

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18503

研究課題名（和文）バイオ3Dプリンタにより創出する靭帯組織体を用いて靭帯再建を目指す研究

研究課題名（英文）A study for ligament reconstruction using a ligament construct produced by a bio-3D printer

研究代表者

村田 大紀（Murata, Daiki）

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：00772683

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、靭帯損傷に対する新たな治療法の確立を目的に、バイオ3Dプリンタにより造形する細胞構造体を用いて、腱・靭帯を再建する計画であった。そこでまず、ウサギ脂肪幹細胞から成る構造体を造形し、膝蓋腱に作製した欠損部に自家移植することで、移植後の時間経過と共に構造体が腱へと組織学的に近似する傾向を確認することに成功した。さらに、主にヒトiPS細胞由来間葉系幹細胞から成る構造体を造形し、自作の自動伸展循環培養容器を用いて培養することで、靭帯組織に類似する力学的特性を有した靭帯組織体を創出することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、脂肪幹細胞から成る細胞構造体をウサギ膝蓋腱の欠損部に移植することで、時間経過と共に腱組織に近似していく傾向が認められた。また、主にiPS細胞由来間葉系幹細胞から成る細胞構造体を、自作の自動伸展循環培養容器で培養することにより、靭帯に類似する組織体を創出することにも成功した。以上より、バイオ3Dプリンタにより造形した幹細胞構造体を用いることで、生体内および生体外において、腱および靭帯を創出できる可能性が示唆され、科学技術的のみならず、社会的および経済産業的にも、大きな影響を及ぼすことが予想される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to reconstruct tendon and ligament using a cell construct formed by a bio 3D printer to establish a new treatment method for ligament injury. A cell construct consisting of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells were autologously implanted into the defect created at the patellar tendon in each rabbit. Then, the implanted construct tended to histologically resemble the tendon tissue over time after implantation. Furthermore, a construct mainly consisting of human iPS cell-derived mesenchymal stem cells was made and then cultured in an automatic extension and circulation culture chamber. Thereafter, a ligament construct having mechanical properties similar to those of ligament tissue was produced.

研究分野：再生医学

キーワード：靭帯再建 バイオ3Dプリンタ 自動伸展循環培養容器 靭帯組織体 細胞構造体 iPS細胞由来間葉系幹細胞 脂肪組織由来間葉系幹細胞 靭帯損傷

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

スポーツ人口や高齢人口が増加している昨今、靭帯組織の断裂は、発生頻度が非常に高い整形外科疾患の1つである。靭帯は、軟骨や半月板と同様に、血管分布が非常に乏しい組織であり、一度断裂するとその損傷部位が本来の組織構造に修復されることはない。現在、前十字靭帯の断裂に対する治療法として、国内・外問わず「自家腱移植による靭帯再建術」が実施されている。しかし、当該「再建術」を行った場合、同一個体の無傷な腱からドナー組織を採取するため、採取部位の機能が犠牲となる。これらの問題を解決するためには、ドナー部位を再建するか、もしくは、損傷靭帯を自家組織以外で再建する必要がある。

そこで近年、コラーゲン等を細胞の足場として使用することで、*in vitro*において靭帯様構造物を作製し、生体内に移植する方法が実験的に試されている。しかし、靭帯様構造物に使用されるコラーゲンは人工材料であるため、長期にわたる異物反応や細菌感染によるバイオフィルムの形成など、そこにも多くの課題は存在する。

これらの問題や課題を解決するためには、細胞足場となる人工材料を一切用いずに、細胞のみで3次元的に組織を構築することにより、ドナー部位の腱組織、もしくは、靭帯そのものを再建する必要がある。

## 2. 研究の目的

申請者は以前より、あらかじめコンピューターデザインされた任意の形状に、細胞凝集塊を剣山上へと機械制御により自動で配置し、人工材料を用いることなく細胞構造体を造形できる、バイオ3Dプリンタの技術開発に携わってきた。本研究では、これまで蓄積してきた構造体造形の技術やノウハウを基に、バイオ3Dプリンタにより幹細胞構造体を造形し、ドナー部位の腱組織、もしくは、靭帯そのものの再建を目指すこととした。

## 3. 研究の方法

実験用ウサギ(日本白色家兔)の背部から皮下脂肪組織を採取し、間葉系幹細胞(AT-MSCs)を分離・培養して細胞凝集塊を作製し、細胞数、培養期間、および、使用する培地の違いが、凝集塊の大きさと真円度に与える影響について比較・評価した。次に、バイオ3Dプリンタでの積層に適した凝集塊を作製し、チューブ状の細胞構造体を造形した後に、自作の培養容器を用いて、構造体を一定期間培養して成熟させた。その後、ウサギの膝蓋腱に欠損を作製し、構造体の一部を切離して展開することによりシート状とした上で、欠損部に埋植・縫合して自家移植した。移植後は、6週、12週、および、24週の3群に分けて経過を観察し、肉眼所見を確認した後に、移植部位の組織学的特性を評価した。

上記とは別に、主にヒトiPS細胞由来間葉系幹細胞(iPSC-MSCs)を用いて凝集塊を作製し、細胞数、培養期間、および使用する培地の違いが、凝集塊の大きさと真円度に与える影響について比較・評価した。次に、バイオ3Dプリンタでの積層に適した凝集塊を作製し、チューブ状の構造体を造形した。その後、自作の自動伸展循環培養容器を用いて、構造体を一定期間培養して成熟させた後に、引張試験機を用いて構造体の破断強度を測定することで、力学的特性を評価した。

#### 4 . 研究の成果

AT-MSCs からなる細胞凝集塊の比較・評価では、細胞数と凝集塊の大きさは正の相関を示した一方で、培養期間と凝集塊の大きさは負の相関を示した。また、使用する培地が異なることによって、それらの相関にはばらつきが認められ、凝集塊の真円度にも大きな影響を及ぼすことが確認された。それにより、それぞれのパラメーターが互いに与える影響について確認することができ、パラメーター同士における相関関係を見出すことに成功した。また、バイオ 3D プリンタでの積層に適した凝集塊の作製条件を確立することにも成功した。さらに、確立した条件を基にバイオ 3D プリンタで凝集塊を積層し、チューブ状の細胞構造体を造形することにも成功した。次に、ウサギへの自家移植を成功させた後の組織学的評価では、移植後の時間経過と共に、移植した構造体が腱組織へと近似する傾向が認められた。以上より、現在の前十字靭帯断裂に対する治療の「自家腱移植による靭帯再建術」において、ドナー腱採取のために欠損となる部位に、AT-MSCs を用いてバイオ 3D プリンタにより造形した構造体を移植することで、腱組織を再生させてドナー部位の機能低下を回避できる可能性が示唆された。

一方、主に iPSC-MSCs からなる細胞凝集塊の比較・評価では、上記同様の相関が認められ、培地が異なることによっても、同様の現象が認められることを確認した上で、バイオ 3D プリンタでの積層に適した凝集塊の作製条件を確立することに成功した。また、主に iPSC-MSCs からなる細胞構造体を自作の容器で培養した後の力学的評価では、短期間の培養であったにも関わらず、靭帯組織に類似する力学的特性を有した靭帯組織体を創出することにも成功した。以上より、主に iPSC-MSCs を用いてバイオ 3D プリンタにより造形した構造体を、自作の自動伸展循環培養容器にて培養し、「自家腱移植による靭帯再建術」の自家腱に代わる靭帯組織体を創出することで、損傷靭帯を自家組織以外で再建できる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yamasaki Atsushi, Kunitomi Yoshihiro, Murata Daiki, Sunaga Takafumi, Kuramoto Tomohide, Sogawa Takeshi, Misumi Kazuhiro	4. 巻 37
2. 論文標題 Osteochondral regeneration using constructs of mesenchymal stem cells made by bio three dimensional printing in mini pigs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	6. 最初と最後の頁 1398 ~ 1408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.24206	査読の有無 無
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 Arai Kenichi, Murata Daiki, Takao Shoko, Verissimo Ana Raquel, Nakayama Koichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Cryopreservation method for spheroids and fabrication of scaffold-free tubular constructs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0230428 ~ 0230428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0230428	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 Murata Daiki, Arai Kenichi, Nakayama Koichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Scaffold Free Bio 3D Printing Using Spheroids as "Bio Inks" for Tissue (Re )Construction and Drug Response Tests	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advanced Healthcare Materials	6. 最初と最後の頁 1901831 ~ 1901831
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adhm.201901831	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 Murata Daiki, Fujimoto Ryota, Nakayama Koichi	4. 巻 21
2. 論文標題 Osteochondral Regeneration Using Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3589 ~ 3589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21103589	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 Arai Kenichi, Murata Daiki, Takao Shoko, Nakamura Anna, Itoh Manabu, Kitsuka Takahiro, Nakayama Koichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Drug response analysis for scaffold-free cardiac constructs fabricated using bio-3D printer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-65681-y	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 Murata Daiki, Kunitomi Yoshihiro, Harada Kaori, Tokunaga Satoshi, Takao Shoko, Nakayama Koichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Osteochondral regeneration using scaffold-free constructs of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells made by a bio three-dimensional printer with a needle-array in rabbits	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 77 ~ 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2020.05.004	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 Nakamura Anna, Murata Daiki, Fujimoto Ryota, Tamaki Sakura, Nagata Sanae, Ikeya Makoto, Toguchida Junya, Nakayama Koichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Bio-3D printing iPSC-derived human chondrocytes for articular cartilage regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biofabrication	6. 最初と最後の頁 044103 ~ 044103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1758-5090/ac1c99	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 Murata Daiki, Ishikawa Shingo, Sunaga Takafumi, Saito Yasuo, Sogawa Takeshi, Nakayama Koichi, Hobo Seiji, Hatazoe Takashi	4. 巻 18
2. 論文標題 Osteochondral regeneration of the femoral medial condyle by using a scaffold-free 3D construct of synovial membrane-derived mesenchymal stem cells in horses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Veterinary Research	6. 最初と最後の頁 53 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12917-021-03126-y	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 Fujimoto Ryota, Murata Daiki, Nakayama Koichi	4. 巻 27
2. 論文標題 Bio-3D printing of scaffold-free osteogenic and chondrogenic constructs using rat adipose-derived stromal cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioscience-Landmark	6. 最初と最後の頁 052 ~ 052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31083/j.fbl2702052	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 Arai Kenichi, Murata Daiki, Takao Shoko, Nakayama Koichi	4. 巻 1
2. 論文標題 Fabrication of Cardiac Constructs Using Bio-3D Printer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pluripotent Stem-Cell Derived Cardiomyocytes (Methods in Molecular Biology)	6. 最初と最後の頁 53 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1484-6_6	査読の有無 無
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14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Murata D, Miyake M, Takao S, Nakamura A, Arai K, Nakayama K
2. 発表標題 Ligament reconstruction using scaffold-free cell construct produced by bio three-dimensional printer
3. 学会等名 International Conference on Biofabrication 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Arai K, Murata D, Nakayama K
2. 発表標題 Drug response of scaffold-free cardiac constructs fabricated using bio-3D printing
3. 学会等名 International Conference on Biofabrication 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 比嘉 浩太郎, 松田 英敏, 東 千夏, 神谷 武志, 村田 大紀, 中山 功一, 西田 康太郎
2. 発表標題 バイオ3Dプリンタで作製した脂肪幹細胞構造体がACL再建術における骨 - 移植腱結合部治癒に与える影響
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 Higa K, Matsuda H, Akamine N, Uehara F, Toma T, Azuma C, Murata D, Nakayama K, Nishida K
2. 発表標題 The early effects of scaffold-free constructs of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on tendon-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2021 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 比嘉 浩太郎, 松田 英敏, 上原 史成, 当真 孝, 東 千夏, 神谷 武志, 村田 大紀, 中山 功一, 西田 康太郎
2. 発表標題 バイオ3Dプリンターで作製した脂肪由来幹細胞構造体がACL再建術の骨孔内骨-移植腱結合部治癒に与える効果
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 中村 アンナ マリア, 村田 大紀, 中山 功一, 池谷 真, 戸口田 淳也
2. 発表標題 Scaffold-free cartilage constructs for large chondral defects fabricated using bio-3D printer
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 Nakamura A, Murata D, Fujimoto R, Nakayama K, Ikeya M, Toguchida J
2. 発表標題 Scaffold-free cartilage constructs for large chondral defects fabricated using bio-3D printer
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 比嘉 浩太郎, 松田 英敏, 上原 史成, 当真 孝, 東 千夏, 神谷 武志, 村田 大紀, 中山 功一
2. 発表標題 バイオ3Dプリンターで作製した脂肪由来幹細胞構造体がACL再建術の骨孔内骨 - 移植腱結合部治癒に与える効果
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本 亮太, 村田 大紀, 中山 功一
2. 発表標題 Bio-3D-printing技術を用いて作製したscaffold-free脂肪組織由来幹細胞構造体により広範囲骨再生を目指す研究
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Murata D, Fujimoto R, Takao S, Miyake M, Nakamura A, Nakayama K
2. 発表標題 Tendon/ligament regeneration using a scaffold-free biofabricated 3D construct of Autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in rabbits
3. 学会等名 6th Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 Higa K, Matsuda H, Uehara F, Toma T, Azuma C, Murata D, Nakayama K, Nishida K
2. 発表標題 The early effects of scaffold-free constructs of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on tendon-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model
3. 学会等名 6th Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Higa K, Matsuda H, Yabiku H, Uehara F, Toma T, Azuma C, Murata D, Nakayama K, Nshida K
2. 発表標題 The potential of scaffold-free constructs of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on tendon-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2022 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤本 亮太, 村田 大紀, 中山 功一
2. 発表標題 Bio-3D Printing技術を用いて作製したScaffold-free脂肪由来幹細胞構造体による骨再生を目指す研究
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 宗像 季生子, 村田 大紀, 藤本 亮太, 高尾 省子, 三宅 美保, 野中 俊宏, 永石 友公子, 中村 アンナ, 中山 功一
2. 発表標題 ウサギ脂肪由来幹細胞からなるscaffold-free 3次元構造体による膝蓋腱再生
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

## 〔図書〕 計2件

1. 著者名 Murata Daiki	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 184
3. 書名 Kenzan Method for Scaffold-Free Biofabrication (Koichi Nakayama editor)	

1. 著者名 藤本 亮太, 中山 功一, 村田 大紀, 伊藤 学	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 329
3. 書名 3Dプリンタ用新規材料開発 (萩原恒夫 監修)	

## 〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 人工組織体及びその製造方法	発明者 村田 大紀, 三宅 美保	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-035597	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

## 〔取得〕 計0件

## 〔その他〕

<p>村田 大紀 (Daiki Murata) - マイポータル - researchmap  <a href="https://researchmap.jp/daiki_net_official">https://researchmap.jp/daiki_net_official</a>  researchmap 村田 大紀  <a href="https://researchmap.jp/daiki_net_official">https://researchmap.jp/daiki_net_official</a>  佐賀大学 教員活動データベース 村田 大紀 (医学部)  <a href="https://research.dl.saga-u.ac.jp/profile/ja.a2db15634a4e7499.html">https://research.dl.saga-u.ac.jp/profile/ja.a2db15634a4e7499.html</a></p>
---

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

## 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
---------	---------