



Title	生体高分子薄膜による細胞表面の機能制御と三次元組織体の構築
Author(s)	松崎, 典弥; 明石, 満
Citation	表面. 2013, 51(4), p. 1-11
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/50815
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

生体高分子薄膜による細胞表面の機能制御と 三次元組織体の構築*

松崎 典弥*, 明石 満*

1. はじめに

細胞の性質を理解し、材料表面への細胞の接着・非接着性を制御することは、バイオマテリアルや人工臓器の開発において重要であり、現在でも大きな課題の一つである。最近では、基材表面の硬さ・柔らかさが細胞の接着性だけでなく幹細胞の分化誘導にも大きく影響を与えることが報告されており¹⁾、表面の化学的性質だけでなく物理的性質の重要性が明らかにされつつある。このように、材料-細胞間の相互作用を理解することは、人工臓器の表面設計や再生医療の足場材料の設計に大変重要である。さらに、材料-細胞間の相互作用だけでなく、細胞-細胞間の相互作用を制御できれば、細胞機能の高発現や細胞の三次元組織化が可能となり、生体組織に類似の三次元構造と機能を併せ持つ生体組織モデルの構築が期待される。

本稿では、材料表面への細胞の接着、細胞外マトリックスと細胞の関係、さらに、細胞-細胞間の

接着制御による三次元組織化(積層化)について、著者らの研究を中心にまとめた。いくつかの書籍が材料と細胞の基本的な相互作用を解説しているため²⁾、詳細はそちらを参照されたい。

2. 細胞の接着とは

生体内では、細胞は細胞外マトリックス (ECM) に接着している。バイオマテリアル表面へ細胞が接着する際に重要となるのが、ECM の中でも接着性タンパク質と呼ばれるタンパク質である。細胞は材料表面に直接接着することはなく、材料表面に吸着した接着性タンパク質との相互作用により材料表面へ接着する³⁾。図 1 は、材料表面への細胞接着と増殖のイメージを示した。まず、培養液に含まれる接着性タンパク質が材料表面に吸着し、そのタンパク質に細胞が接触する。その後、細胞はタンパク質と相互作用をして、接着・伸展・増殖のプロセスに入る。細胞接着性タンパク質として重要なのがフィブロネクチン (FN) やラミニン、コラーゲンなどのタンパク質である。FN はアルギニン-グリシン-アスパラギン (RGD) のアミノ酸配列部位を有しており、このサイトを通して細胞膜タンパク質である $\alpha_5\beta_1$ インテグリンと相互作用することが知られている。従って、材料表面の性質を細胞接着性および非接着性に制御するためには、FN などの細胞接着性タンパ

* Functional Control of Cell Surfaces and Development of Three-dimensional Tissues Using Biopolymer Films

* Michiya MATSUSAKI and Mitsuru AKASHI 大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻
Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University
(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1)

Key words : Cell Surface, Layer-by-Layer Assembly, Biopolymers, Nanofilms, Three-dimensional Tissues

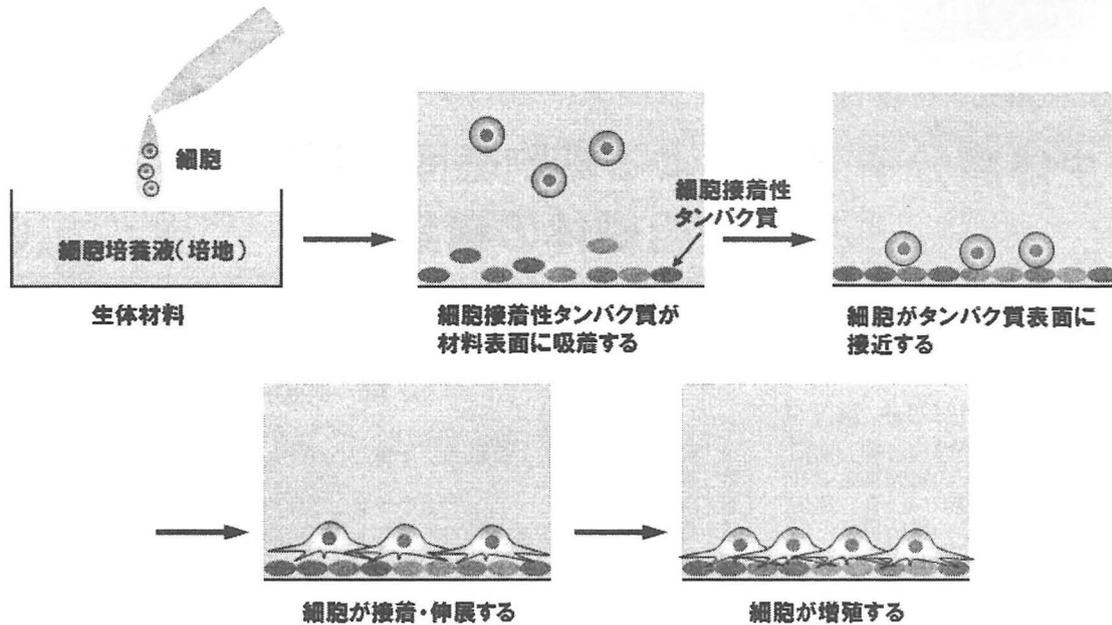


図1 生体材料表面への細胞接着のイメージ

ク質の吸着特性を制御することが重要である。

材料表面の親水性や疎水性、電荷は、細胞接着と密接に関係していることが知られている。有馬らは、異なる末端官能基を有するアルカンチオールを用いて調製した自己組織化単分子膜表面への細胞接着を経時的に評価した⁴⁾。疎水性のメチル(CH₃)基表面では細胞の接近は見られるが接着はほとんど起こらないのに対して、正電荷を有するアミノ(NH₃⁺)基や負電荷を有するカルボキシル(COO⁻)基表面では30分後には多くの細胞が接着する様子が観察されている。一方、親水性で電荷を有していないOH基表面では、疎水性と電荷表面の中間の挙動をとることが明らかにされており、この官能基の違いと細胞接着の関係には、やはりFNなどの細胞接着性タンパク質の吸着が関与している³⁾。

3. 交互積層法

生体材料には、表面の細胞接着性・非接着性だけでなく力学特性や成型加工性も求められる。そこで、材料の基本的な物性を変えずに表面の細

胞接着性のみを制御する手法が重要となる。このような表面改質法として、Langmuir-Blodgett (LB) 法やアルカンチオールの単分子膜作製などが用いられてきたが、特殊な装置が必要であり、材料の適応範囲も限定的であった。近年、簡便かつ精密な表面改質法として交互積層法 (Layer-by-Layer: LbL 法) が注目されている。交互積層法は、相互作用を有する2種類の溶液に材料を交互に浸漬するだけで薄膜を調製できる手法であり、ナノレベルでの膜厚制御が可能である(図2)^{5), 6)}。また、基板の形態に限定されないため、バルク材料やフィルム、粒子、カーボンナノチューブなど、様々な材料表面に適用できる。これまで、静電的相互作用で形成されたLbL薄膜の膜厚や電荷、構造に対する細胞接着性、増殖性、分化誘導の関係が報告されている。簡単にまとめると、正電荷および負電荷を有する最外層において高い細胞接着性や増殖性が報告されている。つまり、LbL法を用いることで、浸漬する高分子の性質に依存して材料表面の性質を自在に制御することが可能である。しかし、例えば正電荷のNH₃⁺基を有する高分子を細胞培養液に添加すると、負

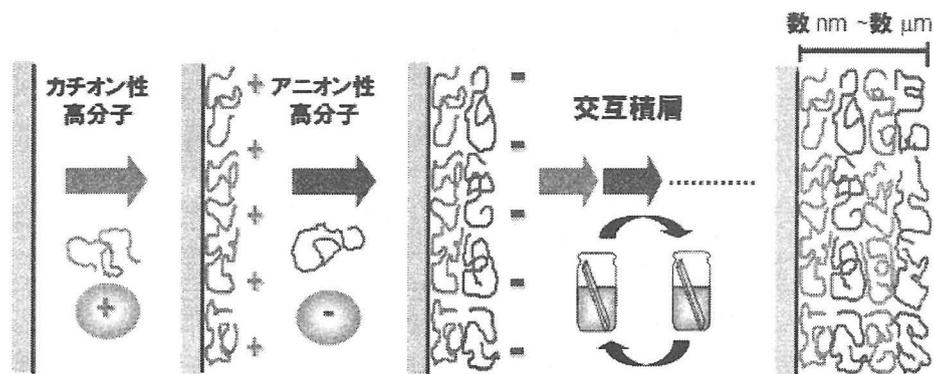


図2 交互積層法のイメージ

電荷の細胞膜に非特異的に吸着・凝集して細胞膜を破壊し、高い細胞毒性が発現することも知られている。つまり、これまでの議論は、材料表面と接着性タンパク質の相互作用に依存して細胞接着性が評価されており、高分子材料が細胞表面に直接吸着した場合とは大きく異なることに注意が必要である。

4. 薄膜への細胞接着と細胞表面への薄膜の形成の違い

著者らは、細胞と材料の相互作用を直接的に評価するため、基板表面に接着した細胞膜表面に直接交互積層ナノ薄膜を形成し、生存率や形態、増殖、炎症惹起への影響を評価した^{7), 8)}。これまで、様々な研究者により、赤血球や血小板、酵母菌や細菌表面への交互積層薄膜の形成が報告されており、著者らも線維芽細胞表面への細胞接着性タンパク質であるFNとゼラチンの薄膜(FN-G薄膜)形成を報告している⁹⁾。そこで、溶液では毒性を発現しない濃度で細胞表面に交互積層ナノ薄膜を形成した。その結果、高分子電解質の薄膜では膜厚の増加に伴って細胞毒性が発現し、細胞の伸展や増殖は観察されなかった。また、炎症性タンパク質であるインターロイキン6(IL-6)の産生量が増加することも確認された。

一方、FNとの特異的相互作用があるFN-G薄膜やFN-デキストラン硫酸薄膜(FN-DS薄膜)の場合、良好な伸展形態と高い増殖性が観察され、細胞毒性は全く無く、IL-6の産生量に変化はなかった。これらの原因は、高分子の電荷に起因すると考えられる。高分子電解質薄膜の場合、正電荷の高分子が薄膜形成により濃縮されることで細胞膜と強く相互作用し、細胞毒性が発現したと考えられる。一方、FN-GやFN-DS薄膜の場合、双方とも中性緩衝液中で負電荷を有しているため細胞毒性は全く発現しなかったと推察される。これらの結果は、正電荷を有する表面は細胞接着性に優れている、という材料表面への細胞接着とは異なる結果である。薄膜表面への細胞接着と細胞表面への薄膜形成のまとめを図3に示した。細胞表面にナノ薄膜を形成すると、細胞膜は薄膜と直接接触するため正電荷の影響を強く受けるが、薄膜への細胞接着の場合はタンパク質を介した接着であるため直接的に正電荷と接触することはなく、細胞へのダメージは発現しないと考えられる。従って、同じ交互積層薄膜であっても、細胞の上か下か、直接接触か間接触かで細胞への影響は大きく異なるため、生体材料を設計する上で細胞との接触を考慮することは大変重要である。

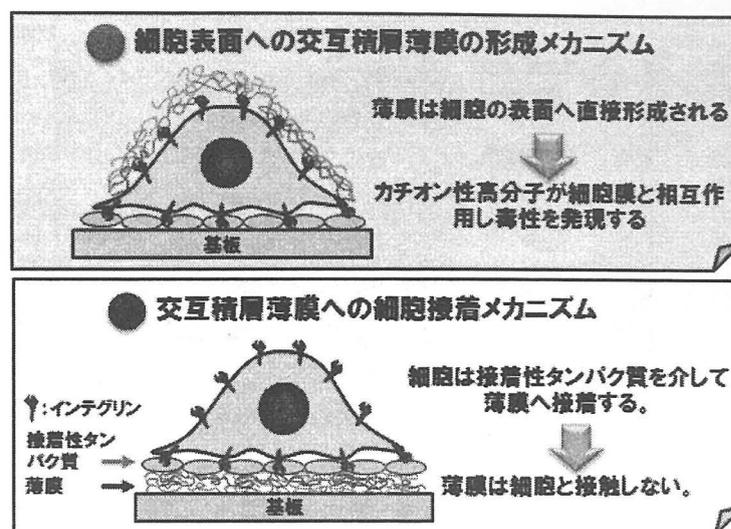


図3 細胞表面および下部の薄膜と細胞の関係

5. 細胞表面での生体高分子薄膜の形態変化

細胞表面に形成した薄膜がどのような形態をしているか観察するため、ローダミンラベル化 FN (Rh-FN) と FITC ラベル化 G (FITC-G) を用いて細胞表面へ 21 nm の薄膜を調製し、蛍光顕微鏡により経時的に観察した。薄膜調製直後は細胞表面に均一に蛍光が観察され、薄膜の存在が示唆されたが、24 時間培養後には線維状の形態が観察された。この線維は FN と G の両成分から構成されていることが重ね画像から示唆され、また、走査型電子顕微鏡観察より、直径約 160 nm、長さ数 μm のナノファイバーであることが確認された。さらに、このナノファイバーは、細胞骨格であるアクチン繊維の配向と同じ配向を示していることがアクチンの蛍光染色より明らかとなった。これまで、細胞が膜表面へ産出した FN は形成から約 6~12 時間後に細胞内のアクチン繊維との相互作用によりアクチンの配向に沿って線維化され、コラーゲン等と会合することで ECM 線維を形成することが報告されている¹⁰⁾。しかし、人工的に ECM 線維を作製して細

胞と複合化させることは困難であった。このナノ薄膜の線維化は FN-DS 薄膜においても確認されているため、FN の結合ドメインと相互作用する成分であればタンパク質や糖鎖を問わず複合化して ECM 様の線維を細胞表面に形成できることが示された。一方、FN を用いた場合でも、静電的相互作用を駆動力とした薄膜の場合は線維形成が観察されなかった⁷⁾。このことは、FN の結合ドメインを介した相互作用が人工 ECM として機能するために重要であることを示唆している。

興味深いのはナノ薄膜からナノファイバーへの形態変化であるが、ナノファイバーの配向がアクチン繊維と相関していたことから、細胞が産出した FN と同様の機構だと考えている。つまり、薄膜形成後、アクチン繊維がインテグリン分子を介して薄膜内の FN に張力をかけることで FN の線維化が開始され、FN と G や DS が複合化した線維が形成されたと推察される。これらの結果は、細胞の界面をナノ薄膜により制御し、人工的に ECM 線維を細胞と複合化して作製した初めての例である⁷⁾。

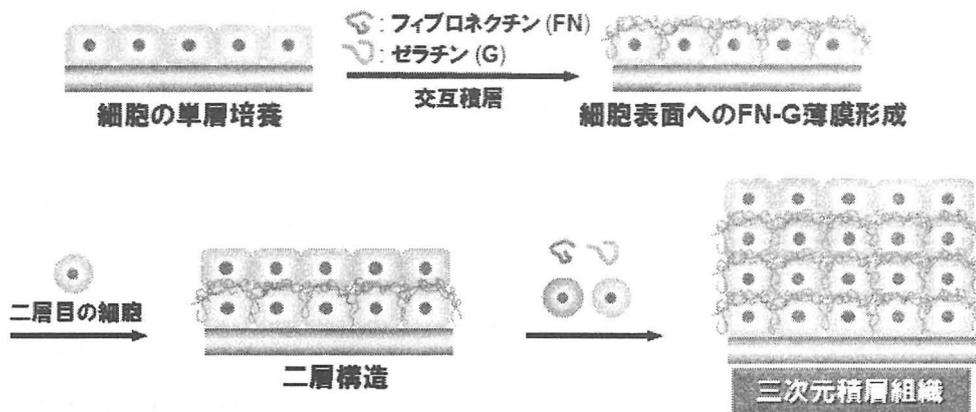


図 4 細胞積層法のイメージ

6. 細胞積層法

生体組織は、様々な細胞と ECM で構成される高度に組織化された三次元の複合構造体である。生体外で三次元組織体を構築するためには、各種細胞の三次元配置を制御して組織化する工学的な細胞操作，“組織工学”技術が必要不可欠である。生体組織中の ECM は単に細胞間隙を埋めるタンパク質ではなく、細胞の機能を制御する重要な役割を担っている。特に、コラーゲンや FN、ラミニンなどの ECM 成分は、細胞膜のインテグリンと結合することで細胞接着や遊走、増殖を誘導するだけでなく、細胞死にも関係している。従って、細胞を用いて三次元組織体を形成するためには ECM 成分が必要不可欠である。通常の細胞培養法では、自発的な三次元構造形成を誘起するほど大量の ECM は産生されず、また、細胞の接触阻害機能のため単層構造しか得ることができない。さらに、細胞回収時のトリプシン酵素処理により、細胞表面の ECM の多くは分解されている。

そこで、著者らは、単層の細胞表面へ ECM 成分のナノ薄膜を形成し、次層の細胞の接着足場を提供することで、細胞の三次元構造体を形成できると考えた。つまり、細胞の表面に ECM の“ナノ

レベルののりづけ”をつくることで細胞を 1 層ずつ積み上げる手法である（細胞積層法，図 4）⁹⁾。細胞表面へ ECM 薄膜を形成する手法として、著者らは、ナノメートルオーダーで高分子薄膜を調製できる LbL 法を用いた。FN-G 薄膜をおよそ 6 nm の膜厚で細胞表面に形成すると、二層目の細胞が接着した。FN は細胞表面の $\alpha_5\beta_1$ インテグリンやコラーゲン、ゼラチンとの相互作用ドメインを有しているため、わずか 6 nm という膜厚でも細胞接着足場として機能したと考えられる。一方、薄膜を形成しない場合や膜厚が薄い場合、均一な二層構造は得られなかった。また、10 nm 以上の薄膜でも同様の効果が確認されたため、少なくとも 6 nm 以上の FN-G 薄膜が次層の細胞接着の足場として重要であることが明らかとなった。詳細は割愛させて頂くが、本細胞積層法を用いることで、線維芽細胞や筋芽細胞、血管平滑筋細胞、心筋細胞など、様々な細胞を望みの層へ積層化することが可能であり、得られた積層組織は、ピンセットを用いて容易に基板から剥離回収することができた（図 5）。また、積層化することでストレスタンパク質や炎症性サイトカインの発現量が軽減されたため、ECM と細胞に周囲を囲まれた“より生体に近い微小環境”を再現できたと考えられる。

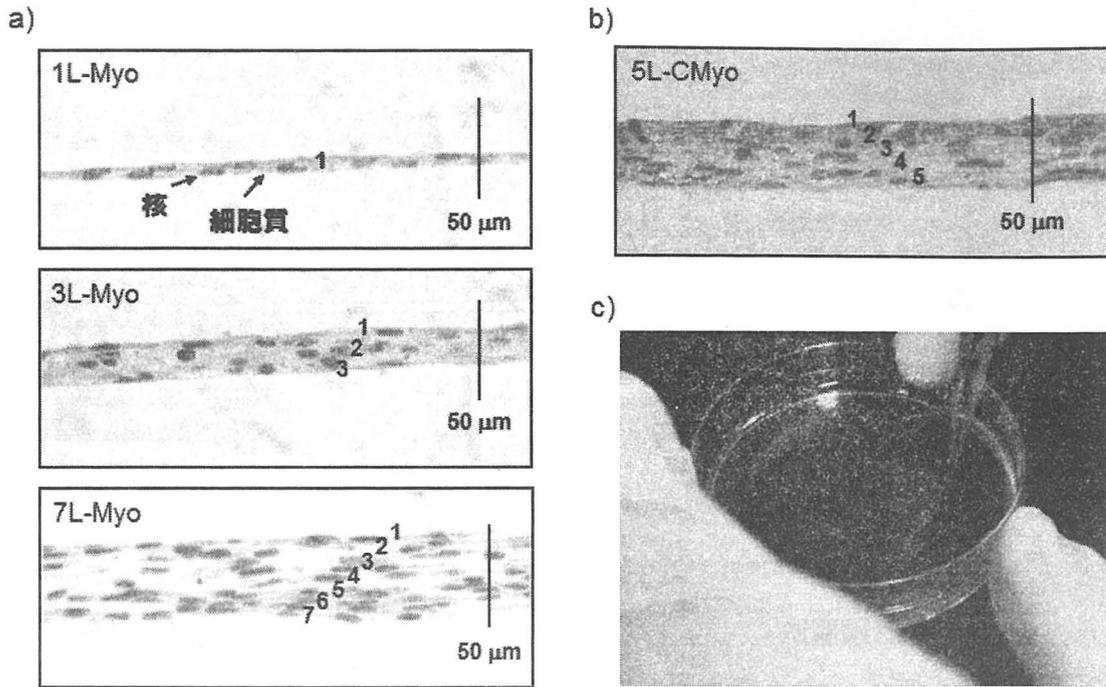


図5 (a) マウス C2C12 筋芽細胞 (Myo) の 1, 3, 7 層構造のヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色組織切片写真。(b) ラット初代心筋細胞 (CMyo) の 5 層構造の HE 染色写真。(c) 4 層のマウス L929 線維芽細胞組織をピンセットで基盤から剥離している様子

7. 積層組織体の安定性

積層組織がいつまで安定に構造を維持できるか明らかにするため、初代細胞である正常ヒト皮膚由来線維芽細胞 (NHDF) と株化細胞であるマウス L929 線維芽細胞を用いて 1, 3, 5 層の構造を作製し、最大 4 週間培養した¹¹⁾。興味深いことに、NHDF の積層構造は 4 週間後においても層数および細胞数がほぼ一定に保たれていたが、L929 細胞の場合、培養時間に伴い構造が不均一に隆起し、細胞数も無秩序に増加する結果となった。これは、初代細胞と株化細胞の性質の違いに起因すると考えられる。初代細胞の場合、お互いが接触すると接触阻害により増殖が停止するが、株化細胞の多くはこの機能が失われており、がん細胞と同様に際限なく増殖する。この性質の違いにより、構造安定性が全く異なる結果を示したと推察される。従って、積層組織を作製する場合は

初代細胞を用いることが重要である。

また、三次元の積層構造と二次元の単層構造が細胞機能に与える影響を評価した¹²⁾。通常、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) は、専用培地 (血管内皮増殖培地 (EGM) など) を用いなければ安定に培養することができない。しかし、4 層の NHDF 構造の上に HUVEC を積層して培養することで、一般的なダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) でも安定に培養できることを見出した。この効果は単層の NHDF では全く確認されなかった。さらに、IL-6 の産生量を比較すると、4 層の NHDF 構造の上で培養することで、単層や通常の培養容器と比較して産生量が半分以下に低下することが明らかとなった。また、ストレスを受けた時に産生されるヒートショックタンパク質 (HSP) の産生量を比較すると、驚くべきことに 4 層構造では通常の培養容器の 1/10 に減少することが確認された。通常の培養容器はプラス

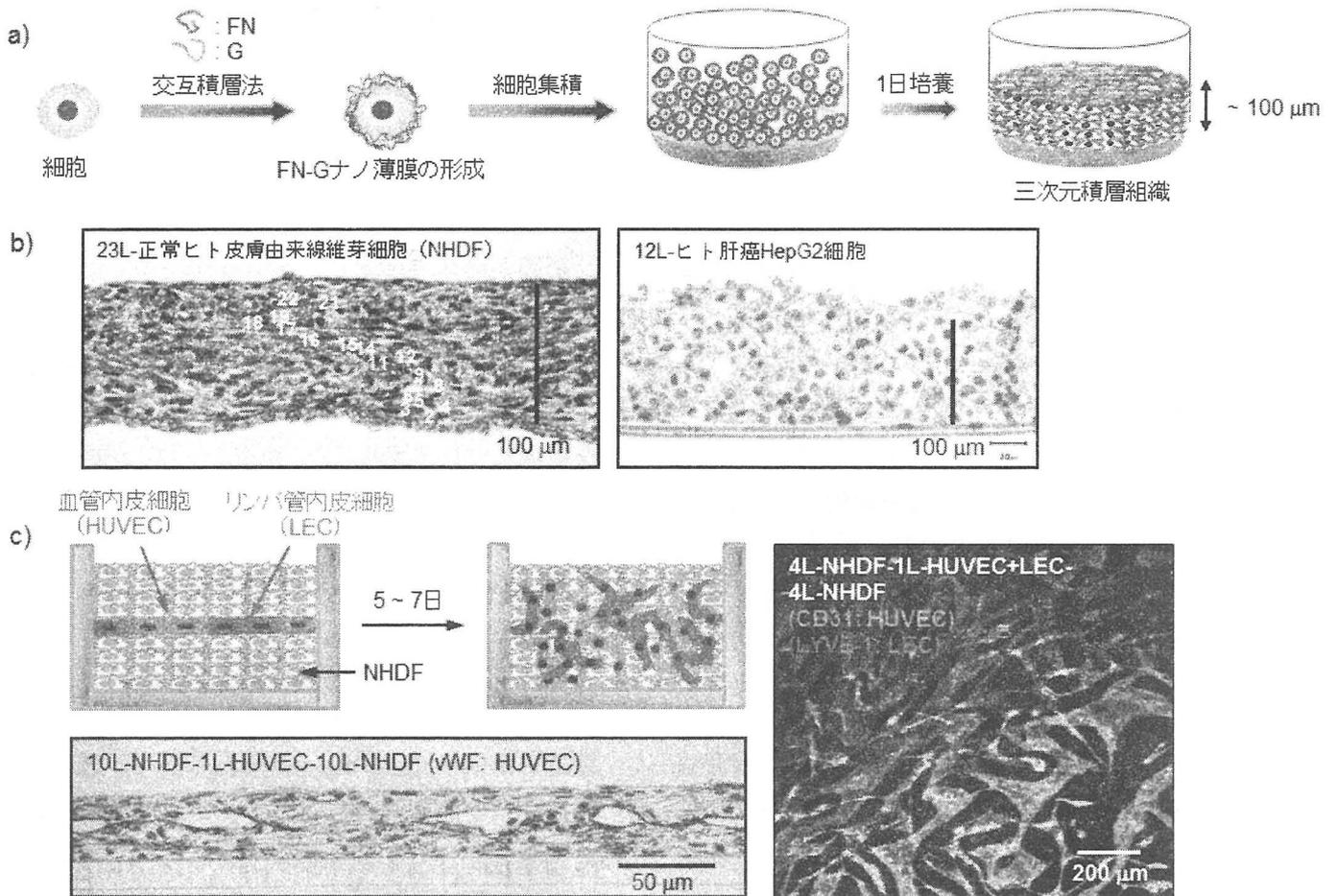


図 6 a) 細胞集積法のイメージ。b) 細胞集積法で構築した三次元組織体の HE 染色による組織切片写真。c) HUVEC 及び LEC の積層培養のイメージ (左) と蛍光免疫染色による共焦点レーザー顕微鏡イメージ (右)。HUVEC (緑) と LEC (赤) がそれぞれ独立したネットワーク構造を形成。抗 vWF 抗体を用いて HUVEC を染色した HUVEC のみ積層培養後の組織切片写真 (左下)。

チックであり、生体内には存在しない物質であるため、炎症を惹起していたと考えられる。一方、積層構造では、ECM 成分である FN-G 薄膜と細胞のみで構成される生体類似の微小環境を細胞に提示するため、細胞にとって居心地の良い三次元環境であると考えている。

8. 細胞集積法

以上のように、細胞積層法は細胞の配置を一層ずつ制御して多層構造を構築できる画期的な手法であるが、各層の細胞が安定に接着するまで半

日ほど培養する必要がある、一日二層の作製が限度であった。例えば、10層の構造を作製するためには約5日必要である。より短期間で積層構造を構築できれば、幅広い応用展開が期待される。そこで、単一細胞表面に FN-G ナノ薄膜を形成することで、短期間で三次元組織体を構築できる“細胞集積法”を新たに考案した(図6)¹³⁾。各細胞が FN-G 薄膜を介して三次元的に相互作用することで、一度に多層構造が構築できると期待される。多孔質膜を介して下部から培地を供給できるセルカルチャーインサートを用いて実験を行った。約 6 nm の FN-G 薄膜を形成した細胞をセルカ

ルチャーインサートに播種し、24 時間培養後に組織切片を観察すると、およそ 8 層の三次元組織体が確認された。一方、薄膜を形成しない場合は空隙や凝集が観察され、均一な構造は得られなかった。これは、FN-G 薄膜が三次元的な細胞接着に機能したことを示している。インサートへの播種細胞数を制御することで得られる層数は制御可能であった。さらに、培地の量を増やすことで、細胞の種類に依存せず最大およそ 100 μm の組織体が得られた。

生体内には、およそ 100~200 μm に一本の毛細血管が存在することで栄養を供給している。そのため、100 μm 以上の組織体において内部細胞の壊死を防ぐためには、毛細血管網を構築する必要がある。そこで、我々は、細胞集積法を用いてヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) や皮膚微小リンパ管内皮細胞 (NHDLMEC) のサンドイッチ培養を行うことで、毛細血管だけでなくリンパ管の構築を検討した (図 6)。その結果、毛細血管およびリンパ管網が共存した三次元組織体を得ることに成功した¹³⁾。これらのネットワークは全体に均一に形成され、ネットワークが占める面積はおよそ 50~60%，チューブ間距離は 100~150 μm であり、現在、このネットワークの形態と生体の毛細血管やリンパ管との類似性・相違性を詳細に評価している。

以上より、細胞集積法を用いることで、より厚

く、かつ脈管構造を有する三次元組織体の短期構築を実現することができた。

9. インクジェットプリントを用いた三次元肝組織チップの作製

細胞積層法で構築した積層構造体を生体組織モデルとして薬剤応答評価に応用するためには、細胞種や層数が異なる組織モデルを大量に作製する必要がある。マイクロメートルサイズの様々な組織モデルを集約した「組織チップ」が構築できれば、医薬品評価において大変有効である。著者らは、ピコリットル (pL) オーダーで定量・定点配置が可能なインクジェットプリントに着目した。これまで、インクジェットプリントによる細胞のパターニングや高分子材料と細胞の複合三次元造形が報告されており、特にピエゾ式のインクジェットは発熱などの影響が無いため、高い生存率が得られることが知られている。そこで、細胞積層法の手法をピエゾ式のインクジェットに応用して実験に取り組んだ (図 7)¹⁴⁾。

プリンターヘッドの口径と吐出液滴数を変えることで、細胞の吐出数を 1 個から 10000 個まで精密に制御可能であった。また、どの吐出細胞数においても細胞生存率は 95% 以上と高く、また、NHDF, C2C12, HUVEC など細胞の種類を変えても生存率は 95% 以上であることが確認され

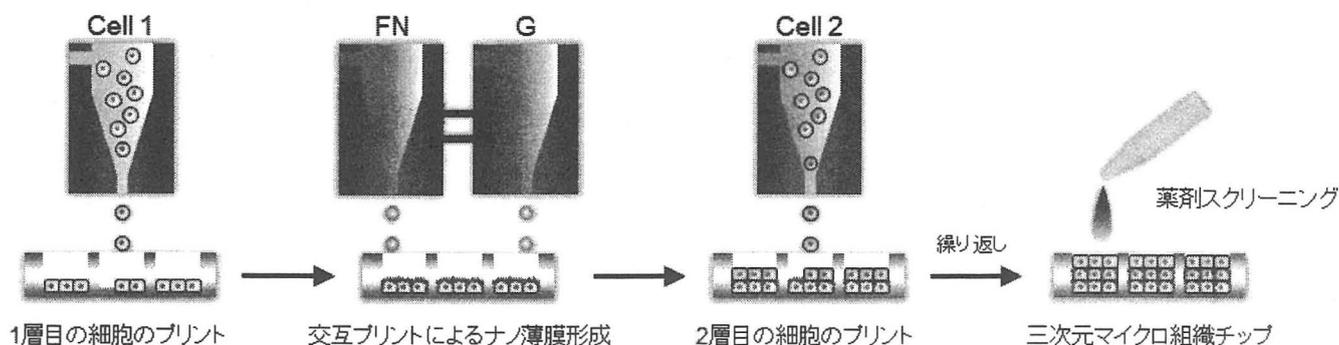


図 7 インクジェットプリントによる三次元組織チップの構築イメージ

た。細胞は自発的に移動するため、チップ化するためには細胞を空間に留める必要がある。そこで、直径 500 μm 、高さ 200 μm のウェルを 440 個有するウェル基板を用いた。このウェル基板へマウス C2C12 筋芽細胞を吐出して接着させ、FN 溶液と G 溶液を交互に吐出することで細胞表面にナノ薄膜を形成した。その後、再び筋芽細胞を吐出することで、筋芽細胞の 2 層構造を作製することができた。さらに、望みの場所に定量・定点配置できる特性を活かして、ある列だけ 1 層の HUVEC をさらに積層した 3 層構造にすることも容易に可能であった。

組織チップとして薬剤評価への応用を目的として、ヒト肝癌細胞 (HepG2) と HUVEC のヘテロ積層組織チップの作製に取り組んだ。肝臓は薬物や化合物を分解する重要な臓器であり、薬物毒性の 7 割は肝臓で発現するため医薬品開発では最も重要な臓器である。しかし、ヒト初代肝細胞は日本国内では入手困難であるため輸入する必要があり、また、継代培養ができないため高価な初代肝細胞を大量に購入して使用しているのが現状である。一方、HepG2 のように株化されて継代培養が可能な肝癌細胞も市販されているが、初代肝細胞と比較して代謝活性が激減している。従って、HepG2 細胞の機能を高めて初代肝細胞に近づけることができれば、薬剤評価に大変有用である。肝組織は肝細胞が血管に挟まれた三次元構造であるため、HepG2 を HUVEC で挟んだ積層構造を構築することで HepG2 の代謝活性の向上が期待される。そこで、HepG2 と HUVEC の 1-3 層構造を一枚のチップの中に作製して種々の活性を評価した (図 8)。肝細胞機能の指標となるアルブミン産生量を評価した結果、7 日間培養後において 3 層構造が 1 層構造と比較して 4 倍以上のアルブミンを産生することが明らかとなった。また、薬物代謝酵素の一種であるシトクロム P450 3A4 (CYP3A4) の産生量と活性を評価した結果、やはり 3 層構造が最も高い産生量と

代謝活性を有していることが確認された。そこで、実際に毒性がある薬物を用いて評価を行った。トログリタゾン (TGZ) は、インスリン抵抗性を軽減する糖尿病治療薬として市販されたが、肝障害が明らかとなり 2000 年に自主回収された薬剤である。その後の分析で、CYP3A4 で代謝された反応性代謝物が毒性を示すことが明らかとなった。そこで、CYP3A4 代謝活性が高いほど低濃度の TGZ で毒性が発現して死細胞数が増加するため、近年では CYP3A4 の薬物代謝活性試薬として用いられている。図 8e に、TGZ 濃度に対する 1-3 層構造の死細胞数変化のグラフを示した。3 層構造においてより低濃度でも死細胞が顕著に観察され、特に TGZ が 50 μM の場合、1 層構造では 16 % の死細胞割合であったのに対して 3 層構造では 60 % (約 4 倍) まで増加し、HUVEC で挟んだ 3 層構造にすることで HepG2 の薬物代謝活性が向上することが明らかとなった¹⁴⁾。

本三次元肝組織チップは、肝組織のハイスループトな薬効・毒性評価を可能とする革新的なツールとして応用が期待される。

10. おわりに

本項では、材料表面への細胞接着において重要な要因について説明し、細胞表面に直接材料を形成する場合とは異なることを概説した。また、細胞接着と ECM の関係を中心に、細胞積層法および細胞集積法による三次元組織体の構築に関する我々の取り組みを紹介した。iPS 細胞の樹立により再生医療・組織工学への社会の期待も大きい昨今、細胞 1 個レベルで制御した三次元組織体を構築する技術の開発が強く求められており、国際競争も激化している。生体反応は全て化学的な反応・相互作用・現象の積み重ねである。生体反応にインスパイアされて生み出された、「化学に基づいた細胞操作技術」である細胞積層

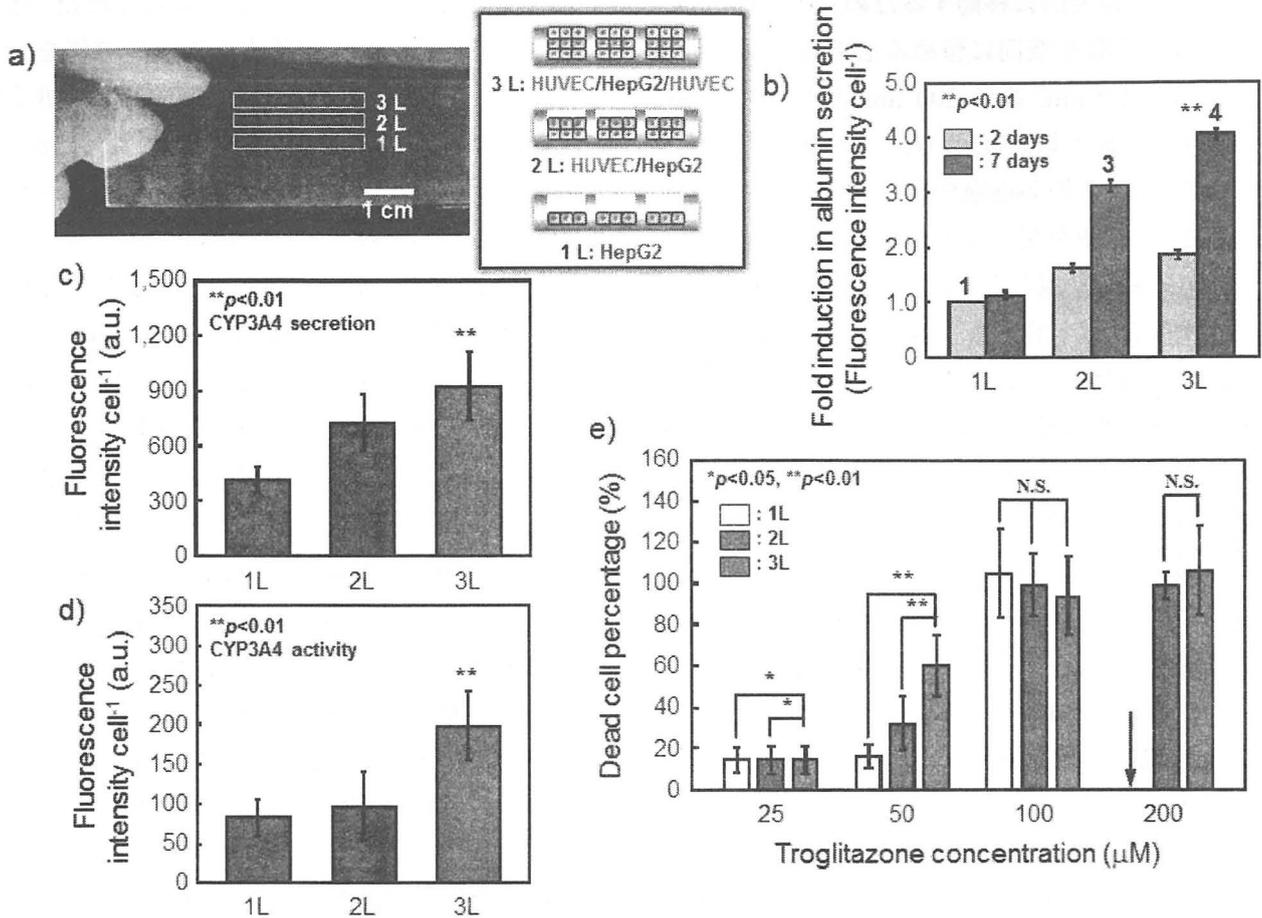


図 8 a) ヒト肝癌細胞 (HepG2) とヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) で作製した 1~3 層構造の肝組織チップの写真。b) アルブミン発現量と層構造の関係。抗アルブミン抗体で蛍光染色した各ウェルの蛍光強度で比較した。c) CYP3A4 発現量および d) 活性と層構造の関係。抗 CYP3A4 抗体での蛍光染色で発現量を評価し, vivid red を用いて活性を評価した。e) トログリタゾン濃度に依存した死細胞の割合と層構造の関係。LIVE/DEAD アッセイにより死細胞を蛍光強度で評価した。矢印は死細胞が剥離して定量できなかったことを示す。

法・集積法は, 新しい組織工学技術として今後の応用展開が期待される。

参考文献

- 1) D. E. Discher, D. J. Mooney, P. W. Zandstra, *Science*, **324**, 1673 (2009).
- 2) 赤池敏宏, 生体機能材料科学, コロナ社, (2005).
- 3) 岩田博夫, バイオマテリアル, 共立出版, (2005).
- 4) Y. Arima, H. Iwata, *J. Mater. Chem.*, **17**, 4079 (2007).
- 5) G. Decher, *Science*, **277**, 1232 (1997).
- 6) M. Matsusaki, H. Ajiro, T. Kida, T. Serizawa, M. Akashi, *Adv. Mater.*, **24**, 454 (2012).
- 7) K. Kadowaki, M. Matsusaki, M. Akashi, *Langmuir*, **26**, 5670 (2010).
- 8) K. Kadowaki, M. Matsusaki, M. Akashi, *Chem. Lett.*, **41**, 523 (2012).
- 9) M. Matsusaki, K. Kadowaki, Y. Nakahara, M. Akashi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 4689 (2007).
- 10) Y. Mao, J. E. Schwarzbauer, *Matrix Biol.*, **24**, 1232 (2005).

- 389 (2005).
- 11) P. Chetprayoon, K. Kadowaki, M. Matsusaki, M. Akashi, *Acta Biomater.*, **9**, 4698 (2013).
- 12) K. Kadowaki, M. Matsusaki, M. Akashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **402**, 153 (2010).
- 13) A. Nishiguchi H. Yoshida, M. Matsusaki, M. Akashi, *Adv. Mater.*, **23**, 3506 (2011).
- 14) M. Matsusaki, K. Sakaue, K. Kadowaki, M. Akashi, *Adv. Healthcare Mater.*, **2**, 534 (2013).