

細胞内マグネシウムイオン恒常性が細胞老化に与える影響の解析

山中 龍

山陽小野市立山口東京理科大学薬学部薬学科

概要 生体内においてマグネシウム(Mg)イオンは多岐にわたる機能を果たしている。実際、Mg イオン恒常性の破綻は、がん、糖尿病、神経系疾患、心臓病、骨粗しょう症など、加齢によって発症リスクが高まる多くの疾患において観察されている。Mg イオンが多くの疾患と関係があるのは、細胞内において Mg イオンは多岐にわたる役割を果たしていることに由来する。また、生物個体における老化現象の細胞レベルでの基礎プロセスとして細胞老化が挙げられるが、これは、正常細胞は細胞分裂によって増殖するが一定の分裂回数を経ると細胞分裂能を喪失し老化細胞となる現象である。細胞老化では様々な細胞機能に異常が生じるが、それらの細胞機能の多くは Mg イオンと密接な関連がある。しかし、Mg イオンと細胞老化の関連を示唆する報告は多数あるが、その直接的な関係は未だに明らかにされていない。その理由の1つとして、生きている細胞内部の Mg イオン濃度を正確に測定する手法がなかったことが挙げられる。我々の研究グループは長年、Mg イオンの蛍光イメージング法の開発を行ない、様々な細胞種において細胞内 Mg イオン濃度のダイナミクス測定を行ってきた。これらの研究を通して、生理学的条件下において刺激や細胞環境に応じて細胞内 Mg イオン濃度はダイナミックに変化し、細胞内代謝や細胞内シグナルの活性を制御し、細胞運命に影響を与えることを解明してきた。そこで本研究では、我々の細胞内 Mg イオン恒常性の解析技術を用いて、細胞老化の進行と細胞内 Mg イオン恒常性の変化の関係を明らかにすることを目的とした。まず、ヒト骨髄から採取した間葉系幹細胞を実験室環境で継続的に長期培養すると約 90 日で細胞分裂を停止し、細胞老化の状態に至ることがわかった。また、実験室環境で長期間培養した間葉系幹細胞は老化細胞に特徴的な形態変化を示すことがわかった。そこで、さらに人工知能技術の一種であるディープラーニングを用いた画像解析モデルを作成することによって非染色の細胞画像から細胞老化レベルを定量的に評価する手法の確立に成功した。これによって細胞環境の変化によって生じる細胞老化の進行速度の変化を捉えることが可能となった。そして、いくつかの細胞外 Mg イオン濃度条件で間葉系幹細胞を培養し老化細胞になるまでの過程を観察した結果、Mg イオンは細胞老化の進行を抑制すること、Mg イオン欠乏はストレス環境において細胞老化の進行を促進することを明らかにした。これらのことより、細胞内 Mg イオンは細胞老化の進行を抑える効果があることがわかった。

1. 研究目的

1.1 研究の背景

細胞老化

世界で最も高齢化が進んでいる我が国において健康寿命の延長は喫緊の課題であり、老化現象の進行速度を遅くするための技術開発や老化によってもたらされる生体機能の低下を抑制する方法は社会的にも切望されている。生物個体における老化現象の細胞レベルでの基礎プロ

セスとして細胞老化と呼ばれる現象が挙げられるが、細胞老化は、正常な細胞は細胞分裂によって増殖するが一定の分裂回数を経ると細胞分裂能を喪失した老化細胞となる現象である。老化細胞では遺伝子発現異常、代謝異常、細胞間コミュニケーション異常といった多岐にわたる細胞機能の異常が起きる。実際、加齢にともなって体内における老化細胞の存在割合が増えることが知られているが、加齢の過程で体内に蓄積した老化細胞を死滅させると、加

んを含め様々な加齢に関連する疾患の発症率が低下することが報告されている^[1]。そのため、細胞老化のメカニズム解明と細胞老化の進行を制御する技術の確立は社会的にも待ち望まれている。

マグネシウムイオン

マグネシウムイオン調節システムの破綻は、がん、糖尿病、神経系疾患〔アルツハイマー病やパーキンソン病など〕、心臓病、骨粗しょう症など、加齢によって発症リスクが高まる多くの疾患において観察されている^[2]。また、マグネシウムイオンは上記疾患の様々なモデルにおいて疾患の発症や進行を抑制することも確認されている^[2]。マグネシウムイオンが多くの疾患と関係があるのは、細胞内シグナル伝達、イオンチャネルの制御、活性酸素種の抑制、タンパク質凝集の抑制、細胞骨格の動態制御、エネルギー

代謝制御、DNA・RNAの安定化、リボソームの活性調節など、細胞内において多岐にわたる役割をマグネシウムイオンは果たしていることに由来する^[2](**図 1**)。これらの細胞内マグネシウムイオンが制御している細胞機能の多くは細胞老化によっても機能不全を起こすことが知られている。加えて、高齢者の赤血球細胞の内部のマグネシウムイオン濃度は若年者と比較して低いことが知られている。また、げっ歯類のモデル動物を用いた研究によって、赤血球細胞の内部のマグネシウムイオン濃度は行動実験による認知機能の指標と高い正の相関を示すため、血球細胞の細胞内マグネシウムイオン濃度は認知症の早期発見のためのマーカー分子として有用であるという報告も近年なされており^[3]、マグネシウムイオンと老化は密接に関わっていることが予想される。

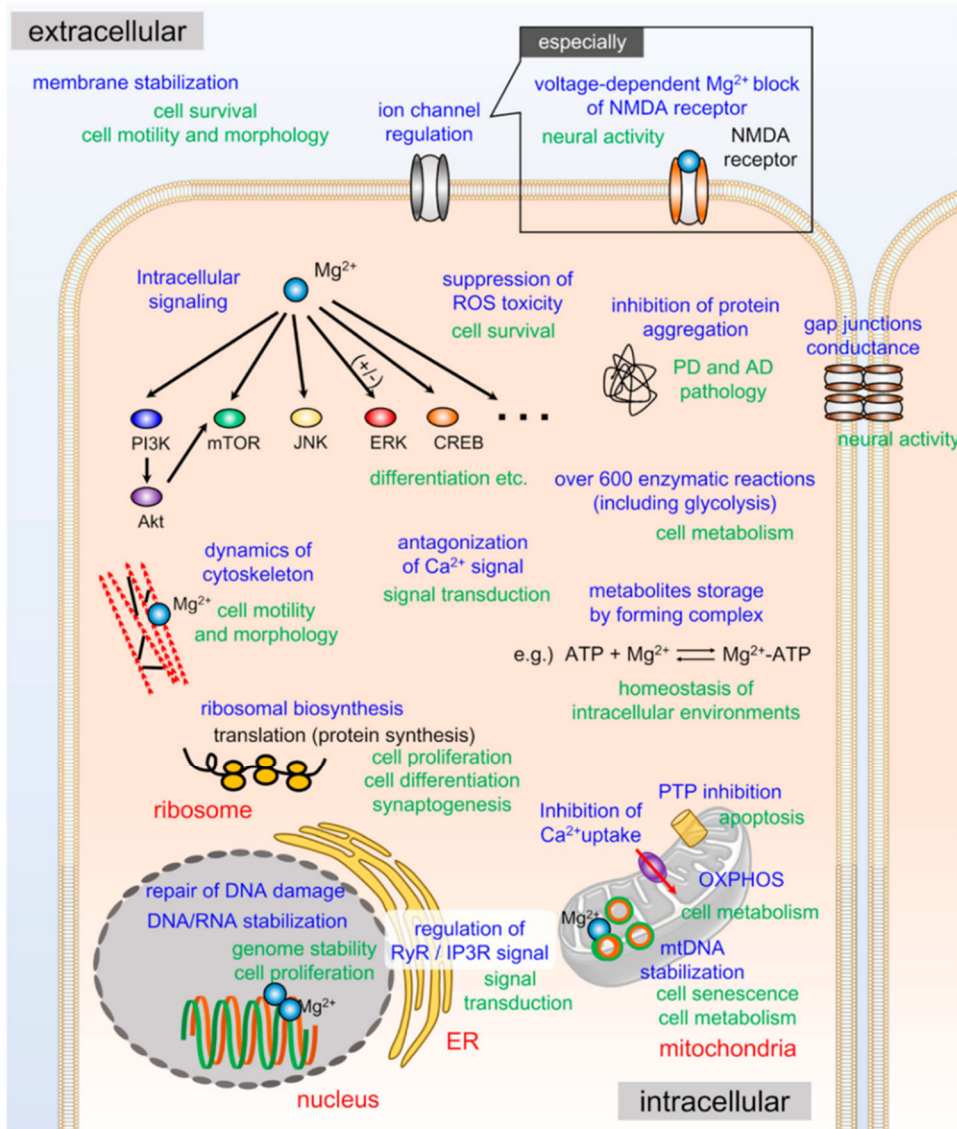


図 1 細胞内におけるマグネシウムイオンの多岐にわたる役割

〔細胞質〕リボソームによるタンパク質合成の制御、細胞骨格ダイナミクスの制御、細胞内シグナルの制御、代謝物の安定化、酵素反応の制御、活性酸素種による毒性抑制、タンパク質凝集の抑制、ギャップ結合の活性制御、〔核内〕DNA 損傷修復、DNA/RNA 安定化、〔ミトコンドリア〕カルシウムイオン恒常性の制御、アポトーシスシグナルの抑制、ミトコンドリアDNAの安定化、酸化リン酸化の制御、〔小胞体〕小胞体シグナル(RyRやIP3R)などの制御

マグネシウムイオンと同じ二価の陽イオンであるカルシウムイオンは、細胞内における主要なセカンドメッセンジャーとして知られており、多くの研究によって解析が進められてきた。一方でマグネシウムイオンは細胞内において重要な機能を担っていることが知られているにも関わらず、その濃度変化についてはほとんど調べられてこなかった。その原因と1つとして、一般に生きている細胞内におけるマグネシウムイオン濃度の変化を正確に測定する手法は限られていることが挙げられる^[4]。そこで我々は所属する研究グループで共同開発した細胞内マグネシウムイオンプローブと独自開発したイメージング画像の解析技術を用いた手法の確立を行ってきた^[5,6]。そして、新たに確立した細胞内マグネシウムイオンイメージング技術を用いて、細胞内マグネシウムイオン濃度の変動を測定し、その生理的な役割を明らかにしてきた^[5-7]。例えば、マグネシウムイオンは新規の細胞内シグナル伝達分子として機能し、細胞分化を誘導することを証明した^[5,8]。また、加齢にともなって発症率が大きく上昇するパーキンソン病において、細胞内マグネシウムイオンは細胞保護の役割を担っていることを蛍光イメージング法による解析で明らかにしてきた^[9,10]。

間葉系幹細胞

本研究で対象とする間葉系幹細胞は周囲の細胞の細胞老化の進行速度を遅らせる性質をもつ一方で、他の細胞種より早く細胞老化した状態に至る。そのため間葉系幹細胞は生物個体における老化速度を決定している可能性がある。また、間葉系幹細胞は様々な細胞種への分化能を有しており間葉系幹細胞を用いた細胞治療は注目を浴びている^[11]。細胞治療に用いるために十分な量の間葉系幹細胞を得るためには細胞を継続的に実験室環境で培養する必要がある。しかし、ヒトから採取した間葉系幹細胞を実験室環境で長期培養すると分裂能・分化能が失われる細胞老化が起こり、治療効果低下の原因となる^[11]。そのため、間葉系幹細胞の細胞老化の進行を制御することが可能となれば、間葉系幹細胞を用いた細胞医療の製薬・創薬プロセスの効率向上につながる。これらの事実より、間葉系幹細胞の細胞老化メカニズムの解明と細胞老化の進行遅延技術の構築は基礎研究にとどまらない意義がある。

1.2 本研究の目的

本研究では間葉系幹細胞の細胞老化モデルにおいて、我々が長年開発してきた細胞内マグネシウムイオンの可視化技術を用いた蛍光イメージング法によって、細胞老化の進行における細胞内マグネシウムイオン濃度変化のメカニズムとその役割を解明することを目的とする。また、細胞内マグネシウムイオン恒常性の制御を介して細胞老化レベルに影響を与えることができるかどうかを定量的に解析する。これによって細胞内マグネシウムイオン恒常性が細胞老化の進行を抑制・制御するための新規ターゲットであることを提案することを目指した。

2. 研究方法

2.1 ヒト間葉系幹細胞の入手・凍結融解

本研究では Lonza 社より購入したヒト間葉系幹細胞を対象として研究を行なった。まず、Lonza 社より入手したヒト間葉系幹細胞の凍結バイアルを 37°C のウォーターバスに約 90 秒間程度、浸すことによって融解し 10 mL の細胞培養液が入った 15 mL チューブへと凍結バイアルから細胞融解液をデカントによって移した。その後、500 g、3 分間、遠心した後、細胞ペレットを吸引しないように十分注意して、上清の凍結保存液を含んだ細胞培養液を吸引除去し、速やかに細胞培養液を添加した。その後、血球計算盤を用いて細胞数を数え、 1.375×10^4 cells/mL となるように希釈し、100 mm ディッシュに 10 mL 細胞懸濁液を添加することによって 2,500 cells/cm² の細胞密度で播種した。そして 37°C 5% CO₂ インキュベータ内にて静置し、2 日に 1 回の頻度で培養液交換を行ない、継続的に細胞培養を行なった。細胞の増殖度合い・形態変化を確認するために 1 日 1 回の頻度で位相差顕微鏡を用いて観察した。細胞密度が 70%コンフルエント以上に達したタイミングで、経代によって新たな 100 mm ディッシュに播種しなおすことによって継続的な拡大培養を行なった。経代に関しては、培養液を取り除いた後、二価の陽イオン(マグネシウムイオンとカルシウムイオン)を含まない PBS (phosphate buffer saline) で 2 回、洗浄作業を行なった後、TripLE Select を 2 mL を添加し 37°C 5% CO₂ インキュベータ内で 5-10 分程度、静置することによってディッシュから細胞を剥離した後、培養液を添加し、細胞剥離液を 15 mL チューブに細胞を回収した。その後、500 g で 5 分間、室温にて遠心し、15 mL チューブの底面に付着した細胞塊を剥がさないように

TripLE Selectを含んだ上清を除去, 新たな5.0 mLの培養液を添加し, 細胞懸濁液を得た。そして, 細胞数をカウントし, 目的の細胞密度になるように細胞懸濁液を希釈, 培養ディッシュへの播種を行なった。マグネシウムイオン濃度を調整した細胞培養液を用いた解析(図5)では, 60 mm ディッシュを用いて培養を行なった。

2.2 間葉系幹細胞に関する培養液の調整

本研究では DMEM(低グルコース)を基礎培地として10%ウシ血清(Fatal bovine serum: FBS)と抗生物質ペニシリン-ストレプトマイシン溶液(P+S 溶液)を添加したものをヒト間葉系幹細胞の培養液として用いた。またマグネシウムイオン濃度調整培養液に関しては表1の組成を基本組成としてMgSO₄(anhyd)の量を調整することによって, マグネシウムイオン濃度が0.16 mM, 0.80 mM, 4.00 mMのDMEM培地を作成し, 基礎培地とした。

2.3 細胞数のカウントと増殖曲線の算出

経代作業において取得した5 mL細胞懸濁液から10 μLを, あらかじめ10 μLトリパンブルーを入れたエッペンチューブに移し, ピペッティングによって混合し, 血球計算盤を用いてセルカウントを行なった。そして得られた細胞数を元に, それぞれの世代における集団分裂回数(population doubling level: PDL)を算出し, 得られたPDLを培養日数に対してプロットすることによって増殖曲線(growth curve)を描いた。ここで, 集団分裂回数は次の式によって算出した。

$$PDL(k+1) = PDL(k) + \log_2[N_{\text{collect}}(k+1)/N_{\text{plate}}(k)]$$

ここで, kは継代回数, PDL(k)はk回目の経代時における集団分裂回数, N_{collect}(k)はk回目の経代時において回収した細胞の数, N_{plate}(k)はk回目の経代時において播種した細胞の数をそれぞれ表す。入手した凍結バイアル内の細胞を融解・播種したときの継代回数kは0, PDL(0)は0とした。そして上記の漸化式を用いて, 再帰的にそれぞれの経代タイミングkでの集団分裂回数PDL(k)を算出した。この値は細胞集団中の個々の細胞が平均して何回分裂したかを示す指標として用いられる値である。そして横軸を培養日数, 縦軸をその培養日数におけるPDLとしてプロットを行ない増殖曲線を描いた(図2a, 図5)。

表1 基礎培地 DMEM の成分組成

本研究で用いた基礎培地の組成

Inorganic salts	mg/L	Amino Acids	mg/L	Amino Acids	mg/L
CaCl ₂ (anhyd)	200	L-Arginine HCl	84	L-Tryptophan	16
Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	0.1	L-Cystine · 2HCl	63	L-Tyrosine · 2Na · 2H ₂ O	104
KCl	400	L-Glutamine	584	L-Valine	94
MgSO ₄ (anhyd)	97.67	Glycine	30	Vitamins	mg/L
NaCl	6400	L-Histidine HCl H ₂ O	42	D-Ca pantothenate	4
NaHCO ₃	3700	L-Isoleucine	105	Choline Chloride	4
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	125	L-Leucine	105	Folic Acid	4
Other Components	mg/L	L-Lysine HCl	146	i-Inositol	7.2
D-Glucose	4500	L-Methionine	30	Niacinamide	4
Phenol Red	15	L-Phenylalanine	66	Riboflavin	0.4
HEPES	9534.4	L-Serine	42	Thiamine HCl	4
Sodium Pyruvate	110	L-Threonine	95	Pyridoxine HCl	4

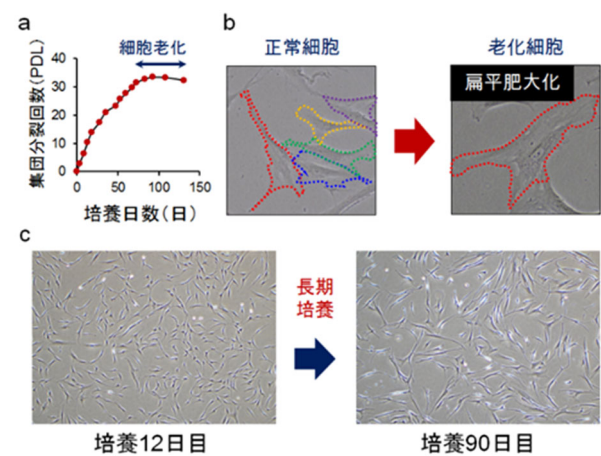


図2 ヒト骨髄から採取した間葉系幹細胞の細胞老化 (a) 集団倍加回数 (PDL: population doubling levels) 積算値の増加, (b) 正常細胞と老化細胞の形態比較; 破線は個々の細胞の輪郭を示した; 画像は20倍レンズを設置した位相差顕微鏡によって取得した (c) 長期の継続培養による細胞形態の変化. 画像は4倍レンズを設置した位相差顕微鏡によって取得した (左図: 培養開始12日目; 右図: 培養開始90日目).

3. 研究結果と考察

3.1 ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞を用いた細胞老化モデルの構築

ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞を10%ウシ血清添加DMEM(低グルコース含有)培地にて継続的に培養を行なった。位相差顕微鏡を用いて細胞形態や細胞数を毎日確認し, 細胞密度が70%コンフルエントに達したタイミングで経代を行なった。経代時に細胞数をカウントすることによって細胞の増殖率を算出し, 前回の経代時からどの程度, 細胞数が増加しているかを経時的に算出し, 得られた数値を元に増殖曲線を描いた(図2a)。この結果より, 本

研究で用いた間葉系幹細胞の細胞老化モデルは培養初期(培養日数 20 日目程度まで)では急激な増殖を示すが、徐々に増殖速度が低下し、約 90 日程度の継続培養で細胞増殖を停止することがわかった。また、培養初期(培養 12 日目)と長期培養後(培養 90 日目)の間葉系幹細胞の細胞形態を比較すると、長期培養後の細胞は扁平化かつ巨大化していることがわかった(図 2b と図 2c)。これによって我々の細胞老化モデルは実験室環境で約 90 日間の培養を行なうと細胞老化の状態に至ることがわかった。

3. 2 細胞老化レベルを定量的に評価する画像解析系の構築

一般に、細胞老化レベルを定量的に評価するためには、p21 や SA- β ガラクトシダーゼといった細胞老化のマーカー分子を免疫蛍光染色や遺伝子解析によって検出する。しかし、これらの方法では細胞を固定液で処理したり、すり潰したりする必要があるため、生きた状態で細胞老化レベルを評価することは困難である。しかし、前述のように細胞老化の進行にともなって細胞の形態は変化する(図 2b)。このように非染色の細胞画像をもとに、熟練した研究者の目視によって細胞老化を定性的に評価することは可能であったが、それらを客観的・定量的に評価する手法はなかった。そこで我々は非染色の細胞観察手法の 1 つである位相差顕微鏡によって取得した細胞形態の画像をもとに細胞老化レベルを定量的かつ客観的に評価する手法の構築を行なった。具体的には、人工知能(AI: Artificial Intelligence)技術の 1 種であるディープラーニング法によって、位相差顕微鏡で取得した細胞画像と培養日数の対応関係を学習モデルに機械学習させた。これにより位相差顕微鏡で取得した細胞画像を入力すると培養日数を出力する画像解析モデルの作成を行なった。具体的には、間葉系幹細胞を実験室環境で継続的に拡大培養し、細胞老化の状態に至るまでの細胞画像データを位相差顕微鏡によって毎日、取得した(約 100 日間:30,000 枚以上)。取得した約 30,000 枚の細胞画像のうち 7 割の約 21,000 枚の画像を学習用データ、残りの約 9,000 枚の画像を検証用データとした。そして、位相差顕微鏡画像を培養日数に変換する Convolutional Neural Network(CNN)モデルを作成し、位相差顕微鏡による細胞画像データを入力、培養日数が出力となるように、ディープラーニングを用いてモデルのパラメータの最適化(学習)を行なった。そして

パラメータの最適化を行なった学習済みモデルに対して検証用データセットを入力することによって得られた培養日数の予測値が実際の培養日数と、どの程度一致しているかを比較することによって作成した予測モデルの検証を行なった(図 3a)。本研究では、細胞画像をもとに培養日数を 1 日~100 日の選択肢の中から最も可能性の高い培養日数を選び出す“分類モデル”と小数点を含めた実数値として予測値を算出する“回帰モデル”の 2 種類の学習モデルの作成を行なった。その結果、実際の培養日数と予測した培養日数の相関係数は、分類モデルでは 0.95、回帰モデルでは 0.98 という値を示し、いずれも高い正確度(accuracy)で、細胞の位相差顕微鏡画像から培養日数を予測することに成功した。分類モデルでの予測結果では、実際の培養日数と予測値が完全に一致するケースが多い一方で、真の値と予測値が大きく外れるケースも多かった(図 3b)。回帰モデルでは培養日数を小数値を含む実数値で予測するため、分類モデルの予測結果と比較して、実際の培養日数と予測した培養日数が完全に一致するケースは少なかったが、大きく外れることも少なかった(図 3b と 3c)。したがって、以下の研究では回帰モデルを採用した。

3. 3 細胞環境が細胞老化の進行速度に与える影響の評価系構築

これまでの研究で構築した細胞老化の評価系(回帰モデル)によって、薬物による細胞老化の進行への影響を検出することができるかどうかの検証を行なった。老化誘導剤であるドキシソルビシンを最終濃度 25 nM となるように細胞培養液に添加し、培養を行なった細胞集団と通常培養液で培養を行なった細胞集団の比較解析を行なった。ここでは、それぞれの細胞集団の細胞画像を毎日経時的に取得し、取得した細胞画像をディープラーニングによって作成した細胞老化の評価モデルに入力した。そして、個々の画像に関して予測された細胞老化レベルの時間変化について、ドキシソルビシン添加条件の細胞集団と通常培養の細胞集団について比較解析を行なった(図 4)。その結果、ドキシソルビシン 25 nM 添加条件の細胞集団では、ドキシソルビシン添加後 5 日間以内に約 20 日程度の細胞老化レベルの進行が観察された(図 4a)。つまり 25 nM ドキシソルビシンの添加によって間葉系幹細胞における細胞老化の進行速度が約 4 倍に加速されることがわかった。

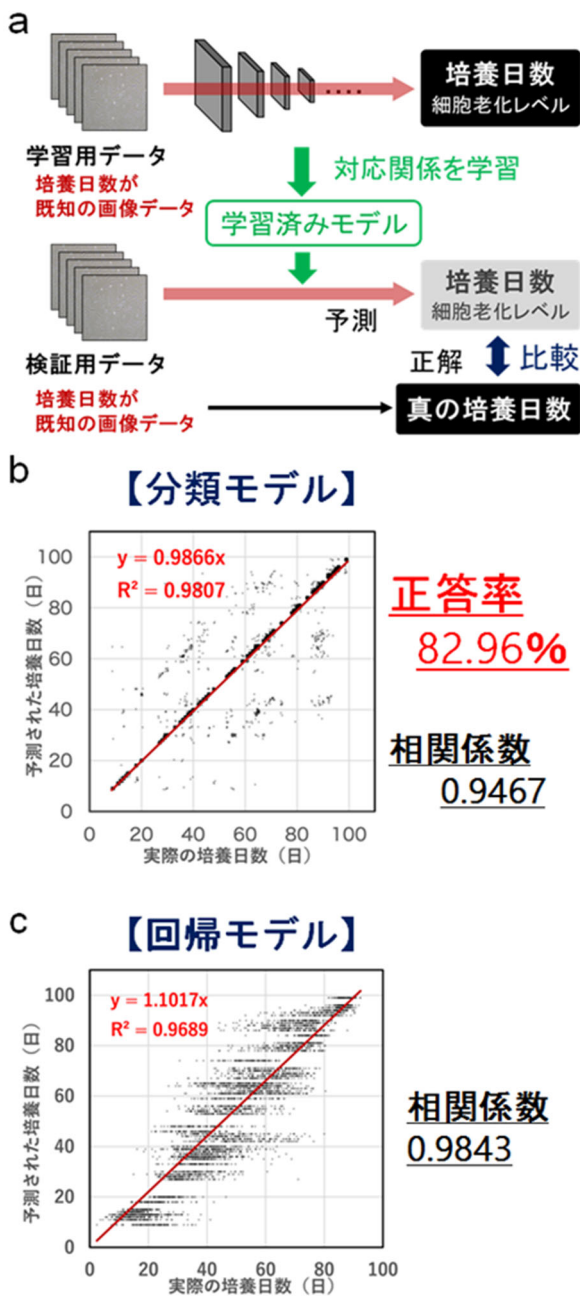


図 3 ディープラーニングによって作成した機械学習モデルの精度検証 (a) 学習用データセットを用いた学習済みモデルの作成と検証用データセットを用いた学習済みモデルの検証, (b) 分類モデルの検証結果, (c) 回帰モデルの検証結果 (b)と(c)の散布図において, 実際の培養日数(X)と予測された培養日数(Y)が完全に一致していれば, $Y=X$ (傾き1, 切片0の一次関数)の直線(赤色で示した直線)上にプロットされるはずである。

実際に, 学習モデルに入力した位相差顕微鏡による細胞画像を比較すると, ドキソルビシンを添加して培養した細

胞では扁平化・肥大化といった老化細胞様の表現型の変化が確認された(図 4b)。これらの結果より, 今回, 我々が構築した非染色の画像データにもとづいた細胞老化レベルの評価系は, 細胞環境の人為的制御によって引き起こされた細胞老化の進行速度の変化を定量的に捉えることができることが示された。

3.4 マグネシウムイオンが細胞老化の進行に与える影響解析

次にマグネシウムイオンが間葉系幹細胞における細胞老化の進行に与える影響を定量的に解析することを目的として, いくつかのマグネシウムイオン濃度の培養液を調整し, それらの培養液中で培養した細胞の細胞老化の進行に関して比較解析を行なった。通常条件における間葉系幹細胞の培養液には 0.80 mM のマグネシウムイオンが含まれているため, 培養日数 9 日目のタイミングでマグネシウムイオンの含有濃度が 0.16 mM, 0.80 mM, 4.00 mM の培養液に交換し, それぞれのマグネシウムイオン濃度条件で培養を行なった。その結果, 高マグネシウムイオン濃度条件(4.00 mM)では通常条件(0.80 mM)や低マグネシウムイオン濃度条件(0.16 mM)で培養した細胞と比較してより多くの回数の細胞分裂を経た後, 細胞老化の状態に至ることがわかった(図 5a)。この結果より, 高濃度のマグネシウムイオンは細胞老化の進行を抑制する一方で, 通常条件の 4 分の 1 程度の低マグネシウムイオン濃度条件(0.16 mM)では細胞老化を促進するわけではないことがわかった。マグネシウムイオンの抗老化作用をさらに詳細に解析することを目的として, 細胞老化誘導剤であるドキソルビシン 25 nM 添加条件で培養している間葉系幹細胞における細胞老化促進効果に対してマグネシウムイオンが及ぼす影響を調べた。その結果, 高マグネシウムイオン濃度条件ではドキソルビシンによる細胞老化の進行加速を抑制することはできなかった一方で, 低マグネシウムイオン濃度条件ではドキソルビシンの細胞老化の促進効果が増強された(図 5b)。したがって, マグネシウムイオンが欠乏すると環境要因による細胞老化の進行が加速されることがわかった。これらの結果を合わせると, 過剰なマグネシウムイオンは細胞老化の進行を抑制し, マグネシウムイオンの欠乏は環境要因による老化進行を早める効果があることがわかった。

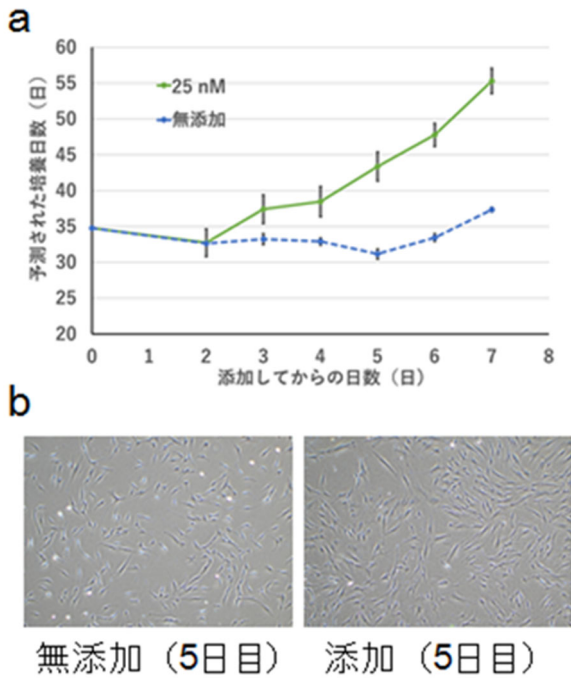


図 4 細胞老化の進行速度の変化を検出できるかどうかの検証 (a) 老化誘導剤ドキソルビシン存在条件(緑線)と通常条件(青線)で培養した間葉系幹細胞の細胞老化レベルの経時変化の比較, (b)ドキソルビシン添加後5日目の細胞形態(左)と通常培養条件下での細胞形態(右). エラーバーは平均の標準誤差(Standard Error of Mean: SEM)を示している。

4. 今後の展望

本研究では、人工知能技術であるディープラーニングを用いて学習モデルを作成することによって非染色の位相差顕微鏡イメージングによって取得した細胞画像をもとに、ヒト間葉系幹細胞の細胞老化レベルを定量的に評価する手法の構築を行なった。加えて、マグネシウムイオンが細胞老化の進行を抑えることを証明することにも成功した。今後は、構築した細胞老化の評価系を用いて、マグネシウムイオンの抗老化作用の評価を行なう予定である。また、我々の構築してきた細胞内マグネシウムイオンの測定系と細胞老化レベルの評価系と遺伝子・タンパク質解析を組み合わせることによって細胞老化の進行に影響を与える細胞内マグネシウム調節の分子機構に関する解析を進めていく予定である。最後に今回、本研究に助成いただきました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に御礼申し上げます。

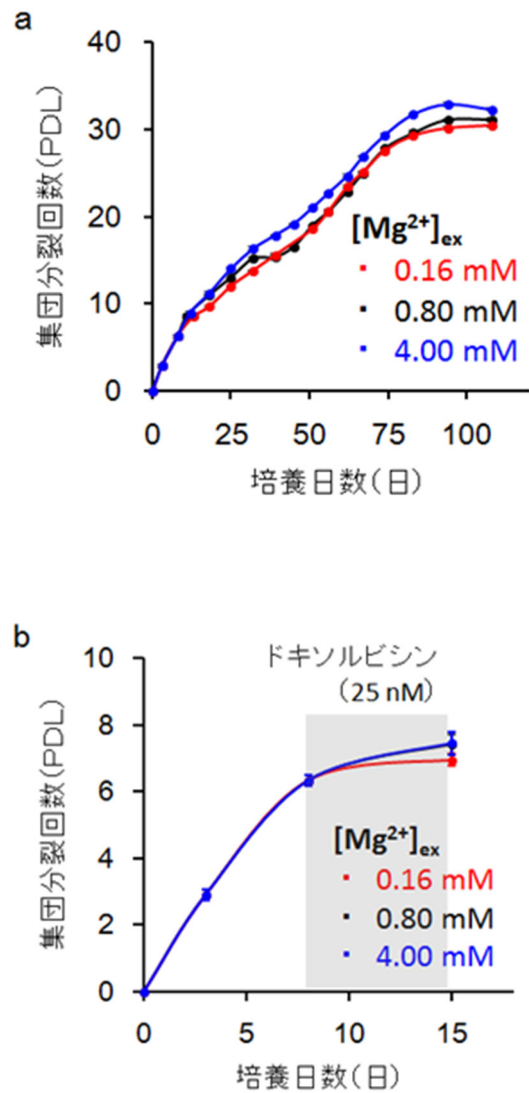


図 5 マグネシウムイオンが細胞老化の進行に与える影響解析 (a) 低マグネシウムイオン濃度条件(0.16 mM: 赤線), 通常条件(0.80 mM: 黒線), 高マグネシウムイオン濃度条件(4.00 mM: 青線)で培養した間葉系幹細胞の集団分裂回数(PDL)の経時変化, 培養日数 9 日目のタイミングで通常培養条件(Mg イオン濃度: 0.80 mM)からそれぞれのマグネシウムイオン濃度条件に変更した。(b) 低マグネシウムイオン濃度条件(0.16 mM: 赤線), 通常条件(0.80 mM: 黒線), 高マグネシウムイオン濃度条件(4.00 mM: 青線)で培養している間葉系幹細胞に対する老化誘導剤ドキソルビシン(25 nM)の影響比較。

6. 文献

- [1] R. M. Naylor, D. J. Baker, and J. M. van Deursen, *Clin. Pharmacol. Ther.* 93, 105 (2013).
- [2] R. Yamanaka, Y. Shindo, and K. Oka, (2019).
- [3] W. Xiong, Y. Liang, X. Li, G. Liu, and Z. Wang, *Biol. Pharm. Bull.* 42, 357 (2019).
- [4] V. Trapani, G. Farruggia, C. Marraccini, S. Iotti, A. Cittadini, and F. I. Wolf, *Analyst* 135, 1855 (2010).
- [5] R. Yamanaka, Y. Shindo, K. Hotta, K. Suzuki, and K. Oka, *Curr. Biol.* 28, 3984 (2018).
- [6] R. Yamanaka, Y. Shindo, T. Karube, K. Hotta, K. Suzuki, and K. Oka, *Neuroscience* 310, 731 (2015).
- [7] R. Yamanaka, S. Tabata, Y. Shindo, K. Hotta, K. Suzuki, T. Soga, and K. Oka, *Sci. Rep.* 6, 30027 (2016).
- [8] A. Stangherlin and J. S. O'Neill, *Curr. Biol.* 28, R1403 (2018).
- [9] Y. Shindo, R. Yamanaka, K. Suzuki, K. Hotta, and K. Oka, *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 3182 (2015).
- [10] Y. Shindo, R. Yamanaka, K. Suzuki, K. Hotta, and K. Oka, *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 1979 (2016).
- [11] C. A. Herberts, M. S. G. Kwa, and H. P. H. Hermsen, *J. Transl. Med.* 9, 29 (2011).

Relationship between Homeostasis of Intracellular Magnesium Ion and Cell Senescence

Ryu Yamanaka

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sanyo-Onoda City University

Summary

Magnesium ion (Mg^{2+}) plays broad range of roles in human body, and the disruption of regulatory systems for Mg^{2+} homeostasis is observed in various age-related diseases such as cancer, diabetes, nervous diseases etc. The tight link between Mg^{2+} homeostasis and age-related diseases is caused by the multiple roles of intracellular Mg^{2+} such as DNA/RNA stability, metabolic regulation, signal transduction etc. Previously, using fluorescence probes for intracellular Mg^{2+} imaging methods developed by our group, we revealed that physiological stimuli and biological contexts induce the changes in intracellular $[Mg^{2+}]$, and they regulate intracellular metabolism and signal transduction, and consequently impact cellular fates and phenotypes. In present study, mesenchymal stem cells derived from human bone marrow were cultured *in vitro* for about 100 days. Cells continuously cultured for more than about 90 days halted their proliferation and exhibited the morphological changes which is characteristic of senescent cells. Next, the convolutional neural network (CNN) model that predict culture day of human mesenchymal stem cells (hMSCs) *in vitro* based on the phase-contrast imaging was constructed for quantitatively estimating the degree of cellular senescence non-invasively. The learned CNN model accurately quantified the degree of cellular senescence, and it also can detect the chemically-induced cellular senescence. Next, the progression of cellular senescence in hMSCs at several concentrations of extracellular Mg^{2+} were observed for the investigation of Mg^{2+} effects on the progression of cellular senescence. The high concentration of extracellular Mg^{2+} suppressed the progression of naturally-occurring cellular senescence, and Mg^{2+} deficiency promoted the chemically-induced cellular senescence. Taken together, Mg^{2+} exhibits the anti-cellular senescence effects.