界面上の分子の混合・相分離について検討を行った結果、動的界面上でのコラーゲンと高分子間の分子混合と思われる結果を得ることができた。また、エネルギー付与による生体と人工材料の接合について、エネルギー付与時の物理的刺激が生体に与える影響を考察した²¹。付与エネルギーを接着に必要な最小限に抑えることによって、炎症が回避され、速やかな治癒が生じることを見いだした²⁵。さらに生体由来組織を用い、組織変性を抑制すると生体内で機能が発現することが明らかとなった^{23, 24}。これらの

結果より、生体に適合するバイオマテリアルを開発するためには、移植する際の炎症反応を制御する技術が必要であることが示唆された。

本年度上半期には東日本大震災の影響により研究遂行の困難な状況に幾度となく遭遇したが、適宜適切な追加予算配賦の効果的な活用と各グループの研究基盤を活かした積極的な連携により、下半期には多くの研究成果へと結実させることができた。今後は、各種動的表面における非特異的および特異的生体応答をタンパク質・細胞・組織レベルで解析することによってバイオマテリアル表面における分子運動性の本質を理解し、これまでのバイオマテリアル-生体界面での相互作用に関する知見と包括し、生体応答全般に亘って調節できる新たな表面設計の学理を構築していく予定である。最終的には、それら知見をまとめてナノバイオ界面に関する教科書作成の礎を築いていきたいと考えている。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. Hoon Hyun, and Nobuhiko Yui, “Ligand accessibility to receptor binding sites enhanced by movable polyrotaxanes”, *Macromol. Biosci.* 11, 765-771, 2011. (doi:10.1002/mabi.201000507)
2. Tomo Ehashi, Hoon Hyun, and Nobuhiko Yui, “Anti-inflammatory response of mannose-conjugated polyrotaxane endocytosed by macrophage“, *Macromol. Res.* 19, 495-500, 2011. (doi:10.1007/s13233-011-0506-8)
3. Yuichiro Kobayashi, Ryo Katoono, Masayuki Yamaguchi, and Nobuhiko Yui, “Modulation of reversible self-assembling of dumbbell-shaped poly(ethylene glycol)s and β -cyclodextrins: precipitation and heat-induced supramolecular crosslinking“, *Polym. J.* 43, 893-900, 2011. (doi:10.1038/pj.2011.71)
4. Ryo Katoono, Yuichiro Kobayashi, Masayuki Yamaguchi, and Nobuhiko Yui, “Heat-induced supramolecular crosslinking of dumbbell-shaped PEG with β -CD dimer based on reversible loose-fit rotaxanation“, *Macromol. Chem. Phys.* 212(3), 211-215, 2011. (doi:10.1002/macp.201000548)
5. Yuuki Inoue, Lin Ye, Kazuhiko Ishihara, and Nobuhiko Yui, “Preparation and surface properties of polyrotaxane-containing tri-block copolymers as a design for dynamic biomaterials surfaces“, *Colloid. Surf. B: Biointerface* 89(1), 223-227, 2012. (doi:10.1016/j.colsurfb.2011.09.020)
6. Ko Yamada, Ryo Katoono, and Nobuhiko Yui, “Controlled loop and graft formations of water-soluble polymers on SAM for the design of biomaterials surfaces“, *Polym. J.* 44, 286-293, 2012. (doi:10.1038/pj.2011.130)
7. Ji-Hun Seo, Sachiro Kakinoki, Yuuki Inoue, Tetsuji Yamaoka, Kazuhiko Ishihara, and Nobuhiko Yui, “Designing dynamic surfaces for regulation of biological responses”, *Soft Matter* 8, in press, 2012. (doi: 10.1039/c2sm25318f)
8. Ye Yao, Kyoko Fukazawa, Nan Huang, and Kazuhiko Ishihara, “Effects of 3,4-dihydrophenyl groups in water-soluble phospholipid polymer on stable surface modification of titanium alloy”, *Colloid Surf. B: Biointerface*, 88(1), 215-220, 2011. (doi:10.1016/j.colsurfb.2011.06.034)
9. Ye Yao, Kyoko Fukazawa, Nan Huang, and Kazuhiko Ishihara, “Bioinspired phospholipid polymer for improvement of biofouling on titanium alloy substrate”, *Trans. Mater. Res. Soc. Jan*, 36(4), 573-576, 2011. (doi: No data)

10. Kimiaki Takami, Ryosuke Matsuno, and Kazuhiko Ishihara, "Synthesis of polyurethanes by polyaddition using diol compounds with methacrylate-derived functional groups", *Polymer*, 52(24), 5445-5451, 2011. (doi:10.1016/j.polymer.2011.09.037)
11. Kazuhiko Ishihara, Yusuke Goto, Ryosuke Matsuno, Yuuki Inoue, and Tomohiro Konno, "Novel polymer biomaterials and interfaces inspired from cell membrane functions", *Biochim Biophys Acta-General*, 1810(3), 268-275, 2011. (doi:10.1016/j.bbagen.2010.04.008)
12. Ryosuke Matsuno, and Kazuhiko Ishihara, "Integrated functional nanocolloids covered with artificial cell membranes for biomedical applications", *Nano Today*, 6(1), 61-74, 2011. (doi:10.1016/j.nantod.2010.12.009)
13. Jiyeon Choi, Tomohiro Konno, Madoka Takai and Kazuhiko Ishihara, "Regulation of cell proliferation by multilayered phospholipid polymer hydrogel through controlled release of bioactive agent", *Biomaterials*, 33(3), 954-961, 2012. (doi:10.1016/j.biomaterials.2011.10.006)
14. Ye Yao, Kyoko Fukazawa, Wenyong Ma, Kazuhiko Ishihara, and Nan Huang, "Platelet adhesion-resistance of titanium substrate with mussel-inspired adhesive polymer bearing phosphorylcholine group", *Appl. Surf. Sci.*, 258(14), 5418-5423, 2012. (doi:10.1016/j.apsusc.2012.02.027)
15. Moriya Kikuchi, Yuki Terayama, Tatsuya Ishikawa, Taiki Hoshino, Motoyasu Kobayashi, Hiroki Ogawa, Hiroyasu Masunaga, Jun-ichiro Koike, Misao Horigome, and Kazuhiko Ishihara, Atsushi Takahara, "Chain dimension of polyampholytes in solution and immobilized brush states", *Polym. J.*, 44(1), 121-130, 2012. (doi:10.1038/pj.2011.116)
16. Kazuhiko Ishihara, Yan Xu, and Tomohiro Konno, "Cytocompatible hydrogel composed of phospholipid polymers for regulation of cell functions", *Adv. Polym. Sci.*, 247, 141-166, 2012. (doi:10.1007./12_2011_151)
17. Tetsuji Yamaoka, and Atsushi Mahara, "Cell rolling column in purification and differentiation analysis of stem cells", *React. Funct. Polym.*, 71, 362-366, 2011. (doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2010.11.019)
18. Sachiro Kakinoki, Sho Uchida, Tomo Ehashi, Akira Murakami, and Tetsuji Yamaoka, "Surface modification of poly(L-lactic acid) nanofiber with oligo(D-lactic acid)-bioactive-peptide conjugates for peripheral nerve regeneration", *Polymers*, 3(2), 820-832, 2011. (doi:10.3390/polym3020820)
19. Tomoko Hashimoto, Takeshi Kawazu, Takeshi Nagasaki, Akira Murakami and Tetsuji Yamaoka, "Quantitative comparison between poly(L-arginine) and

- poly(L-lysine) at each step of polyplex-based gene transfection using a microinjection technique”, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, in press, 2012. (doi:10.1088/1468-6996/13/1/015009)
20. Kwangwoo Nam, Yuuki Sakai, Yoshihide Hashimoto, Tsuyoshi Kimura, and Akio Kishida, “Fabrication of a heterostructural fibrillated collagen matrix for the regeneration of soft tissue function”, *Soft Matter*, 8, 472-480, 2012. (doi: 10.1039/C1SM06543B)
 21. Yukiko Ito, Tsuyoshi Kimura, Yusuke Ago, Kwangwoo Nam, Kaori Hiraku, Kozo Miyazaki, Toru Masuzawa, and Akio Kishida, “Nano-vibration effect on cell adhesion and its shape”, *Bio-Medical Materials and Engineering*, 21(3), 149-158, 2011. (doi: 10.3233/BME-2011-0664)
 22. Kwangwoo Nam, Yuuki Sakai, Seiichi Funamoto, Tsuyoshi Kimura, and Akio Kishida, “Engineering a Collagen Matrix that Replicates the Biological Properties of Native Extracellular Matrix”, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 22(15), 1963-1982, 2011. (doi: 10.1163/092050610X529182)
 23. Jun Negishi, Seiichi Funamoto, Tsuyoshi Kimura, Kwangwoo Nam, Tetsuya Higami, and Akio Kishida, “Effect of treatment temperature on collagen structures of the decellularized carotid artery using high hydrostatic pressure”, *Journal of Artificial Organs*, 14(3): 223-231, 2011. (doi: 10.1007/s10047-011-0570-z)
 24. Yoshihide Hashimoto, Seiichi Funamoto, Tsuyoshi Kimura, Kwangwoo Nam, Toshiya Fujisato, and Akio Kishida, “The effect of decellularized bone/bone marrow produced by high-hydrostatic pressurization on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells”, *Biomaterials*, 32(29), 7060-7067, 2011 (doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.06.008)
 25. Kenji Yamamoto, Tsuyoshi Kimura, Kwangwoo Nam, Seiichi Funamoto, Yukiko Ito, Kumiko Shiba, Ayako Kato, Shigeru Shimizu, Kimio Kurita, Tetsuya Higami, Toru Masuzawa, and Akio Kishida, “Synthetic polymer-tissue adhesion using an ultrasonic scalpel”, *Surgical Endoscopy*, 25, 1270-1275, 2011. (doi: 10.1007/s00464-010-1357-7)