

〈一般研究課題〉 マウス骨芽細胞様細胞由来スフェロイドの
石灰化過程における細胞挙動観察および力学特性評価
助成研究者 名古屋大学 キム ジョンヒョン



マウス骨芽細胞様細胞由来スフェロイドの 石灰化過程における細胞挙動観察および力学特性評価

キム ジョンヒョン
(名古屋大学)

Evaluation of cell behavior and evaluation of mechanical properties in MC3T3-E1 spheroids during mineralization process

Jeonghyun Kim
(Nagoya University)

Abstract :

Three-dimensional spheroids derived from mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells offer a promising in vitro model to investigate bone tissue formation. In this study, we aimed to elucidate cellular behavior and mechanical property changes during the mineralization process of these spheroids over a 35-day culture period. Spheroids were induced to differentiate using osteogenic supplements and observed at different time points. Cell nuclei and collagen distribution were visualized using two-photon microscopy, revealing collagen accumulation and peripheral localization of nuclei after long-term culture. Mineralization was confirmed via Alizarin Red staining in cryosections at day 35. Furthermore, uniaxial compression tests using a micro-manipulator system with glass plates showed a significant increase in stiffness, with Young's modulus rising from 8.23 ± 2.90 kPa at day 2 to 21.8 ± 4.97 kPa at day 35. These findings suggest that long-term culture induces both mineralization and mechanical stiffening of the spheroids, closely mimicking early bone formation processes.

1. はじめに

細胞の3次元培養は2次元培養と比べ、生体組織と類似した構造や機能を与える場合が多く、生体組織の形成過程を試験管内で再現する手段として、近年さまざまな研究が進められている。マウ

ス骨芽細胞様細胞由来スフェロイドにおいては、短期培養では骨細胞分化が引き起こされ(1)、長期培養により中心部から石灰化が起こることが知られている(2)。しかし、スフェロイド内で石灰化が起こる機構については解明されていない。そこで我々はこれらの機構を解明することを目的とし、最大35日間培養したスフェロイドに対し、内部の細胞挙動計測と組織観察および単軸圧縮試験による力学特性計測を行った。

2. 実験方法

2.1 細胞培養

マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 (Riken BRC, Japan) を用いた。MC3T3-E1の培養液には α -MEM (alpha minimum essential medium, Gibco, USA) に非働化したウシ胎児血清 (Fetal bovine serum, Gibco, USA) を 10 %, 抗生物質 (100 unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, Sigma, USA) を 1 % 加えたものを用い、37°C, 5 % CO₂ の環境で培養した。

2.2 スフェロイド作製および培養

マウス骨芽細胞様細胞由来スフェロイドは先行研究(3)を参考に、細胞懸濁液 (2,500 cells/well) を低接着96ウェルプレートに播種することで作製した。本研究ではウェルプレートに細胞懸濁液を播種して最大35日間培養したサンプルを用いて実験を行った。また、スフェロイド培養の際は、骨分化誘導剤を加えることで骨細胞分化を誘導した。骨分化誘導剤には β -グリセロリン酸 (Sigma, USA), アスコルビン酸 (Wako, Japan), 及びデキサメタゾン (Nacalai Tesque, Japan) を用い、細胞懸濁液に対してアスコルビン酸 250 μ M, β -グリセロリン酸 50 μ M, デキサメタゾン 100 nM になるよう α -MEM に加えた。

2.3 コラーゲン観察

培養開始後2日目ならびに35日目のサンプルを回収し、10 %ホルマリン溶液に浸漬し固定処理をした後、細胞核を Ethidium homodimer III (Nacalai Tesque, Japan) で染色し、2光子顕微鏡 (A1RMP, Nikon, Japan) で撮影し画像を取得した。

2.4 石灰化染色

石灰化部分はスフェロイドの凍結切片を作製したのちにアリザリンレッド染色を行うことで観察した。サンプルは24時間以上ホルマリン固定を行い、凍結切片は OCT (Optimal Cut Temperature) コンパウンド (Sakura Finetek, Japan) でサンプルを包埋し、-80°C で急速に冷凍することでブロックを作製した。ブロックをクライオトーム (CM3050S, Leica, Germany) で厚さ 10 μ m にスライスすることで、スフェロイドの凍結切片を得た。その後、凍結切片を洗浄し、アリザリンレッド (Muto Pure Chemicals, Japan) で4分間染色した。そして、水で2回洗浄したのち封入剤 (Entellan New, Sigma, USA) を加え、倒立顕微鏡 (IX73, Olympus, Japan) で観察した。

2.5 力学特性計測

力学特性計測には Fig. 1 に示すガラス板を用いた単軸圧縮試験系を用いた(4)(図1)。長さ100

mm, 幅1.0 mm, 厚さ0.14 mmのホウケイ酸ガラス薄板(D263 Teco, Schott, Germany)を曲げ, ピペットホルダ(HI-7, Narishige, Japan)を介して3軸マイクロマニピュレータ(MHW-3, Narishige, Japan)にセットした。また, スフェロイドを四角形ディッシュ(CS-TECH, Japan)に移し, マイクロマニピュレータでガラス板を操作することで, スフェロイドをディッシュの壁面に押し付けた。ガラス板は5 μm ずつ移動させ, スフェロイド直径の30%程度(約40 μm)圧縮した。これにより圧縮時のスフェロイドの押し込み量とガラス板の移動量の差と, 予め計算したガラス板のばね定数を利用して, スフェロイドのヤング率を算出した。

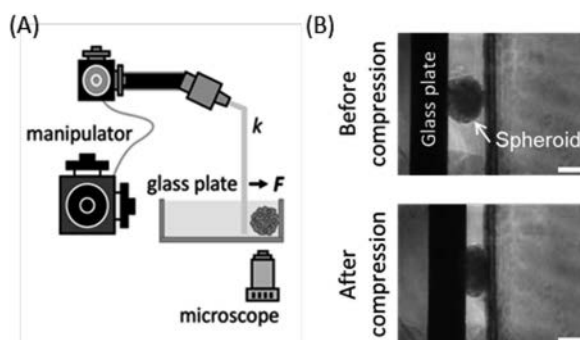


図1. Schematic diagram of compression system using a glass plate (A) and representative images of MC 3T 3-E 1 spheroids under compression (B). White bars in (B) indicate 100 μm .

3. 実験結果

図2に示されるように, マウス骨芽細胞様細胞由来スフェロイドは, 長期培養することでサイズが小さくなり, 培養開始後2日目ではスフェロイド全体に分布していた細胞核が, 35日目のスフェロイドでは外側のみに存在していた。さらに, 培養開始後2, 35日目におけるスフェロイドに対し2光子顕微鏡で細胞核とコラーゲン特有の第2次高調波(SHG光)を観察した結果, 培養開始後2日のスフェロイドでは細胞核のまわりにコラーゲンが点在する様子が観察された一方で, 35日のスフェロイドではコラーゲンが凝集し, 大部分を占めていた。

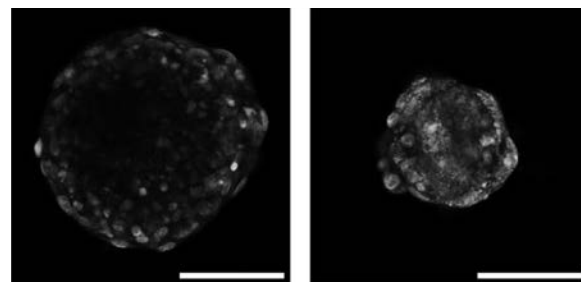


図2. Representative images of nuclei (cyan) and collagen (purple) in MC3T3-E1 spheroids taken by two photon microscopy (left: day 2; right: day 35). White bars indicate 100 μm .

培養開始後35日目のスフェロイドで作製した凍結切片を切断し, アリザリンレッド染色を行った結果を図3(A)に示す。その結果, スフェロイド切片は中心部が赤く染まっており, 我々のモデルでも石灰化を起こしていることが確認できた。また, 単軸圧縮試験を行い2, 7, 35日間培養したスフェロイドのヤング率を算出した結果を図3(B)に示す。その結果, ヤング率は2日目で 8.23 ± 2.90 kPa (mean $\pm$ SD, $n = 6$), 7日目で 14.8 ± 6.15 kPa ($n = 6$), そして35日目で 21.8 ± 4.97 kPa ($n = 4$)であり, 35日間培養したスフェロイドは2日間培養したものと比べて有意に硬くなっていた。

4. 考察

マウス骨芽細胞様細胞由来スフェロイドに対し二光子顕微鏡でコラーゲン特有の第2次高調波(SHG光)を観察した結果, 培養後2日のスフェロイドではコラーゲンが細胞核の周りに点在していたのに対し, 35日のスフェロイドではコラーゲンが凝集し, スフェロイドの大部分を占めている様子が観察された。長期培養後スフェロイド内部の細胞核がなくなった部位にそれぞれの細胞から産生されたコラーゲンが蓄積していることが考えられる。また, ガラス薄板を用いた単軸圧縮試験

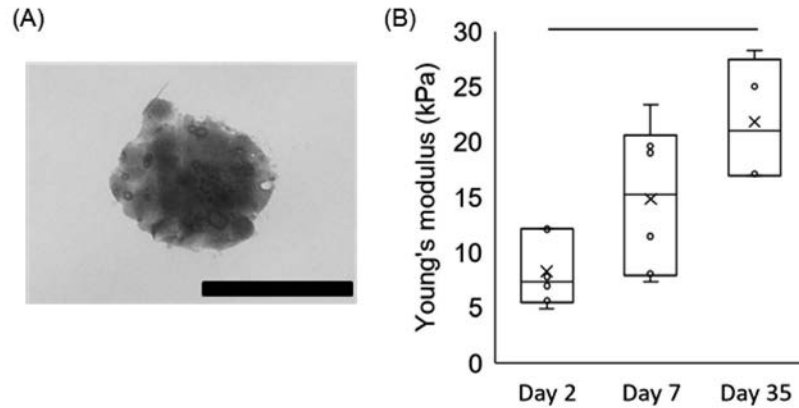


図3. Alizarin red staining image of 35-day MC3T3-E1 spheroid (A). Black bar indicates 100 μm . Box plots of Young's moduli of MC3T3-E1 spheroids at Day 2 ($n = 6$; $N = 3$), Day 7 ($n = 6$; $N = 3$), and Day 35 ($n = 4$; $N = 2$) obtained from uniaxial compression test (n , number of spheroids. N , number of independent dishes) (B). Bar indicates $P < 0.05$ (One-Way ANOVA, Tukey Kramer post-hoc test)

系でヤング率を測定した結果、培養開始後2日目と比べて35日目ではヤング率が有意に上昇し、さらにアリザリンレッド染色により培養開始後35日目のスフェロイド内部で石灰化が確認されたことから、培養後35日のスフェロイドが獲得した硬さは、石灰化が反映されたものであると考えられる。今後は、細胞種や培養条件を更に検討し、スフェロイド培養においてより硬い組織形成を誘導したい。

参考文献

- (1) Kim J & Adachi T, "Cell Condition Triggers the Differentiation of Osteoblast Precursor Cells to Osteocyte-Like Cells", *Front Bioeng Biotechnol*, (2019), 7.
- (2) Koblenzer M, Weiler M, Fragoulis A, Rütten S, Pufe T, & Jahr H, "Physiological Mineralization during In Vitro Osteogenesis in a Biomimetic Spheroid Culture Model", *cells*, (2022), 11(17), 2702.
- (3) Kim J, Kigami H, & Adachi T, "Characterization of self-organized osteocytic spheroids using mouse osteoblast-like cells", *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, (2020), 15(3), 20-00227.
- (4) Inagaki, T, Kim J, Maeda E, & Matsumoto T, "Macroscopic creep behavior of spheroids derived from mesenchymal stem cells under compression", *Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, (2025), 161, 106816.