

## Wnt シグナルによる老化制御

塩島 一朗<sup>1)</sup> 小室 一成<sup>2)</sup>

**要約** Wnt シグナルは発生・発癌・幹細胞機能維持など多彩な作用を有するシグナル伝達系である。老化に関しても、Wnt シグナルが老化あるいは老化に関連してその頻度が増加する老化関連疾患の発症進展に関与しているとの報告がなされている。細胞老化については Wnt が細胞老化を抑制するという報告と逆に促進するとの報告があり、必ずしも統一した見解が得られているわけではない。個体老化に関しては Wnt シグナルが個体老化を促進する、あるいは、老化に関連する臓器機能低下を促進する、との報告があり、さらに、老化にともなって増加する血中の Wnt 活性化因子が個体老化に関与するとの報告もなされていた。我々は血中 Wnt 活性化因子の単離同定を試み、補体経路の構成因子である Clq が血中に存在する Wnt 活性化因子であることを見いだした。Clq は C1r/C1s とともに C1 複合体を形成し、古典的補体経路の最上流に位置するが、Wnt 受容体である Frizzled にも結合し補体の活性化とはまったく無関係に Wnt シグナルを活性化する。また、老齢マウスにおける血中の Clq 濃度は若年マウスにくらべて高く、臓器における Clq 蛋白量も加齢に伴って増加する。さらに、加齢にともなう骨格筋再生性能低下は Clq の作用を抑制することにより回復する。以上の結果は、Clq による Wnt シグナルの活性化が個体老化や老化に関連する臓器・組織の機能低下に関与していることを示唆するものと考えられる。

**Key words** : Wnt, Clq, 補体, 骨格筋再生

(日老医誌 2012; 49: 276-280)

## Wnt シグナル伝達系

Wnt は分子量約 4 万の分泌蛋白で、種をこえて保存されている。ショウジョウバエで最初に同定された *wingless* (*wg*) とマウス乳癌ウイルスによって活性化される癌遺伝子として同定された *int-1* が相同遺伝子であることから、脊椎動物における *wg* 相同遺伝子は *Wnt* (*wg* + *int*) と呼ばれるようになった。Wnt により活性化される細胞内シグナル伝達経路には少なくとも 3 つ (①β-カテニンが遺伝子発現を制御する β-カテニン経路, ②平面内細胞極性 (planar cell polarity (PCP)) を制御する PCP 経路, ③細胞内 Ca<sup>2+</sup> 動員を促進する Ca<sup>2+</sup> 経路) が存在する (図 1)<sup>1)</sup>。このうち β-カテニン経路は古典的 Wnt 経路 (canonical Wnt pathway), それ以外の経路は非古典的 Wnt 経路 (non-canonical Wnt pathway) と呼ばれることもある。これまでにマウス・ヒトでは 19 種類の Wnt が同定されている。また、受容体としては 10 種類の 7 回膜貫通型受容体 Frizzled (Frz) が

あり、これらは古典的 Wnt 経路と非古典的 Wnt 経路の両者に関与する。Frz 以外にも co-receptor として 1 回膜貫通型受容体 low-density lipoprotein receptor-related peptide 5/6 (LRP5/6) が知られており、これらは β-カテニン経路にのみ関与するとされる。

β-カテニン経路は古くから最もよく解析されている Wnt シグナル伝達系である (図 2)<sup>2)</sup>。β-カテニンはもともとカドヘリン結合因子として同定された蛋白であるが、リガンド刺激がない状態では細胞質に存在する β-カテニンは glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), casein kinase 1 (CK1), Axin, APC などによって構成される β-カテニン分解複合体によってリン酸化・ユビキチン化され、さらにプロテアソームで分解される結果、細胞質内の β-カテニン濃度は低く保たれている。リガンドが受容体である Frz および LRP5/6 に結合すると β-カテニン分解複合体が解離するために β-カテニンの分解がおこらなくなり、細胞内の β-カテニンが蓄積する結果、その一部が核内に移行し転写因子である T cell factor (TCF) の co-factor として機能し、標的遺伝子の転写を活性化する。一方、PCP 経路はもともとショウジョウバエの翅原基における翅毛の向きを決定するシグナルとして明らかにされたもので、表皮細胞において頂底軸

Regulation of organismal aging by Wnt signaling

1) Ichiro Shiojima : 関西医科大学第二内科

2) Issei Komuro : 大阪大学大学院医学系研究科循環器内科

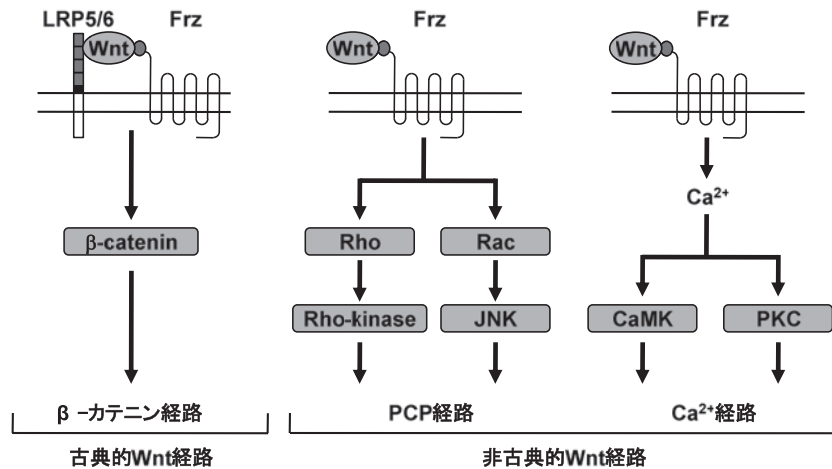


図1 Wnt シグナル伝達系

Wntにより活性化される細胞内刺激伝達経路には少なくとも3つの経路 (①β-カテニン経路, ②PCP経路, ③Ca<sup>2+</sup>経路) が存在する。β-カテニン経路ではβ-カテニンがWnt標的遺伝子の発現を制御するのに対し, PCP経路では低分子量G蛋白を介してRhoキナーゼやJNKが, また, Ca<sup>2+</sup>経路では細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を介してCaMKやPKCがそれぞれ活性化される。β-カテニン経路は古典的Wnt経路 (canonical Wnt pathway), それ以外の経路は非古典的Wnt経路 (non-canonical Wnt pathway) と呼ばれることもある。LRP5/6はβ-カテニン経路に特異的なco-receptorである。

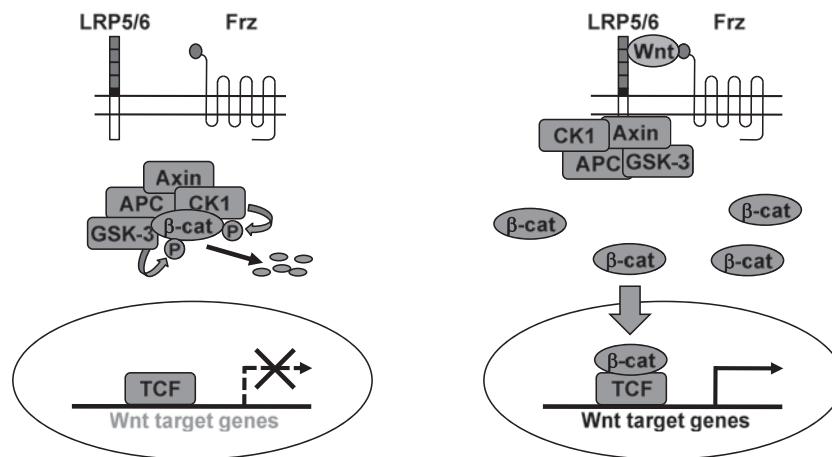


図2 β-カテニン経路

Wntによる刺激がない状態では細胞質に存在するβ-カテニン (β-cat) はGSK-3, CK1, Axin, APCなどによって構成されるβ-カテニン分解複合体によってリン酸化・ユビキチン化され, さらにプロテアソームで分解される結果, 細胞質内のβ-カテニン濃度は低く保たれている。Wntが受容体であるFrzおよびLRP5/6に結合するとβ-カテニン分解複合体が解離するためにβ-カテニンの分解がおこらなくなり, 細胞内のβ-カテニンが蓄積する結果, その一部が核内に移行し転写因子であるTCFのco-factorとして機能し, 標的遺伝子の転写を活性化する。

(apical-basal axis) と直行する平面内で形成された極性を決定するシグナル伝達系である。低分子量G蛋白 (Rho, Rac) を介してRhoキナーゼやJunキナーゼ (c-jun N-terminal kinase (JNK)) を活性化することにより, 細胞極性や細胞の運動を制御する<sup>3)</sup>。またCa<sup>2+</sup>経路は細胞内Ca<sup>2+</sup>動員を介してCa<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性蛋白

リン酸化酵素 (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK)) やプロテインキナーゼC (PKC) を活性化し, 細胞運動を促進あるいはβ-カテニン経路に拮抗するとされる<sup>3)</sup>。

## Wnt シグナルと細胞老化

2007年にWntシグナルの抑制が細胞老化をおこすことがYeらによって報告された<sup>4)</sup>。Yeらはヒト線維芽細胞株WI-38において、細胞老化を呈した細胞ではWnt2の発現低下にともなってWntシグナルが減弱し、細胞質内 $\beta$ -カテニン量の減少とglycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) キナーゼ活性の上昇がみられることを示した。また、Wntシグナルを抑制することにより細胞老化が促進され、逆にWntシグナルを活性化することにより細胞老化が抑制されることが明らかにされた。Wntシグナルの減弱により細胞老化が引き起こされるメカニズムについては以下のように説明されている。すなわち、Wntシグナルが減弱するとGSK-3 $\beta$ のキナーゼ活性が上昇するために、ヒストンシャペロンであるHIRAのリン酸化が亢進し、核内の前骨髄性白血病構造体(promyelocytic leukemia body:PML体)へのHIRAの集積が促進される。HIRAのPML体への集積は、細胞老化をきたした細胞に特徴的にみられる凝集したクロマチン構造(senescence-associated heterochromatin foci(SAHF))の形成に必要で、HIRAのPML体への集積やPML体そのものの形成を阻害するとSAHFの形成も阻害されることが知られている<sup>5)6)</sup>。したがって、WntシグナルはHIRAのPML体への凝集を阻害することにより細胞老化を抑制していると考えられる。Wntシグナルが細胞老化に先立って減弱する理由については現時点で明らかではない。また、細胞老化にともなうWnt2の発現低下およびSAHFの形成はヒト細胞ではみられるもののマウス細胞では認められず、種差についても考慮する必要があると考えられる。

一方、同じ2007年にLiuらは、マウス胎児線維芽細胞をWnt3Aで長期間刺激すると細胞老化が促進されることを報告した<sup>7)</sup>。さらに2010年にYoonらは、マウス胎児線維芽細胞をWnt3Aで刺激することにより細胞老化が促進され、その際ミトコンドリアの増生と活性酸素の産生亢進が認められることを見いだした。また、insulin receptor substrate 1 (IRS1)がWntのターゲット遺伝子として同定され、Wntシグナル活性化によるミトコンドリアの増生にIRS1が必要であることも示されている<sup>8)</sup>。これら3つの報告を統合的に理解することはなかなか難しいが、Wntシグナルが老化の様々な局面において逆の作用を有する可能性が考えられる。

## Wnt シグナルと個体老化

Wntシグナルと個体老化に関しても2007年に2つの

報告がなされた。Liuらは*klotho*マウスにおけるWntシグナルについて検討し、老化に伴って各臓器でWntシグナルの活性化がみられることを報告した<sup>7)</sup>。*klotho*マウスはヒトの老化に類似した表現型を呈する突然変異マウスであり、その原因遺伝子として*klotho*が同定されている<sup>9)</sup>。*klotho*遺伝子はI型膜蛋白をコードし、その細胞外ドメインはADAMファミリーの蛋白分解酵素によって切断される結果、可溶性のKlotho蛋白が産生される<sup>10)</sup>。*klotho*マウスにおいてWntシグナルが活性化される機序に関して、Liuらは可溶性Klotho蛋白がWntリガンドに直接結合し、Wntシグナルを抑制することを見いだした<sup>7)</sup>。また、*klotho*マウスの皮膚や小腸では、Wntシグナル活性化にともない、幹細胞数の減少や老化細胞の増加がみとめられ、同様の表現型は皮膚でWnt1を過剰発現したトランスジェニックマウスにおいてもみとめられた。以上の結果は、Wntシグナルの活性化が*klotho*マウスにおける老化の表現型の原因となっていることを示唆するものと考えられる。しかしながら、Klotho蛋白がインスリンシグナルを抑制することや、FGF23のco-receptorとしてFGF23のシグナル伝達に関与することも報告されており<sup>10)11)</sup>、これら2つのシグナル伝達系も個体老化や老化に関連した表現型に影響を与えることから、*klotho*マウスにおけるWntシグナルの活性化が老化の表現型にどの程度寄与しているかは現時点では明らかではない。

一方、個体老化でみられる特徴のひとつに組織再生能の低下があげられる。例えば骨格筋においては、骨格筋障害後に組織内に存在する幹細胞(筋衛星細胞)が増殖して骨格筋に分化し障害部位の再生がおこるが、加齢にともなって骨格筋の再生能は低下し、線維化が亢進するようになる。このような組織幹細胞の機能低下に全身循環血中の液性因子が関与していることが従来報告されていた<sup>12)</sup>。2007年にBrackらはマウス血清がWntシグナルを活性化すること、また、加齢マウス由来血清のWnt活性化能は若年マウス由来血清のWnt活性化能よりも高いことを示した。さらに、若年マウスの障害骨格筋にWntを局所投与すると骨格筋再生能が低下し、逆に、老齢マウスの障害骨格筋にWnt阻害因子を局所投与すると本来は加齢により低下するはずの骨格筋再生能が回復することを明らかにした<sup>13)</sup>。以上の結果は、血清中に存在するWnt活性化因子が加齢とともに増加し骨格筋再生を抑制していることを示しており、Wntシグナルの活性化が老化にともなう組織の機能低下をきたす原因となっていることを示唆するものと考えられる。

## 血中 Wnt 活性化因子の同定

上記の Brack らの研究から、血清中に存在する Wnt 活性化因子が老化にともなう臓器機能低下に関与する可能性が考えられたが、血清中の Wnt 活性化因子の本体は明らかではなかった。また、Wnt 蛋白はきわめて疎水性が高く、細胞膜や細胞外基質に強く接着して分泌細胞の近傍で機能することが知られており<sup>14)15)</sup>、血清中の Wnt 活性化因子はいわゆる Wnt リガンドとは全く異なるものであると思われた。そこで我々は血清中 Wnt 活性化因子の単離同定を試みた。

まず血清に Wnt 活性化能が存在することを確認し、その Wnt 活性化能が可溶性 Frz 受容体により抑制されることから、未知の Wnt 活性化因子は可溶性 Frz 受容体に結合するものと予想した。また、加齢マウス由来の血清の Wnt 活性化能が若年マウス由来血清に比べて2倍程度であるのに対して、心不全モデルマウス由来血清の Wnt 活性化能は3~5倍程度とさらに高いことを見いだした。そこで、若年マウス由来血清と心不全モデルマウス由来血清を可溶性 Frz 受容体と反応させた後に Protein G を用いて可溶性 Frz 受容体を沈降させ、質量分析計を用いて血清中の Frz 結合蛋白を同定した。その結果、若年マウス由来血清にくらべて心不全モデルマウス由来血清に多く含まれる Frz 結合蛋白として Clq が同定された<sup>16)</sup>。

Clq は古典的補体経路の最も上流に位置する蛋白で、Clr・Cls とともに C1 複合体を形成する。古典的補体経路の活性化の過程では、C1 複合体が Clq を介して免疫グロブリンに結合し<sup>17)18)</sup>、蛋白分解酵素である Clr・Cls を活性化する。Cls の活性化はさらに蛋白分解酵素カスケードの活性化をきたし、最終的に C5b, C6~C9 からなる膜侵襲複合体 (membrane-attack complex: MAC) が形成されることにより、溶菌作用をおこす<sup>19)20)</sup>。Clq が HEK293 細胞や HepG2 細胞などで直接 Wnt シグナルを活性化することや、Clq を除去した血清では Wnt シグナルの活性化がおこらないことから、血清中の Wnt 活性化因子は Clq であるものと考えられた。また、C3 や C5 を除去して補体経路の活性化がおこらないような血清であっても Wnt シグナルの活性化をおこすことから、Clq は補体経路の活性化とは無関係に Wnt シグナルを活性化するものと考えられた。

## Clq による Wnt シグナル活性化

次に我々は生体における Clq-Wnt 経路について検討した。血清中の Clq 濃度は加齢マウスや心不全マウス

において増加していた。また、加齢マウスでは多くの臓器における Clq 蛋白量も増加していた。一方、Clq ノックアウトマウスでは野生型マウスでみられる血清 Wnt 活性化能の加齢に伴う上昇が認められず、また、多くの臓器において Wnt シグナルの活性は低下していた。以上の結果は、Clq が生体内での Wnt シグナル活性化に関与していることを示すものと考えられた<sup>16)</sup>。

Clq による Wnt シグナル活性化のメカニズムについても検討をおこなった。Clq による Wnt シグナル活性化が Cls の中和抗体で抑制されることから、Cls の蛋白分解酵素活性が Wnt シグナル活性化に必要であることが示唆された。さらに、可溶性 LRP6 と Cls を試験管内で反応させると LRP6 の細胞外ドメインが切断され、切断された LRP6 が構成的活性型変異体として機能することが明らかになった。また、Cls で切断されないような LRP6 変異体を遺伝子導入した細胞では Clq による Wnt シグナル活性化が著明に抑制された。以上の結果から、Frz に結合した Clq が Clr/Cls を活性化し、活性化された Cls が LRP6 の細胞外ドメインを切断することにより LRP6 が構成的活性型変異体となり、Wnt シグナルが活性化されるものと考えられた<sup>16)</sup>。

## Clq-Wnt 経路と骨格筋再生

Clq-Wnt 経路が加齢に伴う骨格筋再生能低下に関与しているかを確認するために、骨格筋から筋衛星細胞と線維芽細胞を調製し、Clq や Wnt3A で刺激したところ、筋衛星細胞では細胞増殖が抑制されたのに対して、線維芽細胞では逆に細胞増殖と細胞外マトリクス産生が促進された。また、若年マウスの骨格筋障害モデルにおいては、Clq を局所投与すると Wnt シグナル活性化と骨格筋再生能の低下がみられ、逆に、加齢マウスにおける骨格筋再生能の低下は Clq 遺伝子ノックアウトや Cls に対する中和抗体の投与によって回復することが明らかになった。以上の結果から、Clq が Wnt シグナルの活性化を介して、組織幹細胞の増殖を抑制するとともに線維芽細胞の増殖を促進し、加齢にともなう骨格筋再生能低下をひきおこしているものと考えられた<sup>16)</sup>。

## Wnt シグナルによる老化制御

老化における Wnt シグナルの役割については必ずしも統一した見解が得られているわけではないが、すくなくともいくつかの局面においては Wnt シグナルの活性化が細胞老化・個体老化を促進させる方向で機能しているものと思われる。また、今回の我々の研究から、Clq による Wnt シグナルの活性化が、補体経路の活性化と

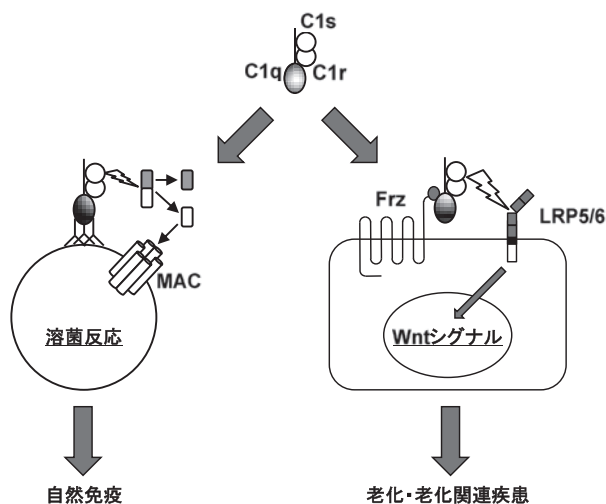


図3 補体成分C1qによるWntシグナル活性化

C1qはC1r/C1sとC1複合体を形成し、免疫グロブリンに結合することにより古典的補体経路を活性化して溶菌反応をおこし、自然免疫において重要な役割を果たしている(左)。一方それとは無関係にC1複合体はFrzと結合してLRP5/6の細胞外ドメインを切断することによりWntシグナルを活性化して個体老化や老化関連疾患の発症に関与する(右)。

は無関係に、個体老化や老化に関連する臓器・組織の機能低下に関与している可能性が考えられた(図3)。C1q-Wnt経路の選択的な阻害法の開発が、老化関連疾患の新しい治療法開発につながることを期待される。

## 文 献

- 1) Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A: Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol* 2009; 19: 119-129.
- 2) MacDonald BT, Tamai K, He X: Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009; 17: 9-26.
- 3) Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT: A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* 2003; 5: 367-377.
- 4) Ye X, Zerlanko B, Kennedy A, Banumathy G, Zhang R, Adams PD: Downregulation of Wnt signaling is a trigger for formation of facultative heterochromatin and onset of cell senescence in primary human cells. *Mol Cell* 2007; 27: 183-196.
- 5) Narita M, Nunez S, Heard E, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, et al: Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 2003; 113: 703-716.
- 6) Zhang R, Poustovoitov MV, Ye X, Santos HA, Chen W, Daganzo SM, et al: Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* 2005; 8: 19-30.
- 7) Liu H, Fergusson MM, Castilho RM, Liu J, Cao L, Chen J, et al: Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* 2007; 317: 803-806.
- 8) Yoon JC, Ng A, Kim BH, Bianco A, Xavier RJ, Elledge SJ: Wnt signaling regulates mitochondrial physiology and insulin sensitivity. *Genes Dev* 2010; 24: 1507-1518.
- 9) Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al: Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; 390: 45-51.
- 10) Kuro-o M: *Klotho* and aging. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790: 1049-1058.
- 11) Lanske B, Razzaque MS: Premature aging in *klotho* mutant mice: cause or consequence? *Ageing Res Rev* 2007; 6: 73-79.
- 12) Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA: Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 2005; 433: 760-764.
- 13) Brack AS, Conboy MJ, Roy S, Lee M, Kuo CJ, Keller C, et al: Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 2007; 317: 807-810.
- 14) Kikuchi A, Yamamoto H, Kishida S: Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cell Signal* 2007; 19: 659-671.
- 15) White BD, Nguyen NK, Moon RT: Wnt signaling: it gets more humorous with age. *Curr Biol* 2007; 17: R923-R925.
- 16) Naito AT, Sumida T, Liu M, Nomura S, Higo T, Nakagawa A, et al: Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell* (2012) in press.
- 17) Schumaker VN, Hanson DC, Kilchherr E, Phillips ML, Poon PH: A molecular mechanism for the activation of the first component of complement by immune complexes. *Mol Immunol* 1986; 23: 557-565.
- 18) Duncan AR, Winter G: The binding site for C1q on IgG. *Nature* 1988; 332: 738-740.
- 19) Walport MJ: Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344: 1058-1066.
- 20) Walport MJ: Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344: 1140-1144.