(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118613283 A
(43)申请公布日 2024.09.06

(21)申请号 202280090108.7
(22)申请日 2022.11.24
(30)优先权数据
2021-196561 2021.12.02 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.07.25
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2022/043424 2022.11.24
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/100745 JA 2023.06.08
(71)申请人 新藏礼子
地址 日本东京都
(72)发明人 新藏礼子 高鹏
(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127
专利代理师 于洁 褚瑶杨
(51)Int.Cl.
A61K 45/00(2006.01)
A61P 1/00(2006.01)
A61P 37/04(2006.01)
A23L 33/135(2016.01)
A61K 35/74(2015.01)

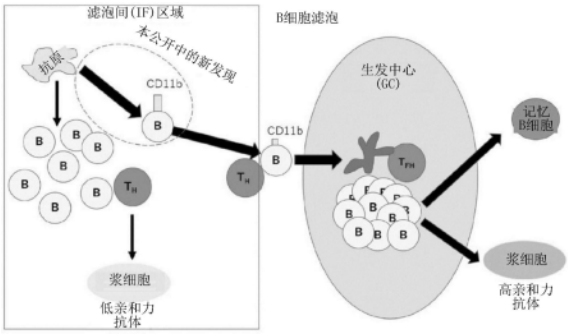
权利要求书1页 说明书30页
序列表（电子公布） 附图16页

(54)发明名称

免疫刺激组合物

(57)摘要

本公开涉及一种用于诱导活化B细胞的生发中心迁移的组合物、其制造方法或其应用，该组合物包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质。在一个方式中，本公开涉及使用诱导B细胞中的CD11b的表达的物质进行的免疫刺激、粘膜菌群的维持或改善。



CN 118613283 A

1.一种用于诱导活化B细胞的生发中心迁移的组合物,其包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质。

2.如权利要求1所述的组合物,其中,所述诱导B细胞中的CD11b的表达的物质为细菌。

3.如权利要求2所述的组合物,其中,所述诱导B细胞中的CD11b的表达的物质为γ变形菌纲或拟杆菌纲的细菌。

4.如权利要求3所述的组合物,其中,所述诱导B细胞中的CD11b的表达的物质为大肠杆菌(Escherichia coli)、肠道沙门氏菌(Salmonella enterica)、克雷伯氏肺炎杆菌(Klebsiella pneumoniae)、普通拟杆菌(Bacteroides vulgatus)或者它们的组合。

5.如权利要求1～4中任一项所述的组合物,其中,所述组合物用于治疗具有通过活化B细胞的生发中心迁移的活化而得到治疗的疾病、障碍或状态的对象。

6.如权利要求1～4中任一项所述的组合物,其中,所述组合物用于免疫刺激、健康维持或增进、粘膜菌群的维持或改善、或者感染症治疗。

7.如权利要求1～4中任一项所述的组合物,其中,所述组合物为粘膜施用疫苗佐剂。

8.如权利要求1～6中任一项所述的组合物,其中,所述组合物为选自由药物、食品、饲料、食品添加物、饲料添加物、它们的原料组合物组成的组中的形态。

9.如权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述组合物与抗原一起施用。

10.如权利要求9所述的组合物,其特征在于,所述组合物与抗原同时施用。

11.如权利要求9所述的组合物,其特征在于,所述组合物与抗原分开施用。

12.如权利要求1所述的组合物,其中,所述组合物为包含抗原的疫苗组合物。

13.如权利要求9～12中任一项所述的组合物,其中,抗原为病毒、细菌、真菌、寄生虫抗原。

14.一种诱导B细胞中的CD11b的表达、诱导该B细胞与T细胞和树突状细胞的接触、诱导活化B细胞的生发中心迁移的方法,其包括:准备包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物,并使该物质与B细胞接触。

免疫刺激组合物

技术领域

[0001] 本公开涉及一种用于诱导活化B细胞的生发中心迁移的组合物、其制造方法或者其应用,该组合物包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质。在一个方式中,本公开涉及使用诱导B细胞中的CD11b的表达的物质进行的免疫刺激、粘膜菌群的维持或改善。

背景技术

[0002] 免疫反应中的B细胞、生发中心(GC)的行为的相关研究的动机在于,其可能有助于疫苗开发(非专利文献1、2)。评价疫苗的有效性的重要标准之一是该疫苗能否有效地诱导生发中心(GC)反应,生成高亲和力的长寿命浆细胞(PC)或记忆B细胞,保护宿主免受侵入的病原体的侵害(非专利文献1、2)。在GC反应期间,B细胞会经历前GC(pre-GC)、GC、后GC(post-GC)这3个阶段(非专利文献3～5)。当受到抗原刺激时,新活化的初始B细胞与活化的记忆B细胞直接分化成滤泡外的短寿命PC;或者移动至滤泡间(IF)区域,与活化的T细胞建立稳定的相互作用(非专利文献3～8)。在T-B细胞间的相互作用后,一部分B细胞分化成低亲和力PC,其他B细胞(pre-GC B细胞)移动至GC(非专利文献3、4)。这些pre-GC B细胞首先移动至GC的暗区(DZ),生长为GC的B细胞。B细胞迅速增殖,发生体细胞超突变(SHM),改变B细胞受体(BCR)的亲和力,从而与其特异性抗原结合(非专利文献3、4)。之后,免疫球蛋白(Ig)基因发生了突变的B细胞从DZ移动至亮区(LZ),在此处借助滤泡辅助性T细胞(T_{FH})的帮助进行亲和力的选择(非专利文献3、4、8)。具有对抗原呈高亲和力的BCR的B细胞被选择为post-GC B细胞,从GC出来并最终分化成长寿命的PC或记忆B细胞,而未被选择B细胞可返回GC的DZ,进一步蓄积用于产生更高亲和力的BCR的SHM(非专利文献7)。

[0003] 据报道,为了引起GC反应,树突状细胞(DC)的有效活化是不可或缺的(非专利文献3)。因此,迄今为止的研究集中在用于刺激DC的最佳佐剂的选择上。但是,Lycke等人发现,在DC枯竭的小鼠中,B细胞从微皱褶(M)细胞中采集抗原,进而迁移至GC(非专利文献9),这表示DC的活化对于向GC中的侵入并不是必要的。即使DC被适当地启动,活化的B细胞中也仅有极小部分群体能够生长为pre-GC B细胞并进入GC(非专利文献4、6)。最近的研究中报道了,GC形成所必需的转录因子irf4在pre-GC B细胞中高表达(非专利文献10、11)。但是,pre-GC B细胞的特异性表面标记物尚未已知。因此,pre-GC B细胞的标准、哪个种类的活化B细胞进入GC、是否产生针对特定抗原的高亲和力BCR还是未知的。

[0004] 现有技术文献

[0005] 非专利文献

[0006] 非专利文献1:Turner,J.S.et al.Human germinal centres engage memory and naive B cells after influenza vaccination.Nature.586,127-132(2020).

[0007] 非专利文献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).

[0008] 非专利文献3:Mesin,L.,Ersching,J.,&Victora,G.D.Germinal center B cell

dynamics.Immunity.45.3,471-482(2016).

[0009] 非专利文献4:Kurosaki,T.,Kometani,K.,&Ise,W.Memory B cells.Nature Reviews Immunology.15.3,149-159(2015).

[0010] 非专利文献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).

[0011] 非专利文献6:Mesin,L.et al.Restricted clonality and limited germinal center reentry characterize memory B cell reactivation by boosting.Ce11.180.1,92-106(2020).

[0012] 非专利文献7:Chen,H.et al.BCR selection and affinity maturation in Peyer's patch germinal centres.Nature.582,421-425(2020).

[0013] 非专利文献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).

[0014] 非专利文献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).

[0015] 非专利文献10:Song,S.&Matthias,P.D.The Transcriptional Regulation of Germinal Center Formation.Front Immunol.10.3389(2018).

[0016] 非专利文献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).

发明内容

[0017] 活化的B细胞进入到生发中心(GC)而进行亲和力成熟,能够产生高亲和力的抗体。但是,还不清楚什么样的活化B细胞会进入GC。在此,本发明人发现了位于GC外侧的$CD11b^{+}IgA^{+}$B细胞的小群体。若将该$CD11b^{+}IgA^{+}$B细胞注入到小鼠中,则其在40小时后进入到GC中。由此提示CD11b是pre-GC IgA^{+}B细胞的新的表面标记物。此外已知,B细胞上的CD11b的表达在体外(in vitro)由pam3CSK4、热致死的大肠杆菌等细菌抗原诱导,而与树突状细胞的活化无关。另外,经口施用pam3CSK4、热致死大肠杆菌时,GC B细胞的数目在2天以内增加,粘膜抗原特异性IgA反应增强。本公开所示的结果表明,B细胞的CD11b的诱导是用于选择有效的粘膜疫苗佐剂的有希望的标记物。

[0018] 基于上述技术思想,本公开的发明人发现,在B细胞中诱导CD11b的表达的物质作为粘膜疫苗的有效佐剂起作用,可诱导高亲和力粘膜IgA抗体的产生;并且,通过该作用,粘膜等的免疫被激活,可诱导针对各种体外来源抗原的免疫;并且,通过该效果,可适当维持粘膜菌群或改善粘膜菌群,从而完成了本公开。

[0019] 在一个方式中,本公开提供一种用于诱导活化B细胞的生发中心迁移的组合物,其包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质。

[0020] 在一个方式中,本公开提供一种诱导B细胞中的CD11b的表达、诱导该B细胞与T细

胞和树突状细胞的接触、诱导活化B细胞的生发中心迁移的方法,其包括:准备包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物,并使该物质与B细胞接触。

[0021] 更具体地说,本公开提供下述方案。

[0022] [项目1]

[0023] 一种用于诱导活化B细胞的生发中心迁移的组合物,其包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质。

[0024] [项目2]

[0025] 如项目1所述的组合物,其中,上述诱导B细胞中的CD11b的表达的物质为细菌。

[0026] [项目3]

[0027] 如项目2所述的组合物,其中,上述诱导B细胞中的CD11b的表达的物质为γ变形菌纲或拟杆菌纲的细菌。

[0028] [项目4]

[0029] 如项目3所述的组合物,其中,上述诱导B细胞中的CD11b的表达的物质为大肠杆菌(Escherichia coli)、肠道沙门氏菌(Salmonella enterica)、克雷伯氏肺炎杆菌(Klebsiella pneumoniae)、普通拟杆菌(Bacteroides vulgatus)或者它们的组合。

[0030] [项目5]

[0031] 如项目1～4中任一项所述的组合物,其用于治疗具有通过活化B细胞的生发中心迁移的活化而得到治疗的疾病、障碍或状态的对象。

[0032] [项目6]

[0033] 如项目1～4中任一项所述的组合物,其用于免疫刺激、健康维持或增进、粘膜菌群的维持或改善、或者感染症治疗。

[0034] [项目7]

[0035] 如项目1～4中任一项所述的组合物,其是疫苗佐剂。

[0036] [项目8]

[0037] 如项目1～7中任一项所述的组合物,其经粘膜施用。

[0038] [项目9]

[0039] 如项目1～6中任一项所述的组合物,其为选自由药物、食品、饲料、食品添加物、饲料添加物、它们的原料组合物组成的组中的形态。

[0040] [项目10]

[0041] 如项目1所述的组合物,其用于与抗原一起施用。

[0042] [项目11]

[0043] 如项目10所述的组合物,其特征在于,其与抗原同时施用。

[0044] [项目12]

[0045] 如项目10所述的组合物,其特征在于,其与抗原分开施用。

[0046] [项目13]

[0047] 如项目1所述的组合物,其是包含抗原的疫苗组合物。

[0048] [项目14]

[0049] 如项目10～13所述的组合物,其中,抗原为病毒抗原、细菌抗原、寄生虫抗原或它们的组合。

[0050] [项目15]

[0051] 一种诱导B细胞中的CD11b的表达、诱导该B细胞与T细胞和树突状细胞的接触、诱导活化B细胞的生发中心迁移的方法,其包括:准备包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物,并使该物质与B细胞接触。

[0052] 另外,在另一方式中,本公开提供下述方案。

[0053] [项目16]

[0054] 一种用于治疗具有通过活化B细胞的生发中心迁移的活化而得到治疗的疾病、障碍或状态的对象的方法,其包括对该对象施用包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物。

[0055] [项目17]

[0056] 如项目16所述的方法,其中,上述诱导B细胞中的CD11b的表达的物质为细菌。

[0057] [项目18]

[0058] 如项目16所述的方法,其中,上述诱导B细胞中的CD11b的表达的物质为γ变形菌纲或拟杆菌纲的细菌。

[0059] [项目19]

[0060] 如项目16所述的方法,其中,上述诱导B细胞中的CD11b的表达的物质为大肠杆菌(Escherichia coli)、肠道沙门氏菌(Salmonella enterica)、克雷伯氏肺炎杆菌(Klebsiella pneumoniae)、普通拟杆菌(Bacteroides vulgatus)或者它们的组合。

[0061] [项目20]

[0062] 如项目16所述的方法,其中,通过活化B细胞的生发中心迁移的活化而得到治疗的疾病、障碍或状态的治疗为免疫刺激、健康维持或增进、粘膜菌群的维持或改善、或者感染症治疗。

[0063] [项目21]

[0064] 如项目16所述的方法,其中,上述组合物被制剂化为疫苗佐剂。

[0065] [项目22]

[0066] 如项目16所述的方法,其中,上述组合物经粘膜施用。

[0067] [项目23]

[0068] 如项目16所述的方法,其中,上述组合物为选自由药物、食品、饲料、食品添加物、饲料添加物、它们的原料组合物组成的组中的形态。

[0069] [项目24]

[0070] 如项目16所述的方法,其特征在于,上述组合物与抗原一起施用。

[0071] [项目25]

[0072] 如项目16所述的方法,其特征在于,上述组合物与抗原同时施用。

[0073] [项目26]

[0074] 如项目16所述的方法,其特征在于,上述组合物与抗原分开施用。

[0075] [项目27]

[0076] 如项目16所述的方法,其中,上述组合物是包含抗原的疫苗组合物。

[0077] [项目28]

[0078] 如项目24～27所述的方法,其中,上述抗原是病毒、细菌、真菌、寄生虫抗原。

附图说明

[0079] 图1是示出仅一部分B细胞侵入到生发中心的示意图。

[0080] 图2是示出$CD11b^+IgA^+$PP B细胞位于GC的外侧并朝向GC移动的图。a是示出WT小鼠的PP $B220^+$B细胞中的IgA和CD11b的表达的代表性流式细胞术数据。b、c是利用B220和PNA(b)、或者B220和Fas(c)进行染色的$CD11b^+IgA^+$PP B细胞中的GC B细胞的流式细胞图。a-c中的数字表示细胞的比例。d是利用PNA、CD11b、IgA、DAPI进行染色的PP截面的显微镜照片。在GC(虚线的圆)的外侧观察到2个$CD11b^+IgA^+$双阳性细胞(黄色箭头)。e是将SED、IF、GC区域利用ICAM-1、CD11c、CD4(左侧照片)、MAdCAM-1(右侧照片)、DAPI进行染色的图像。各区域标注在中央的项目中。比例尺为500μm。f图像示出了$CD11b^+IgA^+$B细胞(标记为箭头1至7)位于所示的区域。GC和IF区域用虚线示出。g:将$CD11b^-IgA^+$B细胞和$CD11b^+IgA^+$B细胞分别直接注入至IgA^-Cre/YC3.60^{flox}小鼠的PP。g是示出注入1小时后移植至IgA^-Cre/YC3.60^{flox}小鼠的PP的$CD11b^+IgA^+$PP B细胞(上)或$CD11b^-IgA^+$PP B细胞(下)的位置的代表图像。GC边界(虚线)是IgA^-YC3.60富集的区域。比例尺为200μm。h:在注入40小时后,利用显微镜观察具有所注入的$CD11b^+IgA^+$B细胞的PP。比例尺为200μm。数据是3次独立实验的代表。

[0081] 图3是示出$CD11b^+IgA^+$B细胞为与$CD4^+$T细胞相互作用的pre-GC B细胞的图。a是示出基于微阵列分析得到的所示基因的表达量的对数倍变化($CD11b^+IgA^+$B细胞/$CD11b^-IgA^+$B细胞)的热图。b:利用qPCR对所示的GC特异性基因、非GC特异性基因和pre-GC基因的表达水平进行分析,相对于β肌动蛋白基因的表达水平进行标准化。将$CD11b^-IgA^+$B细胞的相对表达水平的平均值设为1。各点表示技术上的3次重复的平均值。条状图表示3～4次独立测定的平均值(±SD)。c是示出$CD11b^+IgA^+$B细胞和$CD11b^-IgA^+$B细胞中的CXCR4和CD86的表面标记物的表达的流式细胞术的柱状图。d是与单态(singlet)IgA^+B细胞结合的$CD4^+IgA^+$细胞的流式细胞术数据。e是与$CD11b^-IgA^+$和$CD11b^+IgA^+$PP B细胞结合的$CD4^+$T细胞的流式细胞术数据。f是与$CD11b^+IgA^+$和$CD11b^-IgA^+$PP B细胞结合的$CD4^+$T细胞的比例。条状图表示独立的6次测定的平均值(±SD)。g是对$CD11b^+IgA^+$PP B细胞与$CD4^+$T细胞结合的情形进行拍摄的图。比例尺为20μm。

[0082] 图4-1是示出细菌的抗原诱导B细胞的CD11b表达的图。a、f是利用流式细胞术对给予了3天指定刺激的脾脏初始B细胞的CD11b的表达进行分析的数据。b、g是各刺激中的$CD11b^+$B细胞的比例。c、h是利用qPCR对给予指定刺激后分离出的B细胞的整联蛋白αM(itgam)进行分析的数据。d是在40LB细胞上培养1天后分离出的$CD11b^+IgA^+$和$CD11b^-IgA^+$PP B细胞的流式细胞术数据。e是由Pam3CSK4诱导的CD11b表达通过在40LB细胞上培养而消失。i是在指定抑制剂作用下的各刺激的$CD11b^+$B细胞的比例。b、c、g、h、i中的条状图表示至少3次独立测定的平均值(±SD)。b、c、g、h中的数据利用单因素ANOVA和Tukey的多重比较进行了分析。

[0083] 图4-2是示出加热灭菌的变形菌纲的细菌克雷伯氏肺炎杆菌(Klebsiella pneumoniae)和拟杆菌纲的细菌普通拟杆菌(Bacteroides vulgatus)诱导B细胞的CD11b表达的图。

[0084] 图5是示出CD11b诱导性细菌抗原增强PP中的现有GC反应的图。a是利用指定刺激进行了3天刺激的脾脏初始B细胞的CD11b表达的流式细胞术数据。b是各刺激中的$CD11b^+$B细胞的比例。c-e:对Balb/c小鼠经口施用指定的加热杀菌的细菌、pam3CSK4或PBS(对照)。2

天后,计算出各小鼠的$PNA^{hi}B220^{+}$GC B细胞的流式细胞术数据(c)、$PNA^{high}B220^{+}$PP GC B细胞的比例(d)和绝对数(e)。f:对所示的iGB细胞进行分离、标记后,独立地静脉内注射至小鼠。比例尺为500μm。g是免疫化的方案。h是免疫化后的OVA-特异性IgA。b、d、e、h中的条状图表示至少3个独立测定的平均值(±SD)。d、e中的数据利用单因素ANOVA和Tukey的多重比较进行了分析。h中的数据利用双因素ANOVA和Tukey的多重比较进行了分析。

[0085] 图6是示出在小鼠的PP中存在$CD11b^{+}IgA^{+}$B细胞的图。a:使用8-12周龄的WT Balb/c小鼠进行流式细胞术分析。双联体细胞利用FSC-H/FSC-W门进行识别。死细胞通过碘化丙啶(PI)染色来排除。对B220+B细胞中的IgA和CD11b的表达进行分析。为了确认CD11b的表达,准备作为阴性对照的荧光扣除对照(fluorescence minus one,FMO)样品。活细胞中,GC B细胞表示$PNA^{high}B220^{+}$细胞,非GC B细胞表示$PNA^{low}B220^{+}$细胞。代表性的数据由至少20次实验得到。b中,确认到分选的纯度至少为90%。c是$CD11b^{+}IgA^{+}$PP B细胞和$CD11b^{-}IgA^{+}$PP B细胞中的CD86表达和CXCR4表达的代表性平均荧光强度(Average mean fluorescence intensity)(MFI)分析。条状图表示使用WT小鼠的独立的5次测定的平均值(±SD)。数据通过学生双侧t检验进行比较。

[0086] 图7是示出确认CD11b和IgA的表达的免疫组织化学共聚焦图像的图。将所选择的PP截面利用DAPI、CD11b、IgA进行染色。将显示部分(虚线的四边形)放大,对CD11b与IgA的重叠进行分析。另外,为了确认CD11b与IgA的信号重叠,进行了Z-堆叠分析。比例尺为20μm。

[0087] 图8是示出在HEV中表达ICAM-1的图。使用抗ICAM-1、抗CD4(T细胞标记物)、抗CD11c(DC标记物)、抗MAdCAM-1(HEV标记物)分别对PP的切片进行染色。SED在$CD11c^{+}$DC富集的区域被识别出。IF区域在$CD4^{+}$T细胞富集的区域被识别出。表达MAdCAM-1的HEV在IF区域中观察到。为了分析ICAM-1的表达,示出整体图像和放大的显示区域。

[0088] 图9是示出$CD11b^{+}IgA^{+}$B细胞与$CD4^{+}$T的结合分析的结果的图。使用8-12周龄的WT Balb/c小鼠进行流式细胞术分析。死细胞通过PI染色被排除。单一细胞与结合细胞通过FSC-H/FSC-W门进行选择。在单一细胞和结合细胞中,使用IgA^{+}细胞来分析与$CD4^{+}$T细胞的结合。单一活细胞和结合活细胞中,通过$B220^{+}$细胞来选择B细胞门。对$B220^{+}$细胞中的IgA和CD11b的表达进行分析。在结合$CD11b^{-}IgA^{+}$B细胞和$CD11b^{+}IgA^{+}$B细胞中,对$CD4^{+}$T细胞的结合进行分析。使用单一$CD11b^{-}IgA^{+}$B细胞和$CD11b^{+}IgA^{+}$B细胞作为用于分析$CD4^{+}$T细胞的结合的阴性对照。数据由6次独立实验得到。

[0089] 图10是示出具有SHM的$CD11b^{+}IgA^{+}$B细胞源自新生的活化的记忆B细胞的图。a:对通过PCR扩增后进行了重排的VDJ区域和下游的内含子序列的SHM频率进行分析。b:对从26只WT小鼠的PP中分离出的$CD11b^{-}IgA^{+}$和$CD11b^{+}IgA^{+}$的B细胞的重排$VDJH_3$和JH_3下游的内含子序列(JH3-I)、以及重排$VDJH_4$和JH4下游的内含子序列(JH4-I)的SHM频率进行分析。饼状图的片段大小与在各克隆中观察到的具有突变数的序列数成比例。饼状图中央的数字表示分析的克隆数。

[0090] 图11-1是表示由体外(in vitro)刺激引起的B细胞增殖和CD11b表达的图。a是分选出的脾脏初始B细胞的纯度及其CD11b表达。b是经培养的脾脏初始B细胞的淋巴细胞门和数目(右)。代表性的数据由至少3个独立的实验得到。c是对经培养的脾脏初始B细胞的淋巴细胞门施加所显示的加热杀菌的细菌刺激后的情况。d是经培养的脾脏初始B细胞的淋巴细胞门和CD11b表达。代表性的数据由3个独立的实验得到。

[0091] 图11-2是示出由体外(in vitro)刺激引起的B细胞增殖和CD11b表达的图。e是以各刺激的指示浓度进行了刺激的脾脏B细胞的CD11b表达。将为了图4-1和5的实验而选择的条件用浅灰色表示。

[0092] 图11-3是示出由体外(in vitro)刺激引起的B细胞增殖和CD11b表达的图。f是以各刺激的指示浓度进行了刺激的纯化脾脏B细胞的CD11b表达。g是在所显示的浓度的TLR1/2、TLR4、NOD2抑制剂的存在下利用pam3CSK4(1μg/ml)进行了刺激的脾脏B细胞的CD11b表达。将为了图4-1和5的实验而选择的条件用浅灰色表示。

[0093] 图12-1是示出分离出的$CD11b^+$B细胞在iGB培养系统中失去CD11b表达的图。a:将利用细胞示踪紫(CellTrace Violet)标记的$CD11b^+IgA^+$和$CD11b^-IgA^+$PP B细胞使用IL-21在iGB培养系统中进行培养。对于CD11b的表达,在第0天和第1天利用流式细胞术进行分析。b:准备作为阳性对照的约50,000个初始脾脏B细胞和利用细胞示踪紫标记的5,000个分选出的$CD11b^-IgA^+$B细胞。制备800个分离出的$CD11b^+IgA^+$PP B细胞和$CD11b^-IgA^+$PP B细胞以监控其增殖。代表性的数据由3个独立的实验得到。

[0094] 图12-2是示出分离出的$CD11b^+$B细胞在iGB培养系统中失去CD11b表达的图。c:对于脾脏的初始B细胞,为了诱导$CD11b^+$B细胞,与pam3CSK4一起培养3天。之后,将利用pam3CSK4诱导出的$CD11b^+$B细胞与$CD11b^-$B细胞分离。将约1.5×10^5个分离出的$CD11b^+$B细胞和$CD11b^-$B细胞分别接种至添加有1ng/ml IL-4的40LB细胞上。作为对照,使用分选为阴性的脾脏初始B细胞。在第0天和第4天,对接种至40LB细胞上的B细胞的CD11b表达进行分析。代表性的数据由3个独立的实验得到。

[0095] 图13是示出利用IgM-40LB或CpG-40LB进行了刺激的B细胞在对小鼠静脉注射后未进入到PP GC的图。将包含CpG-40LB细胞(上)和IgM-40LB细胞(下)的所示iGB细胞分离、标记后,独立地静脉注射至小鼠。将抗MAdCAM-1抗体与所标记的iGB细胞一起进行静脉注射,鉴定HEV。将抗IgA抗体直接注入至PP,对IgA^+细胞进行染色,识别GC(虚线的圆)。比例尺为500μm。

[0096] 图14是示出本公开的佐剂组合物完全未升高血清TNFα的浓度的图。

[0097] 图15是示出B细胞能够不依赖于DC或T细胞而感知细菌的抗原,在pre-GC细胞中决定自身细胞命运的示意图。

具体实施方式

[0098] 为了鉴定pre-GC的B细胞,本发明人着眼于粘膜免疫相关免疫诱导组织。这是因为,粘膜免疫相关免疫诱导组织的GC是结构性活化的,因此在任何时间点均能找到进入现有GC中的pre-GC的B细胞[7]。本发明人认为,整联蛋白CD11b可能是粘膜免疫相关免疫诱导组织中的pre-GC IgA+B细胞的候选标记物。作为165kDa的整联蛋白αM的CD11b与CD18结合,形成已知为巨噬细胞1抗原(Mac-1)的异二聚体整联蛋白[12]。CD11b作为骨髓系细胞的标记物广为人知,已知其参与细胞的移动、粘附[12]。此外,在以前的研究中,B细胞中的CD11b显示出复杂的功能[13,14]。Ding等人发现,CD11b对BCR信号进行负控制,维持自身反应性B细胞的耐受性[13]。Kunisawa等人发现,CD11b是小鼠肠道粘膜固有层(LP)中的IgA^+PC的初期阶段的标记物,对于$CD11b^+IgA^+$PC的产生,PP的结构是必需的[15]。这些研究的动机在于调查粘膜免疫相关免疫诱导组织的B细胞中的CD11b的表达。

[0099] 本公开中,将表达整联蛋白CD11b的IgA^+B细胞的小群体鉴定为pre-GC B细胞。该细胞位于GC的外侧,高表达irf4。将该$CD11b^+IgA^+$B细胞注入至IgA^-Cre/$YC3.60^{flox}$报告小鼠的粘膜免疫相关免疫诱导组织中,结果所注入的细胞未直接进入现有GC,而位于GC的周围,在40小时后进入GC,由此可知在鼠的粘膜免疫相关免疫诱导组织中该细胞为pre-GC IgA^+B细胞。进而还发现,包括pam3CSK4、脂多糖(LPS)、加热杀菌的大肠杆菌(Escherichia coli)(E.coli)、肠道沙门氏菌(Salmonella enterica)(S.enterica)而不包括双歧杆菌属(Bifidobacterium)的几种细菌抗原在体外(in vitro)诱导CD11b在初始B细胞中的表达。当B细胞中在与T-B或DC-B的相互作用之前已表达CD11b时,注射到静脉内的B细胞能够进入到粘膜免疫相关免疫诱导组织的现有GC中。这样,B细胞不依赖于DC的活化而控制自身的细胞命运从而成为pre-GC B细胞。此外,将pam3CSK4或加热杀菌的大肠杆菌经口施用至小鼠时,在2天以内进入到粘膜免疫相关免疫诱导组织的GC中的B细胞的数目增加,粘膜抗原特异性IgA反应得到增强。认为在活化的B细胞中诱导CD11b是pre-GC B细胞的有希望的标记物,同时是用于选择有效的粘膜疫苗佐剂的有用的标准。

[0100] (本发明的组合物)

[0101] 本公开的组合物包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质,具有诱导活化B细胞的生发中心迁移的作用。

[0102] 本公开的组合物可期待发挥出上述效果,能够适当地用于药品、食品、饲料领域等中。因此,本公开的组合物可制成药物、食品组合物、食品原料组合物、饲料组合物或饲料原料组合物。

[0103] (诱导B细胞中的CD11b的表达的物质)

[0104] 本公开的组合物中所使用的诱导B细胞中的CD11b的表达的物质可通过将本申请说明书中所示的实施例作为参考,由本领域技术人员基于公知的方法取得。例如,可以对由动物分离出的初始脾脏B细胞和候选物质进行培养,之后将B细胞中的$CD11b^+$B细胞的比例增加的候选化合物作为诱导B细胞中的CD11b的表达的物质使用。

[0105] 在一个方式中,该诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的非限定性示例为细菌。在一个方式中,优选使用革兰氏阴性细菌。在一个方式中,优选使用变形杆菌门或拟杆菌门细菌。在一个方式中,作为变形杆菌门的细菌,优选使用γ变形菌纲的细菌。在一个方式中,优选使用肠杆菌目的细菌。在一个方式中,更优选使用大肠杆菌(Escherichia coli)、肠道沙门氏菌(Salmonella enterica)或克雷伯氏肺炎杆菌(Klebsiella pneumoniae)。在另一方式中,作为拟杆菌门的细菌,优选使用拟杆菌纲的细菌。在一个方式中,优选使用拟杆菌目的细菌。在一个方式中,优选使用拟杆菌目的细菌。在一个方式中,优选使用普通拟杆菌(Bacteroides vulgatus)。作为这些变形杆菌门或拟杆菌门的细菌,可以使用特定种类的各种血清型的细菌。

[0106] 在一个方式中,作为该诱导B细胞中的CD11b的表达的物质使用的细菌是具有下述16S rDNA序列的细菌,该16S rDNA序列与大肠杆菌(Escherichia coli)、肠道沙门氏菌(Salmonella enterica)、克雷伯氏肺炎杆菌(Klebsiella pneumoniae)、普通拟杆菌(Bacteroides vulgatus)的代表性血清型所具有的16S rDNA序列具有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%以上或99.5%以上的碱基序列同一性。

[0107] 在一个方式中,作为该诱导B细胞中的CD11b的表达的物质使用的细菌是具有与下述16S rDNA序列具有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%以上或99.5%以上的碱基序列同一性的16S rDNA序列的细菌。

[0108] 大肠杆菌(Escherichia coli)16S rDNA序列:编码GenBank登记号CP003278.1(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP017100)的16S核糖体RNA的DNA序列(包含位置225107～226662的碱基的序列)。

[0109] 肠道沙门氏菌(Salmonella enterica)16S rDNA序列:编码GenBank登记号CP003278.1(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP003278.1)的16S核糖体RNA的DNA序列(包含位置287486～289015的碱基的序列的互补链、或者包含位置3396200～3397729的碱基的序列的互补链)。

[0110] 克雷伯氏肺炎杆菌(Klebsiella pneumoniae)16S rDNA序列:编码GenBank登记号CP018306.1(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP018306)的16S核糖体RNA的DNA序列(包含位置503553～505106的碱基的序列的互补链、包含位置1312903～1314456的碱基的序列的互补链、包含位置1818027～1819580、1926864～1928417的碱基的序列、包含位置2018746～2020299的碱基的序列、包含位置2444117～2445670的碱基的序列、或者包含位置2799428～2800981的碱基的序列)。

[0111] 普通拟杆菌(Bacteroides vulgatus)16S rDNA序列:编码GenBank登记号AP025232.1(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AP025232)的16S核糖体RNA的DNA序列(包含位置294690～296214的碱基的序列的互补链、包含位置626688～628212的碱基的序列的互补链、包含位置1871179～1872703的碱基的序列、包含位置1957949～1959473的碱基的序列、包含位置2375844～2377368的碱基的序列、包含位置4187249～4188773的碱基的序列的互补链、或者包含位置4496890～4498414的碱基的序列的互补链)。

[0112] 本公开的组合物具有诱导活化B细胞的生发中心迁移的作用。在一个方式中,本公开的组合物具有诱导活化B细胞向粘膜免疫相关免疫诱导组织的生发中心迁移的作用。上述粘膜免疫相关免疫诱导组织没有特别限定,包括带来活化B细胞的亲和力成熟的粘膜免疫相关免疫诱导组织。例如,粘膜免疫相关免疫诱导组织包括消化道内(肠内、口腔内等)、鼻腔内等的粘膜免疫相关免疫诱导组织。在一个方式中,上述粘膜免疫相关免疫诱导组织为派亚氏淋巴丛,本公开的组合物具有诱导活化B细胞向派亚氏淋巴丛的生发中心迁移的作用。

[0113] 在使用细菌作为诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的情况下,可以使用加热灭菌状态的细菌或者活菌。

[0114] 本公开的组合物中,诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的量只要是可发挥出诱导活化B细胞的生发中心迁移的作用的量就没有特别限定。例如,诱导B细胞中的CD11b的表达的物质按照在组合物中为0.001～99.99重量%的范围的方式进行混配。

[0115] (药物组合物)

[0116] 在一个方式中,本公开的包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物以药物组合物的形式提供。本公开的药物组合物代表性地用于刺激免疫。在一个方式中,本公开的药物组合物用于诱导IgA产生B细胞的生发中心迁移活化以及亲和力成熟和高亲和力抗体的产生,在该粘膜组织或远端的粘膜组织等中提供抗原特异性防御。在一个方式中,本公开

的药物组合物用于活化IgA产生B细胞的粘膜免疫相关免疫诱导组织的生发中心迁移。上述粘膜免疫相关免疫诱导组织没有特别限定,包括带来活化B细胞的亲和力成熟的粘膜免疫相关免疫诱导组织。例如,粘膜免疫相关免疫诱导组织包括消化道内(肠内、口腔内等)、鼻腔内等的粘膜免疫相关免疫诱导组织。在一个方式中,上述粘膜免疫相关免疫诱导组织为派亚氏淋巴丛,本公开的组合物用于诱导活化B细胞向派亚氏淋巴丛的生发中心迁移。

[0117] 作为被本公开的药物组合物激活的免疫的对象的抗原可以预先存在于生物体内粘膜组织中,另外也可以与本公开的药物组合物一起施用。在一个方式中,本公开的药物组合物用于刺激免疫。在一个方式中,本公开的药物组合物优选用于刺激粘膜免疫,在一个方式中,用于刺激消化道内(肠内、口腔内等)或鼻腔内的免疫。

[0118] 在一个方式中,本公开的药物组合物以不包含抗原的佐剂组合物的形式提供。在一个方式中,本公开的药物组合物与抗原一起施用。在一个方式中,本公开的药物组合物与抗原同时施用。在一个方式中,本公开的药物组合物与抗原分开施用。将本公开的药物组合物与抗原分开施用的情况下,各自的施用间隔可以适当选择,例如可将各自的施用期间设为5分钟、10分钟、20分钟、30分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、24小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天等,但并不限定于这些。本公开的药物组合物与抗原的施用频率可以相同、也可以不同。本公开的药物组合物与包含抗原的组合物的形态可以相同或不同,例如可以将本公开的药物组合物与食品形态的包含抗原的组合物进行组合。在一个方式中,本公开的药物组合物以包含抗原的疫苗组合物的形式提供。上述抗原没有特别限定,例如选择病毒、细菌、真菌、寄生虫抗原。

[0119] 在一个方式中,本公开的药物组合物用于对具有通过活化B细胞的生发中心迁移的活化得到治疗的疾病、障碍或状态的对象进行治疗。在一个方式中,本公开的组合物用于通过免疫刺激(例如粘膜免疫刺激、肠内免疫刺激)进行伴随免疫刺激的健康维持或增进、粘膜菌群(例如肠内菌群)的维持或改善、或者感染抑制(例如病毒、细菌、真菌或寄生虫的感染抑制)。

[0120] 因此,在一个方式中,本公开提供一种用于诱导活化B细胞的生发中心迁移的药物组合物,其包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质。

[0121] 另外,在一个方式中,本公开提供一种用于对具有通过活化B细胞的生发中心迁移的活化而得到治疗的疾病、障碍或状态的对象进行治疗的药物组合物,其包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质。

[0122] 另外,在一个方式中,本公开提供一种用于免疫刺激的药物组合物,其包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质。上述粘膜免疫的刺激包括消化道免疫(例如肠内免疫和口腔内免疫)以及鼻腔内免疫的刺激,但并不限定于这些。

[0123] 另外,在一个方式中,本公开提供一种用于刺激粘膜中的抗原特异性免疫的药物组合物,其包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质。上述粘膜包括消化道(例如肠道粘膜和口腔内粘膜)和鼻腔内粘膜,但并不限定于这些。

[0124] 在一个方式中,上述免疫刺激包括伴随免疫刺激(例如粘膜免疫刺激、肠内免疫刺激)的健康维持或增进效果、伴随粘膜菌群(例如肠内菌群)的维持或改善的健康维持或增进效果、或者感染症的治疗(例如病毒感染症、细菌感染症、真菌感染症或寄生虫感染症的治疗),但并不限定于这些。

[0125] 另外,在一个方式中,需要在上述粘膜中刺激抗原特异性免疫的对象为下述对象:需要进行免疫刺激(例如粘膜免疫刺激、肠内免疫刺激)的对象、需要进行伴随免疫刺激的健康维持或增进的对象、需要进行粘膜菌群(例如肠内菌群)的维持或改善的对象、需要进行伴随粘膜菌群的健康维持或增进的对象、需要进行感染症的治疗(例如病毒感染症、细菌感染症、真菌感染症或寄生虫感染症的治疗)的对象。

[0126] 另外,在一个方式中,本公开提供一种用于通过免疫刺激进行健康维持或增进的组合物,其包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质。

[0127] 另外,在一个方式中,本公开提供一种用于通过免疫刺激维持或改善粘膜菌群(例如肠内菌群)的组合物,其包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质。

[0128] 另外,在一个方式中,本公开提供一种用于治疗感染症(例如治疗病毒感染症、细菌感染症、真菌感染症或寄生虫感染症)的药物组合物,其包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质。

[0129] 本公开中的“治疗”具有该技术领域中的一般含义,是指出于缓解、根除、治愈某些障碍或疾病状态的目的;出于对这些障碍或疾病状态的发生防患于未然、或者延迟其发生(预防)的目的;或者出于防止这些障碍或疾病状态的复发或降低复发的可能性(复发抑制)的目的,给对象施用本公开的组合物。

[0130] 在一个方式中,本公开的药物组合物是用于刺激粘膜免疫的药物组合物。在一个方式中,本公开的药物组合物是作为经粘膜施用的疫苗佐剂使用的组合物。在一个方式中,本公开的药物组合物是为了促进高亲和力粘膜IgA抗体的表达而使用的组合物。

[0131] 本公开的药物组合物只要包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质即可。例如,可以按照在100重量%的药物组合物中本发明的诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的含有比例为0.001~99.99重量%的范围的方式,考虑对象疾病的种类、剂型、施用方法、施用对象、施用对象的症状的程度、以及通过施用发挥出的效果的程度等进行适当设定。在一个方式中,100重量%的药物组合物中的本发明的诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的含有比例可以为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%或90~99.99重量%。在一个方式中,100重量%的药物组合物中的本发明的诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的含有比例可以为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%。在一个方式中,100重量%的药物组合物中的本发明的诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的含有比例优选为1.0~80重量%、5.0~70重量%、10~60重量%、20~50重量%、30~40重量%,但并不限定于这些。

[0132] 本公开中的“有效量”是指在本公开中诱导B细胞中的CD11b的表达的物质可在生物体中诱导活化B细胞的生发中心迁移的量。

[0133] 本公开的药物组合物中,可将诱导B细胞中的CD11b的表达的物质与药学上可容许的载体或添加物一起进行混配。药学上可容许的载体或添加物是指任意的载体、稀释剂、赋形剂、助悬剂、润滑剂、佐剂、介质、传递系统、乳化剂、片剂分解物质、吸收剂、防腐剂、表面活性剂、着色剂、香料或甜味料,采用公知的物质即可。

[0134] 施用对象没有特别限定,作为非限定性的示例,例如可以举出:人、小鼠、大鼠、豚鼠、兔、仓鼠、狗、猫、鼬、牛、猪、马、鹿、野猪、绵羊、山羊等哺乳类;鸡、鸭、火鸡、鹌鹑等家禽等鸟类;蛇、龟等爬行类;青蛙等两栖类;鲑科鱼类、鲷鱼·海鲡类、淡水鳟鱼、香鱼、鲈鱼·鲷鱼·黄姑鱼类、比目鱼、河豚、幼鲷鱼、高体鲷、黑鲔、真鲹、缟鲹、虎河豚、黄尾鲷、石鲷、丝背细鳞鲀、无备平鲉、褐菖鲉、黑棘鲷、许氏平鲉、鲈鱼、血鲷、三线矶鲈、斑鲆、鲐鱼、七带石斑鱼、褐石斑鱼、鳗鱼、鲶鱼、泥鳅、鲟鱼、热带鱼类、罗非鱼、巨鲶、青鱼、鳙鱼、鲢鱼、草鱼、鲤鱼等鱼类;双壳贝(牡蛎、扇贝、花蛤、贻贝、马氏珍珠贝);鲍鱼;虾;海藻。

[0135] 本公开的药物组合物的施用量以及施用方法根据作为施用对象的个体所罹患的疾病的种类、性别、种类、年龄、全身状态、疾病的严重程度、所需效果的程度等来适当选择。作为施用量,通常在0.001～100mg/kg/天的范围适当设定即可。例如,在使用细菌作为诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的情况下,基于细菌量,例如若为体重20g的小鼠,可以在10^6CFU/次以上、10^7CFU/次以上、10^8CFU/次以上、10^9CFU/次以上、10^{10}CFU/次以上等范围适当进行设定;若为体重60kg的人,可以在3×10^9CFU/次以上、3×10^{10}CFU/次以上、3×10^{11}CFU/次以上、3×10^{12}CFU/次以上、3×10^{13}CFU/次以上等范围适当进行设定,但并不限定于此。对于上述每1次的施用量,例如可以一天施用1次～3次。在一个方式中,在用于体重60kg的人的情况下,优选以3×10^{10}CFU/天～3×10^{13}CFU/天、3×10^{11}CFU/天～3×10^{12}CFU/天等范围进行施用,但并不限定于这些。

[0136] 关于本公开的药物组合物的施用,可以将上述量1天施用1次,也可以分成数次施用。另外,在对上述疾病具有治疗效果的范围内,施用间隔可以为每天、隔天、每周、隔周、每2～3周、每月、隔月或每2～3个月。

[0137] 本公开的药物组合物的施用方法没有特别限定,优选对消化道等的粘膜组织直接施用,作为这样的经粘膜施用,例如可以使用经口施用、经鼻施用、经阴道施用、经肠施用等。通过这些各种器官的粘膜被施用的本公开的组合物在粘膜免疫相关免疫诱导组织中诱导IgA分泌B细胞的亲和力成熟和高亲和力IgA抗体的产生,在该被施用的粘膜组织和远端粘膜组织等组织中带来抗原特异性防御。

[0138] 此处,经肠施用并不限于经由肛门的施用,例如也包括如胃瘘等这样从个体外将管等插入到消化道中并经此进行的施用。插入消化道的位置不限于肠,可以举出食道、胃、小肠(包括十二指肠、空肠、回肠等)、大肠(包括盲肠、结肠、直肠等)等。另外,例如也可将本公开的组合物与公知的成分一起混配而作为肠内清洗液使用。

[0139] 在一个方式中,本公开的药物组合物可以在无损于其功能的范围内与其他治疗剂、例如包含抗原的疫苗组合使用。

[0140] 将本公开的药物组合物两种以上组合使用的情况下、或者与其他治疗药组合使用的情况下,这些药剂可以包含在单一的制剂中,另外也可以包含在不同的制剂中。将它们通

过不同的制剂来提供的情况下,可以以包含该制剂的组合的试剂盒的形态提供,另外也可以分别以用于与其他制剂组合的单剂的形式提供。这些制剂可以同时施用,另外也可以连续地施用。在一个方式中,本公开的药物组合物以最终提供的药物组合物的原材料组合物的方式提供。

[0141] (食品组合物)

[0142] 在一个方式中,本公开的包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物以食品组合物的形式提供。食品组合物是将本公开的免疫刺激组合物专门适当地用于食品领域的组合物。

[0143] 本公开的食品组合物的形态没有特别限制,例如可以以补充剂、固体食品、流质食品、饮料等饮食品的形式提供。本公开的食品组合物可以以特定保健用食品等特殊用途食品或功能性标识食品、营养功能食品的形式提供。本公开的食品组合物可以以保健功能食品、患者用食品、乳制品、发酵乳、配方奶粉、乳酸菌饮料、酸性饮料、酸奶、奶酪、面包、饼干、克力架、薄底比萨、配方奶粉、流食、患者用食品、营养食品、冷冻食品、食品组合物、加工食品、其他市售食品等形式提供。

[0144] 本公开的食品组合物除包括一般性食品以外,还包括包含附带条件的特定保健用食品的特定保健用食品、营养辅助食品、功能性食品、患者用食品等。在一个方式中,本公开的食品组合物例如可以以免疫刺激用、粘膜免疫刺激用、肠内免疫刺激用、健康维持或增进用、粘膜菌群的维持或改善用、肠内菌群的维持或改善用、病毒感染症对策用、细菌感染症对策用、真菌感染症对策用或附带有与这些类似的标识的食品组合物、或者用于这些用途的食品组合物的形式提供。

[0145] 在一个方式中,本公开的食品组合物与抗原一起施用。在一个方式中,本公开的食品组合物与抗原同时施用。在一个方式中,本公开的食品组合物与抗原分开施用。将本公开的食品组合物与抗原分开施用的情况下,各自的施用间隔可适当选择,例如可以使各自的施用期间为5分钟、10分钟、20分钟、30分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、24小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天等,但并不限定于这些。本公开的食品组合物与抗原的施用频率可以相同也可以不同。本公开的食品组合物与包含抗原的组合物的形态可以相同也可以不同,例如,可以将本公开的食品组合物与包含抗原的药品组合物进行组合。在一个方式中,本公开的食品组合物以包含抗原的组合物的形式提供。上述抗原没有特别限定,例如选择病毒、细菌、真菌、寄生虫抗原。

[0146] 本公开的食品组合物的具体形态没有特别限定,例如可例示出:清凉饮料、碳酸饮料、营养饮料、果实饮料、乳酸饮料、乳饮料等饮料;冰淇淋、冰雪泥、刨冰等冷饮;饴糖、糖果、口香糖、巧克力、压片糖果、零食点心、饼干、果冻、果酱、奶油、烘烤点心等糖果点心类;荞麦面、乌冬面、粉丝、中华面、方便面等面类;鱼糕、火腿、香肠等水产·畜产加工食品;加工乳、发酵乳等乳制品;色拉油、天妇罗油、人造黄油、蛋黄酱、起酥油、搅打奶油、调味酱等油脂及油脂加工食品;酱料、调味汁等调味料;汤、炖菜、沙拉、副食、拌饭料、酱菜、面包、谷物片等。另外,在特定保健用食品、营养辅助食品、功能性食品等的情况下,例如可以以粉末、颗粒、胶囊、含片、片剂、糖浆等形态提供。

[0147] 在一个方式中,本公开的组合物以食品材料的形式提供。本公开的食品材料的形状没有特别限制,例如为液态、膏状、粉末、固体状等,根据所使用的食品的种类来适当设

定。本公开的食品材料可以进一步根据需要通过破碎、粉碎、整粒等处理成型为所期望的形状。

[0148] 本公开的食品组合物只要包含本公开的诱导B细胞中的CD11b的表达的物质即可。例如,可以按照100重量%的组合物中的本发明的抗体的含有比例为0.001～99.99重量%的范围的方式,考虑发挥出的效果的程度等适当地设定。在一个方式中,100重量%的食品组合物中的本发明的诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的含有比例可以为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%或90～99.99重量%。在一个方式中,100重量%的食品组合物中的本发明的诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的含有比例可以为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%。在一个方式中,100重量%的食品组合物中的本发明的诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的含有比例优选为1.0～80重量%、5.0～70重量%、10～60重量%、20～50重量%、30～40重量%,但并不限定于这些。

[0149] 在一个方式中,本公开的组合物以摄取上述食品时添加的食品添加物或者用于制造上述食品或食品添加物的原料组合物的形式提供。

[0150] (饲料组合物)

[0151] 在一个方式中,本公开的包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物以饲料组合物的形式提供。饲料组合物是将本公开的饲料组合物专门用于饲料领域的组合物。

[0152] 上述饲料组合物的具体形态没有特别限定,例如只要无损于上述本公开的饲料组合物所发挥的效果,混合在通常的饲料中、或者根据需要与可混配在通常的饲料中的成分一起进行混合而制成饲料组合物即可,也可将饲料组合物本身作为饲料。

[0153] 本公开的饲料组合物例如可以以免疫刺激用、粘膜免疫刺激用、肠内免疫刺激用、粘膜菌群的维持或改善用、肠内菌群的维持或改善用、健康维持或增进用、肠内菌群的维持或改善用、病毒感染症对策用、细菌感染症对策用、真菌感染症对策用或附带有与这些类似的标识的饲料组合物、或者用于这些用途的饲料组合物的形式提供。

[0154] 在一个方式中,本公开的饲料组合物与抗原一起施用。在一个方式中,本公开的饲料组合物与抗原同时施用。在一个方式中,本公开的饲料组合物与抗原分开施用。将本公开的饲料组合物与抗原分开施用的情况下,各自的施用间隔可以适当选择,例如可以使各自的施用期间为5分钟、10分钟、20分钟、30分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、24小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天等,但并不限定于这些。本公开的饲料组合物与抗原的施用频率可以相同也可以不同。本公开的饲料组合物与包含抗原的组合物的形态可以相同也可以不同,例如,可以将本公开的饲料

组合物与包含抗原的药品组合物进行组合。在一个方式中,本公开的饲料组合物以包含抗原的组合物的形式提供。上述抗原没有特别限定,例如选择病毒、细菌、真菌、寄生虫抗原。

[0155] 本公开的饲料组合物只要包含本公开的诱导B细胞中的CD11b的表达的物质即可。例如可以按照100重量%的组合物中的本发明的抗体的含有比例为0.001～99.99重量%的范围的方式,考虑发挥出的效果的程度等适当地设定。在一个方式中,100重量%的饲料组合物中的本发明的诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的含有比例可以为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%或90～99.99重量%。在一个方式中,100重量%的饲料组合物中的本发明的诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的含有比例可以为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%。在一个方式中,100重量%的饲料组合物中的本发明的诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的含有比例优选为1.0～80重量%、5.0～70重量%、10～60重量%、20～50重量%、30～40重量%,但并不限定于这些。

[0156] 在一个方式中,本公开的组合物以摄取上述饲料时添加的饲料添加物或者用于制造上述饲料或饲料添加物的原料组合物的形式提供。

[0157] 本公开的食品组合物或饲料组合物的施用对象没有特别限定,作为非限定性的示例,例如可以举出:人、小鼠、大鼠、豚鼠、兔、仓鼠、狗、猫、鼬、牛、猪、马、鹿、野猪、绵羊、山羊等哺乳类;鸡、鸭、火鸡、鹌鹑等家禽等鸟类;蛇、龟等爬行类;青蛙等两栖类;鲑科鱼类、鲷鱼·海鳊类、淡水鳟鱼、香鱼、鲈鱼·鲷鱼·黄姑鱼类、比目鱼、河豚、幼鲷鱼、高体鲷、黑鲔、真鲹、缟鲹、虎河豚、黄尾鰤、石鲷、丝背细鳞鲀、无备平鲉、褐菖鲉、黑棘鲷、许氏平鲉、鲈鱼、血鲷、三线矶鲈、斑鲆、鲐鱼、七带石斑鱼、褐石斑鱼、鳗鱼、鲶鱼、泥鳅、鲟鱼、热带鱼类、罗非鱼、巨鲶、青鱼、鳙鱼、鲢鱼、草鱼、鲤鱼等鱼类;双壳贝(牡蛎、扇贝、花蛤、贻贝、马氏珍珠贝);鲍鱼;虾;海藻。

[0158] (治疗或健康维持·增进方法)

[0159] 在一个方式中,本公开包括使用诱导B细胞中的CD11b的表达的物质、包含该物质的药物组合物、食品组合物或饲料组合物的治疗方法或者健康维持或增进方法。本公开中的治疗或者健康维持或增进方法包括将本公开的诱导B细胞中的CD11b的表达的物质、或者上述本公开的“组合物”“药物组合物”、“食品组合物”或“饲料组合物”施用至对象。具体的作为预防或治疗对象的障碍或疾病、施用对象、施用方法、施用量等也按照上述“组合物”“药物组合物”、“食品组合物”或“饲料组合物”中所说明的情况即可。另外,通过本公开的方法得到的健康维持或增进效果只要起因于活化B细胞的生发中心迁移就没有特别限定。

[0160] 在一个方式中,本公开提供一种用于在需要使活化B细胞的生发中心迁移活化的

对象中进行活化B细胞的生发中心迁移的方法,其包括将包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物施用至该对象。

[0161] 另外,在一个方式中,本公开提供一种用于治疗具有通过活化B细胞的生发中心迁移的活化而得到治疗的疾病、障碍或状态的对象的方法,其包括将包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物施用至该对象。

[0162] 另外,在一个方式中,本公开提供一种用于在需要免疫刺激的对象中进行免疫刺激的方法,其包括将包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物施用至该对象。

[0163] 另外,在一个方式中,上述免疫刺激优选为粘膜免疫的刺激。因此,本公开提供一种用于在对象中刺激粘膜免疫的方法,其包括将包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物施用至该对象。上述粘膜免疫的刺激包括消化道免疫(例如肠内免疫和口腔内免疫)和鼻腔内免疫的刺激,但并不限定于这些。

[0164] 另外,在一个方式中,上述免疫刺激是粘膜中的抗原特异性免疫的刺激。因此,本公开提供一种用于在需要粘膜中的抗原特异性免疫的刺激的对象中进行粘膜中的抗原特异性免疫的刺激的方法,其包括将包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物施用至该对象。上述粘膜包括消化道(例如肠道粘膜和口腔内粘膜)和鼻腔内粘膜,但并不限定于这些。

[0165] 在一个方式中,上述免疫刺激包括伴随免疫刺激(例如粘膜免疫刺激、肠内免疫刺激)的健康维持或增进效果、伴随粘膜菌群(例如肠内菌群)的维持或改善的健康维持或增进效果、或者感染症的治疗(例如病毒感染症、细菌感染症、真菌感染症或寄生虫感染症的治疗),但并不限定于这些。

[0166] 另外,在一个方式中,上述需要在粘膜中刺激抗原特异性免疫的对象为下述对象:需要免疫刺激(例如粘膜免疫刺激、肠内免疫刺激)的对象、需要伴随免疫刺激的健康维持或增进的对象、需要粘膜菌群(例如肠内菌群)的维持或改善的对象、需要伴随粘膜菌群的健康维持或增进的对象、需要感染症的治疗(例如病毒感染症、细菌感染症、真菌感染症或寄生虫感染症的治疗)的对象。

[0167] 因此,在一个方式中,本公开涉及一种在需要免疫刺激(例如粘膜免疫刺激、肠内免疫刺激)的对象中刺激免疫的方法,其包括将包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物施用至该对象。

[0168] 另外,在一个方式中,本公开涉及一种在需要健康维持或增进的对象中通过免疫刺激进行健康增进的维持或增进方法,其包括将包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物施用至该对象。

[0169] 另外,在一个方式中,本公开涉及在需要粘膜菌群(例如肠内菌群)的维持或改善的对象中通过免疫刺激进行粘膜菌群的维持或改善的方法,其包括将包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物施用至该对象。

[0170] 另外,在一个方式中,本公开涉及在需要感染症的治疗(例如病毒感染症、细菌感染症、真菌感染症或寄生虫感染症的治疗)的对象中对感染症进行治疗的方法,其包括将包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物施用至该对象。

[0171] 在一个方式中,本公开的治疗或者健康维持或增进方法包括诱导活化B细胞的生发中心迁移的方法,其包括:准备包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物,将该组

合物施用至需要或期望进行治疗或者健康维持或增进的对象。

[0172] 在一个方式中,本公开的治疗或者健康维持或增进方法包括对免疫进行刺激的方法,其包括:准备包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物,将该组合物施用至需要或期望进行治疗或者健康维持或增进的对象。在一个方式中,该免疫刺激优选为粘膜免疫的刺激,包括肠内免疫的刺激。

[0173] 在一个方式中,本公开的治疗或者健康维持或增进方法包括维持或改善粘膜菌群的方法,其包括:准备包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物,将该组合物施用至需要或期望进行治疗或者健康维持或增进的对象。在一个方式中,该维持或改善粘膜菌群的方法优选为维持或改善肠内菌群的方法。

[0174] 在一个方式中,本公开的治疗或者健康维持或增进方法包括促进高亲和力IgA抗体表达的方法,其包括:准备包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物,将该组合物施用至需要或期望进行治疗或者健康维持或增进的对象。

[0175] 在一个方式中,本公开的治疗或者健康维持或增进方法包括获得疫苗佐剂活性的方法,其包括:准备包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物,将该组合物施用至需要或期望进行治疗或者健康维持或增进的对象。

[0176] 作为本公开的治疗或者健康维持或增进方法中使用的、诱导B细胞中的CD11b的表达的物质,可以使用上述(诱导B细胞中的CD11b的表达的物质)中记载的任意物质。

[0177] 本公开的治疗或者健康维持或增进方法中使用的、包含诱导B细胞中的CD11b的表达的物质的组合物可以通过本领域技术人员公知的方法来准备。可以将诱导B细胞中的CD11b的表达的物质与赋形剂、载体等一起混合来准备,此外也可以通过预先获得使诱导B细胞中的CD11b的表达的物质与赋形剂、载体等混合而成的组合物来准备。

[0178] 实施例

[0179] 以下通过实施例进一步详细地说明本发明,但这些只不过是例示,并不限定本公开。

[0180] 方法

[0181] 小鼠动物

[0182] Balb/c小鼠(8-12周龄)由日本CLEA获得。小鼠在东京大学定量生物学研究所(IQB)的动物实验设施中在不含特定病原体的条件下饲养。全部实验依据东京大学IQB的动物实验委员会的准则进行。在B细胞的移入实验中,使用由东京医科齿科大学的安达贵弘博士提供的IgA-Cre/YC3.60^{flox}小鼠(8～12周龄)。IgA-Cre小鼠基于Cris Allen的引用文献38进行设计。与YC3.60^{flox}小鼠[39,40]交配后,IgA^{+}细胞被鉴定为YC3.60^{+}细胞。

[0183] 流式细胞术分析和细胞分选

[0184] 将派亚氏淋巴丛(PP)从Balb/c小鼠的小肠中小心地摘除。将由PP制备的单细胞悬浮液利用下述抗体的组合进行温育。藻红蛋白-Cy7(PE-cy7)抗小鼠/人B220(eBioscience mAb RA3-6B2)、PE抗小鼠/人B220(Biolegend mAb RA3-6B2)、FITC抗小鼠/人B220(Biolegend mAb RA3-6B2)、PE抗小鼠IgA(α链特异性)(Southern Biotech公司)、Alexa Fluor(AF)647抗小鼠IgA(Southern Biotech公司)、FITC抗小鼠CD11b(Biolegend mAb M1/70)、PE抗小鼠CD11b(Biolegend mAb M1/70)。PE-cy7抗小鼠CD11b(eBioscience mAb M1/70)、生物素化PNA(Vector Laboratories)、APC-R700仓鼠抗小鼠CD95(Fas)(BD

Biosciences mAb Jo2)。AF488抗小鼠CD86(Biolegend mAb GL-1)、APC抗小鼠CD184(CXCR4)(Biolegend mAb L236F12)、PE抗小鼠IgM(eBiosciences mAb eB121-15F9)、AF647抗小鼠CD4(Biolegend mAb GK1.5)、链霉亲和素PE(Biolegend公司)、链霉亲和素APC(Biolegend公司)、链霉亲和素AF488(Life Technologies公司)。单一细胞的选择中使用FSC-H/FSC-W门。为了排除死亡的细胞,使用碘化丙啶(PI)(Nacalai)。流式细胞术分析利用光谱细胞分析仪SA3800(SONY)进行。细胞分选利用细胞分选仪SH800(SONY)进行。

[0185] 免疫组织化学分析

[0186] 将分离出的派亚氏淋巴丛利用最佳切割温度(OCT)复合物(Sakura Finetek)瞬时冷冻,在-80℃保存。制作厚度6μm的PP切片,干燥一夜。次日,将PP切片用丙酮(Nacalai)在-20℃固定10分钟。用磷酸缓冲生理盐水(PBS)清洗5次后,将PP切片在封闭缓冲液(PBS/5%FCS(NICHIREI BIOSCIENCES INC.))中温育30分钟。之后,将PP切片利用下述抗体的组合在暗箱中在RT下温育30分钟以上。AF488抗小鼠/人CD11b(Biolegend mAb M1/70)、PE抗小鼠/人CD11b(Biolegend mAb M1/70)、AF488抗小鼠CD4(Biolegend mAb GK1.5)、AF647抗小鼠CD4(Biolegend mAb GK1.5)、DAPI溶液(BD Bioscience)、AF488抗小鼠CD54(ICAM-1)(Biolegend mAb YN1/1.7.4)、AF647抗小鼠CD54(ICAM-1mAb YN1/1.7.4)(Biolegend公司)、生物素抗小鼠CD11c(eBioscience公司mAb N418)、AF488抗小鼠MAdCAM-1(Biolegend公司mAb MECA-367)、PE抗小鼠MAdCAM-1(Biolegend公司mAb MECA-367)。生物素化的PNA、AF647抗小鼠IgA(α链特异性)(Southern Biotech公司)、PE抗小鼠IgA(α链特异性)(Southern Biotech公司)、链霉亲和素AF488(Life Technologies公司)。利用显微镜LSM880(Carl Zeiss)进行观察。图像利用ZEN2009(Carl Zeiss)的软件进行分析。

[0187] 微阵列分析

[0188] 使用NucleoSpin RNAXS(Takara)由25,000个$CD11b^{+}IgA^{+}$B细胞和100,000个$CD11b^{-}IgA^{+}$B细胞提取RNA。使用SurePrint G3小鼠GE v2 8x60K微阵列芯片(Affymetrix)进行微阵列分析,检测基因的表达。

[0189] RNA的提纯和实时PCR

[0190] 分别分选出约1×10^{4}个PP GC B细胞($PNA^{hi}B220^{+}$细胞)和约1×10^{4}个非GC PP B细胞($PNA^{lo}B220^{+}$)。使用NucleoSpin RNA XS(Takara)由分离出的细胞提取RNA,使用GoScript(注册商标)逆转录酶(Promega)合成cDNA。使用KAPA SYBR(注册商标)快速qPCR混合母液(2X)试剂盒(KAPA Biosystems),在384孔光学PCR板(Roche)上使用LightCycler 480(Roche)进行3次实时PCR。基因的表达量利用管家基因β-肌动蛋白的表达量进行标准化。分析使用下述引物。

[0191] β-肌动蛋白fw:5'-CCAACCGTGAAAAGATGACC-3'、

[0192] β-肌动蛋白rv:5'-CCAGAGGCATACAGGGACAG-3'、

[0193] itgam(CD11b)fw:5'-CAGATCAACAATGTGACCGTATGGG-3'、

[0194] itgam(CD11b)rv:5'-CATCATCATGTCCTTGTACTGCCGCTTG-3'、

[0195] aicda(AID)fw:5'-CCTACGCTACATCTCAGACT-3'、

[0196] AICDA(AID)rv:5'-CTTTGAAGGTCATGATCCCG-3'、

[0197] BCL6(BCL6)fw:5'-TCCTCACGGTGCCTTTTTACA-3'、

[0198] bcl6(BCL6)rv:5'-TAACGACAAGCATGACGCAG-3'、

[0199] irf4(IRF4)fw:5'-AGGTCTGCTGAAGCCTTGGC-3'、

[0200] irf4(IRF4)rv:5'-CTTCAGGGCTCGTCGTGGTC-3'、

[0201] s1pr2(S1PR2)fw:5'-GTGACGGGACGCAGAGGT-3'、

[0202] s1pr2(S1PR2)rv:5'-AAATGTCGGTGATGTAGGCATG-3'、

[0203] bcl2(BCL2)fw:5'-TGAGTACCTGAACCGGCATCT-3'、

[0204] bcl2(BCL2)rv:5'-GCATCCCAGCCTCCGTTAT-3'、

[0205] gpr183(EBI2)fw:5'-GACATCCTGTTTACCACAGCT-3'、

[0206] gpr183(EBI2)rv:5'-AGACCAGAATCCAGACGGACA-3'

[0207] 体内(In vivo)成像

[0208] 为了进行移动成像,将IgA-Cre/YC3.60^{flox}小鼠(8-12周龄)如参考文献41中所记载那样利用3种麻醉药的混合物进行麻醉。小心地切开腹壁,露出小肠。用肉眼识别PP。将约8,000个分离出的CD11b^{+}IgA^{+}PP B细胞和约30,000个CD11b^{-}IgA^{+}PP B细胞利用细胞示踪橙CMTMR荧光色素(Invitrogen公司)标记后,使用25μL注射器(Trajan Scientific and Medical公司)直接注入至IgA-Cre/YC3.60^{flox}转基因小鼠的PP中。将移植了细胞的PP利用LSM880显微镜(Carl Zeiss公司)进行观察。利用ZEN2009软件(Carl Zeiss公司)对图像进行分析。利用显微镜观察PP 1小时后,将腹部的切开部利用ELP皮肤缝合器(株式会公司Akiyama)小心地闭合。移植40小时后,在麻醉下再次利用LSM880显微镜(Carl Zeiss)对包含所移植的细胞的PP进行观察,确认所移植的CD11b^{+}IgA^{+}PP B细胞的定位,利用ZEN2009软件(Carl Zeiss)进行分析。

[0209] 结合分析

[0210] 通过使用细胞分选仪SH800(SONY)的流式细胞术对CD11b^{+}IgA^{+}PP B细胞与CD4^{+}PP T细胞之间的结合进行分析。单态细胞利用FSCH/FSC-W门进行选择。单态细胞利用FSCH/FSC-W门进行选择,结合细胞通过单态细胞门的判别选择为负。在成像中,从PP结合的CD11b^{+}IgA^{+}CD4^{+}分离出结合细胞,利用显微镜LSM880(Carl Zeiss)和ZEN2009(Carl Zeiss)的分析软件进行观察。

[0211] 利用iGB培养系统进行的CD11b^{+}IgA^{+}PP B细胞的分离

[0212] 将约800个分选出的CD11b^{+}IgA^{+}PP B细胞与800个分选出的CD11b^{-}IgA^{+}PP B细胞利用细胞示踪紫增殖试剂盒(Invitrogen公司)进行染色。由于分离出的CD11b^{+}IgA^{+}PP B细胞的数量非常少,因此准备5,000个CD11b^{-}IgA^{+}PP B细胞和5×10^{4}个初始脾脏B细胞(利用B细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec)以阴性分离)作为阳性对照。为了监测细胞增殖,将分选出的CD11b^{-}IgA^{+}PP B细胞、CD11b^{+}IgA^{+}PP B细胞和初始脾脏B细胞在为了抑制生长利用丝裂霉素C进行了预处理的40LB细胞的存在下接种至6孔组织培养皿中。将细胞使用RPMI-1640培养基(和光)(包含10%FCS、5.5×10^{-5}M 2-巯基乙醇(ME)(Nacalai)、10mM HEPES(Nacalai))在37℃、5%CO_2的条件下培养3天。将分离出的CD11b^{+}IgA^{+}PP B细胞和CD11b^{-}IgA^{+}PP B细胞利用rIL-21(10ng/ml;PeproTech公司)进行培养,将初始脾脏B细胞利用rIL-4(1ng/ml;Biolegend公司)进行培养。使用iGB培养系统,为了检测细胞示踪紫,在第0天至第3天进行流式细胞术分析。关于培养细胞的CD11b表达,使用细胞分选仪SH800(SONY)和光谱细胞分析仪SA3800(SONY)在第0天和第1天利用流式细胞术进行分析。

[0213] iGB培养系统上的Pam3CSK4刺激脾脏CD11b^{+}B细胞

[0214] 利用iGB培养系统进行的脾脏CD11b$^+$B细胞的培养中,将脾脏初始B细胞利用pam3CSK4(Invivogen公司)培养3天,诱导CD11b的表达。之后,利用流式细胞术分离1.5×10^5个CD11b$^+$脾脏B细胞和1.5×10^5个CD11b-脾脏B细胞,利用细胞示踪紫(Invitrogen)染色后,在40LB系统中使用IL-4(1ng/ml;Biolegend)培养4天。之后使用细胞分选仪SH800(SONY)和光谱细胞分析仪SA3800(SONY)通过流式细胞术对CD11b的表达进行分析。

[0215] 用于刺激B细胞的菌的准备

[0216] 将大肠杆菌(E.coli)(DH5α)和肠道沙门氏菌(S.enterica)从甘油原液接种至5ml的LB培养基中,以180rpm在37℃振荡培养一夜。第2天将0.5ml的细胞悬浮液重悬于10ml的LB培养基中。将该培养液在37℃振荡培养3小时,通过每30分钟检测到的波长600nm的光学浓度(OD)(OD600)观察培养液的增殖曲线。将细胞悬浮液的连续稀释液100μl散布在LB板上,计算出CFU。基于生长曲线对大肠杆菌(E.coli)和肠道沙门氏菌(S.enterica)进行培养、收获,利用高压釜(121℃、15分钟)进行热灭活。

[0217] 同样地,两歧双歧杆菌(B.bifidum)和短双歧杆菌(B.breve)利用Difico Lactobacilli MRS肉汤(Becton,Dickinson and Company)培养基在37℃进行厌氧培养,利用高压釜进行加热杀菌。

[0218] 脾脏B细胞的刺激(体外(in vitro))

[0219] 脾脏B细胞使用B细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec)由8周龄的Balb/c小鼠的脾脏进行阴性分选。将脾脏B细胞(浓度:5×10^5/ml)利用RPMI1640培养基进行培养,分别给予13种独立的刺激。为了选择各刺激的适当浓度,将各刺激的滴定结果示于图11e-g。

[0220] 1.抗小鼠IgM(15μg/ml;Jackson ImmunoResearch Laboratories)

[0221] 2.抗小鼠-CD40(HM40-3,500ng/ml;Biolegend公司制造)

[0222] 3.BAFF(50ng/ml;Biolegend)

[0223] 4.Pam3CSK4(1μg/ml,Invivogen公司)

[0224] 5.聚I:C(25ng/ml,Invivogen公司)

[0225] 6.LPS(50ng/ml、Sigma Aldrich公司)

[0226] 7.鞭毛蛋白(20ng/ml、Sigma Aldrich公司)

[0227] 8.咪喹莫特(R837,5ng/ml;Invivogen公司)

[0228] 9.CpG(20μg/ml、GeneDsign Inc.)

[0229] 10.加热杀菌的大肠杆菌(E.coli)(10^7CFU/ml)

[0230] 11.加热杀菌的肠道沙门氏菌(S.Enterica)(10^8CFU/ml)

[0231] 12.加热杀菌的两歧双歧杆菌(B.bifidum)(10^7CFU/ml)

[0232] 13.加热杀菌的短双歧杆菌(B.breve)(10^7CFU/ml)

[0233] 刺激后的B细胞的CD11b表达使用细胞分选仪SH800(SONY)和光谱细胞分析仪SA3800(SONY),在第0天和第3天进行分析。

[0234] MDP刺激中,将提纯的脾脏B细胞(5×10^5/ml)利用加入有N-乙酰胞壁酰基-L-丙氨酰基-D-异谷氨酰胺水合物(1μg/ml;Sigma-Aldrich公司)的RPMI1640培养基进行培养。

[0235] 为了进行TLR抑制剂和NOD2抑制剂的分析,将提纯的脾脏B细胞(5×10^5/ml)在pam3CSK4(1μg/ml,Invivogen)、LPS(50ng/ml;Sigma-Aldrich)、CpG(20μg/ml,GeneDsign Inc)、热致死大肠杆菌(E.coli)(10^7CFU/ml)的存在下利用包含TLR1/2拮抗物、CU-CPT(1μ

M;Sigma-Aldrich)、TLR4抑制剂、TAK-242(1μM;Sigma-Aldrich)或NOD2信号抑制剂II、GSK717(30μM;Sigma-Aldrich)的RPMI1640培养基中进行培养。

[0236] 免疫化

[0237] 在第0天和第16天,对小鼠经口施用OVA(1mg)、OVA(1mg)+pam3CSK4(10μg、Invivogen公司)或OVA(1mg)+热致死大肠杆菌(100μl中10^9CFU)。在第21天采集便,通过酶联免疫吸附法(ELISA)进行OVA特异性抗体的测定。

[0238] OVA特异性IgA ELISA的检测

[0239] 将便悬浮在10倍重量/体积(w/v)的PBS中。离心分离(8,000g、15分钟)后,回收上清作为粪便提取液。将板用1mg/ml OVA预包被一夜,接着利用包含1%(w/v)牛血清白蛋白的PBS在室温下封闭1小时。之后加入连续稀释的便提取物,在室温下温育1小时。IgA的相对结合力利用碱性磷酸酶标记山羊抗小鼠IgA(Southern Biotech公司制造)进行检测。在4℃温育一夜后,使用TriStar Multimode Reader LB942(BERTHOLD公司制造)测定405nm的光学密度(OD)值。

[0240] 加热杀菌后的细菌对WT小鼠的经口施用

[0241] 对Balb/c小鼠(8-12周龄)经口施用加热杀菌的大肠杆菌(E.coli)(将10^9CFU用100μl PBS稀释而成)、肠道沙门氏菌(S.enterica)(将10^9CFU用100μl PBS稀释而成)、两歧双歧杆菌(B.bifidum)(将10^9CFU用100μl PBS稀释而成)、短双歧杆菌(B.breve)(将10^9CFU用100μl PBS稀释而成)、pam3CSK4(将10μg用100μl PBS稀释而成)。作为对照,准备经口施用了100μl PBS的小鼠。2天后,摘除这些小鼠的PP,如上述那样使用光谱细胞分析仪SA3800(SONY)对GC的B细胞进行分析。

[0242] 以OVA作为抗原的经口佐剂施用

[0243] 将1mg的OVA作为抗原,在其中混合各佐剂(CpG-K3(GeneDsign Inc.)10μg、CpG-ODN1826(Invirogen tlrl-1826)10μg、或者加热杀菌的大肠杆菌(E.coli)10^9c.f.u.),每2周对C57BL/6小鼠进行3次经口免疫,在第3次免疫后的第2天实施采血。血清中的TNF-α值按照小鼠TNF-αELISA试剂盒(Invitrogen,BMS607-3)的操作规程进行测定。

[0244] 通过事先刺激诱导的被移植的iGB细胞的体内(in vivo)成像

[0245] 如上所述,将脾脏初始B细胞使用pam3CSK4(1μg/ml、Invivogen公司)、加热杀菌的大肠杆菌(10^7CFU/ml)、CpG(20μg/ml、GeneDsign Inc公司)或者抗IgM-Ab(15μg/ml、Jackson Immuno Research Laboratories公司)分别在体外(in vitro)培养3天。之后,由刺激细胞分离出1×10^5个$B220^+$B细胞,接着接种在添加有rIL-4(1ng/ml;Biolegend公司)的40LB饲养细胞中,诱导iGB细胞。作为对照组,将未受刺激的脾脏初始B细胞接种在添加有rIL-4(1ng/ml;Biolegend公司)的40LB饲养细胞中。培养4天后,分离出3×10^5个iGB细胞($B220^+$)的初始B-40LB细胞、pam3CSK4-40LB细胞、大肠杆菌(E.coli)-40LB、IgM-40LB和CpG-40LB细胞,利用细胞示踪橙CMTMR荧光色素(Invitrogen公司)标记后,与用于识别HEV的AF488抗小鼠MAdCAM-1(Biolegend mAb MECA-367)10μg一起分开地静脉内注射至小鼠(Balb/c,8-12周龄)中。为了对IgA^+细胞进行染色以鉴定GC,在麻醉下将AF647抗小鼠IgA(Southern Biotech)1μg直接注入至与移入有iGB细胞的小鼠相同的小鼠的PP中。利用显微镜LSM880(Carl Zeiss)和ZEN2009(Carl Zeiss)的分析软件观察静注后的标记iGB细胞的定位。

[0246] 重排的VDJ区域和下游内含子的DNA扩增

[0247] 关于具有下游内含子序列的重排的VDJ序列,通过使用几种不同的上游引物(此处,“S”为C或G,“R”为A或G,“N”为A、G、C或T,“M”为A或C,“W”为A或T)的2轮嵌套PCR进行扩增。MH1:5’-SARGTNMAGCTGSAGSAGTC-3’;MH2:5’-SARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG-3’;MH3:5’-CAGGTTACTCTGAAAGWGTSTG-3’。MH4:5’-GAGGTCCARCTGCAACARTC-3’;MH5:5’-CAGGTCCAACTVCAGCARCC-3’;MH6:5’-GAGGTGAASSTGGTGGAATC-3’。将MH7:5’-GATGTGAACTTGGAAGTGTC-3’与JH4R引物(5’-GACTAGTCCTCTCCAGTTTCGGCTGAATCC-3’)[16,42](与位于IgH内含子•增强子的5’末端的序列互补)一起使用。第2次PCR中,将相同的上游引物与JH4R-2引物(5’-CAGGTGGTGTTTTGCTCA-3’)(与JH4R引物的上游序列互补)一起使用。扩增中,使用PrimeSTAR Max DNA聚合酶(TaKaRa公司制造),通过20次循环(95℃15秒、58℃10秒、72℃30秒)进行第1轮PCR,通过30次循环进行第2轮PCR。将PCR产物克隆至pGEM T载体(Promega公司)中后,使用EmeraldAmp(注册商标)PCR混合母液(TAKARA公司),利用JH4F引物(5’-TAT GCT ATG GAC TAC TGG-3’)和JH4R-2引物进行菌落PCR,选择包含内含子序列的克隆。

[0248] DNA测序和SHM分析

[0249] 分离出质粒DNA后,使用T7引物和SP6引物进行DNA序列分析。IgH的内含子DNA序列的共有序列由登记号AJ 851868.3取得。重排的VDJ利用IgBLAST进行分析。

[0250] 统计分析

[0251] 除非另有记载,统计分析使用Mac用GraphPad Prism 8.4.2版(GraphPad Software,圣迭戈,CA,USA)进行。2组间的差异使用双侧学生t检验进行比较。具有3个以上组的情况下,在单因素或双因素的方差分析(ANOVA)后,进行Tukey的多重比较检验。统计学检验以及组数和复制的相关详细内容示于图例中。将p值<0.05作为显著。

[0252] 实施例1:在小鼠的PP中表达CD11b的IgA^+B细胞的小群体

[0253] 通过流式细胞术确认到在PP中存在$CD11b^+IgA^+$B细胞的小群体(PP B细胞的约0.1%～0.2%)(图2a、图6a)。$CD11b^+IgA^+$和$CD11b^-IgA^+$的PP B细胞均显示出花生凝集素$(PNA)^{high}$、Fas^{+16}之类的典型GC B细胞的表现型(图2b、c)。

[0254] 接着,由于pre-GC B细胞存在于进入GC之前的IF区域(GC外),因此调查了$CD11b^+IgA^+$B细胞的定位[3,4]。在免疫组织学上通过PNA和IgA这两者的表达确定了GC区域(图2d)。其结果可知,在切片的GC外的区域仅存在2个$CD11b^+IgA^+$B细胞(黄色的细胞)(图2d、图7)。接着对CD11b配体的定位进行了分析。细胞间粘附分子1(ICAM-1)作为介导细胞的粘附和移动的CD11b/CD18的配体而广为人知[17]。如已有报道[8,18]中所示,IF区域的GC B细胞与高内皮静脉(HEV)均表达ICAM-1。另外,HEV也表达粘膜寻址细胞粘附分子-1(MAdCAM-1)[19](图2e、图8)。尽管未能确认$CD11b^+IgA^+$PP B细胞与HEV直接结合,但可知在PP切片的IF区域中,7个$CD11b^+IgA^+$PP B细胞中的6个位于HEV的附近(图2f)。另外,还有1个$CD11b^+IgA^+$PP B细胞(No.7)位于GC的附近(图2f),由于该细胞在GC内不存在,因此提示了从IF移动至GC的可能性。

[0255] 接下来的问题是,$CD11b^+IgA^+$PP B细胞之后是否从GC外移动至GC内。分离出$CD11b^+IgA^+$和$CD11b^-IgA^+$的PP B细胞,附上标记后,将它们分开地注入到不同的IgA-Cre/$YC3.60^{flox}$报告小鼠的PP中。PP的GC可在IgA^+B细胞富集的区域中鉴定(图2d),因此,在IgA^+细胞中发出YC3.60的荧光的这些报告小鼠能够容易地鉴定PP的GC。注入1小时后,被注入的

CD11b$^-$IgA$^+$B细胞位于GC的内部(图2g)、提示CD11b$^-$IgA$^+$B细胞为GC的B细胞。另一方面,被注入的CD11b$^+$IgA$^+$B细胞不进入GC而是包围GC(图2g)。注入40小时后,被注入的CD11b$^+$IgA$^+$B细胞也进入了GC(图2h)。这样,原本存在于IF区域的CD11b$^+$IgA$^+$B细胞移动至GC。

[0256] 实施例2:CD11b$^+$IgA$^+$PP B细胞的基因表达

[0257] 为了进一步确认pre-GC B细胞的表现型,分离出CD11b$^+$IgA$^+$和CD11b$^-$IgA$^+$的PP B细胞,通过微阵列分析对基因表达进行比较(图3a和图6b)。CD11b$^+$IgA$^+$B细胞与CD11b$^-$IgA$^+$B细胞相比GC基因表达得相对较低、非GC基因表达得相对较高,表明CD11b$^+$IgA$^+$B细胞是与CD11b$^-$IgA$^+$B细胞不同的群体。为了确认微阵列的结果,进一步进行定量PCR(qPCR)(图3b和图6b),对CD11b$^+$IgA$^+$B细胞的基因表达与GC(PNA^{high}B220$^+$)和非GC(PNA^{low}B220$^+$)的PP B细胞的基因表达进行了比较。本发明人选择了包含bcl6(在GC的B细胞中受到限制的主要转录因子)、aicda(编码活化诱导胞苷脱氨酶(AID)并诱导体细胞超突变(SHM)和类别转换重组的酶)和s1pr2(在GC的内外控制B细胞的位置的受体)[10,20-22]的在GC的B细胞中高表达的3个基因、以及2个非GC基因gpr183(在滤泡外控制B细胞的位置的受体)和bcl2(在GC以外的B细胞中高表达的转录因子)[10,23,24]。CD11b+IgA+和CD11b$^-$IgA$^+$PP B细胞的这些基因的表达水平与非GC B细胞的这些基因的表达水平不同(图3b),表明这2个群体均为GC B细胞的可能性高。pre-GC B细胞中,转录因子irf4(已被证实对于GC反应的开始是必要的)的表达增加[10,11,25],因此进一步分析了irf4的表达。与CD11b$^-$IgA$^+$PP B细胞相比,CD11b$^+$IgA$^+$PP B细胞表达更高的irf4(图3b),可知其是pre-GC B细胞。但是,考虑到一部分GC亮区(LZ)B细胞也高表达irf4[8,25],接着利用流式细胞术对CD11b$^+$IgA$^+$PP B细胞的CXCR4与CD86的表达进行了分析。GC LZ B细胞被鉴定为CD86^{high}CXCR4^{low} B细胞[3,8],由于CD11b$^+$IgA$^+$B细胞与CD11b$^-$IgA$^+$B细胞相比CD86的表达低、CXCR4的表达高(图3c、图6c),因此表明CD11b$^+$IgA$^+$B细胞不是GC LZ B细胞而是pre-GC B细胞。

[0258] 实施例3:CD11b$^+$IgA$^+$PP B细胞在进入GC之前与T细胞相互作用

[0259] 为了进入GC,如以前所报道,pre-GC的B细胞需要与T细胞或DC相互作用[3,26]。因此,调查了CD11b$^+$IgA$^+$PP B细胞在进入GC之前是否与CD4$^+$T细胞相互作用。IgA$^+$PP B细胞在基于流式细胞术的单一B细胞门中并不是CD4$^+$阳性的(图3d、图9)。但是,结合B细胞中存在IgA$^+$CD4$^+$双阳性的PP细胞的明确群体(图3d、图9),表明这些IgA$^+$PP B细胞与CD4$^+$T细胞发生了相互作用。特别是CD11b$^+$IgA$^+$B细胞中的40%以上显示出与CD4$^+$T细胞的结合(图3e、f、图9),提示CD11b$^+$IgA$^+$PP B细胞与CD4$^+$T细胞发生了相互作用。另一方面,约14.5%的CD11b$^-$IgA$^+$PP B细胞与CD4$^+$T细胞相互作用,在GC LZ中具有与CD4$^+$滤泡辅助性T细胞(T_{FH})相互作用的可能性(图3e、f)[4,8]。利用共聚焦显微镜拍摄从PP分离出的结合细胞时,能够进一步确认到CD11b$^+$IgA$^+$PP B细胞与CD4$^+$T细胞的相互作用(图3g)。这样,本次的结果明确表明了CD11b$^+$IgA$^+$PP B细胞为pre-GC PP B细胞。

[0260] 实施例4:CD11b$^+$IgA$^+$PP B细胞在Ig基因中累积SHM

[0261] 为了确认CD11b$^+$IgA$^+$B细胞是否来源于新活化的初始B细胞,对CD11b$^+$IgA$^+$和CD11b$^-$IgA$^+$PP B细胞的IgH的重排的VDJ区域和下游内含子序列这两者进行了测序,结果在GC反应中导入了SHM(图10a、10b)[16]。在CD11b$^+$IgA$^+$PP B细胞(25克隆中的21克隆)和CD11b$^-$IgA$^+$PP B细胞(39克隆中的32克隆)的80%以上的序列中观察到突变(图10b)。这表明,CD11b$^+$IgA$^+$PP B细胞不仅来源于新活化的初始B细胞,而且如以前所报道,也来源于再侵入到GC中的记忆B

细胞[6,7]。

[0262] 实施例5:细菌抗原在初始脾脏B细胞中诱导CD11b的表达

[0263] 本发明人关于CD11b$^+$IgA$^+$PP B细胞的发现提出了另一个疑问,即pre-GC B细胞的CD11b表达是由什么引起的。B细胞不仅受到抗原的刺激,而且与DC、T细胞相互作用,变化为pre-GC B细胞[3,4,26]。为了调查何种信号诱导CD11b的表达,本发明人分离出未经免疫的小鼠的初始脾脏B细胞,在BCR的交联中使用抗IgM、在与DC的相互作用中使用B细胞激活因子(BAFF)、在与T细胞的相互作用中使用抗CD40,进行体外(in vitro)培养。但是,模拟T-B和DC-B相互作用的这些刺激并未在初始B细胞中诱导出CD11b。接着,对于TLR2使用pam3CSK4、对于TLR3使用聚I:C、对于TLR4使用脂多糖(LPS)、对于TLR5使用鞭毛蛋白、对于TLR7使用咪喹莫特、对于TLR9使用CpG这样不同的Toll样受体(TLR)配体,对初始B细胞进行刺激。培养3天后,用pam3CSK4、LPS、CpG刺激的B细胞数比用抗IgM、抗CD40、BAFF、聚I:C、鞭毛蛋白、咪喹莫特刺激的B细胞显著增加(图11a、b)。用pam3CSK4和LPS刺激的B细胞中的CD11b$^+$B细胞的比例分别为27.6%和8%,而在利用其他刺激进行刺激的B细胞中,CD11b$^+$B细胞的比例为5%以下(图4-1a、b)。应当注意的是,虽然CpG活化B细胞的增殖,但并未诱导CD11b的表达。进而确认到,仅在利用已知为细菌抗原的pam3CSK4、LPS进行刺激的情况下,B细胞的itgam(CD11b)的表达增加(图4-1c)。接着,准备了对TLR2和(或)TLR4[27,28]这两者施加强刺激的加热杀菌的大肠杆菌,结果加热杀菌的大肠杆菌显著诱导了脾脏B细胞的CD11b表达(图4-1a)。由这些结果可知,作为TLR2和TLR4的配体的细菌抗原诱导B细胞的CD11b。

[0264] 由于PP GC内部的B细胞未表达CD11b(图2d),因此认为B细胞的CD11b表达是一过性的,可能通过T-B、DC-B的相互作用而收敛。因此,使用以表达CD40L和BAFF[26]的40LB细胞作为饲养层、模拟T细胞和DC细胞的作用诱导GC样B细胞的体外(in vitro)诱导GC B细胞(iGB)培养系统来追踪表面表现型。将细胞在iGB系统中进行培养时,分离出的CD11b$^+$IgA$^+$PP B细胞与分离出的CD11b$^-$IgA$^+$PP B细胞、初始脾脏B细胞能够以同样的水平进行增殖(图12a,b)。实际上,分离出的CD11b$^+$IgA$^+$PP B细胞在iGB系统中培养1天时,失去了CD11b的表达(图4-1d、图12a)。同样地,由pam3CSK4诱导的CD11b$^+$脾脏B细胞在iGB系统中培养4天时,失去了CD11b的表达(图4-1e、图12c)。利用抗CD40 Ab和抗IgM Ab进行了处理的脾脏初始B细胞即使在pam3CSK4的存在下也显著抑制了CD11b的表达(图4-1f-h)。这表明,T-B细胞间的相互作用和BCR交联会下调B细胞的CD11b表达。因此,在生物体内仅观察到极少数的CD11b$^+$IgA$^+$PP B细胞是恰当的(图2)。

[0265] 为了进一步确认TLR2和TLR4是否参与了脾脏B细胞的CD11b表达诱导,在TLR1/2抑制剂、TLR4抑制剂、NOD2抑制剂的存在下,利用pam3CSK4、LPS、CpG、热灭活的大肠杆菌对脾脏B细胞进行刺激。已知NOD2参与TLR2的下游的信号传递[29]。有趣的是,在使用TLR1/2抑制剂的情况下,pam3CSK4和加热杀菌的大肠杆菌使CD11b$^+$B细胞的比例增加,但利用TLR4抑制剂时,该比例未增加(图4-1i)。另一方面,作为NOD2配体的胞壁酰二肽(MDP)未诱导CD11b的表达,但NOD2抑制剂强力抑制了利用pam3CSK4和加热杀菌的大肠杆菌刺激后的B细胞的CD11b的表达(图11d)。该结果有力地提示,CD11b的表达不是通过TLR2、TLR4的活化被直接诱导的,而是通过NOD2介导的来自细菌的刺激被部分地诱导的(图4-1i)。

[0266] 对于加热杀菌的属于变形杆菌门的克雷伯氏肺炎杆菌(Klebsiella pneumoniae)和属于拟杆菌门的普通拟杆菌(Bacteroides vulgatus),与大肠杆菌同样地进行了试验,

结果确认到,这些细菌也诱导CD11b的表达。将利用各细菌刺激后的B细胞中的$CD11b^{+}$B细胞的比例示于图4-2。该结果表示,属于变形杆菌门的细菌和属于拟杆菌门的细菌在初始脾脏B细胞中诱导CD11b的表达。

[0267] 实施例6:热处理的CD11b诱导性细菌的经口施用对GC反应的促进

[0268] 接下来的问题是,什么样的细菌能够经由CD11b的表达诱导pre-GC B细胞。作为有害菌选择大肠杆菌(E.coli)和肠道沙门氏菌(S.enterica),作为代表性的有益菌选择两歧双歧杆菌(B.bifidum)和短双歧杆菌(B.breve)。通过体外(in vitro)的刺激,大肠杆菌和肠道沙门氏菌(S.enterica)诱导了CD11b的表达,但两歧双歧杆菌(B.bifidum)和短双歧杆菌(B.breve)并未诱导CD11b的表达(图5a、b)。将pam3CSK4、加热杀菌的菌经口施用至小鼠,结果在2天内PP GC B细胞的数目和比例增加(图5c-e)。由此提示,在生物体内能够增强进行中的GC反应的仅为有害细菌。

[0269] 实施例7:培养B细胞能够通过CD11b的一过性表达向GC侵入。

[0270] 接着,确认了在体外(in vitro)诱导的$CD11b^{+}$B细胞是否能够侵入现有GC中。为了在体外(in vitro)诱导GC的B细胞,将脾脏的初始B细胞利用pam3CSK4或加热杀菌的大肠杆菌进行体外(in vitro)刺激来诱导CD11b,之后在40LB细胞上培养4天。利用作为诱导CD11b的刺激的pam3CSK4或加热处理的大肠杆菌事先进行了刺激的iGB细胞被静脉内注射到小鼠中时,大部分进入到GC中,而利用CpG、抗IgM等事先刺激但不表达CD11b的iGB细胞未进入到GC中(图5f、图13)。由以上的结果表明,为了使pre-GC的B细胞进入GC,必须在与T-B或DC-B的相互作用之前使B细胞表达CD11b。这与作为非自身抗原的细菌抗原对于引起GC反应很重要[30]的既往报道是一致的。

[0271] 实施例8:CD11b诱导性的加热杀菌的细菌作为有效的粘膜佐剂发挥功能,诱导抗原特异性粘膜IgA

[0272] 以TLR2或TLR9配体为基础的佐剂可有效地刺激DC,因此已被广泛用于疫苗接种[31,32]。但是,本发明人的结果表明,B细胞可在接受DC或T细胞的帮助之前确定自身细胞命运为pre-GC B细胞。因此,本发明人认为,pam3CSK4与加热处理的大肠杆菌或许可作为粘膜疫苗的佐剂发挥功能。本发明人将作为抗原的卵清蛋白(OVA)经口施用至小鼠,此外还经口施用了pam3CSK4或加热杀菌的大肠杆菌作为佐剂(图5g)。如所预料的那样,在同时施用了OVA以及加热杀菌的大肠杆菌或pam3CSK4的小鼠中,便中的OVA特异性IgA增加,但在仅施用了OVA的小鼠中并未增加(图5h)。这样,通过本研究可知,B细胞上的作为pre-GC表面标记物的CD11b是用于选择有效的粘膜疫苗佐剂的有希望的标记物,特别是可增强来自GC的高亲和力粘膜IgA。

[0273] 另一方面,对第3次免疫后的细胞因子的浓度进行了测定,结果本公开的佐剂组合物完全未使血清TNFα的浓度升高。另一方面,认为作为现有疫苗佐剂而已知的CpG-K3和CpG-ODN1826引起血清TNFα的浓度上升,诱发炎症反应(图14)。

[0274] 由该结果确认到,本公开的佐剂组合物具有高抗原特异性结合性IgA诱导能力而不会诱导炎症反应,在这一点上具有极为有益的特性。

[0275] (考察)

[0276] 本研究中,通过调查$CD11b^{+}IgA^{+}$B细胞的不同群体,表明了CD11b为pre-GC IgA^{+}B细胞的新的表面标记物。B细胞中的CD11b的诱导依赖于有害的细菌抗原的刺激,但与活化DC

无关。将这些CD11b诱导性细菌抗原经口施用至小鼠,结果在体内增强了粘膜抗原特异性IgA反应。这些结果表明,在进入GC之前使活化B细胞一过性表达CD11b是用于选择适合于GC应答的活化B细胞的重要步骤。

[0277] 关于B细胞中的CD11b的功能,Yan的团队阐明了CD11b对于经由Lyn-CD22-SHP-1的负反馈通路来控制BCR信号很重要[13]。在CD11b-/-小鼠中,抗体产生亢进,观察到因自身反应性B细胞所致的GC反应[13,14]。另外,编码CD11b的ITGAM基因的突变作为系统性红斑狼疮(SLE)等自身免疫疾病发病的高风险因子[33]被进行了报道。本公开中确认了CD11b的表达是进入GC之前的B细胞的标记物。认为CD11b的一过性表达对于进入GC是充分但非必要的。当B细胞通过细菌的刺激被活化时,B细胞表达CD11b,防止其增殖并产生自身反应性的抗体。之后,B细胞在IF区域开始与T细胞相互作用。在T-B相互作用后,活化的B细胞失去CD11b的表达,进入GC DZ,迅速地增殖,为了获得高亲和力而经受SHM。认为,CD11b在控制活化B细胞以使其发生有益的GC反应的方面发挥出重要的作用,也控制其以避免有害的自身反应。

[0278] 人的B细胞是否也通过微生物抗原而表达CD11b呢?Dutra的团队证实了,利用来自克氏锥虫(Trypanosoma cruzi)的富含蛋白的组分刺激恰加斯病患者的B细胞时,$CD11b^+$B细胞的频率增高[34]。

[0279] 另外还明确了什么样的信号诱导CD11b的表达。首先,作为TLR2配体的pam3CSK4和热灭活的大肠杆菌在体外(in vitro)强力诱导B细胞的CD11b,因此预测通过TLR2刺激可诱导CD11b。大肠杆菌具有作为细胞壁构成成分的肽聚糖(PGN),其成为TLR2的配体[35]。但是,出乎预料的是,通过pam3CSK4与TLR1/2抑制剂的合用,促进了B细胞的CD11b的表达。另一方面,通过pam3CSK4和加热杀菌的大肠杆菌诱导的CD11b的表达被NOD2抑制剂所抑制(图4-1i),由此提示,NOD2对CD11b进行了控制。该结果与NOD2作为TLR2的负调控因子发挥作用[35]的以往研究结果部分地一致。此外,NOD2通过抑制与克隆病(CD)强相关的TLR2/4介导的炎性细胞因子产生的诱导,对免疫耐受和稳态性的维持作出贡献[36]。如此提示了TLR2-NOD2通路经由CD11b不仅控制炎症反应、而且还控制GC反应的可能性。但是,另一研究表明TLR1/2信号通路与NOD2[37]是独立的。期待结合TLR2抑制剂对CD11b诱导的促进,通过进一步的研究明确详细情况。

[0280] 关于CD11b诱导性的细菌刺激,明确了作为有害菌示例的肠道沙门氏菌(S.enterica)、大肠杆菌(E.coli)在体外(in vitro)诱导CD11b的表达,在体内(in vivo)增强GC反应,并明确了克雷伯氏肺炎杆菌(Klebsiella pneumoniae)和拟杆菌纲的细菌普通拟杆菌(Bacteroides vulgatus)在体外(in vitro)诱导CD11b的表达,但双歧杆菌属(Bifidobacterium)并非如此。

[0281] 概括来说,根据本公开的实验明确了下述情况。

[0282] 1.$CD11b^+IgA^+$B细胞表达作为GC B细胞的表面标记物的PNA和FAS。$CD11b^+IgA^+$B细胞高表达GC B特异性基因,但不表达非GC基因。

[0283] 2.$CD11b^+IgA^+$B细胞高表达作为pre-GC基因的irf4。

[0284] 3.$CD11b^+IgA^+$B细胞位于GC的外侧并即将进入GC。

[0285] 4.$CD11b^+IgA^+$B细胞在GC外与$CD4^+$T细胞发生相互作用。

[0286] 5.通过基于细菌抗原的体外(in vitro)刺激,在脾脏B细胞中诱导CD11b的表达。

[0287] 6.经口施用的细菌抗原在生物体内在2天以内促进GC反应。

[0288] 7.通过将热处理的大肠杆菌作为经口疫苗的佐剂使用,能够通过pre-GC的B细胞诱导提高抗原特异性反应。

[0289] 即,本公开明确了下述情况。

[0290] (1)$CD11b^{+}IgA^{+}$B细胞为pre-GC B细胞;

[0291] (2)B细胞中的CD11b的诱导在选择有效的粘膜免疫疫苗佐剂方面是有希望的标记物。

[0292] 并且提示了,B细胞可以不依赖于DC、T细胞而感知细菌的抗原并决定pre-GC细胞的自身细胞命运(图15)。

[0293] 粘膜免疫相关免疫诱导组织进行识别由粘膜组织上皮等摄取的抗原分子的IgA+B细胞的亲和力成熟,由粘膜上皮分泌高亲和力的抗体,由此在带来粘膜组织上的抗原特异性防御方面具有重要功能。粘膜免疫相关免疫诱导组织存在于肠道粘膜(派亚氏淋巴丛)、鼻腔粘膜等各种粘膜中,它们之中活化的免疫细胞在该粘膜或远端的粘膜等组织中提供抗原特异性防御(例如,日耳鼻114:843-850,2011,Vaccine Vol.30,pp.180-188,2012,Frontiers in Immunology,2021,Vol.12,Article 635471)。通过本公开的各实施例,以作为粘膜免疫相关免疫诱导组织的派亚氏淋巴丛生发中心为模型,明确了$CD11b^{+}IgA^{+}$B细胞进入生发中心(GC)而进行亲和力成熟,产生高亲和力的抗体。并且明确了,在IgA^{+}B细胞中诱导CD11b表达的加热灭菌细菌可作为抑制炎症反应诱发的极为有用的粘膜免疫疫苗佐剂使用。

[0294] 本公开中明确了,诱导$CD11b^{+}IgA^{+}$B细胞的佐剂对于各种粘膜免疫相关免疫诱导组织的生发中心的B细胞的亲和力成熟、以及高亲和力的IgA抗体产生诱导极为有用,并且可利用加热灭菌细菌作为该佐剂。

[0295] 已知粘膜分泌IgA抗体对细菌显示出多反应性,与通过一般的疫苗等诱导产生的IgG抗体等相比,能够提供针对广泛抗原的抗原特异性免疫防御(例如,肠内细菌学杂志31:151-157,2017,Science.20170ct 20;358(6361):eaan6619.,Cell Reports 36,109655,2021)。在一个方面,本公开的佐剂在抑制炎症应答、同时可提供多反应性的抗原特异性免疫防御方面极为有用,在药物、食品、饲料等领域中带来重大的贡献。

[0296] (参考文献)

[0297] 1.Turner,J.S.et al.Human germinal centres engage memory and naive B cells after influenza vaccination.Nature.586,127-132(2020).

[0298] 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).

[0299] 3.Mesin,L.,Ersching,J.,&Victora,G.D.Germinal center B cell dynamics.Immunity.45.3,471-482(2016).

[0300] 4.Kurosaki,T.,Kometani,K.,&Ise,W.Memory B cells.Nature Reviews Immunology.15.3,149-159(2015).

[0301] 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).

[0302] 6.Mesin,L.et al.Restricted clonality and limited germinal center reentry characterize memory B cell reactivation by boosting.Ce11.180.1,92-106 (2020).

[0303] 7.Chen,H.et al.BCR selection and affinity maturation in Peyer's patch germinal centres.Nature.582,421-425(2020).

[0304] 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).

[0305] 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).

[0306] 10.Song,S.&Matthias,P.D.The Transcriptional Regulation of Germinal Center Formation.Front Immunol.10.3389(2018).

[0307] 11.Willis,SN.et al.Transcription factor IRF4 regulates germinal center cell formationthrough a B cell-intrinsic mechanism.J Immunol.192(7), 3200-6(2014).

[0308] 12.Ahn,G.O.et al.Inhibition of Mac-1(CD11b/CD18)enhances tumor response toradiation by reducing myeloid cell recruitment.Proc Natl Acad Sci.107,8363-8368(2010)

[0309] 13.Ding,C.et al.Integrin CD11b negatively regulates BCR signalling to maintainautoreactive B cell tolerance.Nat Commun.4:2813(2013).

[0310] 14.Zhou,M.et al.Integrin CD11b Negatively Regulates B Cell Receptor Signaling toShape Humoral Response during Immunization and Autoimmunity.The Journal ofImmunology.207.7,1785-1797(2021).

[0311] 15.Kunisawa,J.et al.Microbe-dependent CD11b+IgA+plasma cells mediate robustearly-phase intestinal IgA responses in mice.Nat Commun,4,1772(2013)

[0312] 16.Wei,M.et al.Mice carrying a knock-in mutation of Aicda resulting in a defect insomatic hypermutation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense.Nature immunology.12.3,264-270(2011).

[0313] 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).

[0314] 18.Figenschau,S.L.et al.ICAM1 expression is induced by proinflammatory cytokinesand associated with TLS formation in aggressive breast cancer subtypes.Scientific Reports.8,11720(2018).

[0315] 19.Miyasaka,M.,Tanaka,T.Lymphocyte trafficking across high endothelial venules:dogmas and enigmas.Nat Rev Immunol 4,360-370(2004).

[0316] 20.Robinson,M.J.et al.The amount of BCL6 in B cells shortly after antigenengagement determines their representation in subsequent germinal centers.Cell reports.30.5,1530-1541(2020).

[0317] 21.Green,J.A.&Cyster,J.G.S1PR2 links germinal center confinement and

growthregulation.Immunological reviews.247.1,36-51(2012).

[0318] 22.Shinkura,S.et al.Separate domains of AID are required for somatic hypermutationand class-switch recombination.Nature Immunology.5,707-712(2004).

[0319] 23.Pereira,J.P.,Kelly,L.M.,Xu,Y.&Cyster,J.G.EBI2 mediates B cell segregationbetween the outer and centre follicle.Nature.460.1122-1126(2009).

[0320] 24.Saito,M.et al.BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuselarge B cell lymphoma.Proceedings of the National Academy of Sciences.106(27),11294-11299(2009).

[0321] 25.Ochiai,K.et al.Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cellfates by dynamical control of IRF4.Immunity.38.5,918-929(2013).

[0322] 26.Nojima,T.et al.In-vitro derived germinal centre B cells differentially generatememory B or plasma cells in vivo.Nature Communications.2,465(2011)

[0323] 27.Lee,H.K.,Lee,J.&Tobias,P.S.Two lipoproteins extracted from Escherichia coliK-12 LCD25 lipopolysaccharide are the major components responsible for Toll-like receptor2-mediated signaling.The Journal of Immunology.168(8),4012-4017(2002).

[0324] 28.Lachmandas,T.et al.Microbial stimulation of different Toll-like receptor signallingpathways induces diverse metabolic programmes in human monocytes.Nat Microbiol.2,16246(2017).

[0325] 29.Borm,M.,van Bodegraven,A.,Mulder,C.et al.The effect of NOD2 activation onTLR2-mediated cytokine responses is dependent on activation dose and NOD2 genotype.Genes Immun.9,274-278(2008).

[0326] 30.Schwickert,T.A.et al.A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinitydependent B cell entry into the germinal center.J Exp Med.208(6),1243-1252(2011).

[0327] 31.Rammensee,H.G.,Wiesmuller,K.H.&Loffler,M.W.A new synthetic toll-likereceptor 1/2 ligand is an efficient adjuvant for peptide vaccination in a human volunteer.j.immunotherapy cancer.7,307(2019).

[0328] 32.List,C.et al.Toll-Like Receptor Ligand Based Adjuvant,PorB, Increases AntigenDeposition on Germinal Center Follicular Dendritic Cells While Enhancing the FollicularDendritic Cells Network.Frontiers in Immunology.11,1254(2020).

[0329] 33.FARIDI,M.H.et al.CD11b activation suppresses TLR-dependent inflammationand autoimmunity in systemic lupus erythematosus.The Journal of clinical investigation,127.4:1271-1283(2017).

[0330] 34.PASSOS,L.S.A.et al.Activation of human CD11b+B1 B-cells by Trypanosomacruzi-derived proteins is associated with protective immune

response in human Chagasdisease.Frontiers in immunology.9,3015(2019)

[0331] 35.Watanabe,T.et al.NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated Thelper type 1 responses.Nat Immunol 5,800-808(2004)

[0332] 36.Caruso,R.et al.NOD1 and NOD2:signaling,host defense,and inflammatorydisease.Immunity 41.6,898-908(2014)

[0333] 37.Takeda,K.,Akira,S.Toll-like receptors in innate immunity.Internationalimmunology,17(1),1-14.(2005).

[0334] 38.Yang,Z.,Sullivan,B.M.&Allen,C.D.C.Fluorescent in vivo detection revealsthat IgE+B cells are restrained by an intrinsic cell fate predisposition.Immunity.36(5),857-872(2012).

[0335] 39.Nagai,T.et al.Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca2+bycircularly permuted yellow fluorescent proteins.Proceedings of the National Academy ofSciences.101(29),10554-10559,(2004).

[0336] 40.Yoshikawa,S.et al.Intravital imaging of Ca2+signals in lymphocytes of Ca2+biosensor transgenic mice:indication of autoimmune diseases before the pathological onset.Sci Rep.6,18738(2016).

[0337] 41.Miwa,Y.,Tsubota,K.&Kurihara,T.Effect of midazolam,medetomidine, andbutorphanol tartrate combination anesthetic on electroretinograms of mice.Molecular vision.25,645(2019).

[0338] 42.Jolly,C.J.,Klix,N.&Neuberger,M.S.Rapid methods for the analysis ofimmunoglobulin gene hypermutation:application to transgenic and gene targeted mice.Nucleic acids research.25.10,1913-1919(1997).

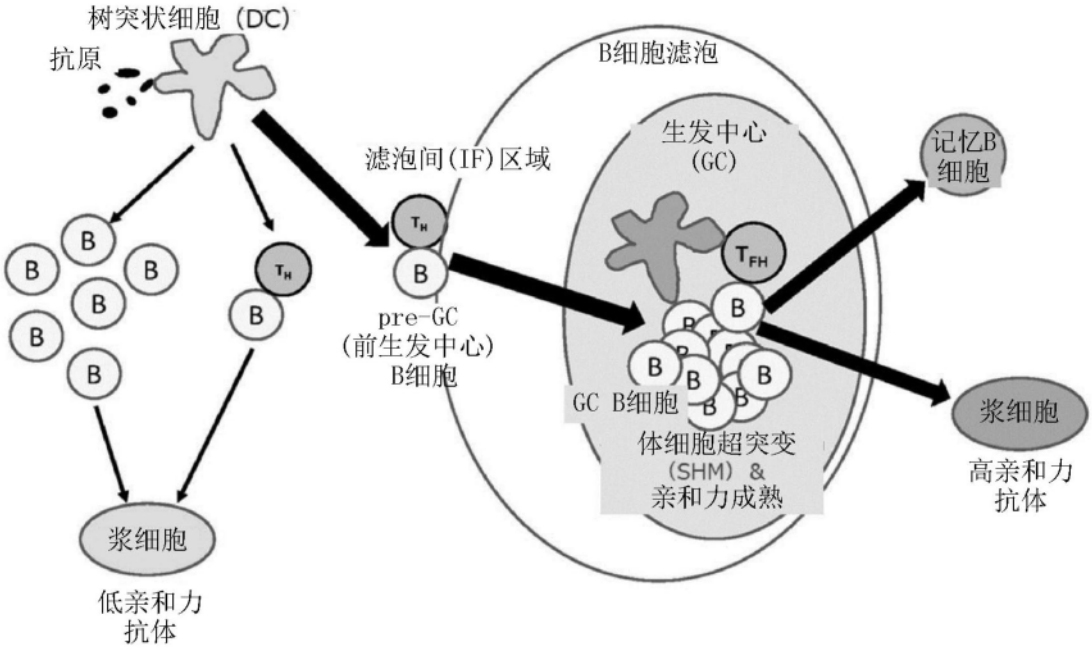

树突状细胞（DC）
抗原
B
B
B
B
B
B
T_H
B
浆细胞
低亲和力
抗体
滤泡间(IF)区域
T_H
B
pre-GC
(前生发中心)
B细胞
B细胞滤泡
生发中心
(GC)
T_{FH}
B
B
B
B
B
GC B细胞
体细胞超突变
(SHM) &
亲和力成熟
记忆B
细胞
浆细胞
高亲和力
抗体

图1

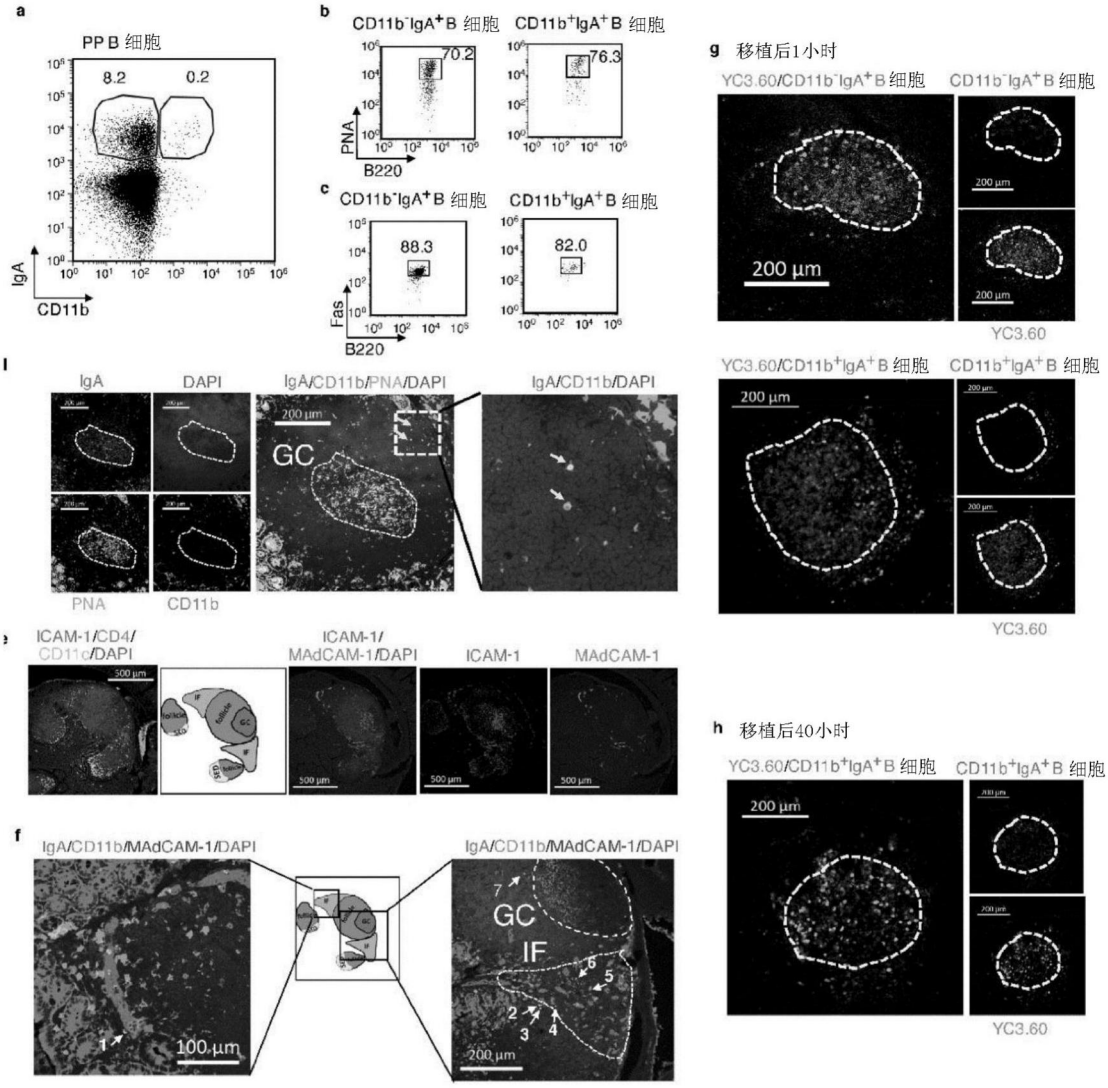

a
PP B 细胞
8.2
0.2
IgA
CD11b
b
CD11b⁻IgA⁺B 细胞
CD11b⁺IgA⁺B 细胞
70.2
76.3
PNA
B220
c
CD11b⁻IgA⁺B 细胞
CD11b⁺IgA⁺B 细胞
88.3
82.0
Fas
B220
g 移植后1小时
YC3.60/CD11b⁻IgA⁺B 细胞
CD11b⁻IgA⁺B 细胞
200 μm
YC3.60
YC3.60/CD11b⁺IgA⁺B 细胞
CD11b⁺IgA⁺B 细胞
200 μm
YC3.60
l
IgA
DAPI
IgA/CD11b/PNA/DAPI
IgA/CD11b/DAPI
200 μm
GC
PNA
CD11b
e
ICAM-1/CD4/
CD11c/DAPI
ICAM-1/
MAdCAM-1/DAPI
ICAM-1
MAdCAM-1
500 μm
f
IgA/CD11b/MAdCAM-1/DAPI
IgA/CD11b/MAdCAM-1/DAPI
1
100 μm
7
GC
IF
5
5
2
3
4
200 μm
h 移植后40小时
YC3.60/CD11b⁺IgA⁺B 细胞
CD11b⁺IgA⁺B 细胞
200 μm
YC3.60

图2

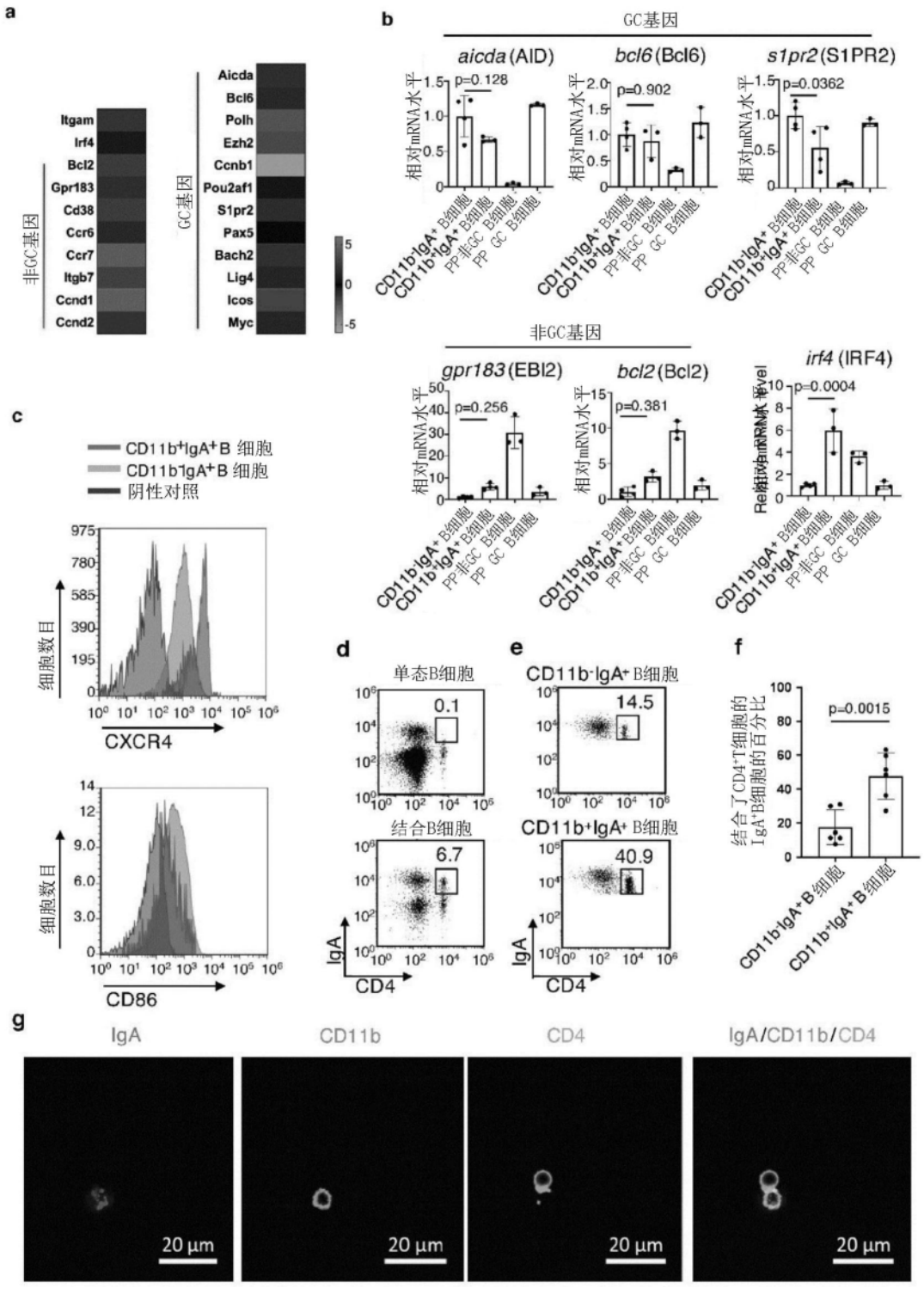

a
非GC基因
Itgam
Irf4
Bcl2
Gpr183
Cd38
Ccr6
Ccr7
Itgb7
Ccnd1
Ccnd2
GC基因
Aicda
Bcl6
Poln
Ezh2
Ccnb1
Pou2af1
S1pr2
Pax5
Bach2
Lig4
Icos
Myc
5
0
-5
b
GC基因
aicda (AID)
bcl6 (Bcl6)
s1pr2 (S1PR2)
相对mRNA水平
p=0.128
p=0.902
p=0.0362
非GC基因
gpr183 (EBI2)
bcl2 (Bcl2)
irf4 (IRF4)
p=0.256
p=0.381
p=0.0004
CD11b-IgA+ B细胞
CD11b+IgA+ B细胞
PP非GC B细胞
PP GC B细胞
c
CD11b+IgA+B 细胞
CD11b-IgA+B 细胞
阴性对照
细胞数目
CXCR4
CD86
d
单态B细胞
结合B细胞
0.1
6.7
IgA
CD4
e
CD11b-IgA+ B细胞
CD11b+IgA+ B细胞
14.5
40.9
f
结合了CD4+T细胞的IgA+B细胞的百分比
p=0.0015
g
IgA
CD11b
CD4
IgA/CD11b/CD4
20 μm

图3

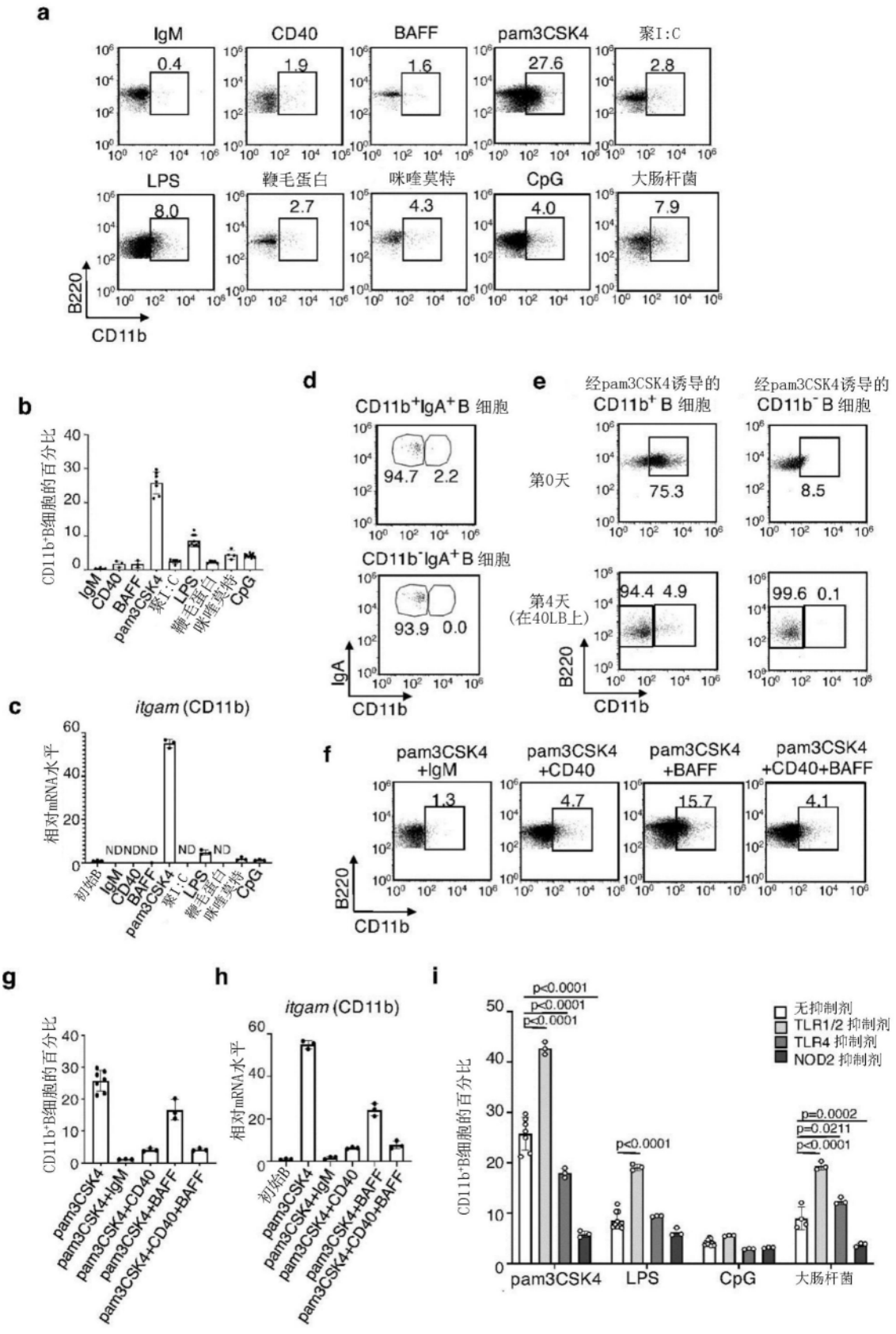

a
IgM
CD40
BAFF
pam3CSK4
聚I:C
0.4
1.9
1.6
27.6
2.8
LPS
鞭毛蛋白
咪喹莫特
CpG
大肠杆菌
8.0
2.7
4.3
4.0
7.9
B220
CD11b
b
CD11b+B细胞的百分比
IgM
CD40
BAFF
pam3CSK4
聚I:C
LPS
鞭毛蛋白
咪喹莫特
CpG
c
itgam (CD11b)
相对mRNA水平
NDNDND
ND
ND
初始B
d
CD11b+IgA+B 细胞
94.7 2.2
CD11b-IgA+B 细胞
93.9 0.0
IgA
CD11b
e
经pam3CSK4诱导的
CD11b+ B 细胞
经pam3CSK4诱导的
CD11b- B 细胞
第0天
75.3
8.5
第4天
(在40LB上)
94.4 4.9
99.6 0.1
B220
CD11b
f
pam3CSK4
+IgM
pam3CSK4
+CD40
pam3CSK4
+BAFF
pam3CSK4
+CD40+BAFF
1.3
4.7
15.7
4.1
B220
CD11b
g
CD11b+B细胞的百分比
pam3CSK4
pam3CSK4+IgM
pam3CSK4+CD40
pam3CSK4+BAFF
pam3CSK4+CD40+BAFF
h
itgam (CD11b)
相对mRNA水平
初始B
pam3CSK4
pam3CSK4+IgM
pam3CSK4+CD40
pam3CSK4+BAFF
pam3CSK4+CD40+BAFF
i
CD11b+B细胞的百分比
p<0.0001
p<0.0001
p<0.0001
p<0.0001
p=0.0002
p=0.0211
p<0.0001
无抑制剂
TLR1/2 抑制剂
TLR4 抑制剂
NOD2 抑制剂
pam3CSK4
LPS
CpG
大肠杆菌

图4-1

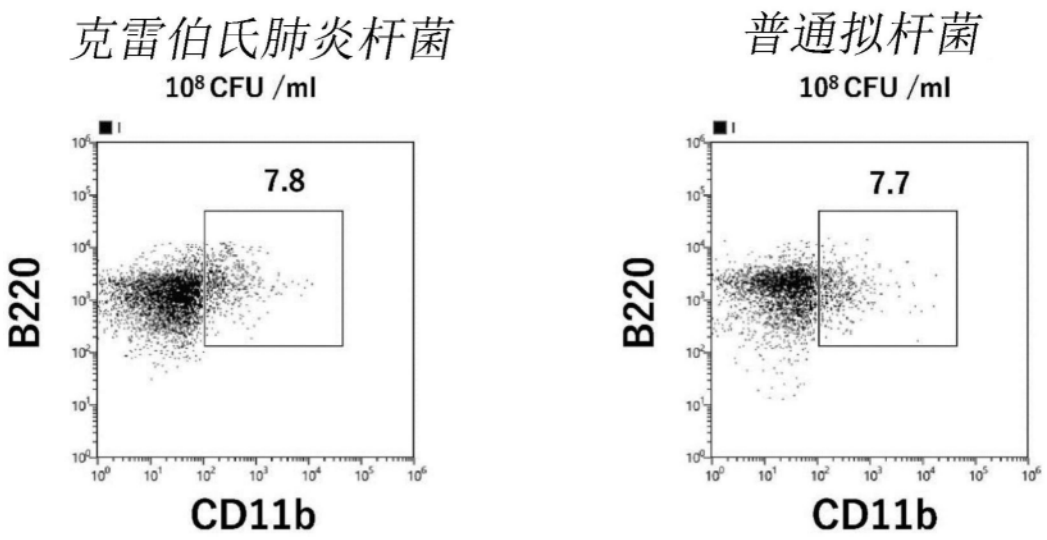

克雷伯氏肺炎杆菌
10⁸ CFU /ml
7.8
B220
CD11b
普通拟杆菌
10⁸ CFU /ml
7.7
B220
CD11b

图4-2

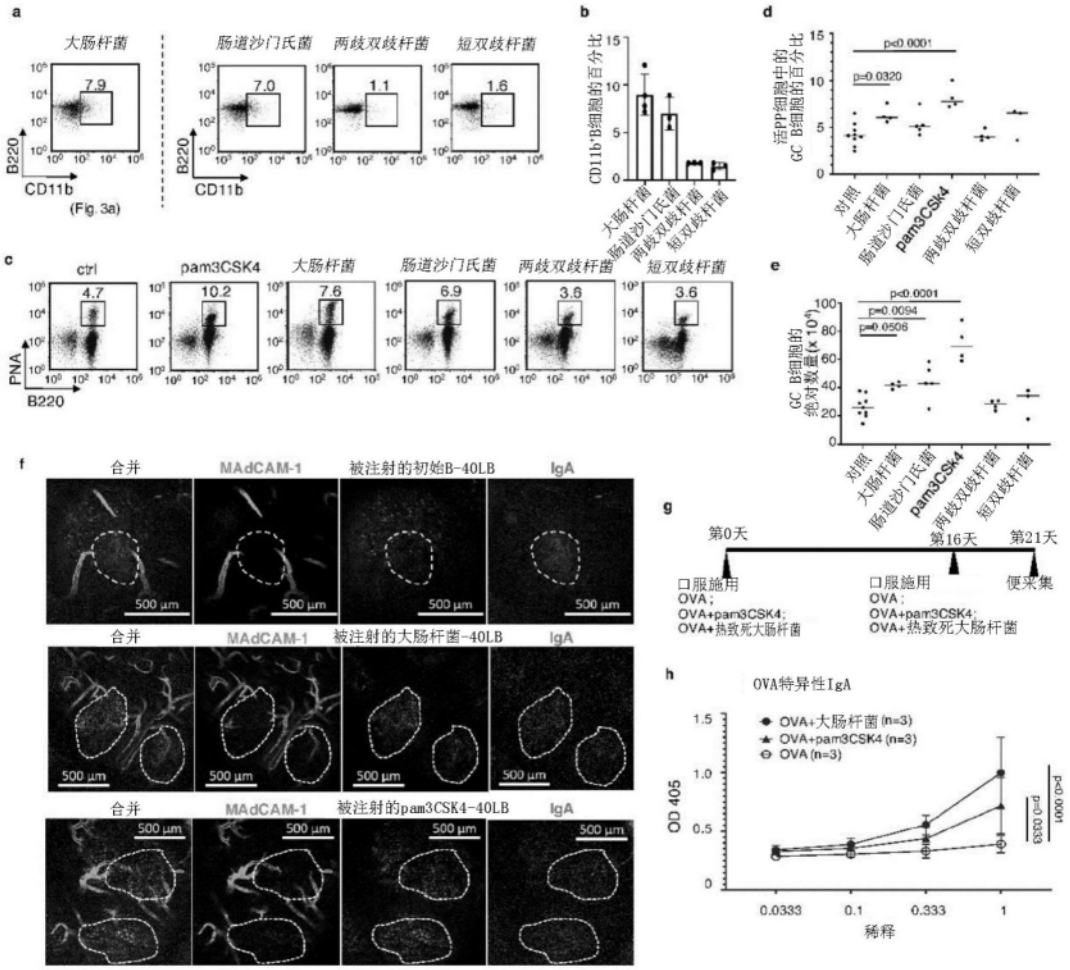

a
大肠杆菌
肠道沙门氏菌
两歧双歧杆菌
短双歧杆菌
7.9
7.0
1.1
1.6
B220
CD11b
(Fig.3a)
b
CD11b⁺B细胞的百分比
c
ctrl
pam3CSK4
大肠杆菌
肠道沙门氏菌
两歧双歧杆菌
短双歧杆菌
4.7
10.2
7.6
6.9
3.6
3.6
PNA
B220
d
活PP细胞中的GC B细胞的百分比
p<0.0001
p=0.0320
对照
大肠杆菌
肠道沙门氏菌
pam3CSK4
两歧双歧杆菌
短双歧杆菌
e
GC B细胞的绝对数量(×10⁴)
p<0.0001
p=0.0094
p=0.0506
f
合并
MAdCAM-1
被注射的初始B-40LB
IgA
被注射的大肠杆菌-40LB
被注射的pam3CSK4-40LB
500 μm
g
第0天
第16天
第21天
口服施用
OVA;
OVA+pam3CSK4;
OVA+热致死大肠杆菌
便采集
h
OVA特异性IgA
OVA+大肠杆菌(n=3)
OVA+pam3CSK4(n=3)
OVA(n=3)
OD 405
p<0.0001
p=0.0333
0.0333
0.1
0.333
1
稀释

图5

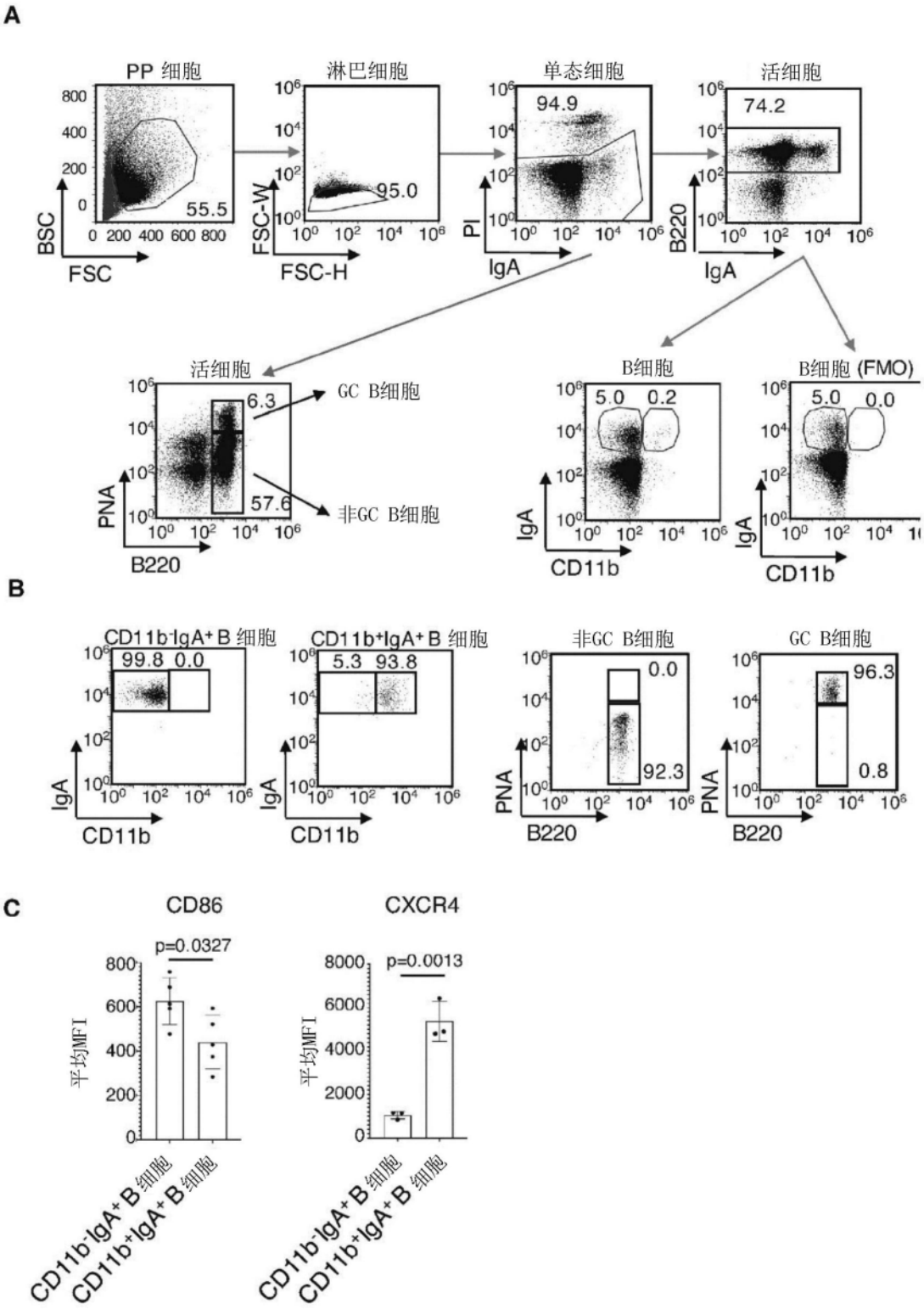

A
PP 细胞
淋巴细胞
单态细胞
活细胞
55.5
95.0
94.9
74.2
BSC
FSC
FSC-W
FSC-H
PI
IgA
B220
活细胞
6.3
57.6
GC B细胞
非GC B细胞
PNA
B220
B细胞
B细胞 (FMO)
5.0
0.2
5.0
0.0
IgA
CD11b
B
CD11b-IgA+ B 细胞
CD11b+IgA+ B 细胞
非GC B细胞
GC B细胞
99.8
0.0
5.3
93.8
0.0
92.3
96.3
0.8
C
CD86
CXCR4
p=0.0327
p=0.0013
平均MFI
CD11b-IgA+ B细胞
CD11b+IgA+ B细胞

图6

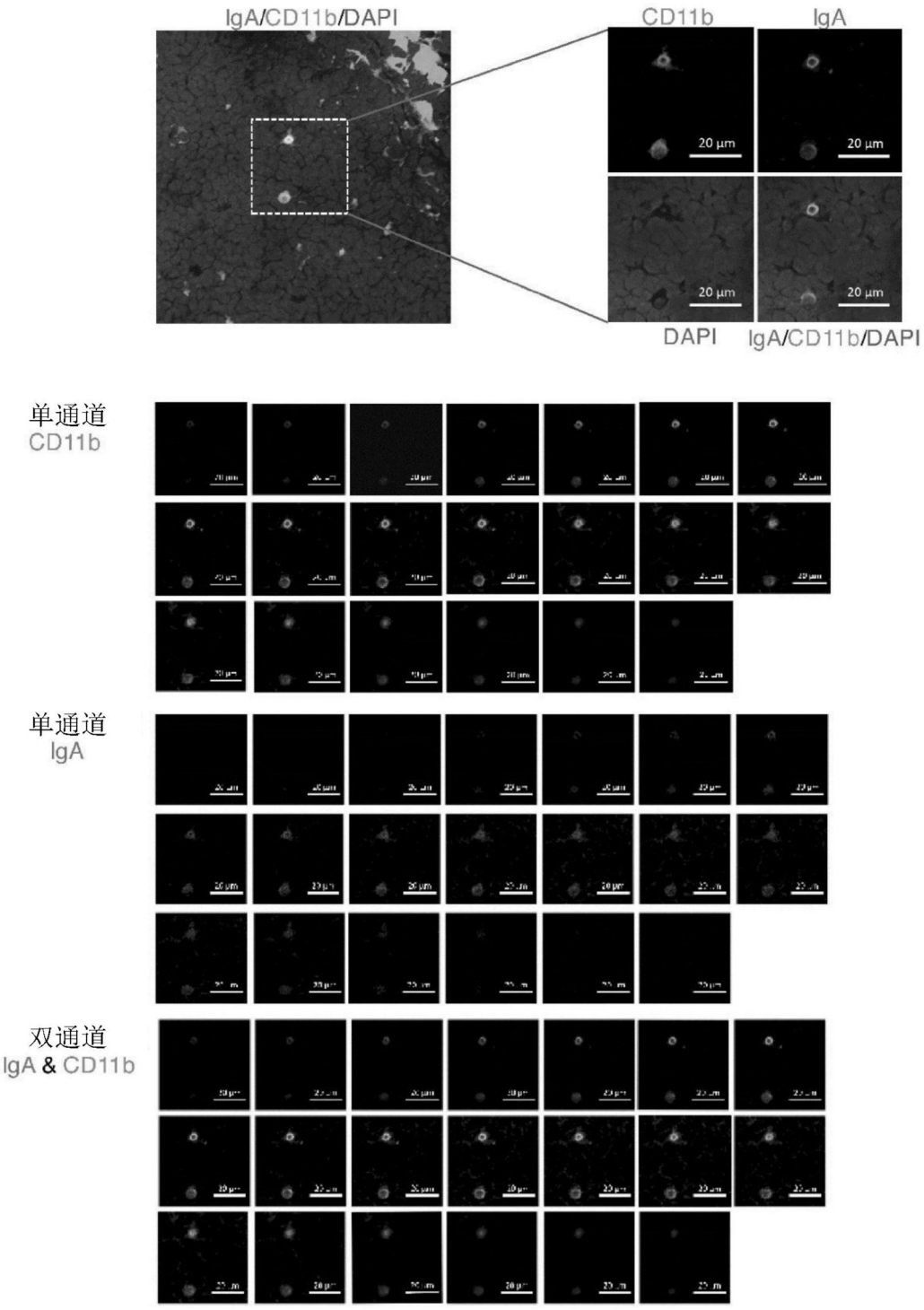

IgA/CD11b/DAPI
CD11b
IgA
20 μm
20 μm
20 μm
20 μm
DAPI
IgA/CD11b/DAPI
单通道
CD11b
单通道
IgA
双通道
IgA & CD11b

图7

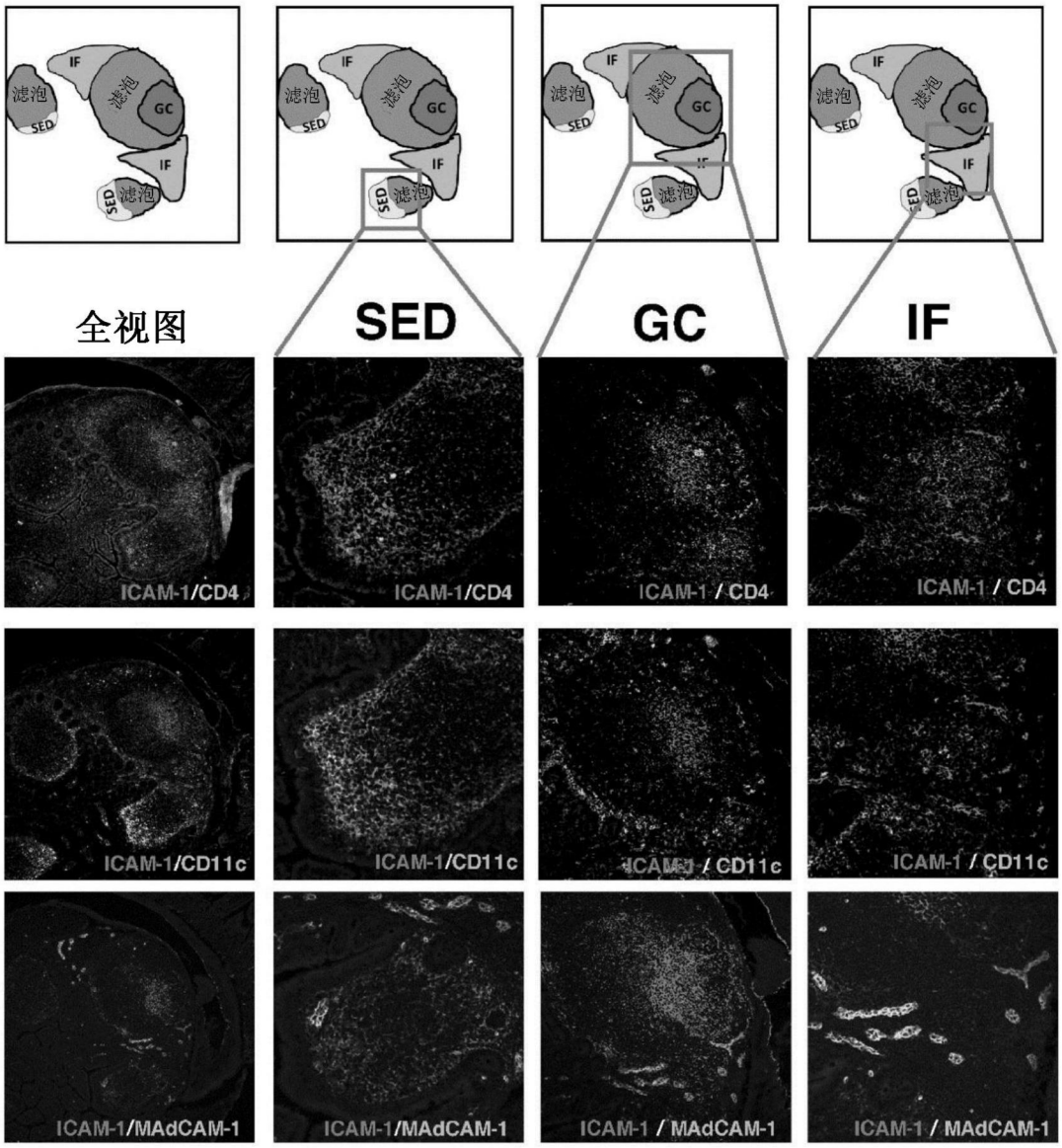

IF
滤泡
GC
SED
全视图
SED
GC
IF
ICAM-1/CD4
ICAM-1/CD4
ICAM-1 / CD4
ICAM-1 / CD4
ICAM-1/CD11c
ICAM-1/CD11c
ICAM-1 / CD11c
ICAM-1 / CD11c
ICAM-1/MAdCAM-1
ICAM-1/MAdCAM-1
ICAM-1 / MAdCAM-1
ICAM-1 / MAdCAM-1

图8

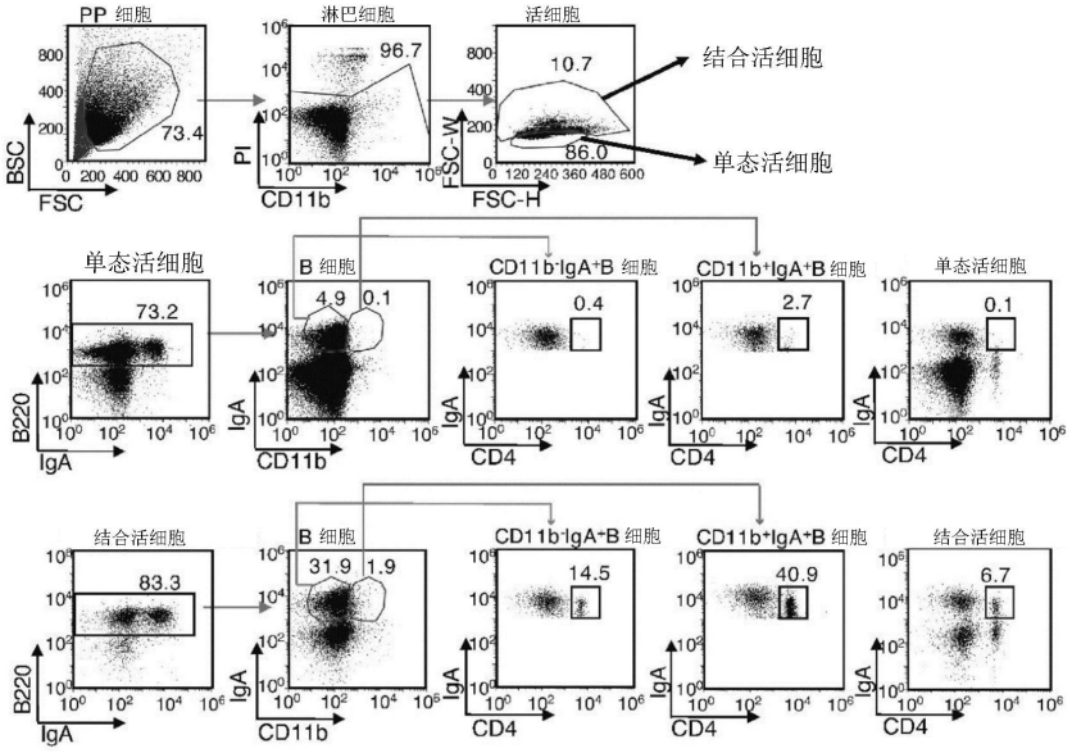

PP 细胞
淋巴细胞
活细胞
结合活细胞
单态活细胞
BSC
FSC
PI
CD11b
FSC-W
FSC-H
73.4
96.7
10.7
86.0
单态活细胞
B 细胞
CD11b⁻IgA⁺B 细胞
CD11b⁺IgA⁺B 细胞
单态活细胞
73.2
4.9
0.1
0.4
2.7
0.1
B220
IgA
CD4
结合活细胞
B 细胞
CD11b⁻IgA⁺B 细胞
CD11b⁺IgA⁺B 细胞
结合活细胞
83.3
31.9
1.9
14.5
40.9
6.7

图9

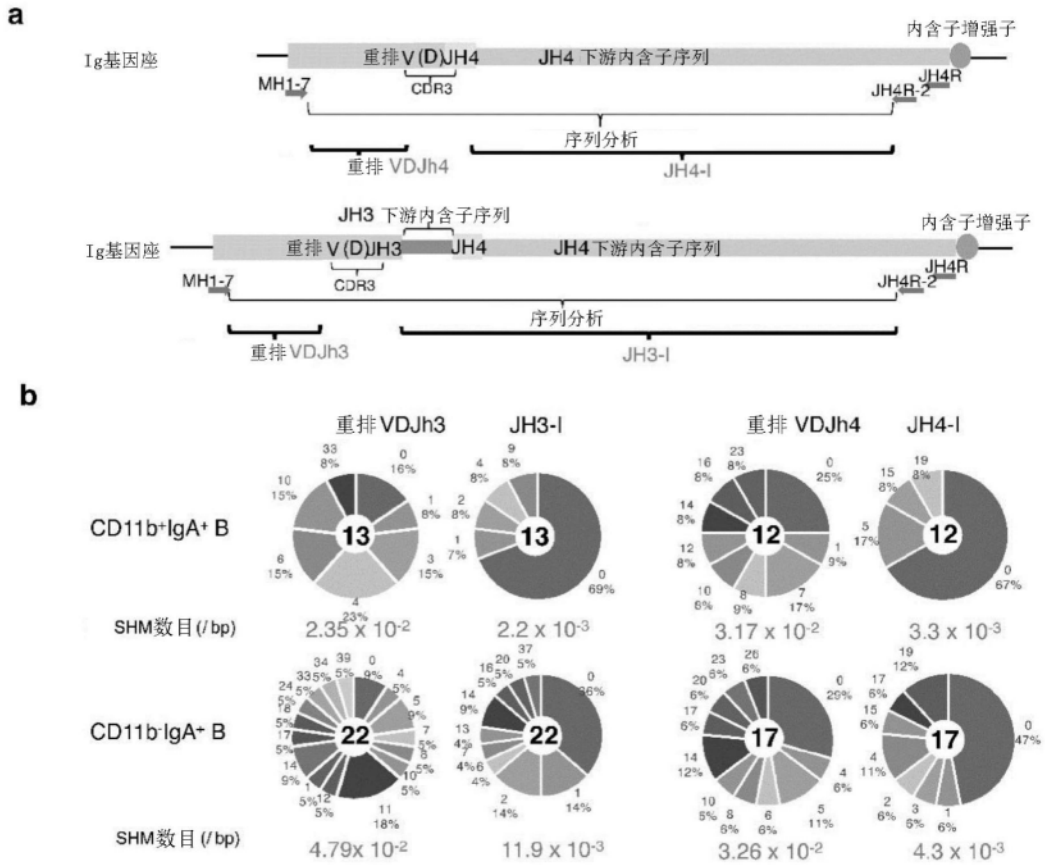

a
Ig基因座
重排V(D)JH4
JH4 下游内含子序列
内含子增强子
MH1-7
CDR3
JH4R
JH4R-2
序列分析
重排 VDJh4
JH4-I
JH3 下游内含子序列
Ig基因座
重排V(D)JH3
JH4
JH4下游内含子序列
内含子增强子
MH1-7
CDR3
JH4R
JH4R-2
序列分析
重排VDJh3
JH3-I
b
重排VDJh3
JH3-I
重排 VDJh4
JH4-I
CD11b+IgA+ B
SHM数目(/bp)
2.35 x 10-2
2.2 x 10-3
3.17 x 10-2
3.3 x 10-3
CD11b-IgA+ B
SHM数目(/bp)
4.79x 10-2
11.9 x 10-3
3.26 x 10-2
4.3 x 10-3

图10

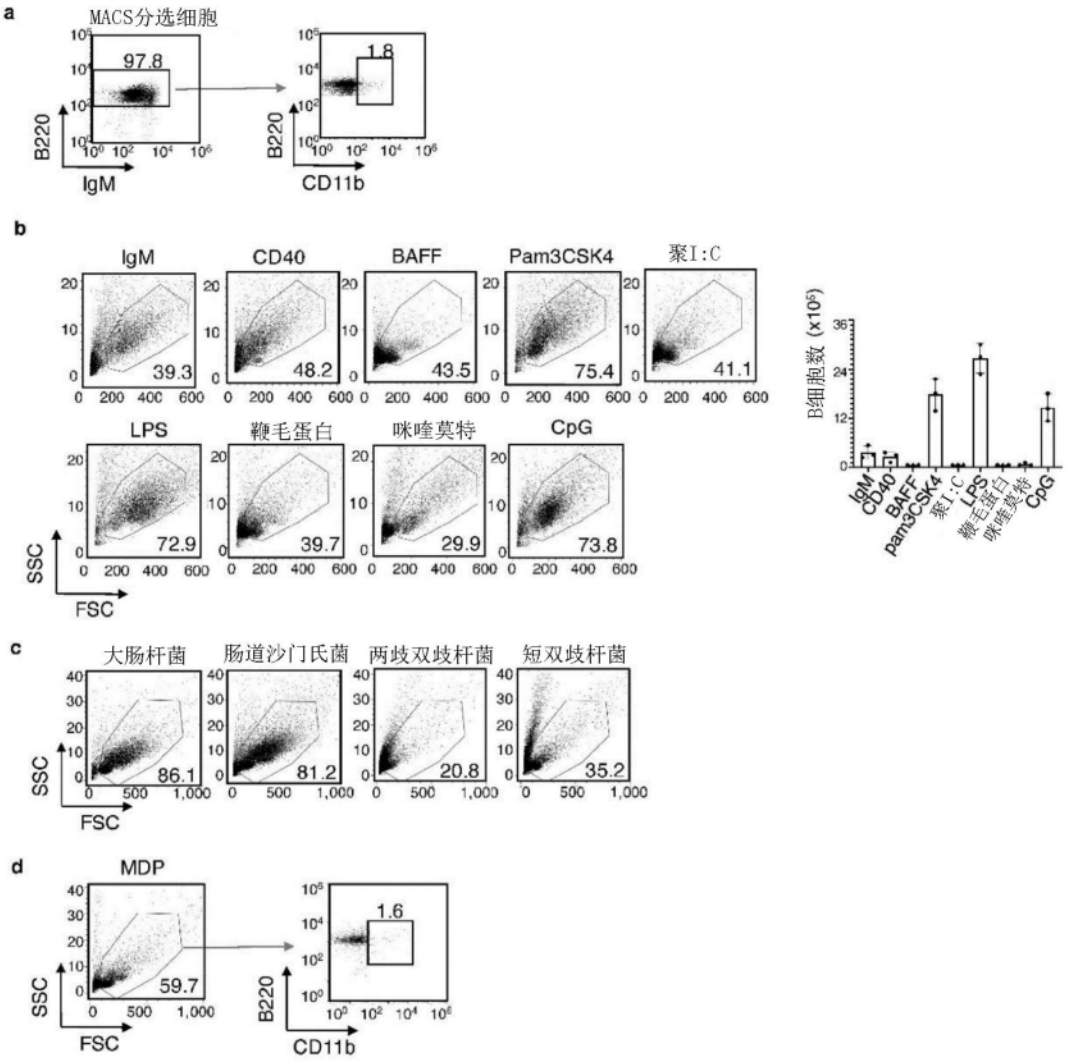

a
MACS分选细胞
97.8
1.8
B220
IgM
CD11b
b
IgM
CD40
BAFF
Pam3CSK4
聚I:C
39.3
48.2
43.5
75.4
41.1
LPS
鞭毛蛋白
咪喹莫特
CpG
72.9
39.7
29.9
73.8
SSC
FSC
B细胞数 (x10⁵)
c
大肠杆菌
肠道沙门氏菌
两歧双歧杆菌
短双歧杆菌
86.1
81.2
20.8
35.2
d
MDP
59.7
1.6

图11-1

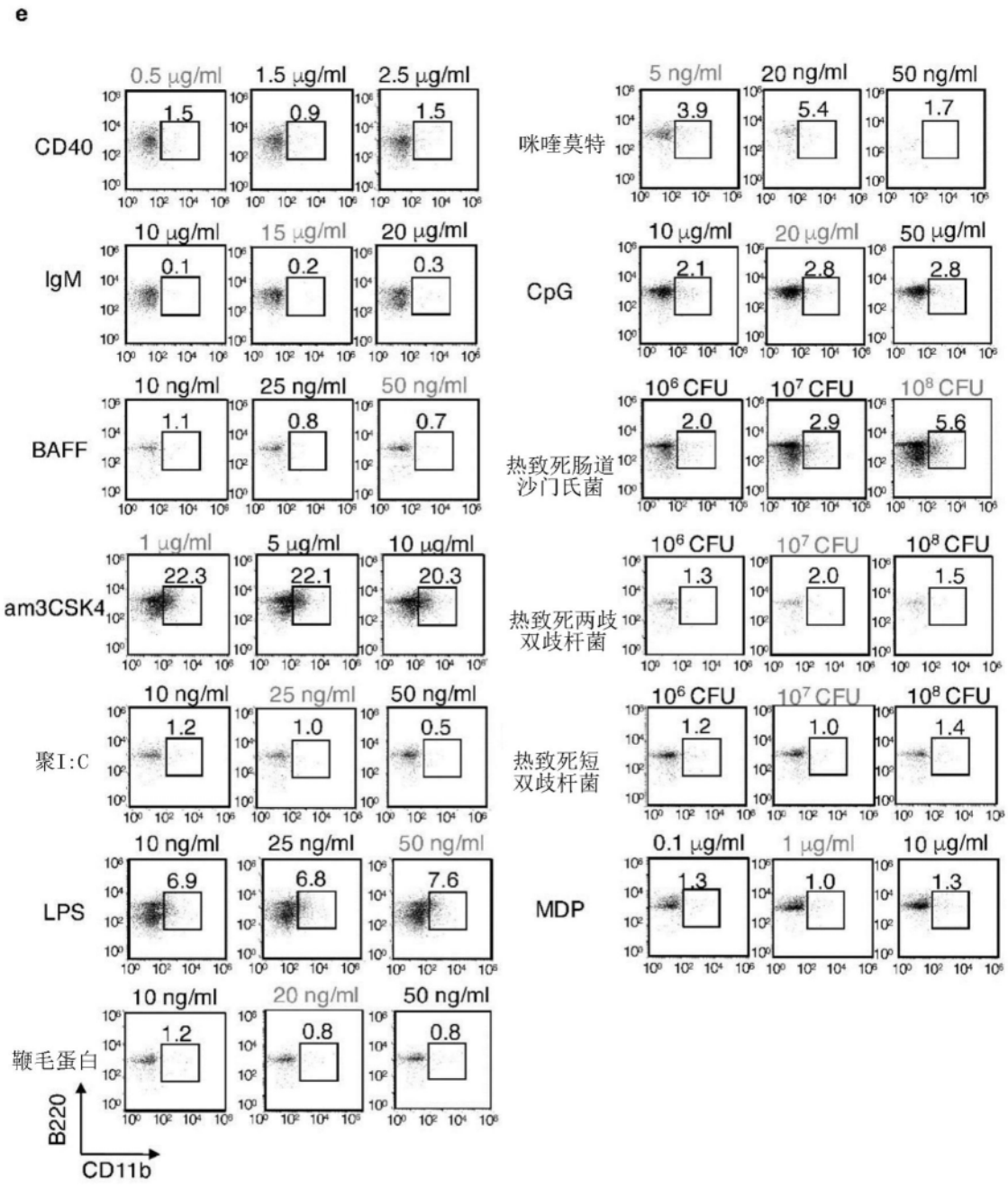

e
0.5 μg/ml
1.5 μg/ml
2.5 μg/ml
CD40
1.5
0.9
1.5
5 ng/ml
20 ng/ml
50 ng/ml
咪喹莫特
3.9
5.4
1.7
10 μg/ml
15 μg/ml
20 μg/ml
IgM
0.1
0.2
0.3
10 μg/ml
20 μg/ml
50 μg/ml
CpG
2.1
2.8
2.8
10 ng/ml
25 ng/ml
50 ng/ml
BAFF
1.1
0.8
0.7
10⁶ CFU
10⁷ CFU
10⁸ CFU
热致死肠道沙门氏菌
2.0
2.9
5.6
1 μg/ml
5 μg/ml
10 μg/ml
am3CSK4
22.3
22.1
20.3
10⁶ CFU
10⁷ CFU
10⁸ CFU
热致死两歧双歧杆菌
1.3
2.0
1.5
10 ng/ml
25 ng/ml
50 ng/ml
聚I:C
1.2
1.0
0.5
10⁶ CFU
10⁷ CFU
10⁸ CFU
热致死短双歧杆菌
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
鞭毛蛋白
1.2
0.8
0.8
B220
CD11b

图11-2

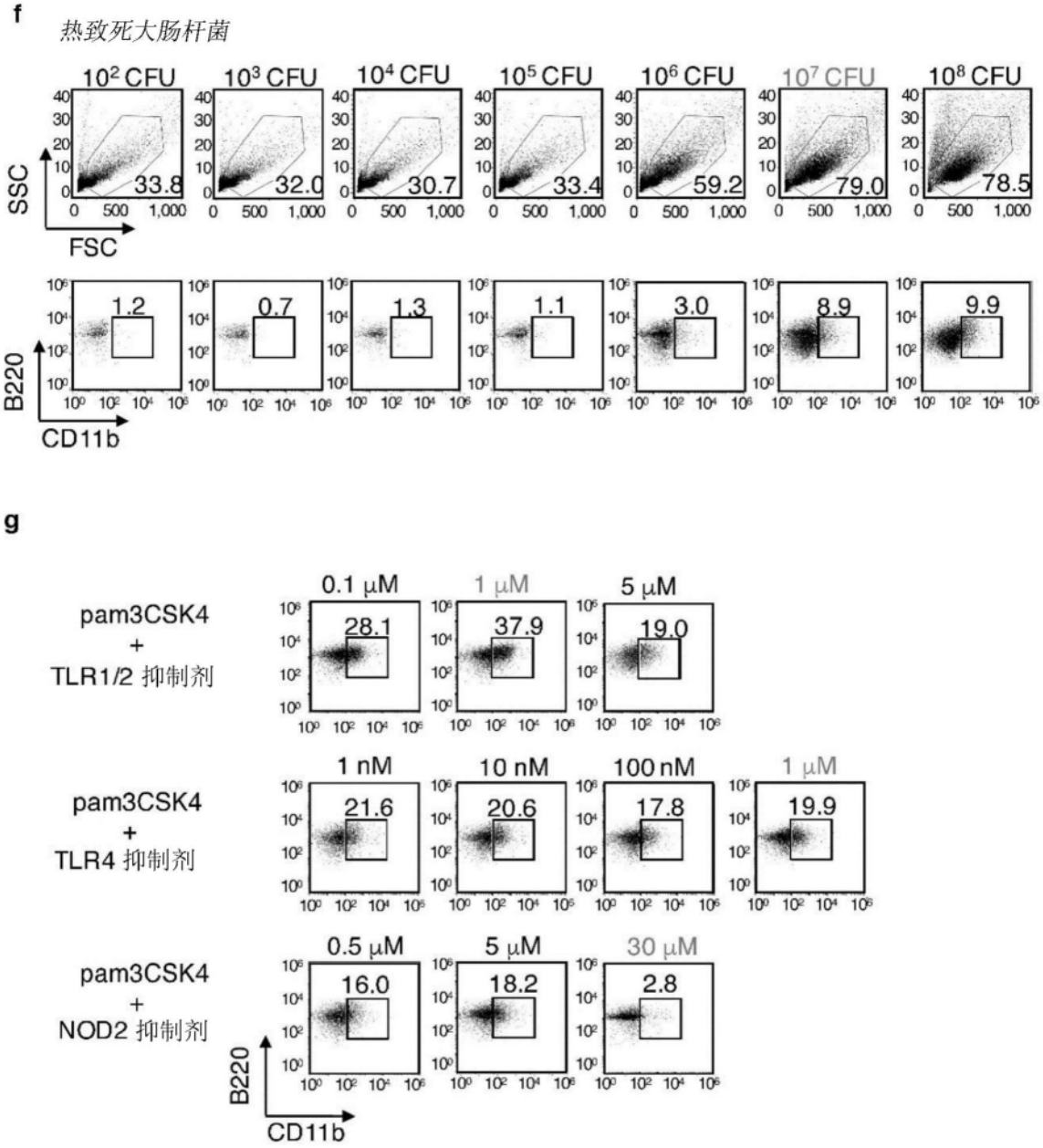

f
热致死大肠杆菌
10² CFU
10³ CFU
10⁴ CFU
10⁵ CFU
10⁶ CFU
10⁷ CFU
10⁸ CFU
SSC
FSC
33.8
32.0
30.7
33.4
59.2
79.0
78.5
B220
CD11b
1.2
0.7
1.3
1.1
3.0
8.9
9.9
g
pam3CSK4
+
TLR1/2 抑制剂
0.1 μM
1 μM
5 μM
28.1
37.9
19.0
pam3CSK4
+
TLR4 抑制剂
1 nM
10 nM
100 nM
1 μM
21.6
20.6
17.8
19.9
pam3CSK4
+
NOD2 抑制剂
0.5 μM
5 μM
30 μM
16.0
18.2
2.8
B220
CD11b

图11-3

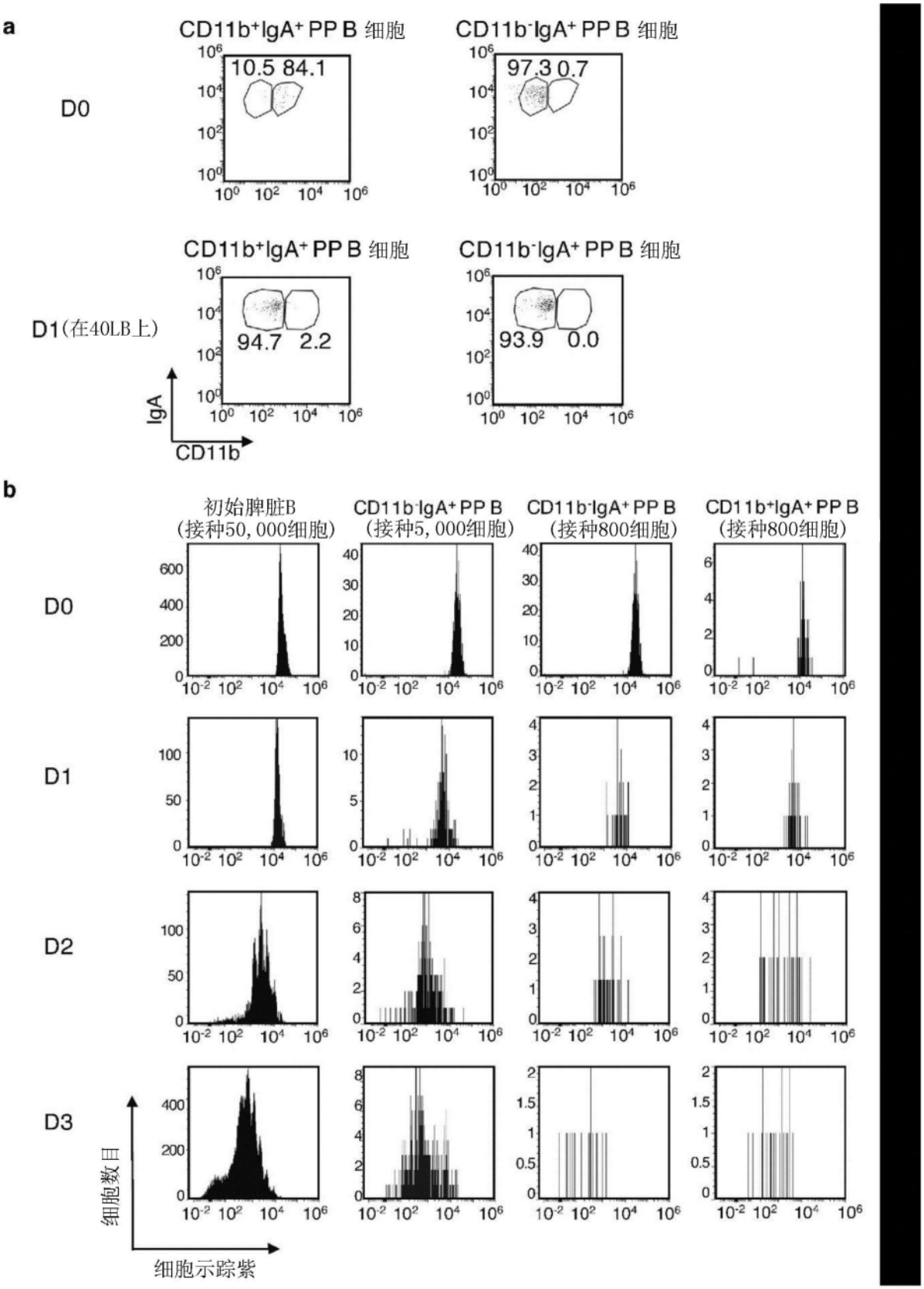

a
CD11b+IgA+ PP B 细胞
CD11b-IgA+ PP B 细胞
D0
10.5 84.1
97.3 0.7
D1(在40LB上)
94.7 2.2
93.9 0.0
IgA
CD11b
b
初始脾脏B (接种50,000细胞)
CD11b-IgA+ PP B (接种5,000细胞)
CD11b-IgA+ PP B (接种800细胞)
CD11b+IgA+ PP B (接种800细胞)
D0
D1
D2
D3
细胞数目
细胞示踪紫

图12-1

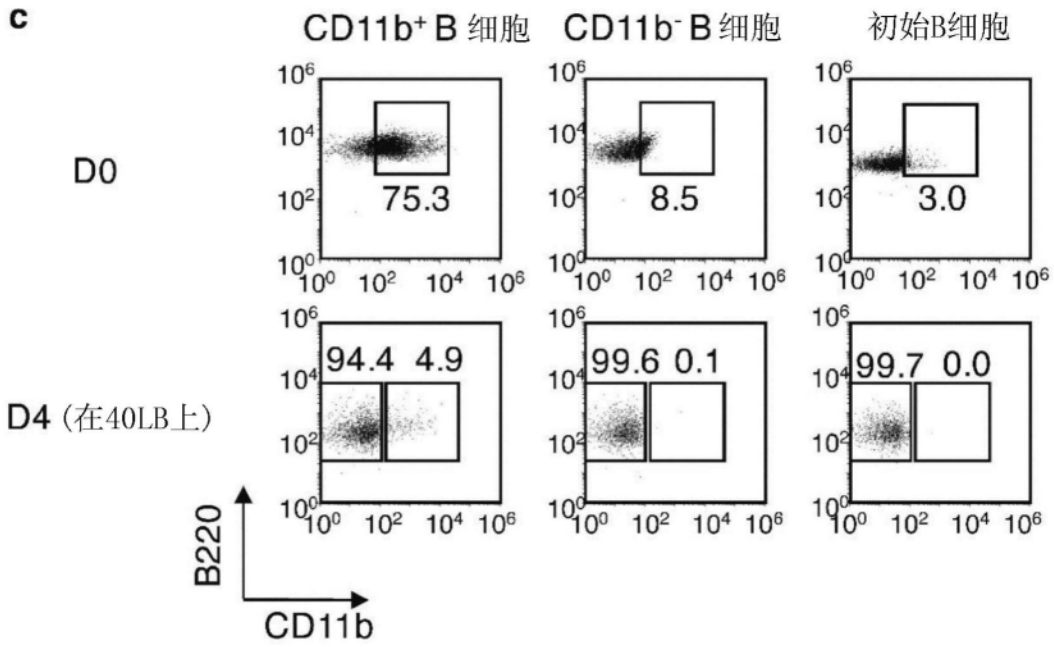

c
CD11b+ B 细胞
CD11b- B 细胞
初始B细胞
D0
D4 (在40LB上)
75.3
8.5
3.0
94.4 4.9
99.6 0.1
99.7 0.0
B220
CD11b

图12-2

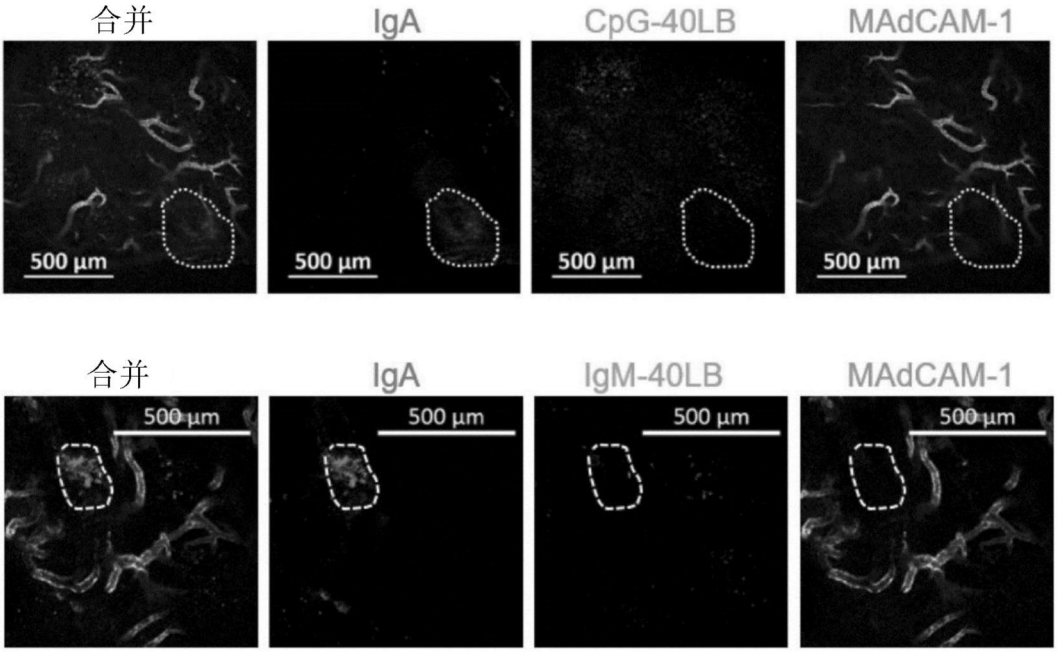

合并
IgA
CpG-40LB
MAdCAM-1
500 μm
合并
IgA
IgM-40LB
MAdCAM-1
500 μm

图13

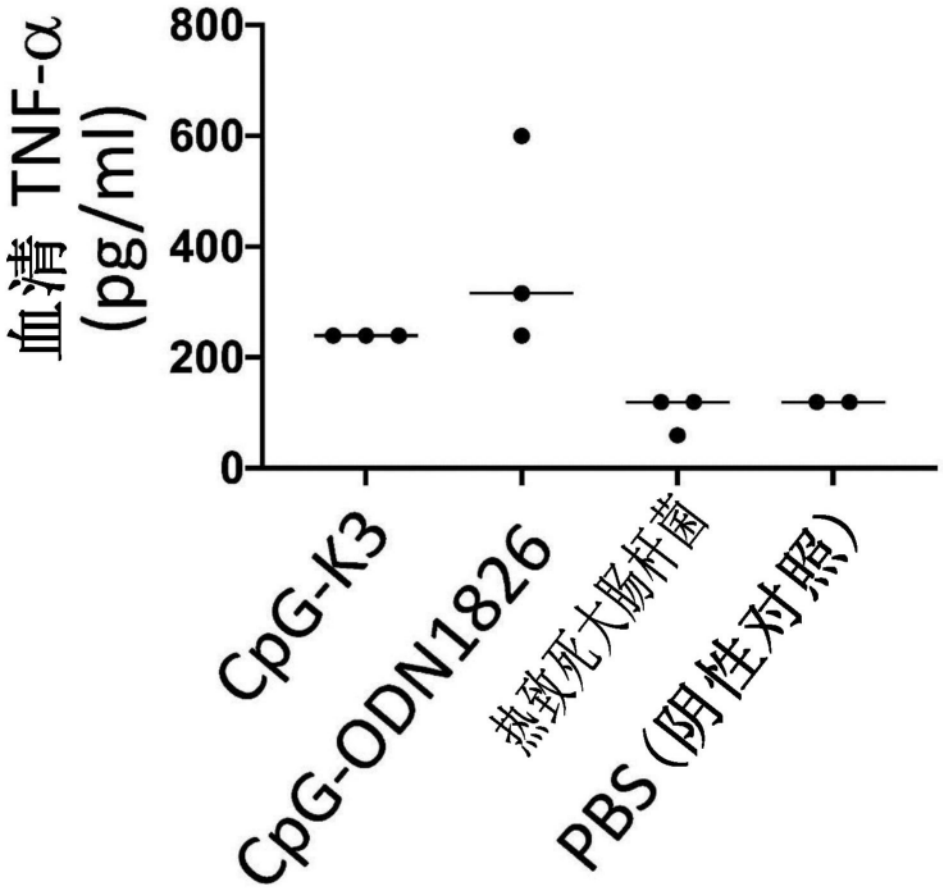

血清 TNF-α (pg/ml)
800
600
400
200
0
CpG-K3
CpG-ODN1826
热致死大肠杆菌
PBS (阴性对照)

图14

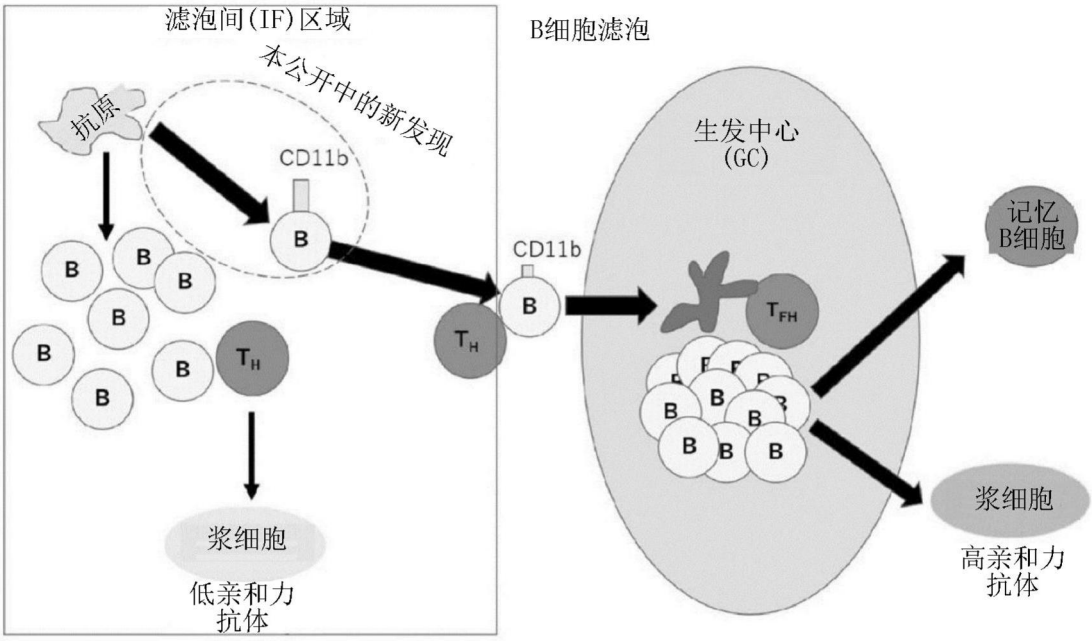

滤泡间(IF)区域
本公开中的新发现
抗原
CD11b
B
TH
浆细胞
低亲和力抗体
B细胞滤泡
生发中心 (GC)
CD11b
TFH
记忆 B细胞
浆细胞
高亲和力抗体

图15