

令和 3 年 4 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09055

研究課題名（和文）コラーゲン3Dプリンターを用いたオーダーメイド骨・軟骨インプラントの開発

研究課題名（英文）Development of bone and cartilage implant using collagen 3D printer

研究代表者

武富 修治（Taketomi, Shuji）

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70570018

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、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞を含んだコラーゲン主体のインプラントの造形技術の開発を行った。主に軟骨組織への応用を検討したが、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞そのものを用いるより、一定程度軟骨細胞に分化誘導してから用いる方が、より良好な軟骨組織を形成することが分かった。これらの組織を実験動物の関節内に移植したところ、良質な軟骨を維持できることも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨、軟骨の欠損は骨折などの外傷や変形性関節症、感染症などにより引き起こされ、治療が困難になる場合も珍しくない。軟骨欠損に対しては、自家軟骨細胞から造形した軟骨組織が保険収載されているが、関節鏡視下での細胞採取の侵襲を要し、また移植に際しては欠損部に合わせた形状の細工を術中に行う必要があり、欠損部に精密に整合させることも困難である。脂肪組織は局所麻酔下に皮下から容易に採取でき、豊富に間葉系幹細胞を含むことが知られている。本研究は低侵襲で簡便に軟骨移植用インプラントを造形することを可能にするものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we have developed a technique to make an implant which consists of collagen and human adipose-derived stem cells. First, we mainly examined optimal conditions for cartilage regeneration. Various in vitro experiments suggested that human adipose-derived stem cells should be used after chondrocyte differentiation by chondrogenic cytokines such as BMP-2 and TGF-beta1. These implants could form cartilage tissues in animal transplantation experiments.

研究分野：整形外科

キーワード：整形外科

### 1. 研究開始当初の背景

骨、軟骨の欠損は骨折などの外傷や変形性関節症、感染症などにより引き起こされ、その結果重大な生活の質の低下を招く。現状では、手術を要する大きな骨欠損に対しては第一に自家骨移植が行われるが、自家骨を採取する際には当然ながら健全な骨を犠牲にする必要があり、よって採取できる量にも限界がある。代替のマテリアルとして、ハイドロキシアパタイトや -TCP などの人工骨のブロックや粉末などが用いられているが、骨形成のための細胞の足場とある程度の初期強度を付与することはできても、移植量が大きくなると良好な骨癒合が得られにくく、欠損部に合わせた造形も困難で、また術後長期にリモデリングされず、本来の骨強度に到達しえないことも少なくない。軟骨欠損に対しては、自家軟骨細胞から造形した軟骨組織が保険収載されているが、関節鏡視下での細胞採取の侵襲を要し、また移植に際しては欠損部に合わせた形状の細工を術中に行う必要があり、欠損部に精密に整合させることも困難である。軟骨欠損に対する臨床試験としては間葉系幹細胞を用いた再生医療も盛んに行われており、体外で培養・増幅した滑膜由来幹細胞を関節鏡視下に欠損部に充填する方法などは良好な成績を示しているが、滑膜組織を採取するための外科的処置は避けられない。軟骨については上記の人工骨のような実用化されたマテリアルは存在せず、関節近傍の外傷で骨軟骨が複合欠損した場合などの機能再建は極めて困難となる。

一方、自家組織・細胞と人工マテリアルの中間的な存在として、他家骨移植がある。国内ではその応用は限定的であるものの、脱細胞化した骨組織を移植すると人工骨より早く骨癒合がみられる。また最近の報告で、骨格成長後にマウスの関節で軟骨細胞を死滅させても基質に変性は生じず、逆に変形性関節症が抑制されることが分かった。成体では、無細胞でも生理的な骨基質さえあれば早くに細胞が遊走・生着して自己組織化すること、関節軟骨の場合はその維持に細胞はさほど必要ではないことが想定され、骨・軟骨とも欠損部の修復には生理的な基質さえあれば事足りる可能性が十分考えられる。

### 2. 研究の目的

今回我々は、コラーゲンを人工合成・重合する技術を開発し、3D プリンターでオーダーメイドに造形する技術を世界に先駆けて開発した。コラーゲンは骨や軟骨の基質の主成分であり、CT、MRI 画像を基にオーダーメイドで骨、軟骨欠損に合わせた組織片を造形することができる。我々は細胞毒性がなく生体親和性が高く、骨・軟骨にそれぞれ特有の細胞外基質を模倣する材料を用い、かつ欠損部を事前に再構築した形状で移植することで、理想的な骨軟骨再生が実現できるのではないかと考えた。複数種のコラーゲンをを用い患者毎の骨・軟骨欠損部に合わせたオーダーメイドインプラントを作成する方法は国内外で報告がない。本研究は、骨・軟骨欠損の再生治療法を創出し、これまでに無い骨軟骨欠損の治療法の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

コラーゲンインプラントの力学試験、コラーゲンインプラント内での組織幹細胞の生着、増殖能、分化能の評価(in vitro, in vivo)、家兎骨・軟骨欠損モデルを用いたコラーゲンインプラントの移植実験、を実施した。

#### コラーゲンインプラントの力学強度の至適条件の決定

コラーゲンの濃度を変えてインプラントを作成し、力学負荷試験を行って至適な力学特性を決定する。これらの検討で十分な力学強度が担保できない場合には、インプラント作成後にコラーゲン架橋等の化学処理を施し力学強度の増強を検討する。

コラーゲンインプラント内での組織幹細胞の生着、増殖能、分化能の評価(in vitro, in vivo) : これらの合成コラーゲン自体の生体安全性はヌードマウスを用いた実験で確認済みであるが、内部に細胞を包埋する検討は行っておらず、組織幹細胞を用いて基礎検討を行う。先述で条件検討したコラーゲンインプラント内にヒト脂肪組織幹細胞を 3D プリンター下に配置する。組織幹細胞を含有したインプラントを Dish 上で培養し、in vitro での細胞生着、増殖能、分化能、基質産生能を評価する。分化能は骨分化マーカーとして RUNX2, OSX, COL1A1, オステオポンチン, オステオカルシンを、軟骨分化マーカーとして SOX9, COL2A1, Aggrecan (アグリカン) の発現を調べる。基質産生能として免疫染色でインプラント内の骨基質(COL1A1, オステオポンチン, オステオカルシン)および軟骨基質(COL2A1, Aggrecan)の蛋白発現を調べる。また、十分な分化が得られない場合には、骨分化もしくは軟骨分化を誘導する成長因子や化合物をインプラント内に含有させ、至適条件を決定する。

家兎軟骨欠損モデルを用いたコラーゲンインプラントの移植実験 : 家兎大腿骨滑車軟骨欠損モデルを用いる。骨格が成熟した家兎を用い、大腿骨滑車軟骨に欠損を作成する。3D プリンタ

ーで作成したコラーゲンインプラントを欠損部作成 1 週後に移植し、経時的に組織切片を評価する。

#### 4 . 研究成果

まず I 型コラーゲンを主成分に複数の条件でインプラント作成を行い、力学強度試験を実施して粗く条件を絞り込んだ。次にゲルの段階で、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞を複数の細胞密度で混合、懸濁し、インプラントを試作した。一般的な細胞培養用培地で器官培養を行ったのちに RNA を回収し、定量的 PCR によって分化傾向を評価した。通常の培地で培養した限りは、SOX9, COL2A1, COL9A1, COL11A2, Aggrecan などの軟骨分化マーカーの劇的な増加はみられず、特徴的な分化を示すことはなかった。細胞増殖についても、一定数以上の増殖は見られなかった。次に BMP-2, TGFbeta-1 などを用いてヒト脂肪由来間葉系幹細胞に軟骨分化誘導をかけ、その後に同様の実験を行い、同様の評価を行った。すると、これらの軟骨分化マーカーについては比較的良好な増加が認められ、COL1A1, オステオポンチン、オステオカルシン、Runx2, Osterix などの骨分化マーカーについては目立った増加は伴わなかった。組織切片を作成し、各種染色を実施したところ、軟骨基質の蓄積について確認ができた。これらの条件で作成された組織を、家兎軟骨欠損モデル（大腿骨滑車軟骨部に欠損を作製）に移植したところ、術後 8 週間の時点でサフラニン 0 陽性の軟骨様組織が広範囲にみられた。

軟骨欠損部、特に荷重部への移植については一定強度の足場素材が付与されることが望まれる。また同素材は半月板治療への応用も期待され、今後の研究課題として検証を進めていきたい。

## 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 1件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Omata Yasunori, Frech Michael, Lucas S?bastien, Primbs Tatjana, Knipfer Lisa, Wirtz Stefan, Kadono Yuhō, Saito Taku, Tanaka Sakae, Sarter Kerstin, Schett Georg, Zaiss Mario M.	4. 巻 136
2. 論文標題 Type 2 innate lymphoid cells inhibit the differentiation of osteoclasts and protect from ovariectomy-induced bone loss	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115335 ~ 115335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115335	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 Zujur Denise, Kanke Kosuke, Onodera Shoko, Tani Shoichiro, Lai Jenny, Azuma Toshifumi, Xin Xiaonan, Lichtler Alexander C., Rowe David W., Saito Taku, Tanaka Sakae, Masaki Hideki, Nakauchi Hiromitsu, Chung Ung-il, Hojo Hironori, Ohba Shinsuke	4. 巻 14
2. 論文標題 Stepwise strategy for generating osteoblasts from human pluripotent stem cells under fully defined xeno-free conditions with small-molecule inducers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 19 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.12.010	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 SUGIMOTO Hikaru, MURAHASHI Yasutaka, CHIJIMATSU Ryota, MIWA Satoshi, YANO Fumiko, TANAKA Sakae, SAITO Taku	4. 巻 41
2. 論文標題 Primary culture of mouse adipose and fibrous synovial fibroblasts under normoxic and hypoxic conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 43 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.41.43	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 Murahashi Yasutaka, Yano Fumiko, Chijimatsu Ryota, Nakamoto Hideki, Maenohara Yuji, Amakawa Masahiro, Miyake Yoshihide, Yamanaka Hiroyuki, Iba Kousuke, Yamashita Toshihiko, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 9
2. 論文標題 Oral administration of EP4-selective agonist KAG-308 suppresses mouse knee osteoarthritis development through reduction of chondrocyte hypertrophy and TNF secretion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56861-6	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 Nakamoto Hideki, Katanosaka Yuki, Chijimatsu Ryota, Mori Daisuke, Xuan Fengjun, Yano Fumiko, Omata Yasunori, Maenohara Yuji, Murahashi Yasutaka, Kawaguchi Kohei, Yamagami Ryota, Inui Hiroshi, Taketomi Shuji, Taniguchi Yuki, Kanagawa Motoi, Naruse Keiji, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 online
2. 論文標題 TRPV2 is involved in induction of lubricin and suppression of ectopic endochondral ossification in articular joints	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.41684	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 Maenohara Yuji, Chijimatsu Ryota, Tachibana Naohiro, Uehara Kosuke, Xuan Fengjun, Mori Daisuke, Murahashi Yasutaka, Nakamoto Hideki, Oichi Takeshi, Chang Song Ho, Matsumoto Takumi, Omata Yasunori, Yano Fumiko, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 36
2. 論文標題 Lubricin Contributes to Homeostasis of Articular Cartilage by Modulating Differentiation of Superficial Zone Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	6. 最初と最後の頁 792 ~ 802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbmr.4226	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 Kobayashi Masato, Chijimatsu Ryota, Hart David A., Hamamoto Shuichi, Jacob George, Yano Fumiko, Saito Taku, Shimomura Kazunori, Ando Wataru, Chung Ung il, Tanaka Sakae, Yoshikawa Hideki, Nakamura Norimasa	4. 巻 15
2. 論文標題 Evidence that TD 198946 enhances the chondrogenic potential of human synovium derived stem cells through the NOTCH3 signaling pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine	6. 最初と最後の頁 103 ~ 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/term.3149	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 Kushioka Junichi, Kaito Takashi, Chijimatsu Ryota, Okada Rintaro, Ishiguro Hiroyuki, Bal Zeynep, Kodama Joe, Yano Fumiko, Saito Taku, Chung Ung-il, Tanaka Sakae, Yoshikawa Hideki	4. 巻 10
2. 論文標題 The small compound, TD-198946, protects against intervertebral degeneration by enhancing glycosaminoglycan synthesis in nucleus pulposus cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-71193-6	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 Higuchi Junya, Yamagami Ryota, Matsumoto Takumi, Terao Tomohiro, Inoue Keita, Tsuji Shinsaku, Maenohara Yuji, Matsuzaki Tokio, Chijimatsu Ryota, Omata Yasunori, Yano Fumiko, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 14
2. 論文標題 Associations of clinical outcomes and MRI findings in intra-articular administration of autologous adipose-derived stem cells for knee osteoarthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 332 ~ 340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2020.04.003	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 Okada Keita, Mori Daisuke, Makii Yuma, Nakamoto Hideki, Murahashi Yasutaka, Yano Fumiko, Chang Song Ho, Taniguchi Yuki, Kobayashi Hiroshi, Semba Hiroaki, Takeda Norihiko, Piao Wen, Hanaoka Kenjiro, Nagano Tetsuo, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 10
2. 論文標題 Hypoxia-inducible factor-1 alpha maintains mouse articular cartilage through suppression of NF- $\kappa$ B signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-62463-4	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 Hamamoto Shuichi, Chijimatsu Ryota, Shimomura Kazunori, Kobayashi Masato, Jacob George, Yano Fumiko, Saito Taku, Chung Ung-il, Tanaka Sakae, Nakamura Norimasa	4. 巻 7
2. 論文標題 Enhancement of chondrogenic differentiation supplemented by a novel small compound for chondrocyte-based tissue engineering	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Orthopaedics	6. 最初と最後の頁 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40634-020-00228-8	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 Kawata Manabu, Mori Daisuke, Kanke Kosuke, Hojo Hironori, Ohba Shinsuke, Chung Ung-il, Yano Fumiko, Masaki Hideki, Otsu Makoto, Nakauchi Hiromitsu, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 13
2. 論文標題 Simple and Robust Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells toward Chondrocytes by Two Small-Molecule Compounds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 530 ~ 544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2019.07.012	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学医学部整形外科  
<http://www.u-tokyo-ortho.jp/>

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	齋藤 琢 (Saito Taku)  (30456107)	東京大学・医学部附属病院・准教授  (12601)	
研究分担者	稲田 全規 (Inada Masaki)  (80401454)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授  (12605)	

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