

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20181

研究課題名（和文）Scaffold-free tissue積層化による3次元骨軟骨モデル構築

研究課題名（英文）Reconstruction of three-dimensional osteochondral model by multilayered scaffold-free tissue

研究代表者

KIM JEONGHYUN (Kim, Jeonghyun)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：20844591

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）：本研究では、マウス軟骨前駆細胞(ATDC5)由来スフェロイドを作製・評価した。分化誘導剤無添加の長期培養後、スフェロイド内の細胞の肥大化が確認されると共にスフェロイド中心部からアポトーシスが観察された。これは、軟骨内骨化の初期段階に見られる現象であり、3次元軟骨モデルの構造的効果を示す結果である。また、ヒト間葉系幹細胞由来スフェロイドを用い、分化誘導剤添加によりスフェロイド内の多細胞挙動が変化することが明らかになった。さらに、3次元スフェロイド内の細胞観察において必要な透明化技術を確立し、スフェロイド内の細胞核形状を定量評価するプログラムをPythonを用い開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨を対象としたマウス軟骨前駆細胞(ATDC5)由来3次元細胞組織体scaffold-free tissue(SFT)を作製・評価し、3次元培養法による構造的な効果を示すことができた。また、3次元培養モデルの多細胞挙動計測法や透明化技術を活用した細胞核形状定量計測法を開発し、3次元培養モデルを対象とする新たなin vitro計測技術発展のための学術的意義がある。さらに、これらの技術は移植後生体内におけるin vivoにおける多細胞挙動を予測できる。これらの計測法は、オルガノイドなどの様々な3次元モデルにおける基礎研究及び移植実験による組織工学・再生医療分野に貢献できる社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we fabricated and evaluated a cartilage scaffold-free tissue (SFT), which is a three-dimensional cell assembly derived from mouse chondroprogenitor ATDC5 cells. After long-term culture without addition of chemical differentiation supplements, hypertrophy of cells within the spheroids was confirmed, and apoptosis was also observed from the center of the spheroids. This is a phenomenon observed in the initial stage of endochondral ossification, and is a result showing the structural effect of the three-dimensional model. In addition, using human mesenchymal stem cell-derived spheroids, it was clarified that the multicellular behavior in the spheroids was greatly changed by chemical differentiation supplements. Moreover, we established an optical clearing technique necessary for cell observation inside the 3D spheroids and further developed a custom-made image analysis pipeline in Python to quantitatively evaluate cell nucleus shape in the spheroids.

研究分野：細胞バイオメカニクス

キーワード：軟骨 3次元培養 スフェロイド 肥大化 軟骨内骨化 多細胞 計測 細胞核

1. 研究開始当初の背景

骨軟骨欠損(Osteochondral defect; OCD)は、関節軟骨および軟骨下骨の局所的部分の形態学的変化を表し、関節に強い痛みを引き起こす病気である。OCD治療に向けて骨・軟骨を別々にターゲットした様々なコンビネーションのBiphasic scaffold (多層 scaffold)の報告も多いが、これらの人工物質を用いた研究は移植後の拒否反応などの副作用のリスクがある。また、軟骨と骨の間には bone-cartilage interface という無血管軟骨組織への毛細血管侵入を防ぐ役割を持つ重要な部位があるが、現在の組織工学的なアプローチでは再現できていない。さらに、移植などの in vivo 応用だけでなく、骨および軟骨の薬剤応答などの in vitro がディッシュ上で軟骨と骨細胞を独立に 2 次元培養して行なわれてきたが、骨と軟骨は分離して考えられる器官ではないため、骨・軟骨を同時に再現できる新たな in vitro モデルが必要である。

2. 研究の目的

本研究では工学・医学的技術を用いて in vitro・in vivo で活用できる Scaffold を用いない 3 次元骨-軟骨モデルの構築を目的とする。これまでに様々な人工物質を含む 3 次元組織化が報告されているが、本研究では scaffold を用いずに細胞のみで骨・軟骨組織を再現する Scaffold-free tissue を作製する。さらに、3 次元細胞ディスク (Disc) 型の骨 SFT を軟骨 SFT と積層化させる手法で、この骨・軟骨を同時に再構築するという in vitro モデル(Osteochondral SFT)の開発に挑む。この手法により、生体の骨と軟骨に限りなく近い環境を再構築することで bone-cartilage interface も再現できると期待できる。

3. 研究の方法

本研究では目的達成のため以下の 3 つの研究を実施した。

- 1) 軟骨 SFT の作製・評価
- 2) SFT 内の多細胞挙動観察
- 3) 透明化技術と Python を用いた 3 次元培養モデル内細胞核形状計測法開発

4. 研究成果

1) 軟骨 SFT の作製・評価

マウス軟骨前駆細胞(ATDC5)を用いスフェロイド(spheroid)型 SFT を作製し、軟骨モデルとしての機能評価を行った。化学刺激である分化誘導剤無しでも培養 4 日目からスフェロイドは大きくなり、長期培養後には軟骨細胞分化マーカーが大きく上昇した。また、4 週間の長期培養後にはスフェロイド内の個々の細胞の肥大化と共にスフェロイド中心部からアポトーシスが観察された。これは、軟骨内骨化の初期段階に見られる現象であり、3 次元培養により得られた結果である。この研究成果は、Biotechnology and Bioengineering に公表された。

2) SFT 内の多細胞挙動観察

3次元 SFT 培養モデルの *in vitro* における多細胞挙動を評価した。ヒト間葉系幹細胞由来スフェロイドを用い、次の3つの実験を行った。スフェロイドのサイズ変化観察、2つのスフェロイドの合体実験 (fusion experiment)、スフェロイドのコラーゲンゲル埋込実験を行い、化学刺激である分化誘導剤添加によりスフェロイド内の多細胞挙動が大きく変化することが明らかになった。また、この変化はスフェロイド外側に形成されるアクチンフィラメント (actin filaments) の差によるものだということがわかった。これらの結果は、骨 SFT と軟骨 SFT の積層化時に予想される多細胞挙動を予想できるだけでなく、スフェロイド移植後生体内における *in vivo* 多細胞挙動を予測できると考えられる。この研究成果は、Biochemical and Biophysical Research Communications に公表された。

3) 透明化技術と Python を用いた 3次元培養モデル内細胞核形状計測法開発

3次元培養モデル内の細胞核形状評価において、Iodixanol 水溶液を用いた透明化処理を3次元スフェロイドモデルに対して実施した。その結果、2時間の短時間でスフェロイドの透明化に成功し、スフェロイド内部の細胞核形状が観察可能になった。一方、細胞核形状を定量的に評価するプログラムを Python を用い開発した。このプログラムにより、スフェロイド内の細胞核のアスペクト比及び方向性を定量的に示すことができるようになった。この研究成果は、Integrative Biology に投稿済みである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 9件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kim Jeonghyun, Tomida Kosei, Matsumoto Takeo, Adachi Taiji	4. 巻 119
2. 論文標題 Spheroid culture for chondrocytes triggers the initial stage of endochondral ossification	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biotechnology and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 3311 ~ 3318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bit.28203	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 Kim Jeonghyun, Inagaki Takashi, Sunaga Junko, Adachi Taiji, Matsumoto Takeo	4. 巻 622
2. 論文標題 Effect of chemically induced osteogenesis supplements on multicellular behavior of osteocytic spheroids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 79 ~ 85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.07.026	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 Fan Yong, Wang Junfeng, Kim Jeonghyun, Maeda Eijiro, Matsumoto Takeo	4. 巻 133
2. 論文標題 Dependency of deformation of cell nucleus on stretch direction of tissue: Relation to anisotropic response of aortic media to hypertension	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 105326 ~ 105326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmbbm.2022.105326	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 Kim Jeonghyun, Adachi Taiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Cell-fate decision of mesenchymal stem cells toward osteocyte differentiation is committed by spheroid culture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92607-z	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 Kim Jeonghyun, Kigami Hiroyuki, Adachi Taiji	4. 巻 132
2. 論文標題 Comparative gene expression analysis for pre-osteoblast MC3T3-E1 cells under non-adhesive culture toward osteocyte differentiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 651 ~ 656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.09.004	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 Charoensombut Narintadeach, Kawabata Kinyoshi, Kim Jeonghyun, Chang Minki, Kimura Tsuyoshi, Kishida Akio, Ushida Takashi, Furukawa Katsuko S.	4. 巻 133
2. 論文標題 Internal radial perfusion bioreactor promotes decellularization and recellularization of rat uterine tissue	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 83 ~ 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.09.007	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 Kim Jeonghyun, Kigami Hiroyuki, Adachi Taiji	4. 巻 15
2. 論文標題 Characterization of self-organized osteocytic spheroids using mouse osteoblast-like cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanical Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 20-00227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1299/jbse.20-00227	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 Kim Jeonghyun, Adachi Taiji	4. 巻 -
2. 論文標題 Modulation of Sost Gene Expression Under Hypoxia in Three-Dimensional Scaffold-Free Osteocytic Tissue	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	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) 10.1089/ten.TEA.2020.0228	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 Kim Jeonghyun, Ishikawa Keiichi, Sunaga Junko, Adachi Taiji	4. 巻 -
2. 論文標題 Uniaxially-fixed mechanical boundary condition elicits cellular alignment in collagen matrix with induction of osteogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) なし	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

〔学会発表〕 計29件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Chemical osteogenesis supplements modulated the multicellular behaviors of osteocytic spheroids
2. 発表標題 キム・ジョンヒョン, 安達 泰治, 松本 健郎
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 In vitro spheroid culture for chondrogenic precursor ATDC5 cells provokes an initial stage of endochondral ossification
2. 発表標題 Jeonghyun Kim, Kosei Tomida, Eijiro Maeda, Taij Adachi, Takeo Matsumoto
3. 学会等名 The 4th International Symposium on Mechanobiology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jeonghyun Kim, Taiji Adachi, Takeo Matsumoto
2. 発表標題 Induction of osteocyte differentiation for mesenchymal stem cells in 3D scaffold-free spheroid culture
3. 学会等名 Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society - Asia-Pacific Conference 2022 (TERMIS-AP 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 キム・ジョンヒョン, 安達泰治, 松本健郎
2. 発表標題 Generation of tight actin filaments in response to osteogenesis supplements modulated the mechanical behaviors of osteocytic spheroids
3. 学会等名 日本機械学会 2022年度年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jeonghyun Kim, Takashi Inagaki, Taiji Adachi, Takeo Matsumoto
2. 発表標題 Modulation of mechanical environment to induce osteocyte differentiation of mesenchymal stem cells
3. 学会等名 9th World Congress of Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 キム・ジョンヒョン, 安達泰治, 松本健郎
2. 発表標題 Effect of chemical osteogenesis induction on mechanical behavior of 3D osteocytic spheroids
3. 学会等名 第61回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 キム・ジョンヒョン, 安達泰治, 松本健郎
2. 発表標題 骨細胞スフェロイドの機械的挙動に対する骨分化誘導剤の影響
3. 学会等名 第45回日本バイオロロジー学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kosei Tomida, Jeonghyun Kim, Eijiro Maeda, Takeo Matsumoto
2. 発表標題 Hypertrophic chondrocyte differentiation of chondrogenic progenitor cells in 3D spheroid culture
3. 学会等名 The 9th World Congress of Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富田航世, キム・ジョンヒョン, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 マウス軟骨前駆細胞の3次元培養による初期軟骨内骨化誘導法の検討
3. 学会等名 第32回ライフサポート学会フロンティア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富田航世, キム・ジョンヒョン, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 スフェロイド培養法によるマウス軟骨前駆細胞の肥大化軟骨細胞分化誘導
3. 学会等名 日本機械学会東海支部 第72期総会・講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富田航世, キム・ジョンヒョン, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 マウス軟骨前駆細胞のスフェロイド培養による肥大化軟骨細胞分化誘導とその3次元形態解析
3. 学会等名 日本機械学会 第33回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲垣貴士, キム・ジョンヒョン, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 圧縮試験によるヒト間葉系幹細胞由来スフェロイドの機械特性評価
3. 学会等名 日本機械学会 第33回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲垣貴士, キム・ジョンヒョン, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 3D image analysis for nuclear morphology in osteocytic spheroids with optical clearing technique
3. 学会等名 第61回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富田航世, キム・ジョンヒョン, 前田英次郎, 松本健郎,
2. 発表標題 富田航世, キム・ジョンヒョン, 前田英次郎, 松本健郎,
3. 学会等名 日本機械学会 第34回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jeonghyun Kim, Keiichi Ishikawa, Junko Sunaga, Taiji Adachi
2. 発表標題 Intracellular tension of osteoblast in collagen gel elicits osteocyte alignment under uniaxially-fixed boundary condition
3. 学会等名 The 2nd Joint Meeting of the European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation, the International Society for Clinical Hemorheology, and the International Society of Biorheology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jeonghyun Kim, Taiji Adachi
2. 発表標題 Pre-osteoblasts in three-dimensional spheroids exert osteocyte-likeness
3. 学会等名 The 26th Congress of the European Society of Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jeonghyun Kim, Taiji Adachi
2. 発表標題 Differentiation fate of mesenchymal stem cells toward osteocyte is determined by actin balancing
3. 学会等名 The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 キム・ジョンヒョン, 安達泰治
2. 発表標題 Study of osteocyte differentiation triggered by 3D spheroid culture
3. 学会等名 第60回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 キム・ジョンヒョン, 安達泰治
2. 発表標題 Application of three-dimensional tissue-engineered spheroid using osteoblast-like cells for osteocytic differentiation model
3. 学会等名 日本機械学会 第33回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 キム・ジョンヒョン, 安達泰治
2. 発表標題 Cellular biomechanics using 3D osteocytic tissue engineered model
3. 学会等名 日本機械学会 2021年度年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富田航世, キム・ジョンヒョン, 前田英次郎, 松本健郎,
2. 発表標題 マウス軟骨前駆細胞の3次元培養による肥大軟骨細胞分化誘導
3. 学会等名 日本機械学会 第32回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲垣貴士, キム・ジョンヒョン, 前田英次郎, 松本健郎
2. 発表標題 組織透明化手法による3次元骨細胞スフェロイド内部の細胞核形状評価
3. 学会等名 日本機械学会東海支部 第53回学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水島慎吾, キム・ジョンヒョン, 前田英次郎, 松本健郎,
2. 発表標題 静水圧刺激がマウス骨芽前駆細胞の細胞形状・増殖に与える影響
3. 学会等名 日本機械学会東海支部 第53回学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jeonghyun Kim, Taiji Adachi
2. 発表標題 In vitro osteocytogenesis induction by three-dimensional scaffold-free spheroid model
3. 学会等名 第38回 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jeonghyun Kim, Taiji Adachi
2. 発表標題 Cell condensation acquired in three-dimensional culture system triggers osteocyte differentiation of pre-osteoblast cells
3. 学会等名 第47回 日本臨床バイオメカニクス学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroyuki Kigami, Jeonghyun Kim, Taiji Adachi
2. 発表標題 Evaluation of three-dimensional osteocytic spheroid using mouse osteoblast-like cells
3. 学会等名 日本機械学会 第31回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jeonghyun Kim, Taiji Adachi
2. 発表標題 Development of cartilage cell sheet using pre-chondrocyte ATDC5 cells
3. 学会等名 12th Annual Meeting of the Korean Scientists and Engineers Association in Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jeonghyun Kim, Taiji Adachi
2. 発表標題 Mesenchymal stem cell commitment to osteocyte differentiation is facilitated in spheroid culture
3. 学会等名 第20回 日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jeonghyun Kim, Taiji Adachi
2. 発表標題 Three-dimensional culture technology: Self-organized spheroid culture drives osteocytogenesis
3. 学会等名 2021 IEEE 3rd Global Conference on Life Sciences and Technologies (LifeTech) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	安達 泰治 (Adachi Taiji)		
研究協力者	松本 健郎 (Matsumoto Takeo)		
研究協力者	前田 英次郎 (Maeda Eijiro)		

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