

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25293317

研究課題名(和文) 骨、関節組織のホメオスタシスにおける骨形成因子BMPの生理機能の解析

研究課題名(英文) Roles of BMPs in postnatal bone and joint 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・寄附講座准教授

研究者番号：20323694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：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であるが、各BMP分子がどのように生後の骨、軟骨組織の恒常性に機能しているか、またその破綻に伴って発症する変形性関節症や骨粗鬆症等の運動器疾患に関与するかの統括的な理解は未だ進んでいない。本研究では、特に中心的に機能していると考えられているBMP2, 4, 7の生後の硬組織における分子機能を解析するために、組織特異的ノックアウトマウスの作成と表現型解析をおこなった。その結果、生後の関節軟骨の恒常性にBMP7の活性が必須であること、BMP2欠損で半月板の形成不全が生じること、BMP4欠損で造血幹細胞数の低下が観察されることを示した。

研究成果の概要(英文)：We have reported that the absence of locally produced BMP7 had no effect on limb bone and joint formation and the process of fracture healing in the postnatal animals. Here, to evaluate the physiological roles of endogenous BMP7 in postnatal joint homeostasis, we performed detailed analyses on the knee joint of these mice. Histological analyses showed that the absence of locally produced BMP7 reduced proteoglycan contents in articular cartilage starting at 8 weeks of age. Loss of BMP7 did not affect survival of articular cartilage cells, but resulted in their reduced expression of aggrecan and enhanced expression of matrix metalloproteinase 13. We also found extensive synovial hyperplasia and enhanced expression of the inflammatory cytokine, Activin, in the synovial membrane in the absence of BMP7. These data suggest that local production of BMP7 is prerequisite for postnatal synovial joint homeostasis and loss of BMP7 may involve in osteoarthritic changes in adult synovial joints.

研究分野：骨、軟骨代謝

キーワード：BMP Fracture Hematopoietic stem cell Osteoarthritis Articular Cartilage Meniscus Bone Homeostasis

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 骨、関節軟骨の形成、ホメオスタシスと BMP2, 4, 7

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。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、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、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、正常な骨格形成には厳密な 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。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 システムを用いて肢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<sup>cre</sup>/Prx1cre*, *Bmp4<sup>cre</sup>/Prx1cre*, *Bmp7<sup>cre</sup>/Prx1cre*) と骨、関節軟骨の表現型の解析をおこなってきた。その結果、*Bmp2<sup>cre</sup>/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、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。これに対して、*Bmp4<sup>cre</sup>/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。一方、*Bmp7<sup>cre</sup>/Prx1cre* マウスでは骨形成、骨代謝に著しい欠損は認められなかったが、関節軟骨において生後早期に変形性関節症様の変化が認められた。また、骨形成過程における各ノックアウトマウスの解析の結果から、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<sup>cre</sup>/Bmp4<sup>cre</sup>/Prx1cre*) では、骨髄腔及び骨形成が認められなかった。

(2) BMP シグナルによる HSC (Hematopoietic Stem Cell) 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。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、*Bmp2<sup>cre</sup>/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、BMP が CD34 陽性細胞の増殖を促進すること等は、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。私は、骨髄腔内で発現している BMP 分子のうち、造血系の維持に必要な BMP 分子の同定を行うため、これまで骨髄特異的 BMP ノックアウトマウスの作成と骨髄細胞の解析を行ってきた (*Bmp4<sup>cre</sup>/Mx1cre*, *Bmp7<sup>cre</sup>/Mx1cre*, *Bmp4<sup>cre</sup>/Bmp7<sup>cre</sup>/Mx1cre*)。その結果、BMP4 欠損マウスの骨髄において HSC のポピュレーションが有意に減少することを発見した。

以上、私は、硬組織で発現がみられる BMP のうち、BMP2 の活性は骨のホメオスタシスに必須であり、BMP4 の活性は主に髄内造血の制

御に参与し、BMP7の活性は関節軟骨の維持に必須であることを示した。これらの研究成果をふまえて、本研究では、BMPによる硬組織のホメオスタシスの制御の分子メカニズムを統括的に理解することを試みる。

## 2. 研究の目的

本研究は、骨形成因子(BMP)ファミリーに属する遺伝子群による硬組織のホメオスタシスの統括的な理解、及びその破綻に基づく硬組織関連疾患の病因の解明を最終目的としている。これまでの研究成果に基づき、本研究期間においては、

(1) BMP2欠損マウスで観察される骨折治癒プロセスの破綻の原因解析に基づく、骨のホメオスタシスにおけるBMPシグナルの生理機能の解析、

(2) BMP7欠損マウスに観察される自然発症の変形性膝関節症の病態の解析に基づく、関節軟骨のホメオスタシスにおけるBMPシグナルの生理機能の解析、及びBMP2欠損マウスに見られる半月板形成不全の解析

(3) BMP4欠損マウスにおいて観察される造血幹細胞数の低下の分子メカニズムの解析に基づく、骨髄造血微小環境(HSC niche)のホメオスタシスにおけるBMPシグナルの生理機能の解析、

に関して検討を行う。

## 3. 研究の方法

これまでの研究成果に基づいて、本研究期間では、骨とBMP2、随内造血とBMP4、関節軟骨とBMP7の関係に主に注目し、それらの生理機能に関して更なる解析を行い、硬組織全体のホメオスタシスにおけるBMPシグナルの統括的理解を試みる。以下に各検討項目を示す。

(1)骨のホメオスタシスとBMP

私は *Bmp2<sup>fl/fl</sup>Prx1cre* マウスの解析から、骨折治癒のプロセスを開始する為にはBMP2が必須であることを示した。しかしながら、未だ

その分子メカニズムは不明である。そこで本研究項目では、間葉系細胞においてBMP2の下流に存在する遺伝子の解析を行う。

(2) 軟骨のホメオスタシスとBMP

予備的検討から私たちは、*Bmp7<sup>fl/fl</sup>Prx1cre* マウスの膝関節軟骨が加齢とともに自然発症の変形性関節症様の变化を起こすことを発見した。本研究項目では、関節軟骨のホメオスタシスにおけるBMPシグナルの生理的機能の解明を行うため、本モデルマウスの詳細な組織学的解析を行う。

また、私たちは、*Bmp2<sup>fl/fl</sup>Prx1cre* マウスでは半月板形成不全が観察されることを示してきた。本研究項目においては、BMP2欠損マウスにおける半月板形成過程の詳細な挿入学的解析を行う。

(3) 随内造血のホメオスタシスとBMP

*Bmp4<sup>fl/fl</sup>Mx1cre* マウスの骨髄細胞の解析から私たちは、骨髄造血幹細胞(HSC)の維持にBMP4タンパクの活性が重要であることを発見した。本研究項目では、その分子メカニズムの解析を行い、造血微小環境の重要な構成成分である骨芽細胞、間葉系幹細胞と、造血幹細胞のコミュニケーションにBMPシグナルがどのように関与しているかを明らかにすることを試みる。

## 4. 研究成果

(1) 骨のホメオスタシスとBMP

間葉系幹細胞の培養系においてrhBMP2を作用させたのち経時的にSmad1に対する抗体を用いてクロマチン免疫沈降法(ChIP-Seq)を行い、BMP2刺激により転写が活性化される領域を全ゲノム領域から抽出する作業を行っている(進行中)

(2) 軟骨のホメオスタシスとBMP

BMP7欠損マウスの解析

生後0日、4週、8週、24週のマウスの膝関節の組織学的解析を行い、BMP7欠損で生じる関節軟骨の退行変性の経時変化を詳細に観察した。その結果、BMP7欠損マウスにおい

ては、生後4週までは、コントロールマウス同様の関節軟骨の表原型を示したが、生後8週以降、関節軟骨のプロテオグリカン量が有意に減少した。24週まで解析を行ったが、関節軟骨におけるプロテオグリカンの減少は8週同様に観察された。一方で半月板並びに軟骨下骨の表原型は、24週においてもコントロールマウスと同等であった。

BMP7 欠損マウスにおける関節軟骨のプロテオグリカン量の減少の原因を解析するため、関節軟骨より RNA を抽出し遺伝子発現解析を行ったところ、24週においてアグリカンの発現低下と MMP13 の発現上昇が観察された。また、BMP7 欠損マウスにおいて滑膜の肥厚が観察された。以上のことから、BMP7 は anti-inflammatory, anti-catabolic, anabolic の分子機能を持ち、生後の関節軟骨の恒常性に重要な機能を果たしていることが示唆された（発表文献 11）。

#### BMP2 欠損マウスの解析

四肢特異的に BMP2 を欠損させたマウスにおいては、半月板の形成不全が観察される。本研究ではその詳細な組織学的解析を行った。その結果、BMP2 欠損下においては、発生過程において半月板の予定領域に存在する間葉系細胞の軟骨分化が完全に抑制されること、そのために力学的性質が低下することで、生後半半月板組織の変形が観察され、ヒトの円板状半月板とよく似た表原型を示すことが明らかとなった。

#### (3) 随内造血のホメオスタシスと BMP

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として、BMP4, BMP7, BMP4/7 欠損マウスを作成し、骨髄細胞の表現型解析を行った。その結果、BMP4 のみが骨髄造血幹細胞の微小環境の制御をおこなっている可能性が示唆された。

## 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 36 件) 全て査読あり

Mizuno M, Katano H, Mabuchi Y, Ogata Y, Ichinose S, Fujii S, Otabe K, Komori K, Ozeki N, Koga H, Tsuji K, Akazawa C, Muneta T, Sekiya I. Specific markers and properties of synovial mesenchymal stem cells in the surface, stromal, and perivascular regions. *Stem Cell Res Ther*. 2018 May 2;9(1):123. doi: 10.1186/s13287-018-0870-9. PubMed PMID: 29720268; PubMed Central PMCID: PMC5930798.

Oyaizu T, Enomoto M, Yamamoto N, Tsuji K, Horie M, Muneta T, Sekiya I, Okawa A, Yagishita K. Hyperbaric oxygen reduces inflammation, oxygenates injured muscle, and regenerates skeletal muscle via macrophage and satellite cell activation. *Sci Rep*. 2018 Jan 22;8(1):1288. doi: 10.1038/s41598-018-19670-x. PubMed PMID: 29358697; PubMed Central PMCID: PMC5778072.

Ozeki N, Muneta T, Kawabata K, Koga H, Nakagawa Y, Saito R, Udo M, Yanagisawa K, Ohara T, Mochizuki T, Tsuji K, Saito T, Sekiya I. Centralization of extruded medial meniscus delays cartilage degeneration in rats. *J Orthop Sci*. 2017 May;22(3):542-548. doi: 10.1016/j.jos.2017.01.024. Epub 2017 Mar 25. PubMed PMID: 28351717.

Tsuji K, Ojima M, Otabe K, Horie M, Koga H, Sekiya I, Muneta T. Effects of Different Cell-Detaching Methods on the Viability and Cell Surface Antigen Expression of Synovial Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant*. 2017 Jun 9;26(6):1089-1102. doi: 10.3727/096368917X694831. Epub 2017 Jan 31. PubMed PMID: 28139195; PubMed Central PMCID: PMC5657749.

Saito R, Muneta T, Ozeki N, Nakagawa Y, Udo M, Yanagisawa K, Tsuji K, Tomita M, Koga H, Sekiya I. Strenuous running exacerbates knee cartilage erosion induced by low amount of mono-iodoacetate in rats. *BMC Musculoskelet Disord*. 2017 Jan 25;18(1):36. doi: 10.1186/s12891-017-1393-8. PubMed PMID: 28122526; PubMed Central PMCID: PMC5264323.

Hiyama K, Muneta T, Koga H, Sekiya I, Tsuji K. Meniscal regeneration after resection of the anterior half of the medial meniscus in mice. *J Orthop Res*. 2017 Sep;35(9):1958-1965. doi: 10.1002/jor.23470. Epub 2016 Nov 11. PubMed PMID: 27805288.

Miyatake K, Muneta T, Ojima M, Yamada J, Matsukura Y, Abula K, Sekiya I, Tsuji K. Coordinate and synergistic effects of extensive treadmill exercise and ovariectomy on articular cartilage degeneration. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016 May 31;17:238. doi: 10.1186/s12891-016-1094-8. PubMed PMID: 27245323; PubMed Central PMCID: PMC4888618.

Udo M, Muneta T, Tsuji K, Ozeki N, Nakagawa Y, Ohara T, Saito R, Yanagisawa K, Koga H, Sekiya I. Monoiodoacetic acid induces arthritis and synovitis in rats in a dose- and time-dependent manner: proposed model-specific scoring systems. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016 Jul;24(7):1284-91. doi: 10.1016/j.joca.2016.02.005. Epub 2016 Feb 23. PubMed PMID: 26915639.

Ozeki N, Muneta T, Koga H, Nakagawa Y, Mizuno M, Tsuji K, Mabuchi Y, Akazawa C, Kobayashi E, Matsumoto K, Futamura K,

Saito T, Sekiya I. Not single but periodic injections of synovial mesenchymal stem cells maintain viable cells in knees and inhibit osteoarthritis progression in rats. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016 Jun;24(6):1061-70. doi: 10.1016/j.joca.2015.12.018. Epub 2016 Feb 12. PubMed PMID: 26880531.

Ozeki N, Muneta T, Matsuta S, Koga H, Nakagawa Y, Mizuno M, Tsuji K, Mabuchi Y, Akazawa C, Kobayashi E, Saito T, Sekiya I. Synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration augmented by an autologous Achilles tendon graft in a rat partial meniscus defect model. *Stem Cells*. 2015 Jun;33(6):1927-38. doi: 10.1002/stem.2030. PubMed PMID: 25993981; PubMed Central PMCID: PMC4497612.

Abula K, Muneta T, Miyatake K, Yamada J, Matsukura Y, Inoue M, Sekiya I, Graf D, Economides AN, Rosen V, Tsuji K. Elimination of BMP7 from the developing limb mesenchyme leads to articular cartilage degeneration and synovial inflammation with increased age. *FEBS Lett*. 2015 May 8;589(11):1240-8. doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.004. Epub 2015 Apr 15. PubMed PMID: 25889639.

Nakagawa Y, Muneta T, Kondo S, Mizuno M, Takakuda K, Ichinose S, Tabuchi T, Koga H, Tsuji K, Sekiya I. Synovial mesenchymal stem cells promote healing after meniscal repair in microminipigs. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015 Jun;23(6):1007-17. doi: 10.1016/j.joca.2015.02.008. Epub 2015 Feb 13. PubMed PMID: 25683149.

Yamada J, Tsuji K, Miyatake K, Matsukura Y, Abula K, Inoue M, Sekiya I, Muneta T. Follistatin alleviates synovitis and articular cartilage degeneration induced

by carrageenan. Int J Inflamm. 2014;2014:959271. doi: 10.1155/2014/959271. Epub 2014 Dec 9. PubMed PMID: 25574420; PubMed Central PMCID: PMC4276300.

Matsukura Y, Muneta T, Tsuji K, Miyatake K, Yamada J, Abula K, Koga H, Tomita M, Sekiya I. Mouse synovial mesenchymal stem cells increase in yield with knee inflammation. J Orthop Res. 2015 Feb;33(2):246-53. doi: 10.1002/jor.22753. Epub 2014 Nov 17. PubMed PMID: 25403845; PubMed Central PMCID: PMC4359008.

Ozeki N, Muneta T, Koga H, Katagiri H, Otabe K, Okuno M, Tsuji K, Kobayashi E, Matsumoto K, Saito H, Saito T, Sekiya I. Transplantation of Achilles tendon treated with bone morphogenetic protein 7 promotes meniscus regeneration in a rat model of massive meniscal defect. Arthritis Rheum. 2013 Nov;65(11):2876-86. doi: 10.1002/art.38099. PubMed PMID: 23897174; PubMed Central PMCID: PMC4034586.

Katagiri H, Muneta T, Tsuji K, Horie M, Koga H, Ozeki N, Kobayashi E, Sekiya I. Transplantation of aggregates of synovial mesenchymal stem cells regenerates meniscus more effectively in a rat massive meniscal defect. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Jun 14;435(4):603-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.026. Epub 2013 May 16. PubMed PMID: 23685144.

Miyatake K, Tsuji K, Yamaga M, Yamada J, Matsukura Y, Abula K, Sekiya I, Muneta T. 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. 2013 Feb

1;431(1):52-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.094. Epub 2013 Jan 3. PubMed PMID: 23291184.

〔学会発表〕(計8件)

Tsuji K: Bmp4 activity is not prerequisite for postnatal articular cartilage homeostasis. 11<sup>th</sup> International BMP Conference. Boston, MA. USA. October 26-30, 2016

Tsuji K, Ojima M, Otabe K, Horie M, Koga H, Sekiya I, Muneta T: Comprehensive analysis of surface antigen expression on cultured mesenchymal stem cells from human synovial membrane. International Cartilage Repair Society. Sorrento-Naples, Italy. September 24-27, 2016

Tsuji K: Roles of Bmp4 in bone marrow homeostasis. Global Center of Excellence Program International Research Day. Tokyo, Japan. February 19-20, 2014

〔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〕  
ホームページ等:該当なし

## 6. 研究組織

(1)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・准教授  
研究者番号: 20323694

(2)研究分担者  
宗田 大 (MUNETA, Takeshi)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師  
研究者番号: 50190864

(3)研究分担者  
関矢 一郎 (SEKIYA, Ichiro)  
東京医科歯科大学・再生医療研究センター・教授  
研究者番号: 10345291