

博士学位論文 2024 年度

涙道関連リンパ組織の性状解析と
免疫学的意義の解明

慶應義塾大学大学院薬学研究科
大谷 祐貴

目次

略語.....	3
第一章 序論.....	4
第二章 実験材料と方法	6
第三章 結果.....	17
第四章 考察.....	24
第五章 参考文献.....	28
第六章 謝辞.....	34
第七章 図	35

略語

本論文では、以下の略語を使用する

- cLN: cervical lymph nodes
- CT: cholera toxin
- DAB: diaminobenzidine
- EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
- εGLT: epsilon germline transcript
- FAE: follicle-associated epithelium
- FISH: Fluorescent in situ hybridization
- GC: germinal center
- GP2: glycoprotein 2
- GST: glutathione S-transferase
- IgA: immunoglobulin A
- IgE: immunoglobulin E
- IgG: immunoglobulin G
- Krt5: Keratin 5
- M cell: microfold cell
- NALT: nasopharynx-associated lymphoid tissue
- NIK: NF-κB inducing kinase
- OPG: osteoprotegerin
- OVA: ovalbumin
- PBS: phosphate buffered saline
- PFA: paraformaldehyde
- PNA: peanut agglutinin
- RANK: receptor-activator of NF-κB
- RANKL: receptor-activator of NF-κB ligand
- TALT: tear duct-associated lymphoid tissue
- Tfh: T follicular helper
- Tfr cell: T follicular regulatory cell
- Th2 cell: T helper 2 cell
- Treg cell: regulatory T cell

第一章 序論

眼は視覚のための感覚器官であり、日常生活において重要な役割を果たす。眼の粘膜組織は外部に露出し細菌やウイルス、花粉などに曝露されている。これらの異物に対し、眼の表面を覆う涙液は眼粘膜表面への付着を防ぐ物理的バリアとして働く。それに加えて、涙液には抗原特異的な分泌型 immunoglobulin A (IgA) 抗体や抗菌タンパク質が含まれており、防御機構の第一線として働いている¹。涙液は主に涙腺から分泌され、眼の表面を洗い流し、涙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 (tear duct-associated lymphoid tissue: TALT) というリンパ組織が存在する²⁻⁶。TALT は粘膜である涙道に隣接して存在し、被膜に覆われたリンパ節とは異なり明確な境界面を持たない。また、リンパ球の循環に必要な高内皮細静脈や抗体産生に重要な胚中心 (germinal center: GC) が確認されており、涙液を介して運ばれた抗原やアレルゲンに対する粘膜免疫応答の誘導部位であると考えられる。こういった組織学的特徴から、TALT は腸管のパイエル板や、鼻腔の鼻咽頭関連リンパ組織 (nasopharynx-associated lymphoid tissue: NALT) などと同様に粘膜関連リンパ組織に該当する⁷。

パイエル板は、腸管における IgA の主要な誘導組織である。その誘導は管腔内の抗原が濾胞関連上皮 (follicle-associated epithelium: FAE) を通じて取り込まれることで開始される⁸⁻¹⁰。FAE に存在する Microfold 細胞 (M 細胞) は管腔に存在する可溶性分子や細菌を直接取り込み、トランスサイトシスによって上皮を通過し、上皮下の抗原提示細胞に輸送する。その後、抗原提示細胞は成熟し、ナイーブ T 細胞を活性化させ、胚中心反応を引き起こし、IgA 産生細胞を誘導する。腸管の M 細胞を欠損するマウスでは、糞便中の分泌型 IgA が減少すること¹¹、M 細胞表面に発現する glycoprotein 2 (GP2) を欠損したマウスでは、GP2 に結合する微生物抗原に対する特異的 IgA と IgG が有意に減少する¹²。これらは M 細胞による抗原の取り込みが免疫応答の誘導に重要であることを示している。異物を取り込む M 細胞は腸管上皮の物理的バリアという面では脆弱な細胞と言える。実際に、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium などの病原性細菌、ボツリヌス毒素、異常プリオンタンパク質が M 細胞から体内へと侵入することが明らかとなっている¹³⁻¹⁸。

TNF スーパーファミリーの receptor-activator of NF- κ B ligand (RANKL) はパイエル板における M 細胞分化促進因子である^{11,19-22}。RANKL とその受容体 RANK による細胞内シグナルは細胞内のアダプタータンパク質 TRAF6 を介して NF- κ B 経路の古典的経路と非古典的経路の両者を活性化する²³。非古典的経路では NF- κ B inducing kinase (NIK) の活性化によって p52/RelB 複合体の核内移行を促進する^{23,24}。古典的経路では p52 の転写活性促進によって、非古典的経路で働く RelB の発現を促進することで、相乗的に M 細胞分化を促進する²³。RelB は転写因子 Spi-B と Sox8 を発現させ、この 2 つの転写因子は GP2 を含む M 細胞を特徴づける複数の遺伝子の発現を促進する^{23,25-28}。最終的に、GP2 が M 細胞表面に発現することで、取り込み能の高い成熟した M 細胞となる^{12,24}。

パイエル板における M 細胞の割合は FAE の 10-20%程度である。M 細胞は RANKL の内因性阻害因子である Osteoprotegerin (OPG) を分泌することで、RANKL-RANK 相互作用を阻害し、近傍の細胞が M 細胞に分化することを抑制する^{29,30}。OPG 欠損による M 細胞の増加は、腸管粘膜免疫応答を促進する一方で、病原体の侵入門戸の拡大に繋がる。そのため、サルモネラ経口感染への耐性が低下する。したがって、M 細胞の数の制御は感染と免疫のバランス制御に重要であり、10-20%というのは進化的に適した割合であると考えられる。以上のような M 細胞に関する研究は特に腸管で進められてきた。一方で、腸管外の M 細胞に関する解析は不十分である。眼周辺粘膜組織における M 細胞の存在は形態学的な特徴やレクチン染色を元にした報告が主になっており、その分化機構や役割は不明である³¹。

眼球や網膜、角膜は、免疫が抑制される免疫特権部位となっており、ひとたび感染や物理的障害により組織が損傷すると、免疫機構が機能せずに失明などの重篤な組織傷害を引き起こす可能性がある。また、ドライアイやドライマウスを症状とする、自己免疫疾患であるシェーグレン症候群は自己応答性の免疫応答が誘導される。

花粉やハウスダストを抗原とするアレルギー性結膜炎は、日本、米国、スウェーデンで人口の 15-45.3%が罹患している³²⁻³⁵。その症状には、充血、眼の痒みなどがあり、QOL を著しく低下させる。アレルギー性結膜炎の発症には、2 型ヘルパー T (T helper 2: Th2) 細胞、immunoglobulin E (IgE) 抗体、濾胞性ヘルパー T (T follicular helper: Tfh) 細胞などの多くの細胞や分子が関与する^{36,37}。マウスモデルでは、結膜に浸潤した ST-2⁺CD4⁺T 細胞が IL-9 の産生を介して上皮バリアを破綻させることで、結膜炎が誘導されることが報告されている³⁸。また、ST-2⁺Th2 細胞はカルシトニン遺伝子関連ペプチドを分泌することで結膜炎における痒みを引き起こす³⁹。アレルギー喘息モデルでは、気道の所属リンパ組織である縦隔リンパ節で Tfh 細胞や IgE⁺GC B 細胞が誘導される。IgE の誘導には、Tfh 細胞が産生する IL-4 が重要であり、Tfh 細胞を欠損マウスではアレルギーに伴う IgE の増加が認められない⁴⁰⁻⁴³。しかしながら、結膜炎における IgE 誘導機構の研究はあまり進んでおらず、その誘導組織は不明である。

TALT は涙道に位置することから、眼表面の抗原に対して免疫応答し、抗原特異的な IgE の誘導、さらにはアレルギーの発症・増悪に関与することが推察された。また、近年の報告により、抗原の点眼投与が血中の IgG や全身の粘膜における IgA が誘導するという報告があることから⁴⁴、TALT を介した粘膜免疫ワクチンという応用研究にも発展する可能性を秘めている。

これまで TALT の研究が進んでこなかった原因は、周囲を骨で囲まれ、採取が難しく解析が困難であるためであった。そこで、本研究では TALT を採取する手技を確立し、TALT を構成する免疫細胞の組成、さらには TALT における免疫応答の重要性を解明することを目的とした。そのために、免疫応答の誘導に重要と想定される TALT M 細胞の性状を明らかにすることで、TALT の包括的な理解を試みた。本研究は、これまで未解明であった眼周辺の粘膜免疫応答における研究基盤を与えるものである。

第二章 実験材料と方法

2-1 実験動物

全ての動物実験は慶應義塾大学の動物実験委員会（許可番号：A2023-044）によって承認されたプロトコルに従って実施した。マウスは、慶應義塾大学の実験動物ガイドラインに従って維持し、明暗周期 12/12 時間（照明点灯時間 8:00-20:00）、温度 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ の SPF またはコンベンショナル環境下で飼育した。野生型 C57BL/6J および BALB/c（6-15 週齢）は三協ラボサービス社または日本クレア社から購入した。*Krt5-Cre* マウス⁴⁵ は熊本大学 Center for Animal Resources and Development (CARD) から分与を受けた。*Tnfrsf11a*^{flox/flox} マウス^{11,46} と muMT マウス⁴⁷ は Jackson Laboratory から購入した。*Tnfrsf11b*^{-/-} マウス⁴⁸ は松本歯科大学の宇田川信之教授と中村美どり准教授から分与を受けた。マウスの genotype は下表の primer を用いて行なった。いずれのマウスも CE-2（日本クレア社）給餌下で 1 日以上馴化飼育し、実験に供した。全ての実験において自由摂餌、自由飲水とした。

マウス系統 (いずれも C57BL6/J 背景)	配列
<i>Krt5-Cre</i>	5'-ATGCCAATGCCCCCTCAGTTCCT-3' 5'-TGCCCCCTTTTTATCCCTTCCAGA-3'.
<i>Tnfrsf11a</i> ^{flox/flox}	5' -CATTGACAAAATGTCTCCACAGAG-3' 5' -AACCTGAGCTACAGAGTGAGATC-3'
muMT	5'-CCGTCTAGCTTGAGCTATTAGG-3' 5'-GAAGAGGACGATGAAGGTGG-3' 5'-TTGTGCCCAGTCATAGCCGAAT-3'
<i>Tnfrsf11b</i> ^{-/-}	5'- TCCTGGCACCTACCTAAAACAGCAC -3' 5'- GCTAACGCCCTTCCTCACACTCAC -3' 5'- ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACG -3' 5'- GAGCAAATGGACCTCCCGTAATGGA -3'

2-2 脱灰処理

マウスをイソフルラン（Pfizer）によって麻酔後、頸椎脱臼により安楽死させた。マウス頭部を断頭し、頭部表面の皮膚を取り除いた後、4% paraformaldehyde (PFA, Nacalai Tesque) / phosphate buffered saline (PBS, Nacalai Tesque) で一晩浸漬固定した。その後、2-3 週間 5% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA: EDTA・4NA と EDTA・2NA の 1:1 混合物, Nacalai Tesque, 同仁化学) に浸漬して脱灰を行った。1 週間ごとに 5% EDTA を交換し、不要な部分を剃刀で除去した。

2-3 TALT の分離

イソフルランによる深麻酔、または麻酔後の頸椎脱臼により安楽死させたマウス頭部を断頭した。表皮・下顎・眼球を取り除いた後、頭部を正中線で半分に分断した。口蓋と切歯を除去し、実体顕微鏡（M125, Leica）下でピンセットを用いて結合組織を剥離することで前頭骨・前上顎骨・上顎骨・涙骨を露出させた。露出させた上顎骨をハサミで切断し、周辺の結合組織とともに頭部から分離した。分離後、涙骨に隣接している涙嚢をハーダー腺や神経などから分離した。

2-4 凍結切片作製とヘマトキシリン・エオジン染色

脱灰処理後の頭部、TALT を含む涙嚢、結膜組織を 4% PFA で固定後、30% Sucrose に一晩浸漬し、OCT compound（Sakura Finetek Japan）で包埋後、液体窒素で急速凍結した。凍結ブロックはクライオスタット（CM1950, Leica）を用いて、MAS コートスライドガラス（松浪硝子）上に凍結切片（厚さ 15-20 μm ）を作製し、室温で 1 晩以上乾燥させた。乾燥後の凍結切片を PBS に浸透し、hematoxylin（Wako）で室温、10 分間染色した。温水で洗浄後、Eosin [1% Eosin Y（Wako）水溶液 50 mL, 1% Phloxine B（Wako）水溶液 5 mL, 95% エタノール 390 mL, 酢酸 2.5 mL] で室温、30 秒間染色した。マスト細胞を検出するために、切片を 0.05% トルイジンブルー溶液（pH 4.1, WAKO）で 30 分間染色した。エタノールを用いて段階的に脱水を行い、キシレン（Nacalai Tesque）による透徹後、MOUNT-QUICK（大道産業）によって封入した。観察は正立顕微鏡（BX53, Olympus）または倒立顕微鏡（BZ-X810, Keyence）で行った。

2-5 ホールマウント免疫染色

骨から分離した TALT を含む鼻涙管を PBS で洗浄後、氷上で 25% メタノール（Nacalai Tesque）/PBS、50% メタノール/PBS、75% メタノール/PBS、100% メタノールに組織をそれぞれ 15 分間静置し、段階的脱水を行った。脱水後、新たな 100% メタノールに組織を移し、4°C で一晩静置した。0.3% H_2O_2 /メタノールに組織を氷上で静置することで内在性ペルオキシダーゼの不活性化を行った。その後、氷上で 100% メタノール、75% メタノール/PBS、50% メタノール/PBS、25% メタノール/PBS でそれぞれ組織を 15 分間静置し、段階的親水を行った。親水後、氷上にて TBS-T [0.1% Triton X-100（Nacalai Tesque）/PBS] で組織を処理し、4°C で振盪しながら TBS-MT [0.1% Triton X-100/1% skim milk（Nacalai Tesque）/PBS] で 60 分間静置を 2 度行うことでブロッキング処理を行った。その後、ビオチン標識抗マウス CD45R/B220 抗体（BioLegend, clone RA3-6B2）を用いて TBS-MT 中、4°C で振盪しながら一晩染色した。染色後、4°C で TBS-MT 中で 15 分間振盪を 4 度行い、goat 抗 Rat HRP 抗体（希釈倍率 1:1000, Thermo fisher Scientific, Cat: 31470）を用いて TBS-MT 中、4°C で振盪しながら一晩染色した。染色後、4°C で TBS-MT 中で 15 分間振盪を 4 度行った。その後、室温で TBS-T 中で 5 分間振盪を 4 度行った。ペルオキシダーゼ染色 Diaminobenzidine（DAB）

キット (Nacalai Tesque) を用いて発色を行い、鮮明な像が得られた際に水洗し、反応を停止した。反応停止後、染色像を実体顕微鏡 (M125, Leica) によって観察した。

2-6 Flow cytometry

TALT および NALT は 50 µg/mL LiberaseTM (Roche) /DNase (Sigma) /12.5 mM HEPES (Nacalai Tesque) /1% Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (Nacalai Tesque) /2% FCS (MP Biomedicals) /RPMI1640 (Nacalai Tesque) 中で 30 分間 37 °C で震盪し、100 µm ナイロンセルストレーナー (Greiner Bio-One) に通すことで細胞を採取した。頸部リンパ節 (cervical lymph node: cLN) とパイエル板は採取後、100 µm ナイロンセルストレーナー上で注射器のプランジャーにより組織をすりつぶし細胞を採取した。採取後の各組織の細胞を 1 mL の RBC lysis buffer (BioLegend, Cat:420301)中で 3 分間氷上に静置することで、赤血球を除去した。2% FCS/PBS を 9 mL 加えてメスアップした後、4 °C、500 × g で 5 分間遠心分離した。沈殿を 2% FCS/PBS で懸濁し、Precision Count Beads (BioLegend, Cat: 424902)またはトリパンブルー (Nacalai Tesque) を用いて細胞数を測定した。2.0 x10⁶ 細胞、それに満たない場合は各組織の全細胞を 96 well plate へ移し、4 °C、1500 × rpm で 3 分間遠心分離した。沈殿を FcXTM PLUS (抗 CD16/32) 抗体 (1:200, BioLegend, Cat: 156604) を含んだ 2% FCS/PBS で懸濁し、10 分間氷上で静置することでブロッキングを行った。ブロッキング後、特異的抗体 (下表参照) を用いて、30 分間氷上で静置することで、各分子を標識した。また、転写因子などの細胞内分子を染色する際には、細胞の固定および洗浄は BD PharmingenTM Transcription Factor Buffer Set (BD Biosciences, Cat: 562574)を用いて行い、細胞固定後に特異的抗体希釈液 (下表参照) 中、45 分間氷上で静置することで細胞内分子を染色した。低親和性 IgE 受容体 (CD23) の影響を除去するために、IgE⁺細胞の測定は先行研究で確立された方法を用いた⁴⁹。具体的には、CD23 上の IgE をマスクするために細胞表面の染色時に Purified 抗 IgE 抗体 (Clone: RME-1)を加えた。細胞固定後に PE 標識 抗 IgE 抗体 (Clone: RME-1) を用いて細胞内の IgE を染色した。死細胞の除去には Fixable Viability Stain (FVS780, 1:500, BD Biosciences, Cat: 565388) または 7-AAD Viability Staining Solution (1:200; Biolegend; 420404) を用いた。染色後のサンプルの測定は LSRII または FACSCalesta flow cytometer (いずれも BD Biosciences) を用い、Flowjo (BD, version 10) を用いて解析した。

抗体・ストレプトア ビジン	蛍光色素・ ビオチン	Clone	希釈倍率	購入元 (型番)
------------------	---------------	-------	------	----------

anti-B220	BV605	RA3-6B2	400	103244
anti-B220	APC-H7	RA3-6B2	400	565371
anti-Bcl-6	PE-CF594	K112-91	25	562401
anti-CD3	BV421	BM10-37	400	100341
anti-CD3	PE	145-2C11	400	12-0031-83
anti-CD4	BV605	RM4-5	500	563151
anti-CD4	BV786	RM4-5	500	563727
anti-CD4	PE/Dazzle594	RM4-5	500	100566
anti-CD4	Red Fluor 710	RM4-5	400	80-0042-U100
anti-CD8a	APC-eF780	E08443-1632	400	47-0081-82
anti-CD8a	FITC	53-6.7	400	35-0081-U500
anti-CD19	APC-R700	1D3	1000	565473
anti-CD25	BV650	PC61	500	564021
anti-CD44	APC	IM7	400	103012
anti-CD45	BV510	30-F11	500	103138
anti-CD62L	BV786	MEL-14	400	564109
anti-CD95	APC-R700	Jo2	200	565130
anti-CXCR5	APC	L138D7	50	145506
anti-Foxp3	AF488	FJK-16s	100	53-5773-82
anti-Foxp3	PE	FJK-16s	125	12-5773-82

anti-GATA3	eF660	TWAJ	25	50-9966-42
anti-GL7	PB	GL7	500	144613
anti-GL7	AF647	GL7	200	144606
anti-IgA	FITC	C10-3	250	559354
anti-IgA	Biotin	C10-1	200	556978
anti-IgE	PE	RME-1	200	406908
anti-IgE	Purified	RME-1	200	406902
anti-PD-1	PerCP-eF710	J43	500	46-9985-82
anti-PD-1	BV421	29F.1A12	200	135221
anti-RORgt	PE	Q31-378	50	562607
anti-ST-2	BV421	DIH9	250	145309
anti-TCR β	BV605	H57-597	500	562840
Streptavidin	FITC	-	400	11-4317-87

2-7 蛍光免疫染色

多くの実験では骨から分離した TALT を 4% PFA で固定、30% Sucrose に置換後、凍結切片を作製した。染色に際して脱灰を行った場合は 2-2 項で示すように、頭部組織の脱灰を経て凍結切片を作製した。十分に乾燥させた凍結切片を PBS で洗浄し、0.3% Triton X-100 (Nacalai Tesque) /PBS を用いて室温で 30 分間膜透過処理を行った。PBS で洗浄後、10% donkey serum (Sigma-Aldrich) /PBS で室温、30 分間ブロッキングした。その後、一次抗体を用いて PBS 中、室温で一晩染色した。PBS で洗浄し、二次抗体と Hoechst 33342 trihydrochloride (Life Technologies または Thermo fisher Scientific) を用いて室温 2 時間染色した。PBS で洗浄後、ProLongTM Gold antifade reagent (Thermo fisher Scientific) で封入した。観察は、共焦点レーザー顕微鏡 (FV3000, Olympus) で行った。Spi-B の染色に際しては抗原の賦活化のために EDTA 含有 Tris-HCl 溶液 (pH 9.0) 中に切片を浸し、電子レンジで 500W、5 分間加熱処

理を行った。RANKL、RANK、Tnfaip2 の染色に際して、TALT を分離後、未固定の状態で OCT compound に包埋した。凍結切片を作製した後、4% PFA で 15 分間固定した。使用した抗体・レクチンについては下表にまとめた。

一次抗体	宿主	希釈倍率	購入元
anti-B220	rat	1:200	BioLegend; clone RA3-6B2
anti-Sox8	guinea pig	1:2000	本研究室で作製 (28)
anti-GP2	rat	1:200	MBL; clone 2F11-C3
anti-Tnfaip2	rabbit	1:200	本研究室で作製 (24)
anti-CCL9	goat	1:100	R&D systems; AF463
anti-CCL20	goat	1:200	R&D systems; AF760
anti-OPG	goat	1:400	R&D systems; AF549
anti-Aif1	goat	1:200	abcam; ab5076
anti-Marksl1	rabbit	1:200	Proteintech; 10002-2-AP
anti-Uromodulin	sheep	1:200	R&D systems; AF5175
anti-Spi-B	sheep	1:200	R&D systems; AF7204
anti-ZO-1	rabbit	1:200	Thermo fisher Scientific; 61-7300
anti-RANKL	guinea pig	1:1000	本研究室で作製
anti-RANK	goat	1:400	R&D systems; AF692
anti-EpCAM	rat	1:200	eBiosciences; clone G8.8
anti-Krt5	rabbit	1:200	Biolegend; 905504
anti-CD45	rat	1:200	BD Biosciences; 30-F11
anti-E-Cadherin	goat	1:400	R&D systems; AF748
anti-Ly6G	rat	1:200	BD Biosciences; 551459
anti-Siglec F	rat	1:200	BD Biosciences; E50-2440
二次抗体	宿主	希釈倍率	購入元
Alexa Fluor 488 anti-goat IgG	donkey	1:1000	Thermo fisher Scientific; A32814
Alexa Fluor 488 anti-guinea pig IgG	donkey	1:800	Jackson ImmunoResearch; 706-545-148
Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG	donkey	1:800	Thermo fisher Scientific; A32790
Alexa Fluor 488 anti-rat IgG	donkey	1:800	Jackson ImmunoResearch; 712-545-153

Alexa Fluor 555 anti-goat IgG	donkey	1:1000	Thermo fisher Scientific; A32816
Alexa Fluor 555 anti-rabbit IgG	donkey	1:1000	Thermo fisher Scientific; A32794
Cy3 anti-sheep IgG	donkey	1:800	Jackson ImmunoResearch; 713-165-147
Cy3 anti-guinea pig IgG	donkey	1:800	Jackson ImmunoResearch; 706-165-148
Alexa Fluor 647 anti-rabbit IgG	donkey	1:800	Thermo fisher Scientific; A32795
Cy5 anti-rat IgG	donkey	1:800	Jackson ImmunoResearch; 712-175-153
レクチン	宿主	希釈倍率	購入元
Alexa Fluor 488 PNA	-	1:400	Thermo fisher Scientific; L21409

2-8 蛍光ナノ粒子の点眼

マウスに三種混合麻酔 [0.3 mg/kg メデトミジン (日本全薬工業)、4.0 mg/kg ミダゾラム (アステラス製薬)、5.0 mg/kg ブトルファノール (Meiji Seika ファルマ)] を腹腔内投与することで昏睡させた。マウスが昏睡状態になったことを確認し、 1.0×10^9 粒子の蛍光ナノ粒子 (直径 200 nm, Polysciences, Inc.) を含む 5 μ L の PBS 溶液を眼の表面に点眼した⁵⁰。その後、塩酸アチパメゾール (日本全薬工業) を投与することでマウスを覚醒させ、30 分後または 60 分後に深麻酔または頸椎脱臼により安楽死させた。

2-9 Fluorescence *in situ* hybridization

TALT を採取後 OCT compound に直接包埋し凍結ブロックを作製した。その後、作製した凍結切片を、室温にて 4 % PFA 中で 15 分間固定した。Quantigene View RNA ISH Cell Assay (Affymetrix) のプロトコルに従って Fluorescent *in situ* hybridization (Fluorescent *in situ* hybridization: FISH) を行った。固定後の切片を室温下で detergent solution 中に 10 分間静置した後、Protease QS/PBS 中で 10 分間静置した。その後、*Tnfsf11* 特異的オリゴヌクレオチドプローブ (Affymetrix, Cat: VB1-13707) で 40°C、3 時間静置した。その後シグナルの増幅処理を行い、Hoechst 33342 trihydrochloride で細胞核を染色し、ProLong™ Gold antifade reagent で封入した。観察は、共焦点レーザー顕微鏡 (FV3000, Olympus) で行った。

2-10 RANKL 投与

Glutathione S-transferase (GST) および GST-RANKL リコンビナントタンパク質は、木村俊介准教授と高野峻輔様、遠藤真弓様に作成いただいた。野生型 BALB/c マウスに 10 mg/kg の GST-RANKL を 3 日間腹腔内投与した。最後の投与から 24 時間後にマウスを頸椎脱臼に

より安楽死させ、組織を採取した。GST および GST-RANKL の精製度を確かめるために、各タンパク質 1.25 μg を SDS-PAGE で分離し、CBB Stain One (Nacalai Tesque) を用いて室温で 15 分間染色した。染色像を基に Fiji を用いて濃度を測定した結果、90%以上の純度であることを確かめた⁵¹。さらに、GST と GST-RANKL のエンドトキシン含有量を ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GenScript) で測定した結果、それぞれ 350、666 EU/mL であった。

2-11 定量的 PCR

TALT、NALT、cLN、結膜を TRIzol (Thermo fisher Scientific) または Sepazol (Nacalai Tesque) 中で破碎した後、4°C、15000 $\times g$ で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。製品プロトコルに従い RNA を抽出した後、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて cDNA を合成した。合成後の cDNA を SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad)、各種プライマーを用いて CFX-connect (Bio-Rad) で定量的 PCR を行った。得られた結果はハウスキーピング遺伝子を用いて標準化し、 ΔCt 値または対照群に対する $\Delta\Delta\text{Ct}$ 値を用いて解析した。各種プライマーの配列情報は下表に記載した。

標的遺伝子	配列
<i>Gapdh</i>	Forward 5' -AGGTCGGTGTGAACGGATTTG- 3' Reverse 5' -TGTAGACCATGTAGTTGAGGTC- 3'
<i>Sox8</i>	Forward 5' -CGAGGGGATACTGCTGAGG-3' Reverse 5' -AGCTCTGCGTTATGGAGATGC- 3'
<i>Spib</i>	Forward 5' -CCGAGGGGAGGGGATCTGAG- 3' Reverse 5' -GGAGGAGAACTGGAAGACGCCG- 3'
<i>Tnfaip2</i>	Forward 5' -GTGCAGAACCTCTACCCCAATG- 3' Reverse 5' -TGGAGAATGTGCGATGGCCA- 3'
<i>Tnfrsf11b</i>	Forward 5' -ACCCAGAACTGGTCATCAGC- 3' Reverse 5' -CTGCAATACACACACTCATCACT- 3'
<i>Gp2</i>	Forward 5' -GATACTGCACAGACCCCTCCA- 3' Reverse 5' -GCAGTTCCGGTCATTGAGGTA - 3'
<i>Tnfrsf11a</i>	Forward 5' -CCAGGAGAGGCATTATGAGCA- 3' Reverse 5' -ACTGTCTGGAGGTAGGAGTGC- 3'
<i>Ccl9</i>	Forward 5' -CAACAGAGACAAAAGAAGTCCAGAG- 3' Reverse 5' -CTTGCTGATAAAGATGATGCCC- 3'

<i>Ccl20</i>	Forward 5' -TGCTCTTCCTTGCTTTGGCATGGGTA- 3' Reverse 5' -TCTGTGCAGTGATGTGCAGGTGAAGC- 3'
<i>Aif1</i>	Forward 5' -TGAGGAGATTTCAACAGAAGCTGA- 3' Reverse 5' -CCTCAGACGCTGGTTGTCTT- 3'
<i>Rpl32</i>	Forward 5' -TTCCTGGTCCACAATGTCAA- 3' Reverse 5' - GGCTTTTCGGTTCTTAGAGGA- 3'
epsilon germline transcript (εGLT)	Forward 5' -TCGAATAAGAACAGTCTGGCC- 3' Reverse 5' -TCACAGGACCAGGGAAGTAG- 3'
<i>Il4</i>	Forward 5' -CATCGGCATTTTGAACGAG- 3' Reverse 5' -CGAGCTCACTCTCTGTGGTG- 3'
<i>Il5</i>	Forward 5' -ACATTGACCGCCAAAAAGAG- 3' Reverse 5' -ATCCAGGAAGTGCCTCGTC- 3'
<i>Il10</i>	Forward 5' -GCTGGACAACATACTGCTAACC- 3' Reverse 5' -ATTTCGATAAGGCTTGGCAA- 3'
<i>Il13</i>	Forward 5' -GGTCCACACAGGGCAACT- 3' Reverse 5' -AATAAGATCAAGAAGAAATGTGCTCAA- 3'

2-12 抗 RANKL 抗体の投与

5 mg/kg の抗 RANKL 中和抗体 (Oriental Yeast Co., clone: OYC1) をマウスに 4 日ごとに計 2 回腹腔内投与した。2 回目の投与から 4 日後にマウスを頸椎脱臼によって安楽死させ、パイエル板と TALT を採取した。採取したパイエル板は PBS で洗浄後、1 mM dithiothreitol/Hank's balanced salt solution に浸漬した。採取したパイエル板の管腔側をキムタオルに押し付け粘液を除き、30 mM EDTA/1 mM dithiothreitol/Hank's balanced salt solution 中で氷上 20 分間インキュベートした。実体顕微鏡 (M125, Leica) 下で注射針 (26G) を用いてパイエル板上皮をシート上に剥離し、注射針と剃刃を使用して FAE を単離した²⁴。

2-13 アレルギー結膜炎モデル

アレルギー結膜炎モデルは先行研究を一部改変することで確立した³⁹。三種混合麻酔を用いてマウスを昏睡させ、200 µg 卵白アルブミン (ovalbumin: OVA, grade V, Sigma-Aldrich) と 0.5 µg コレラ毒素 (cholera toxin: CT, List Biological Laboratories, Cat: 100 B) を懸濁した PBS を片目あたり 5 µL ずつマイクロピペッターで点眼することで免疫応答を誘導した。投与は 2 日間に 1 回の投与を 5 回行った後、6 日間の間隔を空けてから再度 2 日間に 1 回の投与を 5 回行った。最後の 1 回はアレルギー結膜炎の主な症状である、痒みの評価を行うために、マウスが覚醒した状態で OVA 溶液 (CT を含まない) を投与した。OVA 溶液投与後、

マウスを透明なケージに直ちに移し、10 分間行動をスコアリングした。毛繕いの行動を除き、1 ストロークを 1 回として眼を掻く回数を計測した。スコアリングに際して、測定者はマウスがどの群に該当するかわからない状態で計測した。

2-14 ELISA による OVA 特異的抗体の検出

麻酔下でマウス血液を心採血により採取し、遠心分離することで血清を得た。その後、片目あたり 10 μ L の PBS で眼を洗浄した液を集め、涙液とした。鼻腔洗浄液は、1 mL の PBS を鼻腔内に流し込むことで収集した。

総 IgA および IgG を測定するため、ELISA 96 ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific) を使用し、50 mM 炭酸ナトリウムに希釈した抗 IgA 抗体または抗 IgG 抗体 (1:100、Bethyl Laboratories) を各 well に 100 μ L 加え、室温で 1 時間コートした。OVA 特異的な抗体量を測定する際には、ELISA プレートに 100 μ L の 1 mg/mL の OVA/PBS でコーティングし、4 $^{\circ}$ C で一晩静置した。0.05% Tween 20 (Nacalai Tesque) /PBS で洗浄した後、2% BSA (Nacalai Tesque) /PBS を用いて 1 時間室温でブロッキングを行い、サンプルを各 well に 100 μ L 滴下してから 2 時間室温で静置した。サンプル中の抗体を検出するために、HRP 標識抗マウス IgA 抗体 (1:20000、Bethyl Laboratories) または抗 IgG 抗体 (1:50000、Bethyl Laboratories) を 2% BSA/PBS で希釈して加え、さらに 1 時間インキュベートした。IgE の検出には、2% BSA/PBS で希釈したビオチン標識抗 IgE 抗体 (1:200、BioLegend) を加え 1 時間インキュベートした後、HRP-ストレプトアビジン (1:1000、BioLegend) を加え 30 分間インキュベートした。その後、1-StepTM Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo fisher Scientific) または ELISA POD Substrate TMB Kit (Nacalai Tesque) で抗体を検出し、1.2M H₂SO₄ を 100 μ L 滴下して反応を停止した。反応停止後の各 well の 450 nm での吸光度を Infinite 200 PRO multimode plate reader (Tecan Group Ltd.) で測定した。血清中ヒスタミンを測定する際には、血清をメタノール沈殿により濃縮し、検出にはヒスタミン ELISA キット (Abcam, Cat: ab213975) を用いた。

2-15 定量画像解析

定量画像解析では、BZ-X810 All-in-One fluorescence microscope (Keyence) または共焦点レーザー顕微鏡 (FV3000, Olympus) を用いて画像を取得した。前者を用いた場合は BZ-X800 Analyzer software (Keyence) を、後者の場合は Fiji をそれぞれ用いた。各細胞集団のうち蛍光ナノ粒子を細胞内に含んでいる細胞の割合を算出した⁵¹。細胞数 (好中球、好酸球、マスト細胞) は結膜固有層の面積で標準化した。Sox8⁺M 細胞の数は、TALT または NALT の FAE の面積に対して標準化した。

2-16 統計解析・作図

2 群間の比較においては、正規分布である場合は F 検定により等分散性を調べ、等分散の場合には Student's *t* test を使用し、不等分散の場合には Welch's *t* test を採用した。非正規分布である場合には Mann-Whitney *U* test を使用した。3 群以上の比較には Bartlett test で等分散性を調べ、等分散の時には Tukey's test を、不等分散の時には Kruskal-Wallis test を行った。腸管オルガノイドにおける NIK SMI1 の効果を調べた実験では、NIK SMI1 無添加群を対照群として Dunnett test を行った。対応のない且つ 2 つの因子が含まれる群の比較には、Two way ANOVA と Tukey's multiple comparison test を用いた。p 値によって * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ と表記した。また、エラーバーには標準誤差 (SEM) を使用した。統計解析および Figure の作成には Prism 10 (GraphPad Software) を用いた。一部の図は Biorender を用いて作成した。

第三章 結果

3-1 マウス TALT を肉眼解剖学的に採取する技術を確立した

TALT の解剖学的位置を把握するため BALB/c マウス頭部の冠状断面の連続切片を作製し、HE 染色を行った (Figure 1A, B)。眼に近い部位から 2 つの隣接する管腔構造が認められ、二股に分かれた構造から涙小管と判別した (Figure 1B-a)。さらに鼻側に進んだ切片では管腔は広がって 1 つになり涙嚢に達した。涙嚢では骨に接するリンパ球の集積が認められ TALT であると考えられた (Figure 1B-b, c)。鼻腔に近づき管腔が狭くなるにつれて、リンパ球集積は消失し、管腔は骨により完全に外部から隔離された (Figure 1B-d)。これらの結果から TALT が存在する涙嚢は体表近くに位置し、骨により隔絶されるのは、涙嚢より鼻側であると推察された。

続いて肉眼解剖学的に TALT の分離を試みた。TALT は上顎骨、涙骨の周囲に位置すると推定されたことから (Figure 2A)、マウス頭部の表皮を剥がし、頭蓋骨を露出させた (Figure 2B-a)。眼球前部の上顎骨頬骨突起の根本部分を切断し、頬部の結合組織を上顎骨から剥離させた後、眼から鼻部へとつながる管状構造を露出させた (Figure 2B-b, c)。管状構造の眼側には、涙骨に接して嚢状構造が認められた (Figure 2B-d)。青色色素のエバンスブルーの点眼により、管状構造内に色素が確認できたことから、眼から連続した涙道であること、嚢状構造は涙嚢であると結論づけた (Figure 3A)。上記の方法により鼻涙管と涙嚢を露出した状態の試料を用いて、B 細胞に対する抗 B220 抗体によるホルマウント免疫染色を行った。DAB によって抗体結合部位を茶褐色に発色させたところ、涙嚢において B220⁺細胞が集積していた (Figure 3B)。この涙嚢を含む組織切片を作成し、HE 染色を行なった結果、TALT のリンパ球集積が認められた (Figure 3C)。以上の結果から、TALT を肉眼解剖学的に採取する技術を確立することに成功した。

3-2 TALT の組織学的解析

上記の方法で眼球と周辺組織を含む組織を採取し、組織切片を作製し HE 染色を行った結果、涙嚢にリンパ球の集積が認められた (Figure 4A, B)。TALT 濾胞には HE 染色により細胞質が比較的大きな細胞が濾胞の中心に集まった胚中心構造、細胞核が明瞭で背の高い内皮細胞で内腔が覆われた高内皮細静脈が確認できた (Figure 4C, D)。涙嚢の内腔を覆う上皮、TALT の FAE のいずれも重層扁平上皮で構成されていた (Figure 4E)。

3-3 TALT のリンパ球組成は粘膜関連リンパ組織の組成に類似している

上述のように確立した技術を用いて、単離した TALT の免疫細胞構成を Flow cytometry で調べた (Figure 5A, B)。細胞構成を比較するために、鼻腔内の粘膜関連リンパ組織 NALT

とパイエル板、頭部の所属リンパ節である cLN を同一マウスから採取して解析した (Figure 5C-G)。

TALT は主に B 細胞 ($CD3\epsilon^+B220^+$) と T 細胞 ($CD3\epsilon^+B220^-$) で構成されていた。特に、B 細胞の割合が高く、NALT やパイエル板の細胞構成と類似していた (Figure 5D)。さらに、詳細に細胞集団を解析したところ、T 細胞集団は、 $CD4^+$ および $CD8\alpha^+$ T 細胞の T 細胞中の割合 (平均 $\pm$ 標準誤差) はそれぞれ $53.53 \pm 1.74\%$ 、 $37.00 \pm 0.84\%$ という組成であった (Figure 5E)。TALT の $CD4^+$ T 細胞集団は、主に $CD62L^+CD44^+CD4^+$ エフェクターメモリー T 細胞で構成され ($CD4^+$ T 細胞の $50.35 \pm 1.60\%$)、比較的小さい割合で $CD62L^+CD44^+CD4^+$ のナイーブ T 細胞 (同 $23.95 \pm 0.48\%$) が含まれていた (Figure 5E)。

続いて、B 細胞の構成について調べた結果、 IgA^+ B 細胞が TALT 全 B 細胞中の $4.05 \pm 0.43\%$ を占め、パイエル板や NALT と同程度だった (Fig. 5F, G)。また、TALT における B 細胞中では $Bcl-6^+GL7^+GC B$ 細胞の割合が $3.04 \pm 1.07\%$ であった (Figure 5G)。GC B 細胞と相互作用することで、その分化・生存を維持する $PD-1^+Bcl-6^+Tfh$ 細胞も TALT 内で多く検出された ($CD4^+$ T 細胞中の $8.40 \pm 1.93\%$)。一方で、cLN では GC B 細胞や Tfh 細胞はほとんど検出されなかった (Fig. 5G)。

このように、TALT のリンパ球構成は粘膜関連リンパ組織の構成と類似しており、cLN の構成とは大きく異なっていた。以上の結果は、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る。

3-4 点眼による抗原投与は TALT における免疫応答を活性化させる

TALT は涙道管腔に隣接して存在することから、眼粘膜の抗原に対して免疫応答を引き起こすのではないかと考えた。そこで、OVA 抗原をアジュバントである CT とともに点眼投与する免疫誘導モデルを作成した (Figure 6A)。最初の抗原投与から 21 日後に TALT を採取し、組織切片と Flow cytometry によって GC B 細胞の増加を測定した。Peanut agglutinin (PNA) と抗 B220 抗体を用いて、GC B 細胞を組織切片で解析したところ、OVA 単独投与では GC B 細胞は増加せず、CT とともに投与することで胚中心の顕著な拡大が認められた (Figure 6B)。Flow cytometry による解析でも同様に、 $GL7^+CD95^+$ である GC B 細胞が OVA+CT 投与群で増加していた (Figure 6C)。同様に cLN で GC B 細胞と Tfh 細胞が OVA+CT 投与によって増加していた (Figure 6D)。これらのマウスでは、血清中の OVA 特異的 IgG と涙液中の OVA 特異的 IgA の有意な増加が認められた (Figure 6E)。以上の結果は点眼による抗原投与がアジュバントの存在下において TALT の胚中心反応を活性化させること、それにより涙液中の抗原特異的抗体を誘導できることを示している。興味深いことに、点眼により cLN が活性化し血中の抗体量が増加した。これは点眼による抗原投与が局所の免疫応答だけでなく、全身の免疫応答を活性化することを示している。

3-5 TALT FAE に高い取り込み能を有する M 細胞が存在する

続いて TALT における M 細胞の存在を調べた。TALT の凍結切片を作製し、パイエル板で M 細胞に発現することが報告されている分子について TALT における発現を調べた。蛍光免疫染色の結果、いずれの分子についても TALT FAE に発現が認められた (Figure 7, 8)。GP2、Sox8、Tnfaip2 を共発現する細胞が TALT FAE に認められ、Sox8⁺細胞は全てが Spi-B を、 $93.57 \pm 3.00\%$ が Tnfaip2 を共発現していた (Figure 7)。Sox8⁺細胞のうち $63.32 \pm 5.70\%$ が GP2 を発現していた。これはパイエル板 M 細胞における GP2⁺細胞の割合 $79.98 \pm 3.51\%$ よりやや少ない値であった²⁴。さらに、Sox8⁺細胞は他の 5 種の M 細胞マーカー (Mars11⁵³、CCL9⁵⁴、CCL20^{55,56}、Uromodulin^{26,27}、Aif1⁵⁷) と上皮マーカー EpCAM を発現していた (Figure 8)。Sox8 と Spi-B は M 細胞の性質を決定づける転写因子であること、複数の発現分子を共有することは腸管と TALT の M 細胞が共通した性質を有することを示している。

続いて、TALT M 細胞の抗原の取り込み能を評価した。麻酔下でマウスに蛍光ナノ粒子 (直径 200 nm) を点眼した。腸管では Tnfaip2 が細胞質に、GP2 が細胞膜にそれぞれ局在することから細胞の形状を認識しやすいこと^{24,52}、GP2 が取り込み能の高い成熟 M 細胞に発現することから²⁴、この 2 つを M 細胞マーカー分子として蛍光ナノ粒子を含む細胞集団を定量解析した。その結果、GP2⁺Tnfaip2⁺細胞の $71.39 \pm 6.88\%$ が細胞質に蛍光ナノ粒子を取り込んでいた (Figure 9A, B)。一方で、涙道には Sox8 や Tnfaip2 を発現せずに GP2 を発現する細胞が存在し、蛍光ナノ粒子を取り込んでいたものの $21.46 \pm 8.79\%$ 程度であった。これらの細胞は形態的に杯細胞であると考えられた^{58,59}。

続いて、タイトジャンクション構成タンパク質 ZO-1 の免疫組織染色を行った。その結果、2~3 層の重層扁平上皮で構成される FAE の最外層でタイトジャンクションが構築されていた (Figure 9C)。TALT M 細胞は複数の細胞核を持つように見えるが、Sox8 で染まる核は一つであり、他の細胞核は M 細胞のものではないことを示している (Figure 9C-a, b)。このような構造は腸管の M 細胞にも認められ、M 細胞が取り込んだ抗原を免疫細胞がすぐに受け取ることで、効率的に免疫応答を誘導することに寄与していると推察される^{8,10}。また、上皮構造に着目すると、TALT FAE は 2-3 層の重層を形成するが、M 細胞が重層を形成している様子は認められず、基底膜に接し、管腔側に通じることで、管腔内物質の重層上皮の通過を可能にしていると想定される。

3-6 RANKL/RANK/OPG は TALT M 細胞の分化を制御する

腸管や気道の M 細胞は、上皮下のストローマ細胞が発現する RANKL が上皮細胞の RANK と相互作用することで分化誘導される^{11,19-22}。そこで、TALT における RANKL と RANK の分布を蛍光免疫染色により解析した。FAE に RANK⁺細胞、その上皮下に RANKL⁺細胞が認められた (Figure 10A)。FISH による RANKL mRNA (*Tnfsf11*) も同様に FAE 下に

認められた (Figure 10B)。これらの結果から RANKL を発現する細胞が TALTFAE 下に存在することが示された。

続いて、リコンビナントタンパク質 GST-RANKL または対照群には GST をマウスに腹腔内投与した (Figure 11A)。蛍光免疫染色の結果、GST-RANKL 投与群では GST 投与群と比較して TALT M 細胞が増加することが明らかになった (Figure 11B, C)。さらに、定量的 PCR 解析を行なった結果、8 種類の M 細胞関連遺伝子の発現が GST-RANKL 投与によって上昇していた (Figure 11D)。しかしながら、*Gp2* の発現に有意な差は認められなかった。*Sox8*⁺*GP2*⁺細胞が TALT 周辺に存在すること、マウス頭部では杯細胞が GP2 を発現することが報告されていることから^{58,59}、M 細胞以外の細胞による *Gp2* の発現量が多いためであると考えられる。

一方で、抗 RANKL 抗体の腹腔内投与ではパイエル板 M 細胞が完全に消失する条件下でも、TALTM 細胞数は若干の減少傾向を示した (Figure 12)。さらに、RANKL-RANK シグナルの下流に位置し、M 細胞への分化に必要な因子である NIK の関与について調べた。NIK の阻害剤 NIK SMI1 は腸管オルガノイドを用いた *in vitro* モデルで効果的に M 細胞分化を抑制する (Figure 13A)^{23,24}。NIK の TALTM 細胞の分化への関与を調べるために、NIK SMI1 をマウスに 3 日間点眼し、蛍光免疫染色像によって TALTM 細胞数を定量した。その結果、NIK の阻害によって統計的に有意な M 細胞の減少を示した (Figure 13B, C)。

続いて、M 細胞への分化を抑制する内因性分子である OPG の関与を調べた^{29,30}。TALTM 細胞は OPG を発現していた (Figure 14A)。さらに、OPG 欠損マウス (*Tnfrsf11b*^{-/-}) では対照群 (*Tnfrsf11b*^{+/+}) と比べて単位面積あたりの M 細胞数は 11.92 倍に増加していた (Figure 14B, C)。以上の結果から RANKL/RANK/OPG は TALTM 細胞の分化制御を担っていることが明らかになった。

3-7 RANKL の投与は抗原特異的な抗体の産生を促進する

次に、TALTM 細胞による鼻涙管内抗原の取り込みが免疫学的に重要であるかを調べた。GST-RANKL を腹腔内投与し TALTM 細胞を増加させた後、OVA を CT とともに点眼することで免疫応答を誘導した (Figure 15A)。cLN における GC B 細胞と Tfh 細胞の細胞数に変化は見られなかったが、抗原と血清中の抗原特異的な抗体は GST-RANKL 投与群で統計的に有意に高い値を示した (Figure 15B, C)。

3-8 TALTM 細胞の欠損は TALT における胚中心応答を減弱させる

前項では、RANKL を全身性に投与することで免疫応答の変化を追跡した。しかしながら、RANKL の受容体である RANK は樹状細胞などにも発現しており⁶⁰、上述の手法ではその影響を排除することができない。そこで、TALT 特異的な M 細胞欠損マウスの作出を試みた。TALT FAE は、皮膚と同様に重層扁平上皮で構成されていることから (Figure 4E,

9C)、皮膚に発現が認められるケラチンタンパク質 Keratin 5 (Krt5) が発現していると考えた。実際に、野生型のマウスの TALT 組織切片を用いて、蛍光免疫染色を行なったところ、TALT の重層扁平上皮にその発現が認められた (Figure 16A)。そこで、*Krt5*-Cre トランスジェニックマウスと、RANK の遺伝子である *Tnfrsf11a* の遺伝子座を loxP 配列で挟んだ *Tnfrsf11a*^{lox/lox} マウスを交配させて *Krt5*-Cre *Tnfrsf11a*^{lox/lox} マウスを作出した。このマウスでは、TALT における RANK の発現が欠損し、Sox8⁺Tnfaip2⁺M 細胞が欠如していた (Figure 16B, C)。さらに、点眼投与した蛍光ナノ粒子の輸送は、対照群 (*Tnfrsf11a*^{lox/lox}) と比較して有意に減少していた (Figure 16D)。これらの結果は、*Krt5*-Cre *Tnfrsf11a*^{lox/lox} マウスの TALT FAE で機能的な M 細胞が欠如していることを示している。

このマウスでパリエル板や NALT における M 細胞への影響を調べた。*Krt5* は NALT で一部の細胞に発現が認められ、パリエル板では発現が認められなかった (Figure 17A)。また、RANK の発現および M 細胞は *Krt5*-Cre *Tnfrsf11a*^{lox/lox} マウスの NALT とパリエル板でも認められた (Figure 17B, C)。以上の結果から、このマウスでは TALT 特異的に M 細胞を欠損することが明らかになった。

次に、定常状態における *Krt5*-Cre *Tnfrsf11a*^{lox/lox} マウスにおける頭部のリンパ組織 (TALT, NALT, cLN) における免疫細胞組成を調べた (Figure 18, 19)。Flow cytometry 解析の結果、*Krt5*-Cre *Tnfrsf11a*^{lox/lox} マウスでは CD45⁺細胞数が有意に減少していた (Figure 18A)。さらに、TALT 内の GC B 細胞と Tfh 細胞の数および割合が有意に減少していた (Figure 18B, C)。一方で、NALT や cLN における細胞数や割合は、*Tnfrsf11a*^{lox/lox} マウスと同程度であった (Figure 19)。これらのデータは、TALT 内での胚中心反応を開始する上で M 細胞が重要な役割を果たしていることを示している。一方で、涙液や鼻腔洗浄液中の IgA 量や血清中の IgG 量に変化は認められなかった (Figure 20)。

3-9 TALT は眼アレルゲンに対する IgE 応答の誘導部位である

TALT は眼粘膜表面の抗原に対して免疫応答することから (Figure 6)、TALT における免疫応答がアレルギー性結膜炎の発症に関与するのではないかと考えた。初めに、OVA 抗原と CT を複数回点眼投与することで、アレルギー性結膜炎モデルの確立を試みた (Figure 21A)。抗原感作後のマウスに OVA を曝露した後、眼を掻く回数をかゆみの指数として測定した。その結果、感作 22 日後のマウス (Day 22) では非感作群 (Day 0) と比較して、眼を掻く回数が有意に増加した (Figure 21B)。組織学的解析では、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色で結膜にリンパ球の浸潤が確認された (Figure 21C)。さらに、アレルギーの発症に重要なマスト細胞をトルイジンブルーで検出した結果、脱顆粒したマスト細胞が Day 23 で有意に多かった (Figure 21D, E)。蛍光免疫染色によって Day 23 において結膜で CD45⁺免疫細胞、Flow cytometry によって CD45⁺細胞、CD4⁺T 細胞、CD4⁺GATA3⁺Th2 細胞の増加が認められた (Figure 21F, G)。これらのマウスでは、血清中の OVA 特異的抗体 (IgE、IgA、IgG1)、涙液や鼻腔洗浄液中の IgA 量が上昇していた (Figure 21H)。次に、膜結合型 IgM

および成熟 B 細胞を欠損する muMT マウスにアレルギー結膜炎を誘導した。muMT マウスでは抗原特異的な抗体が検出されず、Day 22 において眼を掻く頻度が有意に減少した (Figure 21I, J)。以上の結果はこのアレルギーモデルは抗体依存的な応答であることを示唆している。

このモデルにおける、免疫細胞について頭部のリンパ組織 (TALT、NALT、cLN) を解析した。CD4⁺免疫細胞数は、Day 23 で TALT と cLN において有意な増加を示し、NALT でも高い傾向にあった (Figure 22A)。次に、アレルギーの誘導に重要な CD4⁺GATA3⁺の Th2 細胞は、TALT および NALT で Day 9 に一時的かつ有意に増加したが (Figure 22B)、cLN ではこの増加が Day 23 まで持続した。Th2 細胞の中でも ST2⁺ Th2 細胞も同様の傾向を示した (Figure 22C)。一方で、食物アレルギーや喘息に関連する RORγt⁺Foxp3⁺の制御性 T (regulatory T cell: Treg) 細胞、RORγt⁺Foxp3⁺Treg 細胞、および RORγt⁺Foxp3⁺Th17 細胞は TALT では非感作群に比較して有意な変化は見られなかった (Figure 22 D-F)。

IgE の誘導に重要とされる Tfh 細胞や GC B 細胞を調べた結果、TALT、NALT では Day 23 に、cLN では Day 9 および Day 23 に有意な増加が認められた (Figure 23 A, B)。さらに、IgE⁺GC B 細胞および IgE⁺B 細胞の数について調べたところ、Day 23 に TALT と NALT で有意に増加し、Day 9 と Day 23 に cLN でも増加が見られた (Figure 23 C, D)。このように、cLN に比較して TALT や NALT で遅れて応答が認められるのは、胚中心応答を制御する PD-1⁺Bcl-6⁺Foxp3⁺濾胞制御性 T (Tfr: T follicular regulatory) 細胞が TALT や NALT では cLN に比較して高い割合で存在していることに起因すると考えられる (Figure 23E)。また、B 細胞での IgE クラススイッチによって生成される免疫グロブリン ε 遺伝子転写産物 (εGLT) も TALT で発現が増加しており (Figure 24A)、IgE 産生に関連する抗炎症性サイトカインである *Il10* の発現も、TALT および cLN で増加していた (Figure 24B)。これらの結果は、TALT、NALT、および cLN が眼粘膜におけるアレルギー特異的 IgE 応答の誘導部位として機能することを示唆している。

3-10 TALT M 細胞の欠損はアレルギー症状を減弱させる

TALT M 細胞による抗原の取り込みがアレルギーにどのような影響を与えるかを TALT M 細胞欠損マウス (*Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{flox/flox}) を用いて調べた (Figure 25A)。*Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{flox/flox} マウスでは、Day 22 における OVA 曝露後の痒みが有意に抑制されていた (Figure 25B)。続いて、アレルギー患者やマウスモデルで認められる上皮バリアの破綻について調べた³⁸。上皮間接着を担う E-Cadherin を蛍光免疫染色で調べたところ、OVA と CT を投与した群で結膜上皮細胞の E-Cadherin が有意に減弱したが、免疫蛍光解析の結果、*Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{flox/flox} マウスではその減弱がキャンセルされた (Figure 25 C)。さらに、*Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{flox/flox} マウスでは、結膜の固有層において脱顆粒したマスト細胞の数が減少していた (Figure 25 D)。*Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{flox/flox} マウスの結膜では、*Il4* および *Il5* の発現が対照群に比べて有意に低下していた (Figure 25E)。一方で、特に Th2 や Th17 細胞によって活性

化される好中球や好酸球は、アレルギーの誘導に伴って浸潤が認められるものの、*Krt5-Cre Tnfrsf11a^{flx/flx}* マウスと *Tnfrsf11a^{flx/flx}* マウスの間では差が認められなかった (Figure 26A, B)。また、血清中のヒスタミンおよび OVA 特異的 IgE 量についても、TALT M 細胞欠損の影響は認められなかった (Figure 26C, D)。

M 細胞欠損に伴うアレルギーの減弱がどのように起こっているか調べるために、各リンパ組織のアレルギー関連の免疫細胞を Flow cytometry によって調べた。Th2 細胞が最も多く認められた Day 9 で解析すると、いずれの組織においても Th2 細胞数には有意な変化は認められなかった (Figure 27A)。一方、Day 23 において、胚中心応答に関連する細胞を調べたところ、アレルギーの誘導に伴う Tfh 細胞、GCB 細胞、IgE⁺GCB 細胞、および IgE⁺B 細胞の増加は *Krt5-Cre Tnfrsf11a^{flx/flx}* マウスで抑制されていた (Figure 27B-E)。これらの細胞数は *Krt5-Cre Tnfrsf11a^{flx/flx}* マウスの NALT および cLN 中では変化しなかった。アレルギーを誘導した *Krt5-Cre Tnfrsf11a^{flx/flx}* マウスでは TALT における *Il4* の遺伝子発現が有意に減弱していた (Figure 27F)。IL-4 は Tfh 細胞に産生されること、IgE の誘導因子であることから、免疫細胞の変化とも一致している。以上の結果をまとめると、TALT における M 細胞依存的な抗原輸送が、Tfh 細胞を介して胚中心反応依存的に IgE を誘導し、アレルギー性結膜炎の増悪に関与していることが示唆された。

第四章 考察

これまでの TALT 研究では、涙嚢が上顎骨と涙骨に囲まれ TALT の単離が困難であったため、組織切片による研究に限られていた。また、組織切片の作製には、骨を切るために数週間を要する脱灰処理が必須であった。本研究では TALT の位置を特定し、分離する手法を開発したことで、脱灰処理が不要になり、試料採取の当日に切片作製が可能となった。さらに、未固定凍結切片の作製、アルコール系の固定液の使用による抗原性の維持など染色条件の選択肢が増え、免疫組織染色を効率的に行うことが可能になった。それに加えて、TALT 組織を直接採取することで、定量的 PCR 法、Flow cytometry による定量的解析が可能になった。

Flow cytometry 解析により TALT の免疫細胞構成を定常状態で調べたところ、B 細胞を主要な集団とし、エフェクターメモリー T 細胞、GC B 細胞、Tfh 細胞がリンパ節に比較して高い割合で存在していた。また、涙道管腔内の抗原を TALT に輸送する M 細胞が FAE に存在していた。これらの特徴はパイエル板や NALT に類似しており、従来は組織学的な特徴でのみ定義されていたが、免疫細胞組成や抗原輸送機構の観点でも粘膜関連リンパ組織としての特徴を有することを見出した⁷。

定常状態の TALT における抗原は、眼粘膜表面から涙道に輸送される空気中の抗原や常在細菌によって誘導されているかもしれない。TALT M 細胞は、腸管 M 細胞で細菌の取り込み受容体として報告されている分子が発現していた。GP2 は *E.coli* やサルモネラ菌が持つ I 型線毛に結合し取り込み受容体として機能する分子である¹²。さらに、Aif1 は *Yersinia enterocolitica* に結合する $\beta 1$ インテグリンの活性化に寄与する⁵⁷。Uromodulin は *Lactobacillus* 株の一種 L-92 の取り込み受容体として作用する⁶¹。これらは TALT M 細胞も微生物を取り込み、細菌に対する免疫応答を誘導する能力を持つことを示唆している。定常状態における TALT における GC B 細胞および Tfh 細胞の割合はパイエル板よりも低かったが、これは涙道と消化管における抗原量の違いによるものであり、TALT には細菌性抗原が比較的少ないためであると考えられる^{1,62}。

TALT FAE の M 細胞は GP2、Sox8、Tnfrsf25、Spi-B などの発現分子が一致していた。パイエル板の FAE では GP2 は Sox8 と良く共局在し、単独でも特異性の高い M 細胞マーカーとなるが、頭部には Sox8⁺GP2⁺の杯細胞が多く存在し、GP2 の発現のみで M 細胞を同定できない。それゆえ、頭部における M 細胞の同定には GP2 に加えて、他の M 細胞発現分子との二重染色が適切であると考えられる。Sox8 はマウスだけでなく、ヒトの M 細胞においても発現していることからヒト M 細胞研究への適用も可能であると想定される²⁸。

過去の報告により、RANKL/RANK の相互作用は腸管と呼吸器の M 細胞への分化を誘導することが明らかになっていた¹⁹⁻²²。RANKL 投与により TALT M 細胞が増加したこと、逆に TALT FAE における RANK の欠損が TALT M 細胞を欠損させたことから、RANKL/RANK は粘膜組織における普遍的な M 細胞分化制御機構であると考えられる。そのため、未だ解析されていない他の粘膜組織においても同様に RANKL が M 細胞分化を誘

導する可能性が高い。OPG による自己抑制機構も同様に粘膜組織に共通していると想定される。しかしながら、興味深いことに抗 RANKL 抗体の投与はパイエル板 M 細胞を顕著に減少させた一方、TALT M 細胞における変化は減少傾向にとどまった。これは腸管では 3-5 日間という短期間でターンオーバーが起こるため、抗体投与前に存在していた M 細胞は消失しており、その後の M 細胞の発生が抗体により抑えられている。一方で、TALT FAE のターンオーバーが極めて遅いため抗体投与前に存在する M 細胞が残存し、且つ M 細胞への分化後の維持には RANKL が不要である可能性が考えられる。

単層上皮で構成される腸管や呼吸器と異なり、マウス TALT の FAE は重層扁平上皮であった。本研究では M 細胞が重層扁平上皮の管腔から基底膜まで連続し、上皮下へ直接抗原を輸送できる可能性が示唆された。これは重層扁平上皮において M 細胞が存在することを示した初めての研究である。ヒト TALT FAE は単層上皮で構成されるが、口蓋扁桃、舌扁桃、膣、子宮内膜は重層扁平上皮で構成されるため、本知見はこれらの粘膜組織における M 細胞研究へと適用できる可能性がある⁶³。

従来のアレルギー性結膜炎における免疫誘導組織は、所属リンパ節である cLN のみに焦点が当てられていた。また、解析対象も Th2 細胞に限局し、IgE はほとんど解析されていなかった。本研究では、アレルゲンへの曝露により、TALT で Th2 細胞、Tfh 細胞、IgE⁺GCB 細胞といったアレルギー関連免疫細胞が誘導されていることを新たに見出した。特に、GATA3⁺Th2 細胞の割合は、TALT で CD4⁺T 細胞の約 20%に達し、NALT (約 5%) や cLN (約 0.8%) よりも非常に高かった (Day 9)。その後、Th2 細胞は Day23 において結膜で認められることから、TALT で早期に強力な 2 型免疫応答が誘導され、その後実行組織である結膜で機能すると考えられる。さらに、アレルギーの悪化に特に重要とされる、ST2⁺pathogenic Th2 細胞も一時的に TALT で増加していた。これらのことから、TALT はアレルギー誘導性細胞の誘導組織として機能することが示唆される。

本研究では、アレルゲンが TALT における Tfh 細胞を増加させること、この増加は M 細胞の欠損で抑制されることを発見した。Tfh 細胞は、高親和性抗体の誘導に重要であり、IgE 産生にも重要な細胞である。パイエル板や気道組織において、Tfh 細胞の分化は主に 2 型コンベンショナル樹状細胞 (cDC2) によって促進される^{64,65}。また、腸管 M 細胞は cDC2 の成熟に必須であることが報告されている⁶⁶。したがって、TALT では、M 細胞と cDC2 によって Tfh 細胞が誘導され、アレルゲン特異的な IgE 抗体の産生を促進している可能性がある。

本研究では、M 細胞がアレルギー性結膜炎の発症に重要であることを解明した。TALT M 細胞の欠損は、マスト細胞の脱顆粒、上皮バリアの維持、痒みなど、局所的なアレルギー性結膜炎の症状を部分的に緩和した。一方で、血清中の IgE とヒスタミンには影響が認められなかった。これはアレルゲンが NALT と cLN での IgE を誘導することが関与すると考えられる。アレルギー症状と IgE 量が相関しないことを説明する仮説としては、IgE の量には変化が認められないが、その親和性が異なるという別の仮説も考えられる。IgE の親和性は

マスト細胞の脱顆粒やアナフィラキシーにおいて重要である^{43,67-69}。また、Tfh細胞の中でも、特にIL-4やIL-13を産生するTfh13細胞が高親和性IgEの誘導に重要とされる⁴⁰⁻⁴³。Tfh細胞由来のIL-13を欠損させたマウスでは、血清中IgEの総量は変化しない一方、高親和性IgEが減少する⁴³。本研究ではアレルギー結膜炎を誘導したM細胞欠損マウスのTALTでTfh細胞が減少し、*Il4*や*Il13*の遺伝子発現がTALTでそれぞれ有意な減少または減少傾向を示すことを見出した。この結果から、TALTM細胞の欠損がTfh13細胞と高親和性IgEを減少させ、アレルギーの緩和につながっている可能性が考えられる。

本研究では、Krt5プロモーター陽性細胞でCreリコンビナーゼを発現するマウスを用いて、TALT FAEにおけるRANKを選択的に欠損させた。NALTではFAEにKrt5⁺細胞が検出されたものの、M細胞は維持されていたことから、NALTにおけるM細胞の前駆細胞はKrt5陰性であるという可能性がある。Krt5は様々な上皮で発現している。例えば、髄質胸腺上皮細胞が該当する⁷⁰。この細胞はT細胞の発達過程におけるネガティブセレクションに関与することから、*Krt5-Cre Tnfrsf11a^{flox/flox}*ではT細胞分化に影響が出ている可能性がある。しかしながら、髄質胸腺上皮細胞におけるRANK欠損は、妊娠中の雌マウスの胎盤および脂肪組織でのTreg機能に影響を与えるものの、非妊娠マウスではほとんど影響を受けない⁷⁰。本研究成果でもNALTとcLNにおけるT細胞構成は定常状態およびアレルギー条件下の両方でほとんど影響を受けなかった。

抗原の点眼投与によって、三次リンパ組織である結膜関連リンパ組織が誘導されることが報告されている^{39,44}。この組織はB細胞やT細胞などの免疫細胞に加えて、痒みの伝達に関わるβ-IIIチューブリン陽性の神経を内包している³⁹。また、マウスではその上皮にM細胞様の形態を持つ細胞が存在する⁴⁴。結膜関連リンパ組織においてもM細胞が存在し、アレルギーの応答に関与する可能性は本研究では検証できていない。

本研究は組織特異的なM細胞欠損マウスを用いて、アレルギーとM細胞の関係を解析した初めての研究である。先行研究では、腸管のM細胞を標的とした抗原の投与により、パイエル板における免疫寛容が誘導されることが報告されている⁷¹。この結果はM細胞による抗原の取り込みがアレルギーを悪化させる、という本研究結果と相反するように思われるが、M細胞による抗原取り込みが、免疫の活性化または抑制のいずれを誘導するのかは、抗原やアジュバントの種類・投与頻度、免疫応答を担う組織といった様々な因子によって決定される可能性があり、さらなる検証が必要である。また、アレルギー条件下でM細胞の機能や細胞数が変化するのかは不明である。興味深いことに、アレルギーで誘導されるカルシトニン遺伝子関連ペプチドはパイエル板のM細胞への分化を抑制することが報告されている^{39,72}。これはM細胞数の制御を介して、アレルギーの制御に関与する可能性を示唆している。これらの検証は、アレルギー研究に新たな知見をもたらすかもしれない。

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。本研究で示したアレルギーへの関与に加えて、M細胞が病原微生物の侵入口となることを考えると、本研究の知見は眼領域の感染症に関する研

究にも役立つと期待される。また、腸管の M 細胞は任意の抗原を取り込ませることで、粘膜ワクチンを効率的に誘導する標的として期待されている。今後、点眼によって眼周辺の粘膜免疫応答を制御する創薬標的として本研究の知見が有用となることが期待される。

第五章 参考文献

1. Paiva, C. S. de, Leger, A. J. St. & Caspi, R. R. Mucosal immunology of the ocular surface. *Mucosal Immunol.* **15**, 1143–1157 (2022).
2. Paulsen, F. *et al.* Functional anatomy of human lacrimal duct epithelium. *Anat. Embryol.* **198**, 1–12 (1998).
3. Paulsen, F. P., Paulsen, J. I., Thale, A. B. & Tillmann, B. N. Mucosa-associated lymphoid tissue in human efferent tear ducts. *Virchows Arch.* **437**, 185–189 (2000).
4. Knop, E. & Knop, N. Lacrimal drainage-associated lymphoid tissue (LDALT): a part of the human mucosal immune system. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**, 566–74 (2001).
5. Paulsen, F. P., Schaudig, U., Maune, S. & Thale, A. B. Loss of tear duct-associated lymphoid tissue in association with the scarring of symptomatic dacryostenosis. *Ophthalmology* **110**, 85–92 (2003).
6. Nagatake, T. *et al.* Id2-, ROR γ t-, and LT β R-independent initiation of lymphoid organogenesis in ocular immunity. *J. Exp. Med.* **206**, 2351–2364 (2009).
7. Brandtzaeg, P., Kiyono, H., Pabst, R. & Russell, M. W. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol.* **1**, 31–37 (2008).
8. Owen, R. L. & Jones, A. L. Epithelial Cell Specialization within Human Peyer's Patches: An Ultrastructural Study of Intestinal Lymphoid Follicles. *Gastroenterology* **66**, 189–203 (1974).
9. Owen, R. L. Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches—a personal and historical perspective. *Semin. Immunol.* **11**, 157–163 (1999).
10. Mabbott, N. A., Donaldson, D. S., Ohno, H., Williams, I. R. & Mahajan, A. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol.* **6**, 666–677 (2013).
11. Rios, D. *et al.* Antigen sampling by intestinal M cells is the principal pathway initiating mucosal IgA production to commensal enteric bacteria. *Mucosal Immunol.* **9**, 907–916 (2016).

12. Hase, K. *et al.* Uptake through glycoprotein 2 of FimH⁺ bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* **462**, 226–230 (2009).
13. Tahoun, A. *et al.* Salmonella Transforms Follicle-Associated Epithelial Cells into M Cells to Promote Intestinal Invasion. *Cell Host Microbe* **12**, 645–656 (2012).
14. Nakato, G. *et al.* Cutting Edge: Brucella abortus Exploits a Cellular Prion Protein on Intestinal M Cells as an Invasive Receptor. *J. Immunol.* **189**, 1540–1544 (2012).
15. Donaldson, D. S. *et al.* M cell-depletion blocks oral prion disease pathogenesis. *Mucosal Immunol.* **5**, 216–225 (2012).
16. Nair, V. R. *et al.* Microfold Cells Actively Translocate Mycobacterium tuberculosis to Initiate Infection. *Cell Rep.* **16**, 1253–1258 (2016).
17. Ding, S. *et al.* Retinoic Acid and Lymphotoxin Signaling Promote Differentiation of Human Intestinal M Cells. *Gastroenterology* **159**, 214–226.e1 (2020).
18. Matsumura, T. *et al.* Botulinum toxin A complex exploits intestinal M cells to enter the host and exert neurotoxicity. *Nat. Commun.* **6**, 6255 (2015).
19. Knoop, K. A. *et al.* RANKL Is Necessary and Sufficient to Initiate Development of Antigen-Sampling M Cells in the Intestinal Epithelium. *J. Immunol.* **183**, 5738–5747 (2009).
20. Nagashima, K. *et al.* Identification of subepithelial mesenchymal cells that induce IgA and diversify gut microbiota. *Nat. Immunol.* **18**, 675–682 (2017).
21. Mutoh, M. *et al.* RANKL regulates differentiation of microfold cells in mouse nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT). *Cell Tissue Res.* **364**, 175–184 (2016).
22. Kimura, S. *et al.* Airway M Cells Arise in the Lower Airway Due to RANKL Signaling and Reside in the Bronchiolar Epithelium Associated With iBALT in Murine Models of Respiratory Disease. *Front. Immunol.* **10**, 1323 (2019).
23. Kanaya, T. *et al.* Development of intestinal M cells and follicle-associated epithelium is regulated by TRAF6-mediated NF- κ B signaling. *J. Exp. Med.* **215**, 501–519 (2018).
24. Kimura, S. *et al.* Visualization of the entire differentiation process of murine M cells: suppression of their maturation in cecal patches. *Mucosal Immunol.* **8**, 650–660 (2015).

25. Kanaya, T. *et al.* The Ets transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold cells. *Nat. Immunol.* **13**, 729–736 (2012).
26. Lau, W. de *et al.* Peyer's Patch M Cells Derived from Lgr5+ Stem Cells Require SpiB and Are Induced by RankL in Cultured "Miniguts." *Mol. Cell. Biol.* **32**, 3639–3647 (2012).
27. Sato, S. *et al.* Transcription factor Spi-B–dependent and –independent pathways for the development of Peyer's patch M cells. *Mucosal Immunol.* **6**, 838–846 (2013).
28. Kimura, S. *et al.* Sox8 is essential for M cell maturation to accelerate IgA response at the early stage after weaning in mice. *J. Exp. Med.* **216**, 831–846 (2019).
29. Kimura, S. *et al.* Osteoprotegerin-dependent M cell self-regulation balances gut infection and immunity. *Nat. Commun.* **11**, 234 (2020).
30. Tsukasaki, M. *et al.* OPG Production Matters Where It Happened. *Cell Rep.* **32**, 108124 (2020).
31. Nagatake, T. *et al.* Id2-, ROR γ t-, and LT β R-independent initiation of lymphoid organogenesis in ocular immunity. *J. Exp. Med.* **206**, 2351–2364 (2009).
32. Hesselmar, B., Åberg, B., Eriksson, B. & Åberg, N. Allergic rhinoconjunctivitis, eczema, and sensitization in two areas with differing climates. *Pediatr. Allergy Immunol.* **12**, 208–215 (2001).
33. Singh, K., Axelrod, S. & Bielory, L. The epidemiology of ocular and nasal allergy in the United States, 1988-1994. *J. Allergy Clin. Immunol.* **126**, 778-783.e6 (2010).
34. Azari, A. A. & Barney, N. P. Conjunctivitis: A Systematic Review of Diagnosis and Treatment. *JAMA* **310**, 1721–1730 (2013).
35. Miyazaki, D. *et al.* Epidemiological aspects of allergic conjunctivitis. *Allergol. Int.* **69**, 487–495 (2020).
36. Fukuda, K. *et al.* Critical role of IgE-dependent mast cell activation in a murine model of allergic conjunctivitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **124**, 827-833.e2 (2009).
37. Komi, D. E. A., Rambasek, T. & Bielory, L. Clinical implications of mast cell involvement in allergic conjunctivitis. *Allergy* **73**, 528–539 (2018).

38. Hu, J. *et al.* IL-33/ST2/IL-9/IL-9R signaling disrupts ocular surface barrier in allergic inflammation. *Mucosal Immunol.* **13**, 919–930 (2020).
39. Okano, M. *et al.* Interleukin-33-activated neuropeptide CGRP-producing memory Th2 cells cooperate with somatosensory neurons to induce conjunctival itch. *Immunity* **55**, 2352–2368.e7 (2022).
40. King, I. L. & Mohrs, M. IL-4-producing CD4⁺ T cells in reactive lymph nodes during helminth infection are T follicular helper cells. *J. Exp. Med.* **206**, 1001–1007 (2009).
41. Reinhardt, R. L., Liang, H.-E. & Locksley, R. M. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat. Immunol.* **10**, 385–393 (2009).
42. Kobayashi, T., Iijima, K., Dent, A. L. & Kita, H. Follicular helper T cells mediate IgE antibody response to airborne allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **139**, 300–313.e7 (2017).
43. Gowthaman, U. *et al.* Identification of a T follicular helper cell subset that drives anaphylactic IgE. *Science* **365**, (2019).
44. Seo, K. Y. *et al.* Eye Mucosa: An Efficient Vaccine Delivery Route for Inducing Protective Immunity. *J. Immunol.* **185**, 3610–3619 (2010).
45. Tarutani, M. *et al.* Tissue-specific knockout of the mouse *Pig-a* gene reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 7400–7405 (1997).
46. Powell, J. J. *et al.* An endogenous nanomineral chaperones luminal antigen and peptidoglycan to intestinal immune cells. *Nat. Nanotechnol.* **10**, 361–369 (2015).
47. Kitamura, D., Roes, J., Kühn, R. & Rajewsky, K. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin μ chain gene. *Nature* **350**, 423–426 (1991).
48. Mizuno, A. *et al.* Severe Osteoporosis in Mice Lacking Osteoclastogenesis Inhibitory Factor/Osteoprotegerin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 610–615 (1998).
49. Yang, Z., Sullivan, B. M. & Allen, C. D. C. Fluorescent In Vivo Detection Reveals that IgE⁺ B Cells Are Restrained by an Intrinsic Cell Fate Predisposition. *Immunity* **36**, 857–872 (2012).
50. KAWAI, S., TAKAGI, Y., KANEKO, S. & KUROSAWA, T. Effect of Three Types of Mixed Anesthetic Agents Alternate to Ketamine in Mice. *Exp. Anim.* **60**, 481 (2011).

51. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
52. Hase, K. *et al.* M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the exocyst complex. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1427–1432 (2009).
53. Terahara, K. *et al.* Comprehensive Gene Expression Profiling of Peyer’s Patch M Cells, Villous M-Like Cells, and Intestinal Epithelial Cells. *J. Immunol.* **180**, 7840–7846 (2008).
54. Hase, K. *et al.* Distinct Gene Expression Profiles Characterize Cellular Phenotypes of Follicle-Associated Epithelium and M Cells. *DNA Res.* **12**, 127–137 (2005).
55. Iwasaki, A. & Kelsall, B. L. Localization of Distinct Peyer’s Patch Dendritic Cell Subsets and Their Recruitment by Chemokines Macrophage Inflammatory Protein (Mip)-3 α , Mip-3 β , and Secondary Lymphoid Organ Chemokine. *J. Exp. Med.* **191**, 1381–1394 (2000).
56. L gering, A. *et al.* Absence of CCR6 Inhibits CD4⁺ Regulatory T-Cell Development and M-Cell Formation inside Peyer’s Patches. *Am. J. Pathol.* **166**, 1647–1654 (2005).
57. Kishikawa, S. *et al.* Allograft inflammatory factor 1 is a regulator of transcytosis in M cells. *Nat. Commun.* **8**, 14509 (2017).
58. KIMURA, S., KISHIMOTO, A., MUTOH, M., TAKAHASHI-IWANAGA, H. & IWANAGA, T. GP2-expressing cells in the conjunctiva and tear ducts of mice: identification of a novel type of cells in the squamous stratified epithelium. *Biomed. Res.* **36**, 263 (2015).
59. KIMURA, S., NIO-KOBAYASHI, J., KISHIMOTO, A. & IWANAGA, T. The broad distribution of GP2 in mucous glands and secretory products. *Biomed. Res.* **37**, 351–358 (2016).
60. Anderson, D. M. *et al.* A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* **390**, 175–179 (1997).
61. Yanagihara, S. *et al.* Uromodulin–SlpA binding dictates *Lactobacillus acidophilus* uptake by intestinal epithelial M cells. *Int. Immunol.* **29**, 357–363 (2017).
62. Leger, A. J. St. *et al.* An Ocular Commensal Protects against Corneal Infection by Driving an Interleukin-17 Response from Mucosal $\gamma\delta$ T Cells. *Immunity* **47**, 148-158.e5 (2017).

63. Verbrugghe, P., Kujala, P., Waelput, W., Peters, P. J. & Cuvelier, C. A. Clusterin in human gut-associated lymphoid tissue, tonsils, and adenoids: localization to M cells and follicular dendritic cells. *Histochem. Cell Biol.* **129**, 311–320 (2008).
64. Krishnaswamy, J. K. *et al.* Migratory CD11b⁺ conventional dendritic cells induce T follicular helper cell–dependent antibody responses. *Sci. Immunol.* **2**, (2017).
65. Gribonika, I. *et al.* Migratory CD103⁺CD11b⁺ cDC2 cells in Peyer’s patches are critical for gut IgA responses following oral immunization. *Mucosal Immunol.* (2024)
doi:10.1016/j.mucimm.2024.03.004.
66. Torow, N. *et al.* M cell maturation and cDC activation determine the onset of adaptive immune priming in the neonatal Peyer’s patch. *Immunity* **56**, 1220–1238.e7 (2023).
67. Mita, H., Yasueda, H. & Akiyama, K. Affinity of IgE antibody to antigen influences allergen-induced histamine release. *Clin. Exp. Allergy* **30**, 1583–1589 (2000).
68. Suzuki, R. *et al.* Molecular Editing of Cellular Responses by the High-Affinity Receptor for IgE. *Science* **343**, 1021–1025 (2014).
69. Wang, J. *et al.* Correlation of IgE/IgG4 milk epitopes and affinity of milk-specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, 695–702.e6 (2010).
70. Paolino, M. *et al.* RANK links thymic regulatory T cells to fetal loss and gestational diabetes in pregnancy. *Nature* **589**, 442–447 (2021).
71. Suzuki, H. *et al.* Ovalbumin-Protein σ 1 M-Cell Targeting Facilitates Oral Tolerance With Reduction of Antigen-Specific CD4⁺ T Cells. *Gastroenterology* **135**, 917–925 (2008).
72. Lai, N. Y. *et al.* Gut-Innervating Nociceptor Neurons Regulate Peyer’s Patch Microfold Cells and SFB Levels to Mediate Salmonella Host Defense. *Cell* **180**, 33–49.e22 (2020).

第六章 謝辞

本研究において、実験結果のディスカッションや論文執筆のご指導ご鞭撻賜りました長谷耕二教授に深く感謝し、御礼申し上げます。

実験方針や実験手法、論文の執筆のご指導賜りました木村俊介准教授に深く感謝し、御礼申し上げます。

実験結果の解釈や実験方針で、有意義な議論を賜りました高橋大輔専任講師、鈴木功一郎特任助教に深く感謝し、御礼申し上げます。

実験試料の提供、マウスの解剖補助、多くの実験のアドバイスを賜りました和歌山県立医科大学薬学部病態生理学講座の中村有孝助教に深く感謝し、御礼申し上げます。

実験動物の飼育管理を賜りました藤村由美子様に深く感謝し、御礼申し上げます。

FISH の解析にご協力賜りました石原成美様に深く感謝し、御礼申し上げます。

リコンビナントタンパク質の作成と腸管オルガノイドの実験にご協力賜りました高野峻輔様に深く感謝し、御礼申し上げます。

アレルギーの誘導とスコアリングにご協力賜りました上村真帆様に深く感謝し、御礼申し上げます。

蛍光免疫染色の実験にご協力賜りました森田涼様、遠藤真弓様に深く感謝し、御礼申し上げます。

Flow cytometry の細胞調整やアレルギー実験にご協力賜りました、大川拓真様に深く感謝し、御礼申し上げます。

実験手技や多くの情報を賜り、私を高めて下さった生化学講座の皆様には深く感謝し、御礼申し上げます。

遺伝子改変マウスを分与して下さった、松本歯科大学の宇田川信之教授と中村美どり准教授に深く感謝し、御礼申し上げます。

留学に際して、様々な経験をさせて下さった National Institutes of Health、Laboratory of Immunology の Rachel Caspi 博士、Reiko Horai-Yamane 博士、Xiaoyan Xu 博士、Allen Tangeman 様に深く感謝し、御礼申し上げます。

生活面および研究資金面で金銭的な援助を賜りました、日本学術振興会（特別研究員、科研費、海外挑戦プログラム）の皆様、公益財団法人吉田育英会＜マスター21＞の皆様、潮田記念基金 慶應義塾博士課程学生研究支援プログラム（全塾選抜枠）の皆様には深く感謝し、御礼申し上げます。

最後に、ここまで私を支えて下さった家族に深く感謝し、御礼申し上げます。

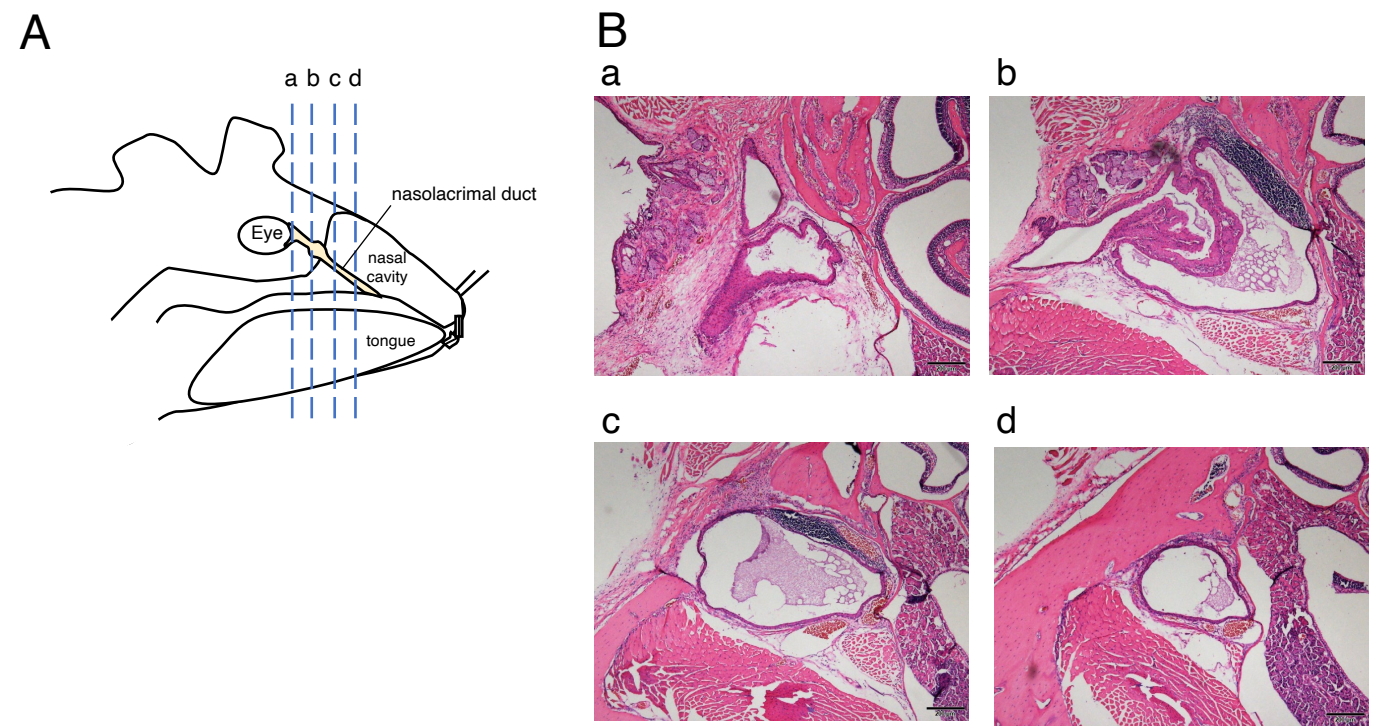
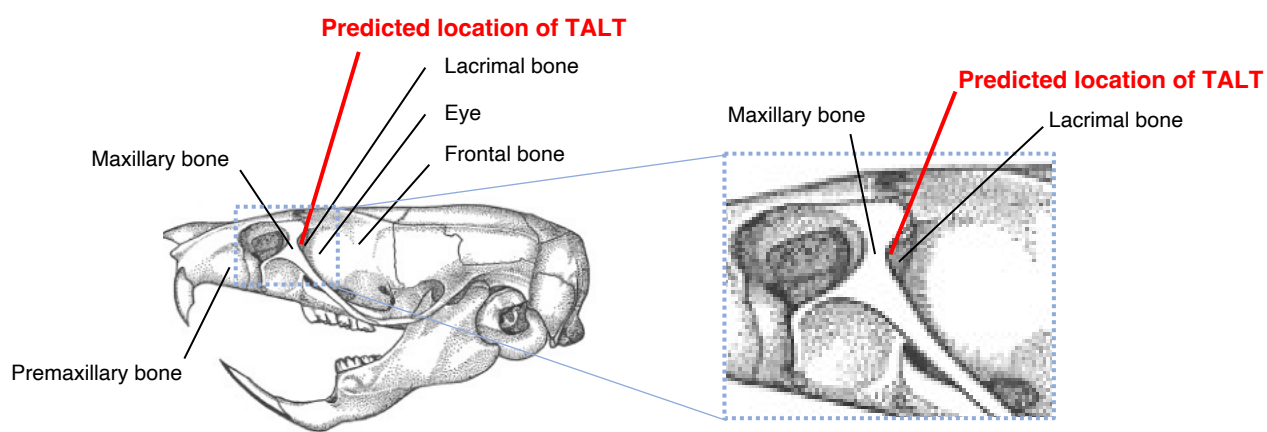


Figure 1 組織切片を用いたTALTの解剖学的位置の探索

(A) マウス頭部の概略図。

(B) 脱灰処理を施したマウス頭部の冠状断面切片のヘマトキシリン・エオジン（HE）染色像。a-dはそれぞれ（A）のa-d に対応した部位の組織切片を示す。

A



B

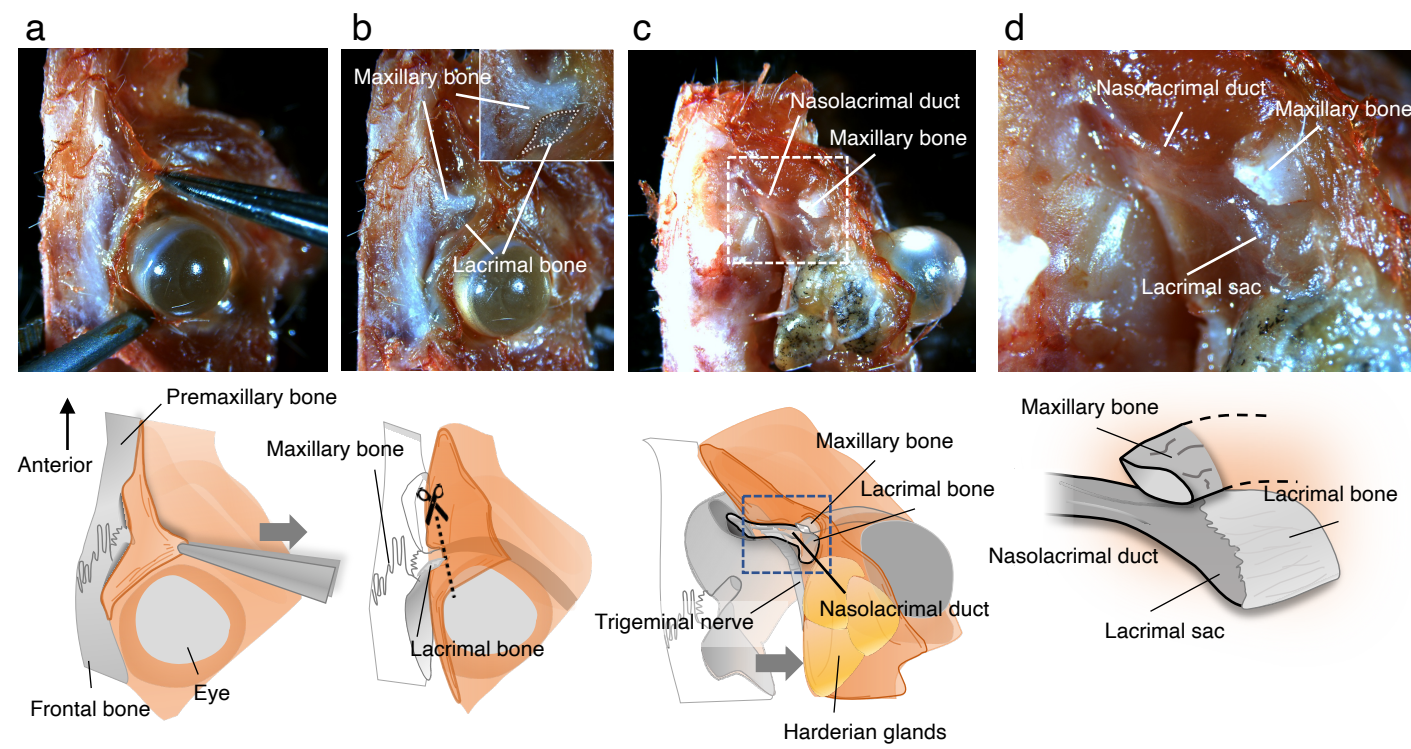
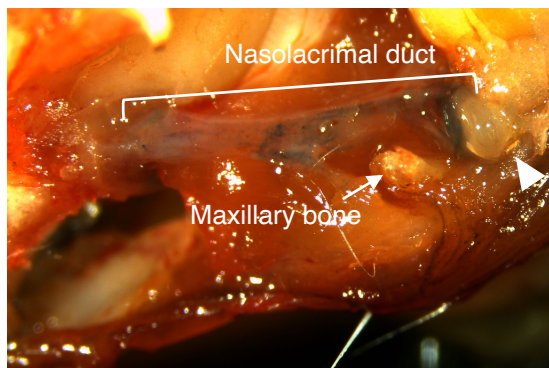
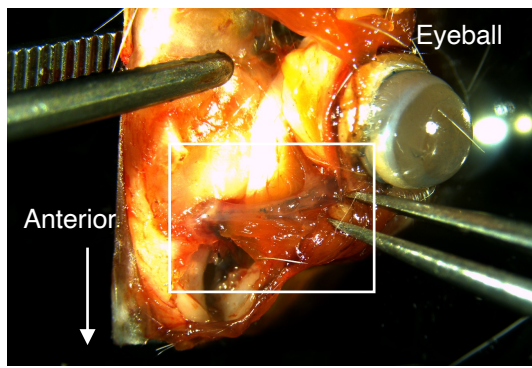


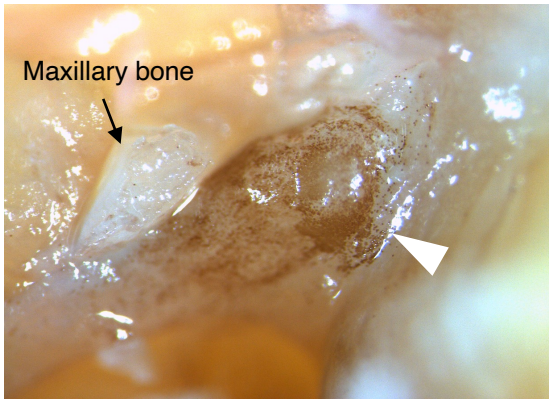
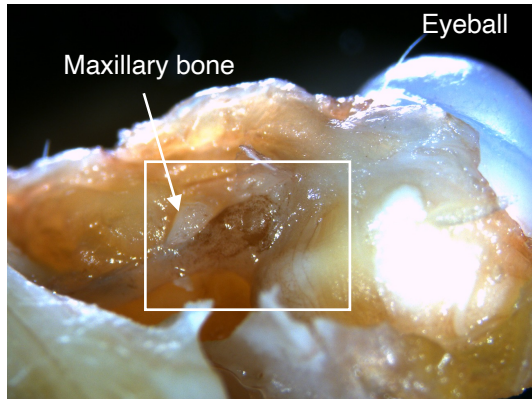
Figure 2 肉眼的なTALTの解剖学的位置の探索

(A) マウス頭蓋骨の模式図。広島大学生物学会 (編)、日本動物解剖図説から一部改変。各頭蓋骨 (Premaxillary bone: 前上顎骨、Maxillary bone: 上顎骨、Lacrimal bone: 涙骨、Frontal bone: 前頭骨) と、眼の位置を示す。(B) マウス頭部から鼻涙管の採取方法。画像 (上段) と図説 (下段)。ピンセットを用いて結合組織を剥離することで前頭骨・前上顎骨・上顎骨・涙骨を露出させた (a, b)。その後、上顎骨をハサミで切断し、周辺の結合組織とともに頭部から分離した (b, c)。鼻涙管、涙骨と上顎骨に隣接した涙嚢が認められた (d)。

A



B



C

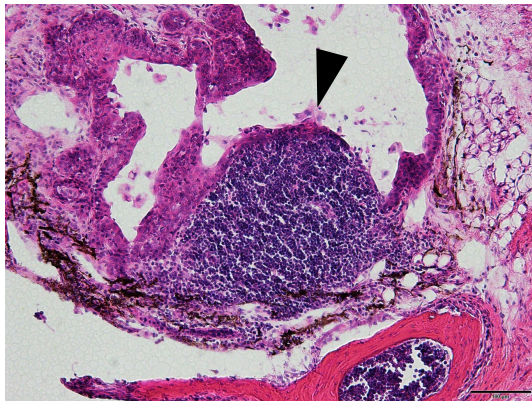
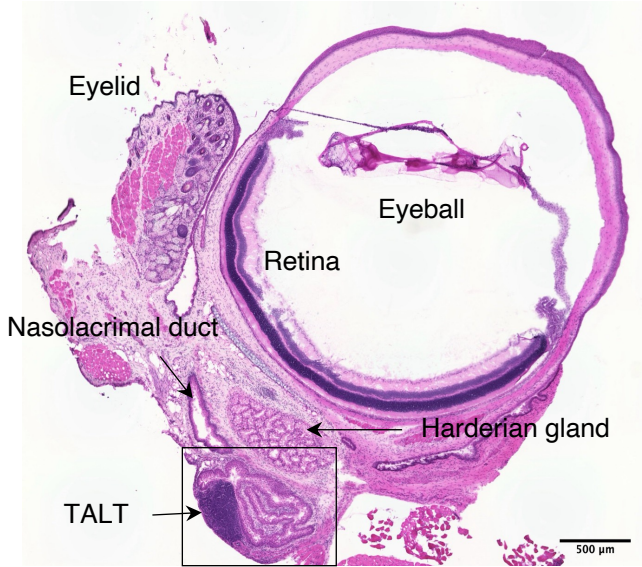


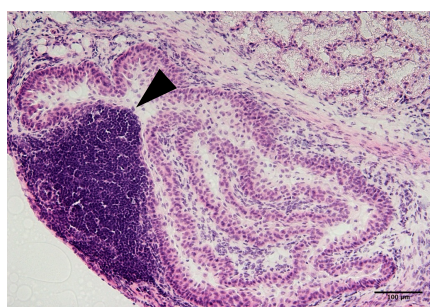
Figure 3 鼻涙管構造とTALT濾胞の同定

(A) 色素エバンスブルーを点眼したマウスの眼周辺組織の画像。涙道内にエバンスブルーが含まれる。右図は左図の白線部の拡大像。矢頭は涙嚢を示す。(B) 鼻涙管のホルマウント免疫化学染色像。B細胞をHRP標識anti-B220抗体で標識し、DABを用いて検出した。標識されたB細胞は茶褐色に染色されている。右図は左図の白線部の拡大像。矢頭は涙嚢を示す。(C) 肉眼解剖学的に採取し、HE染色した涙嚢の組織切片。矢頭はTALTを示す。Bar: 100 μ m。

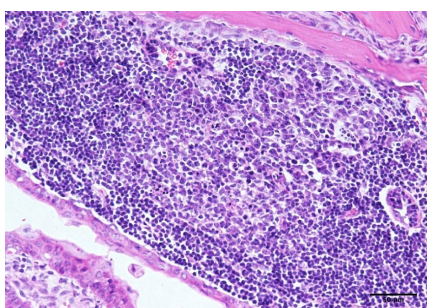
A



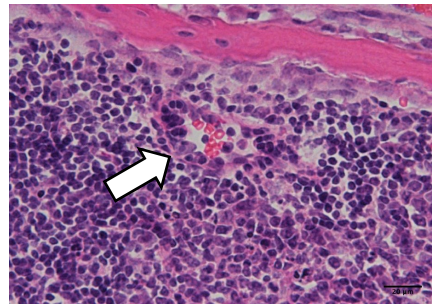
B



C



D



E

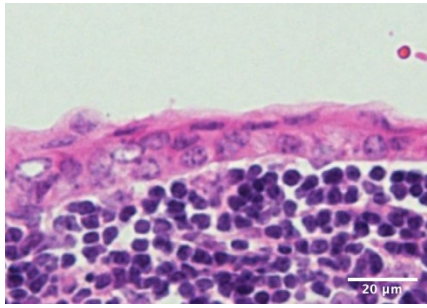


Figure 4 組織染色像によるTALTの解析

(A-E) 眼粘膜組織切片のHE染色像。(B) は (A) の黒線部の拡大像。矢頭はTALTリンパ濾胞を示す。TALTには胚中心構造 (C)、高内皮細静脈 (D) が認められ、その濾胞は2-3層で構成された重層扁平上皮で覆われる (E)。(D) 内の矢印は高内皮細静脈を示す。Bars: 500 μm (A)、100 μm (B)、50 μm (C)、20 μm (D, E)。

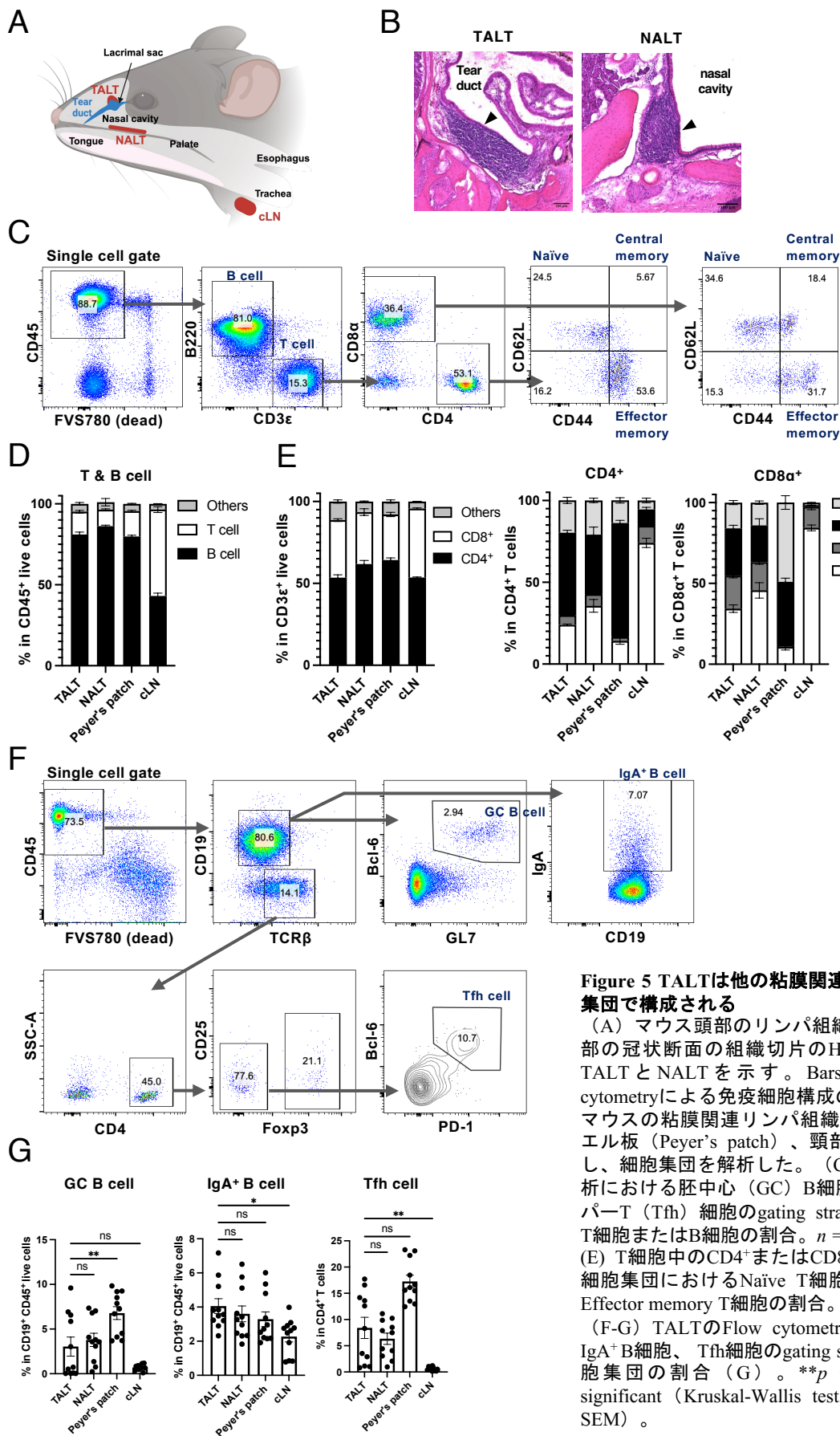


Figure 5 TALTは他の粘膜関連リンパ組織と類似した細胞集団で構成される

(A) マウス頭部のリンパ組織の概略図。(B) マウス頭部の冠状断面の組織切片のHE染色像。矢頭はそれぞれTALTとNALTを示す。Bars: 100 μ m。(C-G) Flow cytometryによる免疫細胞構成の解析。C57BL/6Jの野生型マウスの粘膜関連リンパ組織としてTALT、NALT、パイエル板 (Peyer's patch)、頸部リンパ節 (cLN)、を採取し、細胞集団を解析した。(C) TALTのFlow cytometry解析における胚中心 (GC) B細胞、IgA⁺B細胞、濾胞性ヘルパーT (Tfh) 細胞のgating strategy。(D) CD45⁺細胞中のT細胞またはB細胞の割合。 $n = 5$ animals, mean $\pm$ SEM。(E) T細胞中のCD4⁺またはCD8 α ⁺細胞の割合、それぞれの細胞集団におけるNaïve T細胞、Central memory T細胞、Effector memory T細胞の割合。 $n = 5$ animals, mean $\pm$ SEM。(F-G) TALTのFlow cytometry解析におけるGC B細胞、IgA⁺B細胞、Tfh細胞のgating strategy (F) とそれぞれの細胞集団の割合 (G)。 $**p < 0.01$, $*p < 0.05$, ns: not significant (Kruskal-Wallis test, $n = 11$ animals, mean $\pm$ SEM)。

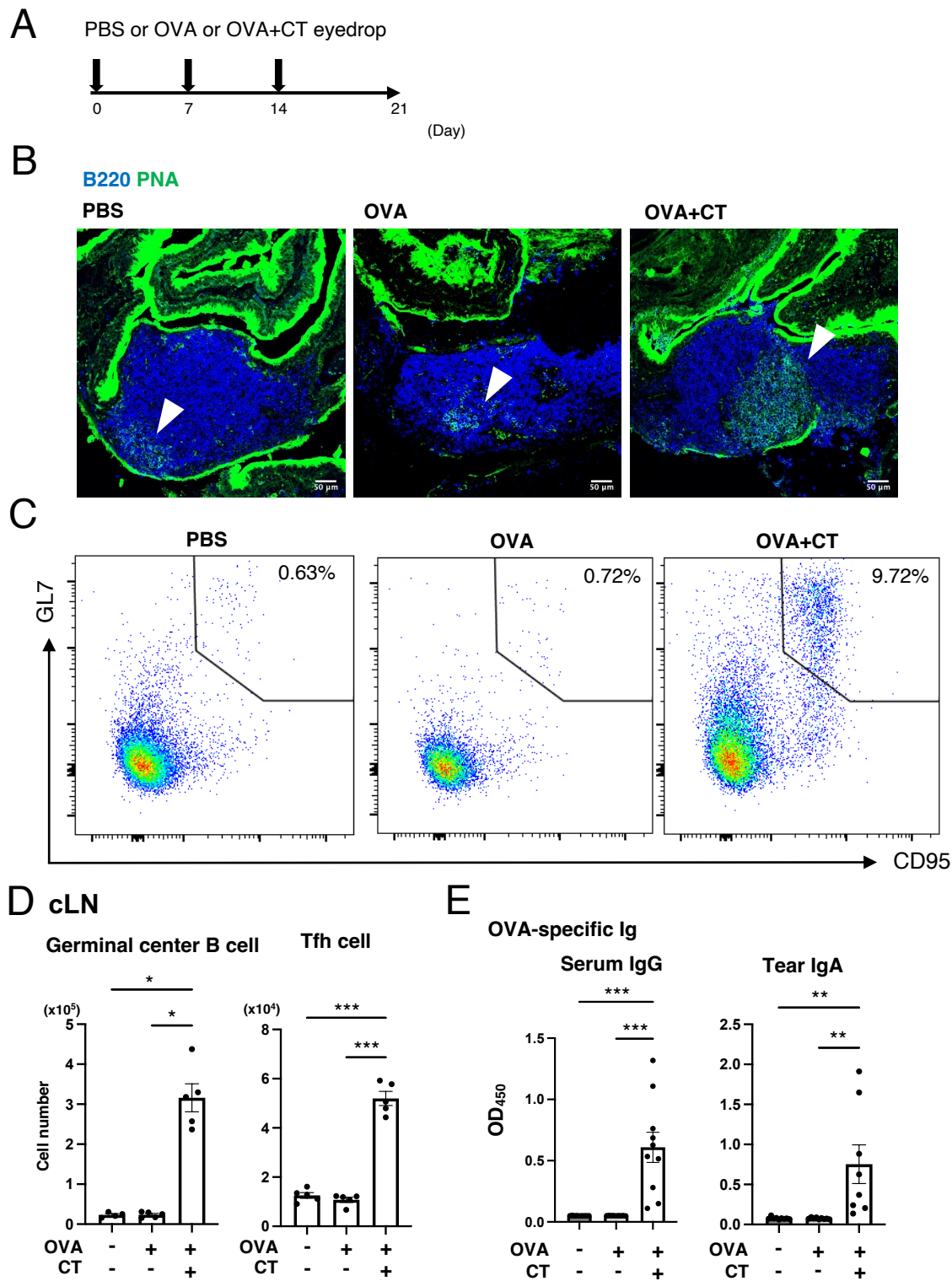


Figure 6 卵白アルブミン (OVA) の点眼はアジュバンド存在下でTALTと所属リンパ節の胚中心反応を惹起する

(A) 点眼投与による免疫モデルの模式図。(B) TALT切片のレクチン・蛍光免疫染色像。Peanut agglutinin (PNA、緑)、B220 (青)。矢頭はGC B細胞 (PNA⁺B220⁺細胞) を示す。Bars: 50 μ m。(C) 4-5匹のマウスからプールしたTALT細胞におけるCD95とGL7の発現。図中の数字はTALTにおけるCD3 ϵ ⁺B220⁺リンパ球中のCD95⁺GL7⁺ GC B細胞の割合を示す。(D) 3回目の免疫から1週間後、cLNにおけるGC B細胞と、CXCR5⁺PD-1⁺CD4⁺ Tfh細胞の細胞数。*** p < 0.001, * p < 0.05 (GC B細胞: Kruskal-Wallis test, Tfh細胞: one-way ANOVA by Tukey's test, n = 4-5 animals)。(E) ELISA法で測定したOVA特異的な血清中IgG、OVA特異的な涙液中IgA量。*** p < 0.001, ** p < 0.01 (Kruskal-Wallis test, n = 8-10 animals, mean $\pm$ SEM)。

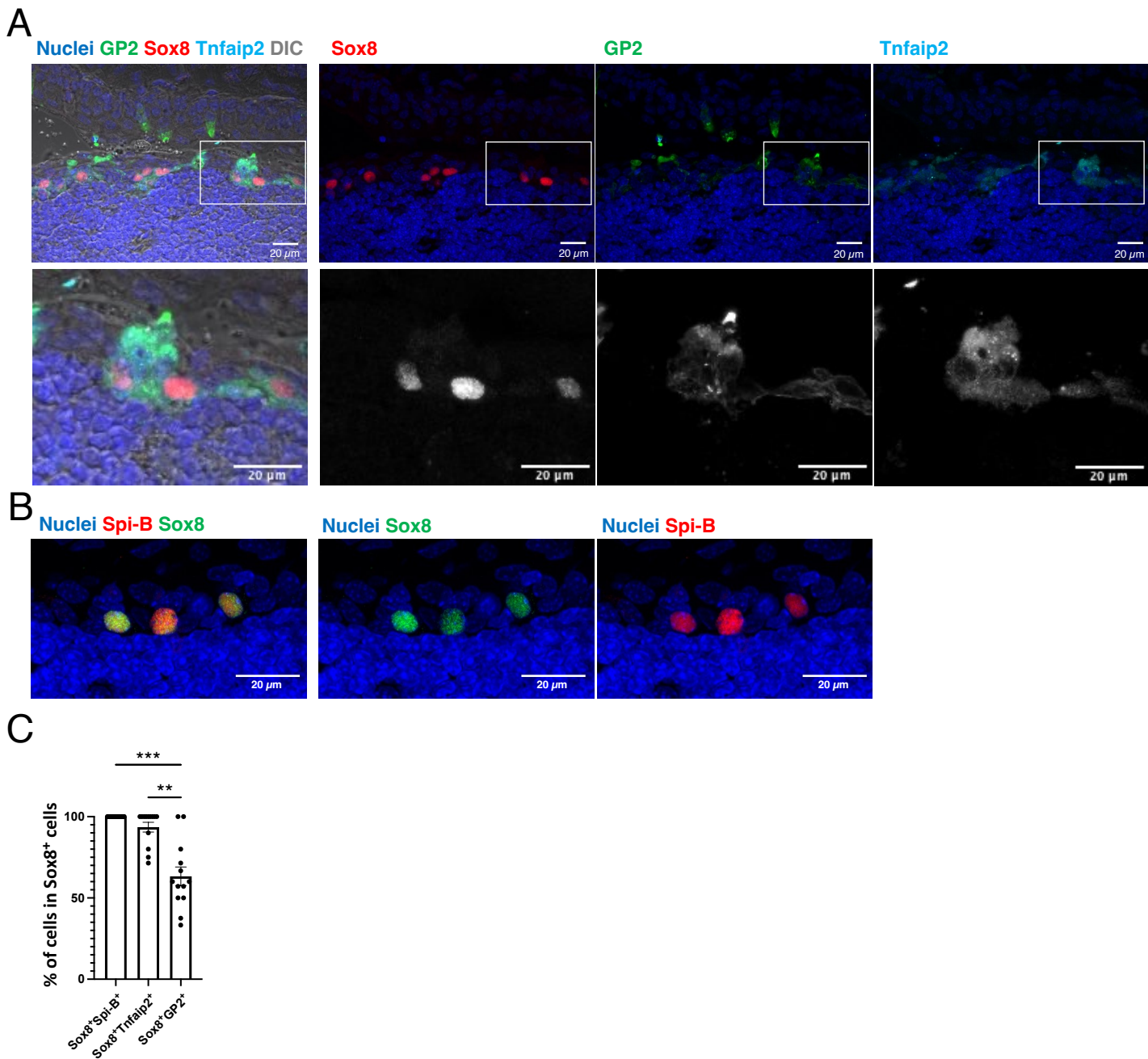
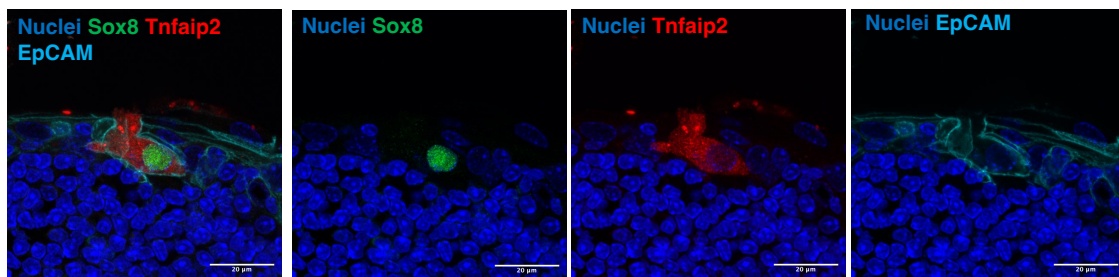


Figure 7 TALT FAEにM細胞マーカー陽性細胞が存在する

(A) マウスのTALT FAEにおける蛍光免疫染色像。GP2（緑）、Sox8（赤）、Tnfaip2（シアン）の発現を共焦点顕微鏡で撮影し、Fijiを用いて擬似カラーで示した。上段の白線部の拡大像を下段に、各分子はグレースケールで示した。DIC: differential interference contrast. (B) TALT FAEにおけるSpi-B⁺（赤）、Sox8⁺（緑）細胞。Spi-Bの染色にあたり、EDTA含有Tris-HCl溶液中で熱処理を行うことで抗原を賦活化させた。核（青）はHoechst 33342で染色した。Bars: 20 μm。

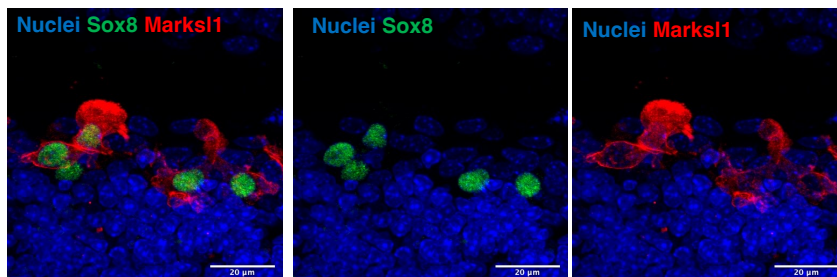
(C) マウスのTALT FAEにおけるSox8⁺細胞中のSpi-B、Tnfaip2、GP2⁺細胞の割合。各シンボルは1枚の凍結切片における、各細胞集団の割合を示す。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ (Kruskal-Wallis test, $n = 5$ animals, mean $\pm$ SEM)。

A

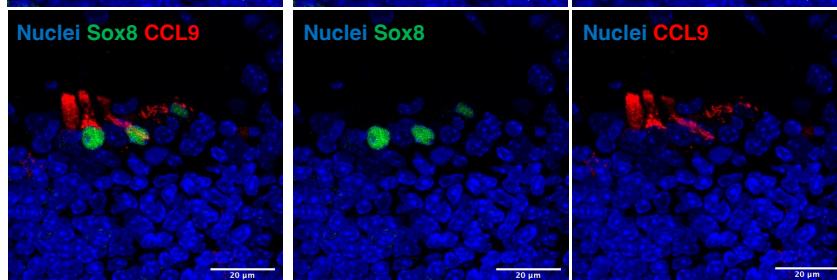


B

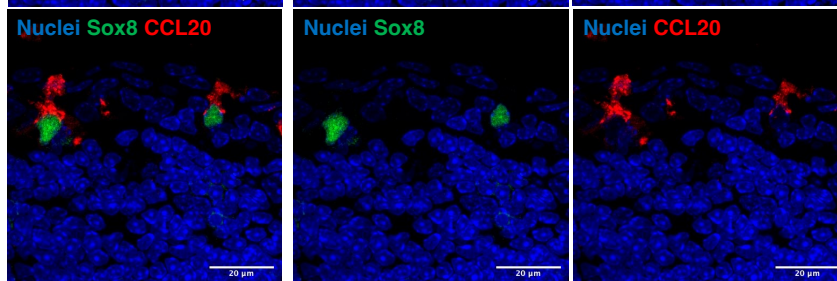
Marks11



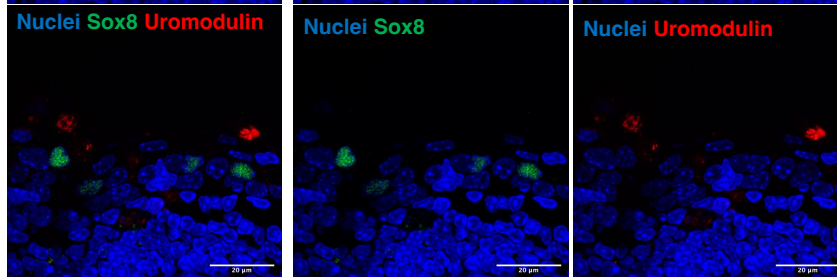
CCL9



CCL20



Uromodulin



Aif1

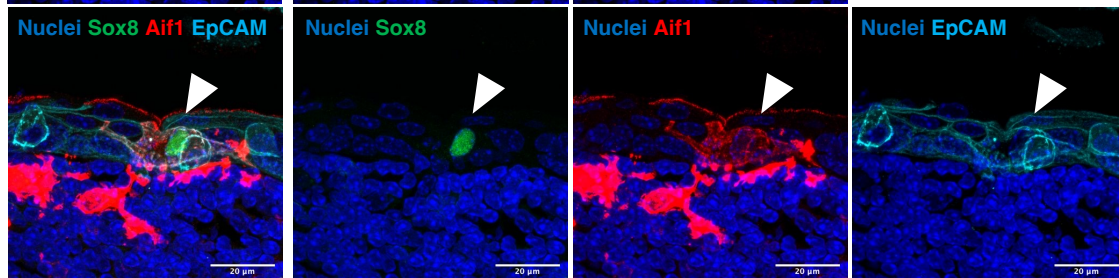
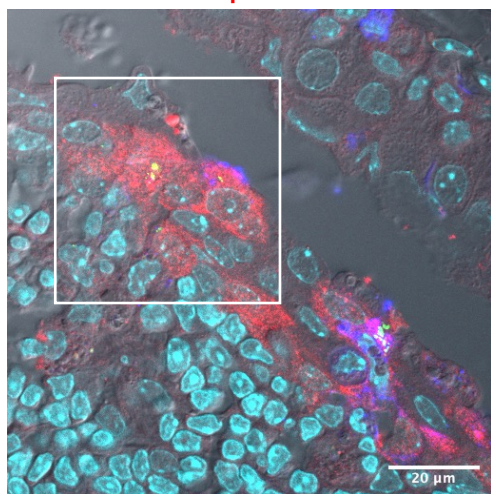


Figure 8 TALT FAE上のSox8⁺細胞は様々なM細胞関連分子を発現する

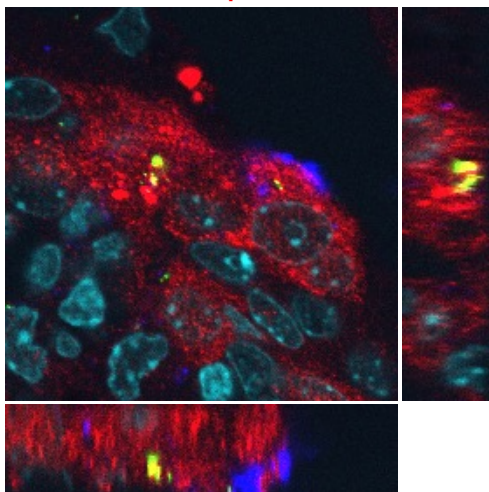
(A) Sox8⁺ (緑)、Tnfaip2⁺ (赤) 細胞は上皮細胞マーカーEpCAM (シアン) を共発現する。(B) TALT FAEにおける蛍光免疫染色像。Sox8 (緑) と各M細胞関連分子 (赤) : Marks11、CCL9、CCL20、Uromodulin、Aif1。矢頭はSox8⁺Aif1⁺EpCAM⁺細胞を示す。核 (青) はHoechst 33342で対比染色した。Bars: 20 μm。

A

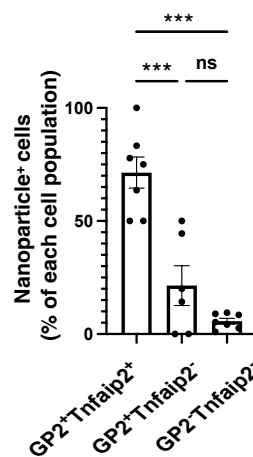
Nuclei Beads Tnfaip2 GP2 DIC



Nuclei Beads Tnfaip2 GP2

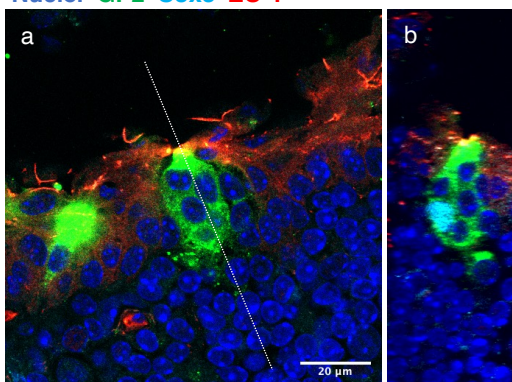


B

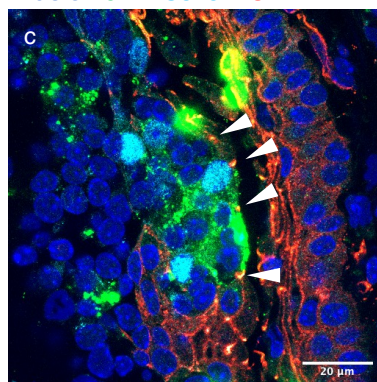


C

Nuclei GP2 Sox8 ZO-1



Nuclei GP2 Sox8 ZO-1



Nuclei ZO-1

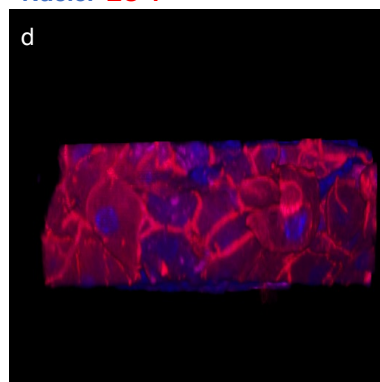


Figure 9 GP2⁺Tnfaip2⁺細胞は点眼した蛍光ナノ粒子を取り込む

(A) 麻酔下で蛍光ナノ粒子（直径200 nm）を点眼したマウスのTALT FAEの蛍光免疫染色像。GP2⁺（青）Tnfaip2⁺（赤）細胞は蛍光ナノ粒子（緑）を取り込んでいた。右図は左図の白線部を拡大したものである。(B) GP2⁺Tnfaip2⁺細胞、GP2⁻Tnfaip2⁺細胞、GP2⁻Tnfaip2⁻細胞の取り込みの定量解析結果。各細胞集団における蛍光ナノ粒子陽性細胞の割合を示す。*** $p < 0.001$, ns: not significant (Kruskal-Wallis test, $n = 4$ animals, mean $\pm$ SEM)。(C) TALT FAEの厚切り凍結切片（40 μ m）の蛍光免疫染色像。ZO-1（赤）の発現がTALT FAEの最外層に認められる。GP2（緑）、Sox8（シアン）。パネルbはパネルaの破線部における断面図をFiji上で構築したものである。パネルc中の矢頭はTALT FAEのタイトジャンクションを示している。パネルdはパネルcの画像をFijiを用いて3D構築し、FAEの最外層を示したものである。核（青）はHoechst 33342で染色した。Bars: 20 μ m。

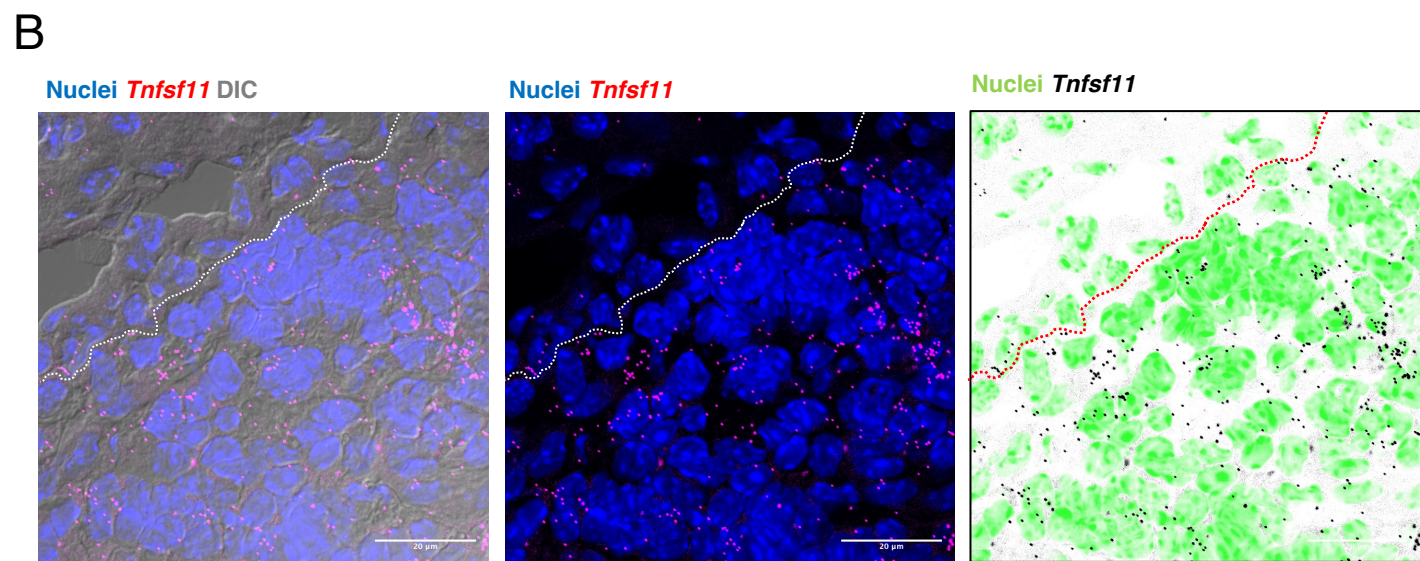
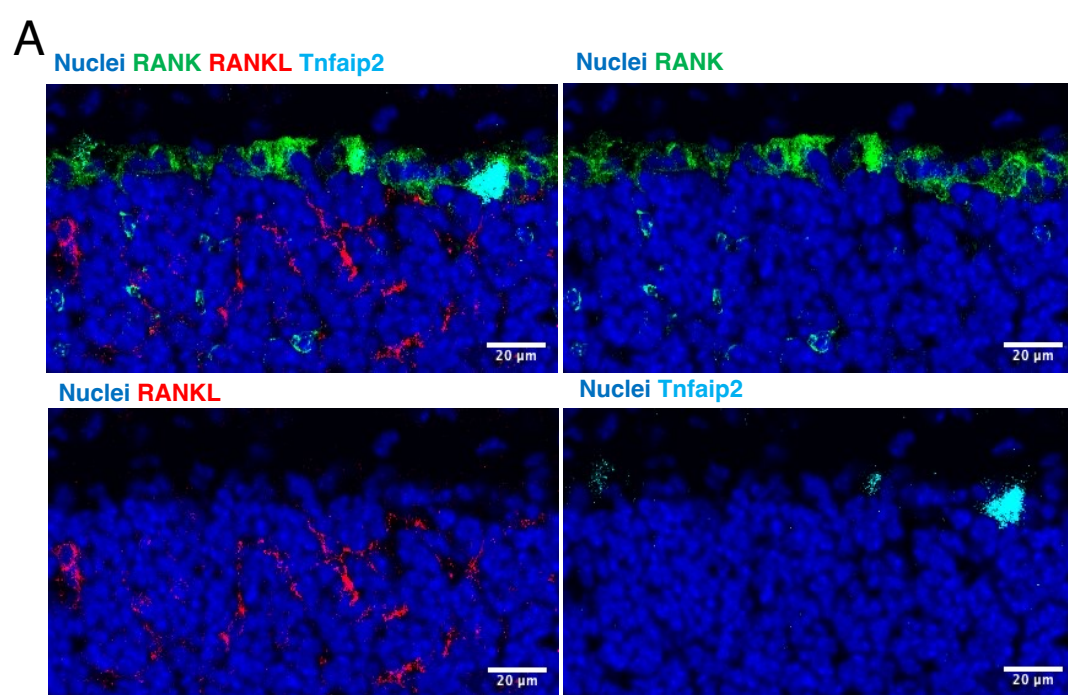
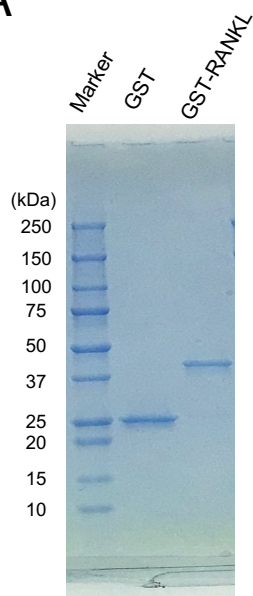


Figure 10 RANK⁺細胞とRANK⁺細胞がTALTに存在する

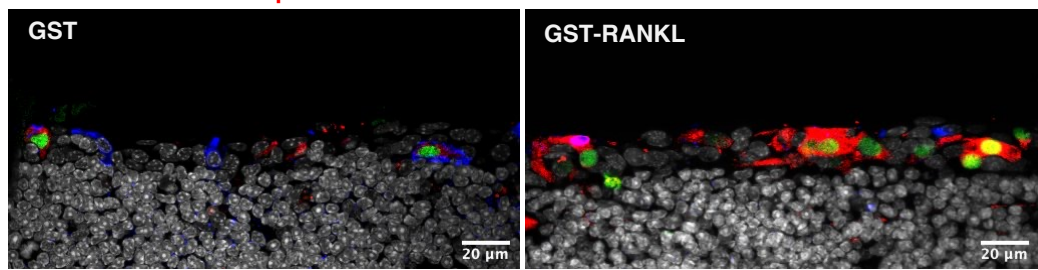
(A) TALTにおけるRANK (緑)、RANKL (赤)、Tnfaip2 (シアン) の蛍光免疫染色像。核 (青) はHoechst 33342で染色した。
 (B) FISHによるTALTの染色像。*Tnfsf11* (RANKL mRNA)に対するオリゴヌクレオチドプローブを用いた。共焦点顕微鏡FV3000で得た1つの画像をFijiを用いて、異なる擬似カラーで示した。*Tnfsf11*: マゼンダ (左・中央)、黒 (右)。核: 青 (左・中央)、緑 (右)。基底膜: 白線 (左・中央)、赤線 (右)。DIC (グレー)。Bars: 20 μm。

A

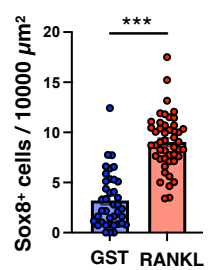


B

Nuclei GP2 Sox8 Tnfaip2



C



D

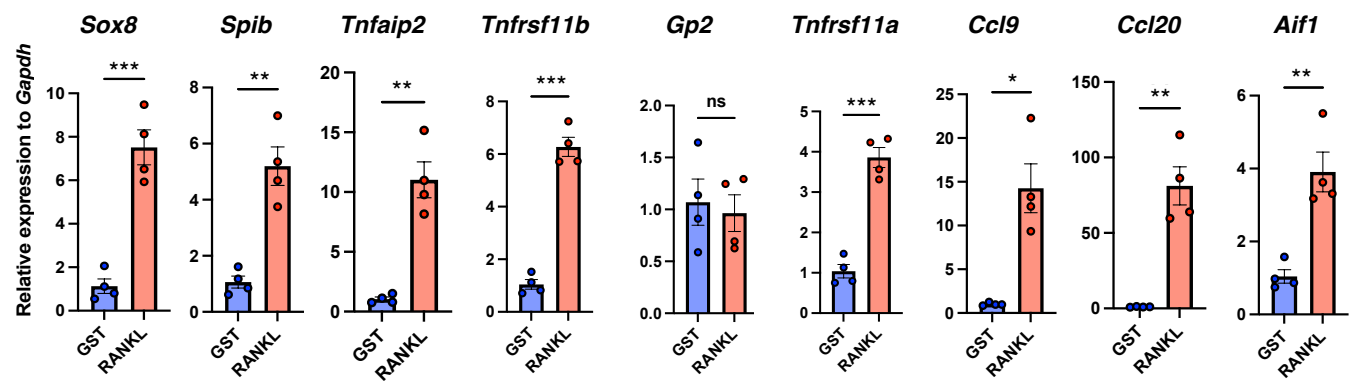
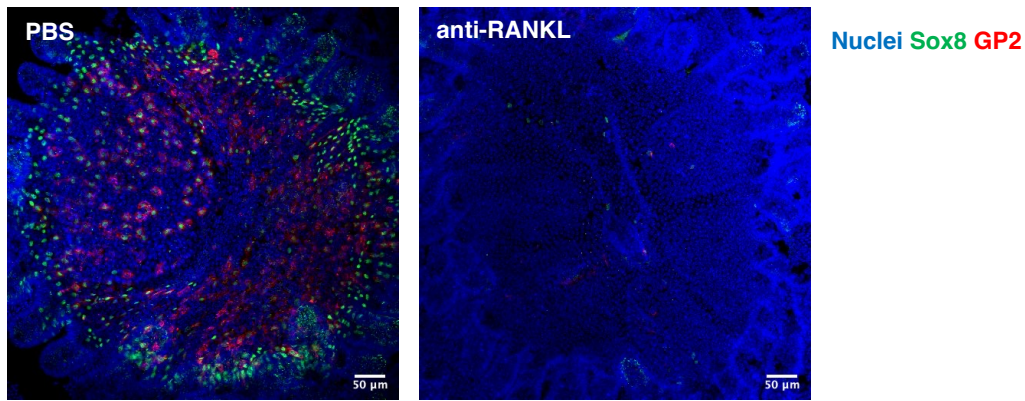


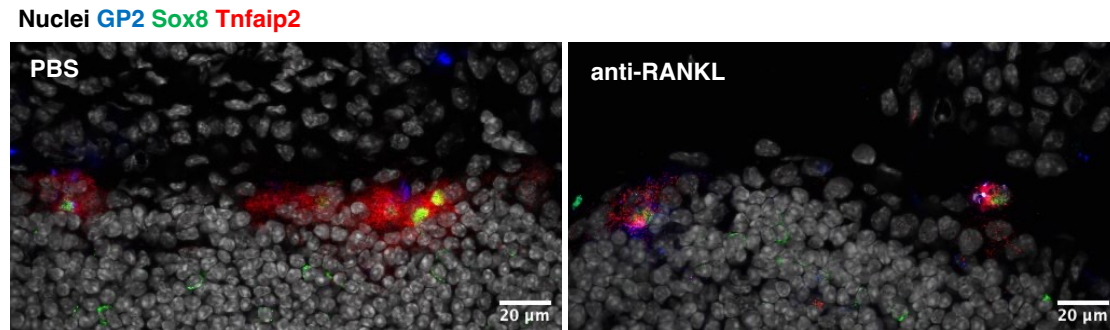
Figure 11 RANKLはTALT M細胞を分化を促進する

(A) 精製したリコンビナントタンパク質GST (25 kDa) とGST-RANKL (40 kDa) をSDS-PAGEで分離し、CBBで染色した。(B-D) 10 mg/kgのGSTまたはGST-RANKLを3日間投与したマウスのTALT FAEにおける解析。(B) GP2 (青)、Sox8 (緑)、Tnfaip2 (赤) の蛍光免疫染色像。(C) TALT FAEにおけるSox8⁺細胞の画像定量解析。各シンボルは1枚の切片における10,000 μm²あたりのSox8⁺細胞数。*** $p < 0.001$ (Welch's t test, $n = 3$ animals)。核(グレー)はHoechst 33342で染色した。Bars: 20 μm。(D) 定量的PCRによって測定したM細胞関連遺伝子発現。各データは*Gapdh*を用いて標準化し、GST投与群に対する相対量として示した。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns: not significant (*Sox8*, *Spib*, *Tnfrsf11b*, *Gp2*, *Tnfrsf11a* and *Aif1*: Student's t -test, *Tnfaip2*, *Ccl9* and *Ccl20*: Welch's t test, $n = 4$, mean $\pm$ SEM)。

A



B



C

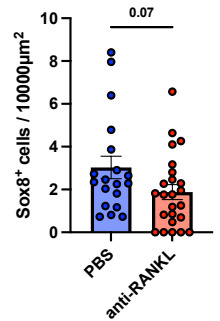
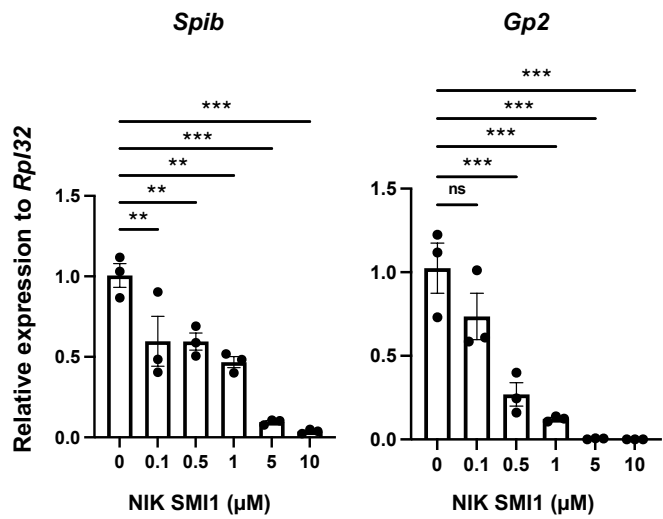


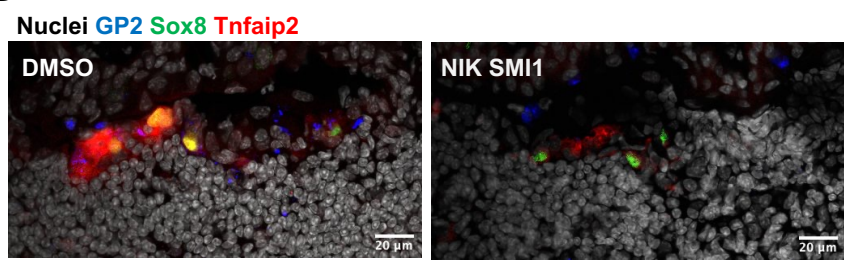
Figure 12 RANKL-RANK相互作用の阻害によってTALT M細胞は減少傾向を示す

(A-C) 抗RANKL抗体を投与したマウスのTALT FAEの解析結果。(A) パイエル板FAEのホールマウント免疫染色像。M細胞の存在を確認するために、Sox8 (緑)、GP2 (赤) について標識した。(B) TALT FAEの凍結切片染色像。GP2 (青)、Sox8 (緑)、Tnfaip2 (赤)。(C) TALT FAEにおけるSox8⁺細胞の画像定量解析。各シンボルは1枚の切片における10,000 μ m²あたりのSox8⁺細胞数。グラフ上の数値はp値 (Mann-Whitney U test, $n = 3$ animals, mean $\pm$ SEM) を示す。核 (A: 青, B: グレー) は Hoechst 33342で染色した。Bars: 50 μ m (A)、20 μ m (B)。

A



B



C

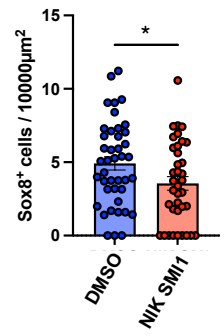


Figure 13 NIKはTALT M細胞の分化に必要である
(A) 腸管オルガノイドにおけるM細胞マーカー (*Spib*, *Gp2*) の遺伝子発現。腸管オルガノイドはGST-RANKLに加えて、NIK SMI1添加培地または対照群として無添加の培地で3日間培養した。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, ns: not significant (one-way ANOVA by Dunnett's test, $n = 3$ organoids)。各データは*Rpl32*を用いて標準化し、NIK SMI1無添加群に対する相対量として示した。(B, C) 100 μMのNIK SMI1を3日間点眼したマウスのTALT FAEの蛍光免疫染色像 (B) と画像定量解析 (C)。* $p < 0.05$ (Welch's t -test, $n = 4$ animals, mean $\pm$ SEM)。各シンボルは1枚の切片における10,000 μm²あたりのSox8⁺細胞数。核 (グレー) はHoechst 33342で染色した。

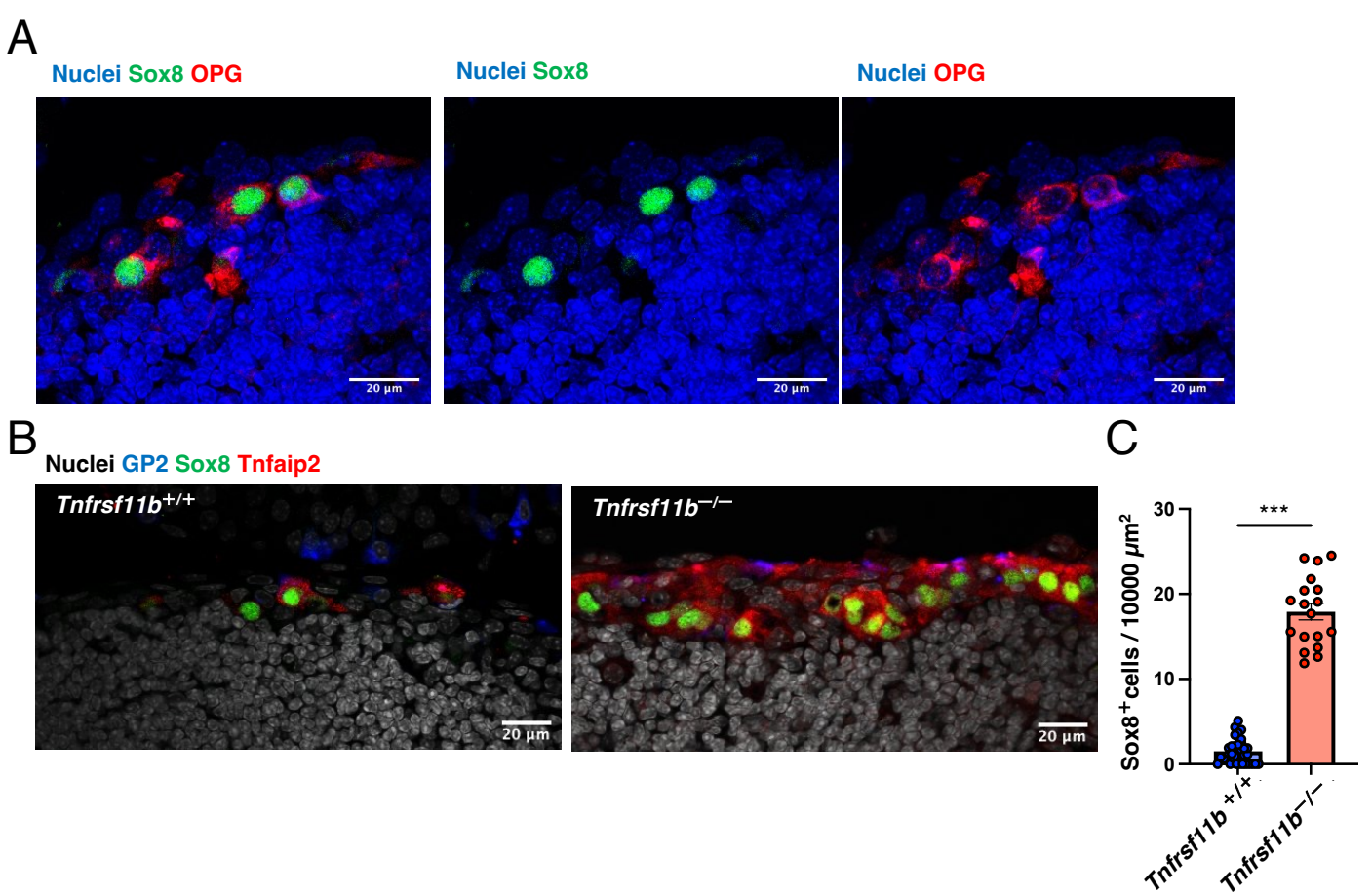
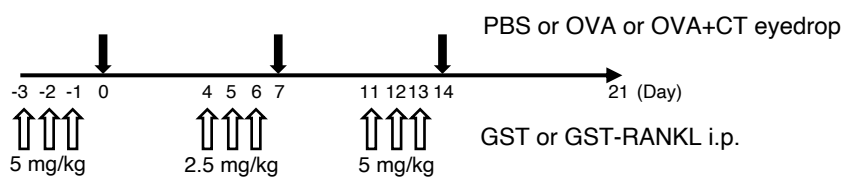


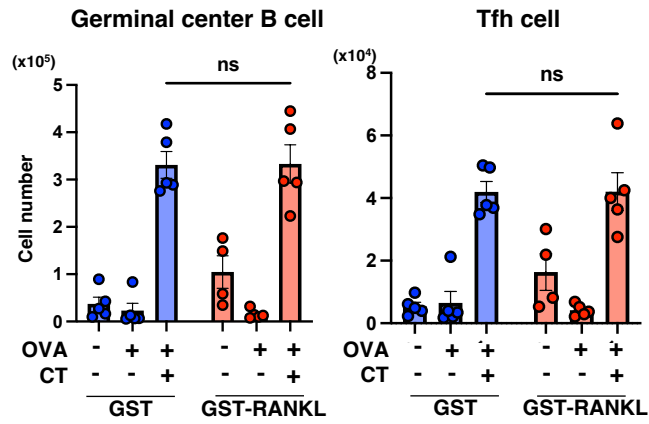
Figure 14 OPGはTALT M細胞の分化を抑制する

(A) Sox8 (緑) と OPG (赤) についての TALT FAE の蛍光免疫染色像。(B, C) *Tnfrsf11b*^{-/-} マウスまたは対照群 *Tnfrsf11b*^{+/+} マウスの TALT M 細胞の解析。GP2 (青)、Sox8 (緑)、Tnfaip2 (赤) の蛍光免疫染色像 (B) と Sox8⁺ 細胞の画像定量解析結果 (C)。各シンボルは1枚の切片における10,000 μm²あたりの Sox8⁺ 細胞数。****p* < 0.001 (Mann-Whitney U test, *n* = 3 animals, mean ± SEM)。核 (A: 青、B: グレー) は Hoechst 33342 で染色した。Bars: 20 μm。

A



B



C

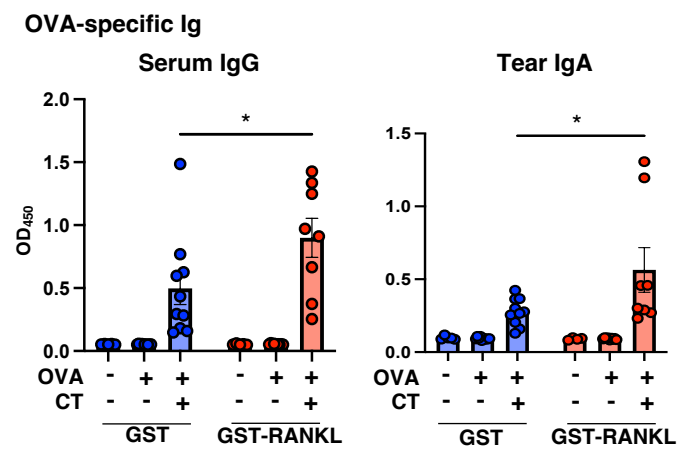


Figure 15 RANKL投与は抗原特異的な抗体を増加させる
(A-C) マウスにGSTまたはGST-RANKLを腹腔内投与し、点眼による免疫を施した。(A) 実験モデルの模式図。(B) cLNにおけるGC B細胞とTfh細胞の細胞数をFlow cytometryで測定した。ns: not significant (Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, $n = 4-5$ animals, mean $\pm$ SEM)。(C) ELISA法で測定したOVA特異的な血清中IgG、OVA特異的な涙液中IgA量。* $p < 0.05$ (Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, $n = 4-10$ animals, mean $\pm$ SEM)。

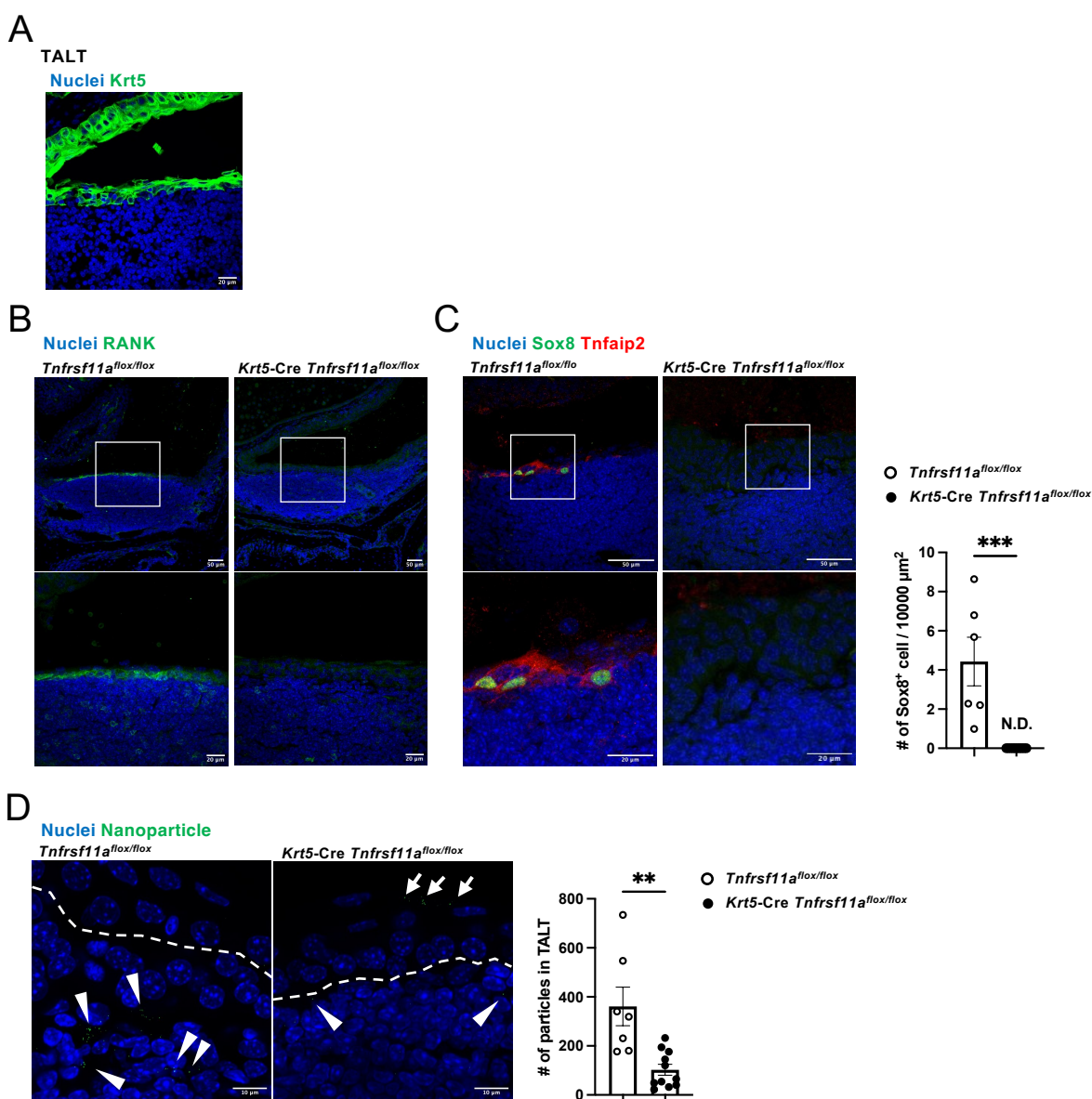


Figure 16 *Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{flox/flox} マウスは TALT M細胞を欠損する。

(A) 野生型マウスのTALTにおける組織切片の免疫染色画像。Krt5 (緑)。

(B-C) *Tnfrsf11a*^{flox/flox} マウスまたは *Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{flox/flox} マウスのTALTにおける組織切片の免疫染色画像。 RANK (緑、 B), Sox8 (緑、 C), Tnfaip2 (赤、 C)。グラフはTALT FAE 10,000 μm² あたりのSox8⁺細胞を示す。

(D) *Tnfrsf11a*^{flox/flox} マウスまたは *Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{flox/flox} マウスに蛍光ナノ粒子 (直径200 nm) を点眼してから60分後のTALTの蛍光染色画像。矢印はTALT内部の蛍光ナノ粒子、矢頭は涙道管腔に残存している蛍光ナノ粒子、破線はTALT FAEにおける基底膜をそれぞれ示す。グラフはTALT内部の蛍光ナノ粒子数を示す。

核 (いずれも青) はHoechst 33342で染色した。Bars: 50 μm (A), 20 μm (B, C), 10 μm (D). ****p* < 0.001, ***p* < 0.01, N.D.: not detected: (Mann-Whitney U test, *n* = 3-6 animals, mean ± SEM)。

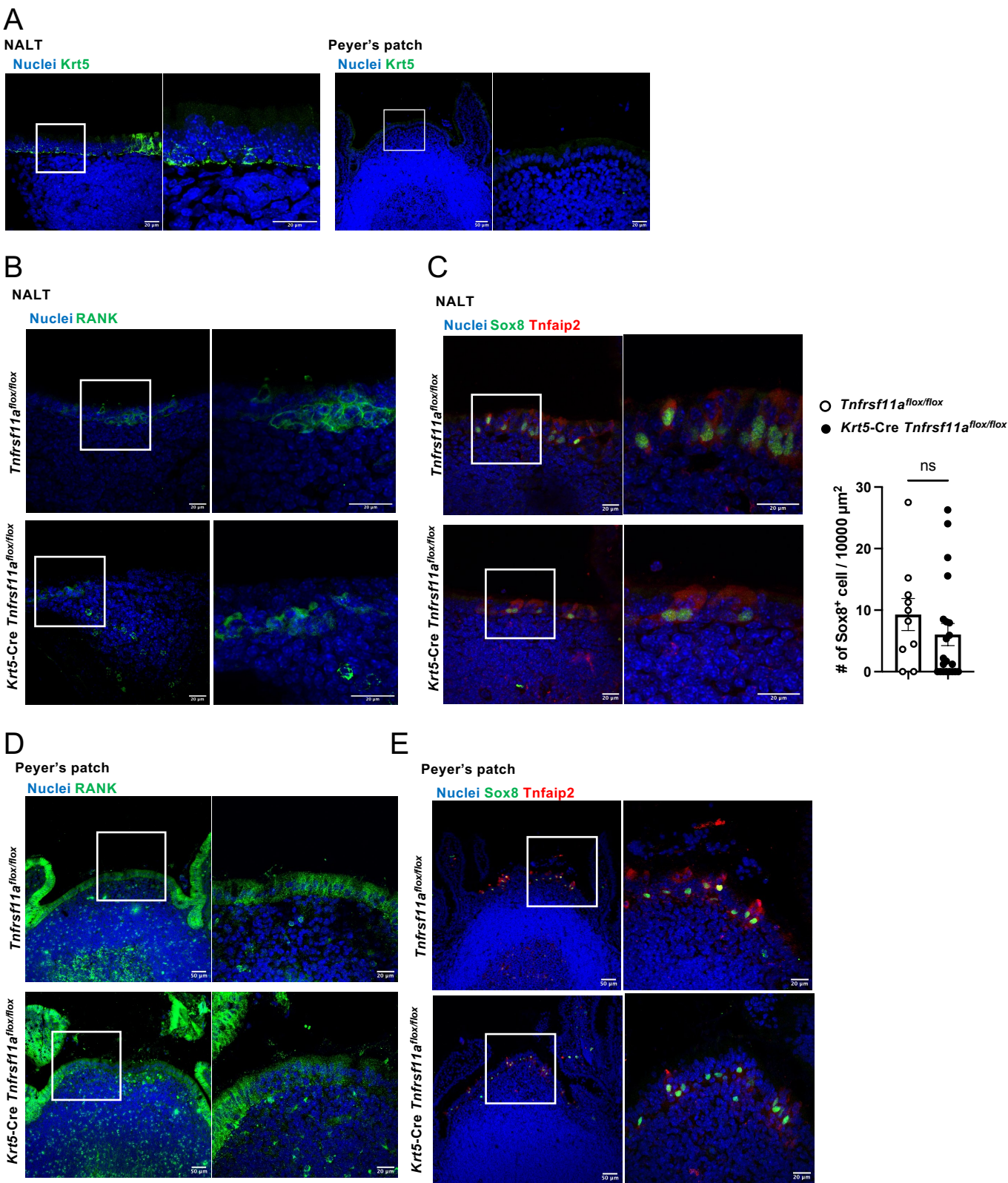


Figure 17 *Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{flx/flx} マウスには NALT および パイエル板の M 細胞を欠損しない。

(A) 野生型マウスの NALT および パイエル板における組織切片の免疫染色画像。Krt5 (緑)
 (B-E) *Tnfrsf11a*^{flx/flx} マウスまたは *Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{flx/flx} マウスの NALT (B, C) および パイエル板 (D, E) における組織切片の免疫染色画像。RANK (緑、B, D), Sox8 (緑、C, E), Tnfaip2 (赤、C, E)。右側の画像は各画像の左側の白線部分を強拡大を示す。(C) のグラフは NALT FAE 10,000 μm² あたりの Sox8⁺ 細胞数を示す。ns: not significant (Mann-Whitney U test, $n = 4-5$ mice, mean $\pm$ SEM)。核 (青) は Hoechst 33342 で染色した。Bars: 50 μm (各左画像)、20 μm (各右画像)。

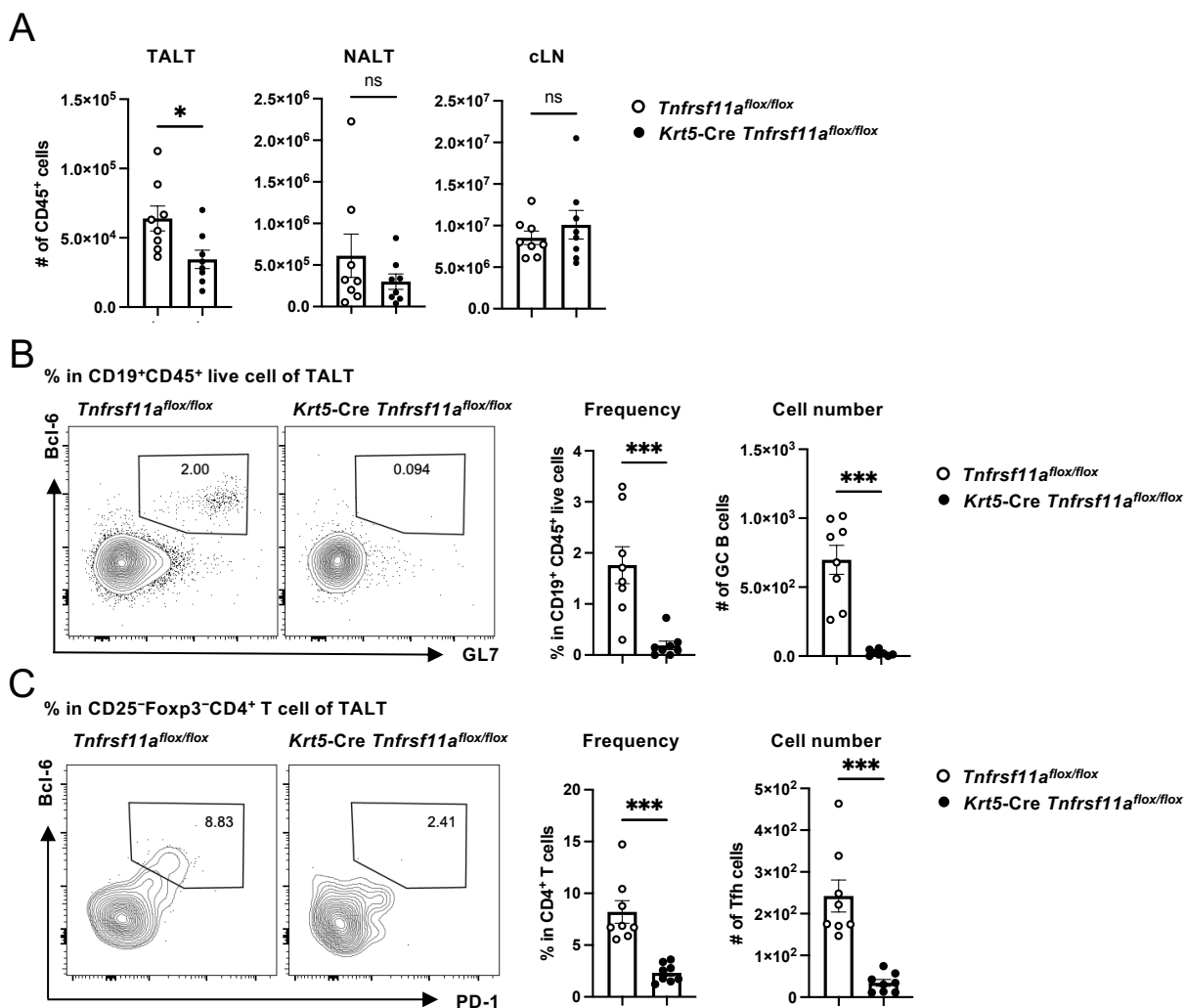
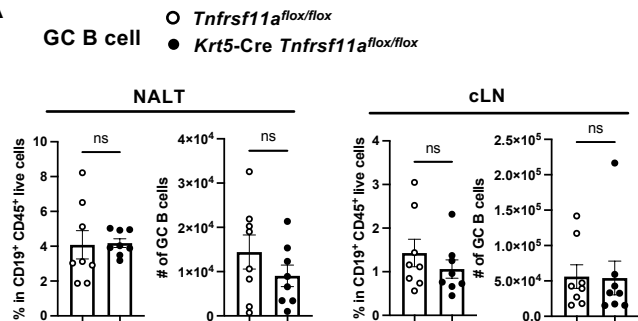


Figure 18 *Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{flox/flox} マウスは定常状態にける TALT における胚中心応答が減弱している。

(A-C) *Tnfrsf11a*^{flox/flox} mice マウスまたは *Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{flox/flox} マウスの TALT における免疫細胞のフローサイトメトリー解析。TALT、NALT、cLN における CD45⁺ 細胞数 (A)。TALT の胚中心 (GC) B 細胞 (B)、TALT の濾胞性 T ヘルパー (Tfh) 細胞 (C) の代表的なパネル、割合、細胞数を示す。データは 2 つの独立した実験から取得した。*** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, ns: not significant (割合: Mann-Whitney U test、細胞数: Student's t test、 $n = 8$ animals、mean $\pm$ SEM)。

A



B

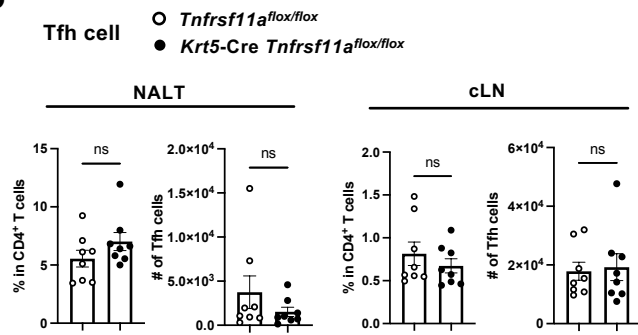


Figure 19 *Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{fllox/fllox} マウスは 定常状態において、NALTおよびcLNにおける胚中心応答は変化しない。

(A-B) *Tnfrsf11a*^{fllox/fllox} マウスまたは *Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{fllox/fllox} マウスのNALTおよびcLNにおける免疫細胞のフローサイトメトリ解析。GC B細胞 (A)、Tfh細胞 (B) の代表的なパネル、割合、細胞数を示す。データは2つの独立した実験から取得した。ns: not significant (割合: Mann-Whitney U test, 細胞数: Student's *t* test, *n* = 8 animals, mean ± SEM)。

- *Tnfrsf11a*^{flox/flox}
- *Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{flox/flox}

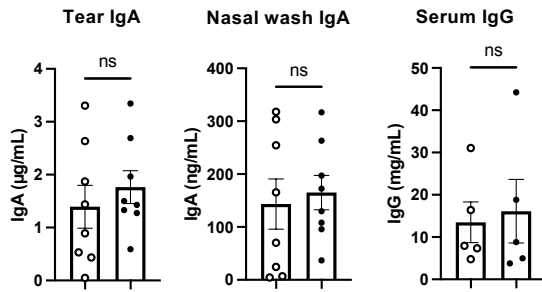


Figure 20 *Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{flox/flox} マウスの涙液、鼻腔洗浄液、血液中の抗体量は変化しない

ELISAによって測定した涙液中総IgA、鼻洗浄液中総IgA、血清中総IgGの量。データは2つの独立した実験から取得した。ns: not significant (Mann-Whitney U test, $n = 5-8$ animals, mean $\pm$ SEM)。

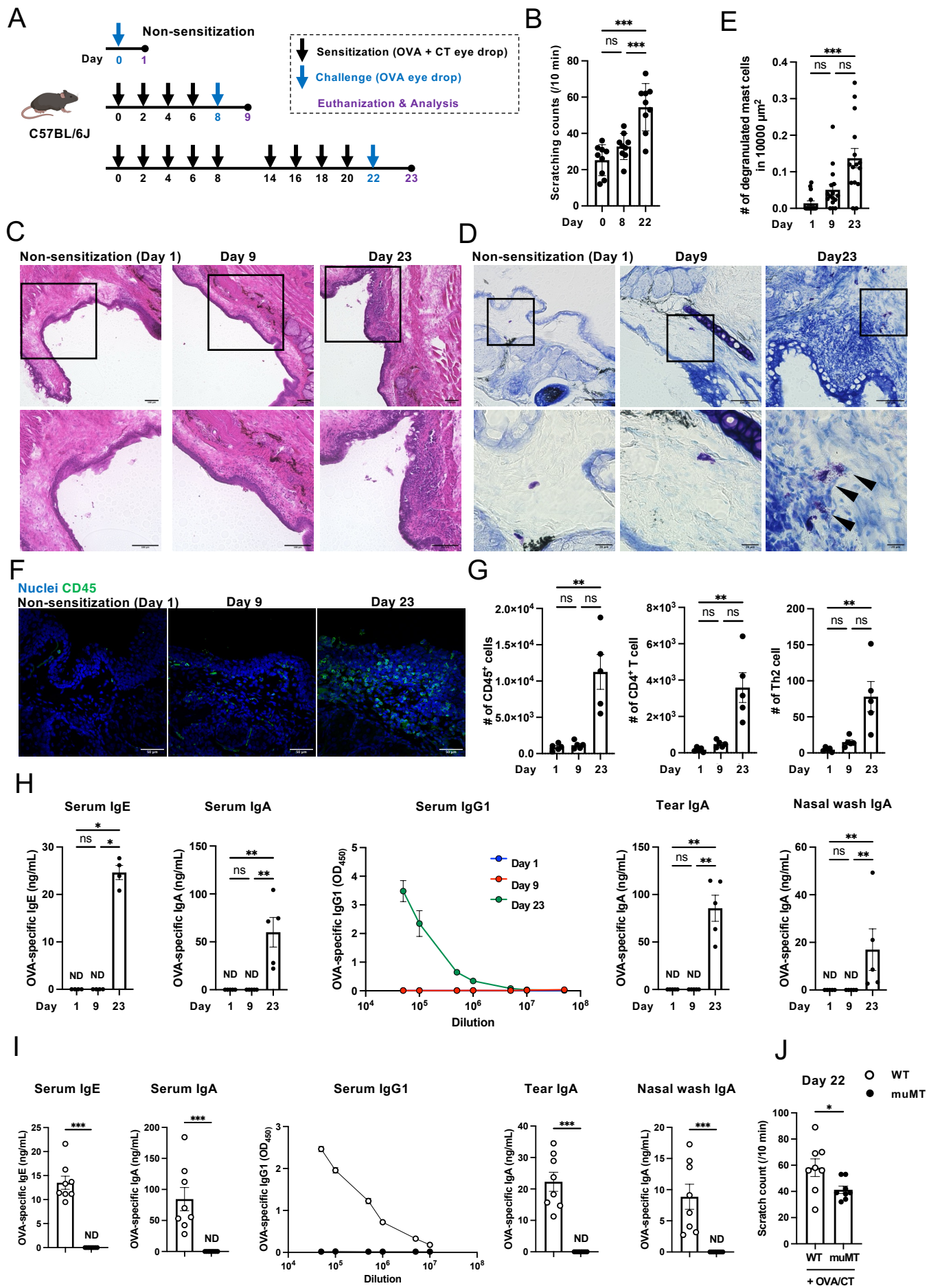
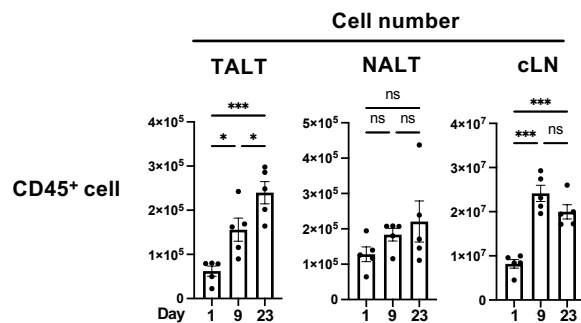


Figure 21 OVA抗原とコレラ毒素の点眼投与はアレルギー性結膜炎を誘発する。

(A-G) 野生型C57BL/6Jマウスを用いたアレルギー性結膜炎モデル。(A) モデル模式図。図に示すスケジュールのように、麻酔下で200 μ gのOVAと0.5 μ gのCTを点眼投与することで免疫した。マウスの解剖前日にOVA抗原を曝露した。(B) OVA曝露直後10分間における眼を掻く回数。(C) ヘマトキシリン・エオシン (HE) で染色した結膜の凍結切片の代表的な組織画像。Bars: 100 μ m。(D, E) トリジンブルーによる結膜マスト細胞の解析。結膜の組織染色像 (D) と定量解析結果 (E)。矢頭は脱顆粒したマスト細胞を示す。Bars: 100 μ m (上段)、20 μ m (下段)。(F) 結膜の蛍光免疫染色像。CD45 (緑) はanti-CD45抗体で、核 (青) はHoechst 33342で染色した。Bars: 20 μ m。(G) 結膜のフローサイトメトリー解析。CD45⁺細胞 (左)、CD4⁺ T細胞 (中央)、およびGATA3⁺CD4⁺ Th2細胞 (右)。(H) ELISAによって測定したOVA特異的抗体量 (血清IgE、血清IgA、血清IgG1、涙液IgA、鼻腔洗浄液IgA)。(I, J) 野生型C57BL/6Jマウス (WT) またはmuMTマウス (B細胞受容体IgMの重鎖を欠損するマウス) を用いたアレルギー性結膜炎モデル。麻酔下で200 μ gのOVAと0.5 μ gのCTを点眼投与することで免疫し、Day 22にOVAを点眼投与により曝露させた。ELISAによって測定したOVA特異的抗体量 (血清IgE、血清IgA、血清IgG1、涙液IgA、鼻腔洗浄液IgA) を (I)、OVA曝露直後10分間における眼を掻く回数を (J) に示す。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns: not significant, N.D.: not detected [Mann-Whitney U test (B, I, J), One-way ANOVA with Tukey's test (F), Kruskal-Wallis test (G), $n = 4-5$ animals, mean $\pm$ SEM]。データは2つ以上の独立した実験から代表的なものを示している。

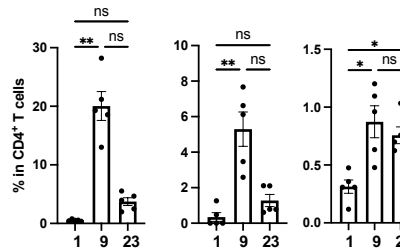
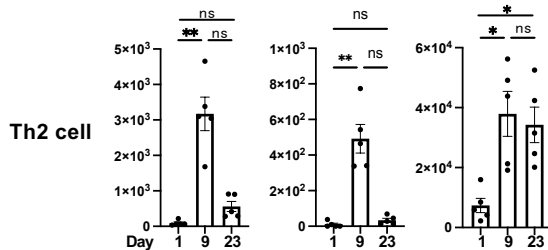
A



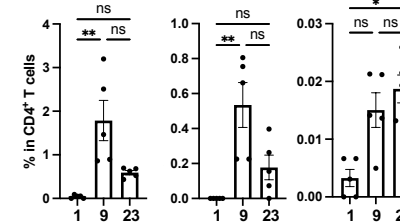
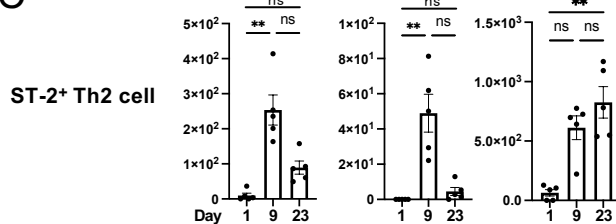
Frequency

TALT NALT cLN

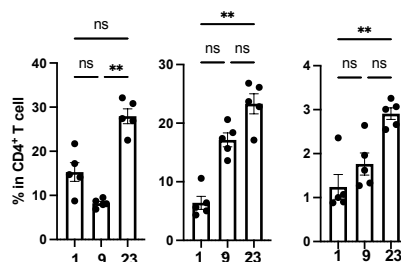
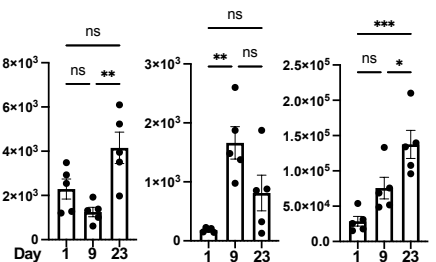
B



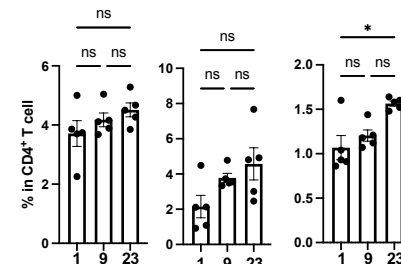
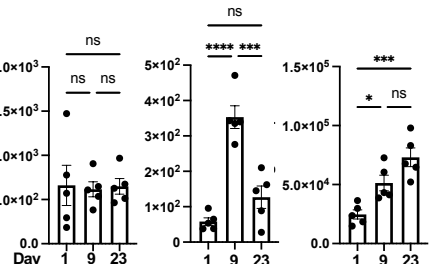
C



D

RORgt⁺Foxp3⁻ cell

E

RORgt⁺Foxp3⁺ cell

F

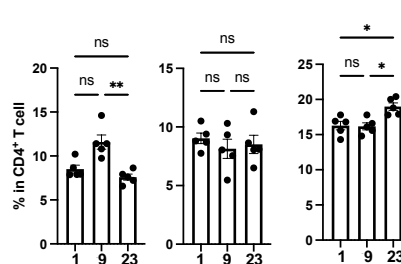
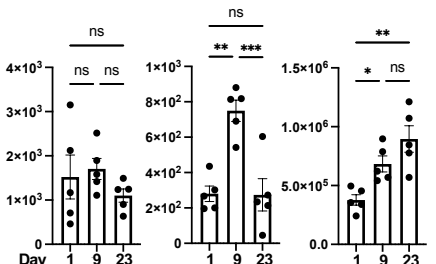
RORgt⁺Foxp3⁺ cell

Figure 22 OVA抗原とコレラ毒素の点眼投与はTh2細胞を誘導する。

(A-F) Figure 21Aに示すアレルギー性結膜炎モデルを誘導したマウスのTALT、NALT、cLNのフローサイトメトリー解析。
(A) 各組織におけるCD45⁺細胞数。(B-F) GATA3⁺Th2細胞 (B)、ST-2⁺GATA3⁺Th2細胞 (C)、RORgt⁺Foxp3⁻Th17細胞 (D)、RORgt⁺Foxp3⁺末梢性Treg細胞 (E)、RORgt⁺Foxp3⁺中枢性Treg細胞 (F) の割合と細胞数。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns: not significant (割合 : Kruskal-Wallis test、細胞数: One-way ANOVA with Tukey's test, $n = 5$ animals, mean $\pm$ SEM)。
データは2つ以上の独立した実験から代表的なものを示している。

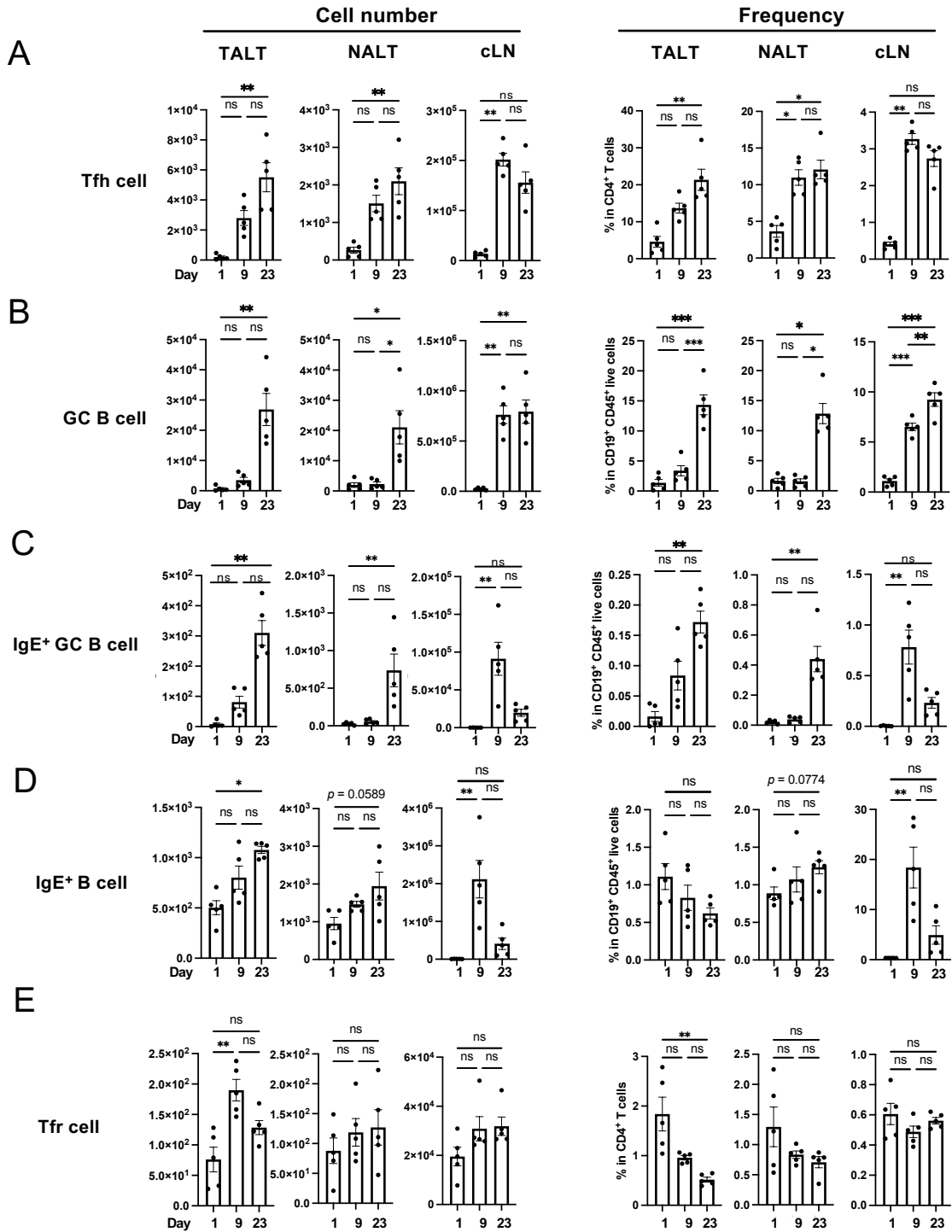
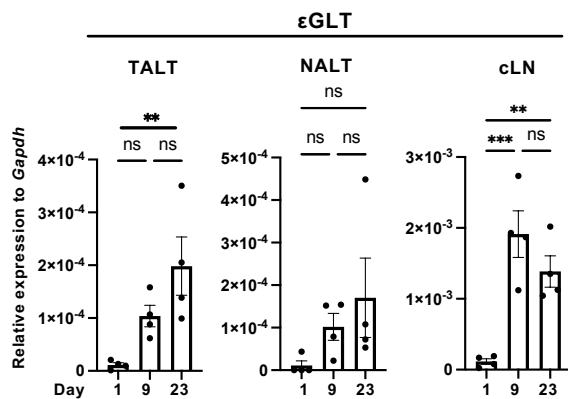


Figure 23 OVA抗原とコレラ毒素の点眼投与はTfh細胞、IgE⁺細胞を誘導する。

(A-E) Figure 21 (A) に示すアレルギー性結膜炎モデルを誘導したマウスのTALT、NALT、cLNのフローサイトメトリ解析。PD-1⁺Bcl-6⁺Tfh細胞 (A)、GL7⁺Bcl-6⁺GC B細胞 (B)、GL7⁺Bcl-6⁺IgE⁺GC B細胞 (C)、IgE⁺B細胞 (D)、PD-1⁺Bcl-6⁺Foxp3⁺Tfr細胞 (E) の割合と細胞数。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns: not significant (割合: Kruskal-Wallis test, 細胞数: One-way ANOVA with Tukey's test, $n = 5$ animals, mean $\pm$ SEM)。データは2つ以上の独立した実験から代表的なものを示している。

A



B

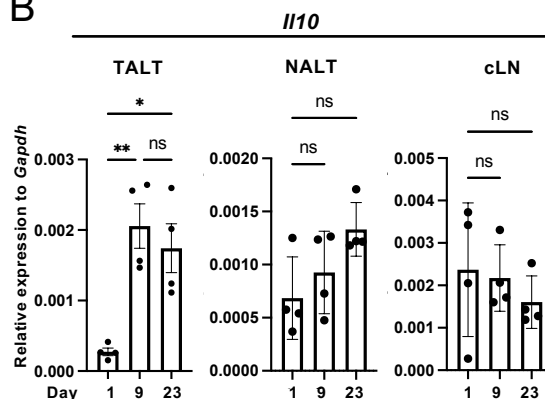


Figure 24 OVA抗原とコレラ毒素の点眼投与はアレルギー関連の遺伝子発現を誘導する。

(A, B) Figure 21 (A) に示すアレルギー性結膜炎モデルを誘導したマウスのTALT、NALT、cLNの定量的PCR解析。 ϵ GLTと *Il10*の遺伝子発現をハウスキーピング遺伝子 *Gapdh*で標準化した。 $***p < 0.001$, $**p < 0.01$, $*p < 0.05$, ns: not significant (Kruskal-Wallis test, $n = 4$ animals, mean $\pm$ SEM)。データは2つ以上の独立した実験から取得した。

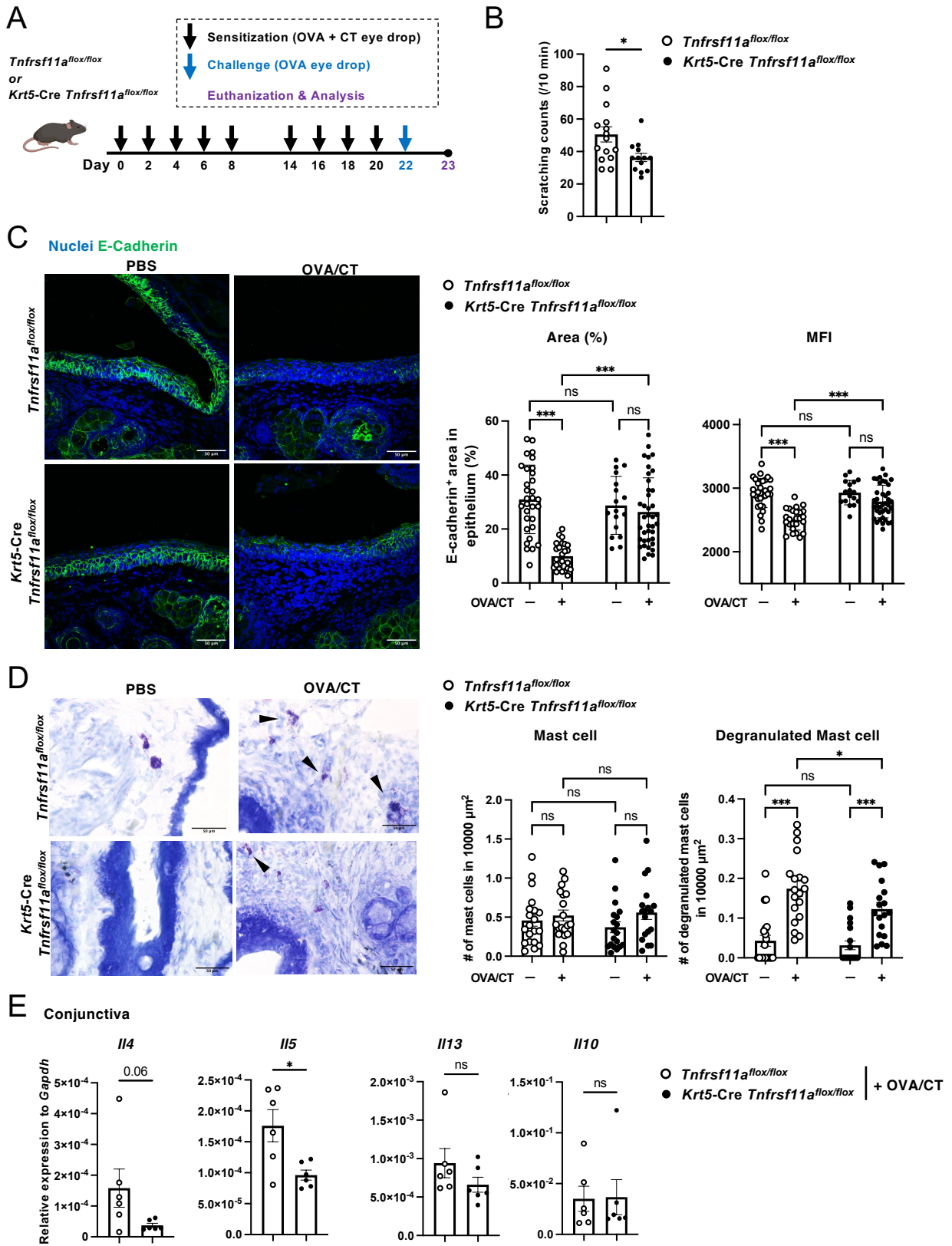
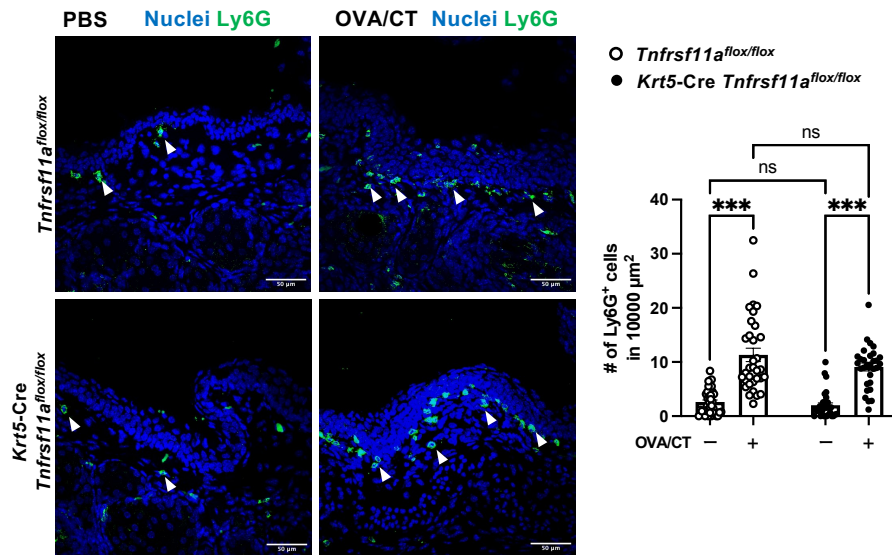


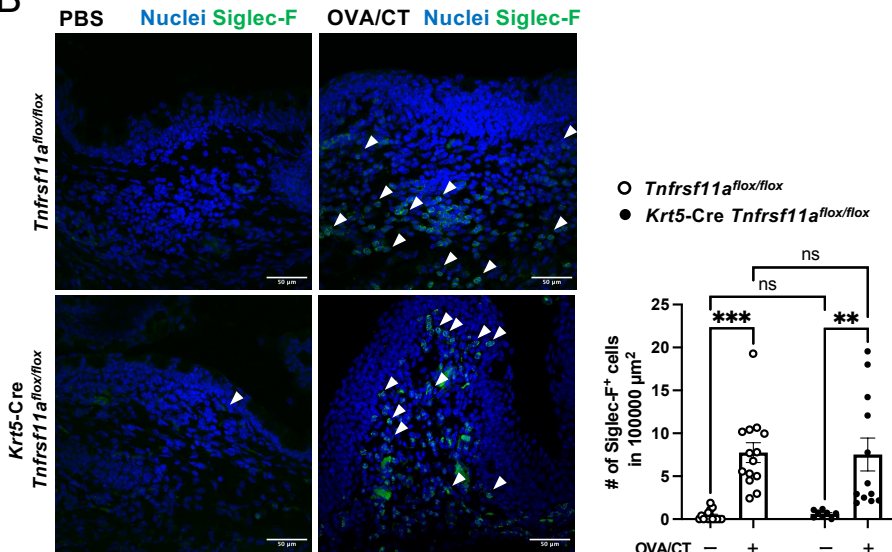
Figure 25 TALT M細胞の欠損はアレルギー症状を減弱させる

(A) アレルギー性結膜炎マウスモデルの模式図。麻酔下で200 µgのOVAと0.5 µgのCTを点眼投与することで免疫したマウスと、非免疫（PBSを投与）のマウスを用意し。Day 22にOVAを点眼投与により曝露させた。(B) OVA曝露後10分間における眼を掻く回数を測定。データは3つの独立した実験から習得した。 *Tnfrsf11a*^{flox/flox}マウス ($n=15$ animals) または *Krt5-Cre* *Tnfrsf11a*^{flox/flox}マウス ($n=13$ animals) 。 $*p < 0.01$ (Mann-Whitney U test, mean $\pm$ SEM)。(C) 結膜上皮における接着分子E-Cadherinの免疫蛍光画像。結膜は *Tnfrsf11a*^{flox/flox}マウスまたは *Krt5-Cre* *Tnfrsf11a*^{flox/flox}マウスから採取した。E-Cadherin（緑）、核はHoechst 33342（青）で示す。結膜上皮におけるE-Cadherin⁺領域の割合、平均蛍光強度（MFI）をFijiで解析した。Bars: 50 µm。 $***p < 0.001$, ns: not significant (Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, $n=4$ animals, mean $\pm$ SEM)。(D) トルイジンブルーで染色した結膜の組織画像。結膜は *Tnfrsf11a*^{flox/flox}マウスまたは *Krt5-Cre* *Tnfrsf11a*^{flox/flox}マウスから採取した。矢頭は脱顆粒したマスト細胞を示す。Bars: 50 µm。グラフは結膜の粘膜固有層10,000 µm²あたりのマスト細胞数および脱顆粒したマスト細胞数の定量解析結果を示す。 $***p < 0.001$, $*p < 0.01$, ns: not significant (Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, $n=4-6$ animals, mean $\pm$ SEM)。(E) *Tnfrsf11a*^{flox/flox}マウスまたは *Krt5-Cre* *Tnfrsf11a*^{flox/flox}マウス由来の結膜の定量的PCR。 *Il4*、*Il5*、*Il13*、および *Il10*遺伝子発現をハウスキーピング遺伝子 *Gapdh*で標準化した。 $*p < 0.01$, ns: not significant (Mann-Whitney U test, $n=6$ animals, mean $\pm$ SEM)。データは2つ以上の独立した実験から取得した。

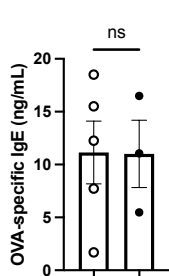
A



B



C



D

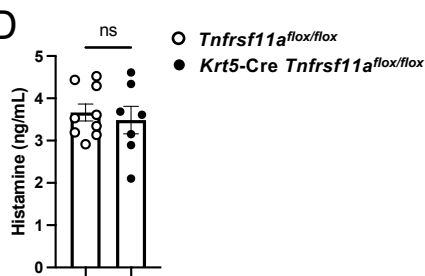


Figure 26 TALT M細胞の欠損は好中球、好酸球、血清中のヒスタミン量、OVA特異的IgE抗体量に影響しない

(A-D) Figure 25 (A) に示す、アレルギー性結膜炎モデルの結膜および血清の解析。(A-B) *Tnfrsf11a^{flox/flox}* マウスおよび *Krt5-Cre Tnfrsf11a^{flox/flox}* マウスの結膜切片の蛍光免疫染色像。Ly6G⁺好中球 (A、緑)、Siglec-F⁺好酸球 (B、緑)。矢頭はそれぞれ代表的な細胞を示す。Bars: 50 μm 。核(青)はHoechst 33342で染色した。グラフは結膜の粘膜固有層10,000 μm^2 あたりのそれぞれの細胞数を示す。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, ns: not significant (Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, $n = 4-6$ animals, mean $\pm$ SEM)。(C) 血清中のOVA特異的IgE量。*Tnfrsf11a^{flox/flox}* マウス または *Krt5-Cre Tnfrsf11a^{flox/flox}* マウス。(D) ELISAで測定したヒスタミン濃度。*Tnfrsf11a^{flox/flox}* マウス ($n = 9$ animals) または *Krt5-Cre Tnfrsf11a^{flox/flox}* マウス ($n = 7$ animals)。
ns: not significant [Mann-Whitney U test (C, D), $n = 3-9$ animals, mean $\pm$ SEM]。データは2つの独立した実験から得た。

A

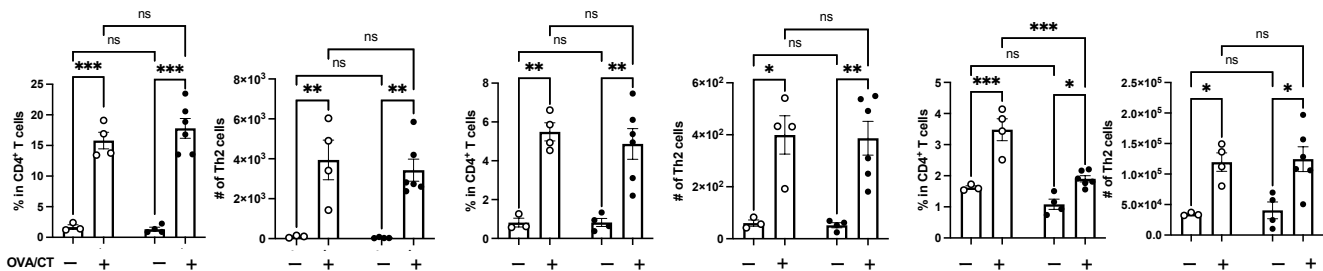
Th2 cell (Day 9)

○ *Tnfrsf11a*^{flx/flx}
● *Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{flx/flx}

TALT

NALT

cLN



B

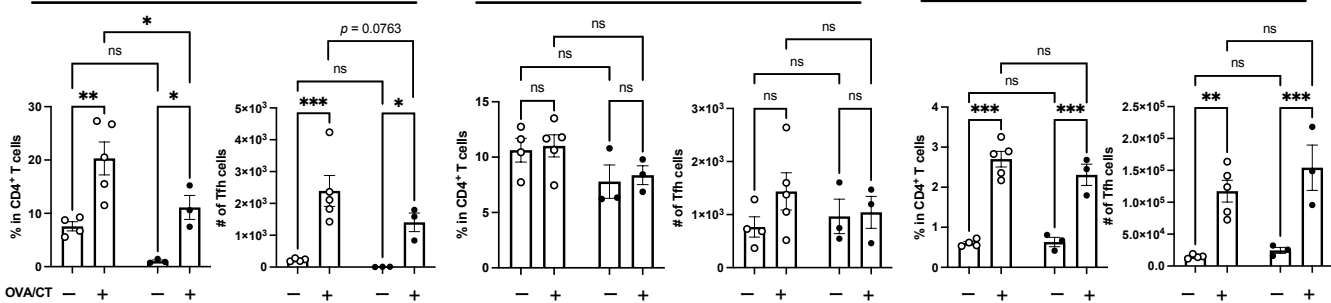
Tfh cell (Day 23)

○ *Tnfrsf11a*^{flx/flx}
● *Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{flx/flx}

TALT

NALT

cLN



C

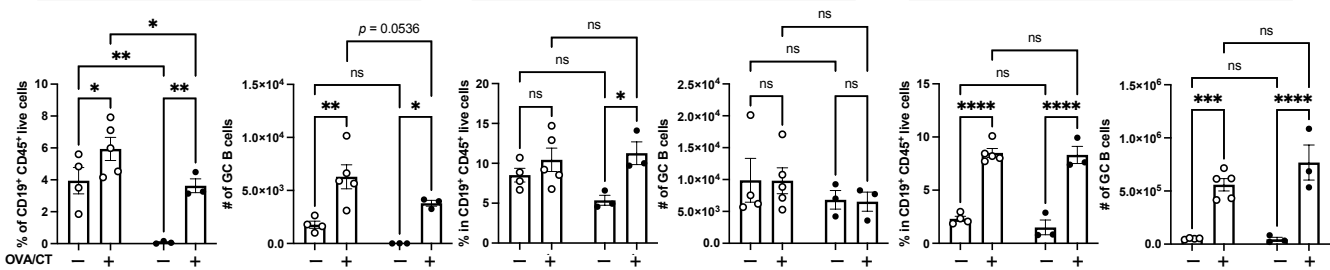
GC B cell (Day23)

○ *Tnfrsf11a*^{flx/flx}
● *Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{flx/flx}

TALT

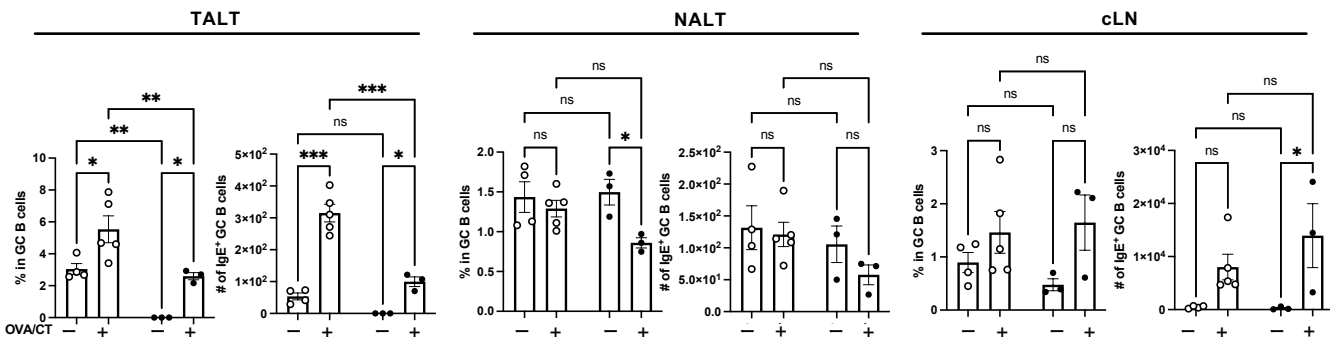
NALT

cLN



IgE⁺ GC B cell (Day 23)

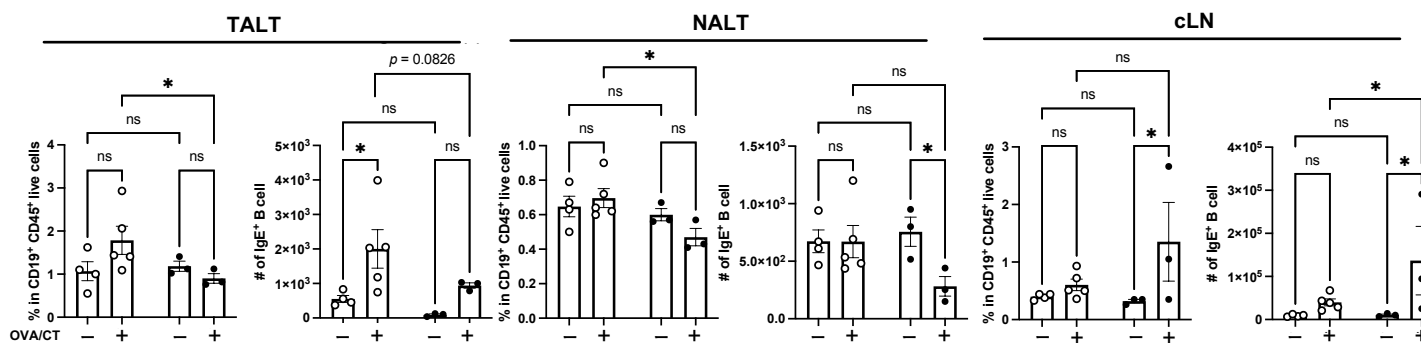
- *Tnfrsf11a*^{flx/flx}
- *Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{flx/flx}



E

IgE⁺ B cell (Day23)

- *Tnfrsf11a*^{flx/flx}
- *Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{flx/flx}



F

TALT

114

115

1113

○ *Tnfrsf11a*^{flox/flox} | + OVA/CT
● *Krt5-Cre Tnfrsf11a*^{flox/flox}

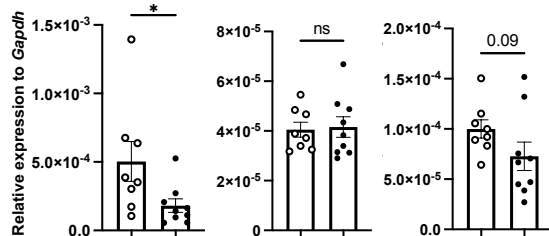


Figure 27 TALT M細胞の欠損はTALTにおけるIgE胚中心応答を減弱させる

(A-E) Figure 25 (A) に示すアレルギー性結膜炎モデルにおけるTALT, NALT, cLNの免疫細胞組成。GATA3⁺Th2細胞 (A)、PD-1⁺Bcl-6⁺Tfh細胞 (B)、GL7⁺Bcl-6⁺GC B細胞 (C)、GL7⁺Bcl-6⁺IgE⁺GC B細胞 (D)、IgE⁺B細胞 (E) の割合と細胞数。n = 3-6 animals。 (F) TALTにおける定量的PCR解析。Il4, Il5, Il13の遺伝子発現をハウスキーピング遺伝子Gapdhで標準化した。n = 8-9 animals。***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05, ns: not significant [Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test (A-E), Mann-Whitney U test (F), mean $\pm$ SEM]。データは2つ以上の独立した実験から取得した。