早老症研究の最前線

2. ウェルナー症候群の基礎研究

Basic science of Werner syndrome

前澤 善朗

要 約

ウェルナー症候群は、思春期以降に白内障、白髪禿頭、メタボリックシンドロームや動脈硬化、悪性腫瘍などの老化徴候が早発する、単一遺伝子による早老症である。多くの早老症が小児期に発症し、発育、発達障害の要素を含む中、ウェルナー症候群は30代以降に発症することから、ヒトの老化のモデル病態と言われる。この疾患の老化機構については、テロメア、エピゲノム、ゲノム不安定性、酸化ストレスなど多くの知見が報告されており、本疾患の機序解析からヒトの一般老化の機序解明につながることを期待される。

Key words ウェルナー症候群、遺伝性早老症、エピゲノム、テロメア

(日老医誌 2021; 58: 402-408)

ウェルナー遺伝子・蛋白

ウェルナー症候群 (WS) の原因遺伝子 WRN は 1996 年にクローニングされた (WRN 遺伝子: OMIM 604611)¹⁾ RecQ 型 DNA helicase であり、1,432 個のアミノ酸から構成されている。現在までに 83 種類の変異が報告され、さらに新規変異が同定されている²⁾。日本人における遺伝子変異のほとんどが変異 1, 4, 6 と呼ばれる 3 種類の変異により占められ、なかでもタイプ 4 変異 (エクソン 26 の直前の塩基が G から C への変異による切断変異蛋白の形成: c.3139-1 G>C) は日本人 WS の約 7 割が保有し、創始者変異と考えられている (図 1)。

ウェルナー症候群の早老機序

WS の早老機序には WRN 蛋白/RecQ 型 DNA ヘリ

カーゼの機能喪失が関与する。WRN は DNA の修復、複製、組み換え、転写など、さまざまな核の機能に重要な役割を果たす。WRN 蛋白は ATP の存在下で 3' → 5' 方向に DNA の二重鎖を 1 重鎖にする。さらに WRN 蛋白の N 末端には 3' → 5' 方向に塩基を一つずつ取り除くエクソヌクレアーゼドメインを有している。大型放射光施設 Spring-8 を使った構造解析の結果、WRN 蛋白の winged-helix motif と呼ばれる突起構造が、DNA の 2 本鎖を解きほぐす「分子ナイフ」のように働くことが近年報告されている (図 2)³⁾。WRN 蛋白の C 末端には核移行シグナルが存在し WRN 蛋白は核内で働くが、いままでに報告された変異アレルから産生される WRN 蛋白は C 末を形成しない truncated protein となり核移行シグナルを欠損するため、核移行が阻害され機能障害をきたすと考えられている。このことが、今までに WS において明らかな変異と症候の相関が見られない原因であるとき

千葉大学大学院医学研究院内分泌代謝・血液・老年内科学

連絡責任者: 前澤善朗 千葉大学大学院医学研究院内分泌代謝・血液・老年内科学 [〒60-8670 千葉市中央区亥鼻 1-8-1]

e-mail: yoshiromaezawa@chiba-u.jp

doi: 10.3143/geriatrics.58.402

図1 WRN 遺伝子の模式図

エクソヌクレアーゼドメイン、RecQヘリカーゼドメインを持ち、C末に核移行シグナルを有する

図2 大型放射線施設 Spring 8 によって明らかになった WRN 遺伝子の機能のイメージ図
タンパクの突起がDNAの間にビックのように入り込み、DNA構造を解く（文献3）

れている（図2）。

(1) WRN と DNA 損傷修復

WRN 遺伝子の DNA 損傷修復、特に Double strand break (DSB) 後の修復における役割は多く報告されている。WRN 欠損線維芽細胞は DNA 修復異常を呈し、ゲノム不安定性を呈する。一部の WRN 欠損細胞は大きな染色体変異を生ずることが報告されている。WS 患者由来線維芽細胞にエクソヌクレアーゼドメイン欠損 WRN 蛋白、ヘリカーゼドメイン欠損 WRN、両者を欠損する WRN 蛋白を発現させると、興味深いことに、DNA 損傷修復は両者を欠損する WRN 蛋白を発現させた場合に最も改善する。すなわち、これらのドメインがバランスよく存在することが重要のようである。DSB 後の修復にはゲノムの相同配列を用いる相同組み換え (homologous recombination : HR) と損傷された両末端をつなぐ非相同末端結合 (non-

homologous end joining : NHEJ) という2つの修復形態がある。WRN は NHEJ の中でも、修復エラーの少ない classical-NHEJ を促進し、修復エラーが起こりやすい alternative-NHEJ を抑制することが近年報告され⁴⁾、WRN は DSB 後の修復過程を最適化する機能を有することが示唆されている。

(2) WRN とテロメア

また、WRN 蛋白はテロメア維持にも関与する。テロメアは TTAGGG の特徴的な繰り返し DNA 配列と、シュルテリン複合体と称される蛋白によって構成される染色体末端の複合体であり、染色体の DNA 末端を保護している。老化とともにテロメアは短縮し、テロメアが一定の長さをこえて短くなると、細胞は不可逆に増殖を停止し、細胞老化に至る。シュルテリン複合体は主に TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1, POT1 という6つの蛋白からなるが、WRN は POT1 や TRF2 と相互作用し、テロメアを維持する⁵⁾。WS の40~60歳の患者では、WSの30歳未満の患者や年齢が一致する非WSの患者より、著しいテロメアの短縮が見られる⁶⁾ことから、WRNの喪失によりテロメア短縮が加速すると考えられる。WS患者由来の線維芽細胞や血球、WRN 遺伝子欠損細胞などでは、染色体の癒合や分離不全が認められ、これはテロメアの機能不全に起因すると考えられている⁷⁾。WRN に変異があると、テロメア複製の際に生成されるグアニン4量体を解きほぐすことができず、DNA合成のLagging strandが停止し複製ができなくなることで、テロメアの短縮が加速すると推察されている⁸⁾。実際に、テロメラーゼ活性を再導入することによりウェルナー患者由来の細胞のテロメア欠損や細胞老化を抑制できると報告されており⁹⁾、WSの表現系の少なくとも一部はテロメア障害によるものと考えられる（図3）。

図3 シェルテリン複合体と WRN の相互作用

WRN はテロメア複製の際に生じる G4 量体や、テロメアの t-loop 構造と呼ばれる DNA のループを解きほぐす役割を担う。テロメアのシェルテリン複合体の一部である POT1 や TRF2 は、WRN のこの機能を促進する。

テロメアにおいては、長寿遺伝子 Sirtuin の一つである SIRT6 が Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) 依存性に histone H3K9 のアセチル化を除去するが、WRN がテロメアクロマチンに結合するためには、SIRT6 によるヒストンアセチル化が必要であり、WRN はテロメアの精妙な調節に参画している¹⁰⁾。一方、WS 患者由来の肝細胞ではテロメアの短縮は観察されず、皮膚のケラチノサイトもテロメラゼ活性を保持し、継代老化を示さなかったとの報告もあり¹¹⁾、WRN 欠損によるテロメア障害は組織により異なるようである。近年当研究室では、WS における四肢と体幹の線維芽細胞の変化に着目した。WS では、体幹は比較的ふくよかであるが、四肢の萎縮が非常に強く難治性皮膚潰瘍に至る。検討の結果、腹部と比較し、末梢においては細胞老化の亢進とテロメアの短縮を認めた。興味深いことに、末梢の線維芽細胞は、骨分化能を有し、脂肪分化能が著しく減弱しており、WS の病態を反映していた¹²⁾(図4)。

(3) WRN KO マウスの表現型

WS はヒトにおいては顕著な表現型を呈するが、欠損マウスの表現型がほとんど無いことも WRN の特徴である。最初の WRN 変異マウスは 1998 年に helicase ドメインの触媒サイトのみ欠損する形で作成されたが、13 カ月程度の検討では白髪、短命などの老化徴候を示さず、一方でヘテロ同士を交配した場合の出生率は野生型：ヘテロ：ホモ=1：1.9：0.6 と、KO マウスの出生率が低下していた。また、KO マウス由来の ES 細胞はカンプトテシンなどのトポイソメラーゼ阻

害薬への感受性が上昇した¹³⁾。このマウスを長期観察すると、20 カ月以降に軽度の寿命短縮がみられ、肝臓における活性酸素の蓄積と脂肪肝を呈した¹⁴⁾。一方、Guarente らのグループは WRN 遺伝子のエクソン 18 以降 (helicase ドメインの C 末の大部分) を欠損するマウスを作成したが、このマウスは全く老化徴候を示さず、しかし、DNA 傷害からゲノムを保護する分子である P53 KO マウスとのダブル KO マウスで寿命の短縮が認められた¹⁵⁾。また、興味深いことに WRN KO マウスは、テロメア維持複合体の non-coding RNA である Terc (Telomere RNA component) 欠損マウスとの double KO により、5~6 世代後に白髪、白内障、亀背、短命といった老化表現系を生ずる¹⁶⁾。このように WRN KO マウスの表現型が軽微であるメカニズムははっきりしていないが、WRN の欠損を補完する機構の存在、もともと短命であることから、蓄積する DNA 損傷自体が十分でない可能性、WS の表現型がテロメア依存性であり、マウスではテロメラゼ活性が比較的高いことで表現型がマスクされているといった理由が考えられている。

(4) WRN と幹細胞老化、Epigenome 制御

WS は幹細胞の老化や Epigenetic 制御にも関与する。細胞は老化すると細胞質の肥大と核の膨化をきたし、従来見られる転写不活性型の Heterochromatin 構造が緩み、転写が起こりやすい構造である Euchromatin 優位となると言われている¹⁷⁾。2015 年に Salk 研究所の Belmonte らのグループは、WRN 欠損 ES 細胞を作成したところ、内胚葉、中胚葉、外胚葉への

脂肪分化能は足部で抑制される

骨分化能は体幹と足部で差がない

図4 ウェルナー症候群線維芽細胞の体幹、末梢における特徴の違い
(Kato et al. Aging (Albany NY). 2021 ; 13 (4) : 4946-61. より引用改変)

分化能、並びにES細胞の増殖などには全く異常は見られなかった。興味深いことに、このWRN欠損ES細胞から間葉系幹細胞 mesenchymal stem cell (MSC) を分化誘導すると、増殖の低下、老化関連Beta-Gal染色やp16, p21などの細胞周期抑制性の老化マーカー、IL6やIL8といったSenescence associated secretory phenotype (SASP, 老化関連分泌現象)と呼ばれる炎症性サイトカインの増加を呈し、細胞老化をきたしていた。さらにWRN蛋白はHistone methyltransferaseであるSUV39H1, LAP2beta, HP1alphaといった蛋白と相互作用しヒストンのメチル化を制御するが、WRN欠損株においてはこの機構が障害され、結果として、H3K9me3やH3K27me3が減少し老化形質を呈していることが判明した(図5)¹⁸⁾。実際のWS患者におけるエピゲノムの知見も報告されている。Steve Horvathらは、ゲノムの391個のCpG領域のDNAメチル化解析により細胞や組織の老化を推

算する、DNAメチル化年齢(Epigenetic Clock)を提唱している。この方法を用いてWS患者の全血のDNAメチル化を解析すると、WSは健常群と比較して平均6.4年メチル化年齢が高い¹⁹⁾。しかしながら更なる解析により、WSにおけるDNAのメチル化はLMNA1, POLD1など、WSでの発現変化が報告されている領域に変化を生じており、一方でLINE1やALUといった老化に伴って変化するレトロトランスポゾン領域には変化をきたさないことから、WSの老化は正常老化のエピゲノムと一部異なっていると考えられている²⁰⁾。

(5) WS患者由来iPS細胞

前述のようにWRNを欠損したES細胞は明らかな表現系を示さないが、それでは、生涯にわたるDNA傷害が蓄積しているWS患者細胞から作成したiPS細胞ではどうだろうか。2014年に嶋本らは、WS患

図5 WRN ノックアウト MSC の細胞老化表現型とエピゲノム変化
(Zhang et al. Science5 JUNE 2015 • VOL 348 ISSUE 6239. より引用改変)

者の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立した。この iPS 細胞は、2 年以上にわたって無限増殖能を有し、未分化状態を保持し、培養期間に染色体異常の増加もみられなかったが、一方で、体細胞への分化誘導を行うと、早期老化徴候が見られた。さらにこの表現型の一部は、リプログラミングによるテロメアの延伸によるものと推察された²¹⁾。同時期に米国の National Institute of Health においても WS 特異的 iPS 細胞が樹立され、MSC へ誘導すると早期老化が見られるが、外胚葉である神経前駆細胞へ分化させても老化は見られなかった。WS 特異的 iPS 細胞から誘導した MSC は様々な増殖因子の発現低下をきたし、軟骨や骨、脂肪への分化能が減弱していた²²⁾。このような MSC での異常と、他の胚葉由来組織が比較的保たれるという知見は、WS において皮下組織の萎縮、内臓脂肪蓄積、心筋梗塞、間葉系肉腫をきたすが、認知機能低下は来し難いという、間葉系組織に異常が集中する症候と一致している。近年、MSC は皮膚潰瘍、糖尿病を含むさまざまな病態における細胞治療として期待されており、WS においても潜在的な治療戦略となる可能性がある。

(6) 悪性腫瘍と WRN

WS 患者は悪性腫瘍を高率に合併する。その機構としては、WRN の欠損によるゲノム不安定性から、DNA 傷害が蓄積して腫瘍化に至ると考えられている。その一方で、一見全く逆の事象のように見えるが、WRN は癌治療における合成致死性の遺伝子として注

目されている。合成致死 (Synthetic lethality) とは、一つの遺伝子の欠損では細胞に致死性を示さないが、2 つ以上の経路が同時に欠損、障害されることで細胞死が惹起される現象をさす。2019 年に、CRISPR あるいは RNAi を使用したスクリーニングにより、DNA ミスマッチ修復機構の不全によって起こる microsatellite instability (マイクロサテライト不安定性, MSI) を示す腫瘍は、数ある遺伝子の中で WRN を欠損あるいは抑制すると細胞生存が著しく減少すると報告された。これらの細胞では WRN 欠損により、DNA 切断、アポトーシスがおこる。一方で MSI のない癌細胞では、WRN が減少しても生存は変わらない²³⁾²⁴⁾。さらに 2021 年に入って、60 の MSI を有する前臨床がんモデルを用いた検討で、WRN を欠損すると癌細胞が死んでいくという現象は、幅広く認められることが報告された。すなわち、MSI を有する悪性腫瘍において、最初のあるいは抗がん剤耐性獲得後といった幅広い状況において、WRN を標的とした治療が有効である可能性がある²⁵⁾。これらは、WS 患者ではなく、WRN 遺伝子の腫瘍における機能についての知見であるが、WRN 遺伝子が抑制されることに生物学的アドバンテージがあるという事実は、WRN 変異を hetero で有する population が相当数存在することの意義を示しているのかもしれない。

(7) その他

細胞レベルでは p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) 阻害剤が WS 患者由来の線維芽

細胞の複製能力を向上させたことや, mechanistic target of rapamycin (mTOR) 阻害剤である Rapamycin が WRN 遺伝子ノックダウン細胞においてオートファジー経路を活性化し細胞内蛋白凝集を軽減させ DNA 障害を減少させたと報告されている²⁶⁾。カロテノイドの一つであるアスタキサンチンが WS 患者で高率に観察される脂肪肝を改善させたとの報告もある²⁷⁾。

おわりに

WRN 遺伝子の同定から 20 年以上が経つが、マウスに表現型がない、細胞が早期老化をきたし培養が困難であるといった制約から、WS の病態解明研究はいままで困難であった。しかしながら近年、幹細胞生物学や遺伝子改変技術の進歩により、WS の分子機構と治療への展望が徐々にひらけつつある。一方、糖尿病や脂質異常症などの代謝合併症の管理の改善や、難治性皮膚潰瘍の治療の進歩により、WS 患者の平均寿命は以前よりも延長しているものの²⁸⁾、その治療は依然として対症療法しかない。WS の患者は高頻度に難治性皮膚潰瘍や足切断に苦しんでおり、今後、根本的な治療法の開発により、この難病の治療に新たな光がもたらされることが期待される。

著者の COI (Conflict of Interest) 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文献

- 1) Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama F, Alisch R, et al.: Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 1996; 272 (5259): 258-262.
- 2) Yokote K, Chanprasert S, Lee L, Eirich K, Takemoto M, Watanabe A, et al.: WRN Mutation Update: Mutation Spectrum, Patient Registries, and Translational Prospects. *Hum Mutat* 2017; 38 (1): 7-15.
- 3) Kitano K, Kim SY, Hakoshima T: Structural basis for DNA strand separation by the unconventional winged-helix domain of RecQ helicase WRN. *Structure* 2010; 18 (2): 177-187.
- 4) Shamanna RA, Lu H, de Freitas JK, Tian J, Croteau DL, Bohr VA: WRN regulates pathway choice between classical and alternative non-homologous end joining. *Nature communications* 7: 13785.
- 5) Opresko PL, Otterlei M, Graakjaer J, Bruheim P, Dawut L, Kolvraa S, et al.: The Werner syndrome helicase and exonuclease cooperate to resolve telomeric D loops in a manner regulated by TRF1 and TRF2. *Mol Cell* 2004; 14 (6): 763-774.
- 6) Ishikawa N, Nakamura K, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishii A, Goto M, et al.: Accelerated in vivo epidermal telomere loss in Werner syndrome. *Aging (Albany NY)* 2011; 3 (4): 417-429.
- 7) Crabbe L, Jauch A, Naeger CM, Holtgreve-Grez H, Karlseder J: Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104 (7): 2205-2210.
- 8) Shimamoto A, Yokote K, Tahara H: Werner Syndrome-specific induced pluripotent stem cells: recovery of telomere function by reprogramming. *Front Genet* 2015; 6: 10.
- 9) Wyllie FS, Jones CJ, Skinner JW, Haughton MF, Wallis C, Wynford-Thomas D, et al.: Telomerase prevents the accelerated cell ageing of Werner syndrome fibroblasts. *Nat Genet* 2000; 24 (1): 16-17.
- 10) Michishita E, McCord RA, Berber E, Kioi M, Padilla-Nash H, Damian M, et al.: SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature* 2008; 452 (7186): 492-496.
- 11) Tokita M, Kennedy SR, Risques RA, Chun SG, Pritchard C, Oshima J, et al.: Werner syndrome through the lens of tissue and tumour genomics. *Sci Rep* 6: 32038.
- 12) Kato H, Maezawa Y, Takayama N, Ouchi Y, Kaneko H, Kinoshita D, et al.: Fibroblasts from different body parts exhibit distinct phenotypes in adult progeria Werner syndrome. *Aging (Albany NY)* 2021; 13 (4): 4946-4961.
- 13) Lebel M, Leder P: A deletion within the murine Werner syndrome helicase induces sensitivity to inhibitors of topoisomerase and loss of cellular proliferative capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95 (22): 13097-13102.
- 14) Massip L, Garand C, Paquet ER, Cogger VC, O'Reilly JN, Tworek L, et al.: Vitamin C restores healthy aging in a mouse model for Werner syndrome. *FASEB J* 2010; 24 (1): 158-172.
- 15) Lombard DB, Beard C, Johnson B, Marciniak RA, Dausman J, Bronson R, et al.: Mutations in the WRN gene in mice accelerate mortality in a p53-null background.

- ground. *Mol Cell Biol* 2000; 20 (9): 3286–3291.
- 16) Chang S, Multani AS, Cabrera NG, Naylor ML, Laud P, Lombard D, et al.: Essential role of limiting telomeres in the pathogenesis of Werner syndrome. *Nat Genet* 2004; 36 (8): 877–882.
 - 17) Zhang W, Qu J, Liu GH, Belmonte JCI: The ageing epigenome and its rejuvenation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21 (3): 137–150.
 - 18) Zhang W, Li J, Suzuki K, Qu J, Wang P, Zhou J, et al.: Aging stem cells. A Werner syndrome stem cell model unveils heterochromatin alterations as a driver of human aging. *Science* 2015; 348 (6239): 1160–1163.
 - 19) Maierhofer A, Flunkert J, Oshima J, Martin GM, Haaf T, Horvath S: Accelerated epigenetic aging in Werner syndrome. *Aging (Albany NY)* 2017; 9 (4): 1143–1152.
 - 20) Maierhofer A, Flunkert J, Oshima J, Martin GM, Poot M, Nanda I, et al.: Epigenetic signatures of Werner syndrome occur early in life and are distinct from normal epigenetic aging processes. *Aging Cell* 2019; 18 (5): e12995.
 - 21) Shimamoto A, Kagawa H, Zensho K, Sera Y, Kazuki Y, Osaki M, et al.: Reprogramming suppresses premature senescence phenotypes of Werner syndrome cells and maintains chromosomal stability over long-term culture. *PLoS One* 2014; 9 (11): e112900.
 - 22) Tu J, Wan C, Zhang F, Cao L, Law PWN, Tian Y, et al.: Genetic correction of Werner syndrome gene reveals impaired pro-angiogenic function and HGF insufficiency in mesenchymal stem cells. *Aging Cell* 2020; 19 (5): e13116.
 - 23) van Wietmarschen N, Sridharan S, Nathan WJ, Tubbs A, Chan EM, Callen E, et al.: Repeat expansions confer WRN dependence in microsatellite-unstable cancers. *Nature* 2020; 586 (7828): 292–298.
 - 24) Chan EM, Shibue T, McFarland JM, Gaeta B, Ghandi M, Dumont N, et al.: WRN helicase is a synthetic lethal target in microsatellite unstable cancers. *Nature* 2019; 568 (7753): 551–556.
 - 25) Picco G, Cattaneo CM, van Vliet EJ, Crisafulli G, Rospo G, Consonni S, et al.: Werner helicase is a synthetic-lethal vulnerability in Mismatch Repair-Deficient Colorectal Cancer Refractory to Targeted Therapies, Chemotherapy and Immunotherapy. *Cancer Discov* 2021.
 - 26) Saha B, Cypro A, Martin GM, Oshima J: Rapamycin decreases DNA damage accumulation and enhances cell growth of WRN-deficient human fibroblasts. *Aging cell* 2014; 13 (3): 573–575.
 - 27) Takemoto M, Yamaga M, Furuichi Y, Yokote K: As-taxanthin Improves Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Werner Syndrome with Diabetes Mellitus. *J Am Geriatr Soc* 2015; 63 (6): 1271–1273.
 - 28) Yokote K, Saito Y: Extension of the life span in patients with Werner syndrome. *J Am Geriatr Soc* 2008; 56 (9): 1770–1771.