

# 骨誘導型生分解性三次元高分子を用いて再生誘導した ヒト指骨モデルにおける骨膜の役割

徳井 琢

近畿大学医学部形成外科学教室

## 抄 録

本研究では、指骨形状を有する骨誘導型生分解性三次元高分子 (P (LA-CL) および HA-P (LA-CL)) に、骨膜、培養軟骨細胞を付加してヒト指骨モデルを作成した。これを免疫不全マウスに移植し、指骨と関節軟骨からなる複合硬組織の再生誘導を試みた。指骨モデルには、骨膜を付加した部位〈骨膜側〉と付加しない部位〈非骨膜側〉を設け、新生硬組織の成熟過程における骨膜の関与を検討した。骨誘導型高分子にハイドロキシアパタイト粒子を組み込み、骨形成促進作用を検討した。再生組織の肉眼的検討では、骨膜側では、指骨の三次元形状がより良好に維持され、組織学的検索でも、良好な新生骨組織形成を認めた。さらに免疫染色では、骨膜側で BSP を産生する様子が観察され、P (LA-CL) に比較して HA-P (LA-CL) ではより良好な骨形成を認めた。一方、関節軟骨における組織形成の程度を骨膜側と非骨膜側で比較検討した所、骨膜側では、軟骨細胞領域、肥大軟骨領域、石灰化領域が連続して観察された。分子生物学的検索より、骨膜側の関節軟骨では、II型コラーゲンおよびアグリカンの遺伝子発現が低く制御されることが示唆された。これらの結果から、ヒト指骨モデルでは、付加した骨膜が、指骨および関節軟骨の再生誘導過程で重要な役割を果たすことが示唆された。また、ハイドロキシアパタイト粒子は骨膜による骨および軟骨形成を促進し、ヒト指骨再生誘導を加速する上で極めて有用であることが示唆された。

**Key words :** 再生医学, Tissue engineering, Poly (L-lactide-ε-caprolactone), Hydroxyapatite, 骨膜

## 緒 言

Tissue engineering (組織工学) では、生分解性高分子の足場に細胞を導入し、成長因子の存在下で三次元構造を持つ組織を再生誘導する方法が基本であり、すでに本手技を応用して人工培養軟骨や人工培養骨などの単独組織が作製されている<sup>1-4</sup>。磯貝らのグループは、骨と軟骨組織から構成される複合組織の再生誘導を系統的に追及しており、1999年には生分解性高分子であるポリグリコール酸をヒト指骨の形状に採型し、骨膜を付加して指骨再生を行った。指骨の両端に培養軟骨細胞を播種したポリグリコール酸シートを複合化させて生体内に移植したところ、関節軟骨を有する再生指骨・指関節が再生できることを報告している<sup>5</sup>。しかし、このヒト指骨・指関節モデルでは、ヒト指骨形状に特有な3次元形状を維持することが困難であり、ポリグリコール酸が理想的な素材ではないことも明らかとなっ

た<sup>6-9</sup>。

そこで、従来の欠点を克服するため、ポリ乳酸とポリカプロラク톤の共重合体 P (LA-CL) に注目した<sup>10,11</sup>。P (LA-CL) は、採形が容易で、組織再生に適合する性質を有する生分解性高分子として知られている<sup>12,13</sup>。これまでに P (LA-CL) を骨・軟骨組織の再生誘導に用いた場合、再生硬組織の三次元形状が長期間維持されることが報告されている<sup>14</sup>。一方、骨は、無機のハイドロキシアパタイト (Hydroxyapatite, HA) というリン酸カルシウムと有機のコラーゲンを主体とした成分からなる。HA は、コラーゲン上で高度に組織化して石灰化し、骨伝導による骨形成を促進する<sup>15</sup>。そこでわれわれは、この P (LA-CL) の内部構造に HA 粒子を組み込むことにより、力学的強度と骨伝導能をさらに向上させた新しい骨誘導型の生分解性高分子を開発した。

本研究では、HA 粒子を P (LA-CL) にブレンドした新しい骨誘導型生分解性三次元高分子をヒト指

骨モデルに応用して再生誘導を試み、本モデルにおける骨・軟骨組織の成熟過程および再生能について検討した。骨・軟骨組織の再生誘導には、様々な諸因子が関与する。特に関節軟骨細胞の増殖・分化は、様々なホルモン、増殖因子、骨膜や軟骨膜などによって複雑に制御されている<sup>16-18</sup>。そこで本研究では、特に骨膜に着目し、骨膜が骨形成および関節軟骨細胞の増殖・分化に及ぼす影響について検討した。

### 方法および材料

実験動物は、4～6週齢ヌードマウス（平均体重28 g, 雄, 24匹, Herlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN, USA）を用いた。飼育は、クリーンラック内で室温22°C, 湿度50%, 12時間明暗サイクルの条件下に行った。飼料は、放射線（3 mG）にて滅菌された固形飼料を与え、飲料用水は制限なく与えた。

#### 1. 骨誘導型生分解性三次元高分子の作成

二種類のヒト指骨形状を有する骨誘導型生分解性三次元高分子（ポリマー, 長さ17 mm, 幅7 mm, 高さ5 mm）を準備した。まず、あらかじめ手指の骨標本モデルから準備したヒト指骨形状の鋳型に、ポリマー溶液（5% (w/w) 1,4-dioxaneおよびP (LA-CL) 75:25）を泡立てないように駒込ピペットにて注入して、P (LA-CL) を作成した。同様の方法にて、P (LA-CL) に直径約30 μmのHydroxyapatite (HA) 粒子を混合してHA-P (LA-CL) (70:30 wt%) を作成した。各ポリマーを注入した鋳型を-40°Cの冷蔵庫へ移し、2時間静置した。次に、ポリマーを鋳型より取り出し、40 Pa, -40°C, 12時間の条件下に凍結乾燥 (TF10-80ATA, 宝製作所, 東京) 処理した。最後に真空乾燥 (60°C, 12時間) にてモノマーおよび溶媒の除去を行い、ヒト指骨形状を有する骨誘導型生分解性三次元高分子を作成した。

作成したP (LA-CL) は、分子量367,000 Da, ポリマーの内部はスポンジ構造, 気孔径は50～100 μm, 空隙率は95%, 生体内での分解速度は4～6ヶ月, HA粒子はP (LA-CL) のスポンジ構造内部に組み込まれるように調整した<sup>19</sup>。

#### 2. ヒト指骨モデルの作成

指骨部の作成：新鮮骨膜を、仔ウシ（生後1ヶ月以内）の橈骨骨幹部より骨膜剝離子にて挙上、採取した。採取した骨膜を、ヒト指骨形状を有する生分解性ポリマーの半分のみを全周性に巻き、吸収糸（5-0 Vicryl®, Ethicon, Somerville, NJ, USA）を用いて縫合固定した。その際、骨形成層（Cambium layer）から遊離される骨芽細胞や未分化細胞がポリマー内に遊走できるように、骨形成層をポリマー面

に直接密着させた。作成した骨膜・ポリマー複合体に、あらかじめ10%ウシ胎児血清（Fetal Bovine Serum, FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）、アスコルビン酸50 μg/ml, ペニシリンG 100 unit/ml, ストレプトマイシン100 μg/ml, アンホテリシンB 0.25 μg/mlを添加した調整M199培養液（Gibco, Grand Island, NY, USA）を加え、培養器内（37°C, 5% CO<sub>2</sub>）にて6日間培養した。

関節軟骨部の作成：Klagsbrun<sup>20</sup>の方法に準じて、仔ウシの肩関節より軟骨組織を#10メスにて採取した。採取組織を5×5 mmの大きさに細切したのち、0.3% collagenase type II（Worthington Biochemical, Freehold, NJ, USA）にて37°C, 14時間の条件下に酵素処理をした。ナイロンメッシュ（孔サイズ：300 μm）にて濾過した後、10%ウシ胎児血清, アスコルビン酸50 μg/ml, ペニシリンG 100 unit/ml, ストレプトマイシン100 μg/ml, アンホテリシンB 0.25 μg/mlを添加した調整F12培養液（Gibco, Grand Island, NY, USA）を加えて酵素反応を止めた。得られた軟骨細胞浮遊液は、Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 不含リン酸緩衝液（PBS, Mediatech INC, Herndon, VA, USA）にて、3回洗浄, 遠心分離（4°C, 400 G, 10分間）をした。軟骨細胞浮遊液に調製F12培養液を加えて、細胞濃度を100×10<sup>6</sup>個/mlに調整し、PGA（Gunze Co. Ltd, Kyoto, サイズ：10×10×2 mm）に播種した。細胞・ポリマー複合体は、播種細胞をポリマー表面に細胞接着させるため、培養器（37°C, 5% CO<sub>2</sub>）に入れ、4時間静置した。その後、調製F12培養液を静かに加えて、再度、培養器内（37°C, 5% CO<sub>2</sub>）にて5日間培養した。

ヒト指骨形状モデルの作成：吸収糸にて、指骨部（骨膜・ポリマー複合体）の両端に関節軟骨部（軟骨細胞・ポリマー複合体）を縫合した。作成したヒト指骨形状モデルに調製M199培養液を加え、培養器（37°C, 5% CO<sub>2</sub>）にて24時間培養した。

ヒト指骨モデルの移植と標本採取：麻酔前投薬として、ヌードマウスに硫酸アトロピン（0.04 mg/Kg, Atropine sulfate; Phoenix Scientific Inc, MO, USA）およびトルブタミド（3 mg/kg, Trobugesic N; Dodge Animal Health, IW, USA）を皮下注射した。イソフルラン（Pittman and Moores, Mundelein, IL, USA）による全身麻酔下、ヌードマウスの背部をポピドンヨード（The Purdue Frederick Company, Stamford, CT, USA）にて消毒し、約2 cmの皮膚切開を加えた。皮下を剝離して形成した皮下ポケット内にヒト指骨モデルを挿入し、5-0ナイロン縫合糸（シグマ, 長門石器械店, 東京）を用いて閉創した。移植後、10週目（n=3）お

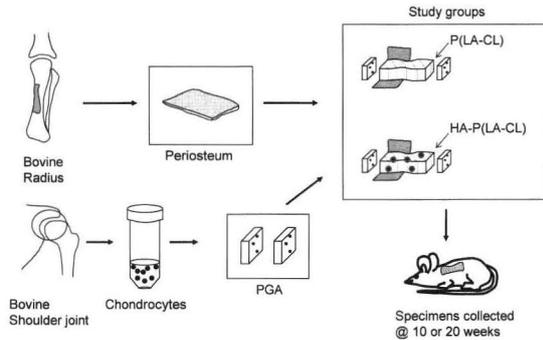


図1 実験プロトコール

よび20週目 (n=3) に移植組織を摘出した。摘出組織は長軸方向に半切し、一方を(1)肉眼的観察、(2)単純X線写真による検索、(3)組織学的検索並びに免疫組織化学による形態学的検索に、他方をRT-PCRを用いた分子生物学的検索に用いた。

実験群は、ヒト指骨モデルに用いた生分解性ポリマー別に、(1)P(LA-CL)群、(2)HA-P(LA-CL)群の2群を設定した(図1)。

### 3. 単純X線による検索

単純X線撮影による検索では、採取組織をX線発生装置(Lorad MIIE, mammoview, Bedford, MA, USA)を用いて、25 kV, 2.4 mA, 0.2秒の条件下にて撮影し、標本における石灰化の有無および範囲を観察した。

### 4. 組織学的検索

採取組織を10%中性ホルマリンにて24時間浸漬固定し、エタノール系列により脱水した後、パラフィン切片(厚さ6 $\mu$ m)を作成した。染色は軟骨細胞一般的性状を調べるためにToluidine blue染色(キシレン:5分 $\times$ 3回, 100%エタノール:5分間 $\times$ 5回, 90%エタノール:3分間, 80%エタノール:3分間, 流水水洗および純水水洗, 0.05% Toluidine blue液:15分, 水洗, イソプロピルアルコール:30秒 $\times$ 3回, キシレン:10分間 $\times$ 4回)を施した。さらに、プロテオグリカン産生状況を調べるためSafranin-O染色, 石灰化の有無および範囲を確認するためにAlizarin red染色(カルシウム)およびvon Kossa染色(リン酸)を施行した。

### 5. 免疫組織化学的検索

再生硬組織を評価するため、I型コラーゲン、II型コラーゲン、X型コラーゲンおよびBSP(Bone sialoprotein)に関する免疫組織化学的検討を行った。

採取組織を10%中性ホルマリンにて24時間浸漬固定し、エタノール系列により脱水した後、10% EDTAにて3週間、脱灰処理を行った。さらに水洗、脱水後、標本をパラフィン包埋し、5 $\mu$ mの切片を薄

切した。切片スライドを焼灼(65 $^{\circ}$ C, 16時間)、脱パラフィン後、0.1% Pronase 溶液にて、タンパク分解酵素処理を行った(37 $^{\circ}$ C, 10分間, 室温, 10分間)。次に、0.3%過酸化水素加メタノールを用いて、内因性ペルオキシダーゼを不活化した(5分間)。さらに、切片のブロッキングを行った(室温, 60分間)。一次抗体は、抗ウシ抗体を希釈して(I型コラーゲン:1000倍, II型コラーゲン:50倍, X型コラーゲン:1000倍, BSP:20倍)反応させた(4 $^{\circ}$ C, 30分間)。二次抗体として、I型コラーゲンでは、Nova red 溶液(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を用い、II型コラーゲン、X型コラーゲンおよびBSPでは、DAB溶液(組成: Diaminobenzidine 20 mg, 30%過酸化水素水, PBS 100 ml)を用いて発色(I型コラーゲン, II型コラーゲンおよびX型コラーゲン:室温, 5分間, BSP:室温, 20時間)させ、ヘマトキシリンで核染色した。

### 6. Real time RT-PCR法を用いた遺伝子発現

再生軟骨組織におけるII型コラーゲン、アグリカン遺伝子発現を検討するため、Real time RT-PCR法を用いて解析を行った。まず、移植後10週目および20週目に摘出した再生硬組織を、正中にて短軸方向に半切し、骨膜付加部および非付加部に分離した。次に、分離した各検体から凍結切片(5~7 $\mu$ m)を作成した後、組織の固定、染色、脱水を行った。続いて、Laser capture装置(PixCell II; ARCTURUS, Mountain View, CA, USA)を用いて、再生軟骨組織より約2,000個の軟骨細胞を選択的に採取し、RNAを抽出した。採取部位は、関節軟骨中層とした。

得られたRNAをdiethylpyrocarbonate(DEPC)処理水に溶解し、紫外可視分光光度計(Eppendorf Biophotometer, Brinkmann Instruments Inc. Westbury, NY, USA)を用いて測定を行った。抽出したRNA 1 $\mu$ gに対して5 $\times$ reaction buffer(4 $\mu$ l), 25 mM MgCl<sub>2</sub>(2.5 $\mu$ l), dithiothreitol(DTT, 2 $\mu$ l), RNase inhibitor(20 unit, 0.5 $\mu$ l), random hexamers(1 $\mu$ l), oligo dT primer(1 $\mu$ l), 10 mM deoxynucleotide triphosphate(dNTP, 2 $\mu$ l)を加えた。各サンプルを2チューブずつ用意し、一方にmultiscribe reverse transcriptase(50 unit/ $\mu$ l, 1 $\mu$ l, Applied Biosystems, Foster city, CA)を加え、もう一方はDEPC処理水を加えminus RTとし、コントロールとした。サンプルにSYBR green master mix(Molecular Probes, Eugene, OR)と0.3 $\mu$ Mのプライマーを加えて、総量30 $\mu$ lに調整した。多くの細胞でほぼ一定に含まれると予想される遺伝子、ハウスキープ遺伝子の一つであるグリセルアル

表1 Real time RT-PCR 法において使用したプライマー

	Sense primer	Antisense primer
TypeII collagen	F315 5'-GCTCATCC AGGGCTCCAA-3'	R404 5'-TGTTTCGT GCAGCCATCCT-3'
aggrecan	F285 5'-CAGGAGC CCCCTGTCT-3'	R367 5'-TGGTCATAGTT CACCTTCAAGAGTTG-3'
GAPDH	F203 5'-GAGATCCTG CCAACATCAAGTG-3'	R290 5'-CCAGCCTTC TCCATGGTAGTG-3'

表2 再生ヒト指骨の三次元計測

Groups	Implant duration	Length	Width periosteum		Thickness periosteum	
			(+)	(-)	(+)	(-)
P(LA-CL)	10 wk	18.8±0.5*	8.3±0.6	6.8±0.8	5.5±0.3	4.2±0.7
	20 wk	19.8±1.3*	7.6±0.5	6.7±0.3	5.3±0.1	4.1±0.3
HA-P(LA-CL)	10 wk	20.7±0.9*	9.1±0.9	7.3±0.5	6.6±0.5	5.0±0.2
	20 wk	24.1±1.5	9.1±1.3	8.3±1.2	6.4±0.1	5.2±0.5

Values are mm in unit and mean±S.D.

\*indicate significant differences at  $p < 0.05$  from value of HA-P(LA-CL) at 20 wk.

デヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) を対照 RNA とし、定量的解析を行った<sup>21</sup>.

PCR 装置は、AMI Prism 7,700 Sequence detector (Applied Biosystems) を使用し、各サンプルの Threshold cycle (Ct) 値を求めた。△Ct = (II型コラーゲンまたはアグリカンの Ct 値) - (GAPDH の Ct 値) とし、△Ct 値を相対的に比較した。また、v. IObl (Applied Biosystems) を用いて dissociation curve を作成し、PCR 産物の融解温度と PCR 産物が純水であることを確認した。PCR の条件は、逆転写37°Cで1時間、変性95°Cで15秒、アニーリング60°Cで30秒、伸長反応を72°Cで2分を1サイクルとして、40サイクル行った。使用したプライマーは、表1に示した。

## 7. 統計処理

RT-PCR の定量的解析において、有意差検定を Wilcoxon test にて行った。統計用ソフトウェアには、GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, Ca, USA) を使用した。

## 結 果

### 1. 肉眼的所見

移植後10週目および20週目に摘出したヒト指骨モデルの両群 (P (LA-CL) 群および HA-P (LA-CL) 群) において、骨膜を付加した部位 (骨膜側) と付加しない部位 (非骨膜側) は、白色の骨膜によって明瞭に区別された。非骨膜側では、ポリマーの周囲はやや赤みを帯びていた。これらの所見より、HA-P (LA-CL) 群の骨膜側では、骨膜からポリマー内

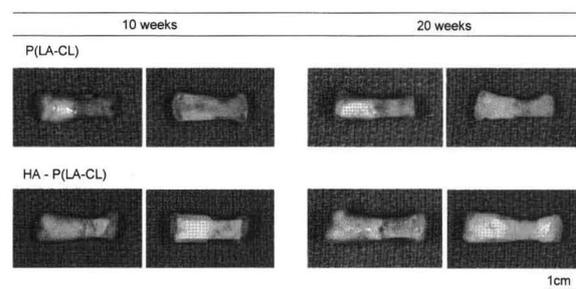


図2 P (LA-CL) 群および HA-P (LA-CL) 群における肉眼所見  
各群の (右) は全体像、(左) は断面像を示す (Bar=1 cm)。

部に遊走した骨形成細胞によって良好な骨形成が生じ、一方、P (LA-CL) の非骨膜側では、周囲血管が直接ポリマー内部に侵入し、強いポリマー分解・吸収が生ずることが示唆された。断面像の観察では、移植後10週目および20週目の骨膜側および非骨膜側の両端において、平滑で白く、柔軟性に富み、著明な光沢を持つ関節軟骨が観察された。関節軟骨は硬い骨組織に強固に接着しており、外観上、その境界は不明瞭であった。

移植経過に伴い、HA-P (LA-CL) 群において、指骨の長さの増加が有意に認められた (表2)。この変化は、特に骨膜側において著明であった (図2)。

### 2. 単純X線写真による所見

移植前の単純X線像において、P (LA-CL) 群では、P (LA-CL) 自体にカルシウム成分が含まれていないため石灰化像は認められなかった。一方、HA-P (LA-CL) 群では、HA 粒子の存在によってびま

ん性の石灰化像を認め、淡いスリガラス様の透過性低下像が観察された。

移植後の骨膜側では、経時的に透過性低下が認められた。P (LA-CL) 群では、移植後10週目において、骨膜下に限局した石灰化を認めるのみであった。移植後20週目では、指骨内部に向かって石灰化領域の拡大を認めた。一方、HA-P (LA-CL) 群では、移植後10週目において、すでに指骨内部に至る石灰化領域を認めた。移植後20週目では、石灰化による透過性はさらに低下し、非骨膜側に拡大していた。この結果から、HA の優れた骨伝導能が示唆された。移植後の非骨膜側では、いずれの群においても明らかな石灰化像は観察されなかった (図3)。

### 3. 組織学的所見

移植後10週目および20週目に摘出したヒト指骨モデルの両群 (P (LA-CL) 群および HA-P (LA-CL))

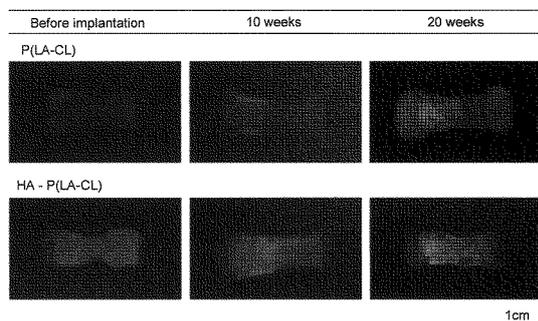


図3 P (LA-CL) 群および HA-P (LA-CL) 群における単純X線写真の所見

P (LA-CL) 群では、骨膜下に限局した石灰化 (移植後10週目)、指骨内部への石灰化の拡大 (移植後20週目) を認めた。一方、HA-P (LA-CL) 群では、指骨内部に至る石灰化 (移植後10週目)、非骨膜側への石灰化の拡大 (移植後20週目) を認めた (Bar=1 cm)。

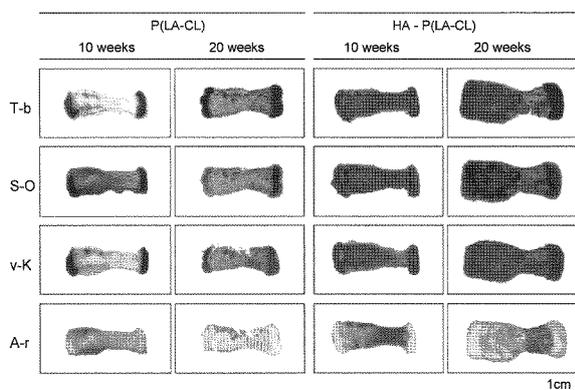


図4 移植後10週目および20週目のヒト指骨モデルにおける組織学的所見

T-b : Toluidine blue 染色, S-O : Safranin-O 染色, v-K : von Kossa 染色, A-r : Alizarin red 染色を示す (Bar=1 cm)。

群) において、骨膜を付加した部位 <骨膜側> では、von Kossa 染色に対して陽性反応を示す石灰化領域が観察された。P (LA-CL) 群では、移植後20週目において、骨膜下に限局した陽性領域が認められた。一方、HA-P (LA-CL) 群では、骨膜下の陽性領域は移植後10週目に認められ、移植後20週目では陽性領域が指骨内部へ拡大していた。非骨膜側では、von Kossa 染色に対する陽性領域は観察されなかった。また、骨膜側および非骨膜側の両端 (関節軟骨部) では、両群の移植後10週目および20週目において、Safranin-O 染色陽性反応を示す軟骨組織が観察された (図4)。

移植後10週目における組織学的所見 : Safranin-O 染色を用いて、両群 (P (LA-CL) 群および HA-P (LA-CL) 群) における骨膜側および非骨膜側の両端 (関節軟骨部) を比較検討した。さらに骨膜側および非骨膜側の境界部を観察した。

P (LA-CL) 群の骨膜側および非骨膜側の両端 (関節軟骨部) は、Safranin-O 染色によって陽性反応を示した。軟骨細胞の形状は大小不同で、不規則な細胞配列が観察された。境界部では、Safranin-O 染色に対する陽性領域は認められなかった (図5)。一方、HA-P (LA-CL) 群の骨膜側および非骨膜側の両端 (関節軟骨部) は、P (LA-CL) 群と同様な組織所見を認めた。しかし境界部では、骨膜側の指骨内部の広い範囲に Safranin-O 染色に対する陽性領域が認められた (図6)。

次に von Kossa 染色を用いて、両群 (P (LA-CL) 群および HA-P (LA-CL) 群) の骨膜側および非骨膜側における石灰化領域を検討した。P (LA-CL) 群の骨膜側では、骨膜下に限局した陽性領域が認められ、石灰化は少ないことが判明した。一方、HA-

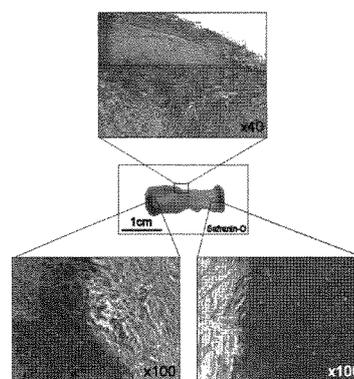


図5 移植後10週目の P (LA-CL) 群における組織学的所見

(上段) 骨膜および非骨膜の境界部 (Safranin-O 染色,  $\times 40$ )

(中断) 断面像 (Safranin-O 染色, Bar=1 cm)

(下段) 関節軟骨部 (Safranin-O 染色,  $\times 100$ )

P (LA-CL) 群の骨膜側では、骨膜下の陽性領域は、P (LA-CL) 群に比較して、より広い範囲に認められた。非骨膜側では、いずれの群においても von Kossa 染色に対する陽性領域は観察されなかった (図 7)。

移植後20週目における組織学的所見：両群 (P (LA-CL) 群および HA-P (LA-CL) 群) の骨膜側および非骨膜側の両端 (関節軟骨部) は、移植10週目に比較して、Safranin-O 染色に対する強い陽性反応を示した。この結果から、移植20週目では、軟骨細胞外基質であるプロテオグリカンが豊富に存在することが判明した。

P (LA-CL) 群の骨膜側および非骨膜側の両端 (関節軟骨部) では、10週目と同様な軟骨組織性状 (細胞は大小不同で、不規則な細胞配列) が観察された。境界部では、骨膜下の小範囲において Safranin-O 染色に対する陽性領域が認められた (図 8)。一方、

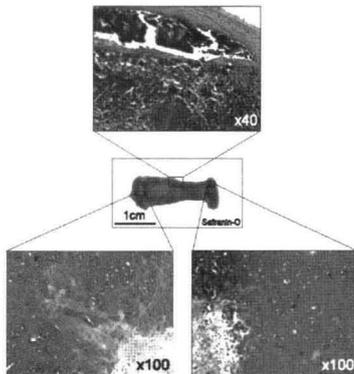


図 6 移植後10週目の HA-P (LA-CL) 群における組織学的所見  
(上段) 骨膜および非骨膜の境界部 (Safranin-O 染色,  $\times 40$ )  
(中斷) 断面像 (Safranin-O 染色, Bar=1 cm)  
(下段) 関節軟骨部 (Safranin-O 染色,  $\times 100$ )

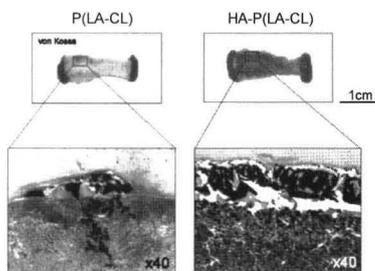


図 7 移植後10週目の P (LA-CL) 群および HA-P (LA-CL) 群における組織学的所見  
(上段) 断面像 (von Kossa 染色, Bar=1 cm)  
(下段) 境界部 (von Kossa 染色,  $\times 40$ )  
HA-P (LA-CL) 群の骨膜側では、P (LA-CL) 群に比較して骨膜下に von Kossa に対する陽性領域が広範囲に認められた。非骨膜側では、いずれの群においても von Kossa 染色に対する陽性領域は観察されなかった。

HA-P (LA-CL) 群の骨膜側の関節軟骨部では、石灰化層の表層に肥大化した軟骨細胞が観察され、それらの細胞は規則的な柱状配列を呈していた。しかし、非骨膜側の関節軟骨部では、このような軟骨細胞の配列構造は確認できず、表層から深層の全域に、大小不同で円形の軟骨細胞が散在していた。境界部では、骨膜側の指骨内部の広い範囲において、Safranin-O 染色に対する陽性領域が認められた (図 9)。

次に von Kossa 染色を用いて石灰化領域を検討した。P (LA-CL) 群の骨膜側では、指骨内部に限

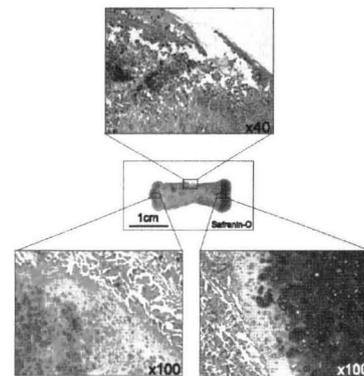


図 8 移植後20週目の P (LA-CL) 群における組織学的所見  
(上段) 境界部 (Safranin-O 染色,  $\times 40$ )  
(中斷) 断面像 (Safranin-O 染色, Bar=1 cm)  
(下段) 関節軟骨部 (Safranin-O 染色,  $\times 100$ )  
骨膜側および非骨膜側の関節軟骨は、移植後10週目に比較して強い Safranin-O 染色陽性反応を示した。境界部では、骨膜下の小範囲に陽性領域を認めた。

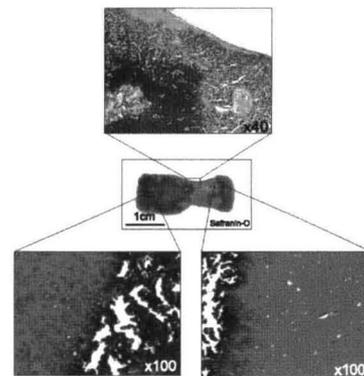


図 9 移植後20週目の HA-P (LA-CL) 群における組織学的所見  
(上段) 境界部 (Safranin-O 染色,  $\times 40$ )  
(中斷) 断面像 (Safranin-O 染色, Bar=1 cm)  
(下段) 関節軟骨部 (Safranin-O 染色,  $\times 100$ )  
骨膜側の関節軟骨では、軟骨細胞の柱状配列が観察された。非骨膜側では、大小不同で不規則な細胞配列を認め、軟骨細胞の柱状配列は認められなかった。境界部では、骨膜側の指骨内部の広範囲に陽性反応領域を認めた。

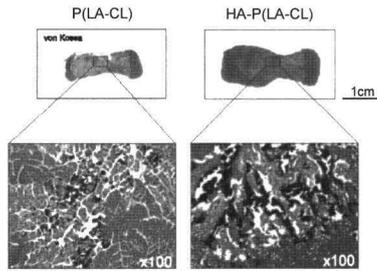


図10 移植後20週目の P (LA-CL) 群および HA-P (LA-CL) 群における組織学的所見 (上段) 断面像 (von Kossa 染色, Bar=1 cm) (下段) 境界部 (von Kossa 染色, ×40) P (LA-CL) 群では, 指骨内部に局限した陽性領域を認められたが, HA-P (LA-CL) 群では, 指骨全体に及ぶ陽性領域を認めた。

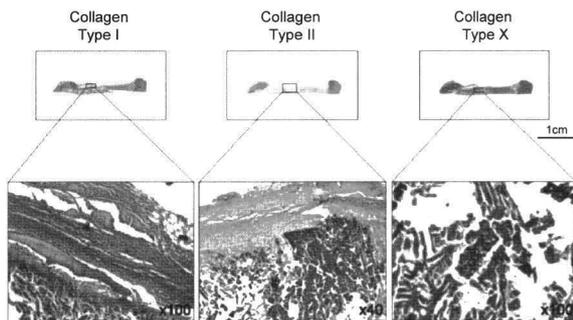


図11 移植後20週目の P (LA-CL) 群における免疫組織化学的所見 (上段) 断面像 (I, II, X型コラーゲン染色, Bar=1 cm) (下段) 骨膜部 (I型コラーゲン染色; ×100, II型コラーゲン染色; ×40, X型コラーゲン染色; ×100) I型コラーゲン染色では骨膜および骨梁に, II型コラーゲン染色では指骨表層に, X型コラーゲン染色では骨梁の下部に陽性領域を認めた。

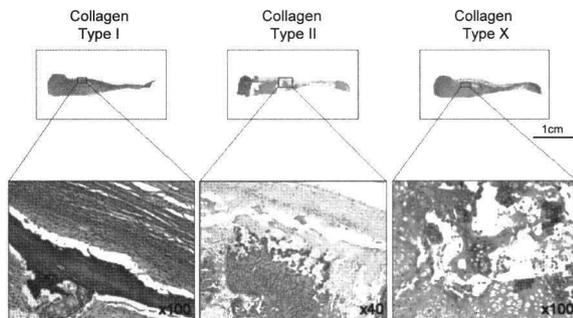


図12 移植後20週目における HA-P (LA-CL) 群の免疫組織化学的所見 (上段) 断面像 (I, II, X型コラーゲン染色, Bar=1 cm) (下段) 骨膜部 (I型コラーゲン染色; ×100, II型コラーゲン染色; ×40, X型コラーゲン染色; ×100) I型コラーゲンと I型コラーゲン染色における陽性領域の中間部に一致して, X型コラーゲン染色陽性領域を認めた。

局した陽性領域が認められた。一方, HA-P (LA-CL) 群の骨膜側では, 指骨内部の全体が陽性反応を示し, 石灰化が指骨の全域に及んでいることが判明した。この結果から, 両群 (P (LA-CL) 群および HA-P (LA-CL) 群) において, 初期石灰化は骨膜下に局限されるが, 経時的に石灰化領域は指骨内部に拡大すると考えられた。また, P (LA-CL) 群と比較して, HA-P (LA-CL) 群では移植早期から強い石灰化が誘導されることが判明した。非骨膜側では, いずれの群においても von Kossa 染色に対する陽性領域は観察されなかった (図10)。

移植後20週目における免疫組織学的所見: I, II, X型コラーゲン免疫染色では, P (LA-CL) 群および HA-P (LA-CL) 群の骨膜側において, 近似する発現領域が観察された (図11, 12)。特に, HA-P (LA-CL) 群の骨膜側では, I型コラーゲン免疫染色によ

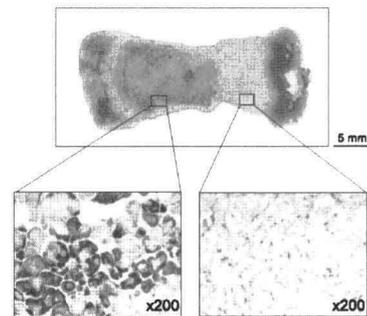


図13 移植後20週目の P (LA-CL) 群における免疫組織化学的所見 (上段) 断面像 (BSP 染色, Bar=5 mm) (下段) 骨膜部および非骨膜部 (BSP 染色, ×200) 骨膜側の指骨部全体に BSP 陽性領域が観察された。非骨膜側では, BSP 陽性領域は観察されなかった。

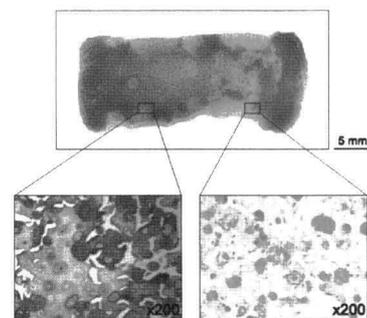


図14 移植後20週目の HA-P (LA-CL) 群における免疫組織化学的所見 (上段) 断面像 (BSP 染色, Bar=5 mm) (下段) 骨膜部および非骨膜部 (BSP 染色, ×200) 骨膜側から非骨膜側へ向かって BSP 陽性領域の拡大が認められ, 陽性・陰性境界部は著しく非骨膜側に変位していた。

って、指骨部の表層組織である骨膜および骨梁に限局して陽性領域が認められた。骨梁の深層では、大型、円形の軟骨細胞が規則正しく柱状配列していた。この領域は、II型コラーゲン免疫染色による陽性領域に一致していた。X型コラーゲン免疫染色による陽性領域は、柱状配列する肥大軟骨細胞層の最も骨梁側に観察された。この部位は、I型コラーゲン陽性領域とII型コラーゲン陽性領域の中間部に一致していた(図12)。この結果から、指骨部は内軟骨骨化の機序を経て骨形成が生じることが推察された。非骨膜側では、いずれの群においても、I, II, X型コラーゲン免疫染色に対する陽性領域は観察されなかった。

次にBSP免疫染色では、P(LA-CL)群およびHA-P(LA-CL)群の両群において、骨膜を付加した部位(骨膜側)の指骨部全体にBSP陽性領域が観察された(図13, 14)。骨膜を付加しない部位(非骨膜側)では、BSP陽性領域は観察されなかった。さらに、HA-P(LA-CL)群では、骨膜側から非骨膜側へ向かってBSP陽性領域の拡大が認められ、陽性領域と陰性領域の境界部は非骨膜側に著しく変位していた(図14)。この結果より、HA粒子によってBSP発現は著しく亢進されることが示唆された。

#### 4. 分子生物学的解析所見

RT-PCR法を用いて遺伝子解析を行い、指骨部に付加した骨膜が関節軟骨細胞の増殖・分化に及ぼす影響について検討した。Laser capture microdissection法を導入して、ヒト指骨モデルの関節軟骨細胞

非選択的に捕捉(capture)した。その後、捕捉細胞群における軟骨関連遺伝子(II型コラーゲン、アグリカン)の経時的变化を調べ、再生軟骨組織の制御機構を検討した。その結果、II型コラーゲンおよびアグリカンの遺伝子発現は、P(LA-CL)群およびHA-P(LA-CL)群の両群において経時的に上昇する傾向を示した。また、非骨膜側に比較して骨膜側の関節軟骨では、弱い遺伝子発現が認められた。さらに、II型コラーゲンの遺伝子発現はP(LA-CL)群において、アグリカンの遺伝子発現はHA-P(LA-CL)群において増強される傾向が認められた(図15)。

### 考 察

骨膜には、(1)多能性未分化間葉系細胞から分化する骨・軟骨細胞の供給源、(2)骨・軟骨細胞が増殖する足場、(3)細胞増殖因子の供給源としての三つの役割があることが知られている<sup>22</sup>。組織学的には、表層の厚い線維層と、深層の薄い骨形成層からなる二層構造によって構成されている。骨形成層には、トルイジン青染色によって好塩基性に染色される多数の骨形成細胞(多能性未分化間葉系細胞)が存在し、これらは骨および軟骨細胞に分化する。骨膜は、骨形成細胞の増殖・分化を通して骨成長(付加成長)に関与し、骨の厚さと強度を増す<sup>23</sup>。また、加齢に伴い骨膜を構成する骨形成層の厚さと細胞数は著明に減少し、骨成長能は低下する<sup>22,24</sup>ことが知られている。近年、骨膜に関するより詳細な研究がなされ、骨幹部と骨幹部では、骨膜構造が異なっていることが報告された。骨幹部部の骨膜は、骨形成層が厚く、細胞数も多い特徴が認められる。また、加齢に伴う構造上の変化は認められない。一方、骨幹部の骨膜は、骨幹部部に比較して薄く、加齢に伴い骨形成層の厚さ、細胞数はともに著しく減少することが報告された<sup>25</sup>。さらに、骨膜は、TGF- $\beta$ 、IGF-1、BMP-2、integrinsなどの様々な細胞成長因子を遊離し<sup>22</sup>、関節軟骨の構造および細胞外基質の調節機構に深く関与することが示唆されている。特に、骨膜より遊離されるTGF- $\beta$ 、関節軟骨の最表面に存在する静止軟骨層より遊離されるPTHrP、増殖軟骨層より遊離されるIhhはFeed back loopを形成し、骨膜が関節軟骨をシグナル制御している機序<sup>26-34</sup>が解明された。ヒト指骨モデルにおいて、骨膜は新生硬組織の成熟過程に大きな役割を果たしていることが推察される。しかし、骨形成過程および関節軟骨の制御機構における骨膜の関与について未だにその詳細は解明されておらず極めて興味深い。

本研究では、ヒト指骨モデルに対して組織学的検

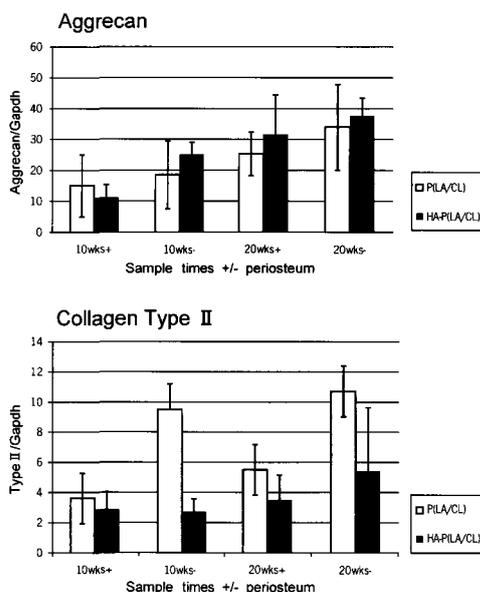


図15 移植後20週目におけるアグリカンおよびII型コラーゲンの遺伝子発現  
(上段) アグリカン遺伝子発現  
(下段) II型コラーゲン遺伝子発現

討を行い、関節軟骨における組織形成の度合いを、骨膜側と非骨膜側で比較検討した。また遺伝子解析を行い、指骨部に付加した骨膜が関節軟骨細胞の増殖・分化に及ぼす影響について検討した。移植20週目の HA-P (LA-CL) 群の骨膜側と非骨膜側の関節軟骨部を比較すると、軟骨細胞の性状と配列は明らかに異なっていた。特に、骨膜側の関節軟骨部では、増殖軟骨領域、肥大軟骨領域、石灰化領域が連続して観察され、正常関節軟骨に近似した関節軟骨構造が観察された。肥大化した軟骨細胞は規則的に柱状配列しており、骨膜が軟骨細胞の形状変化や構造に関与していることが示唆された。また RT-PCR 法を用いた遺伝子解析では、II型コラーゲンおよびアグリカンの遺伝子発現は、P(LA-CL)群および HA-P (LA-CL) 群の両群において、移植期間にかかわらず非骨膜側の関節軟骨では強く、骨膜側の関節軟骨では弱い発現を示した。このため、骨膜は軟骨細胞の遺伝子発現を制御し、II型コラーゲンおよびアグリカンの発現に対して抑制的に作用すると考えられた。

II型コラーゲンやアグリカンは、軟骨の代表的な細胞外基質で、その遺伝子発現は軟骨細胞に特異的に認められる。これらの遺伝子の制御機構は十分に明らかにされていない。近年、未分化間葉系細胞が前軟骨細胞に分化するためには転写因子 Sox9 の発現が必要であり、さらに前軟骨細胞が軟骨芽細胞に分化するためには転写因子 Sox5 と Sox6 が必要であることが報告された<sup>35</sup>。軟骨細胞外基質の産生には、したがって、これらの転写因子の発現が必要であり、転写因子が発現する結果、II型コラーゲンやアグリカン遺伝子発現が誘導される機序が示唆されている。転写因子 Sox5, Sox6 欠損マウスでは、軟骨細胞は分化度の低い前軟骨細胞に止まる。この欠損マウスでは、II型コラーゲン発現は認められるが、アグリカン発現は認められないことが報告された<sup>35</sup>。この結果から、II型コラーゲンは分化度の低い軟骨細胞（前軟骨細胞）から基質産生されるが、アグリカンはより分化度の高い軟骨細胞（軟骨芽細胞）から基質産生されることが示唆された。

本研究では、ヒト指骨を再生誘導するため二種類の骨誘導型生分解性三次元高分子、P (LA-CL) および HA-P (LA-CL)、を試用して、その両端（関節軟骨部）に軟骨細胞を播種した PGA を縫合してヒト指形状モデルを作成した。関節軟骨部の遺伝子発現を検討した結果、II型コラーゲンの遺伝子発現は P (LA-CL) 群において、アグリカンの遺伝子発現は HA-P (LA-CL) 群において増強される傾向が認められた。関節軟骨の遺伝子発現に影響する因子

として、これまで酸素分圧の関与が示唆されている。関節軟骨では、酸素分圧勾配が軟骨表面において約10%、最も深い層においては1%以下であり、この勾配が、軟骨細胞の遺伝子表現型や性質を調節していると考えられている<sup>36,37</sup>。今回の結果より、軟骨形成は、酸素分圧の他に、生分解性高分子の種類、もしくは再生誘導された骨組織の成熟度に強く影響される可能性が考えられた。

正常の関節軟骨の形成過程では、骨端に近い一定の層（静止軟骨層）において軟骨細胞の分裂が起これ、新生軟骨細胞が順次骨幹の方へ送られて増殖軟骨層を形成する。骨幹に近づくに連れ、軟骨細胞は柱状に配列し、細胞は肥大化（肥大軟骨層）、さらには石灰化（石灰化軟骨層）する。やがて骨芽細胞の作用により骨組織へと置換されて石灰化軟骨層の下部には海綿骨が形成される。このように関節軟骨では、骨端部の新生軟骨細胞がしだいに増殖・分化して成長帯を形成しながら、順次骨化し、骨は長軸方向に成長することが報告された<sup>38</sup>。近年、幹細胞に隣接する微小環境（niche）が、幹細胞の自己増殖と分化の制御に重要な役割を果たすと考えられ、その解明が急がれている。軟骨再生 niche に関する報告では、軟骨細胞・ポリマー複合体が皮下移植された場合、本来、軟骨細胞へ分化すべき幹細胞がその表現型を失い、安定した軟骨形成が困難となることが知られている<sup>39,40</sup>。Liu らは、ヒト骨髄幹細胞を PGA に播種し、in vitro 環境下に4~12週間培養した後、軟骨細胞・ポリマー複合体をヌードマウス皮下に移植した。その結果、in vitro における培養期間が8週間以下の場合、移植後、複合体に骨化が生じた。一方、培養期間が12週間の場合、移植後、複合体より軟骨が再生誘導されたと報告している。このことから、in vitro 環境下において軟骨細胞の分化誘導が不完全な場合、in vivo 環境下において軟骨細胞が細胞表現型を保持し、安定した異所性軟骨を形成することは困難であることが示された<sup>41</sup>。本研究によって再生誘導されたヒト指モデルの骨膜側では、移植期間中に成長帯様の組織構造が関節軟骨部および指骨部において観察された。再生誘導されたヒト指モデルが指骨の長軸方向に成長することから、骨膜より遊離されたと推測される幹細胞および播種軟骨細胞が、正常と近似する分化誘導過程を経て成熟しうることが判明した。

骨シアロタンパク（Bone Sialoprotein, BSP）は、骨に存在する二種類のシアロタンパク質の一つである。BSP は分子量70,000~80,000で、ほぼ骨に特有なタンパク質である。BSP は骨芽細胞によって合成され、RGD (Arg-Glu-Asp) 細胞接着配列によって

骨芽細胞および破骨細胞の基質への接着を促進し、グルタミン酸の連続配列によって HA 表面に吸着し平面的石灰化 (plate-like HA) を形成する<sup>42,43</sup>。近年の報告<sup>44,45</sup>によると, BSP は新しく形成された類骨に分布し, 石灰化軟骨と初期類骨のコラーゲン線維間の相互に作用して, 骨形成の初期に重要な役割を果たしていると考えられている。これまでの *in vitro* の実験から, BSP および OPN は HA に結合して HA 結晶核形成に関与することが判明している<sup>46,47</sup>。特に BSP は, カルシウムおよび HA に結合して高い骨形成能を有している<sup>48</sup>。本研究では, 骨膜を付加した部位 (骨膜側) の指骨部全体に BSP 陽性領域が免疫染色において観察された。さらに, 移植後20週目の HA-P (LA-CL) 群では, 骨膜側から非骨膜側へ向かって BSP 陽性領域は著明に拡大し, HA 粒子によって BSP 発現は著しく亢進されることが判明した。この結果より, ヒト指骨の再生誘導を行う上で, BSP は HA 粒子に結合することにより骨形成を著しく促進し, ヒト指骨モデルの再生誘導を加速する上で極めて有用であることが示唆された。

## 結 語

本実験では, 指骨形状を有する骨誘導型生分解性三次元高分子 (P (LA-CL) および HA-P (LA-CL)) に, 骨膜および培養軟骨細胞を付加してヒト指骨モデルを作成した。これを免疫不全マウスに移植して, 指骨と関節軟骨から構成される複合硬組織の再生誘導を試みた。その結果, ヒト指骨の再生誘導において, 骨膜は, 骨形成細胞の供給源として骨形成に深く関与するのみならず, 関節軟骨細胞の成熟過程やヒト指骨の成長にも深く関与していることが強く示唆された。これらの結果より, ヒト指骨の再生誘導をする上で, 骨膜の付加は不可欠であると考えられた。また, HA 粒子を組み込んだ骨誘導型生分解性三次元高分子は, 骨膜による骨および関節軟骨の形成過程を促進するため, 指骨モデルの再生誘導を加速する上で極めて有用であることが判明した。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました磯貝典孝教授に深謝申し上げます。また, 本実験を遂行するにあたり, 御協力を頂きました Northeastern Ohio Universities Colleges of Medicine and Pharmacy Integrative Medical Science William J. Landis 教授に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

1. Chung C, Burdick JA (2008) Engineering cartilage tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 243-262

2. Lin Z, Willers C, Xu J, Zheng MH (2006) The chondrocyte: biology and clinical application. *Tissue Eng* 12: 1971-1984

3. Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, Laurencin CT (2008) Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *J Bone Joint Surg Am Suppl* 1: 36-42

4. Malicev E, Marolt D, Kregar Velikonja N, Kreft ME, Drobnic M, Rode M (2008) Growth and differentiation of alveolar bone cells in tissue-engineered constructs and monolayer cultures. *Biotechnol Bioeng* 100: 773-781

5. Isogai N, Landis W, Vacanti JP (1999) Formation of phalanges and small joints by tissue engineering. *J Bone Joint Surg* 81A: 306-316

6. Isogai N, Landis W (2001) Phalanges and small joints. In: Atla A, Lanza R, editors. *Methods of tissue engineering*. San Diego Academic Press: 1041-1047

7. Chubinskaya S, Isogai N, Landis W (2004) Characterization of the cellular origin of a tissue-engineered human phalanx model by *in situ* hybridization. *Tissue Eng* 10: 1204-1213

8. Landis W, Jacquet R, Isogai N (2005) The potential of tissue engineering in orthopedics. *Orthop Clin N Am* 36: 97-104

9. Potter K, Isogai N, Landis W (2006) Non-destructive studies of tissue-engineered phalanges by magnetic resonance microscopy and X-ray microtomography. *Bone* 38: 350-358

10. Honda M, Yada T, Ueda M, Kimata K (2000) Cartilage formation by cultured chondrocytes in a new scaffold made of poly (L-lactide-epsilon-caprolactone) sponge. *J Oral Maxillofac Surg* 58: 767-775

11. Watanabe M, Shinoka T, Tohyama S, Hibino N, Konuma T, Matsumura G, Kosaka Y, Ishida T, Imai Y, Yamakawa M, Ikada Y, Morita S (2001) Tissue-engineered vascular autograft: inferior vena cava replacement in a dog model. *Tissue Eng* 7: 429-439

12. Yamada K, Miyamoto S, Nagata I, Kikuchi H, Ikada Y, Iwata H, Yamamoto K (1997) Development of a dural substitute from synthetic bioabsorbable polymers. *J Neurosurg* 86: 1012-1017

13. Yamada K, Miyamoto S, Takayama M, Nagata I, Hashimoto N, Ikada Y, Kikuchi H (2002) Clinical application of a new bioabsorbable artificial dura mater. *J Neurosurg* 96: 731-735

14. Isogai N, Asamura S, Higashi T, Ikada Y, Morita S, Hillyer J, Jacquet R, Landis W (2004) Tissue engineering of an auricular cartilage model utilizing cultured chondrocyte-poly (L-lactide-epsilon-caprolactone) scaffolds. *Tissue Eng* 10: 673-687

15. Baht GS, Hunter GK, Goldberg HA (2008) Bone sialoprotein-collagen interaction promotes hydroxyapatite nucleation. *Matrix Biol* 2008 Jun 24

16. Adams SL, Cohen AJ, Lassoova L (2007) Integration of signaling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation. *J Cell Physiol*

- 213: 635-641
17. Vortkamp A (2001) Interaction of growth factors regulating chondrocyte differentiation in the developing embryo. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001; 9 Suppl A: S109-117
  18. Di Nino DL, Long F, Linsenmayer TF (2001) Regulation of endochondral cartilage growth in the developing avian limb: cooperative involvement of perichondrium and periosteum. *Dev Biol* 240: 433-442
  19. 和田仁孝 (2006) 新たな骨誘導型生分解性ポリマーを用いた指骨の再生誘導. *近畿大医誌*31: 203-213
  20. Klagsbrun M (1979) Large-scale preparation of chondrocytes. *Methods Enzymol* 58: 560-564
  21. Jacquet R, Landis W (2005) Analysis of connective tissues by laser capture microdissection and reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Analytical biochem* 337: 22-34
  22. O'Driscoll SW, Fitzsimmons JS. (2001) The role of periosteum in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*. 391 Suppl: S190-207
  23. Kwon DS, Spevak MR, Fletcher K, Kleinman PK (2002) Physiologic subperiosteal new bone formation: prevalence, distribution, and thickness in neonates and infants. *AJR Am J Roentgenol* 179: 985-988
  24. Szule P, Seeman E, Duboeuf F, Sornay-Rendu E, Delmas P (2006) Bone fragility: failure of periosteal apposition to compensate for increased endocortical resorption in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 21: 1856-1863
  25. Fan W, Crawford R, Xiao Y (2008) Structural and cellular differences between metaphyseal and diaphyseal periosteum in aged rats. *Bone* 42: 81-89
  26. Alvarez J, Horton J, Sohn P, Serra R (2001) The perichondrium plays an important role in mediating the effects of TGF-beta1 on endochondral bone formation. *Dev Dyn* 221 311-321
  27. Fauchoux C, Nicholls BM, Allen S, Danks JA, Horton MA, Price JS (2004) Recapitulation of the parathyroid hormone-related peptide-Indian hedgehog pathway in regenerating deer antler. *Dev Dyn* 231: 88-97
  28. Bandyopadhyay A, Kubilus JK, Crochiere ML, Linsenmayer TF, Tabin CJ (2008) Identification of unique molecular subdomains in the perichondrium and periosteum and their role in regulating gene expression in the underlying chondrocytes. *Dev Biol* 2008 Jun 16
  29. Goldring MB, Tsuchimori K, Ijiri K (2006) The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97: 33-44
  30. de Crombrugge B, Lefebvre V, Nakashima K (2001) Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol* 13: 721-727
  31. Henry M. Kronenberg (2003) Developmental regulation of the growth plate. *NATURE* 423: 332-336
  32. Sylvain Provot, Ernestina Schipani (2005) Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 658-665
  33. B. Frank Eames, Luis de la Fuente, Jill A. Helms (2003) Molecular Ontogeny of the Skeleton. *Birth Defects Research (Part C)* 69: 93-101
  34. R. Tracy Ballock, Regis J. O'Keefe (2003) Current Concepts Review The Biology of the Growth Plate. *J Bone Joint Surg*; 85, 4; ProQuest Nursing Journals: 715-725
  35. Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrugge B, Lefebvre V (2001) The transcription factors L-Sox and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev cell* 1: 277-290
  36. Grimshaw MJ, Mason RM (2000) Bovine articular chondrocyte function in vitro depends upon oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage* 8: 386-392
  37. Kawanishi M, Oura A, Furukawa K, Fukubayashi T, Nakamura K, Tateishi T, Ushida T (2007) Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes enhanced by cyclic hydrostatic pressure under a gas-controlled system. *Tissue Eng* 13: 957-964
  38. Baron RE (1996) Anatomy and ultrastructure of bone. : Favus MJ. (1996) Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, 3rd ed. New York, Lippicott-Raven, pp3
  39. Kolf CM, Cho E, Tuan RS (2007) Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 9: 204
  40. Kindler V (2005) Postnatal stem cell survival: does the niche, a rare harbor where to resist the ebb tide of differentiation, also provide lineage-specific instructions? *J Leukoc Biol* 78: 836-844
  41. Liu K, Zhou GD, Liu W, Zhang WJ, Cui L, Liu X, Liu TY, Cao Y (2008) The dependence of in vivo stable ectopic chondrogenesis by human mesenchymal stem cells on chondrogenic differentiation in vitro. *Biomaterials* 29: 2183-2192
  42. Pao H, Tao J, Xu X, Tang R (2007) Adsorption processes of Gly and Glu amino acids on hydroxyapatite surfaces at the atomic level. *Langmuir* 23: 8972-8981
  43. Harris NL, Rattray KR, Tye CE, Underhill TM, Somerman MJ, D'Errico JA, Chambers AF, Hunter GK, Goldberg HA (2000) Functional analysis of bone sialoprotein: identification of the hydroxyapatite-nucleating and cell-binding domains by recombinant peptide expression and site-directed mutagenesis. *Bone* 27: 795-802
  44. Fujiwara R, Mizuno M (2003) A model Peptide of Bone Sialoprotein (BSP) That supports Development of Osteoclast-like Cells on Hydroxyapatite. *Connective Tissue* 35: 141-145
  45. Takai H, Ogata Y (2007) Effect of Androgen Receptor on Bone Sialoprotein Gene Transcription. *Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi* 49: 27-36
  46. Wazen RM, Tye CE, Goldberg HA, Hunter GK, Smith CE, Nanci A (2007) In vivo functional analysis of polyglutamic acid domains in recombinant bone sialoprotein. *J Histochem Cytochem* 55: 35-42

47. Goldberg HA, Warner KJ, Li MC, Hunter GK (2001) Binding of bone sialoprotein, osteopontin and synthetic polypeptides to hydroxyapatite. *Connect Tissue Res* 42 : 25-37
48. Ganss B, Kim RH, Sodek J (1999) Bone Sialoprotein *Crit Rev Oral Biol Med* 10 : 79-98