

図3 軟骨小片が凝集するタイミングの検討

Ultra-low attachment plateで10%FBS群 (n = 30)、DMEM群 (n = 4)、IGF-1群 (n = 4)での培養経過を週に1回、デジタルカメラで撮影した。

a 軟骨小片培養のwellごとのデジタルカメラによる記録の1例。

b 肉眼的に、凝集が起こるタイミングをグラフ化した。10%FBS群ではほとんどが6週以内に凝集した。DMEM群、IGF群では凝集が起こらなかった。

### 3 複合培養：軟骨基質を形成する条件

Ultra-low attachment plate を用いて、10%FBS 培地で培養を行って得られた凝集体の組織切片を作製したところ、軟骨小片が被膜に覆われており、被膜内には僅かな間質細胞が認められた。(図 4 a: 12w/-, 8w/-) そこで、凝集が起こった時点で、IGF-1 培地で培養し、分化誘導を行った。組織切片を作製して、HE 染色および TB 染色で基質形成を評価した。10%FBS 培地で 5 週培養後に IGF-1 培地で 3 週培養を行った群 (5w/3w) と 10%FBS 培地のみで 8 週間培養した群 (8w/-) を比較すると、HE 染色および TB 染色において明らかな差は認められなかった。軟骨小片の基質部分は両群で TB 陽性であった。10%FBS 培地で 5 週培養後に IGF-1 培地で 7 週培養を行った群 (5w/7w)、10%FBS 培地で 7 週培養後に IGF-1 培地で 5 週培養を行った群 (7w/5w) と 10%FBS 培地のみで 12 週培養した群 (12w/-) とを比較すると、5w/7w、7w/5w では間質内で TB 陽性領域が認められた。また 5w/7w と 7w/5w を比較すると、7w/5w がより TB 陽性領域が顕著であった。12w/- では軟骨小片は TB 陰性であった。(図 4 a)

ATOS III Triple Scan で 5w/7w、12w/- の体積をそれぞれ測定した ( $n = 3$ )。三次元画像処理したものを代表 1 例のみ提示する (図 4b)。5w/7w では  $18.53 \text{ mm}^3 \pm 4.064 \text{ mm}^3$ 、12w/- では  $15.69 \text{ mm}^3 \pm 1.796 \text{ mm}^3$  であり、培養条件による差は認められなかった ( $p = 0.55$ ) (図 4c)。しかし、培養開始前の軟骨小片の体積

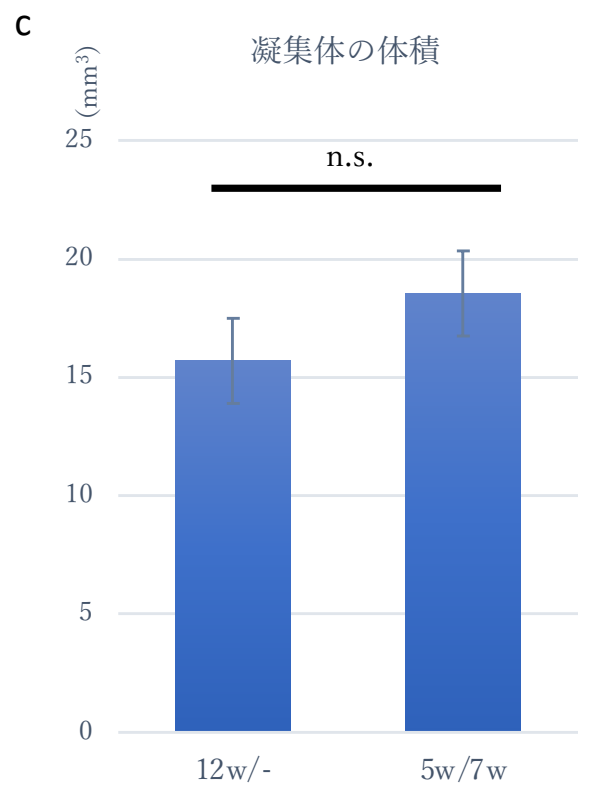
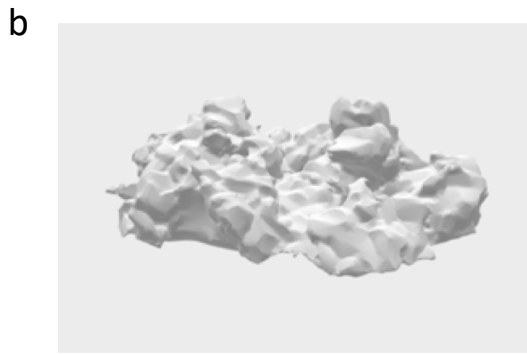
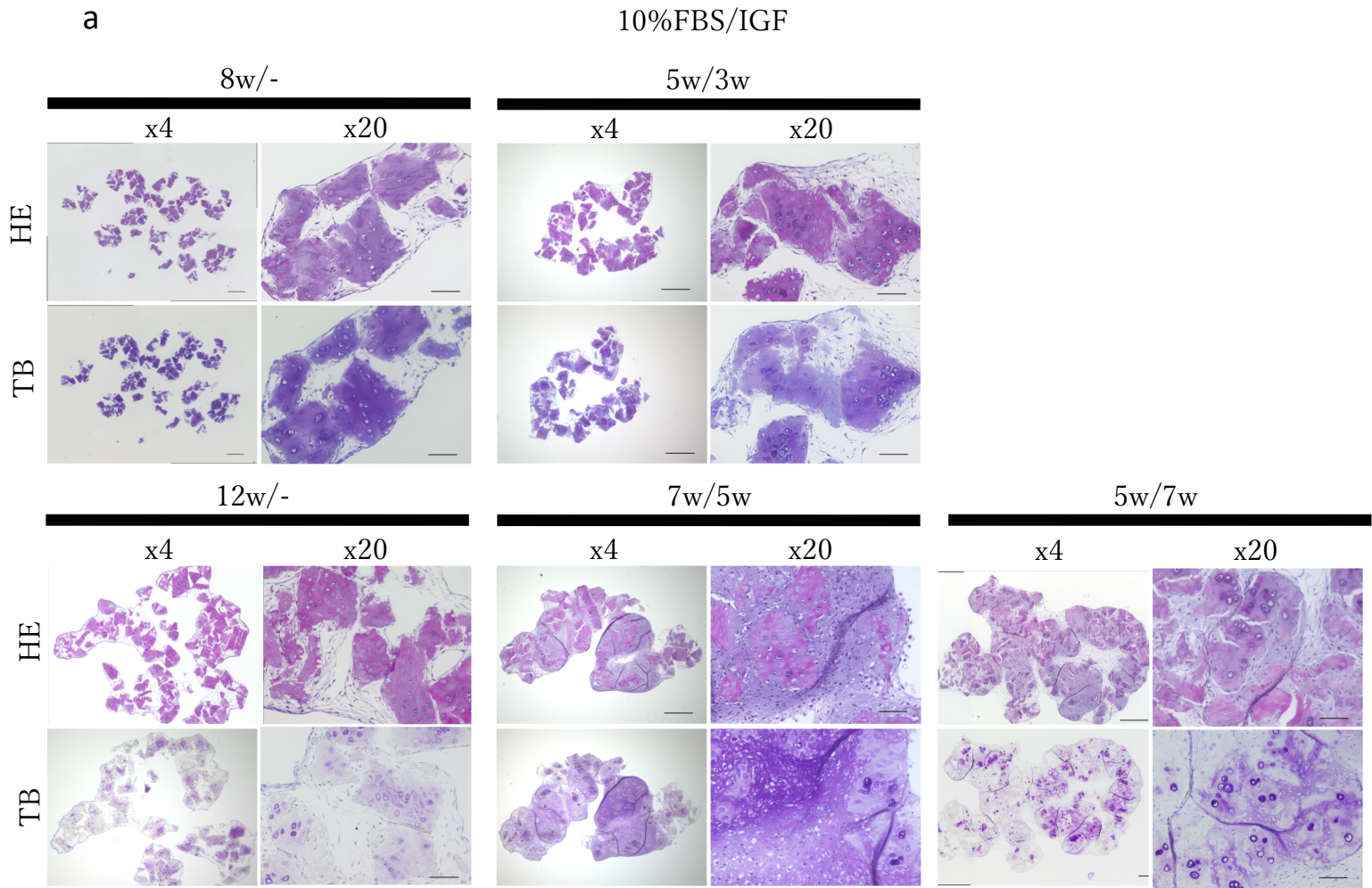


図4 基質産生する条件の検討

- a 10%FBSで培養し、得られた凝集体をIGF-1で分化誘導した凝集体のTB染色およびHE染色の組織所見。スケールバー；x4：500  $\mu$ m、x20：100  $\mu$ m。  
 b ATOS III Triple Scanで凝集体の形態を計測し、三次元画像処理した代表例。  
 c 体積の変化のグラフ。  
 Error bar; mean  $\pm$  S.D. n.s.: not significant

( $0.2 \times 0.2 \times 0.2 \times 1,000 = 8 \text{ mm}^3$ )と比較すると、いずれのサンプルも体積は増大していた (図 4 c)。

#### 4 凝集体形成における細胞動態解析

凝集体形成時の細胞動態を解析するため、10%FBS 培地で 3 週間培養後のサンプルに対してタイムラプス撮影を行った。撮影開始時、12 時間後、24 時間後、36 時間後の画像を示す(図 5)。結果として、培地中に浮遊している細胞が、軟骨小片同士の間徐々に集積していく様子が観察された。

#### 5 凝集体移植時の軟骨再生能についての検討

Ultra-low attachment plate において種々の条件で培養した凝集体 (7w/5w、5w/7w、12w/-、5w/3w、8w/-)および細切直後の軟骨小片をヌードマウスの背部皮下に移植し、8 週後に回収して組織学的評価を行なった (7w/5w/8w、5w/7w/8w、12w/-/8w、5w/3w/8w、8w/-/8w、直後/8w)。7w/5w/8w および 5w/7w/8w では良好な基質産生が認められた。さらに、7w/5w/8w では、軟骨小片と新生基質との境界がなくなり、一塊の再生軟骨となっていた。直後/8w および 12w/-/8w では新生基質は認められなかった (図 6)。

ImageJ を用いた解析の結果 (図 7a)、新生基質の割合は 7w/5w/8w において、12w/-/8w ( $p = 0.024$ )および直後/8w ( $p = 0.010$ )と比較して、有意に高値となった。12w/-/8w と直後/8w では有意差はなかった ( $p = 0.209$ ) (図 7b)。拡大率



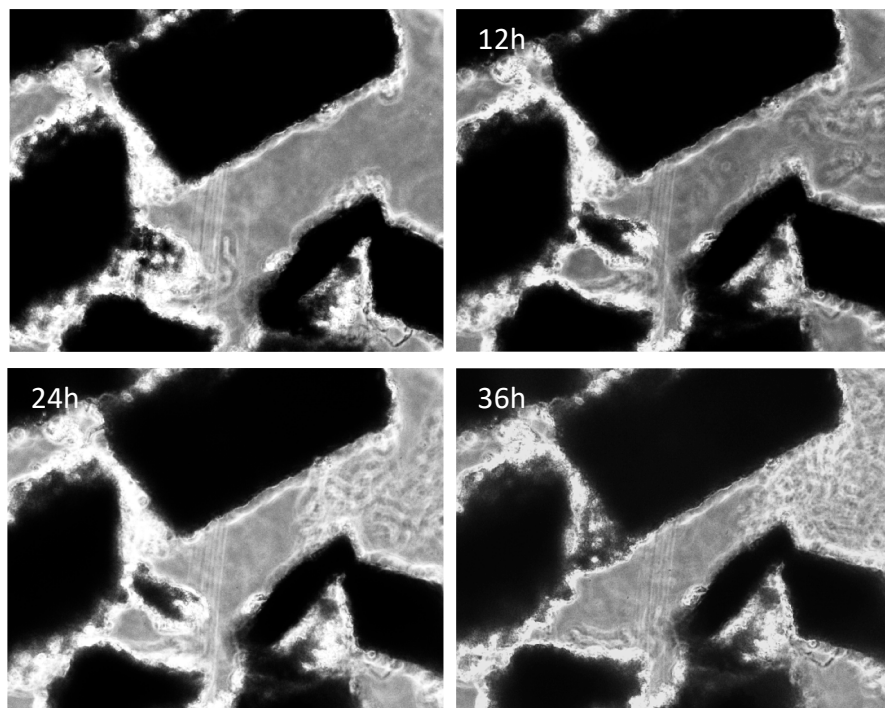


図5 間質を形成する細胞の観察

10%FBS培地で3週間培養後のサンプルを使用し、KEYENCE (BZ-X700)で3日間タイムラプス撮影を行った。撮影は、15分間隔で、位相差顕微鏡モードの10倍で撮影した。撮影開始時、24時間後、36時間後、48時間後の様子を抜粋したところ、軟骨小片間に細胞が集積していく様子が認められた。

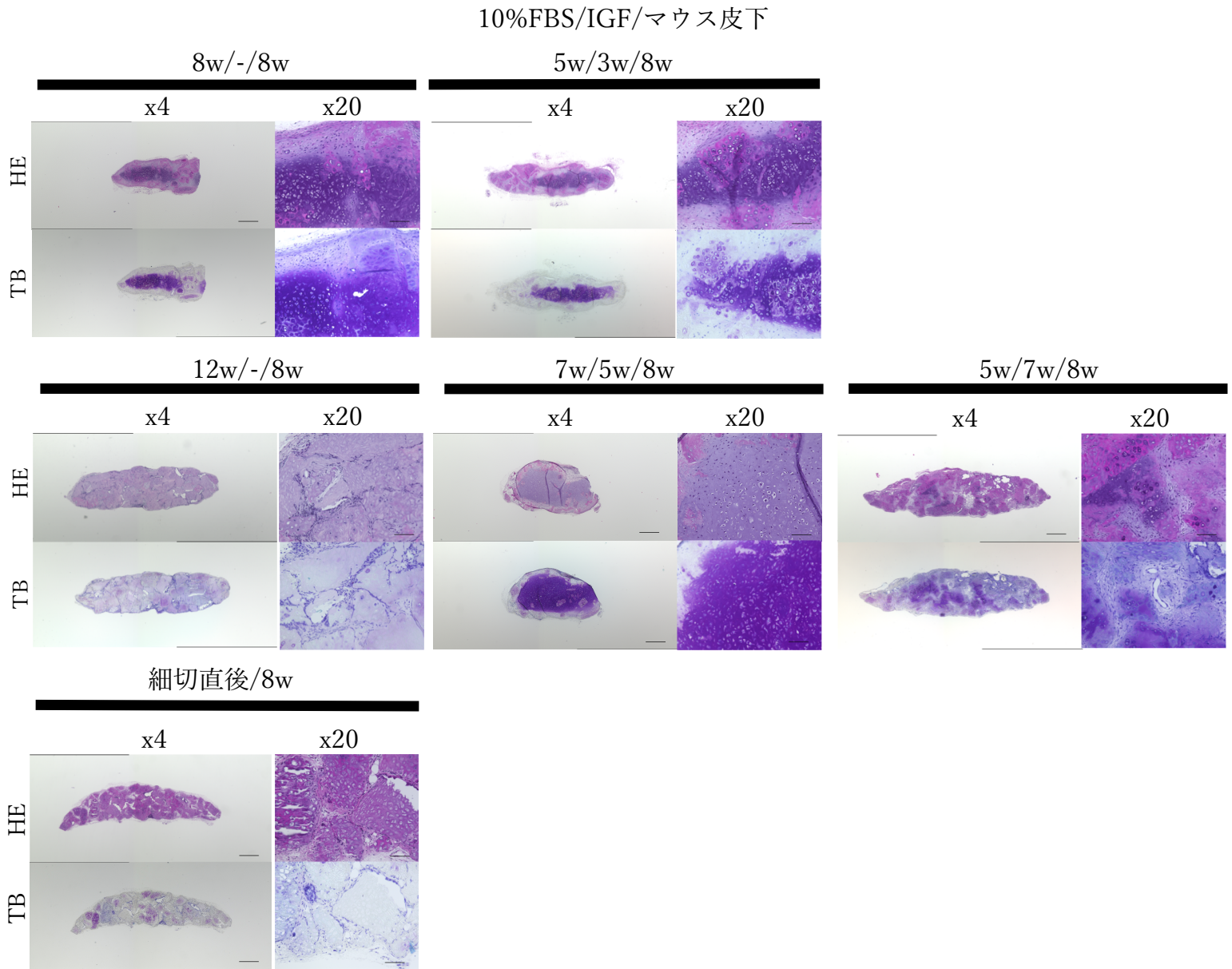
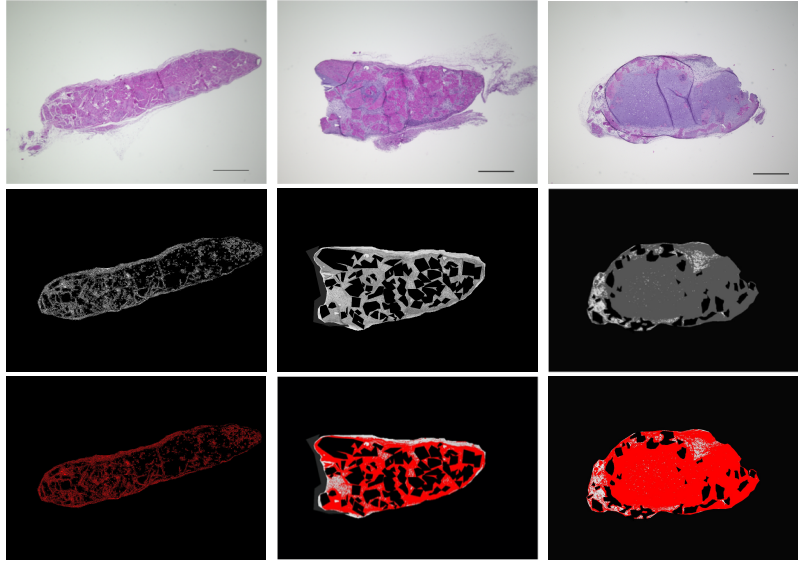


図6 in vivoでの基質産生の評価

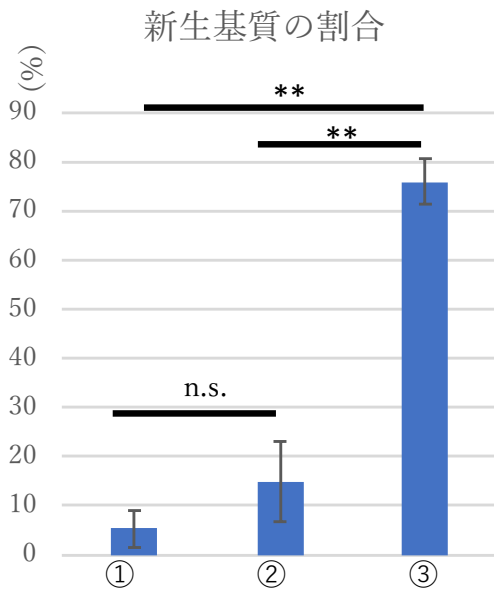
10%FBS培地で8週間（8w/-）、12週間（12w/-）、10%FBS培地で5週間培養した後、IGF-1培地で3週間または7週間（それぞれ5w/3wおよび5w/7w）、または10%FBS培地で7週間、その後IGF-1培地で5週間（7w/5w）培養して得られた凝集体、および細切直後の軟骨小片をマウス皮下移植した。8週後に回収した組織のTB染色および、HE染色の結果。スケールバー；x4：500 $\mu$ m、x20：100 $\mu$ m

a

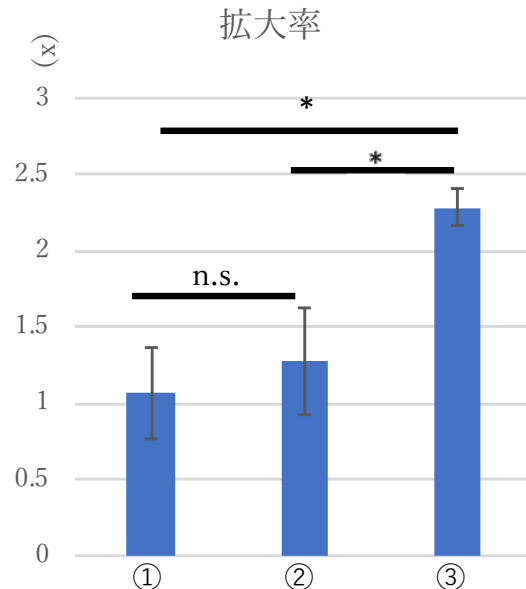
10%FBS /IGF-1/マウス皮下移植  
 細切直後/8w      12w/-/8w      7w/5w/8w  
 (培養なし)



b



c



10%FBS/IGF-1/ transplant in vivo ① 細切直後/8w ② 12w/-/8w ③ 7w/5w/8w

\* : p値 < 0.05, \*\* : p値 < 0.01 n.s.: not significant Error bar; mean ± S.D.

図7 新生基質の比較

a ImageJによる画像解析

HE染色した組織切片を用いてImageJによる画像解析を行なった (n=3)。代表例。

b 新生基質の割合

新生基質面積/回収組織の軟骨部分面積 x 100で算出した。

7w/5w/8wにおいて、12w/-/8w (p = 0.024)および直後/8w (p = 0.010)と比較して、有意に高値となった。12w/-/8wと直後/8wでは有意差はなかった (p = 0.209)。

c 拡大率

回収組織全体の面積/元の軟骨基質の計算上の面積 (組織切片に含まれる軟骨小片の個数 x 40,000 μm<sup>2</sup>) で算出した。

7w/5w/8wにおいて、12w/-/8w (p = 0.000)および直後/8w (p = 0.000)と比較して、有意に高値となった。12w/-/8wと直後/8wでは有意差はなかった (p = 0.296)。

についても 7w/5w/8w において、12w/-/8w ( $p = 0.000$ )および直後/8w ( $p = 0.000$ )と比較して、有意に高値となった。12w/-/8w と直後/8w では有意差はなかった ( $p = 0.296$ ) (図 7c)。Venustron Alpha version 5.4J を用いて力学強度を測定したところ、7w/5w/8w では 12w/-/8w ( $p = 0.000$ )、直後/8w ( $p = 0.000$ )、5w/7w/8w ( $p = 0.000$ )と比較して有意に高値となった。また、いずれの群においても再生軟骨としては十分な強度<sup>18</sup>が得られた (図 8)

## 6 間質細胞の特性

間質細胞の特性評価を行うため、periostin、PCNA、MMP-13 に対する免疫染色を行った。7w/5w では periostin も PCNA も陽性であった。7w/-においては periostin 陰性で、間質に存在する細胞は少ないが、基質辺縁に存在する細胞で MMP-13 は陽性であった。細切直後では全て陰性であった (図 9)。さらに、間質細胞が幹細胞特性を有する可能性について評価するため、TRA-1-60、SSEA-3 に対する免疫染色を行なった。iPS 細胞および 5w/7w,12w/-ではいずれも陽性であった。Native cartilage, および diced cartilage 由来の軟骨細胞では TRA-1-60、SSEA-3 共に陰性であった (図 10)。



## 力学強度 (MPa)

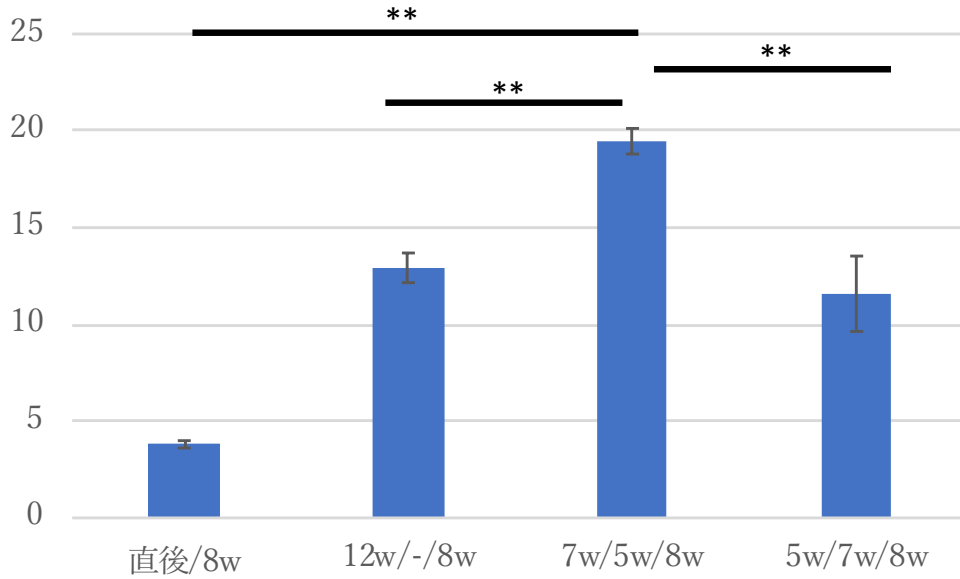


図 8 力学強度

Venustron Alpha version 5.4Jを用いて力学強度を測定した。  
7w/5w/8wでは12w/-/8w ( $p = 0.000$ )、直後/8w ( $p = 0.000$ )、5w/7w/8w ( $p = 0.000$ )と  
比較して有意に高値となった。\* :  $p$ 値 < 0.05、\*\* :  $p$ 値 < 0.01 Error bar; mean  $\pm$  S.D.

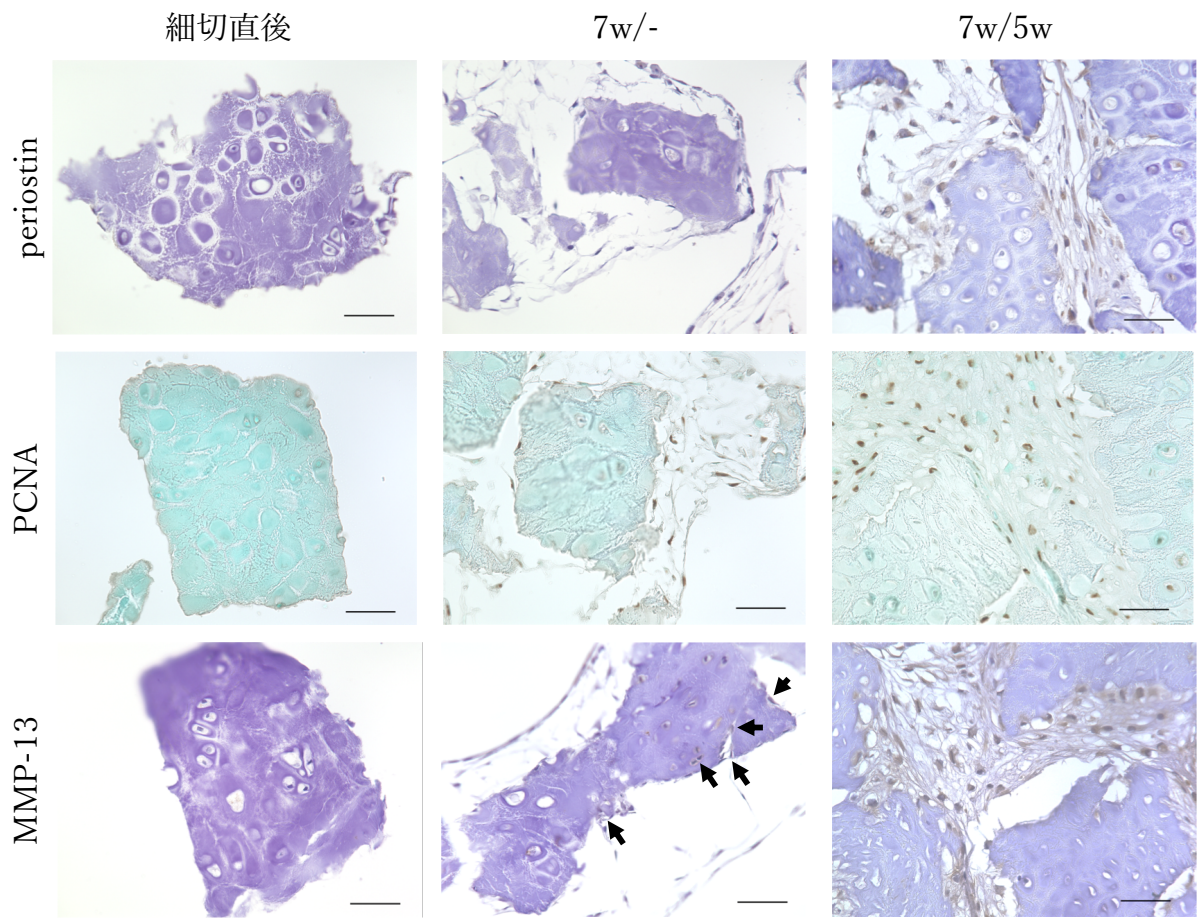


図9 間質の細胞特性評価

Periostin、PCNA、MMP-13に対する免疫染色を行った。7w/5wではperiostinもPCNAも陽性であった。7w/-においてはperiostin陰性で、間質に存在する細胞は少ないが、基質辺縁に存在する細胞でMMP-13は陽性であった。細切直後では全て陰性であった。  
スケールバー：50  $\mu$ m

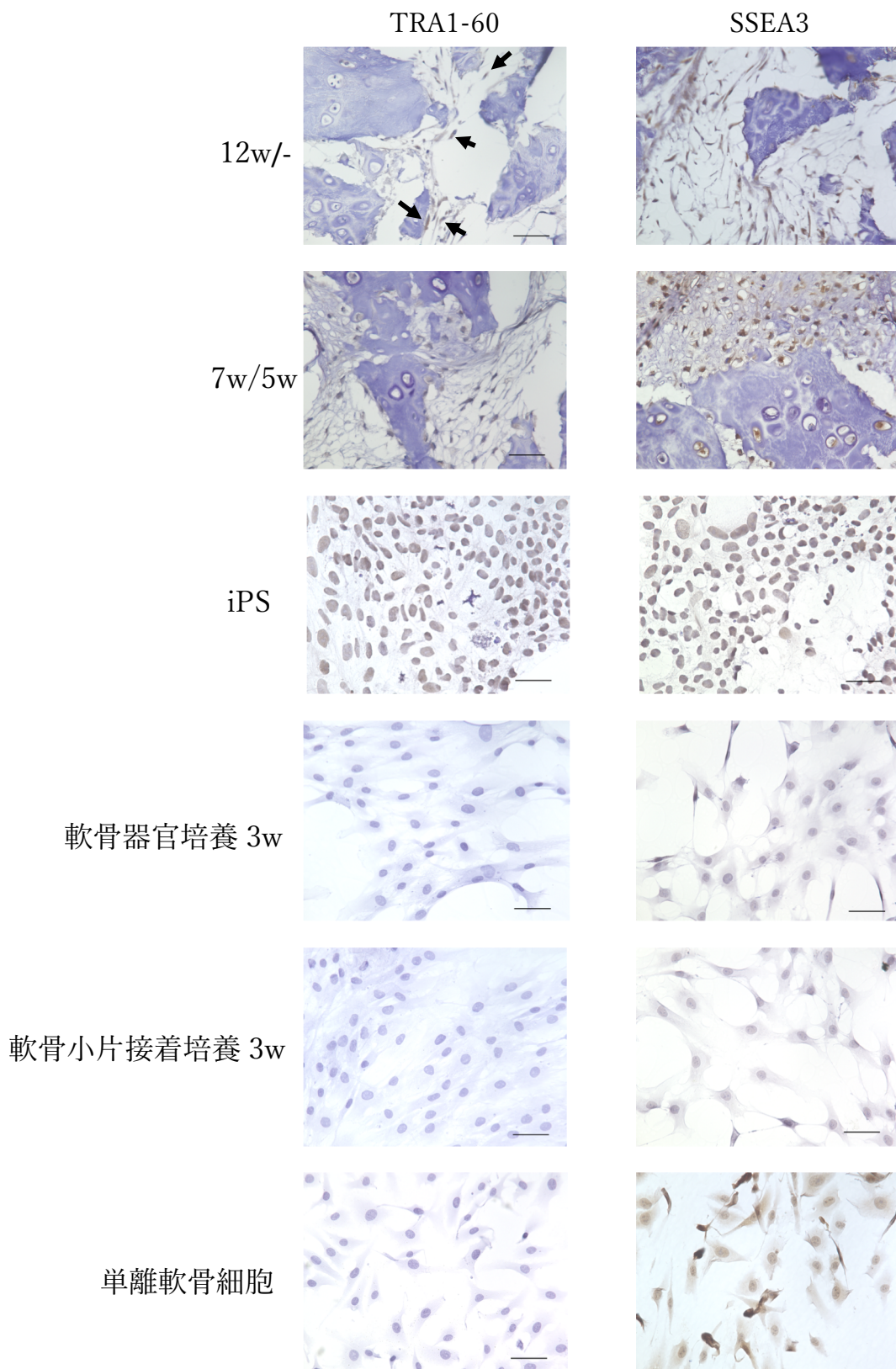


図 10 幹細胞特性の評価

TRA-1-60、SSEA-3に対する免疫染色の結果。iPS細胞および5w/7w,12w/-ではいずれも陽性であった。軟骨器官培養, および軟骨小片由来の軟骨細胞ではTRA-1-60、SSEA3共に陰性であった。スケールバー：50  $\mu$ m

## 考察

本研究では、軟骨細胞に負の影響を与えうる酵素処理や平面培養を経ずに、再生軟骨の細胞源となり得ることが先行研究で示されている軟骨小片を用いて、スカフォールドフリーの再生軟骨を作製する方法を確立すべく、培養条件の検討を行った。軟骨小片の大きさを  $200\mu\text{m}$  の立方体にした理由については、近畿大学の先行研究<sup>14</sup>を基にしている。この報告によると、足場に搭載する場合には  $100\mu\text{m}$  が軟骨修復における至適な大きさであったが、細胞の生存率は  $200\mu\text{m}$  が最も高かった。本研究では足場を用いず、あらかじめ凝集、分化培養を行ってから移植するという点で先行文献と異なるため、細胞生存率を重視し、 $200\mu\text{m}$  を選択した。

スカフォールドフリーの再生軟骨を作製するためには、軟骨小片が自律的に融合し、凝集体を形成する必要がある。そのため、最初に軟骨小片が凝集体形成する培養条件（培地、接着状態、培養期間）について検討した。今回の検討では、作製した軟骨小片を維持するために 10%FBS 含有培地で非接着培養していたところ、凝集体が形成されていることを発見した。そこで、FBS 含有培地による凝集体形成についてより詳細な解析を行った。対照群として DMEM のみ、また増殖培地である FBS 含有培地との比較対象として FBS を含まない



IGF-1 含有分化培地<sup>19</sup>を使用した。その結果、DMEM 培地（基礎培地）や IGF-1 培地では凝集は起こらず、10%FBS 培地のみで凝集体が得られた（図 3）。先行文献では 10%FBS を含む培地で単離軟骨細胞を培養すると大きな凝集体が得られること<sup>20</sup>が報告されている。今回、軟骨小片をそのまま培養した場合においても、10%FBS 含有培地を用いることで凝集体を得ることができた。

軟骨を器官培養すると、軟骨小腔から細胞が遊走する<sup>21,22</sup>ことが報告されている。軟骨小片を 10%FBS 培地で接着培養した際に、軟骨小片から遊走したと考えられる細胞が well 底面に接着している像が観察された（図 2）。一方、非接着条件で軟骨小片を 10%FBS 培地で培養した際には、well 底面には細胞は見られず（図 2）、凝集した軟骨小片の間質に細胞が観察された（図 4）。タイムラプス撮影（図 5）の所見からは、培地中に浮遊している細胞が軟骨小片間に集積している像が見られた。このことから、軟骨小片から遊走し、培地中に一旦放出された細胞が集積して、間質を形成したことが考えられる。しかし、遊走後も軟骨小片に接着したまま、間質形成に寄与している細胞の存在も否定できず、凝集体形成時の細胞動態の解明には、さらなる解析が必要である。

次に、形成した凝集体に対して分化誘導を行うことが、基質形成に与える影響について検討した。IGF-1 は細胞増殖を促すこと<sup>23</sup>、スカフォールドフリーの

三次元培養で軟骨組織形成を促進すること<sup>24</sup>、間葉系幹細胞の軟骨分化を促進する働きがあること<sup>25</sup>などが報告されている。今回の検討でも IGF-1 培地で培養を行うことで、間質の細胞増殖および基質産生が認められた (図4)。

興味深い事に、10%FBS 培地で7週、IGF-1 培地で5週培養した凝集体は、10%FBS 培地で5週、IGF-1 培地で7週培養した凝集体よりも軟骨基質形成が良好であった。培地の切り替えのタイミングにおける、この2週間の差がなぜこのような基質形成の差異を生じるのかは不明である。考えうる機序としては、10%FBS 培地で5週培養した時点と7週培養した時点の細胞の状態の差異が影響している可能性、IGF-1 培地での培養期間は7週よりも5週の方が適切である可能性などが考えられる。これらの仮説について今後検討していくことで、培養条件のさらなる最適化につながる所見が得られる可能性がある。また IGF 添加培地での培養が7週間以上の長期に及ぶと、細胞の生存率が低下した。(data not shown)

さらに、これらの条件で培養した凝集体について、移植後の軟骨再生能を検討した。先行研究においては、移植前の軟骨細胞三次元培養に用いる培地の比較で、本研究と同様に分化培地を用いた方が増殖培地を用いた場合に比べ、移植後の軟骨再生が良好であるとする報告がある<sup>26</sup>。一方で、申請者の所属する研

研究室からの報告では、移植前の軟骨細胞三次元培養において、分化培地を用いた方が *in vitro* での軟骨組織成熟は良好であるが、移植後の結果に関しては、逆に増殖培地を用いることで軟骨細胞の生存率が向上し、分化培地を用いた場合に比較して良好な再生軟骨が得られたとしている<sup>19</sup>。これらの報告では、用いた細胞（関節軟骨細胞と耳介軟骨細胞）、分化因子(TGF- $\beta$ 、insulin、L-ascorbic acid と IGF-1)、足場（ヒアルロン酸メッシュとアテロコラーゲン）が異なり、結果の差異が生じた可能性がある。すなわち、3次元軟骨細胞培養において分化培地と増殖培地のいずれが移植後の好結果につながるかどうかは一概に決められず、再生軟骨コンストラクト毎に最適な条件を検索する必要がある。本研究では結果として、増殖培地から IGF-1 を含んだ分化培地に切り替える複合培養を行うことで、上述のように *in vitro* で軟骨基質産生が見られたのみならず、移植後もより良好な軟骨組織形成が得られた。

細切直後の軟骨小片、10%FBS 培地で7週培養した軟骨小片由来凝集体と、さらに5週 IGF-1 培地で培養した凝集体の組織切片の比較では、PCNA、periostin、MMP-13 陽性細胞が、培養期間が進むにつれ増加した。PCNA は細切直後では陰性であったが、10%FBS 含有培地で培養を行うと、間質細胞で陽性細胞が認められた。また、10%FBS で7週間培養後に5週間、分化誘導を行った群（7w/5w）では、分化誘導前（7w/-）と比較して間質細胞が多く存

在し、分化培地に切り替えた後も、皮膜内で細胞の増殖性は維持されている可能性が示唆された。軟骨組織の発生では、細胞の増殖による細胞同士の接触により、間充織凝集が起こり、軟骨へと分化することを考慮すると、本研究において見られた間質細胞の増殖は、間質に軟骨基質を誘導することに寄与していると考えられる。しかし、今回使用している耳介軟骨は全て小耳症患者から得られた軟骨組織であり、成人の軟骨から得られた細胞で同様の現象が起こるかについては確認できていない。

Periostin は分泌型のタンパク質で、骨、発育中の骨の軟骨細胞、関節軟骨細胞、骨膜、前十字靭帯、歯根膜、筋肉などにも発現している。インテグリンと結合し、コラーゲン組織の高次構造化を促進して、再生組織の形態維持および成熟に寄与する<sup>27</sup>との報告がある。本研究においては、periostin 陽性細胞は 10%FBS 培地で 7 週培養した時点ではほとんど見られず、IGF-1 培地でさらに 5 週培養したことで増加している。IGF-1 培地で培養することで periostin 発現が亢進したことが、基質産生を促進した一因であると考えられるが、periostin 発現亢進の機序については今後の検討で明らかにする必要がある。また、periostin には様々なアイソフォームが存在し、関節においては、細胞および組織レベルでの関節軟骨と比較して、前十字靭帯でより高度に発現されたことを示されているが、関節軟骨細胞でのみ高度に発現されているアイソフォーム



もあり、軟骨細胞における特異的調節が示唆されている<sup>28</sup>。本研究で用いた耳介軟骨細胞において発現するアイソフォームが関節軟骨細胞と同一であるかどうかは今後の検討が必要である。

細胞が遊走する過程における基質分解に MMP-13 が関与している可能性を考慮し、MMP-13 のタンパク発現について検討した。本研究において、MMP-13 に対する免疫染色では 10%FBS 培地で 7 週培養した軟骨小片 (7w/-) では僅かな細胞で陽性であったが、さらに 5 週間 IGF-1 培地で分化誘導を行った群 (7w/5w) では陽性細胞が増加した。IGF-1 は MMP-13 の発現を低下させ<sup>29</sup>、コンドロイチン硫酸に富むプロテオグリカンの維持作用によって軟骨に対して保護的に働く<sup>30</sup> という報告がある一方、逆に MMP-13 の発現を促進させる<sup>31</sup> という報告もある。一方、細胞の遊走は凝集体形成時 7 週までに既に生じている。これらの結果は、この過程における MMP-13 の関与を完全に否定するものではないが、基質分解には他のタンパク分解酵素も関与していることが示唆された。タンパク分解酵素である MMP-13 は、成長板における肥大軟骨マーカーであるとともに、変形性関節症などで上昇し、基質を分解することが知られている<sup>32</sup>。一方、生理的な内軟骨骨化過程に必須であることも報告されている<sup>33</sup>。本研究で用いた耳介軟骨細胞における MMP-13 の役割について、報告は少ないが、MMP-13 発現と肥大を関連付ける報告もある<sup>34</sup>。しかし、本研究

では間質の MMP-13 陽性細胞について、形態的には肥大は認められなかった。また、軟骨小片間に存在する間質細胞においては幹細胞性を示す TRA1-60 や SSEA-3 も発現しており、MMP-13 発現が示す意味については今後の検討課題である。

軟骨細胞を平面培養すると脱分化が生じるが、3次元培養では軟骨基質形成能が維持されるとの報告が複数ある<sup>35,36</sup>。移植後の軟骨再生には、軟骨幹・前駆細胞が大きく貢献すると考えられていることから、本研究において軟骨小片の3次元培養が軟骨幹・前駆細胞の維持に寄与している可能性があるが、耳介軟骨細胞に関してはそれらの細胞に対するマーカーが確立されていない<sup>37,38</sup>。そのため、本研究では幹細胞マーカーとして知られている TRA-1-60, SSEA3<sup>39,40</sup>の発現を検討した。TRA-1-60 は iPS 細胞や ES 細胞に発現する幹細胞マーカーとされているが、体細胞を iPS 細胞にリプログラムする過程の初期から、すなわち体細胞が iPS 細胞に完全に变化する前から発現が見られる<sup>41</sup>。一方、胎児軟骨前駆細胞<sup>42</sup>、培養耳介軟骨細胞<sup>43</sup>では陰性であるとの報告がある。SSEA-3 は、胎児軟骨幹細胞<sup>44</sup>、羊水幹細胞<sup>45</sup>などで陽性であることが報告されている。本研究において、細切直後の軟骨小片由来細胞を平面培養すると TRA-1-60 および SSEA-3 は陰性であったが、非接着 plate で三次元培養すると、IGF-1 刺激の有無にかかわらず間質細胞は TRA-1-60、SSEA-3 陽性となっ

た。(図 10) この結果からは、軟骨小片の凝集体を三次元培養することで生じた間質細胞は幹細胞特性を有することが示唆される。しかし、幹細胞には ES 細胞、iPS 細胞のようなほぼ全ての細胞に分化可能なものから、限られた系統の細胞のみに分化可能なものまで幅広く存在し、本研究における間質細胞の幹細胞特性の詳細については種々のマーカー発現や多系統分化実験で確認する必要がある。

細胞や組織の特性を維持する培養方法の一つとして、臓器の一部を採取して培養する器官培養法が知られているが、細胞の生存性を維持することが極めて難しく長期間の培養には適さないため、再生医療分野での応用はほとんど進展していない。また、多孔質の足場は懸濁した細胞を担持することを想定して使用されていることもあり、現行の軟骨細胞は必ず酵素で軟骨基質を分解し単離せざるを得なかった。しかし、単離された軟骨細胞は、平面・拡大培養を行うことで、軟骨特性が欠失する「脱分化」するため、脱分化の抑制および軟骨特性を再獲得させる「再分化」の誘導方法の開発に焦点が当てられてきた。本研究では、生体軟骨組織細断装置を用いて作製した軟骨小片自体をコラゲナーゼ処理することなく細胞の供給源として軟骨基質ごと培養し、凝集させることで、脱分化させることなく、少量の軟骨から大きな再生軟骨を作成できる可能性が示唆された。

しかし、この方法を臨床応用するためには、さらに任意の3次元形状を付与する方法を確立しなければならない。現在想定している方法は、目的とする形状の型を三次元プリンタなどを用いて作製し、この型を用いて鋳型を作製した上で、軟骨小片を鋳型内で培養するというものである。鋳型は軟骨小片が漏出しない密封構造でなくてはならない。そのためには、最初に作製する型を溶解可能な材料で作製する、あるいは鋳型を半分に切って中の型を取り出した後、再び張り合わせるなどの方法が考えられる。また、鋳型の材料としては酸素や栄養分を透過する材質を選定する必要がある。さらに、鋳型の作製法が確立した後には、軟骨小片を注入する時期（細切直後あるいは培養後）などの検討も必要となる。このように、実現にはまだ解決すべき課題が多く残されているが、この新規培養技術が確立されれば、口腔外科領域のみならず形成外科および整形外科などの他領域でも適応され、新たな再生医療技術を提供できると考える。

## 結論

生体軟骨組織細断装置を用いて作製した軟骨小片自体をコラゲナーゼ処理することなく細胞の供給源として軟骨基質ごと培養し、凝集させることで、脱分化



させることなく、少量の軟骨から大きな再生軟骨を作成できる可能性が示唆された。

## 謝辞

最後に、指導を賜った指導教官の星和人教授はじめ、疋田温彦先生、浅輪幸世先生に感謝いたします。また、耳介組織を提供していただいた永田小耳症形成外科クリニックのスタッフの皆様、iPS細胞を提供してくださった西澤悟先生に感謝いたします。丸紅情報システムズ株式会社の黒原様、由利様には凝集体の体積計測および、三次元画像構築にご協力いただきました。厚く御礼を申し上げ、感謝の意を表します。

## 引用文献

1. Godin, M. S., Randolph, W. S. & Johnson, C. M. Nasal augmentation using gore-tex a 10-year experience. *Arch. Facial Plast. Surg.* **2**, 118–121 (1999).
2. Kim, Y. K., Shin, S., Kang, N. K. & Kim, J. H. Contracted nose after silicone implantation: a new classification system and treatment algorithm. *Arch. Plast Surg.* **44**, 59–64 (2017).
3. S. M. Balaji. Costal cartilage nasal augmentation rhinoplasty: Study on warping. *Ann Maxillofac Surg.* **3**, 20–24 (2013).
4. Tom Shokri. The Nagata Technique for Microtia Reconstruction *Operative Techniques in Otolaryngology-Head and Neck Surgery.* **28**(2),84-89 (2017).
5. Hoshi, K., *et al.* Three-dimensional changes of noses after transplantation of implant-type tissue-engineered cartilage for secondary correction of cleft lip–nose patients. *Regen. Ther.* **7**, 72–79 (2017).
6. Hoshi K., *et al.* Implant-type Tissue-engineered Cartilage for Secondary Correction of Cleft Lip-nose Patients: An Exploratory First-in-human Trial. *J Clin. Trials* **7**, 315; 10.4172/2167-0870.1000315 (2017).
7. Stewart, M. C., Saunders, K. M., Burton-Wurster, N. & Macleod J. N. Phenotypic stability of articular chondrocytes in vitro: the effects of culture models, bone morphogenetic protein 2, and serum supplementation. *J. Bone Miner. Res.* **15**, 166–174 (2000).
8. Qiu, W., Murray M. M., Shortkroff, S., Lee, C. R., Martin, S. D. & Spector, M. Outgrowth of chondrocytes from human articular cartilage explants and expression of alpha-smooth muscle actin. *Wound Repair Regen.* **8**, 383–391 (2000).
9. Yukiyo, A. *et al.* Early stage foreign body reaction against biodegradable polymer scaffolds affects tissue regeneration during the autologous transplantation of tissue-engineered cartilage in the canine model. *Cell Transplant.* **21**, 1431–1442 (2012).
10. Hoshi, K. *et al.* Production of three-dimensional tissue-engineered cartilage through mutual fusion of chondrocyte pellets. *Oral Maxillofac. Surg.* **45**, 1177–1185 (2016).
11. Peer, L. A. Reconstruction of the auricle with diced cartilage grafts in a vitallium ear mold. *Plast. Reconstr. Surg.* **3**, 653–666 (1948).
12. Buckwalter, J.A., Bowman, G.N., Albright, J.P., Wolf, B.R., Bollier, M. Clinical Outcomes of Patellar Chondral Lesions Treated with Juvenile Particulated Cartilage Allografts. *Iowa Orthop J.* **34**, 44–49 (2014).
13. Lu, Y. *et al.* Minced cartilage without cell culture serves as an effective intraoperative cell source for cartilage repair. *J. Orthop. Res.* **24**, 1261–1270 (2006).

14. Nishiwaki, H. *et al.* Novel method to induce cartilage regeneration with cubic microcartilage. *Cells Tissues Organs* **204**, 251–260 (2017).
15. Fujihara, Y., Takato, T. & Hoshi, K. Immunological response to tissue-engineered cartilage derived from auricular chondrocytes and a PLLA scaffold in transgenic mice. *Biomaterials* **31**, 1227–1234 (2010).
16. Rueden, C. T., *et al.* ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* **18**, 529 (on Google Scholar) (2017),
17. Ryoji, A. & Tetsuo, Y. Frequency equations of an ultrasonic vibrator for the elastic sensor using a contact impedance method. *Jpn. J. Appl. Phys.* **43**, 3204–3209 (2004)
18. Griffin, M.F., Premakumar, Y., Seifalian, A.M., Szarko, M., Butler, P.E. Biomechanical Characterisation of the Human Auricular Cartilages; Implications for Tissue Engineering. *Ann Biomed Eng.* **44**, 3460-3467 (2016).
19. Okubo, R. *et al.* Proliferation Medium in Three-Dimensional Culture of Auricular Chondrocytes Promotes Effective Cartilage Regeneration In Vivo. *Regen Ther.* **11**, 306-315 (2019).
20. Ecke, A., *et al.* Tissue Specific Differentiation of Human Chondrocytes Depends on Cell Microenvironment and Serum Selection. *Cells* **8**, 934; <https://doi.org/10.3390/cells8080934> (2019).
21. Bos, P. K., Kops, N., Verhaar, J. A. & van Osch, G. J. Cellular origin of neocartilage formed at wound edges of articular cartilage in a tissue culture experiment. *Osteoarthr. Cartil.* **16**, 204–211 (2008).
22. Pretzel, D., *et al.* A novel in vitro bovine cartilage punch model for assessing the regeneration of focal cartilage defects with biocompatible bacterial nanocellulose. *Arthritis Res. Ther.* **15**, R59; 10.1186/ar4231 (2013).
23. Böhme, K., Conscience-Egli, M., Tschan, T., Winterhalter, K. H. & Bruckner, P. Induction of proliferation or hypertrophy of chondrocytes in serum-free culture: the role of insulin-like growth factor-I, insulin, or thyroxine. *J. Cell Biol.* **116**, 1035–1042 (1992).
24. Rosa, R. G. *et al.* Growth factor stimulation improves the structure and properties of scaffold-free engineered auricular cartilage constructs. *PLoS One.* **9**, e105170; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105170> (2014).
25. Longobardi, L., O'Rear, L., Aakula, S. & Johnstone, B. Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. *J. Bone Miner. Res.* **21**, 626–636 (2005).
26. Moretti, M. *et al.* Effects of in vitro preculture on in vivo development of human engineered cartilage in an ectopic model. *Tissue Eng.* **11**, 1421-1428 (2005)

27. Inaki, R. *et al.* Periostin contributes to the maturation and shape retention of tissue-engineered cartilage. *Sci. Rep.* **8**, 11210; <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29228-6> (2018).
28. Lei Cai, *et al.* Distinct expression pattern of periostin splice variants in chondrocytes and ligament progenitor cells. *FASEB J.* **33**, 8386-8405 (2019).
29. Zhang, M., *et al.* IGF-1 regulation of type II collagen and MMP-13 expression in rat endplate chondrocytes via distinct signaling pathways. *Osteoarthr. Cartil.* **17**, 100–106 (2009).
30. Tyler, J. A. Insulin-like growth factor 1 can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokine. *Biochem. J.* **260**, 543–548 (1989).
31. Tardif, G. *et al.* Collagenase 3 production by human osteoarthritic chondrocytes in response to growth factors and cytokines is a function of the physiologic state of the cells. *Arthr. Rheum.* **42**, 1147–1158 (1999).
32. Billingham, R. C. *et al.* Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J. Clin. Invest.* **99**, 1534–1545 (1997).
33. Inada, M. *et al.* Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proc Natl Acad Sci USA.* **7**, 17192–17197 (2004).
34. Liu, X *et al.* Role of insulin-transferrin-selenium in auricular chondrocyte proliferation and engineered cartilage formation in vitro. *Int J Mol Sci.* **21**, 1525-1537 (2014).
35. Kimura, T., Yasui, N., Ohsawa, S., Ono, K. Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long-term cultures. *Clin Orthop Relat Res.* **186**, 231-239 (1984).
36. Uchio, Y., Ochi, M., Matsusaki, M., Kurioka, H., Katsube, K. Human chondrocyte proliferation and matrix synthesis cultured in Atelocollagen gel. *J Biomed Mater Res.* **50**, 138-143 (2000).
37. Otto, IA., Levato, R., Webb, W.R., Khan, I.M., Breugem, C.C., Malda, J. Progenitor cells in auricular cartilage demonstrate cartilage-forming capacity in 3D hydrogel culture. *Eur Cell Mater.* **27**, 132-150 (2018)
38. Zhang, X., Qi, L., Chen, Y., Xiong, Z., Li, J., Xu, P., Pan, Z., Zhang, H., Chen, Z., Xue, K., Liu, K. The in vivo chondrogenesis of cartilage stem/progenitor cells from auricular cartilage and the perichondrium. *Am J Transl Res.* **15**,2855-2865 (2019).
39. Pera, M. F., Reubinoff, B. & Trounson, A. Human embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* **113**, 5–10 (2000).

40. Hwang, S. T. *et al.* The expansion of human ES and iPS cells on porous membranes and proliferating human adipose-derived feeder cells. *Biomaterials* **31**, 8012–8021 (2010).
41. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotency in human somatic cells via a transient state resembling primitive streak-like mesendoderm. *Nat Commun.* **24**, 3678 (2014).
42. Kim, H.R., Kim, J., Park, S.R., Min, B.H., Choi, B.H. Characterization of Human Fetal Cartilage Progenitor Cells During Long-Term Expansion in a Xeno-Free Medium. *Tissue Eng Regen Med.* **15**, 649-659 (2018).
43. Ishibashi, M., Hikita, A., Fujihara, Y., Takato, T., Hoshi, K. Human auricular chondrocytes with high proliferation rate show high production of cartilage matrix. *Regen Ther.* **26**, 21-28 (2017)
44. Fu, C.*et al.*s Isolation, identification and differentiation of human embryonic cartilage stem cells. *Cell Biol***39**, 777-787 (2015)
45. Nogami, M.*et al.* Isolation and characterization of human amniotic mesenchymal stem cells and their chondrogenic differentiation. *Transplantation.* **27**, 1221-1228 (2012).