



# Critical role of Frizzled1 in age-related alterations of Wnt/ $\beta$ -catenin signal in myogenic cells during differentiation

Doi, Ryosuke

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2014-03-25

(Date of Publication)

2015-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6061号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006061>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

Critical role of Frizzled1 in age-related alterations of Wnt/ $\beta$ -catenin signal in myogenic cells during differentiation

骨格筋分化過程での加齢に伴う Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの変化において Frizzled 1 が担う重要な役割

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

細胞生理学

(指導教員：南 康博教授)

土井 亮助

### 【背景と目的】

近年、日本のみならず他の先進国においても高齢化が進み老年人口の割合が増加の一途を辿っている。医療技術の進歩による平均寿命の延長を考慮すると、老年人口はさらに増加し続けると考えられる。このような現状に鑑みると、老年症候群の緩和・治療は、社会的に重要な課題である。代表的な老年症候群の一つである加齢性筋減弱症(サルコペニア)は、高齢者の QOL を脅かすのみならず、他の多くの疾患のリスク要因となることが知られている(1)。サルコペニアは、加齢に伴う筋再生能力の低下が主な要因として知られており、筋再生制御機構を解明することは、サルコペニアの予防または治療法の開発に繋がると期待され、医学的・社会的にも重要な課題である。

骨格筋細胞系譜の最終分化細胞は巨大な多核細胞(筋線維)である。筋線維の細胞膜上には、単核の細胞が接着しており、これが筋肉の幹細胞(筋サテライト細胞)である。成体筋組織中の筋サテライト細胞は、骨格筋の損傷時に放出される炎症性分泌因子などにより活性化され増殖を開始し、基底膜を通り抜けた後、筋芽細胞に分化し、活発に分裂・増殖を繰り返しながら損傷部位へと遊走する。筋芽細胞は、損傷を受けた筋線維周囲の基底膜に沿って配向し、基底膜の内側に侵入後、互いにあるいは残存する筋線維と細胞融合して筋管細胞を形成する。筋管細胞はさらに構造的成熟を遂げ、筋線維となる(2)。

Wnt シグナル経路は、 $\beta$ -catenin 依存的経路と非依存的経路に大別される。 $\beta$ -catenin 依存的経路は、Wnt リガンド存在下において、その受容体である 7 回膜貫通型受容体 Frizzled-family of receptor (Fzd) と lipoprotein receptor-related protein 5/6 を介して活性化され、細胞内で $\beta$ -catenin を安定化する。細胞質内に蓄積した $\beta$ -catenin は核内へと移行し、TCF/LEF 転写因子と複合体を形成することで *Axin2* などの標的遺伝子の転写を制御している(3)。この Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは、高齢個体の様々な組織において活性化していることが知られており、骨格筋においては、高齢マウス由来の筋サテライト細胞を含む筋系譜の細胞で活性化することで筋組織の再生を減弱させることが報告されている。また、この加齢に伴う Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化および筋組織再生能の低下は、若齢マウスと高齢マウスの血管接合実験により一定の改善が認められることから、老化に伴い変化する液性分子が加齢に伴う Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル活性化の要因である可能性が示唆された(4)。そして、最近になって、その液性分子の候補として補体の構成成分である C1q タンパク質が報告された(5)。このように、加齢に伴う Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化および筋組織再生の減弱は、主に筋系譜の細胞を取り巻く細胞外環境の変化により生じていると考えられている。一方、高齢マウス由来の筋系譜の細胞を単離培養すると、若齢マウス由来細胞と比較して、細胞増殖能や筋分化能が低いことから、加齢に伴う筋系譜の細胞の内在的な変化も筋分化や再生を抑制している可能性が考えられるが、その詳細については不明である。そこで、本研究では、筋系譜の細胞の加齢に伴う内在的变化として、「Wnt 受容体の発現量の変化」に焦点をあて、解析を行った。

## 【結果・考察】

はじめに、若齢マウス(2~3ヶ月齢)と高齢マウス(>22ヶ月齢)を用いて、加齢に伴う筋組織の変化を解析した結果、加齢に伴う筋重量の低下および筋グリコーゲン量の低下が認められた。さらに、Cardiotoxinにより筋損傷を誘発した後、再生過程の筋繊維径を解析した結果、若齢マウスと比較して高齢マウスでは細い筋繊維が多く筋再生能の低下が認められた。また、筋再生過程の高齢マウスの筋組織において Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の代表的な標的遺伝子である *Axin2* の発現が有意に高いことが分かった。これらの結果から、本研究で用いた高齢マウスは、サルコペニアを呈しており、筋組織中で加齢に伴った Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化が生じていることが示唆された。

次に、筋サテライト細胞特異的抗体である SM/C-2.6 抗体を用いて、筋組織における筋サテライト細胞の含有割合をフローサイトメトリーにより解析した結果、高齢マウスの筋組織では、筋サテライト細胞の含有割合が若齢マウスの筋組織の半分程度にまで減少していた。さらに、これら若齢および高齢マウスの筋組織から Fluorescence activated cell sorting 法により筋サテライト細胞を単離し、Wnt 受容体の遺伝子発現解析を行った。その結果、Frizzled1 (*Fzd1*)が高齢マウスの筋サテライト細胞で選択的に高発現していることを見出した。また若齢および高齢マウス由来の筋芽細胞を *in vitro* で分化誘導すると、高齢マウス由来筋芽細胞では分化過程を通して *Fzd1* および *Axin2* の発現が顕著に高く、筋分化後期のマーカーである *Myhc* の発現誘導は抑制された。さらに、高齢マウス由来の筋芽細胞では、特に筋分化後期に見られる細胞融合が阻害されていることを見出した。これらの結果から、高齢マウス由来の筋芽細胞では Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが *in vitro* においても活性化され、かつ筋分化が抑制されていることが示された。

そこで、筋系譜の細胞において *Fzd1* が Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化に寄与しているかどうかを検討するために、マウス筋サテライト細胞由来細胞株である C2C12 細胞に *Fzd1* 特異的な siRNA あるいは *Fzd1* 発現プラスミドを導入し、Wnt リガンド投与による Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルへの影響を検討した。その結果、siRNA により *Fzd1* を発現抑制すると、Wnt リガンド依存的な *Axin2* の発現誘導が低下し、*Fzd1* 発現プラスミドにより *Fzd1* を過剰発現させると、Wnt リガンド依存的な  $\beta$ -catenin の蓄積や TCF/LEF の転写活性化が促進した。これらの結果から、筋系譜の細胞において *Fzd1* は Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化に寄与していると考えられた。

次に、加齢に伴う筋分化抑制に *Fzd1* が関与しているかどうかについて検討するため、高齢マウス由来の筋芽細胞の *Fzd1* を siRNA により発現抑制し分化誘導を行った。その結果、*Fzd1* 発現抑制細胞では、対照群と比較して有意に細胞融合の亢進が認められた。他方、若齢マウス由来の筋芽細胞に *Fzd1* を過剰発現させると、細胞融合の抑制が認められた。これらの結果は、*Fzd1* が加齢に伴う筋分化抑制に関与していることを示している。

以上の結果から、筋サテライト細胞および筋芽細胞において、加齢に伴い *Fzd1* の発現が上昇することで Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが活性化され、筋分化が抑制されることが示された。

## 【総括】

これまで骨格筋細胞の加齢に伴う Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化は、加齢による細胞外環境変化によって生じていると考えられてきた。しかしながら、本研究によりはじめて、筋系譜の細胞における「*Fzd1* の発現上昇」という内在的变化によって老化依存的な Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化が惹起され、筋再生が抑制されている可能性が見出された。

一方、Wnt リガンドは哺乳類では 19 種類が知られているが、加齢に伴う Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化に *Fzd1* のリガンドとしてどの分子が機能しているのか、また、加齢に伴う *Fzd1* の発現誘導はどのように制御されているのかについては、今後さらなる解析が必要である。

## 【参考文献】

- 1) Narici, M.V. & Maffulli N. (2010) Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance. *Br. Med. Bull.* 95, 139-159
- 2) Chargé, S.B. & Rudnicki, M.A. (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 84, 209-238.
- 3) Anastas, J.N. & Moon, R.T. (2013) WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 13, 11-26.
- 4) Brack, A.S., *et al.* (2007) Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 317, 807-810.
- 5) Naito, A.T., *et al.* (2012) Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell* 149, 1298-1313.

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2423 号	氏 名	土井 亮助
論文題目 Title of Dissertation	Critical role of Frizzled1 in age-related alterations of Wnt/b-catenin signal in myogenic cells during differentiation 骨格筋分化過程での加齢に伴う Wnt/b-catenin シグナルの変化において Frizzled 1 が担う重要な役割		
審査委員 Examiner	主 査 予田 達史 Chief Examiner 副 査 匂坂 敏嗣 Vice-examiner 副 査 的 研 尚 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字~2, 000字程度)

【背景と目的】

近年、日本のみならず他の先進国においても高齢化が進み老年人口の割合が増加の一途を辿っている。代表的な老年症候群の一つである加齢性筋減弱症(サルコペニア)は、高齢者の QOL を脅かすのみならず、他の多くの疾患のリスク要因となることが知られている。このサルコペニアは、加齢に伴う筋再生能力の低下が主な要因として知られており、筋再生制御機構を解明することは、サルコペニアの予防または治療法の開発に繋がると期待され、医学的・社会的にも重要な課題である。筋線維の細胞膜上には、単核の細胞が接着しており、これが筋肉の幹細胞(筋サテライト細胞)である。成体筋組織中の筋サテライト細胞は、骨格筋の損傷時に放出される炎症性分泌因子などにより活性化され増殖を開始し、筋芽細胞に分化し、活発に分裂・増殖を繰り返しながら損傷部位へと遊走する。筋芽細胞は、互いにあるいは残存する筋線維と細胞融合して筋管細胞を形成する。筋管細胞はさらに構造的成熟を遂げ、筋線維となる。

発生過程の組織形成において主要な役割を担う Wnt/β-catenin シグナル経路は、Wnt リガンド存

在下において、その受容体である 7 回膜貫通型受容体 Fzd と LRP 5/6 を介して活性化され、細胞内で β-catenin を安定化する。細胞質内に蓄積した β-catenin は核内へと移行し、TCF/LEF 転写因子と複合体を形成することで *Axin2* などの標的遺伝子の転写を制御している。この Wnt/β-catenin シグナルは、高齢個体の様々な組織において活性化していることが知られており、骨格筋においても、高齢マウス由来の筋サテライト細胞を含む筋系譜の細胞で活性化することで筋組織の再生を減弱させることが報告されている。さらに、高齢マウス由来の筋系譜の細胞を単離培養し、若齢マウス由来の同系譜の細胞と比較して、細胞増殖能や筋分化能が低いことから、加齢に伴う筋系譜の細胞の内在的な変化が筋分化や再生を抑制している可能性が考えられるが、その詳細については不明である。そこで、本研究では、筋系譜の細胞の加齢に伴う内在的な変化として、「Wnt 受容体の発現量の変化」に焦点をあて、解析を行った。

【結果・考察】

本研究では、まず若齢および高齢マウスの前脛骨筋の筋線維およびグリコーゲン含有量を解析することで、高齢マウスでのサルコペニアの発症を確認した。次に筋サテライト細胞特異的抗体である SM/C-2.6 抗体を用いて、骨格筋組織における筋サテライト細胞の含有割合をフローサイトメトリーにより解析した結果、高齢マウスの筋組織では、筋サテライト細胞の含有割合が若齢マウスの筋組織の半分程度にまで減少していた。次に、若齢マウスおよび高齢マウスの骨格筋より SM/C-2.6 抗体を用いて FACS 法により筋サテライト細胞を単離した後、一連の Wnt 受容体の遺伝子発現を比較解析した結果、*Fzd1* が高齢マウスの筋サテライト細胞で選択的に高発現していることを見出した。若齢および高齢マウス由来の筋芽細胞を *in vitro* で分化誘導させると、高齢マウス由来筋芽細胞では分化過程を通して *Fzd1* および Wnt/β-catenin シグナルの標的遺伝子である *Axin2* の発現が顕著に高く、筋分化過程後期のマーカーである *Myhc* の発現誘導は抑制された。さらに、高齢マウス由来の筋芽細胞では、特に筋分化過程後期に見られる細胞融合が阻害されていることを見出した。また、筋芽細胞において *siRNA* により *Fzd1* を発現抑制すると、Wnt リガンド依存的な *Axin2* の発現誘導が低下し、*Fzd1* 発現プラスミドにより *Fzd1* を過剰発現させると、Wnt リガンド依存的な β-catenin の蓄積や TCF/LEF の転写活性化が促進した。これらの結果から、筋系譜の細胞において *Fzd1* は Wnt/β-catenin シグナルの活性化に寄与していると考えられた。また高齢マウス由来の筋芽細胞の細胞融合の抑制は、*Fzd1* を *siRNA* により発現阻害することにより改善され、他方、若齢マウス由来の筋芽細胞に発現プラスミドにより *Fzd1* を過剰発現させると、細胞融合の抑制が観察された。以上の結果から、本研究によりはじめて、筋系譜の細胞における「*Fzd1* の発現上昇」という内在的な変化によって老化依存的な Wnt/β-catenin シグナルの活性化が惹起され、筋再生が抑制されている可能性が見出された

本研究は、骨格筋における加齢に伴う Wnt/β-catenin シグナルの活性化およびそれに伴う筋分化・再生の抑制に関わる分子として *Fzd1* を同定し、*Fzd1* の機能について研究したものであるが、従来知られていなかった加齢に伴う筋系譜の細胞における *Fzd1* の発現上昇を見出し、その筋分化・再生における重要性を示したもので、重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。よって、本研究は、博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める。