

氏名	おおや ゆうき 大谷 祐貴
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	博士甲 第 号
学位授与の日付	2025年3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	涙道関連リンパ組織の性状解析と免疫学的意義の解明
論文審査委員	(主査) 教授 長谷 耕二 (博士 (薬学)) (副査) 教授 米澤 淳 (博士 (薬学)) 専任講師 中澤 洋介 (博士 (薬学))
慶應義塾大学学位規程第11条に基づく審査委員会実施日： 2025年 2月 6日	

論文内容の要旨

1. 研究の背景

眼は細菌やウイルス、花粉などのアレルゲンに曝されている。涙液はこれらの異物を洗い流し、涙小点から涙小管に入り、涙嚢という袋状の器官に連続し鼻涙管を通過して鼻腔へと抜ける。涙嚢には涙道関連リンパ組織 (tear duct-associated lymphoid tissue: TALT) が存在する。TALT は涙道管腔に接し、2-3 層の重層扁平上皮で覆われ、リンパ球循環に必要な高内皮細静脈と、抗体産生に重要な胚中心 (germinal center: GC) を持つことから組織学的に粘膜関連組織に分類される。しかしながら、これまで TALT を構成する免疫細胞の組成や免疫応答における重要性は不明であった。TALT は周囲を骨で囲まれた位置にあり、採取方法が確立されていなかった。

粘膜関連リンパ組織では、リンパ節とは異なり輸入リンパ管が存在せず、抗原は管腔に接する濾胞関連上皮 (follicle-associated epithelium: FAE) を通じて、リンパ濾胞へと取り込まれることで免疫応答が誘導される。この抗原輸送では FAE に存在する Microfold 細胞 (M 細胞) が主要な経路となる。しかしながら、TALT における M 細胞研究は形態学的解析にとどまり、分子生物学的な情報は明らかにされていなかった。また、TALT の免疫細胞構成や眼粘膜の免疫応答における重要性は不明であった。

花粉やハウスダストなどを抗原とするアレルギー性結膜炎の発症には、抗原特異的 immunoglobulin E (IgE) 抗体が重要である。IgE は抗原と結合し、マスト細胞の脱顆粒を引き起こすことで、痒みなどのアレルギー症状を引き起こす。IgE の誘導は 2 型ヘルパー T (T helper 2: Th2) 細胞や濾胞性ヘルパー T (T follicular helper: Tfh) 細胞によって促進されるが、アレルギー性結膜炎を引き起こす IgE がどの組織で誘導されるかは不明

な点が多い。TALT は涙嚢に位置することから、涙液により眼表面から流されてきた抗原に対する免疫応答の主要な場となると考えられるが実験的な証拠は得られていない。

本研究では TALT の採取方法を確立し、その免疫細胞構成を明らかにすること、眼粘膜免疫における TALT の重要性や疾患との関係性を解明することを目指した。

2. 結果と考察・展望

1. TALT を肉眼解剖学的に採取する技術を確立した

初めに、TALT の周辺組織を把握するために、眼から鼻にかけての領域の連続組織切片を作製し、HE 染色を行なった。その結果、TALT は上顎骨と薄い涙骨、脂質を分泌するハーダー腺に近接していた。また、涙道が骨によって完全に隔絶されるのは鼻に近い領域であり、眼側の領域から TALT を採取できるのではないかと考えた。この組織学的情報を基に、肉眼的に TALT の位置を探索した。眼窩に接する上顎骨の根本を切断することで TALT を含む涙嚢を露出させて切除したところ、涙道と推定される構造が認められた。そこで、マウスに色素エバンスブルーを点眼投与して涙道内腔を染色した結果、涙道であることを確かめた。さらに、抗 B220 抗体を用いた B 細胞のホールマウント染色により、涙嚢に存在する B 細胞のリンパ濾胞を特定した。さらに、肉眼的に露出させた涙嚢の切片を作製した結果、TALT のリンパ濾胞が確認できた。以上のように、TALT の採取技術を確立することに成功した。

2. TALT の免疫細胞組成は粘膜関連リンパ組織の特徴を持つ

上記のように確立した手法を用いて TALT を採取し、その免疫細胞の組成を Flow cytometry により解析した。その結果、TALT は主に B 細胞と T 細胞で構成され、特に B 細胞の割合が高かった。さらに、B 細胞サブセットを詳細に解析した結果、抗原を認識して活性化した B 細胞である胚中心 B 細胞 (GC B 細胞; $GL7^+Bcl-6^+B220^+$) やクラススイッチ後の IgA^+ 細胞が頸部リンパ節に比較して高い割合を占めていた。T 細胞の構成は、活性化した T 細胞であるエフェクターメモリー T 細胞 ($CD44^+CD62L^-$)、濾胞性ヘルパー T 細胞 (T follicular helper cell: Tfh 細胞; $PD-1^+Bcl-6^+$) の割合が高かった。これらの結果は、TALT が恒常的に活性化していることを示している。これらの特徴は鼻咽頭関連リンパ組織 (nasopharynx-associated lymphoid tissue: NALT) と小腸のパイエル板と類似しており、TALT は免疫細胞構成の観点からも粘膜関連リンパ組織としての特徴を持つことを示した。

3. TALT FAE に M 細胞が存在する

粘膜関連リンパ組織の抗原輸送に重要である M 細胞の存在を調べた。腸管 M 細胞に発現している GP2、Sox8、Tnfaip2 に対する特異的抗体によって TALT の組織切片を免疫染色した結果、FAE にこれらの分子を共発現する上皮細胞が認められた。次に、M 細胞の機能である抗原取り込み能について調べるために、マウスに蛍光ナノ粒子を点眼投与し、30 分後に解剖したマウスの TALT を共焦点顕微鏡により観察した。定量解析を行った結果、多くの GP2⁺Tnfaip2⁺細胞内に蛍光ナノ粒子が確認され、高い取り込み能を持つことが明らかになった。これらの結果から、腸管 M 細胞マーカー分子群を発現する機能的な M 細胞が TALT に存在することを同定した。

4. RANKL-RANK は TALT M 細胞の分化誘導因子である

腸管の M 細胞は TNF スーパーファミリーの receptor-activator of NF- κ B ligand (RANKL) とその受容体 receptor-activator of NF- κ B (RANK) の相互作用によって分化が誘導される。TALT における M 細胞も同様の機構で誘導されるのではないかと考えた。初めに、RANKL と RANK について蛍光免疫染色を行なったところ、TALT の FAE に RANK⁺ 細胞、その上皮下に RANKL⁺ 細胞が認められた。これらの細胞は近接していたおり、相互作用していることが推定された。さらに、リコンビナントタンパク質 GST-RANKL を腹腔内投与すると、GST 投与群に比較して TALT M 細胞が増加していたことから、RANKL はパイエル板と TALT における共通の M 細胞分化誘導因子であることが示唆された。

次に、TALT M 細胞欠損マウスの作製を試みた。TALT FAE で発現が認められた Keratin 5 (Krt5) のプロモーター下で Cre リコンビナーゼを発現するマウスと、RANK の遺伝子座 *Tnfrsf11a* を loxP 配列で挟んだマウスを交配させることで、M 細胞を欠損すると考えた。実際に作製した *Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{fllox/fllox} マウスでは、RANK の発現と TALT M 細胞が消失しており、点眼投与した蛍光ナノ粒子の取り込み量が減少していた。一方で、パイエル板や NALT では M 細胞が存在していたことから、このマウスは TALT 特異的に M 細胞を欠損すると結論した。次に、M 細胞の欠損が免疫応答に与える影響を調べるために、本マウスの TALT における免疫細胞を Flow cytometry によって解析した結果、CD45⁺ の全免疫細胞数が低下しており、胚中心反応を担う GCB 細胞や Tfh 細胞も有意に減少していた。これらの観察結果より、定常状態における TALT の免疫応答には M 細胞依存的な抗原取り込みが必須であることが明らかになった。

5. TALT は眼粘膜の抗原に対する IgE の誘導部位である

次に、アレルギー疾患における TALT の重要性について調べるために、アレルギー性結膜炎モデルの確立を試みた。卵白アルブミン (ovalbumin: OVA) 抗原、およびアジュバントであるコレラ毒素 (cholera toxin: CT) の点眼により C57BL/6J マウスを感作した後、OVA 単独を点眼してアレルギー症状の評価を行った。痒みの指標として眼掻きの回数を測定した結果、OVA/CT による感作後 22 日目に、非感作群に比べて、その回数は有意に増加していた。これらのマウスの結膜では免疫細胞の浸潤と脱顆粒したマスト細胞の増加が認められ、血清中には抗原特異的な IgE 抗体が検出された。アレルギーの惹起に重要な Th2 細胞の増加も認められ、本条件によりアレルギー性結膜炎が誘導されると結論づけた。一方で、眼掻き回数の増加は、B 細胞や抗原特異的な抗体を欠損する *muMT* マウスでは野生型マウスに比較して有意に減少し、抗体依存的な応答であると考えられた。このアレルギーモデルにおいて、TALT の免疫細胞の挙動を調べた結果、アレルギー誘導性の細胞である Th2 細胞、Tfh 細胞、IgE⁺ GC B 細胞の数が顕著に増加していた。これらの結果は TALT が眼粘膜の抗原に対する免疫応答の誘導組織であることを示している。

6. TALT M 細胞はアレルギー性結膜炎を悪化させる

次に、TALT M 細胞欠損マウスである *Krt5-Cre Tnfrsf11a^{flx/flx}* マウスに結膜炎アレルギーを誘導した。痒みの指標である眼掻き行動は M 細胞の欠損により有意に抑制され、脱顆粒したマスト細胞の数も有意に減少していた。続いて、結膜上皮のバリア機能の評価を行った。細胞間接着分子である E-cadherin の蛍光免疫染色の結果、アレルギー性結膜炎の誘導によって E-cadherin の検出量が減弱していたが、M 細胞の欠損により、この減弱はキャンセルされた。したがって、TALT における M 細胞の欠損は、アレルギー性結膜炎の症状を緩和することが明らかになった。

次に、アレルギー性結膜炎誘導時の免疫細胞の組成を調べた結果、TALT M 細胞欠損によって Tfh 細胞と IgE⁺ GC B 細胞が TALT で減少していた。一方で、NALT と頭部の所属リンパ節である頸部リンパ節 (cervical lymph node: cLN) では、これらの細胞数に有意な変化は認められなかった。Th2 細胞数はいずれの組織においても M 細胞欠損の影響はなかった。これらの結果から、M 細胞の欠損により認められたアレルギー症状の緩和は TALT における免疫応答が特に重要であることが示唆された。さらに、IgE の誘導に重要な 2 型サイトカイン *Il4* の遺伝子発現について、TALT の qPCR 解析を行なったところ、M 細胞欠損で有意に減少していた。Tfh 細胞は GC B 細胞の活性化、さらに IL-4 の産生により IgE 抗体の誘導を促進する報告があることから、M 細胞の抗原の取り込

みが TALT の Tfh 細胞と IL-4 の誘導を介して IgE を誘導し、マスト細胞の脱顆粒を引き起こすことでアレルギーを発症すると考えられる。

本研究は未解明であった TALT の粘膜免疫応答における機能を明らかにし、眼周辺の粘膜免疫研究に新たな基盤を与えるものである。単層上皮で覆われたパイエル板や NALT とは異なり、TALT M 細胞は重層扁平上皮に存在する。それにもかかわらず、特徴的な遺伝子発現や分化機構の多くが共通していた。これは RANKL-RANK シグナルが粘膜組織で広く共通する M 細胞誘導因子であることが示唆された。また、本研究は TALT の免疫機能を解明した。すなわち、定常状態では涙道に存在する抗原を M 細胞から取り込むことで TALT は恒常的に活性化している。一方で、過剰なアレルゲンの存在下では、M 細胞から入ったアレルゲンが Tfh 細胞の活性化を介して胚中心反応を促進し、IgE 抗体の産生によりアレルギー性結膜炎を悪化させていることが明らかとなった。また、TALT M 細胞は腸管で取り込み受容体として機能する分子を発現することから、抗原の点眼によって M 細胞を介して TALT に取り込ませることで、眼周辺の粘膜免疫応答を誘導する粘膜ワクチン創出に、本研究の知見が有用となることが期待される。

論文審査結果の要旨

本審査委員会では、申請者が約 25 分間の研究発表を行った後、約 45 分間の質疑応答を行った。最後に申請者が退室し、審査委員による協議を行った。

申請者は、涙道関連リンパ組織 (TALT) の解析技術を確立し、それを用いて TALT の免疫細胞構成や M 細胞の存在を明らかにした。さらに、TALT がアレルギー関連細胞の誘導組織として機能すること、TALT M 細胞が定常状態とアレルギー条件下において免疫応答を誘導するのに重要であることを明らかにした。

審査委員より従来の TALT の研究については何が既知であるのかという質問を受けた。これに対し、申請者は、ヒトでは TALT が存在することのみが明らかになっているにとどまり、マウスについては先行研究で全身性の遺伝子欠損マウスを用いて TALT が存在するかを調べた研究が行われたことや、TALT の免疫染色像から B 細胞や T 細胞などのリンパ球で主に構成されるということが明らかになっていると回答した。さらに、自身で行なった実験結果は TALT の免疫細胞構成がパイエル板と類似した割合を示したが、パイエル板のように T 細胞、B 細胞領域が分かれているのかという質問に対して、TALT も同様の性質を示すが、比較的領域は曖昧であり、その原因や意義については不明であると回答した。さらに、本研究では T 細胞と B 細胞のみを解析しているが、他の免疫細胞組成に関してはどうかと尋ねられ、TALT の 9 割以上を占める B 細胞や T 細胞を優先的に解析したことを説明した上で、樹状細胞の存在は確認しており、その割合は免疫細胞 (CD45⁺ 細胞) の 1%未満であると回答した。また、眼は免疫応答が低い免疫特権部位であることから、それに対する TALT の関与についての質問には、免疫特権は眼球などである一方で、TALT が位置する涙道粘膜は免疫応答が起こること、TALT は免疫寛容に重要な Treg が豊富に存在していたことから抑制に関与しているかもしれないと回答した。

TALT M 細胞を研究する上で様々なマーカー分子を見ているが、M 細胞の定義について質問を受けた際には、Sox8 と Spi-B という M 細胞のマスター転写因子を発現する上皮細胞であることと、抗原の取り込み能が高いという 2 つの要素を併せ持つことであることを説明した。さらに、Sox8⁺GP2⁺の細胞が M 細胞ではないのかという質問に対し、先行研究で涙道上皮には GP2⁺の杯細胞が存在することがすでに報告されていると回答した。さらに、Sox8⁺GP2⁻ M 細胞についての質問では、GP2⁺ M 細胞が、より抗原取り込み能の高い成熟した M 細胞であることに加えて、本研究で用いた蛍光ナノ粒子の取り込みように、GP2 (抗原受容体) 依存的ではない取り込みを行うという旨を回答した。M 細胞欠損マウスにおける他の組織への影響についての質問には、NALT でも Krt5 が発現するが、M 細胞は存在することを確認しており、M 細胞の前駆細胞が Krt5 を発現していないのではないかと考えられること、さらに皮膚にも Krt5 は発現しているが、RANK を発現していないため影響がないと考えられると回答した。主論文に

記載のあった、抗 RANKL 抗体を用いた実験ではパイエル板で M 細胞が消失した一方で、TALT では M 細胞の減少が比較的マイルドであったのことに對する考察の記述が不十分であり、欠損マウスの実験と矛盾するのではないかと指摘を受けた。これに對して、パイエル板などの腸管では 3-5 日間という非常に短期間でターンオーバーが起こるため、RANKL 中和抗体を投与する前から存在する M 細胞は完全に消失する一方で、TALT ではターンオーバーが比較的遅く、最初の抗体投与から 8 日間では元から存在する M 細胞がそのまま残っているのではないかと回答し、主論文の記述を修正することとした。さらに、腸管と TALT でターンオーバーに要する期間が異なる意義について尋ねられた際には、腸管では腸内細菌などの莫大な抗原に曝露されているため、それに対応できるようにターンオーバーを早めている一方で、TALT が位置する涙道は腸管に比べると曝露量が少なくエネルギーを大量に消費するターンオーバーの必要性はないと考えられると述べた。

アレルギー性結膜炎について、本研究では頭部のリンパ組織である TALT、NALT、cLN の免疫細胞構成について、それらの違いを問われた。それに対して、TALT が組織学的に眼の抗原には一番応答しやすいのではないかと考えられ、実際の免疫細胞の割合については、例えば Th2 細胞に関しては TALT で CD4⁺ 細胞中のおよそ 20% を占める一方で、NALT ではおよそ 5%、およそ 1% ほどであり、TALT が最も高い割合を占めると回答した。また、アレルギー性結膜炎の眼掻き行動についての定義についての質問に対しては、1 回のストロークを 1 回としており、複数回の眼掻き行為を一回としているわけではないと回答した。これを受けて審査委員より眼掻き行為中のストロークの回数が大事という説があるとの助言を受けた。続いて、M 細胞欠損によるアレルギー症状の緩和は部分的であるという質問に対して、本研究で TALT における Th2 細胞が減少しなかったことと、先行研究で Th2 細胞による CGRP という分子を介した痒みの伝達経路があることから Th2 依存的な経路が関与しているのではないかと考えていると回答した。花粉症と M 細胞についての関係性についての質問に対しては、アレルギー性鼻炎患者では血中や鼻粘膜中の RANKL が向上していることが報告されており、M 細胞を介した花粉症の悪化につながっている可能性も考えられると述べた。さらに、年齢と M 細胞の数との関連について尋ねられた際には、先行研究により老齡マウスでは腸管 M 細胞が減少することが報告されていると回答した。

加えて、TALT M 細胞の応用例として挙げた点眼投与による粘膜ワクチンの詳細について質問を受け、インフルエンザの生菌を点眼投与することで、抗原特異的な抗体が誘導されること、さらにその後の感染抵抗性を与えることから、抗原の点眼投与が有用であると回答した。さらに、粘膜ワクチンとして、経鼻投与は肺や嗅球への抗原の移行が危惧されること、経口投与では胃酸や消化酵素に対する抵抗性を持った DDS の開発が必要であることをデメリットとして説明した。一方、審査委員からは点眼ワクチンに関しては角膜の混濁といった懸念事項も考えられることが指摘された。

公聴会では、アレルギー症状の測定方法について質問を受け、アレルギーが比較的弱いために前足での眼搔き行動を測定し、毛繕い行動を排除していると回答した。M 細胞欠損による症状の緩和が弱いという指摘に対しては、M 細胞以外の抗原輸送経路として樹状細胞を考えていると回答した。また、M 細胞の抗原取り込み後の免疫応答の活性化には樹状細胞が関与すること、腸管の M 細胞が樹状細胞の成熟に関与することが先行研究で報告されていることを述べた。また、B 細胞の活性化は MHC II を介した Tfh 細胞との相互作用によることが一般的であると回答した。点眼投与ワクチンの有用性を問われた際には、微量のインフルエンザウイルスの点眼投与により、抗体産生が促進され、感染抵抗性を獲得する点から有用であることに加えて、経鼻投与に比較して安全であることが先行研究で明らかになっていると回答した。TALT 特異的な応答を誘導する方法について質問を受け、M 細胞を標的とした抗原の付加が考えられると回答した。TALT とパイエル板や NALT の相違点についての質問に対しては、FAE の形態がそれぞれ TALT は重層扁平上皮、NALT やパイエル板は単層で構成されると回答した。

申請者の博士学位論文、学位審査委員会及び公聴会での発表・質疑応答は概ね妥当であった。自分で考えて研究を行っていることがわかり、質疑応答も周辺知識を踏まえて適切に答えられていた。研究内容も十分であり、博士（薬科学）としての資質を十分に備えていると判断した。

論文目録

主論文に関する原著論文

Oya Y, Kimura S, Uemura M, Fujimura Y, Hase K. Tear duct M cells exacerbate allergic conjunctivitis by facilitating germinal-center reactions. *Mucosal Immunol*. Published online February 1, 2025. doi:10.1016/j.mucimm.2025.01.009

参考文献（申請者が著者である、主論文に関する原著論文以外の論文）

Oya Y, Kimura S, Nakamura Y, Ishihara N, Takano S, Morita R, Endo M, Hase K. Characterization of M cells in tear duct-associated lymphoid tissue of mice: A potential role in immunosurveillance on the ocular surface. *Front Immunol*. 12: 779709, 2021.