

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04448

研究課題名(和文) 強固な骨接合を促進する軟骨再生マイクロパターン基材の開発

研究課題名(英文) Development of cartilage regeneration micropatterned substrates that promote strong cartilage-bone junctions

研究代表者

角南 寛 (Sunami, Hiroshi)

琉球大学・医学部・特命准教授

研究者番号：50374723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、軟骨と骨を強固に接合させるマイクロパターン基材を開発するものである。関節軟骨の欠損部を再生治療する場合、軟骨と骨を強固に接合させることが重要である。我々は、適切な形状を有するマイクロパターン基材に脂肪幹細胞を播種し、これを軟骨へ分化誘導させることで、厚い軟骨組織を形成させることに成功した。基材表面では石灰化の促進も確認されたことから、適切な形状を持ったマイクロパターン基材上で脂肪幹細胞を分化誘導すれば、軟骨が骨に強固に接合した丈夫な軟骨-骨組織を作製できることが分かった。本研究では、このように軟骨と骨の強固な接合を創出する、軟骨再生マイクロパターン基材の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた知見は、軟骨と骨の界面の構造が強固な軟骨-骨接合を生むメカニズムの解明に大いに貢献するものである。また、本研究で開発されたマイクロパターン基材は、軟骨と骨を強固に接合させる新しい軟骨再生治療技術の創出に繋がると考えている。更に、こういった軟骨と骨との接合を重視した新しい軟骨再生治療技術は、腱や靭帯を骨と強固に接合させるような高度な再生治療技術へと発展していく可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：In this study, we develop micropatterned base materials that create strong bonds between the cartilage and the bone. When a defective part of the articular cartilage is treated regeneratively, it is important to form a thick cartilage tissue bonding strongly with the bone. We have succeeded in forming the thick cartilage tissue by differentiation induction of adipose derived stem cells into the cartilage on micropatterned base materials having optimized shapes. It was also confirmed that the calcification was promoted on the micropatterned base materials. These results suggest that we can produce the thick cartilage tissue in which the cartilage and the bone are strongly bonded to each other when adipose derived stem cells are induced differentiation into the cartilage on micropatterned base materials with optimized shapes. In this study, we developed micropatterned base materials for cartilage regeneration, which creates the thick cartilage tissue bonding strongly with the bone.

研究分野：再生医工学、生物物理学、界面科学、高分子化学

キーワード：軟骨再生 マイクロパターン 脂肪幹細胞 石灰化層 アグリカン I型コラーゲン 関節軟骨 再生治療

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

人体にはさまざまな軟骨がある。その中で関節の軟骨に疾患を抱える患者は、高齢者を中心に1000万人以上いると考えられている。できるだけ自己の関節を温存しつつ、疾患部位の状態に合わせて軟骨を再生させる治療が望まれている。我々は、そうした社会的なニーズに応えられるような、**関節軟骨を再生させる画期的なデバイス**を開発したいと考えた。これまでに、軟骨を疾患部に移植投与する研究が多数実施されてきたが、生体内に埋め込まれた軟骨を骨と強固に接合させ、その状態を持続させることができず、軟骨が患部から剥離してしまうことが大きな問題となっていた。そのため、軟骨と骨を強固に接合させ、これを恒常的に維持させる技術が求められていた。

こういった社会的なニーズや技術的な問題点に対し、我々は、**生体の軟骨の多層構造を人工的に再現**できれば、治療のニーズに応え、技術的な問題点を解決できると考えた。生体の軟骨組織は、表層、中間層、深層、石灰化層の四層からなる多層構造をとっている。これらの各層において、軟骨細胞の形態やサイズ、配向性、代謝機能などが異なることが知られている。軟骨と骨の接合に不可欠な軟骨の石灰化は軟骨と骨の境界にある石灰化層で起こる。その石灰化層を発達させ恒常的に維持するには、軟骨の多層構造が健全に発達していることが重要である。我々は、これまでの経験から適切な形状のマイクロパターン基材上で幹細胞を軟骨へ分化誘導させることで、こういった多層構造を再現できると予想した。実際にマイクロパターン基材上で脂肪幹細胞を軟骨へ分化誘導させる予備的な検討を行ったところ、平坦な基材上で軟骨へ分化誘導させたものよりも厚い軟骨組織になることが判明した。我々は、この原因を、マイクロパターン基材の形状が生体内の軟骨の石灰化層のような凹凸構造になっていたためではないかと推察した(図1ab)。これらの検討結果から、我々は、**マイクロパターン基材の凹凸構造を用いて、軟骨の石灰化層の構造と機能を再現**するという独自の着想を得た。生体には様々な関節の軟骨組織があり、それらの石灰化層の構造や機能も多様である。我々は、石灰化層の代替となり得るマイクロパターン基材の候補をいくつも作製し、それらの中から関節の軟骨と骨の接合に最適なパターン形状をスクリーニングする計画である。パターン形状を最適化することで、生体に近い構造と機能を持った関節軟骨組織を作製できると確信している(図1cd)。

また、本研究は、パターン形状を自由自在に設計できる点でも大きな可能性を秘めている。さまざまな形状のマイクロパターン基材を用いて軟骨への分化を詳しく検証すれば、**よく分かっていない、軟骨の石灰化層の凹凸構造が軟骨の分化や発生に及ぼす影響を解明**できると考えている。これは、生化学や発生学分野において極めて重要な発見となる。将来的には、関節軟骨欠損部の骨表面にマイクロパターンを挿入し、軟骨と骨を強固かつ持続的に接合させる新しい軟骨再生デバイスを開発したいと考えている。こういった骨との接合を重視した新しい軟骨再生治療技術は、腱や靭帯と骨を強固に接合させる再生治療技術にも応用できると期待される。

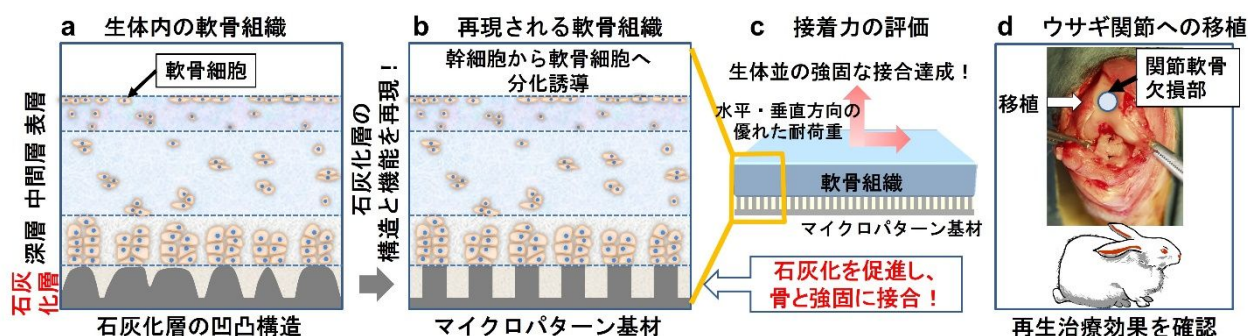


図 1 軟骨の石灰化層の構造と機能をマイクロパターン基材で再現することで、関節の軟骨と骨を強固かつ持続的に接合させる軟骨再生デバイスを開発

2. 研究の目的

本研究は、軟骨と骨を強固に接合させ、その状態を長期的に持続させるマイクロパターン基材を開発するものである。関節軟骨の欠損部を再生治療する場合、軟骨と骨を強固に接合させ、その状態を長期的に維持させる必要がある。我々は、適切な形状を持ったマイクロパターン基材上で脂肪幹細胞を軟骨へ分化誘導させれば、軟骨と骨が強固かつ持続的に接合した軟骨-骨組織を作製できると予想した。本研究は、この軟骨-骨組織の強固で持続的な接合を創出する、**軟骨再生マイクロパターン基材の開発**を目指している。研究期間内に、我々は、このマイクロパターン基材上で脂肪幹細胞を軟骨へ分化誘導させることで、軟骨と骨が強固に接合した厚みのある軟骨-骨組織の多層構造を再現し、これを長期的に維持させたいと考えている。関節軟骨の石灰化層の凹凸構造を模したマイクロパターン基材を用いて、この多層構造を再現できれば、よく分か

っていない軟骨の石灰化層の凹凸構造が軟骨の分化や発生に及ぼす影響の解明に繋がると期待される。

3. 研究の方法

本研究は、軟骨と骨の境界にある石灰化層の凹凸構造の機能を再現すべく、この凹凸構造を模した様々なマイクロパターン基材を作製した。これらのマイクロパターン基材は、シリコンウェハをフォトリソグラフィ技術で微細加工することで作製された。マイクロパターン基材上で脂肪幹細胞から軟骨への分化誘導を行い、最も厚くて強固な軟骨-骨組織を形成できるマイクロパターン基材をスクリーニングした。厚くて強固な軟骨-骨組織を形成した軟骨-骨組織は、各構成要素を染色され、共焦点レーザー走査型顕微鏡で三次元的に観察された。得られた三次元像から、各マイクロパターン基材上に形成された軟骨-骨組織の多層構造を評価し、基材の凹凸構造との関連を調査した。

まず、8インチのP型(100)シリコンウェハ(ウェハ厚: 725 ± 25 μm 、熱酸化膜厚: 600 nm)を用いてマイクロパターン基材の作製を行った。前述のシリコンウェハを1cm角もしくは2cm角にダイシングしたものの上にレジストOFPR-5000LB 23cp(東京応化工業(株))をスピコート(4000 rpm、50 sec)した。これをベイクした後、フォトマスクがセットされたマスクアライナーMA6 BSA(ズース・マイクロテック(株))で露光した。現像とベイクを実施後、多目的ドライエッチング装置RIE-200NL(サムコ(株))を用いてレジスト膜で描かれたパターンを SiO_2 層に転写した。 SiO_2 で描かれたパターンをマスクとして、シリコン深掘エッチング装置MUC-21 ASE-SRE(住友精密工業(株))のポッシュプロセスを実行し、Siを深掘りした。このようにして、凹凸構造を有するマイクロパターン基材を何種類も作製した。次に、走査電子顕微鏡S-4800(株日立ハイテク)およびカラーレーザー3D顕微鏡VK-9710(株キーエンス)を用いて、各マイクロパターン基材の三次元的な形状像を撮影した。この形状像から基本的な形状パラメータを求めた後、各マイクロパターン基材上での脂肪幹細胞の軟骨への分化誘導実験に使用した。

作製されたマイクロパターン基材上に脂肪幹細胞を 1×10^5 cells/cm²の密度で播種し、マイクロパターン基材にしっかりと接着させた後、軟骨誘導培地中で3日、7日、14日、21日、28日、35日、42日間、分化誘導培養(37、5%CO₂)した。これを4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液(ナカライテスク(株))で固定化(室温、12 h)し、細胞核やアグリカン、I型コラーゲン、F-アクチン、石灰化部分を染色した後、形成された軟骨層の厚みや多層構造を共焦点レーザー走査型顕微鏡FV-1000D(オリンパス(株))で三次元的に観察した。

4. 研究成果

作製されたマイクロパターン基材の形状パラメータの実測値は、設計値と殆ど同一であった。このことから、今回作製された各マイクロパターン基材は、設計通りに精緻に作製できていることが分かった。マイクロパターン基材の作製に用いられたシリコンウェハは、フォトリソグラフィで容易かつ精緻に微細加工できる。そのため、我々は、さまざまな凹凸構造のマイクロパターン基材を手早く大量生産し、これらを気軽に使用できる恵まれた研究環境を構築することができた。作製されたマイクロパターン基材は、親水化処理によって細胞接着性を大きく向上させられることも判明した。また、我々は、適切な凹凸構造を有するマイクロパターン基材上で、脂肪幹細胞を軟骨へ分化誘導させ、基材上に軟骨-骨組織の多層構造を形成させることにも成功した。更に、ある特定の凹凸構造を有するマイクロパターン基材によって、脂肪幹細胞から軟骨への分化誘導効率が飛躍的に高まることや、軟骨組織の厚みが大幅に向上すること、基材との極めて強力な接合力が得られることなども発見している。

以上のように、我々は、従来法よりも大幅に厚くて強固な軟骨-骨組織を作製し、これを長期的に維持する独自技術の開発に成功した。(特許出願を予定しているため、これらの研究成果の詳細を記述できない)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Sunami Hiroshi, Shimizu Yusuke, Denda Junko, Yokota Ikuko, Kishimoto Hidehiro, Igarashi Yasuyuki	4. 巻 4
2. 論文標題 A 3D Microfabricated Scaffold System for Unidirectional Cell Migration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advanced Biosystems	6. 最初と最後の頁 2000113 ~ 2000113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adbi.202000113	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ntege Edward H., Sunami Hiroshi, Shimizu Yusuke	4. 巻 14
2. 論文標題 Advances in regenerative therapy: A review of the literature and future directions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 136 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2020.01.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 野村紘史, 清水雄介, 角南寛	4. 巻 47(7)
2. 論文標題 日本産の脂肪組織由来幹細胞の培養上清液を活用したコスメ開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FRAGRANCE JOURNAL	6. 最初と最後の頁 46 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 角南寛, 清水雄介, 普天間直子, 牧田昌士, 大阪直也, 西川靖俊	4. 巻 Vol.36(No.10)
2. 論文標題 組織再生を促進する幹細胞抽出培養シートの開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO INDUSTRY	6. 最初と最後の頁 38 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Yusuke, Ntege Edward Hosea, Sunami Hiroshi	4. 巻 1
2. 論文標題 Adipose tissue-derived regenerative cell-based therapies: Current optimisation strategies for effective treatment in aesthetic surgery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Handbook of Stem Cell Therapy (editor: K. H. Haider)	6. 最初と最後の頁 1~33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-16-6016-0_35-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Yusuke, Ntege Edward Hosea, Sunami Hiroshi, Inoue Yoshikazu	4. 巻 21
2. 論文標題 Regenerative medicine strategies for hair growth and regeneration: A narrative review of literature	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 527~539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2022.10.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Yusuke, Ntege Edward Hosea, Sunami Hiroshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Current regenerative medicine-based approaches for skin regeneration: A review of literature and a report on clinical applications in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 73~80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2022.05.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 SUNAMI Hiroshi	4. 巻 62
2. 論文標題 The Shape of a Microfabricated Scaffold can Control Cell Migration Direction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 62~65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.62.62	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 A. Fuku, Y. Taki, Y. Nakamura, H. Kitajima, T. Takaki, T. Koya, I. Tanida, K. Nozaki, H. Sunami, H. Hirata, Y. Tachi, T. Masauji, N. Yamamoto, Y. Ishigaki, S. Shimodaira, Y. Shimizu, T. Ichiseki, A. Kaneuji, S. Osawa, N. Kawahara	4. 巻 11
2. 論文標題 Evaluation of the Usefulness of Human Adipose-Derived Stem Cell Spheroids Formed Using SphereRing((R)) and the Lethal Damage Sensitivity to Synovial Fluid In Vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 337 ~ 337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11030337	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sunami Hiroshi, Shimizu Yusuke, Futenma Naoko, Denda Junko, Nakasone Hitoshi, Yokota Sayaka, Kishimoto Hidehiro, Makita Masashi, Nishikawa Yasutoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Rapid Stem Cell Extraction and Culture Device for Regenerative Therapy Using Biodegradable Nonwoven Fabrics with Strongly Oriented Fibers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Advanced Materials Interfaces	6. 最初と最後の頁 2101776 ~ 2101776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/admi.202101776	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Y. Taki, A. Fuku, Y. Nakamura, T. Koya, H. Kitajima, I. Tanida, T. Takaki, K. Nozaki, H. Sunami, H. Hirata, Y. Tachi, T. Shimasaki, T. Masauji, N. Yamamoto, Y. Ishigaki, S. Shimodaira, Y. Shimizu, T. Ichiseki, A. Kaneuji, S. Osawa, N. Kawahara	4. 巻 55
2. 論文標題 A morphological study of adipose-derived stem cell sheets created with temperature-responsive culture dishes using scanning electron microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 187 ~ 198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-022-00319-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 角南寛, 傳田淳子, 清水雄介, 普天間直子, 牧田昌士, 大坂直也, 西川靖俊
2. 発表標題 幹細胞の抽出培養を促進する三次元培養基材の開発
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本哲太, 宇田耀一, 大沼かおり, 川瀬倫子, 石黒亘, 朝比奈潤子, 角南寛, 清水雄介, 佐々木一謹
2. 発表標題 サイズ排除クロマトグラフィー精製を用いた細胞外小胞メタボローム解析手法の開発
3. 学会等名 第7回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角南寛, 傳田淳子, 與古田沙耶香, 清水雄介
2. 発表標題 脂肪幹細胞の軟骨分化を促進する足場基材の開発
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角南寛, 傳田淳子, 普天間直子, 清水雄介, 平田哲生, 山本俊成
2. 発表標題 大学および医療機関の臨床検体情報共有のための新システム
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 春川慧, 角南寛, 牧谷修治, 土田龍太郎, 井浦陽介, 石田肇
2. 発表標題 凹凸表面を有する培養基材の開発とそれを用いた細胞機能制御
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会 (WEB)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 角南寛, 清水雄介
2. 発表標題 播種から移植まで使い勝手重視の細胞シート
3. 学会等名 13thバイオメディカルインタフェース・ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi SUNAMI, Yusuke SHIMIZU, Junko DENDA, Ikuko YOKOTA, Yasuyuki IGARASHI
2. 発表標題 Development of a new taxis assay using micro-patterned scaffolds
3. 学会等名 IVC21 (Malmo, Sweden) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Sunami, Y. Shimizu, I. Yokota, J. Denda, Y. Igarashi
2. 発表標題 Stem cell separation using micro-patterned scaffolds
3. 学会等名 TERMIS-AP (Brisbane, Australia) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Sunami
2. 発表標題 The shape of a microfabricated scaffold can control cell protrusion and migration direction
3. 学会等名 Cell Bio 2022 (Washington DC, USA) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 コラゲナーゼを用いないで脂肪組織から脂肪由来幹細胞を分離抽出培養するための方法、及び脂肪由来幹細胞分離抽出用キット	発明者 角南寛、清水雄介、 普天間直子、牧田昌 士、大坂直也	権利者 琉球大学・ ORTHOREBIRTH(株)
産業財産権の種類、番号 特許、第6783969	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 脂質二重膜に覆われた微粒子又は細胞外小胞の回収方法および脂質二重膜に覆われた微粒子又は細胞外小胞を回収するための回収キット	発明者 清水雄介、角南寛、 他7名	権利者 琉球大学・ ヒューマン・メ タボローム・テ
産業財産権の種類、番号 特許、第7160294号	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	清水 雄介 (Shimizu Yusuke) (10327570)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (18001)	
研究 分 担 者	東 千夏 (Azuma Chinatsu) (60579085)	琉球大学・病院・講師 (18001)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------