

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09196

研究課題名(和文)半月板の形成、恒常性及び損傷後修復におけるBMPの生理機能の解析

研究課題名(英文)Physiological roles of BMP2 in meniscus homeostasis

研究代表者

辻 邦和 (Tsuji, Kunikazu)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任教授

研究者番号：20323694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：半月板は膝関節機能の維持に必須の組織であるにも関わらず、その形成、成熟、恒常性の分子機序は未だ明らかとされていない。私たちはこれまでに、マウス胎仔肢芽の間葉組織特異的に骨形成因子BMP2を欠損させると、半月板原基の軟骨分化が非常に強く阻害され、円板状半月板様の形態異常が生じることを明らかとしてきた。本研究では、半月板及び隣接する関節軟骨におけるTGF β /BMPファミリー分子の時空間的発現解析を行った。さらに間葉系幹細胞の凝集塊に対して軟骨分化誘導をかけた時にTGF β /BMPファミリー分子がどのような遺伝子の活性化を行うか網羅的解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

半月板は関節機能の維持に必須の組織であるにも関わらず、その発生並びに恒常性の分子機序はほとんど解析されていない。近年では、半月板機能の低下が変形性膝関節症の発症並びに増悪に深く関与していることが報告されている。本研究の成果は、半月板機能の維持に必要な分子機序の解明につながることで期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the physiological roles of Bmp2, Bmp4, and Bmp7 in postnatal joint homeostasis, we have created limb specific Bmp conditional knockout mice (Bmp2c/c;Prx1::cre, Bmp4c/c;Prx1::cre, Bmp7c/c;Prx1::cre). We have reported that conditional null mutation of Bmp2 results in the malformation of meniscus and down regulation of type II collagen expression in the superficial region of articular cartilage within 2 weeks after birth. We also reported that conditional null mutation of Bmp7 results in the reduction of proteoglycan contents in articular cartilage after 8 weeks of age. In contrast, we observed subtle morphological changes in articular cartilage and meniscus in the absence of Bmp4. In this study, to further analyze the physiological roles of BMP2 during the knee joint development and in the postnatal homeostasis, we analyzed the spatiotemporal expressions of BMP molecules in the knee joint. We also analyzed the target molecules regulated by BMPs in chondrocytes.

研究分野：整形外科学

キーワード：BMP TGF β 半月板 関節軟骨

1. 研究開始当初の背景

半月板は、膝関節の大腿骨と脛骨の間に位置する、三日月型の線維軟骨組織である。膝関節の力学的負荷の低減、安定化、及び潤滑に機能しているため、半月板の損傷や、半月板切除術の施行による半月板機能の喪失、加齢に伴う半月板の細胞外基質の退行変性に起因する機能低下は、慢性的な関節疼痛や日常生活動作(ADL)の減少に直接結びつく症状を誘導するとともに、隣接する関節軟骨の変性を引き起こし、変形性膝関節症の重要な危険因子となることが報告されている。

半月板は、解剖学的には、比較的血管に富む外縁領域、ほぼ無血管組織である内縁領域とその中間の領域の3種類に分類されている。外縁部の損傷に対しては、縫合術が施行される例が多く、その術後成績も概ね良好とされている。これに対して、内縁部は自己修復能力に劣るため、一般的に正常と思われる領域を残して切除(トリミング)を行うことが多い。内縁部と外縁部の修復能力の差は血管分布の差や細胞外基質の質的差異に起因すると考えられているが、詳しい理由は未だ不明である。半月板の部位毎の損傷後修復能力の違いを科学的に解釈するためには、胎生期、生後の半月板形成過程や、半月板機能発現に重要と考えられる生後の組織の成熟のプロセスの詳細な解析が重要であると考えられるが、この領域の研究は、現在までほとんど進捗が得られていない。

半月板の機能異常を引き起こすもう一つの要因として、半月板形成異常があげられる。その中でも円板状半月板は、1889年にYoungらによって初めて報告された先天性の形態異常で、白人種に比して、日本人を含むアジア系人種で特に発症頻度が高い(人口の約20%)ことが報告されている。円板状半月板と半月板損傷は、MRI画像所見から診断されるが、円板状半月板は、正常な半月板よりも組織の断裂が生じる頻度が有意に高いことが示されている。しかしながら、その理由が形態異常による過度な力学的負荷が主原因であるのか、半月板の器質的变化による物理強度の低下のためであるか検証されていない。Atay等による透過型電子顕微鏡を用いた構造解析では、円板状半月板の細胞外基質では、コラーゲン線維密度が正常半月板よりも低下することが定性的に示されているが、これが半月板機能(力学的負荷の低減や膝関節の安定性)にどのように影響しているかは明らかとされていない。私は、生後の骨組織の恒常性におけるBMP(Bone Morphogenetic Protein, 骨形成因子)の生理機能の解析を行う目的で四肢特異的BMP欠損マウスを作成し、膝関節を含む四肢の骨格の表現型の解析を行ってきた(1-5)。その過程で、生後の骨代謝において最も中心的に機能することが示されているBMP2を骨格形成期に欠損したマウス(*Bmp2^{fl/c};Prx1::cre*)では、半月板の形成異常が観察されることを発見した(4)。

- (1) Gamer LW, Tsuji K, Cox K, Capelo LP, Lowery J, Beppu H, Rosen V. BMPR-II is dispensable for formation of the limb skeleton. *Genesis*. 2011 Sep;49(9):719-24.
- (2) Tsuji K, Cox K, Gamer L, Graf D, Economides A, Rosen V. Conditional deletion of BMP7 from the limb skeleton does not affect bone formation or fracture repair. *J Orthop Res*. 2010 Mar;28(3):384-9.

- (3) Tsuji K, Cox K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Tabin CJ, Rosen V. BMP4 is dispensable for skeletogenesis and fracture-healing in the limb. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Feb;90 S1:14-8.
- (4) Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, Einhorn T, Tabin CJ, Rosen V. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet*. 2006 Dec;38(12):1424-9.
- (5) Bandyopadhyay A, Tsuji K (equally contributed), Cox K, Harfe BD, Rosen V, Tabin CJ. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genetics*. 2006 Dec;2(12):e216.

(2)本研究の目的

BMP は TGFb スーパーファミリーに属する分子で、細胞膜表面に存在する Ser/Thr キナーゼ活性を持つ受容体に結合し、転写因子としての活性を有する Smad タンパクのリン酸化を介して標的遺伝子の転写活性化を誘導する。これらファミリー分子は、骨、軟骨のみならず形態形成期においてほぼ全ての臓器の発生に関与する Growth/Differentiation Factor として機能することが報告されている。

これまでの研究成果を踏まえて、本研究では、半月板における BMP/TGFb の情報伝達経路を詳細に解析し、その形態形成、成熟、恒常性及び損傷後修復のプロセスにおける分子機能を明らかとすることを目的とする。さらに、ヒトの円板状半月板と BMP2 欠損マウス由来半月板の組織学的、物性学的差異の比較を行い、マウスより得られた知見が、どの程度ヒトの円板状半月板の病態を説明し得るか検証を行う。さらに軟骨、骨分化における BMP/TGFb の標的遺伝子の探索を行う。

本研究計画は、私たちが行ってきた四肢の間葉系組織特異的 BMP2 欠損マウスの表現型の解析から明らかとなった新たな知見を基に立案されており、独自性は担保されている。ヒトの円板状半月板はアジア人に多く見られる形態異常で、膝関節の痛み、腫脹、引っかかり感等の症状が観察される。また、正常な半月板よりも断裂が生じる頻度が有意に高く、変形性膝関節症の早期発症のリスクと考えられている。しかしながら詳しい病態が解析されていないため、現在は外科的に切除を行うこと以外に対策（治療）はない。本研究の成果は、ヒトの円板状半月板の診断やより効果的な治療法の開発に応用できる可能性が期待できる。

3. 研究の方法

本研究は、本学の遺伝子組み換え実験委員会と動物実験委員会の承認を得て行われた。四肢特異的 BMP 欠損マウスは *Bmp^{c/c}* (雌) マウスを *Bmp^{c/wt};Prx1::cre* (雄) マウスと交配させることにより得た。半月板および関節軟骨の解析のため、マウスを経時的に安楽死させ、膝組織を 4%PFA を用いて固定後、脱灰し、パラフィン包埋を行った。ミクロトームを用いてパラフィンブロックから 5mm 厚の矢状断切片を作成し、染色(ヘマトキシリン、エオジン染色またはサフラニン O 染色)並びに BMP 分子に対する免疫染色を行って、組織学的解析を行った。

また、軟骨分化誘導時における BMP/TGFb 標的遺伝子の探索は、軟骨前駆細胞の in vitro spheroid culture の系を用いて、total RNA Sequencing により行った。

4. 研究成果

4-1. 四肢特異的 BMP2 欠損マウスにおける半月板形成異常の解析

四肢特異的 BMP2 欠損マウスの膝関節の詳細な形態学的解析を行ったところ、BMP2 マウスでは、生後 1 週目で、100%の確率で内側半月板に円板状半月板様の形成異常、すなわち半月板内縁部の拡大を確認した。この形成異常は、生後 15 週齢まで 100%の確率で同様に観察された。

半月板の形成異常がいつから観察されるかを検討するため、胎生期のマウスの膝の組織学的解析を行ったところ、出生時における半月板原器に顕著な差は観察されないことが判明した。生後の半月板の組織学的解析では、コントロールマウスにおいては半月板の予定領域への間葉細胞の集積は生後 2 週までに完了し、その後、軟骨分化のプロセスが開始され、15 週では前節の一部の骨化が観察された)。これに対して BMP2 欠損マウスでは、半月板予定領域への細胞の集積は、コントロールマウス同様に起こるが、生後 2 週目以降に観察されていた軟骨分化のプロセスが完全に阻害されていることが明らかとなった。これ等の結果は、BMP2 は胎生期における半月板原器の形成には必須ではないが、生後の半月板の成熟に必須であることを示唆している。

BMP 活性の欠損による生後の半月板の成熟阻害が隣接する関節軟骨に及ぼす影響を組織学的に解析したところ、半月板の成熟の阻害が観察される生後 2 週以降でプロテオグリカン量の低下（サフラニン O 染色性の低下）が観察された。

4-2. 四肢特異的 BMP4, BMP7 欠損マウスにおける半月板形成異常並びに関節軟骨の表現型の解析

BMP2 と同様に異所性に骨組織を誘導することができる BMP/TGF β スーパーファミリー分子の中で、発生過程において、骨格原器において BMP2 とオーバーラップした発現が観察されている BMP4、および BMP7 を用いて四肢特異的遺伝子欠損マウス (*Bmp4^{fl/c}; Prx1::cre*、*Bmp7^{fl/c}; Prx1::cre*) を作成し、膝関節の表現型の解析を行った。その結果、四肢特異的 BMP2 欠損マウスの表現型とは異なり、BMP4 及び BMP7 の欠損マウスでは、半月板の形成、並びに生後の maturation のプロセスにおいて、組織学的に著名な変化は観察されなかった。このことは、半月板組織における BMP2 の分子機能の特異性を示していると考えている。これが、BMP2, BMP4, BMP7 分子のそれぞれの分子機能の差異によるものなのか、それとも時空間的な発現制御の差異によるものなのかを検証するため、膝組織における BMP2, BMP4, BMP7 の発現を経時的に免疫組織学的に観察したところ、BMP2 が軟骨表層並びに深層において発現が観察されたのに対して、BMP4 は、主に軟骨の深層に発現が観察され、表層には発現が観察されなかった。BMP7 は、発生過程においては、軟骨の表層と深層に発現が観察されるが、生後、8 週齢までに、軟骨表層細胞における発現が消失することが明らかとなった。詳細な発現制御機構はいまだ未知であるが、軟骨表層における BMP7 の発現が生後に低下することは、四肢特異的 BMP7 欠損マウスにおいて、生後、関節軟骨の退行変性が加速することの一因となっている可能性が考えられる。一方で、四肢特異的 BMP4 欠損マウスにおいて関節の表現型が観察されなかった理由として、BMP4 の発現が常に他の BMP 分子とオーバーラップしていたため、BMP4 の発現低下が、他の分子の活性により相補されたと予想している。

4-3. *in vitro* spheroid culture 系を用いた軟骨分化過程における BMP/TGF β 分子の標的遺伝子の検索

膝滑膜由来の線維芽細胞は、*in vitro* で二次元培養することにより、骨、軟骨、脂肪細胞に分化誘導できる多能性幹細胞様の細胞集団を形成する。この細胞を BMP 並びに TGF β 存在下で spheroid culture を行うことにより、軟骨細胞様細胞に分化誘導できることが、報告されている。本実験系を用いて、軟骨分化誘導時における BMP/TGF β ファミリー分子の標的遺伝子の発現解析を、Total RNA Sequencing 法を用いて行った。その結果、BMP/TGF β シグナルにより活性化される一連の遺伝子群の同定を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tang Guo, Asou Yoshinori, Matsumura Etsuko, Nakagawa Yusuke, Miyatake Kazumasa, Katagiri Hiroki, Nakamura Tomomasa, Koga Hideyuki, Komori Keiichiro, Sekiya Ichiro, Ezura Yoich, Tsuji Kunikazu	4. 巻 8
2. 論文標題 Short cytoplasmic isoform of IL1R1/CD121a mediates IL1 induced proliferation of synovium-derived mesenchymal stem/stromal cells through ERK1/2 pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e09476 ~ e09476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2022.e09476	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Isono Masaaki, Takeuchi Jun, Maehara Ami, Nakagawa Yusuke, Katagiri Hiroki, Miyatake Kazumasa, Sekiya Ichiro, Koga Hideyuki, Asou Yoshinori, Tsuji Kunikazu	4. 巻 8
2. 論文標題 Effect of CD44 signal axis in the gain of mesenchymal stem cell surface antigens from synovial fibroblasts in vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e10739 ~ e10739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2022.e10739	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakagawa Yusuke, Tsuji Kunikazu, Nakamura Tomomasa, Katagiri Hiroki, Ozeki Nobutake, Shioda Mikio, An Jae-Sung, Yoshida Ryu, Sekiya Ichiro, Koga Hideyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Association of Infrapatellar Fat Pad Fibrosis at 3 Months After ACL Reconstruction With Short-term Clinical Outcomes and Inflammatory Cytokine Levels in the Synovial Fluid	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Orthopaedic Journal of Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/23259671231164122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa Shoichi, An Jae-Sung, Hino Jun, Amano Yusuke, Nakagawa Yusuke, Miyatake Kazumasa, Katagiri Hiroki, Nakamura Tomomasa, Sekiya Ichiro, Koga Hideyuki, Tsuji Kunikazu	4. 巻 31
2. 論文標題 Therapeutic effect of C-type natriuretic peptide on persistent pain in a rat knee arthritis model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Surgery	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/10225536231181708	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	古賀 英之 (Koga Hideyuki) (30594080)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	
研究分担者	宮武 和正 (Miyatake Kazumasa) (00777435)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師 (12602)	
研究分担者	片桐 洋樹 (Katagiri Hiroki) (50795028)	東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤講師 (12602)	
研究分担者	中川 裕介 (Nakagawa Yusuke) (60822666)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授 (12602)	
研究分担者	中村 智祐 (Nakamura Tomomasa) (90725201)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授 (12602)	
研究分担者	関矢 一郎 (Sekiya Ichiro) (10345291)	東京医科歯科大学・統合研究機構・教授 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------