

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09056

研究課題名(和文) 骨形成因子BMP2による半月板の恒常性の分子機構の解析

研究課題名(英文) Roles of Bone Morphogenetic Protein 2 in postnatal meniscus homeostasis

研究代表者

古賀 英之 (Koga, Hideyuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30594080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：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構はほとんど解析されていない。本研究では、半月板の形成、成熟、恒常性及び損傷後修復のプロセスにおけるBMP2の生理機能を明らかとすることを目的としている。半月板形成過程でBMP2を欠損したマウスでは、軟骨分化(成熟)のプロセスが完全に阻害されることを発見した。一方で関節形成初期に、四肢の間葉組織特異的にBMP4またはBMP7を欠損させたマウスでは、半月板の形成に異常は観察されなかった。以上の結果は、半月板形成過程においてBMP2が必須かつ特異的な生理機能を有することを示唆している。

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構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構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) and analyzed age related knee joint phenotypes. 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 (not published). In this study we focused on the analyses of meniscus formation in the absence of Bmp2 and showed that chondrogenic differentiation of the cells reside in the meniscus primordium was strictly inhibited after birth.

研究分野：整形外科

キーワード：半月板 骨形成因子 BMP2 BMP4 BMP7

## 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、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と考えられている。半月板損傷や、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、関節疼痛や膝のロッキング等の日常生活動作(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(Atay et al. *Am J Sports Med.* 35(3): 475-8, 2007)。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。私たちは、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(1-4)。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<sup>fl/c</sup>;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.

## (2) 本研究の目的

本研究では、半月板における BMP2 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。

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、マウスを計時的に安楽死させ、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。パラフィンブロックをマイクロトームを用いて 5mm 厚に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）を行って、組織学的解析を行った。

## 4. 研究成果

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

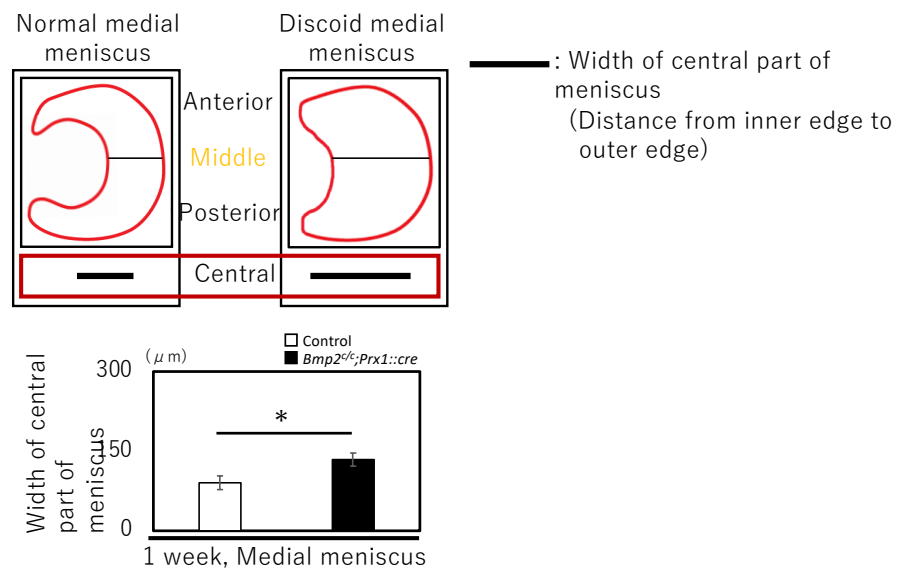


図1. 四肢特異的BMP2欠損マウスは、円板状半月板の表現型を示す

縁部の拡大を確認した (図1)。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(図2)。

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(図3)。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

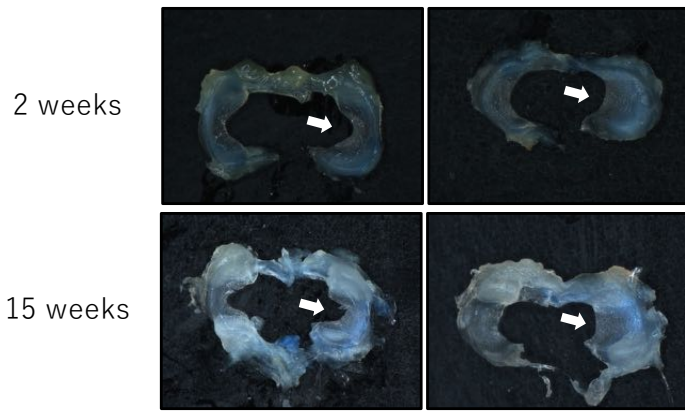


図2. 四肢特異的BMP2欠損マウスの生後2週、15週における半月板の形態  
四肢特異的BMP2欠損マウスは、100%の確率で円板状半月板の表現型を示す

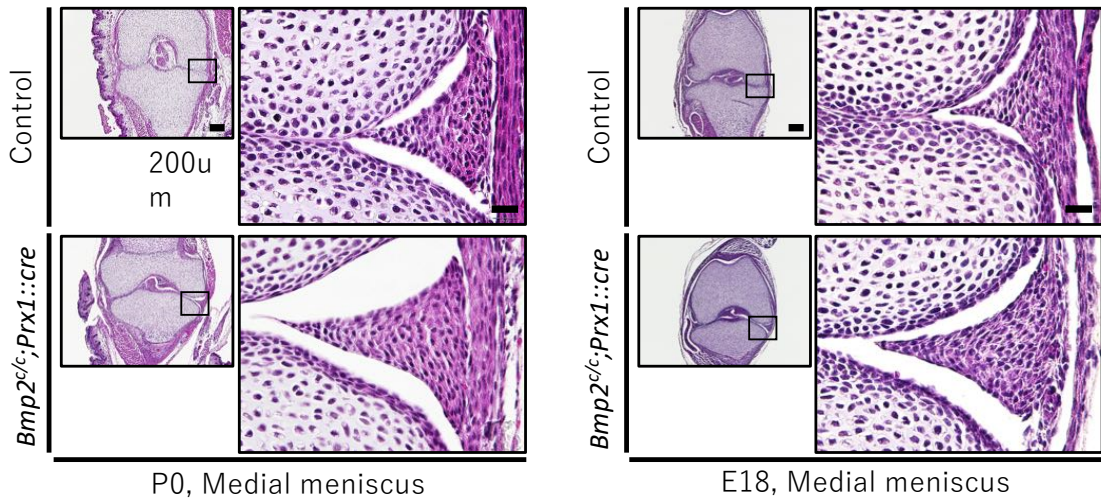


図3. 四肢特異的BMP2欠損マウスの胎生期の半月板原器の形成はほぼ正常に観察される(ヘマトキシリン、エオジン染色)

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(図4および5)。

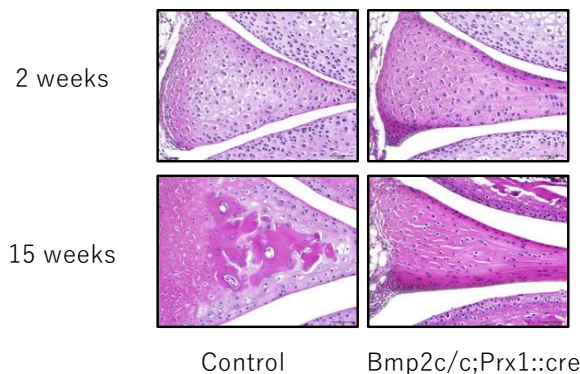


図4. 四肢特異的BMP2欠損マウスの生後2週、15週における半月板の形態  
四肢特異的BMP2欠損マウスは、生後2週以降の半月板の成熟(軟骨分化)過程が観察されない(ヘマトキシリン、エオジン染色)

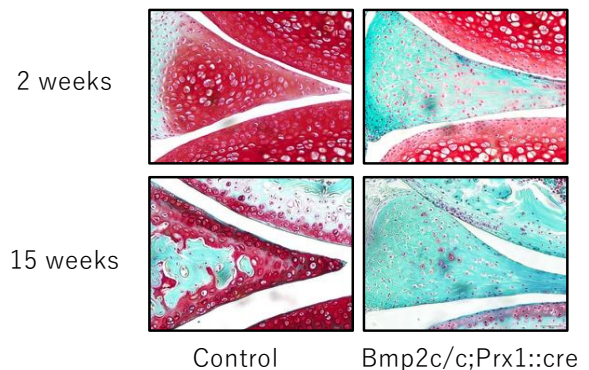


図5. 四肢特異的BMP2欠損マウスの生後2週、15週における半月板の形態  
四肢特異的BMP2欠損マウスは、生後2週以降の半月板の成熟(軟骨分化)過程が観察されない(サフランニンO染色)



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 (図 4 および 5)。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。

BMP2 同様異所性に骨組織を誘導することができる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 を用いて同様の実験を行ったところ、生後の半月板に組織学的に顕著な変化は観察されなかった。

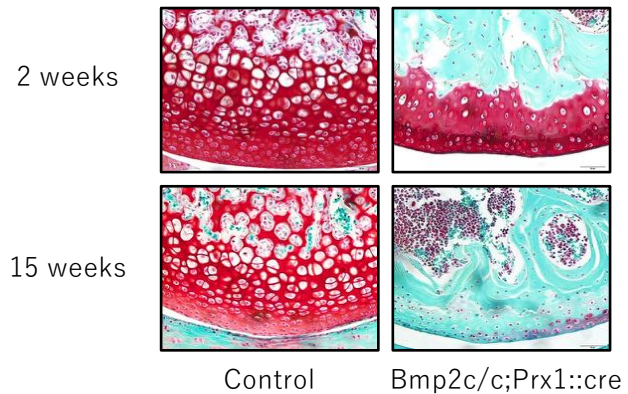


図6. 四肢特異的BMP2欠損マウスでは生後 2 週以降、関節軟骨の退行変性が観察される  
四肢特異的BMP2欠損マウスは、生後2週以降の半月板の形成不全に伴って関節軟骨の退行変性が観察される (サフラニンO染色)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Onuma H, Tsuji K, Hoshino T, Inomata K, Udo M, Nakagawa Y, Katagiri H, Miyatake K, Watanabe T, Sekiya I, Muneta T, Koga H	4. 巻 In press
2. 論文標題 Fibrotic changes in the infrapatellar fat pad induce new vessel formation and sensory nerve fiber endings that associate prolonged pain.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Orthop Res.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.24580	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Amemiya M, Tsuji K, Katagiri H, Miyatake K, Nakagawa Y, Sekiya I, Muneta T, Koga H.	4. 巻 523
2. 論文標題 Synovial fluid-derived mesenchymal cells have non-inferior chondrogenic potential and can be utilized for regenerative therapy as substitute for synovium-derived cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 465-472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.12.068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inomata K, Tsuji K, Onuma H, Hoshino T, Udo M, Akiyama M, Nakagawa Y, Katagiri H, Miyatake K, Sekiya I, Muneta T, Koga H.	4. 巻 20
2. 論文標題 Time course analyses of structural changes in the infrapatellar fat pad and synovial membrane during inflammation-induced persistent pain development in rat knee joint.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Musculoskelet Disord.	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12891-018-2391-1	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 Hoshino T, Tsuji K, Onuma H, Udo M, Ueki H, Akiyama M, Abula K, Katagiri H, Miyatake K, Watanabe T, Sekiya I, Koga H, Muneta T.	4. 巻 19
2. 論文標題 Persistent synovial inflammation plays important roles in persistent pain development in the rat knee before cartilage degradation reaches the subchondral bone.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Musculoskelet Disord.	6. 最初と最後の頁 291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12891-018-2221-5	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 Tsuji K.	4. 巻 28
2. 論文標題 Cartilage/chondrocyte research and osteoarthritis. Emerging drugs for Osteoarthritis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Calcium.	6. 最初と最後の頁 817-824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hideyuki Koga, Tomomasa Nakamura, Yusuke Nakagawa, Nobutake Ozeki, Toshiyuki Ohara, Mikio Shioda, Yuji Kohno, Masaki Amemiya, Ichiro Sekiya	4. 巻 10
2. 論文標題 Arthroscopic Centralization Using Knotless Anchors for Extruded Medial Meniscus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthroc. Tech.	6. 最初と最後の頁 e639-e645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.eats.2020.10.051	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 Takashi Hoshino, Yusuke Nakagawa, Kei Inomata, Toshiyuki Ohara, Hiroki Katagiri, Koji Otabe, Kanehiro Hiyama, Kenta Katagiri, Mai Katakura, Hiroko Ueki, Masaya Hayashi, Tsuyoshi Nagase, Ichiro Sekiya, Takashi Ogiuchi, Takeshi Muneta, Hideyuki Koga	4. 巻 in press
2. 論文標題 Effects of different surgical procedures for meniscus injury on two-year clinical and radiological outcomes after anterior cruciate ligament reconstructions. -TMDU MAKs study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Ortho Sci.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2020.12.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hideyuki Koga, Tomomasa Nakamura, Hiroki Katagiri, Yusuke Nakagawa, Nobutake Ozeki, Toshiyuki Ohara, Mikio Shioda, Yuji Kohno, Masaki Amemiya, Ichiro Sekiya	4. 巻 48
2. 論文標題 Two-Year Outcomes After Meniscopectomy by Capsular Advancement With the Application of Arthroscopic Centralization Technique for Lateral Compartment Knee Osteoarthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Sports Med	6. 最初と最後の頁 3154-3162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0363546520957367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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	辻 邦和  (Tuji Kunikazu)  (20323694)	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	関矢 一郎  (Sekiya Ichiro)  (10345291)	東京医科歯科大学・統合研究機構・教授   (12602)	
研究分担者	宗田 大  (Muneta Takeshi)  (50190864)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師   (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
---------	---------