(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年6月8日(08.06.2023)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2023/100745 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) *A23L 33/135* (2016.01)
A61P 1/00 (2006.01) *A61K 35/74* (2015.01)
A61P 37/04 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/043424

(22) 国際出願日： 2022年11月24日(24.11.2022)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2021-196561 2021年12月2日(02.12.2021) JP

(72) 発明者；および
(71) 出願人：新藏 礼子(**SHINKURA Reiko**) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).

(72) 発明者：高 鵬(**GAO Peng**); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).

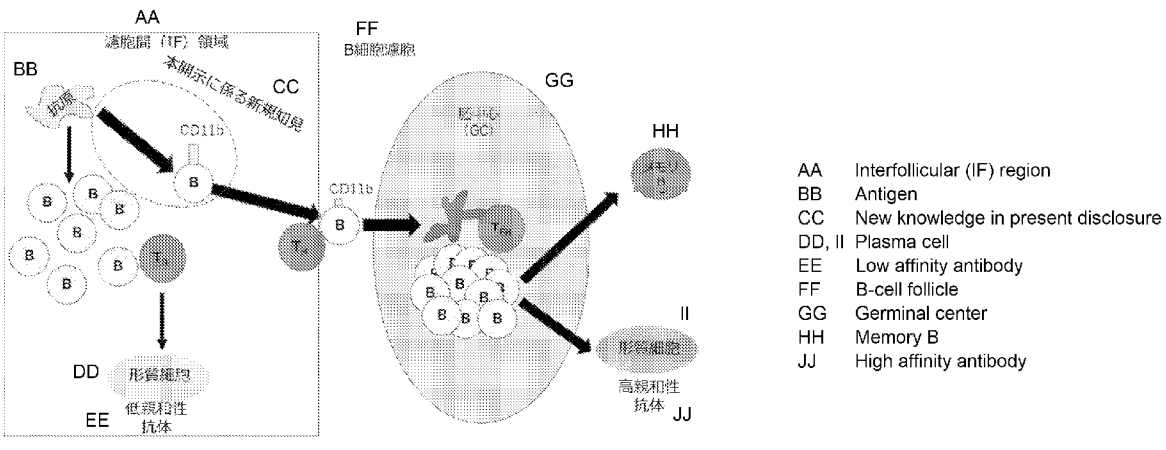
(74) 代理人：小野 誠，外 (**ONO Makoto** et al.); 〒1008136 東京都千代田区大手町一丁目１番１号 大手町パークビルディング アンダーソン・毛利・友常法律事務所 外国法共同事業 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能)：AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,

(54) **Title:** IMMUNOSTIMULATORY COMPOSITION

(54) 発明の名称： 免疫賦活化組成物

[図15]



(57) **Abstract:** The present disclosure relates to: a composition for inducing germinal center migration of activated B-cells, the composition containing a substance that induces expression of CD11b in B-cells; a method for manufacturing the composition; and use of the composition. In one embodiment, the present disclosure pertains to immunostimulation and maintenance or improvement of mucosal flora using a substance that induces expression of CD11b in B-cells.

(57) 要約：本開示は、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む、活性化Ｂ細胞の胚中心移行を誘導するための組成物、その製造方法、またはその使用に関する。一態様において、本開示はＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を用いた免疫賦活化、粘膜細菌叢の維持または改善に関連する。

［続葉有］

WO 2023/100745 A1

PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明　細　書

発明の名称 ： 免疫賦活化組成物

技術分野

[0001] 本開示は、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む、活性化Ｂ細胞の胚中心移行を誘導するための組成物、その製造方法、またはその使用に関する。一態様において、本開示はＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を用いた免疫賦活化、粘膜細菌叢の維持または改善に関連する。

背景技術

[0002] 免疫反応中のＢ細胞や胚中心（ＧＣ）の挙動に関する研究は、ワクチン開発に役立つ可能性があることが動機となっている（非特許文献１、２）。ワクチンの有効性を評価する上で重要な基準の一つは、そのワクチンが胚中心（ＧＣ）反応を効率的に誘導し、高親和性の長寿命形質細胞（ＰＣ）や記憶Ｂ細胞を生成して、侵入してきた病原体から宿主を守ることができるか否かである（非特許文献１、２）。ＧＣ反応の間、Ｂ細胞は、ｐｒｅ－ＧＣ、ＧＣ、ｐｏｓｔ－ＧＣの３つの段階を経る（非特許文献３～５）。抗原刺激を受けると、新たに活性化されたナイーブＢ細胞と活性化されたメモリーＢ細胞は、直接、濾胞外の短命のＰＣに分化するか、または、濾胞間（ＩＦ）領域に移動して、活性化されたＴ細胞と安定した相互作用を確立する（非特許文献３～８）。Ｔ－Ｂ細胞間の相互作用の後、一部のＢ細胞は低親和性ＰＣに分化し、その他のＢ細胞（ｐｒｅ－ＧＣ　Ｂ細胞）はＧＣに移動する（非特許文献３、４）。これらのｐｒｅ－ＧＣ　Ｂ細胞は、まずＧＣの暗領域（ＤＺ）に移動し、ＧＣのＢ細胞に成長する。Ｂ細胞は急速に増殖し、体細胞超変異（ＳＨＭ）を起こしてＢ細胞受容体（ＢＣＲ）の親和性を変化させ、その特異的な抗原に結合する（非特許文献３、４）。その後、免疫グロブリン（Ｉｇ）遺伝子に変異が生じたＢ細胞は、ＤＺから明領域（ＬＺ）に移動し、そこでＴ濾胞ヘルパー（$Ｔ_{ＦＨ}$）細胞の助けを借りて親和性の選択が行わ

れる（非特許文献３、４、８）。抗原に対して高親和性のＢＣＲを持つＢ細胞はｐｏｓｔ－ＧＣ　Ｂ細胞として選択され、ＧＣから出て最終的に長寿命のＰＣやメモリーＢ細胞に分化するが、選択されなかったＢ細胞はＧＣのＤＺに戻り、より高親和性のＢＣＲのためのＳＨＭをさらに蓄積することができる（非特許文献７）。

[0003] ＧＣ反応を起こすためには、樹状細胞（ＤＣ）の効率的な活性化が不可欠であることが報告されている（非特許文献３）。そのため、これまでの研究では、ＤＣを刺激するための最適なアジュバントの選択に焦点が当てられてきた。しかし、Ｌｙｃｋｅらは、ＤＣを枯渇させたマウスにおいて、Ｂ細胞がマイクロフォールド（Ｍ）細胞から抗原を採取し、さらにＧＣに移行することを明らかにしており（非特許文献９）、ＤＣの活性化はＧＣへの侵入には必要ないことを示している。ＤＣが適切にプライミングされていても、活性化されたＢ細胞のうち、ごく一部の集団だけがｐｒｅ－ＧＣ　Ｂ細胞に成長し、ＧＣに入ることができる（非特許文献４、６）。最近の研究では、ＧＣ形成に必須の転写因子であるｉｒｆ４がｐｒｅ－ＧＣ　Ｂ細胞に高発現していることが報告されている（非特許文献１０、１１）。しかし、ｐｒｅ－ＧＣ　Ｂ細胞の特異的な表面マーカーは知られていない。そのため、ｐｒｅ－ＧＣ　Ｂ細胞の基準や、どのような種類の活性化Ｂ細胞がＧＣに入り、特定の抗原に対する高親和性ＢＣＲを産生するのかは、よくわかっていなかった。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Ｔｕｒｎｅｒ，　Ｊ．　Ｓ．　ｅｔ　ａｌ．　Ｈｕｍａｎ　ｇｅｒｍｉｎａｌ　ｃｅｎｔｒｅｓ　ｅｎｇａｇｅ　ｍｅｍｏｒｙ　ａｎｄ　ｎａｉｖｅ　Ｂ　ｃｅｌｌｓ　ａｆｔｅｒ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａ　ｖａｃｃｉｎａｔｉｏｎ．　Ｎａｔｕｒｅ．　５８６，　１２７-１３２　（２０２０）．

非特許文献2：Ａｎｄｅｒｓｅｎ，　Ｔ．　Ｋ．　ｅｔ　ａｌ．　Ｅｎｈａｎ

ced germinal center reaction by targeting vaccine antigen to major histocompatibility complex class II molecules. npj Vaccines. 4, 9 (2019).

非特許文献3：Mesin, L., Ersching, J., & Victora, G. D. Germinal center B cell dynamics. Immunity. 45. 3, 471－482 (2016).

非特許文献4：Kurosaki, T., Kometani, K., & Ise, W. Memory B cells. Nature Reviews Immunology. 15. 3, 149－159 (2015).

非特許文献5：Chen, K., Magri, G., Grasset, E. K. & Cerutti, A. Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA. Nature Reviews Immunology. 20, 427－441 (2020).

非特許文献6：Mesin, L. et al. Restricted clonality and limited germinal center reentry characterize memory B cell reactivation by boosting. Cell. 180. 1, 92－106 (2020).

非特許文献7：Chen, H. et al. BCR selection and affinity maturation in Peyer's patch germinal centres. Nature. 582, 421-425 (2020).

非特許文献8：Ise, W. et al. T follicular

helper cell－germinal center B cell interaction strength regulates entry into plasma cell or recycling germinal center cell fate. Immunity. 48.4, 702－715 (2018).

非特許文献9：Komban, R. J. et al. Activated Peyer′s patch B cells sample antigen directly from M cells in the subepithelial dome. Nat Commun. 10, 2423 (2019).

非特許文献10：Song, S. & Matthias, P. D. The Transcriptional Regulation of Germinal Center Formation. Front Immunol. 10.3389 (2018).

非特許文献11：Willis, SN. et al. Transcription factor IRF4 regulates germinal center cell formation through a B cell－intrinsic mechanism. J Immunol. 192(7), 3200－6 (2014).

発明の概要

[0005] 活性化されたＢ細胞は、胚中心（ＧＣ）に入って親和性成熟を行い、高親和性の抗体を産生することができる。しかし、どのような活性化Ｂ細胞がＧＣに入るのかは不明のままであった。ここで発明者らは、ＧＣの外側に位置するＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$ Ｂ細胞の小さな集団を発見した。このＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$ Ｂ細胞をマウスに注入すると、４０時間後にＧＣに入った。このことから、ＣＤ１１ｂはｐｒｅ－ＧＣ ＩｇＡ$^{+}$ Ｂ細胞の新しい表面マーカーであることが示唆された。さらに、樹状細胞の活性化とは無関係に、Ｂ細胞上のＣＤ１１ｂの発現は、ｉｎ ｖｉｔｒｏでｐａｍ３ＣＳＫ４や熱死した

大腸菌などの細菌抗原によって誘導されることがわかった。また、ｐａｍ３ＣＳＫ４や熱死大腸菌を経口投与すると、２日以内にＧＣ　Ｂ細胞の数が増加し、粘膜抗原特異的ＩｇＡ反応が増強された。本開示の示す結果は、Ｂ細胞のＣＤ１１ｂの誘導が、効果的な粘膜ワクチンのアジュバントを選択するための有望なマーカーであることを示している。

[0006] 上記知見に基づいて、本開示の発明者らは、Ｂ細胞においてＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質が、粘膜ワクチンの効果的なアジュバントとして作用し、高親和性粘膜ＩｇＡ抗体の産生が誘導され得ること、また当該作用により、粘膜などの免疫が賦活化され、様々な体外由来の抗原に対する免疫が誘導され得ること、また、当該効果によって適切な粘膜細菌叢の維持または粘膜細菌叢の改善がもたらされることを見出し、本開示を完成した。

[0007] 一態様において、本開示はＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む、活性化Ｂ細胞の胚中心移行を誘導するための組成物を提供する。

[0008] 一態様において、本開示はＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物を準備し、当該物質とＢ細胞を接触させること含む、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導し、当該Ｂ細胞とＴ細胞および樹状細胞の接触を誘導し、活性化Ｂ細胞の胚中心移行を誘導する方法を提供する。

[0009] より具体的には、本開示は下記を提供する。

［項目１］

Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む、活性化Ｂ細胞の胚中心移行を誘導するための組成物。

［項目２］

前記Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質が、細菌である、項目１に記載の組成物。

［項目３］

前記Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質が、γプロテオバクテリア綱またはバクテロイデス綱の細菌である、項目２に記載の組成物。

［項目４］

前記Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質が大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）、サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｅｎｔｅｒｉｃａ）、クレブシエラ・ニューモニエ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、バクテロイデス・ブルガータス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ　ｖｕｌｇａｔｕｓ）またはこれらの組み合わせである、項目３に記載の組成物。

［項目５］

活性化Ｂ細胞の胚中心移行の活性化によって治療される疾患、障害または状態を有する対象を治療するための、項目１～４のいずれか一項に記載の組成物。

［項目６］

免疫賦活、健康維持もしくは増進、粘膜細菌叢の維持もしくは改善、または感染症治療に使用するための、項目１～４のいずれか一項に記載の組成物。

［項目７］

ワクチンアジュバントである、項目１～４のいずれか一項に記載の組成物。

［項目８］

粘膜投与される、項目１～７のいずれか一項に記載の組成物。

［項目９］

医薬、食品、飼料、食品添加物、飼料添加物、これらの原料組成物からなる群から選択される形態である、項目１～６のいずれか一項に記載の組成物。

［項目１０］

抗原とともに投与するための、項目１に記載の組成物。

［項目１１］

抗原と同時に投与されることを特徴とする、項目１０に記載の組成物。

［項目１２］

抗原の投与とは別に投与されることを特徴とする、項目１０に記載の組成物。

［項目１３］

抗原を含むワクチン組成物である、項目１に記載の組成物。

［項目１４］

抗原がウイルス抗原、細菌抗原、寄生虫抗原またはこれらの組み合わせである、項目１０～１３に記載の組成物。

［項目１５］

Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物を準備し、当該物質とＢ細胞を接触させること含む、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導し、当該Ｂ細胞とＴ細胞および樹状細胞の接触を誘導し、活性化Ｂ細胞の胚中心移行を誘導する方法。

[0010] また、別の態様において、本開示は下記を提供する。

［項目１６］

活性化Ｂ細胞の胚中心移行の活性化によって治療される疾患、障害または状態を有する対象を治療するための方法であって、当該対象にＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物を投与することを含む方法。

［項目１７］

前記Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質が、細菌である、項目１６に記載の方法。

［項目１８］

前記Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質が、γプロテオバクテリア綱またはバクテロイデス綱の細菌である、項目１６に記載の方法。

［項目１９］

前記Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質が大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）、サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｅｎｔｅｒｉｃａ）、クレブシエラ・ニューモニエ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎ

ｅｕｍｏｎｉａｅ）、バクテロイデス・ブルガータス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ　ｖｕｌｇａｔｕｓ）またはこれらの組み合わせである、項目１６に記載の方法。

［項目２０］

活性化Ｂ細胞の胚中心移行の活性化によって治療される疾患、障害または状態の治療が免疫賦活化、健康維持もしくは増進、粘膜細菌叢の維持もしくは改善、または感染症治療である、項目１６に記載の方法。

［項目２１］

前記組成物がワクチンアジュバントとして製剤化されている、項目１６に記載の方法。

［項目２２］

前記組成物が粘膜投与される、項目１６に記載の方法。

［項目２３］

前記組成物が、医薬、食品、飼料、食品添加物、飼料添加物、これらの原料組成物からなる群から選択される形態である、項目１６に記載の方法。

［項目２４］

前記組成物が、抗原とともに投与されることを特徴とする、項目１６に記載の方法。

［項目２５］

前記組成物が、抗原と同時に投与されることを特徴とする、項目１６に記載の方法。

［項目２６］

前記組成物が、抗原の投与とは別に投与されることを特徴とする、項目１６に記載の方法。

［項目２７］

前記組成物が、抗原を含むワクチン組成物である、項目１６に記載の方法。

［項目２８］

前記抗原がウイルス、細菌、真菌、寄生虫抗原である、項目２４～２７に記載の方法。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図１はＢ細胞の一部のみが胚中心に侵入することを示す模式図である。

[図2]図２はＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞はＧＣの外側に位置し、ＧＣに向かって移動していることを示す図である。ａ，ＷＴマウスのＰＰ　Ｂ２２０$^{+}$　Ｂ細胞におけるＩｇＡとＣＤ１１ｂの発現を示す代表的なフローサイトメトリーデータ。ｂ，ｃ，Ｂ２２０とＰＮＡ（ｂ）またはＢ２２０とＦａｓ（ｃ）で染色したＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞におけるＧＣ　Ｂ細胞のフローサイトメトリー。ａ－ｃ，数字は細胞の割合を示す。ｄ，ＰＮＡ、ＣＤ１１ｂ、ＩｇＡ、ＤＡＰＩで染色したＰＰ　断面の顕微鏡写真。ＧＣ（破線の円）の外側に２つのＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$二重陽性細胞（黄矢印）が見られた。ｅ，ＳＥＤ，ＩＦ，ＧＣ領域をＩＣＡＭ－１、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ４（左の写真）、ＭＡｄＣＡＭ－１（右の写真）、ＤＡＰＩで染色した画像。各領域は中央のスキーマに記されている。スケールバー、５００μｍ。ｆ，画像は、ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞（矢印、１から７とマークされている）が示された領域にあることを示している。ＧＣとＩＦ領域は破線で示した。ｇ，ＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞およびＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞を、それぞれＩｇＡ$^{-}$Ｃｒｅ／ＹＣ３．６０^{flox}マウスのＰＰに直接注入した。注入から１時間後、ＩｇＡ$^{-}$Ｃｒｅ／ＹＣ３．６０^{flox}マウスのＰＰに移植されたＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞（上）またはＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞（下）の位置を示す代表画像。ＧＣ境界（破線）は、ＩｇＡ$^{-}$ＹＣ３．６０が濃縮された領域。スケールバー、２００μｍ。ｈ，注入から４０時間後、注入されたＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞を有するＰＰを顕微鏡で観察した。スケールバー、２００μｍ。データは３回の独立した実験の代表である。

[図3]図３は、ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞は、ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞と相互作用するｐｒｅ－ＧＣ　Ｂ細胞であることを示す図である。ａ，マイクロアレイ分

析による、示される遺伝子の発現量の対数倍変化（ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$Ｂ細胞／ＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞）を示すヒートマップ。ｂ，示されたＧＣ特異的遺伝子、非ＧＣ特異的遺伝子および、ｐｒｅ－ＧＣ遺伝子の発現レベルを、ｑＰＣＲで分析し、βアクチン遺伝子の発現レベルに対して正規化した。ＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞の相対的な発現レベルの平均を１とした。各スポットは、技術的な３回繰り返しの平均を示す。棒グラフは、３～４回の独立した測定の平均値（±ＳＤ）を示す。ｃ，ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞およびＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞におけるＣＸＣＲ４およびＣＤ８６の表面マーカーの発現を示すフローサイトメトリーのヒストグラム。ｄ，シングレットＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞とコンジュゲートされたＣＤ４$^{+}$　ＩｇＡ$^{+}$細胞のフローサイトメトリーデータ。ｅ，ＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$およびＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞とコンジュゲートされたＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞のフローサイトメトリーデータ。　ｆ，ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$およびＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞とコンジュゲートされたＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞の割合。棒グラフは、独立した６回の測定の平均値（±ＳＤ）を示す。ｇ，ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞がＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞とコンジュゲートしている様子を撮影したもの。スケールバー、２０μｍ。

[図4-1]図４－１は細菌の抗原はＢ細胞のＣＤ１１ｂ発現を誘導することを示す図である。ａ，ｆ，指示された刺激を３日間与えた脾臓ナイーブＢ細胞のＣＤ１１ｂの発現をフローサイトメトリーで解析したデータ。ｂ，ｇ，各刺激におけるＣＤ１１ｂ$^{+}$　Ｂ細胞の割合。ｃ，ｈ，指示された刺激を与えた後に単離したＢ細胞のｉｔｇａｍをｑＰＣＲで解析したデータ。ｄ，４０ＬＢ細胞上で１日培養した後に単離したＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$およびＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞のフローサイトメトリーデータ。ｅ，Ｐａｍ３ＣＳＫ４によるＣＤ１１ｂ発現は４０ＬＢ細胞上での培養によって失われた。ｉ，指示された阻害剤による各刺激のＣＤ１１ｂ$^{+}$　Ｂ細胞の割合。ｂ，ｃ，ｇ，ｈ，ｉ，棒グラフは、少なくとも３回の独立した測定の平均値（±ＳＤ）を示す。ｂ，ｃ，ｇ，ｈ，データは、一元配置のＡＮＯＶＡとＴｕｋｅｙの多重

比較で分析した。

[図4-2]図４－２は、加熱滅菌したプロテオバクテリア綱の細菌クレブシエラ・ニューモニエ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）とバクテロイデス綱の細菌バクテロイデス・ブルガータス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ　ｖｕｌｇａｔｕｓ）がＢ細胞のＣＤ１１ｂ発現を誘導することを示す図である。

[図5]図５はＣＤ１１ｂ誘導性細菌抗原がＰＰにおける既存のＧＣ反応を増強することを示す図である。ａ，指示された刺激で３日間刺激した脾臓ナイーブＢ細胞のＣＤ１１ｂ発現のフローサイトメトリーデータ。ｂ，各刺激におけるＣＤ１１ｂ$^{+}$　Ｂ細胞の割合。ｃ－ｅ，Ｂａｌｂ／ｃマウスに指示された加熱殺菌した細菌、ｐａｍ３ＣＳＫ４またはＰＢＳ（コントロール）を経口投与した。２日後、各マウスのＰＮＡ^{ｈｉ}Ｂ２２０$^{+}$　ＧＣ　Ｂ細胞のフローサイトメトリーデータ（ｃ）、ＰＮＡ^{ｈｉｇｈ}Ｂ２２０$^{+}$　ＰＰ　ＧＣ　Ｂ細胞の割合（ｄ）および絶対数（ｅ）を算出した。ｆ，示されたｉＧＢ細胞を単離し、標識した後、独立してマウスに静脈内注射した。スケールバー、５００μｍ。ｇ，免疫化のスケジュール。ｈ，免疫化後のＯＶＡ－特異的ＩｇＡ。ｂ，ｄ，ｅ，ｈ，棒グラフは少なくとも３つの独立した測定の平均値（±ＳＤ）を示す。ｄ，ｅ，データは一元配置ＡＮＯＶＡとＴｕｋｅｙの多重比較で分析した。ｈ，データは二元配置ＡＮＯＶＡとＴｕｋｅｙの多重比較で分析した。

[図6]図６はマウスのＰＰにはＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞が存在することを示す図である。ａ，８－１２週齢のＷＴ　Ｂａｌｂ／ｃマウスを用いてフローサイトメトリー解析を行った。ダブレット細胞はＦＳＣ－Ｈ／ＦＳＣ－Ｗゲートで識別した。死細胞はヨウ化プロピジウム（ＰＩ）染色により除外した。Ｂ２２０＋　Ｂ細胞におけるＩｇＡとＣＤ１１ｂの発現を分析した。ＣＤ１１ｂの発現を確認するために、ネガティブコントロールとしてｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ　ｍｉｎｕｓ　ｏｎｅ　（ＦＭＯ）サンプルを用意した。生細胞において、ＧＣ　Ｂ細胞はＰＮＡ^{ｈｉｇｈ}Ｂ２２０$^{+}$細胞を、非ＧＣ　Ｂ細

胞はＰＮＡ^{low}Ｂ２２０$^{+}$細胞を表す。代表的なデータは、少なくとも２０回の実験から得られたものである。ｂ，ソーティングの純度は少なくとも９０％であることが確認された。ｃ，ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞およびＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞におけるＣＤ８６発現およびＣＸＣＲ４発現の代表平均蛍光強度（Ａｖｅｒａｇｅ　ｍｅａｎ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ　ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ）（ＭＦＩ）分析。棒グラフは、ＷＴマウスを用いた独立した５回の測定の平均値（±ＳＤ）を示す。データは、スチューデントの両側ｔ検定で比較した。

[図7]図７はＣＤ１１ｂとＩｇＡの発現を確認する免疫組織化学的共焦点画像を示す図である。選択したＰＰ断面をＤＡＰＩ、ＣＤ１１ｂ、ＩｇＡで染色した。表示部分（破線の四角）を増幅して、ＣＤ１１ｂとＩｇＡの重なりを解析した。また、ＣＤ１１ｂとＩｇＡのシグナルが重なっていることを確認するため、Ｚスタック解析を行った。スケールバー、２０μｍ。

[図8]図８はＩＣＡＭ－１がＨＥＶに発現していることを示す図である。ＰＰの切片を抗ＩＣＡＭ－１、抗ＣＤ４（Ｔ　ｃｅｌｌマーカー）、抗ＣＤ１１ｃ（ＤＣマーカー）、抗ＭＡｄＣＡＭ－１（ＨＥＶマーカー）を用いてそれぞれ染色した。ＳＥＤはＣＤ１１ｃ$^{+}$　ＤＣに富む領域で識別された。ＩＦ領域はＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞が濃縮された領域で識別された。ＭＡｄＣＡＭ－１を発現しているＨＥＶはＩＦ領域に見られた。ＩＣＡＭ－１の発現を解析するために、全体像と増幅した表示領域を示した。

[図9]図９は、ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞とＣＤ４$^{+}$　Ｔのコンジュゲート解析の結果を示す図である。８－１２週齢のＷＴ　Ｂａｌｂ／ｃマウスを用いてフローサイトメトリー解析を行った。死細胞はＰＩ染色により除外した。単一細胞とコンジュゲート細胞はＦＳＣ－Ｈ／ＦＳＣ－Ｗゲートで選択した。単一細胞とコンジュゲート細胞では、ＩｇＡ$^{+}$細胞を用いてＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞とのコンジュゲーションを解析した。単一生細胞およびコンジュゲート生細胞では、Ｂ細胞ゲートはＢ２２０$^{+}$細胞で選択した。Ｂ２２０$^{+}$細胞におけるＩｇＡとＣＤ１１ｂの発現を解析した。コンジュゲートＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ

$^{+}$　Ｂ細胞とＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞において、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞のコンジュゲーションを解析した。単一ＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞およびＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞を、ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞のコンジュゲーションを分析するためのネガティブコントロールとして使用した。データは６回の独立した実験から得られたものである。

[図10]図１０は、ＳＨＭを持つＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞が、新たに生まれた活性化されたメモリーＢ細胞由来であることを示す図である。ａ，ＰＣＲで増幅した再構成されたＶＤＪ領域と下流のイントロン配列のＳＨＭ頻度を解析した。ｂ，２６匹のＷＴマウスのＰＰから単離したＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$とＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$のＢ細胞の再配列ＶＤＪＨ$_{3}$とＪＨ$_{3}$下流のイントロン配列（ＪＨ３－Ｉ）および再配列ＶＤＪＨ$_{4}$とＪＨ４下流のイントロン配列（ＪＨ４－Ｉ）のＳＨＭ頻度を解析した。円グラフのセグメントサイズは、各クローンで観察された変異数を持つ配列の数に比例する。円グラフの中央の数字は、解析したクローンの数を表す。

[図11-1]図１１－１は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ刺激による、Ｂ細胞増殖とＣＤ１１ｂ発現を示す図である。ａ，ソートされた脾臓ナイーブＢ細胞の純度とそのＣＤ１１ｂ発現。ｂ，培養された脾臓ナイーブＢ細胞のリンパ球ゲートと数（右）。代表的なデータは、少なくとも３つの独立した実験から得られたものである。ｃ，　培養した脾臓ナイーブＢ細胞のリンパ球ゲートに、表示された加熱殺菌した細菌刺激を加えたもの。ｄ，培養された脾臓ナイーブＢ細胞のリンパ球ゲートとＣＤ１１ｂ発現。代表的なデータは、３つの独立した実験から得られたものである。

[図11-2]図１１－２は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ刺激による、Ｂ細胞増殖とＣＤ１１ｂ発現を示す図である。ｅ，各刺激の指示濃度で刺激した脾臓Ｂ細胞のＣＤ１１ｂ発現。図４－１と５の実験のために選択した条件を薄いグレーで示した。

[図11-3]図１１－３は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ刺激による、Ｂ細胞増殖とＣＤ１１ｂ発現を示す図である。ｆ，各刺激の指示濃度で刺激した精製脾臓Ｂ細胞

のＣＤ１１ｂ発現。ｇ，示された濃度のＴＬＲ１／２，ＴＬＲ４，ＮＯＤ２阻害剤の存在下でｐａｍ３ＣＳＫ４（１μｇ／ｍｌ）で刺激した脾臓Ｂ細胞のＣＤ１１ｂ発現。図４－１と５の実験のために選択した条件を薄いグレーで示した。

[図12-1]図１２－１は、単離されたＣＤ１１ｂ$^+$　Ｂ細胞は、ｉＧＢ培養システムにおいてＣＤ１１ｂ発現を失ったことを示す図である。ａ，ＣｅｌｌＴｒａｃｅ　Ｖｉｏｌｅｔで標識したＣＤ１１ｂ$^+$ＩｇＡ$^+$およびＣＤ１１ｂ$^-$ＩｇＡ$^+$　ＰＰ　Ｂ細胞を、ＩＬ－２１を用いてｉＧＢ培養システムで培養した。ＣＤ１１ｂの発現は０日目と１日目にフローサイトメトリーで解析した。ｂ，ポジティブコントロールとして、約５０，０００個のナイーブな脾臓Ｂ細胞と、ＣｅｌｌＴｒａｃｅ　Ｖｉｏｌｅｔで標識した５，０００個のソーティングしたＣＤ１１ｂ$^-$ＩｇＡ$^+$　Ｂ細胞を用意した。８００個の単離されたＣＤ１１ｂ$^+$ＩｇＡ$^+$　ＰＰ　Ｂ細胞およびＣＤ１１ｂ$^-$ＩｇＡ$^+$　ＰＰ　Ｂ細胞を、その増殖をモニターするために調製した。代表的なデータは、３つの独立した実験から得られたものである。

[図12-2]図１２－２は、単離されたＣＤ１１ｂ$^+$　Ｂ細胞は、ｉＧＢ培養システムにおいてＣＤ１１ｂ発現を失ったことを示す図である。ｃ，脾臓のナイーブＢ細胞は、ＣＤ１１ｂ$^+$　Ｂ細胞を誘導するために、ｐａｍ３ＣＳＫ４と共に３日間培養された。その後、ｐａｍ３ＣＳＫ４で誘導したＣＤ１１ｂ$^+$　Ｂ細胞とＣＤ１１ｂ$^-$　Ｂ細胞を単離した。約１．５×１０^{5}個の単離したＣＤ１１ｂ$^+$　Ｂ細胞とＣＤ１１ｂ$^-$　Ｂ細胞を、１ｎｇ／ｍｌのＩＬ－４を添加した４０ＬＢ細胞に別々に播種した。コントロールとして、ネガティブにソーティングした脾臓ナイーブＢ細胞を用いた。Ｄ０およびＤ４において、４０ＬＢ細胞に播種したＢ細胞のＣＤ１１ｂ発現を分析した。代表的なデータは、３つの独立した実験から得られたものである。

[図13]図１３は、ＩｇＭ－４０ＬＢまたはＣｐＧ－４０ＬＢで刺激したＢ細胞はマウスへの静脈注射後ＰＰ　ＧＣに入らないことを示す図である。ＣｐＧ－４０ＬＢ細胞（上）とＩｇＭ－４０ＬＢ細胞（下）を含む示されたｉＧ

Ｂ細胞を単離し、ラベル付けした後、独立してマウスに静脈注射した。標識したｉＧＢ細胞とともに、抗ＭＡｄＣＡＭ－１抗体を静脈注射し、ＨＥＶを同定した。抗ＩｇＡ抗体をＰＰに直接注入してＩｇＡ$^{+}$細胞を染色し、ＧＣ（破線の円）を識別した。スケールバー、５００μｍ。

[図14]図１４は、本開示のアジュバント組成物は、血清ＴＮＦαの濃度を全く上昇させなかったことを示す図である。

[図15]図１５は、Ｂ細胞がＤＣやＴ細胞とは無関係に、細菌の抗原を感知して、ｐｒｅ－ＧＣ細胞に自身の細胞運命を決定し得ることを示す模式図である。

発明を実施するための形態

[0012] ｐｒｅ－ＧＣのＢ細胞を同定するために、我々は粘膜免疫関連免疫誘導組織に着目した。粘膜免疫関連免疫誘導組織のＧＣは構成的に活性化しているため、どの時点でも既存のＧＣに入り込んでいるｐｒｅ－ＧＣのＢ細胞を見つけることができるからである[7]。我々は、インテグリンＣＤ１１ｂが、粘膜免疫関連免疫誘導組織におけるｐｒｅ－ＧＣ ＩｇＡ＋ Ｂ細胞のマーカー候補になるのではないかと考えた。１６５ｋＤａのインテグリンαＭであるＣＤ１１ｂは、ＣＤ１８と結合して、マクロファージ－１抗原（Ｍａｃ－１）として知られるヘテロ二量体インテグリンを形成する[12]。ＣＤ１１ｂは骨髄系細胞のマーカーとして広く知られており、細胞の移動や接着に関与していることが知られている[12]。さらに、以前の研究では、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの複雑な機能が示されていた[13, 14]。Ｄｉｎｇらは、ＣＤ１１ｂがＢＣＲシグナルを負に制御し、自己反応性Ｂ細胞の寛容性を維持していることを示した[13]。Ｋｕｎｉｓａｗａらは、ＣＤ１１ｂがマウス腸管粘膜固有層（ＬＰ）におけるＩｇＡ$^{+}$ ＰＣの初期段階のマーカーであり、ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$ ＰＣの産生にはＰＰの構造が必須であることを示した[15]。これらの研究は、粘膜免疫関連免疫誘導組織のＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を調査する動機となった。

[0013] 本開示では、インテグリンＣＤ１１ｂを発現するＩｇＡ$^{+}$ Ｂ細胞の小さな

集団をｐｒｅ－ＧＣ　Ｂ細胞として同定した。この細胞はＧＣの外側に位置し、ｉｒｆ４を高発現していた。このＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞をＩｇＡ$^{-}$Ｃｒｅ／ＹＣ３．６０^{flox}レポーターマウスの粘膜免疫関連免疫誘導組織に注入したところ、注入された細胞は既存のＧＣに直接入らず、ＧＣの周囲に位置し、４０時間後にはＧＣに入ったことから、ネズミの粘膜免疫関連免疫誘導組織においてｐｒｅ－ＧＣ　ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞であることがわかった。さらに、Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍではなく、ｐａｍ３ＣＳＫ４、リポポリサッカライド（ＬＰＳ）、加熱殺菌した大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）（Ｅ．　ｃｏｌｉ）やＳａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｅｎｔｅｒｉｃａ（Ｓ．　ｅｎｔｅｒｉｃａ）を含むいくつかの細菌抗原が、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでナイーブなＢ細胞にＣＤ１１ｂの発現を誘導することを発見した。Ｔ－ＢまたはＤＣ－Ｂとの相互作用の前にＢ細胞にＣＤ１１ｂが発現していると、静脈内に注射したＢ細胞が粘膜免疫関連免疫誘導組織の既存のＧＣに入ることができた。このように、Ｂ細胞は、ＤＣの活性化とは無関係に、自らの細胞運命をコントロールしてｐｒｅ－ＧＣ　Ｂ細胞になるのである。さらに、ｐａｍ３ＣＳＫ４または加熱殺菌した大腸菌をマウスに経口投与すると、２日以内に粘膜免疫関連免疫誘導組織のＧＣに入るＢ細胞の数が増加し、粘膜抗原特異的ＩｇＡ反応が増強された。活性化されたＢ細胞にＣＤ１１ｂを誘導することは、ｐｒｅ－ＧＣ　Ｂ細胞の有望なマーカーであると同時に、効果的な粘膜ワクチンのアジュバントを選択するための有用な基準であると考えられる。

[0014]　（本発明の組成物）

本開示の組成物は、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含み、活性化Ｂ細胞の胚中心移行を誘導する作用を有する。

本開示の組成物は、上記効果を発揮することを期待して、医薬品、食品、飼料の分野等に好適に用いることができる。従って、本開示の組成物は、医薬、食品組成物、食品原料組成物、飼料組成物又は飼料原料組成物とすることができる。

[0015] （Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質）

本開示の組成物で用いるＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質は、本願明細書に示す実施例を参考にすることで、当業者が公知の方法に基づいて取得することができる。例えば、動物から単離したナイーブな脾臓Ｂ細胞と候補物質を培養した後に、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂ$^+$　Ｂ細胞の割合が増加する候補化合物を、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質として用いることができる。

[0016] 一態様において、当該Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質の非限定的な例示は細菌である。一態様において、グラム陰性細菌を用いることが好ましい。一態様において、プロテオバクテリア門またはバクテロイデス門細菌を用いることが好ましい。一態様において、プロテオバクテリア門の細菌として、γプロテオバクテリア綱の細菌を用いることが好ましい。一態様において、エンテロバクター目の細菌を用いることが好ましい。一態様において、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）、サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｅｎｔｅｒｉｃａ）またはクレブシエラ・ニューモニエ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）を用いることがより好ましい。別の態様において、バクテロイデス門の細菌として、バクテロイデス綱の細菌を用いることが好ましい。一態様においてバクテロイデス目の細菌を用いることが好ましい。一態様においてバクテロイデス目の細菌を用いることが好ましい。一態様においてバクテロイデス・ブルガータス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ　ｖｕｌｇａｔｕｓ）を用いることが好ましい。これらプロテオバクテリア門またはバクテロイデス門の細菌として、特定の種の様々な血清型の細菌を用いることができる。

[0017] 一態様において、当該Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質として用いられる細菌は、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）、サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｅｎｔｅｒｉｃａ）、クレブシエラ・ニューモニエ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、バクテロイデス・ブルガータス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ　ｖｕｌｇａｔｕｓ）の代表

的な血清型が有する１６Ｓ　ｒＤＮＡ配列と、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９８％以上、９９％以上または９９．５％以上の塩基配列同一性を有する１６Ｓ　ｒＤＮＡ配列を有する細菌である。

[0018] 一態様において、当該Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質として用いられる細菌は、下記１６Ｓ　ｒＤＮＡ配列と、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９８％以上、９９％以上または９９．５％以上の塩基配列同一性を有する１６Ｓ　ｒＤＮＡ配列を有する細菌である。

大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）１６Ｓ　ｒＤＮＡ配列：ＧｅｎＢａｎｋ　登録番号ＣＰ００３２７８．１（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｎｕｃｃｏｒｅ／ＣＰ０１７１００）の１６Ｓ　ｒｉｂｏｓｏｍａｌ　ＲＮＡをコードするＤＮＡ配列（位置２２５１０７～２２６６６２の塩基からなる配列）。

サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｅｎｔｅｒｉｃａ）１６Ｓ　ｒＤＮＡ配列：ＧｅｎＢａｎｋ　登録番号ＣＰ００３２７８．１（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｎｕｃｃｏｒｅ／ＣＰ００３２７８．１）の１６Ｓ　ｒｉｂｏｓｏｍａｌ　ＲＮＡをコードするＤＮＡ配列（位置２８７４８６～２８９０１５の塩基を含む配列の相補鎖、または位置３３９６２００～３３９７７２９の塩基を含む配列の相補鎖）。

クレブシエラ・ニューモニエ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）１６Ｓ　ｒＤＮＡ配列：ＧｅｎＢａｎｋ　登録番号ＣＰ０１８３０６．１（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｎｕｃｃｏｒｅ／ＣＰ０１８３０６）の１６Ｓ　ｒｉｂｏｓｏｍａｌ　ＲＮＡをコードするＤＮＡ配列（位置５０３５５３～５０５１０６の塩基を含む配列の相補鎖、位置１３１２９０３～１３１４４５６の塩基を含む配列の相補鎖、位置１８１８０２７～１８１９５８０、１９２６８６４～１９２８４１７の塩基を含む配列、位置２０１８７４６～２０２０２９９の塩基を含む配列

、位置２４４４１１７～２４４５６７０の塩基を含む配列、または位置２７９９４２８～２８００９８１の塩基を含む配列）。

バクテロイデス・ブルガータス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ　ｖｕｌｇａｔｕｓ）１６Ｓ　ｒＤＮＡ配列：ＧｅｎＢａｎｋ　登録番号ＡＰ０２５２３２．１（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｎｕｃｃｏｒｅ／ＡＰ０２５２３２）の１６Ｓ　ｒｉｂｏｓｏｍａｌ　ＲＮＡをコードするＤＮＡ配列（位置２９４６９０～２９６２１４の塩基を含む配列の相補鎖、位置６２６６８８～６２８２１２の塩基を含む配列の相補鎖、位置１８７１１７９～１８７２７０３の塩基を含む配列、位置１９５７９４９～１９５９４７３の塩基を含む配列、位置２３７５８４４～２３７７３６８の塩基を含む配列、位置４１８７２４９～４１８８７７３の塩基を含む配列の相補鎖または位置４４９６８９０～４４９８４１４の塩基を含む配列の相補鎖）。

[0019] 本開示の組成物は、活性化Ｂ細胞の胚中心移行を誘導する作用を有する。一態様において、本開示の組成物は、活性化Ｂ細胞の粘膜免疫関連免疫誘導組織の胚中心への移行を誘導する作用を有する。上記粘膜免疫関連免疫誘導組織は特に限定されず、活性化B細胞の親和性成熟をもたらす粘膜免疫関連免疫誘導組織を含む。たとえば、粘膜免疫関連免疫誘導組織は、消化管内（腸内、口腔内等）、鼻腔内などの粘膜免疫関連免疫誘導組織を含む。一態様において、前記粘膜免疫関連免疫誘導組織はパイエル板であり、本開示の組成物は、活性化Ｂ細胞のパイエル板の胚中心への移行を誘導する作用を有する。

[0020] Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質として細菌を用いる場合、加熱滅菌した状態の細菌または生菌を用いることができる。

[0021] 本開示の組成物中において、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質の量は、活性化Ｂ細胞の胚中心移行を誘導する作用を発揮し得る量であれば特に限定されない。例えば、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質は、組成物中に０．００１～９９．９９重量％の範囲になるように配

合される。

[0022] （医薬組成物）

一態様において、本開示のＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物は医薬組成物として提供される。本開示の医薬組成物は、典型的には免疫を賦活化するために使用される。一態様において、本開示の医薬組成物は、IgA産生B細胞の胚中心移行活性化と親和性成熟および高親和性の抗体産生を誘導し、当該粘膜組織または遠位の粘膜組織等において抗原特異的防御を提供するために用いられる。一態様において、本開示の医薬組成物は、IgA産生B細胞の粘膜免疫関連免疫誘導組織の胚中心移行を活性化するために用いられる。前記粘膜免疫関連免疫誘導組織は特に限定されず、活性化B細胞の親和性成熟をもたらす粘膜免疫関連免疫誘導組織を含む。たとえば、粘膜免疫関連免疫誘導組織は、消化管内（腸内、口腔内等）、鼻腔内などの粘膜免疫関連免疫誘導組織を含む。一態様において、前記粘膜免疫関連免疫誘導組織はパイエル板であり、本開示の組成物は、活性化Ｂ細胞のパイエル板の胚中心への移行を誘導するために用いられる。

[0023] 本開示の医薬組成物によって賦活化される免疫が対象とする抗原は、生体内粘膜組織に予め存在しているものであってもよく、また、本開示の医薬組成物とともに、投与されるものであってもよい。一態様において、本開示の医薬組成物は免疫を賦活化するために用いられる。一態様において、本開示の医薬組成物は好ましくは粘膜免疫を賦活化するために用いられ、一態様において消化管内（腸内、口腔内等）または鼻腔内の免疫を賦活化するために用いられる。

[0024] 一態様において、本開示の医薬組成物は、抗原を含まないアジュバント組成物として提供される。一態様において、本開示の医薬組成物は抗原とともに投与される。一態様において、本開示の医薬組成物は抗原と同時に投与される。一態様において、本開示の医薬組成物は抗原と別に投与される。本開示の医薬組成物と抗原を別に投与する場合、それぞれの投与間隔は適宜選択することができ、例えばそれぞれの投与の間を５分、１０分、２０分、３０

分、１時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、２４時間、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日などとすることができるがこれらに限定されない。本開示の医薬組成物と抗原の投与頻度は同一または異なっていてよい。本開示の医薬組成物と抗原を含む組成物の形態は同一または異なっていてもよく、例えば、本開示の医薬組成物と食品形態の抗原を含む組成物を組み合わせてもよい。一態様において、本開示の医薬組成物は、抗原を含むワクチン組成物として提供される。上記抗原は特に限定されないが、例えば、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫抗原が選択される。

[0025] 一態様において、本開示の医薬組成物は、活性化Ｂ細胞の胚中心移行の活性化によって治療される疾患、障害または状態を有する対象を治療するために使用される。一態様において、本開示の組成物は免疫賦活化（例えば、粘膜免疫賦活化、腸内免疫賦活化）を通じて、免疫賦活化を伴う健康維持または増進、粘膜細菌叢（例えば腸内細菌叢）の維持または改善、または、感染抑制（例えば、ウイルス、細菌、真菌もしくは寄生虫の感染抑制）のために使用される。

[0026] したがって、本開示は一態様において、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む、活性化Ｂ細胞の胚中心移行を誘導するための医薬組成物を提供する。

[0027] また、本開示は一態様において、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む、活性化Ｂ細胞の胚中心移行の活性化によって治療される疾患、障害または状態を有する対象を治療するための医薬組成物を提供する。

[0028] また、本開示は一態様において、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む、免疫賦活化のための医薬組成物を提供する。前記粘膜免疫の賦活化は、消化管免疫（例えば、腸内免疫および口腔内免疫）および鼻腔内免疫の賦活化を含むがこれらに限定されない。

[0029] また、本開示は一態様において、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む、粘膜における抗原特異的免疫の賦活化のための医薬組成物

を提供する。前記粘膜は、消化管（例えば、腸管粘膜および口腔内粘膜）および鼻腔内粘膜を含むがこれらに限定されない。

[0030] 一態様において、前記免疫賦活は、免疫賦活化（例えば、粘膜免疫賦活化、腸内免疫賦活化）を伴う健康維持または増進効果、粘膜細菌叢（例えば腸内細菌叢）の維持または改善を伴う健康維持または増進効果、または、感染症の治療（例えば、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症もしくは寄生虫感染症の治療）を含むが、これらに限定されない。

[0031] また、一態様において、前記粘膜において抗原特異的免疫を賦活化する必要のある対象は、免疫賦活化（例えば、粘膜免疫賦活化、腸内免疫賦活化）を必要とする対象、免疫賦活化を伴う健康維持または増進を必要とする対象、粘膜細菌叢（例えば腸内細菌叢）の維持または改善を必要とする対象、粘膜細菌叢を伴う健康維持または増進を必要とする対象、感染症の治療（例えば、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症もしくは寄生虫感染症の治療）を必要とする対象である。

[0032] また、一態様において、本開示はＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む、免疫賦活化を通じて健康維持または増進するための組成物を提供する。

[0033] また、一態様において、本開示はＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む、免疫賦活化を通じて粘膜細菌叢（例えば腸内細菌叢）を維持または改善するための組成物を提供する。

[0034] また、本開示は一態様において、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む、感染症を治療する（例えば、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症もしくは寄生虫感染症を治療する）ための医薬組成物を提供する。

[0035] 本開示において「治療」とは、当技術分野における一般的な意味を有し、何らかの障害または疾病状態を寛解、根絶、治癒する目的で、これらの障害または疾病状態の発生を未然に防止する、あるいはその発生を遅延する（予防）目的で、または、これらの障害または疾病状態の再発の防止あるいは再

発の可能性を低減させる（再発抑制）目的で、本開示の組成物を対象に投与することを意味する。

[0036] 一態様において、本開示の医薬組成物は、粘膜免疫を賦活化するための医薬組成物である。一態様において、本開示の医薬組成物は、粘膜投与されるワクチンアジュバントとして使用される組成物である。一態様において、本開示の医薬組成物は、高親和性粘膜ＩｇＡ抗体の発現を促進するために使用される組成物である。

[0037] 本開示の医薬組成物は、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含んでいればよい。例えば、医薬組成物１００重量％中の本発明に係るＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質の含有割合が０．００１～９９．９９重量％の範囲になるように、対象とする疾患の種類、剤型、投与方法、投与対象、投与対象者の症状の度合い、並びに投与によって発揮される効果の程度等を勘案して、適宜設定することができる。一態様において、医薬組成物１００重量％中の本発明に係るＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質の含有割合は、０．００１～９９．９９重量％、０．０１～９９．９９重量％、０．１～９９．９９重量％、０．２～９９．９９重量％、０．３～９９．９９重量％、０．４～９９．９９重量％、０．５～９９．９９重量％、０．６～９９．９９重量％、０．７～９９．９９重量％、０．８～９９．９９重量％、０．９～９９．９９重量％、１．０～９９．９９重量％、２．０～９９．９９重量％、３．０～９９．９９重量％、４．０～９９．９９重量％、５．０～９９．９９重量％、６．０～９９．９９重量％、７．０～９９．９９重量％、８．０～９９．９９重量％、９．０～９９．９９重量％、１０～９９．９９重量％、２０～９９．９９重量％、３０～９９．９９重量％、４０～９９．９９重量％、５０～９９．９９重量％、６０～９９．９９重量％、７０～９９．９９重量％、８０～９９．９９重量％または９０～９９．９９重量％であってもよい。一態様において、医薬組成物１００重量％中の本発明に係るＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質の含有割合は、０．００１～９０重量％、０．００１～８０重量％、０．０

０１～７０重量%、０．００１～６０重量%、０．００１～５０重量%、０．００１～４０重量%、０．００１～３０重量%、０．００１～２０重量%、０．００１～１０重量%、０．００１～９．０重量%、０．００１～８．０重量%、０．００１～７．０重量%、０．００１～６．０重量%、０．００１～５．０重量%、０．００１～４．０重量%、０．００１～３．０重量%、０．００１～２．０重量%、０．００１～１．０重量%であってもよい。一態様において、医薬組成物１００重量%中の本発明に係るＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質の含有割合は、１．０～８０重量%、５．０～７０重量%、１０～６０重量%、２０～５０重量%、３０～４０重量%が好ましいが、これらに限定されない。

[0038] 本開示において「有効量」とは、本開示にＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質が生体において活性化Ｂ細胞の胚中心移行を誘導し得る量をいう。

[0039] 本開示に係る医薬組成物には、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質と共に、薬学的に許容可能な担体或いは添加物を配合しても良い。薬学的に許容可能な担体或いは添加物とは、任意の担体、希釈剤、賦形剤、懸濁剤、潤滑剤、アジュバント、媒体、送達システム、乳化剤、錠剤分解物質、吸収剤、保存剤、界面活性剤、着色剤、香料、または甘味料を意味し、公知のものを採用すればよい。

[0040] 投与対象は特に限定はされないが、非限定的な例として、例えばヒト、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ハムスター、イヌ、ネコ、イタチ、ウシ、ブタ、ウマ、シカ、イノシシ、ヒツジ、ヤギ等の哺乳類、鶏、アヒル、シチメンチョウ、ウズラなど家禽等の鳥類、ヘビ、カメ等の爬虫類、カエル等の両生類、サケ科魚類、ブリ・スギ類、淡水マス、アユ、シーバス・タイ・オオニベ類、ヒラメ、フグ、ハマチ、カンパチ、クロマグロ、マアジ、シマアジ、トラフグ、ヒラマサ、イシダイ、カワハギ、メバル、カサゴ、クロダイ、クロソイ、スズキ、チダイ、イサキ、メジナ、マサバ、マハタ、クエ、ウナギ、ナマズ、ドジョウ、チョウザメ、熱帯魚類、ティラピア、パンガ

シウス、アオウオ、コクレン、ハクレン、ソウギョ、コイ等の魚類、二枚貝（カキ、ホタテ、アサリ、ムール貝、アコヤガイ）、アワビ、エビ、海藻が挙げられる。

[0041] 本開示の医薬組成物の投与量並びに投与方法は、投与対象となる個体が罹患する疾患の種類、性別、種、年齢、全身状態、疾患の重篤度、所望する効果の程度等に応じて適宜選択される。投与量としては、通常は、０．００１～１００ｍｇ／ｋｇ／日の範囲で適宜設定すればよい。例えば、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質として細菌を用いる場合、細菌量に基づいて、例えば体重２０ｇのマウスであれば、10^6ＣＦＵ／回以上、10^7ＣＦＵ／回以上、10^8ＣＦＵ／回以上、10^9ＣＦＵ／回以上、10^{10}ＣＦＵ／回以上などの範囲で、体重６０ｋｇのヒトであれば、３ｘ10^9ＣＦＵ／回以上、３ｘ10^{10}ＣＦＵ／回以上、３ｘ10^{11}ＣＦＵ／回以上、３ｘ10^{12}ＣＦＵ／回以上、３ｘ10^{13}ＣＦＵ／回以上などの範囲で適宜設定することができるが、これに限定されない。上記１回あたりの投与量において、例えば一日１回～３回投与することができる。一態様において体重６０ｋｇのヒトに使用する場合、３ｘ10^{10}ＣＦＵ／日～３ｘ10^{13}ＣＦＵ／日、３ｘ10^{11}ＣＦＵ／日～３ｘ10^{12}ＣＦＵ／日などの範囲で投与することが好ましいがこれらに限定されない。

[0042] 本開示に係る医薬組成物の投与は、上記の量を１日に１度に投与してもよく、数回に分けて投与してもよい。また、上記疾患に対する治療効果を有する範囲において、投与間隔は、毎日、隔日、毎週、隔週、２～３週毎、毎月、隔月または２～３ヶ月毎でもよい。

[0043] 本開示の医薬組成物の投与方法は特に限定はされないが、消化管などの粘膜組織に直接投与することが好ましく、このような経粘膜投与として、例えば経口投与、経鼻投与、経膣投与、経腸投与等を用いることができる。これら各種器官の粘膜を通じて投与された本開示の組成物は、粘膜免疫関連免疫誘導組織においてＩｇＡ分泌Ｂ細胞の親和性成熟および高親和性のＩｇＡ抗体の産生を誘導し、当該投与された粘膜組織および遠位粘膜組織などの組織

における抗原特異的防御をもたらす。

[0044] ここで、経腸投与とは、肛門を介した投与には限られず、例えば胃瘻等の様に個体外からチューブ等を消化管に挿入して、それを経由した投与も含まれる。消化管を挿入する位置は腸に限らず、食道、胃、小腸（十二指腸、空腸、回腸等を含む。）、大腸（盲腸、結腸、直腸等を含む。）等が挙げられる。また、例えば、本開示の組成物を、公知の成分と共に配合して腸内洗浄液として使用することも可能である。

[0045] 一態様において、本開示の医薬組成物は、その機能を損なわない範囲で他の治療剤、例えば抗原を含むワクチンと組合せて用いることができる。

[0046] 本開示の医薬組成物を複数組み合わせて用いる場合、あるいは、他の治療薬と組み合わせて用いる場合、これらの薬剤は単一の製剤に含まれていてもよく、また、別の製剤に含まれていてもよい。これらが別の製剤によって提供される場合、その製剤の組み合わせを含むキットの形態で提供されてもよく、また、それぞれ、他の製剤と組み合せるための単剤として提供されてもよい。これらの製剤は、同時に投与されてもよく、また、連続的に投与されてもよい。一態様において、本開示の医薬組成物は、最終的に提供される医薬成物の原材料組成物の態様で提供される。

[0047]（食品組成物）

一態様において、本開示のＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物は食品組成物として提供される。食品組成物は、本開示の免疫賦活化組成物を食品の分野に専ら好適に用いる組成物である。

[0048] 本開示の食品組成物の形態は特に制限されず、例えば、サプリメント、固形食品、流動食品、飲料などの飲食品として提供することができる。本開示の食品組成物は、特定保健用食品などの特別用途食品や機能性表示食品、栄養機能食品として提供することができる。本開示の食品組成物は保健機能食品、病者用食品、乳製品、発酵乳、調製粉乳、乳酸菌飲料、酸性飲料、ヨーグルト、チーズ、パン、ビスケット、クラッカー、ピッツァクラスト、調製粉乳、流動食、病者用食品、栄養食品、冷凍食品、食品組成物、加工食品、

その他の市販食品などとして提供することができる。

[0049] 本開示の食品組成物は、一般の食品の他、条件付き特定保健用食品を含む特定保健用食品、栄養補助食品、機能性食品、病者用食品等を包含する。一態様において、本開示の食品組成物は、例えば免疫賦活用、粘膜免疫賦活用、腸内免疫賦活用、健康維持または増進用、粘膜細菌叢の維持または改善用、腸内細菌叢の維持または改善用、ウイルス感染症対策用、細菌感染症対策用、真菌感染症対策用、またはこれらに類する表示を付した食品組成物、あるいはこれらの用途に用いるための食品組成物として提供することができる。

[0050] 一態様において、本開示の食品組成物は抗原とともに投与される。一態様において、本開示の食品組成物は抗原と同時に投与される。一態様において、本開示の食品組成物は抗原と別に投与される。本開示の食品組成物と抗原を別に投与する場合、それぞれの投与間隔は適宜選択することができ、例えばそれぞれの投与の間を５分、１０分、２０分、３０分、１時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、２４時間、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日などとすることができるがこれらに限定されない。本開示の食品組成物と抗原の投与頻度は同一または異なっていてよい。本開示の食品組成物と抗原を含む組成物の形態は同一または異なっていてもよく、例えば、本開示の食品組成物と抗原を含む医薬品組成物を組み合わせてもよい。一態様において、本開示の食品組成物は、抗原を含む組成物として提供される。上記抗原は特に限定されないが、例えば、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫抗原が選択される。

[0051] 本開示の食品組成物の具体的な形態は特に限定はされないが、例えば、清涼飲料、炭酸飲料、栄養飲料、果実飲料、乳酸飲料、乳飲料等の飲料；アイスクリーム、アイスシャーベット、かき氷等の冷菓；飴、キャンディー、ガム、チョコレート、錠菓、スナック菓子、ビスケット、ゼリー、ジャム、クリーム、焼き菓子等の菓子類；そば、うどん、はるさめ、中華麺、即席麺等

の麺類；かまぼこ、ハム、ソーセージ等の水産・畜産加工食品；加工乳、発酵乳等の乳製品；サラダ油、てんぷら油、マーガリン、マヨネーズ、ショートニング、ホイップクリーム、ドレッシング等の油脂及び油脂加工食品；ソース、たれ等の調味料；スープ、シチュー、サラダ、惣菜、ふりかけ、漬物、パン、シリアル等を例示できる。また、特定保健用食品、栄養補助食品、機能性食品等の場合であれば、例えば粉末、顆粒、カプセル、トローチ、タブレット、シロップ等の形態として提供することができる。

[0052] 一態様において、本開示の組成物は食品素材として提供される。本開示の食品素材の形状には特に制限されず、例えば液状、ペースト状、粉末、固形状等、使用される食品の種類に応じて適宜設定される。本開示の食品素材は、さらに必要に応じて、破砕、粉砕、整粒等の処理により、所望の形状に成形されてもよい。

[0053] 本開示の食品組成物は、本開示に係るＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含んでいればよい。例えば、組成物１００重量％中の本発明に係る抗体の含有割合が０．００１～９９．９９重量％の範囲になるように、発揮される効果の程度等を勘案して、適宜設定することができる。一態様において、食品組成物１００重量％中の本発明に係るＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質の含有割合は、０．００１～９９．９９重量％、０．０１～９９．９９重量％、０．１～９９．９９重量％、０．２～９９．９９重量％、０．３～９９．９９重量％、０．４～９９．９９重量％、０．５～９９．９９重量％、０．６～９９．９９重量％、０．７～９９．９９重量％、０．８～９９．９９重量％、０．９～９９．９９重量％、１．０～９９．９９重量％、２．０～９９．９９重量％、３．０～９９．９９重量％、４．０～９９．９９重量％、５．０～９９．９９重量％、６．０～９９．９９重量％、７．０～９９．９９重量％、８．０～９９．９９重量％、９．０～９９．９９重量％、１０～９９．９９重量％、２０～９９．９９重量％、３０～９９．９９重量％、４０～９９．９９重量％、５０～９９．９９重量％、６０～９９．９９重量％、７０～９９．９９重量％、８０～９９．９９

重量％または９０～９９．９９重量％であってもよい。一態様において、食品組成物１００重量％中の本発明に係るＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質の含有割合は、０．００１～９０重量％、０．００１～８０重量％、０．００１～７０重量％、０．００１～６０重量％、０．００１～５０重量％、０．００１～４０重量％、０．００１～３０重量％、０．００１～２０重量％、０．００１～１０重量％、０．００１～９．０重量％、０．００１～８．０重量％、０．００１～７．０重量％、０．００１～６．０重量％、０．００１～５．０重量％、０．００１～４．０重量％、０．００１～３．０重量％、０．００１～２．０重量％、０．００１～１．０重量％であってもよい。一態様において、食品組成物１００重量％中の本発明に係るＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質の含有割合は、１．０～８０重量％、５．０～７０重量％、１０～６０重量％、２０～５０重量％、３０～４０重量％が好ましいが、これらに限定されない。

[0054] 一態様において、本開示の組成物は上記食品を摂取する際に加える食品添加物あるいは、上記食品または食品添加物を製造するための原料組成物として提供される。

[0055] （飼料組成物）

一態様において、本開示のＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物は飼料組成物として提供される。飼料組成物は、本開示の飼料組成物を飼料の分野に専ら用いられる組成物である。

[0056] 上述の飼料組成物の具体的な形態は特に限定はされないが、例えば上述した本開示に係る飼料組成物が発揮する効果が損なわれない限りにおいて、通常の飼料に混合、又は必要に応じて通常の飼料に配合可能な成分と共に混合して飼料組成物とすればよく、飼料組成物そのものを飼料としてもよい。

[0057] 本開示の飼料組成物は、例えば免疫賦活用、粘膜免疫賦活用、腸内免疫賦活用、粘膜細菌叢の維持または改善用、腸内細菌叢の維持または改善用、健康維持または増進用、腸内細菌叢の維持または改善用、ウイルス感染症対策用、細菌感染症対策用、真菌感染症対策用、またはこれらに類する表示を付

した飼料組成物、あるいはこれらの用途に用いるための飼料組成物として提供することができる。

[0058] 一態様において、本開示の飼料組成物は抗原とともに投与される。一態様において、本開示の飼料組成物は抗原と同時に投与される。一態様において、本開示の飼料組成物は抗原と別に投与される。本開示の飼料組成物と抗原を別に投与する場合、それぞれの投与間隔は適宜選択することができ、例えばそれぞれの投与の間を５分、１０分、２０分、３０分、１時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、２４時間、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日などとすることができるがこれらに限定されない。本開示の飼料組成物と抗原の投与頻度は同一または異なっていてよい。本開示の飼料組成物と抗原を含む組成物の形態は同一または異なっていてもよく、例えば、本開示の飼料組成物と抗原を含む医薬品組成物を組み合わせてもよい。一態様において、本開示の飼料組成物は、抗原を含む組成物として提供される。上記抗原は特に限定されないが、例えば、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫抗原が選択される。

[0059] 本開示の飼料組成物は、本開示に係るＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含んでいればよい。例えば、組成物１００重量％中の本発明に係る抗体の含有割合が０．００１～９９．９９重量％の範囲になるように、発揮される効果の程度等を勘案して、適宜設定することができる。一態様において、飼料組成物１００重量％中の本発明に係るＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質の含有割合は、０．００１～９９．９９重量％、０．０１～９９．９９重量％、０．１～９９．９９重量％、０．２～９９．９９重量％、０．３～９９．９９重量％、０．４～９９．９９重量％、０．５～９９．９９重量％、０．６～９９．９９重量％、０．７～９９．９９重量％、０．８～９９．９９重量％、０．９～９９．９９重量％、１．０～９９．９９重量％、２．０～９９．９９重量％、３．０～９９．９９重量％、４．０～９９．９９重量％、５．０～９９．９９重量％、６．０～９９．９

９重量％、７．０～９９．９９重量％、８．０～９９．９９重量％、９．０～９９．９９重量％、１０～９９．９９重量％、２０～９９．９９重量％、３０～９９．９９重量％、４０～９９．９９重量％、５０～９９．９９重量％、６０～９９．９９重量％、７０～９９．９９重量％、８０～９９．９９重量％または９０～９９．９９重量％であってもよい。一態様において、飼料組成物１００重量％中の本発明に係るＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質の含有割合は、０．００１～９０重量％、０．００１～８０重量％、０．００１～７０重量％、０．００１～６０重量％、０．００１～５０重量％、０．００１～４０重量％、０．００１～３０重量％、０．００１～２０重量％、０．００１～１０重量％、０．００１～９．０重量％、０．００１～８．０重量％、０．００１～７．０重量％、０．００１～６．０重量％、０．００１～５．０重量％、０．００１～４．０重量％、０．００１～３．０重量％、０．００１～２．０重量％、０．００１～１．０重量％であってもよい。一態様において、飼料組成物１００重量％中の本発明に係るＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質の含有割合は、１．０～８０重量％、５．０～７０重量％、１０～６０重量％、２０～５０重量％、３０～４０重量％が好ましいがこれらに限定されない。

[0060] 一態様において、本開示の組成物は上記飼料を摂取する際に加える飼料添加物あるいは、上記飼料または飼料添加物を製造するための原料組成物として提供される。

[0061] 本開示の食品組成物または飼料組成物の投与対象は特に限定はされないが、非限定的な例として、例えばヒト、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ハムスター、イヌ、ネコ、イタチ、ウシ、ブタ、ウマ、シカ、イノシシ、ヒツジ、ヤギ等の哺乳類、鶏、アヒル、シチメンチョウ、ウズラなど家禽等の鳥類、ヘビ、カメ等の爬虫類、カエル等の両生類、サケ、科魚類、ブリ・スギ類、淡水マス、アユ、シーバス・タイ・オオニベ類、ヒラメ、フグ、ハマチ、カンパチ、クロマグロ、マアジ、シマアジ、トラフグ、ヒラマサ、イシダイ、カワハギ、メバル、カサゴ、クロダイ、クロソイ、スズキ、チダイ

、イサキ、メジナ、マサバ、マハタ、クエ、ウナギ、ナマズ、ドジョウ、チョウザメ、熱帯魚類、ティラピア、パンガシウス、アオウオ、コクレン、ハクレン、ソウギョ、コイ等の魚類、二枚貝（カキ、ホタテ、アサリ、ムール貝、アコヤガイ）、アワビ、エビ、海藻が挙げられる。

[0062]（治療または健康維持・増進方法）

一態様において、本開示はＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質、これを含む医薬組成物、食品組成物または飼料組成物を用いた治療方法または健康維持もしくは増進方法を含む。本開示における治療または健康維持もしくは増進方法は、本開示のＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質、または上記本開示の「組成物」「医薬組成物」、「食品組成物」または「飼料組成物」を対象に投与することを含む。具体的な予防または治療の対象となる障害または疾患、投与対象、投与方法、投与量等についても上記「組成物」「医薬組成物」、「食品組成物」、または「飼料組成物」にて説明したものとすればよい。また、本開示の方法によって得られる健康維持もしくは増進効果は、活性化Ｂ細胞の胚中心移行に起因するものであれば特に限定されない。

[0063] 一態様において、本開示は活性化Ｂ細胞の胚中心移行の活性化を必要とする対象において活性化Ｂ細胞の胚中心移行をするための方法であって、当該対象にＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物を投与することを含む方法を提供する。

[0064] また、一態様において、本開示は活性化Ｂ細胞の胚中心移行の活性化によって治療される疾患、障害または状態を有する対象を治療するための方法であって、当該対象にＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物を投与することを含む方法を提供する。

[0065] また、一態様において、本開示は免疫賦活を必要とする対象において免疫賦活するための方法であって、当該対象にＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物を投与することを含む方法を提供する。

[0066] また、一態様において、前記免疫賦活は好ましくは粘膜免疫の賦活化であ

る。したがって、本開示は対象において粘膜免疫を賦活化するための方法であって、当該対象にＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物を投与することを含む方法を提供する。前記粘膜免疫の賦活化は、消化管免疫（例えば、腸内免疫および口腔内免疫）および鼻腔内免疫の賦活化を含むがこれらに限定されない。

[0067] また、一態様において、前記免疫賦活は粘膜における抗原特異的免疫の賦活化である。したがって、本開示は粘膜における抗原特異的免疫の賦活化を必要とする対象において、粘膜における抗原特異的免疫の賦活化をするための方法であって、当該対象にＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物を投与することを含む方法を提供する。前記粘膜は、消化管（例えば、腸管粘膜および口腔内粘膜）および鼻腔内粘膜を含むがこれらに限定されない。

[0068] 一態様において、前記免疫賦活は、免疫賦活化（例えば、粘膜免疫賦活化、腸内免疫賦活化）を伴う健康維持または増進効果、粘膜細菌叢（例えば腸内細菌叢）の維持または改善を伴う健康維持または増進効果、または、感染症の治療（例えば、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症もしくは寄生虫感染症の治療）を含むが、これらに限定されない。

[0069] また、一態様において、前記粘膜において抗原特異的免疫を賦活化する必要のある対象は、免疫賦活化（例えば、粘膜免疫賦活化、腸内免疫賦活化）を必要とする対象、免疫賦活化を伴う健康維持または増進を必要とする対象、粘膜細菌叢（例えば腸内細菌叢）の維持または改善を必要とする対象、粘膜細菌叢を伴う健康維持または増進を必要とする対象、感染症の治療（例えば、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症もしくは寄生虫感染症の治療）を必要とする対象である。

[0070] したがって、一態様において、本開示は免疫賦活化（例えば、粘膜免疫賦活化、腸内免疫賦活化）を必要とする対象において、免疫を賦活化する方法であって、当該対象にＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物を投与することを含む方法を提供する。

[0071] また、一態様において、本開示は健康維持または増進を必要とする対象において、免疫賦活化を通じて健康増進を維持または増進する方法であって、当該対象にＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物を投与することを含む方法を提供する。

[0072] また、一態様において、本開示は粘膜細菌叢（例えば腸内細菌叢）の維持または改善を必要とする対象において、免疫賦活化を通じて粘膜細菌叢を維持または改善する方法であって、当該対象にＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物を投与することを含む方法を提供する。

[0073] また、一態様において、本開示は感染症の治療（例えば、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症もしくは寄生虫感染症の治療）を必要とする対象において、感染症を治療する方法であって、当該対象にＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物を投与することを含む方法を提供する。

[0074] 一態様において、本開示の治療または健康維持もしくは増進方法は、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物を準備し、治療または健康維持もしくは増進を必要とするまたは要望する対象に、当該組成物を投与することを含む、組活性化Ｂ細胞の胚中心移行を誘導する方法を包含する。

[0075] 一態様において、本開示の治療または健康維持もしくは増進方法は、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物を準備し、治療または健康維持もしくは増進を必要とするまたは要望する対象に、当該組成物を投与することを含む、免疫を賦活化する方法を包含する。一態様において、当該免疫賦活化は、好ましくは粘膜免疫の賦活化であり、腸内免疫の賦活化を含む。

[0076] 一態様において、本開示の治療または健康維持もしくは増進方法は、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物を準備し、治療または健康維持もしくは増進を必要とするまたは要望する対象に、当該組成物を投与することを含む、粘膜細菌叢を維持または改善する方法を包含する。

一態様において、当該粘膜細菌叢を維持または改善する方法は、好ましくは腸内細菌叢を維持または改善する方法である。

[0077] 一態様において、本開示の治療または健康維持もしくは増進方法は、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物を準備し、治療または健康維持もしくは増進を必要とするまたは要望する対象に、当該組成物を投与することを含む、高親和性ＩｇＡ抗体発現を促進する方法を包含する。

[0078] 一態様において、本開示の治療または健康維持もしくは増進方法は、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物を準備し、治療または健康維持もしくは増進を必要とするまたは要望する対象に、当該組成物を投与することを含む、ワクチンアジュバント活性を得る方法を包含する。

[0079] 本開示の治療または健康維持もしくは増進方法において用いる、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質としては、上記（Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質）に記載した任意の物質を使用することができる。

[0080] 本開示の治療または健康維持もしくは増進方法において用いる、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物は、当業者に公知の方法で準備することができる。Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を賦形剤、担体等とともに混合して準備することができる他、あらかじめＢ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質が賦形剤、担体等と混合された組成物を入手することで準備することができる。

実施例

[0081] 以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、これらは例示に過ぎず本開示を限定するものではない。

[0082] 方法

マウス動物

Ｂａｌｂ／ｃマウス（８－１２週齢）は，日本ＣＬＥＡから入手した。マウスは，東京大学定量生物学研究所（ＩＱＢ）の動物実験施設において，特

定の病原体を含まない条件で飼育された。すべての実験は，東京大学ＩＱＢの動物実験委員会のガイドラインに従って行われた。Ｂ細胞の移入実験には，東京医科歯科大学の安達貴弘博士から提供されたＩｇＡ－Ｃｒｅ／ＹＣ３．６０^{flox}マウス（８～１２週齢）を使用した。ＩｇＡ－Ｃｒｅマウスは、Ｃｒｉｓ　Ａｌｌｅｎの引用文献３８に基づいて設計された。ＹＣ３．６０^{flox}マウス[39,40]との交配後、ＩｇＡ$^{+}$細胞はＹＣ３．６０$^{+}$細胞として同定される。

[0083] フローサイトメトリー解析とセルソーティング

パイエル板（ＰＰ）をＢａｌｂ／ｃマウスの小腸から丁寧に摘出した。ＰＰから調製した単細胞懸濁液を以下の抗体の組み合わせでインキュベートした。Ｐｈｙａｃｏｅｒｙｔｈｒｉｎ－Ｃｙ７　（ＰＥ－ｃｙ７）　抗ｍｏｕｓｅ／ｈｕｍａｎ　Ｂ２２０　（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　ｍＡｂ　ＲＡ３－６Ｂ２），　ＰＥ　抗ｍｏｕｓｅ／ｈｕｍａｎ　Ｂ２２０　（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ　ｍＡｂ　ＲＡ３－６Ｂ２），　ＦＩＴＣ　抗ｍｏｕｓｅ／ｈｕｍａｎ　Ｂ２２０　（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ　ｍＡｂ　ＲＡ３－６Ｂ２），ＰＥ抗マウスＩｇＡ（α鎖特異的）（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ社）、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（ＡＦ）６４７抗マウスＩｇＡ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ社）、ＦＩＴＣ抗マウスＣＤ１１ｂ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ　ｍＡｂ　Ｍ１／７０）、ＰＥ抗マウスＣＤ１１ｂ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ　ｍＡｂ　Ｍ１／７０）。ＰＥ－ｃｙ７抗マウスＣＤ１１ｂ（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　ｍＡｂ　Ｍ１／７０）、ビオチン化ＰＮＡ（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）、ＡＰＣ－Ｒ７００ハムスター抗マウスＣＤ９５（Ｆａｓ）（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　ｍＡｂ　Ｊｏ２）。ＡＦ４８８抗マウスＣＤ８６（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ　ｍＡｂ　ＧＬ－１）、ＡＰＣ抗マウスＣＤ１８４（ＣＸＣＲ４）（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ　ｍＡｂ　Ｌ２３６Ｆ１２）、ＰＥ抗マウスＩｇＭ（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　ｍＡｂ　ｅＢ１２１－１５Ｆ９）、ＡＦ６４７抗マウスＣＤ４（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ　ｍＡｂ　ＧＫ１．５）、ストレプトアビジンＰＥ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ社）、ス

トレプトアビジンＡＰＣ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ社）、ストレプトアビジンＡＦ４８８（Ｌｉｆｅｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）。単一細胞の選択にはＦＳＣ－Ｈ／ＦＳＣ－Ｗゲートを用いた。死んだ細胞を除外するために、Ｐｒｏｐｉｄｉｕｍ ｉｏｄｉｄｅ （ＰＩ） （Ｎａｃａｌａｉ） を使用した。フローサイトメトリー分析はＳｐｅｃｔｒａｌ Ｃｅｌｌ Ａｎａｌｙｚｅｒ ＳＡ３８００（ＳＯＮＹ）で行った。セルソーティングはＣｅｌｌ Ｓｏｒｔｅｒ ＳＨ８００ （ＳＯＮＹ）で行った。

[0084] 免疫組織化学的分析

分離したパイエル板をＯｐｔｉｍｕｍ Ｃｕｔｔｉｎｇ Ｔｅｍｐｅｒａｔｕｒｅ （ＯＣＴ）コンパウンド（サクラファインテクノ）で瞬時凍結し，－８０℃で保存した。厚さ６μｍのＰＰ切片を作製し，一晩乾燥させた。翌日、ＰＰ切片をアセトン（ナカライ）で、－２０℃で１０分間固定した。リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で５回洗浄した後、ＰＰ切片をブロッキングバッファー（ＰＢＳ／５％ＦＣＳ（ＮＩＣＨＩＲＥＩ ＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥＳ ＩＮＣ．））で３０分間インキュベートした。その後、ＰＰ切片を、以下の抗体の組み合わせで、暗箱の中で、ＲＴで３０分以上インキュベートした。ＡＦ４８８抗マウス／ヒトＣＤ１１ｂ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ ｍＡｂ Ｍ１／７０）、ＰＥ抗マウス／ヒトＣＤ１１ｂ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ ｍＡｂ Ｍ１／７０）、ＡＦ４８８抗マウスＣＤ４（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ ｍＡｂ ＧＫ１．５）、ＡＦ６４７抗マウスＣＤ４（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ ｍＡｂ ＧＫ１．５）、ＤＡＰＩ溶液（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＡＦ４８８抗マウスＣＤ５４（ＩＣＡＭ－１）（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ ｍＡｂ ＹＮ１／１．７．４）、ＡＦ６４７抗マウスＣＤ５４（ＩＣＡＭ－１ ｍＡｂ ＹＮ１／１．７．４）（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ社）、ビオチン抗マウスＣＤ１１ｃ（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社 ｍＡｂ Ｎ４１８）、ＡＦ４８８抗マウスＭＡｄＣＡＭ－１（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ社 ｍＡｂ ＭＥＣＡ－３６７）、ＰＥ抗マウスＭＡｄＣＡＭ－１（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ社 ｍＡｂ ＭＥＣＡ－３６７）。ビオチン化したＰＮＡ、ＡＦ６４７抗マウスＩｇＡ（

α鎖特異的）（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ社）、ＰＥ抗マウスＩｇＡ（α鎖特異的）（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ社）、ストレプトアビジンＡＦ４８８（Ｌｉｆｅｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）。顕微鏡ＬＳＭ８８０（Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ）で観察した。画像はＺＥＮ２００９（Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ）のソフトウエアで解析した。

[0085] マイクロアレイ解析

２５，０００個のＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$ Ｂ細胞と１００，０００個のＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$ Ｂ細胞から、ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ　ＲＮＡ　ＸＳ（Ｔａｋａｒａ）を用いてＲＮＡを抽出した。ＳｕｒｅＰｒｉｎｔ　Ｇ３　Ｍｏｕｓｅ　ＧＥ　ｖ２　８ｘ６０Ｋ　Ｍｉｃｒｏａｒｒａｙ　Ｃｈｉｐ（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ）を用いてマイクロアレイ解析を行い、遺伝子の発現を検出した。

[0086] ＲＮＡの精製とリアルタイムＰＣＲ

約１×１０^{4}個のＰＰ　ＧＣ　Ｂ細胞（ＰＮＡ^{hi}Ｂ２２０$^{+}$細胞）と約１×１０^{4}個の非ＧＣ　ＰＰ　Ｂ細胞（ＰＮＡ^{lo}Ｂ２２０$^{+}$）をそれぞれソーティングした。単離した細胞からＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ　ＲＮＡ　ＸＳ（Ｔａｋａｒａ）を用いてＲＮＡを抽出し、ＧｏＳｃｒｉｐｔ（登録商標）　Ｒｅｖｅｒｓｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔａｓｅ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いてｃＤＮＡを合成した。ＫＡＰＡ　ＳＹＢＲ（登録商標）　ＦＡＳＴ　ｑＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（２Ｘ）Ｋｉｔ　（ＫＡＰＡ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて，３８４ウェル光学式ＰＣＲプレート（Ｒｏｃｈｅ）上で　ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ　４８０　（Ｒｏｃｈｅ）　を用いてリアルタイムＰＣＲを３重に行った。遺伝子の発現量は，ハウスキーピング遺伝子β－ａｃｔｉｎの発現量で正規化した。解析には以下のプライマーを使用した。

β－ａｃｔｉｎ　ｆｗ：５’－ＣＣＡＡＣＣＧＴＧＡＡＡＡＧＡＴＧＡＣＣ－３’，

β－ａｃｔｉｎ　ｒｖ：５’－ＣＣＡＧＡＧＧＣＡＴＡＣＡＧＧＧＡＣＡＧ－３’，

itgam (CD11b) fw:5'-CAGATCAACAATGTGACCGTATGGG-3'、

itgam (CD11b) rv:5'-CATCATCATGTCCTTGTACTGCCGCTTG-3'、

aicda (AID) fw:5'-CCTACGCTACATCTCAGACT-3'、

AICDA (AID) rv:5'-CTTTGAAGGTCATGATCCCG-3'、

BCL6 (BCL6) fw:5'-TCCTCACGGTGCCTTTTTACA-3'、

bcl6 (BCL6) rv:5'-TAACGACAAGCATGACGCAG-3'、

irf4 (IRF4) fw:5'-AGGTCTGCTGAAGCCTTGGC-3'、

irf4 (IRF4) rv:5'-CTTCAGGGCTCGTCGTGGTC-3'、

s1pr2 (S1PR2) fw:5'-GTGACGGGACGCAGAGGT-3'、

s1pr2 (S1PR2) rv:5'-AAATGTCGGTGATGTAGGCATG-3'、

bcl2 (BCL2) fw:5'-TGAGTACCTGAACCGGCATCT-3',

bcl2 (BCL2) rv:5'-GCATCCCAGCCTCCGTTAT-3',

gpr183 (EBI2) fw:5'-GACATCCTGTTTACCACAGCT-3',

gpr183 (EBI2) rv:5'-AGACCAGAATCCAGACGGACA-3'

[0087] Ｉｎ ｖｉｖｏ イメージング

移動のイメージングのために、ＩｇＡ－Ｃｒｅ／ＹＣ３．６０^{flox}マウス（８－１２週齢）を、参考文献４１に記述されているように３種類の麻酔薬の混合物で麻酔した。慎重に腹壁を切開し、小腸を露出させた。ＰＰは肉眼で識別した。約８，０００個の単離したＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$ ＰＰ Ｂ細胞と約３０，０００個のＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$ ＰＰ Ｂ細胞をＣｅｌｌＴｒａｃｋｅｒ Ｏｒａｎｇｅ ＣＭＴＭＲ蛍光色素（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）で標識した後、２５μＬシリンジ（Ｔｒａｊａｎ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ａｎｄ Ｍｅｄｉｃａｌ社）を用いてＩｇＡ－Ｃｒｅ／ＹＣ３．６０^{flox}トランスジェニックマウスのＰＰに直接注入した。細胞を移植したＰＰをＬＳＭ８８０顕微鏡（Ｃａｒｌ Ｚｅｉｓｓ社）で観察した。画像はＺＥＮ２００９ソフトウェア（Ｃａｒｌ Ｚｅｉｓｓ社）で解析した。顕微鏡でＰＰを１時間観察した後、腹部の切開部をＥＬＰスキンステープラー（株式会社アキヤマ）で慎重に閉鎖した。移植から４０時間後、麻酔下で、移植された細胞を含むＰＰを再度、ＬＳＭ８８０顕微鏡（Ｃａｒｌ Ｚｅｉｓｓ）で観察し、移植されたＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$ ＰＰ Ｂ細胞の局在を確認し、ＺＥＮ２００９ソフトウェア（Ｃａｒｌ Ｚｅｉｓｓ）で解析した。

[0088] コンジュゲーション分析

ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$ ＰＰ Ｂ細胞とＣＤ４$^{+}$ ＰＰ Ｔ細胞の間のコンジュゲートは、Ｃｅｌｌ Ｓｏｒｔｅｒ ＳＨ８００ （ＳＯＮＹ）を用いたフローサイトメトリーで解析した。一重項細胞はＦＳＣＨ／ＦＳＣ－Ｗゲートで選択した。一重項細胞はＦＳＣＨ／ＦＳＣ－Ｗゲートで選択し、コンジュゲート細胞は一重項細胞ゲートの判別で負に選択した。イメージングでは、ＰＰコンジュゲートのＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$ＣＤ４$^{+}$からコンジュゲート細胞を単離し、顕微鏡ＬＳＭ８８０（Ｃａｒｌ Ｚｅｉｓｓ）とＺＥＮ２００９（Ｃａｒｌ Ｚｅｉｓｓ）の解析ソフトで観察した。

[0089] ｉＧＢ培養システムでＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$ ＰＰ Ｂ細胞の単離

約８００個のソーティングされたＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$ ＰＰ Ｂ細胞と８

００個のソーティングされたＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞をＣｅｌｌ Ｔｒａｃｅ　Ｖｉｏｌｅｔ　Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）で染色した。単離されたＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞の数が非常に少なかったため、５，０００個のＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞および５×１０^{4}個のナイーブ脾臓Ｂ細胞（Ｂ　ｃｅｌｌ　ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　ｋｉｔ　（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）によりネガティブに単離された）をポジティブコントロールとして用意した。細胞増殖をモニターするために、ソートされたＣＤ１１ｂ$^{-}$　ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞、ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞およびナイーブ脾臓Ｂ細胞を、成長を阻害するためにマイトマイシンＣで前処理された４０ＬＢ細胞の存在下で、６ウェル組織培養皿に播種した。細胞はＲＰＭＩ－１６４０培地（和光）（１０％ＦＣＳ、５．５×１０$^{-5}$Ｍ　２－メルカプトエタノール（ＭＥ）（ナカライ）、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ナカライ）を含む）を用いて、３７℃、５％ＣＯ２で３日間培養した。単離したＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞とＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞をｒＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ；ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ社）で培養し、ナイーブ脾臓Ｂ細胞をｒＩＬ－４（１ｎｇ／ｍｌ；Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ社）で培養した。ｉＧＢ培養システムを用いて、０日目から３日目までＣｅｌｌＴｒａｃｅ　Ｖｉｏｌｅｔを検出するためにフローサイトメトリー解析を行った。培養細胞のＣＤ１１ｂ発現は、Ｃｅｌｌ　Ｓｏｒｔｅｒ　ＳＨ８００　（ＳＯＮＹ）とＳｐｅｃｔｒａｌ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　ＳＡ３８００　（ＳＯＮＹ）を用いて、０日目と１日目にフローサイトメトリーで解析した。

[0090]　ｉＧＢ培養システム上のＰａｍ３ＣＳＫ４刺激脾臓ＣＤ１１ｂ$^{+}$Ｂ細胞

ｉＧＢ培養システムでの脾臓ＣＤ１１ｂ$^{+}$　Ｂ細胞の培養は、脾臓ナイーブＢ細胞をｐａｍ３ＣＳＫ４（Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ社）で３日間培養し、ＣＤ１１ｂの発現を誘導した。その後、フローサイトメトリーで１．５×１０^{5}個のＣＤ１１ｂ$^{+}$脾臓Ｂ細胞と１．５×１０^{5}個のＣＤ１１ｂ－脾臓Ｂ細胞を単離し、ＣｅｌｌＴｒａｃｅ　Ｖｉｏｌｅｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で染色

した後、４０ＬＢシステムでＩＬ－４（１ｎｇ／ｍｌ；　Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）を用いて４日間培養した。その後、Ｃｅｌｌ　Ｓｏｒｔｅｒ　ＳＨ８００　（ＳＯＮＹ）とＳｐｅｃｔｒａｌ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　ＳＡ３８００　（ＳＯＮＹ）を用いてフローサイトメトリーによりＣＤ１１ｂの発現を解析した。

[0091] Ｂ細胞を刺激するための菌の準備

Ｅ．ｃｏｌｉ（ＤＨ５α）とＳ．ｅｎｔｅｒｉｃａを、グリセロールストックから５ｍｌのＬＢ培地に接種し、１８０ｒｐｍで一晩、３７℃で振盪して培養した。２日目に細胞懸濁液の０．５ｍｌを１０ｍｌのＬＢ培地に再懸濁した。この培養液を３７℃で３時間振とう培養し、３０分ごとに検出した波長６００ｎｍの光学濃度（ＯＤ）（ＯＤ６００）で培養液の増殖曲線を観察した。細胞懸濁液の連続希釈液１００μｌをＬＢプレート上に散布し、ＣＦＵを算出した。成長曲線に基づいて、Ｅ．ｃｏｌｉとＳ．ｅｎｔｅｒｉｃａを培養、収穫し、オートクレーブ（１２１℃、１５分）で熱死させた。

[0092] 同様に、Ｂ．　ｂｉｆｉｄｕｍとＢ．　ｂｒｅｖｅは、Ｄｉｆｉｃｏ　Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｉ　ＭＲＳ　ｂｒｏｔｈ（Ｂｅｃｔｏｎ，　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ａｎｄ　Ｃｏｍｐａｎｙ）培地で、３７℃で嫌気培養し、オートクレーブで加熱殺菌した。

[0093] 脾臓Ｂ細胞の刺激（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）

脾臓Ｂ細胞は、８週齢のＢａｌｂ／ｃマウスの脾臓からＢ　ｃｅｌｌ　ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　ｋｉｔ　（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を用いてネガティブソートした。脾臓Ｂ細胞（濃度：５×10^5／ｍｌ）をＲＰＭＩ１６４０培地で培養し、それぞれ１３種類の独立した刺激を与えた。各刺激の適切な濃度を選択するために、各刺激を滴定した結果を図１１ｅ－ｇに示す。

[0094] １．抗マウスＩｇＭ（１５μｇ／ｍｌ；ジャクソン・イムノ・リサーチ・ラボラトリーズ）

２．抗マウス－ＣＤ４０（ＨＭ４０－３，５００ｎｇ／ｍｌ；　Ｂｉｏｌｅ

ｇｅｎｄ社製）

３．ＢＡＦＦ　（５０　ｎｇ／ｍｌ；　Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）

４．Ｐａｍ３ＣＳＫ４　（１μｇ／ｍｌ，　Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ社）

５．Ｐｏｌｙ　Ｉ：Ｃ　（２５　ｎｇ／ｍｌ，　Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ社）

６．ＬＰＳ（５０ｎｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ社）

７．フラジェリン（２０ｎｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ　社）

８．イミキモド（Ｒ８３７，　５ｎｇ／ｍｌ；　Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ社）

９．ＣｐＧ（２０μｇ／ｍｌ、ＧｅｎｅＤｓｉｇｎ　Ｉｎｃ．）

１０．加熱殺菌したＥ．ｃｏｌｉ（10^7　ＣＦＵ／ｍｌ）

１１．加熱殺菌したＳ．Ｅｎｔｅｒｉｃａ（10^8　ＣＦＵ／ｍｌ）

１２．加熱殺菌したＢ．　ｂｉｆｉｄｕｍ（10^7　ＣＦＵ／ｍｌ）

１３．加熱殺菌したＢ．　ｂｒｅｖｅ（10^7　ＣＦＵ／ｍｌ）

刺激したＢ細胞のＣＤ１１ｂ発現を、Ｃｅｌｌ　Ｓｏｒｔｅｒ　ＳＨ８００（ＳＯＮＹ）およびＳｐｅｃｔｒａｌ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　ＳＡ３８００（ＳＯＮＹ）を用いて、０日目と３日目に解析した。

[0095]　ＭＤＰ刺激には、精製した脾臓Ｂ細胞（５×10^5／ｍｌ）を、Ｎ－ａｃｅｔｙｌｍｕｒａｍｙｌ－Ｌ－ａｌａｎｙｌ－Ｄ－ｉｓｏｇｌｕｔａｍｉｎｅ　ｈｙｄｒａｔｅ（１μｇ／ｍｌ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社）を加えたＲＰＭＩ１６４０培地で培養した。

[0096]　ＴＬＲ阻害剤およびＮＯＤ２阻害剤の分析のために、精製した脾臓Ｂ細胞（５×10^5／ｍｌ）を、ｐａｍ３ＣＳＫ４（１μｇ　／ｍｌ，　Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ）、ＬＰＳ（５０　ｎｇ／ｍｌ；　Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、ＣｐＧ（２０μｇ／ｍｌ，　ＧｅｎｅＤｓｉｇｎ　Ｉｎｃ）、熱殺Ｅ．ｃｏｌｉ（10^7　ＣＦＵ／ｍｌ）の存在下で、ＴＬＲ１／２アンタゴニスト、ＣＵ－ＣＰＴ（１μＭ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、ＴＬＲ４阻害剤、ＴＡＫ－２４２（１μＭ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）またはＮＯＤ２シグナル阻害剤ＩＩ、ＧＳＫ７１７（３０μＭ；　Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を含むＲＰＭＩ１６４０培地で培養した。

[0097] 免疫化

０日目および１６日目に、マウスにＯＶＡ（１ｍｇ）、ＯＶＡ（１ｍｇ）＋ｐａｍ３ＣＳＫ４（１０μｇ、Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ社）またはＯＶＡ（１ｍｇ）＋熱殺大腸菌（１００μｌ中10^9ＣＦＵ）を経口投与した。２１日目に便を採取し、酵素結合免疫吸着法（ＥＬＩＳＡ）によるＯＶＡ特異的抗体の測定を行った。

[0098] ＯＶＡ特異的ＩｇＡ ＥＬＩＳＡの検出

便を１０倍重量／体積（ｗ／ｖ）のＰＢＳに懸濁した。遠心分離（８，０００ｇ、１５分）した後、上清を糞便抽出液として回収した。プレートを１ｍｇ／ｍｌ ＯＶＡで一晩プレコートし、続いて１％（ｗ／ｖ）のウシ血清アルブミンを含むＰＢＳで室温で１時間ブロッキングした。その後、連続希釈した便抽出物を加え、室温で１時間インキュベートした。ＩｇＡの相対的な結合力は、アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウスＩｇＡ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ社製）で検出した。４℃で一晩インキュベートした後、ＴｒｉＳｔａｒ Ｍｕｌｔｉｍｏｄｅ Ｒｅａｄｅｒ ＬＢ ９４２（ＢＥＲＴＨＯＬＤ社製）を用いて、４０５ｎｍの光学密度（ＯＤ）値を測定した。

[0099] ＷＴマウスへの加熱殺菌した細菌の経口投与

Ｂａｌｂ／ｃマウス（８－１２週齢）に、加熱殺菌したＥ． ｃｏｌｉ（10^9ＣＦＵを１００μｌ ＰＢＳで希釈したもの）、Ｓ． ｅｎｔｅｒｉｃａ（10^9ＣＦＵを１００μｌ ＰＢＳで希釈したもの）、Ｂ． ｂｉｆｉｄｕｍ（10^9ＣＦＵを１００μｌ ＰＢＳで希釈したもの）、Ｂ． ｂｒｅｖｅ（10^9ＣＦＵを１００μｌ ＰＢＳで希釈したもの）、ｐａｍ３ＣＳＫ４（１０μｇを１００μｌ ＰＢＳで希釈したもの）を経口投与した。コントロールとして、１００μｌのＰＢＳを経口投与したマウスを用意した。２日後、それらのマウスのＰＰを摘出し、上述のようにＳｐｅｃｔｒａｌ Ｃｅｌｌ Ａｎａｌｙｚｅｒ ＳＡ３８００（ＳＯＮＹ）を用いてＧＣのＢ細胞を解析した。

[0100] ＯＶＡを抗原とした経口アジュバント投与

ＯＶＡ　１ｍｇを抗原として、それに各アジュバント（ＣｐＧ－Ｋ３　（ＧｅｎｅＤｓｉｇｎ　Ｉｎｃ．）１０μｇ、ＣｐＧ－ＯＤＮ１８２６　（Ｉｎｖｉｒｏｇｅｎ　ｔｌｒｌ－１８２６）１０μｇ、または加熱殺菌したＥ．　ｃｏｌｉ　10^9　ｃ．ｆ．ｕ．）を混合して２週間ごとに３回Ｃ５７ＢＬ／６マウスに経口免疫を行い、３回目の免疫後２日目に採血を実施した。血清中のＴＮＦ－α値はｍｏｕｓｅ　ＴＮＦ－α　ＥＬＩＳＡ　ｋｉｔ　（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，　ＢＭＳ６０７－３）のプロトコールに従って測定した。

[0101] 事前刺激によって誘導された移植されたｉＧＢ細胞のｉｎ　ｖｉｖｏイメージング

上述のように、脾臓ナイーブＢ細胞を、ｐａｍ３ＣＳＫ４（１μｇ／ｍｌ、Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ社）、加熱殺菌した大腸菌（10^7ＣＦＵ／ｍｌ）、ＣｐＧ（２０μｇ／ｍｌ、ＧｅｎｅＤｓｉｇｎ　Ｉｎｃ社）または抗ＩｇＭ－Ａｂ（１５μｇ／ｍｌ、Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社）を用いて、別々にｉｎ　ｖｉｔｒｏで３日間培養した。その後、刺激細胞から１×10^5個のＢ２２０$^+$　Ｂ細胞を単離し、続いてｒＩＬ－４（１ｎｇ／ｍｌ；Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ社）を添加した４０ＬＢフィーダー細胞に播種し、ｉＧＢ細胞を誘導した。対照群として、刺激を受けていない脾臓のナイーブＢ細胞を、ｒＩＬ－４（１ｎｇ／ｍｌ；Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ社）を添加した４０ＬＢフィーダー細胞に播種した。４日間培養した後、３×10^5個のｉＧＢ細胞（Ｂ２２０$^+$）のナイーブＢ－４０ＬＢ細胞、ｐａｍ３ＣＳＫ４－４０ＬＢ細胞、Ｅ．ｃｏｌｉ－４０ＬＢ、ＩｇＭ－４０ＬＢおよびＣｐＧ－４０ＬＢ細胞を単離し、ＣｅｌｌＴｒａｃｋｅｒ　Ｏｒａｎｇｅ　ＣＭＴＭＲ蛍光色素（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）で標識した後、ＨＥＶを識別するためにＡＦ４８８抗マウスＭＡｄＣＡＭ－１（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ　ｍＡｂ　ＭＥＣＡ－３６７）１０μｇとともにマウス（Ｂａｌｂ／ｃ，８－１２週齢）に別々に静脈内注射した。麻酔下で、

ＧＣ同定のためにＩｇＡ+細胞を染色するために、ＡＦ６４７抗マウスＩｇＡ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）１μｇを、ｉＧＢ細胞を移入したのと同じマウスのＰＰに直接注入した。静注された標識ｉＧＢ細胞の局在を、顕微鏡ＬＳＭ８８０（Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ）とＺＥＮ２００９（Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ）の解析ソフトウェアで観察した。

[0102] 再構成されたＶＤＪ領域と下流のイントロンのＤＮＡ増幅

下流のイントロン配列を有する再構成されたＶＤＪ配列は、いくつかの異なる上流プライマー（ここで、「Ｓ」はＣまたはＧであり、「Ｒ」はＡまたはＧであり、「Ｎ」はＡ、Ｇ、ＣまたはＴであり、「Ｍ」はＡまたはＣであり、「Ｗ」はＡまたはＴである）を用いた２ラウンドのネスティッドＰＣＲによって増幅された。ＭＨ１，５′ＳＡＲＧＴＮＭＡＧＣＴＧＳＡＧＳＡＧＴＣ－３′；ＭＨ２，５′－ＳＡＲＧＴＮＭＡＧＣＴＧＳＡＧＳＡＧＴＣＷＧＧ－３′；ＭＨ３，５′－ＣＡＧＧＴＴＡＣＴＣＴＧＡＡＡＧＷＧＴＳＴＧ－３′。ＭＨ４，５′－－ＧＡＧＧＴＣＣＡＲＣＴＧＣＡＡＣＡＲＴＣ－３′；ＭＨ５，５′－ＣＡＧＧＴＣＣＡＡＣＴＶＣＡＧＣＡＲＣＣ－３′；ＭＨ６，５′－ＧＡＧＧＴＧＡＡＳＳＴＧＧＴＧＧＡＡＴＣ－３′。ＭＨ７，５′－ＧＡＴＧＴＧＡＡＣＴＴＧＧＡＡＧＴＧＴＣ－３′を、ＩｇＨイントロン・エンハンサーの５’末端に位置する配列に相補的なＪＨ４Ｒプライマー（５’－ＧＡＣＴＡＧＴＣＣＴＣＴＣＣＡＧＴＴＴＣＧＧＣＴＧＡＡＴＣＣ－３’）[16,42]と一緒に用いた。２回目のＰＣＲは、同じ上流のプライマーを、ＪＨ４Ｒプライマーの上流配列に相補的なＪＨ４Ｒ－２プライマー（５’－ＣＡＧＧＴＧＧＴＧＴＴＴＴＧＣＴＣＡ－３’）と一緒に使用した。増幅は、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ　Ｍａｘ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（ＴａＫａＲａ社製）を用いて、ファーストラウンドＰＣＲを２０サイクル、セカンドラウンドＰＣＲを３０サイクル（９５℃１５秒、５８℃１０秒、７２℃３０秒）で行った。ＰＣＲ産物をｐＧＥＭ　Ｔベクター（Ｐｒｏｍｅｇａ社）にクローニングした後、ＥｍｅｒａｌｄＡｍｐ（登録商標）ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（ＴＡＫＡＲＡ社）を用いて、ＪＨ４Ｆプライマー（５

’－ＴＡＴ　ＧＣＴ　ＡＴＧ　ＧＡＣ　ＴＡＣ　ＴＧＧ－３’）およびＪＨ４Ｒ－２プライマーでコロニーＰＣＲを行い、イントロン配列を含むクローンを選択した。

[0103] ＤＮＡシークエンスとＳＨＭ解析

プラスミドＤＮＡを分離した後、Ｔ７プライマーとＳＰ６プライマーを用いてＤＮＡ配列解析を行った。ＩｇＨのイントロンＤＮＡ配列のコンセンサスは、Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＡＪ　８５１８６８．３から取得した。再構成されたＶＤＪはＩｇＢＬＡＳＴで分析した。

[0104] 統計解析

別段の記載がある場合を除き、統計解析はＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　ｖｅｒｓｉｏｎ　８．４．２　ｆｏｒ　Ｍａｃ　（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，　Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，　ＣＡ，　ＵＳＡ）を用いて行った。２つのグループ間の差は、両側Ｓｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ　検定を用いて比較した。３つ以上のグループがある場合は、一元配置または二元配置の分散分析（ＡＮＯＶＡ）の後、Ｔｕｋｅｙの多重比較検定を行った。統計的検定、およびグループ数と複製に関する詳細は、図の凡例に示した。ｐ値＜０．０５を有意とした。

[0105] 実施例１：マウスのＰＰにおいてＣＤ１１ｂを発現しているＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞の小さな集団

フローサイトメトリーにより、ＰＰにはＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞の小さな集団（ＰＰ　Ｂ細胞の約０．１％～０．２％）が存在することが確認された（図２ａ、図６ａ）。ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$とＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$のＰＰ　Ｂ細胞はともに、Ｐｅａｎｕｔ　Ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ　（ＰＮＡ）^{high}やＦａｓ$^{+}$[16]といった典型的なＧＣ　Ｂ細胞の表現型を示した（図２ｂ、ｃ）。

[0106] 次に、ｐｒｅ－ＧＣ　Ｂ細胞は、ＧＣに入る前のＩＦ領域（ＧＣ外）に存在することから、ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞の局在を調べた[3, 4]。免疫組織学的には、ＰＮＡとＩｇＡの両方の発現によってＧＣ領域が特定された（図

２ｄ）。その結果、切片のＧＣ外の領域には、２個のＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$Ｂ細胞（黄色の細胞）しか存在しないことがわかった（図２ｄ、図７）。続いて、ＣＤ１１ｂリガンドの局在を解析した。細胞間接着分子１（ＩＣＡＭ－１）は、細胞の接着と移動を媒介するＣＤ１１ｂ／ＣＤ１８のリガンドとして広く知られている[17]。既報[8, 18]のように、ＩＦ領域のＧＣ　Ｂ細胞と高内皮静脈（ＨＥＶ）はともにＩＣＡＭ－１を発現している。また、ＨＥＶは粘膜アドレッセンス細胞接着分子－１（ＭＡｄＣＡＭ－１）[19]も発現している（図２ｅ、図８）。ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞がＨＥＶに直接結合していることは確認できなかったが、ＰＰの切片のＩＦ領域において、７個のＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞のうち６個がＨＥＶの近傍に位置していることがわかった（図２ｆ）。また、もう１つのＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞（Ｎｏ．７）は、ＧＣの近くに位置していたが（図２ｆ）、ＧＣ内には存在しなかったことから、ＩＦからＧＣに移動している可能性が示唆された。

[0107]　次に、ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞がその後、ＧＣの外からＧＣ内に移動するかどうかが問題となった。ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$とＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$のＰＰ　Ｂ細胞を単離し、ラベルを付けた上で、異なるＩｇＡ－Ｃｒｅ／ＹＣ３．６０^{flox}レポーターマウスのＰＰにこれらを別々に注入した。ＰＰのＧＣは、ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞が濃縮された領域で同定できるので（図２ｄ）、ＩｇＡ$^{+}$細胞でＹＣ３．６０の蛍光を発するこれらのレポーターマウスは、ＰＰのＧＣを容易に同定することができる。注入から１時間後、注入されたＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞はＧＣの内部に位置しており（図２ｇ）、ＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞がＧＣのＢ細胞であることが示唆された。一方、注入したＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞はＧＣに入らず、ＧＣを取り囲んでいた（図２ｇ）。注入から４０時間後には、注入されたＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞もＧＣに入った（図２ｈ）。このように、もともとＩＦ領域にあったＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞は、ＧＣに移動する。

[0108]　実施例２：ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞の遺伝子発現

ｐｒｅ－ＧＣ　Ｂ細胞の表現型をさらに確認するために、ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$とＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$のＰＰ　Ｂ細胞を単離し、マイクロアレイ解析によって遺伝子発現を比較した（図３ａおよび図６ｂ）。ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞は、ＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞に比べて、ＧＣ遺伝子を相対的に低く、非ＧＣ遺伝子を相対的に高く発現しており、ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞はＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞とは異なる集団であることが示された。マイクロアレイの結果を確認するために、さらに定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）を行い（図３ｂおよび図６ｂ）、ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞の遺伝子発現と、ＧＣ（ＰＮＡ^{high}Ｂ２２０$^{+}$）および非ＧＣ（ＰＮＡ^{low}Ｂ２２０$^{+}$）のＰＰ　Ｂ細胞の遺伝子発現を比較した。我々は、ｂｃｌ６（ＧＣのＢ細胞で制限されている主要な転写因子）、ａｉｃｄａ（活性化誘導シチジンデアミナーゼ（ＡＩＤ）をコードし、体細胞超変異（ＳＨＭ）とクラススイッチ組換えを誘発する酵素）、およびｓ１ｐｒ２（ＧＣの内外でＢ細胞の位置を制御する受容体）[10, 20-22]を含む、ＧＣのＢ細胞で高発現している３つの遺伝子、ならびに、２つの非ＧＣ遺伝子、ｇｐｒ１８３（濾胞の外でＢ細胞の位置を制御する受容体）とｂｃｌ２（ＧＣ以外のＢ細胞で高発現する転写因子）[10, 23, 24]を選択した。ＣＤ１１ｂ＋ＩｇＡ＋およびＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞のこれらの遺伝子の発現レベルは、非ＧＣ　Ｂ細胞のそれとは異なっており（図３ｂ）、この２つの集団はいずれもＧＣ　Ｂ細胞である可能性が高いことを示している。ｐｒｅ－ＧＣ　Ｂ細胞は、ＧＣ反応の開始に必要であることが実証されている転写因子ｉｒｆ４の発現が増加しているので[10, 11, 25]、さらにｉｒｆ４の発現を解析した。ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞は、ＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞よりも高いｉｒｆ４を発現しており（図３ｂ）、ｐｒｅ－ＧＣ　Ｂ細胞であることがわかった。しかし、一部のＧＣ明領域（ＬＺ）Ｂ細胞もｉｒｆ４を高発現していることを考慮して[8, 25]、続いてＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞のＣＸＣＲ４とＣＤ８６の発現をフローサイトメトリーで解析した。ＧＣ　ＬＺ　Ｂ細胞は、ＣＤ８６^{high}ＣＸＣＲ４^{low}　Ｂ　ｃｅｌｌ[3, 8]として同定されているので、ＣＤ１

１ｂ－ＩｇＡ＋　Ｂ細胞と比
較して、ＣＤ８６の発現が低く、ＣＸＣＲ４の発現が高いことから（図３ｃ、図６ｃ）、ＣＤ１１ｂ＋ＩｇＡ＋　Ｂ細胞はＧＣ　ＬＺ　Ｂ細胞ではなく、ｐｒｅ－ＧＣ　Ｂ細胞であることが示された。

[0109] 実施例３：ＣＤ１１ｂ＋ＩｇＡ＋　ＰＰ　Ｂ細胞は、ＧＣに入る前にＴ細胞と相互作用する

ＧＣに入るためには、以前に報告されているように、ｐｒｅ－ＧＣのＢ細胞がＴ細胞やＤＣと相互作用する必要がある[3，26]。そこで、ＣＤ１１ｂ＋ＩｇＡ＋　ＰＰ　Ｂ細胞がＧＣに入る前にＣＤ４＋　Ｔ細胞と相互作用するかどうかを調べた。ＩｇＡ＋　ＰＰ　Ｂ細胞は、フローサイトメトリーによる単一Ｂ細胞ゲートではＣＤ４＋陽性ではなかった（図３ｄ、図９）。しかし、コンジュゲートＢ細胞には、ＩｇＡ＋ＣＤ４＋二重陽性のＰＰ細胞の明確な集団が存在し（図３ｄ、図９）、これらのＩｇＡ＋　ＰＰ　Ｂ細胞がＣＤ４＋　Ｔ細胞と相互作用していることを示している。特に、ＣＤ１１ｂ＋ＩｇＡ＋　Ｂ細胞の４０％以上がＣＤ４＋　Ｔ細胞との結合を示し（図３ｅ，ｆ，図９）、ＣＤ１１ｂ＋ＩｇＡ＋　ＰＰ　Ｂ細胞がＣＤ４＋　Ｔ細胞と相互作用していることが示唆された。一方、約１４．５％のＣＤ１１ｂ－ＩｇＡ＋　ＰＰ　Ｂ細胞はＣＤ４＋　Ｔ細胞と相互作用しており、ＧＣ　ＬＺではＣＤ４＋　Ｔ　ｆｏｌｌｉｃｕｌａｒ　ｈｅｌｐｅｒ　（T_{FH}）細胞と相互作用している可能性がある（図３ｅ，ｆ）[4，8]。ＰＰから分離したコンジュゲート細胞を共焦点顕微鏡で撮影すると、ＣＤ１１ｂ＋ＩｇＡ＋　ＰＰ　Ｂ細胞とＣＤ４＋　Ｔ細胞の相互作用がさらに確認できた（図３ｇ）。このように、今回の結果は、ＣＤ１１ｂ＋ＩｇＡ＋　ＰＰ　Ｂ細胞がｐｒｅ－ＧＣ　ＰＰ　Ｂ細胞であることを明確に示している。

[0110] 実施例４：ＣＤ１１ｂ＋ＩｇＡ＋　ＰＰ　Ｂ細胞は、Ｉｇ遺伝子にＳＨＭを蓄積している

ＣＤ１１ｂ＋ＩｇＡ＋　Ｂ細胞が新たに活性化されたナイーブＢ細胞に由来するかどうかを確認するために、ＣＤ１１ｂ＋ＩｇＡ＋およびＣＤ１１ｂ－Ｉｇ

Ａ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞のＩｇＨの再構成されたＶＤＪ領域と下流のイントロン配列の両方を配列決定したところ、ＧＣ反応中にＳＨＭが導入されていた（図１０ａ，ｂ）[16]。ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞（２５クローン中２１クローン）およびＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞（３９クローン中３２クローン）の配列の８０％以上に変異が見られた（図１０ｂ）。このことは、ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞は、新たに活性化されたナイーブＢ細胞だけでなく、以前に報告されたように、ＧＣに再侵入したメモリーＢ細胞にも由来することを示している[6，7]。

[0111] 実施例５：細菌抗原はナイーブな脾臓Ｂ細胞にＣＤ１１ｂの発現を誘導する

ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞に関する我々の発見は、ｐｒｅ－ＧＣ　Ｂ細胞のＣＤ１１ｂ発現が何によって引き起こされるのかという別の疑問を提起する。Ｂ細胞は、抗原による刺激だけでなく、ＤＣやＴ細胞と相互作用して、ｐｒｅ－ＧＣ　Ｂ細胞に変化する[3，4，26]。どのようなシグナルがＣＤ１１ｂの発現を誘導するのかを調べるため、我々は免疫を受けていないマウスのナイーブな脾臓Ｂ細胞を単離し、ＢＣＲの架橋には抗ＩｇＭ、ＤＣとの相互作用にはＢ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、Ｔ細胞との相互作用には抗ＣＤ４０を用いてｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養した。しかし、Ｔ－ＢおよびＤＣ－Ｂ相互作用を模倣したこれらの刺激は、ナイーブＢ細胞にＣＤ１１ｂを誘導しなかった。次に、ＴＬＲ２にはｐａｍ３ＣＳＫ４、ＴＬＲ３にはｐｏｌｙ　Ｉ：Ｃ、ＴＬＲ４にはリポポリサッカライド（ＬＰＳ）、ＴＬＲ５にはフラジェリン、ＴＬＲ７にはイミキモド、ＴＬＲ９にはＣｐＧといった異なるＴｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）リガンドを用いてナイーブＢ細胞を刺激した。３日間培養したところ、ｐａｍ３ＣＳＫ４、ＬＰＳ、ＣｐＧで刺激したＢ細胞の数は、抗ＩｇＭ、抗ＣＤ４０、ＢＡＦＦ、ポリＩ：Ｃ、フラジェリン、イミキモドで刺激したＢ細胞よりも有意に増加した（図１１ａ、ｂ）。ｐａｍ３ＣＳＫ４とＬＰＳで刺激したＢ細胞におけるＣＤ１１ｂ$^{+}$　Ｂ細胞の割合は、それぞれ２７．６％と８％であったが、他の刺激で刺激したＢ細胞に

おけるＣＤ１１ｂ$^{+}$　Ｂ細胞の割合は５％以下であった（図４－１ａ，ｂ）。注目すべきは、ＣｐＧはＢ細胞の増殖を活性化するものの、ＣＤ１１ｂの発現を誘導しなかったことである。さらに、細菌抗原として知られるｐａｍ３ＣＳＫ４やＬＰＳで刺激した場合にのみ、Ｂ細胞のｉｔｇａｍ（ＣＤ１１ｂ）の発現が増加することを確認した（図４－１ｃ）。次に、ＴＬＲ２と（または）ＴＬＲ４[27,28]の両方に強い刺激を与える加熱殺菌した大腸菌を用意したところ、加熱殺菌した大腸菌は脾臓Ｂ細胞のＣＤ１１ｂ発現を有意に誘導した（図４－１ａ）。これらの結果から、ＴＬＲ２およびＴＬＲ４のリガンドである細菌抗原が、Ｂ細胞のＣＤ１１ｂを誘導することがわかった。

[0112]　ＰＰ　ＧＣ内部のＢ細胞はＣＤ１１ｂを発現していないことから（図２ｄ）、Ｂ細胞のＣＤ１１ｂ発現は一過性のものであり、Ｔ－ＢやＤＣ－Ｂの相互作用を介して収束するのではないかと考えた。そこで、ＣＤ４０ＬとＢＡＦＦ[26]を発現させた４０ＬＢ細胞をフィーダー層として、Ｔ細胞とＤＣ細胞の役割を模倣してＧＣ様Ｂ細胞を誘導するｉｎ　ｖｉｔｒｏ誘導ＧＣ　Ｂ細胞（ｉＧＢ）培養システムを用いて、表面表現型を追跡した。ｉＧＢシステムで細胞を培養すると、単離されたＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞は、単離されたＣＤ１１ｂ$^{-}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞やナイーブな脾臓Ｂ細胞と同様のレベルで増殖することができた（図１２ａ，ｂ）。実際、単離されたＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞は、ｉＧＢシステムで１日培養すると、ＣＤ１１ｂの発現を失った（図４－１ｄ、図１２ａ）。同様に、ｐａｍ３ＣＳＫ４によって誘導されたＣＤ１１ｂ$^{+}$脾臓Ｂ細胞は、ｉＧＢシステムで４日間培養するとＣＤ１１ｂの発現を失った（図４－１ｅ、図１２ｃ）。抗ＣＤ４０　Ａｂおよび抗ＩｇＭ　Ａｂで処理した脾臓ナイーブＢ細胞は、ｐａｍ３ＣＳＫ４の存在下でもＣＤ１１ｂの発現を有意に抑制した（図４－１ｆ－ｈ）。このことは、Ｔ－Ｂ細胞間の相互作用およびＢＣＲクロスリンキングがＢ細胞のＣＤ１１ｂ発現をダウンレギュレートすることを示している。したがって、生体内ではごく少数のＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　ＰＰ　Ｂ細胞しか見つからないことは妥当である（図２）。

[0113] ＴＬＲ２とＴＬＲ４が脾臓Ｂ細胞のＣＤ１１ｂ発現誘導に関与しているかどうかをさらに確認するために、ＴＬＲ１／２阻害剤、ＴＬＲ４阻害剤、ＮＯＤ２阻害剤の存在下で、ｐａｍ３ＣＳＫ４、ＬＰＳ、ＣｐＧ、熱で殺した大腸菌で脾臓Ｂ細胞を刺激した。ＮＯＤ２はＴＬＲ２の下流のシグナル伝達に関与することが知られている[29]。興味深いことに、ＴＬＲ１／２阻害剤を用いた場合、ｐａｍ３ＣＳＫ４と加熱殺菌した大腸菌はＣＤ１１ｂ$^{+}$　Ｂ細胞の割合を増加させたが、ＴＬＲ４阻害剤では増加しなかった（図４－１ｉ）。一方、ＮＯＤ２のリガンドであるムラミルジペプチド（ＭＤＰ）はＣＤ１１ｂの発現を誘導しなかったが、ＮＯＤ２阻害剤は、ｐａｍ３ＣＳＫ４および加熱殺菌した大腸菌で刺激したＢ細胞のＣＤ１１ｂの発現を強く抑制した（図１１ｄ）。この結果は、ＣＤ１１ｂの発現がＴＬＲ２やＴＬＲ４の活性化によって直接誘導されるのではなく、ＮＯＤ２を介した細菌由来の刺激によって部分的に誘導されることを強く示唆している（図４－１ｉ）。

[0114] 加熱殺菌したプロテオバクテリア門に属するクレブシエラ・ニューモニエ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）とバクテロイデス門に属するバクテロイデス・ブルガータス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ　ｖｕｌｇａｔｕｓ）を大腸菌と同様に試験したところ、これらの細菌もＣＤ１１ｂの発現を誘導することが確認された。それぞれの細菌で刺激した後のＢ細胞におけるＣＤ１１ｂ$^{+}$　Ｂ細胞の割合を図４－２に示す。本結果は、プロテオバクテリア門に属する細菌およびバクテロイデス門に属する細菌が、ナイーブな脾臓Ｂ細胞にＣＤ１１ｂの発現を誘導することを示している。

[0115] 実施例６：熱処理したＣＤ１１ｂ誘導性細菌の経口投与によるＧＣ反応の促進

次に、どのような細菌がＣＤ１１ｂの発現を介してｐｒｅ－ＧＣ　Ｂ細胞を誘導できるかを問題とした。有害菌としてＥ．　ｃｏｌｉとＳ．　ｅｎｔｅｒｉｃａを、代表的な有益菌としてＢｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｂｉｆｉｄｕｍ（Ｂ．　ｂｉｆｉｄｕｍ）とＢ．　ｂｒｅｖｅを選択した。ｉｎ　ｖｉｔｒｏの刺激により、大腸菌とＳ．　ｅｎｔｅｒｉｃａはＣＤ１１

ｂの発現を誘導したが、Ｂ．　ｂｉｆｉｄｕｍとＢ．　ｂｒｅｖｅは誘導しなかった（図５ａ，ｂ）。ｐａｍ３ＣＳＫ４や加熱殺菌した菌をマウスに経口投与したところ、２日間でＰＰ　ＧＣ　Ｂ細胞の数と割合が増加した（図５ｃ－ｅ）。このことから、生体内で進行中のＧＣ反応を増強できるのは、有害な細菌のみであることが示唆された。

[0116] 実施例７：ＣＤ１１ｂの一過性発現により培養Ｂ細胞のＧＣへの侵入が可能になる。

次に、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで誘導したＣＤ１１ｂ$^{+}$　Ｂ細胞が既存のＧＣに侵入できるかどうかを確認した。ｉｎ　ｖｉｔｒｏでＧＣのＢ細胞を誘導するために、脾臓のナイーブＢ細胞をｐａｍ３ＣＳＫ４または加熱殺菌した大腸菌でｉｎ　ｖｉｔｒｏ刺激してＣＤ１１ｂを誘導し、その後４０ＬＢ細胞上で４日間培養した。ＣＤ１１ｂを誘導する刺激であるｐａｍ３ＣＳＫ４や加熱処理した大腸菌で事前に刺激したｉＧＢ細胞は、マウスに静脈内注射するとほとんどがＧＣに入ったが、ＣｐＧや抗ＩｇＭなどで事前に刺激してＣＤ１１ｂを発現しなかったｉＧＢ細胞はＧＣに入らなかった（図５ｆ、図１３）。以上の結果から、Ｔ－ＢまたはＤＣ－Ｂとの相互作用前にＢ細胞にＣＤ１１ｂを発現させることが、ｐｒｅ－ＧＣのＢ細胞がＧＣに入るために必須であることが示された。これは、非自己抗原である細菌抗原がＧＣ反応を引き起こすために重要であるという過去の報告と一致する[30]。

[0117] 実施例８：ＣＤ１１ｂ誘導性の加熱殺菌した細菌は、有効な粘膜アジュバントとして機能し、抗原特異的粘膜ＩｇＡを誘導する

ＴＬＲ２またはＴＬＲ９リガンドをベースにしたアジュバントは、ＤＣを効率的に刺激するため、すでにワクチン接種に広く使用されている[31, 32]。しかし、我々の結果は、Ｂ細胞がＤＣやＴ細胞の助けを受ける前に、自らの細胞運命をｐｒｅ－ＧＣ　Ｂ細胞に決定できることを示している。そこで、我々は、ｐａｍ３ＣＳＫ４と加熱処理した大腸菌が、粘膜ワクチンのアジュバントとして機能するのではないかと考えた。我々は、マウスに抗原としてオバルブミン（ＯＶＡ）を経口投与し、それに加えてｐａｍ３ＣＳＫ４または

加熱殺菌した大腸菌をアジュバントとして経口投与した（図５ｇ）。予想通り、ＯＶＡと加熱殺菌した大腸菌またはｐａｍ３ＣＳＫ４を同時に投与したマウスでは、便中のＯＶＡ特異的ＩｇＡが増加したが、ＯＶＡのみを投与したマウスでは増加しなかった（図５ｈ）。このように、本研究では、Ｂ細胞上のｐｒｅ－ＧＣ表面マーカーであるＣＤ１１ｂが、効果的な粘膜ワクチンアジュバントを選択するための有望なマーカーであり、特にＧＣ由来の高親和性粘膜ＩｇＡを増強することが明らかになった。

[0118] 一方、３回目免疫後のサイトカインの濃度を測定した結果、本開示のアジュバント組成物は、血清ＴＮＦαの濃度を全く上昇させなかった。一方、既知のワクチンアジュバントとして知られるＣｐＧ－Ｋ３およびＣｐＧ－ＯＤＮ１８２６は、血清ＴＮＦαの濃度の上昇を引き起こし、炎症反応を誘発すると考えられた（図１４）。

本結果より、本開示のアジュバント組成物は、炎症反応を誘導することなく、高い抗原特異的結合性ＩｇＡ誘導能を有する点で、きわめて有益な特性を有することが確認された。

[0119] （考察）

本研究では、ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$ Ｂ細胞の異なる集団を調査することで、ＣＤ１１ｂがｐｒｅ－ＧＣ ＩｇＡ$^{+}$ Ｂ細胞の新しい表面マーカーであることを示した。Ｂ細胞へのＣＤ１１ｂの誘導は、有害な細菌抗原の刺激に依存するが、活性化ＤＣとは無関係である。これらのＣＤ１１ｂ誘導性細菌抗原をマウスに経口投与したところ、ｉｎ ｖｉｖｏで粘膜抗原特異的ＩｇＡ反応が増強された。これらの結果は、ＧＣに入る前に活性化Ｂ細胞に一時的にＣＤ１１ｂを発現させることが、ＧＣ応答に適した活性化Ｂ細胞を選択するための重要なステップであることを示している。

[0120] Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの機能について、Ｙａｎのグループは、ＣＤ１１ｂがＬｙｎ－ＣＤ２２－ＳＨＰ－１のネガティブフィードバック経路を介してＢＣＲシグナルを制御するのに重要であることを明らかにした[13]。ＣＤ１１ｂ－／－マウスでは、抗体産生が亢進し、自己反応性Ｂ細胞によるＧＣ

反応が見られた[13, 14]。また、ＣＤ１１ｂをコードするＩＴＧＡＭ遺伝子の変異は、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）などの自己免疫疾患を発症する高リスク因子として報告されている[33]。本開示では、ＣＤ１１ｂの発現がＧＣに入る前のＢ細胞のマーカーであることが確認された。おそらく、ＣＤ１１ｂの一過性の発現は、ＧＣに入るために必要ではないが十分であると考えられる。Ｂ細胞が細菌の刺激によって活性化されると、Ｂ細胞はＣＤ１１ｂを発現し、増殖して自己反応性の抗体が産生されるのを防ぐ。その後、Ｂ細胞は、ＩＦ領域でＴ細胞との相互作用を開始する。Ｔ－Ｂ相互作用後、活性化されたＢ細胞はＣＤ１１ｂの発現を失い、ＧＣ　ＤＺに入り、急速に増殖し、高い親和性を得るためにＳＨＭを受ける。ＣＤ１１ｂは、活性化Ｂ細胞が有益なＧＣ反応を起こすように制御する上で重要な役割を果たしているが、有害な自己反応を避けるようにも制御していると考えられる。

[0121] ヒトのＢ細胞も微生物抗原によってＣＤ１１ｂを発現するのか？Ｄｕｔｒａのグループは、シャーガス病患者のＢ細胞をＴｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｃｒｕｚｉ由来のｐｒｏｔｅｉｎ－ｅｎｒｉｃｈ　ｆｒａｃｔｉｏｎで刺激すると、ＣＤ１１ｂ$^+$Ｂ細胞の頻度が高くなることを実証している[34]。

[0122] また、どのようなシグナルがＣＤ１１ｂの発現を誘導するのかという点も明らかとした。まず、ＴＬＲ２リガンドであるｐａｍ３ＣＳＫ４と熱死した大腸菌がｉｎ　ｖｉｔｒｏでＢ細胞のＣＤ１１ｂを強く誘導したことから、ＴＬＲ２刺激によってＣＤ１１ｂが誘導されることが予想された。大腸菌は、細胞壁の構成成分であるペプチドグリカン（ＰＧＮ）を持っており、これがＴＬＲ２のリガンドとなる[35]。しかし、予期せぬことに、ｐａｍ３ＣＳＫ４とＴＬＲ１／２阻害剤の併用により、Ｂ細胞のＣＤ１１ｂの発現が促進された。一方で、ｐａｍ３ＣＳＫ４と加熱殺菌した大腸菌によって誘導されたＣＤ１１ｂの発現は、ＮＯＤ２阻害剤によって抑制された（図４－１ｉ）ことから、ＮＯＤ２がＣＤ１１ｂを制御していることが示唆された。この結果は、ＮＯＤ２がＴＬＲ２のネガティブレギュレーターとして働くという以前の研究結果と一部一致している[35]。さらに、ＮＯＤ２は、クローン病（ＣＤ

）に強く関連するＴＬＲ２／４を介した炎症性サイトカイン産生の誘導を抑制することで、免疫寛容と恒常性の維持に貢献している[36]。このように、ＴＬＲ２－ＮＯＤ２経路は、ＣＤ１１ｂを介して、炎症反応だけでなく、ＧＣ反応も制御している可能性が示唆された。しかし、他の研究では、ＴＬＲ１／２シグナル伝達経路はＮＯＤ２[37]とは独立していることが示されている。ＴＬＲ２阻害剤によってＣＤ１１ｂの誘導が促進されることと合わせてさらなる研究によって詳細が明らかとなることが期待される。

[0123] ＣＤ１１ｂ誘導性の細菌刺激については、有害菌の例としてＳ．ｅｎｔｅｒｉｃａ、Ｅ．ｃｏｌｉがｉｎ ｖｉｔｒｏでＣＤ１１ｂの発現を誘導し、ｉｎ ｖｉｖｏでＧＣ反応を増強することを示しており、クレブシエラ・ニューモニエ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）とバクテロイデス綱の細菌バクテロイデス・ブルガータス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ ｖｕｌｇａｔｕｓ）がｉｎ ｖｉｔｒｏでＣＤ１１ｂの発現を誘導することを示しているが、Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属はそうではない。

[0124] まとめると、本開示の実験から下記のことが明らかとなった。

１． ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$ Ｂ細胞は、ＧＣ Ｂ細胞の表面マーカーであるＰＮＡとＦＡＳを発現している。ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$ Ｂ細胞は、ＧＣ Ｂ特異的遺伝子を高発現しているが、非ＧＣ遺伝子は発現していない。

２． ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$ Ｂ細胞は、ｐｒｅ－ＧＣ遺伝子であるｉｒｆ４を高発現している。

３． ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$ Ｂ細胞はＧＣの外側に位置しておりＧＣに入ろうとしている。

４． ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$ Ｂ細胞は、ＧＣの外でＣＤ４$^{+}$ Ｔ細胞と相互作用している。

５． 細菌抗原によるｉｎ ｖｉｔｒｏ刺激で脾臓Ｂ細胞にＣＤ１１ｂの発現が誘導される。

６． 経口投与された細菌抗原は、生体内で２日以内にＧＣ反応を促進する。

７．　熱処理した大腸菌を経口ワクチンのアジュバントとして使用することで、ｐｒｅ－ＧＣのＢ細胞誘導により抗原特異的反応を高めることができる。

[0125] すなわち、本開示は下記を明らかとしている。

（１）ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞は、ｐｒｅ－ＧＣ　Ｂ細胞であること

（２）Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの誘導は、効果的な粘膜免疫ワクチンアジュバントを選択する上で有望なマーカーであること。

そして、Ｂ細胞はＤＣやＴ細胞とは無関係に、細菌の抗原を感知して、ｐｒｅ－ＧＣ細胞に自身の細胞運命を決定し得ることが示唆された（図１５）。

[0126] 粘膜免疫関連免疫誘導組織は、粘膜組織上皮等から取り込まれた抗原分子を認識するＩｇＡ＋　Ｂ細胞の親和性成熟を行い、高親和性の抗体を粘膜上皮より分泌することで、粘膜組織上の抗原特異的防御をもたらすうえで重要な機能を有している。粘膜免疫関連免疫誘導組織は、腸管粘膜（パイエル板）、鼻腔粘膜など様々な粘膜に存在し、これらにおいて活性化された免疫細胞は当該粘膜または遠位の粘膜などの組織において抗原特異的防御を提供する（例えば、日耳鼻１１４:８４３－８５０，２０１１、Ｖａｃｃｉｎｅ　Ｖｏｌ．３０、ｐｐ．１８０－１８８、２０１２，Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、２０２１、Ｖｏｌ．１２、Ａｒｔｉｃｌｅ　６３５４７１）。本開示の各実施例によって、粘膜免疫関連免疫誘導組織としてパイエル板胚中心をモデルとして、ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞が胚中心（ＧＣ）に入って親和性成熟を行い、高親和性の抗体を産生することを明らかとした。そして、ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞にＣＤ１１ｂの発現を誘導する加熱滅菌細菌を、炎症反応誘発が抑制された極めて有用な粘膜免疫ワクチンアジュバントとして使用し得ることを明らかとした。

本開示は、ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ細胞の誘導するアジュバントが、各種粘膜免疫関連免疫誘導組織の胚中心におけるB細胞の親和性成熟および、高親和性のIgA抗体産生誘導においてきわめて有用であること、そして、当該アジ

ュバントとして、加熱滅菌細菌を利用し得ることを示している。

粘膜分泌IgA抗体は細菌に対してポリリアクティブな反応性を示すことが知られており、一般的なワクチンなどにより産生誘導がされるIgG抗体などに比して、広範な抗原に対する抗原特異性免疫防御を提供することができる（例えば、腸内細菌学雑誌　３１：１５１－１５７，２０１７、Ｓｃｉｅｎｃｅ．２０１７　Ｏｃｔ　２０；　３５８（６３６１）：　ｅａａｎ６６１９．、Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐｏｒｔｓ　３６，　１０９６５５，２０２１）。一局面において、本開示のアジュバントは、炎症応答を抑制しつつ、ポリリアクティブな抗原特異性免疫防御を提供し得る点において、きわめて有用であり、医薬、食品、飼料などの分野において、多大な貢献をもたらすものである。

[0127] （参考文献）

1. Turner, J. S. et al. Human germinal centres engage memory and naive B cells after influenza vaccination. Nature. 586, 127-132 (2020).

2. Andersen, T. K. et al. Enhanced germinal center reaction by targeting vaccine antigen to major histocompatibility complex class II molecules. npj Vaccines. 4, 9 (2019).

3. Mesin, L., Ersching, J., & Victora, G. D. Germinal center B cell dynamics. Immunity. 45.3, 471-482 (2016).

4. Kurosaki, T., Kometani, K., & Ise, W. Memory B cells. Nature Reviews Immunology. 15.3, 149-159 (2015).

5. Chen, K., Magri, G., Grasset, E. K. & Cerutti, A. Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA. Nature Reviews Immunology. 20, 427-441 (2020).

6. Mesin, L. et al. Restricted clonality and limited germinal center reentry characterize memory B cell reactivation by boosting. Cell. 180.1, 92-106 (2020).

7. Chen, H. et al. BCR selection and affinity maturation in Peyer's patch germinal centres. Nature. 582, 421-425 (2020).

8. Ise, W. et al. T follicular helper cell－germinal center B cell interaction strength regulates entry into plasma cell or recycling germinal center cell fate. Immunity. 48.4, 702-715 (2018).

9. Komban, R.J. et al. Activated Peyer′s patch B cells sample antigen directly from M cells in the subepithelial dome. Nat Commun. 10, 2423 (2019).

10. Song, S. & Matthias, P. D. The Transcriptional Regulation of Germinal Center Formation. Front Immunol. 10.3389 (2018).

11. Willis, SN. et al. Transcription factor IRF4 regulates germinal center cell formation through a B cell-intrinsic mechanism. J Immunol. 192(7), 3200-6 (2014).

12. Ahn, G. O. et al. Inhibition of Mac-1 (CD11b/CD18) enhances tumor response to radiation by reducing myeloid cell recruitment. Proc Natl Acad Sci. 107, 8363-8368 (2010)

13. Ding, C. et al. Integrin CD11b negatively regulates BCR signalling to maintain autoreactive B cell tolerance. Nat Commun. 4:2813 (2013).

14. Zhou, M. et al. Integrin CD11b Negatively Regulates B Cell Receptor Signaling to Shape Humoral Response during Immunization and Autoimmunity. The Journal of Immunology. 207.7, 1785-1797 (2021).

15. Kunisawa, J. et al. Microbe-dependent CD11b+ IgA+ plasma cells mediate robust early-phase intestinal IgA responses in mice. Nat Commun, 4, 1772 (2013)

16. Wei, M. et al. Mice carrying a knock－in mutation of Aicda resulting in a defect in somatic hypermutation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense. Nature immunology. 12.3, 264-270 (2011).

17. Diamond, M. S. et al. ICAM-654 1 (CD54): a counter－receptor for

Mac－1 (CD11b/CD18). The Journal of cell biology. 111(6), 3129-3139 (1990).

18. Figenschau, S. L. et al. ICAM1 expression is induced by proinflam matory cytokines and associated with TLS formation in aggressive brea st cancer subtypes. Scientific Reports. 8, 11720 (2018).

19. Miyasaka, M., Tanaka, T. Lymphocyte trafficking across high endot helial venules: dogmas and enigmas. Nat Rev Immunol 4, 360-370 (2004) .

20. Robinson, M. J. et al. The amount of BCL6 in B cells shortly afte r antigen engagement determines their representation in subsequent ge rminal centers. Cell reports. 30.5, 1530-1541 (2020).

21. Green, J. A. & Cyster, J. G. S1PR2 links germinal center confinem ent and growth regulation. Immunological reviews. 247.1, 36-51 (2012) .

22. Shinkura, S. et al. Separate domains of AID are required for soma tic hypermutation and class-switch recombination. Nature Immunology. 5, 707-712 (2004).

23. Pereira, J. P., Kelly, L. M., Xu, Y. & Cyster,J. G. EBI2 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. Nature. 46 0. 1122-1126 (2009).

24. Saito, M. et al. BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disrup tion in diffuse large B cell lymphoma. Proceedings of the National Ac ademy of Sciences. 106(27), 11294-11299 (2009).

25. Ochiai, K. et al. Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4. Immunity. 38.5, 918-929 (2013).

26. Nojima, T. et al. In－vitro derived germinal centre B cells diffe rentially generate memory B or plasma cells in vivo. Nature Communica

tions. 2, 465 (2011)

27. Lee, H. K., Lee, J. & Tobias, P. S. Two lipoproteins extracted fr om Escherichia coli K-12 LCD25 lipopolysaccharide are the major compo nents responsible for Toll-like receptor 2-mediated signaling. The Jo urnal of Immunology. 168(8), 4012-4017 (2002).

28. Lachmandas, T. et al. Microbial stimulation of different Toll-lik e receptor signalling pathways induces diverse metabolic programmes i n human monocytes. Nat Microbiol. 2, 16246 (2017).

29. Borm, M., van Bodegraven, A., Mulder, C. et al. The effect of NOD 2 activation on TLR2-mediated cytokine responses is dependent on acti vation dose and NOD2 genotype. Genes Immun. 9, 274-278 (2008).

30. Schwickert, T. A. et al. A dynamic T cell-limited checkpoint regu lates affinity dependent B cell entry into the germinal center. J Exp Med. 208(6), 1243－1252 (2011).

31. Rammensee, H. G., Wiesmuller, K. H. & Loffler, M. W. A new synthe tic toll-like receptor 1/2 ligand is an efficient adjuvant for peptid e vaccination in a human volunteer. j. immunotherapy cancer. 7, 307 (2019).

32. List, C. et al. Toll-Like Receptor Ligand Based Adjuvant, PorB, I ncreases Antigen Deposition on Germinal Center Follicular Dendritic C ells While Enhancing the Follicular Dendritic Cells Network. Frontier s in Immunology. 11, 1254 (2020).

33. FARIDI, M. H. et al. CD11b activation suppresses TLR-dependent in flammation and autoimmunity in systemic lupus erythematosus. The Jour nal of clinical investigation, 127.4: 1271-1283 (2017).

34. PASSOS, L. S. A. et al. Activation of human CD11b+ B1 B-cells by Trypanosoma cruzi-derived proteins is associated with protective immu ne response in human Chagas disease. Frontiers in immunology. 9, 3015

(2019)

35. Watanabe, T. et al. NOD2 is a negative regulator of Toll-like rec eptor 2-mediated T helper type 1 responses. Nat Immunol 5, 800-808 (2 004)

36. Caruso, R. et al. NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inf lammatory disease. Immunity 41.6, 898-908 (2014)

37. Takeda, K., Akira, S. Toll－like receptors in innate immunity. In ternational immunology, 17(1), 1-14. (2005).

38. Yang, Z., Sullivan, B. M. & Allen, C. D. C. Fluorescent in vivo d etection reveals that IgE+ B cells are restrained by an intrinsic cel l fate predisposition. Immunity. 36(5), 857-872 (2012).

39. Nagai, T. et al. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca2+ by circularly permuted yellow fluorescent proteins. Proceed ings of the National Academy of Sciences. 101(29), 10554-10559, (2004).

40. Yoshikawa, S. et al. Intravital imaging of Ca2+ signals in lympho cytes of Ca2+ biosensor transgenic mice: indication of autoimmune dis eases before the pathological onset. Sci Rep. 6, 18738 (2016).

41. Miwa, Y., Tsubota, K. & Kurihara, T. Effect of midazolam, medetom idine, and butorphanol tartrate combination anesthetic on electroreti nograms of mice. Molecular vision. 25, 645 (2019).

42. Jolly, C. J., Klix, N. & Neuberger, M. S. Rapid methods for the a nalysis of immunoglobulin gene hypermutation: application to transgen ic and gene targeted mice. Nucleic acids research. 25.10,1913-1919 (1 997).

請求の範囲

[請求項1] Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む、活性化Ｂ細胞の胚中心移行を誘導するための組成物。

[請求項2] 前記Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質が、細菌である、請求項１に記載の組成物。

[請求項3] 前記Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質が、γプロテオバクテリア綱またはバクテロイデス綱の細菌である、請求項２に記載の組成物。

[請求項4] 前記Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質が大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）、サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｃａ）、クレブシエラ・ニューモニエ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、バクテロイデス・ブルガータス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ ｖｕｌｇａｔｕｓ）またはこれらの組み合わせである、請求項３に記載の組成物。

[請求項5] 活性化Ｂ細胞の胚中心移行の活性化によって治療される疾患、障害または状態を有する対象を治療するための、請求項１～４のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項6] 免疫賦活化、健康維持もしくは増進、粘膜細菌叢の維持もしくは改善、または感染症治療に使用するための、請求項１～４のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項7] 粘膜投与ワクチンアジュバントである、請求項１～４のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項8] 医薬、食品、飼料、食品添加物、飼料添加物、これらの原料組成物からなる群から選択される形態である、請求項１～６のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項9] 抗原とともに投与されることを特徴とする、請求項１に記載の組成物。

[請求項10] 抗原と同時に投与されることを特徴とする、請求項９に記載の組成

物。

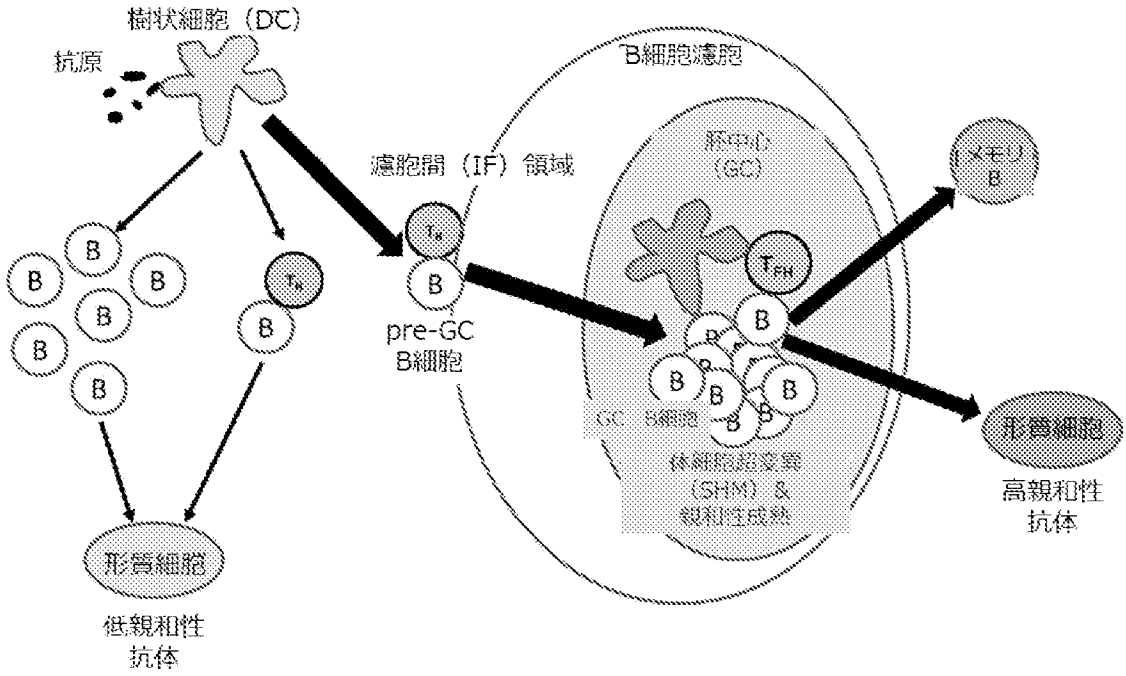
[請求項11] 抗原の投与とは別に投与されることを特徴とする、請求項９に記載の組成物。

[請求項12] 抗原を含むワクチン組成物である、請求項１に記載の組成物。

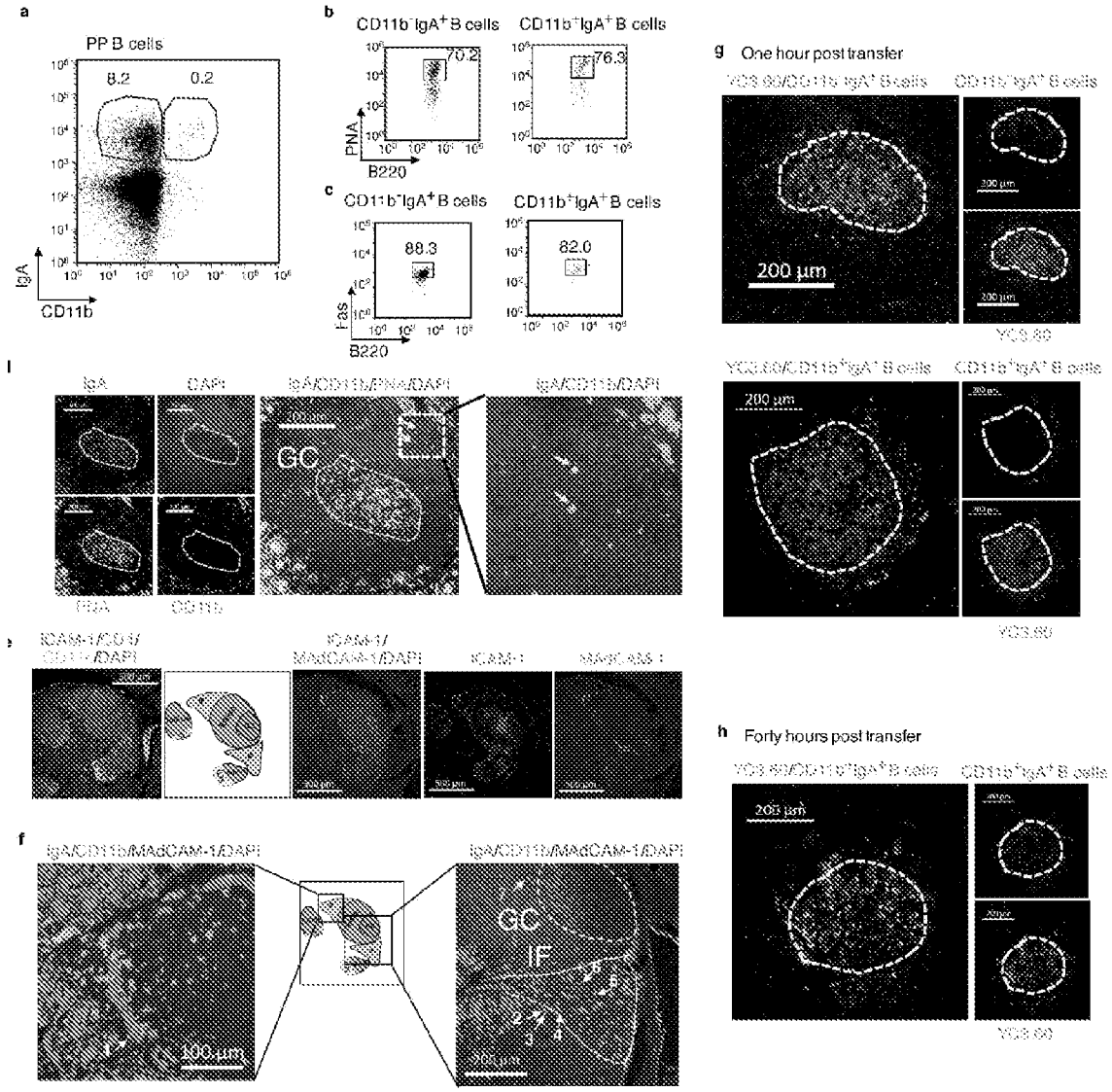
[請求項13] 抗原がウイルス、細菌、真菌、寄生虫抗原である、請求項９～１２に記載の組成物。

[請求項14] Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導する物質を含む組成物を準備し、当該物質とＢ細胞を接触させること含む、Ｂ細胞におけるＣＤ１１ｂの発現を誘導し、当該Ｂ細胞とＴ細胞および樹状細胞の接触を誘導し、活性化Ｂ細胞の胚中心移行を誘導する方法。

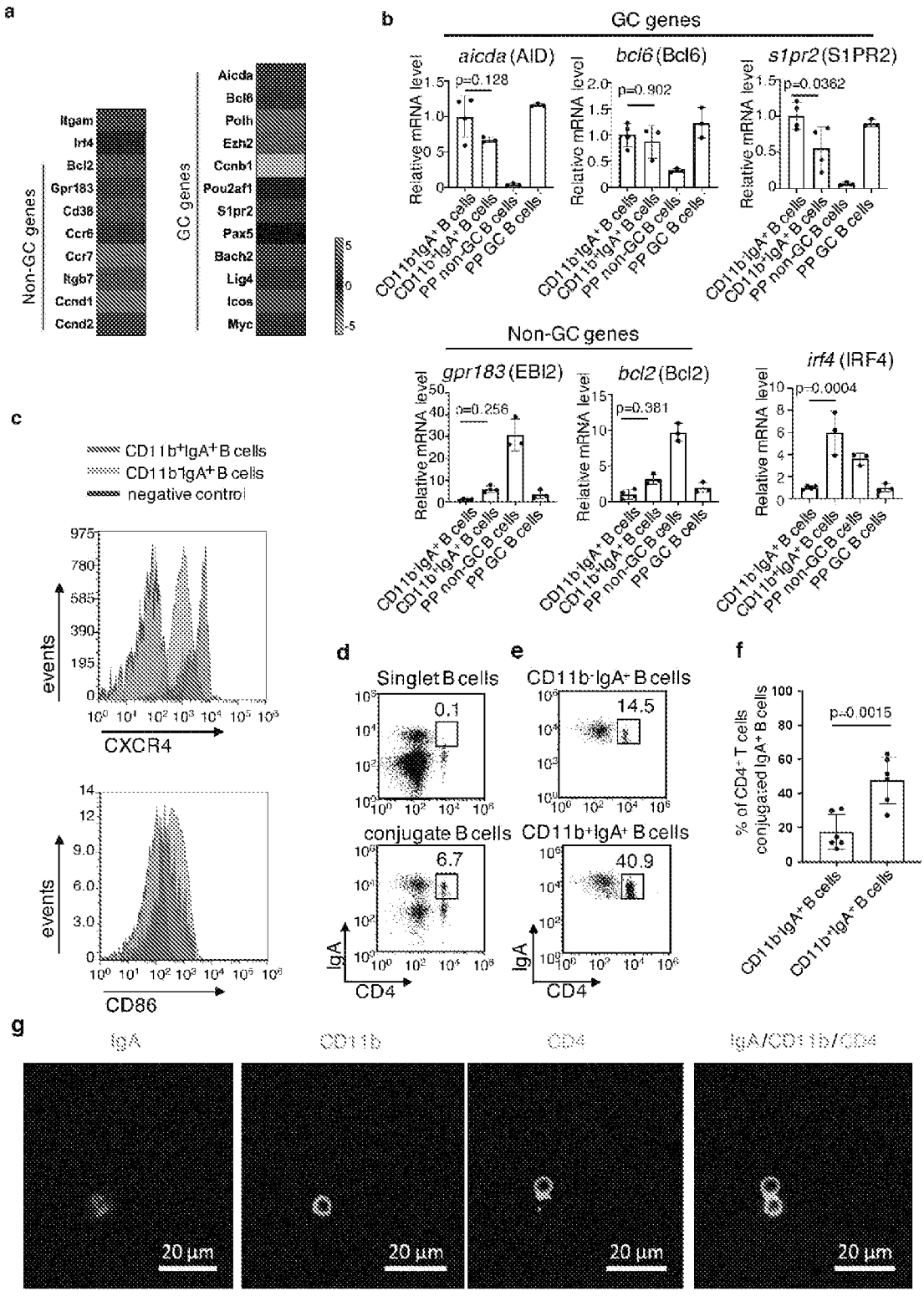
[図1]


樹状細胞（DC）
抗原
濾胞間（IF）領域
B細胞濾胞
胚中心
（GC）
pre-GC
B細胞
形質細胞
低親和性
抗体
形質細胞
高親和性
抗体

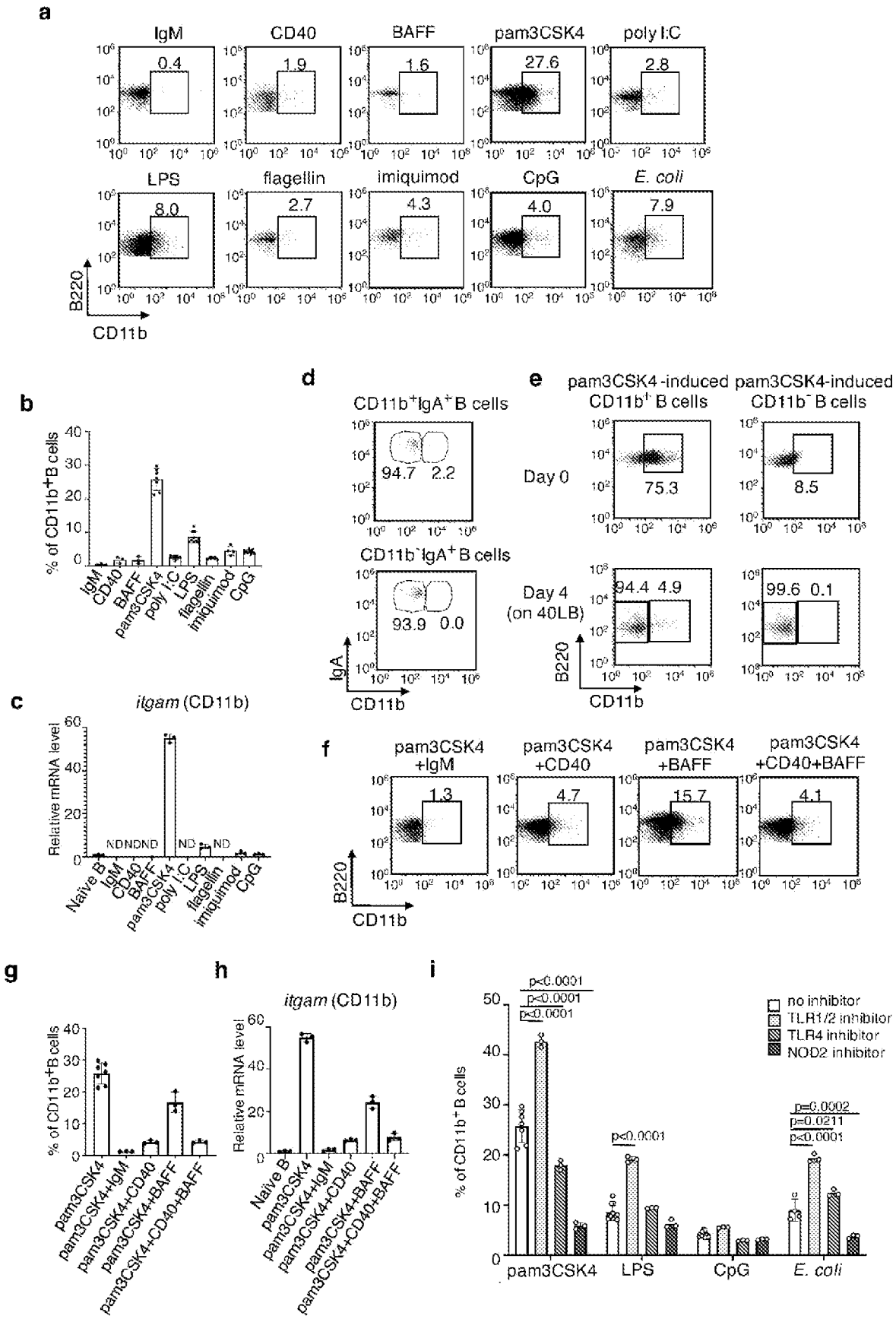
[図2]


a
PP B cells
8.2
0.2
IgA
CD11b
b
CD11b⁻IgA⁺B cells
CD11b⁺IgA⁺B cells
70.2
76.3
PNA
B220
c
CD11b⁻IgA⁺B cells
CD11b⁺IgA⁺B cells
88.3
82.0
Fas
B220
g
One hour post transfer
200 μm
h
Forty hours post transfer
200 μm
GC
IF
100 μm

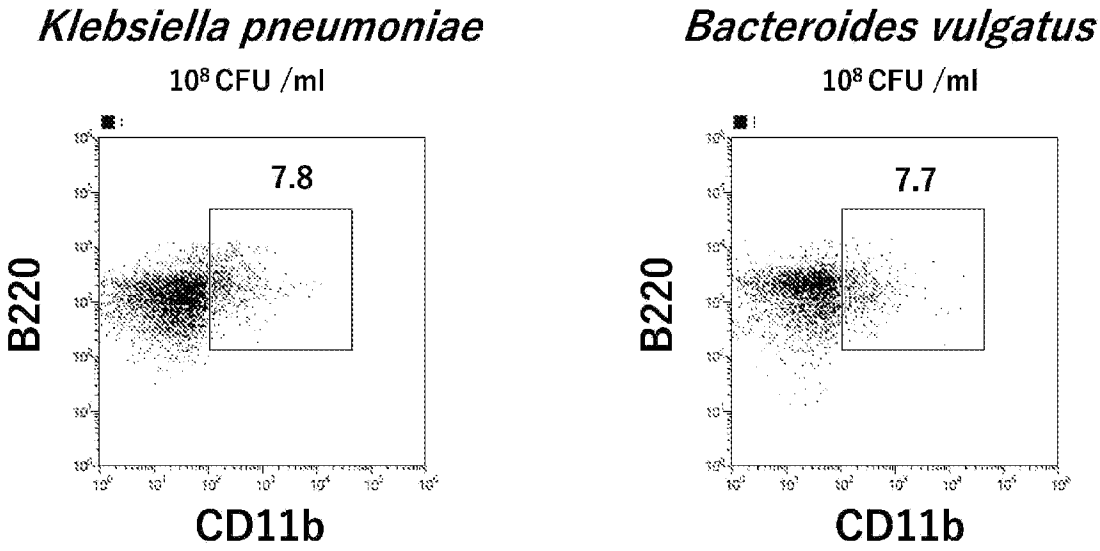
[図3]


a
Non-GC genes
Itgam
Irf4
Bcl2
Gpr183
Cd38
Ccr6
Ccr7
Itgb7
Ccnd1
Ccnd2
GC genes
Aicda
Bcl6
Polh
Ezh2
Ccnb1
Pou2af1
S1pr2
Pax5
Bach2
Lig4
Icos
Myc
5
0
-5
b
GC genes
aicda (AID)
bcl6 (Bcl6)
s1pr2 (S1PR2)
Relative mRNA level
p=0.128
p=0.902
p=0.0362
CD11b-IgA+ B cells
CD11b+IgA+ B cells
PP non-GC B cells
PP GC B cells
Non-GC genes
gpr183 (EBI2)
bcl2 (Bcl2)
irf4 (IRF4)
p=0.256
p=0.381
p=0.0004
c
CD11b+IgA+ B cells
CD11b-IgA+ B cells
negative control
events
CXCR4
CD86
d
Singlet B cells
0.1
conjugate B cells
6.7
IgA
CD4
e
CD11b-IgA+ B cells
14.5
CD11b+IgA+ B cells
40.9
f
% of CD4+ T cells conjugated IgA+ B cells
p=0.0015
g
IgA
CD11b
CD4
IgA/CD11b/CD4
20 μm

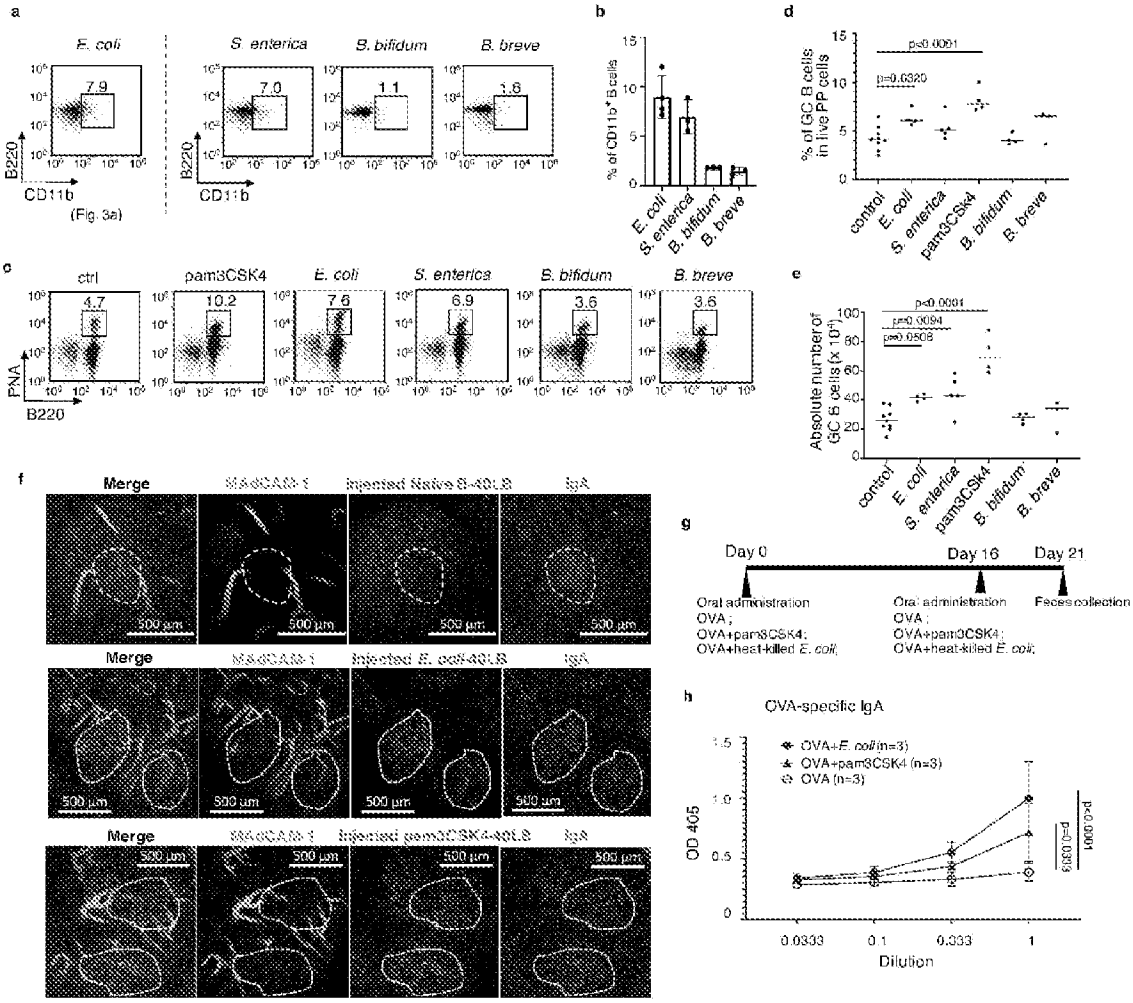
[図4-1]


a
IgM
CD40
BAFF
pam3CSK4
poly I:C
LPS
flagellin
imiquimod
CpG
E. coli
0.4
1.9
1.6
27.6
2.8
8.0
2.7
4.3
4.0
7.9
B220
CD11b
b
% of CD11b+B cells
c
itgam (CD11b)
Relative mRNA level
Naive B
ND
d
CD11b+IgA+ B cells
94.7 2.2
CD11b-IgA+ B cells
93.9 0.0
IgA
e
pam3CSK4 -induced CD11b+ B cells
pam3CSK4-induced CD11b- B cells
Day 0
75.3
8.5
Day 4 (on 40LB)
94.4 4.9
99.6 0.1
f
pam3CSK4 +IgM
pam3CSK4 +CD40
pam3CSK4 +BAFF
pam3CSK4 +CD40+BAFF
1.3
4.7
15.7
4.1
g
h
i
p<0.0001
p=0.0002
p=0.0211
no inhibitor
TLR1/2 inhibitor
TLR4 inhibitor
NOD2 inhibitor

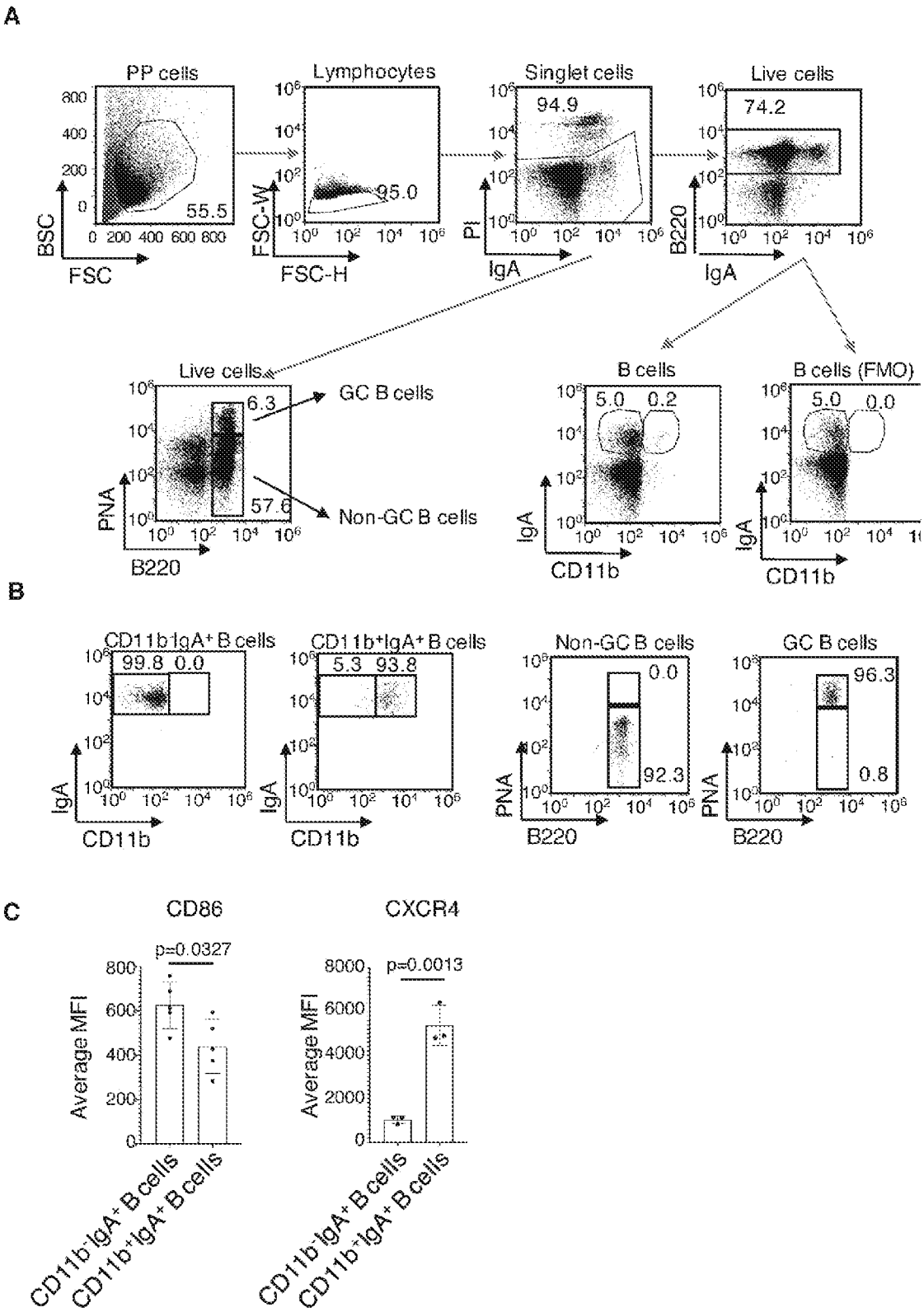
[図4-2]


Klebsiella pneumoniae
10⁸ CFU /ml
7.8
B220
CD11b
Bacteroides vulgatus
10⁸ CFU /ml
7.7
B220
CD11b

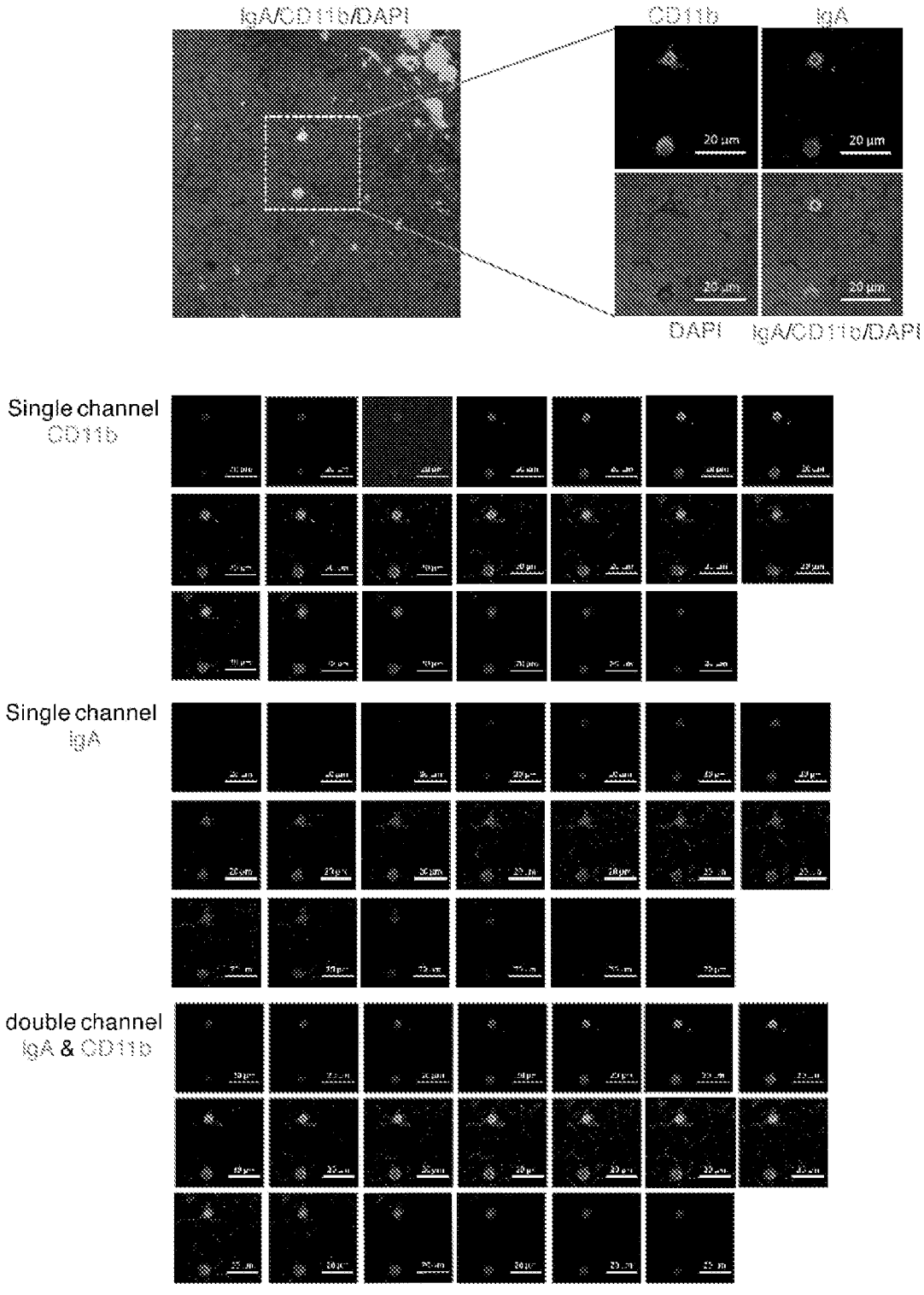
[図5]


a
E. coli
S. enterica
B. bifidum
B. breve
7.9
7.0
1.1
1.6
B220
CD11b
(Fig. 3a)
b
% of CD11b+ B cells
E. coli
S. enterica
B. bifidum
B. breve
d
% of GC B cells in live PP cells
p<0.0001
p=0.0320
control
E. coli
S. enterica
pam3CSK4
B. bifidum
B. breve
c
ctrl
pam3CSK4
E. coli
S. enterica
B. bifidum
B. breve
4.7
10.2
7.6
6.9
3.6
3.6
PNA
B220
e
Absolute number of GC B cells (x 10⁴)
p<0.0001
p=0.0094
p=0.0508
f
Merge
MAdCAM-1
Injected Naive B-401.B
IgA
Injected E. coli-401.B
Injected pam3CSK4-401.B
500 μm
g
Day 0
Day 16
Day 21
Oral administration
OVA;
OVA+pam3CSK4;
OVA+heat-killed E. coli;
Feces collection
h
OVA-specific IgA
OVA+E. coli (n=3)
OVA+pam3CSK4 (n=3)
OVA (n=3)
OD 405
Dilution
p<0.0001
p=0.0313

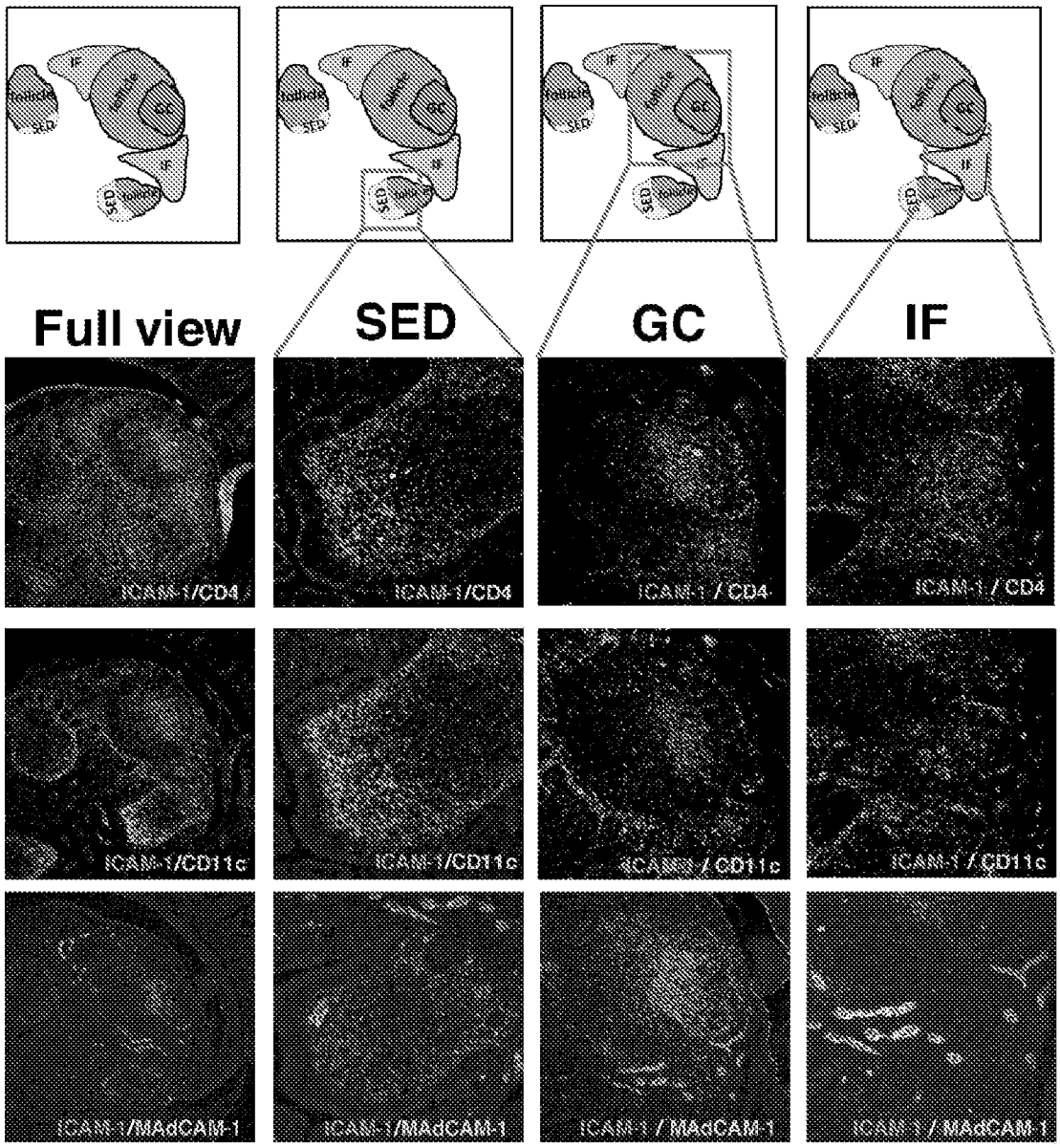
[図6]


A
PP cells
Lymphocytes
Singlet cells
Live cells
55.5
95.0
94.9
74.2
BSC
FSC
FSC-W
FSC-H
PI
IgA
B220
Live cells
GC B cells
Non-GC B cells
6.3
57.6
PNA
B220
B cells
B cells (FMO)
5.0
0.2
5.0
0.0
IgA
CD11b
B
CD11b-IgA+ B cells
CD11b+IgA+ B cells
Non-GC B cells
GC B cells
99.8
0.0
5.3
93.8
0.0
92.3
96.3
0.8
IgA
CD11b
PNA
B220
C
CD86
CXCR4
p=0.0327
p=0.0013
Average MFI
CD11b-IgA+ B cells
CD11b+IgA+ B cells

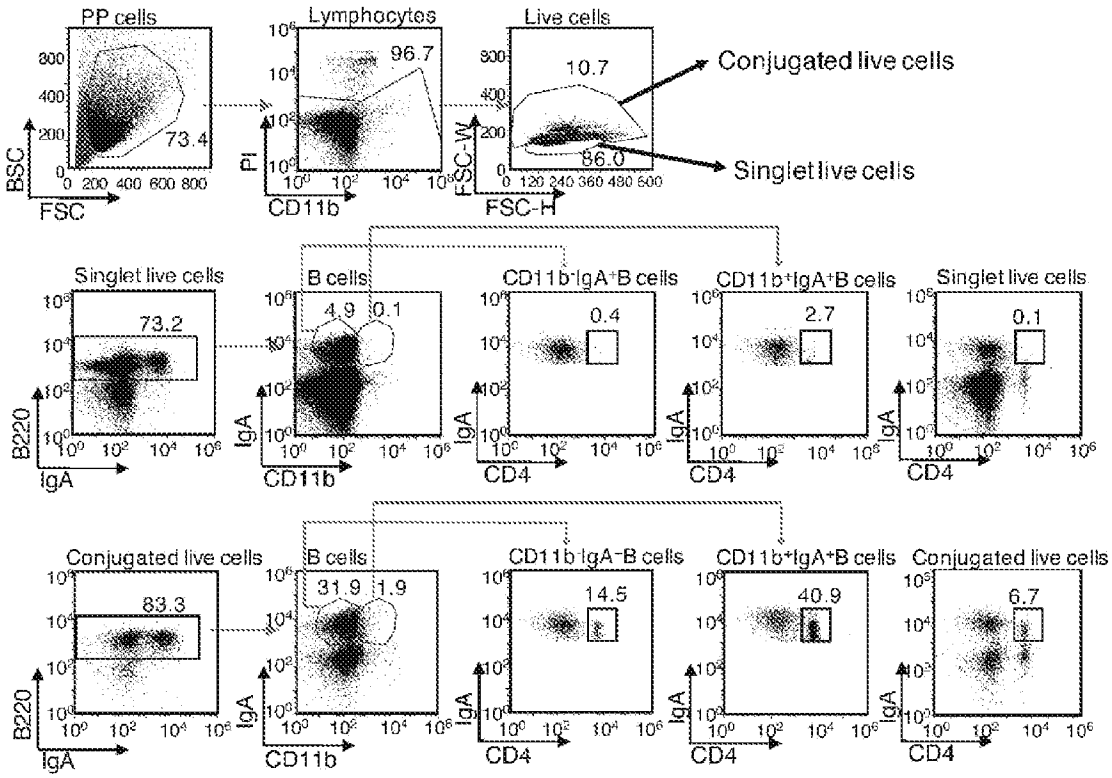
[図7]


IgA/CD11b/DAPI
CD11b
IgA
20 μm
20 μm
DAPI
IgA/CD11b/DAPI
Single channel
CD11b
Single channel
IgA
double channel
IgA & CD11b

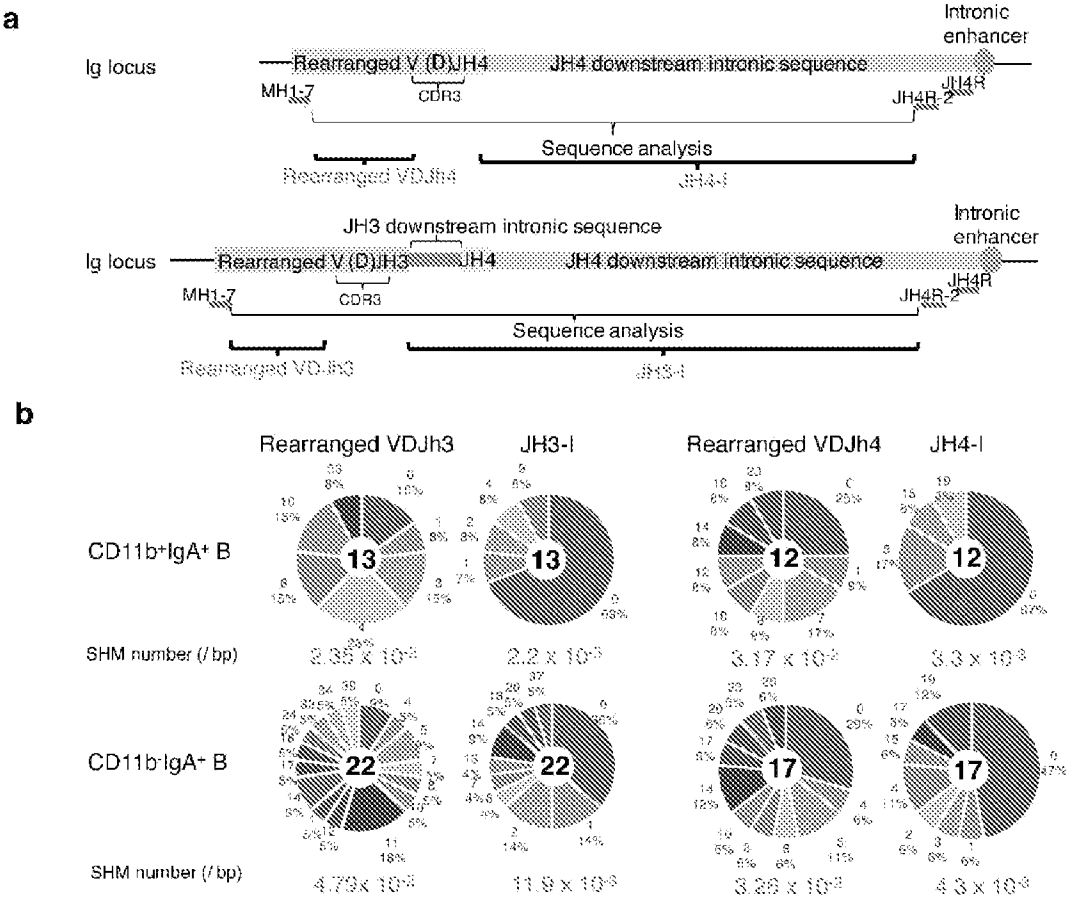
[図8]


Full view
SED
GC
IF
ICAM-1/CD4
ICAM-1/CD4
ICAM-1 / CD4
ICAM-1 / CD4
ICAM-1/CD11c
ICAM-1/CD11c
ICAM-1 / CD11c
ICAM-1 / CD11c
ICAM-1/MAdCAM-1
ICAM-1/MAdCAM-1
ICAM-1 / MAdCAM-1
ICAM-1 / MAdCAM-1

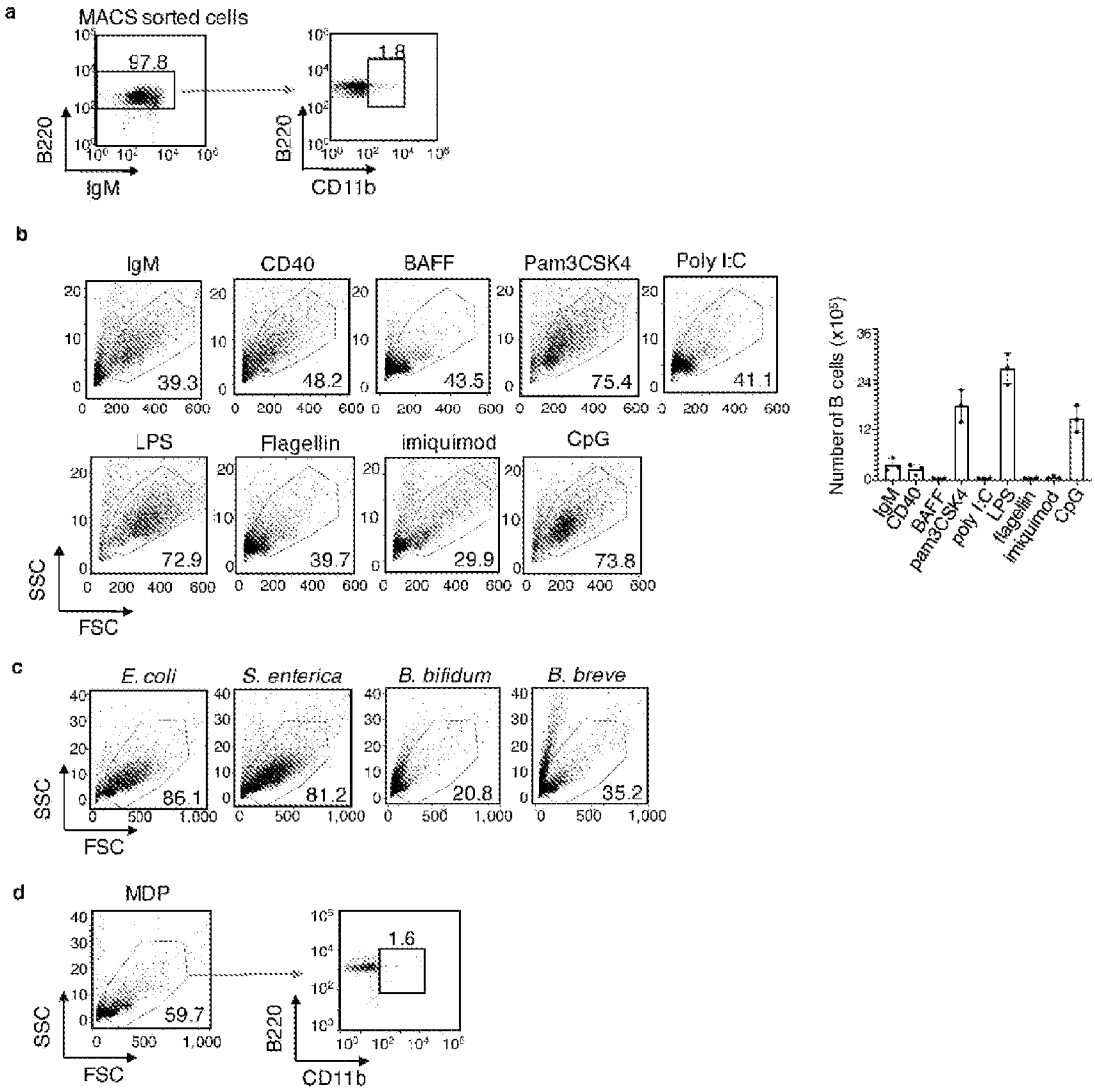
[図9]


PP cells
Lymphocytes
Live cells
73.4
96.7
10.7
86.0
Conjugated live cells
Singlet live cells
BSC
FSC
PI
CD11b
FSC-W
FSC-H
Singlet live cells
B cells
CD11b-IgA+B cells
CD11b+IgA+B cells
Singlet live cells
73.2
4.9
0.1
0.4
2.7
0.1
B220
IgA
CD11b
CD4
Conjugated live cells
B cells
CD11b-IgA-B cells
CD11b+IgA+B cells
Conjugated live cells
83.3
31.9
1.9
14.5
40.9
6.7

[図10]

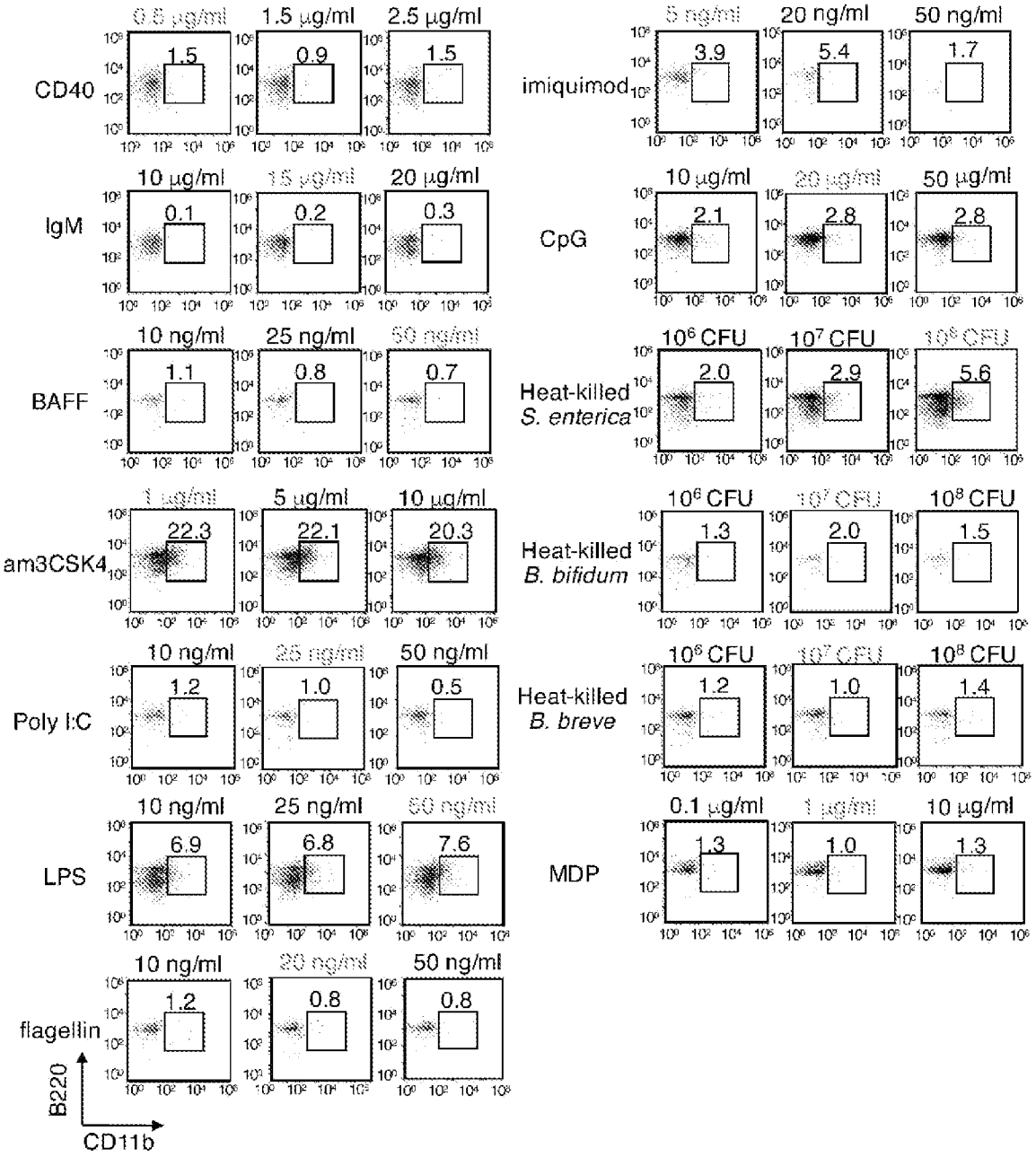

a
Ig locus
Rearranged V (D)JH4
JH4 downstream intronic sequence
Intronic enhancer
MH1-7
CDR3
JH4R-2
JH4R
Sequence analysis
Rearranged VDJh4
JH4-I
JH3 downstream intronic sequence
Rearranged V (D)JH3
JH4
Rearranged VDJh3
JH3-I
b
Rearranged VDJh3
JH3-I
Rearranged VDJh4
JH4-I
CD11b+IgA+ B
CD11b-IgA+ B
SHM number (/ bp)
2.35 x 10-2
2.2 x 10-2
3.17 x 10-2
3.3 x 10-2
4.79x 10-2
11.9 x 10-2
3.26 x 10-2
4.3 x 10-2

[図11-1]

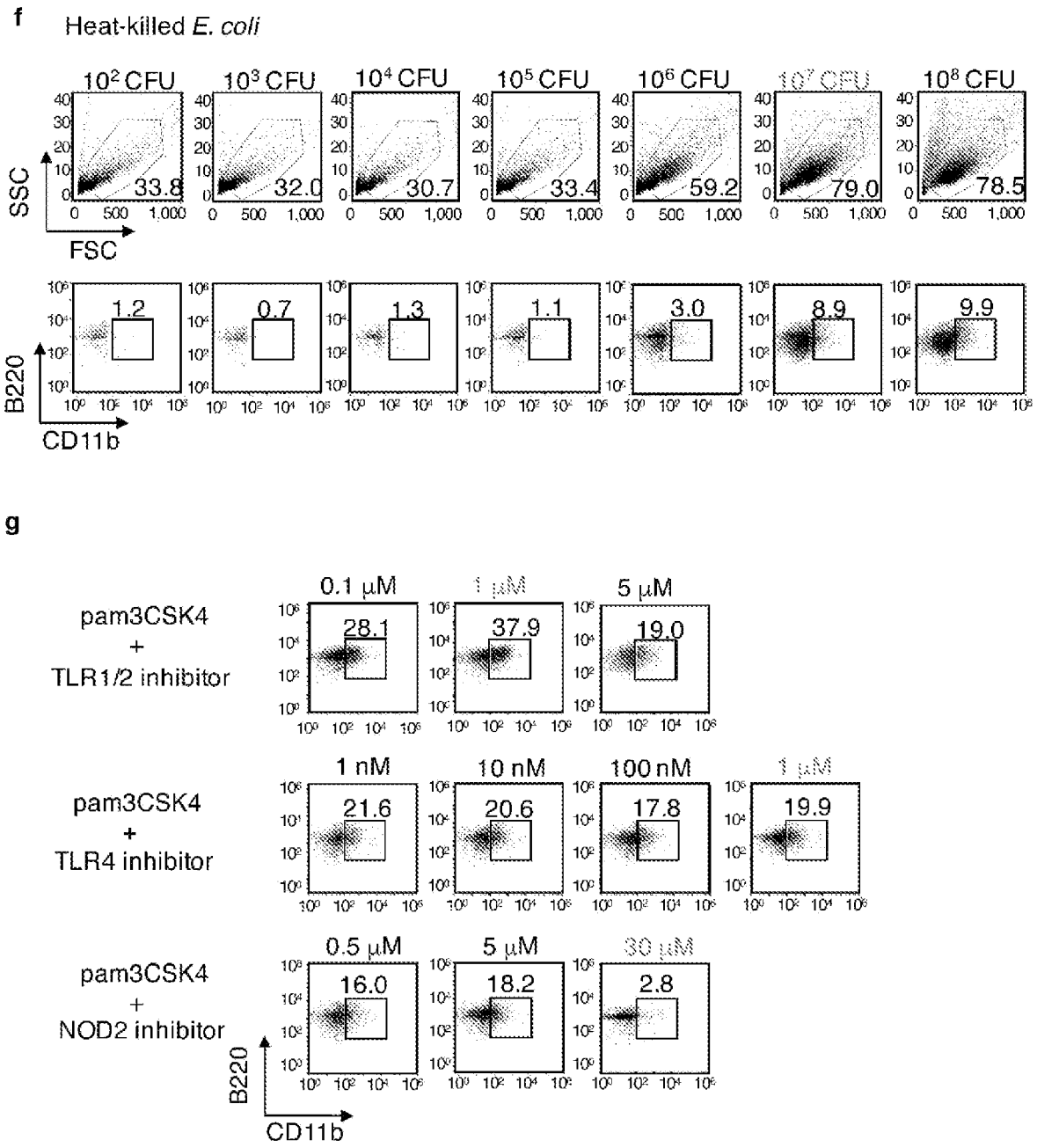

a
MACS sorted cells
97.8
1.8
B220
IgM
CD11b
b
IgM
CD40
BAFF
Pam3CSK4
Poly I:C
39.3
48.2
43.5
75.4
41.1
LPS
Flagellin
imiquimod
CpG
72.9
39.7
29.9
73.8
SSC
FSC
Number of B cells (x10⁵)
IgM
CD40
BAFF
pam3CSK4
poly I:C
LPS
flagellin
imiquimod
CpG
c
E. coli
S. enterica
B. bifidum
B. breve
86.1
81.2
20.8
35.2
SSC
FSC
d
MDP
59.7
1.6
SSC
FSC
B220
CD11b

[図11-2]

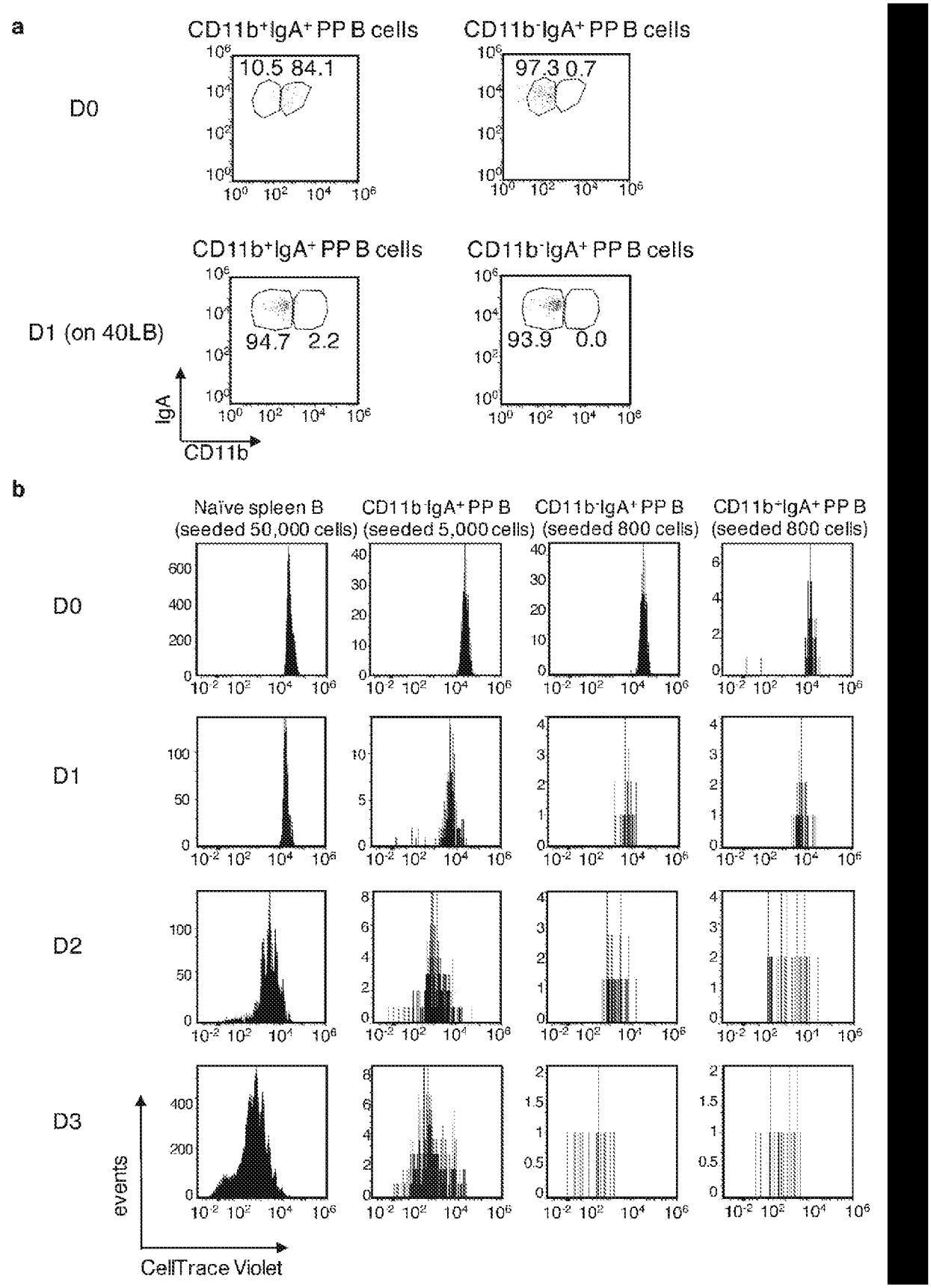
e


0.5 μg/ml
1.5 μg/ml
2.5 μg/ml
CD40
1.5
0.9
1.5
5 ng/ml
20 ng/ml
50 ng/ml
imiquimod
3.9
5.4
1.7
10 μg/ml
15 μg/ml
20 μg/ml
IgM
0.1
0.2
0.3
10 μg/ml
20 μg/ml
50 μg/ml
CpG
2.1
2.8
2.8
10 ng/ml
25 ng/ml
50 ng/ml
BAFF
1.1
0.8
0.7
10^6 CFU
10^7 CFU
10^8 CFU
Heat-killed
S. enterica
2.0
2.9
5.6
1 μg/ml
5 μg/ml
10 μg/ml
am3CSK4
22.3
22.1
20.3
10^6 CFU
10^7 CFU
10^8 CFU
Heat-killed
B. bifidum
1.3
2.0
1.5
10 ng/ml
25 ng/ml
50 ng/ml
Poly I:C
1.2
1.0
0.5
10^6 CFU
10^7 CFU
10^8 CFU
Heat-killed
B. breve
1.2
1.0
1.4
10 ng/ml
25 ng/ml
50 ng/ml
LPS
6.9
6.8
7.6
0.1 μg/ml
1 μg/ml
10 μg/ml
MDP
1.3
1.0
1.3
10 ng/ml
20 ng/ml
50 ng/ml
flagellin
1.2
0.8
0.8
B220
CD11b

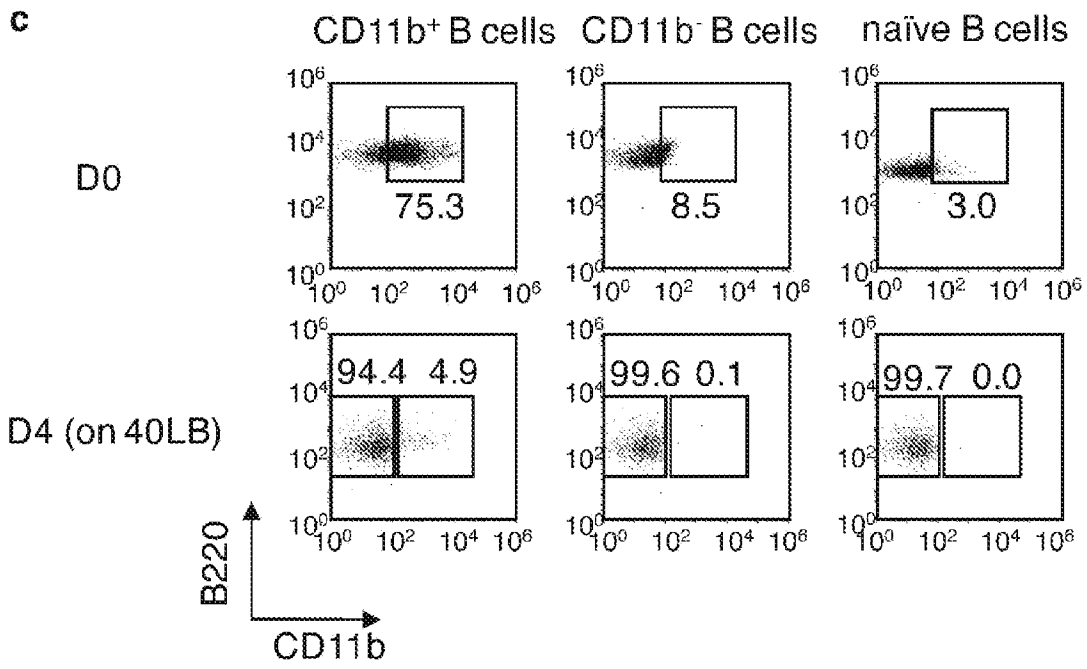
[図11-3]


f
Heat-killed E. coli
10² CFU
10³ CFU
10⁴ CFU
10⁵ CFU
10⁶ CFU
10⁷ CFU
10⁸ CFU
33.8
32.0
30.7
33.4
59.2
79.0
78.5
SSC
FSC
1.2
0.7
1.3
1.1
3.0
8.9
9.9
B220
CD11b
g
pam3CSK4
+
TLR1/2 inhibitor
0.1 μM
1 μM
5 μM
28.1
37.9
19.0
pam3CSK4
+
TLR4 inhibitor
1 nM
10 nM
100 nM
1 μM
21.6
20.6
17.8
19.9
pam3CSK4
+
NOD2 inhibitor
0.5 μM
5 μM
30 μM
16.0
18.2
2.8
B220
CD11b

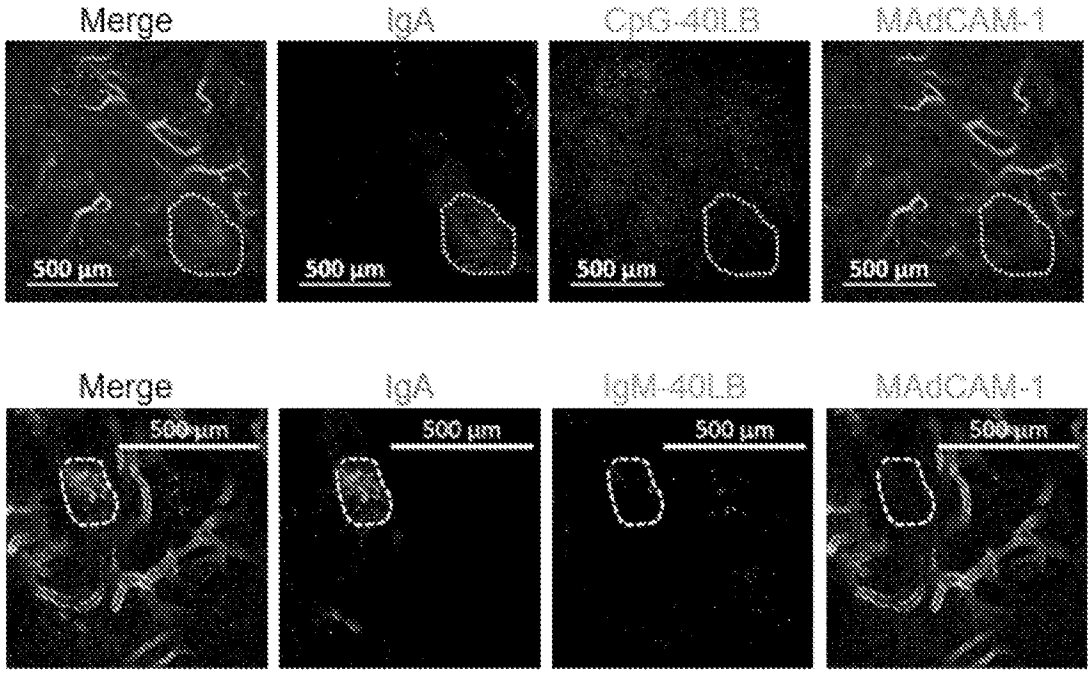
[図12-1]


a
CD11b+IgA+ PP B cells
CD11b-IgA+ PP B cells
D0
10.5 84.1
97.3 0.7
D1 (on 40LB)
94.7 2.2
93.9 0.0
IgA
CD11b
b
Naïve spleen B (seeded 50,000 cells)
CD11b+IgA+ PP B (seeded 5,000 cells)
CD11b-IgA+ PP B (seeded 800 cells)
CD11b+IgA+ PP B (seeded 800 cells)
D0
D1
D2
D3
events
CellTrace Violet

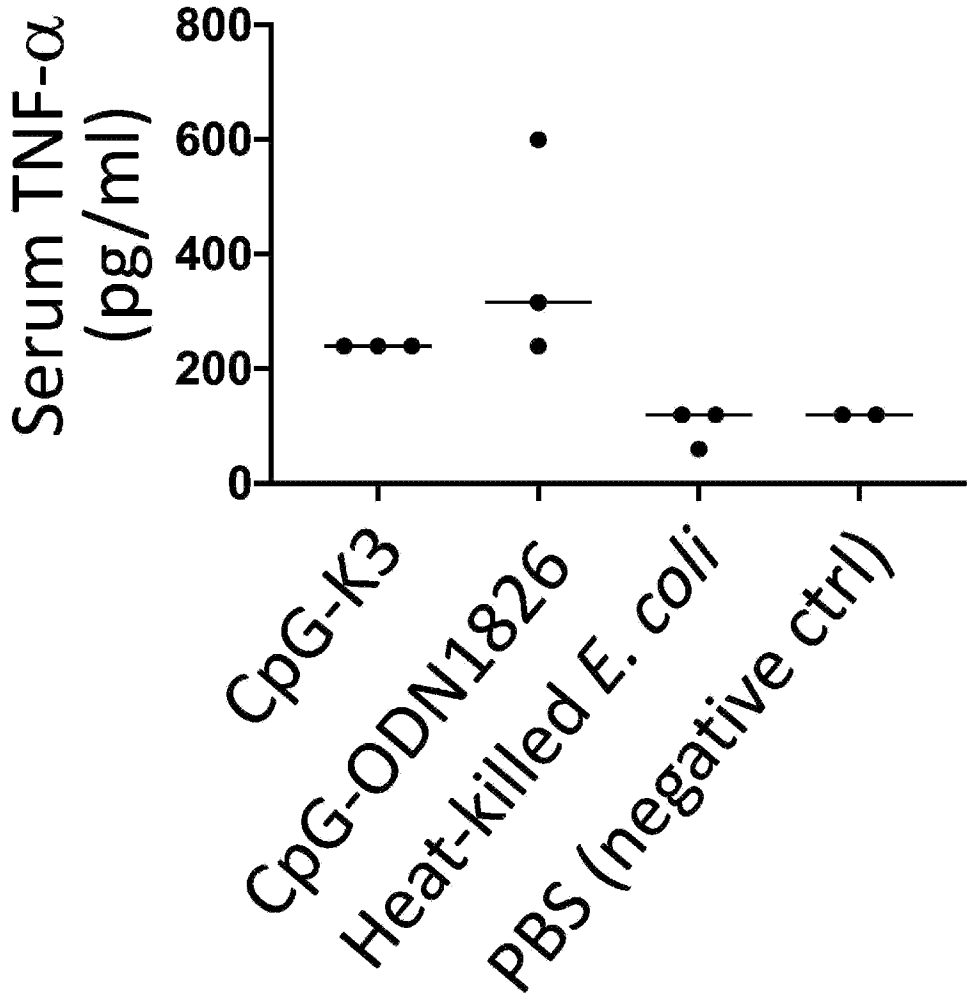
[図12-2]


c
CD11b+ B cells
CD11b- B cells
naïve B cells
D0
D4 (on 40LB)
75.3
8.5
3.0
94.4 4.9
99.6 0.1
99.7 0.0
B220
CD11b

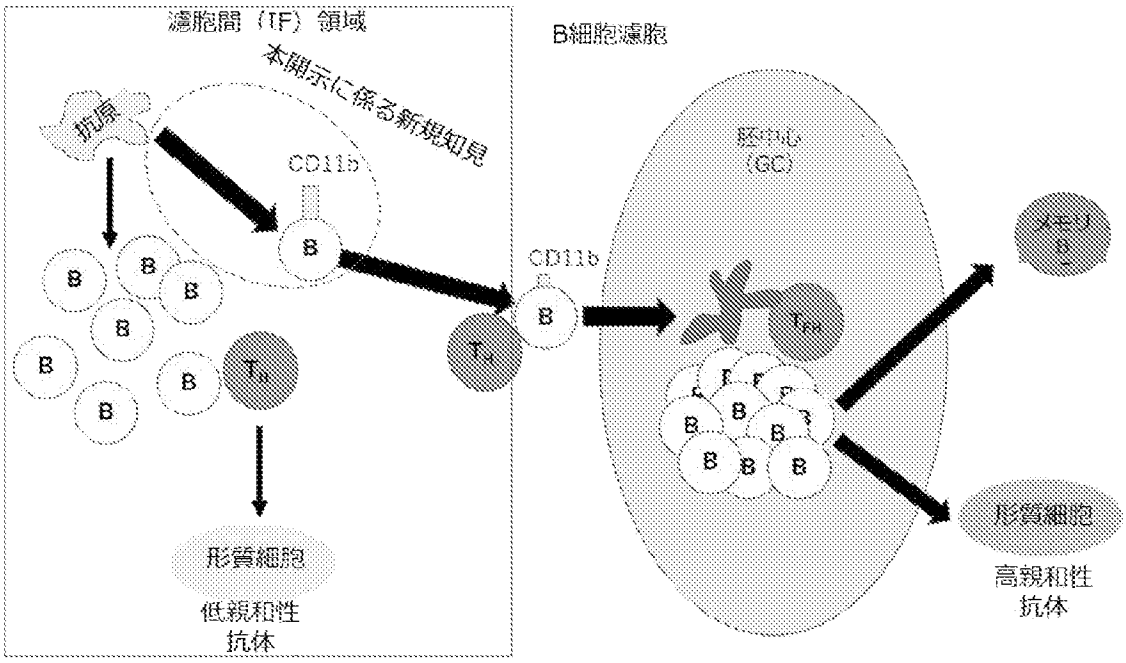
[図13]


Merge
IgA
CpG-40LB
MAdCAM-1
500 μm
Merge
IgA
IgM-40LB
MAdCAM-1
500 μm

[図14]


Serum TNF-α (pg/ml)
800
600
400
200
0
CpG-K3
CpG-ODN1826
Heat-killed E. coli
PBS (negative ctrl)

[図15]


濾胞間（TF）領域
本開示に係る新規知見
抗原
CD11b
B
T
形質細胞
低親和性
抗体
B細胞濾胞
CD11b
(GC)
形質細胞
高親和性
抗体

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/043424

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 45/00(2006.01)i; ***A61P 1/00***(2006.01)i; ***A61P 37/04***(2006.01)i; ***A23L 33/135***(2016.01)i; ***A61K 35/74***(2015.01)i
FI: A61K45/00 ZNA; A61P1/00; A61P37/04; A23L33/135; A61K35/74 A

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K45/00; A61P1/00; A61P37/04; A23L33/135; A61K35/74

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/034318 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORP. NARA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 22 February 2018 (2018-02-22) claims, example 2	1-8
Y		1-14
Y	PARK, S. et al. CD11b regulates antibody class switching via induction of AID. Molecular Immunology. 2017, vol. 87, pp. 47-59, http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2017.04.005 abstract, page 48, left column, last paragraph, page 49, left column, last paragraph to page 54, left column, third paragraph, page 58, left column, first paragraph	1-14
Y	森田直樹ほか, 腸管IgA抗体による腸内細菌制御, 医学のあゆみ, 28 August 2021, vol. 278, no. 9, pp. 757-760, non-official translation (MORITA, Naoki et al. Regulation of intestinal bacteria by intestinal antibody IgA. History of Medicine.) abstract, page 758, second paragraph to right column, first paragraph, page 759, right column, second paragraph to page 760, right column, first paragraph	1-14
X	WO 2019/156251 A1 (NOSTER INC.) 15 August 2019 (2019-08-15) claims, paragraphs [0009], [0046]	1-6, 8

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
31 January 2023	**07 February 2023**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/043424

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	GAO, P. et al. Integrin CD11b provides a new marker of pre-germinal center IgA+ B cells in murine Peyer's patches. International Immunology. 31 December 2021, vol. 34, no. 5, pp. 249-261, https://doi.org/10.1093/intimm/dxab113 abstract	1-14
P, Y		1-14
A	GAO, P. et al., IgA+ B cells express CD11b in murine Peyer's patches, 日本免疫学会総会・学術集会記録, 2016, vol. 45, p. 97, non-official translation (Japanese Society for Immunology General Meeting/Academic Meeting Records.) 2-B-W16-5-P	1-14
A	新蔵礼子, 腸管における免疫応答の特殊性とその要因 腸管免疫の恒常性における免疫グロブリン遺伝子の体細胞突然変異の重要性, 臨床免疫・アレルギー科, 2012, vol. 58, no. 4, pp. 361-367, non-official translation (SHINKURA, Reiko. Specificity of immune response in the intestinal tract and its factors, Importance of somatic immunoglobulin gene mutations in intestinal immune homeostasis. Department of Clinical Immunology and Allergy.) particularly, entire text	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/043424

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

"The form of Annex C/ST.25 text file" above shall read as "the form of ST.26.".

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/043424

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2018/034318 A1	22 February 2018	US 2019/0192479 A1 claims, example 2 EP 3501519 A1 CN 109982695 A	
WO 2019/156251 A1	15 August 2019	US 2020/0390828 A1 claims, paragraphs [0020]-[0022], [0082] EP 3750548 A1 CN 112105371 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/043424

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K 45/00(2006.01)i; A61P 1/00(2006.01)i; A61P 37/04(2006.01)i; A23L 33/135(2016.01)i; A61K 35/74(2015.01)i
FI: A61K45/00 ZNA; A61P1/00; A61P37/04; A23L33/135; A61K35/74 A

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K45/00; A61P1/00; A61P37/04; A23L33/135; A61K35/74

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２３年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	WO 2018/034318 A1 (国立大学法人　奈良先端科学技術大学院大学) 22.02.2018 (2018-02-22) 請求の範囲、例２	1-8 1-14
Y	PARK, S., et al., CD11b regulates antibody class switching via induction of AID, Molecular Immunology, 2017, Vol.87, pp.47-59, http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2017.04.005 Abstract、第48頁左欄最終段落、第49頁左欄最終段落－第54頁左欄第3段落、第第58頁左欄第1段落	1-14
Y	森田 直樹 ほか, 腸管ＩｇＡ抗体による腸内細菌制御, 医学のあゆみ, 2021.08.28, Vol.278, No.9, pp.757-760 要約、第758頁第2段落－右欄第1段落、第759頁右欄第2段落－第760頁右欄第1段落	1-14
X	WO 2019/156251 A1 (Ｎｏｓｔｅｒ株式会社) 15.08.2019 (2019-08-15) 請求の範囲、[0009]、[0046]	1-6,8

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
31.01.2023	07.02.2023

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
佐々木　大輔 4U 3962

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
P, X	GAO, P., et al., Integrin CD11b provides a new marker of pre-germinal center IgA+ B cells in murine Peyer's patches, International Immunology, 2021.12.31, Vol.34, No.5, pp.249-261, https://doi.org/10.1093/intimm/dxab113 Abstract	1-14
P, Y		1-14
A	GAO, P., et al., IgA+ B cells express CD11b in murine Peyer's patches, 日本免疫学会総会・学術集会記録, 2016, Vol.45, p.97 2-B-W16-5-P	1-14
A	新藏 礼子, 腸管における免疫応答の特殊性とその要因　腸管免疫の恒常性における免疫グロブリン遺伝子の体細胞突然変異の重要性, 臨床免疫・アレルギー科, 2012, Vol.58, No.4, pp.361-367 特に全文	1-14

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/043424

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25 テキストファイル形式」は「ST.26 形式」と読み替える。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/043424

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2018/034318 A1	22.02.2018	US 2019/0192479 A1 Claims, Example 2 EP 3501519 A1 CN 109982695 A	
WO 2019/156251 A1	15.08.2019	US 2020/0390828 A1 Claims, [0020]-[0022], [0082] EP 3750548 A1 CN 112105371 A	