<総 説>

(受理: 平成 28 年 3 月 1 日)

生体組織と人工材料間の接着および材料設計 Adhesion between Artificial Materials and Human Tissue and Material Design

城 崎 由 紀*
Yuki SHIROSAKI

1. はじめに

ヒトの身体には、細胞-細胞間、細胞がある程度集合した組織-組織間、さらには組織によって構築される各臓器間の結合が存在する。これらは、通常ははっきりとした界面を持たない融合した状態である。しかし、事故や疾患等で臓器あるいは組織の一部を人工物で置き換える際には、人工物と生体組織間に界面が存在し、その界面での接着あるいは結合が大変重要となってくる。近年では、生体内で徐々に生体組織と置き換わる生体内分解材料を用いた生体足場材料（スキャフォールド）の開発が盛んであるが、その場合にも埋入初期において生体組織あるいは埋入部周辺細胞との接着が必須である。本稿では、生体組織（硬組織・軟組織）と人工医療材料の結合・接着に関する研究に関して紹介する。

2. 人工材料と骨組織との結合

1970年に開発されたHenchらのバイオガラス(Bioglass®)を発端に、ケイ酸塩系材料と骨との結合に関する研究が活発となった^{1,2)}。1980年代初頭には、Ceravital® (Bromer 他)³⁾, Bioverit® (Vogel, Höland 他)⁴⁾, CeraboneAW® (Kokubo, Yamamuro 他)⁵⁾ が相次いで開発され、それら材料表面と骨界面の現象が詳細に研究された。

上記材料の骨との結合は、体液と材料が接触した際の材料からのカルシウムイオンの溶出と表面に形成する水和ケイ酸塩層がアパタイトの不均一核形成を誘起し、その結果形成する骨類似アパタイト層が骨との接着剤の役目をする

と報告されている(図1)^{1,5)}。また、その後の研究で多孔質シリカゲル(Nakanishi 他)⁶⁾ やゾルーゲル法で作製したチタニア被覆層⁷⁾ 表面でも同様にアパタイト層が析出することが分かっている。このようなことから、材料表面に存在するシラノール基(Si-OH)やチタノール基(Ti-OH)はアパタイト層の析出を誘起する因子の一つである

図1 アパタイト層を介した骨組織との結合の模式図

城 崎 由 紀

略歴: 2005年3月岡山大学大学院自然科学研究科生体機能科学専攻修了, 博士(学術)。ポルト大学(ポルトガル)博士研究員, 岡山大学助教の職を経て2012年9月より現職。有機-無機複合材料を用いた組織再生用足場材料の創製を中心に新規医療材料開発に関する研究を進めている。

趣味: 旅行, 語学習得, 合気道, ハンドメイド

*九州工業大学 若手研究者フロンティア研究アカデミー
福岡県北九州市若松区ひびきの2-4 ☎ 808-0196
Kyushu Institute of Technology
2-4 Hibikino, Wakamatsu-ku, Kitakyushu, Fukuoka
808-0196, Japan

と考えられている。この現象を人工関節に応用した例を紹介する。

関節の機能不全が起きた際、人工関節を用いてその機能を再建することは、近年では一般的な治療である。この人工関節を骨組織に固定するにはポリメチルメタクリレート (PMMA) を主成分とする骨セメント⁸⁾が長らく使用されてきた。しかし、充填時の骨髓内への過度の圧迫や、硬化時の高い発熱によるショック症状や血圧低下の懸念があり、その利用は減少している。前述した、アパタイトが骨組織と人工材料表面を繋ぐという理論を人工関節に導入し、セメントレス人工関節の適切な表面形状や表面組成の研究・開発が進められてきた。尾坂らは、3~30重量%の過酸化水素水溶液中へ、純チタン基板を浸漬し、30~80℃で酸化させた⁹⁾。この酸化反応では、微細な網目構造が表面に構築され、さらに300~600℃で焼成すると、そのアパタイト析出能が向上する。チタン骨ピン丸棒試片を五塩化タンタルを含む過酸化水素水で処理し、家兎頸骨に埋入すると、第2週目から処理なしの試料に対して、十分優位な初期固定力を発揮する¹⁰⁾。このように、チタン基板へのアパタイトの析出は、化学的処理によって生成した酸化チタン層でのみ可能であって、一般に大気中で熱酸化したチタン表面では観察されない。しかし、近年この熱酸化したチタン表面でも適切な隙間空間と組み合わせると、体液環境下において自発的に骨類似アパタイトが析出することが報告されている (GRAPE[®] Technology)^{11,12)}。200~800℃で1時間熱酸化処理したチタン基板2枚から隙間環境を有する試料を作製し、擬似体液 (小久保溶液, SBF¹³⁾) 中でのアパタイト形成能を調べると、400℃および500℃処理した際に、アパタイトが析出する範囲が増大した。36.5℃に保持した擬似体液中に材料を浸漬し、その表面に骨類似アパタイトが形成された場合、その材料は生体内で骨伝導性を示す¹³⁾。400℃および500℃で形成した酸化チタン層は、700℃以上で処理した場合よりも結晶性が低く、表面に多くの Ti-OH 基が重縮合せず残存していると考えられる。

この残存した Ti-OH 基が隙間空間でのアパタイト形成に有利に働いたことを示唆している。熱処理温度は400℃に保持し、隙間空間の幅を0.1~3.0 mmに変化させると、幅0.8 mm以下の際に、より活発なアパタイト形成が観察された。この微小隙間を、大腿骨インプラントでは、微小溝空間に置き換えることができる (図2)^{14,15)}。そこで、チタン合金ブロックから10×10×5 mmの試片を切り出し、幅および深さをそれぞれ0.2~1 mmの組み合わせとした溝切り加工を施した。この試料を400℃、1h大気中加熱した後、平らな底面を持つ容器底部に溝切り部が底面側にくるように試料を置き、SBFに浸漬した。溝深さ0.5 mm、溝幅を0.2, 0.5 および1 mmと変化させると、1 mm幅を除き溝内に微細粒子の析出が観察された。拡大図では、花弁状の物質が半球状に成長しており、これは、SBF中で不均一核形成・結晶成長機構で析出するアパタイトに特徴的な微細構造である。同右下図の微小部 X-線回折図には基板のチタン由来の回折に加えて、アパタイトの回折がはっきりと確認できる。したがって、このチタンに溝型の微小隙間加工を施し、中温域 (~400℃) で短時間大気中加熱するだけで、アパタイト析出能力が付与できる、すなわち高い骨結合性が与えられる。そこで、この隙間効果をもたらす空間技術は、GRoove and APatitE から GRAPE[®] テクノロジー (商標権登録: 2008-39459) と命名され、臨床応用への開発が進められている。

3. ゴルーゲル法を用いた組織結合性足場材料の創製

セラミックスや金属から得られた知見を利用し、新規有機-無機複合体に関する研究も多く行われている。ケイ酸塩と類似のシロキサン骨格 (-Si-O-Si-) を持つポリジメチルシロキサン (poly(dimethylsiloxane); PDMS) とテトラエトキシシラン (tetraethoxysilane; TEOS) とをエタノール・水混合溶液中塩酸触媒下で反応させると、一部 PDMS のシロキサン結合が加水分解を受けて -Si(CH₃)₂-OH が生成し、それらと TEOS の中間的加水分解物 (-O-) _m

図2 チタン合金に適切なサイズの溝を設け、熱酸化により表面に酸化皮膜を形成させると、溝内部に骨類似アパタイトが析出する。

$(\text{RO})_n\text{SiOH}$ ($m+n=3$; $\text{R}=\text{H}, \text{C}_2\text{H}_5$) とが重合しハイブリッド化する。このケイ酸塩と有機物とのハイブリッド体はシロキサン結合を骨格とすることから、Ormosil (organically modified silicate: オーモシル) と呼ばれる¹⁵⁾。反応中に TEOS は独自に加水分解均一重合を繰り返し、ハイブリット体内に微細なシリカ領域を形成する (図 3)。このオーモシルにカルシウムイオンを添加すると SBF 中でアパタイトを自発析出させる^{16,17)}。ゾル溶液にショ糖顆粒を添加してゲル化させた後、温水でショ糖を溶かし出すと、柔軟な多孔質オーモシルが得られる。多孔率や孔径は顆粒径や顆粒投入量によって容易に制御できる。約 0.6 mm 大の顆粒で孔径 0.3~0.6 mm の多孔を導入した多孔率~90%の多孔体は、1000 回の 80% 圧縮テストで疲労が見られない。またカルシウムイオンの導入なしに、マウス由来骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) やヒト骨芽細胞様細胞

(HuO-3N1) 等が孔壁に沿ってよく増殖する。

組織工学の発展に伴い、従来の生体組織欠損部を補うだけの材料ではなく、埋入時には生体組織とよくなじみ、その後生体組織の再生を促し、最終的には再生した組織と完全に置き換わる生体内分解性足場材料への要求が高まってきた¹⁸⁾。このような足場材料には、高い組織適合性、培養液や細胞が行き渡ることの出来る連通した多孔構造を有し、材料の存在が組織の再生を妨げない速度で分解・消失することが重要である。そこで、生体分解性高分子を用いた有機-無機複合体の研究も数多く行われている。Ren らは^{19,20)}、ゼラチンを主骨格として用い、その分子内のアミノ基との反応基であるエポキシ基を有する 3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン (GPTMS) を無機成分として修飾した (図 4)。ゼラチンは、コラーゲンを酸やアルカリ等で処理することによって得られる水溶性のタン

図 3 オーモシルの構造。TEOS 由来のシリカブロックを PDMS 鎖が繋ぎ 3 次元構造を構築している。

図 4 各種構造解析から予想されるゼラチン-GPTMS 複合体の構造模式図。AA1, AA2 はゼラチン骨格中のアミノ酸残基を示す。

図5 キトサン-GPTMS 複合体をビーグル犬の頭蓋骨に埋入した場合の12ヶ月後の組織画像²⁸⁾。(左) HE (ヘマトキシリン-エオジン染色), (右) AM (アザン-マローリー染色)。多くの骨芽細胞が材料埋入周辺に存在し (→), 埋入部に類骨組織 (*) や血管新生 (**) が観察される。

パク質であり、古くから食品や医薬品に用いられている生体吸収性高分子である²¹⁾。GPTMS 分子のエポキシ基はゼラチン骨格のリジン (Lys) およびヒスチジン (His) 残基と選択的に重合して、ゼラチン骨格を橋掛けする。その結果、GPTMS の添加量により、生体模倣環境内での分解性を抑制する。また前述のオーモシルと異なり、水溶液系での反応の為、ゾル溶液や湿潤ゲルを凍結乾燥すれば多孔性が付与できる。孔径は凍結温度 5~500 μm までマイクロオーダーで制御できる。この多孔質体表面で培養した MC3T3-E1 細胞はその表面によく接着・増殖した。さらに、カルシウムイオンを含有させると、*in vitro* 環境ではあるが、3 週間以内に細胞による石灰化 (アパタイト顆粒産生) も見られた。また、マウスの下腿筋肉内に埋入しても 2 週間で石灰化が確認できる、骨伝導・骨誘導にも優れた材料である。本ハイブリッドは、アパタイト形成能の発現や、骨芽細胞の接着・増殖といった骨組織との結合だけでなく、脳組織欠損部の足場材料への可能性も秘める。上記多孔質ハイブリッド (カルシウムイオン無添加) に成長因子を担持させ、脳皮質の欠損部位に埋入すると^{22,23)}、多孔質体が欠損部の構造を保持し、その内部に新生組織の再生が認められた。さらに、新生組織内部には、血管内皮細胞、アストロサイト、ミクログリアが存在し、周辺脳組織からの神経突起の伸展も観察された。残念ながら、脳組織内とハイブリッド表面構造との関係は明らかにされていないが、このようなハイブリッド体は軟組織との接着にも期待が持てる。

筆者らは、ゼラチンの部分をキトサンに変更したキトサン-GPTMS 複合体を作製し、その微細構造と各種細胞や組織再生との関連を見出すことに取り組んでいる^{24~27)}。前述したゼラチン系と同様にキトサン骨格内のアミノ基が GPTMS のエポキシ基と反応し、GPTMS のメトキシ基が加水分解・縮重合して、ハイブリッド体を構成する。乾燥条件を工夫することで、前駆体ゾル溶液から、透明膜、多孔質体、ペレット、ヒドロゲル、カプセル等様々な形に成型できる。適切な組成で作製した透明膜や多孔質体内部で

は、ヒト由来骨芽細胞用細胞 (MG63) が良好に・接着増殖する。またヒト骨髄由来細胞による実験から、細胞接着を促進するだけではなく、それらの分化能も発現させることも分かっている。GPTMS の重合度と細胞接着との関係を詳細に観察した結果、重合度が高くなり過ぎると表面の接触角が増加し、細胞接着が抑制されることが明らかである。材料の構造解析から、表面濡れ性や細胞との接着には、ハイブリッド表面の Si-OH 基が関係していると考えられるが、直接的な証拠は得られていない^{25,26)}。また、骨芽細胞だけではなく、ヒト歯肉細胞もよく接着・増殖する。さらに、多孔質体は 3 次元体の構造を構築出来るため、組織損傷部の足場材料としての応用が期待出来る^{28,29)}。頭蓋骨損傷部にカルシウムを含有した多孔質体を埋入すると、周辺組織からの細胞が材料表面まで遊走し接着する²⁸⁾。接着した細胞は、その後骨組織へと分化していく (図 5)。前述したバイオガラス、金属インプラントや非分解性材料とは異なり、アパタイトを介した結合ではない。一方、この多孔質体は、神経のガイド材料としても効果がある²⁹⁾。しかし、この場合には、材料表面で神経細胞が遊走することが重要で、細胞が材料表面に強固に接着しないことが望ましい。このように、アパタイトを介した生体組織との結合を目的に設計された材料も、生分解性材料を基本構造として導入すると、細胞が直接関与し、その後の組織再生および組織との融合へと進んでいく。

4. 骨芽細胞の接着機構

生体内で析出したアパタイトが人工材料と生体組織とを繋ぐ接着剤の役割を担うことによって発揮されることは前述した通りであるが、一般に、生体内に人工材料を埋入した際、その表面では体液からのタンパク質吸着、さらに周辺組織からの細胞の遊走・接着が起こる。細胞は生体組織を構築する最小単位であり、その接着機構を知ることは、人工埋入材料や再生足場材料の表面を設計するのに必須である。材料表面の親水・疎水性^{30~32)}、微細構造^{33~35)}、官能基^{36~38)}等の物理的相互作用が総合的に初期の細胞接着

に寄与していることはよく知られている。さらに、近年の分析技術の発展から、生物学的相互作用に関する細胞接着機構の解明も飛躍的に進んでいる。

骨の細胞外基質は90%のコラーゲタンパク質 (Type I コラーゲン 97%, Type V コラーゲン 3%), 10%の非コラーゲタンパク質 (オステオカルシン 20%, オステオネクチン 20%, 骨シアロタンパク質 12%, プロテオグリカン 10%, オステオポンチン, フィブロネクチン, 成長因子, 骨誘導因子等) から構成される。これらのタンパク質は、骨芽細胞によって生成され、ほとんどが骨芽細胞の接着機構に関与している。他にも *in vitro* の実験から、ヴィトロネクチンや血漿由来タンパク質も骨芽細胞の接着に関与していることが知られている³⁹⁾。このように接着に関与するタンパク質には、Arg-Gly-Asp (RGD) という共通したアミノ酸配列が含まれている⁴⁰⁾。Verrier らは、RGD ペプチドと RGE ペプチドを修飾した表面への骨前駆細胞の接着挙動を調べ、RGD 配列が細胞接着き大きく関与していることを明らかにしている⁴¹⁾。RGD 配列を組み込んだ材料設計に関しては後述する。

接着した骨芽細胞と材料間には focal contact と呼ばれる 10–15 nm の接着斑が存在する。この focal contact の外表面にはインテグリンといった接着機構に特異的な受容タンパク質が存在する。一方、内表面にはタリンやビンキュリンのようなタンパク質が存在し、細胞骨格であるアクチンフィラメントとインテグリン間の相互作用を調整していることが知られている。この接着斑の形成は、遊走性の低い細胞中に存在し、*in vitro* においては、フィブロネクチンやヴィトロネクチンの存在下で促進される。アクチンフィラメント、特に接着斑中に存在するものが、基板表面と細胞間の接着力に関与している⁴²⁾。また接着分子であるイムノグロブリンやカドヘリンも骨芽細胞の接着に大きく寄与する。材料表面の細胞接着に関わるタンパク質を模式化したものを図6に示す。材料表面と骨芽細胞間の接着分子に関しても多く報告されている。例えば CoCrMo 合金や

Ti6Al4V 合金表面で、骨芽細胞が発現するインテグリン (細胞接着分子) の分子鎖は基板に依存して異なる。どちらの表面でも、 $\alpha 2$, $\alpha 4$, αv と $\beta 1$ のインテグリンが発現するが、 $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 3$ インテグリンは Ti6Al4V 合金上でのみ発現する^{43,44)}。中でも $\beta 1$ が Ti4Al4V 表面上の骨芽細胞の接着機構に最も関与している。

5. RGD 配列を利用した足場材料の創製

前述した通り、RGD 配列は材料表面の細胞接着を促進するのに有効なペプチドである。RGD 配列を分子構造に組み込んだ医療材料の研究は数多く行われているが、足場材料への応用に関していくつか下記に紹介する。RGD 配列を修飾したポリエチレングリコール (PEG) ヒドロゲルは各種細胞の接着を劇的に増加させる^{45–47)}。通常 PEG ヒドロゲル表面は、細胞接着能に乏しい。光重合により RGD 配列を修飾した PEG ヒドロゲル上にヒト線維芽細胞の接着挙動を観察すると、ある一定量以上の修飾量がある場合に細胞接着を促進する⁴⁵⁾。さらに培地に血清を含まない場合も同様に細胞接着は増加する。これらの現象は RGD ペプチドと PEG ヒドロゲル間にスパーサー分子を導入し、RGD の運動性を制御しない場合のみ観察されている。つまり、RGD 分子が強固に材料基板表面に存在するのではなく、ある程度の運動性を持つ事で、細胞側の接着分子と相互作用し易くなる。骨芽細胞の場合も同様に、RGD 修飾したヒドロゲル上で、その接着は促進される⁴⁷⁾。接着細胞の密度は、修飾した RGD ペプチドの量に依存する。接着した細胞はヒドロゲル表面に平滑に広がり RGD ペプチドの量が多い程、その接着面積も増加する。修飾した RGD ペプチドの効果によって、修飾 PEG ヒドロゲル上の培養初期から骨芽細胞はアクチンファイバーが接着斑に向かって伸張し、微小繊維束を形成する。ヒドロゲル内に骨芽細胞を包括して3次元培養を行うと、接着・増殖だけではなく、その石灰化も促進される。さらに修飾する RGD 配列の分子構造を制御すると、内皮細胞の増殖を促

図6 材料表面の細胞接着に関わるタンパク質の模式図。

進する⁴⁸⁾。

In vivo においても RGD ペプチド修飾の効果が報告されている。GGRGD を修飾したアクリル系ヒドロゲルをラットの脳に埋入すると、周辺組織から神経細胞が遊走し、ヒドロゲル表面に接着する⁴⁹⁾。これはインテグリンがアストロサイトの接着や遊走を調整している為である。RGD 修飾した PMMA 多孔質体を骨欠損部に埋入すると、埋入 2 週後に海綿骨より活発な再生が観察される⁵⁰⁾。新生骨は直接多孔質体表面と接着し、さらに多孔内部まで侵入している様子が観察できる。一方で、未処理の PMMA 多孔質体は、線維性皮膜で覆われ、周辺組織と結合しない。ポリ乳酸/ポリグリコール酸 (PLA/PLG) ディスクを用いた動物実験でも、RGD 修飾により同様の現象が見られる⁵¹⁾。一方、ポリエチレンテレフタレート (PET) や超高分子量ポリエチレン (UHMWPE) では、RGD ペプチドを修飾しても線維芽細胞によるカプセル化が起こり、生体組織と結合しない⁵²⁾。

6. 最後に

細胞工学の発展によって、細胞接着機構の詳細がどんどんと明らかになっている。それに伴い、材料設計もより緻密に行うことができる。しかし、生体内の反応は複雑で、様々な反応が相互に作用して起こり、材料表面の構造はそれら反応によって刻々と変化する。埋入初期には生体と結合していた材料も、その後その結合が切れる場合もある。生体内での材料表面の変化と、それに伴う生体反応との関係をより明らかにすることは、組織再生の足場材料を設計するのに大変重要な点である。

文 献

- 1) L. L. Hench, *J. Am. Ceram. Soc.*, **74**, 1487 (1991).
- 2) L. L. Hench, D. E. Day and W. Höland, V. M. Rheinberger, *Intnatl. J. Appl. Glass Sci.*, **1**, 104 (2010).
- 3) H. Brömer, E. Pfeil and H. H. Käs, German Patent No. 2, 326, 100 (1973).
- 4) W. Höland, W. Vogel, K. Nakamura and J. Gummert, *J. Biomed. Mater. Res.*, **19**, 303 (1985).
- 5) T. Kokubo, *J. Ceram. Soc. Japan*, **99**, 965 (1991).
- 6) 中西和樹, *NEW GLASS*, **13**, 16 (1998).
- 7) P. Li, C. Ohtsuki, T. Kokubo, K. Nakanishi, N. Soga, T. Nakamura and T. Yamamuro, *J. Am. Ceram. Soc.*, **75**, 2094 (1992).
- 8) J. Charnley, "Low friction arthroplasty of the hip", Springer Verlag, New York (1979).
- 9) X. X. Wang, S. Hayakawa, K. Tsuru and A. Osaka, *J. Biomed. Mater. Res.*, **54**, 172 (2001).
- 10) S. Kaneko, K. Tsuru, S. Hayakawa, S. Takemoto, C. Ohtsuki, T. Ozaki, H. Inoue and A. Osaka, *Biomaterials*, **22**, 875 (2001).
- 11) X. X. Wang, W. Yan, S. Hayakawa, K. Tsuru and A. Osaka, *Biomaterials*, **24**, 4631 (2003).
- 12) Y. Nakao, A. Sugino, K. Tsuru, K. Uetsuki, Y. Shirosaki, S. Hayakawa and A. Osaka, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **118**, 483 (2010).
- 13) T. Kokubo and H. Takadama, *Biomaterials*, **27**, 2907 (2006).
- 14) A. Sugino, C. Ohtsuki, K. Tsuru, S. Hayakawa, T. Nakano, Y. Okazaki and A. Osaka, *Acta Biomater.*, **5**, 298 (2009).
- 15) J. Wen and G. L. Wilkes, *Chem. Mater.*, **8**, 1667 (1996).
- 16) K. Tsuru, C. Ohtsuki, A. Osaka, T. Iwamoto and J. D. Mackenzie, *J. Mater. Sci.; Mater. Med.*, **8**, 157 (1997).
- 17) K. Tsuru, Y. Aburatani, T. Yabuta, S. Hayakawa, C. Ohtsuki and A. Osaka, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **21**, 89 (2001).
- 18) D. W. Hutmacher, *Biomaterials*, **21**, 2529 (2000).
- 19) L. Ren, K. Tsuru, S. Hayakawa and A. Osaka, *J. Non-Cryst Solids*, **285**, 116 (2001).
- 20) L. Ren, K. Tsuru, S. Hayakawa and A. Osaka, *Biomaterials*, **23**, 4765 (2002).
- 21) H. F. M. Cremers, J. Feijen, G. Kwon, Y. H. Bae, S. W. Kim, H. P. J. M. Noteborn and J. G. MacVie, *J. Control. Release*, **11**, 167 (1990).
- 22) K. Deguchi, K. Tsuru, T. Hayashi, M. Takaishi, M. Nagahara, S. Nagotani, Y. Sehara, G. Jin, H. Zhang, S. Hayakawa, M. Shoji, M. Miyazaki, A. Osaka, N. H. Huh and K. Abe, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **26**, 1263 (2006).
- 23) H. Zhang, T. Kamiya, T. Hayashi, K. Tsuru, K. Deguchi, V. Lukic, A. Tsuchiya, T. Yamashita, S. Hayakawa, Y. Ikeda, A. Osaka and K. Abe, *Curr. Neurovasc. Res.*, **5**, 112 (2008).
- 24) Y. Shirosaki, K. Tsuru, S. Hayakawa, A. Osaka, M. A. Lopes, J. D. Santos and M. H. Fernandes, *Biomaterials*, **26**, 485 (2005).
- 25) Y. Shirosaki, K. Tsuru, S. Hayakawa, A. Osaka, M. A. Lopes, J. D. Santos, M. A. Costa and M. H. Fernandes, *Acta Biomater.*, **5**, 346 (2009).
- 26) Y. Shirosaki, K. Tsuru, H. Moribayashi, S. Hayakawa, Y. Nakamura, I. R. Gibson, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **118**, 989 (2010).
- 27) Y. Shirosaki, T. Okayama, K. Tsuru, S. Hayakawa and A. Osaka, *Chem. Eng. J.*, **137**, 122 (2008).
- 28) Y. Shirosaki, M. Furuse, T. Asano, Y. Kinoshita, T. Miyazaki and T. Kuroiwa, *Lett. Appl. NaoBioSci.*, **5**, 342 (2016).
- 29) S. Amado, M. J. Simões, P. A. S. Armada da Silva, A. L. Luis, Y. Shirosaki, M. A. Lopes, J. D. Santos, F. Fregnan, G. Gambarotta, S. Raimondo, M. Fornaro, A. P. Veloso, A. S. P. Varejão, A. C. Mauricio and S. Geuna, *Biomaterials*, **29**, 4409 (2008).
- 30) Y. Tamada and Y. Ikada, *Polymer*, **34**, 2208 (1993).
- 31) M. Lampin, R. WarocquierClerout, C. Legris, M. Degrange and M. F. SigotLuizard, *J. Biomed. Mater. Res.*, **36**, 99 (1997).
- 32) J. H. Lee, G. Khang, J. W. Lee and H. B. Lee, *J. Colloid Interface Sci.*, **205**, 323 (1998).
- 33) T. J. Webster, C. Ergun, R. H. Doremus, R. W. Siegel and R. Bizios, *J. Biomed. Mater. Res.*, **51**, 475 (2000).
- 34) C. J. Bettinger, R. Langer and J. T. Borenstein, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 5406 (2009).
- 35) A. D. Doyle, F. W. Wang, K. Matsumoto and K. M. Yamada, *J. Cell Biol.*, **184**, 481 (2009).
- 36) Y. Arima and H. Iwata, *Biomaterials*, **28**, 3074 (2007).
- 37) K. Webb, V. Hlady and P. A. Tresco, *J. Biomed. Mater. Res.*, **41**, 422 (1998).
- 38) J. H. Lee, H. W. Jung, I. K. Kang and H. B. Lee, *Biomaterials*, **15**, 705 (1994).

-
- 39) John P. Bilezikian, Lawrence G. Raisz, T. John Martin, "Principles of Bone Biology", Academic Press, Massachusetts (2008).
- 40) M. D. Pierschbach and E. Rouslahti, *Nature*, **309**, 30 (1984).
- 41) S. Verrier, A. Jonczyk, M. Dard and J. Amedee, *J. Bone Miner. Res.*, **23**, S535 (1998).
- 42) S. H. Aigmond, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 66 (1996).
- 43) R. K. Sinha and R. S. Tuan, *Bone*, **18**, 451 (1996).
- 44) K. Anselme, M. Biggerelle, B. Noel, E. Dufresne, D. Judas, A. Lost and P. Hardouin, *J. Biomed. Mater. Res.*, **49**, 155 (2000).
- 45) D. L. Hern and J. A. Hubbell, *J. Biomed. Mater. Res.*, **39**, 266 (1998).
- 46) D. L. Elbert and J. A. Hubbell, *Biomacromol.*, **2**, 430 (2001).
- 47) J. A. Burdick and K. S. Anseth, *Biomaterials*, **23**, 4315 (2002).
- 48) O. Jeon, C. Powell, S. M. Ahmed and E. Alsberg, *Tissue Eng. Part A*, **16**, 2915 (2010).
- 49) G. W. Plant, S. Woerly and A. R. Harvey, *Exp. Neurol.*, **143**, 287 (1997).
- 50) M. Kantelehn, P. Schaffner, D. Finsinger, J. Meyer, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, G. Holzemann, S. L. Goodman and H. Kessler H., *Chem - BioChem.*, **1**, 107 (2000).
- 51) K. Eid, E. Chen, L. Griffith and J. Glowacki, *J. Biomed. Mater. Res.*, **57**, 224 (2001).
- 52) R. Johnson, D. Harrison, M. Tucci, A. Tsao, M. Lemos, A. Puckett, J. L. Hughes and H. Benghuzzi, *Biomed. Sci. Instrum.*, **34**, 47 (1997).
-