

細胞内マグネシウムイオン恒常性に着目した細胞老化の制御 (画像解析による細胞評価への応用)

山中 龍, 嶋本 顕, 告 恭史郎

山陽小野田市立山口東京理科大学薬学部薬学科

概要 ヒト間葉系幹細胞は骨髄や脂肪組織に存在し, *in vitro* では神経や筋肉, 脂肪, 骨などに分化する多分化能を有する幹細胞である。iPS 細胞や ES 細胞と比較してがん化などの安全上のリスクや倫理的問題が小さいため再生医療における応用が注目されている。医療用として十分な量のヒト間葉系幹細胞を確保するためには, 組織より採取した僅かなヒト間葉系幹細胞を長期に渡って拡大培養する必要がある。しかし, 長期の拡大培養はヒト間葉系幹細胞に細胞老化を引き起こし, その治療効果に影響を及ぼす可能性がある。まず本研究で示したように, 拡大培養過程において PDL (集団分裂回数) の上昇にともなって, ヒト間葉系幹細胞では老化関連遺伝子 CDK インヒビターである p21 タンパク質レベルの上昇, そして炎症性サイトカイン遺伝子である *IL-6*, *CCL2* の発現が上昇する。これはヒト間葉系幹細胞の分化能の低下や品質の劣化を示しており, 細胞老化を抑制したヒト間葉系幹細胞の培養方法 (培地や培養基質など) の開発は, ヒト間葉系幹細胞の医療への応用において重要である。

Mg イオンは生体機能に必須な因子ではあることは古くから知られており, Mg 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。細胞内において Mg イオンは DNA やタンパク質, 骨格分子などの生体高分子と結合し, その安定化に寄与している。本研究では, Mg イオン濃度がヒト間葉系幹細胞の分裂寿命に及ぼす影響について検討した。その結果, マグネシウムイオンを高濃度 (4.00 mM) に含む培地で継代培養されたヒト間葉系幹細胞では分裂寿命の延長が認められたことから, マグネシウムイオンは細胞老化を抑制する働きがあることが示唆された。

また本研究では, ヒト間葉系幹細胞の非侵襲的な細胞老化判定手法についても検討した。機械学習の一種であるディープラーニングを用いた画像データによるヒト間葉系幹細胞の評価系を作成し, この評価系の分類モデルと回帰モデルの双方において, ヒト間葉系幹細胞の細胞画像から非常に正確に培養日数を予測できることを明らかにした。また, Doxorubicin 処理によって老化を誘導したヒト間葉系幹細胞に対して, 継代老化に相当する培養日数を予測できることを示した。

1. 研究目的

1.1 はじめに

超高齢化社会を迎えた我が国にとって, 国民の健康管理・健康増進は社会保障, 並びに医療経済学的な観点から, そして健康で尊厳のある生活を送るという観点から, 非常に重要な国家レベルの施策である。一方, 我が国の疾病構造は寿命の延長にともなう生活習慣病やフレイル

などの, これまでの医療では対応が難しい疾患へと変化し, これまでの低分子化合物を中心とした阻害する医薬に代わる新しい治療法の開発が必要である。

近年, 身体 (個体) のレベルの老化現象は細胞レベルで理解されるようになってきている。細胞レベルでの基礎プロセスとして「細胞老化」と呼ばれる現象が知られている。細胞老化はそれまでに経験した分裂の回数が一定値に達

する(分裂寿命)と不可逆的に分裂を停止する現象であり、細胞の種類に特異的な分裂寿命があると考えられている。そして分裂寿命の限界による細胞老化は健全な細胞にとっては避けられない現象であり、その結果として永久的に分裂を停止した老化細胞が生じることとなる。この細胞老化の現象はヒト正常二倍体線維芽細胞を *in vitro* で培養することによって、Hayflick によって 1961 年に見いだされた現象であるが¹⁾、生体においては加齢にともなって老化細胞が蓄積し、免疫不全や運動機能の低下が生じ、疾患のリスクの増大や QOL 低下の原因となっている。そのため、細胞老化が起こるメカニズムの解明と細胞老化を遅延させる手法の確立には大きな社会的意義がある。

一方、生活習慣病の延長線上にある心臓血管疾患、脳神経疾患、腎疾患、肝疾患等においてその原因となる局所的、全身性炎症を抑え、必要な機能を補充することが可能な間葉系幹細胞を用いた細胞治療が期待を込めて注目されており、これまでに承認されている造血幹細胞移植後の急性移植片対宿主病に対するヒト(他家)骨髄由来間葉系幹細胞を主成分とする再生医療等製品「テムセル HS 注」、及び脊髄損傷に伴う神経症候及び機能障害に対する(自己)骨髄由来再生医療等製品「ステミラック注」を始め、海外でも米国や韓国で複数の再生医療等製品が上市されている²⁾。加えて、国内大学病院等医療機関においてこれまでに累計 100 件以上の間葉系幹細胞を用いた臨床試験が行われている³⁾。このように間葉系幹細胞を用いた細胞治療は国内外において高い関心を集めているが、その調製方法に関連する細胞の品質管理には大きな課題が存在する。

ヒト間葉系幹細胞は骨髄をはじめ、脂肪、歯髄、臍帯血などから分離・培養することができ、自己或いは他家のどの組織を用いるかは疾患の治療目的による。組織から分離することができる間葉系幹細胞の数には限界があり、骨髄 1 mL 中に含まれる有核細胞のうち間葉系幹細胞は骨髄単核細胞 10,000 個に 1 個程度(0.01%)と非常に少なく、治療に用いるためには生体内から分離した後に *in vitro* で拡大培養する必要がある。間葉系幹細胞は活発に増殖する自己複製能と多分化能を有する組織幹細胞の一種であるが、寿命をカウントする染色体末端のテロメア構造の長さを維持するテロメア延長酵素(テロメラーゼ)をほとんど発現しておらず、拡大培養にともない徐々に分

裂能が低下し最終的には細胞老化に陥ることが知られている。間葉系幹細胞が細胞老化に陥ると、がん抑制遺伝子 p53 の活性化にともなう CDK インヒビター p21 の発現上昇によって分裂が停止するだけでなく、その後の CDK インヒビター p16 発現誘導によるがん抑制遺伝子 Rb の活性化と細胞老化関連ヘテロクロマチン(SAHF)の形成、及び全染色体レベルの遺伝子発現変化と細胞老化関連炎症性サイトカインの誘導(SASP)の誘導が引き起こされることが知られている。SASP は生体内で慢性炎症の原因と考えられていることから、間葉系幹細胞の拡大培養による細胞老化は品質の劣化を招き、間葉系幹細胞の拡大培養とその品質はトレードオフの関係にあり、再生医療・細胞治療の分野では大きな課題となっている。

1.2 研究の背景と目的

我々はこれまでの研究において、マグネシウム(Mg)の動態と役割に着目し研究を進めてきた。Mg イオンは生体機能に必須な因子ではあることは古くから知られており、Mg 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。細胞内において Mg イオンは DNA やタンパク質、骨格分子などの生体高分子と結合し、その安定化に寄与している。しかし長い間、細胞内部の Mg イオン濃度はほとんど変化せず一定に保たれており、細胞の動的機能における役割はなく、「無いと困るが在れば良い」分子であると考えられてきた。そのため、生きている細胞内部における Mg イオンの濃度変化を検出する技術の開発や細胞内 Mg イオン動態に関する研究は行われてこなかった。一方、我々は世界に先駆けて「細胞内 Mg イオン濃度はダイナミックに変化し、細胞機能において重要な役割を果たしている」との仮説を立て研究を進めてきた。具体的には、新規に開発した細胞内 Mg イオンプローブを用いて生きている細胞内部の Mg イオン濃度計測を行ない、細胞外の環境や刺激に応じて細胞内 Mg イオン濃度はダイナミックに変化することを発見した^{3,4)}。さらに代謝物を網羅的に測定するメタボロミクス解析を行ない、細胞内 Mg イオン濃度変動は細胞内エネルギー生産に関わる代謝パスウェイの反応速度を制御していること⁵⁾、代謝レベルやタンパク質生成を活性化するシグナル分子として機能し、神経ネットワークの形成・維持を促進するこ

とを解明した⁶⁾。これらの研究を通して、Mg イオンは細胞外環境や刺激に応じて代謝速度や遺伝子発現を制御している重要なシグナル分子であることを証明してきた。

我々は前述のような正常な機能における細胞内 Mg イオンの役割だけではなく、細胞内 Mg イオン恒常性破綻と神経変性疾患、特にパーキンソン病との関係についての研究を行ってきた。具体的には、パーキンソン病モデルにおいて、Mg イオン輸送タンパク質の発現量は大きく変化していること⁷⁾、細胞内 Mg イオンは神経保護効果をもっていることを示した⁸⁾。これらの研究を通して、細胞内 Mg イオン恒常性は神経変性疾患の予防や治療、進行の抑制を実現する新たな創薬ターゲットであることを示すことに成功した。さらに、筆者は細胞内 Mg イオン恒常性をターゲットとした疾患の予防・治療・進行の遅延の可能性を探ることを目的として包括的な文献調査を行なった結果、細胞老化によって起こる現象は Mg イオン恒常性破綻によって起こる現象と類似していること、加齢にともなって細胞内 Mg 濃度は減少する傾向にあることなど、細胞老化と細胞内 Mg イオンの関係を示唆する報告が多数あることがわかった。そこで、本研究では「細胞老化において細胞内 Mg イオン恒常性は重要な役割を担っているのではないか」と仮説を立て、その検証を行なった。また詳細に「細胞老化と細胞内 Mg イオン恒常性の関係を解明」し、「抗老化手法を確立するための新規ターゲットとしての Mg イオン恒常性の可能性を示す」ことを目的として、細胞外 Mg イオン濃度の違いによる間葉系幹細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、さらに画像解析技術を用いた細胞老化判定手法について検討した。

2. 研究方法

2.1 骨髄由来ヒト間葉系幹細胞の培養

本研究ではヒト骨髄より分離した間葉系幹細胞を用いた。骨髄細胞中に存在する間葉系幹細胞は単核細胞の10,000個に1個程度(0.01%)である。したがって骨髄単核細胞から間葉系幹細胞を効率的に回収するために、間葉系幹細胞の培養基質への接着能を利用してプラスチック製の組織培養用フラスコ、或いはディッシュを用いて培養するのが一般的である。本研究で使用した間葉系幹細胞は、浮遊した大量の血球系単核細胞を培養上清から除去しながら、僅かに含まれる間葉系幹細胞を実験に利用可能な基準に純化したものであり、初代培養中にある程

度の分裂回数が進んだ間葉系幹細胞である。また、本研究で使用した間葉系幹細胞は、ドナーの骨髄を上述のような操作を経て Lonza 社にて製品化されたものであり、したがって、ヒト検体の取り扱いに関連するガイドラインおよび倫理規定等に該当しない。

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て融解し、速やかに新しい培地と混合した。その後、500 g、3 分間の遠心の後、凍結保存液を含んだ培地を吸引除去し、得られた細胞ペレットに新しい培地を添加して細胞懸濁液を調整した。血球計算盤を用いて細胞数を数え、2,500 cells/cm² の細胞密度で播種した後、37°C 5% CO₂ インキュベータ内にて静置した。2 日に 1 回の頻度で培養液交換を行ない、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 80%コンフルエント程度に達したタイミングで、継代によって新たな 100 mm ディッシュに播種して継続的な拡大培養を行なった。

継代に関しては、培養液を取り除いて二価の陽イオン(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 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、培養液を添加して細胞剥離液を 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、TripLE Select を含んだ上清を除去した後、新しい培地を添加して細胞懸濁液を調製した。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して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では、60 mm ディッシュを用いて培養を行なった。

2.2 培地の調製

本研究ではヒト間葉系幹細胞の培養液として、基礎培地 DMEM(低グルコース)に 10%ウシ血清と抗生物質ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を添加したものをを用いた。またマグネシウムイオン濃度調整培地については、DMEM 培地を基本組成として 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 となるよう調製した。

2.3 細胞数のカウントと増殖曲線の算出

継代において取得した細胞懸濁液から 10 μ L を分取し、エッペンチューブ中で 10 μ L トリパンプルーと混合し、血球計算盤を用いてセルカウントを行なった。得られた細胞数を基に、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 回目の継代時における集団分裂回数、 $N_{\text{collect}}(k)$ は k 回目の継代時において回収した細胞の数、 $N_{\text{plate}}(k)$ は k 回目の継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継代タイミング 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 としてプロットし増殖曲線を描いた。

3. 研究結果

3.1 骨髄由来ヒト間葉系幹細胞の細胞老化

Fig. 1 が示すように PDL が小さい継代初期にはヒト間葉系幹細胞は活発な増殖能を示し、大きな倍加速度 (PDL が上昇する傾き) を示した (**Fig. 1**)。一方、培養日数とともに継代が進むと倍加速度が緩やかとなり、したがって徐々にヒト間葉系幹細胞集団の増殖能が低下し、最終的には 10 PDL で分裂を停止して細胞老化に陥った。**Fig. 2** は 7 PDL (培養 24-29 日) の比較的若いヒト間葉系幹細胞、及び細胞老化した 10 PDL (培養 70-78 日) のヒト間葉系幹細胞における老化関連遺伝子 *IL6*, *CCL2* の qRT-PCR (**Fig. 2A**)、及び老化マーカー p21 の免疫染色 (**Fig. 2B**) の結果である。細胞老化に陥った 10 PDL のヒト間葉系幹細胞の方が若いヒト間葉系幹細胞と比較して老化関連遺伝子 *IL6*, *CCL2*, 及び老化マーカー p21 がともに高発現していることが明らかとなった。

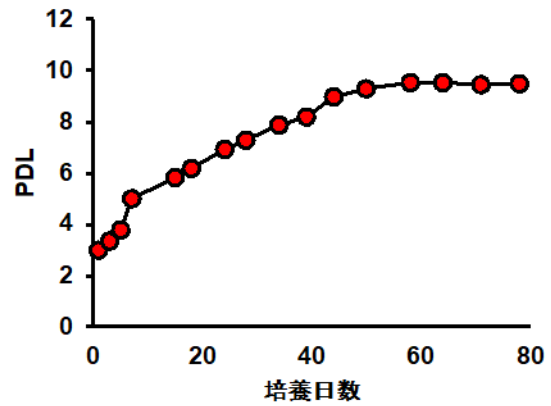


Figure 1. Growth curve of human mesenchymal stem cells. human mesenchymal stem cells (3 PDL) were cultured in DMEM with 10% FBS and cell counts were measured by CCK-8 assay over time. At each point, the number of culture days and the calculated PDL were plotted.

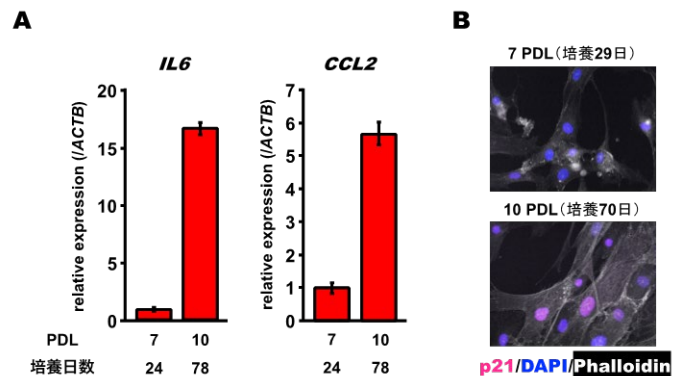


Figure 2. Comparison of senescence-related genes and senescence marker expression in young and aged human mesenchymal stem cells

A. RNA was extracted from human mesenchymal stem cells at 7 PDL (24 days in culture) and 10 PDL (78 days in culture), reverse transcribed, and the expression of aging-related genes *IL6* and *CCL2* was detected by quantitative PCR. Values are expressed as mean \pm SEM (n = 3).

B. 7 PDL (29 days in culture) and 10 PDL (70 days in culture) human mesenchymal stem cells were fixed with 4% PFA and immunostained with anti-human p21 monoclonal antibody (magenta). The nuclei were then stained with DAPI (blue) and the cytoskeleton with Phalloidin (white).

3. 2 マグネシウムイオンが分裂寿命に及ぼす影響

0.16 mM, 0.80 mM, 及び 4.00 mM の異なるマグネシウムイオン濃度の培地を用いて、増殖曲線を描いたところ、通常のマグネシウムイオン濃度 0.80 mM と比較して 4.00 mM の方が、10 PDL から 20 PDL にかけてヒト間葉系幹細胞の倍加速度が高く維持されていることが明らかとなった (Fig. 3)。そしてこれら 3 種類のマグネシウムイオン濃度の培地それぞれにおけるヒト間葉系幹細胞の倍加速度は、20 PDL 以降細胞老化に至るまで同様に低下し、大きな違いは認められなかった (Fig. 3)。最終的に細胞老化に陥った時点での PDL は、4.00 mM のマグネシウムイオン濃度の培地で培養・継代を進めたヒト間葉系幹細胞が 32 PDL と最も大きく、通常の 0.80 mM では 30 PDL, そして 0.16 mM では 29 PDL であった (Fig. 3)。以上の結果から、検討したマグネシウムイオン濃度範囲においては、高濃度のマグネシウムイオン濃度はヒト間葉系幹細胞の分裂寿命を延長する効果があることが明らかとなった。

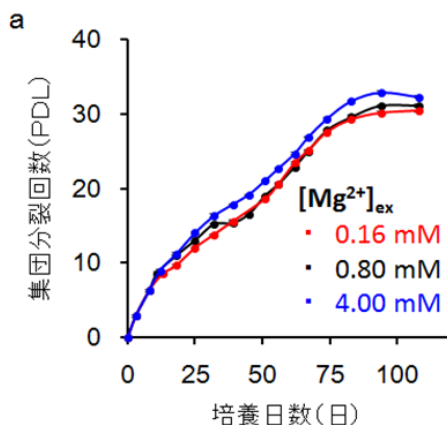


Figure 3. The effect of magnesium ions on the progression of cellular senescence

Changes over time in the number of PDLs of mesenchymal stem cells cultured under low magnesium ion concentration conditions (0.16 mM: red line), normal conditions (0.80 mM: black line), and high magnesium ion concentration conditions (4.00 mM: blue line). (The normal culture condition (Mg ion concentration: 0.80 mM) was changed to each magnesium ion concentration condition at the timing of the 9th day of culture.)

3. 3 ヒト間葉系幹細胞の継代画像を用いた細胞老化

判定手法の開発

ヒト間葉系幹細胞は PDL の上昇にともなう形態変化を引き起こし、細胞老化の特徴の一つである「扁平肥大化」¹として知られている。顕微鏡下における PDL ごとの微妙な形態的变化を人間が視覚的に認識することは困難であるが、機械学習は細胞の画像データに含まれている様々な特徴量を抽出して反復学習することにより、PDL ごとの細胞形態の違いを判定することが可能である。本研究では多層ニューラルネットワークを活用したディープラーニングによりヒト間葉系幹細胞の各 PDL の画像データを用いて機械学習を行うことにより、細胞老化判定手法の開発を行った。

10 cm プラスティックディッシュ上に、8 日間培養 (DIV8)、35 日間培養 (DIV35)、60 日間培養 (DIV60) の培養日数の異なる 3 種類のヒト間葉系幹細胞を、10% 牛胎児血清を含む DMEM (低グルコース) を用いて、それぞれ 3 枚のディッシュに 1.4×10^4 cells/mL, 3.4×10^3 cell/mL, 6.9×10^3 cell/mL となるように播種した。そしてディッシュ上で細胞が 80% コンフルエントに達した時点で継代操作を行い、40 日間培養した。DIV8~DIV100 の細胞を位相差顕微鏡・倍率 4 倍対物レンズを用いて撮影し、それぞれの培養日数の細胞画像を 300 枚ずつ取得した。Fig. 4 に代表的な細胞の画像データを示す。

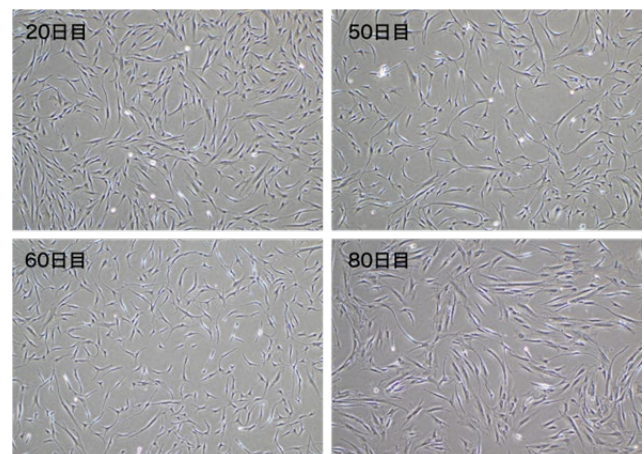


Figure 4. Representative cell images

Cell morphologies was photographed by phase contrast microscopy using a 4x magnification objective; cells from DIV80 were clearly flattened and enlarged compared to the other cells, while cells from DIV20, DIV50, and DIV60 all showed no intuitive differences by visual inspection.

得られた画像約 28000 枚の 7 割である 19600 枚を学習データとし、残りの 3 割である 8400 枚を検証用のデータとして用いて、細胞画像から培養日数を予測するための予測精度を分類モデルと回帰モデルによって算出し、それぞれの正答率を評価した。その結果、分類モデルの正答率は 79.88%, 相関係数 0.9188 となり (Fig. 5), また回帰モデルでは算出した結果を正規化したところ、正答率は 82.96%, 相関係数は 0.9678 であった (Fig. 6)。

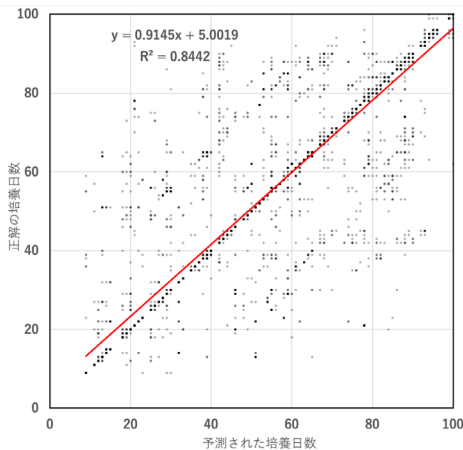


Figure 5. Prediction results by classification model

The classification model was a simple method of assigning to the given choices, and showed a high rate of correct answers that accurately predicted the number of culture days, but a tendency for outlying wrong answers to predict extreme values.

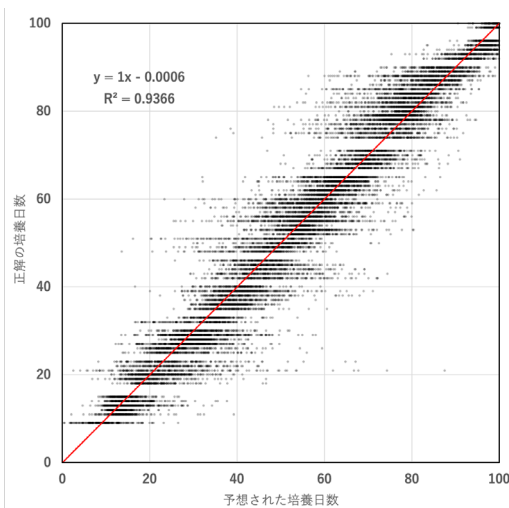


Figure 6. Prediction results by regression model

The regression model was a method of quantifying image data and determining the number of incubation days, and although it did not accurately predict the number of culture days, the predicted values were relatively close to the actual number of incubation days.

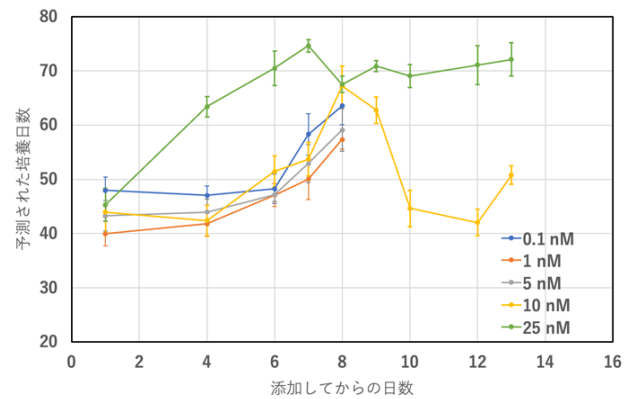


Figure 7. Prediction of the number of culture days for cells treated with five different concentrations of Doxorubicin.

Doxorubicin was added at 0.1 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, and 25 nM and cultured for 12 days and observed.

3. 4 細胞老化判定手法の検証

6 mm ディッシュに 3.4×10^3 cell/mL でヒト間葉系幹細胞を播種し、抗がん剤の一種で細胞に老化を誘導する Doxorubicin を異なる濃度で添加し、経過を観察・撮影した。得られた画像データをもとに、学習させた評価モデルを用いて細胞老化の進行度合いを評価した。ヒト間葉系幹細胞の播種から Doxorubicin 処理と経過を観察・撮影に至る検証を行った結果、本研究で構築した評価モデルは最も強く細胞老化を誘導する Doxorubicin 25 nM 添加して培養したヒト間葉系幹細胞に対して、継代老化に相当する培養日数を予測することに成功した (Fig. 7)。

4. 考察

ヒト間葉系幹細胞は骨髄や脂肪組織に存在し、*in vitro* では神経や筋肉、脂肪、骨などに分化する多分化能を有する幹細胞である。iPS 細胞や ES 細胞と比較してがん化などの安全上のリスクや倫理的問題が小さいため再生医療における応用が注目されている。医療用として十分な量のヒト間葉系幹細胞を確保するためには、組織より採取した僅かなヒト間葉系幹細胞を長期に渡って拡大培養する必要がある。しかし、長期の拡大培養は hMSC に細胞老化を引き起こし、その治療効果に影響を及ぼす可能性がある。本研究で示したように、拡大培養過程において PDL の上昇にともなって、ヒト間葉系幹細胞では老化関連遺伝子 CDK インヒビターである p21 のタンパク質レベル、そして炎症性サイトカイン遺伝子である *IL-6*, *CCL2* の発現が上昇する。これはヒト間葉系幹細胞の分化能の低下や品質の劣化を示しており、細胞老化を抑制したヒト間葉

系幹細胞の培養方法(培地や培養基質など)の開発は、ヒト間葉系幹細胞の医療への応用において重要である。本研究で明らかになったように、マグネシウムイオンを高濃度(4.00 mM)に含む培地で継代培養されたヒト間葉系幹細胞では分裂寿命の延長が認められたことから、マグネシウムイオンは細胞老化を抑制する働きがあることが示唆された。

また本研究では機械学習の一種であるディープラーニングを用いた画像データによるヒト間葉系幹細胞の評価系を作成し、この評価系の分類モデルと回帰モデルの双方において、ヒト間葉系幹細胞の細胞画像から非常に正確に培養日数を予測できることを明らかにした。また、Doxorubicin 処理によって老化を誘導したヒト間葉系幹細胞に対して、継代老化に相当する培養日数を予測できることを示した。

5. 今後の課題

今後の課題としては、高濃度のマグネシウムイオンで培養されたヒト間葉系幹細胞における分子レベルの変化を明らかにするため、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を行う予定である。また、各培養日数画像に分子レベルのデータを紐付けすることにより、細胞画像から培養日数だけでなくヒト間葉系幹細胞の品質を精度高く予測する評価系の構築につなげる。さらに、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析からマグネシウムイオンによる細胞老化抑制に関連した分子をこの評価系に紐付けすることにより、分裂能の高い細胞集団を同定可能な評価系の構築を検討したい。

6. 文献

1. Hayflick, L. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 585-621. 1961
2. 第5回再生・細胞医療・遺伝子治療開発協議会, 参考資料 1「細胞種別の研究開発の現状の整理」(令和 3 年 5 月 28 日)
3. Yamanaka, R. et al. NO/cGMP/PKG signaling pathway induces magnesium release mediated by mitoKATP channel opening in rat hippocampal neurons. *FEBS Lett.* 587(16):2643-2648. 2013
4. Yamanaka, R. et al. Neural depolarization triggers Mg^{2+} influx in rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 310:731-41. 2015
5. Yamanaka, R. et al. Mitochondrial Mg^{2+} homeostasis decides cellular energy metabolism and vulnerability to stress. *Sci Rep.* 6:30027. 2016. doi: 10.1038/srep30027.
6. Yamanaka, R. et al. Magnesium Is a Key Player in Neuronal Maturation and Neuropathology. *Int J Mol Sci.* 20(14):3439. 2019. doi: 10.3390/ijms20143439.
7. Shindo, Y. Yamanaka, R. et al. Intracellular magnesium level determines cell viability in the MPP⁺ model of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1853(12):3182-3191. 2015
8. Shindo, Y. Yamanaka, R. et al. Inhibition of Mg^{2+} Extrusion Attenuates Glutamate Excitotoxicity in Cultured Rat Hippocampal Neurons. *Nutrients* 12(9):2768. 2020

Control of Cellular Senescence by Regulating Intracellular Magnesium Ion Homeostasis (Application of Image Analysis to Cell Evaluation)

Ryu Yamanaka, Akira Shimamoto, Kyoshiro Tsuge

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sanyo-Onoda City University

Summary

Human mesenchymal stem cells (hMSCs) are multipotent stem cells that exist in bone marrow and adipose tissue and can differentiate into nerve, muscle, fat, bone, etc. *in vitro*. To secure enough hMSCs for medical use, it is necessary to culture a small amount of hMSCs harvested from tissues for a long period of time. However, long-term expansion culture may cause cellular senescence of hMSCs, which may affect their therapeutic efficacy. As shown in this study, the expression of the senescence-related gene product CDK inhibitor p21, as well as the inflammatory cytokine genes *IL-6*, *CCL2*, increases in hMSCs as PDL increases during expansion culture. This indicates a decrease in differentiation ability and deterioration in quality of hMSCs, and the development of a method for culturing hMSCs that suppresses cellular senescence (e.g., culture medium and culture substrate) is important for the medical application of hMSCs.

It has long been known that Mg ions are essential for biological functions. Disruption of the Mg ion regulatory system has been observed in many diseases for which risk increases with age, such as cancer, diabetes, neurological diseases (e.g., Alzheimer's disease and Parkinson's disease), heart disease, and osteoporosis. In cells, Mg ions bind to biopolymers such as DNA, proteins, and skeletal molecules, and contribute to their stabilization.

In this study, we investigated the effect of Mg ion concentration on the mitotic lifespan of hMSCs. The results showed that hMSCs passaged in medium containing high concentrations of Mg ions (4.00 mM) showed prolonged mitotic lifespan, suggesting that Mg ions have an inhibitory effect on cellular senescence.

We also investigated a non-invasive method for determining cellular senescence of hMSCs. In this study, we developed an evaluation system for hMSCs based on image data using deep learning, a type of machine learning, and found that both the classification model and regression model of this evaluation system could predict the number of days of culture very accurately from the cell images of hMSCs.