

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570135

研究課題名（和文） 骨形成因子BMPシグナルによる造血微小環境のホメオスタシスの制御

研究課題名（英文） Physiological Roles of Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) in Skeletal Tissue Homeostasis

研究代表者

辻 邦和 (TSUJI KUNIKAZU)

東京医科歯科大学・歯と骨のGCOE拠点・GCOE拠点形成特任教員

研究者番号：20323694

研究成果の概要（和文）：

本研究は、硬組織のホメオスタシスにおける骨形成因子（BMP）シグナルの生理機能を理解することを最終的な目的とした。研究期間では、骨髄造血微小環境(HSC niche)のホメオスタシスにおける BMP4 及び BMP7 の生理機能の解析、並びに、関節軟骨代謝における BMP7 の生理機能の解析を行った。

骨髄特異的 BMP4 及び BMP7 のコンディショナルノックアウトマウスの解析を行った結果、造血幹細胞数の維持に BMP4 が必須であることを示した。

また、四肢特異的 BMP7 ノックアウトマウスの膝関節の表現型の解析を行った結果、BMP7 は、関節組織の形成過程には必須ではないが、関節軟骨の維持に必要であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

Project 1. BMP4 regulates the hematopoietic stem cell niche size in bone marrow

BMP4 (Bone morphogenetic protein 4) signal has critical roles in inducing hematopoietic tissues during embryogenesis. However, evaluating the importance of BMP4 in bone marrow hematopoiesis is complicated by early embryonic lethality in mice lacking BMP4, and by conservation of signaling pathways for osteogenic BMPs. To overcome these limitations and to define the roles of BMP4 in bone marrow hematopoiesis, we established BMP4 conditional knockout mice in which we inactivated BMP4 in adult bone marrow (Bmp4Mx1cre). Here we report that the loss of BMP4 in bone marrow cells significantly reduced the hematopoietic stem cell population. BMP4 gene was knocked-out by the intraperitoneal injection of poly I:C into Bmp4Mx1cre mice at 6 weeks of age. Six to 8 weeks after the injection (after inducing the genomic recombination), total bone marrow cells were isolated from femurs and tibiae, stained by hematopoietic cell surface markers, and analyzed by flow-cytometry (BD FACS Calibur). We found that the populations of differentiated blood cells such as Erythrocytes (Ter119+), T-cells (CD3+), B-cells (CD19+), and Monocytes/Macrophages (CD11b+) were not significantly altered in the absence of BMP4. However, the hematopoietic stem cell fraction (Lin-, c-Kit+, Sca-1+) was significantly decreased in Bmp4Mx1cre mice. These results are specific for the loss of BMP4, because we did not observe any alteration in hematopoietic cell population in the absence of BMP7 (Bmp7Mx1cre). We also did not observe any synergistic effect in the co-absence of BMP4 and BMP7 (Bmp4/7Mx1cre). These results suggest the unique and important roles of BMP4 in the regulation of hematopoietic stem cell niche size in adult bone marrow.

Project 2. Endogenous BMP7 activity is prerequisite for postnatal joint homeostasis

While the osteo- and chondro-inductive activities of recombinant bone morphogenetic protein 7 (BMP7) are well established, evaluation of the role of endogenous BMP7 in bone and cartilage homeostasis has been hampered by perinatal lethality in BMP7 knockout mice. To overcome these problems, we employed conditional deletion of BMP7 from the embryonic limb prior to the onset of skeletogenesis to create limb skeletons lacking BMP7. We have reported that the absence of locally produced BMP7 had no effect on postnatal limb growth, articular cartilage formation, maintenance of bone mass, or fracture healing. In this study, to evaluate the roles of endogenous BMP7 in postnatal joint homeostasis, we performed detailed histological analyses of the knee joint in adult BMP7 conditional knockout mice and found the accelerated degeneration of articular cartilage in the absence of endogenous BMP7. Safranin O staining of sagittal sections of the knee joint from 24 week-old mice revealed the significant loss in proteoglycan contents in articular cartilage matrix in the absence of endogenous BMP7. We observed less severe but similar results in the growing BMP7 conditional knockout mice (8 week-old). Extensive articular cartilage degeneration we observed in the mice at 8 week-old and older may not be due to the defect in cartilage formation since there was no significant alteration in both articular structure and proteoglycan contents in the juvenile BMP7 knockout mice (at 4 weeks of age).

To further analyze the physiological roles of BMP7 in the maintenance of articular cartilage, we investigated the chondrocyte survival, severity of synovial inflammation, and expression of matrix-degrading enzymes, such as hyaluronidase and MMP-13, in the BMP7 knockout mice. TUNEL staining of articular cartilage revealed that BMP7 did not affect chondrocyte survival at 8 weeks of age. Histological evaluation revealed that extensive synovial hyperplasia was observed in 8-week old BMP7 knockout mice. It seemed that severe synovitis occurred in the knockout mice since significant numbers of the cells in synovial membrane were positive for F4/80, a surface marker for mice macrophages. In contrast, appearance of synovial membrane was quite similar between control and BMP7 knockout mice at 4 weeks of age. Gene expression analysis of joint tissue from BMP7 knockout mice revealed that the expression of MMP-13 but not hyaluronidase was increased at 24 weeks of age. These data suggest that BMP7 maintains articular cartilage by negatively regulating synovial inflammation and MMP expression in the adult mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ホルモンと生理活性物質

1. 研究開始当初の背景

1-1. 骨、関節軟骨のホメオスタシスと BMP

BMP は、骨組織中に存在しその高い組織修復能力を担う分子として 1988 年に遺伝子がクローニングされた(1)。軟組織において異所性に骨誘導能を持つという BMP のユニークな特徴は、骨形成、骨代謝のキーファクターとして基礎医学、生物学の分野で現在に至るまで多くの研究者に注目されると同時に、早くから臨床応用が期待されてきた。BMP ファ

ミリーの中で、BMP2, 4, 7 は、骨形成過程並びに生後の骨組織で一部重複した発現パターンを示していること(2)、細胞表面の受容体を共有し、共通した情報伝達機構を有していることが示されている。また、BMP2, 4, 7 のインヒビターである Noggin のノックアウトマウスでは、過剰な BMP シグナルにより軟骨分化が増大するのに対して(3)、Gremlin のノックアウトマウスでは、肢芽の間葉系細胞のアポトーシスが増大することから(4)、正常な骨

骨形成には厳密な BMP2,4,7 活性の制御が必須であることが示されている。しかしながら BMP 分子の個々の骨形成、骨代謝における生理機能は詳しく検討されていなかった。その原因として、それぞれのノックアウトマウスが骨格形成以前(BMP2, BMP4)、又は生後間もなく (BMP7) 致死となる点があげられる (5,6,7)。私はこの問題を克服し、骨形成、骨代謝の過程で BMP2, 4, 7 の固有の分子機能を検討するため、cre-loxP システムを用いて胚芽の間葉系細胞特異的 BMP2, 4, 7 ノックアウトマウスの作成 (*Bmp2^{cre}Prx1cre*, *Bmp4^{cre}Prx1cre*, *Bmp7^{cre}Prx1cre*) と骨の表現型の解析をおこなってきた。その結果、*Bmp2^{cre}Prx1cre* マウスでは、胎生期の骨形成に欠損は認められないが、生後の骨形成に遅延が観察されること、生後早期に全てのマウスにおいて変形性関節症の病態が認められること、恒常的に骨折が認められ、骨折治癒のプロセスが観察されないこと、骨髄間葉系細胞の増殖及び骨芽細胞分化が著しく阻害されることを示した (Tsuji K. et al., Nat Genet 38, 1424-1429, 2006)。これに対して、*Bmp4^{cre}Prx1cre*, *Bmp7^{cre}Prx1cre* マウスでは、骨形成、骨代謝において重篤な欠損は認められなかった (Tsuji K. et al., J Orthop Res 28, 384-389, 2010, J Bone Joint Surg Am 90(1), 14-18, 2008)。一方 BMP2 と BMP4 のダブルコンディショナルノックアウトマウス (*Bmp2^{cre}Bmp4^{cre}Prx1cre*) では、骨髄腔及び骨形成が認められなかった (Tsuji K. et al., PLoS Genet 2, e216, 2006)。以上の結果は、骨形成過程において BMP2, 4 が MSC niche の形成に必須であること、骨代謝においては BMP2 が MSC niche の維持に必須であることを示唆している。

1-2. BMP シグナルによる HSC niche の制御

BMP2 は、皮下または筋肉内に移植すると一時的に異所性骨組織を誘導することが知られているが、この組織内に誘導される骨髄腔には、造血幹細胞を含む全ての血球系の細胞系譜が再現される(8)。このことは、BMP が単体で、完全な HSC niche を誘導する能力があることを示している。加えて、骨芽細胞が HSC niche の主要な構成要素であること(9, 10)、*Bmp2^{cre}Prx1cre* マウス由来の骨髄間葉系細胞の増殖が著しく減少していること、臍帯血由来の造血幹細胞は BMP レセプターを発現していること(11)、BMP が CD34 陽性細胞の増殖を促進すること(12)等は、間葉系細胞由来の BMP が髄内造血における HSC の直接的、間接的な制御因子であることを示している。

1-3. HSC による niche の制御

Jung 等は、HSC が、共培養の系において未分化間葉系細胞の増殖及び骨芽細胞系譜への分化を促進することを見いだした。また、この作用は HSC が発現する BMP2 及び BMP6 を介するものであることを示した(13)。これらの結果は、HSC は niche(間葉組織)からの一方向的シグナルにより維持されているのではなく、自らの周囲環境に対して BMP シグナルを介して積極的に制御を行っていることを示唆している。

以上の知見から、私は、BMP が HSC niche と MSC niche の相互作用に必須の情報伝達因子であり、その活性は骨のみならず造血系のホメオスタシスにも必須であるとの仮説を持つに至った。

(1) Wozney et al. (1988). Science 242, 1528-1534. (2) Solloway et al. (1998). Dev Genet 22, 321-339. (3) Brunet et al. (1998). Science 280, 1455-1457. (4) Michos et al. (2004). Development 131, 3401-3410. (5) Zhang et al. (1996). Development 122, 2977-2986. (6) Winnier et al. (1995). Genes Dev 9, 2105-2116. (7) Dudley et al. (1995). Genes Dev 9, 2795-2807. (8) An et al. (1996). Exp Hematol 24, 768-775. (9) Calvi et al. (2003). Nature 425, 841-846. (10) Zhang et al. (2003). Nature 425, 836-841. (11) Martinovic et al. (2004). J Histochem Cytochem 52, 1159-1167. (12) Grassinger et al. (2007). Cytokine 40, 165-171. (13) Jung et al. (2008). Stem Cells 26, 2042-2051. (14) Visnjic et al. (2004). Blood 103, 3258-3264. (15) Jilka et al. (1998). J Clin Invest 101, 1942-1950.

2. 研究の目的

2-1. 造血微小環境のホメオスタシスにおける BMP の生理機能

骨芽細胞は、骨髄造血微小環境(HSC niche)の重要な構成要素であることが示されている。本研究では、骨芽細胞の増殖分化に必須である BMP シグナルの、造血系のホメオスタシスにおける生理機能を明らかとすることを目的として、以下の項目について検討を行う。

A. 骨髄特異的 BMP コンディショナルノックアウトマウスを作成し、それらの造血系の異常を解析することで、造血系のホメオスタシスにおける個々の BMP 分子の生理機能の解析を行う。

B. BMP シグナルを介した HSC niche、間葉系幹細胞微小環境(MSC niche)の相互作用の分子メカニズムの解析を行う。

2-2. 関節軟骨のホメオスタシスにおける BMP7 の生理機能の解析

BMP7 は、in vitro において間葉系幹細胞の

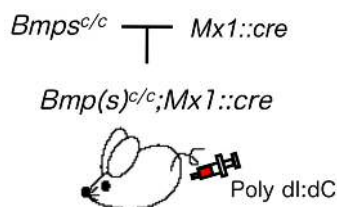
軟骨分化を促進する事、リコンビナント BMP7 蛋白の関節内投与により関節炎と関節軟骨の変性が抑制される事が示されている事から、発生だけでなく、生後の関節のホメオスタシスにも機能している事が予想されている。しかしながら、BMP7 のノックアウトマウスは、腎機能不全により生後直ちに死亡してしまうため、これまで成体の関節における BMP7 の生理機能の解析は行われてこなかった。本研究課題では、四肢特異的 BMP7 欠損マウス(BMP7^{cl};Prx1::cre)の作製と、その関節軟骨の表現型の解析を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

3-1. 造血微小環境のホメオスタシスにおける BMP の生理機能

(i). 骨髄特異的 BMP4, 7, 4/7 コンディショナルノックアウトマウスの作成

骨髄特異的に BMP の発現を消失するトランスジェニックマウスは、上述の floxed BMP allele を持つマウスと Mx1cre マウスの交配により得る。Mx1 は IFN- γ シグナルの標的遺伝子の一つであり、poly(IC)等のダブルストランド RNA の投与により cre の発現を誘導することが出来る。IFN- γ レセプターは MSC, HSC の両方に発現が認められることから、これらトランスジェニックマウスでは HSC, MSC を含む全ての骨髄細胞で各 BMP 分子の発現を欠失できることが期待できる(下図)。



MSC: *Bmp(s)*^{-/-}
HSC: *Bmp(s)*^{-/-}

(ii). コンディショナルノックアウトマウスにおける造血系細胞の細胞系譜の異常の解析

各コンディショナルノックアウトマウスにおける HSC niche 異常の表現型は、フローサイトメトリーを用いて行う。使用する表面抗原は、Ter119, CD3, CD19, CD11b 及び幹細胞マーカー c-kit と Sca-1 を用いた。

3-2. 関節軟骨のホメオスタシスにおける BMP7 の生理機能の解析

4, 8, 24 週齢の BMP7^{cl};Prx1::cre およびコントロールマウス(without Prx1::cre)の両膝の矢状断

切片の Safranin O、Toluidine Blue、Hematoxylin/Eosin 染色を行い、膝関節軟骨の形態の変化の観察を行った。関節軟骨のプロテオグリカン量の減少は、Safranin O の染色性の低下を指標とした。関節軟骨組織より RNA を抽出し、Q-PCR 法によって、遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

4-1. 造血微小環境のホメオスタシスにおける BMP の生理機能

骨に発現が見られる BMP 分子の中で BMP4 は、造血系に重要な機能を有していることが示唆されている。すなわち、マウス胎生初期において Blood Island の形成に BMP4 が機能すること、in vitro において、BMP4 は、マウスの ES 細胞、人の臍帯血細胞から造血幹細胞を誘導できることが示されている。また近年の研究成果から、骨芽細胞が造血微小環境の主要なコンポーネントである事が示されたことは、胎生期の造血だけでなく骨髄組織のホメオスタシスにも BMP シグナルが関与する可能性を示唆している。本研究では、骨髄における BMP4, 7 コンディショナルノックアウトマウスの作成を行い、その表現型の解析をおこなった。骨髄で BMP4 を欠損したマウス (BMP4^{cl};Mx1::cre) では、骨髄内の有核細胞数、赤芽球、T 細胞、B 細胞、単球/マクロファージのポピュレーションに変化は観察されなかったが、造血幹細胞を含む未分化細胞のポピュレーションである LSK (Lin-Scal+c-kit+) 細胞分画は、コントロールマウスに比べ有為に減少していた(各群 n=7)。この LSK 細胞の減少は BMP4 欠損に特異的であり、同様に骨髄内で発現が観察される BMP7 の欠損マウス (BMP7^{cl};Mx1::cre) では、分化した血球細胞、LSK 細胞共に優位な減少は観察されなかった。更に、BMP4 と 7 を同時に欠損したマウス (BMP4^{cl};BMP7^{cl};Mx1::cre) の表現型は、(BMP4^{cl};Mx1::cre) と同等であった。これらの結果は、骨髄内造血幹細胞の維持においては BMP4 がユニークな生理機能を有していることを示唆している。更に、本研究では、BMP4 による HSC niche の制御には性差が存在することを明らかとした。すなわち、BMP7 欠損に伴う LSK 細胞数の減少は、雄マウスに特異的にみられ雌マウスでは有意差は観察されなかった。

これらの結果は、BMP4 と性ホルモンが独立して HSC niche のホメオスタシスに関与している可能性を示唆している。本研究結果は、現在論文投稿準備中である。

4-2. 関節軟骨のホメオスタシスにおける BMP7 の生理機能の解析

24 週齢までの観察では、BMP7^{cl/c};Prx1::cre マウスは、コントロールマウスに比して、著明な発育の遅延は観察されなかった。矢状断切片の観察から、BMP7 の欠損下では 8 及び 24 週齢において関節軟骨の退行変性が観察された。Safranin O の染色性の低下を半定量的にスコア化した結果、BMP7^{cl/c};Prx1::cre では有意な差を持って染色性が低下することが確認された。これに対して、4 週齢の BMP7^{cl/c};Prx1::cre では、有意な Safranin O の染色性の低下は観察されなかったことから、BMP7 は関節軟骨の形成ではなく維持に重要な機能を有していることが示唆された。

Hematoxylin/Eosin 染色による滑膜組織の組織学的所見では、8 及び 24 週齢の BMP7^{cl/c};Prx1::cre マウスでは明らかな滑膜の肥厚と細胞浸潤が観察され、Synovitis Score の有意な増加が観察された。同様の検討を 4 週齢のマウスを用いておこなったところ、Genotype 間で有意な差は観察されなかった。TUNEL 染色の結果では、4 週齢、8 週齢ともに、関節軟骨細胞のアポトーシスに有意な違いは観察されなかった。関節軟骨における遺伝子発現の解析を行ったところ、軟骨基質分解酵素である MMP13 の発現が BMP7^{cl/c};Prx1::cre マウスにおいて有意に増加していることが確認された。本実験結果は、内在性の BMP7 が滑膜組織の炎症に対して抑制的に機能し、軟骨基質分解酵素の発現を抑制する生理活性があることを示唆している。本研究結果を踏まえて、現在、BMP7 による関節軟骨のホメオスタシスの分子メカニズムの解析を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件、全て査読あり)

- ① Katagiri, H., Muneta, T., Tsuji, K., Horie, M., Koga, H., Ozeki, N., Kobayashi, E., and Sekiya, I. (2013). Transplantation of aggregates of synovial mesenchymal stem cells regenerates meniscus more effectively in a rat massive meniscal defect. *Biochem Biophys Res Commun*. In Press.
- ② Hatsushika, D., Muneta, T., Horie, M., Koga, H., Tsuji, K., and Sekiya, I. (2013). Intraarticular Injection of Synovial Stem Cells Promotes Meniscal Regeneration in

a Rabbit Massive Meniscal Defect Model. *J Orthop Res*. In press.

- ③ Miyatake, K., Tsuji, K. (Corresponding Author), Yamaga, M., Yamada, J., Matsukura, Y., Abula, K., Sekiya, I., and Muneta, T. (2013). Human YKL39 (chitinase 3-like protein 2), an osteoarthritis-associated gene, enhances proliferation and type II collagen expression in ATDC5 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 431, 52-57.
- ④ Kokabu, S., Gamer, L., Cox, K., Lowery, J., Tsuji, K., Raz, R., Economides, A., Katagiri, T., and Rosen, V. (2012). BMP3 suppresses osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells via interaction with Acvr2b. *Mol Endocrinol* 26, 87-94.
- ⑤ Yamaga, M., Tsuji, K. (Corresponding Author), Miyatake, K., Yamada, J., Abula, K., Ju, Y.J., Sekiya, I., and Muneta, T. (2012). Osteopontin level in synovial fluid is associated with the severity of joint pain and cartilage degradation after anterior cruciate ligament rupture. *PLoS One* 7, e49014.
- ⑥ Futami, I., Ishijima, M., Kaneko, H., Tsuji, K., Ichikawa-Tomikawa, N., Sadatsuki, R., Muneta, T., Arikawa-Hirasawa, E., Sekiya, I., and Kaneko, K. (2012). Isolation and characterization of multipotential mesenchymal cells from the mouse synovium. *PLoS One* 7, e45517.
- ⑦ Nakamura, T., Sekiya, I., Muneta, T., Hatsushika, D., Horie, M., Tsuji, K., Kawarasaki, T., Watanabe, A., Hishikawa, S., Fujimoto, Y., *et al.* (2012). Arthroscopic, histological and MRI analyses of cartilage repair after a minimally invasive method of transplantation of allogeneic synovial mesenchymal stromal cells into cartilage defects in pigs. *Cytherapy* 14, 327-338.
- ⑧ Sekiya, I., Ojima, M., Suzuki, S., Yamaga, M., Horie, M., Koga, H., Tsuji, K., Miyaguchi, K., Ogishima, S., Tanaka, H., *et al.* (2012). Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis. *J Orthop Res* 30, 943-949.
- ⑨ Suzuki, S., Muneta, T., Tsuji, K., Ichinose, S., Makino, H., Umezawa, A., and Sekiya, I. (2012). Properties and usefulness of aggregates of synovial mesenchymal

stem cells as a source for cartilage regeneration. *Arthritis Res Ther* 14, R136.

- ⑩ Gamer, L.W., Tsuji, K., Cox, K., Capelo, L.P., Lowery, J., Beppu, H., and Rosen, V. (2011). BMPR-II is dispensable for formation of the limb skeleton. *Genesis* 49, 719-724.
- ⑪ Takahashi, T., Muneta, T., Tsuji, K., and Sekiya, I. (2011). BMP-7 inhibits cartilage degeneration through suppression of inflammation in rat zymosan-induced arthritis. *Cell Tissue Res* 344, 321-332.

[学会発表] (計 23 件中の 5 件を表記)

1. Tsuji K., Abula K., Sekiya I., Economides AN, Rosen V., and Muneta T. Role of Endogenous BMP-7 in Articular Cartilage Homeostasis. International Conference on Bone Morphogenetic Proteins. June 19-23, 2012, Granlibakken Conference Center, Tahoe, CA, USA
2. Tsuji, K., Roles of BMPs during skeletal development and in postnatal bone homeostasis. The 3rd International Conference on Oral Biology (TICOB). May 26-27, 2011, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
3. Tsuji K., Osteopontin level in synovial fluid is associated with the severity of joint pain and cartilage degradation after anterior cruciate ligament rupture. 久光製薬 海外特別招待講演会(英語) March 7, 2012, 東京ガーデンパレスホテル
4. Tsuji K., Sekiya I., Muneta T. BMP4 Regulates the Hematopoietic Stem Cell Niche Size in Bone Marrow. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) September 16-20, 2011, San Diego, CA USA
5. Tsuji K., Yamada J., Miyatake K., Abula K., Matsukura Y., Sekiya I., and Muneta T. Follistatin alleviates synovitis and articular cartilage degradation induced by carrageenan in mice. World Congress on Osteoarthritis (OARSI) April 26-29, 2012, Barcelona's International Convention Center, Barcelona, Spain

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻 邦和 (TSUJI KUNIKAZU)

東京医科歯科大学・歯と骨の GCOE 拠点・
特任講師

研究者番号 : 20323694

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし