

Epigenomic Alteration in Replicative Senescent-mesenchymal Stem Cells

Youn Seo Oh^{1,2} and Goang-Won Cho^{1,2*}

¹Department of Biology, College of Natural Science, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

²Department of Life Science, BK21-Plus Research Team for Bioactive Control Technology, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

Received June 8, 2015 / Revised June 18, 2015 / Accepted June 18, 2015

Mesenchymal stem cells (MSCs) are characterized by their multipotency capacity, which allows them to differentiate into diverse cell types (bone, cartilage, fat, tendon, and neuron-like cells) and secrete a variety of trophic factors (ANG, FGF-2, HGF, IGF-1, PIGF, SDF-1 α , TGF- β , and VEGF). MSCs can be easily isolated from human bone-marrow, fat, and umbilical-cord tissues. These features indicate that MSCs might be of use in stem-cell therapy. However, MSCs undergo cellular senescence during long-term expansion, and this is accompanied by functional declines in stem-cell potency. In the human body, because of their senescence and declines in their microenvironmental niches stem cells fail to maintain tissue homeostasis, and as a result, senescent cells accumulate in tissues. This can lead to age-related diseases, including degenerative disorders and cancers. Recent studies suggest that the number of histone modifications to stem cells' genomes and aberrant alterations to their DNA methylation increase as stem cells progress into senescence. These epigenetic alterations have been partly reversed with treatments in which DNA methyltransferase (DNMT) inhibitors or histone deacetylase (HDAC) inhibitors are introduced into replicative senescent-MSCs. This review focuses on epigenetic alteration in replicative senescent-MSCs and explains how epigenetic modifications are widely associated with stem-cell senescences such as differentiation, proliferation, migration, calcium signaling, and apoptosis.

Key words : DNA methylation, epigenetics, histone acetylation, mesenchymal stem cells, senescence

서 론

줄기세포는 스스로 증식(self renewal)하고, 특정 세포로 분화(differentiation)할 수 있는 능력을 지닌 미분화 세포로 정의되며, 배아줄기세포(Embryonic stem cell)와 유도만능줄기세포(Induced pluripotency stem cell), 성체줄기세포(Adult stem cell) 등이 있다[14, 20, 46]. 배아줄기세포는 배 발생 과정 중에 포배기(Blastular stage)의 세포내괴(Inner Cell Mass)를 이루고 있는 세포이며[14], 삼배엽(three germ layer)유래의 어떤 세포로도 분화할 수 있는 능력을 지니고 있다[20]. 유도만능줄기세포는 2006년에 야마나카신야 박사팀이 확립한 줄기세포로써 분화된 체세포에 *Oct-3/4*, *Sox2*, *Klf4* and *c-Myc* 유전자를 도입시켜 재프로그래밍(Reprogramming)을 유도하여 배아줄기세포와 유사한 특징을 지닌 세포를 확립하였다[46]. 성체줄기세포는 인체의 조직(tissue) 내에서 항상성을 유지하며, 각 조직에서 제한된 세포로 분화하는 능력을 가지고 있다. 중간

엽줄기세포(Mesenchymal stem cell)는 성체줄기세포의 한 종류로 스스로 증식할 수 있는 자기재생산능력(self-renewal)을 가지고 있으며 조골, 지방, 신경, 연골 등의 세포로 분화할 수 있는 다분화능(multipotency)을 가진 세포이다[25, 39, 51]. 또한, 골수, 지방, 태줄과 같은 조직에서 손쉽게 얻을 수 있으며 배양이 상대적으로 간편하기 때문에 재생의학적으로 활용도가 높다[9]. 최근 줄기세포에 대한 연구가 활발히 이루어지면서, 줄기세포에 대한 이해가 높아지고 있고, 조직 내의 항상성 유지를 담당하는 성체줄기세포의 노화가 퇴행성 질환의 원인이 된다는 보고가 있다[26, 53]. 이에 따라서 성체줄기세포 자체의 노화에 대한 메커니즘이 규명되었고, 암억제단백질(tumor suppressor protein), 짧아지는 텔로미어(telomere), DNA 수리기능(DNA repair system)의 결함, 활성산소(reactive oxygen species) 등이 노화의 원인으로 알려져 있다[2, 7, 23]. 최근 연구들에 의하면 줄기세포가 노화를 겪는 동안, 후생유전학적인 변화가 관여한다는 보고가 있다. 노화 관련된 후생유전학적인 변화의 주된 메커니즘으로는 DNA 메틸화와 히스톤 변형이 있고, 여기에 관계하는 효소로는 DNMT (DNA methyltransferase), HMT (Histone methyltransferase), HAT (Histone acetyltransferase), HDAC (Histone deacetylase) 등이 유전체(Chromatin) 자체의 구조변형을 통해 전사인자들의 접근성에 관여하는 원리로 노화특이적인 유전자들의 발현을 조절한다[21, 34, 44].

*Corresponding author

Tel : +82-62-230-6641, Fax : +82-62-230-6650

E-mail : gwcho@chosun.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

본 총설에서는 성체줄기세포노화에 관한 메커니즘과 줄기세포의 노화가 진행되면서 나타나는 후생유전학적인 변화가 노화에 있어서 어떠한 영향을 미치는지 여러 연구사례들을 통하여 분석해 보고자 한다.

줄기세포노화의 메커니즘

줄기세포가 노화하게 되면 줄기세포 개체 수의 감소와 분화능력의 감소로 인해 결국 조직의 항상성 유지의 실패로 인한 퇴행성 질환의 원인이 되는데, 줄기세포의 노화를 분자적인 수준에서 보았을 때, p16^{INK4a}의 발현이 증가하는데, 이는 CDK4/6 (Cyclin-dependent kinases 4 and 6)와 cyclin D가 복합체를 이루는 것을 억제한다[35]. 이로 인하여, Rb 단백질 (Retinoblastoma protein)의 인산화 단계에 영향을 미쳐, pRb (phosphorylated Rb)와 E2F (Transcription factor E2F)가 복합체를 만드는 것을 억제 시킨다. 또한, pRb-E2F 복합체를 이루지 못해 자유로워진 E2F는 세포 단계 중 G₁, S기를 억제시키는 기전으로 세포분열을 억제 시킨다[35]. 그리고 다른 기전으로는, p53 단백질의 활성이 관계하는데, 대표적인 p53이 활성화되는 기전으로는, 짧아지는 텔로미어의 길이에 의한 DNA 손상에 의해 유도되는 ATM (Ataxia telangiectasia mutated) 신호전달 경로와 p19^{ARF} 단백질에 의한 활성화가 있다[22, 45]. 활성화된 p53 단백질은 세포주기 억제 인자인 p21^{CIP1/WAF1}의 발현을 유도하게 되고, p21^{CIP1/WAF1}은 pRb-E2F 복합체를 억제시켜 세포분열을 억제 시킨다[13, 45]. 또한, p53에 의한 PTEN (Phosphatase and tensin homolog)의 발현은, PI₃K/PKB (phosphatidylinositol 3-kinases/Protein kinase B) 신호전달 경로를 억제 시킴으로써, 결국에는 FOXO (Forkhead box O) 전사 인자의 핵 방출을 억제 시킨다. FOXO 전사 인자는 핵 내에서 세포주기 억제인자인 p19^{ARF}, p27^{KIP1}, p57^{KIP1}의 발현을

증가시킨다[52]. 또한, p19^{ARF} 단백질은 HDM2 (E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2)에 의한 p53의 유비퀴틴화(ubiquitination)를 억제시켜 p53 단백질을 안정화시켜주는 역할을 한다 [5, 47]. 추가적으로 p53은 미토콘드리아의 Bax (Bcl-2-associated X protein) 단백질의 발현을 유도하며, Bax는 Caspase를 활성화 시키고 이로 인해 노화된 줄기세포에서 세포사 (apoptotic cell death)가 일어나게 된다[19](Fig. 1). 이러한 메커니즘에 의한 줄기세포의 노화는 조직 항상성 유지의 문제가 될 뿐만 아니라, 줄기세포치료를 위한 배양과정에서도 부정적인 영향을 미친다. 예를 들면 중간엽줄기세포를 치료적 목적으로 사용하는데 있어 그 효율성을 높이기 위해서 이식 전 세포배양을 통해 개체 수를 늘리는 과정은 불가피하다. 하지만 이 과정에서 중간엽줄기세포는 점차적인 노화를 겪게 된다 [23]. 따라서 줄기세포의 노화에 의한 분열, 분화능력의 감소에 의해 치료적 효과도 떨어지게 될 것이다.

중간엽줄기세포의 노화와 후생유전학

중간엽줄기세포의 노화에 대한 분자적인 수준과 세포 수준에서 연구는 활발히 이루어져 있다. 예를 들어, 노화가 진행되면서 점차 특이적인 거대하고 납작한 세포 모양이 나타나게 되고, 세포분열의 감소, 분화능력의 감소, 영양물질 분비의 감소와 Senescence associated beta galactosidase 활성의 증가 (Fig. 2) 그리고 세포 내의 활성산소 증가, 텔로미어의 길이가 짧아진다는 것은 여러 연구를 통해 알려진 사실이다[6, 15, 23]. 최근 연구들에 의하면 중간엽줄기세포가 노화를 겪으면서 일반적인 특징들과 함께 후생유전학적인 변화가 나타난다는 보고가 있다. 그중 하나는 DNA 메틸화(DNA methylation) 패턴의 변화이다[4, 11, 18, 36, 40]. DNA 메틸화는 일반적으로 유전자 발현의 억제와 관련되어 있으며[10, 41], DNA 메틸화의

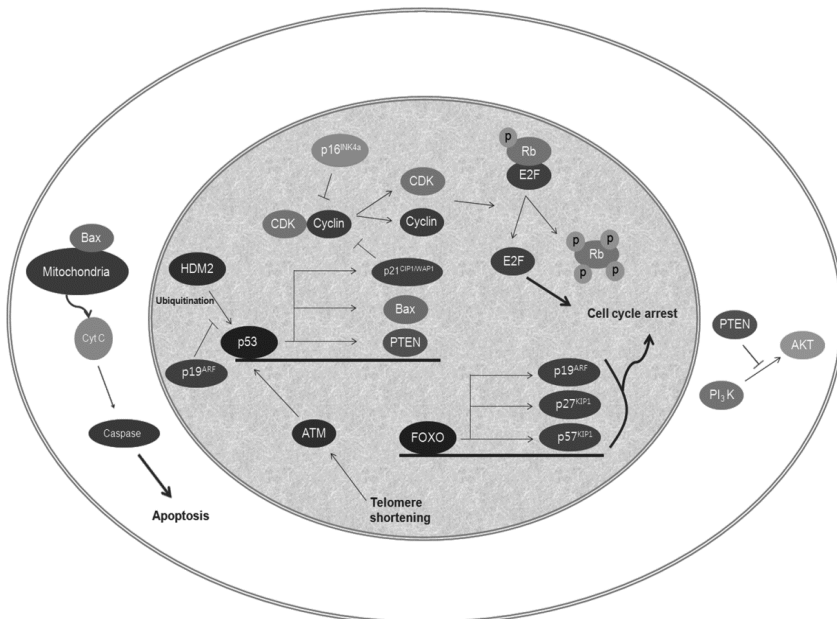


Fig. 1. Molecular mechanisms in adult stem cell senescence. Activation of p16^{INK4a} prevents the formation of CDK4/6-CyclinD complex and induces to RB protein phosphorylation. The phosphorylated RB release E2F as results in free E2F leading to cell cycle arrest. p53 activation is stimulated by p19^{ARF} or activated ATM caused by telomere shortening. The activation of p53 promotes cell cycle arrest (through p21, PTEN) and intrinsic apoptosis (Bax).

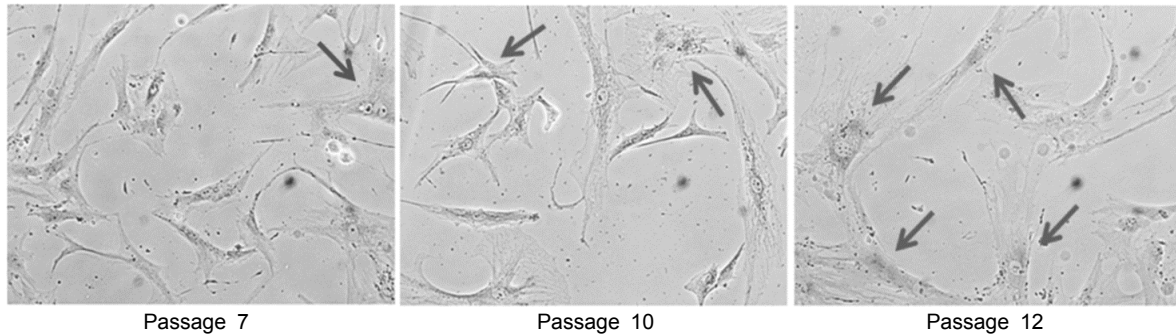


Fig. 2. Replicative senescence in long term expanded human bone marrow-MSCs. The activity of β -galactosidase increased with the number of passages. Arrows indicate SA- β -gal-positive cells.

패턴의 변화로 인해 노화된 중간엽줄기세포에서 발견되는 특이적인 유전자 변화에 영향을 미친다(Fig. 3). DNA 메틸화뿐만 아니라, 히스톤 아세틸화(Histone acetylation)도 관계하는데, 중간엽줄기세포가 노화되었을 때 히스톤 아세틸화의 변화에 의해 특이적인 유전자 발현이 조절된다[27].

분화 효율(Differentiation efficiency)

중간엽줄기세포는 조골세포, 지방세포, 신경세포 등으로 분화능을 가지고 있으며, 일반적으로 노화되었을 때 분화능이 감소한다고 알려져 있다. 후생유전학적인 측면에서도 이러한 양상을 관찰할 수 있다. 한 연구에 의하면, 중간엽줄기세포가 노화를 겪으면서, DNA 메틸화의 패턴에 변화가 일어나며, 그에 따라 변화된 유전자들을 생물학적인 기능으로 구분하여 분석하는 방법인 GO analysis (Gene Ontology analysis)를 통해 분석한 결과, 분화 관련 세포 형태발생(Cell morphogenesis involved differentiation)과 신경분화(neuron differentiation)

관련 유전자들이 노화될 때 메틸화가 증가하였다[11]. 또한, 메틸화의 변화가 있던 유전자들을 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)를 통해 pathway를 분석해본 결과, 별아교세포분화(astrocyte differentiation) 관련 유전자인 *GFAP* (Glial fibrillary acidic protein) 그리고, 지방세포 관련 PPAR 신호전달 경로의 타깃 유전자인 *ADIPOQ* (*adiponectin*) 이 노화가 되면서 DNA 상의 메틸화가 증가하였다[11]. 앞선 유전자들의 DNA 메틸화의 증가에 의한 *GFAP* 유전자 발현의 감소는 중간엽줄기세포의 신경세포로의 분화 효율을 감소시킬 것이고, 지방세포분화(adipogenesis)의 마커 유전자인 *ADIPOQ*의 과-메틸화는 노화에 의해 나타나는 지방세포로의 분화능력의 감소와 부분적으로 연관되어 있다[11]. 추가적으로 중간엽줄기세포가 노화를 겪으면서, 지방세포분화 연관되는 유전자인 *LEP* (*Leptin*), *FABP4* (*Fatty Acid Binding Protein 4*) 유전자의 프로모터 부위에 DNA 메틸화가 증가 한다는 보고가 있다[31]. 이러한 양상은 조골세포의 분화에 필요한 유전

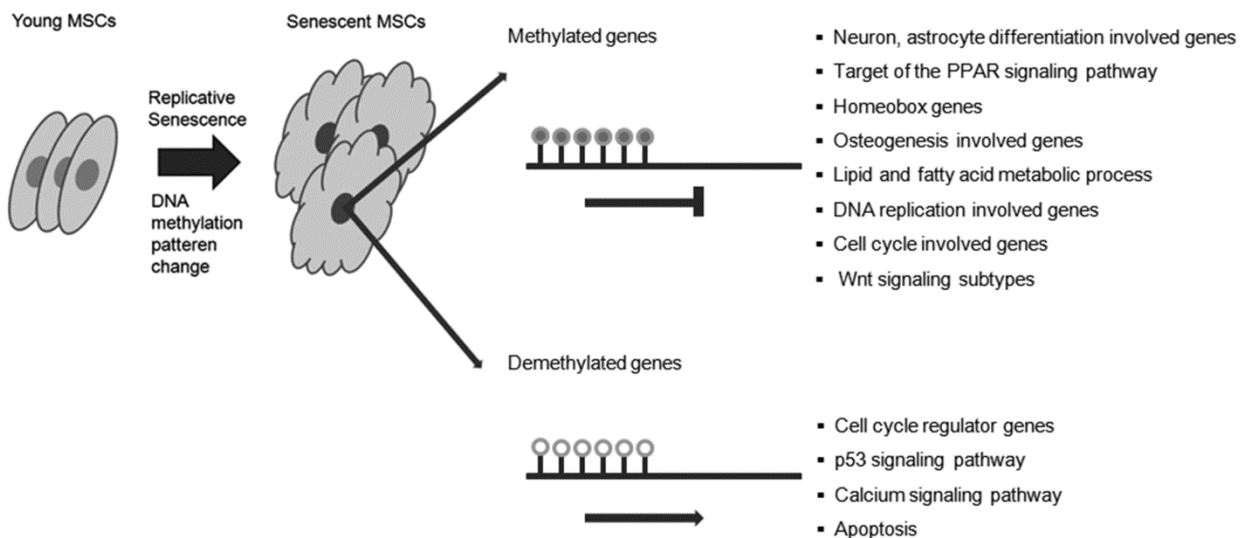


Fig. 3. Alteration of DNA methylation pattern in replicative senescent MSCs. Many genes which are associated with DNA replication, cell differentiation and energy metabolism, were methylated in replicative senescent MSCs, while senescence and apoptosis-related genes were demethylated on their genomic loci.

자에서도 나타난다. 한 연구에 의하면 중간엽줄기세포가 노화됨에 따라서 Homeobox 유전자들의 DNA 메틸화의 변화가 일어남을 관찰하였다[4]. 그중 하나인 *DLX5* (*distal-less homeobox 5*)는 조골세포로의 분화에 관련되어 있는 유전자인데, 계속적인 배양에 의해 점차적으로 *DLX5*의 유전자에 메틸화가 증가하는 것을 관찰하였다[4]. 이는 중간엽줄기세포가 조골세포로 분화하는데 있어서 부정적인 영향을 미칠 것이다. 골 형성에 있어 *DLX5* 유전자의 중요성은 *DLX5/6* knockout 동물 모델에서 확인한 바 있다. 배 발생 과정 중에 *DLX5/6* knockout 쥐에서는 정상적인 골격 형성이 되지 않는 것을 관찰한 연구가 있다[37]. 또 다른 연구에서는, 중간엽줄기세포가 노화를 겪으면서 나타나는 DNA 메틸화의 변화를 GO analysis로 분석해보았을 때, 지질과 지방산 대사과정(Lipid and fatty acid metabolic process) 관계되는 유전자들의 메틸화가 증가되었다고 보고했다[36]. 이 유전자들의 감소는 노화되면서 나타나는 지방세포로의 분화 효율의 감소에 영향을 미칠 것이다. 여러 연구에 의해 알려진 중간엽줄기세포의 노화에 의한 분화능력의 감소는 후생유전학적인 관점에서 보았을 때 깊은 연관성이 있다.

세포분열(Cell division)

세포가 노화되면서 나타나는 대표적인 증상으로는 분열 능력의 감소가 있다. 분열 능력의 감소는 주로 CDK 억제단백질들(Cyclin-dependent kinase inhibitor proteins)에 의해서 매개되는데, 이들 유전자들은 중간엽줄기세포가 노화를 겪으면서 후생유전학적으로 발현이 조절된다. KEGG pathway analysis를 통해 중간엽줄기세포의 노화과정에서 DNA 복제 관련 유전자들인 *POLE* (*DNA polymerase epsilon catalytic subunit A*), *FEN1* (*Flap endonuclease 1*), *RFC2* (*Replication factor C subunit 2*), *POLD4* (*DNA polymerase delta subunit 4*)와 cell cycle 조절 유전자인 *CDC6* (*Cell division control protein 6 homolog*), *CDC27* (*Cell division cycle protein 27 homolog*), *CDK2* (*Cyclin-dependent kinase 2*), *CDK4* (*Cyclin-dependent kinase 4*), *PCNA* (*Proliferating cell nuclear antigen*)들의 DNA 상의 메틸화가 증가하는 것을 관찰하였다[11]. 이들 유전자들의 발현 감소로 인해 노화과정에서 나타나는 DNA 복제와 세포 성장의 감소에 영향을 미칠 것이다. 특히나 *CDK2*의 세포증식에 있어서 중요성은, *CDK2* knockout 쥐 모델에서 MEF (Mouse embryonic fibroblast)의 증식능력이 현저히 감소하는 것을 관찰한 연구 사례가 뒷받침해준다[3]. 또한, 노화된 중간엽줄기세포에서, Cell cycle 억제에 있어 중요하게 작용하는 인자인 *p16^{INK4a}*의 프로모터 상의 DNA 메틸화가 감소되어 간다는 보고가 있다 [4, 42]. 세포노화에 있어서 *p16^{INK4a}*의 발현은 핵심적인 역할을 한다. 마지막으로, p53 신호전달 경로(p53 signaling pathway)에 속하는 *GADD45B* (*Growth arrest and DNA-damage-inducible beta*)와 *TP73* (*tumor protein 73*)가 노화될 때 DNA 상의

메틸화가 감소되어 있는 것을 관찰하였는데, p53 신호전달 경로는 노화에 의한 성장 억제에 연관되어 있다고 알려져 있다 [1, 11]. 따라서 노화에 의한 세포 성장 억제와 연관되는 인자들의 발현이 후생유전학적으로 조절된다는 것을 알 수 있다.

세포 이동 능력(Cell migration ability)

중간엽줄기세포의 세포 이동 능력은 줄기세포의 치료에 있어서 중요하게 작용한다. 노화에 의해 중간엽줄기세포의 이동 능력이 감소한다는 것은 여러 연구를 통해 알려진 사실이다 [12, 15, 38]. 이러한 양상은 후생유전학적으로도 관찰할 수 있는데, 예를 들면, 중간엽줄기세포가 노화될 때, 세포 이동(cell migration) 관련 유전자들의 메틸화가 증가하는 것을 GO analysis로 확인한 사례가 있고, KEGG pathway analysis를 통해 Wnt 신호전달 경로(Wnt signaling pathway)의 subtype 유전자들인 *WNT4*, *WNT5A*, *WNT5B*, *WNT7B*, *WNT9B* 그리고 *WNT11*의 메틸화가 증가되었는데, 이는 세포 운명의 조절과 부착 그리고 이동에 있어서 관련되는 유전자들이다[11, 30]. 노화되었을 때 세포 이동에 관계하는 유전자들의 발현 감소에 의해서 노화된 중간엽줄기세포의 세포 이동 능력의 감소에 영향을 미칠 것이다.

칼슘 신호전달 경로(Calcium signaling pathway)

지속적인 Ca^{2+} 의 증가는 산화스트레스와 세포사에 연관되어 있다[16]. 이에 따라 칼슘 신호전달 경로는 노화되면서 나타나는 세포사와 관련이 있다. 예를 들어 신경퇴행성 질환에서 변화된 Ca^{2+} 항상성에 의해 세포사가 유도된다는 보고가 있다 [43]. 또한 노화된 쥐의 평활근 세포에서 Ca^{2+} 가 증가되어 있다는 연구사례가 있다[28]. 중간엽줄기세포가 노화될 때 GO analysis를 통해 칼슘 신호전달 경로 관련 유전자인 *CACNA1A* (*Voltage-dependent P/Q-type calcium channel subunit alpha-1A*), *CALM1* (*Calmodulin 1*) 등의 DNA 상의 메틸화가 감소하는 것을 관찰하였고[11], 또한 KEGG pathway analysis를 통해 노화 관련된 칼슘 신호전달 경로를 확인하였다[55]. *CACNA1A*와 *CALM1*의 메틸화의 감소에 의한 발현의 증가는 세포 내의 Ca^{2+} 의 항상성을 유지하는데 부정적인 영향을 미칠 것이다.

세포사(Apoptosis)

노화된 성체줄기세포에서, p53의 증가된 활성에 의해 Caspase가 활성화가 되어 세포사가 일어나게 된다[29]. 이는 중간엽줄기세포가 노화되면서 변화되는 DNA 메틸화에서도 관찰할 수 있다. 한 연구에서는 세포사와 관련 있는 *BCL-2* (*B-cell lymphoma 2*), *BAD* (*Bcl-2-associated death promoter*), *CASP7* (*Caspase 7*), *CASP9* (*Caspase 9*)이 노화가 진행됨에 따라 DNA 상의 메틸화가 감소되는 것을 관찰하였다[11]. *BAD*, *CASP7*, *CASP9*은 세포사를 유도한다고 알려진 인자들이다[8, 33, 48]. 또한, 다른 연구에서도 GO analysis를 통해 세포사(Apoptosis

and cell death)에 관계되는 유전자들의 메틸화가 감소한다는 보고가 있다[36]. 이는 아마도 노화되기 전의 중간엽줄기세포의 세포사를 예방할 것이고 노화된 세포에서 나타나는 세포사와 관련이 있을 것이다.

중간엽줄기세포 노화와 DNMT 억제제

DNA 메틸화를 유도하는 DNMT에 대한 억제제(DNA methyltransferase inhibitors)를 중간엽줄기세포에 사용한 연구 사례들을 보면, 노화된 중간엽줄기세포에서 조골세포 관련 유전자들의 발현의 감소와, 이에 따른 조골세포로의 분화 효율이 낮아지는 것을 관찰했지만, DNMT 억제제인 5-Azacytidine을 처리하여 세포분열과 조골세포분화 효율을 증가시킨 연구 사례가 있다[50]. 또한, 5-Azacytidine을 중간엽줄기세포에 처리하여 *DLX5*를 포함한 조골세포 마커 유전자들의 발현을 증가시켜 조골세포로의 분화 효율을 증가시킨 연구 사례가 있다[54]. 그리고, 우리의 이전 연구에서 중간엽줄기세포에 다른 DNMT 억제제인 RG108을 처리하여 텔로미어의 길이 유지에 중요하게 작용하는 *TERT* (Telomerase reverse transcriptase)의 발현을 유도하여 항-노화 효과를 관찰했다[32].

중간엽줄기세포의 노화에서 히스톤 탈-아세틸화

중간엽줄기세포가 노화를 겪으면서 나타내는 후생유전학적인 특징은 히스톤에서도 관찰할 수 있다. 한 연구에 의하면, 중간엽줄기세포의 지속적인 배양으로 인해 *TERT*와 줄기세포의 발생 초기 단계에 높게 발현하는 줄기세포 마커 유전자들인 *OCT4* (octamer-binding transcription factor 4), *Nanog* (Homeobox Transcription Factor *Nanog*), *Rex-1* (zinc finger protein 42 homo-

log), *Sox2* (*SRY-box 2*)의 발현이 감소하는데, 이러한 유전자들의 프로모터의 H3 lysine 9과, 14의 아세틸화(Acetylation)가 감소하여 발현이 감소한다는 연구 사례가 있다[27](Fig.4). 일반적으로 히스톤의 아세틸화는 유전자 발현의 활성화와 연관이 있다[34].

중간엽줄기세포노화와 HDAC 억제제

중간엽줄기세포를 계속적으로 배양할 때, HDAC 억제제 (Histone deacetylase inhibitor)로 잘 알려진 TSA (Trichostatin A)를 저농도로 처리 함으로써, *TERT*와 줄기세포 마커 유전자들의 발현을 유지시켜 주는 것을 확인했고, 이러한 유전자들의 영향으로 인해 중간엽줄기세포의 증식능력이 개선되는 것을 관찰하였다[17]. 그리고, TSA와 다른 HDAC 억제제인 *lagazole*을 저농도로 사용하여, 중간엽줄기세포가 노화되는 동안 나타나는 *TERT*, *Oct4*, *Nanog*, *CXCR4* (*C-X-C chemokine receptor type 4*) 등의 유전자 프로모터에 존재하는 히스톤의 탈-아세틸화(Deacetylation) 현상을 억제해 줌으로써, 이들 유전자의 발현을 원활하게 해주고 이에 따라 증식능력을 개선해주는 효과를 확인한 연구 사례가 있다[49](Fig.4). 뿐만 아니라, 중간엽줄기세포에 HDAC 억제제인 VPA (Valproic acid) 또는 TSA를 사용하여 신경세포분화 혹은 조골세포 분화 효율을 증가시킨 연구 사례들이 존재한다[10, 24].

결론

중간엽줄기세포가 노화를 겪는 동안, 후생유전학적으로 DNA 메틸화 패턴의 변화와 히스톤 변형이 관계하며, 중간엽

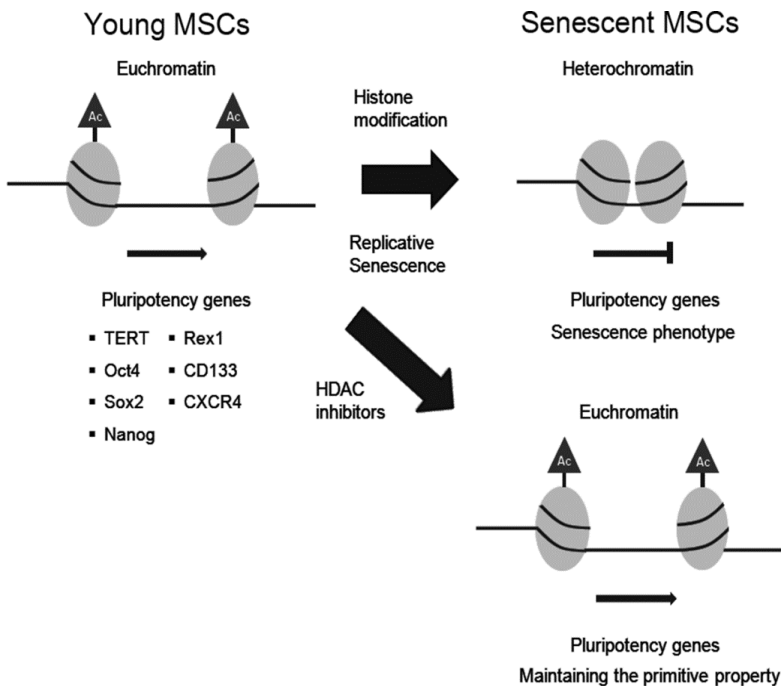


Fig. 4. Histone modification in replicative senescent MSCs. The expression of pluripotency genes (*TERT*, *Oct-4*, *Sox2*, *nanog*, *rex1*, *CD133*, and *CXCR4*) were decreased by histone deacetylation on their gene loci, and partially recovered in treatment of HDAC inhibitor in replicative senescent MSCs.

줄기세포의 노화에 대한 후생유전학적인 이해는 노화를 예방하고 분화능력을 유지하는데 있어 좋은 방법이 될 것이다.

감사의 글

이 논문은 2014학년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

References

1. Beausejour, C. M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S. W., Yaswen, P. and Campisi, J. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* **22**, 4212-4222.
2. Beerman, I., Seita, J., Inlay, M. A., Weissman, I. L. and Rossi, D. J. 2014. Quiescent hematopoietic stem cells accumulate DNA damage during aging that is repaired upon entry into cell cycle. *Cell Stem Cell* **15**, 37-50.
3. Berthet, C., Aleem, E., Coppola, V., Tessarollo, L. and Kaldis, P. 2003. Cdk2 knockout mice are viable. *Curr. Biol.* **13**, 1775-1785.
4. Bork, S., Pfister, S., Witt, H., Horn, P., Korn, B., Ho, A. D. and Wagner, W. 2010. DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells. *Aging Cell* **9**, 54-63.
5. Bothner, B., Lewis, W. S., DiGiammarino, E. L., Weber, J. D., Bothner, S. J. and Kriwacki, R. W. 2001. Defining the molecular basis of Arf and Hdm2 interactions. *J. Mol. Biol.* **314**, 263-277.
6. Bruder, S. P., Jaiswal, N. and Haynesworth, S. E. 1997. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell Biochem.* **64**, 278-294.
7. Calado, R. T. and Young, N. S. 2008. Telomere maintenance and human bone marrow failure. *Blood* **111**, 4446-4455.
8. Cao, Z., Chen, X., Lin, W., Zhao, J., Zheng, L., Ye, H., Liao, L. and Du, J. 2015. Jiedu Xiaozheng Yin decoction inhibits hepatoma cell proliferation by inducing apoptosis via the mitochondrial-mediated pathway. *Mol. Med. Rep.* **12**, 2800-2806.
9. Cho, G. W., Koh, S. H., Kim, M. H., Yoo, A. R., Noh, M. Y., Oh, S. and Kim, S. H. 2010. The neuroprotective effect of erythropoietin-transduced human mesenchymal stromal cells in an animal model of ischemic stroke. *Brain Res.* **1353**, 1-13.
10. Cho, H. H., Park, H. T., Kim, Y. J., Bae, Y. C., Suh, K. T. and Jung, J. S. 2005. Induction of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by histone deacetylase inhibitors. *J. Cell Biochem.* **96**, 533-542.
11. Choi, M. R., In, Y. H., Park, J., Park, T., Jung, K. H., Chai, J. C., Chung, M. K., Lee Y. S., and Chai, Y. G. 2012. Genome-scale DNA methylation pattern profiling of human bone marrow mesenchymal stem cells in long-term culture. *Exp. Mol. Med.* **44**, 503-512.
12. Choi, M. R., Kim, H. Y., Park, J. Y., Lee, T. Y., Baik, C. S., Chai, Y. G., Jung, K. H., Park, K. S., Roh, W., Kim, K. S. and Kim, S. H. 2010. Selection of optimal passage of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for stem cell therapy in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* **472**, 94-98.
13. Dimri, G. P., Nakanishi, M., Desprez, P. Y., Smith, J. R. and Campisi, J. 1996. Inhibition of E2F activity by the cyclin-dependent protein kinase inhibitor p21 in cells expressing or lacking a functional retinoblastoma protein. *Mol. Cell Biol.* **16**, 2987-2997.
14. Docherty, K., Bernardo, A. S. and Vallier, L. 2007. Embryonic stem cell therapy for diabetes mellitus. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**, 827-838.
15. Efimenko, A., Dzhoyashvili, N., Kalinina, N., Kochegura, T., Akchurin, R., Tkachuk, V. and Parfyonova, Y. 2014. Adipose-derived mesenchymal stromal cells from aged patients with coronary artery disease keep mesenchymal stromal cell properties but exhibit characteristics of aging and have impaired angiogenic potential. *Stem Cells Transl. Med.* **3**, 32-41.
16. Ermak, G. and Davies, K. J. 2002. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol. Immunol.* **38**, 713-721.
17. Han, B., Li, J., Li, Z., Guo, L., Wang, S., Liu, P. and Wu, Y. 2013. Trichostatin A stabilizes the expression of pluripotent genes in human mesenchymal stem cells during ex vivo expansion. *PLoS One* **8**, e81781.
18. Hanzelmann, S., Beier, F., Gusmao, E. G., Koch, C. M., Hummel, S., Charapitsa, I., Jousen, S., Benes, V., Brummendorf, T. H., Reid, G., Costa, I. G. and Wagner, W. 2015. Replicative senescence is associated with nuclear reorganization and with DNA methylation at specific transcription factor binding sites. *Clin. Epigenetics* **7**, 19.
19. Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z. and Haupt, Y. 2003. Apoptosis - the p53 network. *J. Cell Sci.* **116**, 4077-4085.
20. Henningson, C. T. Jr., Stanislaus, M. A. and Gewirtz, A. M. 2003. Embryonic and adult stem cell therapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, S745-753.
21. Hidalgo, I. and Gonzalez, S. 2013. New epigenetic pathway for stemness maintenance mediated by the histone methyltransferase Ezh1. *Cell Cycle* **12**, 383-384.
22. Hoare, M., Das, T. and Alexander, G. 2010. Ageing, telomeres, senescence, and liver injury. *J. Hepatol.* **53**, 950-961.
23. Jeong, S. G. and Cho, G. W. 2015. Endogenous ROS levels are increased in replicative senescence in human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **460**, 971-976.
24. Jeong, S. G., Ohn, T., Kim, S. H. and Cho, G. W. 2013. Valproic acid promotes neuronal differentiation by induction of neuroprogenitors in human bone-marrow mesenchymal stromal cells. *Neurosci. Lett.* **554**, 22-27.
25. Joe, I. S., Jeong, S. G. and Cho, G. W. 2015. Resveratrol-induced SIRT1 activation promotes neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Neurosci. Lett.* **584**, 97-102.

26. Krishnamurthy, J., Ramsey, M. R., Ligon, K. L., Torrice, C., Koh, A., Bonner-Weir, S. and Sharpless, N. E. 2006. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* **443**, 453-457.
27. Li, Z., Liu, C., Xie, Z., Song, P., Zhao, R. C., Guo, L., Liu, Z. and Wu, Y. 2011. Epigenetic dysregulation in mesenchymal stem cell aging and spontaneous differentiation. *PLoS One* **6**, e20526.
28. Lopes, G. S., Ferreira, A. T., Oshiro, M. E., Vladimirova, I., Jurkiewicz, N. H., Jurkiewicz, A. and Smaili, S. S. 2006. Aging-related changes of intracellular Ca²⁺ stores and contractile response of intestinal smooth muscle. *Exp. Gerontol.* **41**, 55-62.
29. Mimeault, M. and Batra, S. K. 2009. Recent insights into the molecular mechanisms involved in aging and the malignant transformation of adult stem/progenitor cells and their therapeutic implications. *Ageing Res. Rev.* **8**, 94-112.
30. Nelson, W. J. and Nusse, R. 2004. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* **303**, 1483-1487.
31. Noer, A., Boquest, A. C. and Collas, P. 2007. Dynamics of adipogenic promoter DNA methylation during clonal culture of human adipose stem cells to senescence. *BMC Cell Biol.* **8**, 18.
32. Oh, Y. S., Jeong, S. G. and Cho, G. W. 2015. Anti-senescence effects of DNA methyltransferase inhibitor RG108 in human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biotechnol. Appl. Biochem.*
33. Pal, H. C., Sharma, S., Elmets, C. A., Athar, M. and Afaq, F. 2013. Fisetin inhibits growth, induces G(2) /M arrest and apoptosis of human epidermoid carcinoma A431 cells: role of mitochondrial membrane potential disruption and consequent caspases activation. *Exp. Dermatol.* **22**, 470-475.
34. Pollina, E. A. and Brunet, A. 2011. Epigenetic regulation of aging stem cells. *Oncogene* **30**, 3105-3126.
35. Rayess, H., Wang, M. B. and Srivatsan, E. S. 2012. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int. J. Cancer* **130**, 1715-1725.
36. Redaelli, S., Bentivegna, A., Foudah, D., Miloso, M., Redondo, J., Riva, G., Baronchelli, S., Dalpra, L. and Tredici, G. 2012. From cytogenomic to epigenomic profiles: monitoring the biologic behavior of *in vitro* cultured human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* **3**, 47.
37. Robledo, R. F., Rajan, L., Li, X. and Lufkin, T. 2002. The Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development. *Genes Dev.* **16**, 1089-1101.
38. Rombouts, W. J. and Ploemacher, R. E. 2003. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* **17**, 160-170.
39. Sawatjui, N., Damrongrungruang, T., Leeansaksiri, W., Jearanaikoon, P., Hongeng, S. and Limpaboon, T. 2015. Silk fibroin/gelatin-chondroitin sulfate-hyaluronic acid effectively enhances *in vitro* chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **52**, 90-96.
40. Schellenberg, A., Lin, Q., Schuler, H., Koch, C. M., Jousen, S., Denecke, B., Walenda, G., Pallua, N., Suschek, C. V., Zenke, M. and Wagner, W. 2011. Replicative senescence of mesenchymal stem cells causes DNA-methylation changes which correlate with repressive histone marks. *Aging* **3**, 873-888.
41. Schubeler, D. 2015. Function and information content of DNA methylation. *Nature* **517**, 321-326.
42. Shibata, K. R., Aoyama, T., Shima, Y., Fukiage, K., Otsuka, S., Furu, M., Kohno, Y., Ito, K., Fujibayashi, S., Neo, M., Nakayama, T., Nakamura, T. and Toguchida, J. 2007. Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human mesenchymal stem cells and is potentially silenced by DNA methylation during *in vitro* expansion. *Stem Cells* **25**, 2371-2382.
43. Smaili, S., Hirata, H., Ureshino, R., Monteforte, P. T., Morales, A. P., Muler, M. L., Terashima, J., Oseki, K., Rosenstock, T. R., Lopes, G. S. and Bincoletto, C. 2009. Calcium and cell death signaling in neurodegeneration and aging. *An. Acad. Bras. Cienc.* **81**, 467-475.
44. Soriano-Canton, R., Perez-Villalba, A., Morante-Redolat, J. M., Marques-Torrejon, M. A., Pallas, M., Perez-Sanchez, F. and Farinas, I. 2015. Regulation of the p19 (Arf) /p53 pathway by histone acetylation underlies neural stem cell behavior in senescence-prone SAMP8 mice. *Aging Cell* **14**, 453-462.
45. Sperka, T., Wang, J. and Rudolph, K. L. 2012. DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 579-590.
46. Takahashi, K. and Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676.
47. Tao, W. and Levine, A. J. 1999. Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3077-3080.
48. Wang, D. H., Hu, J. R., Wang, L. Y., Hu, Y. J., Tan, F. Q., Zhou, H., Shao, J. Z. and Yang, W. X. 2012. The apoptotic function analysis of p53, Apaf1, Caspase3 and Caspase7 during the spermatogenesis of the Chinese fire-bellied newt *Cynops orientalis*. *PLoS One* **7**, e39920.
49. Wang, Y., Chen, T., Yan, H., Qi, H., Deng, C., Ye, T., Zhou, S. and Li, F. R. 2013. Role of histone deacetylase inhibitors in the aging of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *J. Cell Biochem.* **114**, 2231-2239.
50. Yan, X., Ehnert, S., Culmes, M., Bachmann, A., Seeliger, C., Schyschka, L., Wang, Z., Rahmanian-Schwarz, A., Stockle, U., De Sousa, P. A., Pelisek, J. and Nussler, A. K. 2014. 5-azacytidine improves the osteogenic differentiation potential of aged human adipose-derived mesenchymal stem cells by DNA demethylation. *PLoS One* **9**, e90846.
51. Yuan, Z., Li, Q., Luo, S., Liu, Z., Luo, D., Zhang, B., Zhang, D., Rao, P. and Xiao, J. 2015. PPARgamma and Wnt signaling in adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **10**, 1-10.
52. thne, X., Tang, N., Hadden, T. J. and Rishi, A. K. 2011. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 1978-1986.

53. Zhao, C., Deng, W. and Gage, F. H. 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* **132**, 645-660.
54. Zhou, G. S., Zhang, X. L., Wu, J. P., Zhang, R. P., Xiang, L. X., Dai, L. C. and Shao, J. Z. 2009. 5-Azacytidine facilitates osteogenic gene expression and differentiation of mesenchymal stem cells by alteration in DNA methylation. *Cytotechnology* **60**, 11-22.
55. Zhu, Y., Song, X., Wang, J., Li, Y., Yang, Y., Yang, T., Ma, H., Wang, L., Zhang, G., Cho, W. C., Liu, X. and Wei, J. 2015. Placental mesenchymal stem cells of fetal origin deposit epigenetic alterations during long-term culture under serum-free condition. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **15**, 163-180.

초록 : 중간엽줄기세포의 노화에 따른 후생유전학적 변화

오윤서^{1,2} · 조광원^{1,2*}

(¹조선대학교 자연과학대학 생명과학과, ²BK21 플러스 생리활성 제어 기술 인력양성 사업팀)

중간엽줄기세포는 성체줄기세포의 한 종류로, 자기재생산능력(self-renewal)과 다분화능(multipotency)을 가지고 있고, 다양한 자양인자(trophic factors)들을 분비한다. 뿐만 아니라, 중간엽줄기세포는 골수, 지방, 태줄과 같은 조직에서 쉽게 얻을 수 있기 때문에 줄기세포치료에 좋은 도구로 이용되고 있다. 하지만, 줄기세포치료의 효율성을 높이기 위해 추출한 세포의 개체 수를 늘리는 과정에서 중간엽줄기세포는 점차적인 노화를 겪게 되고, 이는 줄기세포 자체의 기능적인 감소를 야기한다. 인체 내에서, 노화된 줄기세포는 조직 내의 항상성 유지에 부정적인 영향을 미치게 되고, 이러한 상태가 지속되면 대표적인 노인성 질환인 퇴행성 질환의 원인이 된다. 최근 연구들에 의하면 중간엽줄기세포가 노화를 겪을 때, 노화 관련된 DNA 메틸화 패턴의 변화와 히스톤의 변형이 일어남을 확인하였다. 또한, 중간엽줄기세포의 노화에 있어서 DNA 메틸화효소(DNA methyltransferase) 억제제와 히스톤 아세틸화효소(histone deacetylase) 억제제가 부분적으로 노화를 개선하는 효과를 관찰한 연구사례들이 있다. 본 총설에서는, 노화에 따른 후생유전학적인 변화에 의해, 조절되는 노화 관련 유전자들과 중간엽줄기세포의 노화에 대한 연구사례들을 분석하여 서술하고자 한다.