

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7027462号

(P7027462)

(45)発行日 令和4年3月1日(2022.3.1)

(24)登録日 令和4年2月18日(2022.2.18)

(51)国際特許分類

F I

C 0 8 B 37/00 (2006.01)

C 0 8 B 37/00

Z

A 2 3 L 33/135 (2016.01)

A 2 3 L 33/135

A 6 1 K 31/715 (2006.01)

A 6 1 K 31/715

A 6 1 K 31/716 (2006.01)

A 6 1 K 31/716

A 6 1 K 35/745 (2015.01)

A 6 1 K 35/745

請求項の数 15 (全58頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-569943(P2019-569943)

(86)(22)出願日 平成30年6月14日(2018.6.14)

(65)公表番号 特表2020-525570(P2020-525570  
A)

(43)公表日 令和2年8月27日(2020.8.27)

(86)国際出願番号 PCT/KR2018/006700

(87)国際公開番号 WO2018/230960

(87)国際公開日 平成30年12月20日(2018.12.20)

審査請求日 令和2年1月16日(2020.1.16)

(31)優先権主張番号 10-2017-0075079

(32)優先日 平成29年6月14日(2017.6.14)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
韓国(KR)

前置審査

(73)特許権者 519444052

インスティテュート フォー ベーシッ  
ク サイエンスINSTITUTE FOR BASI  
C SCIENCE大韓民国, 3 4 1 2 6 テジョン, ユソ  
ング, エクスポート 5 5

(73)特許権者 506376458

ポストェック アカデミー-インダストリー  
ファンデーション大韓民国 7 9 0 - 7 8 4 キョンサンブ  
クド ポハン-シ ナム-グ チョンガ

ム-口 7 7

(74)代理人 100139594

弁理士 山口 健次郎

最終頁に続く

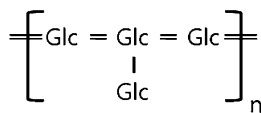
(54)【発明の名称】 新規のビフィドバクテリウムビフィダム菌株及び菌株由来多糖体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

β-1, 6-グルカンを含む多糖体であって、前記β-1, 6-グルカンが、式(I)  
：

【化1】



(式中、G l cはグルコースであり、「=」はβ-1, 6-グリコシド結合であり、  
「-」はα-1, 2-グリコシド結合であり、nは6～12の整数である)  
で表される化合物である、前記多糖体。

【請求項2】

β-1, 4-ガラクトタン、β-1, 6-ガラクトタン又はβ-ガラクトフラナンをさらに含  
有することを特徴とする、請求項1に記載の多糖体。

【請求項3】

前記β-1, 6-グルカン、β-1, 4-ガラクトタン、β-1, 6-ガラクトタン及びβ-  
ガラクトフラナンの含有量比(モル比)は、5～50：2～15：2～15：1～5であ  
ることを特徴とする、請求項2に記載の多糖体。

【請求項4】

前記多糖体は、分子量が3～5 kDa又は100 kDa以下の混合物であることを特徴とする、請求項1～3のいずれか一項に記載の多糖体。

【請求項5】

前記多糖体の電荷は中性であることを特徴とする、請求項1～4のいずれか一項に記載の多糖体。

【請求項6】

前記多糖体は調節T細胞（Treg）を誘導することを特徴とする、請求項1～5のいずれか一項に記載の多糖体。

【請求項7】

前記調節T細胞（Treg）は、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg細胞であることを特徴とする、請求項6に記載の多糖体。

10

【請求項8】

*Bifidobacterium bifidum*由来であることを特徴とする、請求項1～7のいずれか一項に記載の多糖体。

【請求項9】

請求項1～8のいずれか一項に記載の多糖体を有効成分として含有する、免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は治療用医薬組成物。

【請求項10】

請求項1～8のいずれか一項に記載の多糖体を有効成分として含有する、免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は改善用食品。

20

【請求項11】

（a）樹状細胞（DC；Dendritic cell）に請求項1～8のいずれか一項に記載の多糖体を処理して調節樹状細胞（rDC）を得る段階と、

（b）前記rDCをCD4<sup>+</sup>T細胞と共培養して調節T細胞（Treg）を誘導する段階と、

を含む、誘導調節T細胞（iTreg）の製造方法。

【請求項12】

前記調節T細胞（Treg）は、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg細胞であることを特徴とする、請求項11に記載の誘導調節T細胞（iTreg）の製造方法。

【請求項13】

前記（b）段階は、抗-CD3抗体、IL-2及びTGF- $\beta$ で刺激して調節T細胞（Treg）を誘導することを特徴とする、請求項11又は12に記載の誘導調節T細胞（iTreg）の製造方法。

30

【請求項14】

前記樹状細胞及びCD4<sup>+</sup>T細胞は、末梢血単核細胞（PBMCs）由来であることを特徴とする、請求項11～13のいずれか一項に記載の誘導調節T細胞（iTreg）の製造方法。

【請求項15】

請求項11～14のいずれか一項に記載の製造方法で製造された誘導調節T細胞（iTreg）を有効成分として含有する、免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は治療用細胞治療剤。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、調節T細胞（Treg）を誘導するビフィドバクテリウムビフィダム、ビフィドバクテリウムビフィダムから由来した多糖体、及び多糖体を生産するプロバイオティック菌株に関し、より詳細には、 $\beta$ -1-6-グルカンを含む多糖体、 $\beta$ -1-6-グルカンを生産するプロバイオティック菌株、前記多糖体又は菌株を有効成分として含有する免疫疾患又は炎症性疾患の改善用食品及び治療剤、前記多糖体又は菌株を処理して誘導調節T細胞（iTreg）を製造する方法、及びこれによって製造された誘導調節T細胞を含む免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は治療用細胞治療剤に関する。

50

## 【背景技術】

## 【0002】

哺乳類の胃腸管には“マイクロビオタ (microbiota)”を構成する多種多様な菌が共生する。マイクロビオタの変化は、アレルギー疾患、自己免疫及び胃腸管炎症障害のような様々な疾患と密接に関連している。無病原菌 (specific pathogen free; SPF) マウスに比べて無菌 (germ free; GF) マウスはリンパ組織の形成及び免疫反応に異常反応を示し (Macpherson and Harris, Nature Reviews Immunology 4:478-485, 2004)、このような現象は共生微生物の導入によって解決することができる (Mazmanian et al., Cell 122:107-118, 2005)。腸内微生物はTヘルパー17 (Th17) 細胞又は調節T (Treg) 細胞 (Ivanov and Honda, Cell host & microbe 12:496-508, 2012; Wu and Wu, Gut microbes 3:4-14, 2012) のようなCD4T細胞の特定系統の発達と分化を調節する (Atarashi et al., Science 331:337-341, 2011; Macpherson and Harris, Nature Reviews Immunology 4:478-485, 2004; Rund and Mazmanian, Nature Reviews Immunology 9:313-323, 2009)。Treg細胞は抑制機能を持つCD4+T細胞の下位集合であり、転写因子Foxp3の発現を特徴とする (S. Hori et al., Science 299:1057-1061, 2003)。Treg細胞は一般的に胸腺 (nTreg) に形成されるが、正常CD4+細胞 (pTreg) の周辺でも発生することがある。

## 【0003】

最近では微生物群集の個別種が宿主の免疫成分を形成することが知られた。すなわち、TregとTh17細胞は様々な抗原に対する宿主の免疫反応を調節する相互作用をする。例えば、切片繊維状バクテリア (segmented filamentous bacteria; SFB) は、小腸でTh17細胞を強力に誘導し、これは全身性自己免疫を促進し、腸内病原菌に対する宿主耐性に重要な役割を担う (Gaboriau-Routhiau et al., Immunity 31:677-689, 2009; Ivanov et al., Cell 139:485-498, 2009; Wu et al., Immunity 32:815-827, 2010)。これに対し、腸内菌叢を構成する菌株や一部プロバイオティックス菌株の一部は、マウス結腸においてTreg細胞の分化、蓄積及び機能に影響を与えるものと知られている (Tanoue, T et al., Nature reviews Immunology 16:295-309, 2016)。転写因子Foxp3 (forkhead box P3) を発現するCD4+調節T細胞 (Tregs) は、他の臓器に比べて消化器プロプリア層 (lamina propria; LP)、特に大腸でより多く観察される (Atarashi et al., Science 331:337-341, 2011)。粘膜Foxp3+Tregsの数と機能は特定の腸内バクテリアの存在に影響を受けるといいういくつかの研究がある。ClostridiaのIV、XIVa、及びXVIIIIクラスタに属する17個菌株の混合物はマウス大腸においてTreg細胞の分化、蓄積及び機能を向上させた (Atarashi et al., Nature 500:232-236, 2013)。ビフィドバクテリア及びラクトバシリのプロバイオティックス菌を毎日処理したマウスは、Tregs誘導によってマウスの炎症状態を変形させる (Di Giacinto et al., The Journal of Immunology 174:3237-3246, 2005; Karimi et al., American journal of respiratory and critical care medicine 179:186-193, 2009; Lyons et al., Clinical & Experimental Allergy 40:811-819, 2010)。ヒト共生菌であるバクテロイデスフラジリスでマウスをコロニゼーションすると、Treg細胞を生産するTh1及び

10

20

30

40

50

IL-10を強化させる (Round and Mazmanian, PNAS 107: 12204-12209, 2010; Telesford et al., Gut microbes 6: 234-242, 2015)。以前の研究から、5種のプロバイオティック菌の混合物であるIRT5がTreg細胞を誘導して様々な免疫疾患を抑制できることを確認した (Chae et al., PLoS One 7, e52119, 2012; Kwon et al., Clinical Immunology 146: 217-227, 2013; Kwon et al., PNAS 107: 2159-2164, . 2010)。しかし、Treg細胞生成の基本分子メカニズムはまだ不明である。多数の研究によれば、バクテリアが生産した代謝産物又は細胞壁成分がTreg細胞の分化を促進できるとされている。例えば、ブチレートはクロストリジアによって結腸Treg細胞を誘導する主要効果分子として報告された (Furusawa et al., Nature 504: 446-450, 2013)。B. fragilisの双性イオン多糖類である多糖類A (PSA) はTregを生産するIL-10誘導に重要な効果免疫調節剤として確認された (Mazmanian et al., Cell 122: 107-118, 2005; Ochoa-Reparaz et al., The Journal of Immunology 185: 4101-4108, 2010)。患者に足りない主要微生物を投与すれば、調節障害微生物の不均衡 (dysbiosis) を復元することができる。例えば、健康な寄贈者の糞便微生物 (fecal microbiota; FMT) を患者に移すことは胃腸病に有益な効果があると報告された。しかし、FMTは安全性の問題によってまだ一般の治療法として承認されていない。また、プロバイオティックスを含む十分な量の安全性保障バクテリアを服用すれば様々な免疫疾患を改善できると報告されている。しかし、有益な微生物は、患者の免疫状態によって変わり得る。一部の患者は過剰活性化された免疫反応 (すなわち、アレルギー又は自己免疫疾患) を抑制しなければならないのに対し、一部の患者は免疫系を強化 (すなわち、癌又はウイルス感染) させる必要がある。例えば、Th17-誘導プロバイオティックス菌であるビフィドバクテリウムをリウマチ性関節炎動物モデルに投与したとき、関節炎症状を悪化させた (Tze Guan Tan, 113 (50): E8141-E8150, 2016)。したがって、有益な微生物の同定及びその作用因子のメカニズムを解明することは治療学的に非常に重要である。

#### 【0004】

生体内Treg細胞の強化は、自己免疫及びアレルギー疾患のような様々な過免疫疾患を調節することができる。本発明では、安定性の保障された微生物に誘導されたTreg (iTreg) 細胞を向上させる目的で、プロバイオティック候補菌株を選別してBifidobacterium bifidum PRI1を最上の候補として選択した。このバクテリアが食餌抗原又は共生反応性誘導調節T細胞 (iTreg細胞) の生成を誘導できることを、無菌マウス (Germ Free mouse; GF mouse) システムを用いて証明した。Bifidobacterium bifidum PRI1由来作用分子としては、代謝産物であるブチレート (Butyrate)、アセテート (Acetate) を含む。また、本発明は、Bifidobacterium bifidum PRI1から由来したベータグルカン／ガラクトサン多糖体 (cell surface beta glucan/galactan polysaccharide; CSGG) が機能的に腸炎症を抑制することに関する。

#### 【0005】

そこで、本発明者らは、免疫調節及び炎症性免疫疾患に対して治療的潜在力を持つTreg細胞誘導メカニズムを明らかにするために鋭意努力した結果、選別されたプロバイオティックバクテリアのベータグルカン／ガラクトサン多糖体 (cell surface beta glucan/galactan polysaccharide; CSGG) がiTreg細胞の生成を誘導できる主要作用分子であることを見出した後、前記CSGGによって誘導されたiTreg細胞が大腸炎を抑制できることを確認し、本発明を完成した。

#### 【発明の概要】

**【発明が解決しようとする課題】****【0006】**

本発明の目的は、調節T細胞（Treg）を誘導するβ-1-6-グルカンを有効成分として含有する多糖体及び該多糖体を生産するプロバイオティック菌株を提供することにある。

**【0007】**

本発明の他の目的は、前記多糖体又は前記菌株を有効成分として含有する免疫調節用組成物を提供することにある。

**【0008】**

本発明のさらに他の目的は、前記多糖体又は前記菌株を有効成分として含有する免疫疾患又は炎症性疾患の予防、治療又は改善用医薬組成物及び食品を提供することにある。

10

**【0009】**

本発明のさらに他の目的は、前記多糖体又は前記菌株を有効成分として含有する組成物を投与することを含む免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は治療方法を提供することにある。

**【0010】**

本発明のさらに他の目的は、前記多糖体又は前記菌株を有効成分として含有する組成物を免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は治療に使用する用途を提供することにある。

**【0011】**

本発明のさらに他の目的は、前記多糖体又は前記菌株を有効成分として含有する免疫抑制剤又は免疫治療剤を提供することにある。

20

**【0012】**

本発明のさらに他の目的は、前記多糖体又は前記菌株を用いた誘導調節T細胞（iTreg）の製造方法を提供することにある。

**【0013】**

本発明のさらに他の目的は、前記方法で製造された誘導調節T細胞（iTreg）を有効成分として含有する免疫疾患又は炎症性疾患の予防、治療又は改善用細胞治療剤を提供することにある。

**【0014】**

本発明のさらに他の目的は、前記方法で製造された誘導調節T細胞（iTreg）を有効成分として含有する細胞治療剤を投与することを含む免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は治療方法を提供することにある。

30

**【0015】**

本発明のさらに他の目的は、前記方法で製造された誘導調節T細胞（iTreg）を有効成分として含有する細胞治療剤を免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は治療に使用する用途を提供することにある。

**【課題を解決するための手段】****【0016】**

上記の目的を達成するために、本発明は、β-1-6-グルカンを生産する新規のプロバイオティック菌株を提供する。

**【0017】**

本発明はまた、β-1-6-グルカンを有効成分として含有する多糖体を提供する。

40

**【0018】**

本発明はまた、前記多糖体又は前記菌株を有効成分として含有する免疫調節用組成物を提供する。

**【0019】**

本発明はまた、前記多糖体又は前記菌株を有効成分として含有する免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は治療用医薬組成物及び治療剤を提供する。

**【0020】**

本発明はまた、前記多糖体又は前記菌株を有効成分として含有する免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は改善用食品を提供する。

50

## 【0021】

本発明はまた、前記多糖体又は前記菌株を有効成分として含有する組成物を投与することを含む免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は治療方法を提供する。

## 【0022】

本発明はまた、前記多糖体又は前記菌株を有効成分として含有する組成物を免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は治療に使用する用途を提供する。

## 【0023】

本発明はまた、前記多糖体又は前記菌株を有効成分として含有する免疫抑制剤又は免疫治療剤を提供する。

## 【0024】

本発明はまた、樹状細胞 (DC; Dendritic cell) に前記多糖体又は前記菌株を処理して調節樹状細胞 (rDC; regulatory Dendritic Cell) を得る段階; 及び前記 rDC を CD4+T 細胞と共培養して調節 T 細胞 (Treg) を誘導する段階; を含む誘導調節 T 細胞 (iTreg) の製造方法を提供する。

## 【0025】

本発明はまた、前記方法で製造された誘導調節 T 細胞 (iTreg) を有効成分として含有する免疫疾患又は炎症性疾患の予防、治療又は改善用細胞治療剤を提供する。

## 【0026】

本発明はまた、前記方法で製造された誘導調節 T 細胞 (iTreg) を有効成分として含有する細胞治療剤を投与することを含む免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は治療方法を提供する。

## 【0027】

本発明はまた、前記方法で製造された誘導調節 T 細胞 (iTreg) を有効成分として含有する細胞治療剤を免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は治療に使用する用途を提供する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0028】

【図1】 *B. bifidum* のモノコロニゼーション (monocolonization) が結腸プロプリア層で Treg 個体群 (population) を増加させることに関するものである。(A) ~ (C) は、GF マウス、又は Lpa 又は Bb でコロニゼーションされたマウス大腸 (cLP) の Treg 細胞において CD4+FOXP3+ 細胞、CTLA4+ 及び IL10+ を流細胞分析法及び百分率分析で示すものである。(D) ~ (F) は、バクテリアがコロニゼーションされた GF マウスの大腸において Treg 細胞の異なる種類の絶対数、代表的な流細胞分析プロット及び信号を示すものである。象限の数字は細胞比率を表し、グラフプロットの円は、各媒介変数に該当する個別マウスを表す。データは 3 ~ 5 件の独立した実験を代表する ( $n \geq 3$  マウス)。全てのグラフプロットは、平均  $\pm$  SEM を表す。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ 、\*\*\*\*  $p < 0.0001$  (Student's t test)。

【図2】 Treg 誘導バクテリアへの *B. bifidum* PRI1 を確認したものである。(A) ~ (B) は、Treg 誘導を促進するバクテリア菌株として *B. bifidum* PRI1 (Bb) を選択したものであり、選別された候補プロバイオティック菌株において代表的な IL-10/IL-12 サイトカイン比率 (A) 及び Foxp3 発現 (B) である。示されたコロニー形成単位 (cfu) 力価を有するそれぞれのバクテリア菌株を全腸間膜リンパ節 (mLN) 細胞と共に 72 時間培養した後、サイトカインレベル又は Foxp3 発現を ELISA 又は流細胞分析法で分析した。(C) は、コロニゼーション 3 週間後、DNA-Cy5 プローブ (EUB338、赤色) で HISTO-FISH 染色をして GF マウスの腸の隙間における *B. bifidum* PRI1 (Bb) の局所化を分析したものである。(D) は、GF、Bb-モノコロニゼーション (monocolonized) (Bb) 及び SPF マウスの盲腸イメージ (左) 及び盲腸重さ (右) を示すものである。(E) は、GF 又は Bb-モノコロニゼーション (Bb) マウスの盲腸及び大便からブチレートとアセテートのレベルを測定したものである。(F) は、GF マウス、

10

20

30

40

50

SFB又はLpaでモノコロニゼーションされたマウス、SPFマウスの大腸(cLP)プロブリア層においてCD4+Foxp3+T細胞の流細胞分析プロットを示すものである。象限の数字は細胞比率を表し、グラフプロットの円は、各媒介変数に該当する個別マウスを表す。データは、3～5件の独立した実験を代表する( $n \geq 3$ マウス)。(B.bifidum:Bb, Lactobacillus acidophilus:Lac, Lactobacillus casei:Lca, Lactobacillus reuteri:Lre, Lactobacillus paracasei:Lpa, Segmented filamentous bacteria:SFB)。全てのグラフプロットは、平均±SEMを表す。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$  (Student's t test)。

10

【図3】Treg細胞の生成及び表現型に対するB.bifidumのモノコロニゼーション(monocolonization)の影響に関する。(A)は、SPF、GF又はBb, SFB又はLpaでモノコロニゼーションされたマウスの小腸のプロブリア層(silP)、mLN、pLN及び脾臓においてCD4+Foxp3+T細胞の頻度を示すものである。(B)及び(C)は、それぞれのバクテリアでモノコロニゼーションされたマウスのcLP又はsilPにおいてCD4+CD103+Foxp3+(B)及びCD4+CD44hiCD62LloFoxp3+T細胞(C)の流細胞分析プロット及び頻度を百分率で示したものである。象限の数字は細胞比率を表し、グラフプロットの円は、各媒介変数に該当する個別マウスを表す。データは3～5件の独立した実験を代表する( $n \geq 3$ マウス)。全てのグラフプロットは、平均±SEMを表す。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  (Student's t test)。

20

【図4】B.bifidumのモノコロニゼーションが他のリンパ器官においてTreg個体群(population)を増加させることを示す。GF、Bb又はLpaでモノコロニゼーション3週後のマウスのリンパ器官から細胞を分離した。(A)及び(B)は、表示されたリンパ組織においてHelios-及びNrpl-Treg個体群の頻度を示すものである。(C)～(D)は、GF又はBb又はLpaでモノコロニゼーションされたマウスの表示された器官からHelios-Foxp3+(C)又はRORyt+Helios-Foxp3+Treg細胞(D)の流細胞分析プロット及び頻度を百分率で表示したものである。象限の数字は細胞比率を表し、グラフプロットの円は、各媒介変数に該当する個別マウスを表す。データは3～5件の独立した実験を代表する( $n \geq 3$ マウス)。全てのグラフプロットは、平均±SEMを表す。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  (Student's t test)。

30

【図5】B.bifidumのモノコロニゼーションがpTreg細胞の新しい生成を促進することを示す。(A)は、Bbのモノコロニゼーション後、pTreg細胞の新しい生成分析のための実験的戦略を示すものである。(B)～(C)は、CD45.1+Foxp3GFPLレポーターマウスから分類されたナイーブCD4+Foxp3-T細胞をGFマウスに移し、Bbで3週間モノコロニゼーションしたものである。Foxp3+Treg個体群は、cLP(B)及びsilP(C)においてGFP発現から分析した。(D)は、表示されたリンパ器官においてGFP発現によるFoxp3+Treg個体群の頻度を測定したものである。(E)は、CD45.1+Foxp3GFPLレポーターマウスから分類されたナイーブCD4+Foxp3-T細胞をSPFマウスに移し、mock(PBS)又はBb( $5 \times 10^8$  cfu)を3週間一日おきに食餌して、cLPでFoxp3+Treg細胞を分析したものである。データは3～5件の独立した実験を代表する( $n \geq 3$ マウス)。全てのグラフプロットは、平均±SEMを表す。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  (Student's t test)。

40

【図6】B.bifidumのコロニゼーションによる食餌抗原-及びマイクロビオタ反応性Treg細胞誘導に関する。(A)及び(B)は、Thy1.1+Foxp3GFPLマウスのCTV-標識されたナイーブCD4+OT-II+Foxp3-T細胞を、GFマウス又は14日間プレコロニゼーションしたGFマウスに養子移入した後、7日間一日おきにOVA(20mg)を食餌して、供与体(Thy1+OT-II)細胞のcLP

50

CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>個体群を分析したものである。FACSプロット (A) 及び生体内で生成されたTreg細胞の頻度 (B) で表示した。(C)～(E)は、CBirTgCD45.1<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>GFPマウスから分類されたナイーブCD4<sup>+</sup>CBir<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T細胞をSPF Rag1<sup>-/-</sup>授与体に養子移入した後、実験終了時まで毎日Bb又はPBSを食餌して、体重、大腸長さ及び組織病理の変化(それぞれC、D及びE)を測定して分析したものである。(F)～(G)は、mock又はBbコロニゼーションマウスのcLP内のCBir<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg細胞 (F) 及びIFN- $\gamma$ <sup>+</sup>細胞 (G) の流細胞分析プロット及び頻度を示すものである。(H)は、GF又はBb-GFマウスの大腸CD4<sup>+</sup>細胞を分類してCTVで標識した後、GF、Bb又はLpaコロニゼーションマウスの排泄物抗原存在下でT細胞の除去された脾臓APCと共に培養して、3日後、表示された抗原に対する反応するTreg細胞の相対的な増殖をFACSで分析したものである。(I)は、GFマウスと比較して、Bbモノコロニゼーションマウスの大腸、mLN及び脾臓のTregでTCR-CDR3領域の $\alpha$ 鎖固有の43個及び $\beta$ 鎖固有の61個の頻度分布を示すものである。象限の数字は細胞比率を表し、グラフプロットの円は、各媒介変数に該当する個別マウスを表す。データは、3～5件の独立した実験を代表する(n $\geq$ 3マウス)。全てのバークラフは平均 $\pm$ SEMを表す。\* p<0.05、\*\* p<0.01、\*\*\* p<0.001 (Student's t test)。

【図7】B.bifidumのコロニゼーションによる食餌抗原-及びマイクロビオタ反応性Treg細胞誘導に関する。(A)は、GF又はBbコロニゼーションGFマウスで食餌抗原(OVA特異OTIIT細胞)に反応して誘導されたOVA特異pTreg細胞を決定するための実験的戦略を示すものである。(B)は、PBS又はBb食餌されたRag1<sup>-/-</sup>SPFマウスから誘導されたマイクロビオタ(フラジェリン-特異CBirT細胞)特異pTreg細胞を決定する実験的戦略を示すものである。(C)は、PBS又はBb食餌されたCBirナイーブT細胞が伝達されたRag1<sup>-/-</sup>SPFマウスのcLPにおいてCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>又はCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T細胞のROR $\gamma$ 、GATA3、及びTbet個体群分析に関する。(D)は、Bb又はLpaでモノコロニゼーションされたマウス又はGFマウスの排泄物抗原の組合せの存在下にBb誘導されたTreg増殖を決定するための実験的戦略を示すものである。(E)は、GF又はBbでモノコロニゼーションされたマウスの全大腸CD4<sup>+</sup>細胞を選別してCTVで標識した後、GF又はBb又はLpaでモノコロニゼーションされたマウスの排泄物抗原の組合せの存在下にT細胞の除去された脾臓細胞(APC)と共に培養して、3日後、表示された抗原に対する反応するTreg細胞の相対的な増殖をFACSで分析したものである。データは、3個の独立した実験を代表する(n $\geq$ 3マウス)。全てのグラフプロットは、平均 $\pm$ SEMを表す。\* p<0.05、\*\* p<0.01 (Student's t test)。

【図8】Treg細胞のTCRレパートリーに対するB.bifidumモノコロニゼーションの影響に関する。(A)は、GFマウス又はBbモノコロニゼーションマウスの個別の臓器(大腸、MLN及び脾臓)から得たTreg細胞レパートリーの $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖においてシャノン(Shannon)多様性を比較したものである。(B)は、Bbモノコロニゼーション及びGFマウスの大腸Treg細胞において上位85個の優位TCR-CDR3領域の頻度を示す $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖のヒットマップである。‘common’表示(28ペプチド)のCDR3領域は、各グループにおいて判読カウントの存在を表す。色調は、与えられたTCRが発見された相対的な頻度を表す。(C)は、両方向バークラフで表示される一般TCR-CDR3アルファ領域の頻度分布;大腸の85、MLNの1469及び脾臓の1381であり、(D)は、両方向バークラフで表示される一般TCR-CDR3ベータ領域の頻度分布;大腸の118、MLNの1724及び脾臓の1381である。

【図9】B.bifidumの細胞表面ベータグルカン/ガラクトサンポリサッカライド(CSGG)のTreg細胞誘導媒介に関する。(A)は、B.bifidumの細胞表面 $\beta$ -1,6-グルカン(CS $\beta$ G)多糖体の構造である。Glcp:glucopyranose。(B)はCSGG誘導iTreg細胞に対する $\beta$ -1,6-グルカン処理効

10

20

30

40

50

果である。(C)は、Bb, Lpaでコロニゼーションし又はCSGG(100 µg/容量)を3週間一日おきに腹腔内注射したGFマウス又はGFマウスにおいてTreg細胞の個体群及び表現型を示すものである。(D)は、健康な供与者のPBMCのナイーブCD4+T細胞と共にCSGGで前処理されたDCを共培養して濃度依存的ヒトCD4+CD25+Foxp3+Tregsの誘導を確認したものである。(E)は、mock又はCSGGで処理したCD11c+DCsのRNA-Seqを分析したものである。(F)は、mock又はCSGGで前処理したマウスから由来したナイーブCD4+T細胞及びCD11c+DCsを準最適のiTreg生成物と共に培養したものである。CD4+Foxp3+Treg細胞の個体群は流細胞分析で決定された。(G)は、ナイーブCD4+T細胞をmock又はCSGGで前処理した野生型又はTLR2欠乏CD11c+DCsと共に培養した後、培養上澄液においてTGFβ1レベルを測定したものである。データは、最小3個の独立した実験を代表する。全てのバググラフは平均±SEMを表す。\* p<0.05、\*\* p<0.01、\*\*\* p<0.001 (Student's t test)。

10

【図10】B. bifidumのDC依存メカニズムを通じたTreg細胞誘導促進に関する。(A)は、GF又はBbモノコロニゼーションマウスの全大腸内Hprtに対する標準化されたサイトカインの相対的なmRNA発現を定量したものである。(B)~(D)は、GF又はBbモノコロニゼーションマウスのcLP-DCs(MHCI+CD11c+CD11b+CD103+F4/80-)の相対的なmRNA発現レベルである。

(E)は、DC:T細胞共培養システムにおいてin vitro Treg誘導に対する実験戦略である。(F)は、脾臓CD11c+DCsと様々な量のBb(cfu)滴定に反応してFoxp3+細胞の濃度依存的誘導及びT細胞の生存を示したものである。(G)は、Bb又はLpaで前処理された脾臓CD11c+DCsを3日間準最適Treg誘導条件(抗-CD3; 0.1 µg/ml、TGF-β; 0.1 ng/ml、IL-2; 100 unit/ml)でナイーブCD4+T細胞と共培養した後、Foxp3+Treg細胞をライブ細胞内で分析したものである。IL-10分泌は、培養上澄液のELISA分析によって決定された。データは、3~5件の独立した実験を代表する(n≥3マウス)。全てのグラフプロットは、平均±SEMを表す。\* p<0.05、\*\* p<0.01 (Student's t test)。代表的な流細胞分析及びCD4<sup>+</sup>Foxp3+Treg細胞の平均頻度を示す。

20

30

【図11】B. bifidumによって誘導されたTreg細胞の中核エフェクター分子としてベーターグルカン/ガラクトンポリサッカライド(CSGG)を確認したものである。(A)は、B. bifidumの分画で前処理された脾臓CD11c+DCsを準最適Treg誘導条件下にナイーブCD4+T細胞と共培養し、3日後、Foxp3+Treg細胞をFACSで分析したものである。(B)は、表示された量の全細胞表面多糖類(tCSPS)で前処理した脾臓CD11c+DCsをナイーブCD4+T細胞と共培養し、3日後、Foxp3+Treg細胞をFACSで分析したものである。(C)は、B. bifidumの全細胞表面多糖類(tCSPS)から分離した中性(CSGG)又は陰電荷の多糖類(PGβG)の構造を示すものである。(Glcp: glucopyranose、Galp: galactopyranose、Galf: glucofuranose、Gro: glycerolであり、n=反復単位、各多糖類の相対存在量を%(mol/mol)で表示する。)(D)は、tCSPS(100 µg/ml)と比較して、中性(CSGG; 5 µg/ml)と陰電荷の多糖類(PGβG: 100 µg/ml)間のCD4+Foxp3+Treg誘導活性を示したものである。(E)は、β-1, 6-グルカナーゼ、β-1, 4-ガラクタナーゼ及びβ-1, 4-グルカナーゼの処理がCSGG-誘導されたiTreg細胞の誘導に及ぼす影響を示すものである(CSGG; 50 µg/ml)。(F)は、ナイーブCD4+T細胞を準最適のTreg誘導条件下でDCsのないCSGG(50 µg/ml)で処理したものである(抗-CD3; 0.1 µg/ml、α-CD28; 0.1 µg/ml、TGF-β; 0.1 ng/ml、IL-2; 100 unit/ml)。データは3~5件の独立した実験を代表する(n≥3マウス)

40

50

）。全てのグラフプロットは、平均±SEMを表す。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  (Student's t test)。

【図12】*in vitro*及び*in vivo*でCSGGのTreg細胞誘導向上に関する。(A)は、準最適のTreg誘導条件下でナイーブCD4+T細胞とバクテリア又はCSGGで前処理されたCD11c+DCsを共培養した後、*in vitro*でCD4+Foxp3+個体群の生成を示すものである。(B)は、GFマウス又はBb、Lpa又はCSGG(100µg/dose)をGFマウスに3週間一日おきに腹腔内注射してモノコロニゼーションさせたマウスにおいてCD4+Foxp3+個体群を示すものである。(C)及び(D)は、GFマウスにCSGG(100µg/dose)又はPBSを3週間一日おきに腹腔内注射し、Treg細胞の表示された個体群の頻度をリンパ器官において分析したものである。データは、3~5件の独立した実験を代表する( $n \geq 3$ マウス)。全てのグラフプロットは、平均±SEMを表す。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$  (Student's t test)。

【図13】CSGGがTLR2依存性調節DCsの生成を通じてiTreg誘導を促進することを示す。(A)は、mock又はCSGGで前処理されたCD11c+DCsとナイーブCD4+T細胞を共培養した後、培養上澄液においてサイトカインレベルを確認したものである。(B)は、Bb又はCSGG処理後、生体外CD4+Foxp3+Treg誘導に対する抗-TGFβ Ab処理の効果を示すものである。(C)は、CSGGで前処理したIL-10-/-KOマウス又は野生型のCD11c+DCsを野生型ナイーブCD4+T細胞と共培養し、3日後にiTreg誘導を測定したものである。(D)は、CSGG処理時にTLR垂型をコードする遺伝子の発現を調べるためにRNA-seqデータを分析したものである。(E)は、ナイーブCD4+T細胞及びmock又はCSGGで前処理されたマウス由来のCD11c+DCsを準最適のiTreg生成条件下で3日間共培養した後、CD4+Foxp3+Treg細胞誘導を流細胞分析で測定したものである。(F)は、野生型又はmock又はCSGGで前処理されたTLR2-欠乏CD11c+DCsをナイーブCD4+T細胞と共培養した後、培養上澄液でIL-10及びIFNγサイトカインレベルを測定したものである。(G)は、C型レクチンに対するブロッキング抗体の存在下にCD11c+DCsをmock又はCSGGで前処理した後、ナイーブCD4+T細胞と共培養してiTreg誘導を流細胞分析で調べたものである。(H)は、野生型又はCSGGで前処理されたDectin1-/-又はDectin2-/-KOマウスのCD11c+DCsを野生型ナイーブCD4+T細胞と共培養し、3日後にiTreg誘導を測定したものである。データは、少なくとも3回の独立した実験を代表する。全てのバーグラフは平均±SEMを表す。\*  $p < 0.05$  (Student's t test)。

【図14】CSGGによって誘導されたiTreg細胞の腸炎症抑制機能に関する。(A)~(C)は、Thy1.1+Foxp3GFPレポーターマウスから分離したナイーブCD4+Foxp3-T細胞を、iTreg細胞の表示された組合せにおいてRAG1-/-授与体に量子共同移入したものである。体重、大腸長さ及び大腸組織の病理的变化を測定した。(D)は、実験終了時にcLPから移入されたTreg細胞のFoxp3安定性を分析したものである。移入時に分類されたCD4+Foxp3GFP+細胞の純度は98%以上だった。(E)~(G)は、CD45.1+Foxp3GFPレポーターマウスから分離したCD4+Foxp3-T細胞をRAG1-/-マウスに養子移入した後、PBS又はCSGG(100µg/ml)を腹腔内投与したものである。体重、大腸長さ及び大腸組織の病理的变化を測定した。(H)は、実験終了時にcLPにおいてエフェクターT細胞のIFNγ生成を分析したものである。データは、少なくとも3回の独立した実験を代表する。全てのバーグラフは平均±SEMを表す。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ 、\*\*\*\*  $p < 0.0001$  (Student's t test)。

【図15】CSGGによって誘導されたiTreg細胞の腸炎症抑制機能に関する。(A)は、CTV標識されたナイーブ応答者Thy1.1+CD4+Foxp3-T細胞を分

類して共培養したものである。CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>iTreg細胞は、標識されたCD45<sup>+</sup>マウスのT細胞が除去された脾臓細胞から精製されたmock又はCSGGが処理されたAPCsとして生体外で生成した。応答者T細胞の増殖は流細胞分析で分析した。(B)は、iTreg及びmock、Bb、又はCSGGによって生体外で誘導されたiTreg細胞によって抑制された養子移入RAG1<sup>-/-</sup>大腸炎の大腸長さを示すものである。(C)は、mock(PBS)又はCSGG(100μg/dose)を腹腔内投与して養子移入されたナイーブT細胞によって誘導されたRAG1<sup>-/-</sup>大腸炎の大腸長さを示すものである。(D)は、mock又はCSGG処理された養子移入RAG1<sup>-/-</sup>マウスのmLNにおいてCD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg個体群を示すものである。データは、少なくとも2回の独立した実験を代表する。全てのバーグラフは平均±SEMを表す。\* p<0.05(Student's t test)。

10

【発明を実施するための形態】

【0029】

特に定義されない限り、本明細書で使われた全ての技術的及び科学的な用語は、本発明の属する技術分野における熟練した専門家に通常理解されるのと同じ意味を有する。一般に、本明細書で使われた命名法は、この技術分野において周知及び常用されているものである。

【0030】

本発明では、ヒト共生バクテリアである*Bifidobacterium bifidum* PRI1 (*B. bifidum*) が、ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞の、炎症性大腸炎を抑制する機能的活性のFoxp3<sup>+</sup>iTreg細胞への分化を向上させ得ることを示す。細胞表面由来ベータグルカン／ガラクトン多糖体(CSGG)はiTreg細胞を誘導する時に全バクテリアの機能を要約する活性分子である。CSGGの作用機転は、樹状細胞(Dendritic Cell, DC)においてTLR2／IL-10調節経路の誘導によって媒介される。

20

【0031】

共生微生物の調節障害は多くの疾病の発病と密接に関連しているため、Treg誘導微生物による生体内Treg細胞の増進は様々な炎症疾患を調節することができる。腸内微生物は免疫恒常性の維持に重要な役割を担い、このような腸内微生物の調節障害は、免疫抑制性Foxp3<sup>+</sup>T調節(Treg)細胞の損傷された機能に関連した炎症疾患を引き起こすことがある。いくつかの共生微生物がTreg細胞の誘導を向上させると知られているが(Tanoue, Tet al., Nature reviews Immunology 16:295-309, 2016)、この過程を制御する“作用分子”、すなわちバクテリアによって誘導されたTreg細胞の分子機作、抗原特異性及び標的細胞のようなものについてはまだ知られていない。

30

【0032】

したがって、本発明では、一般に安全な(GRAS)バクテリアと見なされるプロバイオティク候補菌株を対象に選別し、食餌抗原又は共生菌に対して様々なTCR特異性を有する*Bifidobacterium bifidum* PRI1 (*B. bifidum*) をTreg誘導バクテリアの最上の候補として選定した。*Bifidobacterium bifidum* PRI1は、2017年5月19日に韓国生命工学研究院生物資源センターに寄託された(受託番号:KCTC13270BP)。また、*B. bifidum* 及びその細胞表面由来ベータグルカン／ガラクトン多糖体(CSGG)がTregを誘導する主要構成要素であることを確認し、特にCSGGは全バクテリアの活動を効率的に再現し、部分的にTLR2依存性メカニズムを通じて調節樹状細胞を媒介してマウスとヒトの両方に作用してTreg細胞を誘導することを確認した。*B. bifidum* 又は精製されたCSGGによって誘導されたTreg細胞は、大腸炎に対する安定的で強力な治療又は抑制能力を示した。

40

【0033】

50

したがって、本発明は、 $\beta$ -1-6-グルカンを生産する新しい菌株に関する。

【0034】

また、本発明は、一観点において、 $\beta$ -1-6-グルカンを有効成分として含有する多糖体に関する。

【0035】

本発明において、前記多糖体は、 $\beta$ -1-4-ガラクトタン、 $\beta$ -1-6-ガラクトタン又は $\beta$ -ガラクトフラナンをさらに含有することを特徴とし、このような多糖体は単独で使用されてもよい。特に $\beta$ -1-6-グルカンの主成分とする複合物、又は単独物であり得る。

【0036】

また、前記 $\beta$ -1-6-グルカン、 $\beta$ -1-4-ガラクトタン、 $\beta$ -1-6-ガラクトタン及び $\beta$ -ガラクトフラナンは、全多糖体において5～50：2～15：2～15：1～5のモル比であることが好ましく、より好ましくは、10～20：3～10：3～10：2～4のモル比であり、最も好ましくは18：5：5：2のモル比であるが、これに限定されない。前記多糖体は、全100重量%に対して $\beta$ -1-6-グルカン5～50重量%、 $\beta$ -1-4-ガラクトタン2～15重量%、 $\beta$ -1-6-ガラクトタン2～15重量%及び $\beta$ -ガラクトフラナン1～5重量%であることを特徴とし、好ましくは、前記多糖体は全100重量%に対して $\beta$ -1-6-グルカン10～20重量%、 $\beta$ -1-4-ガラクトタン3～10重量%、 $\beta$ -1-6-ガラクトタン3～10重量%及び $\beta$ -ガラクトフラナン2～4重量%であり、多糖体はそれぞれ、全100重量%に対して18重量%、5重量%、5重量%及び2重量%であることを特徴とする。

【0037】

本発明において、前記多糖体は、分子量が約3～5 kDaであることが好ましく、より好ましくは4 kDaであるが、これに限定されず、100 kDa以下の様々な分子量を持つ混合物が可能である。

【0038】

本発明において、前記多糖体の電荷は中性であることを特徴とする。

【0039】

本発明において、前記多糖体は調節T細胞 (Treg) を誘導することを特徴とし、前記調節T細胞 (Treg) はCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg細胞が好ましいが、これに限定されない。

【0040】

前記調節T細胞 (Treg) の誘導は、DC (Dendritic cell) によって媒介されることを特徴とし、また、前記調節T細胞 (Treg) はIL-10及びTGF- $\beta$ 生成誘導を増加させることを特徴とする。

【0041】

本発明において、前記多糖体は*Bifidobacterium bifidum*菌株由来のものが好ましく、より好ましくは、*Bifidobacterium bifidum* PRI1と塩基配列相同性が99%以上である菌株由来のものであり、最も好ましくは*Bifidobacterium bifidum* PRI1 (KCTC13279BP) 菌株由来であるが、これに限定されない。

【0042】

本発明において、前記*Bifidobacterium bifidum* PRI1と塩基配列相同性が99%以上である菌株は、*Bifidobacterium bifidum* A8又は*Bifidobacterium bifidum* LMG11582であり得る。

【0043】

本発明において、前記多糖体は抗炎症又は免疫機能調節活性を有することが好ましく、より好ましくは免疫抑制活性であるが、これに限定されない。腸出血などの腸内に傷がある人の場合、プロバイオティックスを誤って服用すれば副作用が発生し得るが、この場合、多糖体を投与すると治療効果を得ることができる。

【0044】

本発明は他の観点において、 $\beta$ -1-6-グルカン多糖体を生産する菌株に関する。

【0045】

本発明において、前記菌株は *Bifidobacterium bifidum* が好ましいが、CSGG多糖体を生産する菌株であればいずれも可能である。また、本発明において、前記 *Bifidobacterium bifidum* は、*Bifidobacterium bifidum* PRI1 と塩基配列相同性が99%以上であることが好ましく、より好ましくは *Bifidobacterium bifidum* PRI1 (KCTC 13279BP) であるが、これに限定されない。

【0046】

本発明において、前記菌株は $\beta$ -1-4-ガラクトン、 $\beta$ -1-6-ガラクトン又は $\beta$ -ガラクトフラナンをさらに生産することが好ましいが、これに限定されない。

10

【0047】

本発明において、前記菌株は調節T細胞 (Treg) を誘導することを特徴とし、前記調節T細胞 (Treg) は  $CD4^+Foxp3^+Treg$  細胞が好ましいが、これに限定されない。また、前記菌株はIL-10及びTGF- $\beta$ 生成誘導を増加させることを特徴とする。

【0048】

前記調節T細胞 (Treg) の誘導はDCによって媒介されることを特徴とする。

【0049】

本発明において、前記菌株は抗炎症又は免疫機能調節活性を有することが好ましく、より好ましくは、過敏免疫を抑制する活性を有するものであるが、これに限定されない。

20

【0050】

特に、前記菌株はCSGG多糖体を生成するので、食物、腸内の他の細菌又は菌自体由来物質などの様々な抗原によって抗原特異的Tregを誘導して、炎症又は免疫疾患治療に適用可能である。

【0051】

本発明はさらに他の観点において、 $\beta$ -1-6-グルカン多糖体又は該多糖体を生産する *Bifidobacterium bifidum* 菌株を有効成分として含有する免疫調節用組成物に関する。

【0052】

本発明において、前記多糖体は $\beta$ -1-4-ガラクトン、 $\beta$ -1-6-ガラクトン又は $\beta$ -ガラクトフラナンをさらに含有できるが、これに限定されない。

30

【0053】

本発明において、前記多糖体又は菌株は調節T細胞 (Treg) を誘導することを特徴とし、前記調節T細胞 (Treg) は  $CD4^+Foxp3^+Treg$  細胞が好ましいが、これに限定されない。また、前記多糖体又は菌株はIL-10及びTGF- $\beta$ 生成誘導を増加させることを特徴とする。

【0054】

前記調節T細胞 (Treg) の誘導はDCによって媒介されることを特徴とする。

【0055】

本発明で使われる用語“免疫調節”とは、血液内免疫不均衡を解消し、免疫恒常性を維持することを意味する。免疫恒常性維持は、免疫を抑制させるメカニズムである免疫寛容 (tolerance) と免疫を増進する免疫反応 (immunity) とがバランスした状態を指し、このような状態の維持は免疫疾患治療、特に自己免疫疾患の治療において必須の要素である。

40

【0056】

本発明はさらに他の観点において、 $\beta$ -1-6-グルカン多糖体又は該多糖体を生産する *Bifidobacterium bifidum* 菌株を有効成分として含有する免疫抑制剤又は免疫治療剤に関する。

【0057】

50

本発明の用語“免疫抑制剤”とは、抗原の作用に対して宿主が抗体を作る能力（体液性免疫反応）又は細胞性免疫反応を起こす能力を低下又は遮断するために用いる様々な物質のことを指す。

【0058】

また、本発明の用語“免疫治療”とは、自分の身体の免疫システムの活性（activation）又は抑制（suppression）反応を誘導して疾病を払う治療法をいう。最も代表的な免疫治療法は、免疫活性を誘導して癌細胞を殺す抗癌免疫治療法（Cancer Immunotherapy）であり、異常免疫反応によって誘発される疾患である自己免疫疾患（autoimmune disease）、炎症性腸疾患（inflammatory bowel disease, IBD）、アレルギー（allergy）などの疾患に対しては免疫抑制剤を用いた免疫治療が可能である。

10

【0059】

したがって、本発明では“免疫抑制剤”と“免疫治療剤”を同じ意味で使うことができる。

【0060】

本発明はさらに他の観点において、 $\beta$ -1-6-グルカン多糖体又は該多糖体を生産する *Bifidobacterium bifidum* 菌株を有効成分として含有する免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は治療用医薬組成物に関する。

【0061】

本発明において、前記多糖体は $\beta$ -1-4-ガラクトタン、 $\beta$ -1-6-ガラクトタン又は $\beta$ -ガラクトフラナンをさらに含有することができるが、これに限定されない。

20

【0062】

本発明において、前記多糖体又は菌株は調節T細胞（Treg）を誘導することを特徴とし、前記調節T細胞（Treg）はCD4+Foxp3+Treg細胞が好ましいが、これに限定されない。また、前記多糖体又は菌株はIL-10及びTGF- $\beta$ 生成誘導を増加させることを特徴とする。

【0063】

前記調節T細胞（Treg）の誘導はDCによって媒介されることを特徴とする。

【0064】

また、前記免疫調節用組成物は、免疫活性の調節及び免疫疾患の予防、改善又は治療のための目的で医薬組成物又は健康機能食品などに使用することができ、このとき、使用量及び使用形態は目的に応じて適宜調節することができる。

30

【0065】

前記免疫調節用組成物は、免疫増進効果及び免疫過剰抑制効果を示すことができる。前記免疫増進効果は大食細胞においてTNF- $\alpha$ の発現を増加させたり又は脾臓細胞増殖能を向上させて免疫を増進させる効果である。前記免疫過剰抑制効果は、脾臓細胞において非特異的刺激源によるリンパ球過発現を抑制して免疫過剰を抑制する効果である。

【0066】

本発明の組成物による予防又は治療対象疾病である“免疫疾患”は、皮膚炎、アレルギー、鼻炎、痛風、強直性脊椎炎、リウマチ熱、ループス、線維筋痛（fibromyalgia）、腱鞘炎、1型糖尿病、強皮症（scleroderma）、退行性神経疾患、2型糖尿病、珪肺症、粥状動脈硬化症、白斑症、結膜炎及び自己免疫疾患から構成される群から選ばれるいずれか一つに該当し得るが、これに制限されない。

40

【0067】

本発明の組成物による予防又は治療対象疾病である“自己免疫疾患”は、リウマチ性関節炎、全身性強皮症（scleroderma）、アトピー皮膚炎、乾癬、喘息、ギランバレー症候群（Guillain-Barre syndrome）、重症筋無力症、皮膚筋炎（dermatomyositis）、多発性筋炎（polymyositis）、多発性硬化症（multiple sclerosis）、自己免疫性脳脊髄炎、結節性多発性動脈炎（polyarteritis nodosa）、側頭動脈炎（temporal arteritis）、小児期糖尿病、円形脱毛症、天疱瘡、アフタ口内炎、クローン病

50

及びベーチェット病から構成される群から選ばれるいずれか一つに該当し得るが、これに制限されない。

【0068】

本発明の組成物による予防又は治療対象疾病である“炎症性疾患”は、炎症を主病変とする疾病を総称するものであり、むくみ、アレルギー、喘息、結膜炎、歯周炎、鼻炎、中耳炎、咽喉炎、片道炎、肺炎、胃潰瘍、胃炎、クローン病、大腸炎、痔疾、痛風、強直性脊椎炎、リウマチ性熱、ループス、線維筋痛（*fibromyalgia*）、乾癬関節炎、骨関節炎、リウマチ性関節炎、肩関節周囲炎、腱炎、腱鞘炎、筋肉炎、肝炎、膀胱炎、腎臓炎、シェーグレン症候群（*sjogren's syndrome*）、重症筋無力症及び多発性硬化症から構成される群から選ばれるいずれか一つに該当し得るが、これに制限されない。

10

【0069】

本発明で使われる用語“予防”とは、本発明に係る医薬組成物の投与によって免疫疾患又は炎症性疾患を抑制させたり又は発病を遅延させる全ての行為を意味する。

【0070】

本発明で使われる用語“治療”とは、本発明に係る医薬組成物の投与によって免疫疾患又は炎症性疾患に対する症状が好転したり又は良くなる全ての行為を意味する。

【0071】

本発明の医薬組成物は、その有効成分の上述した免疫増進効果、又は免疫過剰抑制効果を通じて様々な免疫疾患に対する予防又は治療及び抗炎症効果を示す。

20

【0072】

前記医薬組成物は、 $\beta$ -1-6-グルカン、 $\beta$ -1-4-ガラクトン、 $\beta$ -1-6-ガラクトン及び $\beta$ -ガラクトフラナン（*CSGG*）多糖体又は該多糖体を生産する *Bifidobacterium bifidum* 菌株を有効成分として含有する他、医薬組成物に通常使用される適切な担体、賦形剤及び希釈剤をさらに含むことができる。

【0073】

前記組成物に含まれ得る担体、賦形剤及び希釈剤は、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリスリトール、マルチトール、デンプン、アカシアゴム、アルギネート、ゼラチン、カルシウムホスフェート、カルシウムシリケート、セルロース、メチルセルロース、非晶質セルロース、ポリビニルピロリドン、水、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、ステアリン酸マグネシウム及び鉱物油などがある。前記組成物を製剤化する場合には、通常使用する充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、界面活性剤などの希釈剤又は賦形剤を用いて調剤することができる。

30

【0074】

本発明に係る医薬組成物は、通常の方法によって様々な形態で剤形化して使用することができる。好適な剤形には、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、糖衣錠、硬質又は軟質のカプセル剤、溶液剤、懸濁剤又は乳化液剤、注射剤、エアゾールなどの経口型剤形、外用剤、坐剤及び滅菌注射溶液などがあるが、これに限定されない。

【0075】

本発明に係る医薬組成物は、薬学的に不活性である有機又は無機担体を用いて適当な剤形に製造できる。すなわち、剤形が錠剤、コーティングされた錠剤、糖衣錠及び硬質カプセル剤である場合、ラクトース、スクロース、デンプン又はその誘導体、タルク、カルシウムカーボネート、ゼラチン、ステアリン酸又はその塩を含むことができる。また、剤形が軟質カプセル剤である場合には、植物性オイル、ワックス、脂肪、半固体及び液体のポリオールを含んでもよい。また、剤形が溶液又はシロップ形態である場合、水、ポリオール、グリセロール、及び植物性オイルなどを含んでもよい。

40

【0076】

本発明に係る医薬組成物は、前記の担体の他にも、保存剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、溶解剤、甘味剤、着色剤、滲透圧調節剤、酸化防止剤などをさらに含むことができる。

50

## 【0077】

本発明に係る医薬組成物は、薬学的に有効な量で投与する。本発明において、“薬学的に有効な量”は、医学的治療に適用可能な合理的な受惠／危険の比率であり、疾患を治療するのに十分な量を意味し、有効容量レベルは、患者の疾患の種類、重症度、薬物の活性、薬物に対する敏感度、投与時間、投与経路及び排出比率、治療期間、同時使用される薬物を含む要素、及びその他医学分野によく知られた要素によって決定され得る。本発明に係る医薬組成物は、個別治療剤として投与するか、又は他の治療剤と併用して投与することができ、従来の治療剤とは逐次に又は同時に投与することができ、単一又は多重投与することができる。上述した要素を全て考慮して副作用無しに最小量で最大の効果が得られる量を投与することが重要であり、これは当業者にとって容易に決定できる。

10

## 【0078】

本発明の組成物は、免疫、特に自己免疫又はアレルギー関連タンパク質と共に投与することができる。具体的なタンパク質には、自己免疫疾患に関与する自己抗原、例えば、リウマチ関節炎は熱ショックタンパク質 (heat shock proteins; HSPs)、シトルリン化フィラグリン (citru llinated filaggrin)、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ (glucose-6-phosphate isomerase)、p205、コラーゲンなどを含むことができ、1型糖尿病は、インスリン (insulin)、亜鉛トランスポーター8タンパク質 (Zinc transporter 8 protein; ZnT8)、膵臓および十二指腸のホメオボックス1 (Pancreatic and duodenal homeobox 1; PDX1)、クロモグラニンA (Chromogranin A; CHGA)、膵島アミロイドポリペプチド (Islet amyloid polypeptide; IAPP) を含むことができ、重症筋無力症に関連した自己抗原であるアセチルコリン受容体を含むことができる。また、このような自己免疫疾患に知られたあらゆる種類の自己抗原だけでなく、食品アレルギーを起こすものと知られたいろいろなアレルギー誘導物質であるピーナッツ、牛乳、卵、ナッツ類 (Tree nuts)、豆、海老などの甲殻類、魚由来物質などを含むことができる。

20

## 【0079】

本発明の医薬組成物は、様々な経路で個体に投与することができる。投与の方式は、例えば、皮下、静脈、筋肉又は子宮内硬膜又は脳血管内注射によって投与することができる。本発明の医薬組成物は、治療する疾患、投与経路、患者の年齢、性別及び体重及び疾患の重症度などの様々な関連因子と共に、活性成分である薬物の種類によって決定される。

30

## 【0080】

本発明に係る医薬組成物の投与方法は、剤形によって容易に選択することができ、経口又は非経口投与することができる。投与量は患者の年齢、性別、体重、病症の程度、投与経路によって変わり得る。

## 【0081】

本発明はさらに他の観点において、 $\beta$ -1-6-グルカン多糖体又は該多糖体を生産する *Bifidobacterium bifidum* 菌株を有効成分として含有する免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は治療剤に関する。

40

## 【0082】

本発明はさらに他の観点において、 $\beta$ -1-6-グルカン多糖体又は該多糖体を生産する *Bifidobacterium bifidum* 菌株を有効成分として含有する組成物を投与することを含む免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は治療方法に関する。

## 【0083】

本発明において、前記多糖体は $\beta$ -1-4-ガラクトタン、 $\beta$ -1-6-ガラクトタン又は $\beta$ -ガラクトフラナンをさらに含有することを特徴とする。

## 【0084】

本発明はさらに他の観点において、 $\beta$ -1-6-グルカン多糖体又は該多糖体を生産する *Bifidobacterium bifidum* 菌株を有効成分として含有する組成物

50

を免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は治療に使用する用途に関する。

【0085】

本発明において、前記多糖体は $\beta$ -1-4-ガラクトサン、 $\beta$ -1-6-ガラクトサン又は $\beta$ -ガラクトフラナンをさらに含有することを特徴とする。

【0086】

本発明に係る医薬組成物は、優れた免疫増強及び免疫過剰抑制効果を提供するだけでなく、薬物による毒性及び副作用もほとんどないため、免疫疾患の治療又は予防の目的で長期間服用時にも安心して使用することができる。

【0087】

本発明のB. bifidum又はCSGGは生体内で様々な抗原特異Treg細胞を誘導できるので、経口耐性の補助剤として使用することができる。

10

【0088】

本発明はさらに他の観点において、 $\beta$ -1-6-グルカン多糖体又は該多糖体を生産するBifidobacterium bifidum菌株を有効成分として含有する免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は改善用食品に関する。

【0089】

本発明において、前記多糖体は $\beta$ -1-4-ガラクトサン、 $\beta$ -1-6-ガラクトサン又は $\beta$ -ガラクトフラナンをさらに含有することが好ましいが、これに限定されない。

【0090】

前記免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は改善用食品は、免疫活性を増強させたり或いは過剰免疫を抑制又は改善して免疫機能の恒常性を維持する活性を有する健康機能食品であることを特徴とする。

20

【0091】

本発明において、前記多糖体又は前記菌株は調節T細胞(Treg)を誘導することを特徴とし、前記調節T細胞(Treg)はCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg細胞であることが好ましいが、これに限定されない。

【0092】

前記調節T細胞(Treg)の誘導はDCによって媒介されることを特徴とし、IL-10及びTGF- $\beta$ 生成を誘導することを特徴とする。

【0093】

本発明の用語“食品”とは、肉類、ソーセージ、パン、チョコレート、キャンディ類、スナック類、菓子類、ピザ、ラーメン、その他麺類、ガム類、アイスクリーム類を含む酪農製品、各種スープ、飲料水、茶、ドリンク剤、アルコール飲料、ビタミン複合剤、健康機能食品及び健康食品などがあり、通常の意味におけるいかなる食品も含む。

30

【0094】

前記健康機能(性)食品(functional food)とは、特定保健用食品(food for special health use; FOSHU)と同じ意味の用語であり、栄養供給の他にも生体調節機能を効率的に呈するように加工された医学、医療効果が高い食品を意味する。ここで、“機能(性)”とは、人体の構造及び機能に対して栄養素を調節したり、又は生理学的作用などのような保健用途に有用な効果を得ることを意味する。本発明の食品は、当業界で通常用いられる方法によって製造可能であり、前記製造時には、当業界で通常添加する原料及び成分を添加して製造することができる。また、前記食品の剤形また食品として認められる剤形であればいずれも製造可能であり、本発明に係る健康機能食品は、粉末、顆粒、錠剤、カプセル又は飲料の形態であり得る。

40

【0095】

前記健康食品(health food)は一般食品に比べて積極的な健康維持や増進効果を有する食品を意味し、健康補助食品(health supplement food)は健康補助目的の食品を意味する。場合によって、健康機能食品、健康食品、健康補助食品の用語は同じ意味で使われる。

【0096】

50

前記食品組成物は生理学的に許容可能な担体をさらに含むことができるが、担体の種類は特に制限されず、当該技術分野に通常用いられる担体であればいずれも使用可能である。

【0097】

また、前記組成物は、食品組成物に通常使用されて臭い、味、視覚などを向上させ得る追加成分を含むことができる。例えば、ビタミンA、C、D、E、B1、B2、B6、B12、ナイアシン(niacin)、ビオチン(biotin)、ホレート(folate)、パントテン酸(panthothenic acid)などを含むことができる。また、亜鉛(Zn)、鉄(Fe)、カルシウム(Ca)、クロム(Cr)、マグネシウム(Mg)、マンガン(Mn)、銅(Cu)、クロミウム(Cr)などのミネラルを含むことができる。また、リシン、トリプトファン、システイン、バリンなどのアミノ酸を含むことができる。

10

【0098】

また、前記組成物は、防腐剤(ソルビン酸カリウム、ベンゾ酸ナトリウム、サリチル酸、デヒドロ酢酸ナトリウムなど)、殺菌剤(さらし粉と高度さらし粉、次亜塩素酸ナトリウムなど)、酸化防止剤(ブチルヒドロキシアニソール(BHA)、ブチルヒドロキシトルエン(BHT)など)、着色剤(タール色素など)、発色剤(亜硝酸ナトリウム、亜酢酸ナトリウムなど)、漂白剤(亜硫酸ナトリウム)、調味料(MSGなど)、甘味料(ズルチン、シクラメート、サッカリン、ナトリウムなど)、香料(バニリン、ラクトン類など)、膨張剤(ミョウバン、D-酒石酸水素カリウムなど)、強化剤、乳化剤、増粘剤(糊料)、皮膜剤、ガム基礎剤、気泡抑制剤、溶剤、改良剤などの食品添加物(food additives)を含むことができる。前記添加物は、食品の種類によって選別し、適度の量を使用することができる。

20

【0099】

本発明のCSGG多糖体又は該多糖体を生産する菌株と共に食品学的に許容可能な食品補助添加剤をさらに含むことができ、他の食品又は食品成分と共に使用することができる。通常の方法によって適切に使用することができる。有効成分の混合量は、その使用目的(予防、健康又は治療的処置)によって適切に決定することができる。

【0100】

本発明はさらに他の観点において、(a)樹状細胞(DC; Dendritic cell)に $\beta$ -1-6-グルカン多糖体又は該多糖体を生産するBifidobacterium bifidum菌株を処理して調節樹状細胞(rDC)を得る段階; 及び(b)前記rDCをCD4<sup>+</sup>T細胞と共培養して調節T細胞(Treg)を誘導する段階を含む誘導調節T細胞(iTreg)の製造方法に関する。

30

【0101】

本発明において、前記調節T細胞(Treg)は、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg細胞であることを特徴とし、また、前記調節T細胞(Treg)はIL-10及びTGF- $\beta$ 生成を増加させることを特徴とする。

【0102】

本発明において、前記(b)段階は、抗-CD3抗体、IL-2及びTGF- $\beta$ で刺激して調節T細胞(Treg)を誘導することを特徴とする。

40

【0103】

本発明において、前記樹状細胞及びCD4<sup>+</sup>T細胞は末梢血単核細胞(PBMCs)由来のものが好ましいが、これに限定されない。

【0104】

本発明はさらに他の観点において、前記方法で製造された誘導調節T細胞(iTreg)を有効成分として含有する免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は治療用細胞治療剤に関する。

【0105】

本発明はさらに他の観点において、前記方法で製造された誘導調節T細胞(iTreg)を有効成分として含有する細胞治療剤を投与することを含む免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は治療方法に関する。

50

## 【0106】

本発明はさらに他の観点において、前記方法で製造された誘導調節T細胞 (iTreg) を有効成分として含有する細胞治療剤を免疫疾患又は炎症性疾患の予防又は治療に使用する用途に関する。

## 【0107】

本発明において、前記調節T細胞 (Treg) はCD4+Foxp3+Treg細胞であることを特徴とし、また、前記調節T細胞 (Treg) はIL-10及びTGF-β生成を増加させることを特徴とする。

## 【0108】

本発明において、前記免疫疾患又は炎症性疾患は炎症性大腸炎であることが好ましいが、これに限定されない。

10

## 【0109】

B. bifidumは、母乳授乳児の腸内微生物のうち支配的なバクテリア構成員の一部であり、この菌の不足は幼年期アレルギー、喘息及び自己免疫疾患と関連がある。一部の商業用プロバイオティックス製品にはB. bifidumが含まれているが、効能が不明であり、一部のBifidobacterium種はリウマチ関節炎の進行を悪化させるような有害な影響を及ぼすことがある (PNAS, 113 (50): E8141-E8150, 2016)。したがって、共生菌の特定構成要素が免疫系に有益な影響を及ぼすと考えられる。B. bifidum PRI1から精製されたCSGGがTreg細胞を刺激するのに非常に効果的であり、大腸炎の進行を抑制できることが本発明から証明され、バクテリア細胞壁多糖体の免疫調節の役割が免疫及びアレルギー疾患治療のためのプロバイオバクテリア選択に特に有用であると考えられる。

20

## 【0110】

B. bifidumをSPFマウスに接種したり又はGFマウスにコロニゼーションさせると、ナイーブCD4+細胞をNrp1-Foxp3+、Helios-Foxp3+又はNrp1-Helios-Foxp3+表現型を有し、高いレベルのIL-10及びCTLA4を発現する末梢由来 (peripherally Derived Treg; iTreg) 細胞に分化させる。

## 【0111】

本発明ではB. bifidumが生体内でpTreg生成を誘導できる2つの並列メカニズムを提案した。

30

## 【0112】

第一に、B. bifidumモノコロニゼーションによるブチレートの強化されたレベルは、T細胞を直接標的にしたり又は調節性DC表現型を誘導して間接的にTreg生成を促進することができる (Y. Furusawa et al., Nature 504: 446-450, 2013; N. Arpaia et al., Nature 504: 451-455, 2013)。すなわち、B. bifidumが結腸Treg細胞の誘導を刺激する分子機作は少なくとも2種類の作用分子、代謝産物 (ブチレート) 及び細胞表面多糖体 (CSGG) によって媒介され得る。以前の研究は、共生微生物によって生産された発酵産物である短鎖脂肪酸 (short chain fatty acids; SCFAs) のうち、ブチレートがiTreg誘導物質の共通した作用分子の一つであり得ると提案した。SPFマウスにブチレート生産バクテリア (Clostridium butyrate; Atarashi et al., Nature 500: 232-236, 2014) 又はブチル化デンプンを投与すれば、Foxp3遺伝子座 (locus) のエンハンサー及びプロモーター領域でヒストンH3アセチル化を増加させて結腸Treg細胞を増加させた (Yukihiko Furusawa et al. Nature 504: 446-450, 2013)。しかし、腸内微生物から直接由来した物質がCD4+Foxp3+Treg細胞を誘導できるかどうかは確認できなかった。

40

## 【0113】

本発明の一実施例ではGFマウスの盲腸サイズがB. bifidumコロニゼーションに

50

より正常化され、盲腸及び大便においてブチレートレベルが有意に増加することを発見した。ブチレートの他にも全バクテリアのTreg誘導活性を模倣する主要作用分子としてCSGG (Cell Surface derived beta-Glucan/Galactan polysaccharides)を確認した。細胞表面から分離された他の多糖体である陰電荷を帯びる多糖体PGβG (phospho glycerol-β-galactofuran)は、Treg誘導活性がなかった。PGβGはTh1/Th17反応を向上させた。PGβGの化学構造はBifidobacterium bifidum亜種であるpennsylvanicum DSM20239のリポタイコ酸 (lipoteichoic acid; LTA)と非常に類似している (Fisher W, Eur J Biochem 165 (3): 639-646, 1987)。グラム陽性菌のLTAは一般的にプロ炎症性活性を有しており、これを除去すればプロバイオティック乳酸菌の抗炎症能力が向上する (Sara Lebeer, Trends in Microbiology, January 2012, Vol. 20, No. 1)。このような結果は、同一バクテリアから由来したバクテリア多糖体の構造が差別的に免疫反応を調節できることを示唆し、共生菌由来多糖体の構造及び機能の関連性を解明することは重要である。

#### 【0114】

第二に、B. bifidumの細胞表面から由来したCSGGはDC-依存性メカニズムによってTreg細胞を誘導する (V. K. Raker et al., Frontiers in immunology 6: 569, 2015)。DCsはCSGG及びBifidobacterium bifidum誘導されたiTreg生成において重要な役割を果たす。B. bifidumと作用分子であるCSGGは、TLR/IL-10経路を通じてDCの表現型を調節DC (rDCs)に誘導することができる。B. bifidumのコロニゼーション又はCSGG処理は、全結腸及びcLP-DC (MHCII + CD11c + CD11b + CD103 + F4/80 - CDF)においてIL-10、TGF-β、GM-CSF及び他のTreg誘導因子の発現レベルを増加させる。様々なToll受容体 (TLRs)のうち、DCのTLR2は、CSGG誘導された耐性信号の感知及び伝達に重要な役割を担当し、TLR2 KO (knock-out) DCは、CSGG誘導されたTreg細胞生成において有意の欠陥 (TLR2 DCに比べて約35%のTreg細胞を生成)を示した。他の研究はまた、CD4 T細胞 (Round JL, 2011 Science)又はDCs (Suryasarathi Dasgupta, Cell host and microbes, 2014)のTLR2がIL-10生産のためのバクテリア由来多糖体の認識に重要な役割を担うと提案した。TLR2以外に、TLR2 KO DCが相変わらずTreg細胞を誘導するので、他の受容体がCSGG誘導iTreg生成にも関与することができる。CLR (C-type lectin receptors)抑制剤は、CSGGによって誘導されたTreg生成を減少させなかったため、CLRは関与しない可能性がある。CSGGの認識及びT細胞に対する耐性信号の伝達にどの受容体又はそれらの組合せが関連するかを明らかにするためにはより多くの研究が必要である。TGF-βとIL-10はDCにおいてCSGG-TLR2信号を通じたTreg細胞分化の核心作用分子であり得る。TGF-β遮断抗体の添加は、CSGG誘導されたTreg細胞を完全に消えるようにした。免疫調節サイトカインIL-10は、CSGG誘導されたTreg細胞の生成に重要な役割を担う。TLR2 KO DCは、はるかに低いレベルのIL-10を生産し、Treg細胞を誘導する際に減少した活性を示した。このような結果は、様々な免疫反応においてIL-10が免疫調節の主要調節因子であることを示唆する (Lochner et al., The Journal of experimental medicine 205: 1381-1393, 2008)。

#### 【0115】

また、B. bifidumのコロニゼーション又はCSGGの投与はRORγt + Foxp3 + Treg細胞だけでなくCD103 + も増加させ、CSGG治療が腸Treg細胞を誘導できることを示唆する (B. Yang et al., Mucosal immun

10

20

30

40

50

ology 9:444-457, 2016; E. Sefik et al., Science 349:993-997, 2015)。B. bifidumのコロニゼーションは食餌及び食物反応性Treg細胞を誘導して、食中毒だけでなく食物による調節障害を抑制することもできる。したがって、B. bifidum又はCSGGによって誘導されたRORγt+Foxp3+Treg細胞が高度に抑制された腸特異作用Tregに属すると見なすことができる(M. Esposito et al., The Journal of Immunology 185:7467-7473, 2010; D. M. Tartar et al., The Journal of Immunology 184:3377-3385, 2010)。

【0116】

CSGGは共生グラム陰性菌Bacteroides fragilisの主要免疫調節分子であるPSA (capsular polysaccharides A)と比較して非常に異なる特徴を有する(Neeraj K. Surana et al., Immunol Rev. 245(1):13-26, 2012)。CSGGとPSAはいずれもTreg細胞を誘導する上でTLR2/IL-10信号を必要とするが、Treg細胞の特性はかなり異なる。Bacteroides fragilisのPSA又は外膜小胞(OMV)は主に、Foxp3+Treg細胞ではなくIL-10high調節T細胞を誘発するが(Cell Host & Microbe 124:509-520, 2012; Cell, 122(1):107-18, 2005; PNAS. 107(27):12204-9, 2010)、CD4+Foxp3+Treg細胞生成に対する直接的な証拠はない。PSAはまた、高いレベルのIFN-γhighTh1生産を誘導する(Round et al., Science 332:974-977, 2011; Shen et al., Cell host & microbe 12:509-520, 2012)。PSAによって誘導されたTreg細胞は、Foxp3-IL-10highIFNγhighのような表現型(J. L. Round et al., Science 332:974-977, 2011; Y. Shen et al., Cell host & microbe 12:509-520, 2012)を示すが、CSGGによって誘導されたTreg細胞は大部分Foxp3+IL-10highIFNγlowを示す。PSAは抗原提示細胞を活性化させてIL-12分泌を促進させ、耐性を誘導するよりは樹状細胞の活性化を誘導する(Cell, 122(1):107-18, 2005)。CSGGは、高いレベルのIL-10及びCTLA4を生産するNrp1-Helios-Foxp3+及びRORγt+Foxp3+Treg細胞を誘導する。

【0117】

本発明の一実施例では、試験管内及び生体内GFマウスにおいてBacteroides fragilisとB. bifidum PRI1間のTreg誘導活性を比較した。Bacteroides fragilisがモノコロニゼーションされたマウスはFoxp3+Treg細胞の増加を示さず、CD4+細胞においてIFNγ+IL-10highを示した。流細胞分析法及びELISAによるサイトカイン分析は、B. fragilis処理群で高いレベルのIL-10及びIFN-γを発現することを示した。また、B. bifidumはFoxp3+iTreg細胞を誘導するのに対し、B. fragilisはFoxp3Treg細胞ではなくIL-10highTr1細胞を誘導する可能性が高い。また、PSA又はBacteroides fragilisの投与がCD4+Foxp3+Treg細胞を増進させ得るかに関する直接的な証拠はない。

【0118】

さらに、準最適のTreg誘導条件下でPSA処理されたDCは、Foxp3-IFNγ+IL-10high細胞を主に誘導するのに対し、CSGG処理されたDCはFoxp3+IFNγ-IL-10high細胞を生成した。PSAはMHCII分子に結合されたT細胞に処理され提示されるため、抗原特異的Treg細胞を誘導することができない(B. A. Cobb et al., Cellular microbiology 7:1398-1403, 2005)。対照的に、CSGGは、MHCIIに積載され難いため

10

20

30

40

50

、食餌抗原又は共生菌に反応する様々な抗原特異的 Treg 細胞を誘導することができる。このような機能的差異は化学構造及びメカニズムの差異によって媒介され得る。PSA は陽電荷及び陰性に荷電された当残基を交互に含む独特の陽イオン性 (zwitterionic) モチーフを有する。このような電荷及び大きさによって、PSA は T 細胞刺激において異なる活性を有する。Native PSA は平均 ~130 kDa であり、小さすぎる断片 (5000 Da 断片) は活性がないが、17.1 kDa 断片 (~22 反復単位) は大腸炎を抑制する機能をする と報告されている (Kalka-Moll WM, et al. J Immunol. 164:719-724, 2000)。PSA は TLR-2 を通じて DCs に吸収され、適切に切れた後に MHC II 分子に結合して、PSA を認識する T 細胞と作用して特定ヘルパー T 細胞の分化を誘導する (Cobb BA et al., Cell Microbiol. 7:1398-1403, 2005)。この場合、PSA によって誘導される Treg、Tr1 免疫調節細胞は PSA に特異性を有し、このような現象は将来、抗原特異的な Treg 細胞誘導に限界性を持つ。CSGG は平均 ~4000 Da の中性多糖体であり、PSA とは違い、主に T 細胞に直接作用するのではなく、DC 特性調節を通じて作用する。このような作用メカニズムの差異は、CSGG 処理によって様々な抗原特異的 Treg 細胞を誘導できる可能性を提示している。すなわち、処理された PSA が MHC II 上にローディングされることによって PSA 特異 Treg 細胞だけが生成され得る。一方、CSGG は MHC II に内包作用媒介プロセッシング及びローディングを行うよりは、DC の表現型変化を誘導して rDC となるように誘導する。

【0119】

本発明の一実施例において、CSGG を GF マウスに投与すれば、cLP 及び MLN において CD4<sup>+</sup>Nrp-Foxp3<sup>+</sup>Tregs 細胞が有意に向上した。したがって、全種類の抗原と共に処理された B. bifidum 又は CSGG は、食餌抗原又は共生バクテリア抗原特異 Treg 細胞のような抗原特異的 Treg 細胞を誘導することができる。興味深い結果の一つは、Bb のコロニゼーション又は CSGG の投与が大腸において RORγt<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 細胞のレベルを向上させるということである。また、mock iTreg と比較して、Bb 又は CSGG によって誘導された iTreg 細胞は、腸炎症抑制能力を持つ RORγt<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 細胞の個体群がより高い。大腸炎モデルの mock-iTreg 細胞と比較して、Bb 又は CSGG によって誘導された iTreg 細胞は、Foxp3 遺伝子座の CNS2 においてより高い脱メチル化状態 (50 ~ 60%) を有する持続的な Foxp3 発現を示した。したがって、Bb 又は CSGG によって誘導された RORγt<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 細胞が腸特異作用 Treg に属すると信じる (Esposito et al., J Immunology 185:7467-7473, 2010; Tartar et al., J Immunology 184:3377-3385, 2010; B-H Yang et al., Mucosal Immunology 9:444-457, 2016)。このような過程で先天性免疫細胞の役割を研究して、Bb 又は CSGG 処理が RORγt<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 細胞を強化させる基本メカニズムをさらに調べることができる。

【0120】

本発明では B. bifidum PRI1 とその作用分子である CSGG が iTreg 細胞の生成を促進するということを提示する。Bifidobacterium bifidum は放線菌類 (Actinobacteria) に属し、ヒトの内臓で特異的に同定され、母乳授乳児の内臓マイクロバイオータ (microbiota) の主要バクテリア構成員の一部と表された (Turroni et al., Applied and environmental microbiology 75:1534-1545, 2009)。自然分娩と比較して、帝王切開分娩は、小児期アレルギー、喘息及び自己免疫疾患と関連がある Bifidobacterium 種の欠乏を招いた。IBD 患者は健康な対照群に比べて糞便において B. bifidum の比率がより少ない (Wang et al., Journal of clinical microbiology 52:398-406, 2014; Verma et al., Journal of clinica

l microbiology 48:4279-428, 2010)。種々の共生菌のうちビフィドバクテリウムは一般的に、宿主反応を調節できる能力においてラクトバチルスに比べて強い抗炎症的な特徴を有する。しかし、共生菌の免疫調節効果は菌株特異的であり、機能性菌株の同定は相変らず大きな宿題として残っている。例えば、同一 *Bacteroides fragilis* 菌内で脂質多糖体生産菌株は炎症信号を増加させ、疾病の進行を悪化させる (Walter J. Lukiw et al., Front Microbiol 7:1544, 2016)。これに対し、PSA生成菌株は炎症疾患を抑制すると知られている。したがって、同一の種 (species) 内でも個別の免疫学的特性をどのように有するかを糾明することは非常に重要な宿題である。このような菌株特異的免疫調節特異性を糾明する方法は、菌由来物質とこれらを免疫学的特性を糾明してそれを機能的マーカーとして活用する方法である。例えば、ブチレートはブチル酸が腸間膜 Treg 細胞の分化を促進することによって Treg 誘導バクテリアの標識子になり得る (Yukihiro Furusawa et al., Nature 504:446-450, 2013; Liao HY et al., Scientific reports, 6:20481, 2016)。他の方法は、比較ゲノム分析によって知られた菌株と高い遺伝相同性を有する菌株を同定することである (C. Preston Neff, Cell Host & Microbe, 20(4):535-547, 2016)。本発明では *B. bifidum* 菌株の中で A8 (99.97%) と LMG11582 (99.98%) が最も高い塩基類似性と CSGG 合成に関連したオーソログス (orthologous) 遺伝子を有していることを発見した。IPLA20015 及び A8 菌株はヒト PBMC 培養システムにおいて Treg 増進バクテリアとして知られている。試験管内で Treg 誘導活性を比較した結果、A8 菌株は本発明の菌株と類似の活性を示したが、低い塩基相同性 (98.9%) 及び CSGG 合成に関連したいくつかのオーソログス遺伝子のない ATCC29521 は、Treg 誘導活性はるかに低かった。

#### 【0121】

本発明では *B. bifidum* 又は CSGG の投与が生体内で様々な抗原特異 Treg 細胞を誘導するための経口耐性の補助剤として使用可能であることを確認した。また、*B. bifidum* 又は CSGG 治療は、MHC II で抗原提示を妨害しない上に rDC を誘導するので、自己免疫又はアレルギー関連タンパク質と共に *B. bifidum* 又は CSGG を投与すれば抗原特異的 Treg 細胞が誘導され、疾病進行を抑制できることを確認した。具体的なタンパク質には、自己免疫疾患に関与する自己抗原、例えば、リウマチ関節炎は熱ショックタンパク質 (heat shock proteins; HSPs)、シトルリン化フィラグリン (citrullinated filaggrin)、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ (glucose-6-phosphate isomerase)、p205、コラーゲンなどを含むことができ、1型糖尿病は、インスリン (insulin)、亜鉛トランスポーター8タンパク質 (Zinc transporter 8 protein; ZNT8)、膵臓および十二指腸のホメオボックス1 (Pancreatic and duodenal homeobox 1; PDX1)、クロモグラニンA (Chromogranin A; CHGA)、膵島アミロイドポリペプチド (Islet amyloid polypeptide; IAPP) を含むことができ、重症筋無力症に関連した自己抗原であるアセチルコリン受容体を含むことができる。また、このような自己免疫疾患に知られたあらゆる種類の自己抗原だけでなく、食品アレルギーを起こすものと知られたいろいろなアレルギー誘導物質であるピーナッツ、牛乳、卵、ナッツ類 (Tree nuts)、豆、海老などの甲殻類、魚由来物質などを含むことができる。

#### 【0122】

本発明は、調節 T (Treg) 細胞を誘導又は生成して過免疫疾患を治療できる CSGG (cell surface beta-グルカン/galactan) 多糖体及びこれを発現する *Bifidobacterium bifidum* PRI1 に関し、特に、*Bifidobacterium bifidum* PRI1 が発現する CSGG (cell

10

20

30

40

50

surface beta-グルカン／galactan) 多糖体は既存に知られたプロバイオティクス菌株の多糖体と差異があり、前記CSGGがプロバイオティクス菌株のCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg細胞の形成を誘導する主要物質として確認され、TLR2-媒介DCを生成するメカニズムを通じて炎症性腸疾患又は過免疫疾患治療効果を示す。本発明では、*Bifidobacterium bifidum* PRI1が発現するCSGG (cell surface beta-glucan／galactan) 多糖体の具体的な構造式を明らかにし、前記CSGGが調節T (Treg) 細胞の誘導に主要作用物質であることを最初に証明した。本発明のCSGGのβ-D-グルカンの構造はbeta-1-6-グルカンであり、知られたβ-D-グルカン構造である2-substituted-(1, 3)-beta-D-glucanとはその機能が完全に異なる。以前に知られたβ-D-グルカンはプレバイオティクス機能であるのに対し、本発明のベータ-1-6-グルカンはそれ自体が免疫調節機能を有する。また、PSA (polysaccharide A) のような多糖体は、PSA以外の抗原特異的なTreg誘導能力がないが、これに対し、CSGG生成菌株は種々の抗原、すなわち、飲食物、腸内他の細菌、菌自体由来物質などに対するTregを誘導できるので、PSAとCSGGはその構造及び作用機作が全く異なる。細胞表面の多糖体を一つの物質に一般化することは困難であるが、本発明では構造的差異がどのように機能と関連しているかを糾明した。すなわち、本発明の菌から生成された物質であるCSGG自体がTregを誘導する菌自体の機能を代弁し得る活性指標物質である。

【0123】

CSGGはTreg誘導バクテリアの新しい機能的標識子として作用でき、CSGG又はCSGG生成*B. bifidum*は、自己免疫及びアレルギー疾患に対する特異的免疫療法を開発するための耐性誘発補助剤として使用可能である。

【0124】

実施例

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明する。これらの実施例は単に本発明をより具体的に説明するためのものであり、本発明の要旨によって本発明の範囲がこれらの実施例によって制限されないことは、当業界で通常の知識を有する者にとって明らかであろう。

【0125】

材料及び方法

1. マウス及びバクテリア菌株

1-1: マウス

マウスはPOSTECH Biotech Centerの動物施設で管理し、全実験手順はPOSTECH実験動物運営委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) の承認を受けた。無菌 (Germ-free) C57BL/6 (B6) マウスは、Drs. Andrew Macpherson (Bern Univ., Switzerland) 及びDr. David Artis (Then at Univ. Pennsylvania, currently at Cornell University, USA) から提供されてPOSTECHで確立し、sterile flexible film isolators (Class Biological Clean Ltd., USA) で維持管理した。GF現況は毎月盲腸内容物によってモニタリングした。Foxp3-eGFP、Tlr2<sup>-/-</sup>、Tlr4<sup>-/-</sup>、Tlr6<sup>-/-</sup>及びMyD88<sup>-/-</sup>動物はThe Jackson Laboratoryから購入した。C57BL/6-CD45a (Ly5a) -Rag1<sup>-/-</sup>-TCR OT-II (Rag1<sup>-/-</sup>-OT-II TCR形質転換体) 及びRag1<sup>-/-</sup>-マウスはTagonic交換プログラムによって得た。CBirマウスは、Charles O. Elsona (University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294, USA; Yingzi Cong, PNAS, 19256-19261, doi: 10.1073/pnas.0812681106) から提供された。6~12週齢の性別及び年齢に合うマウスを使用した。

## 【0126】

## 1-2: バクテリア

*B. bifidum* PRI1と他の*B. bifidum*菌株は、0.1% L-システインが添加されたMRS培地(BD, Difco)で嫌気培養し、*L. paracasei*はMRS培地で培養した。モノコロニゼーションのために、バクテリア( $5 \times 10^8$  CFU/ $200 \mu\text{L}$ )を無菌(GF)マウスに経口投与した。

## 【0127】

2. *B. bifidum*で細胞表面多糖体の精製

培養した*B. bifidum* PRI1を収穫し、PBSで2回洗浄した。細胞表面多糖体の精製は、以前の方法(D. L. Kasper et al., Journal of bacteriology 153:991-997, 1983)をやや修正して行った。68°Cで酸性フェノール(Sigma-Aldrich)処理を実施して被膜多糖類を抽出し、エーテルを処理して残留フェノールを除去した後、蒸留水に3日間透析した。核酸とタンパク質を除去するために、DNase I(Roche)及びRNase(Sigma-Aldrich)で37°Cで一晩処理した後、Pronase(Protease from *Streptomyces griseus*, Sigma-Aldrich)で37°Cで一晩処理した。酢酸処理後、沈殿物を除去するために遠心分離をした。冷却されたエタノールを添加して多糖類を沈殿させた後、蒸留水で3日間透析して凍結乾燥させた。精製された多糖類を水に溶解させ、HPLCカラム(TSK gel G5000P WXL, Tosho)でゲル濾過を行った。中性及び陰性電荷多糖類をさらに分離するために陰イオン交換クロマトグラフィー(HiPrep Q FF16/10, GE healthcare)を行った。多糖類の濃度は、酸性フェノール分析(M. DuBois et al., Analytical chemistry 28:350-356, 1956)によって決定された。

## 【0128】

## 3. 16S rRNA遺伝子分析によるバクテリアコロニゼーション分析

モノコロニゼーションを確認するためにバクテリアのゲノムDNAをNeucleoSpin DNA Stool(Macherey-Nagel)を用いてマウスの糞便又は腹腔内容物から分離した。

## 【0129】

PCR分析は、C1000タッチサーマルサイクラー(Bio Rad)を用いて行い、下表1のプライマーを使用した。

## 【0130】

【表1】

| 配列番号 | プライマー              | 配列(5' → 3')                |
|------|--------------------|----------------------------|
| 1    | 全バクテリアEUB(forward) | TCCTACGGGAGGCAGCAGT        |
| 2    | 全バクテリアEUB(reverse) | GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT |
| 3    | BibiF-(forward)    | CCACATGATCGCATGTGATTG      |
| 4    | BibiF-(reverse)    | CCGAAGGCTTGCTCCCAAA        |

## 【0131】

## 4. FISH(fluorescence in situ hybridization)によるバクテリアコロニゼーション分析

*B. bifidum* PRI1によるモノコロニゼーション3週後に、マウスを犠牲して小腸を十二指腸(幽門の末端から1~3cm以内)、空腸(Treitzの靱帯から2~4cm以内)及び回腸(回盲部弁から1~3cm以内)の3部分に分けた。各小腸切片1cmと結腸を組織学的分析のためにカルノア液固定をした。カルノア固定液(3:1のメタノール:氷酢酸)を落とし、細胞懸濁液を500gで5分間遠心分離した後、ペレットをカルノア固定液で再懸濁した(Choolani et al., 2007)。カルノア

溶液で固定したパラフィン埋込 (e m b e d d e d) セクションを脱ワックス処理し、C y 5で標識された*B. bifidum* 16S rRNA 蛍光プローブ (配列番号5: *B b i f*、5'-CCACAATCACATGCGATCATG-3') と混成化した (D i n o t o e t a l. , 2006)。100 ngのプローブを含有する混成化緩衝液 (100 nM T r i s、pH7.2、0.9 M N a C l、0.1% S D S) で45℃加湿チャンバーで16時間混成化させた。スライドを予熱された (37℃) 混成化緩衝液100 mlで15分間洗浄し、予熱された (37℃) 洗浄溶液 (100 mM T r i s、pH7.2、0.9 M N a C l) 10 mlで15分間洗浄した後 (S m i t h e t a l. , 2011)、4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) でDNAを免疫染色した。スライドを水で洗浄してエアードライした後、蛍光顕微鏡 (I X 70, O l y m p u s, T o k y o, J a p a n) でイメージを得た。

【0132】

#### 5. 大腸炎のT細胞伝達モデル

以前に報告された方法 (A. I z c u e e t a l. , A n n u a l r e v i e w o f i m m u n o l o g y 27:313-338, 2009; F. P o w r i e e t a l. , I m m u n i t y 3:171-174, 1995) によってナイーブCD4+ T細胞の養子移入によって大腸炎を誘導した。*B. bifidum* P R I 1 (B b)、C S G G又はm o c k処理によって誘導されたi T r e g細胞 ( $2 \times 10^5$ ) と共に分類されたナイーブCD4+CD62L h i C D 4 4 l o F o x p 3 G F P-T細胞 (>99% p u r e,  $1 \times 10^6$ ) をR a g 1-/-マウスの静脈内に伝達した。大腸炎の進行は、一週間に2回体重を測定してモニタリングし、マウスの体重が初期体重の約25%になった時に実験終了を決定した。T r e g細胞を陽性対照群として、e x v i v oで分離されたCD4+ F o x p 3 G F P+T r e g細胞 ( $2 \times 10^5$ ) をナイーブT細胞と共にR a g 1-/-マウスに共同伝達した。実験終了時に大腸長さや組織学的評価を測定して大腸炎の重症度を決定した。T r e g細胞とサイトカインのレベルも分析した。

【0133】

#### 6. I n v i v o養子移入

分類されたナイーブポリクロナールCD4+CD62L h i C D 4 4 l o F o x p 3 G F P-T細胞 (>99.5% p u r e) ( $1 \times 10^6$ ) をG F C 5 7 B L/6マウスの静脈内に伝達し、単一菌株を経口投与した。養子移入3週後にマウスを犠牲した。食餌抗原に反応するT r e g細胞のT C R特異性を分析するために、O T-I I C D 4+CD62L h i C D 4 4 l o F o x p 3 G F P-T細胞から分離されたナイーブT細胞 ( $1 \times 10^6$ ) を養子移入前の2週間で*B. bifidum* P R I 1でモノコロニゼーションさせたG F C 5 7 B L/6マウスの静脈内に伝達し、7日間一日おきにO V A (20 mg/dose/mice) を移植した。共生バクテリアに反応するT r e g細胞のT C R特異性を分析するために、分類された (>99.5% p u r e) ナイーブC B i r C D 4+CD62L h i C D 4 4 l o F o x p 3 G F P-T細胞 ( $1 \times 10^6$ ) をS P F条件で維持されたC 5 7 B L/6マウスの静脈内に伝達し、実験終了時まで*B. bifidum* P R I 1 ( $5 \times 10^8$  c f u/dose) を週3回移植した。マウスは養子移入3週後に犠牲した。

【0134】

#### 7. D C依存試験管内i T r e g細胞の誘導

大腸L P D C s (M H C I I+CD11c+CD11b+CD103+F4/80-)、脾臓全D C s (t D C; M H C I I+CD11c+)、脾臓CD8α+ (M H C I I+CD11c+CD11b-) 及び脾臓CD8α- (M H C I I+CD11c+CD11b+) D C sを細胞分類又はCD11c磁性ビーズ (M i l t e n y i B i o t e c h) でそれぞれ精製した。分離されたD Cは10% F B S、5%ペニシリン/ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミン、1 mMピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、β-M Eを含む完全なR P M I 1 6 4 0培地で培養した。脾臓D C s ( $2 \times 10^4$ ) は96ウェルプレートに接種して2時間培養した後、表示されたバクテリア、*B. bifidum*

PRI1の分化細胞分画物又は*B. bifidum* PRI1の精製された多糖体と10～12時間培養した。細胞を洗浄し、準最適Treg誘導条件(0.1 µg/ml抗-CD3、100 U IL-2及び0.1 ng TGFβ)で3日間ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞(2×10<sup>5</sup>)と共培養した。サイトカイン又はTreg細胞のレベルはELISA及び流細胞分析法によってそれぞれ決定された。

【0135】

8. CSGG処理によるDC分化及びiTreg細胞誘導のためのヒトサンプル  
亜洲大学校病院臨床研究審議委員会(IRB)からこの研究の承認を受け(AJIRB-BMR-SMP-17-155)、Ficoll-Hypaque gradientを通じて健康な供与者から末梢血単核細胞(PBMCs)を得た(Lymphoprep, Nycomed, Norway)。CD14マイクロビーズキット(Miltenyi biotech)を用いて陽性選別によって単核球(monocyte)をPBMC(CD14<sup>+</sup>>95%)から分離した。5×10<sup>5</sup> monocyte/mlをrhIL-4(35 ng/ml)及びGM-CSF(70 ng/ml)(R&D Systems, UK)存在下に10%熱不活性化されたFCS及び抗生剤が補充されたRPMI-1640培地(2 mM L-グルタミン、25 mM HEPES; BioWhittaker)で7日間24-ウェルプレートで培養した。2日目及び5日目に、0.5 mlの培地をGM-CSF及びIL-4を含有する新しい培地に取り替えた。7日目に、未成熟DCを回収してmock又は個別量のCSGGで14時間前処理した。その後、ヒトPBMCから分離したナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞と準最適Treg誘導条件(0.1 µg/ml抗-CD3、100 U IL-2及び0.1 ng TGFβ)で3日間培養した。Treg細胞のレベルは流細胞分析法によって決定された。

【0136】

9. RNA-seqに対するデータ可用性  
全RNAは、mock又はCSGG(100 µg/ml)で4時間刺激した脾臓CD11c<sup>+</sup>DCsから抽出し、Ribospin TMI I(GeneAll biotechnology)で精製した。RNA定量及び品質管理はNanoDrop 2000™(Thermo Fisher Scientific)で行った。ライブラリー準備は、TruSeq Stranded mRNAサンプル準備キット(Illumina)で行い、RNAシーケンシングはNextSeq 500シーケンシングシステムで行った。RNA-seqデータは、登録番号GEO:RNA-seqデータ:GSE98947としてGene Expression Omnibus(NCBI)データ格納所に寄託した。

【0137】

10. RNA分離及び実時間定量RT-PCR  
TRIzol reagent(Invitrogen)を用いて大腸及びcLP DCから分離した全RNAをM-MLV逆転写酵素(Promega, Madison, WI, USA)を用いて逆転写させてcDNAを製造した。合成されたcDNAは、次のプライマーセット(表2)及びCHROMO4 Detector(Biorad)を用いて定量的実時間PCR(qRT-PCR)に適用した。

【0138】

10

20

30

40

50

【表 2】

| 配列番号 | プライマー                  | 配列(5' →3' )                    |
|------|------------------------|--------------------------------|
| 6    | HPRT (forward)         | TTA TGG ACA GGA CTG AAA GAC    |
| 7    | HPRT (reverse)         | GCT TTA ATG TAA TCC AGC AGG T  |
| 8    | IL-10 (forward)        | ATA ACT GCA CCC ACT TCC CA     |
| 9    | IL-10 (reverse)        | TCA TTT CCG ATA AGG CTT GG     |
| 10   | TGF- $\beta$ (forward) | CTC CCG TGG CTT CTA GTG C      |
| 11   | TGF- $\beta$ (reverse) | GCC TTA GTT TGG ACA GGA TCT G  |
| 12   | IL- $\beta$ (forward)  | CAA CCA ACA AGT GAT ATT CTC C  |
| 13   | IL- $\beta$ (reverse)  | TGC CGT CTT TCA TTA CAC AG     |
| 14   | Csf2 (forward)         | AGG GTC TAC GGG GCA ATT TC     |
| 15   | Csf2 (reverse)         | GGC AGT ATG TCT GGT AGT AGC TG |
| 16   | PD-L1 (forward)        | GCT CCA AAG GAC TTG TAC GTG    |
| 17   | PD-L1 (reverse)        | TGA TCT GAA GGG CAG CAT TTC    |
| 18   | IDO (forward)          | GCT TTG CTC TAC CAC ATC CAC    |
| 19   | IDO (reverse)          | CAG GCG CTG TAA CCT GTG T      |
| 20   | COX2 (forward)         | TGG CTG CAG AAT TGA AAG CCC T  |
| 21   | COX2 (reverse)         | AAA GGT GCT CGG CTT CCA GTA T  |
| 22   | CD80 (forward)         | ACC CCC AAC ATA ACT GAG TCT    |
| 23   | CD80 (reverse)         | TTC CAA CCA AGA GAA GCG AGG    |
| 24   | CD86 (forward)         | TGT TTC CGT GGA GAC GCA AG     |
| 25   | CD86 (reverse)         | CAG CTC ACT CAG GCT TAT GTT TT |
| 26   | CD40 (forward)         | CCT TGC ACT GTG AGG AGA        |
| 27   | CD40 (reverse)         | CTT CGC TTA CAA CGT GTG CT     |

10

20

## 【0139】

全てのqRT-PCRは、95℃で5分、95℃で30秒、62℃で30秒、72℃で30秒間40サイクルで同一条件下で行った。データは、HPRT発現レベルに値を標準化した。結果は、処理群間の各遺伝子に対する相対的な発現レベルとして記述された。

## 【0140】

## 11. リンパ球分離及び流細胞分析

ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞は、細胞分離器を用いてmLN、pLN及び脾臓から精製した（純度98%以上）。マウスの大腸及び小腸を縦方向にオープンして粘液をPBSで洗浄して除去した。大腸は小さい切片に切ってCa<sup>2+</sup>及びMg<sup>2+</sup>が含まれない10mM EDTA及び20mM Hepes、1mMピルビン酸ナトリウム、3% FBS及びPBSで37℃で20分間振盪培養した。組織は、かみそりで小さい切片にして、3% FBS、20mM Hepes、1mMピルビン酸ナトリウム及び0.5mg/mlのCollagenase D (Roche) 及びDNase I (Sigma) がそれぞれ含まれたRPMI 1640培地で37℃で45分間振盪培養した。酵素処理後、上澄液を100μg細胞濾過器を用いて10mM EDTAを含有する冷たいPBSで濾過させた。細胞をPercoll™ (GE Healthcare) 勾配（上端40%パーコール（percoll）、下端75%パーコール）上に置いて2000rpmで20分間ブレーキ無しで遠心分離した。40%及び75%層の間の細胞を取り、10% FBS (Hyclone)、Pen/Strep、β-ME、ピルビン酸ナトリウム、2.0mM L-グルタミンが含まれたRPMI培地 (Hyclone SH30027.01) で2回洗浄し、FACS染色に使用した。細胞懸濁液は、LIVE/DEAD fixable via

30

40

50

ble dye (eBiosciences) 又はPIを用いてPBSでLive/deadでまず染色した。次の1%FBS (Gibco) 及びEDTA (Sigma-Aldrich) を含有する緩衝液で追加染色をした。表面染色は、0.2%牛血清アルブミンを含有するPBSで20分間行った。細胞内転写因子染色のためには、細胞を固定/透過緩衝液 (Fixation/Permeabilization buffer) (eBioscience) 及び1倍の透過/洗浄緩衝液 (permeabilization/wash buffer) (eBioscience) で染色した。細胞内サイトカイン分析のためには、精製されたプロプリア層 (lamina propria) リンパ球をGolgiPlug (BD biosciences, 0.5 µL/sample) を用いて500 ng/mlイオノマイシン (Calbiochem) 及び100 ng/ml PMA (Calbiochem) で37℃で4~5時間細胞を再刺激した。細胞をIC固定バッファ (eBioscience) で固定し、透過/洗浄緩衝液 (eBioscience) で透過性を付与し、IL-10、IL-13、IFN-γ及びIL-17A抗体を用いて染色した。

#### 【0141】

次の抗体クローンを使用した。CD4 (RM4-5)、CD44 (IM7)、CD62L (MEL-14)、CD45.1 (A20)、CD45.2 (104)、CD90.1 (Thy1.1) (OX-7)、CD90.2 (Thy1.2) (30-H12)、CD103 (2E7)、Vα2 (B20.1)、Foxp3 (FJK-16s)、CTLA4 (UC10-4B9)、Nrpl (3E12)、Helios (22F6)、T-bet (4B10)、RORγt (AFKJS-9)、GATA-3 (16E10A23)、IL-10 (JES5-16E3)、IL-13 (eBio13A)、IFN-γ (XMG1.2)、IL-17A (17B7)、CD11c (N418)、CD11b (M1/70)、F4/80 (BM8)、MHCI (M5/114.15.2)。

#### 【0142】

流細胞分析分類のためには、死んだ細胞は排除し、個体群は次をゲートした。LP DCs (CD45+MHCI+CD11c+CD11b+CD103+F4/80-)、SP DCs (MHCI+CD11c+CD11b+CD8α+又はMHCI+CD11c+CD11b+CD8α-)、ナイーブCD4+T細胞 ((CD4+CD45.1+CD62LhiCD44loFoxp3GFP-))、ナイーブOT-II TCRトランスジェニックT細胞 (CD4+CD90.1+OT-II+CD62LhiCD44loFoxp3GFP-)、CBir TCRトランスジェニックナイーブT細胞 (CD4+CD45.1+CD62LhiCD44loFoxp3GFP-)。

#### 【0143】

MoFlo-XDP及び流細胞分析法を用いて行われた細胞分類は、5個のレーザーが装着されたLSR Fortessa流細胞分析器 (BD Biosciences) を用いて行った。データは、FACSDivaソフトウェア (BD Biosciences) 及びFlowJoソフトウェアを用いて分析した。

#### 【0144】

12. CDR3 高効率シーケンシング (high-throughput sequencing) を用いたTCRレパートリー分析

全RNAは、GFマウス又はB. bifidum PRI1で3週間モノコロニゼーションされたマウスの分類されたCD4+Foxp3GFP+Treg細胞から抽出した。死んだ細胞はISOGEN (Nippon Gene) によるFVD染色で除外させた。Repertoire Genesis Inc. の偏向されないTCRレパートリー分析技術を用いて次世代シーケンシングを行った。Adaptor-ligation PCRは、以前方法で行った (R. Yoshida et al., Immunogenetics 52:35-45, 2000)。Superscript III逆転写酵素 (Invitrogen) で最初の二本鎖cDNAを合成し、5'アダプターオリゴヌクレオチドとライゲーションした後、アダプター及びTCRα不変領域又はTCRβ不変領域に特異的

10

20

30

40

50

なプライマーを用いてPCR増幅した。TCR $\alpha$ 及びTCR $\beta$  cDNAの増幅後、Nextera XT索引キットv2 set A (Illumina)を用いて索引(バーコード)配列を追加した。シーケンシングはIllumina Miseq paired-endプラットフォーム(2×300bp)で行った。データ処理は、Repertoire Genesis社製のRepertoire Analysisソフトウェアを使用した。TCR配列は、国際ImmunoGenetics情報システム(IMG T)データベース(<http://www.imgt.org>)の参照配列の可能なデータセットを用いて割り当てた。点数の低い配列を除去した後、TCRレパートリー分析は、Repertoire Genesis社(Ibaraki, Japan)が開発した生物情報学ソフトウェアを使用した。シーケンス読取りは、他のシーケンス読取りと同一性がないので、固有シーケンス読取り(USR)と定義された。同一のUSRのコピー番号はRGソフトウェアによって自動で計算される。

10

【0145】

### 13. 体外でiTreg細胞生成に対するTGF- $\beta$ 中和の効果

脾臓MHCII+CD11c+DCs(2×10<sup>4</sup>)を2時間丸底96ウェルプレートに接種した後、*B. bifidum* PRI1又はCSGGと共に12時間培養した。細胞を洗浄し、0.1 $\mu$ g/mlの抗-CD3(BD Bioscience)、100U IL-2(Peprotech)及び0.1ng/mlのTGF- $\beta$ 存在又は15 $\mu$ g/ml抗-TGF- $\beta$ 抗体(R&D)の不在下にナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞(2×10<sup>5</sup>)と共培養した。培養3日後、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T細胞の個体群を流細胞分析した。

20

【0146】

### 14. 試験管内抑制分析

試験管内生成されたCD45.1+CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>GFP iTreg細胞を分類し、37℃で10分間パルス処理した反応細胞(Thy1.1+CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>)と共に培養した。CTVで標識された細胞はPBSで2回洗浄し、直ちに使用した。T細胞の除去された脾臓細胞(1×10<sup>5</sup>)とCTV-パルス処理された反応細胞(5×10<sup>4</sup>)及び指示された量のiTreg細胞を0.5 $\mu$ g/mlの抗-CD3と共に丸底96ウェルプレートで混合した。細胞を4日間培養し、それらの増殖をCTV強度の希釈を決定するための流細胞分析で分析した。抑制率(%)は反応細胞の百分率だけを比較して分裂細胞の総百分率で計算した。

30

【0147】

### 15. 組織学

実験大腸炎の臨床的状態は、H&E染色を用いた組織学的分析で評価した。大腸を収集し、10%ホルムアルデヒドで固定させた。固定後、組織をパラフィンブロックに埋め込み、3 $\mu$ m厚に切断した後、ヘマトキシリン(Sigma-Aldrich)及びエオシン(Sigma-Aldrich)で染色した。

【0148】

### 16. 統計分析

統計分析は、GraphPad Prismソフトウェア(La Jolla, CA)を用いて行い、対照群と実験群との差異は、Unpaired-Student's t-testを用いて評価した。データは、平均±SEMで表した。Treg細胞及び実験的大腸炎の生体内安定成分分析のために、ボンフェローニ(Bonferroni)の多重比較検査で両方向分散分析を用いて統計分析を行った。P<0.05は有意のものと見なされた。

40

【0149】

### 実施例1: Treg誘導バクテリアスクリーニング

免疫調節微生物によって生体内Treg細胞が強化されると、炎症性障害関連微生物不調和(dysbiosis)を調節することができる。安全性の保障された微生物のうち、Treg誘導バクテリアを同定するために、以前に報告されたex vivoスクリーニングシステム(Kwon et al, PNAS 107:2159-2164, 2010, Kim JE, J Funct Foods. 350-362, 2015)を用いて200

50

余種以上のプロバイオティックス菌株をスクリーニングした。

【0150】

それぞれのバクテリア菌株は、抗生剤（Gentamycin(R)）の存在下でFoxp3レポーターマウスのmLNs（mesenteric lymph node）細胞と共培養した。Foxp3、IL-10及びIL-12のレベルを測定して、IL-10/IL-12比が>100であり、Foxp3発現を10%以上増加させる菌株を選別した。

【0151】

その結果、Foxp3+Treg誘導バクテリアの最適候補としてBifidobacterium bifidum PRI1（B. bifidum; Bb）を選択し（図2A及び図2B）、Lactobacillus paracasei sub. tolerans 467（L. paracasei; Lpa）を、免疫反応を誘導しない対照群菌株として選択した。選択されたBifidobacterium bifidum PRI1は2017年5月19日に韓国生命工学研究院生物資源センターに寄託された（受託番号：KCTC13270BP）。

【0152】

実施例2：B. bifidumによるTreg細胞誘導

B. bifidumが生体内Treg細胞を誘導できるかを調べた。

【0153】

SFB（Segmented filamentous bacteria）は、Th17-誘導対照群バクテリアを使用した。B. bifidum（Bb）を無菌（germ free; GF）マウスに1回投与したとき、大腸に安定してコロニゼーションされ（図2C）、拡大された盲腸サイズは正常SPFマウスと類似のサイズに正常化させた（図2D）。これはBbの繊維質消化活性を意味する。また、ブチレート及びアセテートのような短鎖脂肪酸（short chain fatty acids; SCFAs）は食物繊維発酵の最終産物であるので、Bbがコロニゼーションされたマウスは、盲腸及び大便においてプロピオーネレベルは変わらず、アセレートとブチレートレベルが有意に増加した（図2E）。

【0154】

L. paracasei（Lpa）又はSPFとは違い、B. bifidum（Bb）で3週コロニゼーションされたGFマウスは、結腸プロプリア層（cLP）においてFoxp3+Treg細胞の頻度を劇的に増加させた（図1A及び図2F）。のみならず、腸間膜リンパ節（mesenteric lymph nodes; MLN）、脾臓及び小腸のプロプリア層（sILP）及び末梢リンパ節（peripheral lymph nodes; LN）のような他の器官でもTreg細胞がやや増加した（図3A）。B. bifidumがコロニゼーションされたGFマウス（Bb）の結腸プロプリア層（cLP）においてTreg細胞はCD103+及びメモリー表現型（CD62L<sup>lo</sup>CD44<sup>hi</sup>）が非常に高い比率を表し（図3B及び図3C）、CTLA4及びIL-10も高いレベルの発現を示した（図1B及び図1C）。

【0155】

実施例3：Bbによって新しく生成されたiTreg

Treg細胞は、起源によって胸腺由来Treg（tTreg）又は末梢誘導されたTreg（pTreg又はiTreg）にさらに分化できるので、Treg細胞においてHelios及びNrpl発現を分析してTreg起源を追跡した。

【0156】

Helios+Npr1+胸腺由来Treg（tTreg）とHelios-Npr1-末梢由来Treg（pTreg）細胞（試験管内培養条件下で生成された場合“iTreg”と呼ばれる。）を区別するためにIKAROS系転写因子Helios及びNeuropilin（Nrpl）の発現を観察した（J. M. Weiss et al., The Journal of experimental medicine 209:1723-1742, 2012; E. M. Shevach et al., Immunologica

10

20

30

40

50

l reviews 259:88-102, 2014; J. P. Edwards et al., The Journal of Immunology 193:2843-2849, 2014)。

【0157】

その結果、*B. bifidum*がコロニゼーションされたcLPではNrp1<sup>+</sup>tTreg細胞がやや増加したが、全ての器官においてNrp1<sup>-</sup>及びHelios<sup>+</sup>LoP<sup>+</sup>Treg細胞がはるかに増加した(図1D~図1F及び図4A~図4C)。また、新しく生成されたpTreg細胞の相当な部分が転写因子ROR $\gamma$ tを発現し(図1G及び図4D)、これは微生物との相互作用によって上向き調節される(*B. Yang et al., Mucosal immunology* 9:444-457, 2016; *E. Sefik et al., Science* 349:993-997, 2015)。

10

【0158】

次に、*Bb*のコロニゼーションによって誘導されたTreg細胞の増加は、既に存在するTreg細胞の拡張ではなく、末梢組織のナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞から新しく生成されたことを確認するために、養子移入実験をした。*B. bifidum*によって誘導されたTreg細胞の末梢起源を、Foxp3<sup>+</sup>GFPマウスから分類されたallelically-markedナイーブCD4<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>hiCD44<sup>lo</sup>T細胞を、*B. bifidum*でモノコロニゼーションされたGFマウスに養子移入して確認した(図5A)。

【0159】

3週後、供与体細胞分析の結果、*B. bifidum*でコロニゼーションされたGFマウスの腸(cLP)において供与体細胞のうちFoxp3<sup>+</sup>Treg細胞の相当部分が現れた(図4A~図4D)。*B. bifidum*3週投与SPFマウスにおいてpTreg細胞の誘導が類似に増加した(図5E)。このような結果は、*B. bifidum*の投与が主に結腸のナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞からiTregを新しく生成できることを表す。

20

【0160】

実施例4：pTreg細胞のTCR特異性を分析

*B. bifidum*の存在下で生成されたpTreg細胞のTCR特異性を分析した。*B. bifidum*のコロニゼーションが食餌抗原にpTreg細胞を促進するかどうか、すなわち、*B. bifidum*のコロニゼーションが食餌抗原反応性iTreg細胞の生成を増加させ得るかどうかをテストした。OVA特異TCR-形質転換OT-IIマウスのCTV標識されたナイーブCD4<sup>+</sup>Thy1.1<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>T細胞をGFマウスに養子移入した後、マウスを*Bb*でコロニゼーションするか、コロニゼーションしないで放置した後、経口OVAタンパク質を供給した。すなわち、OT-II.Thy1.1<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>GFPマウスのCTV-標識されたOVA-特異的ナイーブCD4<sup>+</sup>細胞を、OVAタンパク質を投与した正常又は*B. bifidum*コロニゼーションGFマウスに養子移入した(図7A)。

30

【0161】

その結果、前に観察されたように(*K. S. Kim et al., Science* 351:858-863, 2016)、正常GF宿主において拡張されたOT-II細胞の小さな分画は、sILP及びcLPにおいてFoxp3を上向き調節した(図6A及び図6B)。すなわち、GF-OVA食餌マウスと比較して、*Bb*コロニゼーションマウスは主にcLPにおいてThy1.1<sup>+</sup>OT-II特異Foxp3<sup>+</sup>Treg細胞及び宿主由来Treg細胞の有意の増加を示した。特に、ビフィダムコロニゼーションGFマウスにおいて供与体OT-II細胞によるFoxp3の上向き調節の効率はcLPでは2~3倍増加したが、sILPとmLNでは変わらなかった(図6B)。

40

【0162】

実施例5：マイクロビオタに特異的なpTreg細胞の生成

*B. bifidum*のコロニゼーションがマイクロビオタに特異的なpTreg細胞の生成を促進するか否かを決定するために、バクテリアフラジェリン(flagellin)

50

を認識するCBir TCR遺伝子変形マウスを使用した(Y. Cong et al., The Journal of Immunology 165:2173-2182, 2000)。ナイーブCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>T細胞は、CBir遺伝子変形マウスからCD45.1<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>GFP背景で分類してSPF Rag1<sup>-/-</sup>授与体に養子移入した後、mock (PBS) 又はB. bifidumを5週間一日おきに供給した(図7B)。

#### 【0163】

その結果、CBir T細胞の対照群SPF Rag1<sup>-/-</sup>受容体マウスだけが漸進的な体重減少を示し(図6C)、Treg細胞はほとんどなく(図6F) CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>-</sup>及びROR $\gamma$ <sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup>T細胞の比率は高く(図6G及び図7C)、厚い粘膜の(図6E)大腸は長さが減少する(図6D)などの大腸炎の顕著な徴候を示した。病理学のこのような様々な徴候は、B. bifidum投与と共にCBir T細胞を注射した宿主ではほとんど現れなかった。(図6C~図6G及び図7C)。

#### 【0164】

実施例6: iTreg細胞のB. bifidum自体に対する特異性

B. bifidumによって誘導されたpTreg細胞がB. bifidum自体に対する特異性を有するか否かを試験するために、B. bifidumがコロニゼーションされたGFマウスの全大腸CD4<sup>+</sup>T細胞を、正常GFマウス、B. bifidum又はL. paracaseiがコロニゼーションされたGFマウスの排泄物抗原で前処理した脾臓APCと共培養した後、3日後にそれら細胞のT細胞増殖(CTV希釈)を分析した(図7D)。

#### 【0165】

その結果、大部分のTreg細胞が試験管内培養条件で死んだが、B. bifidumがコロニゼーションされたGFマウスのFoxp3<sup>+</sup>Treg細胞は、B. bifidum抗原処理されたAPCで刺激すればFoxp3発現及び増殖が持続した(図6H及び図7E)。

#### 【0166】

また、GFとB. bifidumモノコロニゼーションマウス間のTCR特異性を、大腸、mLN及び脾臓から分類されたFoxp3<sup>+</sup>Treg細胞の $\alpha$ -及び $\beta$ -鎖のシーケンシングで比較した。

#### 【0167】

その結果、両Treg細胞が $\alpha$ -及び $\beta$ -鎖において類似のパターンの多様性を示したが(図8A)、B. bifidumコロニゼーションマウスの大腸Treg細胞はGF対照群に存在しない別個のTCRパターンを示した(図6I及び図8A~図8D)。総合的に、このような結果は、B. bifidumが食餌抗原及び/又は共生微生物及びB. bifidum自体に対する広範囲なTCR特異性を有する機能的に活性のCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg細胞を誘導するというを示す。

#### 【0168】

実施例7: B. bifidumコロニゼーションによるrDCs誘導及び新しいpTreg分化の増進

B. bifidumによるコロニゼーションが調節樹状細胞(rDCs)の集団を誘導するかどうかが調べたが、これは、新しいpTreg分化を向上させることができる。

#### 【0169】

ナイーブT細胞をiTreg細胞に分化させるためには免疫調節サイトカイン環境が必要なので、B. bifidumのコロニゼーションが欠腸内免疫寛容環境を誘導するかを試験した。GFマウスと比較して、Bbがコロニゼーションされたマウスから分離されたcLP-DCs(MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup>)及び結腸全細胞はIL10、Csrf2、Tgfb $\beta$ 1、Ido、Ptgs2、Pdccl1だけでなく、共同刺激分子であるCd86及びCd40のような抑制分子のmRNA発現を顕著に増加させた(図10A~図10D)。これは、BbのコロニゼーションがiTreg細胞

10

20

30

40

50

胞の分化を促進させる調節樹状細胞 (rDCs) を誘導できることを示す。

【0170】

また、*B. bifidum*と共に分類されたcLP-DCを10～12時間培養した後洗浄し、準最適のTreg誘導条件で3日間ナイーブCD4+Foxp3-T細胞と共同培養して生体内模倣実験を行った。*B. bifidum*でcLP-DCを前処理した結果、mock又は*L. paracasei* (Lpa) 処理対照群に比べてiTreg細胞及びIL-10生産の誘導及び増殖が濃度依存的に増加した(図10E～図10G)。

【0171】

実施例8：*B. bifidum*の作用分子の確認

8-1：*B. bifidum*の作用分子

試験管内システムを用いて、iTreg分化を促進する*B. bifidum*由来の作用分子を確認するために広範囲な実験を行った。*B. bifidum*は嫌気性であり、DCとの共培養中に殆ど死んだので、Bbの細胞構成要素の一部がiTreg誘導活性の作用分子であるかどうかをテストした。

【0172】

その結果、細胞壁、細胞膜及びサイトゾルの分画物のうち細胞表面抽出物だけが効果的にTreg細胞を誘導した。細胞表面抽出物にRNase、DNase、Pronase又は高温で沸かす処理はTreg誘導活性を減少させておらず、これは、多糖体がエフェクター分子であることを暗示する。実際に、全細胞表面多糖類 (total cell surface polysaccharides; tCSPS) はTreg細胞を濃度依存的に誘導した(図11A～図11B)。

【0173】

tCSPSはイオン排除クロマトグラフィーによって分離され、低いイオン強度で溶出された分画をin-depth NMRで分析した。

【0174】

その結果、*B. bifidum*の細胞表面多糖体は少なくとも5種からなっていた(図11C)；ベータ-1-6-グルカン(18%)、ベータ-1-4-ガラクトン(5%)、ベータ-1-6-ガラクトン(5%)、ベータ-ガラクトフラナン(2%)及びphosphoglycerol- $\beta$ -galactofuran (PG $\beta$ G)(64%)がそれぞれ異なる量(mol/mol)で示された。PG $\beta$ G多糖体は全多糖体の中で最も豊富な多糖体(64%)であり、平均8000Daであって、陰電荷を帯び、残り4つの中性多糖体( $\beta$ -1-6-グルカン、 $\beta$ -1-4-ガラクトン、 $\beta$ -1-6-ガラクトン及び $\beta$ -ガラクトフラナン)は、類似の分子量(平均 $\sim$ 4000Da)であって、これらは個別にそれ以上分離されない。

【0175】

その後、中性の混合多糖体又はPG $\beta$ Gの多糖体のどれが試験管内でTreg細胞を誘導する活性を有するかを試験した。その結果、陰電荷を帯びる多糖体(PG $\beta$ G)以外の中性多糖体だけがTreg細胞を誘導した(図11D)。

【0176】

このことから、*B. bifidum*由来中性多糖体混合物を“Cell Surface beta-Glucan/Galactan (CSGG)”と命名した。

【0177】

8-2：CSGGのTreg誘導の確認

CSGG多糖類のうち $\beta$ -1, 6-グルカナーゼを処理すれば、濃度依存的にCSGG誘導されたiTreg細胞レベルが減少するので、細胞表面 $\beta$ -1-6-グルカン(CS $\beta$ G)が核心作用分子であり得る(図9A、図9B、及び図11E)。さらに、DCのない状態でCSGGとナイーブCD4+T細胞の共培養がiTreg細胞を誘導するのに失敗したため、CSGGはDC依存性によってTreg細胞を誘導するものと考えられる(図11F)。

【0178】

10

20

30

40

50

次に、CSGGが*in vitro*及び*in vivo*でTreg細胞を誘導する全バクテリアの能力を再現できるか否かをテストした。CSGG処理されたDCsは、*B. bifidum*で処理されたDCをFoxp3<sup>+</sup> iTreg細胞を投与量にしたがって効果的に誘導した（図12A）。CSGG（100μg／容量）を3週間3回GFマウスに腹腔注射した結果、cLP及びmLNにおいて*B. bifidum*がコロニゼーションされたマウスと類似のレベルでCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>及びNrpl-Roryt<sup>+</sup> Treg細胞が誘導された（図9C及び図12B～図12C）。このTreg細胞は対照群GFマウスのTreg細胞に比べてCD103<sup>+</sup>及び活性化された表現型CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>Foxp3<sup>+</sup>の比率がより高かった（図12D）。さらに、健康な供与者のPBMC由来のヒトDCs及びナイーブCD4T細胞とCSGGの共培養は濃度依存的にCD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg細胞を誘導した（図9D）。

【0179】

#### 8-3：CSGG合成遺伝子相同性とTreg誘導活性

乳酸菌の項アレルギー効果は菌株によって異なり、Th1／Th2サイトカイン発現及び均衡によって影響を受けると知られたように（Fujiwara D et al., Int Arch Allergy Immun. 135 (3): 205-215, 2004）、プロバイオティックバクテリアの機能的活性は種特異的ではなく菌株特異的であるため、全ての*B. bifidum*の菌株がiTreg細胞を誘導する機能をするか、或いは本発明の*B. bifidum* PRI1菌株と高い塩基相同性を持つ菌株だけがiTreg誘導活性を有するかを試験した。本発明の*B. bifidum* PRI1菌株（GenBank accession number; CP018757）の全ゲノムシーケンシングを行い、予想されるCSGG合成に関連したオーソログ遺伝子と他の*B. bifidum*のゲノムとの塩基相同性及びTreg誘導活性を比較した。

【0180】

その結果、本発明の*B. bifidum* PRI1は、他の*B. bifidum*菌株と高い相同性を示した。特に、A8菌株（Lopez P et al., PLOS ONE, 6 (9): e24776, 2011）は、本発明の*B. bifidum* PRI1菌株と類似の活性を有するが、CSGG合成に関連したいくつかのオーソログ遺伝子が不足しており、Treg誘導活性がはるかに少なかった。

【0181】

#### 実施例9：CSGGによるrDC生成のメカニズム

CSGG処理が、*B. bifidum*がコロニゼーションされたマウスのcLP-DCから観察されたとおり、一般DCの表現型を調節DCs（rDCs）への変形を誘導するかを試験した。すなわち、CSGGによるrDC生成の根本的なメカニズムを明らかにするために、CSGGで4時間処理したCD11c<sup>+</sup> DCsのRNA-seq分析を行った。

【0182】

その結果、mock対照群処理と比較して、CSGG処理はmRNA及びタンパク質においてIfna2、Pdccl1、Tgfb1、Csrf2、Ptgs2、il10及びil27のようなrDC関連マーカーのレベルを有意に向上させた（図9E及び図13A）。

【0183】

また、CSGG処理はIL-10及びTGF-βのタンパク質レベルを顕著に増加させるが、IFN-γのレベルは減少させる。IL-10と比較して、抗-TGFβ中和抗体の添加は、*B. bifidum*又はCSGG処理によって誘導されたiTreg生成をほぼ完全に遮断できるので、TGF-βが中枢的な役割を担うといえる（図13B及び図13C）。CSGG処理はTLR2発現を選択的に増加させ（図13D）、TLR2-／-又はMyd88-／- DCsはCSGG-媒介iTreg誘導において有意の減少を示したので（図9F、図9G、及び図13E）、DCの様々なパターン認識受容体のうちTLR2及びMyd88は、CSGG認識及び信号伝達に関与する主要分子であり得る。TLR2除去DCは培養物においてTGFβ1及びIL-10の減少を誘導したが（図9G）、IFNγレベルは変化がなかった（図13F）。C型レクチン受容体（CLR）はCS

10

20

30

40

50

GG媒介iTreg細胞生成に関与しなくて済む（図13G及び図13H）。

【0184】

実施例10：CSGGで誘導されたTreg細胞の機能

in vitro及びin vivoでCSGGで誘導されたTreg細胞の機能を調べた。

【0185】

iTreg細胞はしばしば炎症状態で機能的でないか不安定であり、このため、CSGG処理によって誘導されて試験管内で生成されたiTreg細胞の免疫抑制活性を試験した。CD45.1+CD4+Foxp3<sup>-</sup>ナイーブT細胞は、mock又はCSGG処理したDCsと2日間培養した後、細胞を分類してCD45.1+CD4+Foxp3<sup>+</sup>iTregsを精製した。CTVで標識された反応者CD45.2+CD4+Foxp3<sup>-</sup>T細胞をCD45.1+Treg細胞と異なる割合で共培養した後、増殖をFACSで分析した。

【0186】

その結果、試験管内条件において、CSGG処理されたDCの存在下に生成されて分類されたiTreg細胞は、mock処理されたDCで培養された細胞に比べて顕著に向上した免疫抑制能を示した（図15A）。

【0187】

生体内でTreg細胞の抑制活性を試験するために、大腸炎のT細胞伝達モデルを使用した。ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞は、分類されたallelically<sup>-</sup>表示された（CD45.1<sup>+</sup>）iTreg細胞と共に又は単独でRag1<sup>-/-</sup>リンパ球減少症マウスに伝達した（図14A）。

【0188】

その結果、mock誘導されたiTregの共同注入は効果がなく、大腸炎の徴候を抑制できなかった。ナイーブT細胞単独投与した授与マウスも3週で大腸炎及び体重減少の深刻な徴候を示した。しかし、対照的に、B.bifidum又はCSGGによって誘導されたiTreg細胞の伝達は、大腸炎発達及び体重減少を有意に減少させた（図14A～図14D及び図15B）。

【0189】

実施例11：CSGG投与による大腸炎発達の抑制

CSGG自体の投与が大腸炎発達を抑制できるかどうかを調べるために、CD45.1+Foxp3<sup>+</sup>GFPMausから分類されたナイーブCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>T細胞をSPFRag1<sup>-/-</sup>宿主マウスに養子移入した後、実験終了時まで1週に3回PBS又はCSGG（100µg/dose）を腹腔内投与した。

【0190】

その結果、ナイーブT細胞を伝達した後にPBS処理した授与マウスは深刻な大腸炎が発生したが、CSGG投与マウスは、体重減少及び組織病理学的に分析した大腸炎進行が有意に減少した（図14E～図14G及び図15C）。CSGG処理の保護効果は、全Foxp3<sup>+</sup>Treg細胞の増加及びIFN-γ生成作用T細胞の頻度減少と関連している（図14H及び図15C）。この結果は、CSGG処理によって誘導されるCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg細胞が炎症性大腸炎の進行を抑制できることを示唆する。

【受託番号】

【0191】

寄託機関名：韓国生命工学研究院

受託番号：KCTC13270BP

受託日：20170519

【産業上の利用可能性】

【0192】

本発明の多糖体、例えば、ベータグルカン／ガラクトタン多糖体（cell surface beta glucan/galactan polysaccharide; CSGG）及びこれを生成するBifidobacterium bifidum PRI1（KCT

10

20

30

40

50

C 1 3 2 7 0 B P) が様々な抗原によってT r e g細胞を誘導できるので、前記菌株、前記C S G G多糖体又は前記誘導されたT r e g細胞は免疫疾患又は炎症性疾患予防又は治療に有用である。

【 0 1 9 3 】

以上では本発明内容の特定な部分を詳細に述べたが、当業界における通常の知識を有する者にとって、このような具体的技術は単に好ましい実施様態であり、これによって本発明の範囲が制限されることはない点が明らかであろう。したがって、本発明の実質的な範囲は添付の請求項とそれらの等価物によって定義されるべきである。

10

20

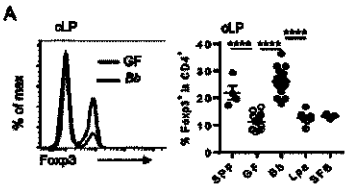
30

40

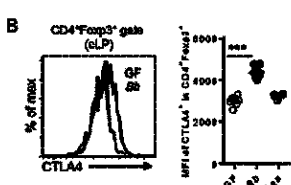
50

【図面】

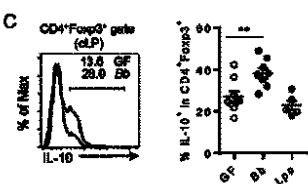
【図 1 A】



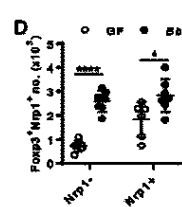
【図 1 B】



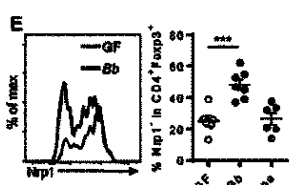
【図 1 C】



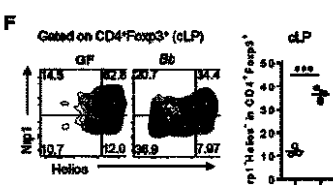
【図 1 D】



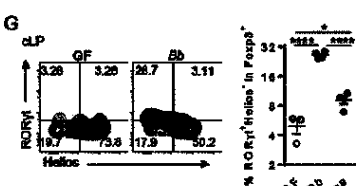
【図 1 E】



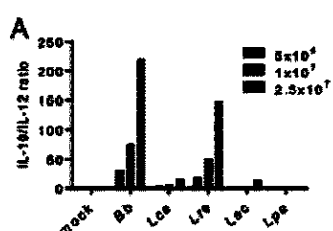
【図 1 F】



【図 1 G】



【図 2 A】



10

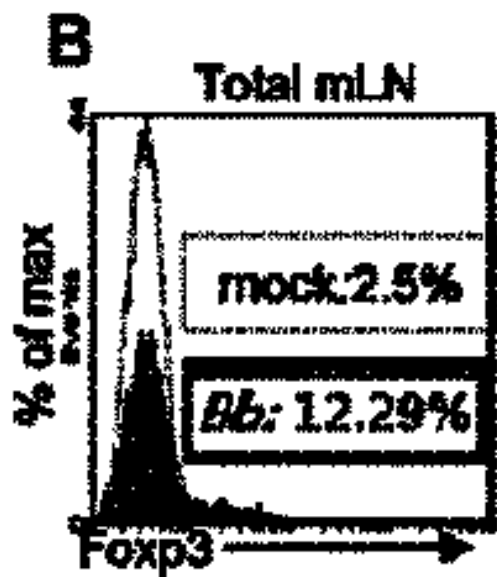
20

30

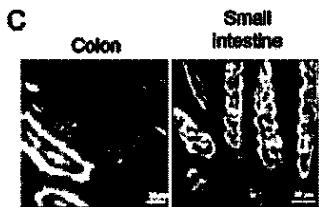
40

50

【 図 2 B 】

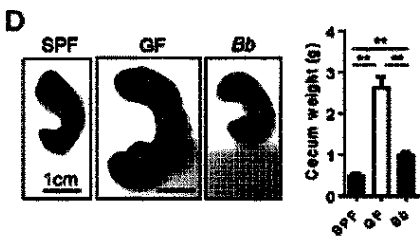


【 図 2 C 】

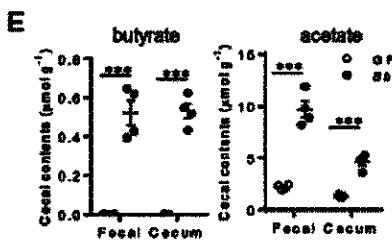


10

【 図 2 D 】



【 図 2 E 】



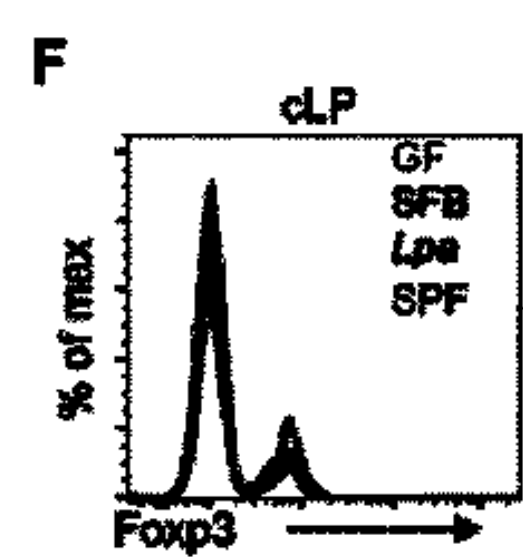
20

30

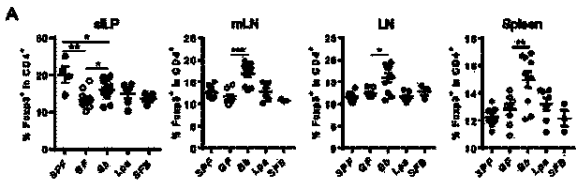
40

50

【 図 2 F 】

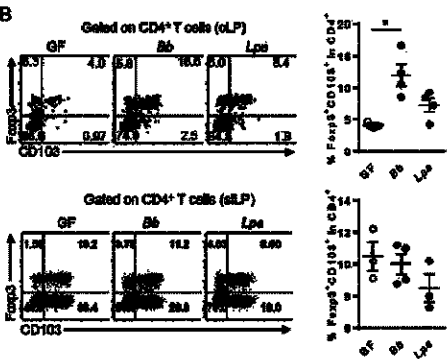


【 図 3 A 】

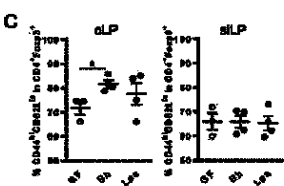


10

【 図 3 B 】



【 図 3 C 】



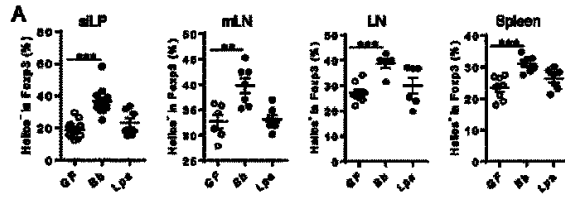
20

30

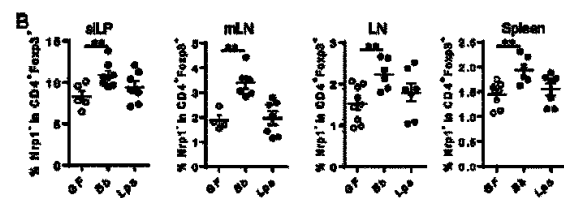
40

50

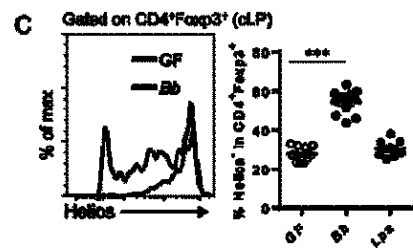
【図 4 A】



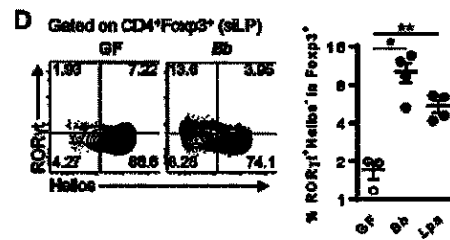
【図 4 B】



【図 4 C】

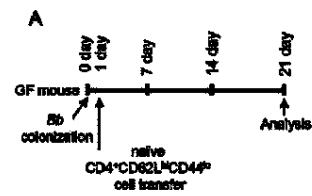


【図 4 D】

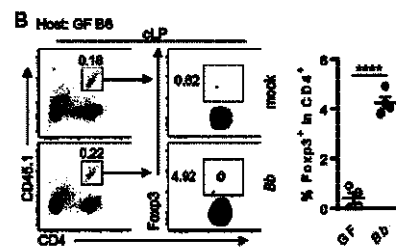


10

【図 5 A】

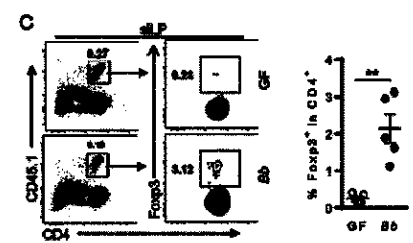


【図 5 B】

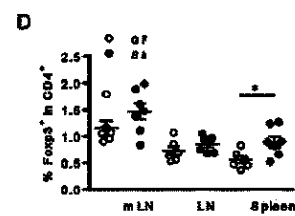


20

【図 5 C】



【図 5 D】



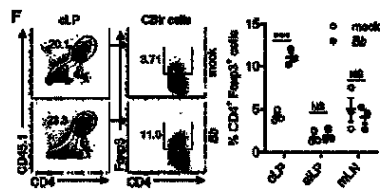
30

40

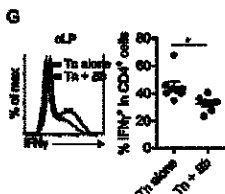
50



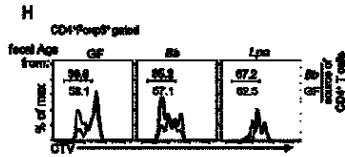
【図 6 F】



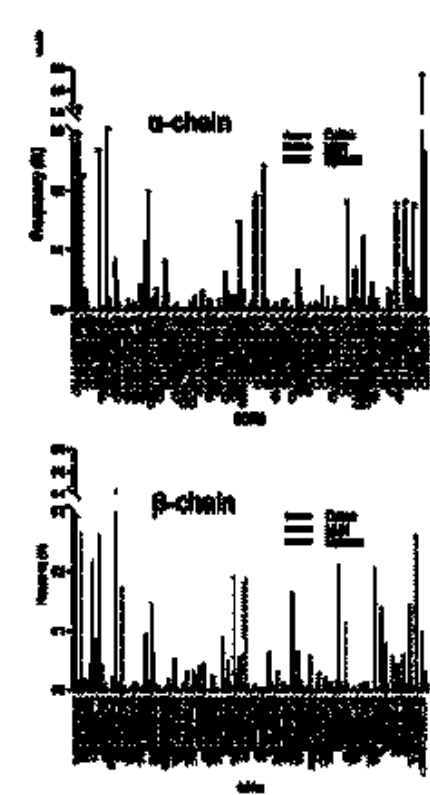
【図 6 G】



【図 6 H】



【図 6 I】



10

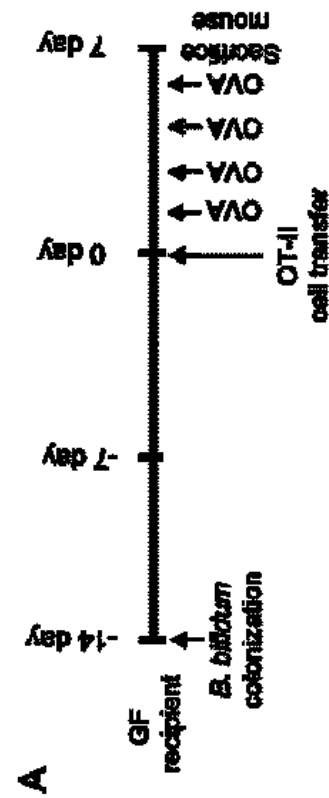
20

30

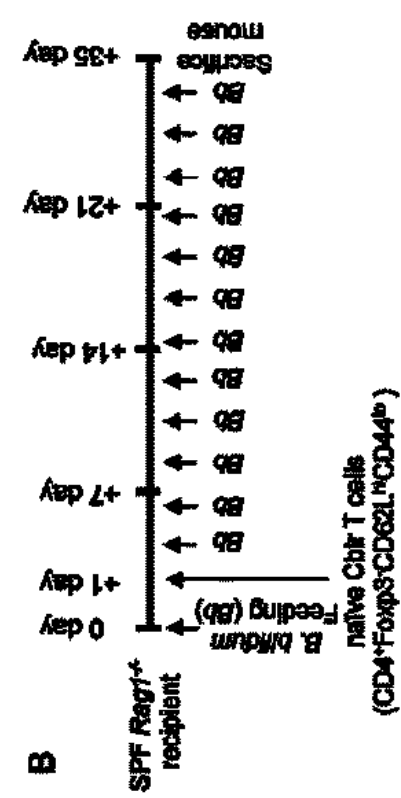
40

50

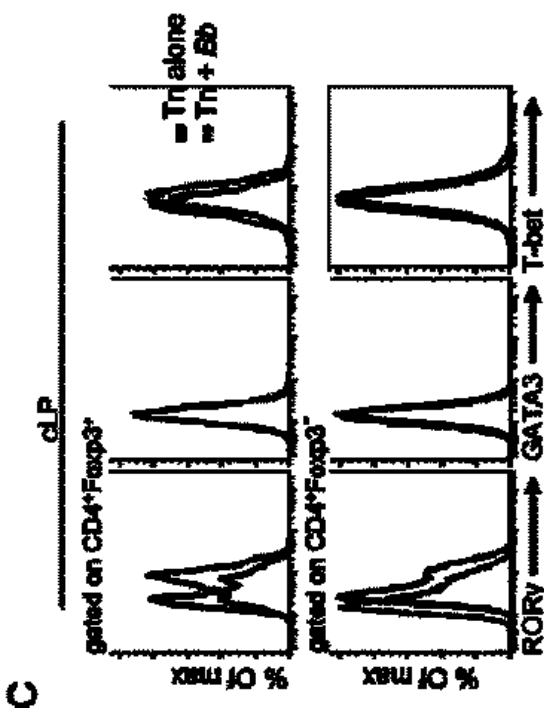
【図 7 A】



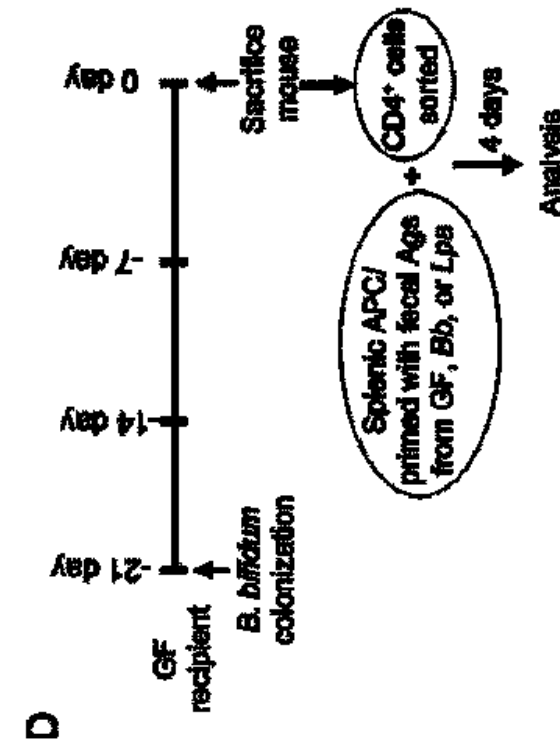
【図 7 B】



【図 7 C】



【図 7 D】



10

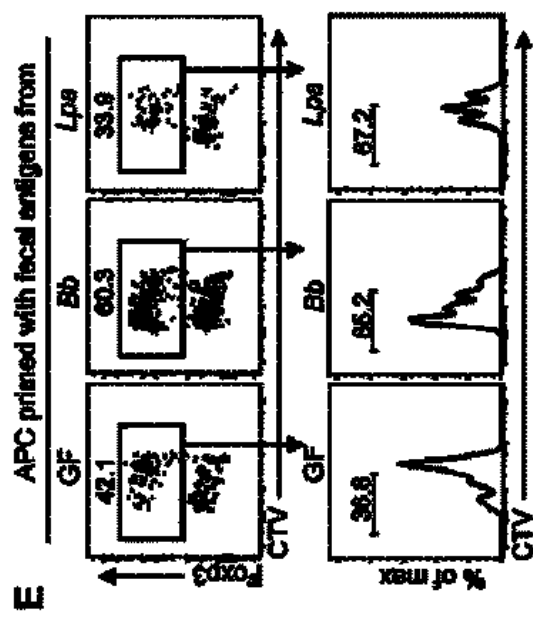
20

30

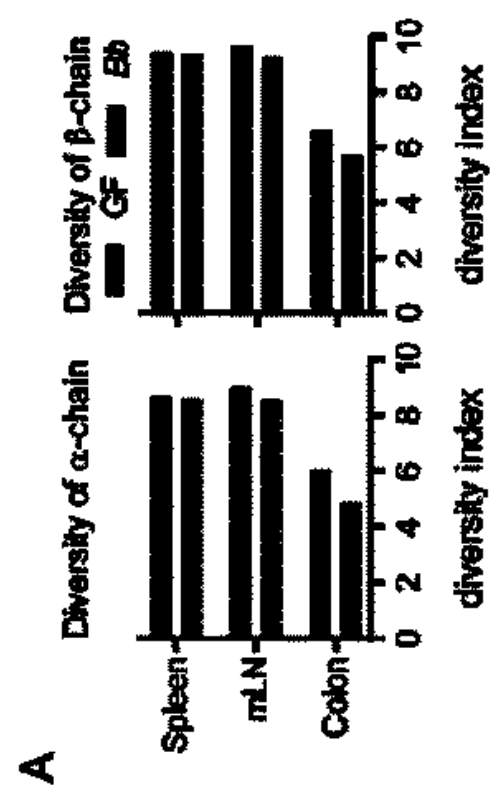
40

50

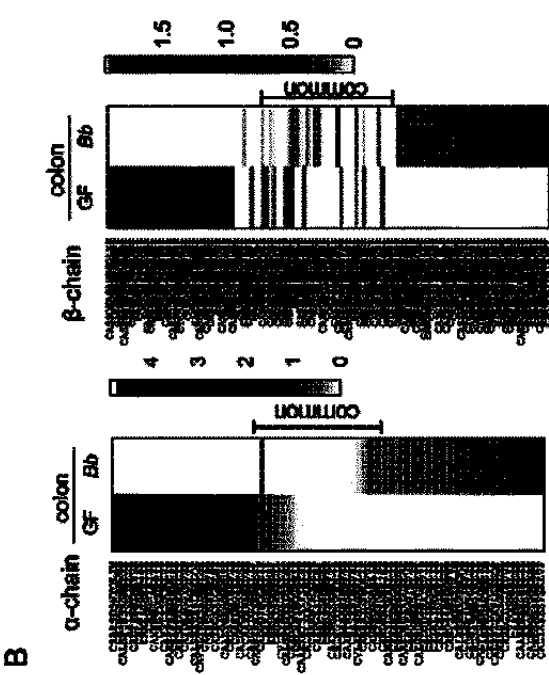
【図 7 E】



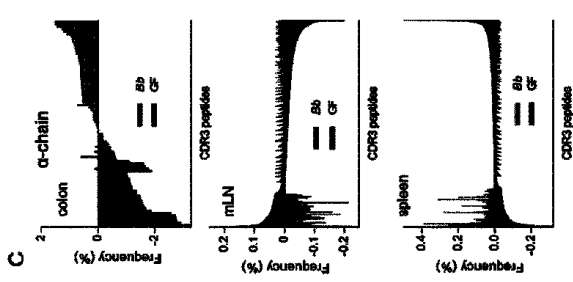
【図 8 A】



【図 8 B】



【図 8 C】



10

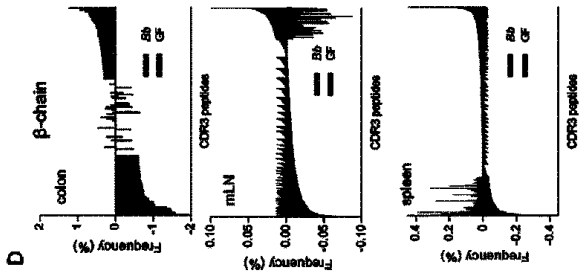
20

30

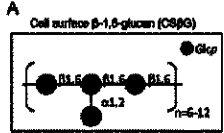
40

50

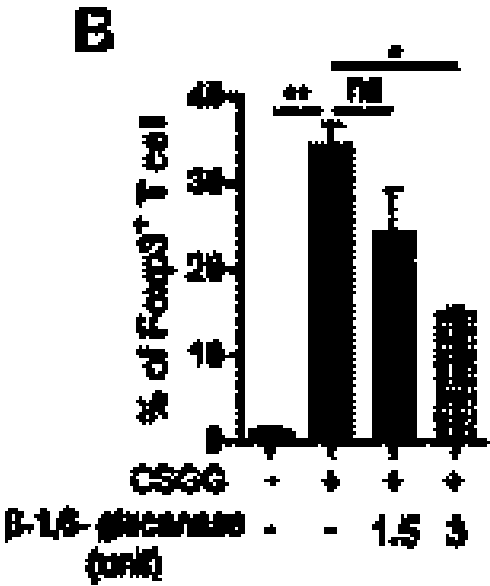
【図 8 D】



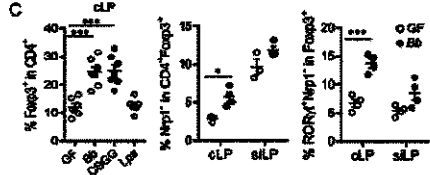
【図 9 A】



【図 9 B】



【図 9 C】



10

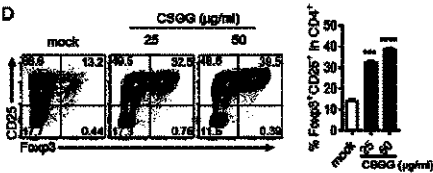
20

30

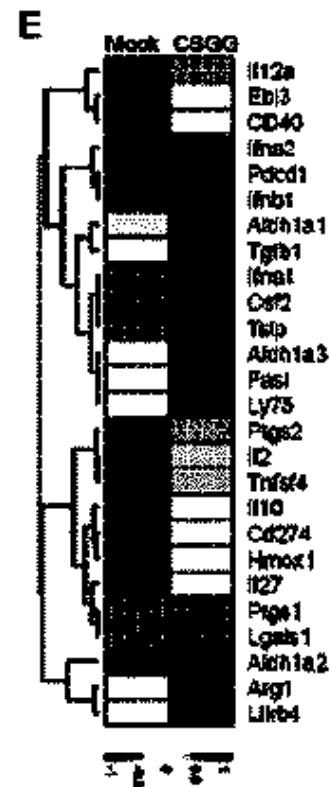
40

50

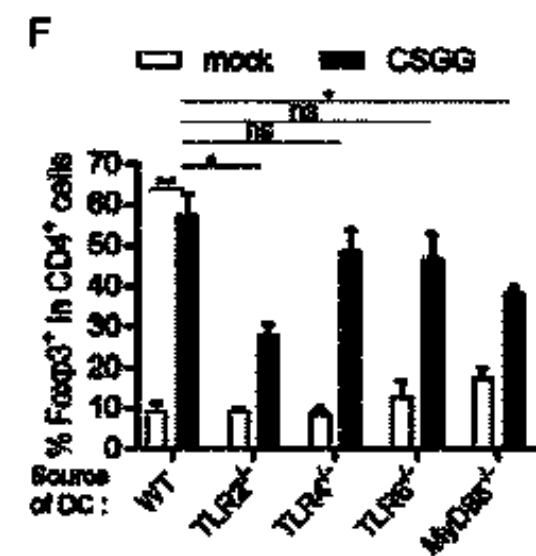
【図 9 D】



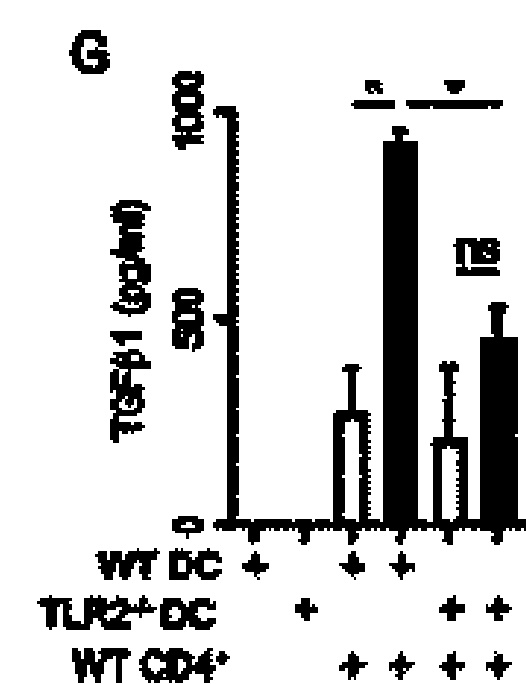
【図 9 E】



【図 9 F】



【図 9 G】



10

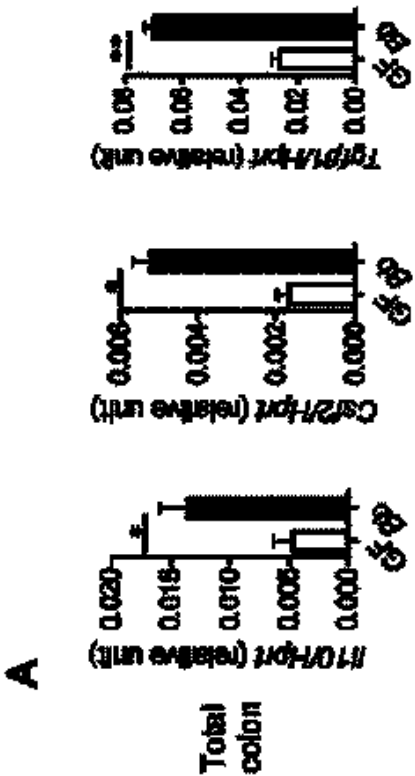
20

30

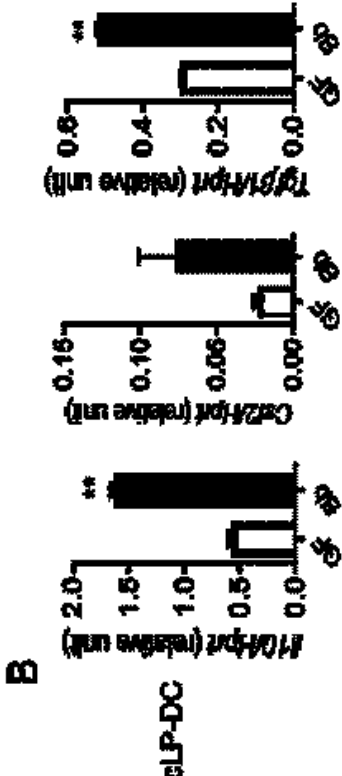
40

50

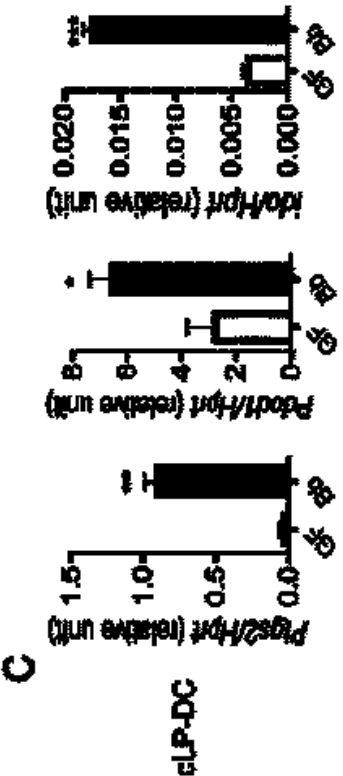
【図 10 A】



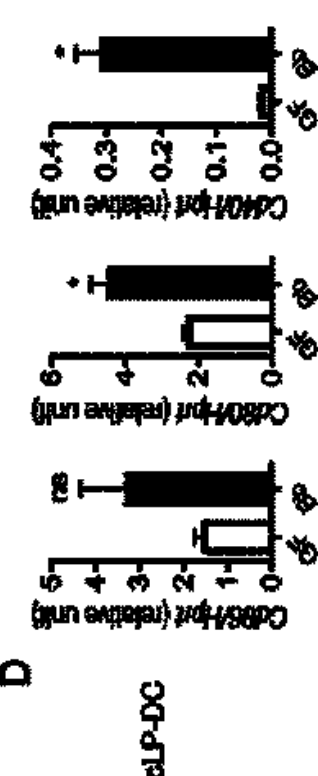
【図 10 B】



【図 10 C】



【図 10 D】



10

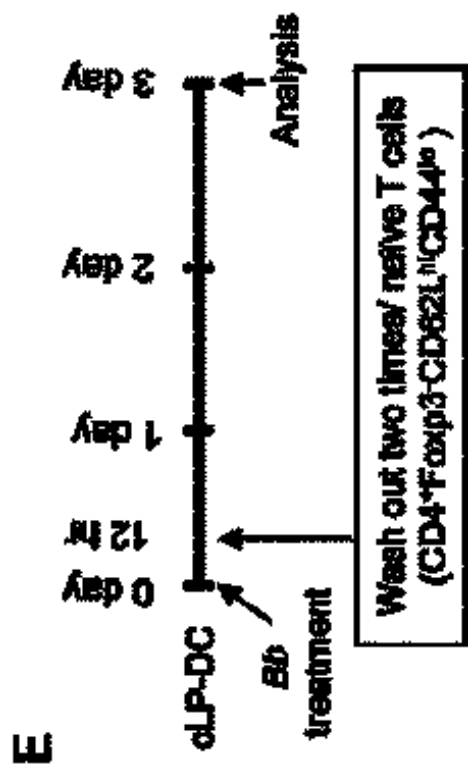
20

30

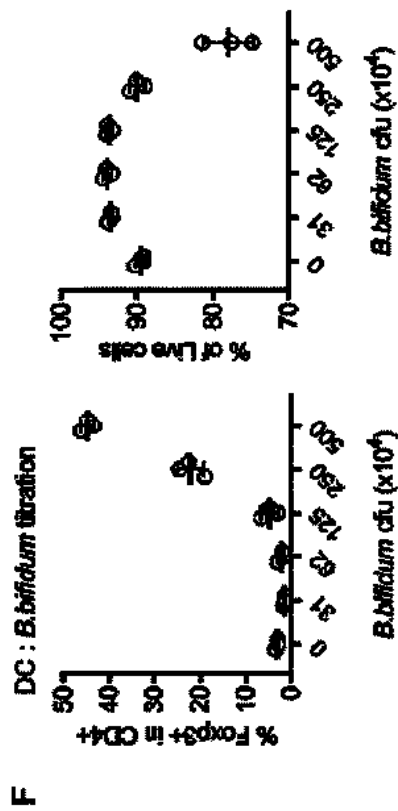
40

50

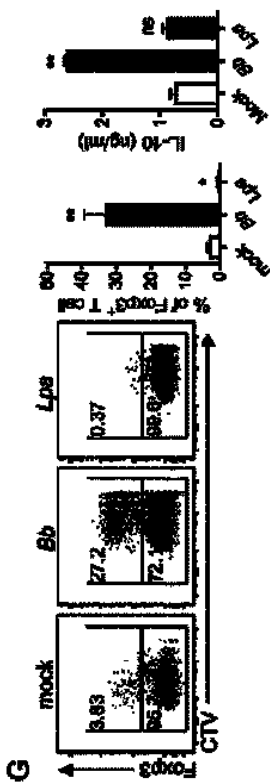
【図 10 E】



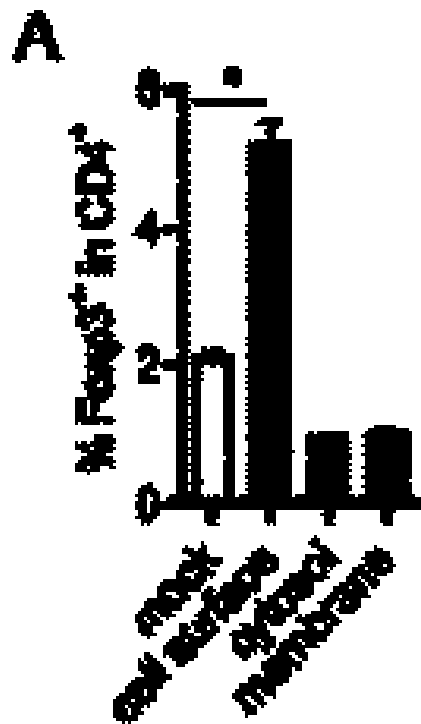
【図 10 F】



【図 10 G】



【図 11 A】



10

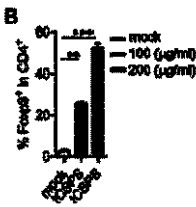
20

30

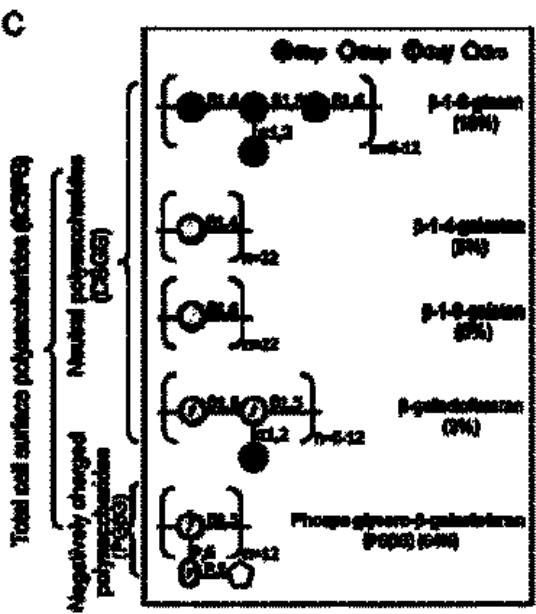
40

50

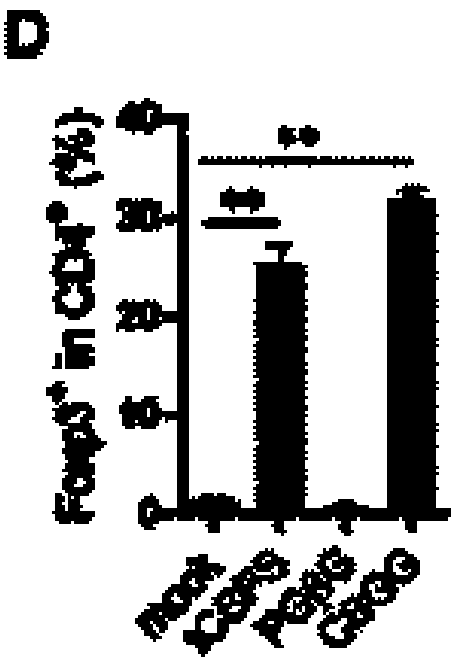
【図 1 1 B】



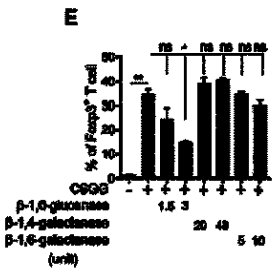
【図 1 1 C】



【図 1 1 D】



【図 1 1 E】



10

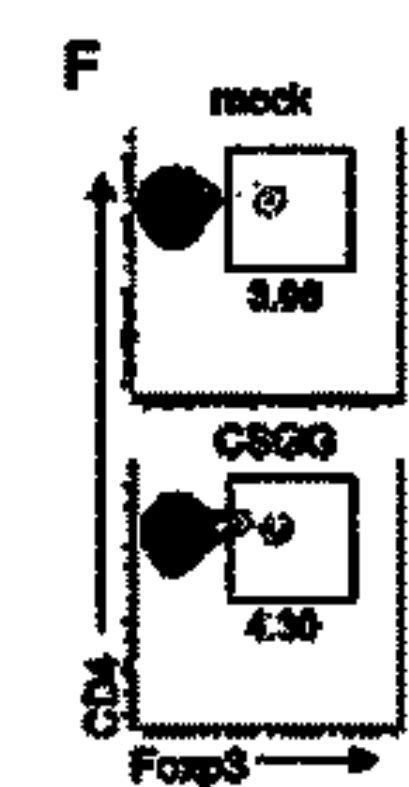
20

30

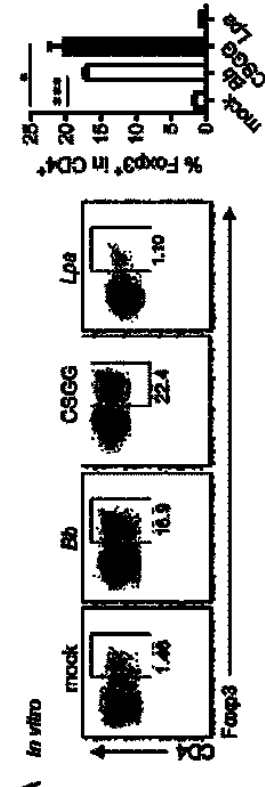
40

50

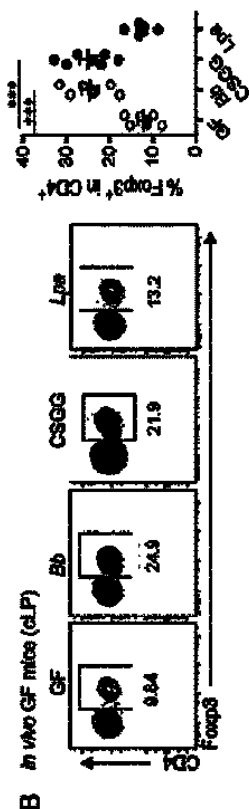
【図 1 1 F】



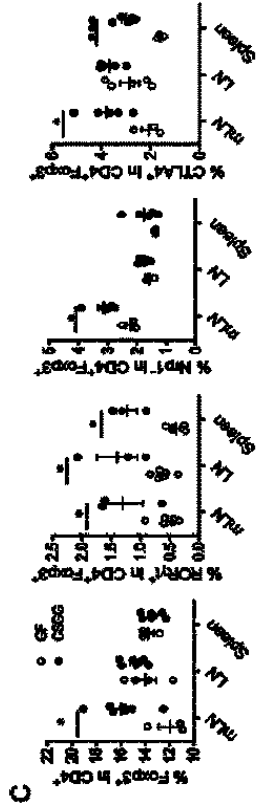
【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



【図 1 2 C】



10

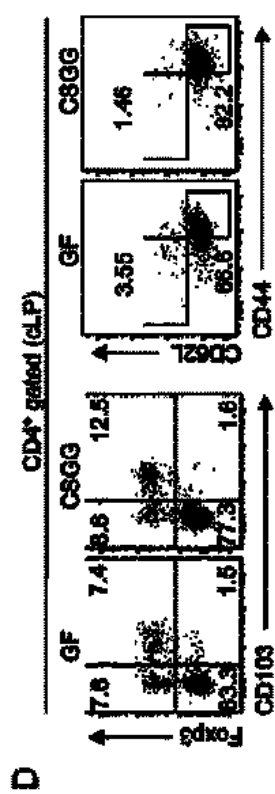
20

30

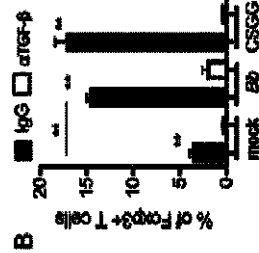
40

50

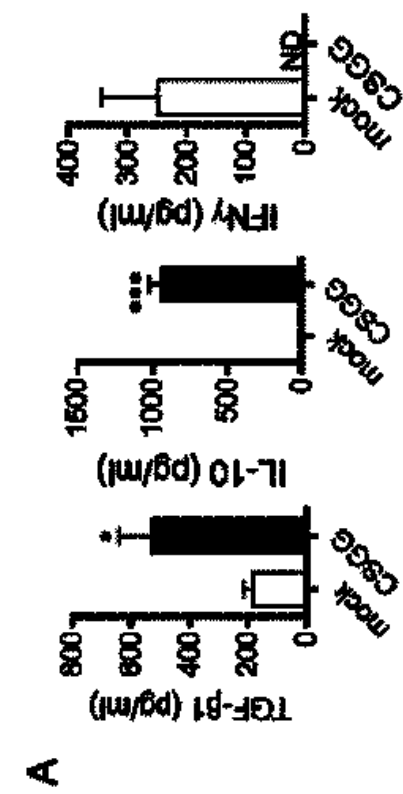
【図 1 2 D】



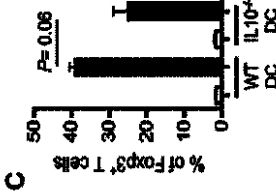
【図 1 3 B】



【図 1 3 A】



【図 1 3 C】



10

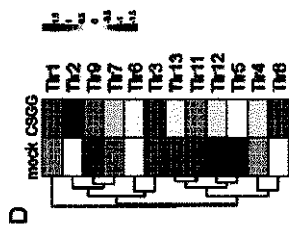
20

30

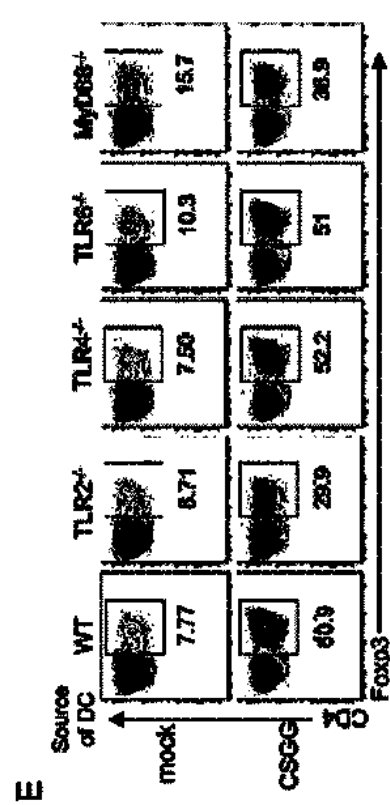
40

50

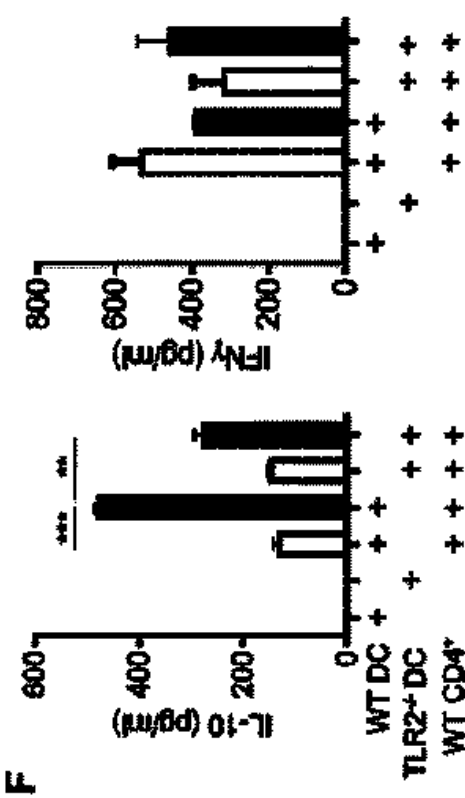
【図 1 3 D】



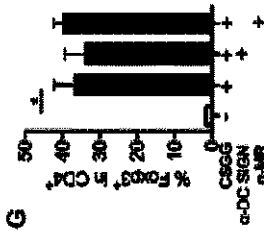
【図 1 3 E】



【図 1 3 F】



【図 1 3 G】



10

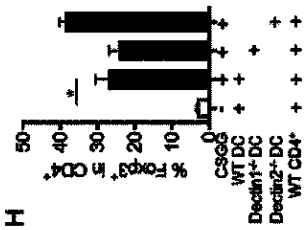
20

30

40

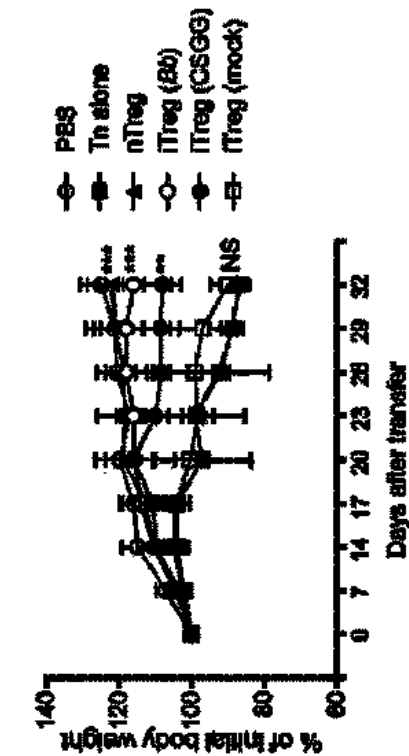
50

【図 1 3 H】



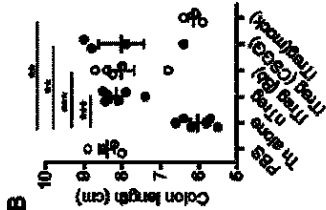
H

【図 1 4 A】



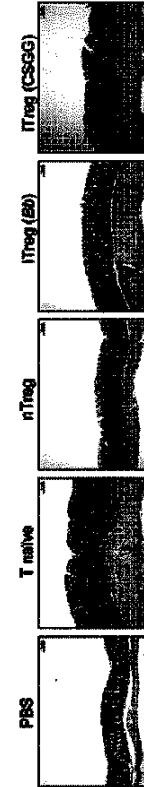
A

【図 1 4 B】



B

【図 1 4 C】



C

10

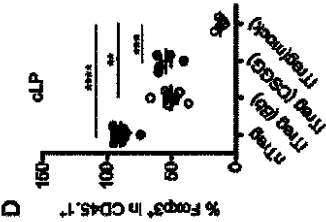
20

30

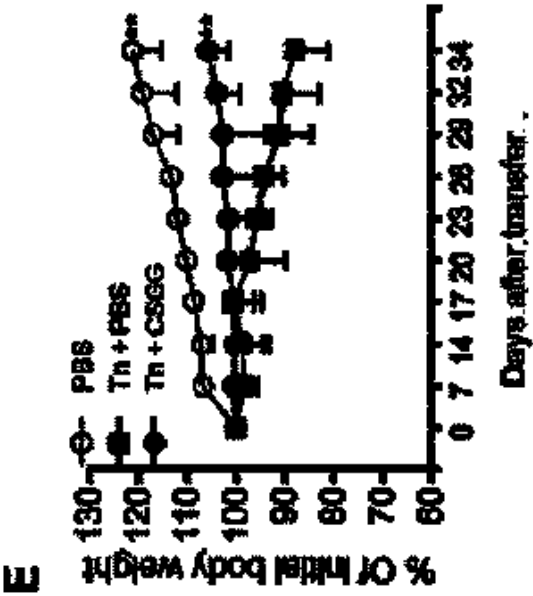
40

50

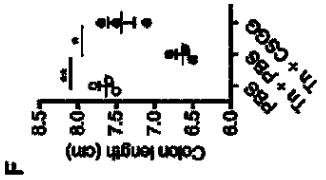
【図 1 4 D】



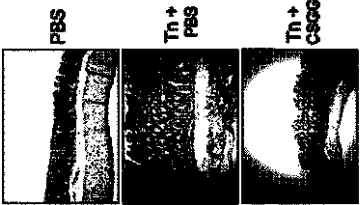
【図 1 4 E】



【図 1 4 F】



【図 1 4 G】



10

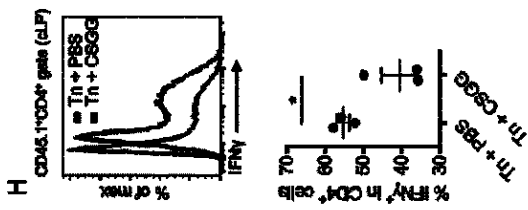
20

30

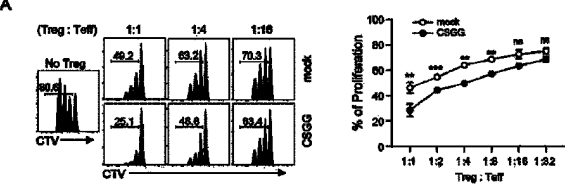
40

50

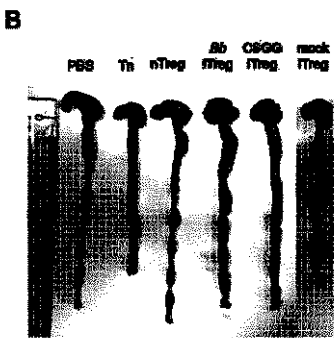
【図 1 4 H】



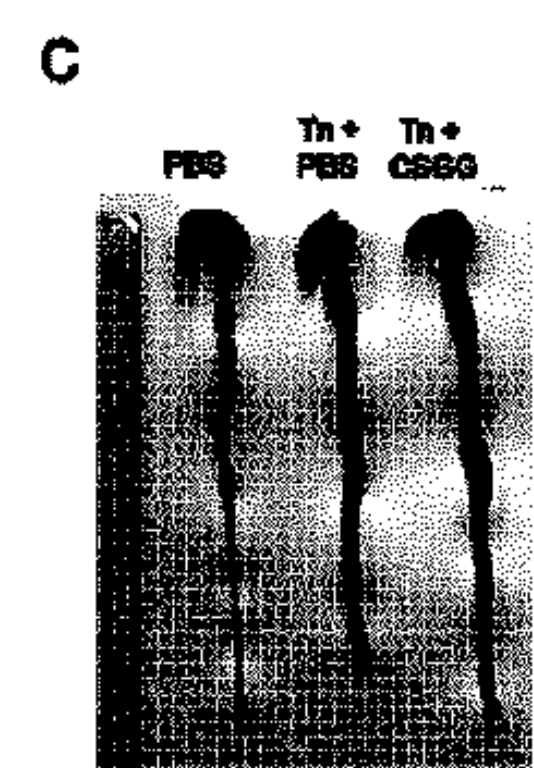
【図 1 5 A】



【図 1 5 B】



【図 1 5 C】



10

20

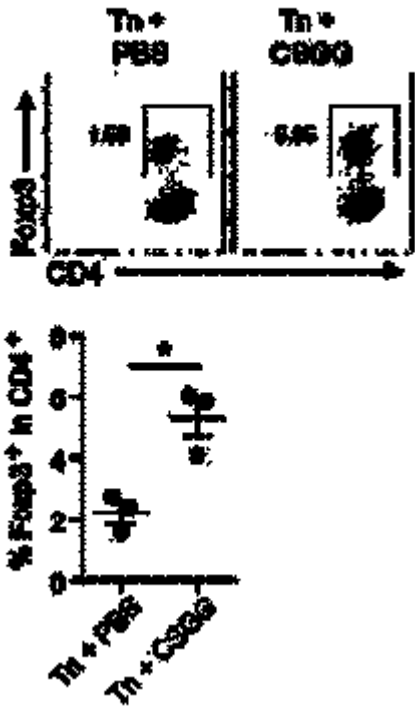
30

40

50

【図 15 D】

D



【配列表】

0007027462000001.app

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

A 6 1 P 29/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 37/02 (2006.01)  
 C 1 2 N 1/20 (2006.01)  
 C 1 2 N 5/0783(2010.01)

A 6 1 P 29/00  
 A 6 1 P 37/02  
 C 0 8 B 37/00 P  
 C 1 2 N 1/20 A Z N A  
 C 1 2 N 5/0783

(74)代理人 100090251

弁理士 森田 憲一

(72)発明者 イン シンヒョク

大韓民国, 3 7 6 6 0 キョンサンブクト, ポハンーシ ナムーグ, フィマンーデロ 5 2 0, 1  
 0 8 - 1 4 0 1

(72)発明者 ベルマ ラビ

大韓民国, 3 7 6 6 4 キョンサンブクト, ポハンーシ ナムーグ, ヒョジャドンーギル, 6 ボン  
 ーギル, 1 6, 3 0 1

(72)発明者 イ チャンホン

大韓民国, 3 7 6 6 4 キョンサンブクト, ポハンーシ ナムーグ, ヒョジャドンーギル, 1 0 ボ  
 ンーギル, 3 5, 1 0 2

審査官 西澤 龍彦

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 5 / 1 7 2 0 4 0 (WO, A 2)

特開 2 0 0 9 - 0 9 1 2 5 5 (JP, A)

SASSAKI, GL et al., Pustulan and branched  $\beta$ -galactofuranan from the phytopathogenic fu  
 ngus Guignardia citricarpa, excreted from media containing glucose and sucrose, Carbohy  
 drate Polymers, 2002年, Vol. 48, pp. 385-389

SPECIALE, I et al., Bifidobacterium bifidum presents on the cell surface a complex mixture  
 of glucans and galactans with different immunological properties, Carbohydrate Polymers  
 , 2019年, Vol. 218, pp. 269-278

LEE, JN et al., Purification of Soluble  $\beta$ -Glucan with Immune-enhancing Activity from the  
 Cell Wall of Yeast, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2001年, Vol. 65, pp. 8  
 37-841

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 0 8 B

A 6 1 K

A 2 3 L

C A p l u s / R E G I S T R Y (STN)