

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09504

研究課題名（和文）生体と類似構造を有する三次元骨軟骨組織を用いた新規変形性関節症治療法の開発

研究課題名（英文）Development of in vivo-like 3D vascularized osteochondral tissue

研究代表者

下村 和範（Shimomura, Kazunori）

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：40755998

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、生体内に類似した構造・機能を有する三次元骨軟骨モデルの作成を目指し研究を行なった。軟骨層は、ヒト軟骨細胞および新規開発の光硬化性ハイドロゲルに2型コラーゲンを混和し、安定して硝子軟骨様の三次元組織が作成が可能となった。骨層は、1型コラーゲンへ間葉系幹細胞とヒト臍帯静脈内皮細胞を共培養することで三次元的な血管網を有する骨組織様の三次元組織の作成が可能となった。骨層については更なる改良の余地があるものの、前述の結果より、概ね目的とする三次元モデルの作成へとつながる成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

in vitroで生体に類似した三次元骨軟骨組織を作成することにより、in vivoでの動物実験を減らすことが可能となり、本三次元モデルを用いた変形性関節症の分子メカニズムの解明や新規変形性関節症治療薬の開発のための薬剤スクリーニングの系の確立、さらには本三次元組織を用いた新たな骨軟骨再生治療の開発へ繋がる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to create a three-dimensional (3D) osteochondral model with the structures and functions, similar to those in vivo. For the cartilage layer, human chondrocytes were seeded in a newly developed photocrosslinkable hydrogel and type 2 collagen, and a hyaline cartilage-like 3D tissue was successfully created. For the bone layer, human mesenchymal stem cells and human umbilical vein endothelial cells were co-cultured in type 1 collagen, and a bone-like tissue with a 3D vascular network was also successfully created. Although there is some rooms for further improvement of the bone layer, the present results have led to the creation of the desired 3D model.

研究分野：整形外科、スポーツ整形外科、再生医療、リハビリテーション

キーワード：骨軟骨再生 三次元組織 骨軟骨組織 血管構造 軟骨再生 骨再生 変形性関節症 生体内類似構造

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

関節軟骨損傷は頻度の高い疾患であるが、関節軟骨は無血管組織であり細胞成分が少ないという独特の組織構造から、自己修復能に乏しく一度損傷すると自然修復は期待できない。そのため軟骨損傷を放置すると高率に変形性関節症へ進行することが知られている。関節症の初期から進行期では、鎮痛剤やヒアルロン酸注射、理学療法などを行うが、効果は限定的であり、また関節症末期では主に人工関節置換術等が行われ、近年手術成績の向上が見られるが、一方で長期耐用性の問題や感染に弱いといった欠点もある。そのため、いずれの病期においても傷害された関節の治癒を促す有効な治療は存在しない。関節症の治療を考える場合、病期に応じた治療戦略が重要であり、(1)関節症初期から進行期では進行予防治療、(2)高度に関節変形が生じた末期の関節症では関節修復・再生治療が理想的な治療となり得る。

関節症の進行予防治療では、近年、関節症発症に關与する分子標的薬の開発(Schnitzer TJ, JAMA 2019;322(1):37-48)や幹細胞の関節注射(Yokota N, Shimomura K, Am J Sports Med 2019;47(11):2577-2583)など行われており、一定の効果が認められることから、新規薬剤開発に注目が集まっている。新規薬剤開発においては、薬剤スクリーニング系が重要であるが、従来は2次元培養(in vitro)や動物モデルが用いられてきた。2次元培養系は生体内とは類似しない環境であり、しばしば in vivo との矛盾が指摘されている。一方で、動物を用いた評価ではコストがかかり、近年実験動物使用の低減化も提唱されている。そこで、今後は in vitro の系において、安価かつ簡便で、より生体に近い環境での評価が可能な系の確立が望ましいと考える。

関節再生治療として、近年、様々な骨軟骨再生法が開発されており(Shimomura K, Tissue Eng Part B Rev 2014;20(5):468-76)、その多くは様々なバイオマテリアル(生物由来材料、高分子ポリマーなど)を利用して体外で三次元骨軟骨組織を作成し、関節損傷部へ移植する方法が主流である。一方で、移植組織の生着性や長期の耐用性などまだまだクリアされるべき課題は多い。そこで、移植後の生着率を向上し、安定した長期成績を得るためには、より本来の生体内構造や機能に近づけた移植組織(三次元骨軟骨組織)の作成が必要である。

### 2. 研究の目的

我々は独自に、細胞外基質の成分であるフィロネクチンやゼラチンを細胞表面に形成させ、細胞の種類や配置を三次元的に積層させる技術を開発し、さらに作成した組織内に三次元血管網を形成させることで、これまでに皮膚、心筋、胎盤、癌転移モデルなど生体に類似した三次元組織の作成に成功している(Matsusaki M, J Biomed Mater Res A 2015;103(10):3386-96. Amano Y, Acta Biomater 2016;33:110-21)。本研究の目的は、これらの三次元組織作成法を応用し、軟骨細胞、骨芽細胞(または間葉系幹細胞)、血管内皮細胞を三次元的に配置させ、in vitro の系でより生体に類似した三次元骨軟骨組織を作成することを目的とする。本三次元モデルの作成により、(1)新規変形性関節症治療薬の開発のための安価かつ簡便な新規の薬剤スクリーニングの系の基盤技術の確立、(2)変形性関節症などの関節疾患の病因メカニズムの解析、(3)さらには本三次元組織を用いた新たな骨軟骨再生治療の開発へ繋がることが期待できる。

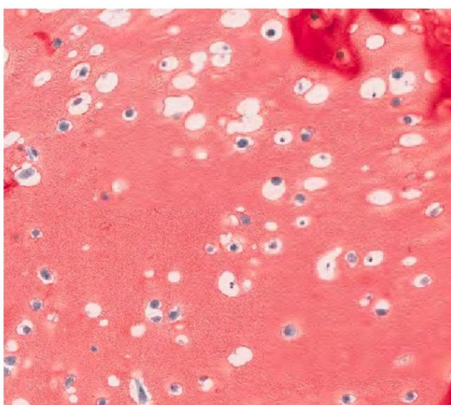
### 3. 研究の方法

生体内構造・機能を模した三次元骨軟骨モデルの作成のため、以下の手法により実験を行った。軟骨層は、人工膝関節置換術で得られたヒト軟骨細胞および軟骨基質に模して新規に開発した光硬化性ハイドロゲルに2型コラーゲンを混和したものを細胞外基質として使用し作成した。次いで、血管網を有する三次元骨組織の作成では、細胞種、マトリックスの最適化のため様々な条件で比較検討を行った。細胞として間葉系幹細胞、骨芽細胞を比較検討し、またマトリックスとしては骨と同様の細胞外基質である1型コラーゲンをベースとして、コラーゲンの最適な濃度の検討、さらにハイドロキシアパタイトの添加およびその濃度の最適化を行った。評価は、関連遺伝子の発現、組織評価にて行った。

#### 4. 研究成果

前述のように軟骨層は、人工膝関節置換術で得られたヒト軟骨細胞および軟骨基質に模して開発した光硬化性ハイドロゲルに2型コラーゲンを混和したものを細胞外基質として使用し、作成した。軟骨関連遺伝子の発現 (col2A1, sox9, Aggrecan など) 組織染色で評価し、安定してより硝子軟骨に類似した三次元組織が作成が可能となった(図1)。次いで、血管網を有する三次元骨組織の作成では、前述のように細胞として間葉系幹細胞、骨芽細胞を比較検討し、またマトリックスとしては骨と同様の細胞外基質である1型コラーゲンをベースとして、コラーゲンの最適な濃度の検討、さらにハイドロキシアパタイトの添加およびその濃度の最適化を行った。結果として、1型コラーゲンをマトリックスとして間葉系幹細胞とヒト臍帯静脈内皮細胞を共培養することで三次元的な血管網を有する骨組織様の三次元組織の作成に成功している(図2)。さらに、より本来の骨組織に近づけるため、ハイドロキシアパタイトを様々な条件下で添加を行ったが、三次元骨組織の作成は可能であったものの、血管網など生体内の骨組織と比べると、更なる検討を要すると思われた。しかしながら、生体内に類似した三次元軟骨組織に加え、血管網を有する三次元骨組織の作成が可能となったことから、これらの研究成果は、今後、変形性関節症治療薬の開発や分子メカニズムの解明、さらには骨軟骨再生治療の基盤研究となることが期待される。

サフラニンO染色



アルシアンブルー染色



図1 軟骨層

サフラニンO染色、アルシアンブルー染色による組織染色像  
軟骨層として、良好な硝子軟骨様組織の作成が可能となった。

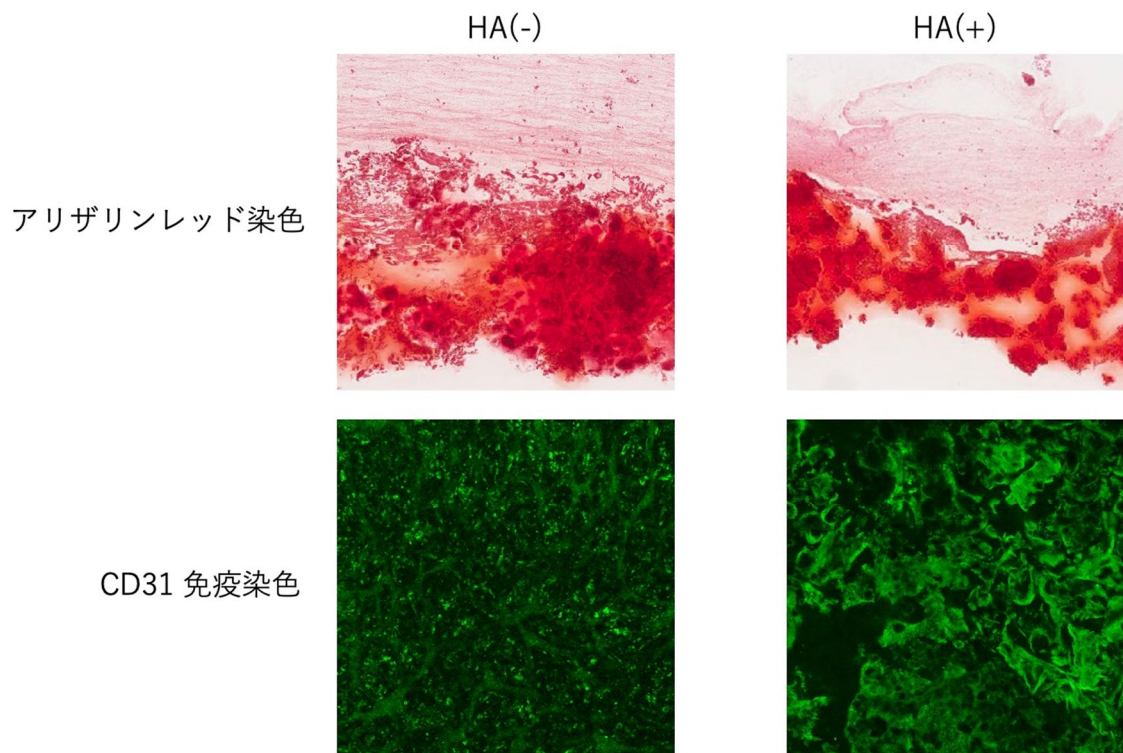


図2 骨層

アリザリンレッド染色による石灰化の評価と CD31 免疫染色による血管網形成の評価  
骨層として、良好な骨様の組織の作成が可能となった。

ハイドロキシアパタイト(HA)の添加無しでは、良好な血管形成が得られているが、添加あり  
では、血管形成はやや不良である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 7件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kinugasa K, Shimomura K, Tachibana Y, Hiramatsu K, Horibe S, Shino K, Tanaka Y	4. 巻 61
2. 論文標題 Posterior Ankle Impingement Caused by Hyaline-like Cartilage Generation in Ballet Dancers -A Report of 2 Cases.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Foot Ankle Surg	6. 最初と最後の頁 e9-e14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.jfas.2021.10.015	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 該当する
1. 著者名 Jacob G, Shimomura K, Yogesh K, Nakamura N	4. 巻 3
2. 論文標題 Tissue Wrapping Augmentation for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: A Review of Clinical Literature.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biologic Orthopedics Journal.	6. 最初と最後の頁 e1-e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.22374/boj.v3iSP2.31	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 該当する
1. 著者名 Jacob G, Shimomura K, Nakamura N.	4. 巻 8
2. 論文標題 Osteochondral Injury, Management and Tissue Engineering Approaches.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 580868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.580868	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 Hanai H, Jacob G, Nakagawa S, Tuan RS, Nakamura N, Shimomura K	4. 巻 8
2. 論文標題 Potential of soluble decellularized extracellular matrix for musculoskeletal tissue engineering - comparison of various mesenchymal tissues -	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 581972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.581972	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 Shimomura K, Hamada H, Hart DA, Ando W, Nishii T, Trattng S, Nehrer S, Nakamura N.	4. 巻 13
2. 論文標題 Histological Analysis of Cartilage Defects Repaired with an Autologous Human Stem-cell Construct 48 Weeks Post-Implantation Reveals Structural Details not Detected by T2 Mapping MRI.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cartilage	6. 最初と最後の頁 694S-706S
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1947603521989423	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 Yokota N, Lyman S, Hanai H, Shimomura K, Ando W, Nakamura N.	4. 巻 50
2. 論文標題 Clinical Safety and Effectiveness of Adipose-Derived Stromal Cell vs Stromal Vascular Fraction Injection for Treatment of Knee Osteoarthritis: 2 Year Results of Parallel Single-Arm Trials.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Sports Med	6. 最初と最後の頁 2659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/03635465221107364.	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 該当する

1. 著者名 Tanaka A, Tsujii A, Shimomura K, Yonetani Y, Hamada M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Two uncommon complications related to suture knots after meniscal all-inside suture repair: A case report.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JBJS Case Connect.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2106/JBJS.CC.22.00014.	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 Fernandes TL, Bueno DF, Shimomura K, Shao Z, Gomoll AH.	4. 巻 10
2. 論文標題 Editorial: Tissue Engineering and Cell Therapy for Cartilage Restoration.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 947588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.947588.	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 該当する

1. 著者名 Shimomura K, Jacob G, Hanai H, Nakamura. N	4. 巻 -
2. 論文標題 Utilization of Orthobiologic Augmentation for Meniscal Repairs: Current Concepts and Future Perspectives.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cartilage & Joint Preservation.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcjp.2022.100090	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 該当する

1. 著者名 Ohtsuru T, Otsuji M, Nakanishi J, Lyman S, Hanai H, Shimomura K, Ando W, Nakamura N.	4. 巻 -
2. 論文標題 Freeze Dried Noncoagulating Platelet-Derived Factor Concentrate is a Safe and Effective Treatment for Early Knee Osteoarthritis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.	6. 最初と最後の頁 in press
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 該当する

1. 著者名 Shimomura K, Ando W, Hart DA, Yonetani Y, Horibe S, Nakamura N.	4. 巻 -
2. 論文標題 Five-year outcomes following implantation of a scaffold-free tissue-engineered construct generated from autologous synovial mesenchymal stromal cells for repair of knee chondral lesions.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Orthop J Sports Med.	6. 最初と最後の頁 in press
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 該当する

1. 著者名 下村和範 米谷泰一 田中綾香 辻井聡 濱田雅之	4. 巻 -
2. 論文標題 解剖学的長方形骨孔前十字靭帯再建術における移植腱の違いによる成績比較 - 骨付き膝蓋腱vs骨付き大腿四頭筋腱 -	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JOSKAS	6. 最初と最後の頁 in press
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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazunori Shimomura, Benjamin B. Rothrauff, David A. Hart, Shuichi Hamamoto, Masato Kobayashi, Hideki Yoshikawa, Rocky S. Tuan, Norimasa Nakamura
2. 発表標題 Enhanced Repair of Meniscal Hoop Structure Injuries Using An Aligned Electrospun Nanofibrous Scaffold Combined with a Mesenchymal Stem Cell-derived Tissue Engineered Construct
3. 学会等名 第26回日本軟骨代謝学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazunori Shimomura, Norimasa Nakamura
2. 発表標題 Cartilage Regeneration by a Scaffold-Free Tissue-Engineered Construct Generated From Autologous Synovial Mesenchymal Stem Cells（シンポジウム）
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下村和範
2. 発表標題 ナノレベル線維構造を有するスキャフォールドを用いた新たな半月板治療法の確立- 変形性関節症の予防を目指して -
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shimomura K, Ando W, Nakamura N.
2. 発表標題 Cartilage Regeneration by a Scaffold-Free Tissue-Engineered Construct Generated From Autologous Synovial Mesenchymal Stem Cells.
3. 学会等名 JOSKAS-JOSSM 2020（招待講演）
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 Shimomura K, Ando W, Hart DA, Yonetani Y, Horibe S, Nakamura N.
2. 発表標題 Five-year Outcome of a Scaffold-free Mesenchymal Stem Cell-based Tissue-engineered Construct for Repair of Knee Chondral Lesion.
3. 学会等名 The 16th World Congress of the International Cartilage Repair and Joint Preservation Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shimomura K, Yonetani Y, Tanaka A, Tsujii A, Hamada M.
2. 発表標題 Comparison of clinical outcomes after anatomic rectangular tunnel anterior cruciate ligament reconstruction with an autograft between bone-patellar tendon-bone and quadriceps tendon.
3. 学会等名 JOSKAS-JOSSM 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下村和範、中村憲正
2. 発表標題 軟骨再生の現状と将来展望 (シンポジウム: 新時代の膝温存治療を考える)
3. 学会等名 第139回 中部日本整形外科災害外科学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下村和範、中村憲正
2. 発表標題 滑膜間葉系幹細胞を用いた軟骨再生 (シンポジウム: 半月板・軟骨再生のバイオメカニクス)
3. 学会等名 第49回 日本臨床バイオメカニクス学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下村和範、中村憲正
2. 発表標題 スキャフォールドフリー滑膜間葉系幹細胞由来三次元人工組織を用いた軟骨再生（シンポジウム：スポーツ損傷に対するバイオセラピー・再生医療）
3. 学会等名 第33回 日本臨床スポーツ医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下村和範、辻井聡、米谷泰一
2. 発表標題 解剖学的長方形骨孔前十字靭帯再建術における移植腱の違いによる臨床成績の比較 -骨付き大腿四頭筋腱 vs 骨付き膝蓋腱-
3. 学会等名 第33回 日本臨床スポーツ医学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計11件

1. 著者名 下村和範、中村憲正	4. 発行年 2021年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 5
3. 書名 膝関節鏡視下手術（ビジュアル・サージカルテクニック）Chapter 4 診断：正常膝関節の鏡視所見	

1. 著者名 Jacob G, Shimomura K, Nakamura N	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 9
3. 書名 ISAKOS/ICRS Book “Cartilage Injury of the Knee” Chapter 20: Role of MSCs in Symptomatic Cartilage Defects	

1. 著者名 Jacob G, Shimomura K, Hart DA, Nakamura N.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 13
3. 書名 ISAKOS/ICRS Book “Early Osteoarthritis” Chapter 15: The Current Role of Stem Cell Therapy and iPS Cells.	

1. 著者名 Jacob G, Shimomura K, Hart DA, Nakamura N	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 11
3. 書名 ISAKOS/ICRS Book “Early Osteoarthritis” Chapter 19: Meniscus Injury and Early Osteoarthritis.	

1. 著者名 Jacob G, Shimomura K, Hart DA, Fujie H, Nakamura N	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 15
3. 書名 ISAKOS Book “Orthopaedic Biomechanics in Sports Medicine” Chapter 5: Mechanical and Biologic Properties of Articular Cartilage Repair Biomaterials.	

1. 著者名 Iseki T, Rothrauff BB, Shimomura K, Nakamura N	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 8
3. 書名 ISAKOS Book “Orthopaedic Biomechanics in Sports Medicine” Chapter 33: Biomechanics of Cartilage Repair.	

1. 著者名 Jacob G, Shimomura K, Ando W, Hart DA, Nakamura N	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 7
3. 書名 ISAKOS Book “Joint Function Preservation” Chapter 20: Biphasic Osteochondral Restoration Techniques Using Synovial Stem Cells and Artificial Bone.	

1. 著者名 Shimomura K, Hart DA, Ando W, Nakamura N	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 9
3. 書名 ISAKOS Book “Advances in Knee Ligament and Knee Preservation Surgery” Chapter 35: Clinical Application of Scaffold-Free Tissue-Engineered Construct Derived from Synovial Stem Cells.	

1. 著者名 Ando W, Wolfe I, Shimomura K, Lyman S, Yokota N, Nakamura N	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 14
3. 書名 ISAKOS Book “Advances in Knee Ligament and Knee Preservation Surgery” Chapter 37: Current Introduction of the Biological Agent Derived from Adipose Tissue to the Treatment of Knee Osteoarthritis.	

1. 著者名 Shimomura K, Hart DA, Nakamura N	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 12
3. 書名 ISAKOS/ICRS Book “Orthobiologics: Injectable Therapies for the Musculoskeletal System” Chapter 22: Meniscal Lesions: Cell Therapy.	

1. 著者名 Fernandes TL, Shimomura K, Hart DA, Boffa A, Nakamura N	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 14
3. 書名 ISAKOS/ICRS Book “Orthobiologics: Injectable Therapies for the Musculoskeletal System” Chapter 25: Cartilage Lesions and Osteoarthritis: Cell Therapy.	

〔産業財産権〕

〔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	松崎 典弥  (Matsusaki Michiya)  (00419467)	大阪大学・大学院工学研究科・教授    (14401)	
研究分担者	中村 憲正  (Nakamura Norimasa)  (50273719)	大阪大学・国際医工情報センター・招へい教授    (14401)	

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
---------	---------