

온도 감응형 배양접시를 이용한 세포시트 공학 기술

김경숙 · Ohashi Kazuo · Okano Teruo

1. 서론

최근 의학기술의 발달로 인하여 기능 부전에 빠지거나 손상되어진 조직이나 장기는 일부 장기에 한하여 장기 이식법에 의해 소생이 가능하다. 이식에 의한 치료는 의학 분야에서 매우 중요한 역할을 하고 있지만 기증되는 장기의 수가 부족하여 현재 미국에서만 6만 5천여명

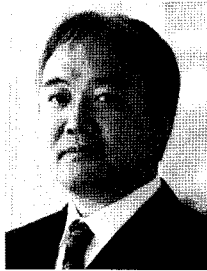
의 환자가 장기 이식을 기다리고 있으며 이식 후에도 이식 거부 반응이 발생할 수 있고, 수술에 성공하더라도 면역 억제제를 장기적으로 복용해야 한다.

그래서 현재는 세포를 이용한 치료법인 재생 의학이 주목받고 있으며, 임상으로의 응용 또한 이루어지고 있다. 재생 의료에는 부유 액에 해리되어진 상태의 세포가 손상되거나 기능 부전에 빠진 장기에 주사하여 치료를 유도하는 방법과 세포를 이용해 생체 내 혹은 생체 외에서 조직을 재건한 후, 손상되거나 기능 부전에 빠진 장기에 이식하는 조직 공학적 방법이 있다. 전자의 경우, 이미 임상에 이용되어지고 있으나, 이식 시 이식 위치의 조절 및 이식물의 크기 제어가 힘들며, 세포 주입 시 이루어지는 조직의 괴사나 주사 부위로부터의 세포유출에 의한 이식되어진 세포의 손실이 새로운 과제로 떠오르고 있다.

조직공학은 생체 내 또는 생체 외에서 생분해성 고분자를 기반으로 세포를 배양하여 조직을 재건하고, 손상되거나 기능 부전에 빠진 장기에 이식하여 정상적인 기능을 하게 하는 치료법으로서 공학, 화학, 재



김경숙
 2003~2007 부경대학교 응용화학공학부(학사)
 2007~2009 부경대학교 고분자공학과(석사)
 2007~2009 한국화학연구원 학연과정
 2009~현재 동경여자의과대학교 재생의공학과(박사과정)



Kazuo Ohashi
 1990 M.D. awarded by Nara Medical University
 1990~1992 Clinical Resident, First Department of Surgery, Nara Medical University
 1992~1996 Ph.D., Nara Medical University
 1996~1998 Faculty, Department of Surgery, Saiseikai Nara Hospital
 1998 Senior Postdoctoral Research Fellow, Department of Genetics, University of Washington
 1998~2002 Senior Postdoctoral Research Fellow, Department of Pediatrics, Stanford University School of Medicine
 1999~2001 Certified Research Scientist, Japan Society for the Promotion of Science
 2002~2003 Faculty, Department of Surgery, Nara Medical University Hospital
 2003~2007 Assistant Professor, Department of Surgery, Nara Medical University
 2006~2007 Visiting Associate Professor, Institute of Advanced Biomedical Engineering, Tokyo Women's Medical University (TWMU)
 2007~현재 Associate Professor, Institute of Advanced Biomedical Engineering and Department of Surgery, TWMU



Teruo Okano
 1974~1979 Graduate Student and Research Assistant, Department of Polymer Chemistry, Waseda University
 1979~1984 Assistant Professor, Institute of Biomedical Engineering, Tokyo Women's Medical University (TWMU)
 1984~1986 Visiting Assistant Professor, Department of Pharmaceutics, University of Utah
 1986~1994 Research Associate Professor, Department of Pharmaceutics and Center for Controlled Chemical Delivery, University of Utah
 1987~1993 Associate Professor, Institute of Biomedical Engineering, TWMU
 1994~2000 Professor, Institute of Biomedical Engineering, TWMU
 2000~2001 Director and Professor, Institute of Biomedical Engineering, TWMU
 1994~현재 Adjunct Professor, Department of Pharmaceutics and Center for Controlled Chemical Delivery, University of Utah
 2001~현재 Director and Professor, ABMES and TWMU
 2004~현재 Visiting Professor, Consolidate Research Institute for Advanced Science and Medical Care, Waseda University

Cell Sheet Engineering Technology Utilizing Temperature Responsive Culture Dish

동경여자의과대학교 첨단생명의과학연구소(Kyungsook Kim, Kazuo Ohashi, and Teruo Okano, Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan)
 e-mail: kim@abmes.twmu.ac.jp

료과학, 의학, 생물학 등 여러 분야가 융합되어진 학문이다. 재생 의학에 대한 조직공학적인 연구는 여러 가지 성과를 달성하고 있으며, 새로운 연구로의 발전 또한 기대되어 지고 있다.¹ 하지만 생분해성 고분자 지지체를 이용한 조직공학적인 치료법은 생분해성 고분자 지지체를 생체 내에 이식 시, 면역 반응을 피할 수 없으며 이식 후 생분해성 고분자의 분해에 의한 염증반응 또한 간과하기 힘들다. 또한 파종되어진 세포가 조직의 재생 및 치료에 필요한 세포외기질(extracellular matrix; ECM)을 생산하기까지 오랜 시간을 필요로 하며, 지지체 내에 균일하고 조밀하게 세포를 파종하는 것이 힘들다. 이러한 이유로 뼈, 연골, 혈관 등 세포의 밀도가 적은 조직의 제작에는 적합하지만, 심장, 간, 신장 등 세포의 밀도가 조밀한 조직을 재건하기에는 역부족이다.

본 특집에서는 조직공학 분야에서 온도 감응형 배양접시를 이용한 세포시트의 제작으로 생분해성 고분자 지지체의 이용없이 3차원적인 조직의 재건이 가능한 『세포시트 공학』이라는 새로운 기술에 대해 소개하고자 한다. 또한 현재 세포시트 공학을 이용한 여러 연구들이 성공에 이르고 있으며, 여러 사례들이 임상으로 응용되어지고 있어 이에 대해 서술하고자 한다.

2. 온도 감응형 배양접시

세포시트 공학은 동경여자의과대학의 Prof. Teruo Okano에 의해 개발되어진 기술로서 온도 감응형 배양접시를 이용해 세포를 시트 형태로 회수하고, 이 시트를 하나의 조직으로써 이식하거나, 회수되어진 세포시트의 적층을 통해 생분해성 고분자 지지체를 이용하지 않고 3차원적인 조직의 재건이 가능하다. 세포시트 공학 기술에서 이용되어지는 온도 감응형 배양접시는 polystyrene 배양접시 표면에 전자 빔 조사를 통해 온도 감응형 고분자 poly(*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm)를 20 nm 이하의 두께로 공유결합시킨 것이다. PIPAAm은 32 °C 부근의 하한임계온도(lower critical solution temperature; LCST)를 가진 온도 감응형 고분자이다. 이 고분자는 하한임계온도 이하에서는 고분자 사슬이 친수성을 띠어 팽윤하며 하한임계온도 이상에서는 고분자 사슬이 소수성을 띠어 수축하게 된다(그림 1). 이러

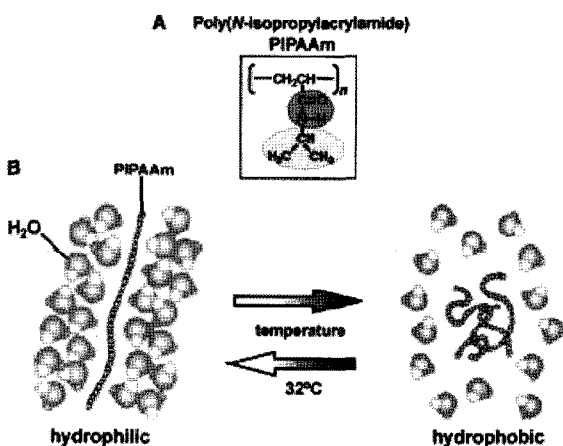


그림 1. Temperature-responsive polymer, poly(*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm). (A) Chemical Structure of poly(*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm) and (B) its temperature-responsive behavior, with an hydrated, extended chain conformation below 32 °C (left) and a dehydrated, compact conformation over 32 °C (right).

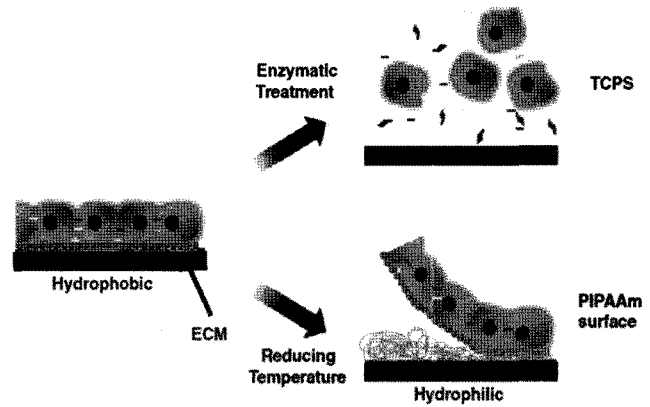


그림 2. Cell sheet harvest. Trypsin degrades deposited ECM (green), as well as membrane proteins, so that confluent, monolayer cells are harvested as single cells (upper right). The temperature-responsive polymer (yellow) covalently immobilized on the dish surface hydrates when the temperature is reduced, decreasing the interaction with deposited ECM. All the cells connected via cell-cell junction proteins are harvested as a contiguous cell sheet without the need for proteolytic enzymes (lower right).

한 PIPAAm의 성질로 인하여 온도 감응형 배양접시의 표면 또한 하한임계온도 이상에서는 소수성을 띠어, 통상의 세포 배양접시와 같은 환경으로서 세포 접착성을 가지지만, 하한임계온도 이하에서는 친수성 표면으로 상 전이가 일어나 수분을 흡수하여 팽윤하게 된다. 이렇게 팽윤되어진 표면으로 인하여 배양되어진 세포는 32 °C 이하의 온도에서 시트의 형태로 배양접시로부터 탈착되어진다(그림 2).^{2,3}

3. 세포시트 공학

온도 감응형 배양접시를 이용하여 얻어지는 세포시트는 조직공학적인 연구 및 임상학적 응용에 있어 몇 가지 이점을 가진다. 첫째, 트립신이나 디스파제 등의 단백질 분해 효소를 이용하지 않고, 배양되어진 세포들이 서로 조밀하게 밀착되어진 상태에서 얻어지기 때문에 cell-cell junction proteins, cell-cell gap junctions 및 desmosomes이 해리되지 않은 상태에서 세포가 회수되어지며, 둘째, 세포 배양 시 세포로부터 분리되어진 세포 아래 면의 세포외기질(extracellular matrix)이 포함되어진 상태로 회수되기 때문에 생체 내에 이식되어진 세포가 세포외기질을 손상된 조직이나 장기에 분비하기 까지 오랜 시간이 걸리지 않으며, 수술적인 절차 없이도 손상된 조직에 손쉽게 부착되어진다(그림 3).^{4,5} 셋째, 세포시트를 이용한 3차원적 조직의 제작을 위한 세포시트의 중층 시에도 세포 아래 면의 세포외기질로 인해 세포시트간의 조속한 접착 및 적층화를 유도하여 생분해성 고분자 지지체를 이용하지 않고도 3차원적인 조직의 제작을 가능하게 한다. 세포시트를 이용하여 제조한 3차원적인 조직의 경우, 생분해성 고분자 지지체를 이용하지 않기 때문에 염증반응을 걱정할 필요가 없으며, 세포가 조밀하게 배양되어진 상태로 회수되어졌기 때문에 세포의 밀도가 조밀한 심장, 간, 신장 등의 조직 재건이 가능하다. 또한 생체 내에 이식 시 세포시트나 세포시트의 적층으로 재건되어진 3차원적인 조직은 세포시트 아래 면의 세포외기질 및 접착 인자로 인해 수술적인 절차 없이도 이식하고자 하는 장기에 신속하게 접착하는 장점을 가진다.^{6,7}

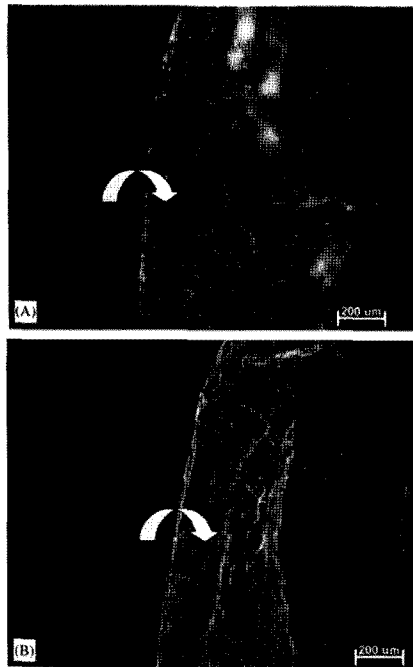


그림 3. Immunofluorescence of ECM components during cell sheet detachment. After low temperature treatment, interconnected cells with intact cell-to-cell junctions were partially detached as a single, intact sheet from the periphery of the temperature-responsive cell adhesive domains. Type IV collagen (A) and fibronectin (B) were identified together with endothelial cells. Faint remnants of deposited matrix were observed on the dish surfaces after cell detachment.⁴

본 연구소에서는 세포시트의 재생 의료에의 응용으로서 단층 시트의 이식(각막, 치주조직, 방광, 피부), 동일 세포시트의 적층화에 의한 균일한 조직의 이식(심장) 및 여러 종류의 세포시트의 적층화에 의한 층 상태 구조를 나타내는 조직의 재생 및 치료를 유도하고 있으며, 임상으로의 응용 또한 일본, 유럽 등에서 성공에 이르고 있다. 이하에서는 세포시트 공학을 이용한 임상 연구를 포함, 몇 가지 조직으로의 응용에 대한 지금까지의 연구 성과를 서술하고자 한다.

4. 세포시트 공학 기술의 응용

4.1 각막

각막이식은 장기 기증자의 절대적인 부족과 이식한 후의 이식 거부 반응이 큰 문제가 되고 있어, 조직공학 분야에서 여러 가지 방법으로 많은 시도가 이루어지고 있다. 각막 질병의 경우 대부분이 각막의 불투명화로 시력을 잃게 된다. 이것은 자가 corneal stem cell의 이식으로 면역 거부 반응없이 치료가 가능하지만, 각막 질병을 가진 대부분의 환자가 양눈성 질병을 앓고 있기 때문에, 거의 불가능하다고 할 수 있다.

각막 조직은 조직구조가 비교적 단순한 층 구조를 나타내어 세포시트에 의한 재생 의료에 있어서 가장 좋은 응용 예 중 하나로서, 본 연구소에서는 환자, 자신이나 친족으로부터 각막 표피 세포를 채취해 온도 감응형 배양접시에서 배양하여, 각막 표피 세포시트를 제작, 이것을 손상된 각막 부위에 이식하는 치료법을 개발하였다.⁸ 또한, 양눈성 질환의 환자에게는 자기 구강점막 조직으로부터 채취한 표피 세포를

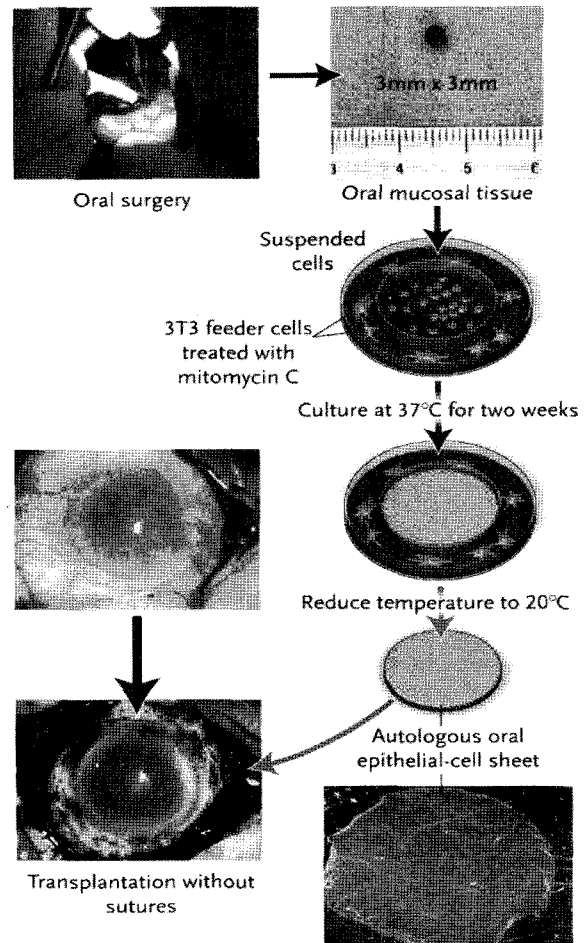


그림 4. Panel shows the removal of oral mucosal tissue (3 by 3 mm) from patient's cheek. Isolated epithelial cells are seeded onto temperature-responsive cell-culture inserts. After two weeks at 37 °C, these cells grow to form multilayered sheets of epithelial cells. The viable cell sheet is harvested with intact cell-to-cell junctions and extracellular matrix in a transplantable form simply by reducing the temperature of the culture to 20 °C for 30 min. The cell sheet is then transplanted directly to the diseased eye without sutures.⁹

이용해 세포시트를 제작, 이식하는 방법도 확립하였다(그림 4).⁹ 통상, 각막이식에서는 봉합에 따른 외과적 수술 절차가 필요하지만, 각막 표피 세포시트를 이용할 경우, 세포시트가 세포 접촉인자나 세포외 기질을 포함하고 있기 때문에, 이식 후 스스로 각막 층에 접착하여 다른 외과적인 수술 절차를 필요로 하지 않는다. 본 연구는 이미 사람의 임상 응용이 시행되어 일본에서는 약 30명의 환자에게 전 임상에 성공하였으며, 유럽에서도 임상으로의 연구가 진행중에 있다.

4.2 식도

최근 endoscopic submucosal dissection(ESD)의 발전으로 외과적인 수술로 식도암의 제거가 가능해졌다. 하지만 ESD법으로 식도암을 제거한 후, 식도 표면에서 염증반응과 협착증이 발생하여 수술 후에도 환자들은 고통받고 있다.

따라서, 본 연구소에서는 ESD 법으로 종양을 제거한 후, 수술 후 염증반응이나 협착반응을 완화시키기 위한 방법으로써 구강 점막 세포시트를 이식하였다. 이식되어진 구강 점막 세포시트는 식도암을 제거한 식도 근육 층에 스스로 접착하였으며, 한달 정도 후에는 완벽하게

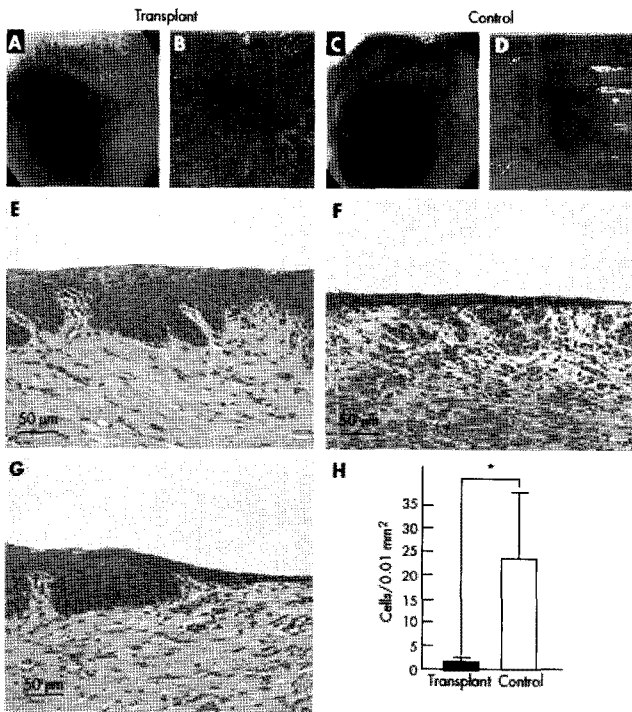


그림 5. Transplantation of oral mucosal epithelial cell sheets promotes wound healing and reduces postoperative inflammation. Left and right panels represent transplant and control groups, respectively. (A, C) Endoscopic photographs were taken 4 weeks after operation. (B, D) Macroscopic images of the oesophageal sites receiving endoscopic submucosal dissection after 4 weeks. (E, F) Hematoxylin and eosin (H&E) staining of the central portions of the ulcer sites. (G) H&E staining of the border region between the transplanted cell sheet and the outer portions of the ulcer site. (H) Comparison of the number of inflammatory cells present in the surgical sites between transplant and control groups. * $p < 0.01$.

상처가 치유되어 졌다. 자가 세포의 이식으로 염증반응은 일어 나지 않았으며, 협착증 또한 관찰되지 않았다(그림 5).¹⁰ 현재 ESD와 세포 시트 이식을 결합한 본 연구는 일본에서 10여명의 환자에게 실시되어, 전 임상에 성공을 거두었다.

4.3 심장

허혈성 심질환이나 중증 심부전에 대한 새로운 치료법으로써 재생 의료는 주목받아 오고 있다. 심근 세포의 대체로서 자가 근 세포나 골 수 유래 세포를 이용한 부유액 주입에 의한 세포 이식 치료는 이미 임상으로 응용되어지고 있다. 한편, 조직 공학적 방법으로 콜라겐 젤, 폴리우산, 알긴산 혹은 젤라틴으로부터 얻은 3차원 지지체를 이용한 심근세포의 3차원적인 배양이 연구되어 지고 있다. 하지만 3차원 지지체를 이용한 심근 세포 배양은 세포의 조밀한 결합이나 심근 조직의 자유로운 수축 및 이완에 방해가 된다.

여기서 우리는 현재 세포시트 공학을 심근 세포에 응용해, 심근 세포시트를 제작, 증충화하는 것으로 지지체를 사용하지 않고 3차원적인 심근 조직의 재생 및 심부전 치료를 목표로 연구를 실시하고 있다. 세포시트를 증충화할 경우, 세포시트간의 세포들의 커뮤니케이션으로 인하여 겹층 후 수시간 내에 각각의 세포시트는 전기적으로 결합을 형성한다.¹¹ 이는 세포시트의 증충화를 통해 박동하는 3차원 심근 조직을 구축할 수 있는 것을 시사한다. 이렇게 제조되어진 삼차원

적인 심근 조직을 누드 래트의 피하 조직에 이식 후, 누드 래트의 심장 심전도와는 독립된 이식되어진 심근 조직 유래 전위가 측정되었다. 또 이식된 심근 조직은 육안으로도 그 박동이 확인되었으며, 조직 절편상에서 다수의 신생 혈관을 유도해 심근 조직이 재생되어 있었다. 이미 이식 후 1년까지, 심근 이식 물의 박동이 유지되는 것을 확인하였으며, 증충화 심근 세포의 심근 경색 동물 모델로의 이식 실험에 의해 심 기능이 개선하는 것을 확인하였다.¹²⁻¹⁵ 장래 다능화 세포 생물학의 발전에 의해 사람에 이식 가능한 심근 세포의 분화 유도법이 확립된다면 생체외에서 재구축한 심근 조직을 심부전 환자에게 이식하는 치료법이 가능해질 것으로 기대된다.

4.4 간

간 조직은 물질 대사, 유해한 물질의 해독 작용, 불필요한 물질의 배설 작용, 혈액 응고, 호르몬 작용 등 광범위한 기능에 관여하고 있는 인체에서 가장 큰 장기이다. 미국에서만 연간 간 부전으로 인하여 4만 명이 넘는 환자가 사망에 이르고 있다. 이러한 간 부전의 치료법으로는 간 이식이 거의 유일하게 그 효과를 인정받고 있으나, 이 또한 간 수여자의 절대적인 부족이나 높은 수술 사망률로 인해 큰 성공을 거두지 못하고 있다. 이러한 이유로 조직공학적으로 간 조직의 치료를 위한 여러 가지 방법들이 모색되어지고 있으나, 종래, 간 실질 세포는 인체 내에서와는 달리, 배양 환경에서 기능의 저하 및 세포의 분해로 장기간 배양을 유지하는 것이 힘들다.

본 연구소에서는 온도 감응형 배양접시를 이용하여 생체 외에서 간 세포시트를 제조, 이를 생체 내에 이식하여 re-created functional liver tissue를 제작하는데 성공했다. 이식되어진 간 세포시트 조직은 150일 이상 liver specific proteins (albumin, A1AT($\alpha 1$ -antitrypsin)) 및 drug related enzyme expressions (CYP1A (cytochrome P450 2B), CYP2B (cytochrome P450 2B))를 유지하였다(그림 6).¹⁶ 이는 생명 유지를 위해 필수 불가결한 장기이지만 복잡한 기능을 하고 있어, 치료가 힘들었던 간 조직의 재생이 세포시트 공학법에 의해 가능해졌다는 것을 시사하고 있다. 현재 이 연구를 기반으로, 세포시트 공학법을 이용한 3차원적인 간 조직의 제작 및 이식을 위한 기술 개발의 연구가 실시되고 있다.

4.5 치주조직

치주 질환은 주로 박테리아 감염에 의해 야기되는 염증 질환으로 치아를 지탱하는 조직의 파괴로 마침내는 치아의 손실을 유발한다. 성인 인구의 80% 이상이 앓고 있는 가장 흔한 치아 질병 중의 하나로 중노년이 치아를 손실하는 주요한 원인 중의 하나이다. 지금까지의 치료법으로는 손실된 치주조직은 재생시키기 힘들며, 치아 기능 장애 및 미적 요인으로 환자의 QOL (quality of life)를 저하시키는 큰 요인 중 하나이다. 또 치주조직 상실에 의해 야기되는 고가의 치과의료는 가정의 경제적 압박으로 연결된다. 치주질환은 고령화 사회에 있어, 치 의학 분야뿐만 아니라 사회적으로도 큰 문제가 되고 있다. 이 때문에 현재 치주조직 재생을 목표로 한 연구가 활발히 행해지고 있다.

이에 본 연구소에서는 세포시트 공학을 이용해 치주조직 재생을 시도하고 있다. 치근 막 조직 유래 세포시트를 제작, 치주조직 결손 부위에 이식하여 효과적으로 치근 조직 막이 재생되어지는 것을 확인하였다(그림 7).^{17,18} 이러한 기술은 치주조직의 재생 치료나 치근 막을 가진 차세대 인공 치근의 개발에 크게 공헌하는 것으로, 현재 임상목표로 여러 연구를 실시하고 있다.

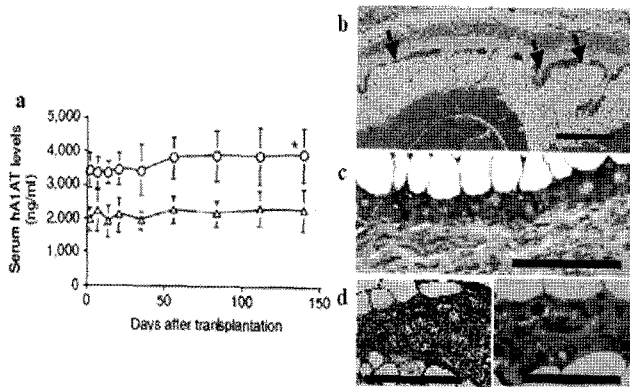


그림 6. Morphological and functional characteristics of the engineered hepatic tissue sheets following transplantation into the subcutaneous space. (a) Engineered hepatic tissue volume determined by recipient serum hA1AT. Single (Δ) or double (\circ) hepatic tissue sheets were transplanted into the vascularized subcutaneous cavity. (b-d) Histological analyses of the engineered hepatic tissue at day 120 from the mouse group (Δ in a) engrafted with the hepatic tissue sheet into the vascularized subcutaneous cavity. (b) Hematoxylin-eosin staining. (c) Albumin staining. (d) CYP2B (left) and CYP1A (right) immunohistochemical analyses of the engineered hepatic tissues in mice that received three consecutive days of intraperitoneal injections of either phenobarbital or 3-methylcholanthrene, respectively.¹⁶

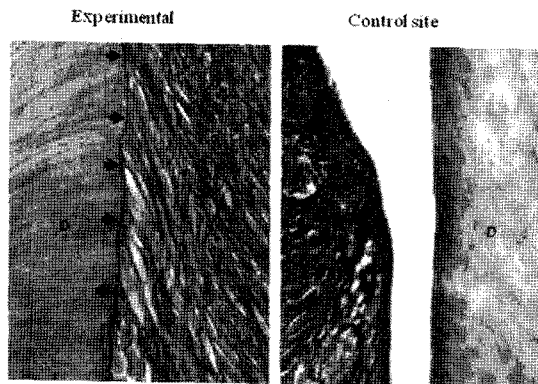


그림 7. Histological sections (Azan staining), 4 weeks post-transplantation, of human periodontal ligament cell sheets to rats. Histology of transplanted periodontal ligament cell sheets indicated uneventful healing during the experimental period. In all experimental sites, periodontal ligament like new immature fibers, which obliquely anchored dentin surfaces, were observed (arrows), whereas no periodontal ligament-like newly immature fibers were found in any control sites. D, dentin 4 weeks post-transplantation.¹⁷

5. 결론

조직공학 분야는 현재 가장 유망받는 직종의 하나로 꼽힐 정도로 인정받는 분야로 성장하고 있으며, 이 분야를 연구하는 과학자들도 늘고 있다. 조직공학은 지금까지의 기술로 치료가 곤란한 질환에 대해 새로운 치료법들을 제안해 앞으로도 다양한 개발이 기대되는 분야이다. 최근에는 분자 세포 생물학이나, ES 세포, ips 세포, 성체유래 줄기세포 등 생물학의 눈부신 발전에 의해, 재생 의학의 가능성이 더욱 증대되고 있다. 또한, 본 고에서 서술한 세포시트 공학으로 기존의 배양 기술에서는 제작이 힘든 세포외기질이나 세포간 결합을 포함한 2차원적인 세포시트에 의해 여러 세포나 조직, 장기로의 응용이 가능해졌다. 또한 세포시트 공학은 생분해성 고분자 지지체를 이용하지 않고도 세포시트의 중층화로 세포의 밀도가 조밀한 3차원적인 조직을 재건할 수 있는 기술로서 지금까지 치료가 힘들었던 조직 및 장기를 치료하기 위한 신기술로 여러 분야에 응용되어져 성공을 거두어, 인체 조직의 재생 및 치료에 대한 차세대 기술로서 이용되어 질 것으로 기대되어 진다.

참고문헌

1. R. Langer and J. P. Vacanti, *Science*, **260**, 920 (1993).
2. T. Okano, *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 1243 (1993).
3. N. Yamada, *et al.*, *Makromol. Chem.*, **11**, 571 (1990).
4. M. Yamato and M. Utsumi, *et al.*, *Tissue Eng.*, **7**, 473 (2001).
5. A. Kushida and M. Yamato, *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **45**, 355 (1999).
6. M. Yamato and Y. Akiyama, *et al.*, *Prog. Polym. Sci.*, **32**, 1123 (2007).
7. M. Yamato and T. Okano, *Materialstoday*, **7**, 42 (2004).
8. K. Nishida, *et al.*, *Transplantation*, **77**, 379 (2004).
9. K. Nishida, *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **351**, 1170 (2004).
10. T. Ohki and M. Yamato, *et al.*, *Gut*, **55**, 1704 (2006).
11. Y. Haraguchi and T. Shimizu, *et al.*, *Biomaterials*, **27**, 4765 (2006).
12. T. Shimizu, *et al.*, *Biomaterials*, **24**, 2309 (2003).
13. T. Shimizu, *et al.*, *Circ. Res.*, **90**, e40 (2002).
14. T. Shimizu, *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **60**, 110 (2002).
15. T. Shimizu, *et al.*, *Tissue Eng.*, **7**, 141 (2001).
16. K. Ohashi and T. Yokoyama, *et al.*, *Nat. Med.*, **13**, 880 (2007).
17. I. Ishikawa and T. Iwata, *et al.*, *Periodontology 2000*, **51**, 220 (2009).
18. M. Hasegawa and M. Yamato, *et al.*, *Tissue Eng.*, **11**, 469 (2005).