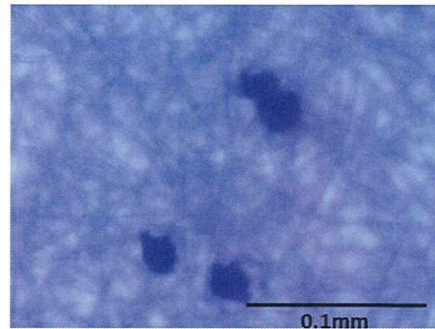
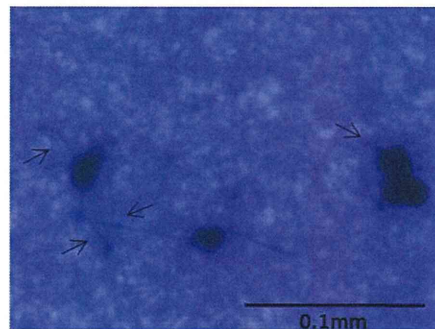


図6. リン酸緩衝溶液への浸漬前後の AG-VP-ポリ L-乳酸複合ナノファイバー不織布の走査型電子顕微鏡像

ポリ-L-乳酸



AG73ペプチド/ポリ-L-乳酸



AG-VP/ポリ-L-乳酸

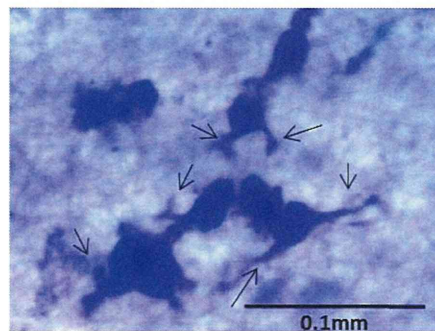


図7. 各ナノファイバー不織布上での PC12 細胞の接着と神経突起伸長

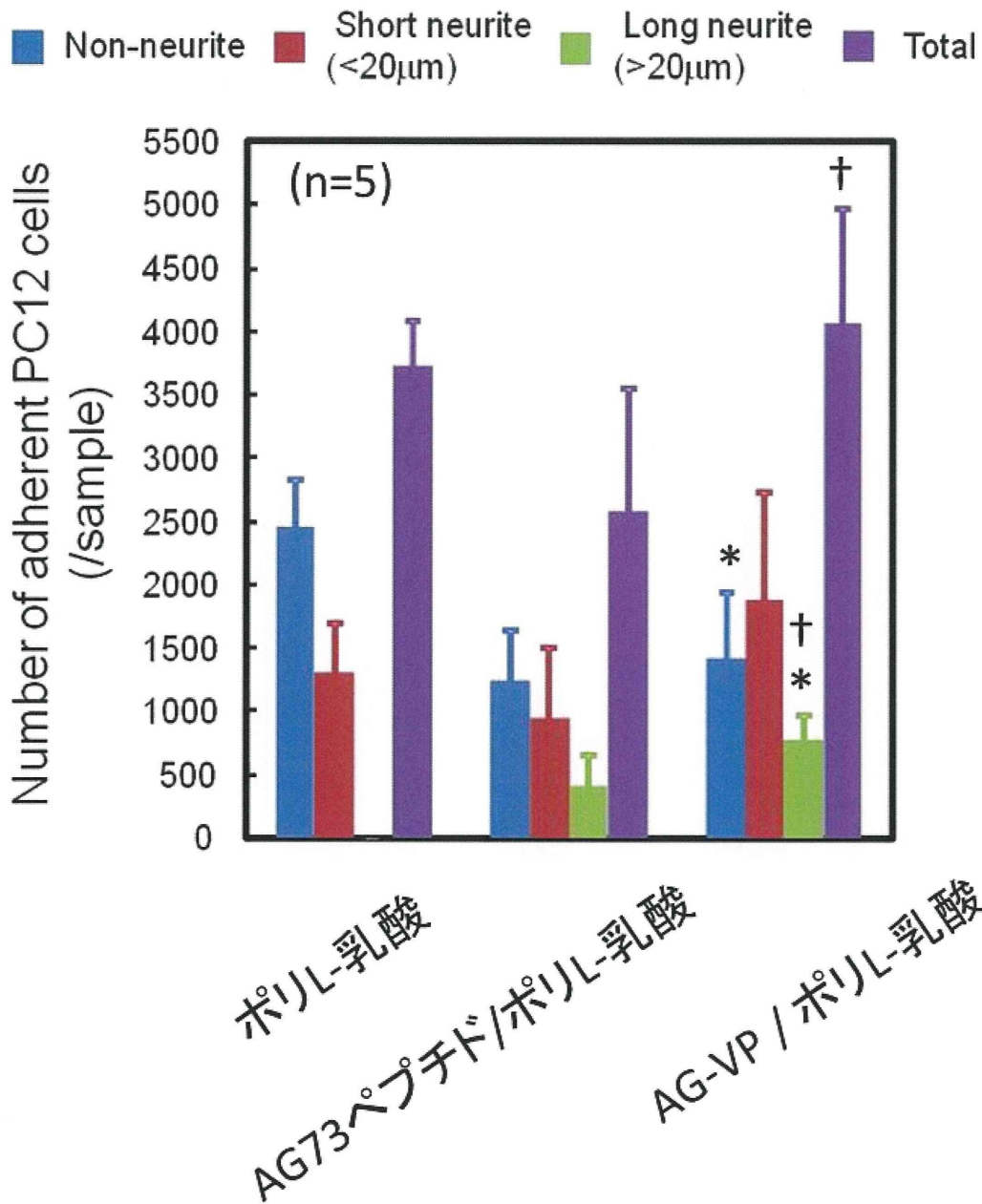
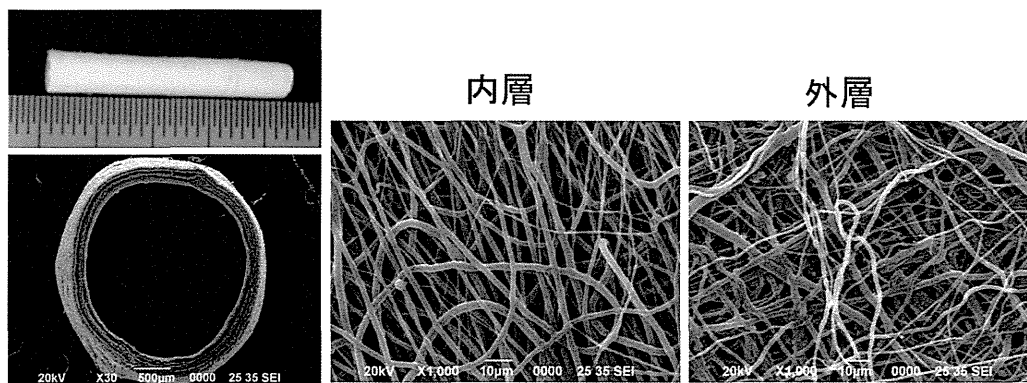
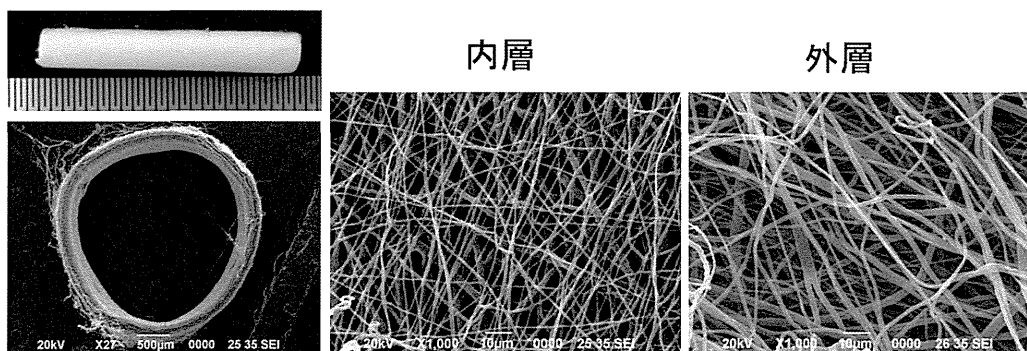


図8. 各ナノファイバー不織布上での PC12 細胞の接着数と神経突起伸長の定量 (* p < 0.05 vs. ポリ L-乳酸、† p < 0.05 vs. AG73ペプチド/ポリ L-乳酸)

ポリ-L-乳酸



AG73ペプチド/ポリ-L-乳酸



AG-VP/ポリ-L-乳酸

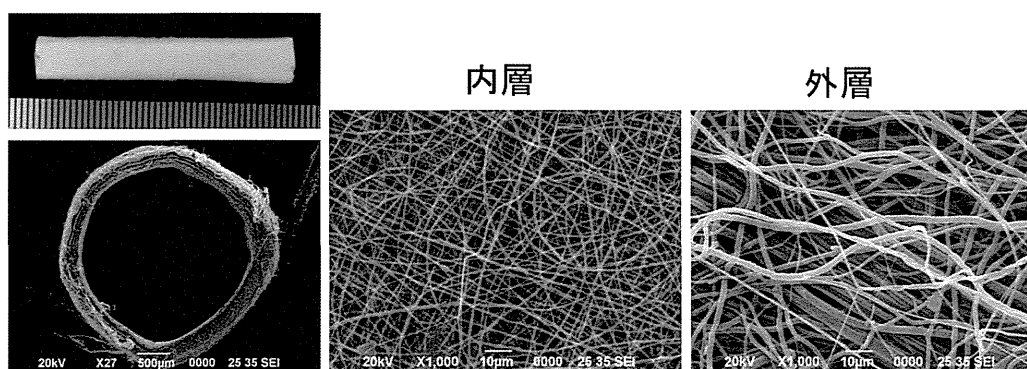
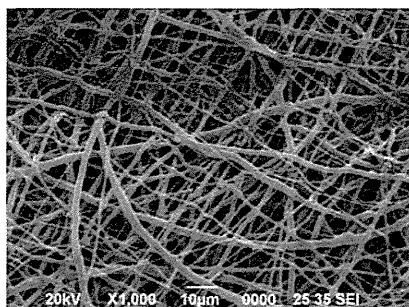


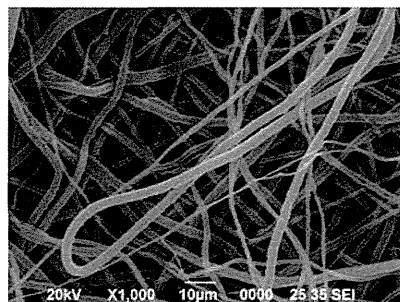
図9. 各ナノファイバーチューブの外観と電子顕微鏡像

ポリ-L-乳酸

内層

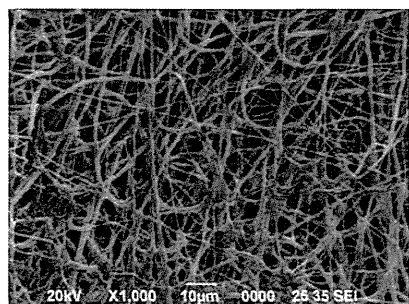


外層

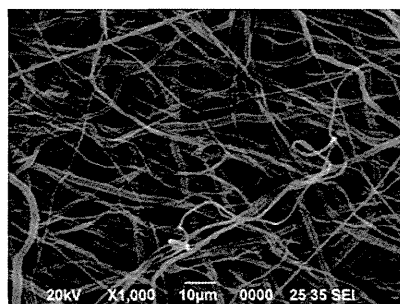


AG73ペプチド/ポリ-L-乳酸

内層

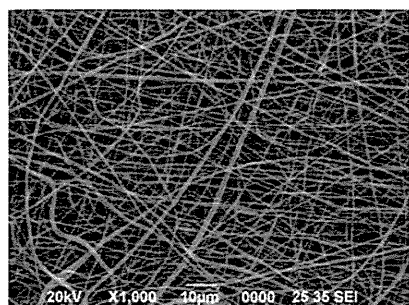


外層



AG-VP/ポリ-L-乳酸

内層



外層

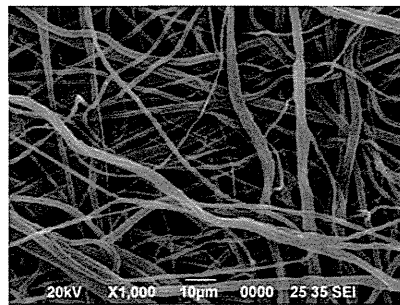


図10. 各ナノファイバチューブのリン酸緩衝溶液浸漬後の電子顕微鏡像

Proximal

Distal

露出した坐骨神経



剥離された脛骨神経

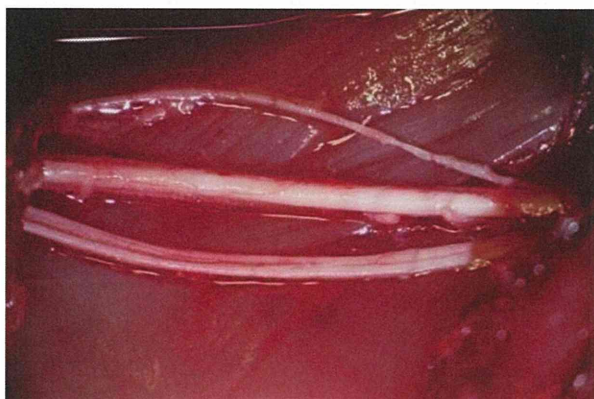
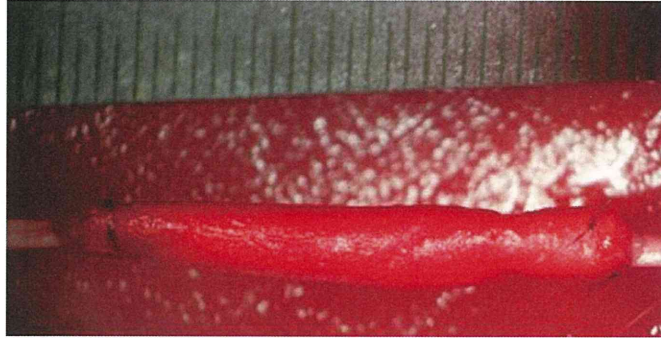
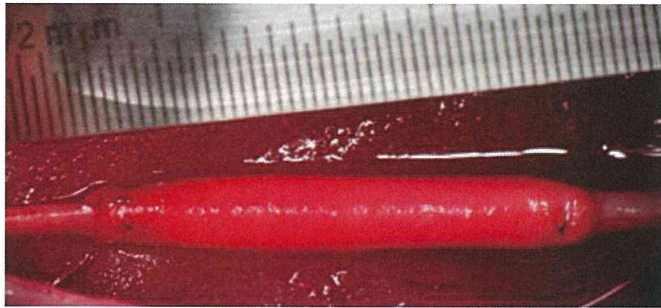


図 1 1. 露出した坐骨神経と剥離して分離した脛骨神経
(下図、上から腓骨神経、脛骨神経、腓腹神経)

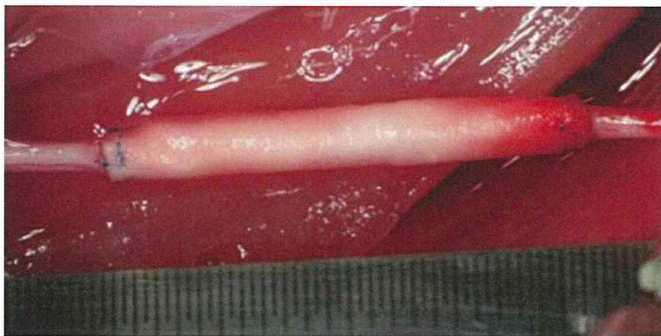
ポリ-L-乳酸



AG73ペプチド/ポリ-L-乳酸



AG-VP/ポリ-L-乳酸

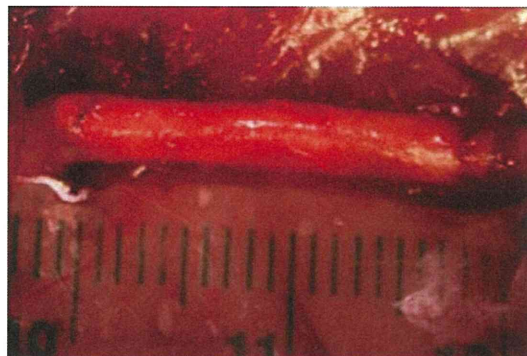


Proximal

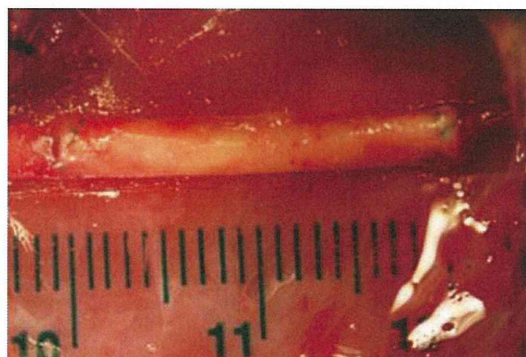
Distal

図 1 2. ウサギ脛骨神経の欠損部 (2 c m) に移植した各ナノファイバークューブ

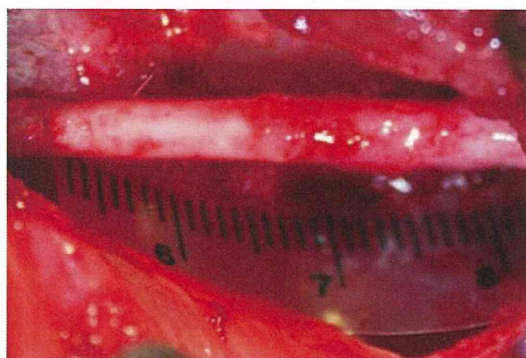
ポリ-L-乳酸



AG73ペプチド/ポリ-L-乳酸



AG-VP/ポリ-L-乳酸



Proximal

Distal

図 1 3. 移植 2 カ月後に露出させた各ナノファイバーチューブ

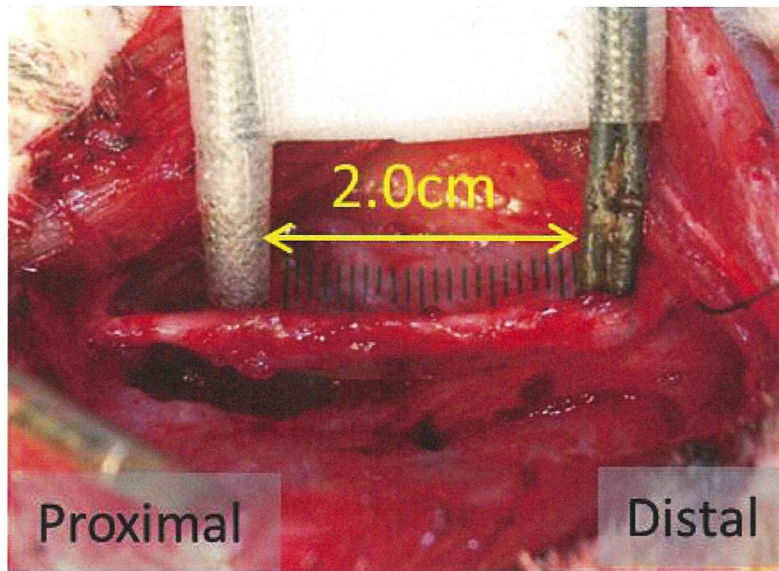
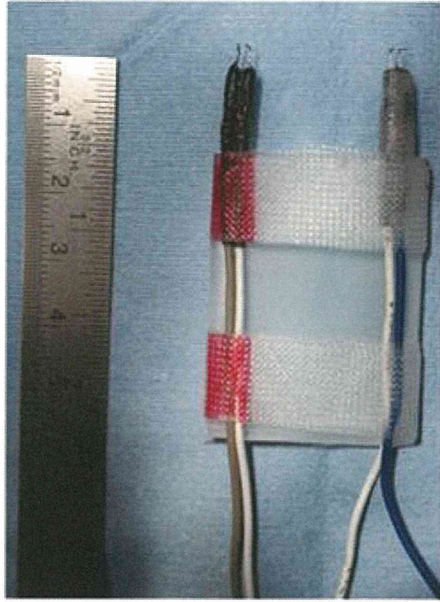
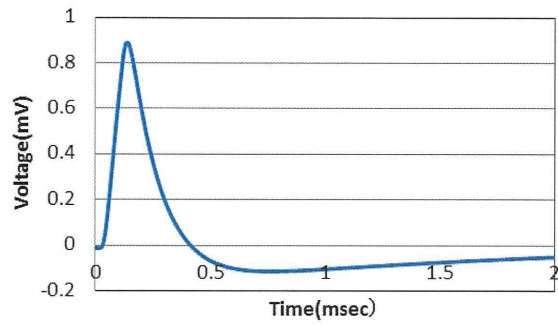
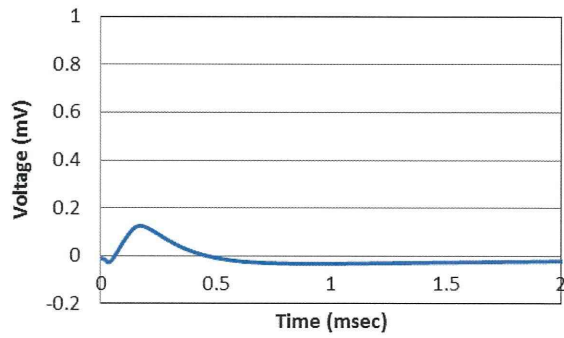


図 1 4. 活動電位測定用の電極と実測している様子

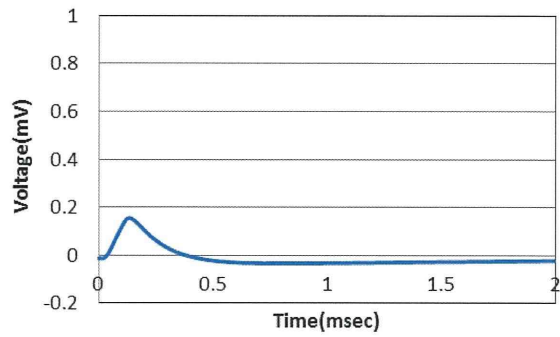
健常な脛骨神経



ポリL-乳酸



AG73ペプチド/ポリL-乳酸



AG-VP/ポリL-乳酸



図15. 健常な脛骨神経および各チューブ移植部の近遠間の活動電位

表 3. 各チューブを移植して2カ月後の移植部活動電位のピーク時間と強度

| 移植群 | | 1 | 2 | 3 | Average | SD |
|---------------------|----------------|------|------|------|-------------|-------------|
| ポリL-乳酸 | Peak (ms) | 0.21 | 0.19 | 0.17 | 0.19 | 0.02 |
| | Intensity (mV) | 0.11 | 0.03 | 0.12 | 0.09 | 0.05 |
| AG73ペプチド/ ポリL-乳酸 | Peak (ms) | 0.16 | 0.17 | 0.16 | 0.16 | 0.01 |
| | Intensity (mV) | 0.28 | 0.13 | 0.08 | 0.16 | 0.10 |
| AG-VP/ポリL-乳酸 | Peak (ms) | 0.17 | 0.15 | 0.14 | 0.15 | 0.02 |
| | Intensity (mV) | 0.24 | 0.19 | 0.19 | 0.21 | 0.03 |

別添 4

総説・著書等

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|---------------|-----------------------------|-----------|-------|------|-----|------|-----------------|
| 山岡哲二 柿木佐知朗 | 再生医療のための 繊維材料修飾 とその評価 | 繊維学会 | 繊維と工業 | 繊維学会 | 東京 | 2012 | 314 - 318 |

学会発表

| 演者氏名 | 演題名 | 学会名 | 開催地 | 年月日 |
|--------------------------------|--|------------------------|-----|---------------|
| 柿木佐知朗 山岡哲二 | ポリ乳酸／人工細胞外マトリクス複合型機能性神経誘導管を用いた末梢神経 | 第11回日本再生医療学会総会 | 横浜 | 2012.6.12-14 |
| 柿木佐知朗 山岡哲二 | 人工ペプチド・人工タンパク質を用いたポリ乳酸スキャホールドの機能化 | 第61回高分子討論会 | 名古屋 | 2012.9.19-21 |
| 柿木佐知朗 中山みどり 森反俊幸 山岡哲二 | 神経疾患治療用担体を志向したエラスチン様人工タンパク質の機能評価 | 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012 | 仙台 | 2012.11.26-27 |
| 中山みどり 柿木佐知朗 森反俊幸 山岡哲二 | ラミニン/エラスチン模倣人工細胞外マトリクスとポリ乳酸を複合化したナノファイバーの神経誘導管への応用 | 第12回日本再生医療学会総会 | 横浜 | 2012.3.21.23 |

再生医療のための繊維材料修飾とその評価

Surface Modification of Fiber Scaffolds for Regenerative Medicine

山岡 哲二・柿木 佐知朗

1. はじめに

生分解性ナノファイバーを再生医療に利用しようとする研究発表や論文発表は驚くほど多い。「我々の身体はコラーゲンなどの繊維物質で構成されており……、そのためにナノファイバーはスキャホールドとして最適である。」とは、あまりに楽観的すぎはしないだろうか。繊維径も、微細構造も、力学特性も、表面特性も、何もかもが大きく異なることは明らかである。本当に、ナノファイバーは、スキャホールドとして適しているのだろうか。ちなみに、1990年代に、ポリグリコール酸(PGA)製の生体吸収性縫合糸から作成した不織布をスキャホールドとして用いて軟骨を再生する組織工学(現在の再生医療)が提唱されたが、この時に用いられた繊維径は14 μ mであった。

2. 再生医療とスキャホールド材料

上述の Vacanti と Langer らによる軟骨組織再生の研究では、PGA 繊維で作成した不織布をスキャホールドとして使用したが、3次元の組織形状を保持させるために、PGA 短繊維をポリ乳酸(PLA)と混合して熱処理することでPGA 繊維どうしがPLAで接合されている“bonded fiber structure”を利用した¹⁾。その後、スキャホールド材料は再生医療の中心的役割を担うとして積極的に研究された。しかし、残念ながら、臨床に近い再生医療の中心は、スキャホールドを用いない細胞移植である²⁾。その背景には、さまざまな幹細胞の発見がある。1981年にマウス胚性幹細胞が³⁾、さらに1998年には、ヒト胚性幹細胞の単離が報告され⁴⁾、allogenicな(他人の)体細胞の入手が可能になると期待された。その後、2006年、2007年には山中らがマウスiPS細胞(induced Pluripotent Stem Cell)⁵⁾、ヒトiPS細胞⁶⁾をあいついで発表し、ご存じの通り、山中らは本年ノーベル医学生理学賞を受賞した。自己由来の体細胞が可能となったことは細胞移植の大きな転換期につながる。

自己由来の血小板や赤血球が作成できるとその有用性は計り知れない。つい最近、「文科省を中心に、iPSを利用した立体的な臓器の作成技術を10年以内に」との報道が駆け巡った。立体的の意味にもよるが、我々がイメージする、腎臓、肝臓などの臓器への再生は、これまでと全く異なる新たなイノベーションが無ければ無理ではないかと筆者は考える。立体構造の再現においてこそ、スキャホールドは不可欠である。

3. 臓器・組織再生とナノファイバー

幹細胞研究の発展にともなって、幹細胞の分化増殖を適切にコントロールする細胞周囲の微小環境(ニッチ・Niche)が次々と報告された。生化学的環境のみならず、合成スキャホールド材料の物理化学的特性、すなわち、生体に近い力学的特性も注目され¹⁰⁾¹¹⁾、ナノファイバーを中心とするスキャホールド材料には幹細胞ニッチとしての機能も要求されるようになった¹²⁾¹³⁾。では、ファイバーとしてのどのような特性が機能性につながる可能性があるのだろうか。表1に、考えられる可能性の一覧を示した。素材に由来するバルクの特性は、もちろん大きな意味を有する

表1 再生医療分野におけるナノファイバー機能の「可能性」

| | 特 性 | 機 能 (特定の組織) |
|-------|-----------------|-------------------------------|
| バルク特性 | 分解速度 | 再生と協調した分解 |
| | 高強度 | 破壊回避・3D寸法安定性 (血管など) |
| | 柔軟性 | 拡張との同期 (血管) 細胞分化制御 |
| | 薬物徐放 | 組織増殖 組織肥厚化抑制 (血管・弁・ステントなど) |
| 構造的特性 | 形状安定性 | 再生組織の保持 (皮膚・軟骨など) |
| | 繊維性 | 細胞接着 |
| | 繊維間空隙 (サイズ・空隙度) | 細胞浸透 物質透過性 (神経誘導管・患部防止材) |
| | 異方性 | 繊維の配列 (細胞分化・神経再生) |
| 表面特性 | 物理化学的特性 | 抗血栓性 (血管など) 組織非付着性 (患部防止材) |
| | 生理活性 | 細胞接着・増殖・分化 |



TETSUJI YAMAOKA
独立行政法人 国立循環器病研究センター研究所
National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute
博士(工学)
〒565-8565 吹田市藤白台5-7-1
Tel: 06-6833-5012 内線 2637
Fax: 06-6835-5476
E-mail: yamete@ri.nccc.go.jp
(専門) バイオマテリアル



SACHIRO KAKIMOTO
独立行政法人 国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部 研究員
博士(工学)
2005年大阪府立大学大学院工学研究科博士課程修了
〒565-8565 吹田市藤白台5-7-1
E-mail: sachiro@ri.nccc.go.jp
(専門) ヘブチド-タンパク質工学、生体材料学

はずであるが、いずれも可能性に過ぎないことを強調させて頂きたい。例えば、「再生(速度)と同調した分解(速度)」と書くのは簡単であるが、同調させるべき組織再生(速度)が明らかでないために、いろんなファイバー材料の分解速度を議論しても、それが、再生医療を推し進めてくれる可能性は低い。定量的なロジックが組み立てられない現状では速度の異なるナノファイバーで実際の組織再生性を比較することが最も早道かも知れない。

もちろん、ナノファイバーの最も注目されるべき特徴は構造的特性であり、三次元的構造体としての高強度性(形状安定性)もきわめて重要である。ナノファイバーは、破断強度は高くても曲げや変形には柔軟であるために、その三次元構造体は一般的に外力によって圧縮されやすく、たとえば皮膚組織再生においては創部のれん縮につながる。また、スキャホールド上に幹細胞を培養するだけでもスキャホールドは収縮する¹⁴⁾。

繊維の直径が細胞との相互作用に大きく影響することも古くから知られている¹⁵⁾。小林らは4、10、500nmの電界紡糸ファイバーを利用して単一細胞との相互作用について詳細に検討している¹⁶⁾。ファイバー構造に対する細胞の接着性は高く、また、その挙動も極めて興味深い。ここで、繊維間隙のサイズや連通性は、細胞や組織の浸潤、組織反応を大きく左右するパラメー

ターとしてきわめて重要である^{17,20)}。細胞の大きさは10~数十μmであり、細胞が浸潤しやすい孔径は100~200μmとされている。一般的には、繊維径が小さい方が、細胞が良く接着し増殖すると云われるが、たとえば直径0.1μmのナノファイバーで作成したナノファイバー多孔質不織布の孔径は、細胞や組織が浸潤できる大きさではない。その孔径を100μm程度にするには全く新たな紡糸法が必要である。

我々の研究グループでは、図1に示したようなポリ乳酸系ファイバー(直径1μm以下にすると構造体としての力学強度が下がったために、数μmを選択した)からなる人工血管の研究を進めていた。外層はポリ乳酸繊維で作成し自己組織化誘導を目指し、内層は抗血栓性を上昇させるために親水性のポリ乳酸誘導体を用い、ラット腹部やイス頸動脈を用いた評価を進めていた。外層の組織再生性は狙い通

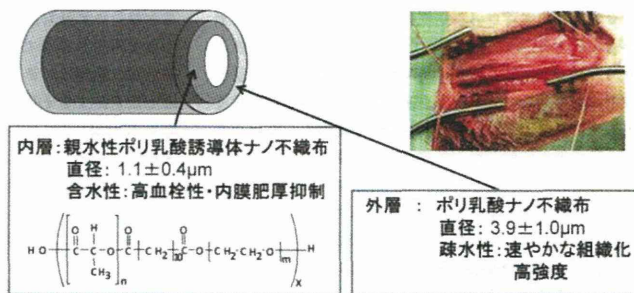


図1 二重構造再生型人工血管とイス頸動脈置換モデル

表2 バイオマテリアルとして研究されているナノファイバー

| | Material | Solvent | Fiber diameter (nm) | Objective | Reference |
|---|----------------------------------|---|---------------------|----------------------------|----------------|
| Synthetic | Poly (ε-caprolactone) | Chloroform | 200 - 600 | Bone regeneration | [21] |
| | Poly(L-lactid-co-ε-caprolactone) | Acetone | 400-700 | Scaffold | [22] |
| | Poly (L-lactide) | HFP ¹⁾ | 1000 | Scaffold | [23] |
| | Poly (lactide-co-glycolide) | HFP ²⁾ | 200-500 | Scaffold | [24] |
| Natural | Polyhydroxyalkanoate | HFP ²⁾ | 200-500 | Scaffold | [24] |
| | Collagen | HFP ²⁾ | 100-700 | Scaffold | [25] |
| | Elastin | HFP ²⁾ | 500-600 | Vascular graft | [26] |
| | Gelatin | Water | 100-800 | Scaffold | [27] |
| | Fibrinogen | HFP ²⁾ | 80-700 | Scaffold | [28] |
| | Silk fibroin | Formic acid | 30-120 | Wound dressing | [29] |
| | Laminin | HFP ²⁾ | 100-200 | Nerve regeneration | [30] |
| | Chitosan | Formic acid | 80-650 | Homogenous fiber | [31] |
| | Hyaluronic acid | Water/FA ³⁾ /DMF ⁴⁾ | 30-50 | Scaffold | [32] |
| | Blend | Poly (ε-caprolactone)/Elastin | HFP ²⁾ | 800-1700 | Vascular graft |
| Poly (lactide-co-glycolide)/Gelatin/Elastin | | HFP ²⁾ | 300-1200 | Vascular graft | [34] |
| Poly (ε-caprolactone)/Collagen/Elastin | | HFP ²⁾ | 500-1600 | Vascular graft | [35] |
| Poly (ε-caprolactone)/CaCO ₃ | | Chloroform/Methanol | 500-1500 | Bone regeneration | [36] |
| Gelatin/hydroxyapatite | | HFP ²⁾ | 200-400 | Guided tissue regeneration | [37] |
| Keratin/poly(ethylene oxide) | | TFE ⁴⁾ | 200-2000 | Wound dressing | [38] |

¹⁾ HFP: 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol

²⁾ FA: Formic acid

³⁾ DMF: N,N-dimethylformamide

⁴⁾ TFE: 2,2,2-trifluoroethanol

りの効果を示したが、内層に関しての問題点が明らかとなった。まず、抗血栓性をあげるための親水性は、類似のメカニズムにより内皮化をも遅延させ、結果、再生型血管としては必ずしも優位ではない。また、繊維状構造は、細胞接着性に優れるのと同様のメカニズムによって、血小板粘着を亢進させ、抗血栓性を劣勢にする。もちろん、偽内膜形成を狙った人工血管が存在するが、これは中・大口径においてのみ有効であり、小口径血管に対しては内腔面に露出する繊維構造は望ましくないと、我々は考えている。このように、繊維構造は、生体に大きな影響を有するが、ターゲットを上手く選択する必要がある。

4. さまざまな素材によるナノファイバー研究

合成高分子、天然高分子、およびそれらのブレンドなどを基材としたエレクトロスピニングによって、様々なナノファイバーが作製されている(表2)。合成高分子としては、すでに骨固定材や外科用縫合糸として臨床で用いられている生体分解吸収性高分子であるポリ乳酸(PLA)、ポリグリコール酸(PGA)、ポリε-カプロラクタム(PCL)およびそれらの共重合体がナノファイバーの基材として広く利用されている^{21, 22)}。これらは生体内で乳酸もしくはグリコール酸に加水分解され、最終的に乳酸回路もしくはクエン酸回路を介して代謝される。その分解速度は、分子量や共重合組成比、ファイバー径などによって容易に制御することができ、一般的には数カ月～数年で完全に分解される。そのため、生体内で長期の安定性が求められる人工血管、人工神経、癒着防止膜やドラッグデリバリー用担体などに有用である。その他にも、微生物由来のポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)なども用いられている²⁴⁾。これらは生体分解吸収性・安全性に優れているものの、細胞接着性などの生物学的な特性を有していないため、組織工学用スキャホールドとして用いるためには何らかの生理活性分子を修飾もしくは複合する必要がある。

生体内の細胞はECMで構成される微細構造を足場としていることから、ECMタンパク質よりなるナノファイバーはスキャホールドに最適であろうと考えられる。その中でも、ECMの骨格タンパク質であるコラーゲン、エラスチンおよびゼラチンよりなるナノファイバーは、人工血管への応用を目的として活発に研究されてきた^{25, 26)}。これらのECMタンパク質中には、細胞接着性や血管新生性を示す様々な生理活性配列が存在する。例えば、エラスチンの場合、血管内皮細胞の遊走や平滑筋細胞の接着を促進し、かつ血小板の粘着を抑制することが知られている。そのため、エラスチンを基材としたナノファイバーは、血管内皮細胞との高い親和性と抗血栓性を兼ね備えた人工血管として望ましい特性を示すとされているが、上述したようにある機能のみの評価では不十分であり、抗血栓性を含めた他の要因に関する評価も同時に必要である。その上、これら骨格タンパク質は生体組織の伸縮性、弾性、剛性を担っており、得られるナノファイバーも優れた力学的特性が期

待できる。他にも、血中に存在するフィブリノゲン²⁸⁾、古くより外科用縫合糸として用いられてきたシルクフィブロイン²⁹⁾、さらに基底膜構成タンパク質であるラミニン³⁰⁾などを基材としたナノファイバーも作製されており、人工神経など幅広い応用が期待されている。タンパク質以外にも、キトサン³¹⁾やヒアルロン酸³²⁾などの天然多糖を基材としたナノファイバーも作製されている。天然高分子を基材としたナノファイバーは、生体親和性や生体活性に優れているものの、力学的な強度が不十分であるものが多い。

そこで、両者の欠点を相互に補完し合うために、合成高分子と天然高分子のブレンド型ナノファイバーの作製も活発に試みられている。PCLやPLAとエラスチンやコラーゲンをブレンドしたナノファイバーは、高い弾性と優れた細胞親和性を有する人工血管として期待されている^{33, 34)}。また、PCL/炭酸カルシウム(CaCO₃)³⁵⁾やゼラチン/ハイロドキシアパタイト³⁷⁾のブレンドナノファイバーも研究されており、いずれも優れた骨芽細胞接着性を示していることから骨再生誘導用スキャホールドとして期待されている。さらに、近年はマテリアルソースの豊富なケラチンを基材としたナノファイバーも作製されており、ケラチン中の細胞接着配列(LDV配列やRGD配列)によって優れた細胞親和性を示す³⁸⁾。これらの、多くの研究では、目的とする評価項目では優れた特性が示されているが、生体内で起こる多方面からの生体応答を総合的に評価する事で、真に生き残るナノファイバー材料が決定されることになる。

5. 細胞を用いないGTR用材料

スキャホールドのみを使って、*in vivo*で、組織再生を試みる組織再生誘導法(GTR, Guided Tissue Regeneration)においても、繊維構造はさまざまな影響を有する。特に、歯周組織の再生(GBR, Guided Tissue Regeneration)は、臨床的にも進んでおり、生体吸収性のシートを使って、歯周組織が再生してくれる空間を確保して、自発的な組織誘

断裂した末梢神経

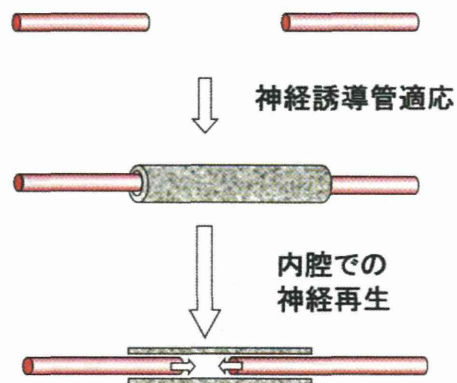


図2 GTRによる末梢神経組織の再生

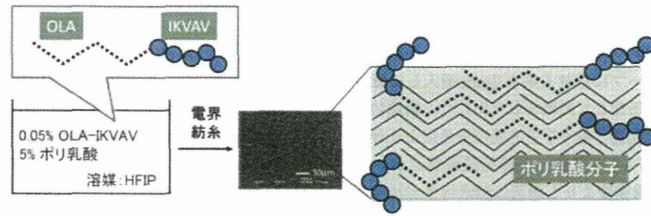


図3 混合溶液を電界防止するだけで、OLA-IKVAVは、ポリ乳酸マトリックスに安定に複合化される。

導に導く手法である。上述したように、ナノファイバーからなる構造体の空隙サイズは小さく、一般的に細胞の進入には適していない。すなわち、GTRにおいて周囲組織の進入を防ぐためには、ナノファイバー構造体の小さな孔径は有効である。たとえば、図2に示した神経誘導管の場合、周囲組織が内腔へと進入することを防ぐこと、さらに、管腔内で再生する神経組織に対して酸素や栄養素を供給するための低分子透過性が重要であることから、ナノファイバー膜構造は極めて有力である³⁹。さらに、繊維の等方的配列は、細胞の分化と増殖に大きく影響を与えることが報告されており、整列ナノファイバーでの神経組織の有為な再生が認められている⁴⁰。同様に、ステント外周にナノファイバーを付したカバードステントは、組織浸潤と、その結果起こる内膜肥厚を有効に抑制できると期待される⁴¹。このような物質透過性と組織浸潤阻止機能は、術後の臓器と

組織との癒着を防ぐ癒着防止材としての応用も有効であろう。

さらなる神経組織の再生を促すためには、生理活性分子による機能化修飾が有効である。PLAは、官能基を持たないために修飾が困難である。水溶性に富むペプチド分子は単純な物理コーティングでは安定な修飾が困難である⁴²。また、側鎖にカルボキシル基などの官能基を有するポリ乳酸誘導体は化学修飾が可能な有用な共重合体であるがバルク特性も大きく変化する⁴³。我々は、ポリ乳酸表面を化学修飾する新たな修飾プロープとしてオリゴ乳酸(OLA)とペプチド(peptide)との結合体(OLA-peptide)を開発した(図3)⁴⁴。L-乳酸を直接脱水重合してOLAを合成し、末端をアセチル化した(acOLA)。目的ペプチド配列を固相合成し、上述のacOLAとカップリングすることで修飾プロープが合成できる。PLAの5w/v%のHFIP溶液に100分の1濃度のOLA-peptideを添加して、常法により電界紡糸して複合化した。共焦点レーザー顕微鏡観察により、蛍光標識OLA-peptideはナノファイバー中に相分離することなく安定に複合化できることを確認した。これは電界紡糸法の極めて早い脱溶媒速度が大きく影響している。IKVAVペプチドは、神経細胞接着、増殖、神経突起伸長を促進するペプチド配列であることが1989年Tashiroらによって、ラミニン内から見出された⁴⁵。このIKVAVの高い神経誘導活性を利用するために⁴⁶⁻⁴⁹、OLA-IKVAVプロープを合成し、エレクトロスピンニング法により内径1.2

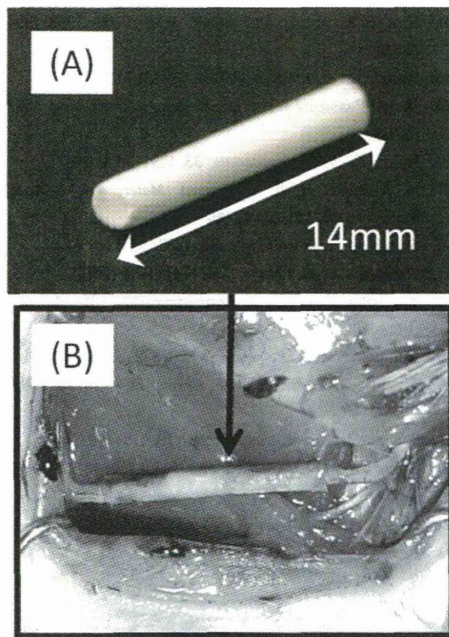


図4 作成した神経誘導管(A)とラット坐骨神経への移植(B)

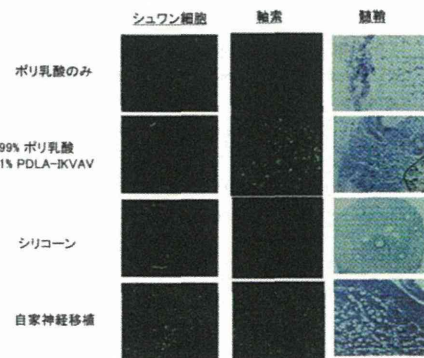


図5 再生した神経の免疫染色像

mm、長さ14mmのポリ乳酸ナノファイバー膜チューブを作製した(図4)。ラット(Wistar rat、メス、8週齢、180-210g)に対して、麻酔下で左肢坐骨神経を10mm長切除し、14mmのガイドチューブに神経末端を2mm挿入して縫合した。所定期間後、屠殺して組織を取り出した。組織切片はパラフィンで固定化後、軸索を蛍光免疫染色により評価した結果、OLA-IKVAVで修飾した神経誘導管において、未修飾のPLA神経誘導管よりも顕著に軸索再生が誘導されていることが確認された(図5)。現在、中空構造を用いているが、超軸方向に神経誘導をガイドできる配列構造の導入が有効と考えさらなる検討を続けている。

6. おわりに

上述したように、ナノファイバー構造に限らず、一つの材料特性は生体に対して多面的な影響をおよぼす。目的とする機能の向上を証明することは重要ではあるが、総合的には逆効果になる時も少なくない。優れた血管内皮化と優れた抗血栓性を両立させることは容易ではない。生体材料の多角的評価により、近年の膨大な研究の中に潜む、「ナノファイバーならではの、組織再生につながる機能性」を、慎重に見出すことが重要である。

参考文献

- 1) Vacanti C. A. et al., *Plast. Reconstr. Surg.*, **88**, 753-759 (1991).
- 2) Langer R. et al., *Science*, **260**, 920-926 (1993).
- 3) Mikos A. G. et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 183-189 (1993).
- 4) Salem H. K. et al., *Stem Cells*, **28**, 585-596 (2010).
- 5) Evans M. J. et al., *Nature*, **292**, 154-156 (1981).
- 6) Martin G. R., *PNAS*, **78**, 7634-7638 (1981).
- 7) Thomson J. A., *Science*, **282**, 1145-1147 (1998).
- 8) Takahashi K. et al., *Cell*, **126**, 663-676 (2006).
- 9) Takahashi K. et al., *Cell*, **131**, 861-872 (2007).
- 10) Watt F. M. et al., *Science*, **287**, 1427-1430 (2000).
- 11) Lim S. H. et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **61**, 1084-1096 (2009).
- 12) Li W. J. et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, **60**, 613-621 (2002).
- 13) S. Y. Chew et al., *J. Biomed. Mater. Res. A*, **97**, 355-374 (2011).
- 14) Awad H. A. et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, **51**, 233-240 (2000).
- 15) Moroni L. et al., *Biomaterials*, **27**, 4911-4922 (2006).
- 16) Tian F. et al., *J. Biomed. Mater. Res. A*, **84**, 291-299 (2008).
- 17) Karageorgiou V. et al., *Biomaterials*, **26**, 5474-5491 (2005).
- 18) Wake M. C. et al., *Cell Transplant.*, **3**, 339-343 (1994).
- 19) Ying T. H. et al., *Biomaterials*, **29**, 1307-1317 (2008).
- 20) Ishii D. et al., *Biomacromolecules*, **10**, 237-242 (2009).
- 21) Yoshimoto H. et al., *Biomaterials*, **24**, 2077-2082 (2003).
- 22) Xu Inai C. Y. et al., *Biomaterials*, **25**, 877-886 (2004).
- 23) Zong X. et al., *Biomaterials*, **26**, 5330-5338 (2005).
- 24) T. H. Ying et al., *Biomaterials*, **29**, 1307-1317 (2008).
- 25) Matthews J. A. et al., *Biomacromolecules*, **3**, 232-238 (2002).
- 26) McKenna K. A. et al., *Acta Biomaterialia*, **8**, 225-233 (2012).
- 27) Zhang S. et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, **90A**, 671-679 (2009).
- 28) Wnek G. E. et al., *Nano Lett.*, **3**, 213-216 (2003).
- 29) Min B. M. et al., *Biomaterials*, **25**, 1289-1297 (2004).
- 30) Neal R. A. et al., *Tissue Eng.*, **15**, 11-21 (2009).
- 31) Ohkawa K. et al., *Rapid Commun.*, **25**, 1600-1605 (2004).
- 32) Liu Y. et al., *Polym.*, **83**, 1011-1015 (2011).
- 33) Wise S. G. et al., *Acta Biomaterialia*, **7**, 295-303 (2011).
- 34) Han J. et al., *Biomacromolecules*, **12**, 399-408 (2011).
- 35) Heydarkhan-Hagvall S. et al., *Biomaterials*, **29**, 2907-2914 (2008).
- 36) Fujihara K., Kotaki M. et al., *Biomaterials*, **26**, 4139-4147 (2005).
- 37) Kim H. W. et al., *Adv. Funct. Mater.*, **15**, 1988-1994 (2005).
- 38) Xing C. et al., *IPCBE*, **2**, 120-124 (2011).
- 39) Jkema-Paassena J. I. et al., *Biomaterials*, **25**, 1583-1592 (2004).
- 40) Huang C. et al., *Biomaterials*, **33**, 1791-1800 (2012).
- 41) K. Kuraishi et al., *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, **88**, 230-239 (2009).
- 42) Shin H. et al., *Biomaterials*, **24**, 4353-4364 (2003).
- 43) Kimura Y. et al., *Polymer*, **34**, 1741-1748 (1993).
- 44) Yamaoka T. et al., *J. Biol. Macromol.*, **25**, 265-271 (1999).
- 45) Kakinoki S. et al., *Polymers*, **3**, 820-832 (2011).
- 46) Tashiro K. et al., *J. Biol. Chem.*, **264**, 16174-16182 (1989).
- 47) Schense J. C. et al., *Nat. Biotech.*, **18**, 415-419 (2000).
- 48) Gunn J. W. et al., *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, **72**, 91-97 (2005).
- 49) Silva G. A. et al., *Science*, **303**, 1352-1355 (2004).

