

## 중간엽 줄기세포를 이용한 연골 재생 연구 동향

김윤희<sup>1,2</sup> · 이진우<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>연세대학교 BK21 의과학 사업단, <sup>2</sup>연세대학교 의과대학 정형외과학교실

### A New Aspect in Cartilage Regeneration Using Mesenchymal Stem Cells

Yun Hee Kim<sup>1,2</sup> and Jin Woo Lee<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopaedic Surgery-29, <sup>2</sup>Yonsei University College of Medicine, Seoul, 120-752, Korea

(Received: July. 5 2007; Accepted: July. 27 2007)

#### 1. 서 론

중간엽 줄기세포(MSC)는 연골세포, 골세포, 지방세포 및 근육세포 등으로 분화할 수 있는 세포로서, *in vitro*에서 특정 배양조건하에 연골, 뼈, 근육, 인대 및 지방조직 등으로 분화를 유도할 수 있다. 중간엽 줄기세포는 골수에서 추출이 용이하여 여러 가지 난치성 질환에 대한 세포 치료제의 가능성에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다. 연골은 재생력이 부족하여 한번 손상 후 치료의 한계점을 보인다. 퇴행성 관절염은 관절의 퇴행성 변화에 의해서 발생하므로 이를 완전히 정지시킬 수는 없으며, 현재 약물 요법이나 물리 치료등에 의존하고 있다. 그러나 관절염을 치료하는 확실한 약물이 개발되지 않은 상태이며, 스테로이드제제 및 윤활제의 장기간 사용은 연골의 변성을 촉진시키는 결과를 초래한다.

최근에 자가 연골 세포 이식술이 개발되었지만, 연골조직의 제한, 연골세포의 시험관 배양 중 탈분화, 고 연령에 따른 세포증식의 한계 등이 문제점으로 남아 있다. 따라서, 재생력이 풍부한 중간엽 줄기세포의 이용은 생물학적 복원이 파괴된 연골을 재생하는데 효과적인 세포 치료제로서 응용되어 질 수 있을 것이다. 세포치료제를 이용한 연골 재생은 큰 골격계 질환뿐만 아니라, 소화기계 및 비뇨기계 등의 질환에 응용할 수 있다.<sup>1</sup> 즉, 국소적으로 연골 조직을 재생시켜 줌으로써 역류성 식도염 및 요도 역류등의 질병 치료에 응용 가능한 것이다(Fig. 1).

연골 재생은 고분자 지지체를 기본으로 생화학적 성장 인자 및 세포외기질과 생역학적 자극등의 조합에 의해 유도되어질 수 있으며, 각 인자에 대한 다양한 종류 및 방

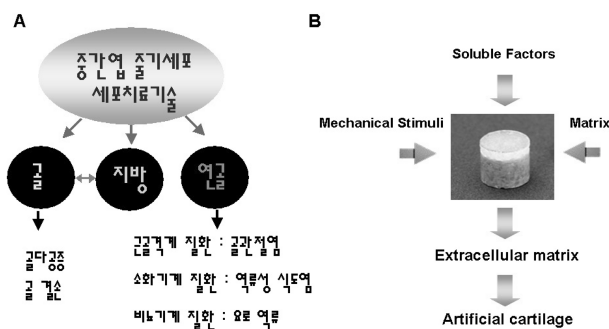


Figure 1. (A) 연골 분화에 의한 다양한 질병 치료로의 응용, (B) 기본 모델.

법이 개발되고 있다. 기존의 고분자 지지체만을 이용한 접근법에서 최근에는 줄기세포를 접목하여 많은 연구가 진행되고 있으나, 생체내에서 얼마나 정상과 유사한 연골로 재생되는지를 이해하기 위해서는 줄기세포의 특성을 파악하는데 무엇보다도 중요하다고 할 수 있다. 따라서, 본 글에서는 현재 조직공학적 또는 세포생물학적 측면에서 연구되고 있는 연골 재생 유도에 대한 동향과 문제점 등을 살펴보고자 한다

#### 2. 본 론

##### 2.1. 중간엽 줄기세포로부터 연골의 형성 단계

발생 과정에서 연골은 크게 성장판 연골과 관절 연골의 형성으로 나누어 볼 수 있으며, 이는 분화 단계에 따라 구분되어 진다(Fig. 2).<sup>2,3</sup> 중간엽 줄기세포의 세포응집은 골격화과정에서 일어나는 가장 첫 번째 현상으로서, 세포가 응집되고, 세포 분열 기능을 변화시킴으로써 세포가 응집으로부터 이탈하지 않도록 하는 분화 초기 과정이다. 이

\*Tel: 82-2-2228-2190; Fax: 82-2-363-1139

e-mail: ljwos@yumc.yonsei.ac.kr

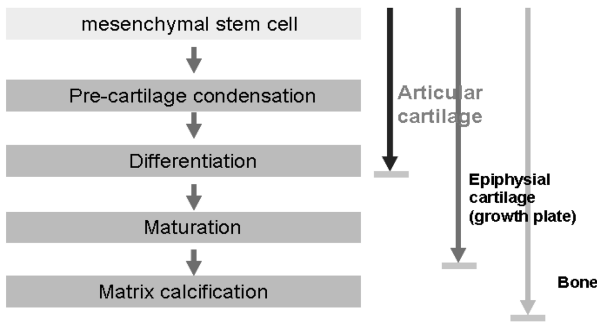


Figure 2. 중간엽 줄기세포로부터 연골 형성 단계.

러한 과정은 생성하고자 하는 근 골격요소의 모양과 크기, 위치 및 수를 결정하는 단계이다. 연골세포의 초기 분화 조건은 고밀도의 세포 수와 세포 응집이 요구됨이 밝혀졌으며, 세포간의 결합은 연골세포로 분화하기 위해서 세포간에 서로 작은 분자량의 물질을 서로 이동시키거나, 리셉터를 통하여 신호전달을 교류하게 된다(Fig. 2).

2.1.1 연골 분화의 초기 단계

연골세포의 분화는 초기 세포간의 결합이 중요한 인자로 작용하기 때문에 시험관 배양시 펠렛배양 또는 알긴비드배양 방법이 사용되어 왔다. 고밀도의 세포덩어리로 응집을 시킨 후에 TGF- $\beta$  계열의 성장호르몬, TGF- $\beta$ s 또는 뼈형성 단백질(BMPs)에 의해 분화를 촉진 시킬 수 있다. TGF- $\beta$ 에 의해 유도되는 연골세포의 분화 과정은 단계적인 유전자 발현을 보인다. 세포 결합으로 인한 여러 세포 신호전달경로의 활성화는 연골 세포를 분화시키는 초기 조절 기전으로 작용한다. 이 과정에 관여하는 세포 부착 단백질로는 신경 카데린(N-Cadherin)과 신경세포부착분자(N-CAM)이 연골화 초기에 발견되었고, 분화가 진행될수록 발현이 억제됨이 보고되었다.<sup>4,5</sup> 초기단계에는 파이프리모듈린과 연골올리고머 매트릭스 단백질(COMP)을, 중간단계에는 어그리칸, 테코린, 바이글리칸과 같은 단백질다당을, 분화 후기에는 제 2형 교원질과 콘드로이드헤린을 발현하며, 과분화(성숙)되어 골 형성시 제 10형 교원질이 발현된다.

2.1.2 연골 분화 후기 단계-연골의 성숙

분화 후기는 연골세포로의 분화가 완전히 일어난 후, 제 2형 교원질은 점차 감소하고, 제 10형 교원질 발현이 증가하며, 혈관이 유입되면서 완전한 골이 형성하는 단계를 의미한다. 이미 골 및 연골 분화능력을 가진 세포를 이식하였을 경우, 이식 부위가 4주 이내 골로 대체됨이 보고되었다. 그와 함께 제 10형 교원질 발현이 증가하였고, 시험관 배양시에도 동일한 결과가 관찰되었다.<sup>6,7</sup> 줄기세포와 달리 연골세포를 이식하였을 경우 골 형성은 관찰되지 않

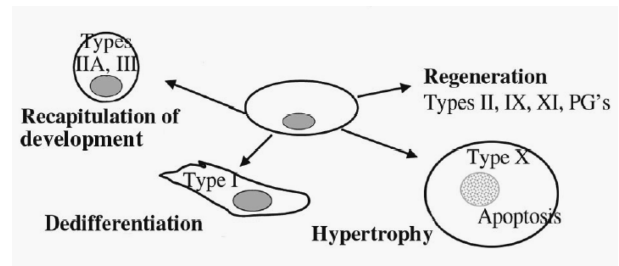


Figure 3. 상처에 의한 연골세포의 반응.

기 때문에, 줄기 세포를 이용하여 연골을 유도할 경우 골 형성으로부터 연골을 보호해야 할 것으로 보고되고 있다.

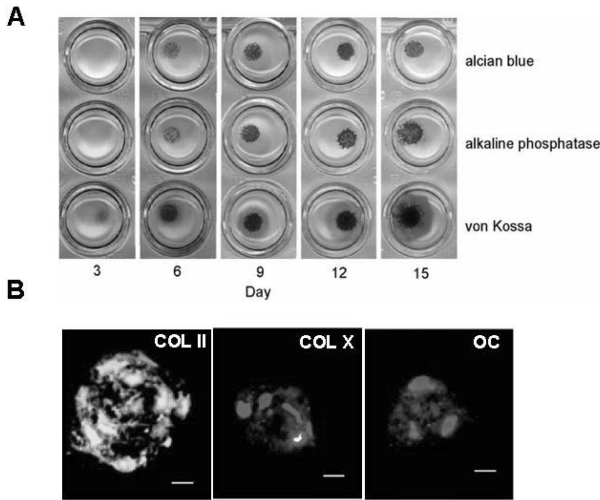
2.1.3 외부 변화에 대한 연골세포의 대응

연골 세포는 물리적 자극 및 염증 반응 등에 대하여 연골 자신의 표현형을 변화시킨다(Fig. 3).<sup>8</sup> 즉, 외부의 여러 자극들은 연골 조직의 세포외기질의 파괴 및 세포 사멸 등을 유도하게 된다. 이러한 조절은 유전자 발현 변화에 의해 일어나며, 단백질 다당이 분해되고, 고유의 단백질 합성 균형을 잃어버려 비정상적인 세포외기질을 갖게 된다(연골 세포의 탈분화). 연골 세포는 비대화가 되면서 골아 세포와 유사한 유전자 발현 양상을 띄게 된다. 즉 제 10형 교원질, MMP-13, 오스테오폰틴등의 발현과 석회화 형성이 이루어지면서 골 관절염에서 나타나는 유전적 발현과 유사한 변형을 보인다.<sup>9,12</sup>

2.2. 줄기세포를 이용한 연골 분화시 제 10형 유전자의 발현

2.2.1 In vitro 연골비대화

위에서 언급한 바와 같이 제 10형 교원질의 발현은 골 형성 단계를 의미하며, 실제 초자 연골의 관절 연골세포에는 제 10형 교원질이 발현되지 않는다.<sup>13</sup> 그러나 국내외적으로 보고되는 대부분의 연구 결과를 살펴보면, 줄기세포를 이용한 연골 분화에서 초자 연골에서 보이지 않는 제 10형 교원질 유전자가 발현됨을 보고하고 있다. TGF- $\beta$  등의 성장인자는 줄기세포의 연골 분화시 시험관 배양에서 연골세포의 특이적 유전자인 제 2형 교원질 및 단백질 다당의 발현을 300배 이상 급격히 증가시키나, 제 10형 교원질 발현 또한 60배 이상 증가시키기도 한다.<sup>14</sup> 시험관 분화방법에서 흔히 사용되는 알긴산비드, 펠렛, 마이크로메스 방법을 이용한 모든 3차원적 분화방법에서 동일하게 유도되며, 성인 골수 유래 중간엽 줄기세포(BMSC) 뿐만 아니라, 배아 줄기세포(ES cell)에서 분화 유도된 연골세포에서도 동일한 현상을 보인다(Fig. 4).<sup>15,16</sup> 또한 제 10형 교원질 유전자 뿐만 아니라, MMP-13 및 알칼라인 포스파테이즈 발현도 함께 증가한다. 여기서 가장 큰 문제점이 제



**Figure 4.** 줄기세포로부터 연골 분화시 제 10형 교원질의 발현. Micromass culture를 이용한 설치류의 배아 줄기세포에서 연골세포 분화시 표현형 확인 (A) 및 성인 골수 유래 중간엽 줄기세포로부터 alginate bead culture를 이용한 연골 분화 (B). COL II: 제 2형 교원질, COL X: 제 10형 교원질, OC: osteocalcin.

기 될 수 있는 것이다. 즉, 우리가 환자의 연골을 재생시키기 위하여 세포치료를 사용할 경우, 생체내에서 연골 특이적 성질이 아닌 비정상적인 유전자 발현이 유도 되고, 연골세포의 비대현상이 생긴다면, 연골이 아닌 골로 대체 될 수도 있기 때문이며, 최근 세계적으로 이러한 현상을 이해하고자 하는 연구가 시작되고 있다.

### 2.2.2 In vivo 연골비대화

관절 연골세포는 골 관절염이 진행되면서 제 10형 교원질 및 MMP-13 증가 및 제 2형 교원질의 억제 등 비대화와 유사한 유전자적 변형을 초래한다. 즉, 환경에 의해 비대화등 그들의 고유 표현형이 언제든지 변화될 수 있다는 것을 의미한다. 그러나, 실제 많은 연구결과에서 관절 연골 세포를 누드마우스의 근육이나 피부에 이식하였을 경우, 연골세포는 고유의 연골조직을 형성하며, 혈관 유입이나 석회화가 일어나지 않음을 보여주고 있다.<sup>17</sup> 반대로, 탈분화된 연골세포는 섬유연골을 형성하는 것으로 보아, 생체내에서 얼마나 정상 연골과 유사한 연골이 형성이 되는냐는 어떤 세포를 이식하느냐, 세포의 분화 단계를 어떻게 조절하느냐에 달려있다고 할 수 있다. 최근처럼 줄기세포를 이용할 경우, 세포 특성의 중요성은 더욱 커지게 되며 세포의 분화 조절은 더욱 복잡하게 된다. 최근 연구 보고에 의하면, 관절 연골세포를 이식한 경우에는 안정적인 정상연골을 형성하지만, 중간엽 줄기세포로부터 분화된 연골세포는 생체내에서 연골의 특징 뿐만 아니라, 석회화, 혈관 유입 및 제 10형 교원질의 합성이 매우 두드러지게 나

타남을 보고하였다.<sup>18</sup> 이와 같이 줄기세포를 이용하여 특정 조직만을 유도하기 위해서는 해결해야 할 일들이 아직 많이 남아있다. 원하는 표현형 확인에만 그치는 것이 아니라, 그 외 조직 형성에 대한 가능성을 항상 염려해야 할 것이며, 이러한 문제점이 해결되어야만 안전하고 유용한 세포치료제 개발이 현실화 될 것이다.

### 2.3. 연골비대화의 억제 연구

위에서 언급한 바와 같이 연골비대화는 최근 연골 재생을 위한 줄기세포의 이용에 큰 제한점으로 인식되고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위한 노력이 일부 연구 결과에서 보고된 바 있다. 성장인자 종류에 따라 제 10형 교원질 유전자 발현을 억제하고자 하였으며, BMP-2와 BMP-4를 비교하였을 경우, BMP-4가 제 2형 교원질은 증가시키고, 제 10형 교원질 발현은 최소화하였다.<sup>19</sup> 뿐만 아니라, BMP-4는 골아 세포의 표현형인 Cbfa-1의 발현도 현저히 억제시켰다. 그러나 어떠한 기전으로 BMP-4에 의한 Cbfa-1 및 제 10형 교원질 합성은 억제되고, 연골 분화는 촉진되는지 아직 밝히지는 못하였다. 이러한 다양한 성장인자의 사용뿐만 아니라, 생체재료에 대한 비대화 억제효과가 보고된 바 있다. 세포는 생체재료 표면의 화학적 특징에 매우 민감하게 반응하며, 이는 곧 세포내 다양한 신호로 전달되어 새로운 조직을 형성하는데 영향을 미친다. 이미 오래전부터 교원질을 코팅한 재료 위에서 골아세포의 분화 및 증식이 촉진되는 결과가 보고된 바 있다.<sup>20</sup> 이와 같이 재료의 스크리닝을 통해 제 10형 교원질 발현이 최소화되는 방법을 모색하고자 하였고, 그 결과 질소도입 고분자필름에서 중간엽 줄기세포를 연골세포로 분화시킬 때, 제 10형 교원질 합성 및 알칼라인 포스파테이즈 발현이 분화 14일까지 억제되었다.<sup>21</sup> 그러나 제 1형 교원질은 억제되지 못한 한계를 보였다. 이러한 연구 결과는 표면처리 기술이 세포의 분화 조절에 큰 영향을 미칠 수 있음을 증명한 것에 그 의미를 둘 수 있으며, 향후 연골 재생에 있어서 비대화를 개선시키기 위한 연구가 더욱 활발히 진행되어야 할 것이다.

### 2.4. 연골 비대 조절 기전

줄기세포로부터 유도된 연골세포는 앞서 서술한 바와 같은 제한점을 가지고 있으며, 이는 많은 장점을 가지고 있는 줄기세포의 이면이기도 하다. 그럼 우리는 다음과 같은 의문을 제시할 수 있을 것이며 이에 대해 살펴보고자 한다.

1. 연골비대는 어떤 인자에 의해 어떻게 조절 받는 것인가?
2. 줄기세포로부터 분화된 연골세포와는 달리 관절 연골 세포는 생체내에서 왜 비대화를 유발하지 않는 것인가?

2.4.1. 연골의 성숙에 관련된 유전자-Runx2 (cbfa1)와 DEC1

(Cbfa-1)라고도 불리는 Runx 2는 골 형성에 관여하는 것으로 밝혀져 있다. Runx 단백질은 runt DNA 결합도메인을 가지고 있는 전사인자이며, 물리적으로 Runx2와 smad가 물리적으로 결합하는 것이 밝혀짐으로써 이 두 단백질이 함께 작용할 때 골아 세포로 유도하는데에 관여할 것으로 제시하였다. Cbfa-1은 골아 세포의 특정한 전사인자로 발견된 것으로 골아 세포로 분화하는 초기 단계에 발현함으로써 선별적으로 골아 세포로 분화시키는데 필수적인 것으로 생각되어진다. TGF-β는 오히려 골아 세포의 분화를 억제하는데 이는 TGF-β에 의해 활성화된 smad3가 cbfa-1과 결합하면 smad3에 의해 cbfa-1의 전사활성을 억제시킴으로써 골아 세포의 특정 유전자인 오스테오칼신의 발현을 억제시킨다는 사실로 뒷받침 되어질 수 있다. 비대화연골에서 Runx 2는 제 10형 교원질의 프로모터에 결합하는 것으로 보고되었으며, *in vitro* 및 *in vivo*에서 Runx 2에 의해 제 10형 교원질 발현이 직접적으로 조절되는 것으로 보고되었다. 또한 Runx 2의 과발현은 제 10형 교원질 뿐만 아니라, MMP13의 유전자 발현을 증가시킴으로써 연골세포의 비대화를 더욱 촉진시켰다. Runx2와 함께 Runx3 발현을 억제 시킨 동물 모델에서 비대화현상이 현저히 감소하였고, Indian hedgehog (Ihh)의 유전자 발현이 완전히 억제되었으며, Runx 2는 Ihh 발현을 조절함으로써 연골세포의 비대화 및 증식을 조절하는 것으로 보고되었다.

DEC1은 Basic helix-loop-helix (bHLH) 계열로서, DEC1 mRNA 발현이 성장판 연골세포의 시험관 분화 18일부터 증가하였으며, 쥐의 ATDC5 세포로부터 연골을 분화시키는 14일째부터 발현이 증가되었다. DEC1의 과발현은 연골세포의 제 2형 교원질, 어그리칸의 발현 증가 뿐만 아니라, 제 10형 교원질의 발현을 함께 증가시켰다. 따라서, DEC1은 연골 분화 초기에서 후기까지 관여하는 것을 의미한다.

2.4.2. 관절 연골세포만의 기억기능

관절 연골세포와 줄기세포에서 분화된 연골세포는 형태학 및 분자생물학적으로 큰 차이가 있는 것으로 보고되어 왔다.<sup>13,18</sup> 어떠한 기전에 의해 이러한 차이를 보이는지 우리는 이해해야 하며, 새로운 방법을 끊임없이 시도해야 한다. 연골세포는 단층 배양법으로 오랜 시간 배양을 하면 그 고유의 표현형은 잃어버리지만, 비대화 등의 성격을 보이지는 않는다. 이는 관절 연골세포만의 스스로 고유 성격을 벗어 나지 않으려는 메모리 또는 프로그래밍이 있는 것으로 추측되어 진다. 즉 비대화 단계가 시작 되기 직전에 정지가 일어나서 혈관의 유입이나 석회화등을 억제하는 것이다. 발생단계에서 이루어지는 세포의 메모리 기능은 DNA메틸화 등의 후생학적 현상에 의해 이루어진다.<sup>22,23</sup>

즉, 특정 조직에서만 발현하는 유전자 이외의 유전자는 대부분 발생과정에서 메틸화 및 염색체 구조에 의해 조절을 받아 지속적으로 발현이 억제된다. 따라서, 관절 연골세포는 줄기세포에서 분화된 연골세포와 달리 제 10형 교원질 등의 비대화 관련 유전자가 메틸화에 의해 정지되었을 가능성이 있는 것이다. 이미 DNA메틸화 등은 암등의 질병 유발 기전 등에 관여하는 것으로 오랜 전부터 밝혀져 왔으며, 골 관절염에서 지속적인 단백질 분해 효소 MMP-13 발현 증가가 DNA메틸화에 의해 조절 된다는 연구 결과가 최근에 보고되고 있다.<sup>24,25</sup>

3. 결 론

현재 의학 산업에서 줄기세포를 이용한 세포치료제는 난치성 질환 치료에 해법이 될 수 있는 큰 기대와 희망을 안고 있다. 연골 손상은 75세 이상 고령자에서는 방사선적 소견으로 85 %의 유병을 또는 교통사고 및 운동에 의한 상해에 의해 매우 빈번하게 일어난다. 뚜렷한 치료제가 없는 상황에서 줄기세포는 연골의 재생에 매우 매력적으로 다가온다. 하지만, 본 글에서 서술한 바와 같이 줄기세포는 시험관 또는 동물 모델에서 쉽게 연골로 분화시킬 수 있는 장점과 함께 원하지 않는 타 조직 형성에 의한 문제점 등이 반드시 검증되어야 할 것이다. 연골세포는 발생과정에서 살펴본 바와 같이 연골 형성 이후, 혈관 유입 등을 통해 골 형성이 촉진되며, 이러한 현상은 줄기세포를 이용하여 유도된 연골에서 동일하게 나타남을 이미 많은 연구에서 확인되었다.

기존 연구 초기에는 줄기세포를 이용하여 연골로 분화를 시키기 위한 것에 주력했다면, 앞으로는 어떻게 하면 정상연골에 가까운 연골을 재생시킬 수 있을 것이며, 원하지 않는 유전자 발현 등의 조절 기전과 억제 방법 그리고 분화 조절등을 연구함으로써 임상 적용이 가능한 효율적인 방법이 개발되어야 할 것이다. 따라서, 이에 대한 근본적이고, 가능성 있는 기전을 제시하였으며, 이러한 연구들이 더욱 활발히 진행됨으로써 효율적이고 안전한 세포치료법으로의 연골 재생 기술이 개발되어 질 것이라 기대된다.<sup>26</sup>

**감사의 글:** 이 총설은 21세기 프론티어 연구개발사업단인 세포응용연구사업단의 연구비지원 (SC3020)에 의해 지원받았음.

참고문헌

1. JH Cho, SH Kim, KD Park, *et al.*, Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using a thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) and water-soluble chitosan

- copolymer, *Biomaterials*, **25**, 5743 (2004).
2. BK Hall, T Miyake, All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development, *Bioessays*, **22**, 138 (2000).
  3. JY Lee, JS Lee, YS Son, Morphological and histological characteristics for various types of cartilages, *Tissue Eng. Med.*, **404** (2006).
  4. S Tavella, P Raffo, C Tacchetti, *et al.*, N-CAM and N-cadherin expression during in vitro chondrogenesis, *Exp. Cell. Res.*, **215**, 354 (1994).
  5. J Chimal-Monroy, L Diaz de Leon. Expression of N-cadherin, N-CAM, fibronectin and tenascin is stimulated by TGF-beta1, beta2, beta3 and beta5 during the formation of precartilaginous condensations, *Int. J. Dev. Biol.*, **43**, 49 (1999).
  6. HL Ma, SC Hung, SY Lin, *et al.*, Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **64**, 273 (2003).
  7. F Mwale, D Stachura, P Roughley, *et al.*, Limitations of using aggrecan and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation, *J. Orthop. Res.*, **24**, 1791 (2006).
  8. LJ Sandell, T Aigner, Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis, *Arthritis Res.*, **3**, 107 (2001).
  9. I Girkontaite, S Frischholz, P Lammi, *et al.*, Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies, *Matrix Biol.*, **15**, 231 (1996).
  10. O Pullig, G Weseloh, S Gauer, *et al.*, Osteopontin is expressed by adult human osteoarthritic chondrocytes: protein and mRNA analysis of normal and osteoarthritic cartilage, *Matrix Biol.*, **19**, 245 (2000).
  11. L Kevorkian, DA Young, C Darrah, *et al.*, Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage, *Arthritis Rheum.*, **50**, 131 (2004).
  12. T Kirsch, B Swoboda, H Nah, *et al.*, Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage, *Osteoarthritis Cartilage*, **82**, 294 (2000).
  13. C Karlsson, C Brantsing, T Svensson, *et al.*, Differentiation of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes: analysis of chondrogenic potential and expression pattern of differentiation-related transcription factors, *J. Orthop. Res.*, **25**, 152 (2007).
  14. I Sekiya, JT Vuoristo, BL Larson, *et al.*, In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **22**, 4397 (2002).
  15. S Ichinose, K Yamagata, I Sekiya, *et al.*, Detailed examination of cartilage formation and endochondral ossification using human mesenchymal stem cells, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **32**, 561 (2005).
  16. CG James, CT Appleton, V Ulici, *et al.*, Microarray analyses of gene expression during chondrocyte differentiation identifies novel regulators of hypertrophy, *Mol. Biol. Cell*, **16**, 5316 (2005).
  17. F Dell'Accio, C De Bari, FP Luyten, Molecular markers predictive of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stable cartilage *in vivo*, *Arthritis Rheum.*, **44**, 1608 (2001).
  18. K Peltari, A Winter, E Steck, *et al.*, Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice, *Arthritis Rheum.*, **54**, 3254 (2006).
  19. A Steinert, M Weber, A Dimmler, *et al.*, Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate, *J. Orthop. Res.*, **21**, 1090 (2003).
  20. RM Salaszyk, WA Williams, A Boskey, *et al.*, Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2004**, 24 (2004).
  21. F Mwale, PL Girard-Lauriault, HT Wang, *et al.*, Suppression of genes related to hypertrophy and osteogenesis in committed human mesenchymal stem cells cultured on novel nitrogen-rich plasma polymer coatings, *Tissue Eng.*, **12**, 2639 (2006).
  22. AD Riggs, DNA methylation and cell memory, *Cell Biophys.*, **15**, 1 (1989).
  23. A Bird, DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes Dev.*, **16**, 6 (2002).
  24. HI Roach, T Aigner, DNA methylation in osteoarthritic chondrocytes: a new molecular target, *Osteoarthritis Cartilage*, **15**, 128 (2007).
  25. HI Roach, N Yamada, KS Cheung, *et al.*, Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions, *Arthritis Rheum.*, **52**, 3110 (2005).
  26. GS Khang, MS Kim, HB Lee, *et al.*, Scaffolds for tissue engineering, *Tissue Eng. Med.*, **376** (2006).