

연골세포와 중간엽줄기세포의 3차원 Co-culture를 통한 연골화 향상

황슬기, 차현명, 임진혁, 이지희, 심혜은, 김동일*

Enhanced Chondrogenesis by Three-dimensional Co-culture of Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells

Sul-Gee Hwang, Hyun-Myoung Cha, Jin-Hyuk Lim, Ji-Hee Lee, Hye-Eun Shim, and Dong-Il Kim*

Received: 24 February 2016 / Revised: 1 June 2016 / Accepted: 15 June 2016

© 2016 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Two-dimensional cultivation is typically used for cell growth, but the method reduces the characteristics of chondrocytes and stem cells, and limits culture area. Therefore, development of three-dimensional culture method is needed to mimic in vivo environment, improve quality of cells and scale-up efficiently. Improving proliferation and chondrogenesis is available by co-culture of chondrocytes and mesenchymal stem cells (MSCs) that leads to interaction between two kinds of cells. However, the co-culture has problems that permeability of sphere diminishes as aggregate size increased and ratio of two kinds of cells composing each spheres is different. In this work, co-cultivation method using controlled sphere composed of chondrocytes and MSCs was established and enhanced chondrogenesis. Periosteum-derived progenitor cells (PDPCs) that are appropriate for cell therapy source of articular cartilage were used as MSCs. Controlled spheres were formed in the hanging-drop plates and shifted for being induced chondrogenesis in 35-mm non-adhesive culture dishes at a rotation rate of 60 rpm. After inducing chondrogenesis, gene expressions related with chondrogenesis were found to be improved and it was apparent that the utilization of controlled spheres promoted chondrogenesis. As a result, available numbers of cells per unit area were increased

and chondrogenic differentiation ability was improved compared to typical two-dimensional culture. This approach shows the potential in cartilage regeneration as it can provide sufficient numbers of chondrocytes.

Keywords: Chondrocytes, Co-cultures, Mesenchymal stem cells, Periosteum-derived progenitor cells

1. INTRODUCTION

줄기세포는 자신과 같은 능력의 세포를 만드는 자기복제 능력과 특정한 세포로 분화되는 능력을 가지는 세포로 조직이나 장기를 재생할 수 있고, 장기 이식 후 각 장기의 특성에 맞게 분화할 수 있어 재생의학에 적합하다 [1]. 중간엽줄기세포 (mesenchymal stem cells)란 부착성 성질을 가지는 성체줄기 세포의 한 종류로 뼈, 연골, 지방과 같은 근골격계 세포들로 분화할 수 있는 다분화능 (multipotency)을 가진 줄기세포이다. 중간엽줄기세포는 체외배양이 용이하고 증식 능력이 뛰어나며 원하는 조직으로의 분화가 가능하여 퇴행성 관절염과 척수손상, 심근경색, 당뇨 질환 등의 치료에 이용되고 있다 [2]. 세포치료제로 줄기세포를 이용하기 위해서는 충분한 양의 세포를 얻을 수 있는 배양 방법이 중요하게 요구된다. 중간엽줄기세포의 경우 부착하여 생존하는 특성 때문에 평평한 바닥이 있는 플라스크에서 2차원으로 부착식 배양 (adhesion culture)을 한다. 이러한 배양 방법은 줄기세포의 고유 성질인 분화와 복제 능력을 감소시키고 부착식으로 계대 배

인하대학교 공과대학 생물공학과
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel: +82-32-860-7515, Fax: +82-32-872-4046
e-mail: kimdi@inha.ac.kr

양을 할 경우에는 세포 손실과 오염이 발생할 수 있다 [3]. 또한, 세포치료제로 줄기세포를 이용하기 위해서는 1.0×10^8 cells 이상의 세포가 요구되어 배양 면적이 제한된 2차원 배양 방법으로 대량의 세포를 얻는 것은 경제성이 낮다. 따라서 최근 연구에서는 2차원 배양 방법의 공간 효율성 및 줄기세포 성질이 감소하는 문제를 보완하기 위하여 3차원 부유식 배양 (suspension culture)을 하는 방법이 개발되고 있다. 현재 개발된 많은 3차원 배양 방법 중 배아줄기세포의 응집 (aggregation)의 유도도 embryonic body를 형성시키는 방법이 중간엽 줄기세포 배양에도 적용되어 구형의 sphere를 형성시키는 3차원 배양 방법이 개발되었다 [4]. 세포의 aggregation을 유도하여 3차원 배양하면 세포 사이의 신호 전달이 활발하게 이루어지며 2차원 배양 방법보다 생체 내 환경을 더 유사하게 재현할 수 있기 때문에 세포의 치료적 잠재성을 높일 수 있다 [5].

3차원 배양 방법과 함께 세포치료제 분야에서 줄기세포를 이용함에 있어 세포의 증식과 특성을 증대시키기 위해 공배양 (co-culture) 방법이 적용되었다. Co-culture는 둘 또는 그 이상의 다른 종류의 세포를 같은 환경에서 배양하여 세포 간 상호작용을 통해 단일 배양 (monoculture)보다 세포의 증식이나 특성이 증대될 수 있다 [6]. 따라서 세포의 성질을 극대화하기 위하여 치료 목적에 맞게 co-culture를 이용한 다양한 시도가 있었다 [7]. 그 예로 연골세포와 중간엽줄기세포를 co-culture 하면 중간엽줄기세포에서 분비되는 fibroblast growth factor-1 (FGF-1)이 줄기세포와 연골세포의 증식에 긍정적인 영향을 미친다 [8]. 이와 같은 co-culture 방법은 중간엽줄기세포가 분비하는 thrombospondin-2가 연골의 재생 능력을 증대시켜 연골로의 분화도 증진시킨다고 알려져 있다 [9].

본 연구에서 사용된 골막 유래 전구세포 (periosteum-derived progenitor cells, PDPCs)는 중간엽줄기세포 표지자 (cluster of differentiation, CD)인 CD9, CD90, CD166에 양성을 나타내고, 조혈모세포에서 발견되는 표지자인 CD45에 음성을 나타내는 PDPCs는 높은 증식력을 가지고 장기간 배양 후에도 중간엽줄기세포의 특이적인 성질을 유지할 수 있다. 또한, 윤리적 문제가 없고 세포 이식 후에도 면역 거부반응이 없다는 장점이 있다 [10]. 이러한 특성을 가진 PDPCs의 연골화를 향상시켜 세포 치료제에 필요한 대량의 세포를 얻는 것을 목적으로 연골세포와 co-culture하여 분화능을 증진시키고 경제적으로 세포를 배양할 수 있는 3차원 배양 방법을 적용하였다. 연골세포와 PDPCs를 3차원으로 배양하기 위하여 hanging-drop 방법으로 두 세포가 함께 포함된 구형의 sphere를 형성시키고, 배양 중 물질 전달 능력의 감소를 방지하기 위해 rotation platform을 이용하여 3차원 co-culture를 하였다. 연골세포만 단일로 배양한 경우와 비교하여 줄기세포와 연골세포를 함께 co-culture를 하였을 때 증식률이 높았고, 분화능이 증진되어 연골화가 촉진된 것을 확인하였다. 이를 통하여 세포 치료제로 사용 가능한 대량의 연골세포를 효율적으로 얻을 수 있는 방법을 제시하였다.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. 연골세포의 분리 및 배양

연골세포의 분리를 위한 연골조직은 정형외과의 인공관절 대체 수술 후 획득한 조직을 사용하였다. 연골조직을 phosphate buffered saline (PBS; Invitrogen, CA, USA)으로 3회 세척한 다음 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen)으로 옮겼다. 세포 외 기질을 제거하기 위해 0.2% collagenase type II (Worthington biochemical, NJ, USA)를 첨가하고, 24시간 반응 후 상등액을 취하여 1,200 rpm에서 3분간 원심분리를 하였다. 상등액을 제거하고 침전물을 PBS로 3회 세척하여 연골조직으로부터 연골세포를 분리하였다. 분리된 연골세포가 80% 증식하였을 때 계대 배양을 하였고, 0.05% trypsin-EDTA (Invitrogen)를 사용하여 세포를 회수하였다.

2.2. 골막 유래 전구세포의 분리 및 배양

정형외과의 수술을 통해 얻은 골막조직을 24시간 이내에 초대 배양하여 골막 유래 세포 (periosteum-derived cells, PDCs)를 분리하였다. 골막조직을 PBS로 세척한 후, 작은 절편으로 자르고 조직의 형성층을 24-well plate (SPL Life science, Seoul, Korea)에 부착시키고, 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen)과 1% penicillin/streptomycin (P/S; Invitrogen)이 첨가된 DMEM을 넣어주었다. 5% CO₂가 공급되는 37°C, CO₂ incubator (Sanyo Electric, Osaka, Japan)에서 7일 동안 배양하여 조직으로부터 세포를 분리하였다. 충분한 양의 PDCs를 회수하여 FACS Vantage (Becton Dickinson, NJ, USA)로 PDPCs만 선택적으로 분리하였다 [10]. 분리된 PDPCs는 T-flask (SPL Life science)에 10% FBS와 1% P/S가 포함된 DMEM을 사용하여 배양하였다.

2.3. 연골세포와 골막 유래 전구세포의 3차원 co-culture

분리된 연골세포와 PDPCs의 aggregation을 유도하여 sphere를 형성시킨 후 rotation platform을 이용하여 배양하였다. 연골세포와 PDPCs를 3:7의 비율로 혼합하여 총 4×10^3 cells/well의 농도로 Perfecta3D 96-well hanging drop plate (3D Biomatix, MI, USA)에 접종하였다. 배지는 10% FBS와 1% P/S가 포함된 DMEM을 사용하고, 3일간 배양한 후에는 세포 부착 유도 인자가 없는 35-mm culture dish (SPL Life science)로 세포를 옮겼다. 3차원 배양을 하기 위해서 35-mm culture dish에서 배양을 할 경우에는 Cha et al.의 연구 결과를 바탕으로 하였다. 3.84×10^5 cells/mL의 농도로 2 mL의 StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit (Invitrogen)를 첨가한 후 orbital shaker (Vision Scientific, Daejeon, Korea)에서 60 rpm으로 5% CO₂가 공급되는 37°C, CO₂ incubator에서 배양하였다.

2.4. WST-1 assay

WST-1 assay는 기질인 high sensitive water soluble tetrazolium salt가 살아있는 세포의 dehydrogenase와 반응하여 수용성 formazan을 생성하는 미토콘드리아의 능력을 이용한 세포 증식

측정법이다. 새로운 배지로 교환한 후에 EZ-Cytox (iTSBiO, Seoul, Korea)를 첨가하였다. 빛을 차단하고 37°C, 5% CO₂가 공급되는 CO₂ incubator에서 1시간 반응시켰다. 형성된 수용성 formazan을 96-well plate (Nunc, NY, USA)에 옮기고 Bio-track II plate reader (GE Healthcare, NJ, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. 역전사 증합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

연골세포와 줄기세포의 특이 유전자를 확인하기 위해 배양한 세포를 회수하여 RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)로 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA의 농도를 측정 후 Maxime RT Premix Kit (iNtRon, Seongnam, Korea)에 첨가하고 T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 45°C에서 60분, 95°C에서 5분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. PCR은 합성된 cDNA와 관련 유전자의 primer를 AccuPower PCR Premix (Bioneer, Daejeon, Korea)에 넣고 T100 Thermal Cycler를 이용하여 primer의 합성 조건에 맞추어 반응시켰고, 1.5% agarose gel에서 전기영동을 수행하여 관련 유전자를 확인하였다. 정량적 RT-PCR은 합성된 cDNA에 primer와 iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad, CA, USA)를 넣고 Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 각 primer의 합성 조건에 맞추어 40회 반복 수행하였고, melting curve를 확인하기 위해 62-95°C까지 0.2°C마다 형광 값을 확인하였다. 사용한 primer의 정보와 조건은 Table 1과 같다.

2.6. Glycosaminoglycan assay

Glycosaminoglycan (GAG)를 정량 분석하기 위하여 배양된 세포를 PBS로 세척하고 papain extraction reagent를 첨가한 후에 60°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 그 후 10,000 g에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 회수하고, Blyscan Assay Kit (Biocolor, County Antrim, UK)를 사용하여 GAG를 염색하였다. 염색된 GAG를 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 침전물에 dissociation reagent를 첨가한 후 96-well plate에 옮겨 Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)를 이용하여 656 nm에서 흡광도

를 측정하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 연골세포와 골막 유래 전구세포의 3차원 co-culture 방법 확립

3차원 co-culture 방법으로 연골세포와 PDPCs를 배양하기 위하여 세포 간의 aggregation을 유도하여 sphere를 형성시켰다. Co-culture에서는 두 세포의 비율이 sphere의 형성에 중요한 역할을 하여 한 개의 sphere를 형성시킬 때 hanging-drop 방법으로 연골세포와 PDPCs의 비율 조절을 하였다. 연골세포의 비율이 높은 환경에서는 sphere 형성이 이뤄지지 않았다 (Fig. 1(a)-1(c)). 하지만, PDPCs의 비율이 높아질수록 aggregation의 유도가 증진되어 구형에 가까운 sphere가 형성되었다 (Fig. 1(d)-1(f)). 연골세포와 PDPCs의 비율이 3:7일 경우에 구형의 sphere 형태가 가장 잘 유지되는 것을 확인하였다 (Fig. 1(d)). 중간엽줄기세포에서 sphere를 형성시켜 배양하는 방법은 세포를 서로 접촉시켜 세포가 접촉할 곳을 잃고 부유 상태가 되어 사멸하는 anoikis mechanism을 극복하는 것으로 밝혀져 왔다 [7]. 이러한 줄기세포의 특성 때문에 co-culture 환경에서 PDPCs의 비율이 높을수록 sphere가 잘 형성된 것으로 사료된다.

3.2. Co-culture 환경에서 세포 증식 확인

Hanging-drop 방법으로 aggregation이 유도된 연골세포와 PDPCs의 co-culture 환경에서 세포의 증식을 확인하였다. 연골세포만을 배양한 단일 배양과 연골세포와 PDPCs를 3:7의 비율로 혼합한 co-culture의 증식률을 비교한 결과, co-culture 조건에서 단일 배양보다 더 높은 증식률을 나타내었다 (Fig. 2). 연골세포와 줄기세포의 co-culture를 진행하면 줄기세포의 사이토카인 (cytokine) 생성을 통해 연골세포의 증식을 자극하는 것으로 알려져 있다 [12]. 또한, 3차원 배양에서 줄기세포와 co-culture를 통해 구형의 sphere 형성으로 세포의 접촉을 증가시켜 anoikis mechanism이 유도되지 않고 세포 사멸을 억제하여 증식률을 높일 수 있다. 따라서 본 연구에서도

Table 1. Oligonucleotide primers for the detection of target mRNAs

mRNA	Sense / antisense sequences	Size (bp)	Annealing temperature (°C)
GAPDH	5'-GCTCTCCAGAACATCATCCCTGCC-3'	346	54
	5'-CGTTGTCATACCAGGAAATGAGCTT-3'		
Nanog	5'-CAGAAAAACAACCTGGCCGAA-3'	253	54
	5'-GGCCTGATTGTTCCAGGATT-3'		
Oct4	5'-AAGCGATCAAGCAGCGACTA-3'	237	54
	5'-CCTCAGTTTGAATGCATGGG-3'		
Sox9	5'-GCCAGGTGCTCAAAGGCTA-3'	213	58
	5'-TCTCGTTCAGAAGTCTCCAGAG-3'		
Aggrecan	5'-CTGCTTCCGAGGCATTTTCAG-3'	98	57
	5'-CTTGGGTCACGATCCACTCC-3'		

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

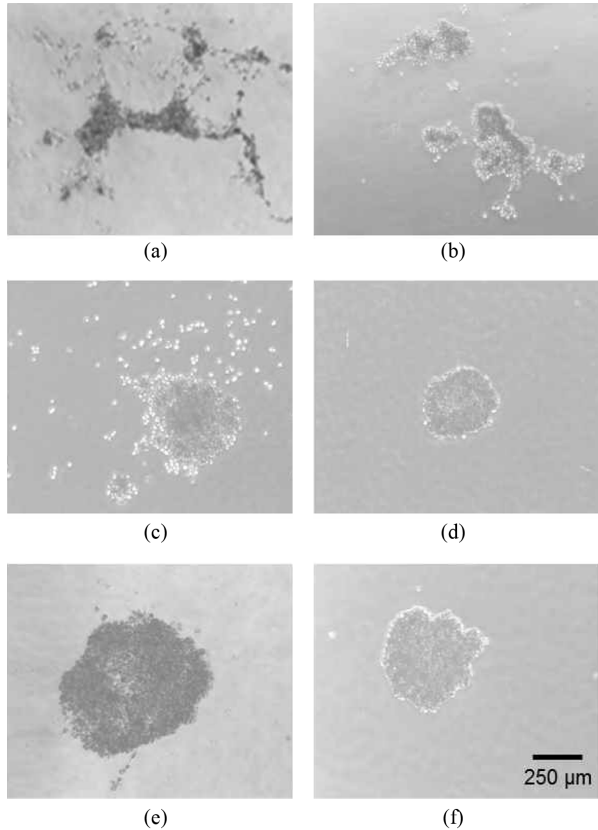


Fig. 1. Comparison of sphere formation in the ratios of chondrocytes:PDPCs as follows: (a) 10:0, (b) 8:2, (c) 7:3, (d) 3:7, (e) 2:8 and (f) 0:10. When the ratio of chondrocytes and PDPCs was 3:7, the spheres were suitable for three-dimensional co-cultures.

줄기세포를 이용한 co-culture가 세포의 증식에 긍정적인 영향을 주는 것을 확인하였다. 형성된 sphere를 rotation platform을 이용하여 대량으로 분화 배양을 할 경우에도 agglomerate가 형성되지 않고 구형의 형태를 유지하였다 (Fig. 3). 이러한 결과는 줄기세포가 연골로 분화되는 과정에서 aggregation 발생의 원인이 되는 E-cadherin의 발현이 감소하고, 세포가 구형으로 변화하는 특징을 가지고 있기 때문이다 [13]. 또한, 기존의 2차원 배양 방법과 단위 면적당 배양 가능한 세포의 수를 비교하면 3차원 배양에서 10배 더 많은 세포를 배양할 수

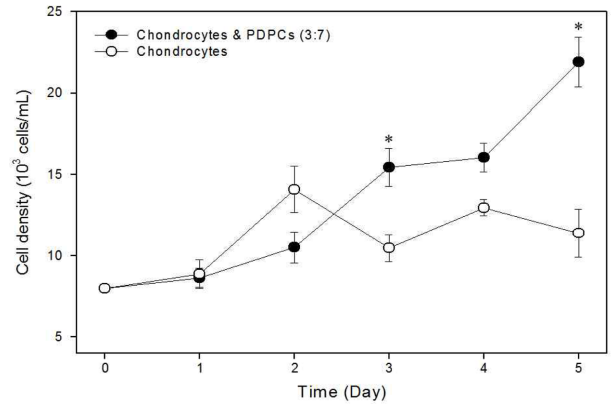


Fig. 2. Determination of proliferation in monocultures and co-cultures with three-dimensional condition. The co-cultures of chondrocytes and PDPCs showed a higher growth rate. The criterion for significant differences is: * for $p < 0.05$.

있기 때문에 3차원 co-culture를 이용하여 대량의 연골세포를 얻는 과정에서 경제성과 효율성을 높일 수 있었다.

3.3. 3차원 배양에서 연골세포로의 분화 확인

3차원 co-culture 환경에서 연골세포로 분화를 유도한 후, 연골세포와 줄기세포의 특이적인 유전자를 이용하여 분화가 이루어졌는지 유전자 수준에서 확인하였다. 분화 배양 2, 4, 6 일차에 RT-PCR을 통하여 연골세포와 관련된 유전자인 Sox9과 Aggrecan 발현을 가시적으로 관찰하였다. 각각의 유전자는 중간엽줄기세포인 PDPCs만 단일 배양했을 때와 비교하여 co-culture 조건에서 더 높은 수준으로 발현되었다 (Fig. 4). 줄기세포를 단일 배양한 경우에는 Aggrecan 유전자의 발현을 분화 6일차에는 확인할 수 없었다. 이는 줄기세포 비율이 높은 조건에서 aggregation을 유도하면 Fig. 1에서 확인한 것처럼 sphere의 크기가 증가하여 내부에 위치한 세포까지 물질 전달이 이루어지기 힘들기 때문에 세포의 상태에 영향을 주거나 탈분화가 일어난 것으로 사료된다. 추가적으로, 분화 배양 6일 차에 연골세포와 줄기세포관련 유전자 발현율을 정량하였다. Co-culture 조건에서 연골세포 유전자인 Sox9과 Aggrecan은 상대적으로 많이 발현이 되었고, 줄기세포 유전자인 Nanog와 Oct4는 거의 발현이 되지 않았다. 단일 배양으

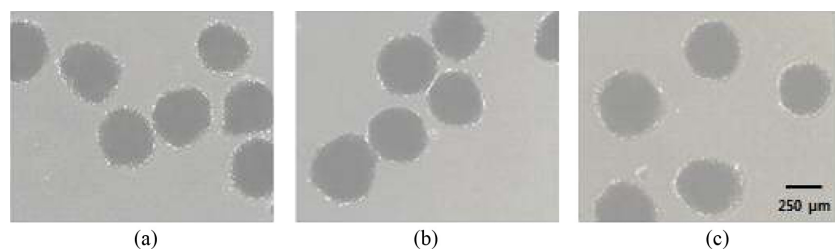


Fig. 3. Sphere formation during chondrogenic differentiation of chondrocytes and PDPCs at (a) day 3, (b) 6 and (c) 9. Homogeneous size of sphere was maintained in the co-culture condition.

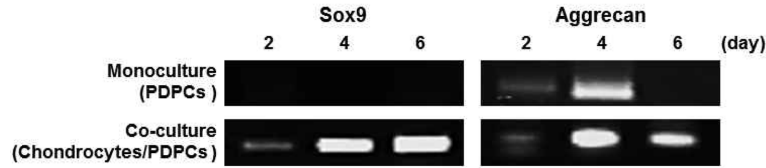


Fig. 4. mRNA expressions of chondrogenesis marker genes after inducing chondrogenesis. Sox9 and Aggrecan genes were highly detected in co-culture of chondrocytes and PDPCs.

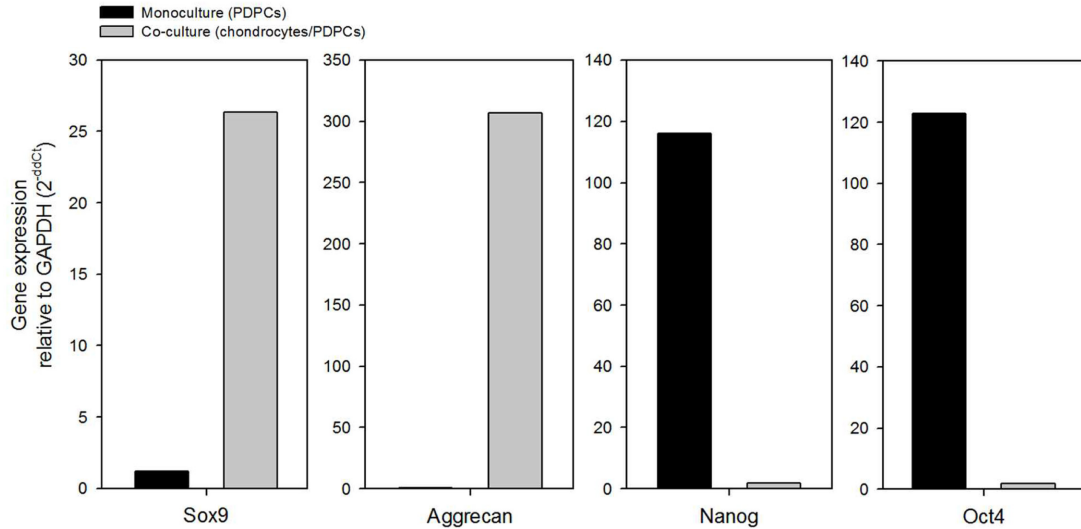


Fig. 5. Evaluation of expression level of chondrocyte genes (Sox9 and Aggrecan) and stemness genes (Nanog and Oct4) at day 6. Co-cultures showed a significantly enhanced chondrogenesis and had low-level expression of stemness genes.

로 PDPCs를 연골세포로 분화시키면 Fig. 4의 결과와 같이 연골세포관련 유전자는 발현율이 낮았으며 Nanog와 Oct4 유전자는 높게 발현되어 줄기세포의 성질이 유지된 것을 확인하였다 (Fig. 5). 줄기세포와 연골세포를 함께 배양하면 줄기세포에 의해서 분비되는 thrombospondin-2가 연골의 재생 능력을 증대시켜 연골화를 증진시킬 수 있으며 FGF-1 분비도 촉진되어 연골세포의 증식에 도움을 줄 수 있다. 이를 바탕으로, 연골세포와 PDPCs의 co-culture 환경 조성이 연골세포로의 분화 효율을 높일 수 있음을 증명하였다.

연골세포로의 분화를 단백질 수준에서 증명하기 위하여 연골세포의 특이 단백질인 GAG의 발현량을 정량 분석하였다. 줄기세포와 연골세포를 함께 배양하였을 때 GAG의 발현량이 꾸준히 증가하였으며 분화 배양 12일차에는 단일 배양에 비해서 GAG의 발현이 6.2배 증가하였다. 단일 배양 조건에서는 GAG의 발현이 낮았을 뿐만 아니라 6일 이후에는 발현량이 현저히 감소하였다 (Fig. 6). 연골세포의 경우 배양 환경에 따라 탈분화가 일어나 세포의 성질이 감소할 수 있기 때문에 세포를 배양하는 방법이 중요하다 [14]. 따라서 연골세포의 탈분화 과정 없이 연골세포로 분화 효율을 증진시킨 3차원 co-culture 방법을 이용하여 대량의 연골세포를 효율적으로 얻을 수 있을 것이다.

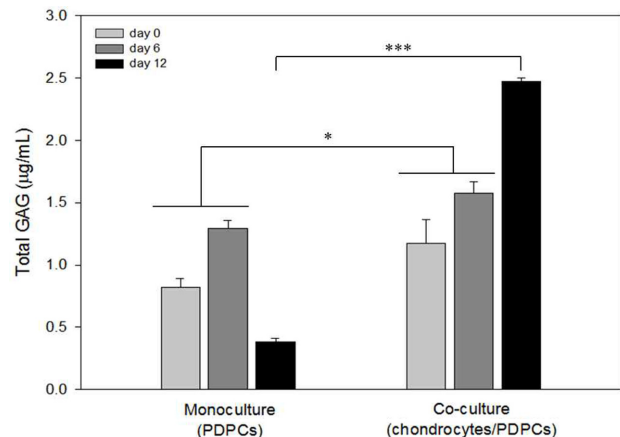


Fig. 6. Quantification of total GAG at day 0, 6, 12 after inducing chondrogenesis. At day 12, co-cultures of chondrocytes and PDPCs showed increased quantification of GAG, whereas amount of GAG was decreased in PDPCs monocultures. The criteria for significant differences are: * for $p < 0.05$ and *** for $p < 0.001$.

로 얻을 수 있을 것이다.

4. CONCLUSION

본 연구에서는 퇴행성 관절염 치료에 사용되는 연골세포를 대량으로 얻는 것을 목적으로 3차원 co-culture 방법을 확립하였다. 연골세포와 줄기세포의 aggregation을 유도하여 sphere 형성을 위한 최적의 비율을 선정하였고, 형성된 sphere의 증식률을 확인하였다. 연골세포와 PDPCs를 3:7 비율로 hanging-drop 방법을 이용하여 단일의 sphere를 형성시킨 후, rotation platform에서 분화 배양할 경우에도 sphere 형태가 계속 유지되었다. 또한, 두 세포의 co-culture를 통해서 단일 배양으로 연골세포를 배양했을 때 문제점인 느린 증식률을 극복하였다. Co-culture 조건에서 연골세포로 분화를 유도한 결과, 연골세포의 특이 유전자 및 단백질의 발현이 높게 나타난 것을 확인하였다. 이처럼, PDPCs와 연골세포의 co-culture를 통해서 연골세포로 분화율을 높이고, 3차원 배양 방법으로 단위 면적당 배양 가능한 세포수를 증가시켜 단기간에 대량의 연골세포를 얻을 수 있었다. 미립운반체 (microcarrier) 또는 지지체 (scaffold) 없이 sphere 형성을 유도하여 개발된 3차원 co-culture 방법은 경제성이 매우 높아 상업적으로 큰 장점을 가지고 있기 때문에 세포치료제 생산 공정에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgements

본 연구는 정부 (미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단 바이오의료기술개발사업 (No. NRF-2013M3A9B6075887)으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Fernandes, T. G., C. A. V. Rodrigues, M. M. Diogo, and J. M. S. Cabral (2014) Stem cell bioprocessing for regenerative medicine. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89: 34-47.
2. Fernandez Vallone, V. B., M. A. Romaniuk, H. Choi, V. Labovsky, J. Otaegui, and N. A. Chasseing (2013) Mesenchymal stem cells and their use in therapy: What has been achieved? *Differentiation* 85: 1-10.
3. Breslin, S. and L. O'Driscoll (2013) Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov. Today* 18: 240-249.
4. Page, H., P. Flood, and E. G. Reynaud (2013) Three-dimensional tissue cultures: current trends and beyond. *Cell Tissue Res.* 352: 123-131.
5. Bartosh, T. J., J. H. Ylostalo, A. Mohammadipoor, N. Bazhanov, K. Coble, K. Claypool, R. H. Lee, H. Choi, and D. J. Prockop (2010) Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 13724-13729.
6. Leijten, J. C., N. Georgi, L. Wu, C. A. van Blitterswijk, and M. Karperien (2012) Cell sources for articular cartilage repair strategies: shifting from monocultures to cocultures. *Tissue Eng. Part B Rev.* 19: 31-40.
7. Frith, J. E., B. Thomson, and P. G. Genever (2009) Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential. *Tissue Eng. Part C Methods* 16: 735-749.
8. Wu, L., X. Cai, S. Zhang, M. Karperien, and Y. Lin (2013) Regeneration of articular cartilage by adipose tissue derived mesenchymal stem cells: perspectives from stem cell biology and molecular medicine. *J. Cell. Physiol.* 228: 938-944.
9. Jeong, S. Y., D. H. Kim, J. Ha, H. J. Jin, S. Kwon, J. W. Chang, S. J. Choi, W. Oh, Y. S. Yang, and G. Kim (2013) Thrombospondin2 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells promotes chondrogenic differentiation. *Stem Cells* 31: 2136-2148.
10. Choi, Y. S., S. E. Noh, S. M. Lim, C. W. Lee, C. S. Kim, M. W. Im, M. H. Lee, and D. I. Kim (2008) Multipotency and growth characteristic of periosteum-derived progenitor cells for chondrogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Biotechnol. Lett.* 30: 593-601.
11. Cha, H. M., S. M. Kim, Y. S. Choi, and D. I. Kim (2015) Scaffold-free three-dimensional culture systems for mass production of periosteum-derived progenitor cells. *J. Biosci. Bioeng.* 120: 218-222.
12. Acharya, C., A. Adesida, P. Zajac, M. Mumme, J. Riesle, I. Martin, and A. Barbero (2012) Enhanced chondrocyte proliferation and mesenchymal stromal cells chondrogenesis in coculture pellets mediate improved cartilage formation. *J. Cell. Physiol.* 227: 88-97.
13. Kinney, M. A., T. A. Hookway, Y. Wang, and T. C. McDevitt (2014) Engineering three-dimensional stem cell morphogenesis for the development of tissue models and scalable regenerative therapeutics. *Ann. Biomed. Eng.* 42: 352-367.
14. Meretoja, V. V., R. L. Dahlin, S. Wright, F. K. Kasper, and A. G. Mikos (2014) Articular chondrocyte redifferentiation in 3D co-cultures with mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part C Methods* 20: 514-523.