再生医療と DDS

東京大学大学院^{*1} 医学系研究科疾患生命工学センター臨床工学部門, ^{*2} 工学系研究科バイオエンジニアリング専攻 (医学系研究科兼任)

大庭伸介^{*1}, 鄭 雄一^{*2}

Regenerative medicine and DDS

Regenerative medicine aims to regenerate tissues or organs by combining medical findings with engineering techniques. To develop novel tissue-regeneration system, we need to efficiently activate tissue-regeneration signal *in vivo* by providing carriers with DDS functions.

再生医療とは、生物・医学的知見と工学的技術を組み合わせて、新たに組織・臓器を還元させようとする医療であり、従来の分析的手法とは異なる統合的手法に基づくものである。

再生医療においては、組織再生誘導シグナルと DDS に関する研究は表裏一体である。担体材料に DDS 機能を持たせ、組織再生誘導シグナルを生体内で安全かつ効率的に活性化させることは、新しい再生システムの開発には必須であると考えられる。

本稿では、この分野における最近の進歩を整理し、併せて将来の展望についても言及する。

Shinsuke Ohba^{*1}, Ung-il Chung/Yuichi Tei^{*2}

Key words : bone and cartilage regenerative medicine, scaffolds, DDS, bioactive factors, nanocarriers

再生医療は、これまで治療困難とされてきたさまざまな原因による不可逆性の臓器損傷を、生物学・医学的知見(幹細胞生物学・分子生物学・発生学)と工学的技術を組み合わせて治療することを目的としている。筆者らは骨軟骨再生に焦点をあて、① 組織再生を誘導するための分子シグナルの最適化、② その知見を生体内へ適用するための担体、および③ DDSに関する検討を行ってきた。

本稿ではまず、再生医療と従来の医療との相違点を概説する。つぎに、組織再生を誘導する分子シグナルの最適化と担体・DDS研究の必要性、およびその位置づけについて述べる。骨・軟骨再生医療におけるこれまでの研究について、分子シグナルと担体・DDS研究に焦点を絞って概説し、この分野が現在抱える問題と将来の展望についても言及する。

従来の医療と再生医療

従来の医学においては、病因を取り除くことに主

眼がおかれ、その後は身体 of 自然治癒力に依存している。基礎研究においてもこの治療方針に呼応して、病因解明に多くの労力が割かれてきた。特に近年の発生工学および分子生物学の発展は、遺伝子レベルでの病因の解明を可能にした。フォワードジェネティクスによるさまざまな疾患の責任遺伝子およびその変異の同定と、リバースジェネティクスにより作出された遺伝子改変動物の解析により、病因のみならず発生および生理機能を制御する機構までも遺伝子レベルで解明されている。そして、これら分析的手法により明らかとなった因子をターゲットとした治療法および薬物が一部で開発されてきている。

しかし、こうした従来の医学的アプローチでは解決できない問題として、外傷・腫瘍・炎症・先天奇形・加齢などさまざまな原因で生じる不可逆性臓器不全がある。不可逆性臓器不全に対する現在の二大戦略としては、臓器移植と人工臓器がある。しかし、臓器移植はきわめて有効な治療法であるものの、慢性的なドナー不足・免疫拒絶・ドナーサイトトラブルといった問題がある。また、人工臓器においても、一部で非常にすぐれたものが開発されているが、生体組織に比して機能および耐久性の面で劣ることは否定できない。

^{*1} Division of Clinical Biotechnology, Center for Disease Biology and Integrative Medicine, The University of Tokyo Graduate School of Medicine

^{*2} Department of Bioengineering, The University of Tokyo Graduate Schools of Engineering and Medicine

再生医療とはこのような問題を解決するために、生物学・医学的知見(幹細胞生物学・分子生物学・発生学)と工学的技術を組み合わせ、新たに組織・臓器を復元させようとする医療であり、従来の分析的手法とは異なる統合的手法に基づくものであるといえる。

組織再生誘導シグナルの最適化と DDS 研究の必要性

再生医療に重要な要素として、1993年に Vacanti らが指摘した“細胞源・足場/担体・シグナル”があげられる¹⁾。近年の再生医療においては、幹細胞を細胞源とし、生分解性の足場材料と組み合わせ、これらを組織欠損部へ移植する細胞移植の有効性が示されている²⁾。

しかしながら、細胞移植による再生医療は以下の三つの問題点を有する。

第1に、量と質を満足させるような理想的な細胞源を完全に確保できていない点である。

第2、第3の問題点は、細胞移植に伴う医療費とリスクである。

現在までに再生組織量とその質(再生組織の機能と安全性)を満足させるような理想的な細胞源を完全には確保できていない。したがって、再生医療における細胞以外の2要素(シグナル・足場/担体)からアプローチすることで、細胞移植にとって代わる新しい再生システムを開発することが今後の再生医療の発展のために重要であると考えられる。

組織再生誘導シグナルに関する従来の研究は、前駆細胞(幹細胞)を分離して増殖させたのちに、いかにして最後の一押しとなるような刺激を加えて所定の組織に分化させるかということに労力が割かれてきた。その基盤となるものは、分析的手法により得られた知見である。しかしこれらの因子は単独では組織再生の必要条件にすぎず、十分条件ではないといえる。上述のように幹細胞移植に依存した再生医療が抱える問題が明らかとなってきた現在、幹細胞以外の細胞源の使用や、細胞を使わずとも再生を促す薬剤の開発をも考慮に入れなければならない。こういった新たな再生医療戦略をとるにあたって、わ

れわれはある臓器をつくりだすための十分条件となる分子シグナルを知らねばならない。

再生医療における足場/担体とは、当初、細胞を移植する際の“足場”としての意味合いが強かった。しかしながら、現在の再生医療においては、細胞の足場としての機能のみならず、再生を誘導する生理活性物質などの“担体”、つまり DDS としての役割が注目されている。したがって、本稿では以後“足場”とはよばず、担体という用語に統一して述べる。担体に関する研究は精力的に行われてきているものの、担体材料そのものが積極的に組織再生を誘導する材料はまだない。それは、これらの材料がその周囲に組織再生を誘導するのに十分なシグナル経路を活性化しないためであると考えられる。したがって、担体材料に適切な DDS 機能を持たせ、組織再生誘導シグナルを生体内で安全かつ効率的に活性化させることは、前述の細胞移植にとって代わる新しい再生システムの開発には必須であると考えられる。したがって、組織再生誘導シグナルの解明と DDS に関する研究は表裏一体であり、今後の再生医療研究において切り離すことは出来ないものであると、筆者らは考えている。

骨軟骨再生医療におけるこれまでの研究

1. 骨軟骨再生を誘導するための細胞内シグナル因子

骨形成性シグナル分子に関する多くの基礎研究がなされた結果、骨が形成される分子メカニズムが徐々に明らかにされつつある。特に、BMP シグナル、ヘッジホッグシグナル、Wnt シグナル、Runx2 を不活性化したマウスにおいて、正常な骨形成が著しく障害されることから、これらの因子は骨形成に必須であるとされている³⁾。骨再生にこれらの因子を応用しようとする試みが数多くなされてきたが、特に BMP に関する試みが盛んである。組換えヒト BMP-2 蛋白と BMP-7 蛋白を骨折治療に応用する臨床研究等が行われ、その有効性も示されている⁴⁾。

しかし、組み換え BMP 蛋白の利用に際しては、いかにして短い生物学的半減期を克服しつつ生理的作用を模倣するかという点について、生体内への適

用方法を含めて考える必要がある⁵⁾。

ほかに、動物実験においては転写因子 Runx2 の遺伝子導入が骨再生に有効であるという報告も多く存在する⁶⁾。筆者らも BMP と Runx2 の組み合わせが、皮膚線維芽細胞や ES 細胞の骨分化を誘導することを見いだした⁷⁾。しかし、転写因子を再生医療へ応用するためには、現在のところその多くは遺伝子導入に頼らざるをえない。したがって、安全かつ効率的な遺伝子導入方法の開発が急務である。

骨形成性の細胞内シグナルを活性化させるもう一つの方法は、低分子化合物の利用である。これまで有効性が報告されているものとしては、アセチル CoA 阻害剤であるスタチン、イソフラボン誘導体、ヘリオキサンチン誘導体、epimedium pubescens という薬草から抽出されたイカリンなどがあげられる⁸⁾。特に筆者らが同定したヘリオキサンチン誘導体は、BMP と組み合わせることで ES 細胞や皮膚の線維芽細胞の骨分化を誘導することが確認されている。

一方、軟骨形成においても、多くの因子が関与することが明らかとされてきている³⁾。TGF β 3 (transforming growth factor β 3), IGF-1 (insulin-like growth factor 1), BMP6 の組み合わせによってヒト骨髄間葉系間質細胞の軟骨細胞分化を誘導できるという報告がある⁹⁾。

また、筆者らは、転写因子 Sox-5, -6, -9 (Sox トリオ) の組み合わせが、ES 細胞、ヒト間葉系間質細胞、ヒト線維芽細胞において強ちに軟骨分化を誘導するとともに、マウスにおける軟骨再生も誘導することを報告した¹⁰⁾。従来の方法とくらべて、Sox トリオの使用の利点は、軟骨の肥大分化や骨芽細胞分化を抑制しつつ、軟骨分化を進める点である。

さらに最近、FGF2 (fibroblast growth factor 2) とインスリンあるいは IGF-1 の組み合わせが、ヒト軟骨細胞を増殖させるのに有効であることが報告された¹¹⁾。さらに同じ研究グループは、この組み合わせで増殖させることで脱分化した軟骨細胞を BMP-2, インスリン, トリヨードサイロニン (T3) 存在下でつづけて培養することによって、軟骨細胞の形質を再獲得させることが可能であることを報告している¹²⁾。

2. 骨再生用担体

骨再生においては、金属、高分子材料、セラミックスの三つの生体材料が主に使用されてきた。チタンはその高い生体適合性から、古くからインプラント材料として用いられてきた。しかし、組織学的解析が容易でないことが、この材料の生物学的活性に関する研究の進展を遅らせていることは否めない¹³⁾。骨再生に使用される生分解性合成高分子としては、ポリ乳酸 (PLA), ポリグリコール酸 (PGA), ポリカプロラクトン, ポリ乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) があげられる⁸⁾。

生体高分子由来の担体では Collapat II (Biomet Inc), Healos (Depuy Spine Inc), Collagraft (Nuecoll Inc, Zimmer Inc), Biostite (Vebas S.r.l.) などのウシの I 型コラーゲンをを用いたものが現在商品化されている¹⁴⁾。コラーゲンは骨基質の大部分を占めることから骨再生への応用は理にかなっていると考えられるが、他種からの病原体への感染や、低い力学的強度などの問題を解決する必要がある。

セラミック材料では、ハイドロキシアパタイトと β 型三カルシウムリン酸が骨再生に広く用いられてきた。生体の骨の 70% がカルシウムリン酸からなるという事実は、この材料の生体適合性を担保すると考えられる。本材料は骨伝導性を有し、生体内の生理的な骨吸収機転によって吸収されるとされている⁸⁾。したがって、カルシウムリン酸からなる人工骨は自家・他家骨にくらべて、安全性、量的制約がない、移植時の侵襲が低い点においてすぐれている。これまでに臨床で用いられてきた人工骨は、力学的強度を高めるために焼結を必要としたが、これにより収縮、生分解性、術中の操作性の低下を引き起こすことが知られている。

そこで筆者らは、十分な力学的強度を焼結なしで人工骨に与え、さらに適切な生分解性と欠損部形態にあった形状を付与するため、三次元造形法による人工骨作製法を現在開発している¹⁵⁾。

3. 軟骨再生用担体

軟骨再生に用いられる担体は、蛋白、多糖体、合成生体材料の三つに分類される。

MACI (Matrix-induced ACI, Verigen, Leverkusen

sen, Germany), Maix (Matricel, Hezzenrath, Germany), Chondro-gide (Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Switzerland) は、I 型および III 型コラーゲン膜であり、自家軟骨細胞移植用の担体として用いられる¹⁶⁾。

Atelocollagen (Koken Co. Ltd, Tokyo, Japan) はわが国で開発され、抗原性を有するテロペプチドを除去した I 型コラーゲングルである。膜型のものにくらべて、移植片への三次元形態の付与にすぐれている¹⁷⁾。また、フィブリン糊 (Tissucol, BAXTER, Austria) も軟骨の修復に使用され、1 年にわたる臨床経過に関する報告が存在する¹⁸⁾。

ヒアルロン酸を用いた HYAFF-11 (Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italy) と自家軟骨細胞との組み合わせは、Hyalograft C として使用され、その有効性が報告されている¹⁹⁾。

Bio-Seed-C (BioTissue Technologies, Freiburg, Germany) は PGA, PLA, ポリジオキサノンからなる合成材料であり、フィブリン糊に埋入された自家軟骨細胞と組み合わせて使用される。硝子軟骨の形成を誘導する結果、関節の機能を有意に改善すると報告されている²⁰⁾。

ほかにも、ポリエチレングリコールからなるハイドロゲルを軟骨再生に応用しようとする試みも存在する²¹⁾。

4. 骨軟骨再生医療における DDS

再生医療において送達される生理活性物質としては、組換え蛋白質、低分子化合物、遺伝子・核酸があげられる。骨軟骨再生医療においては、ヒト組換え BMP-2 蛋白と骨形成性遺伝子の DDS に関する研究が盛んに行われてきた。DDS 用担体は、無機材料、有機材料、複合材料にわけられる。

無機材料に生理活性物質を結合させる最も簡単な方法は、材料を溶液中に浸漬して、物理的あるいは化学的に生理活性物質を吸着させることである。チタンに BMP を物理的に吸着させた場合、最初の数時間で 96% から 99% の活性を失うが²²⁾、ダイヤモンドでコーティングしたチタンは、BMP がより強固に吸着し徐放能も有することが報告されている²³⁾。さらに、コラーゲンとコンドロイチン硫酸を

BMP とともにチタンに吸着させることで、骨形成能が増加するという報告も存在する²⁴⁾。

一方、生理活性物質の無機材料への化学的吸着は、チオールやホスホン酸塩等のリンカー分子を用いることにより達成される。BMP2 の担体表面への吸着にはホスホン酸塩が広く用いられている²⁵⁾。

さらに、チタンの場合は、酸化膜の形成を利用した nanomechanical fixation の応用も考えられ、RGD ペプチドやコラーゲンの固定に用いられている。しかしながら、化学的吸着や nanomechanical fixation は滅菌処置によって、インプラント表面の生理活性が急速に失われることが大きな問題である。したがって、nanomechanical fixation は近年、機能性オリゴヌクレオチドを一部分に結合させるために用いられるようになってきた²⁵⁾。

さらに、 β 型三カルシウムリン酸も BMP2 の DDS 材料として用いられ、その骨再生誘導能に関して多くの報告が存在する。特に、脊椎の癒合術においては、BMP2 を三カルシウムリン酸とハイドロキシアパタイトからなる担体と組み合わせることで、臨床上効果的であったという報告が存在する²⁶⁾。

有機材料は、天然高分子と合成高分子材料にわけられる。天然高分子のなかでも、コラーゲンが骨軟骨再生用 DDS 材料として広く用いられている。コラーゲンは BMP の DDS 用担体として唯一、米国食品医薬局 (FDA) の認可を受けている材料であるが、徐放性に乏しいという欠点を有する²⁵⁾。その欠点の克服のために、いくつかの試みがなされている。たとえば、血管内皮成長因子 (VEGF) の DDS においては、コラーゲン線維へのヘパリン分子のカップリングが、コラーゲン担体からの VEGF の徐放性を向上させることが示されている²⁷⁾。また、BMP2 の N 末にコラーゲン結合ドメインを付与することにより、コラーゲン担体への BMP2 の結合性とそれに伴う徐放性が向上し、骨再生誘導能が上昇することが報告されている²⁸⁾。そのほかに、天然高分子としては絹やキトサンがあげられ、BMP の DDS における有効性が報告されている²⁵⁾。

合成高分子材料としては、PLA, PGA, あるいはその複合材料である PLGA があげられ、BMP2 の DDS あるいは他の遺伝子送達法 (後述) と組み合わ

せて使用されている。これらの高分子材料に生理活性物質を取り込ませるためには、まず高分子材料を生理活性物質を含む有機溶媒中で液化させる。その後、溶媒を蒸発させることで、生理活性物質を含む高分子材料が固体となる。その結果、生体において、材料の吸収に伴って生理活性物質が徐放されるとされている。また、多孔性材料の作製は、塩化ナトリウム粒子を含有させて固体化し、その後塩化ナトリウムを除去することで行われる²⁵⁾。また、ポリエチレングリコールも BMP2 の担体として使用されるが、力学的強度に乏しいため、PLA やリン酸カルシウムと組み合わせて使用されることもある²⁵⁾。

骨軟骨再生への応用を目的に、現在精力的に研究されている遺伝子・核酸送達システムとしては、非ウイルス性のポリプレックスシステムがあげられる。このほかにも、非ウイルス性遺伝子・核酸送達システムとしては、リボプレックスシステムが存在する。ともに、アニオンである DNA とカチオン性の物質とで複合体を形成させることで、DNA を安定化させ、効率的に細胞内へ送達することを目指している。リボプレックスシステムにおいては、カチオン性のリボソーム(脂質二重膜からなる閉鎖小胞)と DNA によって複合体を形成させる。この原理を用いた遺伝子導入法は、リポフェクションとよばれ、*in vitro* 研究で広く使用されているものの、*in vivo* への遺伝子導入効率が低いことが知られている。

ポリプレックスシステムはカチオン性高分子と DNA との間に会合体を形成させ、DNA の導入を図るシステムである。

Huang らは、ポリプレックスシステムの一つであるポリエチレンジアミン(PEI)による *in vivo* 骨再生を報告している。彼らは PEI と BMP-4 遺伝子発現プラスミドの複合体を PLGA に含有させて骨欠損部へ移植することで、骨再生が誘導されることを示した²⁹⁾。さらに彼らは、多孔性の poly(lactide-co-glycolide) (PLG) 担体と PEI による遺伝子送達システムを組み合わせることで、長期間にわたる遺伝子導入が *in vivo* でも可能であることを示している³⁰⁾。

一方、筆者らは、東京大学大学院工学系研究科の片岡研究室において開発された、高分子ナノミセルによる骨再生法に関する研究を行ってきた。高分子

ナノミセルはポリエチレングリコールのブロック共重合体とプラスミド DNA との自己会合により形成される³¹⁾。一連の研究において、BMP シグナルを活性化させる遺伝子と Runx2 遺伝子をそれぞれ発現するプラスミドを含有する高分子ナノミセルをリン酸カルシウム担体に搭載させて骨欠損部に移植したところ、細胞を移植することなく骨再生が誘導できることを見いだしている³²⁾。

展 望

1990 年代後半にヒトの成体幹細胞の存在が確認されて以降、基礎研究者と臨床家がともにこの細胞を骨軟骨再生に応用する方法の開発を目指してきた。これまでになされた多くの前臨床・臨床試験は筆者らに非常に有望な結果をもたらすと同時に、「幹細胞は必ずしも万能薬とはなりえない」という重要な示唆を提示しているかもしれない。幹細胞が組織再生における非常に有望な細胞源であることは間違いない。しかし実際は、この細胞をより安全にかつ効果的に活用する方法を、われわれはいまなお模索している状態である。

改めて、幹細胞の使用、あるいは細胞移植が本当に骨格組織欠損のすべての治療に必要なかを考える時期ではないだろうか。組織欠損の程度によっては、欠損部周囲の細胞の再生能力を助けることで、細胞を移植せずに欠損を修復できる可能性がある。それゆえ、細胞移植を用いた複雑な再生療法の臨床応用を目指す前に、より簡便な治療法(担体やシグナル因子のみの応用)を確立することが重要であると考えられる。そのためには、組織再生誘導シグナルに関する研究と担体・DDS に関する研究を表裏一体で進める必要がある。

これまで以上に骨軟骨再生医学を着実かつ急速に発展させるために、われわれは医学、生物学、工学、薬学、医療経済、医療倫理といった再生医学に関連するあらゆる学問分野に目を向け、他分野にわたる共同研究を積極的に推進させる必要があるであろう。領域を超えた研究体制こそが、再生医療の実現への新たな道を開くと筆者らは考えている。

文 献

- 1) Langer R, Vacanti JP : Tissue engineering. Science 260 (5110) : 920-926, 1993.
- 2) Otto WR, Rao J : Tomorrow's skeleton staff : mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. Cell Prolif 37 (1) : 97-110, 2004.
- 3) Kronenberg HM : Developmental regulation of the growth plate. Nature 423(6937) : 332-336, 2003.
- 4) Lee K, Chan CK, Patil N, Goodman SB : Cell therapy for bone regeneration : bench to bedside. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 89(1) : 252-263, 2009.
- 5) Franceschi RT, Wang D, Krebsbach PH, Rutherford RB : Gene therapy for bone formation : *in vitro* and *in vivo* osteogenic activity of an adenovirus expressing BMP7. J Cell Biochem 78(3) : 476-486, 2000.
- 6) Kojima H, Uemura T : Strong and rapid induction of osteoblast differentiation by Cbfa1/Til-1 overexpression for bone regeneration. J Biol Chem 280(4) : 2944-2953, 2005.
- 7) Ohba S, Ikeda T, Kugimiya F, Yano F, Lichtler AC et al. : Identification of a potent combination of osteogenic genes for bone regeneration using embryonic stem (ES) cell-based sensor. FASEB J 21(8) : 1777-1787, 2007.
- 8) Ohba S, Yano F, Chung U : Tissue engineering of bone and cartilage. IBMS BoneKEy 6(11) : 405-419, 2009.
- 9) Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H et al. : Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. Biochem Biophys Res Commun 320(3) : 914-919, 2004.
- 10) Ikeda T, Kamekura S, Mabuchi A, Kou I, Seki S et al. : The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. Arthritis Rheum 50(11) : 3561-3573, 2004.
- 11) Takahashi T, Ogasawara T, Kishimoto J, Liu G, Asato H et al. : Synergistic effects of FGF-2 with insulin or IGF- I on the proliferation of human auricular chondrocytes. Cell Transplant 14(9) : 683-693, 2005.
- 12) Liu G, Kawaguchi H, Ogasawara T, Asawa Y, Kishimoto J et al. : Optimal combination of soluble factors for tissue engineering of permanent cartilage from cultured human chondrocytes. J Biol Chem 282(28) : 20407-20415, 2007.
- 13) Tortelli F, Cancedda R : Three-dimensional cultures of osteogenic and chondrogenic cells : a tissue engineering approach to mimic bone and cartilage *in vitro*. Eur Cell Mater 17 : 1-14, 2009.
- 14) Wahl DA, Czernuszka JT : Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. Eur Cell Mater 11 : 43-56, 2006.
- 15) Saijo H, Igawa K, Kanno Y, Mori Y, Kondo K et al. : Maxillofacial reconstruction using custom-made artificial bones fabricated by inkjet printing technology. J Artif Organs 12(3) : 200-205, 2009.
- 16) Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, Guicheux J, Noel D : Cartilage engineering : a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. Trends Biotechnol 27(5) : 307-314, 2009.
- 17) Iwasa J, Engebretsen L, Shima Y, Ochi M : Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 17(6) : 561-577, 2009.
- 18) Visna P, Pasa L, Cizmar I, Hart R, Hoch J : Treatment of deep cartilage defects of the knee using autologous chondrograft transplantation and by abrasive techniques : a randomized controlled study. Acta Chir Belg 104(6) : 709-714, 2004.
- 19) Marcacci M, Berruto M, Brocchetta D, Delcogliano A, Ghinelli D et al. : Articular cartilage engineering with Hyalograft C : 3-year clinical results. Clin Orthop Relat Res 435 : 96-105, 2005.
- 20) Ossendorf C, Kaps C, Kreuz PC, Burmester GR, Sittlinger M et al. : Treatment of posttraumatic and focal osteoarthritic cartilage defects of the knee with autologous polymer-based three-dimensional chondrocyte grafts : 2-year clinical results. Arthritis Res Ther 9(2) : R41, 2007.
- 21) Villanueva I, Hauschulz DS, Mejic D, Bryant SJ : Static and dynamic compressive strains influence nitric oxide production and chondrocyte bioactivity when encapsulated in PEG hydrogels of different crosslinking densities. Osteoarthritis Cartilage 16(8) : 909-918, 2008.
- 22) Hall J, Sorensen RG, Wozney JM, Wikesjo UM : Bone formation at rhBMP-2-coated titanium implants in the rat ectopic model. J Clin Periodontol 34(5) : 444-451, 2007.
- 23) Steinmuller-Nethl D, Kloss FR, Najam-UI-Haq M, Rainer M, Larsson K et al. : Strong binding of bioactive BMP-2 to nanocrystalline diamond by physisorption. Biomaterials 27(26) : 4547-4556, 2006.
- 24) Bierbaum S, Douglas T, Hanke T, Scharnweber D, Tippelt S et al. : Collageneous matrix coatings on titanium implants modified with decorin and chondroitin sulfate : characterization and influence on osteoblastic cells. J Biomed Mater Res A 77(3) : 551-562, 2006.
- 25) Schliephake H : Application of bone growth factors : the potential of different carrier systems. Oral Maxillofac Surg 14(1) : 17-22 : PMID : 2820659, 2010.
- 26) Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R : Bone morphogenetic proteins in clinical applications. Anz J Surg 77(8) : 626-631, 2007.
- 27) Steffens GC, Yao C, Prevel P, Markowicz M, Schenck P et al. : Modulation of angiogenic potential of collagen matrices by covalent incorporation of heparin and loading with vascular endothelial growth factor. Tissue Eng 10(9-10) : 1502-1509, 2004.
- 28) Chen B, Lin H, Wang J, Zhao Y, Wang B et al. : Homogeneous osteogenesis and bone regeneration by demineralized bone matrix loading with collagen-targeting bone morphogenetic protein-2. Biomaterials 28(6) : 1027-1035, 2007.
- 29) Huang YC, Simmons C, Kaigler D, Rice KG, Mooney DJ : Bone regeneration in a rat cranial defect with delivery of PEI-condensed plasmid DNA encoding for bone morphogenetic protein-4 (BMP-4). Gene Ther 12(5) : 418-426, 2005.
- 30) Huang YC, Riddle K, Rice KG, Mooney DJ : Long-term *in vivo* gene expression via delivery of PEI-DNA condensates from porous polymer scaffolds. Hum Gene Ther 16(5) : 609-617, 2005.
- 31) Kanayama N, Fukushima S, Nishiyama N, Itaka K, Jang WD, Miyata K et al. : A PEG-based biocompatible block cationer with high buffering capacity for the construction of polyplex micelles showing efficient gene transfer toward primary cells. ChemMedChem 1(4) : 439-444, 2006.
- 32) Itaka K, Ohba S, Miyata K, Kawaguchi H, Nakamura K et al. : Bone regeneration by regulated *in vivo* gene transfer using biocompatible polyplex nanomicelles. Mol Ther 15(9) : 1655-1662, 2007.