

主 論 文 要 旨

No.1

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	大谷 祐貴
主 論 文 題 名： 涙道関連リンパ組織の性状解析と免疫学的意義の解明				
(内容の要旨) 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して鼻腔へと抜ける。涙嚢には涙道関連リンパ組織 (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 (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。そこで、本研究では TALT の採取方法を確立し、その細胞構成を明らかにすること、眼粘膜免疫における TALT の重要性を明らかにすることを目指した。 組織学的解析により TALT の周辺組織を観察すると 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。この組織学的情報を基に、TALT の位置を探索した。色素エバンスブルーの点眼により涙道内腔を染色し、抗 B220 抗体を用いた B 細胞のホールマウント染色により、涙嚢に存在するリンパ濾胞を特定し、TALT であると判断した。これらの観察から、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、取り出す手法を確立した。 本手法を用いて TALT を採取し、その免疫細胞の組成をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、TALT は主にリンパ球で構成され、B 細胞が 60-70%程度、T 細胞が 30-40%程度であった。さらに、B 細胞サブセットを調べた結果、活性化 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 陽性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 CD44 陽性 CD62L 陰性のエフェクターメモリーT 細胞、さらには濾胞性ヘルパーT 細胞 (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 (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ていた。				

粘膜関連リンパ組織は輸入リンパ管を持たず、抗原は濾胞関連上皮（FAE）に存在する M 細胞という特殊な上皮細胞によって取り込まれる。TALT における M 細胞研究はこれまでレクチン染色と形態学的解析に限定され、発現分子の情報は明らかにされていなかった。そこで、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 にこれらを共発現する上皮細胞が認められた。次に、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、定量解析を行った結果、多くの GP2/Tnfaip2 両陽性細胞内に蛍光ナノ粒子が確認され、マクロ分子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 に存在すると考えられた。

さらに、この TALT M 細胞は RANKL の受容体である RANK を発現していることから、腸管と同様に RANKL-RANK シグナルが分化に重要であると予想された。実際に、リコンビナントタンパク質 GST-RANKL を腹腔内投与すると、TALT M 細胞が増加した。さらに、TALT 上皮において RANK (*Tnfrsf11a*) を欠損させるために、*Krt5-Cre Tnfrsf11a^{flox/flox}* マウスを作製した。本マウスでは、GP2、Sox8、Tnfaip2 陽性細胞の数、および点眼投与した蛍光ナノ粒子の TALT への取り込み量も減少していた。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、*Krt5-Cre Tnfrsf11a^{flox/flox}* マウスは TALT 特異的に M 細胞を欠損することを確認した。また、本マウスの TALT における免疫細胞をフローサイトメトリーによって解析した結果、CD45 陽性の全免疫細胞数が低下しており、胚中心反応を担う GC B 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 の免疫応答の維持には 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。

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（OVA）抗原およびアジュバントであるコレラ毒素（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。眼搔きの回数を痒みの指標として測定した結果、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が認められた。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、眼搔き回数の増加は、B 細胞や抗原特異的な抗体を欠損する μ MT マウスでは認められず、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、アレルギーに関係する Th2 細胞、Tfh 細胞、IgE 陽性 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。

次に、TALT M 細胞欠損マウスである *Krt5-Cre Tnfrsf11a^{flox/flox}* 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搔き行動は 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。

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 陽性 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 (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 細胞はいずれの組織においても TALT M 細胞欠損の影響はなかった。Tfh 細胞は GC B 細胞の活性化および IgE 抗体の誘導を促進する報告があることから、M 細胞の欠損によるアレルギー性結膜炎の症状緩和は、TALT の Tfh 細胞の活性化が低下したことに起因すると考えられる。

以上の結果により TALT の免疫機能を明らかにすることができた。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可能性が明らかとなった。

本研究は未解明であった TALT の眼周辺の粘膜免疫応答における機能を明らかにし、新たな研究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を示唆している。今後、点眼によって任意の抗原を 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おいて、本研究の知見が有用となることが期待される。