

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18896

研究課題名(和文)キマ-ゼを介した甲状腺眼症における眼窩内組織線維化の解析

研究課題名(英文)Analysis of chymase in orbital tissue of thyroid eye disease

研究代表者

三村 真士(Mimura, Masashi)

大阪医科薬科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90733436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺眼症は人的、経済的な面から大きな社会的な損失をきたす自己免疫性疾患である。近年の甲状腺眼症治療は、従来の抗炎症療法や手術療法に加えて、より効率的な分子標的療法が注目されてきている。本研究では、組織の線維化に関わるchymaseという酵素に注目して、甲状腺眼症モデルマウスおよび、手術時に破棄するヒト眼窩軟部組織の解析を通じて、新たな分子標的療法のきっかけを模索した。結果、モデルマウスは甲状腺ホルモンの上昇を認めたが、眼部の炎症を認めず、chymase活性の分析をするにまで至らなかった。ヒト眼窩組織の解析については、甲状腺眼症群と非甲状腺眼症群とにchymaseの発現に有意な差はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果からは、残念ながらchymaseを介して甲状腺眼症に対する新たな分子標的療法を開発するきっかけを見出すことはできなかった。しかし、本研究を通じて、甲状腺眼症の動物モデルの作成について、今後さらに造形を深めるきっかけとなり、研究発展の足場をつくることができた。また、ヒト軟部組織を用いた研究については、さらなるデータの蓄積により、新たな知見を見出す可能性があり、総じて有意義な研究であった。

研究成果の概要(英文)：We researched chymase activity in thyroid eye disease (TED) using an animal model and human orbital soft tissue. Regarding the animal study, we tried to develop a TED mouse model; however, the model was found not to observe apparent orbital inflammation despite high thyroid hormone in the blood, so we could not conduct further investigation. Regarding the study using human tissue, we have collected discarding orbital tissue during the surgeries for both TED and non-TED patients. The analysis revealed no difference in chymase activity between TED and the control group.

研究分野：眼科

キーワード：甲状腺眼症 chymase 眼窩線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

甲状腺眼症は人的、経済的な面から大きな社会的な損失をきたす自己免疫性疾患である。甲状腺眼症は年間約 14 人 / 10 万人(自己免疫性甲状腺機能異常症の 25-50%)が発症し、好発年齢は 20 代から 60 代であることから、労働力世代を襲う疾患である。その症状は、顔面醜形(眼球突出、眼瞼後退、眼瞼腫脹)、複視、5-7%の重症例では失明にいたる可能性もある。あまりの顔貌醜形によって精神異常をきたし易いと報告されており、社会生活において多大な影響をきたす後天性疾患である。近年の甲状腺眼症治療は、従来の抗炎症療法や手術療法に加えて、より効率的な分子標的療法が注目されてきている。

2. 研究の目的

本研究では、病態の根幹である、自己免疫機能異常による眼窩内線維芽細胞を介した眼窩内および眼窩周囲組織の異常線維化増殖に關与するシグナルのうち、Transforming growth factor (TGF)- に注目した。そして、Chymase は TGF- や Matrix metalloproteinase (MMP)-9 の前駆体を活性化させる結果、炎症細胞の浸潤や線維化による組織のダメージに關わっており、本研究の最終目標としては、Chymase を介した眼窩内線維芽細胞のコントロールとし、分子標的療法的一端を担えるかを調査することであった。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルの作成

甲状腺眼症の動物モデルは未だ確立されたものはないため、甲状腺眼症の動物モデル作成の確認から始めた。甲状腺機能亢進症の動物モデル作成についての既報としては、Sprague-Dawley(SD)ラットを用いた、人工的に高甲状腺ホルモン状態を作成する方法、および BALB/c マウスにプラスミドを介して hTSHR の遺伝子導入する方法が代表的であった。これらのモデルが作成を検討し、作成できたモデルの眼窩摘出病理標本において、筋組織および脂肪組織における炎症反応といった変化をもって甲状腺眼症発症を確認し、眼窩線維芽細胞内における mast cell, chymase, renin-angiotensin system (angiotensin / , angiotensin receptor), TGF-、MMP6 の増加の有無をトルイジンブルー染色、各免疫染色にて確認する予定とした。また、モデル作成後には、chymase 阻害薬による線維芽細胞抑制効果をコントロールと比較して評価していく予定とした。

(2) ヒト眼窩内脂肪組織および外眼筋組織における chymase 活性の評価

甲状腺眼症患者に対する眼窩減圧術および斜視手術時に切除する眼窩内脂肪組織および外眼筋組織と control (非甲状腺眼症患者に対する眼窩脂肪手術、斜視手術時に切除、破棄となる外眼筋組織)において、眼窩線維芽細胞の免疫染色、real time-PCR および western blot 法を用いて chymase, TGF-、collagen、fibronectin、-SMA, MMP-1,2,7,9 を比較する予定とした。

4. 研究成果

(1) 動物モデルの作成

動物実験規定に準じ、まず hTSHR の遺伝子導入 BALB/c マウスを用いて実験を行った。プラスミドを用いて、作成した hTSHR 遺伝子 (ヒト TSHR A-サブユニットの 1-289 までのアミノ酸配列) を導入し、2 ヶ月後に Basedow 病発症を評価した。結果、血中 TSH 刺激性レセプター抗体 TSAb は上昇していたが、摘出した眼窩部組織は炎症性変化に乏しく、研究に必要な十分な甲状腺眼症モデルを作成できなかった。そこで、別の hTSHR 遺伝子 (hTSHR289His 遺伝子) の導入を同様に試みた。しかし同様に、TSAb の上昇を認めるも、眼症の発症を確認することができず、安定して研究に必要な甲状腺眼症のモデルを作成するまでに至らなかった。

(2) 甲状腺眼症患者におけるヒト眼窩脂肪組織の解析

各種手術時に採取した眼窩組織サンプルは、最終的に甲状腺眼症が 15 (脂肪 13、筋 2)、control が 9 (脂肪 7、筋 2) となった。筋組織の採取数が限定的であったため、脂肪組織のみを使用して解析 (眼窩線維芽細胞の免疫染色、real time-PCR 法を用いた chymase、tryptase、および TGF- β の定量) を行った。免疫染色の結果では、脂肪間の結合組織に線維芽細胞の増加を目視で確認できた。続いて real time-PCR を用いて試料中に発現した chymase、tryptase および TGF- β の定量の結果、chymase および tryptase は甲状腺眼症群と control 群において有意差がなく、TGF- β は逆に甲状腺眼症群で有意に低下するという結果で、予想していた chymase が甲状腺眼症患者において上昇するという結果は得られなかった。なお、今回の臨床データより算出した検出力分析 ($1-\beta = 0.8$ 、 $\alpha = 0.05$) の計算結果、標本サイズは 24 であった。

以上の結果から、甲状腺眼症モデルの安定的な作成にはさらなる改良が必要であることがわかり、ヒト眼窩脂肪組織の解析では、chymase の発現が有意に認められなかった。本研究の結果を踏まえて、甲状腺動物モデル作成に関しては、遺伝子導入以外の方法を用いて今後も追加研究を行っていく予定である。また、ヒト眼窩脂肪組織の解析については、目標サンプル数を集めて再度解析を行い、新たな知見が得られるきっかけになるかを今後さらに検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------