

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7520820号
(P7520820)

(45)発行日 令和6年7月23日(2024.7.23)

(24)登録日 令和6年7月12日(2024.7.12)

(51)国際特許分類

A 6 1 K	35/741 (2015.01)	A 6 1 K	35/741
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00

F I

請求項の数 1 (全125頁)

(21)出願番号 特願2021-515595(P2021-515595)
 (86)(22)出願日 令和1年9月19日(2019.9.19)
 (65)公表番号 特表2022-501381(P2022-501381
 A)
 (43)公表日 令和4年1月6日(2022.1.6)
 (86)国際出願番号 PCT/IL2019/051041
 (87)国際公開番号 WO2020/058979
 (87)国際公開日 令和2年3月26日(2020.3.26)
 審査請求日 令和4年9月14日(2022.9.14)
 (31)優先権主張番号 261908
 (32)優先日 平成30年9月20日(2018.9.20)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 イスラエル(IL)
 (31)優先権主張番号 267752
 (32)優先日 令和1年6月27日(2019.6.27)

最終頁に続く

(73)特許権者 516040109
 イエダ リサーチ アンド ディベロッ
 プメント カンパニー リミテッド
 Y E D A R E S E A R C H A N D D
 E V E L O P M E N T C O . L T D .
 イスラエル国 7 6 1 0 0 0 2 レホヴォ
 ト, ピー. オー. ボックス 9 5, ア
 ット ザ ウィツマン インスティテュート
 オブ サイエンス
 a t t h e W e i z m a n n I n s
 t i t u t e o f S c i e n c e ,
 P . O . B o x 9 5 , 7 6 1 0 0 0 2
 R e h o v o t , I s r a e l
 (74)代理人 100133503
 弁理士 関口 一哉

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 筋萎縮性側索硬化症の治療方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

A k k e r m a n s i a M u c i n i p h i l a (A M) からなる細菌を含む、 A L S の治療において使用するための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0001】

この出願は、2018年9月20日に出願されたイスラエル特許出願公開第261908号および2019年6月27日に出願されたイスラエル特許出願公開第267752号の優先権の利益を主張しており、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

上記の出願の内容はすべて、あたかもその全体が本明細書に完全に記載されているかのように、参照により組み込まれる。

【0003】

2019年9月19日に作成された22,138バイトを含む78818 Sequence Listing.txtというタイトルのASCIIファイルは、本願の提出と同時に提出され、参照により本明細書に組み込まれる。

【技術分野】

【0004】

本発明は、そのいくつかの実施形態において、筋萎縮性側索硬化症（ALS）を治療する方法、より具体的には、ただし排他的になることなく、細菌集団またはその代謝物による治療に関する。

【背景技術】

【0005】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動ニューロンの早期死亡と診断から3～5年の平均生存率とを特徴とする進行性の特発性神経変性疾患である。ALS症例の大部分は孤発性（sALS）であるが、症例の10～20%は家族性（fALS）であり、スーパー・オキシドジスムターゼ1（SOD1）などの遺伝子の遺伝子変異によって引き起こされる。エダラボンのようなALS標的薬を開発するために多大な努力がなされているが、これまでのところ、効果を確証させる疾患の修正活性をもたらしたものはない。過去の疫学研究では、ALSの発生と重症度に相關する明確な環境要因は特定されていないが、中枢神経系（CNS）は、消化管から血流へと吸収され、脳血液閥門（ BBB）を介してCNSに到達し得る循環性の小分子量の代謝物などの末梢信号により影響されるということが、いっそう認識されるようになってきている。そこでは、それらがニューロンや他の常在細胞の代謝、転写、エピジェネティックなプログラムを調節できる。

10

【0006】

複数の宿主の生理学的機能に影響を与える微生物の生態系である腸内マイクロバイオームは、そのような潜在的に生物活性のある中枢神経系疾患を調節する代謝物の大規模な潜在的供給源である。確かに、蓄積された証拠は、腸内マイクロバイオームの組成と機能が、自閉症、パーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症、およびてんかん発作などの神経障害の病因に重要な役割を果たしていることを示唆している。腸内マイクロバイオームによって分泌、枯渇、または修正された代謝物は、ニューロンの伝達、シナプスの可塑性、髓鞘形成、および宿主の複雑な行動に関与することが示された。いくつかのヒントは、宿主の腸内マイクロバイオームのインターフェースがALSの過程に潜在的に関与している可能性があることを示唆している。低レベルの結腸密着結合タンパク質Zonula occludens-1（ZO-1）および付着タンパク質E-カドヘリンを伴う腸内バリアの破壊が2か月齢のSOD1-Tgマウスで報告されており、Butyrylribifibrisolvensという酪酸産生細菌の減少を特徴とする腸内毒素症を引き起こす可能性がある。SOD1-Tgマウスへの酪酸の投与は、マイクロバイオームの組成を変化させたが、マイクロバイオームの評価は単一の時点で1群あたり3匹の動物で行われ、そのため、この設定での腸内毒素症の範囲、重要性、メカニズムの正確な評価は不可能であった。ALS患者の16S rDNA分析は相反する結果をもたらしており、1つの研究は5人の健常な対照と比較した6人のALS患者の異生物構成に注目し、一方で別の研究は25人のALS患者と32人の健常な対照の間に有意な組成の違いを示さなかった。この設定では、直接的な機能的マイクロバイオームの調査は行われていない。

20

【0007】

背景技術には、Richard Bedlack & The ALS Untangled Group (2018) ALS Untangled 42: Elysium health's 'basis', Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration, 19:3-4, 317-319, DOI: 10.1080/21678421.2017.1373978; およびHarlan et al, 2016, The Journal of Biological Chemistry 291, 10836-10846が含まれる。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【文献】Richard Bedlack & The ALS Untangled Group (2018) ALS Untangled 42: Elysium health's 'basis', Amyotrophic Lateral Sclerosis and Fr 50

ontotemporal Degeneration, 19:3-4, 317-319, DOI: 10.1080/21678421.2017.1373978; および Harlan et al, 2016, The Journal of Biological Chemistry 291, 10836-10846

【発明の概要】

【0009】

本発明の態様によれば、治療有効量の少なくとも2つの代謝物を対象に投与し、それによってALSを治療することを含む、それを必要とする対象においてALSを治療する方法が提供され、少なくとも2つの代謝物の少なくとも1つは、4-ヒドロキシ安息香酸プロピル、トリエタノールアミン、セロトニン、2-ケト-3-デオキシ-グルコン酸塩、ニコチンアミド、N-トリメチル5-アミノ吉草酸、フェニルアラニルグリシン、テオブロミン、シスグリ、グルタメート、1-パルミトイール-2-ドコサヘキサエノイル-GPC、シュウ酸塩、ステアロイルスフィンゴミエリン、1-パルミトイール-2-ドコサヘキサエノイル-GPC (16:0/22:6)、3-ウレイドプロピオネート、1-(1-エニル-パルミトイール)-2-アラキドノイル-GPC (P-16:0/20:4)、パルミトイールスフィンゴミエリン (d18:1/16:0)、スフィンゴミエリン (d18:1/18:1、d18:2/18:0)、ピルビン酸、タウロコレート、N-アセチルチロシン、タウロ-ベータ-ムリコレート、タウロウルソデオキシコレート、フェノール硫酸塩、エクオール硫酸塩、シンナメート、フェニルプロピオニルグリシン、2-アミノフェノールサルフェート、4-アリルフェノールサルフェート、エクオールグルクロニド、パルミトレオイル-リノレオイル-グリセロール、オレオイル-リノレノイル-グリセロール、1-パルミトイール-2-オレオイル-GPE、ハイドロキノンサルフェート、グアイアコールサルフェート、ジアシルグリセロール、パルミトイール-リノレオイル-グリセロール、ゲンチセート、および13-HODE + 9-HODEからなる群から選択される。

【0010】

本発明の態様によれば、ALSを治療するための少なくとも2つの代謝物の使用が提供され、少なくとも2つの代謝物の少なくとも1つは、4-ヒドロキシ安息香酸プロピル、トリエタノールアミン、セロトニン、2-ケト-3-デオキシ-グルコン酸塩、ニコチンアミド、N-トリメチル5-アミノ吉草酸、フェニルアラニルグリシン、テオブロミン、シスグリ、グルタメート、1-パルミトイール-2-ドコサヘキサエノイル-GPC、シュウ酸塩、ステアロイルスフィンゴミエリン、1-パルミトイール-2-ドコサヘキサエノイル-GPC (16:0/22:6)、3-ウレイドプロピオネート、1-(1-エニル-パルミトイール)-2-アラキドノイル-GPC (P-16:0/20:4)、パルミトイールスフィンゴミエリン (d18:1/16:0)、スフィンゴミエリン (d18:1/18:1、d18:2/18:0)、ピルビン酸、タウロコレート、N-アセチルチロシン、タウロ-ベータ-ムリコレート、タウロウルソデオキシコレート、フェノール硫酸塩、エクオール硫酸塩、シンナメート、フェニルプロピオニルグリシン、2-アミノフェノールサルフェート、4-アリルフェノールサルフェート、エクオールグルクロニド、パルミトレオイル-リノレオイル-グリセロール、オレオイル-リノレノイル-グリセロール、1-パルミトイール-2-オレオイル-GPE、ハイドロキノンサルフェート、グアイアコールサルフェート、ジアシルグリセロール、パルミトイール-リノレオイル-グリセロール、ゲンチセート、および13-HODE + 9-HODEからなる群から選択される。

【0011】

本発明の態様によれば、*Streptococcus thermophiles*、*Faecalibacterium prausnitzii*、*Eubacterium rectale*、*Bacteroides plebeius*、*Coprococcus*、*Roseburia hominis*、*Eubacterium ventriosum*、*Lachnospiraceae*、*Eubacterium hallii*、*Bacteroidales*、*Bifidobacterium pseudocatenulatum*

10

20

30

40

50

um、Anaerostipes hadrus、Akkermansia muciniphila(AM)、Anaeroplasma、Prevotella、Distanosis、Parabacteroides、Rikenellaceae、Alistipes、Candidatus Arthromitus、Eggerthella、Oscillibacter、Subdoligranulum、およびLactobacillusからなる群から選択される、細菌集団を含む治療有効量のプロバイオティクスを対象に投与し、それによってALSを治療することを含む、それを必要とする対象においてALSを治療する方法が提供される。

【0012】

本発明の態様によれば、ALSを治療するためのプロバイオティクスの使用が提供され、プロバイオティクスが、Streptococcus thermophiles、Faecalibacterium prausnitzii、Eubacterium rectale、Bacteroides plebeius、Coprococcus、Roseburia hominis、Eubacterium ventriosum、Lachnospiraceae、Eubacterium hallii、Bacteroidales、Bifidobacterium pseudocatenulatum、Anaerostipes hadrus、Akkermansia muciniphila(AM)、Anaeroplasma、Prevotella、Distanosis、Parabacteroides、Rikenellaceae、Alistipes、Candidatus Arthromitus、Eggerthella、Oscillibacter、Subdoligranulum、およびLactobacillusからなる群から選択される。

10

20

【0013】

本発明の態様によれば、対象の腸内マイクロバイオームにおけるEscherichia coli、Clostridium leptum、Ruminococcus gnatus、Clostridium nexile、Clostridium bolteae、Bacteroides fragilis、Catenibacterium mitsuokai、Bifidobacterium dentium、Megaspheara、Parasutterella exrementihominis、Burkholderiales bacterium、Clostridium ramosum、Streptococcus anginosus、Flavonifractor plautii、Methanobrevibacter smithii、Acidaminococcus intestine、Ruminococcus torques、Ruminococcus、Bifidobacterium、Coriobacteriaceae、Bacteroides、Parabacteroides、S247、Clostridiaceae、flavefaciens、Desulfovibrrioaceae、Allobaculum、Sutterella、Helicobacteraceae、Coprococcus、Oscillospiraからなる群から選択される細菌集団の量を選択的に減少させる治療有効量の薬剤を対象に投与し、それによってALSを治療することを含む、それを必要とする対象においてALSを治療する方法が提供される。

30

40

【0014】

本発明の態様によれば、ALSを治療するため、Escherichia coli、Clostridium leptum、Ruminococcus gnatus、Clostridium nexile、Clostridium bolteae、Bacteroides fragilis、Catenibacterium mitsuokai、Bifidobacterium dentium、Megaspheara、Parasutterella exrementihominis、Burkholderiales bacterium、Clostridium ramosum、Streptococcus anginosus、Flavonifractor plautii

40

50

i、*Methanobrevibacter smithii*、*Acidaminococcus intestine*、*Ruminococcus torques*、*Ruminococcus*、*Bifidobacterium*、*Coriobacteriaceae*、*Bacteroides*、*Parabacteroides*、S24 7、*Clostridiaceae*、*flavefaciens*、*Desulfovibrionaceae*、*Allobaculum*、*Sutterella*、*Helicobacteraceae*、*Coprococcus*、*Oscillospira*からなる群から選択される細菌集団の量を選択的に減少させる薬剤の使用が提供される。

【0015】

本発明の態様によれば、4 - ヒドロキシ安息香酸プロピル、トリエタノールアミン、セロトニン、2 - ケト - 3 - デオキシ - グルコン酸塩、N - トリメチル5 - アミノ吉草酸、フェニルアラニルグリシン、テオプロミン、シスグリ、グルタメート、1 - パルミトイ - 2 - ドコサヘキサエノイル - GPC、シュウ酸塩、ステアロイルスフィンゴミエリン、1 - パルミトイ - 2 - ドコサヘキサエノイル - GPC (16 : 0 / 22 : 6)、3 - ウレイドプロピオネート、1 - (1 - エニル - パルミトイ) - 2 - アラキドノイル - GPC (P - 16 : 0 / 20 : 4)、パルミトイ尔斯フィンゴミエリン (d18 : 1 / 16 : 0)、スフィンゴミエリン (d18 : 1 / 18 : 1、d18 : 2 / 18 : 0)、ピルビン酸、タウロコレート、N - アセチルチロシン、タウロ - ベータ - ムリコレート、タウロウルソデオキシコレート、フェノール硫酸塩、エクオール硫酸塩、シンナメート、フェニルプロピオニルグリシン、2 - アミノフェノールサルフェート、4 - アリルフェノールサルフェート、エクオールグルクロニド、パルミトレオイル - リノレオイル - グリセロール、オレオイル - リノレノイル - グリセロール、1 - パルミトイ - 2 - オレオイル - GPE、ハイドロキノンサルフェート、グアイアコールサルフェート、ジアシルグリセロール、パルミトイ - リノレオイル - グリセロール、ゲンチセート、および13 - HODE + 9 - HODEからなる群から選択される治療有効量の代謝物を対象に投与し、それによってALSを治療することを含む、それを必要とする対象においてALSを治療する方法が提供される。

【0016】

本発明の態様によれば、ALSを治療するために、4 - ヒドロキシ安息香酸プロピル、トリエタノールアミン、セロトニン、2 - ケト - 3 - デオキシ - グルコン酸塩、N - トリメチル5 - アミノ吉草酸、フェニルアラニルグリシン、テオプロミン、シスグリ、グルタメート、1 - パルミトイ - 2 - ドコサヘキサエノイル - GPC、シュウ酸塩、ステアロイルスフィンゴミエリン、1 - パルミトイ - 2 - ドコサヘキサエノイル - GPC (16 : 0 / 22 : 6)、3 - ウレイドプロピオネート、1 - (1 - エニル - パルミトイ) - 2 - アラキドノイル - GPC (P - 16 : 0 / 20 : 4)、パルミトイ尔斯フィンゴミエリン (d18 : 1 / 16 : 0)、スフィンゴミエリン (d18 : 1 / 18 : 1、d18 : 2 / 18 : 0)、ピルビン酸、タウロコレート、N - アセチルチロシン、タウロ - ベータ - ムリコレート、タウロウルソデオキシコレート、フェノール硫酸塩、エクオール硫酸塩、シンナメート、フェニルプロピオニルグリシン、2 - アミノフェノールサルフェート、4 - アリルフェノールサルフェート、エクオールグルクロニド、パルミトレオイル - リノレオイル - グリセロール、オレオイル - リノレノイル - グリセロール、1 - パルミトイ - 2 - オレオイル - GPE、ハイドロキノンサルフェート、グアイアコールサルフェート、ジアシルグリセロール、パルミトイ - リノレオイル - グリセロール、ゲンチセート、および13 - HODE + 9 - HODEからなる群から選択される、代謝物の使用が提供される。

【0017】

本発明の態様によれば、対象の微生物代謝物を分析することを含む、対象のALSを診断する方法が提供され、健常な対象における微生物代謝物の存在量と比較した、4 - ヒドロキシ安息香酸プロピル、トリエタノールアミン、セロトニン、2 - ケト - 3 - デオキシ - グルコン酸塩、N - トリメチル5 - アミノ吉草酸、フェニルアラニルグリシン、テオブ

10

20

30

40

50

ロミン、シスグリ、グルタメート、1-パルミトイール-2-ドコサヘキサエノイル-G P C、シュウ酸塩、ステアロイルスフィンゴミエリン、1-パルミトイール-2-ドコサヘキサエノイル-G P C (16:0/22:6)、3-ウレイドプロピオネート、1-(1-エニル-パルミトイール)-2-アラキドノイル-G P C (P-16:0/20:4)、パルミトイ尔斯フィンゴミエリン (d18:1/16:0)、スフィンゴミエリン (d18:1/18:1, d18:2/18:0)、ピルビン酸、タウロコレート、N-アセチルチロシン、タウロ-ベータ-ムリコレート、タウロウルソデオキシコレート、フェノール硫酸塩、エクオール硫酸塩、シンナメート、フェニルプロピオニルグリシン、2-アミノフェノールサルフェート、4-アリルフェノールサルフェート、エクオールグルクロニド、パルミトレオイル-リノレオイル-グリセロール、オレオイル-リノレオイル-グリセロール、1-パルミトイール-2-オレオイル-G P E、ハイドロキノンサルフェート、グアイアコールサルフェート、ジアシルグリセロール、パルミトイール-リノレオイル-グリセロール、ゲンチセート、および13-H O D E + 9-H O D E からなる群から選択される微生物代謝物の存在量の統計的に有意な減少が、A L Sを示し、および/または健常な対象における微生物代謝物の存在量と比較した、タウロウルコレートからなる群から選択される微生物代謝物の存在量の統計的に有意な減少が、A L Sを示す。

【0018】

本発明の態様によれば、対象のマイクロバイオームにおける *Ruminococcus* の量および/または活性を分析することを含む、対象のA L Sを診断する方法が提供され、健常な対象のマイクロバイオームにおけるその存在量と比較して、*Ruminococcus* の存在量および/または活性の統計的に有意な増加がA L Sを示す。

【0019】

本発明の実施形態によれば、少なくとも2つの代謝物のうちの少なくとも1つは、ニコチニアミド、フェノール硫酸塩、エクオール硫酸塩およびシンナメートからなる群から選択される。

【0020】

本発明の実施形態によれば、少なくとも2つの代謝物のうちの少なくとも1つは、4-ヒドロキシ安息香酸プロビル、トリエタノールアミン、セロトニン、2-ケト-3-デオキシ-グルタメートニコチニアミド、N-トリメチル5-アミノ吉草酸、フェニルアラニルグリシン、テオブロミン、シスグリ、グルタメートおよび1-パルミトイール-2-ドコサヘキサエノイル-G P C からなる群から選択される。

【0021】

本発明の実施形態によれば、少なくとも2つの代謝物は、4-ヒドロキシ安息香酸プロビル、トリエタノールアミン、セロトニン、2-ケト-3-デオキシ-グルタメートニコチニアミド、N-トリメチル5-アミノ吉草酸、フェニルアラニルグリシン、テオブロミン、シスグリ、グルタメートおよび1-パルミトイール-2-ドコサヘキサエノイル-G P C からなる群から選択される。

【0022】

本発明の実施形態によれば、少なくとも2つの代謝物のうちの少なくとも1つはニコチニアミドである。

【0023】

本発明の実施形態によれば、少なくとも2つの代謝物のうちの少なくとも1つは、細菌集団に含まれる。

【0024】

本発明の実施形態によれば、細菌集団は、*Streptococcus thermophilus*、*Faecalibacterium prausnitzii*、*Eubacterium rectale*、*Bacteroides plebeius*、*Coprococcus*、*Roseburia hominis*、*Eubacterium ventriosum*、*Lachnospiraceae*、*Eubacterium hallii*、*Bacteroidales*、*Bifidobacterium pseudoc*

10

20

30

40

50

atenulatum、Anaerostipes hadrus、Akkermansia Muciniphila (AM)、Anaeroplasma、Prevotella、Distanosis、Parabacteroides、Rikenellaceae、Alistipes、Candidatus Arthromitus、Eggerthella、Oscillibacter、Subdoligranulum、およびLactobacillusからなる群から選択される。

【0025】

本発明の実施形態によれば、細菌集団は、Akkermansia Muciniphila (AM)を含む。

【0026】

細菌集団は、Streptococcus thermophiles、Faecalibacterium prausnitzii、Eubacterium rectale、Bacteroides plebeius、Coprooccus、Roseburia hominis、Eubacterium ventriosum、Lachnospiraceae、Eubacterium hallii、Bacteroidales、Bifidobacterium pseudocatenulatumおよびAnaerostipes hadrusを含む。

【0027】

本発明の実施形態によれば、細菌集団は、Ruminococcus、Desulfovibrioaceae、Allobaculum、Sutterella、Helicobacteraceae、Coprooccus、およびOscillospiraからなる群から選択される。

20

【0028】

本発明の実施形態によれば、細菌集団は、Escherichia coli、Clostridium leptum、Ruminococcus gnavus、Clostridium nexile、Clostridium bolteae、Bacteroides fragilis、Catenibacterium mitsuokai、Bifidobacterium dentium、Megaspheera、Parasutterella exrementihominis、Burkholderiales bacterium、Clostridium ramosum、Streptococcus anginosus、Flavonifractor plautii、Methanobrevibacter smithii、Acidaminococcus intestine、およびRuminococcus torquesからなる群から選択される。

30

【0029】

本発明の実施形態によれば、細菌集団はRuminococcusを含む。

【0030】

本発明の実施形態によれば、Ruminococcusは、Ruminococcus torquesまたはRuminococcus gnavusを含む。

【0031】

本発明の実施形態によれば、薬剤は抗生物質である。

40

【0032】

本発明の実施形態によれば、薬剤はバクテリオファージである。

【0033】

本発明の実施形態によれば、Ruminococcusは、Ruminococcus torquesまたはRuminococcus gnavusを含む。

【0034】

本発明の実施形態によれば、方法は、Escherichia coli、Clostridium leptum、Clostridium nexile、Clostridium bolteae、Bacteroides fragilis、Cateniba

50

cterium mitsuokai、Bifidobacterium dentium、Megaspheera、Parasutterella excrementiphaga minis、Burkholderiales bacterium、Clostridium ramosum、Streptococcus anginosus、Flavonifractor plautii、Methanobrevibacter smithii、およびAcidaminococcus intestineからなる群から選択される細菌の少なくとも1つの量および/または活性を分析することをさらに含み、健常な対象のマイクロバイオームにおけるその存在量と比較して、細菌の存在量の統計的に有意な増加がALSを示す。

【0035】

本発明の実施形態によれば、方法は、Streptococcus thermophilus、Faecalibacterium prausnitzii、Eubacterium rectale、Bacteroides plebeius、Coprococcus、Roseburia hominis、Eubacterium ventriosum、Lachnospiraceae、Eubacterium hallii、Bacteroidales、Bifidobacterium pseudocatenulatum、Anaerostipes hadrussからなる群から選択される細菌の少なくとも1つの量および/または活性を分析することをさらに含む、健常な対象のマイクロバイオームにおけるその存在量と比較しえる細菌の存在量の統計的に有意な減少は、ALSを示している。

【0036】

本発明の実施形態によれば、分析は、対象のマイクロバイオームのサンプルを分析することを含む。

【0037】

本発明の実施形態によれば、マイクロバイオームが、腸内マイクロバイオーム、口腔マイクロバイオーム、気管支マイクロバイオーム、皮膚マイクロバイオーム、および膣マイクロバイオームからなる群から選択される。

【0038】

本発明の実施形態によれば、マイクロバイオームは腸内マイクロバイオームである。

【0039】

本発明の実施形態によれば、サンプルは糞便サンプルを含む。

【0040】

本発明の実施形態によれば、分析することは、対象の血液サンプルにおいて行われる。

【0041】

特に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および/または科学用語は、本発明が関係する当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似または同等の方法および材料を本発明の実施形態の実施または試験に使用することができるが、例示的な方法および/または材料を以下に記載する。矛盾する場合、定義を含む特許明細書が支配する。さらに、材料、方法、および例は単なる例示であり、必ずしも限定することを意図するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0042】

本明細書では、本発明のいくつかの実施形態を、単なる例として、添付の図面を参照して説明する。ここで図面を詳細に具体的に参照すると、示されている詳細は例としてであり、本発明の実施形態の例示的な説明の目的のためであることが強調される。これに関して、図面と共に得られる説明は、本発明の実施形態がどのように実施され得るかを当業者に明らかにする。

【0043】

【図1】図1A～K抗生物質での治療は、ALSマウスモデルの運動症状を悪化させる。

(A) 実験計画。(B) ロータロッド、(C) 吊り下げワイヤーグリップテスト、(D)

10

20

30

40

50

疾患の経過全体にわたる神経学的スコアリングの行動による、運動症状の評価。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.005$ 、マンホイットニーU検定。実験を3回繰り返した($N = 5 \sim 10$ 匹のマウス)。(E)組織学的画像、および(F)140日齢の水およびAbxで処理したSOD1-Tgマウスの脊髄における下位運動ニューロンの定量化。* $P < 0.05$ 、マンホイットニーU検定。(G)T₂マップおよび(H~I)疾患の進行中の水およびAbxで処理したSOD1-Tgマウスの間の対応する領域におけるT₂緩和時間の定量化。** $P < 0.005$ 、*** $P < 0.0005$ 、マンホイットニーU検定。実験を2回繰り返した($N = 5$ 匹のマウス)。(J)GF($N = 14$)およびSPF($N = 17$)のSOD1-Tgマウスの生存。** $P < 0.005$ 、ログランク検定。実験を2回繰り返した。(K)Abxおよび水で処理したTDP43-Tg(各群で $N = 10$)マウスの生存。**** $P < 0.0001$ 、ログランク検定。実験を2回繰り返した。

【図2】図2A~H。SOD1-Tgマウスは、WT同腹仔対照と比較して初期の腸内マイクロバイオームの組成および機能の違いを発症する。(A)40日目(発症前)、(B)100日目(発症)および(C)140日目(進行性疾患)の重み付けUniFrac PCA。実験を3回繰り返した(各群で $N = 6$ 匹のマウス)。(D)疾患の進行中にWTおよびSOD1-Tgの便のサンプルを腸内マイクロバイオームメタゲノムショットガンシーケンシングすることによって得られた種レベルの分類群の概要。(E)WTおよびSOD1-TgマイクロバイオームのKEGGエントリーのPCA。 $p = 1.57 \times 10^{-14}$ 、スピアマンの相関係数。(F)概略図、および(G)トリプトファン代謝の細菌遺伝子存在量のヒートマップ。(H)ニコチニアミドおよびニコチニ酸生合成経路の細菌遺伝子存在量のヒートマップ。 $N = 6$ マウス、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.005$ 、*** $P < 0.0005$ 、マンホイットニーU検定。

【図3】図3A~H。Akkermansia muciniphilaのコロニー形成は、SOD1-Tgマウスの運動変性を改善し、寿命を延ばす。(A)経時的な、SOD1-TgおよびWTの便のAM相対的存在量(16S rDNAシーケンス)の線形回帰、および(B)糞便DNA抽出物中のAM 16S遺伝子コピーのqPCR($N = 6$ マウス)。(C)ロータロッド、(D)吊り下げワイヤーグリップテスト、および(E)神経学的スコアリングによって示されるAMで処理されたSOD1-TgおよびWTマウスの運動機能。(F)組織学的画像および(G)140日齢のPBSおよびAMで処理したSOD1-Tgマウスにおける脊髄の運動ニューロンの定量化。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.005$ 、マンホイットニーU検定。(H)PBS、AM、Prevotella melaninogenica(PM)、およびLactobacillus gasseri(LG)で処理したマウスの生存率*** $P < 0.0005$ ログランク検定。実験を6回繰り返した($N = 5 \sim 26$ 匹のマウス)。

【図4】図4A~F。Akkermansia muciniphilaの治療は、SOD1-Tgマウスにおけるニコチニアミド生合成の増強に関連している。(A)AMで処理されたSOD1-Tgマウス(右上象限 $N = 7 \sim 8$ マウス)で有意に増加した血清代謝物。(B)AMまたはPBSで処理されたSOD1-TgおよびWTマウスの血清レベルのニコチニアミド経路代謝物。(C)細菌培養物中のニコチニアミドレベル。** $P < 0.005$ 、*** $P < 0.0005$ マンホイットニーU検定。(D)100日目および(E)140日目にAMまたはPBSで治療したSOD1-TgおよびWTマウスのCSFニコチニアミドレベル。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.005$ 、*** $P < 0.0005$ マンホイットニーU検定。(F)AM処理されたSOD1-Tg糞便サンプルにおけるマイクロバイオーム由来のニコチニアミド産生遺伝子の概略図。示された遺伝子は、AM処理($N = 7 \sim 8$ マウス)後に存在量が増加した。マンホイットニーU順位和検定。

【図5】図5A~G。ニコチニアミド処理は、SOD1-TgマウスのALSの進行を改善する。(A)CSFおよび(B)NAMおよびビヒクルで処理したSOD1-Tgマウス($N = 10$ マウス)における血清NAMレベル。(C)ロータロッド、(D)吊り下げワイヤーグリップテスト、および(E)神経学的スコアリングによって示される皮下浸透圧ポンプを使用したNAMまたはビヒクル処理SOD1-Tgマウスの運動能力。* $P <$

10

20

30

40

50

0.05***P < 0.0005 マンホイットニー U 検定。実験を 3 回繰り返した (N = 10 匹のマウス)。(F) NAM およびビヒクリルで処理した SOD1-Tg マウスの生存評価。p = 0.1757、ログランク検定。(G) WT または n a d A E . c o l i を接種した Abx で前処理した SOD1-Tg マウスの神経学的スコアリング。***P < 0.0005 マンホイットニー U 検定。

【図 6】図 6 A ~ E。AM および NAM 治療の潜在的な下流運動ニューロン調節メカニズムを明らかにする。(A) NAM 処理 SOD1-Tg マウス (N = 10 マウス) の脊髄における FDR 補正された差次的発現遺伝子のヒートマップ。(B) AM および NAM で処理した SOD1-Tg マウス間の脊髄転写物の 10g 2 倍の変化のスピアマン相関。(C) 4 つの神経病理学的な群に分類された KOG データベースを用いた NAM 治療後の有意に差次的に発現された遺伝子の比較。(D) NAM 処理および(E) AM 処理 SOD1-Tg マウスの脊髄転写産物の生物学的プロセス、分子機能、および細胞成分への FDR 補正遺伝子セット強化分布。

【図 7】図 7 A ~ F。マイクロバイオーム由来のニコチンアミド代謝は、ALS 患者で損なわれる(A)細菌種の組成の PCA (PC1 で p = 3.3 × 10⁻⁶、スピアマン相関係数)または(B)ALS 患者 (N = 32) および健常対照 (家族、N = 27) からの便のサンプルのメタゲノムショットガンシーケンシングによって得られた、KEGG オルソロジー (KO) 注釈付き細菌遺伝子 (PC1 で p = 2.8 × 10⁻⁹、スピアマン相関係数)。(C) ALS および健常者の便のサンプルにおけるニコチンアミド経路のマイクロバイオーム関連遺伝子の KO 相対存在量。(D) 非標的メタボロミクスによって得られた ALS 患者および健常な個人におけるトリプトファン / ニコチンアミド経路の血清代謝物レベル。(E) 血清および(F) ALS 患者 (血清で N = 41、CSF で 12) および健常対照者 (血清で N = 21、CSF で 17) の CSF NAM レベル、***P < 0.0005、マンホイットニー U テスト。

【図 8】図 8 A ~ I。抗生素質治療は、SOD1-Tg マウスの ALS 症状を悪化させる。SOD1-Tg および WT 同腹仔対照マウスは、40 日齢から実験のエンドポイントまで、非処理または飲料水中の広域スペクトル Abx で処理された。60 日目、80 日目、100 日目、120 日目、および 140 日目に、マウスの運動能力を (A, D, および G) ロータロッド、(B, E, および H) 吊り下げワイヤーグリップテスト、および (C, F, および I) 神経学的スコアリングによって評価した。(N = 5 ~ 10 マウス)、*P < 0.05、**P < 0.005、マンホイットニー U 検定。

【図 9】図 9 A ~ P。SOD1-Tg マウスの ALS 症状に対する抗生素質治療の効果。(A) ロータロッド、(B) 吊り下げワイヤーグリップテスト、および (C) 神経学的スコアによって示される、SOD1-Tg および WT 治療における経時的な運動機能の線形回帰。(D) 脳領域の MRI および ALS 全体にわたる水と Abx 処理 SOD1-Tg マウス間の T₂ 緩和時間の対応する (E ~ I) の定量化。*P < 0.05、**P < 0.005、****P < 0.0005、マンホイットニー U 検定。(J) 46 時間、100 ~ 101 日にわたるホームケージの運動分析 (N = 5 マウス)。*P = 0.03。水と Abx で処理した SOD1-Tg マウス間の 50 日目 (O) および 140 日目 (P) の小腸 (K ~ L)、結腸 (M ~ N)、脊髄における免疫細胞亜集団の分布。(N = 5 マウス)、マンホイットニー U 検定。

【図 10】図 10 A ~ D。GF - 対 SPF - SOD1-Tg マウスおよび Abx 処理の TDP43-Tg マウスの生存。115 日目に自発的にコロニー形成した SPF - および GF - SOD1-Tg マウスの生存。*P < 0.05、ログランク検定。実験は 2 回行われた。(A) (N = 13 の SPF および 6 の GF - SOD1-Tg マウス) および (B) (N = 5 の SPF および 8 の GF - SOD1-Tg マウス)。(C ~ D) Abx および水で処理した TDP43-Tg マウスの生存率 **P < 0.005、****P < 0.0001 ログランク検定。実験は 2 回行った (各群で N = 5 ~ 10 匹のマウス)。

【図 11】図 11 A ~ O。ALS の進行全体にわたる SOD1-Tg マウスモデルの微生物の組成ダイナミクス。(A) ALS の経過中の個々の WT および SOD1-Tg マウス

10

20

30

40

50

における細菌叢の分類群の概要、および(B)糞便のサンプルの16S rDNAシーケンシングによって得られた属(平均化された時点)。(N=6マウス)、実験を3回繰り返した。(C)疾患の進行全体にわたるSOD1-TgマウスとWTマウスの間の差次的に表れる有意な属の相対的な存在量。(D~M)WTとSOD1-Tgの便の間における、ALS進行中の代表的な細菌の相対的な存在量の変化に関するFDR補正線形回帰比較。スピアマンの相関係数。(N)経時的なSOD1-TgおよびWTマイクロバイオームのアルファ多様性。実験を3回繰り返した(各群でN=6匹のマウス)。(O)SOD1-TgおよびWTマウス(N=5~6のマウス)の糞便サンプルから抽出された1ngのDNAにおける総16Sコピー数のqPCRベースの定量化。

【図12】図12A~M。ALS進行全体にわたるAbx治療SOD1-Tgマウスモデルの微生物組成ダイナミクス。(A)ALSの経過中の個々のAbx処理されたWTおよびSOD1-Tgマウスにおける細菌門の分類群の概要。慢性的なAbxレジーム下の疾患の(B)47日目(Abx前)および(C~G)60~140日目の重み付けUniFracPCoA。(H~M)ALSの経過中のAbx処理されたWTおよびSOD1-Tgマウスの有意に強化された細菌属のFDR補正ボルケーノプロット。

【図13】図13A~I。ALSの進行全体にわたるEx-GFSOD1-Tgマウスモデルにおける微生物の自発的なコロニー形成。(A)ALSの経過中に特発性細菌コロニー形成を経ている個々のEx-GFWTおよびSOD1-Tgの細菌属の分類群の概要。(B~E)自発的コロニー形成後4日目、5日目、53日目および63日目のEx-GFWTおよびSOD1-Tgマウスの重み付けUniFracPCoA。(F~I)自発的コロニー形成後の4日目、5日目、53日目、および63日目のALSの経過中のEx-GFWTおよびSOD1-Tgの有意に強化された細菌属のFDR補正ボルケーノプロット。

【図14】図14A~E。SOD1-Tgマウスモデルにおける飼養所の影響を受けた腸内毒素症(A)重み付けUniFracPCoAおよび(B)異なる非バリアの飼養所(飼養所B、ベングリオン大学)に4週齢、6週齢、8週齢、12週齢で収容されたWTおよびSOD1-Tgマウスのアルファ多様性。(C)飼養所A(ワイツマン科学研究所)および飼養所B(ベングリオン大学)の80日齢のWTマウスにおける細菌属の個体および(D)平均分類群の概要。(E)2つの施設のWT動物における上位20の非常に豊富なマイクロバイオーム属の存在比の概要、およびSOD1-Tg動物におけるそれらの対応する存在量。比較は、各群で1回(N=5~8の)マウスで実行した。

【図15】図15A~N。WTとSOD1-Tg糞便マイクロバイオームのメタゲノムの違い(A)細菌組成のPCoAプロット、および(B)メタゲノムショットガンシーケンシングによって得られたWTおよびSOD1-Tgマウスの腸内マイクロバイオームの種レベルでの分類群の概要表現。実験を2回繰り返した(N=6のマウス)。(C~N)WTとSOD1-Tgの便の間における、ALS進行中の代表的な細菌の相対的な存在量の変化に関するFDR補正線形回帰比較。スピアマンの相関係数。

【図16】図16A~L。60日齢WT(N=8)およびSOD1-Tg(N=7)マウスの食品摂取量(A、B)、水消費量(C、D)、呼吸交換率(E、F)、O₂消費量(G、H)、熱產生(I)、運動(J)および速度(K、L)のSOD1-TgおよびWT同腹仔の代表的な記録(A、C、E、G、I、J、K)および定量化(B、D、F、H、L)における代謝測定。

【図17】図17A~L。選択されたALS関連マイクロバイオーム株によるAbx前処理SOD1-Tgマウスの單一コロニー形成。(A)ロータロッド、(B)吊り下げワイヤーグリップテスト、および(C)神経学的スコアリングによって示される、PBS、Eggerthella lenta(EL)、Coprobacillus cateniformis(CC)、Parabacteroides goldsteinii(PG)、Lactobacillus murinus(LM)、Parabacteroides distasonis(PD)、Lactobacillus gasseri(LG)、Prevotella melaninogenica(PM)、またはAk

10

20

30

40

50

akermansia muciniphila (AM、ATCC 835) で処理されたAb^x前処理 SOD1-Tgマウスの運動機能。(D~F) PBS または *Escherichia coli* tayi (ET)、または (G~I) *Subdoliglucanulum variabile* (SV) で処理されたAb^x前処理 SOD1-Tgマウスの運動機能。(J~L) PBS、LM、PD、LG、PM、または AM で処理された、Ab^xで前処理された WT 同腹仔対照の運動機能。(N = 6~8 のマウス) * P < 0.05, ** P < 0.005, *** P < 0.0005 マンホイットニー U 検定。

【図18】図18 A~M。 *Ruminococcus torques* の單一コロニー形成が、SOD1-TgマウスのALS進行に与える影響。(A) SOD1-Tg および WT 便 (N = 6 マウス) の *Ruminococcus torques* (RT) の相対的な存在量 (16S rDNA シーケンス) の線形回帰。PBS または RT で処理された Ab^x 前処理 WT および SOD1-Tg の (B) ロータロッド、(C) 吊り下げワイヤーグリップテスト、および (D) 神経学的スコアリング (N = 5~9 マウス)、* P < 0.05, ** P < 0.005, *** P < 0.0005、マンホイットニー U 検定。140 日齢の PBS および RT で処理した SOD1-Tg マウスの (E) 組織学的画像および (F) 脊髄運動ニューロンの定量化。疾患全体にわたる PBS と RT 処理 SOD1-Tg マウス間の (G) 脳領域および対応する (H~M) T₂ 緩和時間の定量化。* P < 0.05, ** P < 0.005, *** P < 0.0005, **** P < 0.00005 マンホイットニー U 検定。実験を 2 回繰り返した (N = 5 匹のマウス)。

【図19】図19 A~I。 *Ruminococcus torques* の治療は、SOD1-Tg マウスの ALS 症状を悪化させる。(A、D、G) ロータロッド、(B、E、H) 吊り下げワイヤーグリップテスト、(C、F、I) 神経学的スコアリングによる、3つの生物学的反復における *Ruminococcus torques* (RT) による Ab^x 前処理 SOD1-Tg および WT 同腹仔処理の評価。(N = 5~10 のマウス) * P < 0.05, ** P < 0.005, *** P < 0.0005 マンホイットニー U 検定。

【図20】図20 A~O。 *Akkermansia muciniphila* 治療は、SOD1-Tg マウスの ALS 症状を軽減する。Ab^x で前処理した SOD1-Tg および WT 同腹仔対照マウスを、60 日齢から実験の終点までビヒクルとして AM (ATCC 835) または PBS で経口投与した。60 日目、80 日目、100 日目、120 日目、および 140 日目に、マウスの運動能力を (A、D、G、J、および O) ロータロッド、(B、E、H、K、および M) 吊り下げワイヤーグリップテスト、および (C、F、I、L および N) 神経学的スコアリングによって評価した。(N = 5~26 マウス)、* P < 0.05, ** P < 0.005, *** P < 0.0005 マンホイットニー U 検定。

【図21】図21 A~L。SOD1-Tg マウスの ALS の症状とマイクロバイオームの組成に対する *Akkermansia muciniphila* 治療の効果。(A~D) 100 日目および 140 日目の PBS および AM (ATCC 835) 処理 Ab^x 前処理 SOD1-Tg マウスにおける T₂ 緩和時間の定量化。*** P < 0.0005, **** P < 0.00005 マンホイットニー U 検定。(E) PBS、AM、P. *Melanogenica* (PM) または L. *gaseri* (LG) で処理された 120 日の WT および SOD1-Tg の全身 FITC-デキストラン測定。(F) PBS または AM で処理された SOD1-Tg マウスにおける細菌種の組成の PCR。 (G) PBS または AM で処理された SOD1-Tg の属細菌の概要。PBS または AM で処理された (H) SOD1-Tg または (I) WT マウスにおける AM の相対的な存在量。* P < 0.05, ** P < 0.005, *** P < 0.0005, **** P < 0.00005 マンホイットニー順位和検定。140 日齢の AM または PBS で処理した WT および SOD1-Tg マウスの GI 管全体の粘膜および管腔サンプルにおける *Akkermansia muciniphila* 16S コピー数の (I) 個々のおよび (J) 平均の qPCR ベースの倍率変化。(K) SOD1-Tg の属細菌の概要、または (L) PBS または AM で処理された WT マウス。

【図22】図22 A~C。 *Akkermansia muciniphila* (ATCC 2869) での治療は、SOD1-Tg マウスの ALS 症状を軽減する。Ab^x で前処理

10

20

30

40

50

した SOD1-Tg および WT 同腹仔対照マウスを、60日齢から実験の終点までビヒクルとして AM (ATCC 2869) または PBS で経口投与した。60日目、80日目、100日目、120日目、および 140 日目に、マウスの運動能力を (A)、ロータロッド、(B) 吊り下げワイヤーグリップテスト、および (C) 神経学的スコアリングによって評価した。(N = 8 ~ 10 マウス)、**P < 0.005、マンホイットニー U 検定。

【図 23】図 23 A ~ J。Akkermansia muciniphila での治療は、SOD1-Tg マウスの粘液特性を変化させる。140 日齢の (A) PBS および (B) AM (BAA-835) Abx で前処理した WT および SOD1-Tg マウスの遠位結腸粘膜の免疫組織化学的評価。DNA は Sytox-green (緑) で染色され、粘液は抗 MUC2C3 抗血清とヤギ抗 Ig (赤) で染色された。上皮と外側の粘液 / 管腔の細菌の間の非染色領域は内側の粘液層であり、この中の細菌へのポイントが可能になる。(C) 総粘液プロテオミクスラングリップおよび (D) AM 関連ペプチドのヒートマップ表現および (E ~ J) 主要な代表的な粘液成分の定量化。(N = 4 ~ 8 マウス)、マンホイットニー U 検定。

【図 24】図 24 A ~ G。血清のメタボロミクスのプロファイルは、ALS SOD1-Tg マウスの抗生物質または AM の治療の影響を受ける。100 日齢の血清代謝物のヒートマップ表現 (A) ナイーブ SOD1-Tg およびそれらの WT 同腹仔、(B) 水または Abx の処理の SOD1-Tg マウス、(C) PBS または AM の処理の SOD1-Tg マウス。(D) 腸内マイクロバイオームに由来する可能性によって SOD1-Tg マウスの Abx 治療によって有意に変化した上位 6 つの血清代謝物のスコアリング。(E) ロータロッド、(F) 吊り下げワイヤーグリップテスト、および (G) 神経学的スコアリングによって示される皮下浸透圧ポンプを使用したフェノール硫酸塩またはビヒクル処理 SOD1-Tg マウスの運動能力。

【図 25】図 25 A ~ B。トリプトファンとニコチニアミドの代謝は、ALS SOD1-Tg マウスの抗生物質または AM 治療の影響を受ける。(A) 水および Abx 処理または (B) PBS および AM 処理された 100 日齢の SOD1-Tg マウスのトリプトファン代謝の非標的メタボロミクス評価。

【図 26】図 26 A ~ I。ニコチニアミド処理は、SOD1-Tg マウスの ALS の進行を改善する。(A, D および G) ロータロッド、(B, E および H) 吊り下げワイヤーグリップテスト、および (C, F および I) 神経学的スコアリングによって示される皮下浸透圧ポンプを使用した NAM またはビヒクル処理 SOD1-Tg マウスの運動能力。(N = 10 匹のマウス)。*P < 0.05、**P < 0.005、***P < 0.0005、****P < 0.00005、マンホイットニー U 検定。

【図 27】図 27 A ~ C。NAM 産生が損なわれた腸共生菌による SOD1-Tg マウスの単回接種 (A) WT または nadA の E. coli 培養物中のニコチニアミドレベル。***P < 0.0005、マンホイットニー U 検定。(B) ロータロッドおよび (C) 吊り下げワイヤーグリップテストによって示される、WT または nadA の E. coli を接種した Abx で前処理した SOD1-Tg マウスの運動能力。

【図 28】NAM は、核呼吸因子 - 1 (NRF-1) に関連する遺伝子を差次的に発現した。SOD1-Tg マウスの AM および NAM 処理後に同様に変化し、核呼吸因子 - 1 (NRF-1) 転写因子の結合部位を共有する RNA-seq 分析によって得られた脊髄転写物の表現。分析は、G: Profiler プラットフォーム⁸⁵を使用して行われた。

【図 29】図 29 A ~ B。ALS 患者における異なる腸内マイクロバイオームの組成と血清代謝物のプロファイル。(A) メタゲノムショットガンシーケンシングによって得られた健常な家族および ALS 患者の腸内マイクロバイオームの種レベルでの分類群の概要表現および ALS 患者と健常な対照の個体の間の上位 20 の変化した細菌種の表。(B) 非標的化メタボロミクスによって得られた健常な個人 (N = 13) と ALS 患者 (N = 23) の間で差次的に表された血清代謝物の上位 97。

【発明を実施するための形態】

【0044】

本発明は、そのいくつかの実施形態において、筋萎縮性側索硬化症（ALS）を治療する方法、より具体的には、ただし排他的になることなく、細菌集団またはその代謝物による治療に関する。

【0045】

本発明の少なくとも1つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明は、その適用において、以下の説明に記載されるか実施例によって例示される詳細に必ずしも限定されないことを理解されたい。本発明は、他の実施形態が可能であり、または様々な方法で実施または実行することができる。

【0046】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、特発性の遺伝的影響を受けた神経変性疾患であり、その様々な発症と臨床経過は、未知の環境要因によって引き起こされる可能性がある。

10

【0047】

本発明者らは、最も一般的に使用されるALSマウスモデル（SOD1-Tgマウスマodel）における広域スペクトル抗生物質誘発性腸内マイクロバイオームの枯渇が、疾患の症状の悪化につながることを今や実証している（図1A～K）。さらに、SOD1-Tgマウスマウスの腸内マイクロバイオームの組成とメタゲノム機能は、運動の臨床症状が現れる前でさえ、WTの同腹仔と比較して変化し、これらのマウスの全身メタボロミクスプロファイルが著しく変化した（図2A～H）。

【0048】

いくつかの微生物種は、SOD1-Tgマウスの疾患の重症度と相関または反相関していることが確認された。これらのうち、*Akkermansia muciniphila* (AM) の嫌気性単培養によるSOD1-Tgの抗生物質後のコロニー形成は、運動の症状と生存の改善をもたらし（図3A～H）、一方で*Ruminococcus*によるコロニー形成は、疾患の症状の悪化と関連していた（図14A～Mおよび図15A～I）。さらに、ニコチンアミド（NAM）生合成経路の主要なAM由来微生物遺伝子は、AM補充SOD1-Tgマウスの腸内マイクロバイオームで強化され、一方でNAとその生合成中間体は、この設定ではAM処理したSOD1-Tgマウスの脳脊髄液（CSF）および血清で強化された（図4A～F）。さらに、SOD1-Tgマウスの全身的なNAM補給は、明確な有益なCNSトランスクリプトーム修飾と相まって、運動ニューロン症状の臨床的改善を誘発した（図5A～Fおよび6A～E）。ヒトでは、健常な家族の対照と比較して、ALS患者では、異生物性腸内マイクロバイオームのメタゲノム構成、歪んだ血清メタボロミクスプロファイル、および血清とCSFのNAMレベルの変化が、認められた（図7A～E）。総合すると、これらの結果は、ALS動物モデルおよび潜在的にヒトにおいて、異なる腸内共生生物、それらの調節された代謝物、および運動症状の間に調節リンクが存在する可能性があることを示唆している。

20

【0049】

結果として、本教示は、ALSの治療のための腸内マイクロバイオーム関連調節剤の使用を示唆している。

30

【0050】

したがって、本発明の第1の態様によれば、4-ヒドロキシ安息香酸プロピル、トリエタノールアミン、セロトニン、2-ケト-3-デオキシ-グルコン酸塩、N-トリメチル5-アミノ吉草酸、フェニルアラニルグリシン、テオプロミン、シスグリ、グルタメート、1-パルミトイyl-2-ドコサヘキサエノイル-GPC、シュウ酸塩、ステアロイルスフィンゴミエリン、1-パルミトイyl-2-ドコサヘキサエノイル-GPC (16:0/22:6)、3-ウレイドプロピオネート、1-(1-エニル-パルミトイyl)-2-アラキドノイル-GPC (P-16:0/20:4)、パルミトイylスフィンゴミエリン(d18:1/16:0)、スフィンゴミエリン(d18:1/18:1, d18:2/18:0)、ピルビン酸、タウロコレート、N-アセチルチロシン、タウロ-ベータ-ムリコレート、タウロウルソデオキシコレート、フェノール硫酸塩、エクオール硫酸塩、シンナメート、フェニルプロピオニルグリシン、2-アミノフェノールサルフェート、4-ア

40

50

リルフェノールサルフェート、エクオールグルクロニド、パルミトレオイル - リノレオイル - グリセロール、オレオイル - リノレノイル - グリセロール、1 - パルミトイール - 2 - オレオイル - G P E、ハイドロキノンサルフェート、グアイアコールサルフェート、ジアシルグリセロール、パルミトイール - リノレオイル - グリセロール、ゲンチセート、および 13 - H O D E + 9 - H O D E からなる群から選択される治療有効量の代謝物を対象に投与し、それによって A L S を治療することを含む、それを必要とする対象において A L S を治療する方法が提供される。

【 0 0 5 1 】

本明細書で使用される場合、「治療」という用語は、A L S の進行を無効にする、実質的に阻害する、遅らせる、または逆転させる、A L S の臨床的または審美的症状を実質的に改善する、またはA L S の臨床的または審美的症状の出現を実質的に防止することを含む。

10

【 0 0 5 2 】

本明細書で使用される場合、「治療する」という用語は、病状（すなわち、A L S）の発症を阻害、予防または阻止すること、および / または病状の軽減、寛解、または退行を引き起こすことを指す。当業者は、本明細書でさらに開示されるように、様々な方法論およびアッセイを使用して、病状の発生または病状の減少、寛解または退行を評価できることを理解するであろう。

20

【 0 0 5 3 】

筋萎縮性側索硬化症（A L S）は、ルーゲーリック病および運動ニューロン疾患（M N D）とも呼ばれ、随意筋運動を制御する中枢神経系の神経細胞である運動ニューロンの変性によって引き起こされる進行性の致命的な神経変性疾患である。A L S は通常、上位運動ニューロンと下位運動ニューロンの両方が変性し、筋肉へのメッセージの送信を停止するため、全身の筋力低下と萎縮を引き起こす。筋肉は、機能できず、徐々に弱くなり、除神経のために線維束性収縮（単収縮）を発症し、最終的にはその除神経のために萎縮する。罹患した対象は、最終的にすべての随意運動を開始および制御する能力を失う可能性がある。膀胱括約筋と腸括約筋、および眼球運動を司る筋肉は、常にではないが、通常は無事である。認知機能障害または行動機能障害もこの疾患に関連している。A L S 対象の約半数が認知と行動に軽度の変化を経ており、10 ~ 15 % が前頭側頭型認知症の兆候を示している。言語機能障害、高次機能障害、および社会的認知と言語記憶の問題は、A L S で最も一般的に報告されている認知症状である。

30

【 0 0 5 4 】

本明細書で使用される「A L S」という用語は、古典的 A L S（典型的には下位運動ニューロンおよび上位運動ニューロンの両方に影響が及ぶ）、原発性側索硬化症（P L S、典型的には上位運動ニューロンのみに影響が及ぶ）、進行性球麻痺（P B P または B u l b a r O n s e t、通常は飲み込み、噛み碎き、発話の困難が開始する A L S の変形版）、進行性筋萎縮性筋萎縮症（P M A、通常は下位運動ニューロンにのみ影響が及ぶ）を含むがこれらに限定されない、当技術分野で知られる A L S のすべての分類を含む。

30

【 0 0 5 5 】

特定の実施形態によれば、A L S は古典的な A L S である。

40

【 0 0 5 6 】

「A L S」という用語には、孤発性および家族性（遺伝性）A L S、任意の進行速度のA L S（すなわち、急速または遅い進行）、および任意の段階のA L S（例えば、A L S の発症前、発症および後期）が含まれる。

【 0 0 5 7 】

特定の実施形態によれば、A L S は孤発性 A L S である。

【 0 0 5 8 】

特定の実施形態によれば、A L S は家族性 A L S である。

【 0 0 5 9 】

特定の実施形態によれば、A L S は急速進行性 A L S である。

50

【0060】

本明細書で使用される場合、「急速進行性ALS」という句は、症状が継続的に進行し、診断から1年未満以内に運動ニューロンの著しい劣悪化が観察され、最大4年対象が生存し得るALSを指す。特定の実施形態によれば、急速進行性ALSは、1ヶ月の期間にわたって0.65 ALSFRS-Rポイントを超える変化を特徴とする。

【0061】

特定の実施形態によれば、ALSは、ALS関連うつ病である。

【0062】

本明細書で使用される場合、「ALS関連うつ病」という句は、ALS発症後に始まるうつ病および/または不安症を指す。特定の実施形態によれば、ALS関連うつ病は、ALSの作用機序の一部であり、例えば、情動調節障害と前頭葉型認知症ALSに起因する可能性がある。うつ病を診断および監視する方法は当技術分野で周知であり、ALSうつ病目録(ADI-12)、ベックうつ病目録(BDI)および病院不安抑うつ尺度(HADS)質問票が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0063】

上記のように、本発明の方法は、とりわけ、ALSを治療することを対象とする。治療は、ALS症状の検出後を含め、疾患のどの段階でも開始できる。

【0064】

ALSの検出は、体内のどの運動ニューロンが最初に損傷を受けているか(したがって、体内のどの筋肉が最初に損傷を受けているか)に応じて、様々な症状の出現によって判断される場合がある。一般に、ALS症状には、典型的には明らかな衰弱および/または筋萎縮である最も初期の症状が含まれる。その他の症状には、筋肉の線維束性収縮(単収縮)、けいれん、または影響の及んだ筋肉のこわばり、腕や脚に影響を与える筋力低下、および/または不明瞭な発話や鼻声が含まれる。ほとんどのALS患者は、腕または脚に最初の症状が出る。明瞭な発話や嚥下の困難に、他者が最初に気づく。その他の症状には、嚥下困難、舌の可動性の喪失、呼吸困難などがある。

20

【0065】

症状は、変性した神経系の部分、すなわち上位運動ニューロンと下位運動ニューロンによって分類することもできる。上位運動ニューロン変性の症状には、筋肉の緊張と硬直(痙攣)、および過剰な絞扼反射を含む反射の亢進(反射亢進)が含まれる。下位運動ニューロン変性の症状には、筋力低下と萎縮、筋肉のけいれん、および皮膚の下に見られる筋肉のつかの間の単収縮(線維束性収縮)が含まれる。ALSと診断されるには、患者が他の原因に帰属し得ない上位および/または下位運動ニューロン損傷の兆候と症状患っている必要がある。

30

【0066】

あるいは、治療は、疾患の進行段階で開始され得る、例えば、筋力の低下と萎縮が体の様々な部分に広がり、対象は、動き[例えば、対象は、引き締まった筋肉(痙攣)、誇大な反射(反射亢進)、筋力低下と萎縮、筋肉のけいれん、および/または皮膚の下に見られる筋肉のつかの間の単収縮(線維束性収縮)に苛まれることがある]、飲み込み(嚥下障害)、発話、または言葉の形成に関する問題が増加する場合がある。

40

【0067】

ALSの進行を監視する方法は、当技術分野でよく知られている。そのような方法の非限定的な例には、医師による身体的評価; 体重; 心電図(ECG); ALS機能評価尺度(ALSFRSまたはALSFRS-R)のスコア; 例えば肺活量(努力性肺活量または通常の肺活量)によって測定することができる呼吸機能; 例えばハンドヘルドダイナモメトリー(HHD)、握力ダイナモメトリー、手動筋力テスト(MMT)、電気インピーダンス筋電図(EIM)、および最大自発的等尺性収縮テスト(MVICT)によって測定することができる筋力; 運動ユニット数推定(MUNE); 例えばALSうつ病目録(ADI-12)、ベックうつ病目録(BDI)および病院不安うつ病尺度(HADS)質問票によって測定することができる認知/行動機能; 例えばALS評価質問票(ALS-AQ

50

- 40) によって評価することができる生活の質；および A k t リン酸化および p A k t : t A k t 比が含まれる（その内容は参照により本明細書に完全に組み込まれる国際特許出願公開第 WO 2012 / 160563 号を参照されたい）。

【 0068 】

特定の実施形態によれば、対象は、ALS 機能評価尺度 (ALSFRS)；呼吸機能；筋力および / または認知機能によって監視される。

【 0069 】

特定の実施形態によれば、筋力は、ハンドヘルドダイナモメトリー (HHD)、握力ダイナモメトリー、手動筋力テスト (MMT) および電気インピーダンス筋電図 (EIM) からなる群から選択される方法によって評価される。それぞれの可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

10

【 0070 】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、疾患（すなわち、ALS）と診断された、または疾患（すなわち、ALS）を発症するリスクがある、任意の年齢および任意の性別のヒトである対象を指す。

【 0071 】

特定の実施形態によれば、対象は、急速進行性 ALS および / または ALS 関連のうつ病を有する。

【 0072 】

特定の実施形態によれば、対象は、可能性があり明確な ALS のエル・エスコリアル基準を満たしている、すなわち、対象は以下を提示している。

20

【 0073 】

1. 臨床的、電気生理学的または神経病理学的検査による下位運動ニューロン (LMN) 変性の兆候、

2. 臨床検査による上位運動ニューロン (UMN) 変性の兆候、および

3. ある地域内または他の地域への兆候の漸進的な広がり。併せて、以下が欠如している。

- LMN および / または UMN 変性の兆候を説明し得る他の疾患のプロセスの電気生理学的証拠、および

- 観察された臨床的および電気生理学的兆候を説明し得る他の疾患のプロセスの神経画像による証拠。

30

【 0074 】

特定の実施形態によれば、対象は、本発明による治療前に 26 ~ 42 の ALSFRS-R スコアを有する。

【 0075 】

特定の実施形態によれば、対象は、本発明による治療前の過去 3 ~ 12 ヶ月にわたって、月あたり 0 . 65 の ALSFRS - R ポイントを超える疾患進行速度を有する。

【 0076 】

前述のように、この方法は、治療有効量の以下の細菌代謝物のうちの少なくとも 1 つを対象に投与することを含む：4 - ヒドロキシ安息香酸プロピル、トリエタノールアミン、セロトニン、2 - ケト - 3 - デオキシ - グルコン酸塩、N - トリメチル 5 - アミノ吉草酸、フェニルアラニルグリシン、テオプロミン、シスグリ、グルタメート、1 - パルミトイール - 2 - ドコサヘキサエノイル - GPC、シュウ酸塩、ステアロイルスフィンゴミエリン、1 - パルミトイール - 2 - ドコサヘキサエノイル - GPC (16 : 0 / 22 : 6)、3 - ウレイドプロピオネート、1 - (1 - エニル - パルミトイール) - 2 - アラキドノイル - GPC (P - 16 : 0 / 20 : 4)、パルミトイ尔斯フィンゴミエリン (d18 : 1 / 16 : 0)、スフィンゴミエリン (d18 : 1 / 18 : 1、d18 : 2 / 18 : 0)、ピルビン酸、タウロコレート、N - アセチルチロシン、タウロ - ベータ - ムリコレート、タウロウルソデオキシコレート、フェノール硫酸塩、エクオール硫酸塩、シンナメート、フェニルプロピオニルグリシン、2 - アミノフェノールサルフェート、4 - アリルフェノールサ

40

50

ルフェート、エクオールグルクロニド、パルミトレオイル - リノレオイル - グリセロール、オレオイル - リノレノイル - グリセロール、1 - パルミトイール - 2 - オレオイル - G P E、ハイドロキノンサルフェート、グアイアコールサルフェート、ジアシルグリセロール、パルミトイール - リノレオイル - グリセロール、ゲンチセート、および 13 - H O D E + 9 - H O D E。

【0077】

特定の実施形態によれば、4 - ヒドロキシ安息香酸プロピル、トリエタノールアミン、セロトニン、2 - ケト - 3 - デオキシ - グルタメートニコチニアミド、N - トリメチル 5 - アミノ吉草酸、フェニルアラニルグリシン、テオブロミン、シスグリ、グルタメートおよび 1 - パルミトイール - 2 - ドコサヘキサエノイル - G P C からなる群から選択される少なくとも 2 つの代謝物が提供される。

10

【0078】

別の実施形態では、細菌代謝物ニコチニアミドは、上記の代謝物の 1 つと一緒に提供される。

【0079】

さらに別の実施形態では、細菌代謝物ニコチニアミドは提供されない。

【0080】

本明細書で使用される場合、「シンナメート」という用語は、シンナメート、その塩、シンナメートエステル、p - ジメチルアミノシンナメート、シンナムアルデヒド、酢酸シンナミル、シンナミルアルコール、安息香酸シンナミル、シンナメートシンナミル、ギ酸シンナミル、イソ酪酸シンナミル、イソ吉草酸シンナミル、およびフェニル酢酸シンナミル、およびそれらの組み合わせを指す。

20

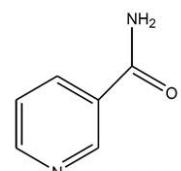
【0081】

本発明のこの態様のエクオールは、(S) - エクオール(例えば、閉経期の女性のほてりの治療のために現在開発中の A U S - 131) であり得る。一実施形態では、エクオールはエクオール塩、例えば、エクオール硫酸塩である。

【0082】

「ナイアシンアミド」としても知られるニコチニアミド(N A)は、ビタミン B 3(ナイアシン)のアミド誘導体である。N A の化学式は C₆H₆N₂O である。

30



ニコチニアミド(N A)

【0083】

ニコチニアミド、ならびに本発明で使用される他の化合物は、塩、錯体、水和物および溶媒和物を形成することができる場合があり、定義された処理においてそのような形態を使用することができる本明細書で企図されているということが、当業者によって理解される。高純度のニコチニアミド製剤、例えば純度 97 または 99 % が、市販されている。そのような市販の製剤は、本発明の方法で使用するためのニコチニアミド組成物を調製するために適切に使用され得る。さらに、高純度のニコチニアミドの合成方法は、当業者に知られている。

40

【0084】

特定の実施形態によれば、ニコチニアミドは、ニコチニアミド誘導体またはニコチニアミド模倣物である。本明細書で使用される「ニコチニアミド(N A)の誘導体」という用語は、天然の N A の化学的に修飾された誘導体である化合物を意味する。一実施形態では、化学修飾は、アミド部分の窒素または酸素原子を介した、(環の炭素または窒素メンバ

50

ーを介した) 基本的な N A 構造のピリジン環の置換であり得る。置換される場合、1つまたは複数の水素原子を置換基で置き換えることができ、および/または置換基を N 原子に結合させて、四価の正に帯電した窒素を形成することができる。したがって、本発明のニコチニアミドは、置換または非置換のニコチニアミドを含む。別の実施形態では、化学修飾は、単一の基の欠失または置換例えば、N A のチオベンズアミド類似体を形成することであり得、このすべては、有機化学に精通している人々に認められている。本発明の文脈における誘導体はまた、N A のヌクレオシド誘導体(例えば、ニコチニアミドアデニン)を含む。N A の様々な誘導体が記載されており、一部はまた、P D E 4 酵素の阻害活性(WO 03/068233; WO 02/060875; GB 2327675 A)に関連して、またはV E G F 受容体チロシンキナーゼ阻害剤(WO 01/55114)として記載されている。例えば、4-アリール-ニコチニアミド誘導体を調製するプロセス(WO 05/014549)として記載されている。他の例示的なニコチニアミド誘導体は、WO 01/55114およびEP 2128244に開示されている。

【0085】

ニコチニアミド模倣物には、ニコチニアミドの修飾型、および多能性細胞からのR P E 細胞の分化および成熟におけるニコチニアミドの効果を再現するニコチニアミドの化学的類似体が含まれる。例示的なニコチニアミド模倣物には、安息香酸、3-アミノ安息香酸、および6-アミノニコチニアミドが含まれる。ニコチニアミド模倣物として作用する可能性のある別のクラスの化合物は、ポリ(A D P - リボース)ポリメラーゼ(P A R P)の阻害剤である。例示的なP A R P 阻害剤には、3-アミノベンズアミド、イニパリブ(B S I 201)、オラパリブ(A Z D - 2281)、ルカパリブ(A G 014699、P F - 01367338)、ベリパリブ(A B T - 888)、C E P 9722、M K 4827、およびB M N - 673が含まれる。

【0086】

一実施形態では、ニコチニアミドはニコチニアミドアデニンジヌクレオチド(N A D)である。別の実施形態では、ニコチニアミドはニコチニアミドリボシドである。

【0087】

本明細書に記載の細菌代謝物の例示的な用量には、1日1~500mg/kgが含まれる。本発明の一実施形態では、治療は、>10mg/kgの毎日の投与、例えば10~500mg/kgの毎日の投与を含む。

【0088】

本発明者らは、上記の細菌代謝物の組み合わせ、例えば、2つの代謝物、3つの代謝物、4つの代謝物、5つの代謝物、6つの代謝物、7つの代謝物、8つの代謝物、9つの代謝物またはそれより多い代謝物を企図している。

【0089】

したがって、例えば、組み合わせは以下を含み得る:

ニコチニアミドとフェノール硫酸塩;

ニコチニアミドとエクオール;

ニコチニアミドとシンナメート;

ニコチニアミド、フェノール硫酸塩およびエクオール;

ニコチニアミド、フェノール硫酸塩およびシンナメート;

ニコチニアミド、エクオールおよびシンナメート;

ニコチニアミド、エクオール、フェノール硫酸塩およびシンナメート。

【0090】

ニコチニアミド、および、4-ヒドロキシ安息香酸プロピル、トリエタノールアミン、セロトニン、2-ケト-3-デオキシ-グルタメートニコチニアミド、N-トリメチル5-アミノ吉草酸、フェニルアラニルグリシン、テオブロミン、シスグリ、グルタメートおよび1-パルミトイ-2-ドコサヘキサエノイル-G P C からなる群から選択される代謝物の少なくとも1つ。

【0091】

10

20

30

40

50

細菌代謝物は、それ自体で、または医薬組成物の一部として提供され得、それは適切な担体または賦形剤と混合される。

【0092】

本明細書で使用される場合、「医薬組成物」は、生理学的に適切な担体および賦形剤などの他の化学成分を用いた、本明細書に記載の有効成分の1つまたは複数の調製物を指す。医薬組成物の目的は、生物への化合物の投与を容易にすることである。

【0093】

本明細書において、「有効成分」という用語は、生物学的効果を司る、本明細書に記載の細菌代謝物の1つまたは複数を指す。

【0094】

以下、互換的に使用され得る「生理学的に許容される担体」および「薬学的に許容される担体」という句は、生物に重大な刺激を引き起こさず、投与された化合物の生物学的活性および特性を無効にしない担体または希釈剤を指す。これらの句にはアジュvantが含まれている。

【0095】

本明細書において、「賦形剤」という用語は、有効成分の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性物質を指す。賦形剤の例には、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖およびデンプンの種類、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油、およびポリエチレングリコールが含まれるが、これらに限定されない。

【0096】

薬物の処方および投与のための技術は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、Mack Publishing Co、ペンシルベニア州イーストン、最新版に見出すことができ、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【0097】

適切な投与経路は、例えば、経口、直腸、経粘膜、特に経鼻、腸または非経口送達を含み得、これには、筋肉内、皮下および髄内注射、ならびに髄腔内、直接脳室内、心臓内、例えば、右心室腔または左心室腔内、総頸動脈内、静脈内、腹腔内、鼻腔内、または眼内への注射が含まれ得る。

【0098】

特定の実施形態によれば、薬剤は経口または直腸に投与される。

【0099】

あるいは、例えば、患者の組織領域に直接医薬組成物を注射することにより、全身的ではなく局所的な方法で、医薬組成物を投与することができる。

【0100】

「組織」という用語は、1つまたは複数の機能を実行するように設計された細胞からなる生物の一部を指す。例としては、脳組織、網膜、皮膚組織、肝組織、脾臓組織、骨、軟骨、結合組織、血液組織、筋肉組織、心臓組織、脳組織、血管組織、腎組織、肺組織、性腺組織、造血組織が挙げられるが、これらに限定されない。

【0101】

本発明のいくつかの実施形態の医薬組成物は、当技術分野で周知のプロセスによって、例えば、従来の混合、溶解、造粒、糖衣錠製造、浮揚、乳化、カプセル化、捕捉または凍結乾燥のプロセスによって製造することができる。

【0102】

したがって、本発明のいくつかの実施形態に従って使用するための医薬組成物は、有効成分を薬学的に使用できる調製物に加工することを容易にする、賦形剤および助剤を含む、1つまたは複数の生理学的に許容される担体を使用して、従来の方法で処方することができる。適切な製剤は、選択した投与経路によって異なる。

【0103】

注射の場合、医薬組成物の有効成分は、水溶液、好ましくはハンクス液、リンゲル液、または生理食塩水緩衝液などの生理学的に適合性のある緩衝液に処方することができる。

10

20

30

40

50

経粘膜投与の場合、浸透するバリアに適した浸透剤が製剤において使用される。そのような浸透剤は、当技術分野で一般的に知られている。

【0104】

経口投与の場合、医薬組成物は、活性化合物を当技術分野で周知の薬学的に許容される担体と組み合わせることによって容易に処方することができる。そのような担体は、患者による経口摂取のために、医薬組成物を錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして処方することを可能にする。経口使用のための薬理学的調製物は、固体賦形剤を使用して作製でき、任意選択で得られた混合物を粉碎し、顆粒の混合物を処理して、適切な助剤を添加した後、所望するのであれば、錠剤または糖衣錠のコアを得る。適切な賦形剤は、特に、糖、例えば、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトール；セルロース調製物、例えば、トウモロコシデンプン、小麦デンプン、米デンプン、馬鈴薯デンプン、ゼラチン、トラガカントガム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボメチルセルロースナトリウム、および／または生理学的に許容されるポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン（PVP）などの充填剤である。所望であれば、崩壊剤、例えば、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸、またはそれらの塩、例えばアルギン酸ナトリウムを添加することができる。

10

【0105】

糖衣錠コアには適切なコーティングが施されている。この目的のために、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、二酸化チタン、ラッカーリ溶液、および適切な有機溶媒または溶媒混合物を任意選択で含み得る強化糖溶液を使用することができる。染料または顔料は、識別のために、または活性化合物の用量の異なる組み合わせを特徴づけるために、錠剤または糖衣錠コーティングに添加され得る。

20

【0106】

経口にて使用できる医薬組成物には、ゼラチンで作られたプッシュフィットカプセル、ならびにゼラチンおよびグリセロールまたはソルビトールなどの可塑剤で作られた柔らかく密封されたカプセルが含まれる。プッシュフィットカプセルは、ラクトースなどの充填剤、デンプンなどの結合剤、タルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、および任意選択で安定剤と混合した有効成分を含み得る。ソフトカプセルでは、有効成分は、脂肪油、流動パラフィン、または液体ポリエチレングリコールなどの適切な液体に溶解または懸濁され得る。さらに、安定剤を加えることができる。経口投与用のすべての製剤は、選択した投与経路に適した投与量であるべきである。

30

【0107】

頬側投与の場合、組成物は、従来の方法で処方された錠剤またはロゼンジの形態をとることができる。

【0108】

経鼻吸入による投与の場合、本発明のいくつかの実施形態による使用のための有効成分は、適切な噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタンまたは二酸化炭素を使用して、加圧パックまたはネブライザからエアゾールスプレーの呈示の形で、便利にも送達される。加圧エアロゾルの場合、投与ユニットは、計量された量を送達するためのバルブを設けることによって、決定することができる。ディスペンサーで使用するための例えばゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、化合物と適切な粉末ベース、例えばラクトースまたはデンプンの粉末混合物を含むように処方することができる。

40

【0109】

本明細書に記載の医薬組成物は、例えば、ボーラス注射または持続注入による非経口投与用に処方することができる。注射用製剤は、単位剤形で、例えば、アンプルで、または任意選択で防腐剤を添加した複数回投与容器で提示することができる。組成物は、油性または水性ビヒクル中の懸濁液、溶液または乳濁液であり得、懸濁剤、安定剤および／また

50

は分散剤などの配合剤を含み得る。

【0110】

非経口投与用の医薬組成物には、水溶性形態の活性製剤の水溶液が含まれる。さらに、有効成分の懸濁液は、適切な油性または水ベースの注射懸濁液として調製することができる。適切な親油性溶媒またはビヒクリには、ゴマ油などの脂肪油、またはオレイン酸エチル、トリグリセリドまたはリポソームなどの合成脂肪酸エステルが含まれる。水性注射懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランなどの懸濁液の粘度を増加させる物質を含み得る。任意選択で、懸濁液はまた、高い濃度の溶液の調製を可能にするために、有効成分の溶解度を増加させる適切な安定剤または薬剤を含み得る。

10

【0111】

あるいは、有効成分は、使用前に、適切なビヒクリ、例えば、無菌のパイロジエンフリーの水ベースの溶液と構成するための粉末形態であり得る。

【0112】

本発明のいくつかの実施形態の医薬組成物はまた、例えば、カカオバターまたは他のグリセリドなどの従来の坐剤基剤を使用して、坐剤または停留浣腸などの直腸組成物に処方され得る。

【0113】

本発明のいくつかの実施形態の文脈での使用に適した医薬組成物には、有効成分が意図された目的を達成するのに有効な量で含まれている組成物が含まれる。より具体的には、治療有効量とは、障害（例えば、ALS）の症状を予防、緩和または改善するか、または治療される対象の生存を延長するのに有効な有効成分（例えば、ニコチニアミド）の量を意味する。

20

【0114】

治療有効量の決定は、特に本明細書で提供される詳細な開示に照らして、十分当業者の能力の範囲内である。

【0115】

本発明の方法で使用される任意の調製物について、治療有効量または用量は、最初に、インビトロおよび細胞培養アッセイから推定することができる。例えば、所望の濃度または効率を達成するために、動物モデルにおいて用量を処方することができる。このような情報は、ヒトの有用な用量をより正確に判断するために使用できる。

30

【0116】

本明細書に記載の有効成分の毒性および治療効果は、細胞の培養または実験動物において、インビトロでの標準的な製薬の処置によって判断することができる。これらの *in vitro* および細胞培養アッセイおよび動物実験から得られたデータは、ヒトで使用するための一連の投与量を処方する際に使用することができる。投与量は、使用される剤形および利用される投与経路に応じて変化し得る。正確な処方、投与経路、および投与量は、患者の状態を考慮して個々の医師が選択することができる。（例えば、Fingl, et al. の 1975 年、‘‘The Pharmacological Basis of Therapeutics’’、Ch. 1 p. 1 を参照）。

40

【0117】

投与量と間隔は、有効成分の血液、脳、またはCSF レベルが生物学的効果（最小有効濃度、MEC）を誘発または抑制するのに十分であるように個別に調整することができる。MEC は製剤ごとに異なるが、*in vitro* のデータから推定できる。MEC を達成するために必要な投与量は、個々の特性と投与経路によって異なる。検出アッセイは、血漿濃度を判定するために使用することができる。

【0118】

治療される状態の重症度および応答性に応じて、投薬は、単回または複数回の投与であり得、治療の過程は、数日から数週間、または治癒がもたらされるか、または病状の減少が達成されるまで続く。

50

【0119】

もちろん、投与される組成物の量は、治療される対象、苦痛の重症度、投与方法、処方する医師の判断などに依存する。

【0120】

本発明のいくつかの実施形態の組成物は、必要に応じて、有効成分を含む1つまたは複数の単位剤形を含み得る、FDA承認キットなどのパックまたはディスペンサーデバイスで提示され得る。パックは、例えば、ブリスター・パックなどの金属またはプラスチック箔を含み得る。パックまたはディスペンサー・デバイスには、投与の説明書が添付されている場合がある。パックまたはディスペンサーは、医薬品の製造、使用、または販売を規制する政府機関によって規定された形式の容器に関連する通知に適合され得る。この通知は、組成物の形態またはヒトまたは獣医の投与の機関による承認を反映している。このような通知は、例えば、処方薬について米国食品医薬品局によって承認されたラベル、または承認された製品挿入物に関するものである可能性がある。適合性のある医薬担体に処方された本発明の調製物を含む組成物はまた、調製され、適切な容器に入れられ、上でさらに詳述されるように、示された状態の治療のために標識され得る。

10

【0121】

本発明の代謝物は、食品（フードバー、ビスケット、スナック食品、および当技術分野で周知の他の標準的な食品形態など）、または飲料配合物で提供することができる。飲料には、香料、緩衝液などを含めることができる。本発明の代謝物を含む栄養補助食品もまた企図される。

20

【0122】

本発明のこの態様の代謝物は、代謝物を生成する微生物を含むプロバイオティクス組成物を介して提供することができる。

【0123】

本明細書で使用される「プロバイオティクス」という用語は、適切に投与されると、宿主または対象への健康上の利益、および／またはリスクの減少、および／または宿主生物における疾患（ALSなど）の症状、障害、状態、またはイベントの軽減を与えることができる、1つまたは複数の微生物を指す。

【0124】

したがって、本発明の別の態様によれば、*Streptococcus thermophilus*、*Faecalibacterium prausnitzii*、*Eubacterium rectale*、*Bacteroides plebeius*、*Coprococcus*、*Roseburia hominis*、*Eubacterium ventriosum*、*Lachnospiraceae*、*Eubacterium hallii*、*Bacteroidales*、*Bifidobacterium pseudocatenulatum*、*Anaerostipes hadrus*、*Akkermansia muciniphila* (AM)、*Anaeroplasma*、*Prevotella*、*Distanosis*、*Parabacteroides* (例えば、*Parabacteroides distasonis*、*Parabacteroides goldsteinii*)、*Rikenellaceae*、*Alistipes*、*Candidatus Arthromitus*、*Eggerthella*、*Oscillibacter*、*Subdoligranulum*、および*Lactobacillus* (例えば、*Lactobacillus murinus*) の少なくとも1つを含む治療有効量の細菌組成物を対象に投与することを含む、ALSを治療する方法が提供される。

30

【0125】

特定の実施形態によれば、細菌組成物は、*Streptococcus thermophilus*、*Faecalibacterium prausnitzii*、*Eubacterium rectale*、*Bacteroides plebeius*、*Coprococcus*、*Roseburia hominis*、*Eubacterium ventriosum*、*Lachnospiraceae*、*Eubacterium hallii*

40

50

i i、Bacteroidales、Bifidobacterium pseudocatenulatumおよびAnaerostipes hadrusの少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つを含む。

【0126】

特定の実施形態によれば、細菌組成物は、Akkermansia muciniphila (AM)を含む。

【0127】

プロバイオティック微生物は、任意の適切な形態、例えば粉末乾燥形態であり得る。さらに、プロバイオティック微生物は、その生存率を高めるために処理を受けていてもよい。例えば、微生物は、多糖類、脂肪、デンプン、タンパク質、または糖マトリックスにコーティングまたはカプセル化され得る。当技術分野で知られている標準的なカプセル化技術を使用することができる。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第6,190,591号に記載されている技術を使用することができる。

10

【0128】

特定の実施形態によれば、プロバイオティック組成物は、食品、機能性食品、または栄養補助食品に処方される。

【0129】

いくつかの実施形態では、食品、機能性食品または栄養補助食品は、乳製品であるか、または乳製品を含む。いくつかの実施形態では、乳製品は、ヨーグルトの製品であるか、またはヨーグルトの製品を含む。いくつかの実施形態では、乳製品は、ミルクの製品であるか、またはミルクの製品を含む。

20

【0130】

いくつかの実施形態では、乳製品は、チーズの製品であるか、またはチーズの製品を含む。いくつかの実施形態では、食品、機能性食品または栄養補助食品は、果物に由来するジュースまたは他の製品であるか、またはそれらを含む。いくつかの実施形態では、食品、機能性食品または栄養補助食品は、野菜に由来する製品であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、食品、機能性食品または栄養補助食品は、穀物、クラッカー、パン、および/またはオートミールを含むがこれらに限定されない穀物の製品であるか、またはそれらを含む。いくつかの実施形態では、食品、機能性食品または栄養補助食品は、米製品であるか、または米製品を含む。いくつかの実施形態では、食品、機能性食品または栄養補助食品は、肉製品であるか、またはそれを含む。

30

【0131】

投与の前に、対象は、マイクロバイオームに天然に存在する微生物の数を減少させる薬剤で事前の治療をされ得る（例えば、抗生物質の治療によって）。特定の実施形態によれば、治療は、天然に存在する腸内マイクロバイオームを、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、さらには90%まで顕著に排除する。

【0132】

いくつかの特定の実施形態において、投与される適切な用量または量のプロバイオティクスは、in vitroまたは動物モデル試験システムから得られた用量反応曲線から外挿され得る。特定の個人に投与される有効な用量または量は、個人の必要性に応じて、時間とともに変化させる（例えば、増加または減少する）ことができる。細菌が投与されるいくつかの実施形態において、適切な投薬量は、少なくとも約100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000またはそれ以上の細菌細胞を含む。いくつかの実施形態において、本発明は、約1000以上（例えば、約1500、2000、2500、3000、35000、4000、4500、5000、5500、6000、7000、8000、9000、10,000、15,000、20,000、25,000、30,000、40,000、50,000、75,000、100,000、200,000、300,000、400,000、500,000、600,000、700,000、800,000、900,000、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、 9×10^{13} 、 1×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 、 9×10^{14} 、 1×10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 、 9×10^{15} 、 1×10^{16} 、 2×10^{16} 、 3×10^{16} 、 4×10^{16} 、 5×10^{16} 、 6×10^{16} 、 7×10^{16} 、 8×10^{16} 、 9×10^{16} 、 1×10^{17} 、 2×10^{17} 、 3×10^{17} 、 4×10^{17} 、 5×10^{17} 、 6×10^{17} 、 7×10^{17} 、 8×10^{17} 、 9×10^{17} 、 1×10^{18} 、 2×10^{18} 、 3×10^{18} 、 4×10^{18} 、 5×10^{18} 、 6×10^{18} 、 7×10^{18} 、 8×10^{18} 、 9×10^{18} 、 1×10^{19} 、 2×10^{19} 、 3×10^{19} 、 4×10^{19} 、 5×10^{19} 、 6×10^{19} 、 7×10^{19} 、 8×10^{19} 、 9×10^{19} 、 1×10^{20} 、 2×10^{20} 、 3×10^{20} 、 4×10^{20} 、 5×10^{20} 、 6×10^{20} 、 7×10^{20} 、 8×10^{20} 、 9×10^{20} 、 1×10^{21} 、 2×10^{21} 、 3×10^{21} 、 4×10^{21} 、 5×10^{21} 、 6×10^{21} 、 7×10^{21} 、 8×10^{21} 、 9×10^{21} 、 1×10^{22} 、 2×10^{22} 、 3×10^{22} 、 4×10^{22} 、 5×10^{22} 、 6×10^{22} 、 7×10^{22} 、 8×10^{22} 、 9×10^{22} 、 1×10^{23} 、 2×10^{23} 、 3×10^{23} 、 4×10^{23} 、 5×10^{23} 、 6×10^{23} 、 7×10^{23} 、 8×10^{23} 、 9×10^{23} 、 1×10^{24} 、 2×10^{24} 、 3×10^{24} 、 4×10^{24} 、 5×10^{24} 、 6×10^{24} 、 7×10^{24} 、 8×10^{24} 、 9×10^{24} 、 1×10^{25} 、 2×10^{25} 、 3×10^{25} 、 4×10^{25} 、 5×10^{25} 、 6×10^{25} 、 7×10^{25} 、 8×10^{25} 、 9×10^{25} 、 1×10^{26} 、 2×10^{26} 、 3×10^{26} 、 4×10^{26} 、 5×10^{26} 、 6×10^{26} 、 7×10^{26} 、 8×10^{26} 、 9×10^{26} 、 1×10^{27} 、 2×10^{27} 、 3×10^{27} 、 4×10^{27} 、 5×10^{27} 、 6×10^{27} 、 7×10^{27} 、 8×10^{27} 、 9×10^{27} 、 1×10^{28} 、 2×10^{28} 、 3×10^{28} 、 4×10^{28} 、 5×10^{28} 、 6×10^{28} 、 7×10^{28} 、 8×10^{28} 、 9×10^{28} 、 1×10^{29} 、 2×10^{29} 、 3×10^{29} 、 4×10^{29} 、 5×10^{29} 、 6×10^{29} 、 7×10^{29} 、 8×10^{29} 、 9×10^{29} 、 1×10^{30} 、 2×10^{30} 、 3×10^{30} 、 4×10^{30} 、 5×10^{30} 、 6×10^{30} 、 7×10^{30} 、 8×10^{30} 、 9×10^{30} 、 1×10^{31} 、 2×10^{31} 、 3×10^{31} 、 4×10^{31} 、 5×10^{31} 、 6×10^{31} 、 7×10^{31} 、 8×10^{31} 、 9×10^{31} 、 1×10^{32} 、 2×10^{32} 、 3×10^{32} 、 4×10^{32} 、 5×10^{32} 、 6×10^{32} 、 7×10^{32} 、 8×10^{32} 、 9×10^{32} 、 1×10^{33} 、 2×10^{33} 、 3×10^{33} 、 4×10^{33} 、 5×10^{33} 、 6×10^{33} 、 7×10^{33} 、 8×10^{33} 、 9×10^{33} 、 1×10^{34} 、 2×10^{34} 、 3×10^{34} 、 4×10^{34} 、 5×10^{34} 、 6×10^{34} 、 7×10^{34} 、 8×10^{34} 、 9×10^{34} 、 1×10^{35} 、 2×10^{35} 、 3×10^{35} 、 4×10^{35} 、 5×10^{35} 、 6×10^{35} 、 7×10^{35} 、 8×10^{35} 、 9×10^{35} 、 1×10^{36} 、 2×10^{36} 、 3×10^{36} 、 4×10^{36} 、 5×10^{36} 、 6×10^{36} 、 7×10^{36} 、 8×10^{36} 、 9×10^{36} 、 1×10^{37} 、 2×10^{37} 、 3×10^{37} 、 4×10^{37} 、 5×10^{37} 、 6×10^{37} 、 7×10^{37} 、 8×10^{37} 、 9×10^{37} 、 1×10^{38} 、 2×10^{38} 、 3×10^{38} 、 4×10^{38} 、 5×10^{38} 、 6×10^{38} 、 7×10^{38} 、 8×10^{38} 、 9×10^{38} 、 1×10^{39} 、 2×10^{39} 、 3×10^{39} 、 4×10^{39} 、 5×10^{39} 、 6×10^{39} 、 7×10^{39} 、 8×10^{39} 、 9×10^{39} 、 1×10^{40} 、 2×10^{40} 、 3×10^{40} 、 4×10^{40} 、 5×10^{40} 、 6×10^{40} 、 7×10^{40} 、 8×10^{40} 、 9×10^{40} 、 1×10^{41} 、 2×10^{41} 、 3×10^{41} 、 4×10^{41} 、 5×10^{41} 、 6×10^{41} 、 7×10^{41} 、 8×10^{41} 、 9×10^{41} 、 1×10^{42} 、 2×10^{42} 、 3×10^{42} 、 4×10^{42} 、 5×10^{42} 、 6×10^{42} 、 7×10^{42} 、 8×10^{42} 、 9×10^{42} 、 1×10^{43} 、 2×10^{43} 、 3×10^{43} 、 4×10^{43} 、 5×10^{43} 、 6×10^{43} 、 7×10^{43} 、 8×10^{43} 、 9×10^{43} 、 1×10^{44} 、 2×10^{44} 、 3×10^{44} 、 4×10^{44} 、 5×10^{44} 、 6×10^{44} 、 7×10^{44} 、 8×10^{44} 、 9×10^{44} 、 1×10^{45} 、 2×10^{45} 、 3×10^{45} 、 4×10^{45} 、 5×10^{45} 、 6×10^{45} 、 7×10^{45} 、 8×10^{45} 、 9×10^{45} 、 1×10^{46} 、 2×10^{46} 、 3×10^{46} 、 4×10^{46} 、 5×10^{46} 、 6×10^{46} 、 7×10^{46} 、 8×10^{46} 、 9×10^{46} 、 1×10^{47} 、 2×10^{47} 、 3×10^{47} 、 4×10^{47} 、 5×10^{47} 、 6×10^{47} 、 7×10^{47} 、 8×10^{47} 、 9×10^{47} 、 1×10^{48} 、 2×10^{48} 、 3×10^{48} 、 4×10^{48} 、 5×10^{48} 、 6×10^{48} 、 7×10^{48} 、 8×10^{48} 、 9×10^{48} 、 1×10^{49} 、 2×10^{49} 、 3×10^{49} 、 4×10^{49} 、 5×10^{49} 、 6×10^{49} 、 7×10^{49} 、 8×10^{49} 、 9×10^{49} 、 1×10^{50} 、 2×10^{50} 、 3×10^{50} 、 4×10^{50} 、 5×10^{50} 、 6×10^{50} 、 7×10^{50} 、 8×10^{50} 、 9×10^{50} 、 1×10^{51} 、 2×10^{51} 、 3×10^{51} 、 4×10^{51} 、 5×10^{51} 、 6×10^{51} 、 7×10^{51} 、 8×10^{51} 、 9×10^{51} 、 1×10^{52} 、 2×10^{52} 、 3×10^{52} 、 4×10^{52} 、 5×10^{52} 、 6×10^{52} 、 7×10^{52} 、 8×10^{52} 、 9×10^{52} 、 1×10^{53} 、 2×10^{53} 、 3×10^{53} 、 4×10^{53} 、 5×10^{53} 、 6×10^{53} 、 7×10^{53} 、 8×10^{53} 、 9×10^{53} 、 1×10^{54} 、 2×10^{54} 、 3×10^{54} 、 4×10^{54} 、 5×10^{54} 、 6×10^{54} 、 7×10^{54} 、 8×10^{54} 、 9×10^{54} 、 1×10^{55} 、 2×10^{55} 、 3×10^{55} 、 4×10^{55} 、 5×10^{55} 、 6×10^{55} 、 7×10^{55} 、 8×10^{55} 、 9×10^{55} 、 1×10^{56} 、 2×10^{56} 、 3×10^{56} 、 4×10^{56} 、 5×10^{56} 、 6×10^{56} 、 7×10^{56} 、 8×10^{56} 、 9×10^{56} 、 1×10^{57} 、 2×10^{57} 、 3×10^{57} 、 4×10^{57} 、 5×10^{57} 、 6×10^{57} 、 7×10^{57} 、 8×10^{57} 、 9×10^{57} 、 1×10^{58} 、 2×10^{58} 、 3×10^{58} 、 4×10^{58} 、 5×10^{58} 、 6×10^{58} 、 7×10^{58} 、 8×10^{58} 、 9×10^{58} 、 1×10^{59} 、 2×10^{59} 、 3×10^{59} 、 4×10^{59} 、 5×10^{59} 、 6×10^{59} 、 7×10^{59} 、 8×10^{59} 、 9×10^{59} 、 1×10^{60} 、 2×10^{60} 、 3×10^{60} 、 4×10^{60} 、 5×10^{60} 、 6×10^{60} 、 7×10^{60} 、 8×10^{60} 、 9×10^{60} 、 1×10^{61} 、 2×10^{61} 、 3×10^{61} 、 4×10^{61} 、 5×10^{61} 、 6×10^{61} 、 7×10^{61} 、 8×10^{61} 、 9×10^{61} 、 1×10^{62} 、 2×10^{62} 、 3×10^{62} 、 4×10^{62} 、 5×10^{62} 、 6×10^{62} 、 7×10^{62} 、 8×10^{62} 、 9×10^{62} 、 1×10^{63} 、 2×10^{63} 、 3×10^{63} 、 4×10^{63} 、 5×10^{63} 、 6×10^{63} 、 7×10^{63} 、 8×10^{63} 、 9×10^{63} 、 1×10^{64} 、 2×10^{64} 、 3×10^{64} 、 4×10^{64} 、 5×10^{64} 、 6×10^{64} 、 7×10^{64} 、 8×10^{64} 、 9×10^{64} 、 1×10^{65} 、 2×10^{65} 、 3×10^{65} 、 4×10^{65} 、 5×10^{65} 、 6×10^{65} 、 7×10^{65} 、 8×10^{65} 、 9×10^{65} 、 1×10^{66} 、 2×10^{66} 、 3×10^{66} 、 4×10^{66} 、 5×10^{66} 、 6×10^{66} 、 7×10^{66} 、 8×10^{66} 、 9×10^{66} 、 1×10^{67} 、 2×10^{67} 、 3×10^{67} 、 4×10^{67} 、 5×10^{67} 、 6×10^{67} 、 7×10^{67} 、 8×10^{67} 、 9×10^{67} 、 1×10^{68} 、 2×10^{68} 、 3×10^{68} 、 4×10^{68} 、 5×10^{68} 、 6×10^{68} 、 7×10^{68} 、 8×10^{68} 、 9×10^{68} 、 1×10^{69} 、 2×10^{69} 、 3×10^{69} 、 4×10^{69} 、 5×10^{69} 、 6×10^{69} 、 7×10^{69} 、 8×10^{69} 、 9×10^{69} 、 1×10^{70} 、 2×10^{70} 、 3×10^{70} 、 4×10^{70} 、 5×10^{70} 、 6×10^{70} 、 7×10^{70} 、 8×10^{70} 、 9×1

10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、またはそれより多い細菌)の細菌細胞の数を提供することによって、より大きな利益が達成され得るという認識を包含する。

【0133】

本発明者らはさらに、特定の細菌集団のレベルが、ALSを有する対象のマイクロバイオームにおいて増加することを示した。

【0134】

したがって、本発明のさらに別の態様によれば、対象の腸内マイクロバイオームにおけるEscherichia coli、Clostridium leptum、Clostridium nexile、Clostridium bolteae、Bacteroides fragilis、Catenibacterium mitsuokai、Bifidobacterium dentium、Megasphaera、Parasutterella excrementihominis、Burkholderiales bacterium、Clostridium ramosum、Streptococcus anginosus、Flavonifractor plautii、Methanobrevibacter smithii、Acidaminococcus intestine、Ruminococcus 例えは、Ruminococcus torques、Ruminococcus gnavus、Bifidobacterium、Coriobacteriaceae、Bacteroides、Parabacteroides、S24 7、Clostridiaceae、flavefaciens、Desulfovibrionaceae、Allobaculum、Sutterella、Helicobacteraceae、Coprococcus、およびOscillospiraからなる群から選択される細菌集団の量を選択的に減少させる治療有効量の薬剤を対象に投与し、それによってALSを治療することを含む、それを必要とする対象においてALSを治療する方法が提供される。

【0135】

特定の実施形態によれば、細菌集団は、Escherichia coli、Clostridium leptum、Ruminococcus (例えは、Ruminococcus gnavus、Ruminococcus torques)、Clostridium nexile、Clostridium bolteae、Bacteroides fragilis、Catenibacterium mitsuokai、Bifidobacterium dentium、Megasphaera、Parasutterella excrementihominis、Burkholderiales bacterium、Clostridium ramosum、Streptococcus anginosus、Flavonifractor plautii、Methanobrevibacter smithii、およびAcidaminococcus intestineからなる群から選択される。

【0136】

特定の実施形態によれば、細菌集団は、Ruminococcus、Desulfovibrionaceae、Allobaculum、Sutterella、Helicobacteraceae、Coprococcus、およびOscillospiraからなる群から選択される。

【0137】

さらなる実施形態において、ダウンレギュレートされる細菌集団は、以下の細菌のうちの少なくとも1つである: Bacteroides dorei、Bacteroides vulgatus、Bacteroides xylophilus、Bifidobacterium pseudolongum、Dorea、Helicobacter hepaticus、Lactobacillus johnsonii、Lactobacillus reuteri、Lactobacillus sp ASF360、Desulfovibrio desulfuricans、Lactobacillus 50

u s vaginalis、*Mucispirillum schaedleri*、*Parabacteroides* (e.g. *Parabacteroides johnsonii*)、および*Ruminococcus torques*。

【0138】

一実施形態では、上記の種／属のうちの少なくとも2つがダウンレギュレートされ、上記の種／属のうちの少なくとも3つがダウンレギュレートされ、上記の種／属のうちの少なくとも4つがダウンレギュレートされる。上記の種／属のうち少なくとも5つがダウンレギュレートされ、上記のすべての種または属がダウンレギュレートされる。

【0139】

本発明は、少なくとも1つの菌株、菌株の10%、菌株の20%、菌株の30%、菌株の40%、菌株の50%、菌株の60%、菌株の70%、菌株の80%、菌株の90%、または上記の種の菌株のすべてをダウンレギュレートする薬剤を企図する。

10

【0140】

本明細書で使用される場合、「ダウンレギュレートする」という用語は、特定の種／属の細菌の量（絶対量または相対量のいずれか）および／または活性（絶対的な活性または相対的な活性のいずれか）を低下させる能力を指す。

【0141】

一実施形態では、薬剤は、特定の種／属の細菌を特異的にダウンレギュレートする。

【0142】

したがって、例えば、薬剤は、対象のマイクロバイオームの他の少なくとも1つの細菌種／属と比較して、特定の細菌種／属の量を少なくとも2分の1に減らすことができる。特定の実施形態によれば、薬剤は、マイクロバイオームの他の少なくとも1つの細菌種／属と比較して、特定の細菌種／属を少なくとも5倍、10倍またはそれ以上ダウンレギュレートする。

20

【0143】

別の実施形態では、薬剤は、対象のマイクロバイオームの全細菌種／属の少なくとも10%と比較して、特定の細菌種／属の量を少なくとも2分の1に減少させる。特定の実施形態によれば、薬剤は、対象のマイクロバイオームの全細菌種／属の少なくとも10%と比較して、特異的な細菌種／属を少なくとも5倍、10倍またはそれ以上ダウンレギュレートする。

30

【0144】

別の実施形態では、薬剤は、対象のマイクロバイオームの全細菌種／属の少なくとも20%と比較して、特定の細菌種／属の量を少なくとも2分の1に減少させる。特定の実施形態によれば、薬剤は、対象のマイクロバイオームの全細菌種／属の少なくとも20%と比較して、特異的な細菌種／属を少なくとも5倍、10倍またはそれ以上ダウンレギュレートする。

【0145】

別の実施形態では、薬剤は、対象のマイクロバイオームの全細菌種／属の少なくとも30%と比較して、特定の細菌種／属の量を少なくとも2分の1に減少させる。特定の実施形態によれば、薬剤は、対象のマイクロバイオームの全細菌種／属の少なくとも30%と比較して、特異的な細菌種／属を少なくとも5倍、10倍またはそれ以上ダウンレギュレートする。

40

【0146】

別の実施形態では、薬剤は、対象のマイクロバイオームの全細菌種／属の少なくとも40%と比較して、特定の細菌種／属の量を少なくとも2分の1に減少させる。特定の実施形態によれば、薬剤は、対象のマイクロバイオームの全細菌種／属の少なくとも40%と比較して、特異的な細菌種／属を少なくとも5倍、10倍またはそれ以上ダウンレギュレートする。

【0147】

別の実施形態では、薬剤は、対象のマイクロバイオームの全細菌種／属の少なくとも5

50

0 %と比較して、特定の細菌種／属の量を少なくとも2分の1に減少させる。特定の実施形態によれば、薬剤は、対象のマイクロバイオームの全細菌種／属の少なくとも50 %と比較して、特異的な細菌種／属を少なくとも5倍、10倍またはそれ以上ダウンレギュレートする。

【0148】

別の実施形態では、薬剤は、対象のマイクロバイオームの全細菌種／属の少なくとも60 %と比較して、特定の細菌種／属の量を少なくとも2分の1に減少させる。特定の実施形態によれば、薬剤は、対象のマイクロバイオームの全細菌種／属の少なくとも60 %と比較して、特異的な細菌種／属を少なくとも5倍、10倍またはそれ以上ダウンレギュレートする。

10

【0149】

別の実施形態では、薬剤は、対象のマイクロバイオームの全細菌種／属の少なくとも70 %と比較して、特定の細菌種／属の量を少なくとも2分の1に減少させる。特定の実施形態によれば、薬剤は、対象のマイクロバイオームの全細菌種／属の少なくとも70 %と比較して、特異的な細菌種／属を少なくとも5倍、10倍またはそれ以上ダウンレギュレートする。

【0150】

別の実施形態では、薬剤は、対象のマイクロバイオームの全細菌種／属の少なくとも80 %と比較して、特定の細菌種／属の量を少なくとも2分の1に減少させる。特定の実施形態によれば、薬剤は、対象のマイクロバイオームの全細菌種／属の少なくとも80 %と比較して、特異的な細菌種／属を少なくとも5倍、10倍またはそれ以上ダウンレギュレートする。

20

【0151】

別の実施形態では、薬剤は、対象のマイクロバイオームの全細菌種／属の少なくとも90 %と比較して、特定の細菌種／属の量を少なくとも2分の1に減少させる。特定の実施形態によれば、薬剤は、対象のマイクロバイオームの全細菌種／属の少なくとも90 %と比較して、特異的な細菌種／属を少なくとも5倍、10倍またはそれ以上ダウンレギュレートする。

【0152】

特定の細菌の属、種、または菌株を減少させることができる例示的な薬剤は抗生物質である。

30

【0153】

本明細書で使用される場合、「抗生物質」という用語は、天然の供給源から単離された、または天然の供給源から単離され、細菌および他の微生物の増殖を阻害または破壊する能力を有する、主に感染症の治療に利用される化学物質の群を指す。抗生物質の例には、アミカシン；アモキシシリソ；アンピシリン；アジスロマイシン；アズルクンイン；アズトレオナム；アズトレオナム；カルベニシリソ；セファクロル；セフェピム；セフェタメット；セフィネタゾール；セフィキシム；セフォニシド；セフォペラゾン；セフォタキシム；セフォテタン；セフォキシチソ；セフポドキシム；セフプロジル；セフスロジン；セフタジジム；セフチゾキシム；セフトリアキソソ；セフロキシム；セファレキシン；セファロチン；セスロマイシン；クロラムフェニコール；シノキサシン；シプロフロキサシン；クラリスロマイシン；クリンダマイシン；クロキサシリソ；Co-amoxiclavulanate；ダルババンシン；ダプトマイシン；ドクロキサシリソ；ドキシサイクリン；エノキサシン；エリスロマイシンエストレート；エリスロマイシンエチルコハク酸塩；エリスロマイシングルコヘプトネート；エリスロマイシンラクトビオン酸塩；エリスロマイシングルコヘプトネート；エリスロマイシンラクトビオン酸塩；エリスロマイシングルコヘプトネート；エリスロマイシン；フィダキソマイシン；フレロキサシン；ゲンタマイシン；イミペネム；カナマイシン；ロメフロキサシン；ロラカルベフ；メチシリソ；メトロニダゾール；メズロシリソ；ミノサイクリン；ムピロシリソ；ナフシリソ；ナリジクス酸；ネチルマイシン；ニトロフラントイン；ノルフロキサシン；オフロキサシン；オキサシリソ；ペニシリソG；ピペラシリソ；レタバムリソ；リファキサミン；リファンピソ

40

50

; ロキシスロマイシン；ストレプトマイシン；スルファメトキサゾール；ティコプラニン；テトラサイクリン；チカルシリン；チゲサイクリン；トブラマイシン；トリメトプリム；バンコマイシン；ピペラシリンとタゾバクタムの組み合わせ；およびそれらの様々な塩、酸、塩基、およびその他の誘導体が含まれるが、これらに限定されない。抗生物質には、アミノグリコシド、カルバペネム、カルバペネム、セファロスポリン、セファマイシン、フルオロキノロン、糖ペプチド、リンコサミド、マクロライド、モノバクテリア、ペニシリリン、キノロン、スルホンアミド、およびテトラサイクリンが含まれるが、これらに限定されない。

【0154】

抗生物質には、抗生物質ペプチドも含まれる。例には、a b a e c i n；アンドロピン；アピダエシン；ボンビニン；ブレビニン；ブフォリンII；C A P 18；セクロピン；セラトトキシン；ディフェンシン；デルマセプチン；デルムシジン；ドロソマイシン；e s c u l e n t i n s；インドリシジン；L L 37；マガイニン；最大H 5；メリチン；モリシン；プロフェニン；プロテグリン；および/またはタキプレシンが含まれるが、これに限定されない。

10

【0155】

特定の実施形態によれば、抗生物質は非吸収性抗生物質である。

【0156】

抗生物質ではない他の薬剤もまた、本発明者らによって企図されている。

20

【0157】

一実施形態では、特定の細菌属/種/株をダウンレギュレートすることができる薬剤は、必須のリソースについて細菌属/種/株と競合する細菌集団である。細菌組成物は、本明細書で以下にさらに記載される。

【0158】

さらに別の実施形態では、特定の細菌の属/種/株をダウンレギュレートすることができる薬剤は、細菌の種/株の相対的な量を減少させるのに役立つ競合する細菌集団の(または同じ種/株からの)代謝物である。

【0159】

特定の細菌の属/種/株を特異的に減少させることができる追加の薬剤は、当技術分野で知られており、ポリヌクレオチドサイレンシング剤を含む。

30

【0160】

好ましくは、本発明のこの態様のポリヌクレオチドサイレンシング剤は、細菌内の少なくとも1つの必須遺伝子(すなわち、生命と適合性がある)をコードする配列を標的とする。標的とされる配列は、ダウンレギュレートすることができる特定の細菌種に特異的であるべきである。このような遺伝子には、リボソームRNA遺伝子(16Sおよび23S)、リボソームタンパク質遺伝子、tRNAシンテターゼ、およびd n a B、f a b I、f o l A、g y r B、m u r A、p y t H、m e t G、およびt u f A(B)などの必須であると示されているさらなる遺伝子が含まれる。

【0161】

本発明の実施形態によれば、ポリヌクレオチドサイレンシング剤は、標的RNAに特異的であり、PCR、ウエスタンプロット、免疫組織化学および/またはフローサイトメトリーによって判定されるものとして、他の標的、または標的遺伝子に対して99%以下の全体的な相同性、例えば標的遺伝子に対して98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%未満の全体的な相同性を示すスプライス変異体を、交差阻害またはサイレンシングしない。

40

【0162】

必須の細菌遺伝子をダウンレギュレートすることができる1つの薬剤は、RNA誘導エンドヌクレアーゼ技術、例えばCRISPRシステムである。

【0163】

50

本明細書で使用される場合、*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (クラスター化された規則的に間隔を空けた短いパリンドロームリピート) としても知られる「CRISPRシステム」という用語は、Cas遺伝子（例えば、CRISPRに関連するエンドヌクレアーゼ9）、tracr（トランス活性化CRISPR）配列（例えば、tracrRNAまたはアクティブな部分的tracrRNA）、tracrメイト配列（「直接反復」およびtracrRNA処理された部分的直接反復を含む）またはガイド配列（「スペーサー」とも呼ばれる）、例えば非限定的にcrrNA配列（すなわち、標的特異性を付与するが、Casに結合するためにtracrRNAを必要とする内因性細菌RNA）またはsgRNA配列（すなわち、单一ガイドRNA）をコードする配列を含む、CRISPR関連遺伝子の発現または活性の指示に関与する転写物および他の要素を集合的に指す。

【0164】

いくつかの実施形態では、CRISPRシステムの1つまたは複数の要素は、タイプI、タイプII、またはタイプIIIのCRISPRシステムに由来する。いくつかの実施形態において、CRISPRシステムの1つ以上の要素（例えば、Cas）は、*Streptococcus pyogenes*、*Neisseria meningitidis*、*Streptococcus thermophilus*、または*Treponema denticola*などの内因性CRISPRシステムを含む特定の生物に由来する。

【0165】

一般に、CRISPRシステムは、標的配列の部位でのCRISPR複合体の形成を促進する要素（内因性CRISPRシステムの文脈ではプロトスペーサーとも呼ばれる）によって特徴付けられる。

【0166】

CRISPR複合体の形成の文脈において、「標的配列」は、ガイド配列（すなわち、ガイドRNA、例えば、sgRNAまたはcrrNA）が相補性を有するように設計される配列を指し、標的配列とガイド配列との間のハイブリダイゼーションは、CRISPR複合体の形成を促進する。ハイブリダイゼーションを引き起こし、CRISPR複合体の形成を促進するのに十分な相補性があれば、完全な相補性は必ずしも必要ではない。したがって、いくつかの実施形態によれば、標的配列に対する全体的な相同性は、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%であり得る。標的配列は、DNAまたはRNAポリヌクレオチドなどの任意のポリヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態において、標的配列は、細胞の核または細胞質に位置する。

【0167】

したがって、CRISPRシステムは2つの異なるコンポーネント、標的配列とハイブリダイズするガイドRNA（gRNA）、およびヌクレアーゼ（II型Cas9タンパク質など）で構成され、それにおいては、gRNAが標的配列を標的化し、ヌクレアーゼ（Cas9タンパク質など）が標的配列を切断する。ガイドRNAは、内因性細菌crrRNAとtracrRNAの組み合わせを含み得る、つまり、gRNAは、crrRNAの標的化特異性とtracrRNAの足場特性（Cas9結合に必要）を組み合わせる。あるいは、ガイドRNAは、Casに直接結合することができる单一のガイドRNAであり得る。

【0168】

通常、内因性CRISPRシステムの文脈では、CRISPR複合体（標的配列にハイブリダイズし、1つまたは複数のCasタンパク質と複合体を形成したガイド配列を含む）の形成により、標的配列において、またはその近く（例えばそれから1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、またはそれ以上の塩基対から以内にて）の一方または両方の鎖が切断される。また、理論に拘束されることを望まないが、野生型tracr配列の全部または一部（例えば、野生型tracr配列の約20、26、32、45、48、54、63、の67、85、またはそれ以上のヌクレオチド、またはその概数より多いもの）を含み得るまたはそれらからなり得るtracr配列はまた、tracr配列の少なくとも一部に沿って、ガイド配列に操作可能にリンクされているtracrメイ

10

20

30

40

50

ト配列の全部または一部にハイブリダイゼーションすることなどによって、C R I S P R 複合体の一部を形成し得る。

【0169】

いくつかの実施形態において、*tracr*配列は、ハイブリダイズしてC R I S P R 複合体の形成に関与するために、*tracr*メイト配列に対して十分な相補性を有する。標的配列と同様に、機能するのに十分であれば、完全な相補性は必要ない。いくつかの実施形態において、*tracr*配列は、最適に整列された場合、*tracr*メイト配列の全長に沿って少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%の配列相補性を有する。

【0170】

細胞へのC R I S P R / C a s の導入は、C R I S P R システムの要素の発現が1つまたは複数の標的部位でのC R I S P R 複合体の形成を指示するように、C R I S P R システムの1つまたは複数の要素の発現を駆動する1つまたは複数のベクターを使用して行うことができる。例えば、C a s 酵素、*tracr-mate*配列に連結されたガイド配列、および*tracr*配列はそれぞれ、別個のベクター上の別個の調節要素に作動可能に連結され得る。あるいは、同じまたは異なる調節要素から発現される2つ以上の要素を单一のベクターに組み合わせて、1つ以上の追加のベクターが、第1のベクターに含まれないC R I S P R システムの任意の構成要素をもたらすことができる。単一のベクターに組み合わされたC R I S P R システム要素は、任意の適切な方向に配置され得る。例えば、1つの要素は、第2の要素（の「上流」）に対して5'またはそれ（の「下流」）に関して3'に位置する。1つの要素のコード配列は、第2の要素のコード配列の同じまたは反対の鎖上に位置し、同じまたは反対の方向に配向され得る。単一のプロモーターは、C R I S P R 酵素、ならびにガイド配列、*tracr*メイト配列（任意選択でガイド配列に作動可能に連結されている）、および1つ以上のイントロン配列内に埋め込まれた*tracr*配列（例えば、異なるイントロンに各々、少なくとも1つのイントロンに2つ以上、または1つのイントロンにすべて）の1つ以上をコードする転写物の発現を駆動できる。

【0171】

本発明者らは、A L S を治療することに加えて、疾患を診断するために、対象のマイクロバイオーム中の特定の細菌種を試験することをさらに提案することが理解されるであろう。

【0172】

したがって、本発明の別の態様によれば、対象のマイクロバイオームにおける*Ruminococcus*の量および/または活性を分析することを含む、対象のA L S を診断する方法が提供され、健常な対象のマイクロバイオームにおけるその存在量と比較して、*Ruminococcus*の存在量および/または活性の統計的に有意な増加がA L S を示す。

【0173】

本明細書で使用される場合、「診断」という用語は、疾患の存在の判定、疾患の分類、疾患の重症度（グレードまたはステージ）の判定、疾患の進行および治療への応答のモニタリング、疾患の結果の予測、および/または回復の見通しを示す。

【0174】

診断に役立つ可能性のある分析可能な追加の細菌種/属には、*Akkermansia muciniphila* (AM)、*Anaeroplasma*、*Distansis*、*Prevotella*、*Parabacteroides*（例えば、*Parabacteroides distasonis* および *Parabacteroides goldsteinii*）、*Rikenellaceae*、*Alistipes*、*Candidatus Arthromitus*、*Eggerthella*、*Oscillibacter*、*Subdoligranulum*、*Lactobacillus*（例えば、*Lactobacillus murinus*）が含まれる。

【0175】

10

20

30

40

50

診断に役立つ可能性のある分析可能なさらなる細菌種／属には、Escherichia coli、Clostridium leptum、Clostridium nexile、Clostridium bolteae、Bacteroides fragilis、Catenibacterium mitsuokai、Bifidobacterium dentium、Megaspheera、Parasutterella excrementihominis、Burkholderiales bacterium、Clostridium ramosum、Streptococcus anginosus、Flavonifractor plautii、Methanobrevibacter smithii、およびAcidaminococcus intestineが含まれ、健常な対象のマイクロバイオームにおけるその存在量と比較して、上記の細菌の存在量の統計的に有意な増加は、ALSを示す。

【0176】

診断に役立つ可能性のある分析可能なさらなる細菌種／属には、Streptococcus thermophiles、Faecalibacterium prausnitzii、Eubacterium rectale、Bacteroides plebeius、Coproccus、Roseburia hominis、Eubacterium ventriosum、Lachnospiraceae、Eubacterium hallii、Bacteroidales、Bifidobacterium pseudocatenulatum、Anaerostipes hadrusが含まれ、健常な対象のマイクロバイオームにおけるその存在量と比較して、前述の細菌の存在量の統計的に有意な減少は、ALSを示す。

【0177】

上記の細菌種の量は、通常、健常な対象のマイクロバイオームにおけるそれらの存在量と比較して、ALSの対象では減少する。

【0178】

上記の細菌種の量は、通常、健常な対象のマイクロバイオームにおけるそれらの存在量と比較して、ALSの対象において増加する。

【0179】

対象をALSであると診断するために、典型的には少なくとも1（例えばRuminococcus）、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、または上記で開示された種／属のさらに多くが分析される。

【0180】

典型的には、所定のレベルを超える上記の細菌種／属のいずれかの増加は、健常な対象（例えば、ALSではない対象）のマイクロバイオームにおけるその微生物量と比較して、量の少なくとも1.5倍、量の2倍、量の3倍、量の4倍、量の5倍である。

【0181】

典型的には、所定のレベルを超える上記の細菌種／属のいずれかの減少は、健常な対象（例えば、ALSではない対象）のマイクロバイオームにおけるその微生物量と比較して、量の少なくとも1.5倍、量の2倍、量の3倍、量の4倍、量の5倍少ない。

【0182】

特定の細菌種の存在量および／または活性を比較する場合、同じ器官または組織のマイクロバイオームを比較するように注意を払う必要があることが理解されよう。

【0183】

一実施形態では、上記で開示された細菌の存在量が分析される。

【0184】

微生物のレベルまたは存在の測定は、微生物の構成要素または微生物の副産物の存在を分析することによって行うことができる。したがって、例えば、微生物のレベルまたは存在は、DNA配列のレベルを測定することによって影響を受ける可能性がある。いくつかの実施形態において、微生物のレベルまたは存在は、16S rRNA遺伝子配列または

10

20

30

40

50

18S rRNA 遺伝子配列を測定することによって影響を受ける可能性がある。他の実施形態では、微生物のレベルまたは存在は、RNA 転写物を測定することによって影響を受ける可能性がある。さらに他の実施形態では、微生物のレベルまたは存在は、タンパク質を測定することによって影響を受ける可能性がある。さらに他の実施形態では、微生物のレベルまたは存在は、代謝物を測定することによって影響を受ける可能性がある。

【0185】

マイクロバイオームのサンプルの入手

マイクロバイオームを分析するために、対象からサンプルを採取する。

対象は通常、哺乳類の対象 - - 例えば、人間の対象である。

【0186】

したがって、例えば、腸内マイクロバイオームを分析するために糞便サンプルを採取することができ、気管支マイクロバイオームを分析するために気管支サンプルを採取することができ、口腔マイクロバイオームを分析するために唾液サンプルを採取することなどができる。特定の実施形態によれば、対象のマイクロバイオームは、対象の便サンプルに由来する。

【0187】

本発明者らは、摂食パターンの変化（例えば、概日リズムのずれによる）がマイクロバイオームの組成に影響を与えることを示した。したがって、サンプルは1日の決まった時間に採取することが好ましい。

【0188】

マイクロバイオームから染色体（ゲノム）DNA を取得することは、例えば、上で引用した *Sam brook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual* に開示されているような従来の技術を使用して行うことができる。場合によっては、特に、少量のDNA が特定のステップで使用される場合、無関係な環状合成二本鎖DNA などの担体DNA を提供することが有利であり、少量のサンプルDNA しか利用できず、非特異的結合、例えばコンテナの壁などに対する損失の危険性がある場合はいつでも、サンプルDNA と混合して使用するようとする。

【0189】

一実施形態では、染色体DNA の長い断片が得られる。細胞を溶解し、穏やかな遠心分離ステップで無傷の核をペレット化することができる。次に、ゲノムDNA が放出される（例えば、プロテイナーゼK およびRNase の消化により、数時間（例えば、1 ~ 5 時間））。材料は、例えば、一定期間（すなわち、2 ~ 16 時間）の透析および/または希釈によって、残存する細胞廃棄物の濃度を低下させるように処理することができる。このような方法では、多くの破壊的なプロセス（エタノール沈殿、遠心分離、ボルテックスなど）を使用する必要がないため、ゲノム核酸はほとんど無傷のままで、150 キロベースを超える長さの断片の大部分が生成される。いくつかの実施形態において、断片は、長さが約5 から約750 キロベースである。さらなる実施形態において、断片は、長さが約150 から約600 、約200 から約500 、約250 から約400 、および約300 から約350 キロベースである。

【0190】

次に、任意選択で、標的ゲノムDNA は、酵素消化、剪断、または超音波処理を含む従来の技術によって所望のサイズに分画または断片化され、後者の2つは、本発明において特定の用途を見出す。

【0191】

標的核酸の断片の大きさは、ソース標的核酸、および使用されるライブラリー構築方法に応じて変化し得るが、標準的な全ゲノム配列決定の場合、そのような断片は、長さが50 から600 ヌクレオチドの範囲であり得る。別の実施形態では、断片は、長さが300 から600 または200 から2000 ヌクレオチドである。さらに別の実施形態では、断片は、長さが10 ~ 100 、50 ~ 100 、50 ~ 300 、100 ~ 200 、200 ~ 300 、50 ~ 400 、100 ~ 400 、200 ~ 400 、300 ~ 400 、400 ~ 500

10

20

30

40

50

0、400～600、500～600、50～1000、100～1000、200～1000、300～1000、400～1000、500～1000、600～1000、700～1000、700～900、700～800、800～1000、900～1000、1500～2000、1750～2000、および50～2000ヌクレオチドである。より長い断片も、企図されている。

【0192】

さらなる実施形態で、特定のサイズまたは特定の範囲のサイズの断片が単離される。そのような方法は当技術分野で周知である。例えば、ゲル分画を使用して、例えば、500塩基対 + 50 塩基対などの塩基対の範囲内にある特定のサイズの断片の集団を生成することができる。

10

【0193】

多くの場合、溶解および抽出中に生成されるせん断力によって目的の範囲の断片が生成されるため、抽出されたDNAの酵素消化は必要ない。さらなる実施形態において、より短い断片(1～5kb)は、制限エンドヌクレアーゼを使用する酵素的断片化によって生成され得る。

【0194】

微生物のレベルの定量化：

微生物の存在量を判定することは、マイクロバイオームのいずれかの特徴を考慮に入れることによって影響を受ける可能性があることが理解されよう。したがって、微生物の存在量は、様々な系統発生レベルでの存在量を考慮することによって影響を受ける可能性がある。すなわち、遺伝子の存在量のレベルで；遺伝子代謝経路の存在量；亜種株の同定；特定の細菌領域におけるSNPおよび挿入と欠失；本明細書で以下にさらに記載されるように、細菌の増殖速度、マイクロバイオームの微生物の多様性である。

20

【0195】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数のタイプの微生物またはその成分または生成物のレベルまたはレベルのセットを判定することは、1つまたは複数のDNA配列のレベルまたはレベルのセットを判定することを含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のDNA配列は、異なる微生物のタイプを区別するために使用することができる任意のDNA配列を含む。特定の実施形態において、1つ以上のDNA配列は、16S rRNA遺伝子配列を含む。特定の実施形態において、1つ以上のDNA配列は、18S rRNA遺伝子配列を含む。いくつかの実施形態では、1、2、3、4、5、10、15、20、25、50、100、1,000、5,000以上の配列が増幅される。

30

【0196】

16Sおよび18S rRNA遺伝子配列は、それぞれ原核生物および真核生物のリボソームの小サブユニット構成要素をコードする。rRNA遺伝子は、微生物の種類を区別するのに特に有用である。これらの遺伝子の配列は微生物種間で異なるが、遺伝子にはプライマー結合のための高度に保存された領域があるためである。保存されたプライマー結合領域間のこの特異性により、多くの異なるタイプの微生物のrRNA遺伝子を単一のプライマーセットで増幅し、増幅された配列で区別することができるようになる。

40

【0197】

いくつかの実施形態では、微生物叢のサンプル(例えば、糞便サンプル)は、1つまたは複数のDNA配列のレベルまたはレベルのセットについて直接アッセイされる。いくつかの実施形態において、DNAは、微生物叢のサンプルから単離され、単離されたDNAは、1つ以上のDNA配列のレベルまたはレベルのセットについてアッセイされる。微生物DNAを単離する方法は当技術分野でよく知られている。例には、フェノール-クロロホルム抽出、およびQIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN、カリフォルニア州バレンシア)を含む多種多様な市販のキットが含まれるが、これらに限定されない。

【0198】

いくつかの実施形態において、1つ以上のDNA配列のレベルまたはレベルのセットは

50

、 P C R (例えは、標準的 P C R 、半定量的、または定量的 P C R) を使用して D N A 配列を増幅することによって判定される。いくつかの実施形態において、1つ以上の D N A 配列のレベルまたはレベルのセットは、定量的 P C R を使用して D N A 配列を増幅することによって判定される。これらおよび他の基本的な D N A 増幅手順は、当技術分野の専門家に周知であり、 A u s e b e l e t a l (A u s u b e l F M , B r e n t R , K i n g s t o n R E , M o o r e D , S e i d m a n J G , S m i t h J A , S t r u h l K (e d s) . 1 9 9 8 . C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y . W i l e y : N e w Y o r k) において記載されている。

【 0 1 9 9 】

10

いくつかの実施形態において、 D N A 配列は、個々の微生物型を他の異なる微生物型から区別する1つ以上の配列に特異的なプライマーを使用して増幅される。いくつかの実施形態において、 1 6 S r R N A 遺伝子配列またはその断片は、 1 6 S r R N A 遺伝子配列に特異的なプライマーを使用して増幅される。いくつかの実施形態において、 1 8 S D N A 配列は、 1 8 S D N A 配列に特異的なプライマーを使用して増幅される。

【 0 2 0 0 】

いくつかの実施形態において、1つ以上の 1 6 S r R N A 遺伝子配列のレベルまたはレベルのセットは、フィロチップ技術を使用して判定される。フィロチップの使用は当技術分野で周知であり、 H a z e n e t a l (' ' D e e p - s e a o i l p l u m e e n r i c h e s i n d i g e n o u s o i l - d e g r a d i n g b a c t e r i a . ' ' S c i e n c e , 3 3 0 , 2 0 4 ~ 2 0 8 , 2 0 1 0) において記載されており、その全体は参照により組み込まれる。簡単に説明すると、 1 6 S r R N A 遺伝子配列は、微生物叢のサンプルから抽出された D N A から増幅および標識される。次に、増幅された D N A は、微生物の 1 6 S r R N A 遺伝子のプローブを含むアレイにハイブリダイズする。次に、各プローブへの結合レベルが定量化され、プローブされた 1 6 S r R N A 遺伝子配列に対応する微生物タイプのサンプルレベルが提供される。いくつかの実施形態では、フィロチップ分析は、商業的ベンダーによって実行される。例には、 S e c o n d G e n o m e I n c . (カリフォルニア州、サンフランシスコ) が含まれるが、これらに限定されない。

20

【 0 2 0 1 】

30

いくつかの実施形態において、上記の細菌種 / 株のいずれかの存在量は、 D N A 配列決定によって判定される。

【 0 2 0 2 】

40

配列決定の方法は、一般に当業者に知られている。好ましい配列決定法は、次世代配列決定法または並列ハイスループット配列決定法である。例えは、細菌ゲノム配列は、超並列署名シーケンス (M P S S) を使用して取得できる。想定される配列方法の例は、パイルシーケンス、特に 4 5 4 パイルシーケンスであり、例えは R o c h e 4 5 4 G e n o m e S e q u e n c e r に基づいている。この方法は、油溶液の中の水滴内の D N A を増幅し、各液滴は單一のプライマーコーティングされたビーズに付着した單一の D N A テンプレートを含み、次いでクローンコロニーを形成する。パイルシーケンシングは、ルシフェラーゼを使用して、発生期の D N A に追加された個々のヌクレオチドを検出するための光を生成し、結合されたデータを使用して、配列の読み取り値を生成する。さらに別の想定される例は、 I l l u m i n a または S o l e x a のシーケンスであり、例えはリバーシブルダイターミネーターに基づく I l l u m i n a G e n o m e A n a l y z e r テクノロジーを使用する。 D N A 分子は通常、スライド上のプライマーに付着して増幅され、局所的なクローンコロニーが形成される。続いて、一度に1つのタイプのヌクレオチドを加えることができ、組み込まれていないヌクレオチドは洗い流される。続いて、蛍光標識されたヌクレオチドの画像を撮影し、色素を D N A から化学的に除去して、次のサイクルを可能にする。さらに別の例は、ライゲーションによるシーケンシングを採用する A p p l i e d B i o s y s t e m s の S O L i D テクノロジーの使用である。この方法

50

は、固定の長さのすべての可能なオリゴヌクレオチドのプールの使用に基づいており、配列決定された位置に従って標識されている。このようなオリゴヌクレオチドはアニーリングされ、ライゲーションされる。続いて、配列を一致させるためのDNAリガーゼによる優先的なライゲーションは、通常、その位置のヌクレオチドを知らせるシグナルをもたらす。DNAは通常、エマルジョンPCRによって増幅されるため、各々が同じDNA分子のコピーのみを含む得られたビーズをスライドガラスに配置すると、*illumina*のシーケンスに匹敵する量と長さのシーケンスが得られる。さらなる方法は、*Helicos*のヘリスコープ技術に基づいており、アレイにつながれたpolyTオリゴマーによって断片が捕捉される。各シーケンスサイクルで、ポリメラーゼと単一の蛍光標識ヌクレオチドが追加され、アレイが画像化される。その後、蛍光タグが除去され、このサイクルが繰り返される。本発明の方法に含まれる配列決定技術のさらなる例は、ハイブリダイゼーションによる配列決定、ナノポアの使用による配列決定、顕微鏡ベースの配列決定技術、マイクロ流体的なサンガー配列決定、またはマイクロチップベースの配列決定方法である。本発明はまた、これらの技術のさらなる開発、例えば、配列決定の精度、または生物のゲノム配列の判定に必要な時間などのさらなる改善を想定している。

【0203】

一実施形態によれば、配列決定方法は、ディープシーケンシングを含む。

【0204】

本明細書で使用される場合、「ディープシーケンシング」という用語は、標的配列が単一の試験で複数回読み取られる配列決定方法を指す。1回のディープシーケンスの実行は、同じ標的配列で実行される多数のシーケンス反応で構成され、それぞれが独立したシーケンス読み出しを生成する。

【0205】

いくつかの実施形態において、1つ以上のタイプの微生物のレベルまたはレベルのセットを判定することは、1つ以上の微生物RNA分子（例えば、転写物）のレベルまたはレベルのセットを判定することを含む。RNA転写物のレベルを定量化する方法は当技術分野で周知であり、ノーザン分析、半定量的逆転写酵素PCR、定量的逆転写酵素PCR、およびマイクロアレイ分析が含まれるが、これらに限定されない。

【0206】

いくつかの実施形態において、1つ以上のタイプの微生物のレベルまたはレベルのセットを判定することは、1つ以上の微生物ポリペプチドのレベルまたはレベルのセットを判定することを含む。ポリペプチドレベルを定量化する方法は当技術分野で周知であり、ウエスタン分析および質量分析が含まれるが、これらに限定されない。

【0207】

本明細書で上述したように、微生物の存在量を分析することに加えて（またはその代わりに）、本発明はまた、微生物の産物のレベルを分析することを企図する。

【0208】

微生物の産物の例には、mRNA、ポリペプチド、炭水化物および代謝物が含まれるが、これらに限定されない。

【0209】

本明細書で使用される場合、「代謝物」は、代謝の中間体または生成物である。代謝物という用語は一般に小分子に限定されており、DNAやタンパク質などの高分子化合物は含まれていない。代謝物は、代謝経路の酵素、そのような経路の中間体、または代謝経路によって得られる生成物の基質として機能し得る。

【0210】

好みの実施形態では、代謝物には、糖、有機酸、アミノ酸、脂肪酸、ホルモン、ビタミン、オリゴペプチド（長さが約100アミノ酸未満）、ならびにそれらのイオン性断片が含まれるが、これらに限定されない。細胞内に存在する細胞の産物を測定するために、細胞を溶解することもできる。特に、代謝物は、分子量が約3000ダルトン未満であり、より具体的には、約50から約3000ダルトンである。

【0211】

本発明のこの態様の代謝物は、一次代謝物（すなわち、成長のため微生物に必須）または二次代謝物（成長、発達または生殖において役割を果たさず、成長の終わりまたは定常期付近で形成されるもの）であり得る。

【0212】

本発明の代謝物が関与する代謝経路の代表的な例には、クエン酸回路、呼吸鎖、光合成、光呼吸、糖分解、糖新生、ヘキソース-リリン酸経路、酸化的ペントースリリン酸経路、脂肪酸産生および酸化、尿素回路、アミノ酸合成経路、タンパク質分解経路、例えばプロテアソーム分解、アミノ酸分解経路、脂質、ポリケチド（例えば、フラボノイドおよびイソフラボノイドを含む）、イソプレノイド（例えば、テルペン、ステロール、ステロイド、カロテノイド、キサントフィルを含む）、炭水化物、フェニルプロパノイドおよび誘導体、アルカロイド、ベンゼノイド、インドール、インドール-硫黄化合物、ポルフィリン、アントシアン、ホルモン、ビタミン、補因子、例えば補欠分子族または電子担体、リグニン、グルコシノレート、プリン、ピリミジン、ヌクレオシド、ヌクレオチド、およびtRNA、microRNA (miRNA) またはmRNAなどの関連分子の生合成または分解が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0213】

いくつかの実施形態において、代謝物のレベルは、質量分析によって判定される。いくつかの実施形態では、代謝物のレベルは、本明細書で以下にさらに説明されるように、核磁気共鳴分光法によって判定される。いくつかの実施形態において、代謝物のレベルは、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）によって判定される。いくつかの実施形態において、代謝物のレベルは、比色分析によって判定される。いくつかの実施形態において、代謝物のレベルは、分光光度法によって判定される。

20

【0214】

特定の実施形態によれば、以下の代謝物のうちの少なくとも1つの存在量が分析される：4-ヒドロキシ安息香酸プロピル、トリエタノールアミン、セロトニン、2-ケト-3-デオキシ-グルコン酸塩、ニコチンアミド、N-トリメチル5-アミノ吉草酸、フェニルアラニルグリシン、テオブロミン、シスグリ、グルタメート、1-パルミトイ-2-ドコサヘキサエノイル-GPC、シュウ酸塩、ステアロイルスフィンゴミエリン、1-パルミトイ-2-ドコサヘキサエノイル-GPC（16:0/22:6）、3-ウレイドプロピオネート、1-(1-エニル-パルミトイ-2-アラキドノイル-GPC（P-16:0/20:4）、パルミトイ-2-ルスフィンゴミエリン（d18:1/16:0）、スフィンゴミエリン（d18:1/18:1、d18:2/18:0）、ピルビン酸、タウロコレート、N-アセチルチロシン、タウロ-ベータ-ムリコレート、タウロウルソデオキシコレート、フェノール硫酸塩、エクオール硫酸塩、シンナメート、フェニルプロピオニルグリシン、2-アミノフェノールサルフェート、4-アリルフェノールサルフェート、エクオールグルクロニド、パルミトレオイル-リノレオイル-グリセロール、オレオイル-リノレノイル-グリセロール、1-パルミトイ-2-オレオイル-GPE、ハイドロキノンサルフェート、グアイアコールサルフェート、ジアシルグリセロール、パルミトイ-リノレオイル-グリセロール、ゲンチセート、および13-HODE+9-HODE。

30

【0215】

特定の実施形態によれば、ニコチンアミドの量が分析される。

【0216】

別の実施形態によれば、代謝物は、4-ヒドロキシ安息香酸プロピル、トリエタノールアミン、セロトニン、2-ケト-3-デオキシ-グルタメートニコチンアミド、ニコチンアミド、N-トリメチル5-アミノ吉草酸、フェニルアラニルグリシン、テオブロミン、シスグリ、グルタメートおよび1-パルミトイ-2-ドコサヘキサエノイル-GPCからなる群から選択される。

【0217】

40

50

対象を A L S であると診断するために、典型的には少なくとも 1 (例えばニコチニアミド) 、少なくとも 2 、少なくとも 3 、少なくとも 4 、少なくとも 5 、少なくとも 6 、少なくとも 7 、少なくとも 8 、少なくとも 9 または上記で開示された種 / 属のさらに多くが、分析される。

【 0 2 1 8 】

典型的には、所定のレベルを超える上記の代謝物のいずれかの増加は、健常な対象 (例えば、 A L S ではない対象) のマイクロバイオームにおけるその代謝物の量と比較して、量の少なくとも 1.5 倍、量の 2 倍、量の 3 倍、量の 4 倍、量の 5 倍である。

【 0 2 1 9 】

典型的には、所定のレベル未満の減少は、健常な対象 (例えば、 A L S ではない対象) のマイクロバイオームのその代謝物の量と比較して、少なくとも 1.5 倍低く、 2 倍低く、 3 倍低く、 4 倍低く、 5 倍低い量である。

【 0 2 2 0 】

前述のように、本発明者らは、 A L S の診断のために特定の微生物種 / 株の存在量を判定するだけでなく (またはその代わりに) 、マイクロバイオームの微生物の微生物成長ダイナミクスを分析することも企図している。

【 0 2 2 1 】

「成長ダイナミクス」という用語は、細菌の成長期 (例えば、遅滞期、定常期、指数増殖期、死滅期) および成長速度自体を指す。

【 0 2 2 2 】

成長ダイナミクスの測定は、 W O 2 0 1 6 / 0 7 9 7 3 1 に記載されている方法を使用して行うことができ、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 2 2 3 】

細菌成長ダイナミクスを分析する他の方法は当技術分野で知られており、例えば、ある期間にわたる細菌接種物の光学密度の分析を含む。

【 0 2 2 4 】

陽性の診断が下されたら、診断を裏付けるために追加の検査を実施することができる。例えば、イメージング、筋生検などがある。対象は診断後に治療され得る - 例えば、本明細書に記載の細菌集団 / 代謝物を使用するか、または A L S の他のいずれかの既知のゴールドスタンダードの治療によってなされ得る。

【 0 2 2 5 】

本明細書で使用される「約」という用語は、 ± 10 % を指す。

【 0 2 2 6 】

用語「含む (c o m p r i s e s) 」、「含む (c o m p r i s i n g) 」、「含む (i n c l u d e s) 」、「含む (i n c l u d i n g) 」、「有する (h a v i n g) 」およびそれらの結合は、「含むが限定されない」ことを意味する。

【 0 2 2 7 】

「からなる」という用語は、「含んで限定される」ことを意味する。

【 0 2 2 8 】

「から本質的になる」という用語は、組成物、方法または構造が追加の成分、ステップおよび / または部品を含むことができるが、追加の成分、ステップおよび / または部品がクレームされる組成物、方法、または構造の基本的および新規の特性を実質的に変更しない場合のみを含み得ることを意味する。

【 0 2 2 9 】

本明細書で使用される単数形「 a 」、「 a n 」、および「 t h e 」は、文脈からそうでないことが明確に示されない限り、複数の言及を含む。例えば、用語「化合物」または「少なくとも 1 つの化合物」は、それらの混合物を含む複数の化合物を含み得る。

【 0 2 3 0 】

本出願を通して、本発明の様々な実施形態は、範囲形式で提示され得る。範囲形式での説明は単に便宜上および簡潔にするためのものであり、本発明の範囲に対する柔軟性のな

10

20

30

40

50

い制限として解釈されるべきではないことを理解されたい。したがって、範囲の説明は、すべての可能な部分範囲およびその範囲内の個々の数値を具体的に開示したと見なされるべきである。例えば、1～6などの範囲の説明は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6などの副次的な範囲およびその範囲内の個々の番号、例えば1、2、3、4、5、6を具体的に開示していると見なされるべきである。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

【0231】

本明細書で数値範囲が示されるときはいつでも、それは、示された範囲内の任意の引用された数字（分数または整数）を含むことを意味する。第1の表示番号と第2の表示番号との「範囲／間の範囲」、また第1の表示番号から第2の表示番号「の範囲／までの範囲」という句は、本明細書では互換的に使用され、第1および第2の表示番号およびそれらの間のすべての分数と整数を含むことを意味する。

10

【0232】

本明細書で使用される「方法」という用語は、化学、薬理学、生物学、生化学および医学の実務家により公知であるか、公知の様式、方法、手段、技術および処置から容易に開発される様式、手段、技術、および手順を含むがこれらに限定されない、所与のタスクを達成するための様式、手段、技術、および手順を指す。

【0233】

明確にするため別個の実施形態の文脈で説明されている本発明の特定の特徴は単一の実施形態に組み合わせて提供することもできるることは分かるであろう。逆に、簡潔にするために単一の実施形態の文脈で説明される本発明の様々な特徴は、別個に、または任意の適切なサブコンビネーションで、または本発明の他の説明された実施形態で適切に提供されてもよい。様々な実施形態の文脈で説明される特定の特徴は、実施形態がそれらの要素なしで動作不能でない限り、それらの実施形態の本質的な特徴と見なされるべきではない。

20

【0234】

本明細書の上にて詳述され、以下の特許請求の範囲で請求される本発明の様々な実施形態および態様は、以下の実施例で実験的裏付けを見出す。

【実施例】

【0235】

ここで、以下の実施例を参照するが、これらの実施例は、上記の説明とともに、本発明のいくつかの実施形態を非限定的な方法で説明するものである。

30

【0236】

一般に、本明細書で使用される命名法および本発明で利用される実験室手順には、分子、生化学、微生物学および組換えDNA技術が含まれる。そのような技術は文献で徹底的に説明されている。例えば、「Molecular Cloning: A laboratory Manual」Sambrook et al., (1989) ; 「Current Protocols in Molecular Biology」Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994) ; Ausubel et al., 「Current Protocols in Molecular Biology」, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989) ; Perbal, 「A Practical Guide to Molecular Cloning」, John Wiley & Sons, New York (1988) ; Watson et al., 「Recombinant DNA」, Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) 「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」, Vols. 1~4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998) ; 米国特許第4,666,828号明細書；第4,683,202号明細書；第4,801,531号明細書；第5,192,659号明細書および第5,272,057号明細書；「Cell Biology: A Laboratory Handbook」, Volumes I-III Cellis, 40

40

50

J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N.Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I - III Coligan J.E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology", (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W.H. Freeman and Co., New York (1980)にて記載されている方法論を参照されたい；米国特許第3,791,932号明細書；第3,839,153号明細書；第3,850,752号明細書；第3,850,578号明細書；第3,853,987号明細書；第3,867,517号明細書；第3,879,262号明細書；第3,901,654号明細書；第3,935,074号明細書；第3,984,533号明細書；第3,996,345号明細書；第4,034,074号明細書；第4,098,876号明細書；第4,879,219号明細書；第5,011,771号明細書、および第5,281,521号明細書；"Oligonucleotide Synthesis" Gait, M.J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B.D., and Higgins S.J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B.D., and Higgins S.J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R.I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1~317, Academic Press；"PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996)などの特許および科学文献に利用可能なイムノアッセイが広範囲に記載されており、参照されたい；これらはすべて、本明細書に完全に記載されているかのように、参照により組み込まれている。他の一般的な参考文献は、この文書全体で提示されている。その中の手順は、当技術分野で周知であると考えられ、読者の便宜のために提供される。ここに含まれるすべての情報は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0237】

材料および方法

マウス

C57BL/6バックグラウンドのG93A mSOD1-Tgマウスを使用した。すべての実験で、年齢と性を一致させたマウスを使用し、WT同腹仔を対照として使用した。実験開始時のマウスは40日齢であった。すべてのマウスは、厳密な24時間の逆明暗サイクルで維持され、明かりが午後10時から午前10時まで点されていた。トリプトファン欠乏食 (A10033Yi, Research Diets, 米国、ニュージャージー) が、40日齢から実験のエンドポイントまで適用された。抗生物質治療のために、マウスは、前述のように40日齢から、飲料水においてバンコマイシン (0.5 g / l)、アンピシリン (1 g / l)、カナマイシン (1 g / l)、およびメトロニダゾール (1 g / l) の組み合わせを与えられた (Levy et al., 2015)。Akkermansia muciniphila または Ruminococcus torqueus のコロニー形成のため、40日齢のマウスを抗生物質で2週間処理し、2日間の洗浄期間の後、実験の終点まで毎週 200 μl の PBS 懸濁細菌 (O.D. = 0.7) を強制飼養した。

【0238】

代謝物の投与

NAMおよびフェノール硫酸塩の *in vivo* 投与には、Alzet 漫透圧ミニポンプモデル 1004（チャールズリバー）を使用した（0.11 μL / 時の速度で 4 週間化合物を注入）。ポンプには、滅菌水で希釈した 100 μL の 50 mg / mL ニコチンアミド（Cymit Quimica、バルセロナ、スペイン）または 33.33 mg / mL のフェノール硫酸ナトリウム塩（TLC、オンタリオ、カナダ）を充填した（49.28 mg / kg / 週の NAM および 30.8 mg / kg / 週の硫酸フェノールに相当）。ビヒクル制御ポンプには、同量の超純水が含まれていた。6 週齢の SOD1-Tg および WT 同腹仔マウスを、ケタミン（100 mg / kg）およびキシラジン（10 mg / kg）の腹腔内注射で麻酔し、首の皮膚を剃り、70% エタノールで滅菌し、皮膚に 1 cm の切開を行い、漫透圧ミニポンプを最小限の鈍的切開に続いて挿入し、右後部側面の上方に配置した。次に、無菌の外科用クリップで切り口を閉じ、ストレス、出血、痛み、または異常な行動の何らかの兆候がないか、動物を注意深く監視した。ミニポンプは、マウスが生後 5 か月になるまで、4 週間ごとに 3 回交換した。

【0239】

マウスの運動機能の評価

ロータロッド：運動協調性およびバランスを評価するために、各マウスをロータロッドデバイス（Panlab L e 8500 Harvard Apparatus、スペイン）で、加速速度モード（10 分間で 4 rpm から 40 rpm に増加）にて、最大テスト時間 5 分でテストした。マウスは、正式な試験の前に、水平回転ロッドに慣れし、3 回の試行で事前に訓練した。各マウスは、60、80、100、120、および 140 日齢で 3 回記録された。装置は、マウスがスピンドルから落ちたときの経過時間を自動的に記録した。

【0240】

吊り下げワイヤーグリップテスト：マウスは前足で 2 mm の厚さの水平金属ワイヤー（作業面から 80 cm 上に吊るされている）をつかむことができ、ワイヤーをつかむために後ろ足を上手く持ち上げるまでの待ち時間が記録される。マウスを 30 秒間観察し、次のようにスコアを付ける。0 = 10 秒以内に脱落する。1 = 2 つの前足でバーにぶら下がっている。2 = バーに登ろうとする。3 = 2 つの前足と片方または両方の後足でバーにぶら下がっている。4 = 4 本の足すべてと尾をバーに巻き付けてぶら下がる。5 = バーの端まで積極的に逃げる。

【0241】

神経学的スコアリング：マウスは、ALS TDI によって開発されたシステムによって神経学的にスコアリングされた（Hatzipetros et al., 2015）：スコア 0：マウスが尾でぶら下がっていたときに、後脚が外側正中線から完全に伸びており、またマウスはこの状態を 2 ~ 3 回ぶら下がりながら 2 秒間保持できる。スコア 1：側方正中線に向かう脚の伸長が崩れる、または部分的に崩れる（脱力する）、あるいは尾でのぶら下がり中に後肢が震える。スコア 2：12 インチの歩行中に、つま先が少なくとも 2 回下に曲がるか、足のいずれかの部分がケージの底 / テーブルに沿って引きずられている。スコア 3：硬直した麻痺または最小限の関節の動き、足は前方への動きを生成するために使用されていない。スコア 4：マウスをどちらかの側に置いてから 30 秒以内に直立することができない。

【0242】

ホームケージの移動：Inframot (TSE - Systems) を使用した体温画像の自動検知により、ホームケージ内で 46 時間にわたって動物の移動を定量化した。個々の動物の動きを 30 分ごとに合計した。

【0243】

生存

130 日齢から、マウスを毎日モニターした。エンドポイントは、神経学的スコアが 4

10

20

30

40

50

に達すること、および／または体重が15%以上減少することと定めた。カプランマイヤー法を使用して生存確率を計算し、ログランク検定を使用して統計分析を実行した。

【0244】

脳脊髄液（CSF）の抽出

マウスをケタミン（100mg/kg）とキシラジン（10mg/kg）の腹腔内注射で麻酔した。首の皮膚を剃り、マウスを定位固定装置にうつ伏せに置いた。頭部をヘッドアダプターで固定した。手術部位を70%エタノールで拭き取り、皮膚の矢状切開を後頭より下に施した。解剖用顕微鏡下で、皮下組織と筋肉（頸板状筋と大後頭直筋）を鉗子による鈍的切開によって分離した。一対のマイクロリトラクターが、筋肉を離して保持するために使用されている。硬膜を無菌の綿棒で吸い取って乾かした。CSFは、毛細管を使用して収集され、硬膜を通って大槽、棘筋動脈の外側に浸透し、直ちに液体窒素で凍結され、-80で保存された。

【0245】

磁気共鳴画像法（MRI）

MRIスキャン中、マウスは酸素（1リットル/分）と混合されたイソフルラン（誘導用に5%、維持用に1~2%）で麻酔され、鼻マスクを通して送達された。麻酔をかけたら、磁石内の再現性のある位置付けを確実にするために、動物をヘッドホルダーに入れた。呼吸数をモニターし、実験期間中、毎分約60~80回の呼吸を維持した。MRI実験は、3方向のそれぞれで最大40ガウス/cmのパルス勾配を生成できる勾配式コイルシステムを備えた9.4 Tesla BioSpec Magnet 94/20 USRシステム（Bruker、ドイツ）で実行された。すべてのMRI画像は、受信直交マウスヘッド表面コイルと送信線形コイル（Bruker）を使用して取得された。T₂マップは、マルチスライススピニエコー（MSME）画像化シーケンスを使用して、次のパラメーターで取得された：3000msの繰り返し遅延（TR）、16回のエコー（TE）増分（10から160msまで直線的に）、256×128の行列の次元（256×256に補間）、および2つの平均、12分48秒の画像取得時間に対応。T₂データセットは、スライスごとに16枚の画像でからなっていた。2.0×2.0 cm²の視野（FOV）で、スライスの厚さが1.00mmである13個の連続スライスを取得した。

【0246】

画像分析：定量的なT₂マップは、マルチエコーT₂強調画像から作成された。マルチエコー信号を単指数関数的減衰に適合させて、各画像ピクセルのT₂値を抽出した。すべての画像分析は、Matlab R2013bで記述された自家製のスクリプトを使用して実行された。MRIデータセット分析の前に、対象間および対象内の同時登録が適用された。マウスの脳地図への最適な適合性（頭の動きの画像アーティファクトの修正）のために、すべての画像は、SPMソフトウェア（バージョン12、UCL、ロンドン、英国）を使用して、アトラス登録、つまり再スライス、再調整、および平滑化を受けた。結果は平均±SDとして報告された。t検定を使用して、2群の平均を比較した。0.01未満のp値は統計的に有意であると見なされた。

【0247】

組織学

脊髄（C3-T6）の切片をパラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋して、ルクソール・ファスト・ブルーとクレシル・エクト・バイオレットで染色した。続いて、盲検化された研究者によって切片が検査され、前角のクレシル・バイオレット陽性運動ニューロンが数えられてニューロンの生存が評価された。結腸組織を乾燥メタノール性カルノイで固定し、核染色剤であるシトックスグリーンで染色し、Muc2ムチンを抗MUC2C3抗血清およびヤギ抗ウサギ-Alexa 555（Thermo Fisher Scientific）⁶⁶で染色した。

【0248】

FITC-デキストランによる腸上皮バリア透過性の測定

アッセイ当日、4kDaフルオレセインイソチオシアネート（FITC）-デキストラ

10

20

30

40

50

ンをPBSに溶解して 80 mg ml^{-1} の濃度にした。 $150\text{ }\mu\text{l}$ のデキストランで強制経口投与する前に、マウスを4時間絶食させた。強制経口投与の3時間後にマウスに麻酔をかけ、血液を採取し、 $1,000\times g$ で12分間4で遠心分離した。血清を収集し、 485 nm の励起波長と 535 nm の発光波長で蛍光を定量した。

【0249】

フローサイトメトリー

40日齢以降Abxまたはコントロールとして水で処理したWTおよびSOD1-Tgマウスを、140日目（小腸および結腸の場合）、または60日目および140日目（脊髄の場合）のいずれかに、小腸、結腸、および脊髄の細胞性分析に使用した。小腸および結腸のサンプルを糞便から徹底的に洗い流した後、37で30分間2 mMのEDTAを解離させた。激しく振とうした後、上皮画分を廃棄した。次に、固有層分析のためにDNase Iとコラゲナーゼを使用してサンプルが消化された。脊髄のサンプルを個々のマウスから採取し、ホモジナイズし、2%BSA（Sigma-Aldrich）、1 mg/mlのコラゲナーゼD（Roche）、および0.15 mg/mlのDNase 1を含むHBSS溶液とインキュベートして、70 μmメッシュでろ過した。密度遠心分離の前に、均質化した切片を40%パーコールに再懸濁した（1000×g。20で15分、低加速、ブレーキなし）。単離した細胞を冷PBSで洗浄し、細胞の表面を直接染色するために1%BSAを含むPBSに再懸濁した。単細胞懸濁液を、CD45、CD11b、CD11c、F4/80、Ly6C、Ly6G、B220、CD3、CD4、CD8、およびNK1.1に対する抗体で氷上で45分間染色した。染色した細胞をBD-LSRFortessaサイトメーターで分析し、FlowJoソフトウェアで分析した。

10

【0250】

粘液プロテオミクス分析

プロテオーム分析のために、単離された粘液サンプルを還元バッファー（6 M塩酸グアニジニウム、0.1 MのTris/HCl、pH 8.5、5 mMのEDTA、0.1 MのDTT（Merck））中で37で一晩インキュベートし、可溶性画分を、尿素の代わりに6 M GuHClを使用した先行のプロトコル^{6,7}に従ったフィルター支援サンプル前処理用のスピンドル（10 kDa、PALL、ニューヨーク州ポートワシントン）の上に加えた。フィルター上のタンパク質をアルキル化し、続いてLysC（Wako、バージニア州リッチモンド）で4時間消化した後、一晩トリプシン（Promega、ウイスコンシン州フィッツバーグ）で消化した。Muc2絶対定量用の重ペプチド（Spinetides TQL、JPT Peptide Technologies、ベルリン、ドイツ）（10ペプチド、各100 fmol^{6,8}）を、トリプシン消化前に添加した。遠心分離後にフィルターから放出されたペプチドは、StageTip C18カラムで洗浄した^{6,9}。NanoLC-MS/MSは、EASY-nLC 1000システム（Thermo Fisher Scientific）で実行され、ナノエレクトロスプレーイオン源を介してQ Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap質量分析計（Thermo Fisher Scientific）に接続された。ペプチドは、インハウスに充填された逆相カラム（150×0.075 mmの内径、C18-AQ 3 μm）により、300 nL/minの流速を使用して、バッファーB（A:0.1%ギ酸、B:0.1%ギ酸/80%アセトニトリル）の10~45%の30分の勾配で分離した。完全質量スペクトルは、350~1,600 m/zから60,000 (m/z 200)の分解能で取得された。最大15個の最も強いピーク（電荷状態 2）が断片化され、タンデム質量スペクトルが15,000の分解能と20秒の動的排除で取得された。絶対定量には、別個の標的質量分析法を使用した。この方法では、前駆体と、重ペプチドおよび対応する軽ペプチドの断片のみを30,000の分解能でスキャンした。タンパク質は、すべてのマウスムチン配列を含む社内データベースが追加されたマウス（2018年7月11日ダウンロード）UniProtタンパク質データベースに対して検索することにより、MaxQuantプログラム（バージョン1.5.7.4^{7,0}）で識別された（www(dot)medkem(dot)gu(dot)se/mucinbio

20

30

40

50

logy / databases /)。検索は、完全なトリプシン特異性、最大2回の切断ミス、再キャリブレーションに使用される最初の検索での20 ppmの前駆体の許容値、続いて主要な検索での7 ppm、断片のイオンでの0.5 Daで実行された。システインのカルバミドメチル化は固定修飾に設定され、メチオニン酸化とタンパク質のN末端アセチル化は可変修飾として設定された。必要な偽発見率(FDR)は、ペプチドレベルとタンパク質レベルの両方で1%に設定され、必要な最小ペプチドの長さは6アミノ酸に設定された。タンパク質は、MaxQuantラベルフリー定量(LFQ)オプションに基づいて、定量に最低2つのペプチドを使用して定量した。Muc2の絶対的な定量は、Skyline(バージョン4.2.0⁷¹)を使用して実行された。

【0251】

細菌培養: Akkermansia muciniphila(ATCC BAA-835)、Akkermansia muciniphila(ATCC BAA-2869)、Ruminococcus torques(ATCC 27756)、Lactobacillus gasseri(ATCC 33323)、Prevotella melaninogenica(ATCC 25845)、Coprobacillus cateniformis(DSM-15921)、Parabacteroides goldsteinii(DSM-19448)、Lactobacillus murinus(DSM-100194)、Parabacteroides distasonis(ATCC 8503)、Eisenbergiella tayi(DSM-24404) Subdoligranulum variabile(SDM-15176)を、嫌気性条件下で、37℃で振とうせずに、刻んだ肉培地(BD 297307)で培養した(Coy Laboratory Products、75% N₂、20% CO₂、5% H₂)。Eggerthella lenta(DSM-15644)は、0.5%アルギニンを添加した刻んだ肉培地で培養した。すべての株は、全遺伝子16Sサンガーシーケンシングによって純度が検証された。WTおよびnadaE.coliは、もともと「Keio collection⁷²」から入手し、LB培地(WT)、または30 μg/mlカナマイシン(nada)を添加したLBで増殖させた。細菌のin vitroのニコチンアミドの分泌を測定するために、菌株を刻んだ肉培地で定常期まで増殖させ、遠心分離し、微量元素とグルコース(4 g/l)を含むM9最小培地で2回洗浄し、嫌気性条件下で3時間M9に再懸濁した。遠心分離後、標的化されたニコチンアミド測定のために50 μlの上清を収集し、BCA法を使用してペレットからタンパク質を抽出した:簡単に述べると、細菌ペレットをプロテアーゼ阻害剤を含むRIPAバッファーでホモジナイズし、4℃で45分間インキュベートし、20分間、14,000 r.p.m.、4℃で遠心分離した。次に、培地のニコチンアミド測定値を、各サンプルの総タンパク質レベルに対して正規化した。

【0252】

核酸抽出

DNAの精製: DNAは、PureLink(商標)Microbiome DNA Purification Kit(Invitrogen)を製造元の推奨に従って使用して、マウスの糞便サンプルから単離した。

【0253】

自動化されたプラットフォーム用に最適化されたPowerSoil DNA Isolation Kit(MOBIO Laboratories)を使用して、患者の糞便スワップからDNAを単離した。

【0254】

RNAの精製: 脊髄、結腸、筋肉(外側広筋)のサンプルをマウスから採取し、液体窒素で急速冷凍した。Tri Reagent(Sigma Aldrich)で組織をホモジナイズした。標準的なクロロホルム抽出を使用してRNAを精製した。2マイクログラムのトータルRNAを使用してcDNAを生成した(High Capacity cDNA Reverse Transcription; Applied Biosystems)。

10

20

30

40

50

【0255】

PCRは、ViiA7の機器（Applied Biosystems）において、Kapa Sybr qPCRキット（Kapa Biosystems）を使用して実行した。PCR条件は、95で20秒間、続いて95で3秒間、60で30秒間を40サイクル行った。データは、参照のハウスキーピング遺伝子として機能する16Sを使用したCT法を使用して分析された。16Sサイクルは、実験条件に影響されないよう保証された。

【0256】

核酸処理とライブラリーの調製

細菌のDNAの定量化用の16S qPCRプロトコル：Fast Sybr（商標）Green Master Mix（Thermo Fisher）を2回使用してプライマーセット（表1に示す）で増幅する前に、DNAテンプレートを1ng/ulに希釈した。Akkermansia muciniphilaの増幅条件は次のとおりである。95で3分間の変性、続いて95で3秒間の変性を40サイクル；66で30秒間アニーリングした後、曲線を満たす。全細菌（16S rRNA）の増幅条件は次のとおりである。95で3分間の変性、続いて95で3秒間の変性を40サイクル；60で30秒間アニーリングした後、曲線を満たす。サイクルの差が2を超える重複は、分析から除外された。40サイクル後に増幅されなかつたいずれのサンプルのCT値も、40（検出のしきい値）として定義された。

【0257】

表1. qPCR分析で使用されるプライマー

プライマーID	シーケンス	標的および参照
AM1	CAGCACGTGAAGGTGGGGAC (配列番号1)	Akkermansia muciniphila 16S rRNA遺伝子
AM2	CCTTGC GGTTGGCTTCAGAT (配列番号2)	Akkermansia muciniphila 16S rRNA遺伝子
F-S	CAACGCGMARAACCTTAC (配列番号3)	16S rRNA遺伝子
F-AQ	CTAACCGANGAACCTYACC (配列番号4)	16S rRNA遺伝子
F-UC3	ATACGCGARGAACCTTAC (配列番号5)	16S rRNA遺伝子
F-PP	CNACGCGAAGAACCTTANC (配列番号6)	16S rRNA遺伝子
R-S	CGACRRCCATGCANCACCT (配列番号7)	16S rRNA遺伝子

【0258】

16S rDNAシーケンシング

16Sアンプリコンバイロシーケンスでは、16S rRNA遺伝子のプライマー5'15F/806Rを使用してV4領域にまたがるPCR増幅を実行し、続いて2×250bpのペアエンドシーケンス（ Illumina MiSeq）を使用してシーケンスした。カスタムプライマーを Illumina MiSeqキットに追加した結果、ペアエンド結合後に253bpの断片が110, 998±66, 946リード（平均±SD）の深

10

20

30

40

50

さまでシーケンスされた。

リード1 : T A T G G T A A T T G T G T G C C A G C M G C C G C G G T A A (配列番号8)

リード2 : A G T C A G T C A G C C G G A C T A C H V G G G T W T C T A A T (配列番号9)

インデックス付加シーケンスプライマー : A T T A G A W A C C C B D G T A G T C C G G C T G A C T G A C T A T T A G A A (配列番号: 10)

【0259】

全ゲノムショットガンシーケンシング

100ngの精製されたDNAをCovaris E220Xソニケーターで剪断した。Illumina互換ライブラリーは、説明されているように調製され(Suez et al., 2014)、Illumina NextSeqプラットフォームで、80bpの読み取り長からヒトのサンプルの場合は10Mの読み取り、AM処理マウスサンプルの場合は1Mの読み取り、ナイーブWTマウスとSOD1-Tgマウスの比較の場合は5Mの読み取りの深さまで、配列決定された。

【0260】

RNA-Seq

リボソームRNAは、公開されている方法の修正版(Adiconis et al., 2013)に従って、RNaseH(New England Biolabs, M0297)によって選択的に枯渇させた。具体的には、マウスrRNA18Sおよび28Sに相補的な50bpのDNAオリゴ(25nM、IDT、表3に示す)のプールを、75μlの10mMのTris、pH8.0に再懸濁した。全RNA(10μlのH₂O中100~1000ng)を等量のrRNAオリゴプールと混合し、2μlおよび3μlの5×rRNAハイブリダイゼーションバッファー(0.5MのTris-HCl、1MのNaCl、HClでpH7.4まで滴定)に希釈し、追加された。サンプルを95℃で2分間インキュベートした後、温度をゆっくりと(-0.1/s)37℃まで下げた。RNaseH酵素混合物(2μlの10U RNaseH、2μlの10×RNaseHバッファー、1μlのH₂O、合計5μlのミックス)をハイブリダイゼーション終了の5分前に調製し、37℃に予熱した。それらが37℃に達したときに酵素混合物をサンプルに添加し、それらをこの温度で30分間インキュベートした。サンプルは、2.2×SPRIビーズ(Ampure XP, Beckmann Coulter)を使用して、製造元の指示に従って精製した。残留オリゴは、37℃で30分間インキュベートした5μlのDNase反応混合物(1μlのTurbo DNase、2.5μlのTurbo DNaseの10×バッファー、1.5μlのH₂O)とインキュベートすることにより、DNase処理(Thermo Fisher Scientific, AM2238)で除去した。サンプルを2.2×SPRIビーズで再度精製し、3.6μlのプライミング混合物(New England Biolabの0.3μlランダムプライマー、E7420、3.3μlのH₂O)に懸濁した。続いて、サンプルを65℃で5分間プライミングした。次にサンプルを氷に移し、2μlのファーストストランド混合物を加えた(1μlの5×ファーストストランドバッファー、NEB E7420; 0.125μlのRNase阻害剤、NEB E7420; 0.25μlのProtoScript II逆転写酵素、NEB E7420; および0.625μlの0.2μl/mlのアクチノマイシンD、Sigma、A1410)。Illumina用NEB Next Ultra Directional RNA Library Prep Kit(NEB、E7420)を製造元の指示に従って使用して、ファーストストランドの合成とその後すべてのライブラリー調製ステップを実行した(すべての反応量を4分の1に減らした)。

【0261】

10

20

30

40

50

表3. rRNAの枯渇に使用されるDNAオリゴ

オリゴ名	シーケンス
AG9327_18_1	TAATGATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGGAAACCTTGTACGACTTTAC (配列番号1)
AG9328_18_2	TTCCTCTAGATAGTCAGTCAAGTTCGACCGTCTTCAGCGCTCCGCCAGGGC (配列番号1)
AG9329_18_3	GTGGGGCGACCCGGCGGGCGATCCGAGGGCCTCACTAAACCATCAA (配列番号1)
AG9330_18_4	TCGGTAGTAGCGACGGCGGTGTACAAAGGGCAGGGACTTAATCAACG (配列番号1)
AG9331_18_5	CAAGCTTATGACCCGCACTACTCGGGAAATTCCCTCGTTCATGGGAATA (配列番号1)
AG9332_18_6	ATTGCAATCCCCGATCCCCATCGAATGGGTTCAACGGGTTACCGCG (配列番号1)
AG9333_18_7	CCTGCCGGCGTAGGGTAGGCCACACGCTGAGCCAGTCAGTGTAGCGCG (配列番号1)
AG9334_18_8	GCAGCCCCGGACATCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCTCAATCTCG (配列番号1)
AG9335_18_9	GGTGGCTGAACGCCACTTGTCCCTCTAAGAAGTTGGGGACGCCGACCGC (配列番号1)
AG9336_18_10	TCGGGGTGCCTTAACTAGTTAGCATGCCAGAGTCTCGTTATCGGA (配列番号2)
AG9337_18_11	ATTAACCAGACAAATCGCTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCCAC (配列番号2)
AG9338_18_12	CCACGGAATCGAGAAAGAGCTATCAATCTGTCAATCCTGTCCGTGTCGG (配列番号2)
AG9339_18_13	GCGGGGTGAGGTTTCCGTGTTGAGTCAAATTAAAGCCGCAGGCTCCACTC (配列番号2)
AG9340_18_14	CTGGTGGTGCCTTCCGTCAATTTCCTTAAGTTTCAAGCTTGCCTTGAACATA (配列番号2)
AG9341_18_15	CTCCCCCGGAACCAAAGACTTGGTTCCCGAAGCTGCCGGCG (配列番号2)
AG9342_18_16	CATGGGAATAACGCCGCCGCATCGGGCATCGTTATGGTCGGAA (配列番号2)
AG9343_18_17	CTACGACGGTATCTGATCGTCTCGAACCTCCGACTTTCGTTCTGATT (配列番号2)
AG9344_18_18	ATGAAAAACATTCTGGCAAATGCTTTCGCTCTGGTCCGTCTTGC (配列番号2)
AG9345_18_19	CCAAGAATTTCACCTCTAGCGGCCGCAATACGAATGCCCGGGCTCC (配列番号2)
AG9346_18_20	CTTAATCATGGCTCAGTCCGAAACCAACAAAATAGAACCGCGGT (配列番号3)
AG9347_18_21	ATTCATTATTCTAGCTGCCGTATCCAGGCCTCGGGCTGCTTGA (配列番号3)
AG9348_18_22	CACTCTAATTTTCAAAGTAAACGCTTCGGGCCGGACACTCAGC (配列番号3)
AG9349_18_23	TAAGAGCATCGAGGGGCGCCGAGAGGCAAGGGCGGGGACGGCGGT (配列番号3)
AG9350_18_24	CTCGCTCGCGCGGACCGCCCGCTCCCAAGATCCAACCTACGAGCT (配列番号3)
AG9351_18_25	TTTTAACTGCAGCAACTTAAATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCG (配列番号3)
AG9352_18_26	GCTGCTGGCACCAAGACTTGCCTCCAAATGGATCCTCGTTAAAGGATTAA (配列番号3)
AG9353_18_27	AGTGGACTCATCCAATTACAGGGCCTCGAAAGAGTCCTGTATTGTTATT (配列番号3)
AG9354_18_28	TTTCGTCACTACCTCCCCGGGTCGGGAGTGGGTAATTGCGGCCGCT (配列番号3)
AG9355_18_29	CCTTCCTGGATGTGGTAGCCGTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAA (配列番号3)
AG9356_18_30	CCCTGATTCCCCGTACCCGTGGCACCATGGTAGGCACGGGACTACCA (配列番号4)

10

20

30

40

50

AG 9 3 5 7_1 8_3 1	TCGAAAGTTGATAGGGCAGACGTTGAATGGGTCGTCGCCGCCACGGG (配列番号4-1)
AG 9 3 5 8_1 8_3 2	GCGTGCATGGCCCGAGGTTATCTAGAGTCACCAAAGCCGCCGGCGCC (配列番号4-2)
AG 9 3 5 9_1 8_3 3	GCCCCCGGCCGGGGCCGGAGAGGGGCTGACCGGGTTGGTTGATCTGA (配列番号4-3)
AG 9 3 6 0_1 8_3 4	TAATGCAACGACATCCCCCGCGAAGGGGCTAGCGCCCGTCGGCATGTA (配列番号4-4)
AG 9 3 6 1_1 8_3 5	TTAGCTCTAGAATTACCAAGTTATCAAGTAGGAGAGGAGCGAGCGACC (配列番号4-5)
AG 9 3 6 2_1 8_3 6	AAAGGAACCATACTGATTAAATGAGGCCATTGAGCTTCACTGTACCGG (配列番号4-6)
AG 9 3 6 3_1 8_3 7	CCGTGCGTACTTAGACATGCATGGCTTAATCTTGAGACAAGCATATGCT (配列番号4-7)
AG 9 3 6 4_1 8_3 8	TGGCTTAATCTTGAGACAAGCATAGCTACTGGCAGGATCAACCAGGTA (配列番号4-8)
AG 9 4 6 6_5_8_1	AAGCGACGCTCAGACAGGGTAGCCCCGGGAGGAACCGGGCCGCAAGT (配列番号4-9)
AG 9 4 6 7_5_8_2	GCGTCAAGTGTGATGATCAATGTCCTGCAATTACATTAATTCTC (配列番号5-0)
AG 9 4 6 8_5_8_3	GCAGCTAGCTGCGTCTTCATCGACGACGAGCCGAGTGATCCACCGCTA (配列番号5-1)
AG 9 4 6 9_1 6_1	AAACCTGTTCTGGGTGGGTGAGGTTAACTAAGTTGAGATGATAT (配列番号5-2)
AG 9 4 7 0_1 6_2	CATTACGGGGAAGGCCTTGTGAAGTAGGCTTATTCTCTTC (配列番号5-3)
AG 9 4 7 1_1 6_3	TTCGTACAGGGAGGAATTGAANGTAGATAGAAACCGACCTGGATTACTC (配列番号5-4)
AG 9 4 7 2_1 6_4	CGGTCTGAACCTCAGATCACGTTAGGACTTTAATCGTTGAACAAACGAAACCT (配列番号5-5)
AG 9 4 7 3_1 6_5	TTAATAGCGGCTGACCATCGGGATGTCCTGATCCAACATCGAGGTCGTA (配列番号5-6)
AG 9 4 7 4_1 6_6	AACCTATTGTTGATATGGACTCTAGAAATAGGATTGCGCTGTTATCCCTA (配列番号5-7)
AG 9 4 7 5_1 6_7	GGGTAACTTGTCGGTGGTCAAGTTATGGATCAATTGAGTATAGTAGT (配列番号5-8)
AG 9 4 7 6_1 6_8	TCGTTTGACTGGTGAAGTCTTAGCATGTTACTGCTCGGAGGTTGGTTCT (配列番号5-9)
AG 9 4 7 7_1 6_9	GCTCCGAGGTGCCCAACCGAAATTAAATGCAAGGTTGGTAGTTAG (配列番号6-0)
AG 9 4 7 8_1 6_1 0	GACCTGTTGGTTAGGTACTGTTGCAATTAAATTAAAGCTCCAT (配列番号6-1)
AG 9 4 7 9_1 6_1 1	AGGGTCTCTCGTCTTGCTGTGTTATGCCGCCCTTCACGGGCAGGTCA (配列番号6-2)
AG 9 4 8 0_1 6_1 2	ATTCACGGTTAAAAGTAAGAGACAGCTGAACCCCTCGTGGAGCCATTCA (配列番号6-3)
AG 9 4 8 1_1 6_1 3	TACAGGTCCCTATTAAGGAACAAAGTGATTATGCTACCTTGCACGGTTA (配列番号6-4)
AG 9 4 8 2_1 6_1 4	GGGTACCGCGGCCGTTAAACATGTGTCACTGGCAGGGCGGTGCCCTTAAT (配列番号6-5)
AG 9 4 8 3_1 6_1 5	ACTGGTGATGCTAGAGGTGATTTTGTAACAGGGGGTAAGATT (配列番号6-6)
AG 9 4 8 4_1 6_1 6	GCGGAGTTCTTTACTTTTAACCTTCTTATGAGCATGCCTGT (配列番号6-7)
AG 9 4 8 5_1 6_1 7	TGGGTTGACAGTGAGGGTAATAATGACTTGGTTGATTGAGATATTG (配列番号6-8)
AG 9 4 8 6_1 6_1 8	GGCTGTTAATGTCAGTTCACTGTTTAATCTGACGCAGGCTTATGCGGA (配列番号6-9)
AG 9 4 8 7_1 6_1 9	GGAGAATGTTTCACTGTTACTTAACTAACATTAGTTCTATAGGGTG (配列番号7-0)
AG 9 4 8 8_1 6_2 0	ATAGATTGGTCCAATTGGGTGAGGGAGTTCACTTATATGTTGGGATT (配列番号7-1)
AG 9 4 8 9_1 6_2 1	TTTAGGTAGTGGGTGTTGAGCTTGAACGCTTCTTAATTGGTGGCTGCTT (配列番号7-2)

10

20

30

40

50

AG9490_16_22	TTAGGCCTACTATGGGTGTTAAATTTTACTCTCTACAAAGGTTTTT (配列番号7 3)
AG9491_16_23	CCTAGTGTCCAAAGAGCTGTTCTTGGACTAACAGTTAAATTACAA (配列番号7 4)
AG9492_16_24	GGGATTTAGAGGGTTCTGTGGGCAAAATTAAAGTTGAACTAAGATTCTA (配列番号7 5)
AG9493_16_25	TCTTGGACAACCAAGCTATCACCAAGGCTCGGTAGGTTGTCGCCTCTACCT (配列番号7 6)
AG9494_16_26	ATAAAATCTTCCCACTATTTGCTACATAGACGGGTGTGCTCTTTAGCTG (配列番号7 7)
AG9495_16_27	TTCTTAGGTAGCTCGTCTGGTTGGGGGTCTTAGCTTTGGCTCTCCTTG (配列番号7 8)
AG9496_16_28	CAAAGTTATTCTAGTTAAATTCAATTATGCAGAAGGTATAGGGTTAGTCC (配列番号7 9)
AG9497_16_29	TTGCTATATTATGCTTGGTTATAATTTCATCTTCCCTTGCCTACTA (配列番号8 0)
AG9498_16_30	TATCTATTGCGCCAGGTTCAATTCTATGCCTATACTTTATTGGGTA (配列番号8 1)
AG9499_16_31	AATGGTTGGCTAAGGTTGCTGGTAGTAAGGTGGAGTGGGTTGGGCT (配列番号8 2)
AG9500_12_1	GTTCGTCCAAGTGCACCTTCCAGTACACTTACCATGTTACGACTTGTCTC (配列番号8 3)
AG9501_12_2	CTCTATATAAATGCGTAGGGGTTAGTTAAATGTCCTTTGAAGTATACT (配列番号8 4)
AG9502_12_3	TGAGGAGGGTGACGGCGGTGTTGACGGCCTTCAGGGCCCTGTTCAACTA (配列番号8 5)
AG9503_12_4	AGCACTCTACTCTTAGTTACTGCTAAATCCACCTTCGACCCCTTAAGTTT (配列番号8 6)
AG9504_12_5	CATAAGGGCTATCGTAGTTCTGGGTAGAAAATGTTAGCCCATTCTTG (配列番号8 7)
AG9505_12_6	CCACCTCATGGGCTACACCTTGACCTAACGTCTTACGTGGTACTTGCG (配列番号8 8)
AG9506_12_7	CTTACTTTGTAGCCTTCATCAGGGTTGCTGAAGATGGCGGTATATAGGC (配列番号8 9)
AG9507_12_8	TGAGCAAGAGGTGGTGAGGTTGATCGGGTTTATCGATTACAGAACAGGC (配列番号9 0)
AG9508_12_9	TCCTCTAGAGGGATATGAAGCACCGCAGGTCTTGGAGTTAAAGCTGT (配列番号9 1)
AG9509_12_10	GGCTCGTAGTGTCTGGCGAGCAGTTTGTTGATTTAACTGTTGAGGTTT (配列番号9 2)
AG9510_12_11	AGGGCTAACGATAGTGGGTATCTAACTCCAGTTGGGTCTTAGCTATTG (配列番号9 3)
AG9511_12_12	TGTGTTCAAGATATGTTAAAGCCACTTTCGTAGTCATTGTTGTCAACTG (配列番号9 4)
AG9512_12_13	GAGTTTTAACAACTCAGGTGAGTTTAGCTTATTGGGAGGGGTGAT (配列番号9 5)
AG9513_12_14	CTAAACACTCTTACGCCGGCTTCTATTGACTTGGGTTAACGTGTGAC (配列番号9 6)
AG9514_12_15	CGCGGTGGCTGGCACAAATTGACCAACCTGGGGTTAGTATAGCTTAGT (配列番号9 7)
AG9515_12_16	TAAACTTCGTTATTGCTAAAGGTTAACACTGCTGTTCCCGTGGG (配列番号9 8)
AG9516_12_17	TGTGGCTAGGCTAACCGTTTGAGCTGCAATTGCTGCGTGTGATGCTTG (配列番号9 9)
AG9517_12_18	TTCTTTGATCGTGGTGATTAGAGGGTGAACACTCACTGGAACGGGGATG (配列番号1 0 0)
AG9518_12_19	CTTGCATGTAACTTAAAGAGCTAATAGAAAGGCTAGGACCAAACCC (配列番号1 0 1)
AG9519_5_1	AAAGCCTACAGCACCCGGTATTCCCAGGCCTCTCCCATCCAAGTACTAA (配列番号1 0 2)
AG9520_5_2	CCAGGCCGACCCCTGCTTAGCTTCCGAGATCAGACGAGATGGCGCGTT (配列番号1 0 3)
AG9521_5_3	TTCCGAGATCAGACGAGATGGCGCGTTCAAGGGTGGTATGCCGTAGAC (配列番号1 0 4)

【0262】

16S rDNA分析

重複するペアエンドのFASTQファイルは、Qiime 2バージョン2018.4.0 (Qiime 2) で実装されたデータキュレーションパイプラインで照合および処理された (Caporaso et al., 2010)。ペアエンドシーケンスデータは、Qiime2 demux-emp-pairedを使用してサンプル固有のバーコードに従って逆多重化された。トリミングおよびアンプリコンシーケンスバリエント (ASV) のピッキングは、DADA2を使用して実行された (Callahan et al., 2016)。アルファ希薄化曲線は、Qiime 2のアルファ希薄化を使用してプロットされ、各比較に適切なサブサンプリングの深度を設定するために使用された。サンプルは、Qiime 2機能テーブルrarefyを使用して希薄化した (Weiss et al., 2017)。読み取り深度が関連するサブサンプリング深度よりも低いサンプルは、分析から除外された。ASVには、97%の同一性のGreengenes rRNAデ

10

20

30

40

50

ータベースである、2013年8月にトレーニングされた単純ベイズ適合分類器を使用した分類学的注釈が割り当てられた (McDonald et al., 2012)。相対存在量テーブルは、Qiime 2 機能テーブル summarize-taxa を使用して計算された。順序プロットは、主座標分析 (PCoA) を使用して、重み付けされていないおよび重み付けされた UniFrac 距離行列から計算された。

【0263】

メタゲノム解析

メタゲノム解析では、Illumina アダプターを含むメタゲノムリードと質の低いリードをフィルタリングし、質の低いリードのエッジをトリミングした。宿主のDNAは、GEM (Marco-Sola et al., 2012) を使用して、包括的パラメーターを使用してヒトまたはマウスのゲノム (それぞれ、hg19 または mm10) にマッピングすることにより検出され、宿主の読み取りは削除された。マウスのメタゲノムでは 100 万回の読み取りが、ヒトでは 700 万から 1000 万回の読み取りがサブサンプリングされた。メタゲノムシーケンスからの相対的な存在量は、デフォルトのパラメーターで MetaPhlAn 2 (Loh et al., 2016) を使用して計算された。MetaPhlAn の相対的な存在量は、 5×10^{-4} のレベルで制限されていた。KO の相対存在量は、DIAMOND (Buchfink et al., 2015) を使用して KEGG (Kanehisa et al., 2006) 細菌遺伝子データベースにマッピングし、最初のヒットのみを考慮し、e 値 < 0.0001 を許容することによって得られた。KO の相対的な存在量は、その KO に関連する細菌遺伝子にマッピングされたすべてのリードの合計を、サンプル内のマッピングされたリードの総数で割ったものとして判定された。KO の相対的な存在量は、マウスでは 2×10^{-5} 、ヒトでは 2×10^{-7} のレベルに制限されていた。サンプルの 10% 未満に存在する分類群と KO は廃棄された。

10

20

30

【0264】

代謝物の選択 : WT および SOD1-Tg マウスで Abx によって変更された上位 12 の重要な血清代謝物を使用して、12 の代謝物を合成または分解する可能性のある KEGG 遺伝子のすべてのヌクレオチド配列を最初にダウンロードした。次に、KEGG 遺伝子のボウタイインデックスを作成し、SOD1-Tg および WT メタゲノムサンプルにマッピングした。最後に、すべてのマップされたリードを取得し、すべてのサンプルと KEGG 遺伝子について、KEGG 遺伝子にマップされたリードの数とその平均スコアを報告する。スコアは bowtie2⁸⁴ で定められたとおりで、範囲は 0 ~ -45 であり、0 は完全一致を示す。

【0265】

RNAseq 分析

データの前処理 : bc1 ファイルは fastq に変換され、アダプターのトリミングは bc12fastq を使用して実行された。次に、STAR (スプライス部位認識アライメント) を使用して、リードを mm10 の参照ゲノム (UCSC) にアライメントした。samtools view-h-F 256-F 1024 を使用して、二次アライメントと PCR / 光学的重複を削除した。アライメントは、htseq-count (htseq-count-a 5-s reverse-r) を使用して遺伝子にビニングされた。転写物完全性数 (TIN) の中央値は、RSeqC を使用して計算された。 (tin.py.bed ファイル : sourceforgedotnet/project/rseqc/files/BED/Mouse_Mus_musculus/ からダウンロードした mm10_RefSeq.bed.gz)

40

【0266】

差次的遺伝子発現 : 各比較について、総読み取り数のうち読み取り値が 10^{-4} 以上で、各比較における群の少なくとも 5 分の 1 で発現している遺伝子を分析に含めた。Deseq2 モデルは、各比較のために個別に適合された [設計 : カウント ~ 群 + 中央値 (TIN)]。Deseq2 オブジェクトの Wald 検定を使用して、差次的に発現する遺伝子が見つかった。ヒートマップは、正規化されたログ変換データ (rlog) を使用して作

50

成された。

【0267】

遺伝子セット強化分析：各遺伝子について、D E S e qの結果から次のスコアを計算した。- log (p adj) sign (log2FoldChange).bulk.gsea関数が、ユニバースモデルとしてwww(dot)ge-lab(dot)org/gskb/2-MousePath/MousePath_GO_gmt.dotgmtを使用して、ライガーパッケージから使用された。

【0268】

非標的メタボロミクス

血清および盲腸のサンプルを収集し、直ちに液体窒素で凍結し、-80で保存した。サンプルの調製と分析はMetabolon Incによって行われた。自動化されたMicroLab STARシステム(Hamilton)を使用してサンプルを調製した。タンパク質、タンパク質に結合した、または沈殿したタンパク質マトリックスにトラップされた解離した小分子を除去し、化学的に多様な代謝物を回収するために、タンパク質をメタノールで沈殿させた。得られた抽出物を5つのフラクションに分けた。1つは陰イオンモードエレクトロスプレーイオン化を使用したUPLC-MS/MSによる分析用、1つは陽イオンモードエレクトロスプレーイオン化を使用したUPLC-MS/MSによる分析用、1つはLC極性プラットフォーム用、もう1つはGC-MSによる分析用にして、1つのサンプルがバックアップ用に確保された。サンプルをTurboVap (Zymark)に短時間置いて、有機溶媒を除去した。LCの場合、分析の準備をする前に、サンプルを窒素下で一晩保存した。GCの場合、分析の準備をする前に、各サンプルを真空中で一晩乾燥させた。

【0269】

データ抽出と化合物の同定：Metabolonのハードウェアとソフトウェアを使用して、生データが抽出され、ピークが特定され、QC処理された。化合物は、精製された標準または再発する未知のエンティティのライブラリーエントリと比較することによって識別された。

【0270】

代謝物の定量化とデータの正規化：ピークは、曲線下面積を使用して定量化された。複数の日にわたる研究では、データの正規化ステップを実行して、機器の日中のチューニングの違いに起因する変動を修正した。

【0271】

標的化メタボロミクス

50ng/mlのD5-グルタミン酸と50ng/mlのD4-ニコチンアミド(Cambridge Isotope Laboratories)を、内部標準としてすべてのサンプルに添加した。サンプル(50%メタノール中)をスピードバックで乾燥させてメタノールを吹き飛ばしてから、凍結乾燥機で完全に乾燥させた。すべてのサンプルを100μlの0.1%ギ酸に再溶解した。

【0272】

液体クロマトグラフィー：液体クロマトグラフィーは、Waters Acuity UPLCシステムで実施した。代謝物は、Acuity HSS T3カラム(2.1×150mm、粒子サイズ1.8μm; Waters)で、10分間のプログラムを使用して40で単離した。移動相は、(A)水と(B)アセトニトリルからなり、それぞれ0.1%ギ酸を含んでいた。勾配の条件は次のとおりである。0~1分=99.9%、A; 0.1% B; 1~6分=0.1%~10.0% B; 6~7分=10%~100% B; 7.0~7.2分=100% B; 7.2~10分=99.9% A、0.1% B。注入量は1.0μl、流速は0.3ml/分であった。

【0273】

質量分析：LC-MS/MS分析は、Zspray ESIソースを備えたWaters Xevoトリプル四重極で実行された。MRMは陽イオンモードで実行された。その他の

10

20

30

40

50

M S パラメーターには、6 0 0 での脱溶媒和温度、9 0 0 L / H r での脱溶媒和ガスフロー、7 B a r での1 5 0 L / H r ネプライザ压力でのコーンガスフロー、2 . 5 3 k V でのキャピラリ電圧 (C V) が含まれる。使用したM R Mの移行は次のとおりである。(a) 各々、グルタミン酸 : 1 4 8 . 1 > 8 4 . 1 および 1 4 8 . 1 > 1 0 2 、衝突エネルギー (C E) 1 5 および 1 1 V 。(b) それぞれ、L - D 5 - グルタミン酸 : 1 5 3 . 1 > 8 8 . 1 および 1 5 3 > 1 0 7 、 C E 1 5 および 1 1 V 。(c) ニコチニアミド : それ ぞれ 1 2 3 > 7 8 および 1 2 3 > 8 0 、 C E 1 9 、 1 3 V 、 および (d) それ ぞれ、D 4 - ニコチニアミド 1 2 7 > 8 1 および 1 2 7 > 8 4 、 C E 1 9 、 1 7 V 。衝突ガスとしてアルゴン (0 . 1 0 m g / 分) を使用した。Target Lynx (Waters) は、定性および定量分析に使用された。

10

【 0 2 7 4 】

患者と対照者

臨床試験 : ヒトの試験は、Hadassah Medical Center Institutional Review Board (I R B 承認番号 H M O - 1 6 - 0 3 9 6) および Weizmann Institute of Science Bioethics and Embryonic Stem Cell Research 監視委員会 (I R B 承認番号 3 6 5 - 1) によって承認された。書面によるインフォームドコンセントがすべての対象から得られた。

20

【 0 2 7 5 】

除外および組み入れ基準 (ヒトのコホート) : すべての対象は、以下の組み入れ基準を満たした : 現在、いずれの食事療法または栄養士の相談にも沿わせておらず、インフォームドコンセントを提出できる 1 8 ~ 7 0 歳の男性および女性。除外基準は次のとおりである。(i) 妊娠または不妊治療。(i i) 参加前 3 か月以内の抗生物質または抗真菌剤の使用。(i i i) 参加前の 1 か月以内の任意の形態のプロバイオティクスの消費。(i v) 登録前の 3 年間の慢性的に活性の炎症性疾患または腫瘍性疾患。(v) 炎症性腸疾患およびセリック病を含む慢性胃腸障害。(v i) 参加前 6 か月の心筋梗塞または脳血管障害。(v i i) 凝固障害。(v i i i) 慢性免疫抑制薬の使用。(i x) 事前に診断された I 型または I I 型糖尿病または抗糖尿病薬による治療。組み入れ基準と除外基準の順守は、医師によって検証された。

30

【 0 2 7 6 】

40

50

表4：参加者の詳細

参加者の番号	性	群	年齢 (y)	重量 (kg)	身長 (cm)	ALS FRS	関係
ALS_728	F	ALS	33	39.3	170	19	
ALS_747	M	ALS	61	84.5	181	28	
ALS_1890	M	ALS	67	83.5	171	42	
ALS_1447	M	ALS	68	80.2	170	37	
ALS_1633	M	ALS	40	69.4	175	25	
ALS_1640	M	ALS	76	92	170	39	
ALS_1641	M	ALS	51	68.3	181	27	
ALS_1659	F	ALS	55	48.7	165	8	
ALS_1671	F	ALS	55	51.3	163	28	
ALS_1680	F	ALS	53	55.7	170	38	
ALS_1717	M	ALS	39	69.9	173	29	
ALS_1730	F	ALS	70	54.9	150	19	
ALS_1731	M	ALS	68	102.3	178	42	
ALS_1739	M	ALS	61	66.4	165	26	
ALS_1745	M	ALS	47	64	175	24	
ALS_1753	F	ALS	72		156	18	
ALS_1764	M	ALS	49	79.5	180	37	
ALS_1781	M	ALS	53	83.2	176	39	
ALS_1784	F	ALS	51	73.5	165	28	
ALS_1787	M	ALS	55	63.5	171	32	
ALS_1789	M	ALS	60	80.2	160	38	
ALS_1799	M	ALS	57	78	167	40	
ALS_1814	M	ALS	59	64.3	178	43	
ALS_1841	M	ALS	47	69.7	186	37	
ALS_1779	M	ALS	58	86.2	179	38	
ALS_1825	M	ALS	56	100	174	22	
ALS_1851	M	ALS	65	67	174	38	
ALS_1869	M	ALS	64	62.4	160	38	
ALS_1883	M	ALS	71		180	27	
ALS_1857	F	ALS	75	72.7	154	41	
ALS_1823	M	ALS	67	74	176	36	
ALS_1888	M	ALS	57	89.8	187	42	
C_728	F	健常	46	73	160	48	妻
C_747	F	健常	56	65	163	48	妻
C_1742	F	健常	43	75	164	48	母
C_1633	F	健常	42	80	167	48	妻
C_1640	F	健常	72	54	158	48	妻
C_1641	M	健常				48	夫
C_1659	M	健常	58	88	187	48	夫
C_1671	M	健常	55	99	185	48	夫
C_1680	M	健常	59	87	193	48	夫
C_1717	F	健常	46	75	155	48	妻
C_1730	M	健常	74	80	176	48	夫
C_1731	F	健常	67	50	162	48	妻
C_1739	F	健常	59	71	141	48	妻

C_1745	F	健常	46	65	175	48	妻
C_1753	M	健常	50	70	172	48	夫
C_1764	F	健常	44	85	163	48	妻
C_1781	F	健常	50	90	160	48	妻
C_1784	M	健常	50	104	174	48	夫
C_1799	F	健常	56	65	165	48	妻
C_1814	F	健常	55	71	163	48	妻
C_1851	F	健常	66	68.4	167	48	妻
C_1833	F	健常				48	妻
C_1857	M	健常				48	夫
C_1888	F	健常	59.5	78	160	48	妻
C_1890	F	健常	67	73	164	48	妻

【0277】

統計分析

データは平均 \pm SEM として表される。p 値 < 0.05 が有意であると見なされた (*)

10

20

30

40

50

$p < 0.05$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.005$; **** $p < 0.0005$)。ペアワイズ比較は、スチュードントの t 検定を使用して実行された。分布が正規であることがわかっていない場合は、マンホイットニー U 検定を使用した。複数の群間の比較は ANOVA を使用して実行され、FDR 補正是複数の比較を調整するために使用された。線形回帰を使用して、時間依存性の様式で時間と治療の関数として神経表現型の測定値（ロータロッド、グリップテストスコア、神経学的スコア）をモデル化することにより、対照のマウスと SOD1-Tg マウスにおける Abx の効果を経時に分析した。

【0278】

表現型 ~ 時間 + 時間 \times 治療 + 時間 \times 遺伝子型 + 時間 \times 治療 \times 遺伝子型

ここで、時間は日（60、80、100、120、および140）であり、治療（ $\pm Abx$ ）および遺伝子型（WT または SOD1-Tg）はバイナリインジケーターである。次に、治療の有意性は、時間 \times 治療予測因子の p 値によって推測されている。この分析では、python statsmodels.api.ols バージョン 0.8.0 statsmodels を使用した。

【0279】

時間の経過に伴う微生物量の変化は、線形回帰を使用して評価された。

【0280】

OTU ~ 時間 + 時間 \times 遺伝子型

OTU の存在量に影響を与える遺伝子型の有意性は、複数の OTU の 5% FDR 補正後の時間 \times 遺伝子型予測子の p 値によって推測された。

【0281】

ニコチンアミドおよびトリプトファン代謝経路の KO を分析するために、マンホイットニー U 順位和検定を使用して群間の KO レベルを比較した。この分析では、python stats.HighLevelRanksum.directed_mannwhitneyu が使用された。

【0282】

結果

腸内マイクロバイオームの変化は、ALS マウスモデルの運動症状を悪化させる。

【0283】

ALS における腸内マイクロバイオームの潜在的な調節的役割を評価するために、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の高コピー数 SOD1-G93A（ここでは「SOD1-Tg」）マウスモデルを使用した。バンコマイシン（0.5 g / 1）、アンピシリン（1 g / 1）、ネオマイシン（1 g / 1）、およびメトロニダゾール（1 g / 1）（広域抗生物質、 Abx ）の併用投与により、当施設で雄と雌の SOD1-Tg または同腹仔対照の腸内マイクロバイオームを枯渇させることから調査を開始し、それらは、40 日齢からマウスの固有のマイクロバイオームを著しく枯渇させることができて示されている²⁵（図 1A）。運動能力は、複数の方法、すなわちロータロッド運動テスト²⁶、吊り下げワイヤーグリップテスト²⁷、および神経学的スコアリング²⁸を使用して定量化された。プロジェクト全体を通して、主要な繰り返し実験は、2 名の盲目の研究者によって独立して採点された。驚くべきことに、 Abx 治療は、水で処理された SOD1-Tg 群と比較して、ALS 進行中の運動異常の有意かつ実質的な悪化と関連していた。プールされた結果（群あたり $N = 15 \sim 30$ マウス、図 1B ~ D）と各反復の独立した結果（（各反復の各群で $N = 5 \sim 10$ のマウス、3 つの独立した反復、図 8A ~ I）の双方は、ロータロッド運動テスト（図 1B、図 8A、8D、および 8G）、吊り下げワイヤーグリップテスト（図 1C、図 8B、8E、および 8H）、および神経学的スコアリング（図 1D、図 8C、8F、および 8I）で悪化した結果を示した。特に、 Abx 処理は、 Abx 処理されていない WT マウスと比較して、本飼養所での WT 同腹仔対照のロータロッドまたはグリップテストのパフォーマンスに影響を与えたかった（図 1B ~ D および図 8A ~ I）。線形回帰分析は、SOD1-Tg マウスにおけるこれらの神経病理学的測定値に対する Abx 治療の統計的に有意な負の効果をさらに支持した（図 9A ~ C）。

10

20

30

40

50

【0284】

これらの発見と一致して、140日目のニューロン数の脊髄組織病理学的分析（ルクソールファストブルー染色を使用）は、水で処理したSOD1-Tgマウスと比較してAbx処理した運動ニューロン細胞数の有意な減少を明らかにし（図1E～F）、慢性的なAbx曝露後の運動ニューロン細胞死の増加を示唆している。さらに、SOD1-Tgモデル（図9D²⁹、3⁰）で変性することが知られている領域のマウスの脳幹のT₂重み付け磁気共鳴画像法（MRI）は、Abx処理SOD1-TgマウスがT₂緩和時間の延長Abxを証明し（図1G～I、図9D～I）、より高いレベルの自由水、強化された脳萎縮および神経変性を示す³¹。自動化されたホームケージ移動システムは、水処理されたSOD1-Tg対照と比較して、100日目にAbx処理されたSOD1-Tgマウスの活性の有意な減少（p = 0.03）を明らかにした（図9J）。SOD1-Tgマウスの運動機能におけるAbx誘発性の悪化は、水処理したSOD1-Tgマウスと比較して、脊髄（活性化ミクログリアを含む）、小腸、または固有層結腸の主要な免疫細胞集団の変化とは関連しておらず（図9K～P）、Abx関連の表現型の違いが顕著な免疫異常によって媒介されなかったことを示唆している。

【0285】

重要なことに、SOD1-Tgマウスの無菌環境への再誘導の試みは、SOD1-Tgの高率の死亡率と関連していたが、WT同腹仔対照の死亡率とは関連していなかった（18か月間の30匹の妊娠した雌親の再誘導の試みの失敗）。再誘導が成功すると、GF SOD1-Tgマウスは、GF WT同腹仔またはコロニー形成したSOD1-Tgマウスと比較して、有意に増強された死亡率を特徴とした（図1J、プールされた結果、群あたりN = 9～22マウス、図10A～B、2つの独立した反復、群あたりN = 5～13）。GFマウスが115日目に自発的にコロニー形成した場合でも、死亡率の上昇は依然として存在しており、微生物の駆動者が初期の病期でALSの進行に影響を与えることを示唆している。さらに、Abx処理によるマイクロバイオームの枯渇は、追加のALSマウスモデルであるTDP43-Tgマウスで死亡率を実質的かつ有意に増強し（プールされた結果については図1K、個々の繰り返しについては図10C～D）、この有害なマイクロバイオーム枯渇効果がSOD1変異に限定されなかったことを示唆している。まとめると、これらの結果は、SOD1-TgマウスのALS発現に対する、本発明者らの飼養場でのAbxを介したマイクロバイオームの変化（またはGFマウスでのその欠如）の潜在的な有害な影響を示し、局所的に異生物の腸内マイクロバイオーム構成がこのモデルにおける疾患の進行を調節する可能性があることを示唆している。

【0286】

SOD1-Tgマウスは、飼養場依存性の前臨床腸内毒素症を発症する。

【0287】

当飼養場でのSOD1-TgモデルにおけるALS神経病理学に対するこれらの示唆された微生物媒介効果は、ALSの過程を調節する可能性のある局所的に蔓延している共生株を特定する機会を提示した。実際、当施設でのSOD1-TgおよびWT同腹仔対照における16S rDNAシーケンスによる糞便のマイクロバイオームの組成と機能の評価は、疾患経過中に持続する初期の有意なマイクロバイオームの組成の違いを示した（図2A～C、図11A～C）。特に、当飼養場では、SOD1-Tgマウスの腸内毒素症は、主にAkermansia、Anaeroplasma、Prevotella、Parabacteroides、Rikenellaceae、Lactobacillus属によって引き起こされ、これらはすべて、WT同腹仔対照と比較してSOD1-Tgの糞便で有意に減少した（図11C～G）が、Ruminococcus、Desulfovibrionaceae、Allobaculum、Sutterella、Helicobacteraceae、Coproccoccus、およびOscillospiraは、SOD1-Tgの糞便のマイクロバイオームにおいて16S rDNAが豊富に含まれていた（図11H～M）。さらに、観察された属の総数（アルファ多様性）は、すべての時点でSOD1-Tgの便でより多く（図11N）、WT同腹仔と比較してSOD1

10

20

30

40

50

- T g マウスのコミュニティ構造が変化したことを示している。しかし、糞便中の総細菌量は、SOD1 - T g の対照とWTの対照の間で変動がなかった（図11O）。さらに、Abxで処理されたSOD1 - T g の腸内マイクロバイオーム構成と当飼養所でのそれらのWT同腹仔対照でさえ、疾患の進行全体にわたって、調べられたすべての時点で、有意に異なるマイクロバイオーム組成をもたらした（図12A～G）。バクテロイデスが栄えることによって駆動されており、Abxで処理されたWTマイクロバイオームにおいてパラバクテロイデス属とクロストリジウム属、およびAbxで処理されたSOD1 - T g マウスにおいてSutterella属とEnterobacteraceae属であった（図12H～M）。重要なことに、当飼養所でのGF SOD1 - T g およびWT同腹仔の自発的コロニー形成は、デノボの腸内毒素症の発症と関連していたが（図13A～I）、これらの施設依存性の腸内毒素症の違いは、Akkermansia、Parabacteroides、ErysipelotrichaceaeおよびHelicobacteraceaeがほとんど存在しないことを特徴とする2番目の障壁のない（非SPF）の飼養所では観察されなかった（図14A～E）。全体として、これらの施設依存の変化は、マウス - ALSの遺伝的的感受性と、局所的に蔓延している共生の特徴との組み合わせが、この施設でのALS調節に寄与する可能性のある初期の前臨床腸内毒素症を引き起こすことを示唆した。

【0288】

当飼養所でのALSの進行に関連する種レベルの組成的および機能的マイクロバイオームの違いをさらに評価するために、異なる時点でのWT同腹仔と比較して、SOD1 - T g マウスの糞便微生物DNAのショットガンメタゲノムシーケンスを実施した。実際、Metaphlan2を使用すると、複数の種レベルの分類学的差異に起因して、同腹仔対照と比較してSOD1マウスのマイクロバイオーム組成に有意差が認められた（図2Dおよび図15A～B）。例えば、Parabacteroides distasonis、Alistipes unclassified、Lactobacillus murinus、非分類のEggerthella、Parabacteroides goldsteinii、非分類のSubdoligranulum、およびAkkermansia muciniphila（図15C～Hおよび図3A）は、SOD1 - T g マイクロバイオームで有意に減少したが、Helicobacter hepaticus、Lactobacillus johnsonii、Bacteroides vulgaris、Bifidobacterium pseudolongum、Lactobacillus reuteriおよびDesulfovibrio desulfuricans（図15I～N）は、WT同腹仔対照と比較して強化されていた。機能的には、SOD1 - T g およびWT糞便細菌代謝物は微生物遺伝子に関して別々にクラスター化され（PC1の場合：40日目、p = 0.0002、60日目、p = 0.0002、80日目、p = 0.0005、100日目、p = 0.0005、KEGGオルソロジー、KO、図2E）、トリプトファン代謝に関する酵素をコードする遺伝子の表現の著しい減少（図2F～G）およびニコチニアミドおよびニコチニ酸代謝に関する酵素をコードする遺伝子の実質的な変化（図2H）を含む。これらの初期のマイクロバイオームの影響がSOD1 - T g マウスの代謝の変化に続発することを除外するために、前臨床60日目に詳細な代謝評価を行い、食物と水の摂取量、呼吸交換率、酸素消費量、運動、および熱生成に有意な変化は見られなかった。（図16A～L）。

【0289】

まとめると、これらの結果は、単一遺伝子型に収容されたSOD1マウスは、臨床運動ニューロン機能障害症状が現れる前でさえ、腸の微生物組成と機能が、当飼育場でのWT同腹仔構成から分岐していることを示した。

【0290】

ALS悪化への共生微生物の寄与

次に、上記の飼養所依存性の異なる豊富な腸内共生微生物とマウスALS関連運動機能の調節との間の考えられる因果関係を判定すべく模索した。総じて、Eggerthella

10

20

30

40

50

la lenta、Coprobacillus cateniformis、Parabacteroides goldsteinii、Lactobacillus murinus、Parabacteroides distasonis、Lactobacillus gasseri、Prevotella melaninogenica、Eisenbergiella tayi (Lachnospiraceae ファミリーのメンバー)、Subdoligranulum variabile、Ruminococcus torques、および Akkermansia muciniphila を含む 11 株を検証し、本複合 16S rDNA とショットガンメタゲノム分析によって、当飼養所での SOD1-Tg モデルにおける ALS 進行の重症度と相關することが示唆された (図 11A~O および図 15A~N)。この目的のために、上記の各株 (定常期 O.D. = 0.4~0.7) の嫌気性培養物を、Abx で前処理した SOD1-Tg および WT マウスに、6 日間の間隔で合計 15 回の治療に対して繰り返し経口投与することにより単回接種した。示された細菌のほとんどによるこれらのマウスの単コロニー形成は、ALS の症状に影響を与えるなかった (図 17A~L)。Abx で処理した SOD1-Tg マウスに、Parabacteroides distasonis (PD、図 17A~L) と Ruminococcus torques (RT、図 18A~M および図 19A~I) の 2 つの菌株を補充すると、疾患の進行が悪化し、一方で Lactobacillus gasseri と Prevotella melaninogenica での処理 (それぞれ LG と PM) は、行動テストのすべてではないが一部で疾患促進効果を示した (図 17A~L)。実際、RT レベルは SOD1-Tg マウスの ALS の進行と正の相関があり (図 18A)、4 つの独立した治療のプールされた結果によって示されるように、ロータロッド、グリップテスト、および神経学的スコアによって示されるように、管理運動機能が悪化した (群あたり N = 20~40 匹のマウス、図 18B~D) が、独立して分析された反復間でいくらかの変動が認められた (各反復の各群で N = 5~10 匹のマウス、図 19A~I)。ニューロンの死亡率に組織学的な違いはないが (図 18E~F)、RT で処理した SOD1-Tg マウスでは、ビヒクル処理のものと比較して T2 重み付け MRI スキャン (図 18G~M) を使用した早期発症 (100 日目) の萎縮が見られた。注目すべきことに、テストされた 11 の細菌株はいずれも WT 動物の運動能力に影響を与えるなかった (9 つのテストされた細菌株については図 17G~I、RT については図 18A~M および図 19A~I)。まとめると、これらの結果は、複数の共生生物が SOD1-Tg ALS マウスモデルの運動ニューロン変性に寄与する可能性があることを示唆している。

【0291】

AM コロニー形成はマウスの ALS を改善し、生存を延長する。

【0292】

当飼養所の SOD1-Tg マウスで異なって変化した種の 1 つは、Akkermansia muciniphila (AM) であり、16S rDNA (図 11C) とショットガンメタゲノムシーケンス (図 15B および図 3A) の両方が、WT 同腹仔のマイクロバイオームでの安定した高い表現と比較して、SOD1-Tg マウスで疾患が進行するにつれて、その存在量が徐々に減少したことを示していた。当飼養所での AM 16S rDNA コピーのレベルの低下は、AM 固有の qPCR を使用して SOD1-Tg の便のサンプルで検証された (図 3B)。Abx で前処理した SOD1-Tg および WT マウスを嫌気的に単培養した AM 株 (BAA-835、O.D. = 0.7、定常期) で、6 日間隔で経口投与し、合計 15 回の治療を行った処理は、ロータロッド、グリップおよび神経学的スコアリングテストにより定量化されて、プールされたサンプル (群あたり N = 34~62 のマウス、図 3C~E) において、または 6 回の反復とは独立して (各反復の各群に N = 5~25 匹のマウス、図 17A~C および図 20A~O) 評価されたとき、AM 処理 SOD1-Tg マウスの運動機能の改善と関連があった。この AM を介した機能の改善は、ビヒクルで処理した Abx で前処理した SOD1-Tg マウスと比較して、AM で処理した SOD1-Tg 脊髄における運動ニューロンの生存率が高いことを伴った (図 3F~G、p = 0.0041)。重要なことに、AM 処理は、SOD1-Tg マウスの寿命を、ビヒ

10

20

30

40

50

クル処理マウス、または細菌対照として機能する他の共生マイクロバイオーム種で処理された SOD1-Tg マウスと比較して、有意にまた大幅に延長した。（図 3 H）。AM 治療はまた、MRI によって測定された特定の ALS の影響を受けた脳の領域における低い T2 緩和時間の短縮によって示されるように、140 日目の脳の萎縮を減少させた（図 2 1 A ~ D）。ALS の進行に対する AM の有益な効果は、他の状況でこの細菌によって誘発される可能性のある腸の透過性の変化に起因しなかった³²。120 日目に、AM、PBS、および他の微生物処理 SOD1-Tg および WT マウスの間で全身の FITC- デキストラン流入に違いが見られなかっただためである。（図 21 E）。AM で処理した SOD1-Tg マウスのマイクロバイオームメタゲノムは、PBS で処理した SOD1-Tg 対照とは異なるクラスターを形成した（図 21 F）。予想通り、AM の相対的な存在量は、ビヒクルで処理した SOD1-Tg マウスと比較して、AM で処理した糞便サンプルで有意に増加した（図 21 G）。対照的に、本飼養場で高く安定した固有の AM レベルを保持する WT マウスは、長期投与時にのみレベルが上昇した外因的に投与された AM の競合相手を特徴としていた（図 21 H）。さらに、AM は、WT GI 管と比較して、SOD1-Tg GI 管の様々な領域でより広範囲かつ効率的にコロニーを形成することがわかった（図 21 I ~ J）。その結果、Abx 治療後の AM 補充は、WT マウスと SOD1-Tg マウスの両方のマイクロバイオーム組成を異なる方法で変化させた（図 21 K、L）。

【0293】

本発明者らの結果をさらに検証するために、Abx で前処理した SOD1-Tg および WT 同腹仔を別の AM 株 (ATCC 2869) で単コロニー化した。AM (ATCC BAA 835) で観察された結果と同様に、AM 2869 コロニー形成 SOD1-Tg マウスは運動能力の有意な改善を示し（図 22 A ~ C）、ALS の症状に対する AM の観察された有益な効果が異なる AM 株にまたがる可能性があることを示唆している。AM はムチングリカン分解細菌である³³ため、140 日目に AM または PBS で処理した SOD1-Tg の遠位結腸粘液の組織病理学的分析をさらに実施した。無傷の内粘液層粘液が、AM 補充および PBS 処理 SOD1-Tg マウスで観察された（図 23 A）。PBS で処理した対照の SOD1-Tg マウスとは対照的に、AM で処理した SOD1-Tg マウスでは、細菌が内粘液に浸透し、まれに陰窩に侵入した（図 23 B、白い矢印）。プロテオミクス分析では、AM 補充マウスの粘液成分レベルに有意差は見られなかっただ（図 23 C ~ J）。まとめると、SOD1-Tg マウスへの単回接種による複数の差次的に発現する腸内共生の評価により、マウスの ALS 疾患の経過と重症度を逆に（PD、RT、場合によっては LG と PM）または有利に（AM）調節する選択された共生が特定された。

【0294】

AM は、ニコチニアミドレベルを全身で上昇させることにより、マウスの ALS を軽減する。

【0295】

異なる腸内共生生物がマウスの ALS の臨床経過に及ぼす上記の調節的影響は、様々なメカニズムによってもたらされる可能性がある。一例として、次にマイクロバイオームによって誘発されるメカニズムを評価し、当飼養所でのマウスの ALS 疾患の経過に対する AM を介した有益な効果を説明する可能性がある。腸内マイクロバイオームが CNS 疾患部位から離れていることを考えると、腸内マイクロバイオームによって調節される代謝物は、CNS^{9, 10} に移行することにより、SOD1-Tg マウスの運動ニューロン感受性に影響を与える可能性があると仮定した。この目的のために、ALS の初期段階（100 日目）に、AM 補充およびビヒクルコントロールの血清に特異的に豊富なマイクロバイオーム依存性分子候補を特定するために、非標的メタボロミクスプロファイリングを利用した。SOD1-Tg マウスで同定された 711 の血清代謝物のうち、84 の代謝物が AM 補給によって有意に変化し、そのうち 51 が AM 処理によって上昇した（図 4 A および図 24 A ~ C）。これらのうち、6 つの代謝物のみの生合成遺伝子（ヌクレオチド配列、KEGG データベース）がメタゲノムインデックスにアラインメントされ、2 つの代謝物、ニコチニアミドとフェノール硫酸塩が、当飼養所の SOD1-Tg マイクロバイオームを

10

20

30

40

50

凌ぐWTマイクロバイオームによって合成される最高のメタゲノム確率を特徴としている(図24D)。マウスのALSの経過する期間中の継続的な薬物投与を確実にする皮下に埋め込まれた徐放性ミニ浸透圧ポンプを使用したSOD1-Tgマウスへのフェノール硫酸塩の投与は、in vivoでのALS症状に影響を与えたかった(図24E~G)。

【0296】

いくつかの重要な観察は、NAMがAMを介したマウスのALSの正の調節に関与している可能性があることを示唆した。メタゲノムNAM生合成経路の顕著な変化は、Abx処理時に認められた(図2H)。NAM生合成中間体の血清レベルの強化は、AM補充時に認められた(図4B)。さらに、ショットガンメタゲノムシーケンシングにより、NAM³⁴、³⁵の生成に関与していることも示されている腸内マイクロバイオーム由来のトリプトファン代謝経路のいくつかの遺伝子(図2F~G)が、ナイーブSOD1マウスでは有意に減少していることが明示され、一方でトリプトファン経路の全身性代謝物は、Abx処理またはAM補給時に変化し(図25A~B)、トリプトファンの代謝のマイクロバイオーム調節がこれらの設定でのNAMレベルの変化に寄与する可能性があることを示唆している。

【0297】

AMがNAMを生成および分泌できるかどうかを調べるために、嫌気的に増殖したAMのNAMレベルを測定し、標的化メタボロミクスを使用してグラム陽性および陰性の共生分離株を制御した。実際、熱で死滅させたAMまたは他の共生分離株から収集した上清と比較して、AM培養培地では有意に高いレベルのNAMが見つかった(図4C)。AM分泌/誘導NAMがCNSに到達し、運動ニューロンに影響を与える可能性をさらに調査するために、当飼養所でビヒクル処理SOD1-TgおよびWT同腹仔マウスと比較したAM処理のCSFにおけるNAMレベルを測定した。実際、CSFのNAMレベルは、AM処理したSOD1-TgマウスとWTマウスの両方ですでに100日齢(疾患初期)で有意に高かった(図4D)。疾患の進行期(140日目)では、CSFのNAMレベルはAM治療SOD1-Tgマウスで有意に高かったが、AM治療WTマウスでは、非治療対照と比較して高くなかった(図4E)。WTマウスとSOD1-Tgマウスの間で認められる腸のコロニー形成の安定性の違いを反映している可能性がある。(図21G~L)。重要なことに、NAM代謝に関する酵素をコードする10個のAMゲノム関連遺伝子のうち8個は、ビヒクル処理SOD1-Tgマウスと比較してAM処理SOD1-Tgマウスで有意に強化されており(図4F)、SOD1-TgマウスのAM補充は、機能的なNAM生合成を直接修正する可能性があることを示唆している。

【0298】

全身性NAMレベルの増加について、AM補充時に認められる関連する表現型の作用と因果関係をもたらすために、SOD1-TgマウスにNAMを継続的に補充し、埋め込み式小型浸透圧ポンプを介して皮下投与し、0.11μl/hrの一定速度と49.28mg/kg/週の累積投与量でNAMを放出した。ポンプを28日ごとに、40~152日齢の間に合計4回交換することにより、疾患全体を通してマウスへの安定した継続的なNAM投与を確実に行なった。実際、NAMのレベルは、水で処理した対照と比較して、NAMで処理したSOD1-TgマウスのCSFおよび血清で、有意に増加した(図5A~B)。重要なことに、プール分析(群あたりN=30のマウス、図5C~E)、または独立して3回の繰り返しで(各繰り返しの各群でN=10のマウス、図26A~I)によって示されるように、行動および神経学的運動試験の両方において、NAM処理SOD1-Tgマウスは、ビヒクル処理SOD1-Tgマウスよりも、有意に良好なパフォーマンスであった。注目すべきことに、NAMの治療は生存率を改善する有意ではない傾向をもたらし(図5F)、おそらく不十分な投与または曝露時間、または観察されたAM誘発の生存の恩恵に到達する他のAM媒介調節メカニズムの統合の必要性(図3H)を反映している。

【0299】

G1細菌によって産生されたNAMが運動能力に影響を与えることができるかを調べるために、Abxで前処理したSOD1-Tgマウスに、対照としてWT E. coliを

10

20

30

40

50

接種するか、NAM産生の低下を示す *nada E. coli* を接種した（図27）。注目すべきことに、*E. coli* はマウス消化管のコロニー形成が不十分であると考えられる³⁶。*nada E. coli* の補充はロータロッドとグリップテストのパフォーマンスに影響を与えたかったが（図27）、WT *E. coli* 治療の動物と比較して SOD1-Tg マウスの神経学的スコアを有意に改善し（図5G）、腸内細菌が分泌したNAMは、コロニー形成能力が低くても、このALSマウスモデルのいくつかの運動能力に影響を与えることを示唆している。

【0300】

ALS変調の潜在的なAMおよびNAMメカニズム

AMおよびNAMがSOD1-Tg マウスの運動ニューロンの生存を助け、ALSの進行を改善する可能性のある潜在的な分子メカニズムを探究するために、当飼養所にてAMおよびNAMで処理したマウスから収集した脊髄サンプルのバルク RNA シーケンス (RNA-seq) を実施し、AMまたはNAM補充の処理によって誘発された転写の変化を、対応する対照（AMおよびNAM処理実験で、それぞれ PBS 処理または水処理の対照）と比較した。全体として、213遺伝子の偽発見率 (FDR) で補正された発見は、SOD1-Tg マウスのNAM処理後に有意に変化した（図6A）。また、これらの遺伝子のうち31個は、AM処理後の発見パターンに有意な相関があった（図6B）。NAM応答性遺伝子に表現型オントロジーの注釈を付けると、異常な脳の形態、生理学、および運動に関連する4つのカテゴリーに21%の有意な適合が得られ、これらの遺伝子はまた疾患修正性である可能性があることが示された（図6C）。AMおよびNAMの影響を受けた転写産物の機能を判定するために、GO（遺伝子オントロジー）経路を遺伝子の各群に割り当てた（図6D～E）。AMとNAMの介入の間で共有される最も有意に強化された経路は、ミトコンドリアの構造と機能、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド+ (NAD+) の恒常性、およびスーパーオキシドラジカルの除去、ALSで破壊されることが知られている標準的な機能に関連している。興味深いことに、AM処理とNAM処理の間で共有される遺伝子の28.6%は、ミトコンドリアの生合成、電子伝達系の活動、および酸化ストレスを制御することが知られている転写因子 Nuclear Respiratory Factor-1 (NRF-1、図28) によって調節されていることがわかった^{37～41}。

【0301】

ヒトALS患者における腸内毒素症およびNAMレベルの障害

最後に、当飼養所でのSOD1-Tg の所見とヒトのALSの特徴との間の予備的な関連を調べた。この目的のために、ALS患者32人と、健常なBMIおよび年齢が一致する家族27人から便のサンプルを対照として収集し、腸内マイクロバイオームのメタゲノムを配列決定することにより、人間の観察研究を実施した。ショットガンメタゲノムシーケンシングによって定量化されたALS患者のマイクロバイオームの組成は、健常な対照家族とは有意に異なっていた（図7A、PC1の場合： $p = 3.3 \times 10^{-6}$ ）。FDR補正後、特定の細菌種の存在量にいずれの有意差も観察されなかつたが、複数の組成の傾向が認められ（図29A）、ヒトALSマイクロバイオームの有意に異なる全体的なクラスタリングが細菌の存在量の多数の蓄積された小さな変化に起因する可能性を示唆している。機能的には、ALSマイクロバイオームは全体的な細菌遺伝子含有量における有意差を示し（図7B、PC1の場合： $p = 2.88 \times 10^{-9}$ ）、トリプトファンおよびNAM代謝に関与するいくつかの重要な遺伝子のFDR補正（これらの経路に合わせて調整）の減少を伴い、例えば、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ（K03783、puna）、ニコチンアミドヌクレオチドアミダーゼ（K03742、Amuc_0430）、L-アスパラギン酸オキシダーゼ（K00278、Amuc_1079）NAD+シンターゼ（K01950、Amuc_0620）、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ（K00164、OGDH）、ニコチン酸ヌクレオチドピロホスホリラーゼ（K00767、Amuc_1263）およびエノイル-CoAヒドラターゼ（K01782、fadJ、図7C）がある。重要なことに、これらの有意に減少した遺伝子のいくつかはすべてA.m

10

20

30

40

50

u c i n i p h i l a ゲノムにマッピングされており、検査された A L S 患者のマイクロバイオームにおける A M の相対的な存在量は健常な対照と類似していたが、独自の A M 株の N A M 生合成能力は A L S で異なって損なわれる可能性があることを示唆している。

【 0 3 0 2 】

A L S 患者の血清の非標的化メタボロミクスプロファイリングにより、リルゾールの上昇（外因的に投与された A L S の治療）、クレアチニンおよび 3 - ヒドロキシ - 2 - エチルプロピオネートおよび還元メチルインドール 3 - アセテートおよびトリエタノールアミンを含む、複数の有意に変化した代謝物が明らかになった（図 2 9 B）。興味深いことに、トリプトファン - ニコチンアミド代謝経路の重要な分子は、A L S 患者の血清で有意に変化し、その中には、インドレアアセテート、キヌレニン、セロトニン、循環ニコチンアミドがあり（図 7 D ~ E）、これらのヒトの A L S の症例の一部で異常な N A M 代謝が示唆された。これらの全身異常が C N S にも反映されるかどうかを調べるために、12人の A L S 患者の C S F 中の N A M のレベルを 17人の健常な非家家族対照と比較した。A L S 患者の平均 N A M の C S F レベルは、健常な個人の平均よりも有意に低く、一部の患者は著しく低い N A M の C S F レベルを特徴としていた（図 7 F）。

【 参考文献 】

【 0 3 0 3 】

REFERENCES

- Turner, M. R. *et al.* Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet Neurology* **12**, 310–322 (2013).
- Andersen, P. M. & Al-Chalabi, A. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: What do we really know? *Nature Reviews Neurology* (2011). doi:10.1038/nrneurol.2011.150
- Bönnemann, G., Lacomblez, L. & Meining, V. A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **330**, 585–591 (1994).
- Group, T. W. G. on behalf of the E. (MCI-186) A. 19 S. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* **16**, 505–512 (2017).
- Al-Chalabi, A. & Hardiman, O. The epidemiology of ALS: A conspiracy of genes, environment and time. *Nature Reviews Neurology* **9**, 617–628 (2013).
- Veiga-fernandes, H. & Mucida, D. Review: Neuro-Immune Interactions at Barrier Surfaces. *Cell* **165**, 801–811 (2016).
- Sharon, G., Sampson, T. R., Geschwind, D. H. & Mazmanian, S. K. The Central Nervous System and the Gut Microbiome. *Cell* **167**, 915–932 (2016).
- Blücher, E., Levy, M., Tatirovsky, E. & Eliaz, E. Microbiome-Modulated Metabolites at the Interface of Host Immunity. *J. Immunol.* **198**, 572–580 (2017).
- Hsiao, E. Y. *et al.* Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* **155**, 1451–1463 (2013).
- Sampson, T. R. *et al.* Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell* **167**, 1469–1480.e12 (2016).
- Harach, T. *et al.* Reduction of Abeta amyloid pathology in APPPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota. *Sci. Rep.* **7**, 41802 (2017).
- Cignarella, F. *et al.* Intermittent Fasting Confers Protection in CNS Autoimmunity by Altering the Gut Microbiota. *Cell Metab.* **27**, 1222–1235 (2018).
- Yaduv, S. K. *et al.* Gut dysbiosis breaks immunological tolerance toward the central nervous system during young adulthood. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **144**, 9318–9327 (2017).
- Berer, K. *et al.* Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 10719–10724 (2017).
- Cekanaviciute, E. *et al.* Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 10713–10718 (2017).
- Olson, C. A. *et al.* The Gut Microbiota Mediates the Anti-Seizure Effects of the Ketogenic

10

20

30

40

50

- Diat. Cell* **173**, 1728–1741 (2018).
17. Rowin, J., Xia, Y., Jung, B. & Sun, J. Gut inflammation and dystrophia in human motor neuron disease. *Physiol. Rep.* **5**, 1–6 (2017).
18. Fang, X. Potential role of gut microbiota and tissue barriers in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Int. J. Neurosci.* **126**, 771–776 (2016).
19. Alonso, R. *et al.* Evidence for fungal infection in cerebrospinal fluid and brain tissue from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Int. J. Biol. Sci.* **11**, 546–558 (2015).
20. Wu, S., Yi, J., Zhang, Y., Zhou, J. & Sun, J. Leaky intestine and impaired microbiome in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Physiol. Rep.* **3**, e12356 (2015).
21. Zhang, Y., *et al.* Target Intestinal Microbiota to Alleviate Disease Progression in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Clin. Ther.* **39**, 322–336 (2017).
22. Fang, X. *et al.* Evaluation of the microbial diversity in amyotrophic lateral sclerosis using high-throughput sequencing. *Front. Microbiol.* **7**, 1474 (2016).
23. Brenner, D. *et al.* The fecal microbiome of ALS patients. *Neurobiol. Aging* **61**, 132–137 (2018).
24. Gurney, M. E. *et al.* Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu/Zn superoxide dismutase mutation. *Science (88-)* **264**, 1772–1775 (1994).
25. Hill, D. A. *et al.* Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis. *Mucosal Immunol.* (2010). doi:10.1038/mi.2009.132
26. Ralph, G. S. *et al.* Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat. Med.* **11**, 429–433 (2005).
27. Aartsma-Rus, A. & van Putten, M. Assessing functional performance in the *mdx* mouse model. *J. Vis. Exp.* **27**, 51303 (2014).
28. Sugiyama, K. & Tanaka, K. Spinal cord-specific deletion of the glutamate transporter GLT1 causes motor neuron death in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **497**, 689–693 (2018).
29. Bontempi, P. *et al.* MRI reveals therapeutic efficacy of stem cells: An experimental study on the SOD1(G93A) animal model. *Magn. Reson. Med.* **79**, 459–469 (2018).
30. Niessen, H. G. *et al.* In vivo quantification of spinal and bulbar motor neuron degeneration in the G93A-SOD1 transgenic mouse model of ALS by T2 relaxation time and apparent diffusion coefficient. *Exp. Neurol.* **201**, 293–300 (2006).
31. Zang, D. W. *et al.* Magnetic resonance imaging reveals neuronal degeneration in the brainstem of the superoxide dismutase 1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral

10

20

- sclerosis. *Eur. J. Neurosci.* **20**, 1745–51 (2004).
32. Chelakkot, C. *et al.* Akkermansia muciniphila-derived extracellular vesicles influence gut permeability through the regulation of tight junctions. *Exp. Mol. Med.* **50**, e450 (2018).
33. Derrien, M., Vaughan, E. E., Plugge, C. M. & de Vos, W. M. Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2004). doi:10.1099/ijs.0.02873-0
34. Canti, C., Menzies, K. J. & Auwerx, J. NAD+ Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metabolism* **22**, 31–53 (2015).
35. Verdin, E. NAD+ in aging, metabolism, and neurodegeneration. *Science* **350**, 1208–1213 (2015).
36. Sweeley, N. J., Laux, D. C. & Cohen, P. S. Escherichia coli F-18 and E. coli K-12 *eds* mutants do not colonize the streptomycin-treated mouse large intestine. *Infect. Immun.* (1996).
37. Golko-Perez, S., Amit, T., Bar-Am, O., Yudin, M. B. H. & Weinreb, O. A Novel Iron-Chelator-Radical Scavenger Ameliorates Motor Dysfunction and Improves Life Span and Mitochondrial Biogenesis in SOD1G93A/ALS Mice. *Neurotox. Res.* **31**, 230–244 (2017).
38. Scarpulla, R. C., Vega, R. B. & Kelly, D. P. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **23**, 459–466 (2012).
39. Bergeron, R. *et al.* Chronic activation of AMP kinase results in NRF1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281**, 1340–1346 (2001).
40. Evans, M. J. & Scarpulla, R. C. NRF-1: A trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes Dev.* **4**, 1023–1034 (1990).
41. Virbasius, C. M. A., Virbasius, J. V. & Scarpulla, R. C. NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev.* **7**, 2431–2445 (1993).
42. Sampson, T. R. & Mazmanian, S. K. Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. *Cell Host and Microbe* **17**, 565–576 (2015).
43. Colling, S. M., Surette, M. & Bercik, P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 735–742 (2012).
44. Yano, J. M. *et al.* Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell* **161**, 264–276 (2015).
45. Pessione, E. *et al.* A proteomic approach to studying biogenic amine producing lactic acid bacteria. in *Proteomics* **5**, 687–698 (2005).

30

40

50

46. Levy, M. *et al.* Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell* **163**, 1428–1443 (2015).
47. Pessine, E. *et al.* First evidence of a membrane-bound, tyrosine and β -phenylethylamine producing, tyrosine decarboxylase in *Enterococcus faecalis*: A two-dimensional electrophoresis proteomic study. *Proteomics* **9**, 2695–2710 (2009).
48. Tanous, C., Chambellan, E., Sepulchre, A. M. & Yvon, M. The gene encoding the glutamate dehydrogenase in *Lactococcus lactis* is part of a remnant Trc transposon carried by a large plasmid. *J. Bacteriol.* **187**, 5019–5022 (2005).
49. Zareian, M. *et al.* A glutamic acid-producing lactic acid bacteria isolated from malaysian fermented foods. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 5482–5497 (2012).
50. Han, T. C., Kwon, D. H., Hegazy, M. & Lu, C. D. Transcriptome analysis of agmatine and putrescine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **190**, 1966–1975 (2008).
51. Mazzoli, R. *et al.* Glutamate-induced metabolic changes in *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during GABA production: Combined transcriptomic and proteomic analysis. *Amino Acids* **39**, 727–737 (2010).
52. Wong, R. K., Yang, C., Song, G. H., Wong, J. & Ho, K. Y. Melatonin Regulation as a Possible Mechanism for Probiotic (VSL#3) in Irritable Bowel Syndrome: A Randomized Double-Blinded Placebo Study. *Dig. Dis. Sci.* **60**, 186–194 (2014).
53. Benakis, C. *et al.* Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal $\gamma\delta$ T cells. *Nat. Med.* **22**, 516–523 (2016).
54. Lee, Y. K., Menezes, J. S., Umesski, Y. & Mazmanian, S. K. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 4615–4622 (2011).
55. Veit Rothhammer, Ivan D Masicunfroni, L. B. . . . et. Type I Interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nat. Med.* **22**, 586–597 (2016).
56. Chini, E. N., Chini, C. C. S., Espindola Netto, J. M., de Oliveira, G. C. & van Schooten, W. The Pharmacology of CD38/NADase: An Emerging Target in Cancer and Diseases of Aging. *Trends in Pharmacological Sciences* **39**, 424–436 (2018).
57. Tarrago, M. G. *et al.* A Potent and Specific CD38 Inhibitor Ameliorates Age-Related Metabolic Dysfunction by Reversing Tissue NAD+ Decline. *Cell Metab.* **27**, 1081–1095 (2018).
58. Camacho-Pereira, J. *et al.* CD38 Dictates Age-Related NAD Decline and Mitochondrial dysfunction through an SIRT3-Dependent Mechanism. *Cell Metab.* **23**, 1127–1139 (2016).
59. Ryu, D. *et al.* NAD+ repletion improves muscle function in muscular dystrophy and counters global paralytic. *Sci. Transl. Med.* **8**, 361ra139 (2016).
60. Chang, W.-T., Chen, H., Chien, R.-J., Chen, C.-Y. & Huang, A.-M. A novel function of transcription factor alpha-Paf/NRF-1: increasing neurite outgrowth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**, 199–206 (2005).
61. Li, Z., Cogswell, M., Hixon, K., Brooks-Kayal, A. R. & Russek, S. J. Nuclear Respiratory Factor 1 (NRF-1) Controls the Activity Dependent Transcription of the GABA-A Receptor Beta 1 Subunit Gene in Neurons. *bioRxiv* **321257**, 1–25 (2018).
62. Robertson, S. J. *et al.* Nod1 and Nod2 signaling does not alter the composition of intestinal bacterial communities at homeostasis. *Gut Microbes* **4**, 222–231 (2013).
63. Koren, Tali; Zeevi, David; Zmora, Niv; Weisbrod, Ori; Bar, Noam; Lotan-Pompan, Maya; Avnit-Sagi, Tali; Kosower, Noa; Malka, Gal; Rein, Michal; Suze, Jotham; Goldberg, Ben Z.; Weinberger, Adina; Levy, Avraham A.; Elinav, Eran; and Segal, E. Bread Affects Clinical Parameters and Induces Gut Microbiome-Associated Personal Glycemic Responses. *Cell Metab.* **25**, 1243–1253 (2017).
64. Zeevi, D. *et al.* Personalized nutrition by prediction of glycemic responses. *Cell* **163**, 1079–1095 (2015).
65. Hatzipetros, T. *et al.* A Quick Phenotypic Neurological Scoring System for Evaluating Disease Progression in the SOD1-G93A Mouse Model of ALS. *J. Vis. Exp.* **104**, 1–6 (2015).
66. Hansson, G. C. & Johansson, M. E. V. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut Microbes* (2010). doi:10.4161/gmic.1.1.10470
67. Wisniewski, J. R., Zongyan, A., Nagaraj, N. & Mann, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods* (2009). doi:10.1038/nmeth.1322
68. Schroeder, B. O. *et al.* Bifidobacteria or Fiber Protects against Diet-Induced Microbiota-Mediated Colonic Mucus Deterioration. *Cell Host Microbe* (2018). doi:10.1016/j.chom.2017.11.004
69. Rappaport, J., Mann, M. & Ishihama, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protoc.* (2007). doi:10.1038/prot.2007.261
70. Cox, J. & Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized

10

20

30

40

50

- p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* (2008). doi:10.1038/nbt.1511
71. MacLean, B. *et al.* Skyline: An open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* (2010). doi:10.1093/bioinformatics/btq054
72. Babu, T. *et al.* Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* (2006). doi:10.1038/msb4100050
73. Schneeberger, M. *et al.* *Akkermansia maccapinphila* inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Sci. Rep.* **5**, 16643 (2015).
74. Siez, J. *et al.* Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature* (2014). doi:10.1038/nature13793
75. Adiconis, X. *et al.* Comparative analysis of RNA sequencing methods for degraded or low-input samples. *Nat. Methods* **10**, 623–629 (2013).
76. Caporaso, J. G., Kuczynski, J. & *et al.* QIIME allows high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* **7**, 335–336 (2010).
77. Callahan, B. J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **13**, 581–583 (2016).
78. Weiss, S. *et al.* Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome* **5**, 27 (2017).
79. McDonald, D. *et al.* An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* **6**, 610–618 (2012).
80. Marco-Sola, S., Sammeth, M., Guigó, R. & Ribeca, P. The GEM mapper: Fast, accurate and versatile alignment by filtration. *Nat. Methods* **9**, 1185–1188 (2012).
81. Loh, P. R. *et al.* Reference-based phasing using the Haplotype Reference Consortium panel. *Nat. Genet.* **48**, 1443–1448 (2016).
82. Kanehisa, M. *et al.* From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res.* **34**, 354–357 (2006).
83. Buchfink, B., Xie, C. & Huson, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods* **12**, 59–60 (2015).
84. Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* (2012). doi:10.1038/nmeth.1923
85. Reimand, J., Kull, M., Peterson, H., Hinsen, J. & Vilo, J. G:Profiler—a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments. *Nucleic Acids Res.* (2007). doi:10.1093/nar/gkm226

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1 A】

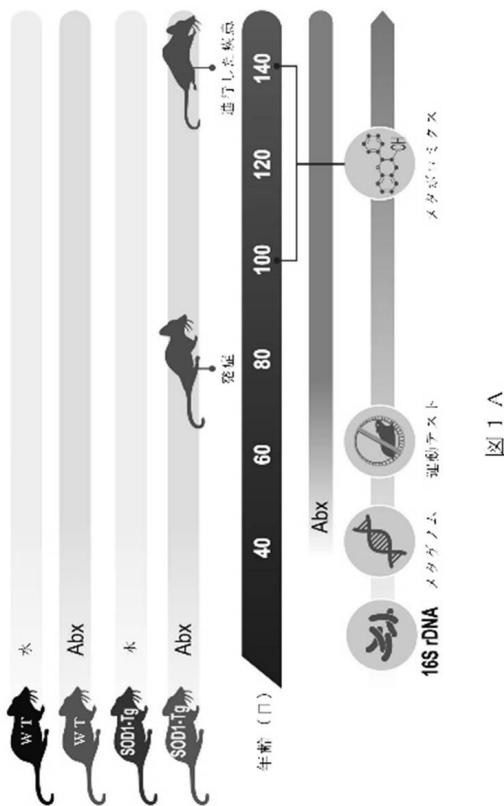


図 1 A

【図 1 B】

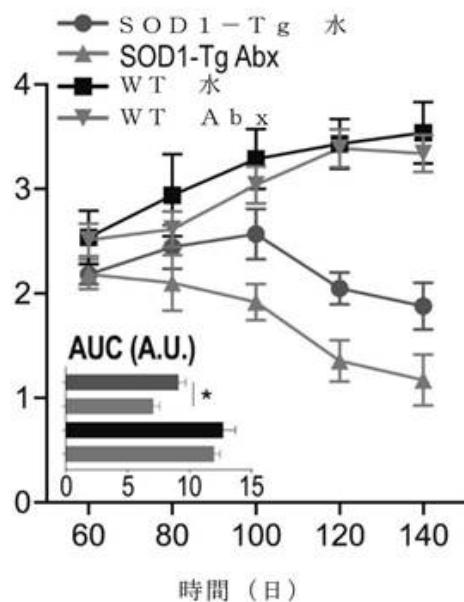


図 1 B

20

20

30

40

【図 1 C】

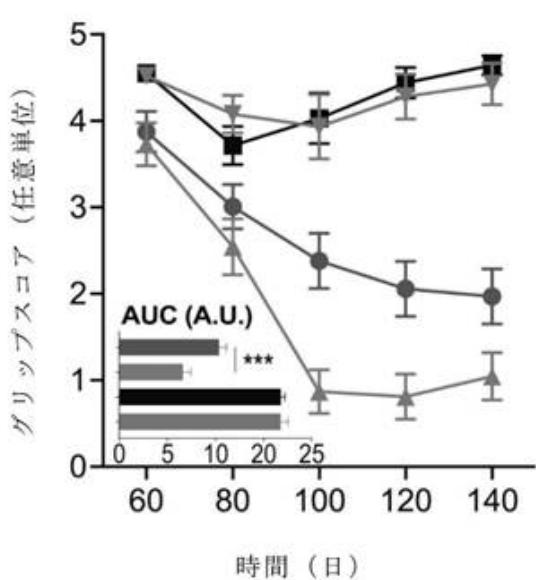


図 1 C

【図 1 D】

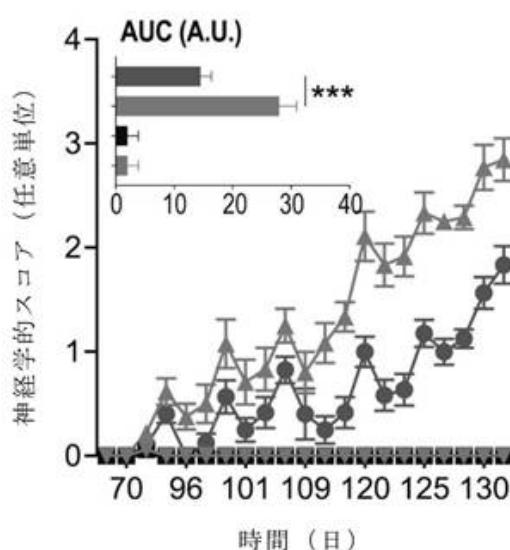


図 1 D

50

【図 1 E】

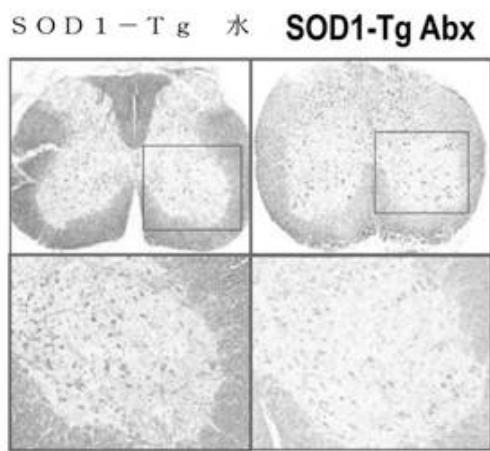


図 1 E

【図 1 F】

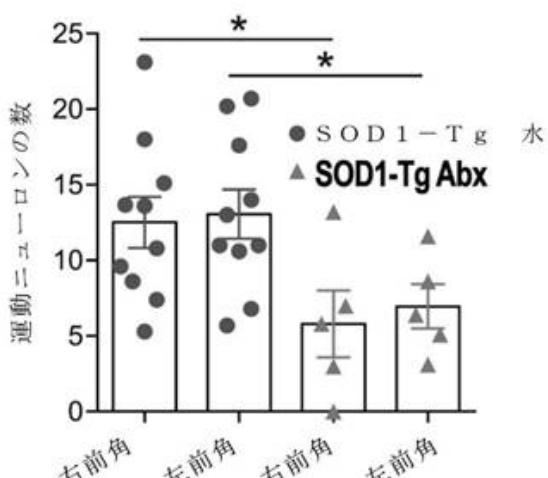


図 1 F

【図 1 G】

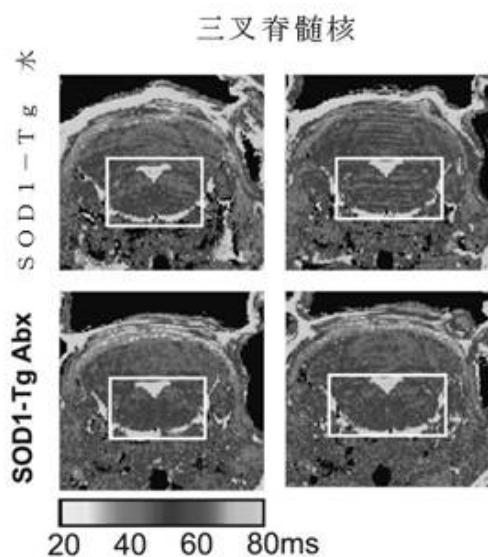


図 1 G

【図 1 H】

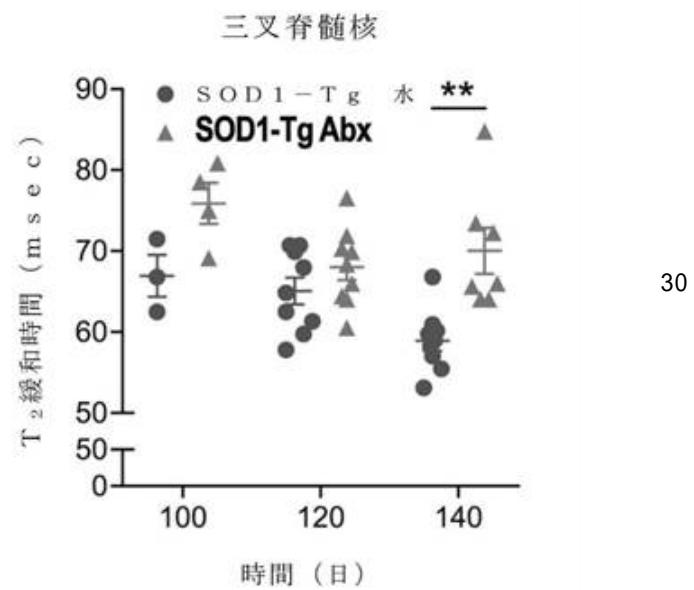


図 1 H

【図 1 I】

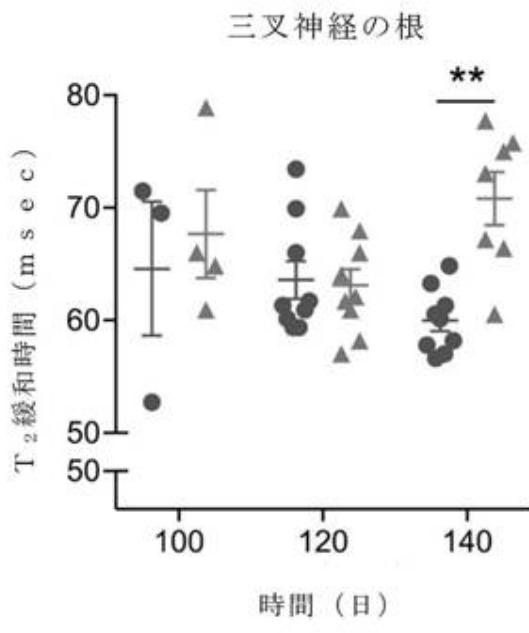


図 1 I

【図 1 J】

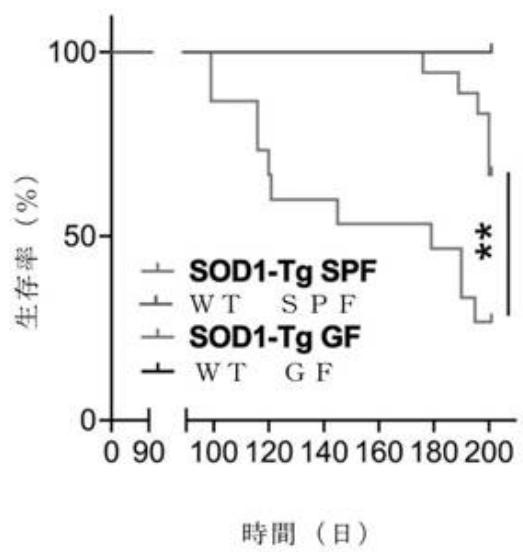


図 1 J

10

20

【図 1 K】

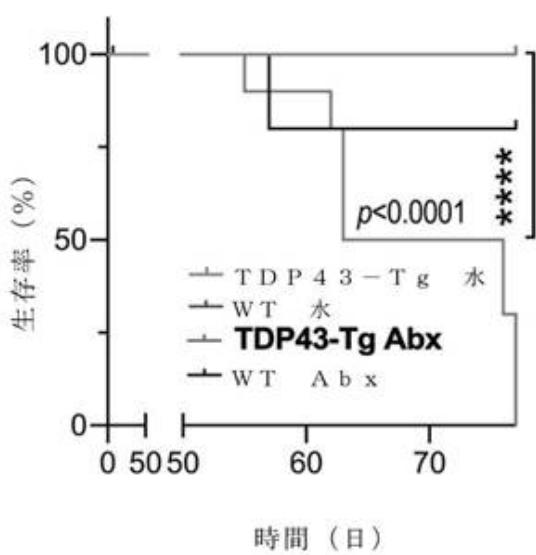


図 1 K

30

40

【図 2 A B C】

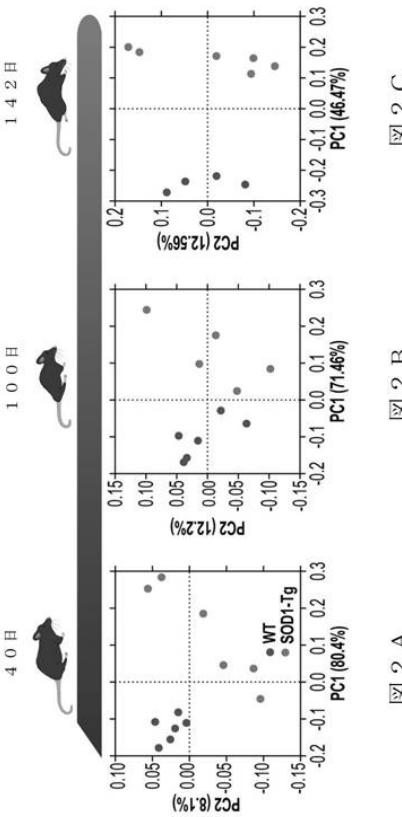


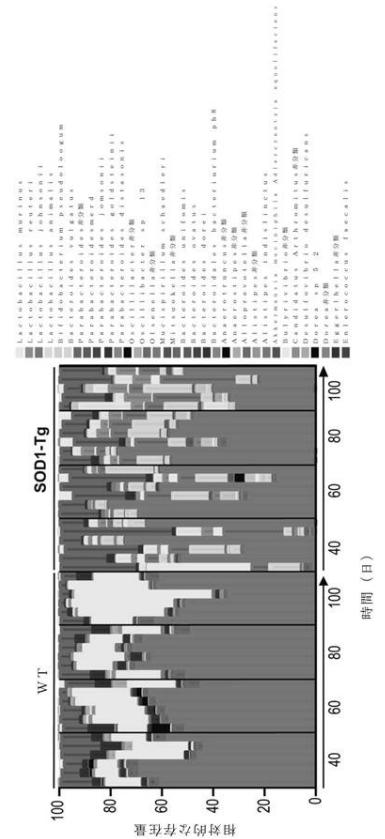
図 2 C

図 2 B

図 2 A

50

【図2D】



【図2E】

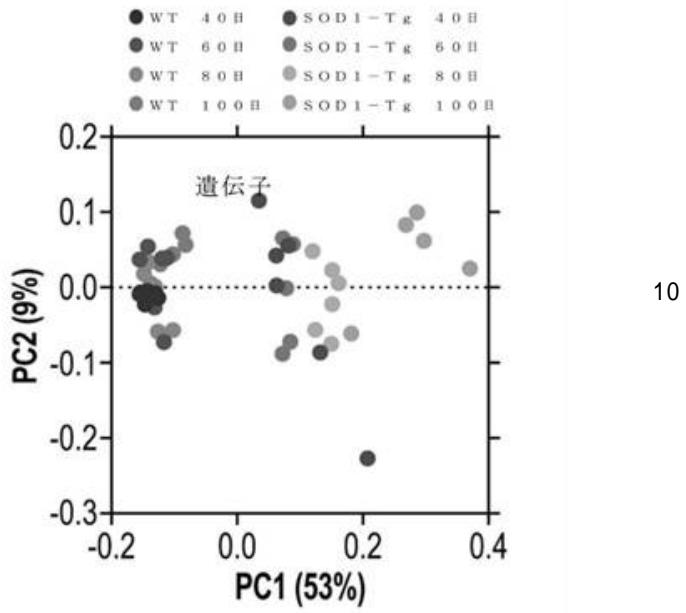
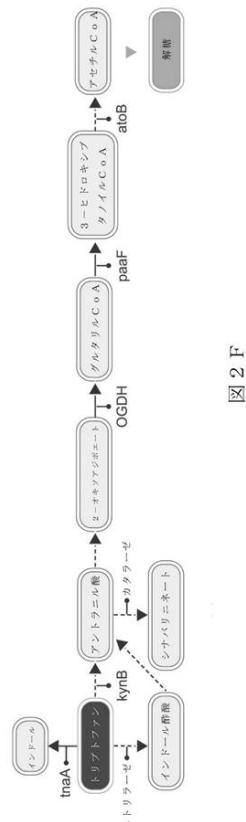


図2E

20

【図2F】



【図2G】

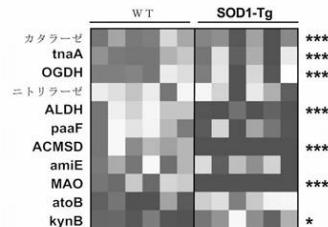


图 2 G

30

40

【図 2 H】

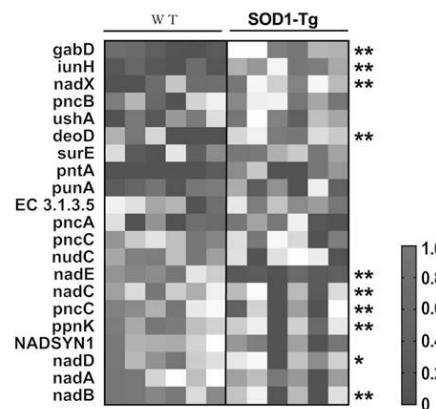


図 2 H

【図 3 A】

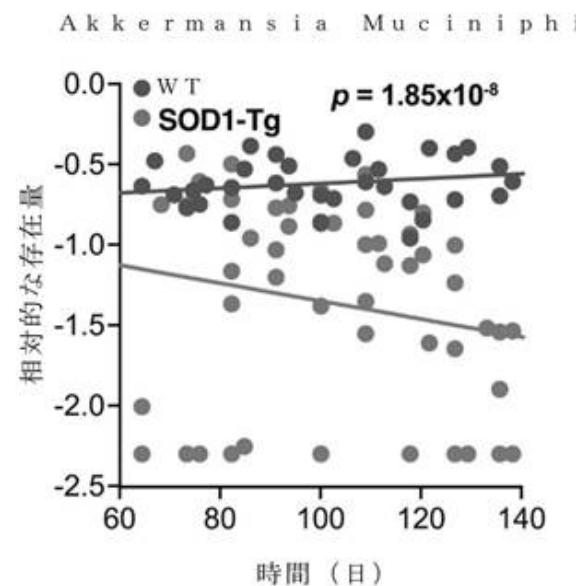


図 3 A

20

【図 3 B】

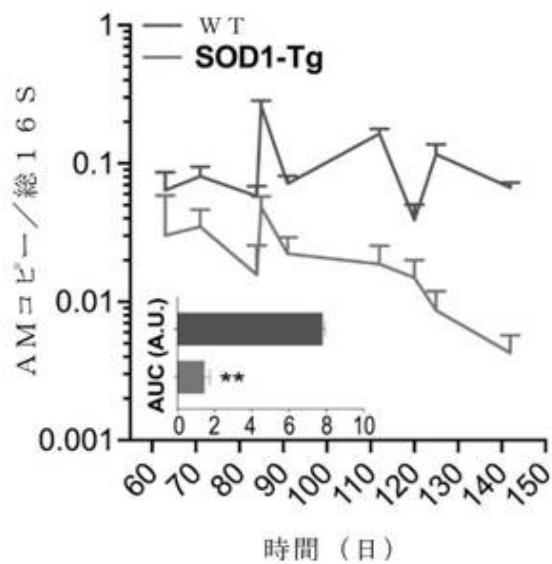


図 3 B

【図 3 C】

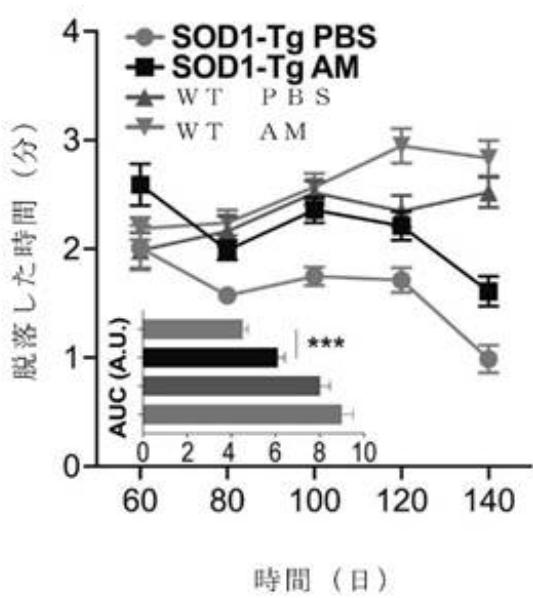


図 3 C

40

50

【図 3 D】

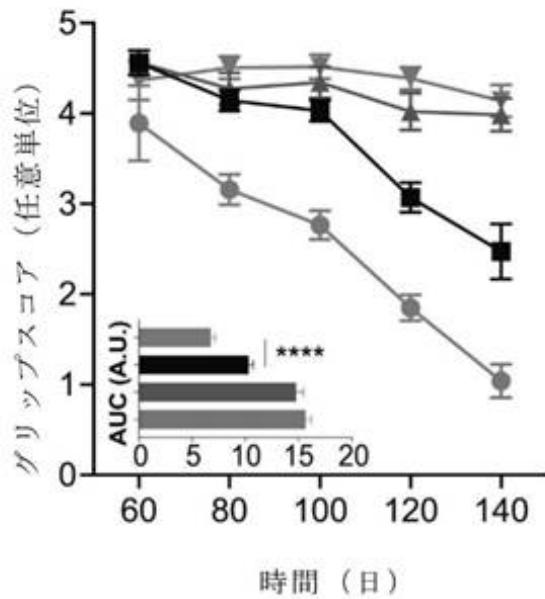


図 3 D

【図 3 E】

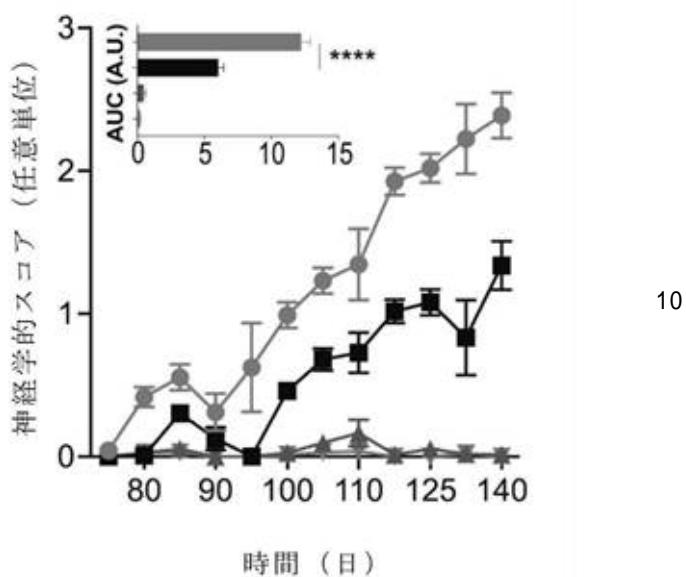


図 3 E

20

【図 3 F】

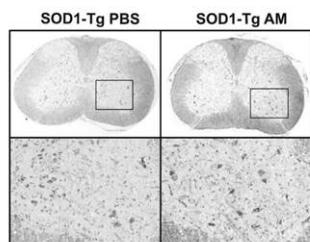


図 3 F

【図 3 G】

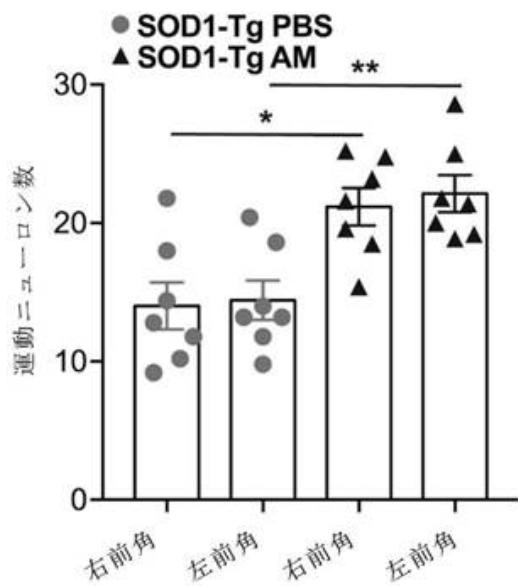


図 3 G

40

50

【図 3 H】

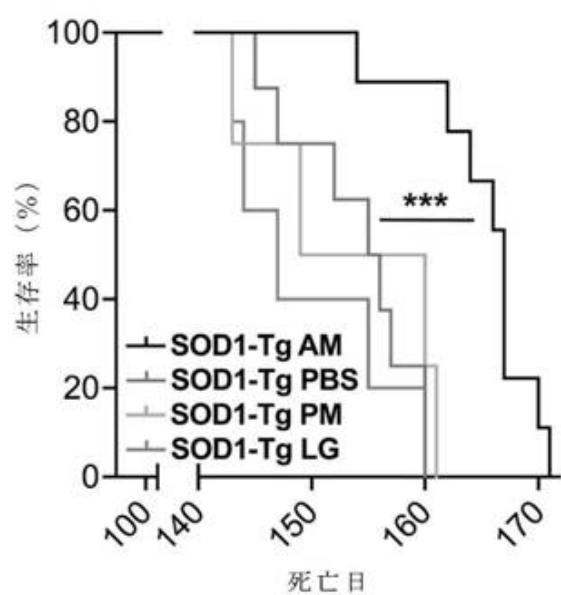


図 3 H

【図 4 A】

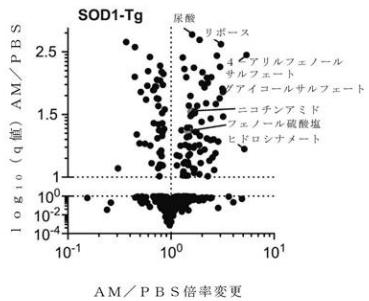


図 4 A

【図 4 B】

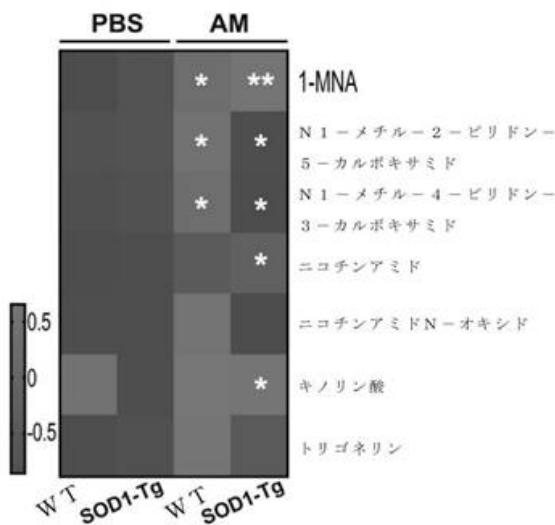


図 4 B

【図 4 C】

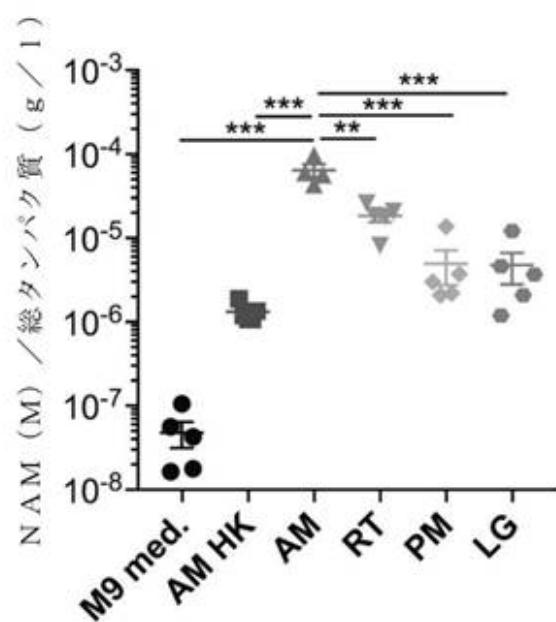


図 4 C

10

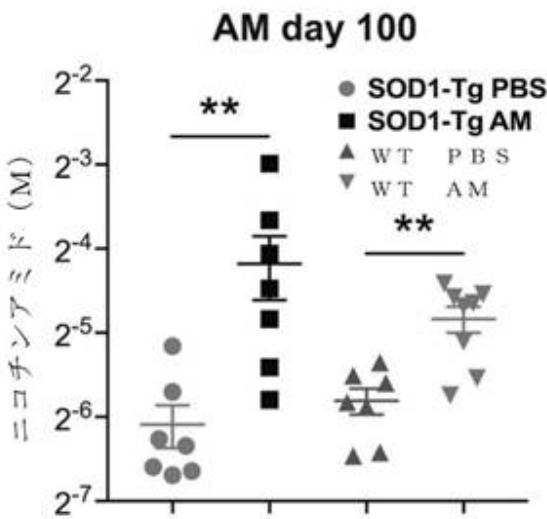
20

30

40

50

【図4D】



四 4 D

【図4E】

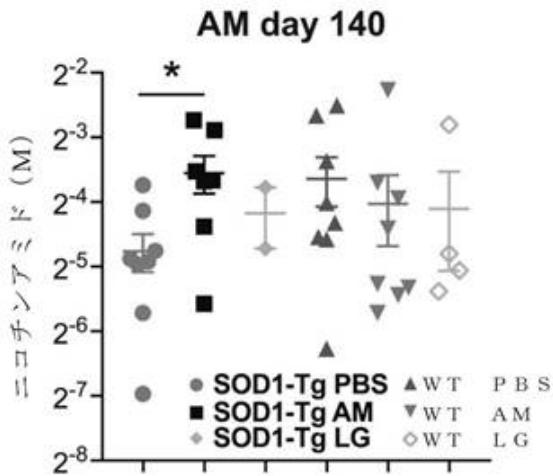
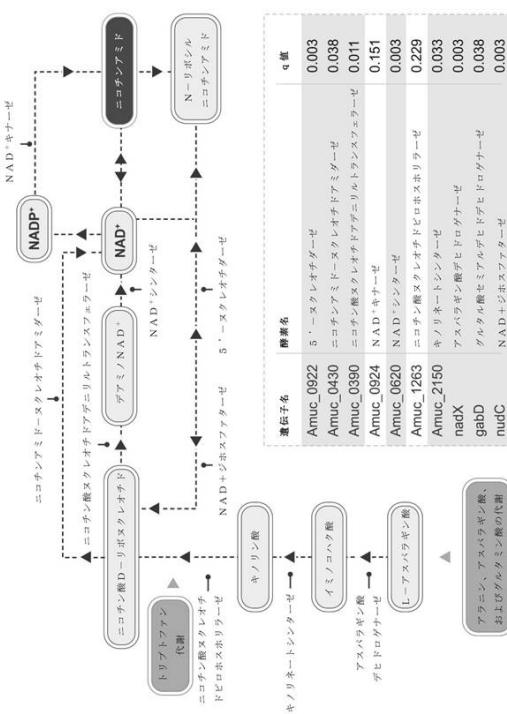


図 4 E

【図4F】



四

〔図5A〕

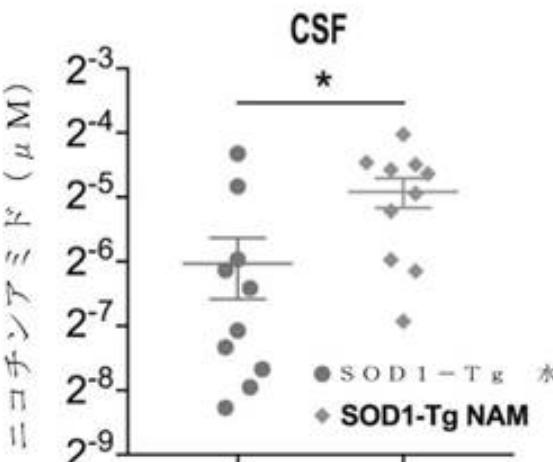


図 5 A

【図 5 B】

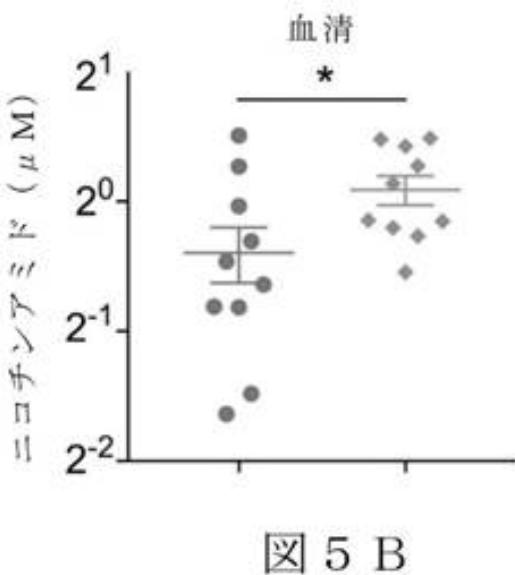


図 5 B

【図 5 C】

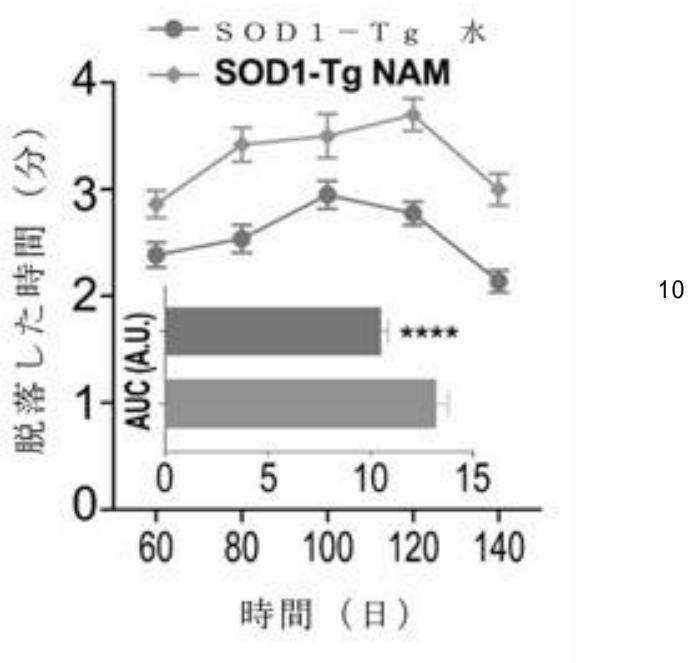


図 5 C

【図 5 D】

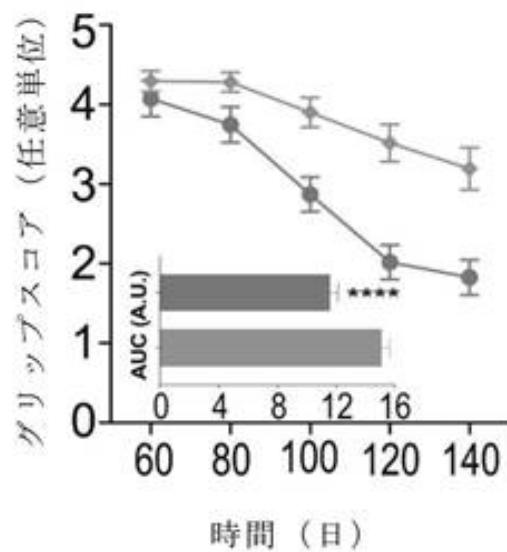


図 5 D

【図 5 E】

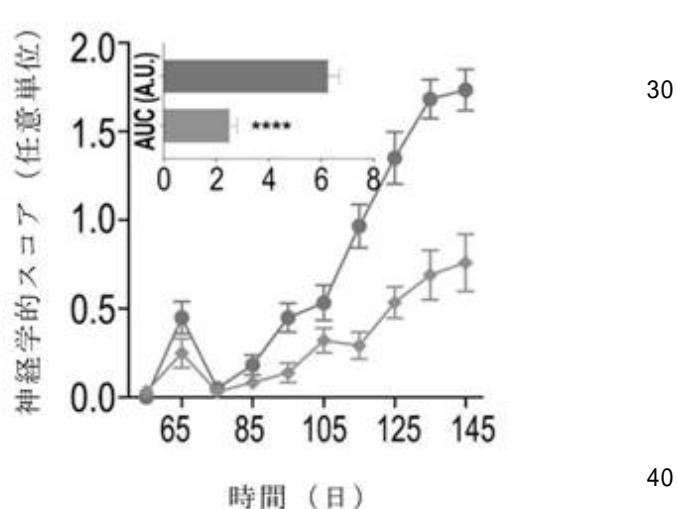


図 5 E

【図 5 F】

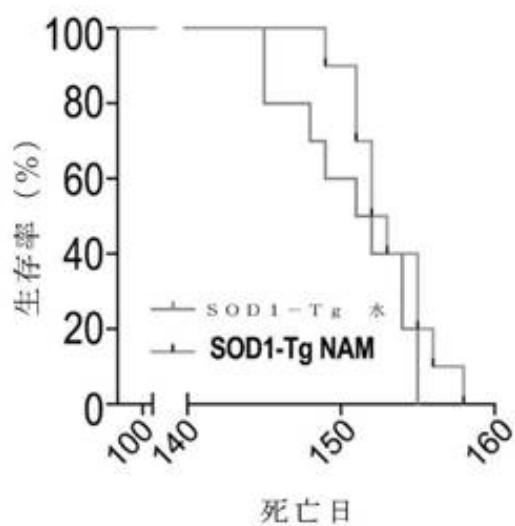


図 5 F

【図 5 G】

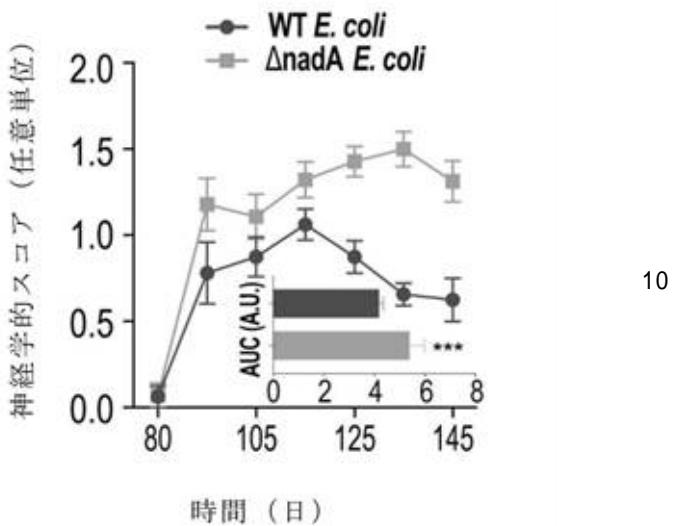


図 5 G

【図 6 A】

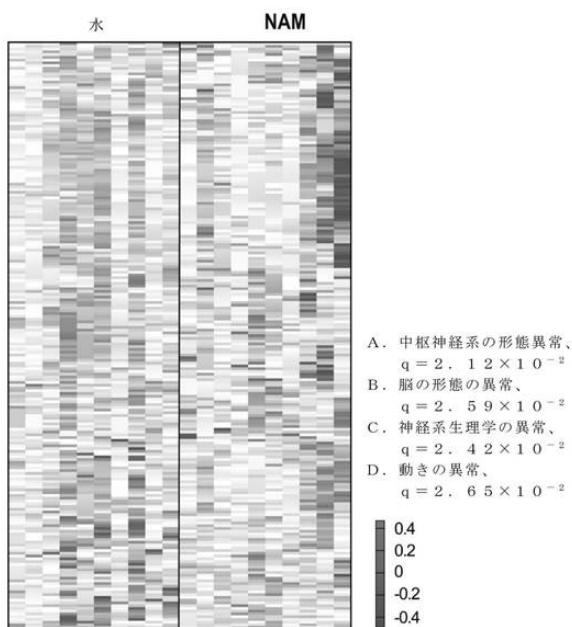


図 6 A

【図 6 B】

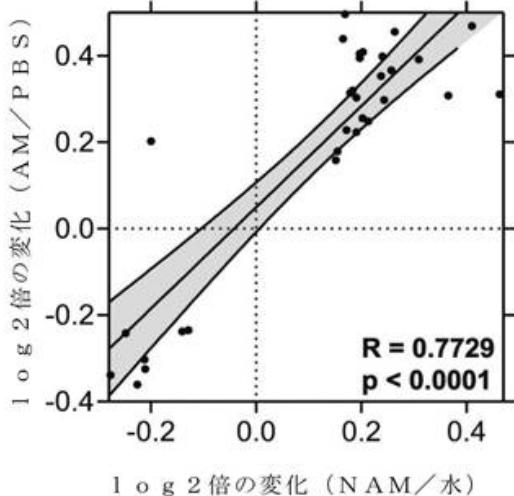


図 6 B

【図 6 C】

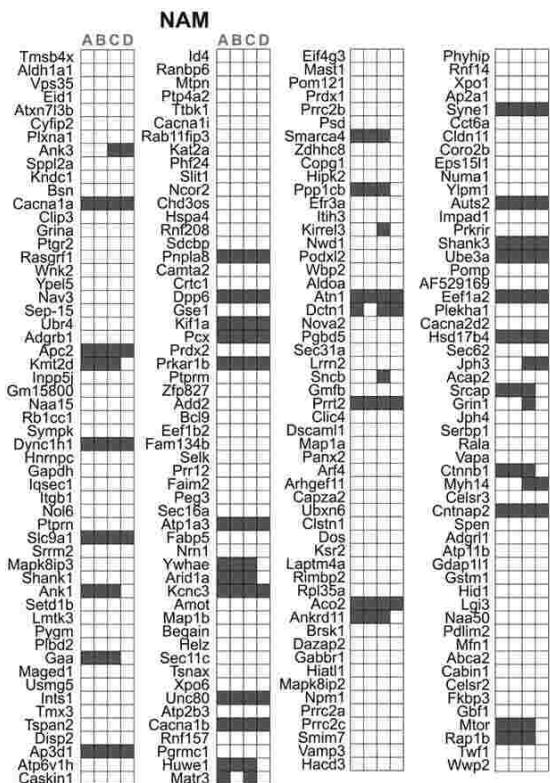


図 6 C

【図 6 D】

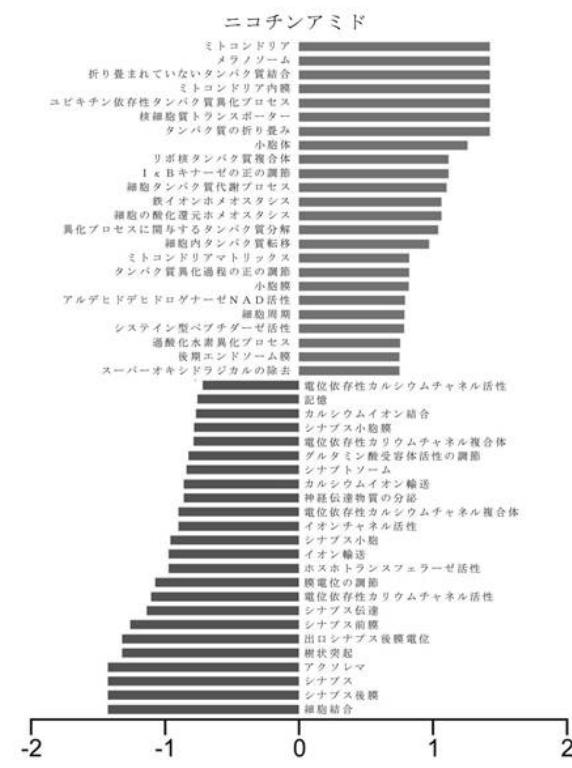


図 6 D

【図 6 E】

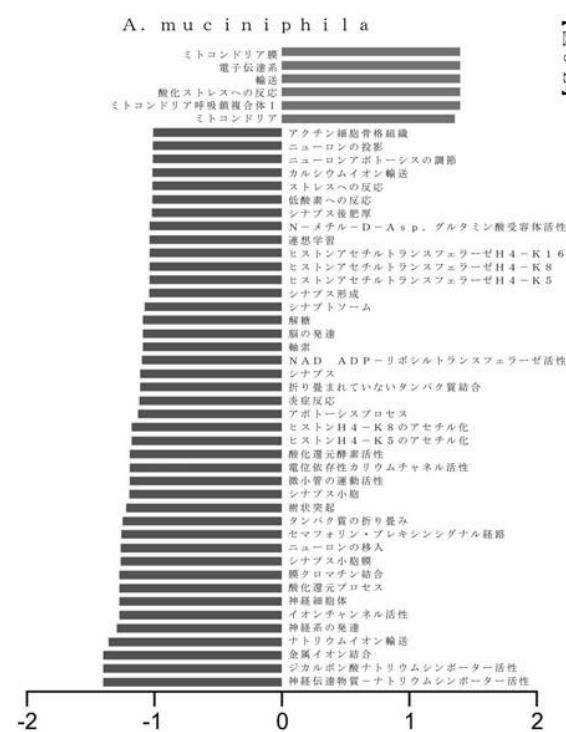


図 6 E

【図 7 A】

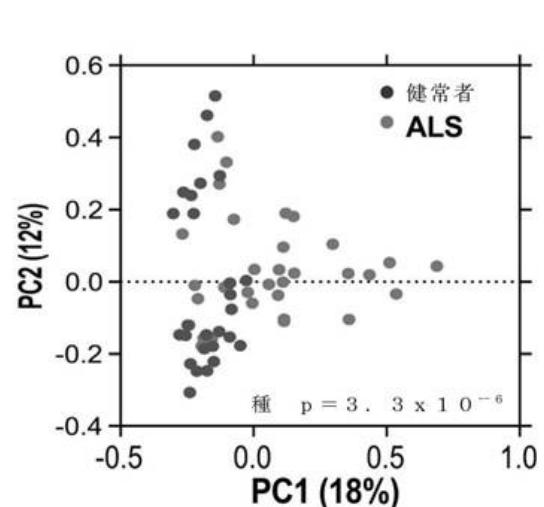


図 7 A

【図 7 B】

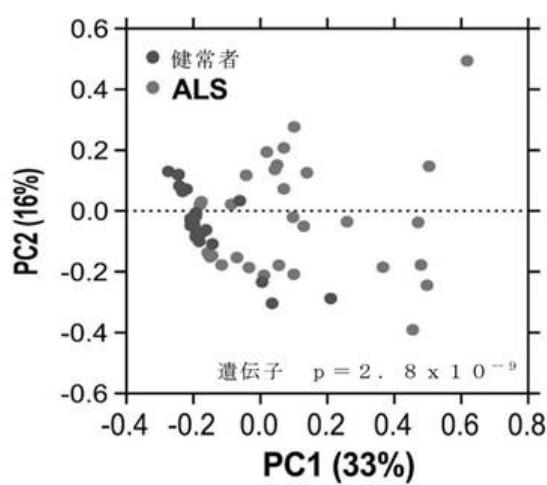
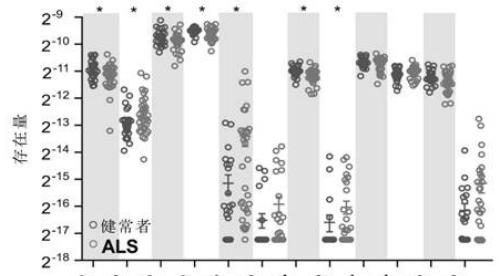


図 7 B

【図 7 C】



KEGG エントリー	遺伝子名	酵素名	q 値
K03783	punA	ブリンスクレオシドホスホリラーゼ	0.04
K03742	Amuc_0430	ニコチンアミドスクレオチドアミダーゼ	0.04
K00278	Amuc_1079	L-アスパラギン酸オキシダーゼ	0.04
K01950	Amuc_0620	NAD+シンターゼ	0.04
K00164	OGDH	2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ	0.01
K03782	katG	カタラーゼベルオキシダーゼ	0.05
K00767	Amuc_1263	ニコチン酸スクレオチドビロホスホリラーゼ	0.04
K01782	fadJ	エノイルCoAヒドロゲナーゼ	0.03
K01825	Amuc_1263	ニコチン酸スクレオチドビロホスホリラーゼ	0.05
K03517	Amuc_2150	キノリネートシンターゼ	0.07
K00858	Amuc_0924	NAD+キナーゼ	0.08
K03426	Amuc_2150	キノリネートシンターゼ	0.11

図 7 C

【図 7 D】

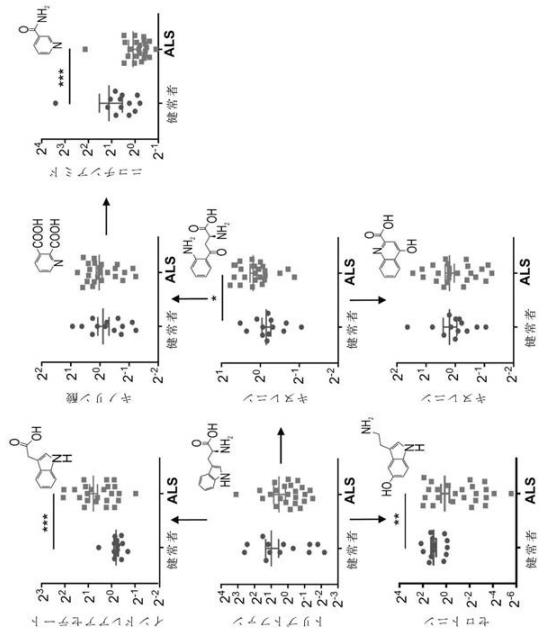


図 7 D

【図 7 E】

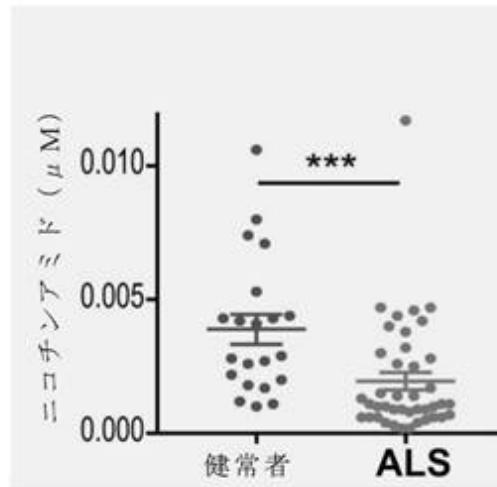


図 7 E

【図 7 F】

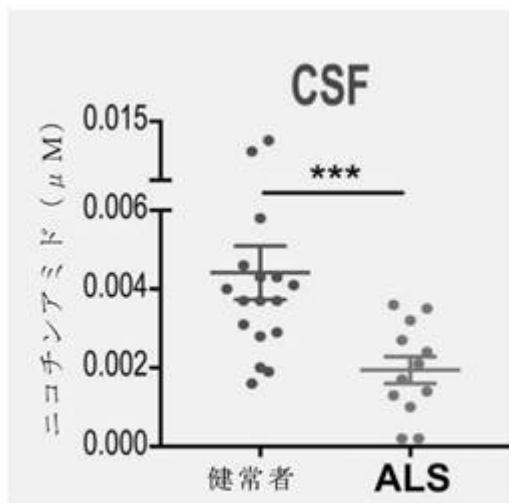


図 7 F

【図 8 A】

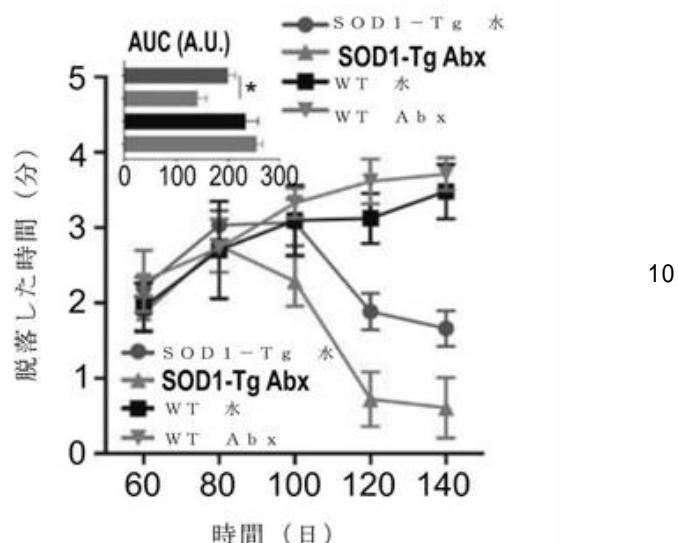


図 8 A

20

【図 8 B】

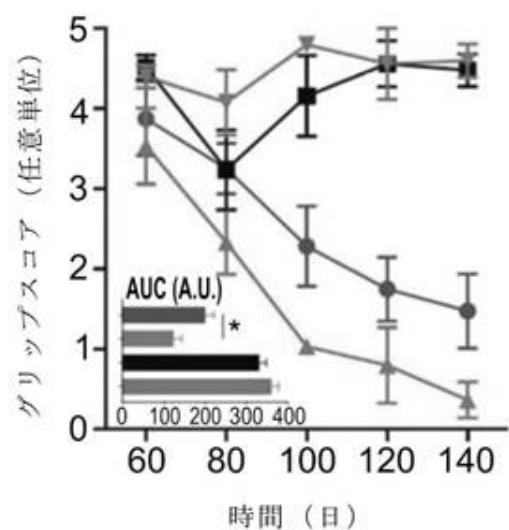


図 8 B

【図 8 C】

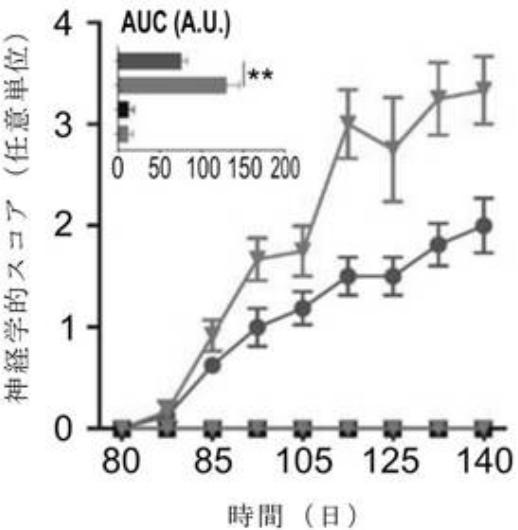


図 8 C

40

50

【図 8 D】

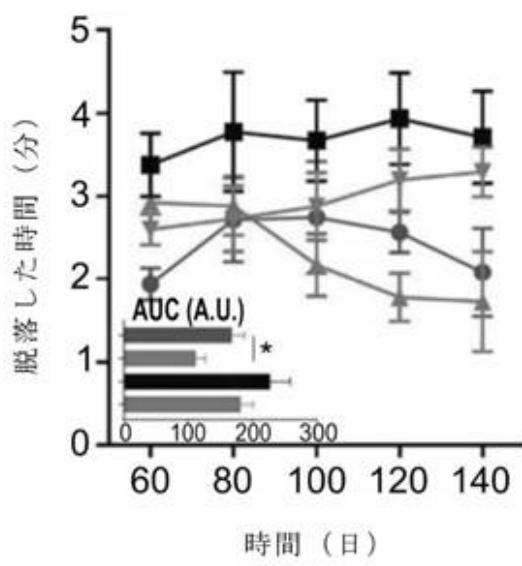


図 8 D

【図 8 E】

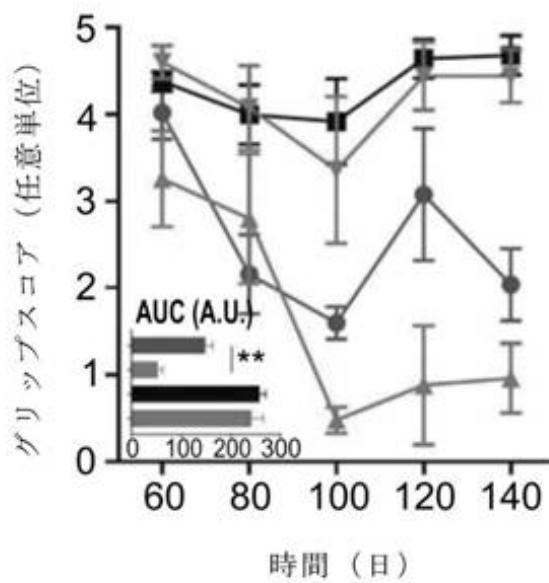


図 8 E

20

【図 8 F】

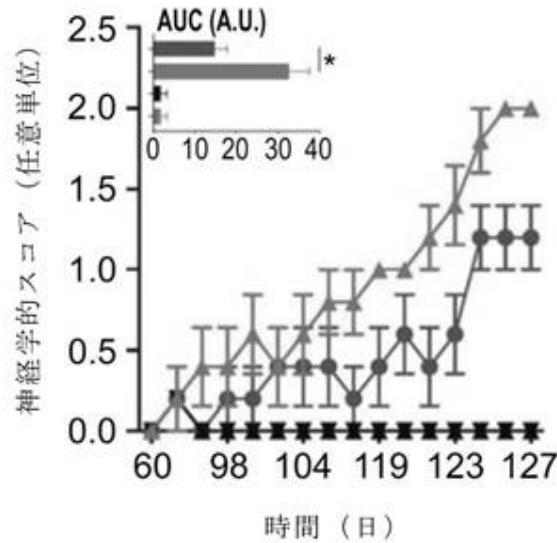


図 8 F

【図 8 G】

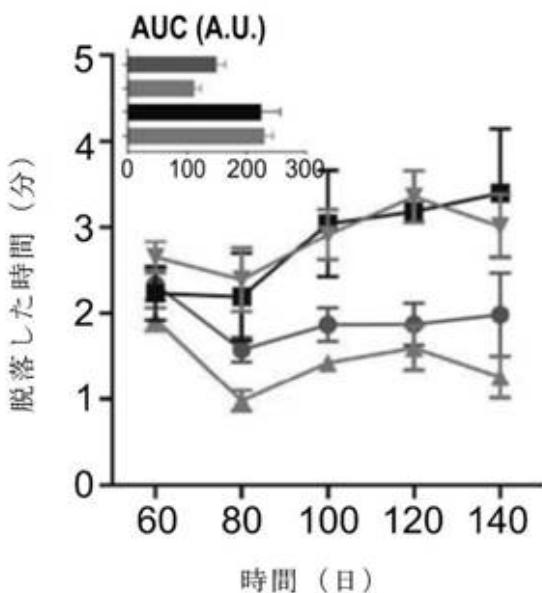


図 8 G

30

40

50

【図 8 H】

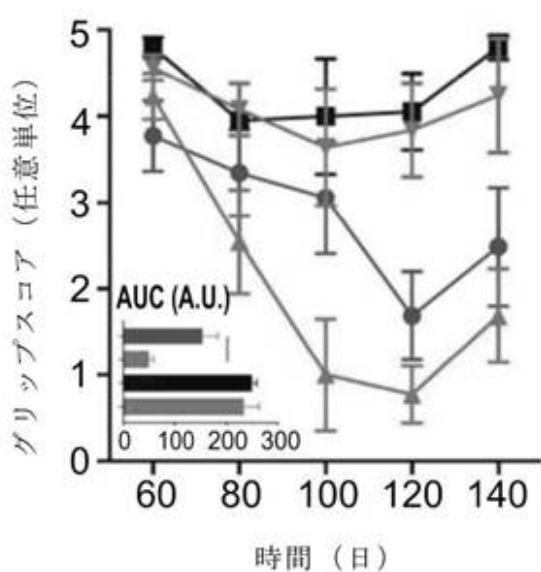


図 8 H

【図 8 I】

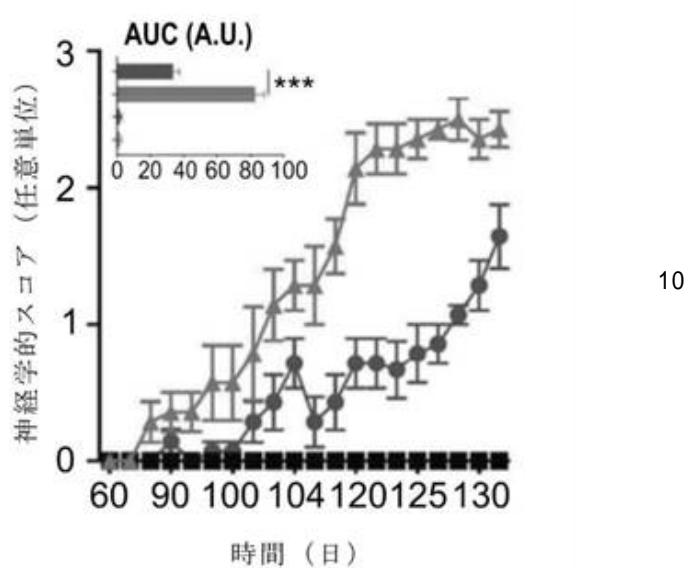


図 8 I

20

【図 9 A】

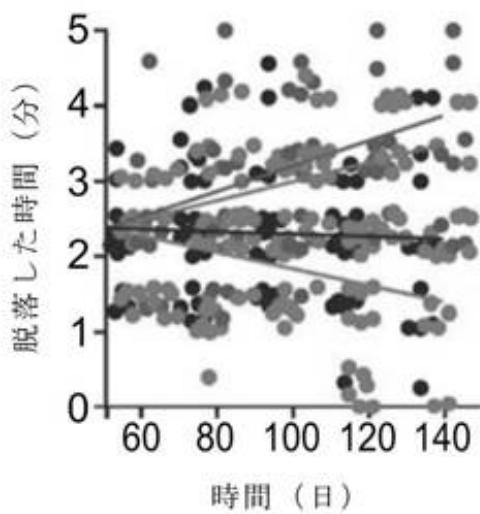


図 9 A

【図 9 B】

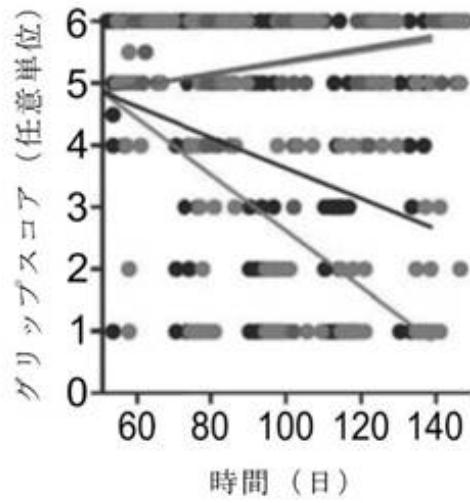


図 9 B

40

50

【図 9 C】

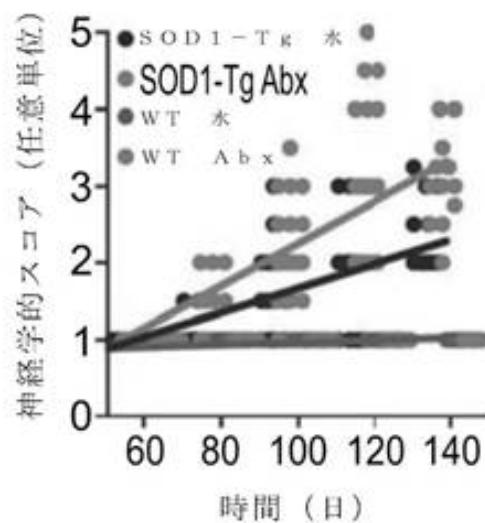


図 9 C

【図 9 D】

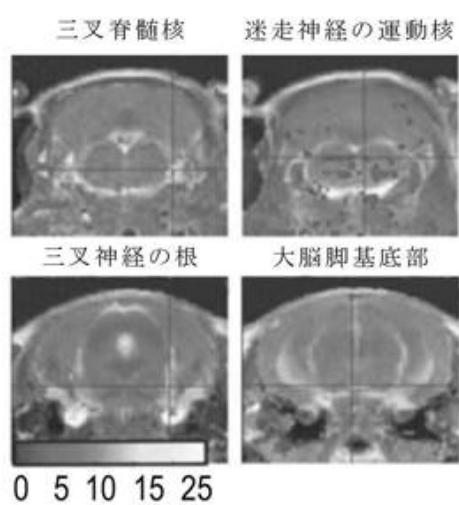


図 9 D

【図 9 E】

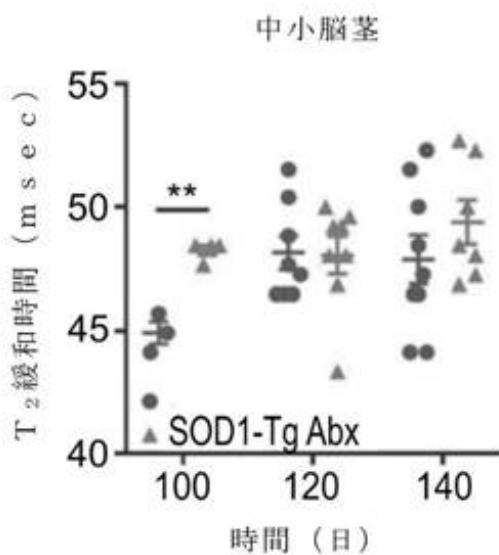


図 9 E

【図 9 F】

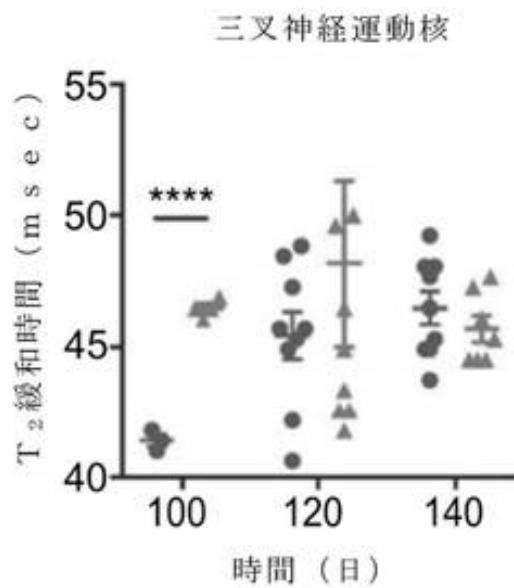


図 9 F

【図 9 G】

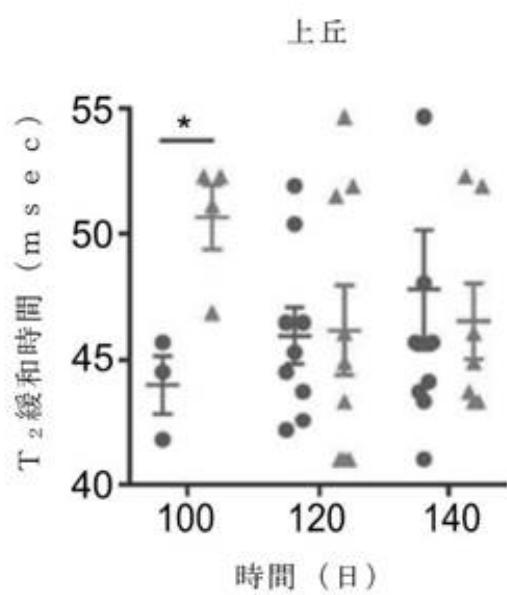


図 9 G

【図 9 H】

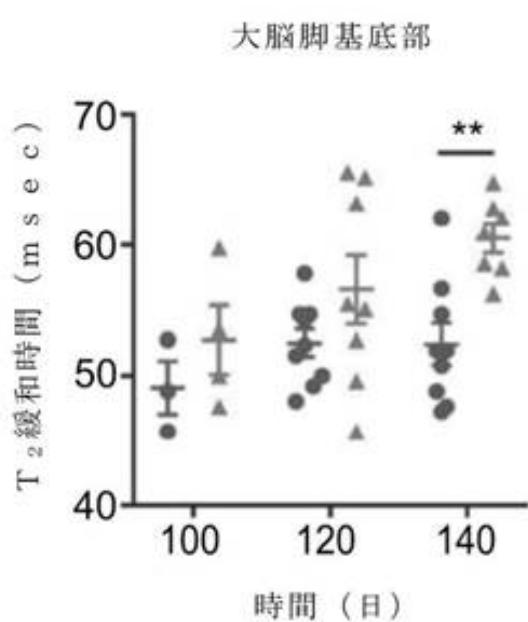


図 9 H

【図 9 I】

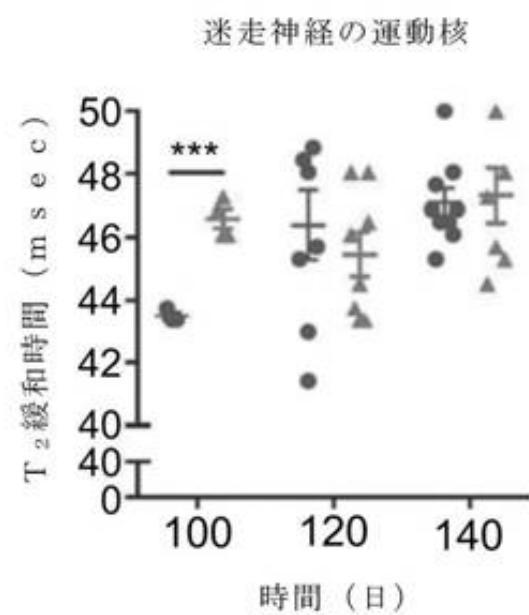


図 9 I

【図 9 J】

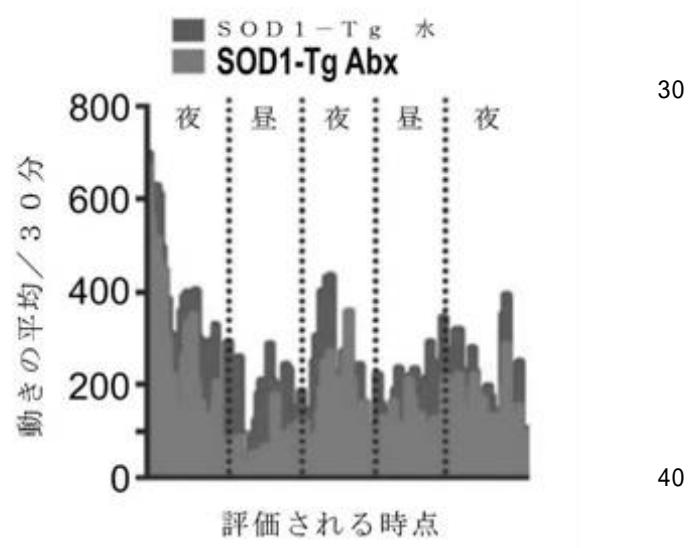


図 9 J

【図 9 K】

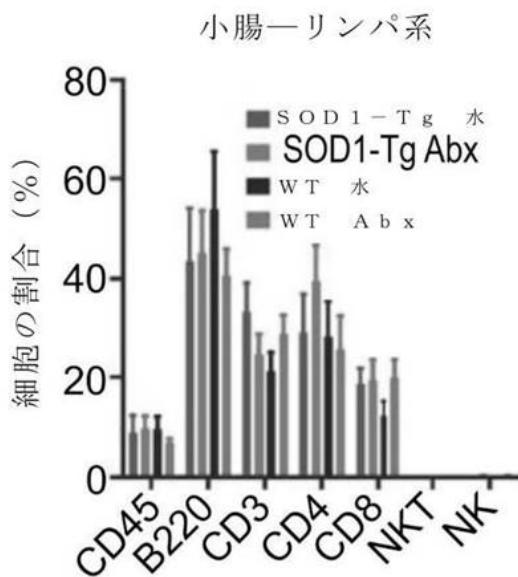


図 9 K

【図 9 L】

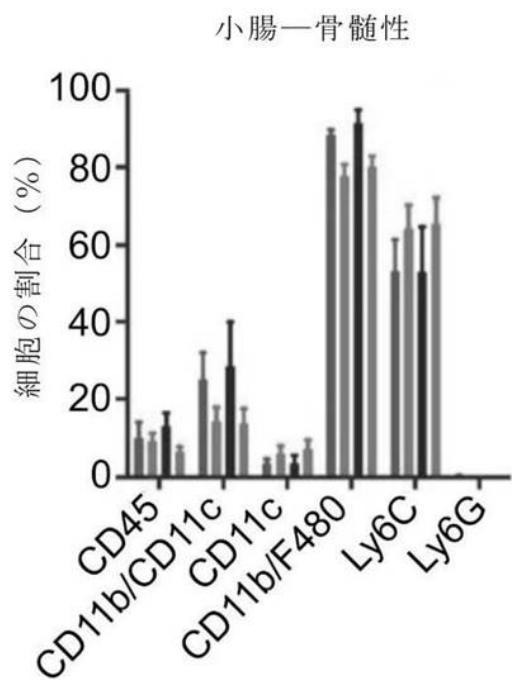


図 9 L

【図 9 M】

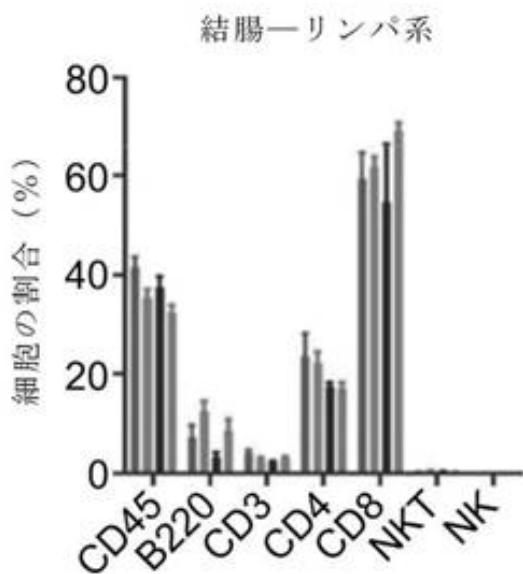


図 9 M

【図 9 N】

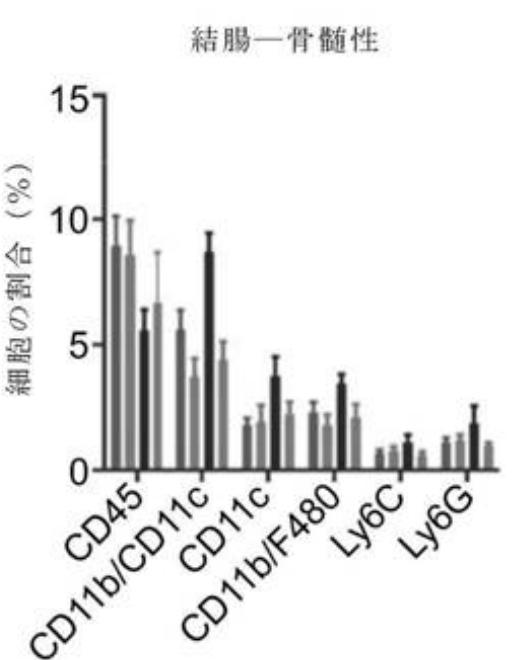


図 9 N

【図 9 O】

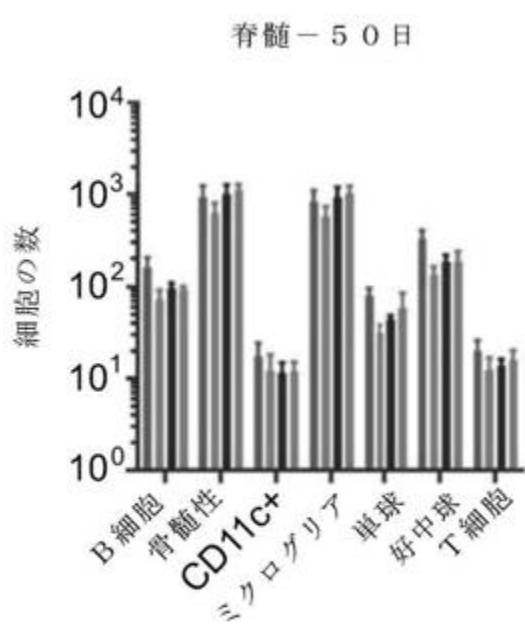


図 9 O

【図 9 P】

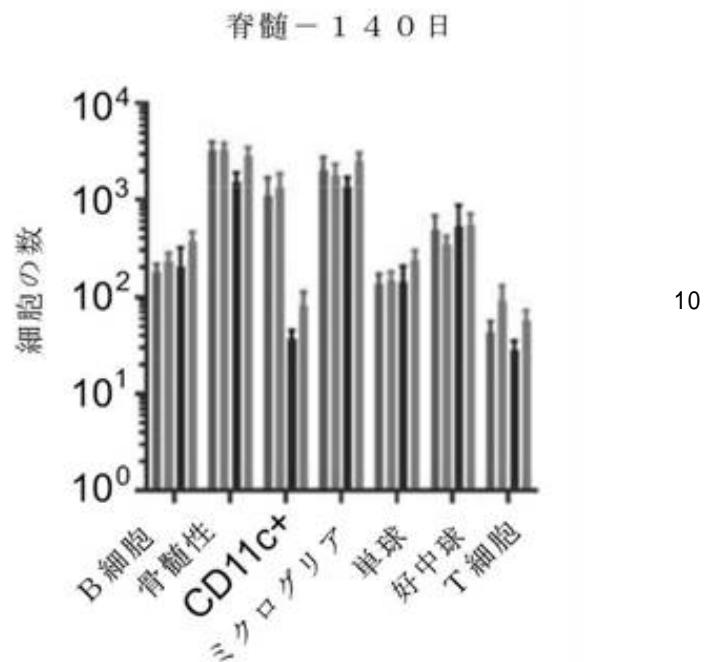


図 9 P

【図 10 A】

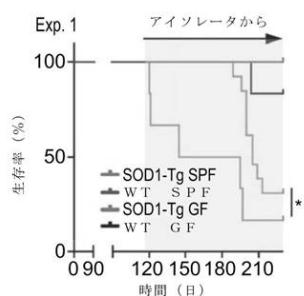


図 10 A

【図 10 B】

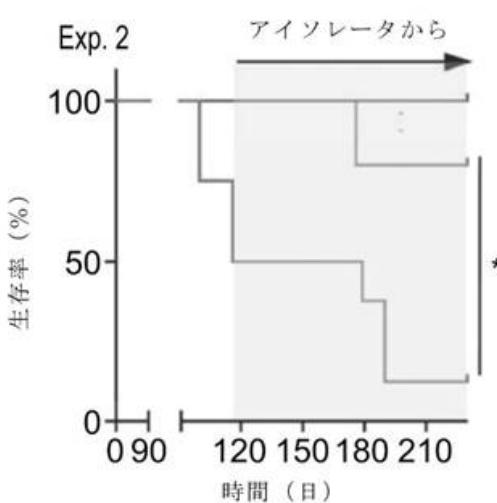


図 10 B

20

30

40

50

【図 1 0 C】

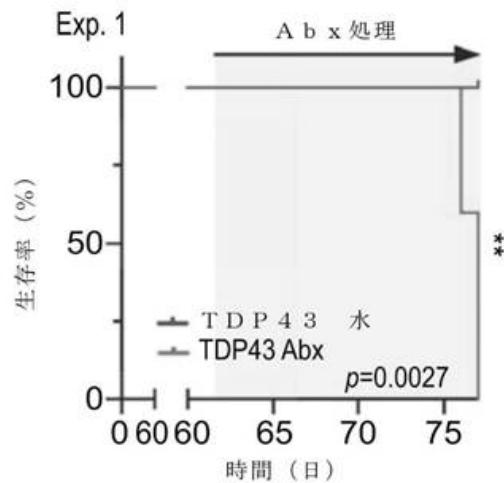


図 1 0 C

【図 1 0 D】

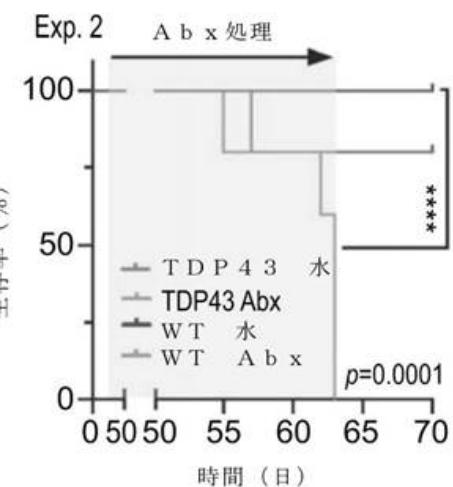


図 1 0 D

【図 1 1 A】

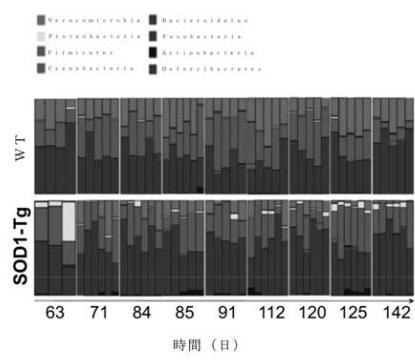


図 1 1 A

【図 1 1 B】

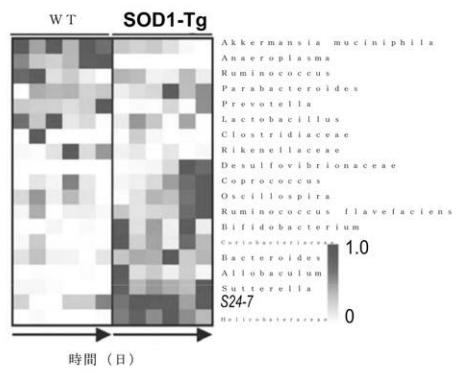


図 1 1 B

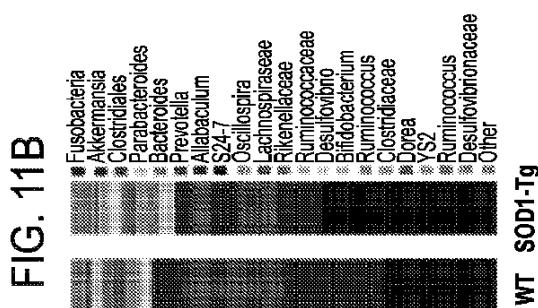
20

30

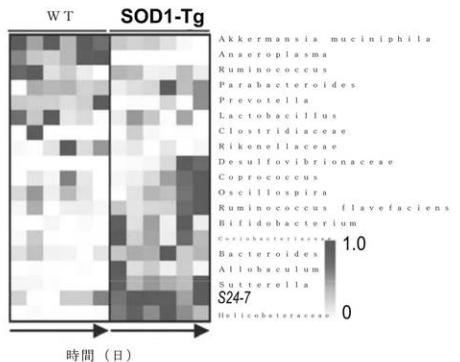
40

50

【図 1】



【図 1 1 C】



10

図 1 1 C

【図 1 1 D】

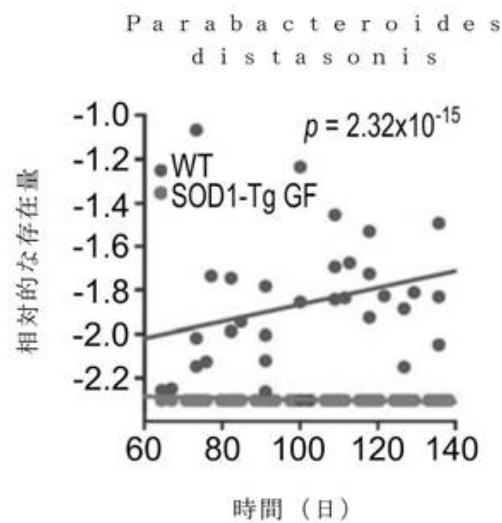


図 1 1 D

【図 1 1 E】

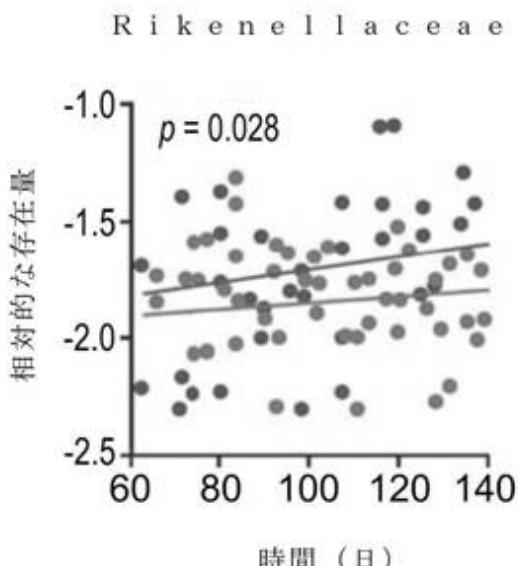


図 1 1 E

20

30

40

50

【図 1 1 F】

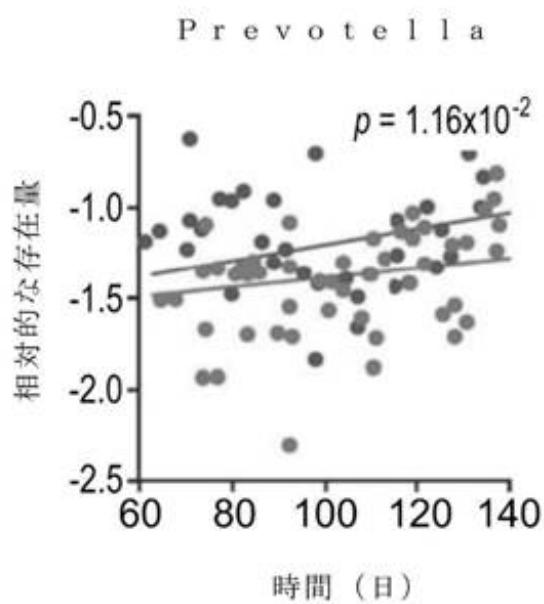


図 1 1 F

【図 1 1 G】

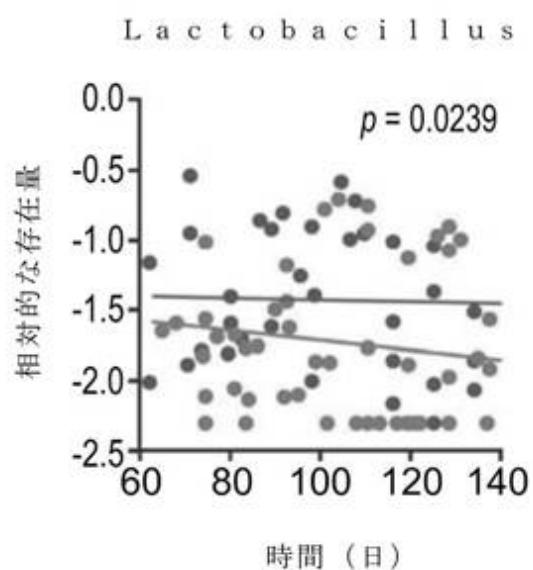


図 1 1 G

20

【図 1 1 H】

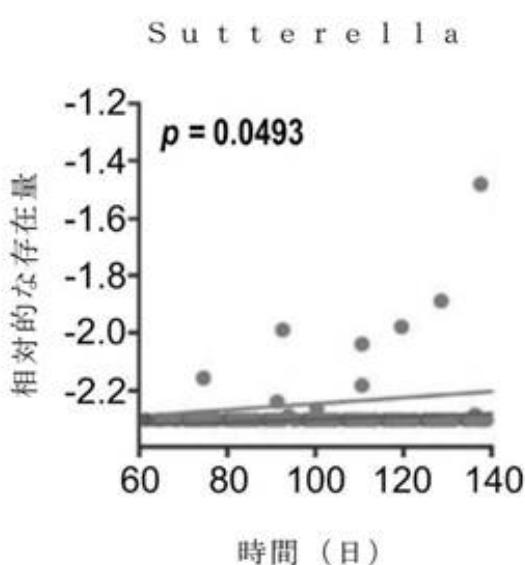


図 1 1 H

【図 1 1 I】

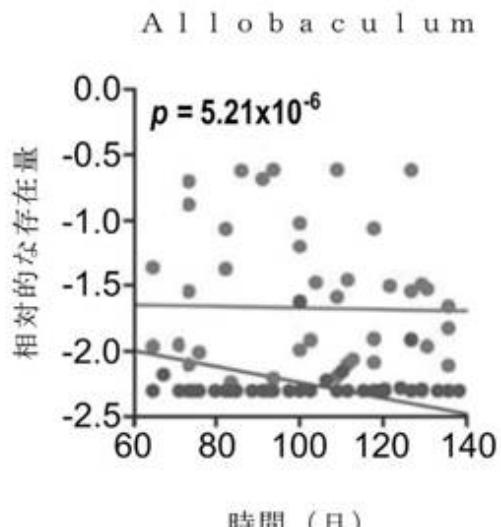


図 1 1 I

30

40

50

【図 1 1 J】

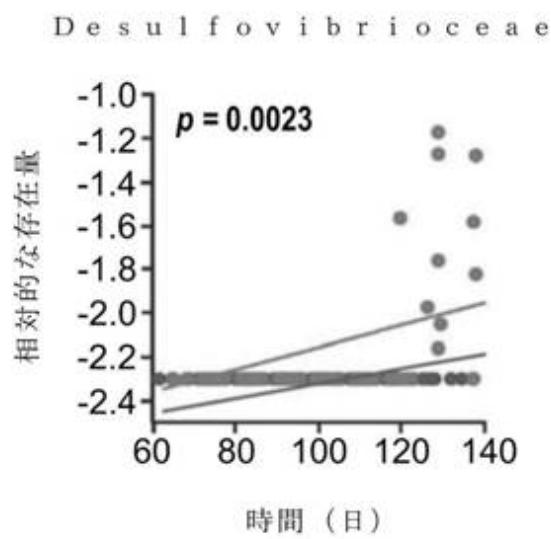


図 1 1 J

【図 1 1 K】

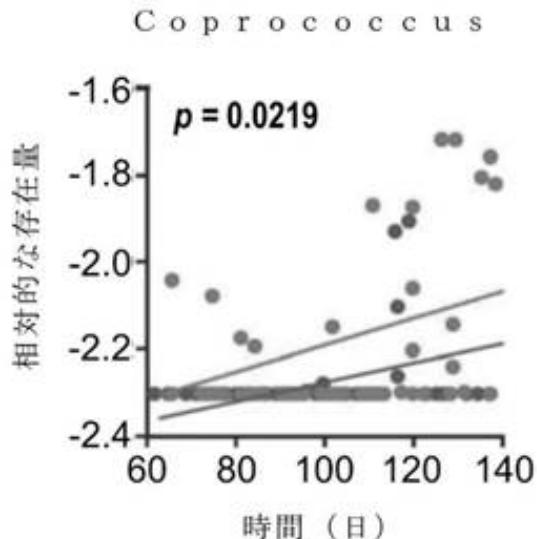


図 1 1 K

10

20

【図 1 1 L】

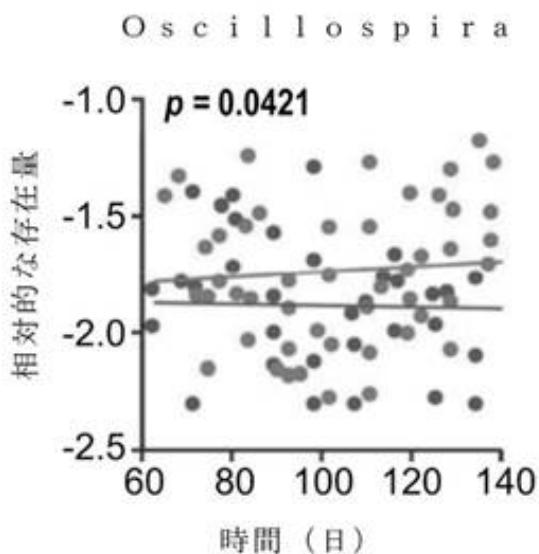


図 1 1 L

【図 1 1 M】

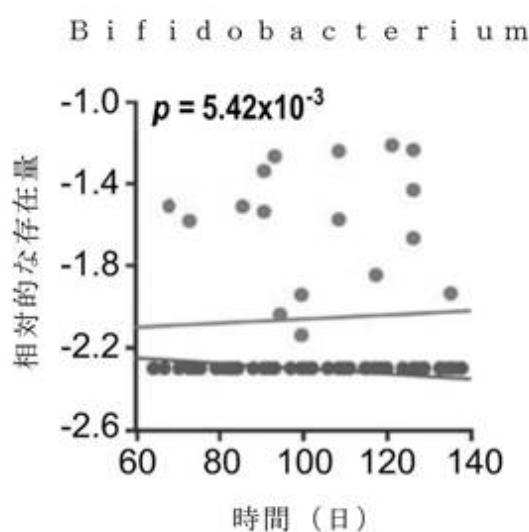


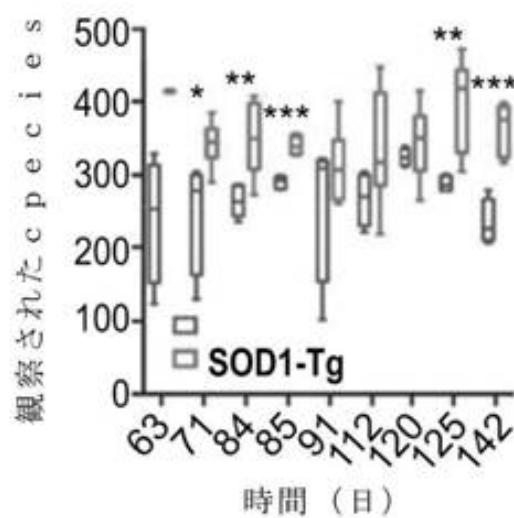
図 1 1 M

30

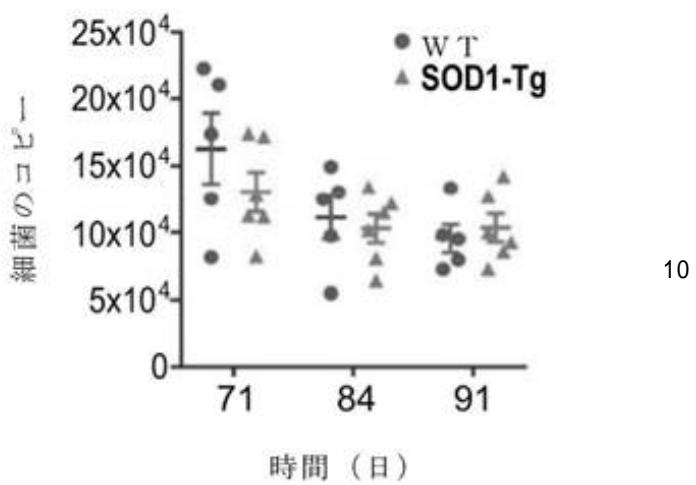
40

50

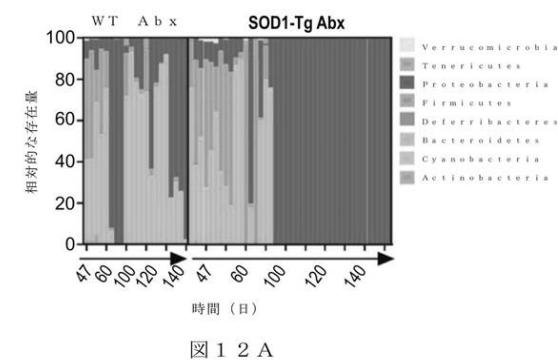
【図 1 1 N】



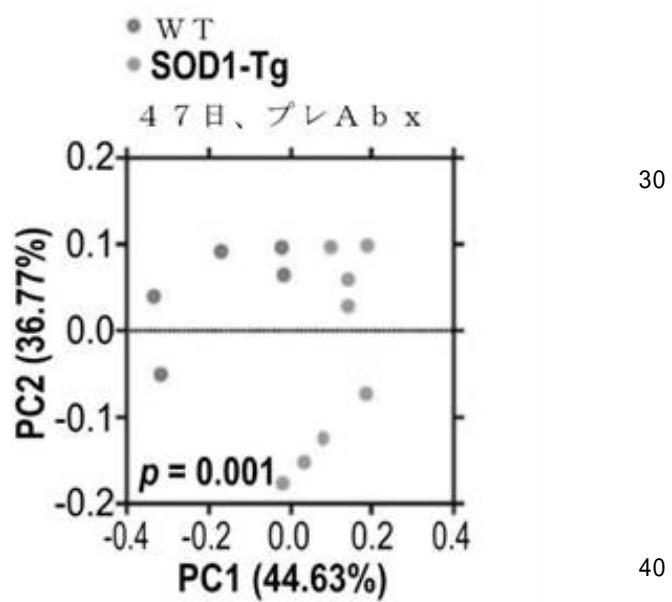
【図 1 1 O】



【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



【図 1 2 C】

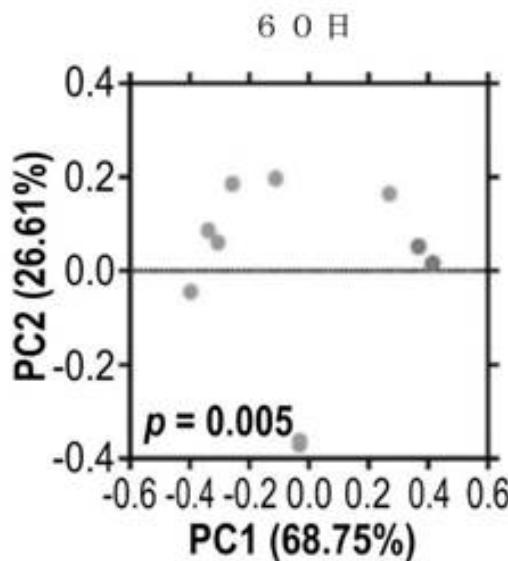


図 1 2 C

【図 1 2 D】

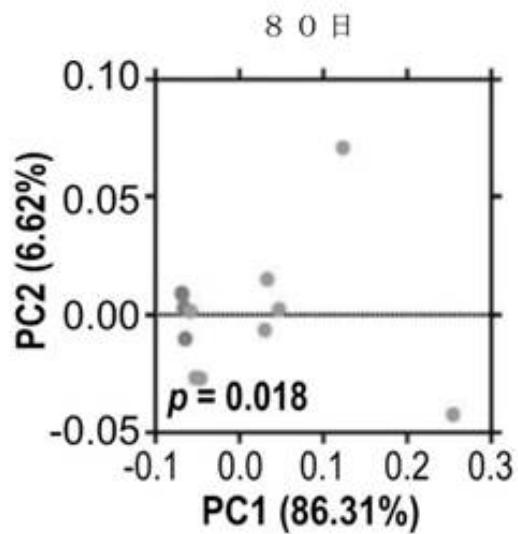


図 1 2 D

20

【図 1 2 E】

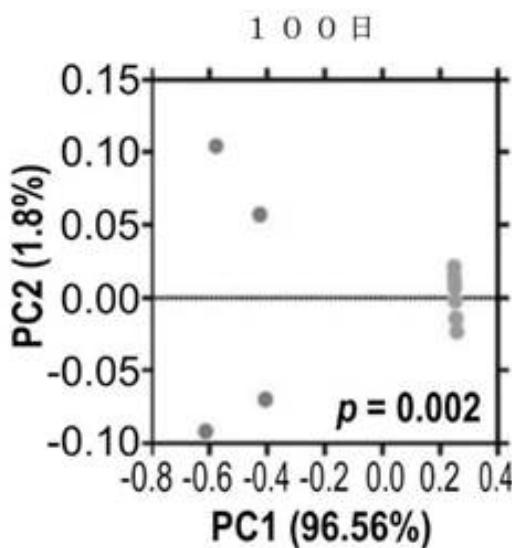


図 1 2 E

【図 1 2 F】

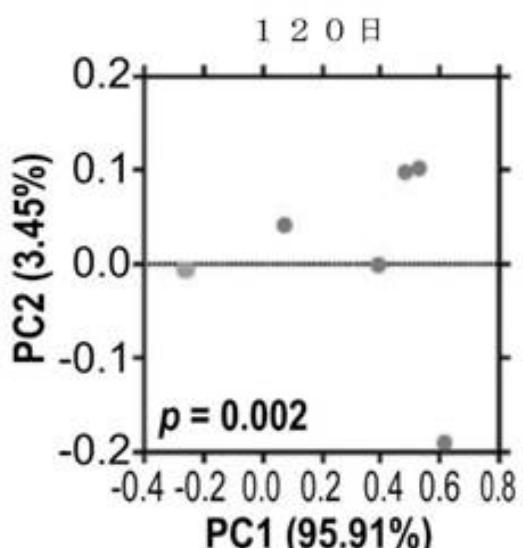


図 1 2 F

40

50

【図 1 2 G】

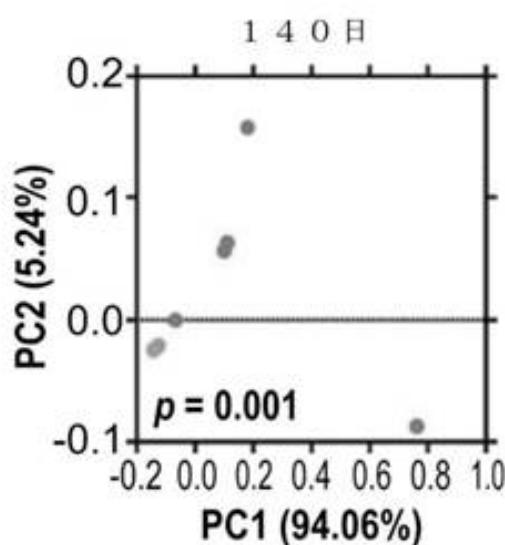


図 1 2 G

【図 1 2 H】

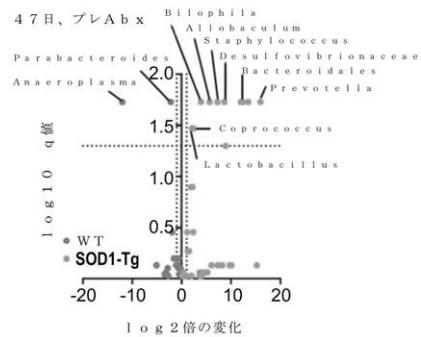


図 1 2 H

【図 1 2 I】

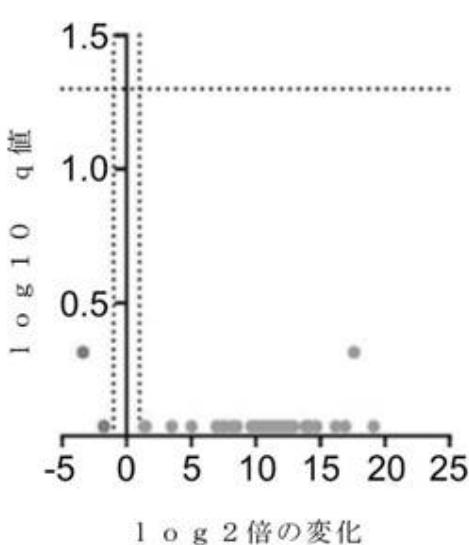


図 1 2 I

【図 1 2 J】

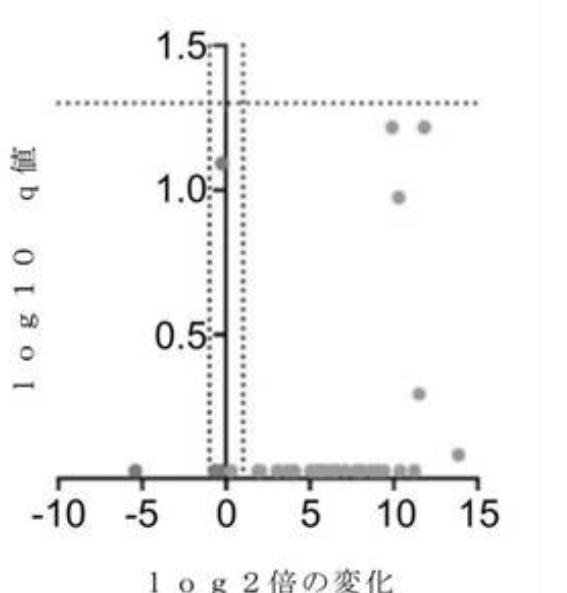


図 1 2 J

10

20

30

40

50

【図 1 2 K】

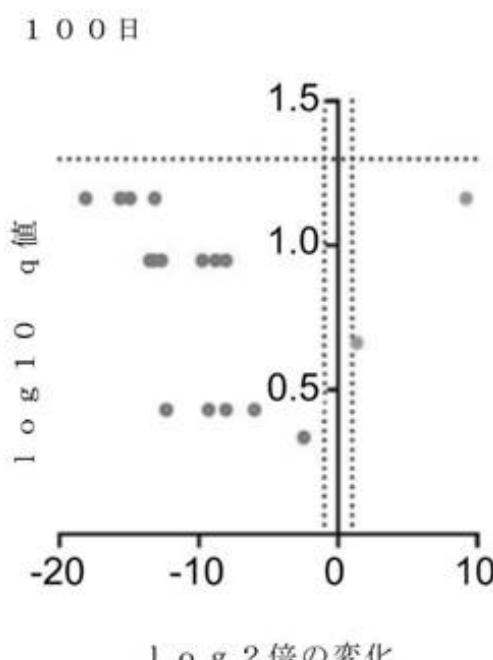


図 1 2 K

【図 1 2 L】

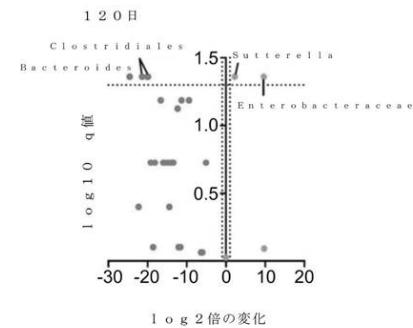


図 1 2 L

10

20

【図 1 2 M】

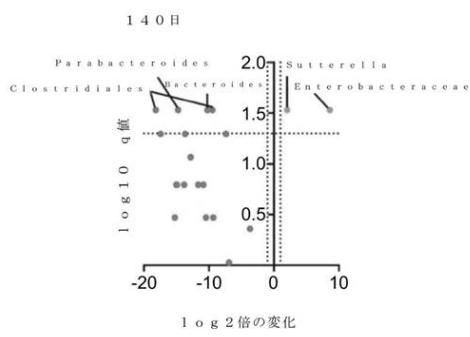


図 1 2 M

30

【図 1 3 A】

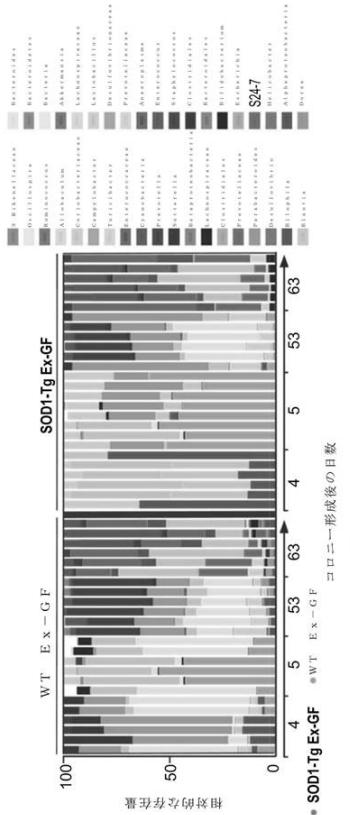


図 1 3 A

40

50

【図 1 3 B】

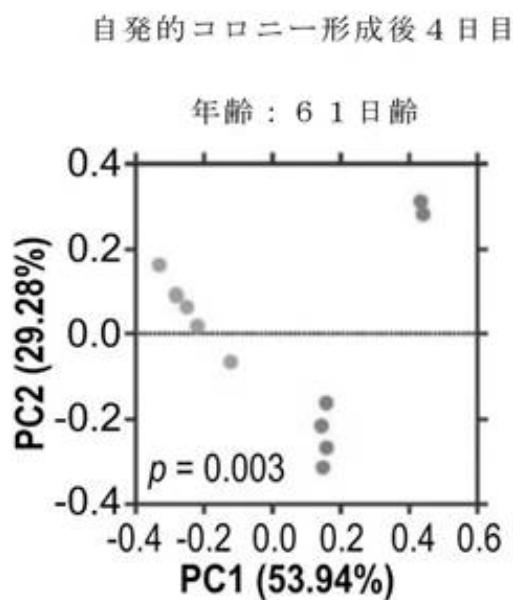


図 1 3 B

【図 1 3 C】

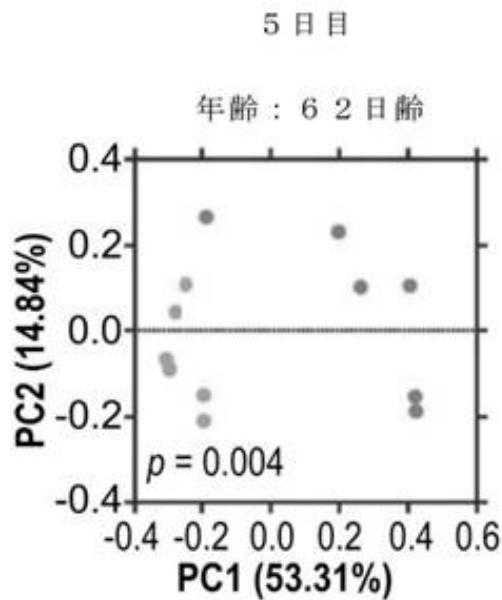


図 1 3 C

20

【図 1 3 D】

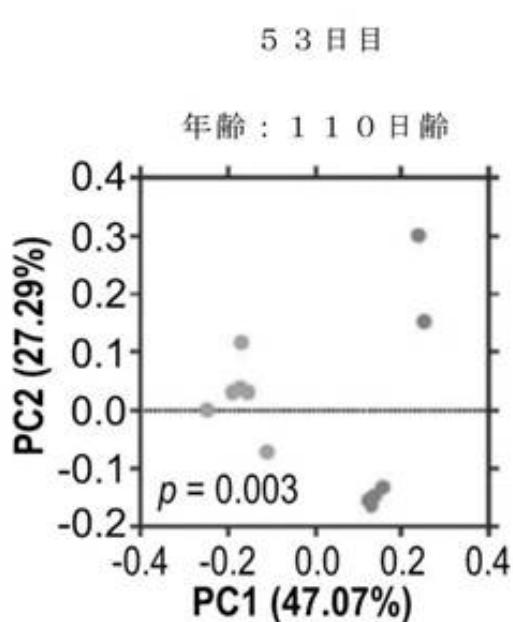


図 1 3 D

【図 1 3 E】

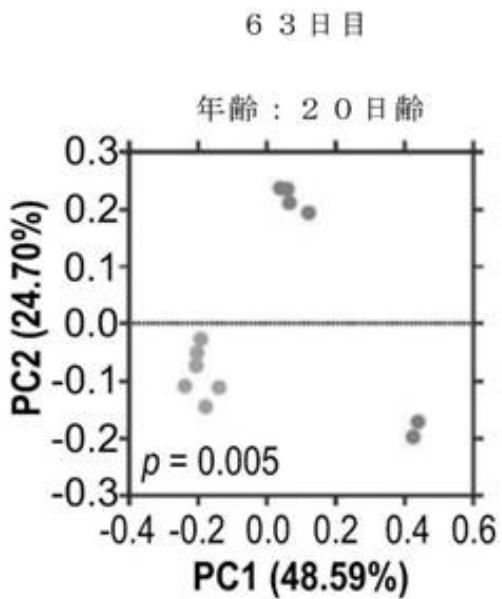


図 1 3 E

30

40

50

【図 1 3 F】

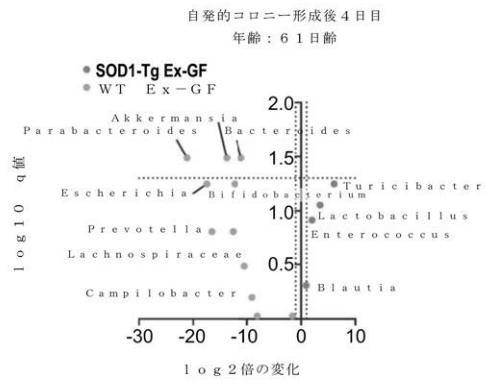


図 1 3 F

【図 1 3 G】

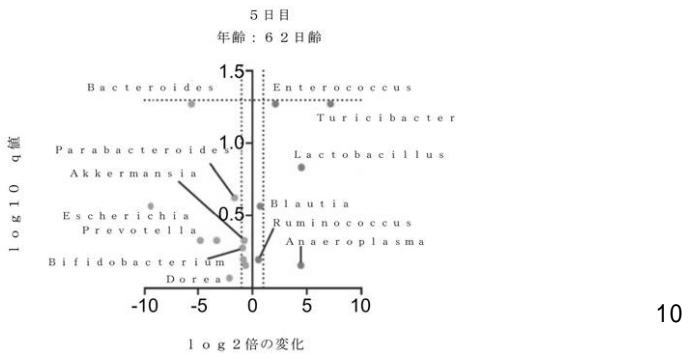


図 1 3 G

【図 1 3 H】

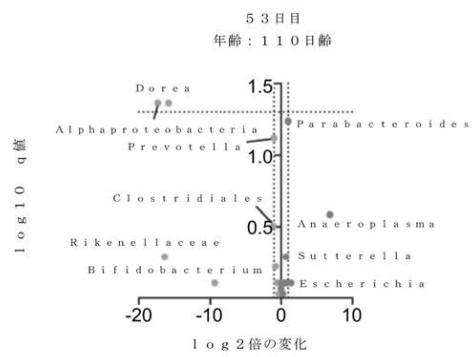


図 1 3 H

【図 1 3 I】

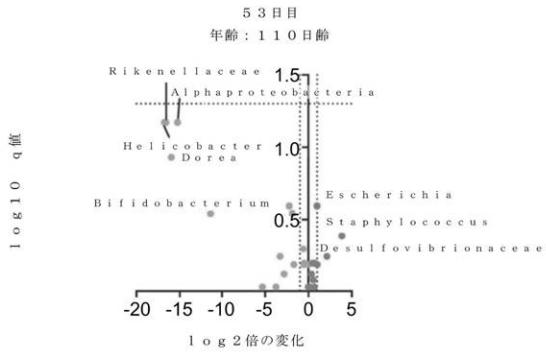


図 1 3 I

30

40

50

【図 1 4 A】

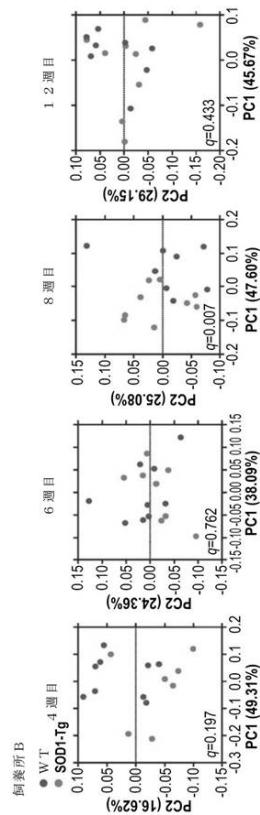


図 1 4 A

【図 1 4 B】

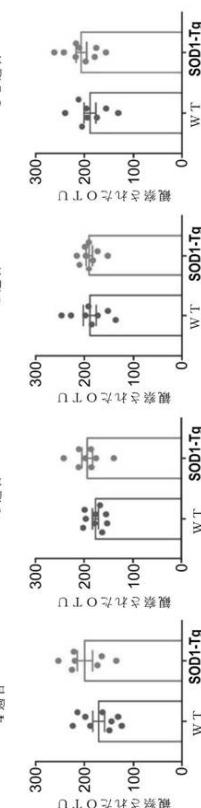


図 1 4 B

10

20

30

【図 1 4 C】

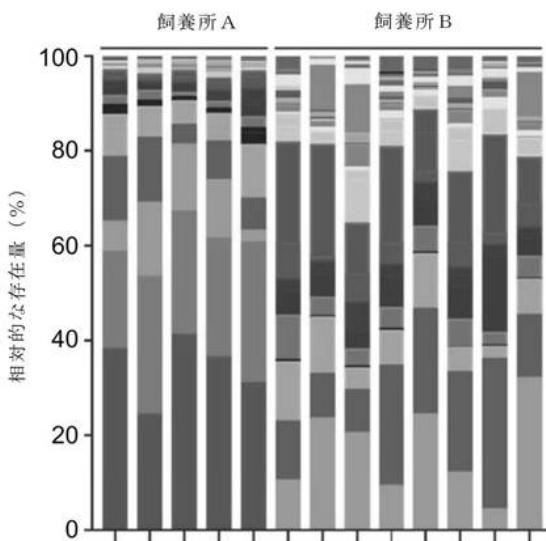


図 1 4 C

40

【図 1 4 D】

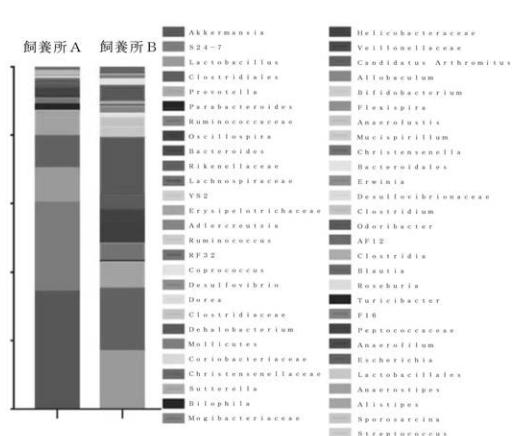


図 1 4 D

50

【図14E】



【図15A】

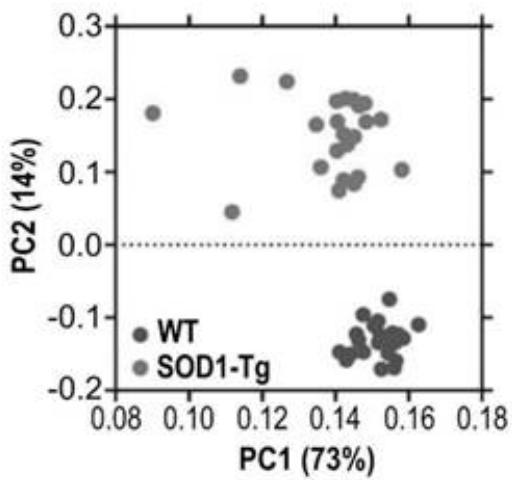


図 15 A

【図15B】

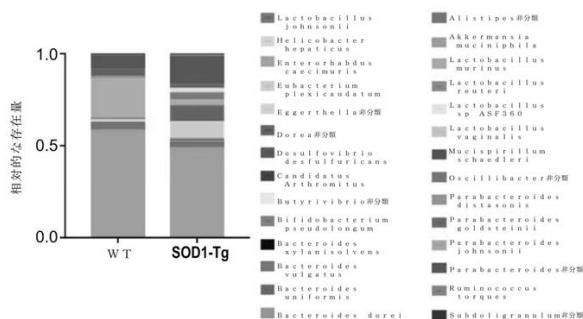


图 15 B

【図15C】

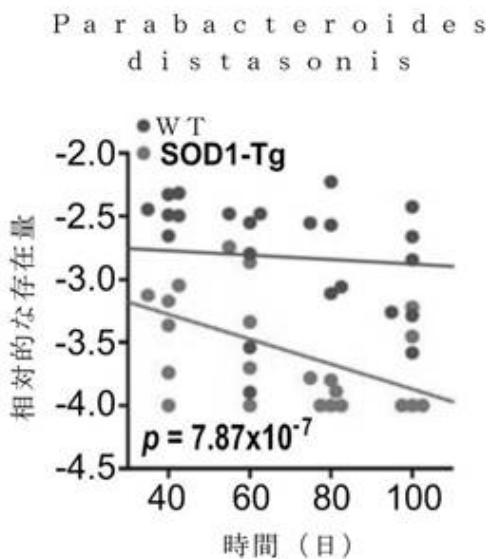


图 15 C

【図 15 D】

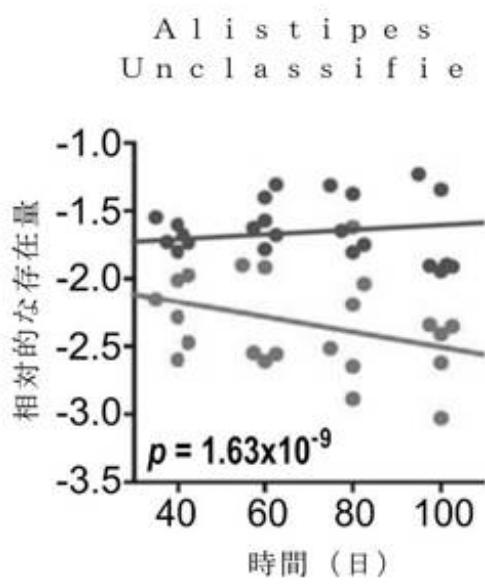


図 15 D

【図 15 E】

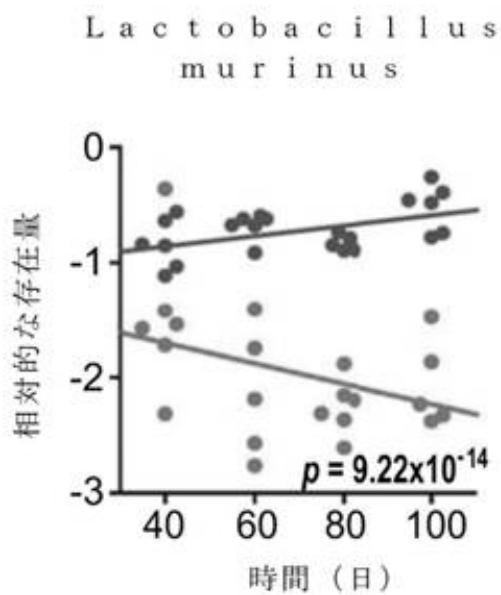


図 15 E

10

20

【図 15 F】

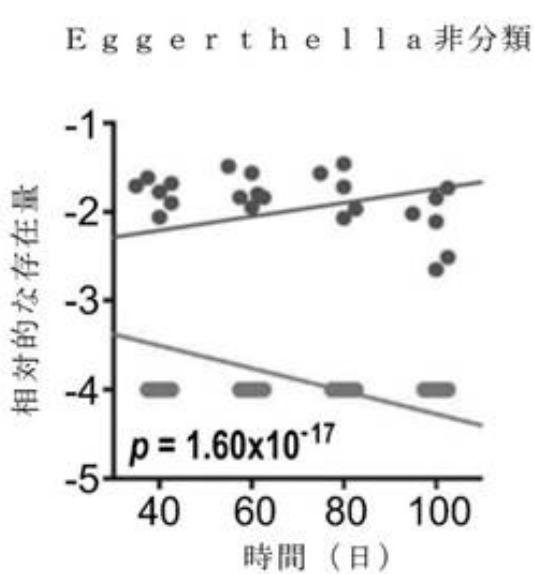


図 15 F

【図 15 G】

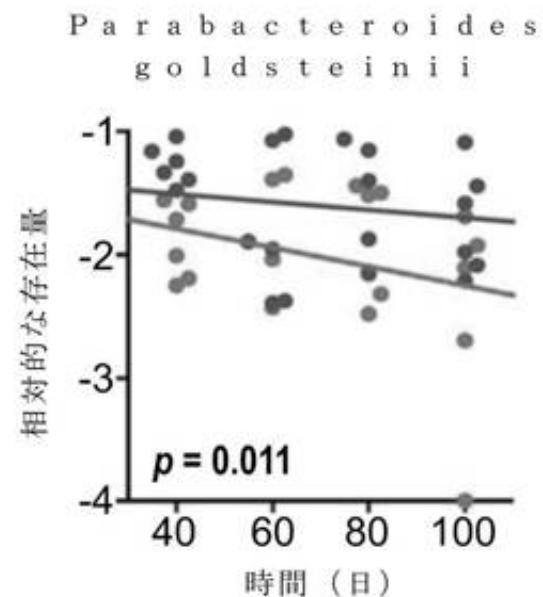


図 15 G

30

40

50

【図 15 H】

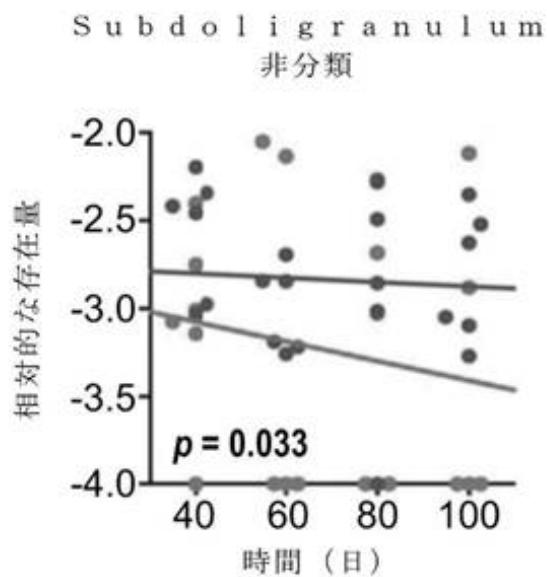


図 15 H

【図 15 I】

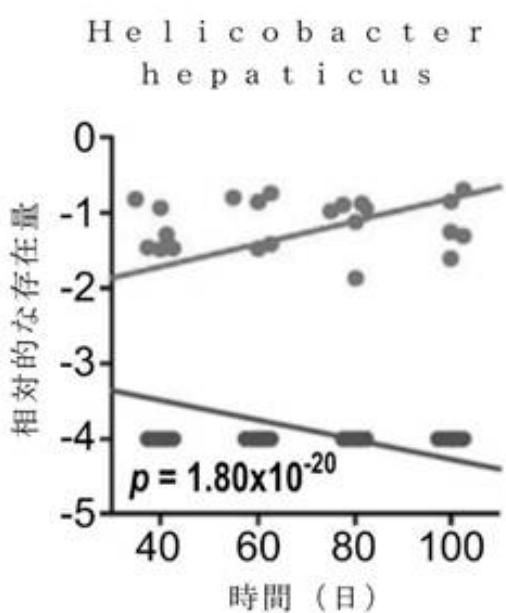


図 15 I

【図 15 J】

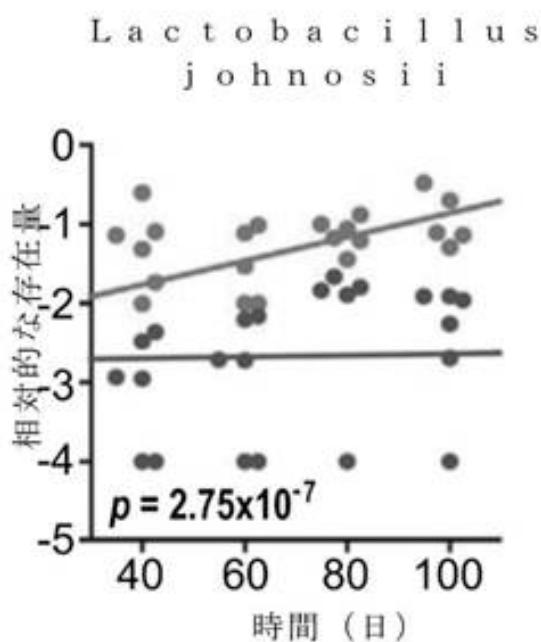


図 15 J

【図 15 K】

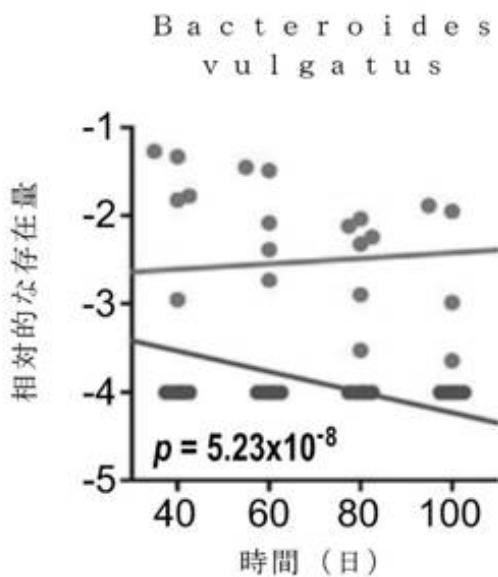


図 15 K

10

20

30

40

50

【図 1 5 L】

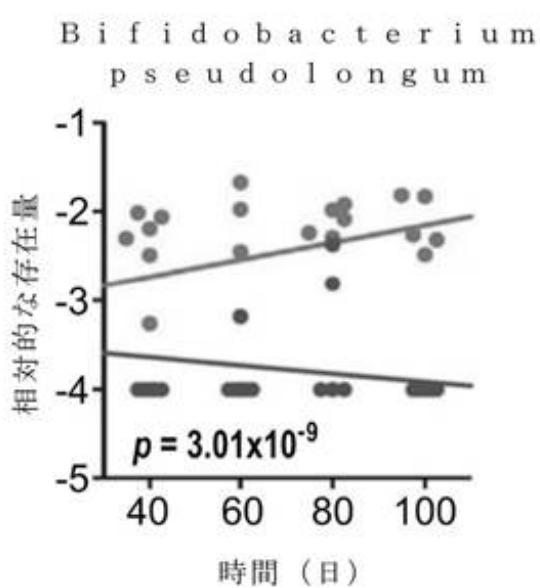


図 1 5 L

【図 1 5 M】

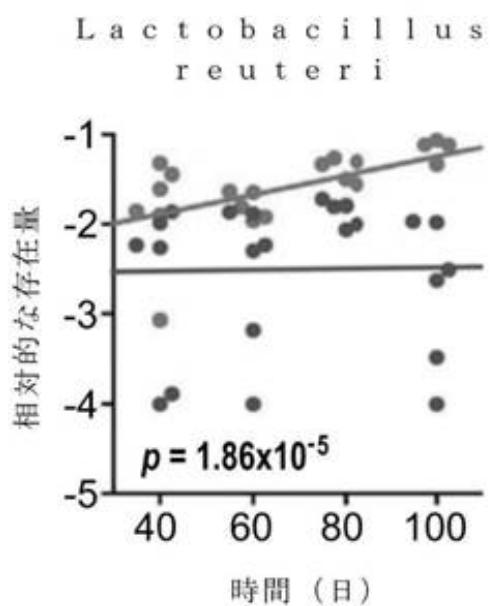


図 1 5 M

10

20

【図 1 5 N】

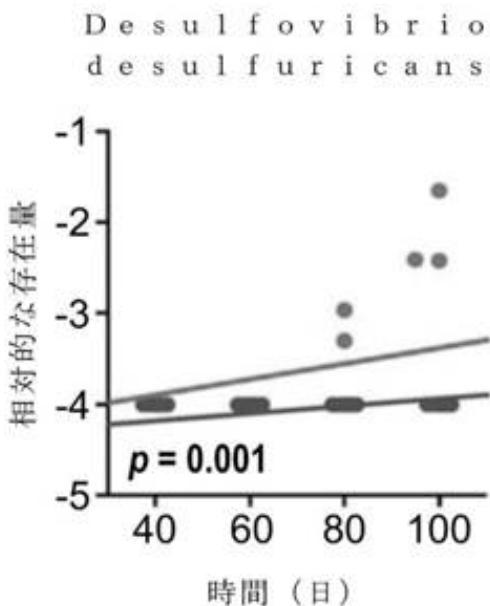


図 1 5 N

【図 1 6 A】

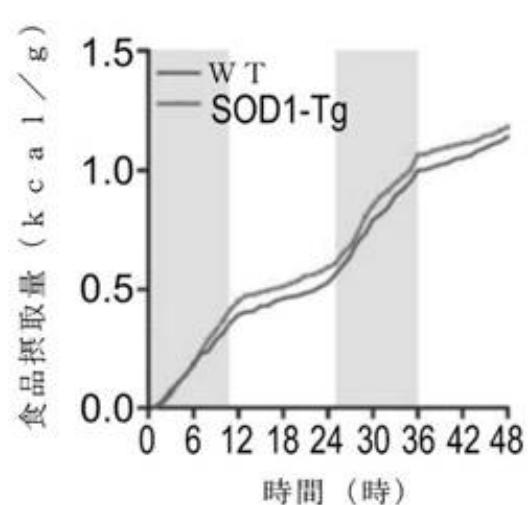


図 1 6 A

30

40

50

【図 1 6 B】

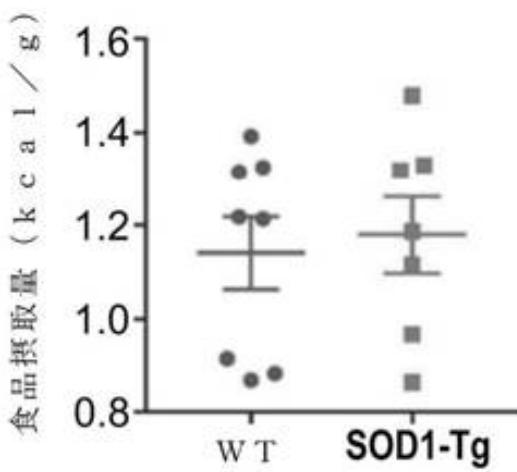


図 1 6 B

【図 1 6 C】

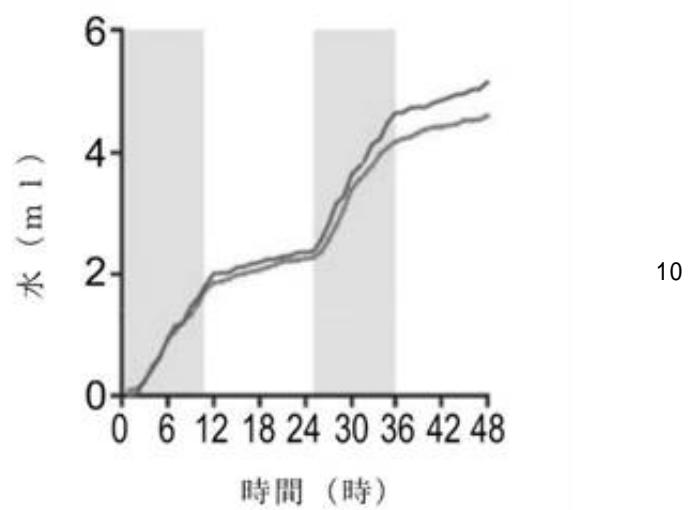


図 1 6 C

【図 1 6 D】

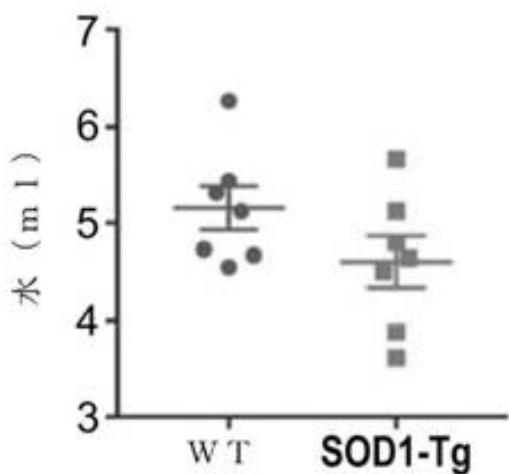


図 1 6 D

【図 1 6 E】

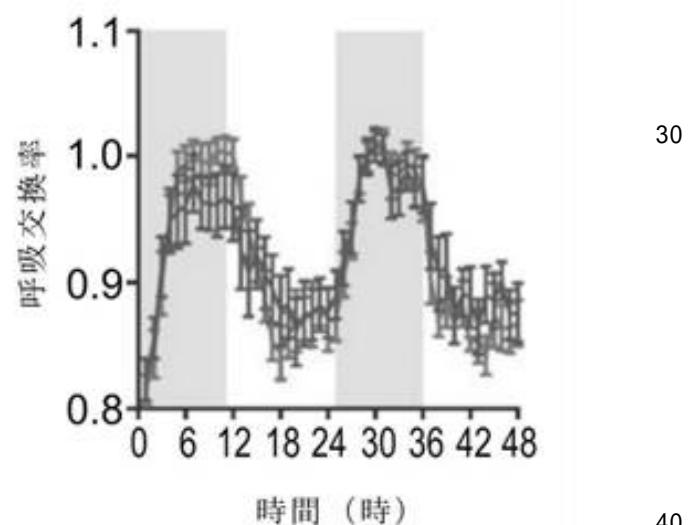


図 1 6 E

【図 1 6 F】

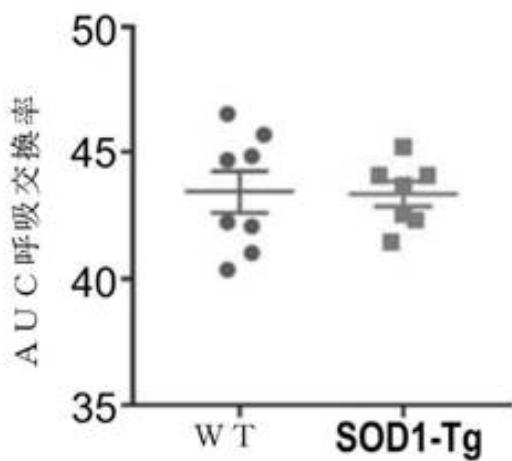


図 1 6 F

【図 1 6 G】

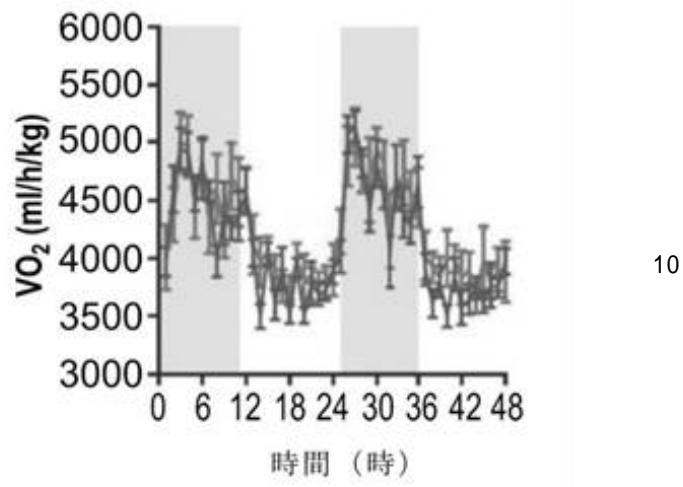


図 1 6 G

【図 1 6 H】

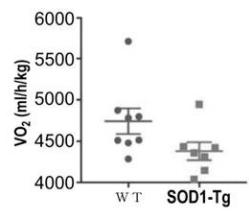


図 1 6 H

【図 1 6 I】

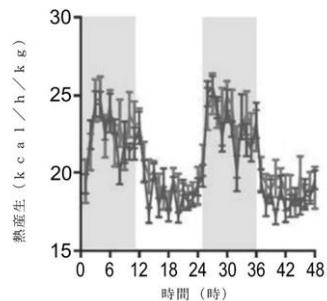


図 1 6 I

20

30

40

50

【図 1 6 J】

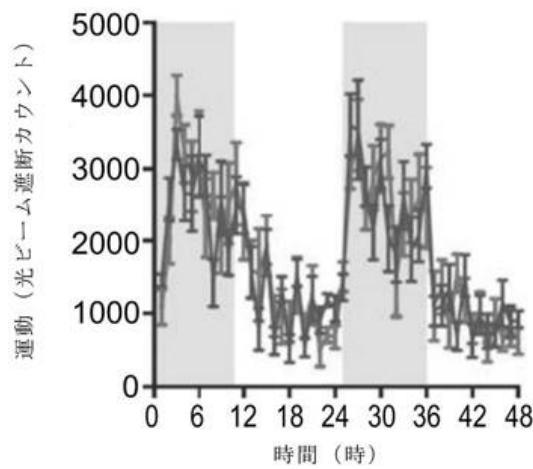


図 1 6 J

【図 1 6 K】

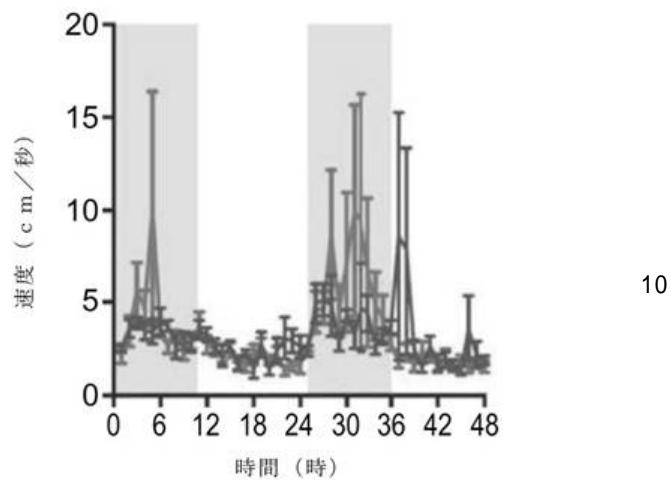


図 1 6 K

【図 1 6 L】

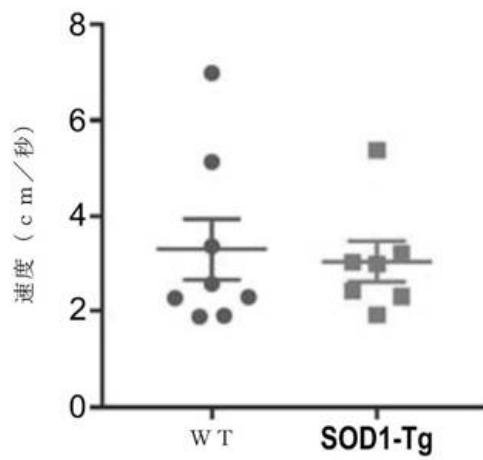


図 1 6 L

【図 1 7 A】

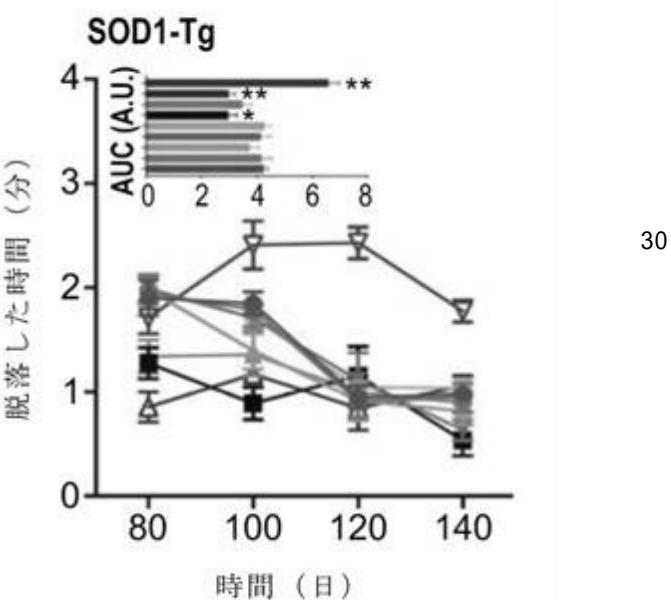


図 1 7 A

【図 1 7 B】

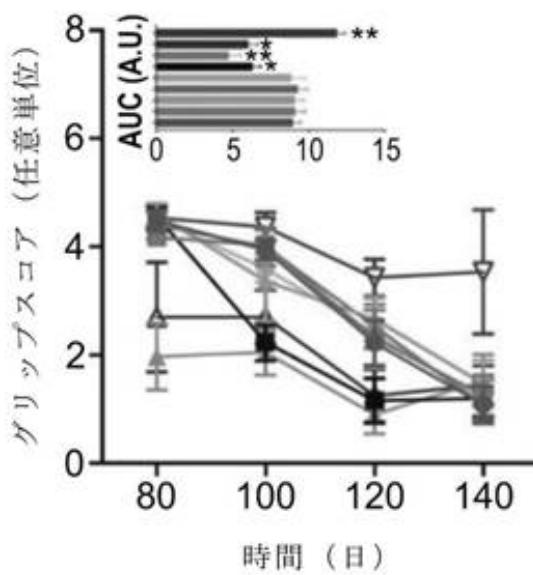


図 1 7 B

【図 1 7 C】

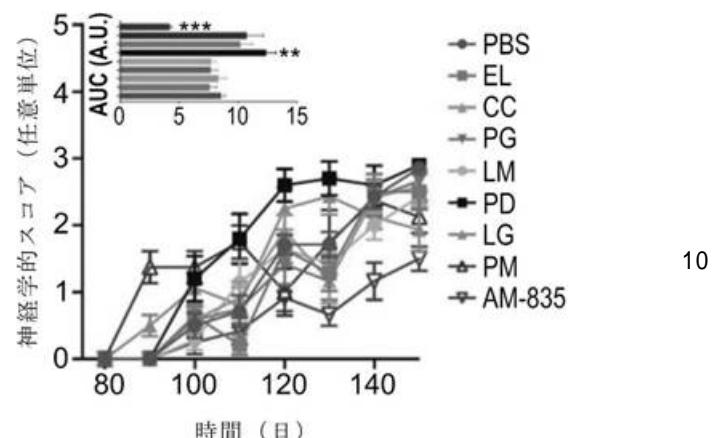


図 1 7 C

10

20

【図 1 7 D】

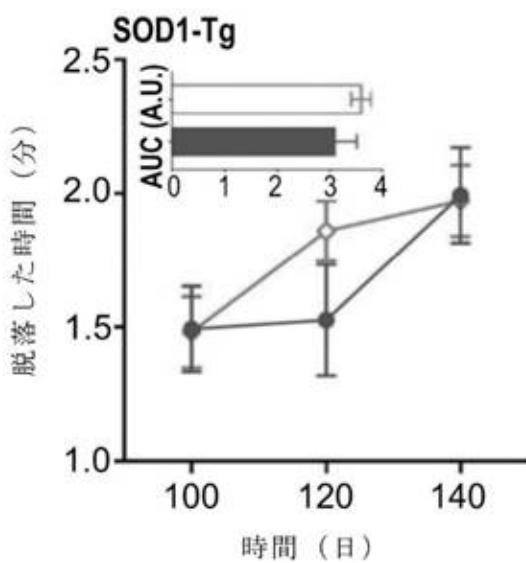


図 1 7 D

30

40

【図 1 7 E】

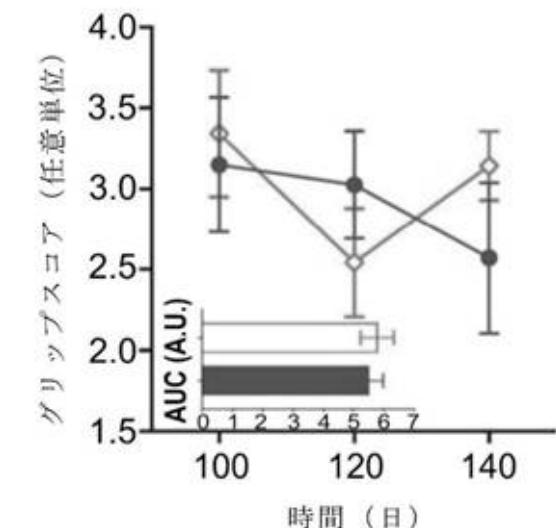


図 1 7 E

50

【図 1 7 F】

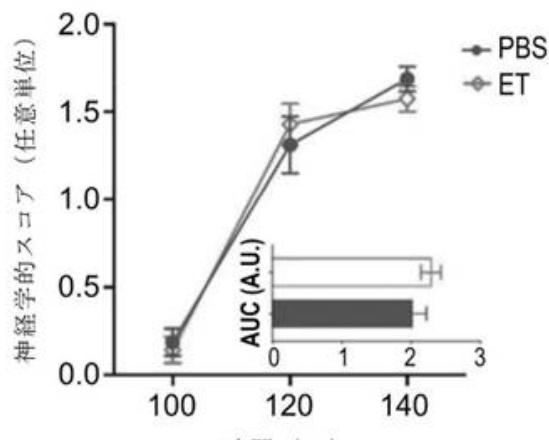


図 1 7 F

【図 1 7 G】

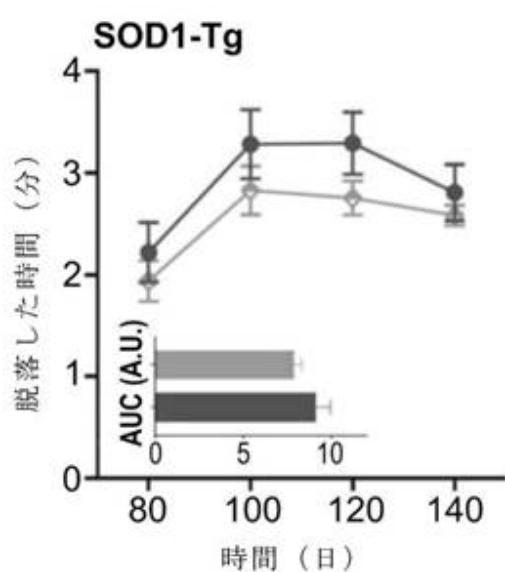


図 1 7 G

10

20

【図 1 7 H】

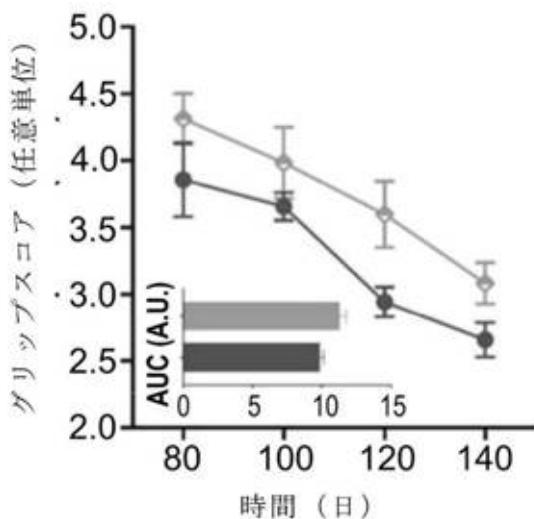


図 1 7 H

【図 1 7 I】

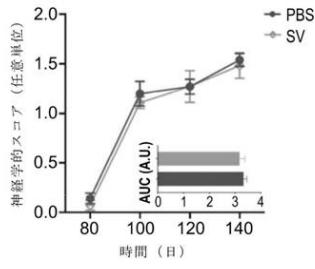


図 1 7 I

30

40

50

【図 1 7 J】

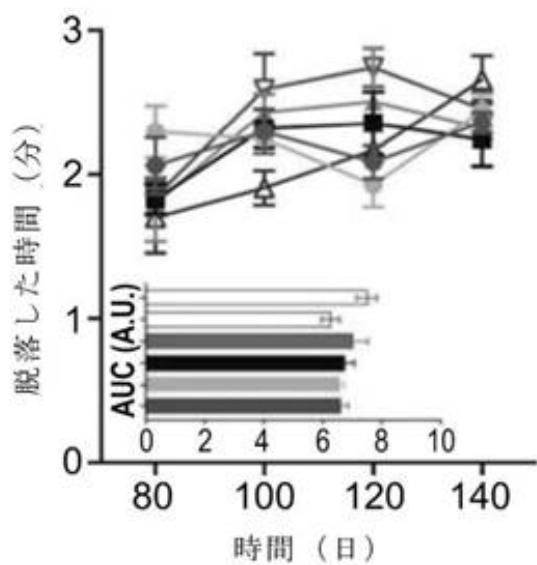


図 1 7 J

【図 1 7 K】

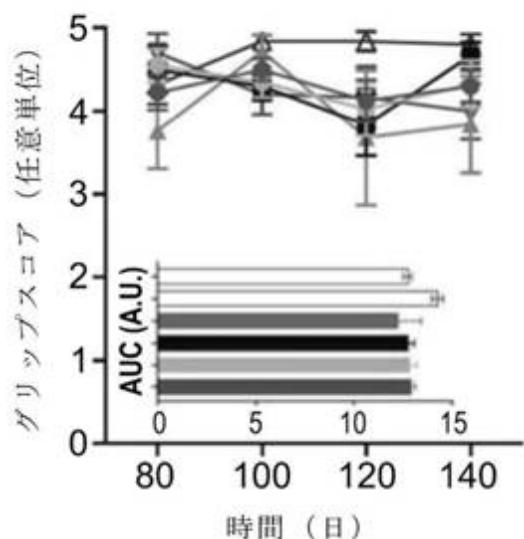


図 1 7 K

10

20

【図 1 7 L】

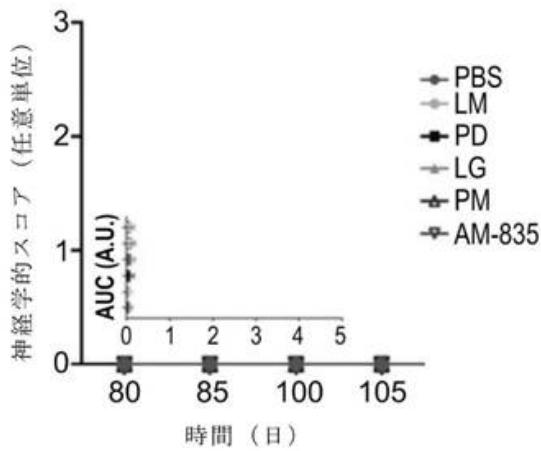


図 1 7 L

【図 1 8 A】

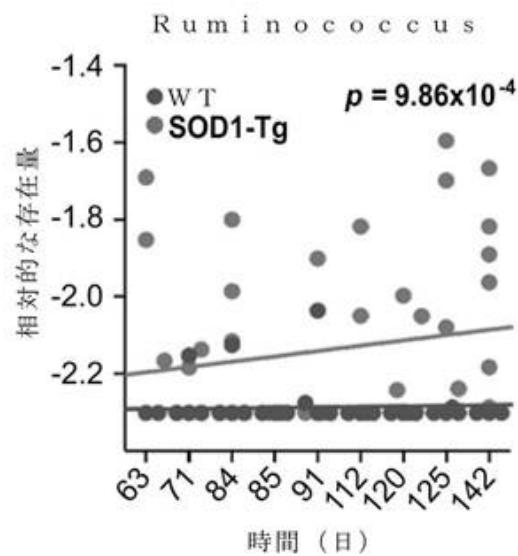


図 1 8 A

30

40

50

【図 1 8 B】

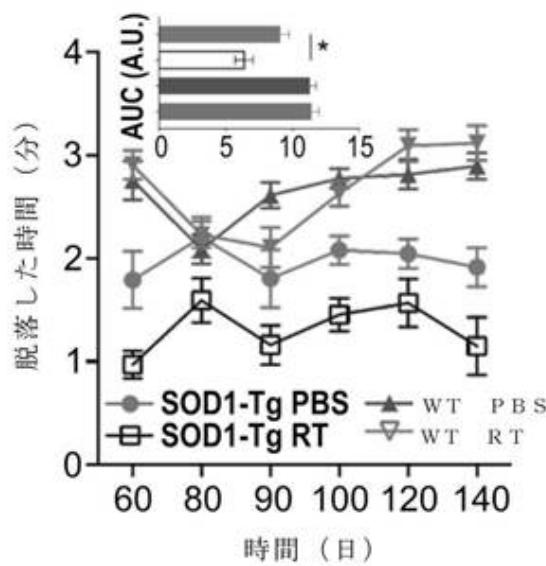


図 1 8 B

【図 1 8 C】

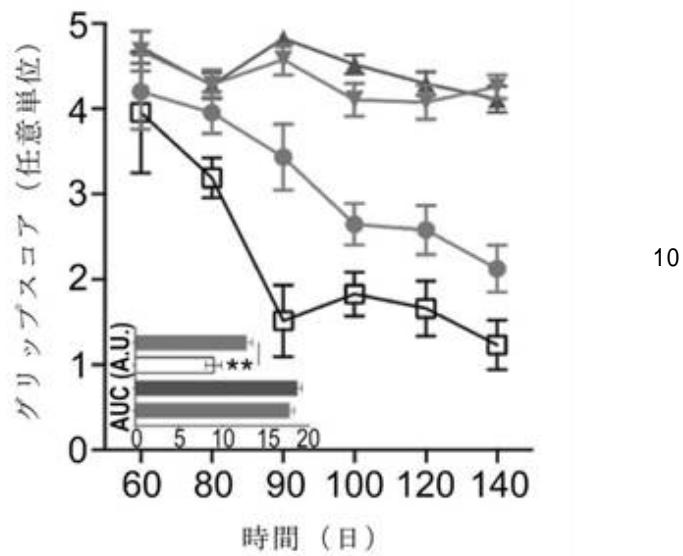


図 1 8 C

20

【図 1 8 D】

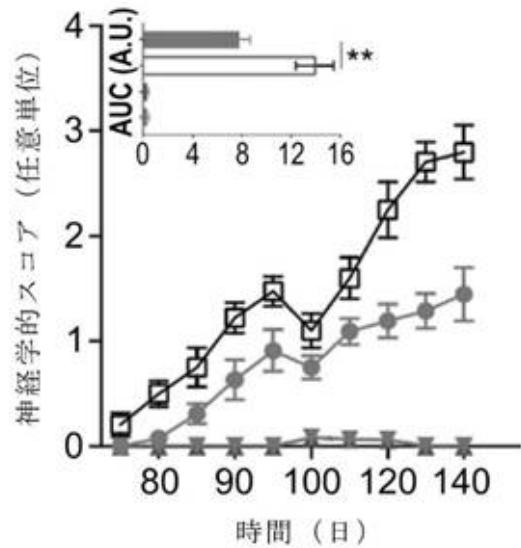


図 1 8 D

【図 1 8 E】

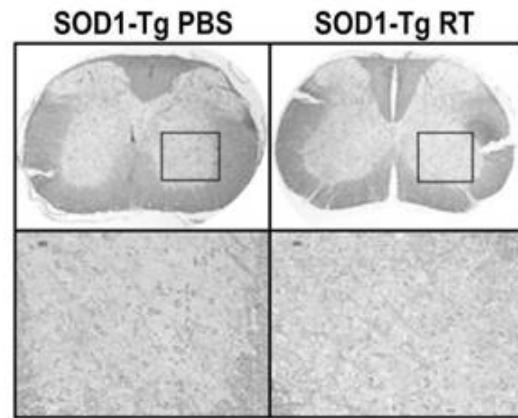


図 1 8 E

30

40

50

【図 18 F】

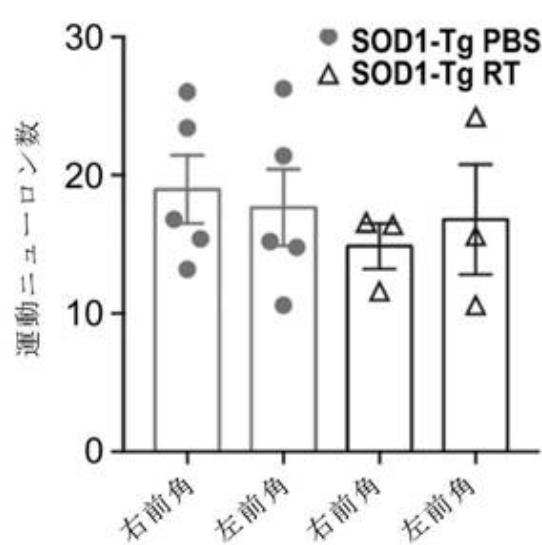


図 18 F

【図 18 G】

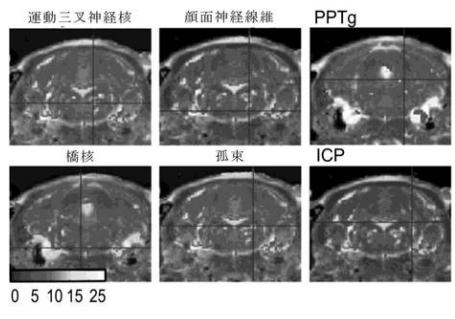


図 18 G

10

【図 18 H】

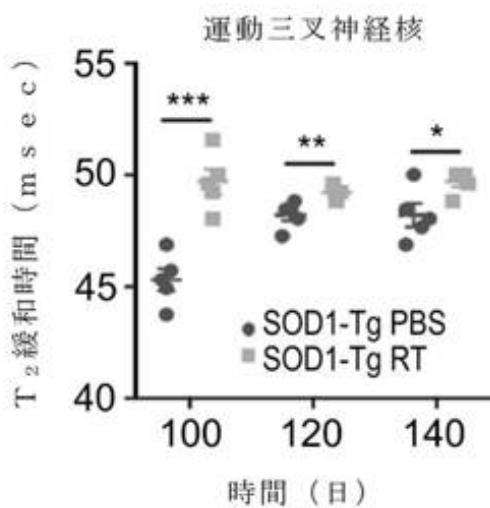


図 18 H

【図 18 I】

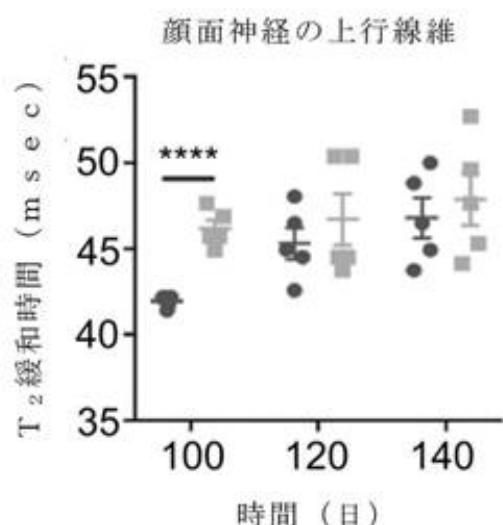


図 18 I

20

30

40

50

【図 18 J】

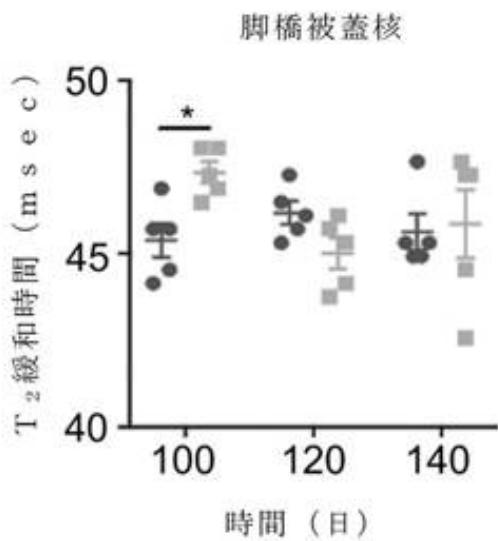


図 18 J

【図 18 K】

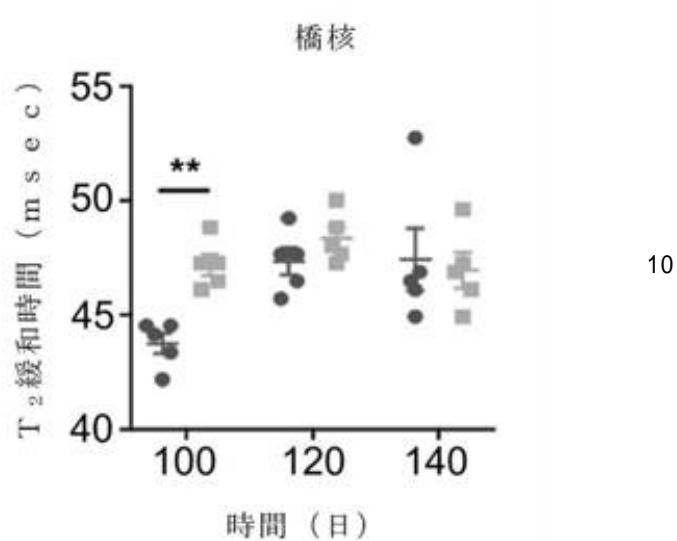


図 18 K

【図 18 L】

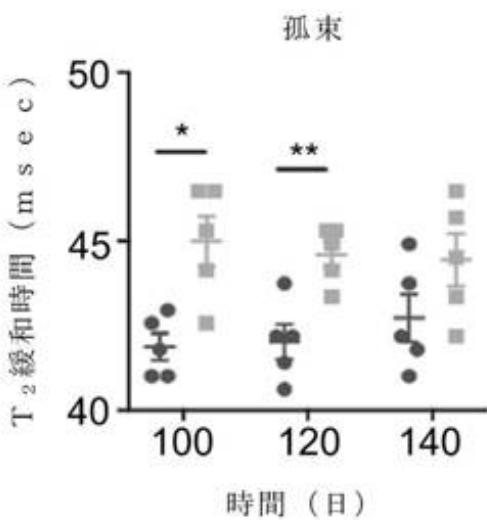


図 18 L

【図 18 M】

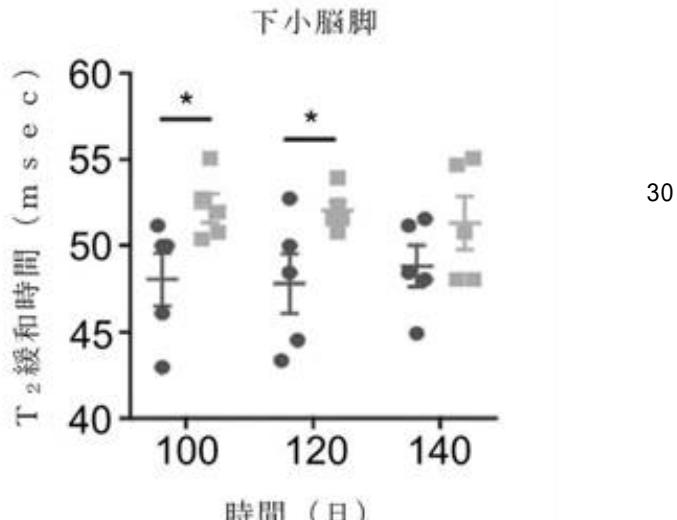


図 18 M

【図 1 9 A】

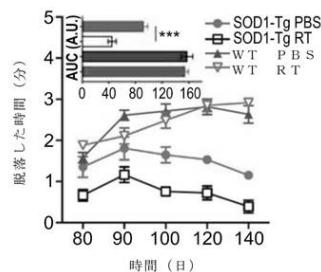


図 1 9 A

【図 1 9 B】

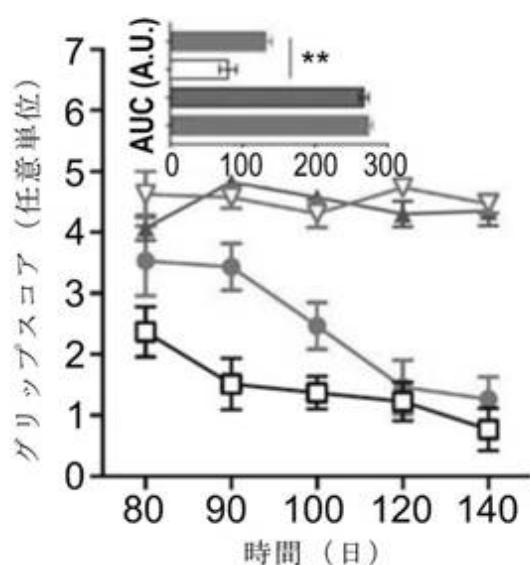


図 1 9 B

10

20

【図 1 9 C】

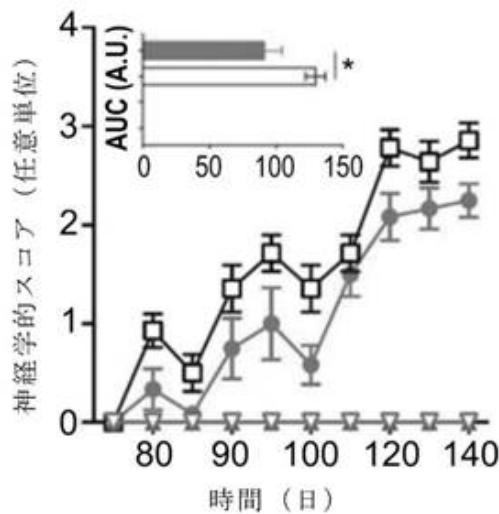


図 1 9 C

【図 1 9 D】

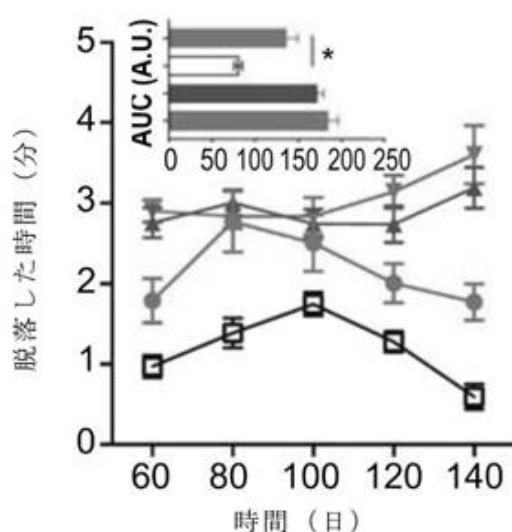


図 1 9 D

40

50

【図 1 9 E】

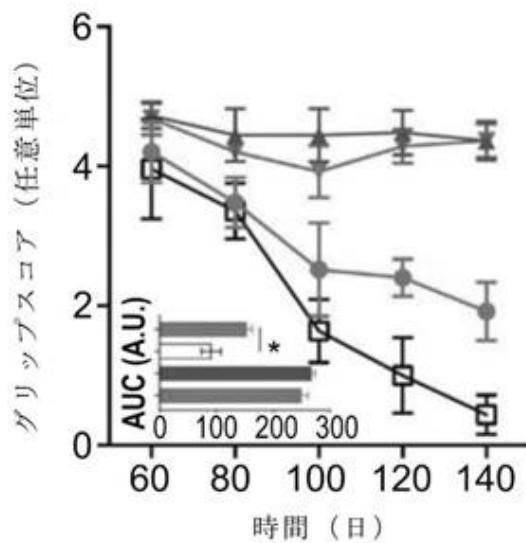


図 1 9 E

【図 1 9 F】

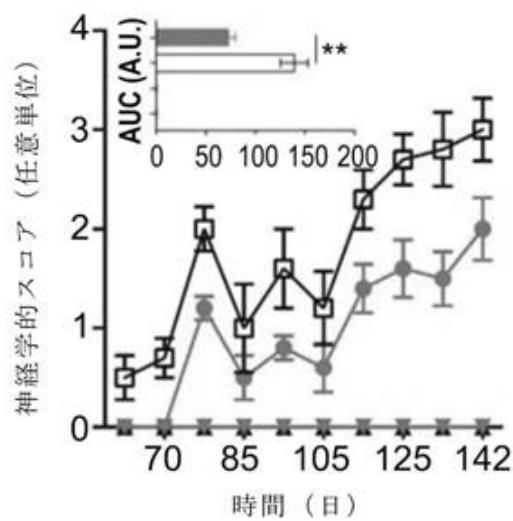


図 1 9 F

10

20

【図 1 9 G】

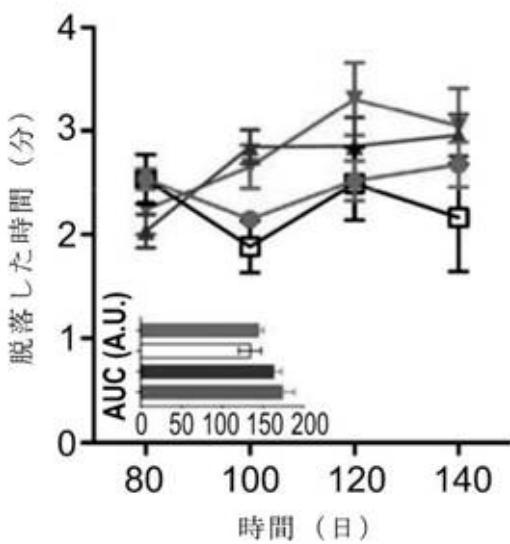


図 1 9 G

【図 1 9 H】

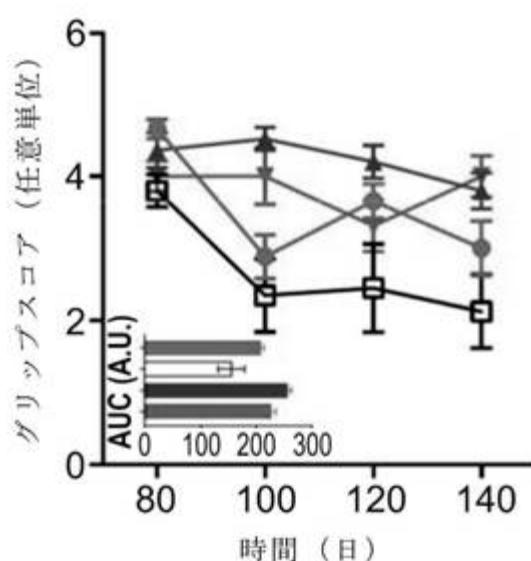


図 1 9 H

30

40

50

【図 19 I】

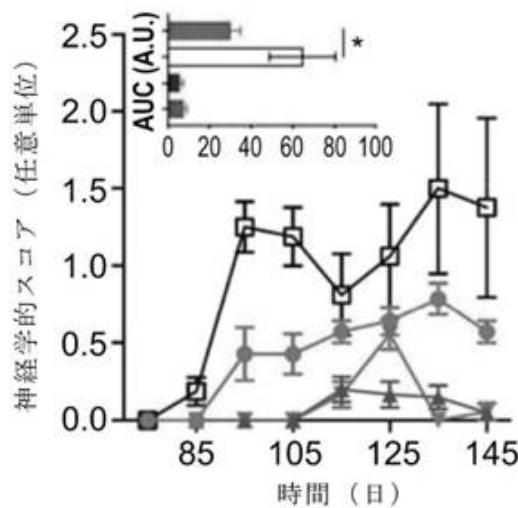


図 19 I

【図 20 A】

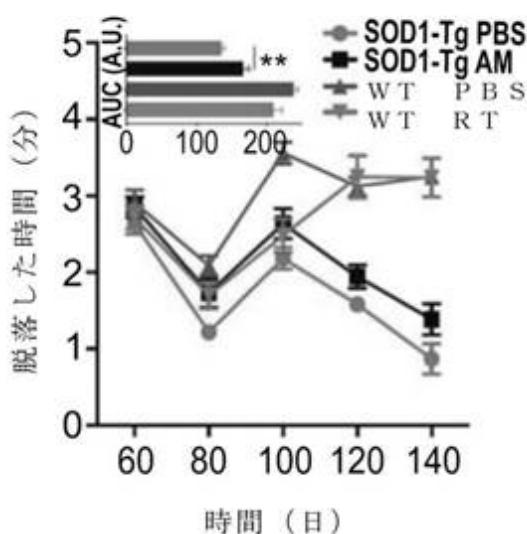


図 20 A

20

【図 20 B】

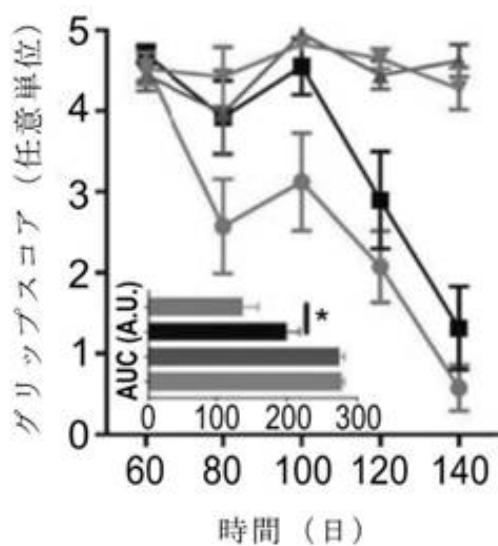


図 20 B

【図 20 C】

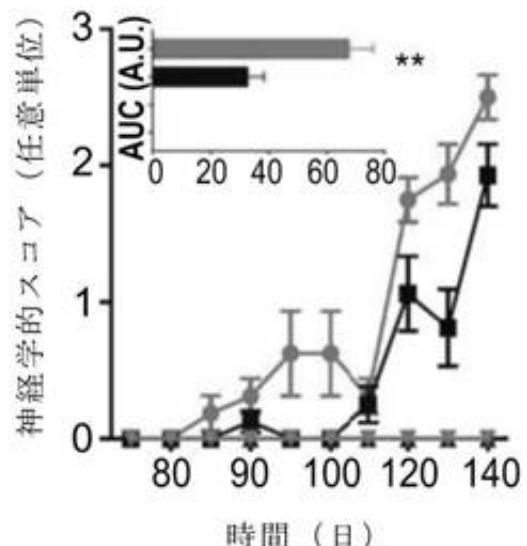


図 20 C

40

50

【図 20 D】

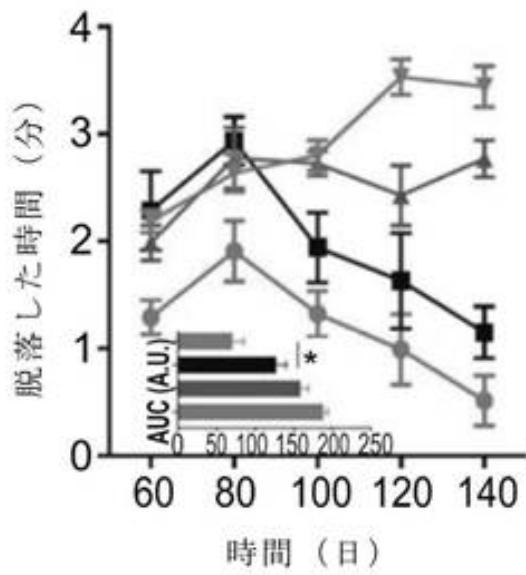


図 20 D

【図 20 E】

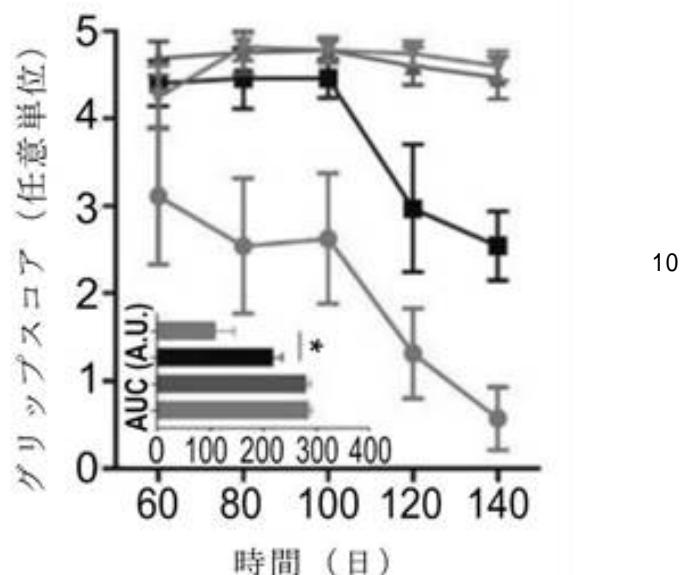


図 20 E

20

【図 20 F】

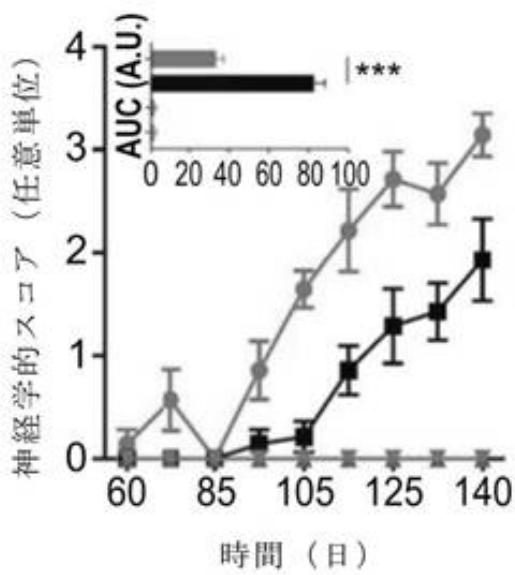


図 20 F

【図 20 G】

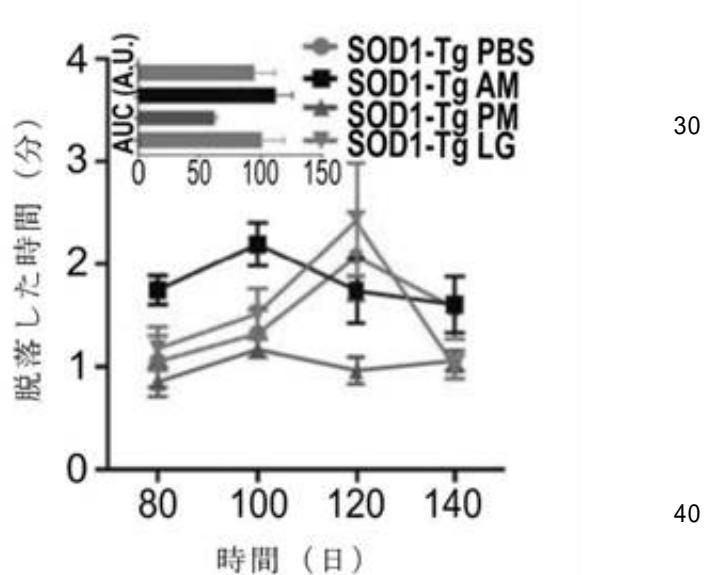


図 20 G

40

50

【図 20 H】

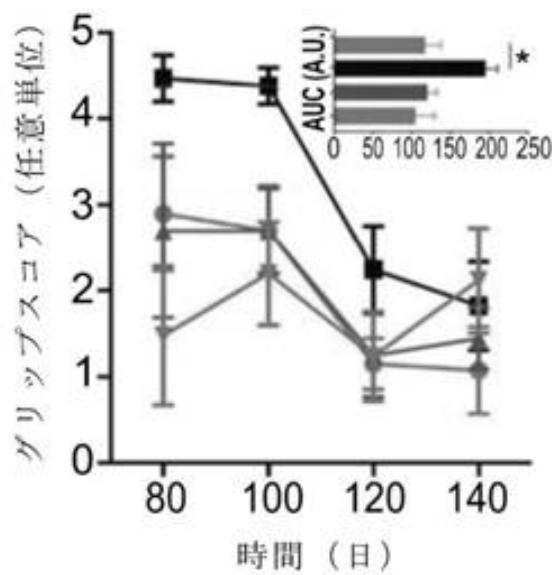


図 20 H

【図 20 I】

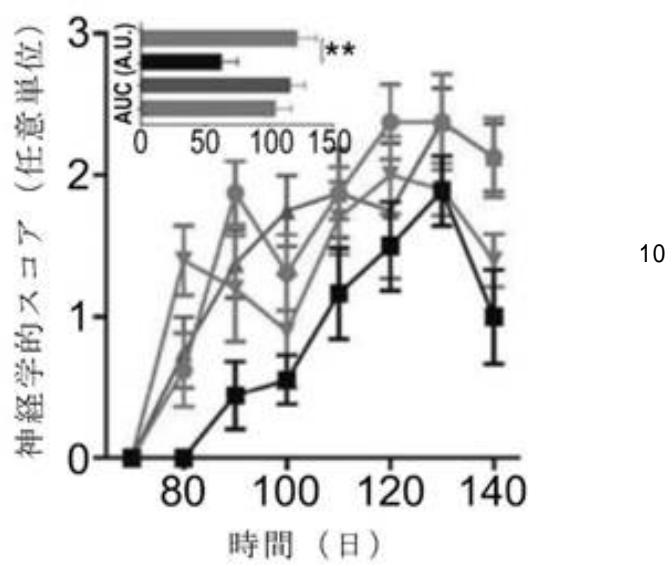


図 20 I

20

【図 20 J】

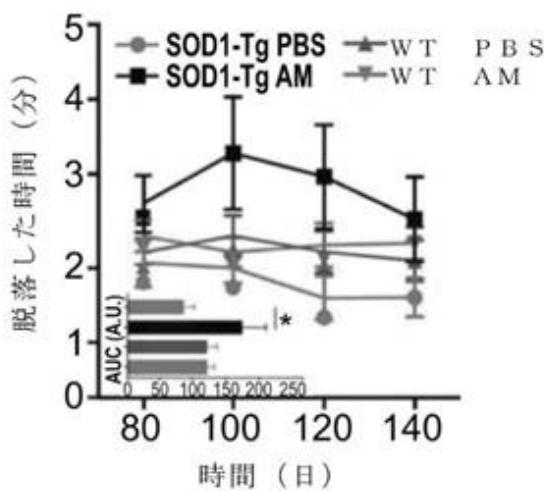


図 20 J

【図 20 K】

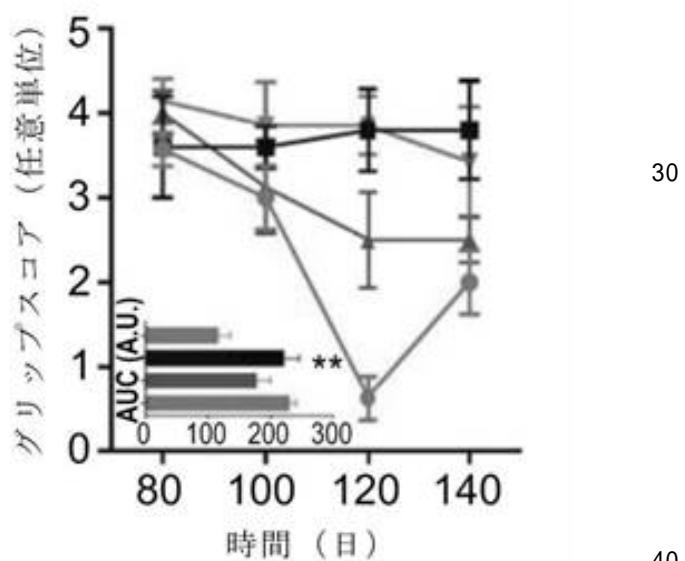


図 20 K

40

50

【図 2 0 L】

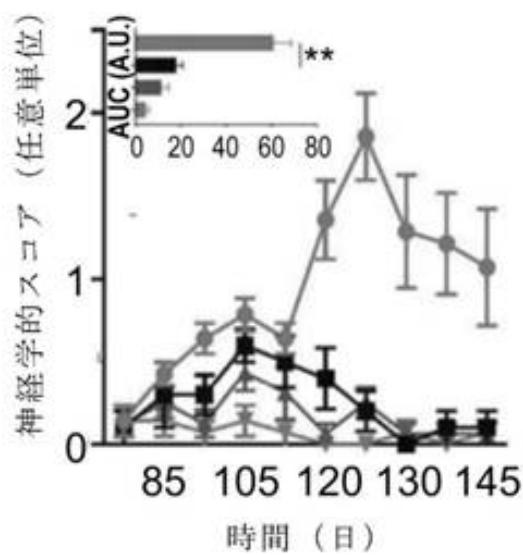


図 2 0 L

【図 2 0 M】

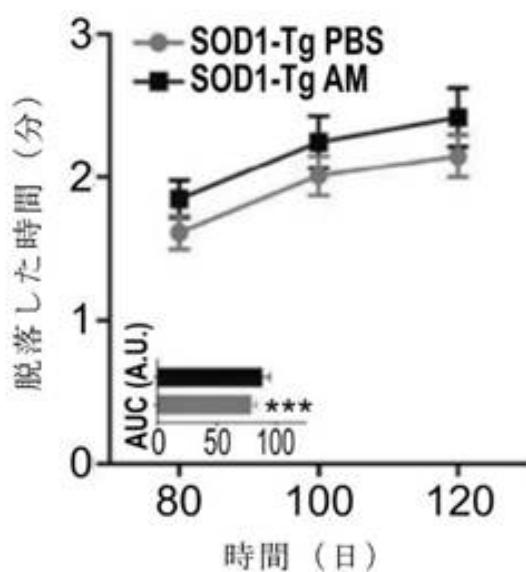


図 2 0 M

20

【図 2 0 N】

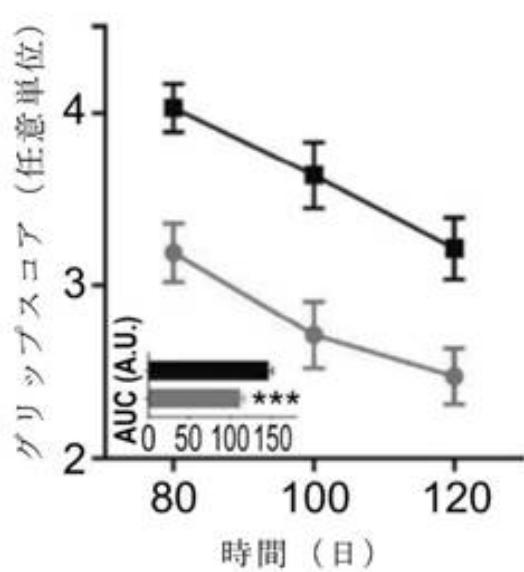


図 2 0 N

【図 2 0 O】

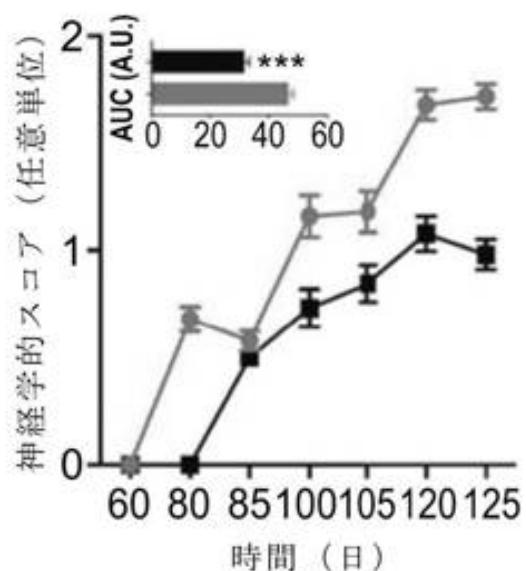


図 2 0 O

40

50

【図 2 1 A】

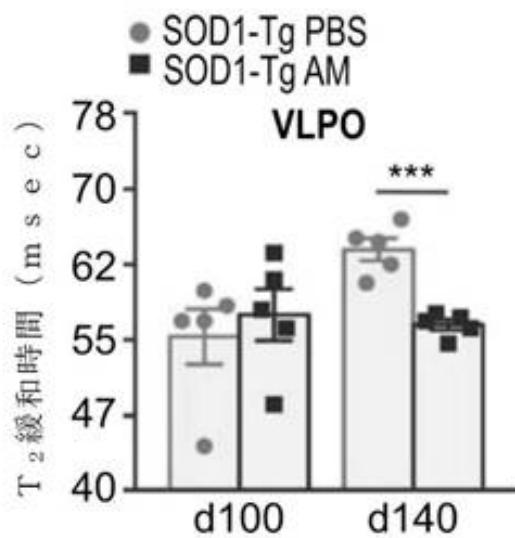


図 2 1 A

【図 2 1 B】

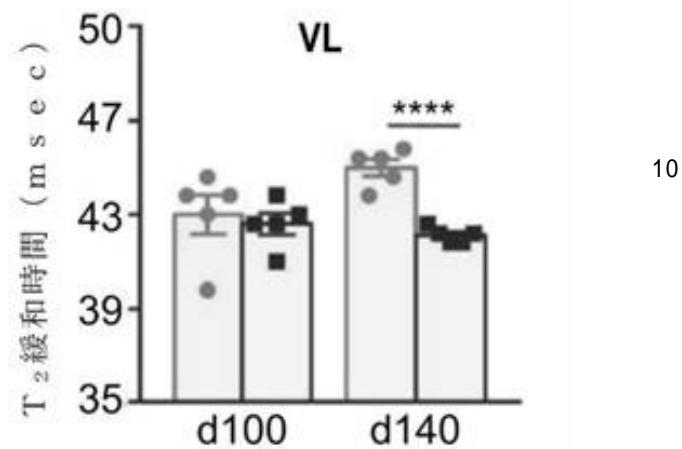


図 2 1 B

【図 2 1 C】

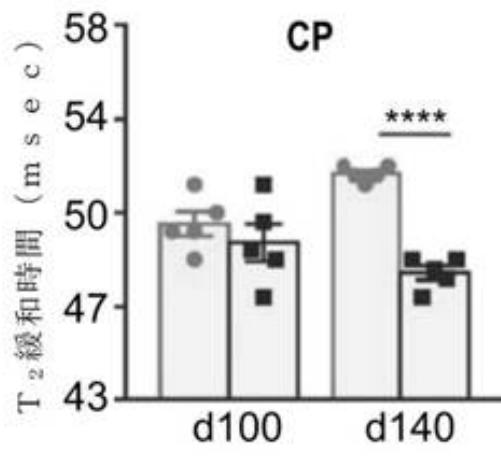


図 2 1 C

【図 2 1 D】

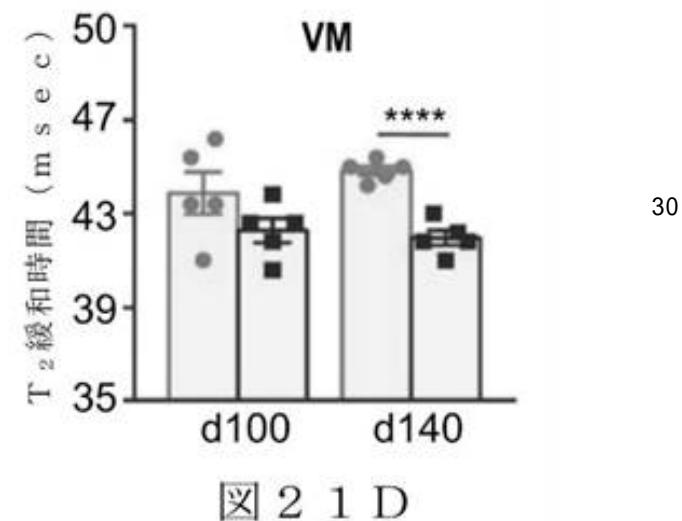


図 2 1 D

【図 2 1 E】

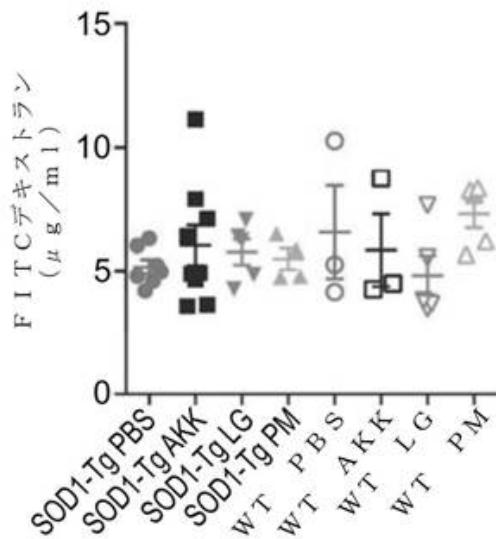


図 2 1 E

【図 2 1 F】

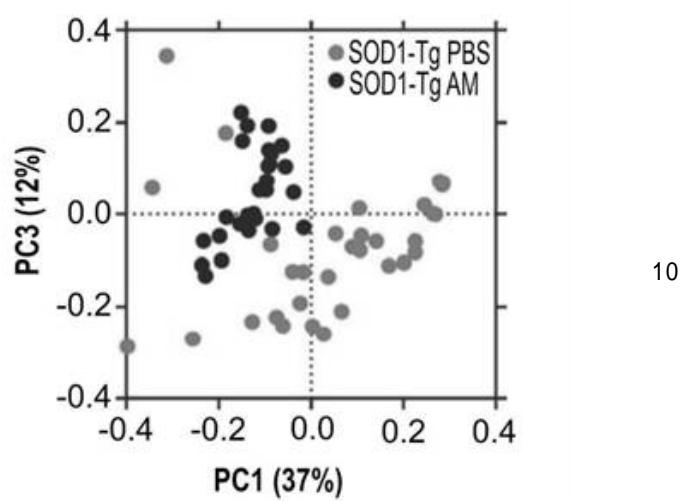


図 2 1 F

【図 2 1 G】

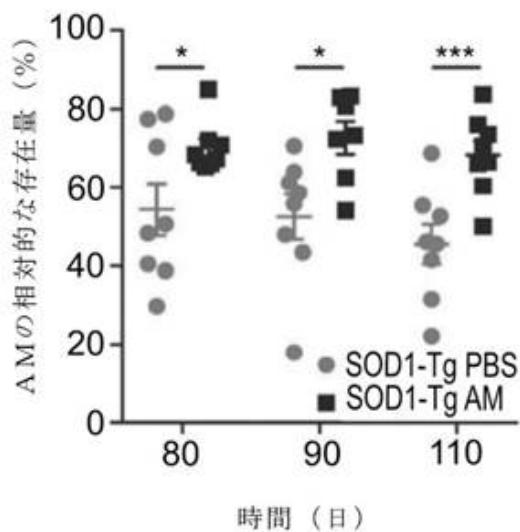


図 2 1 G

【図 2 1 H】

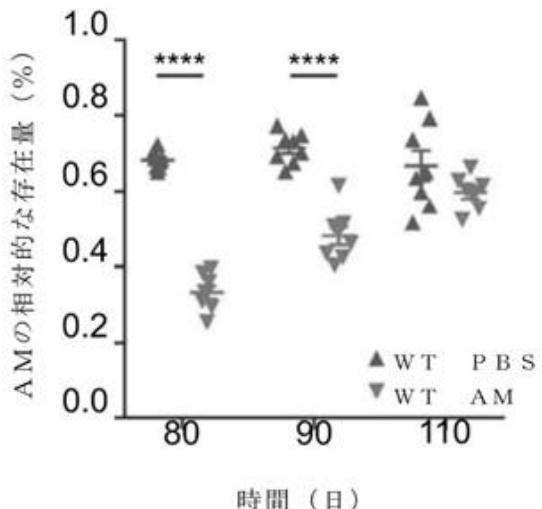
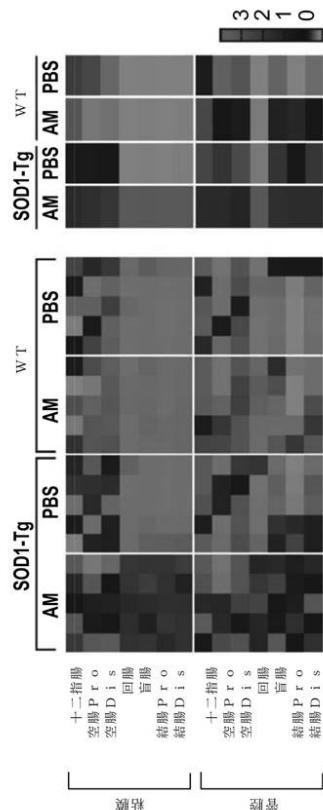


図 2 1 H

【図 2 1 I - J】

図 2 1 I
図 2 1 J

【図 2 1 K】

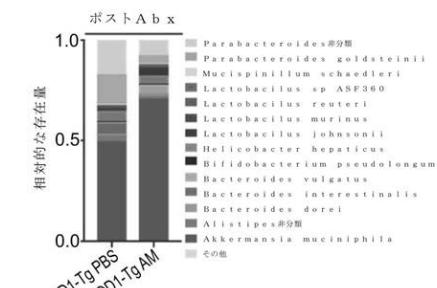


図 2 1 K

10

【図 2 1 L】

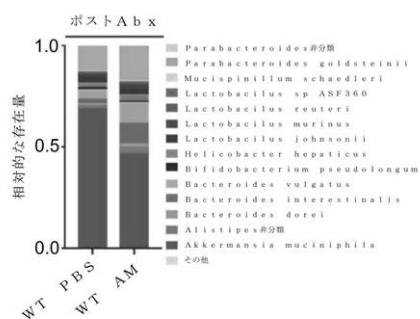


図 2 1 L

【図 2 2 A】

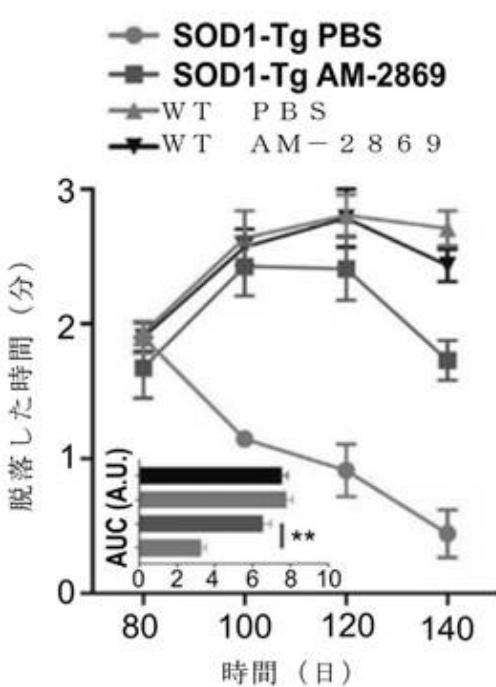


図 2 2 A

30

40

50

【図 2 2 B】

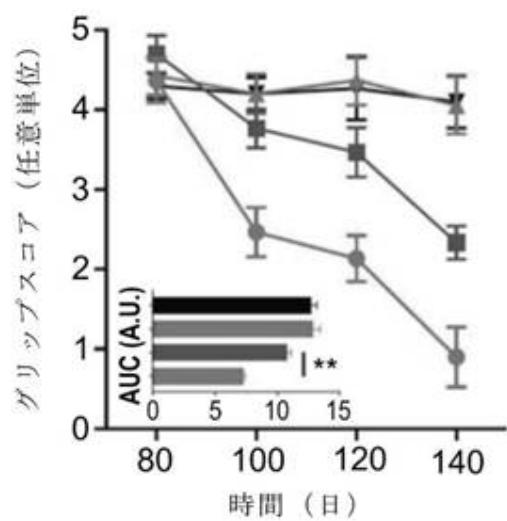


図 2 2 B

【図 2 2 C】

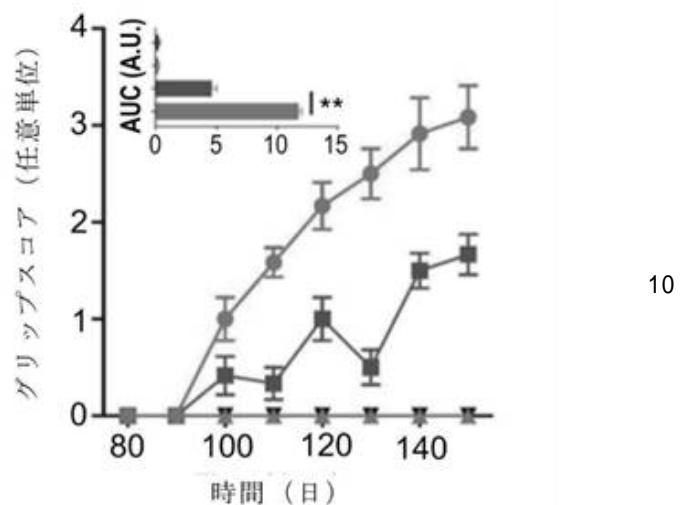


図 2 2 C

20

【図 2 3 A】

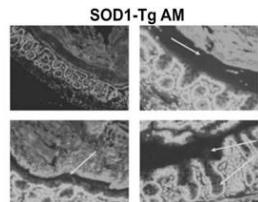


図 2 3 A

【図 2 3 B】

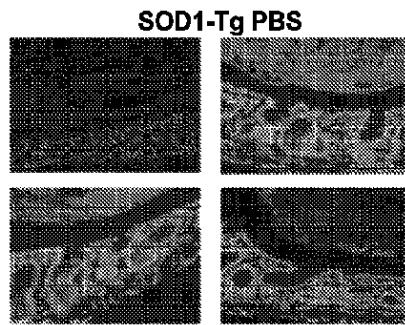


FIG. 23A

30

40

50

【図 2 3 B】

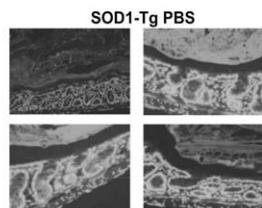


図 2 3 B

【図 2 3 E】

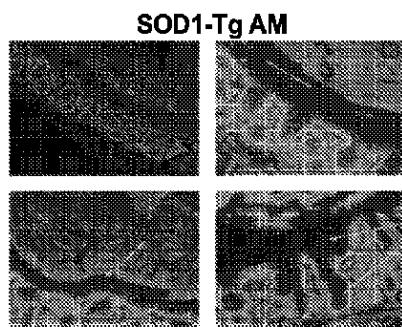
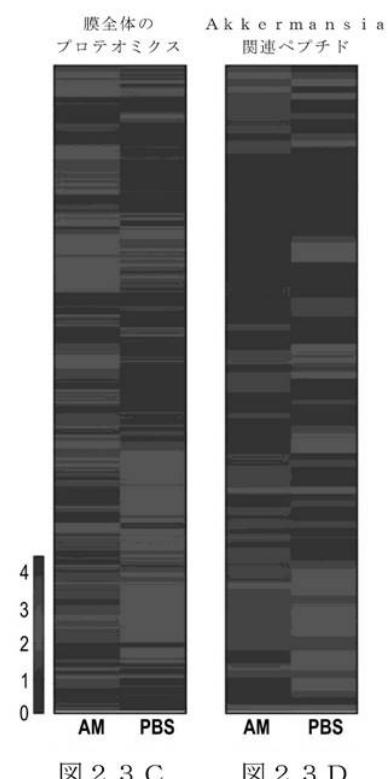


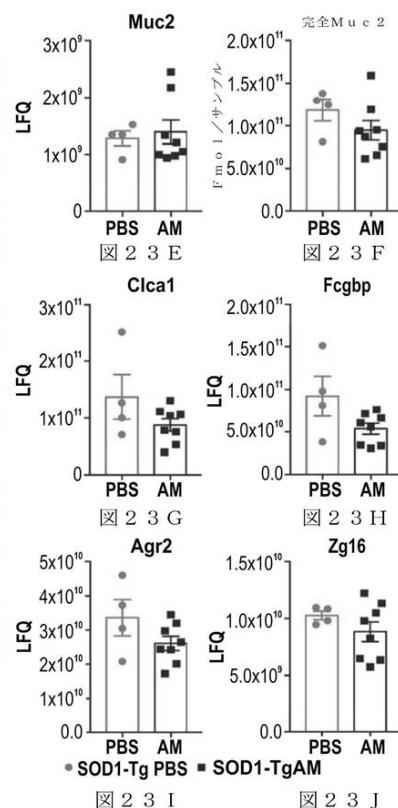
FIG. 23B

10

【図 2 3 C - D】



【図 2 3 E - J】



20

30

40

50

【図24A】

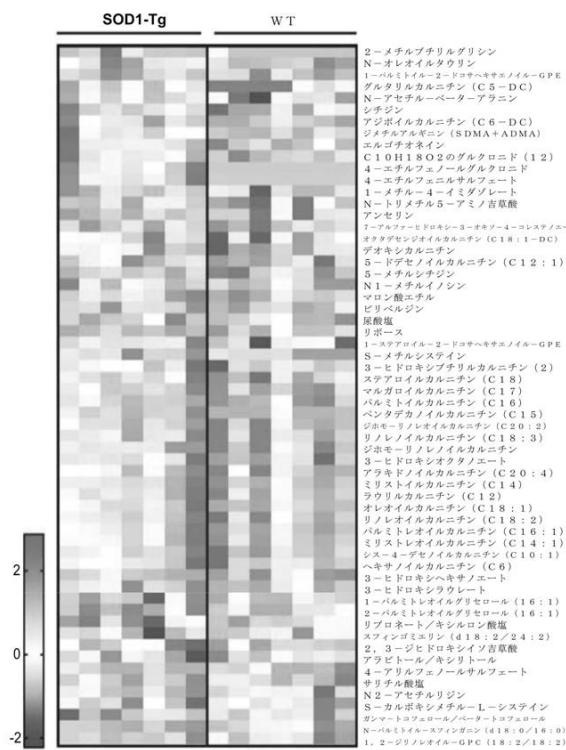


図24A

【 図 2 4 B 】

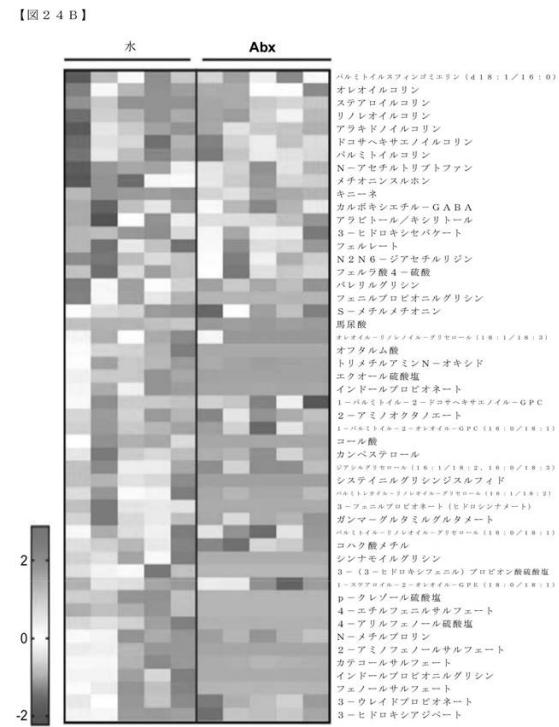


図 24 B

【図24C】

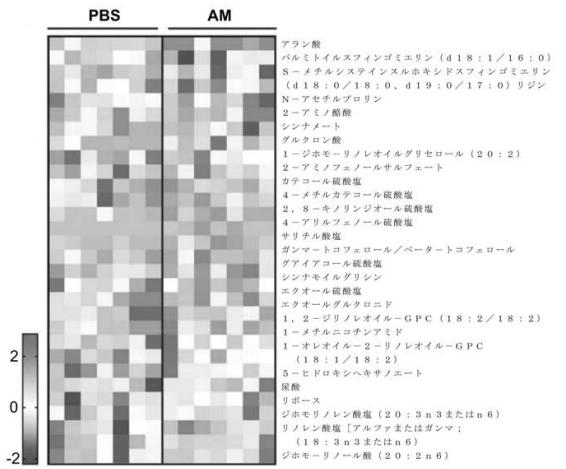


図24C

【図24D】

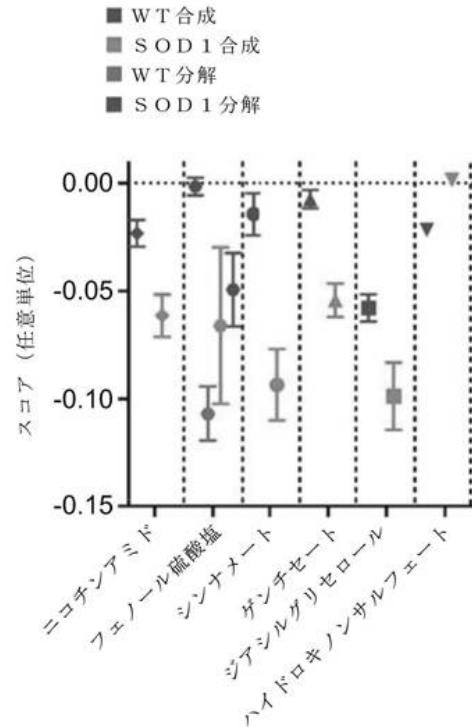


図24D

【図 2 4 E】

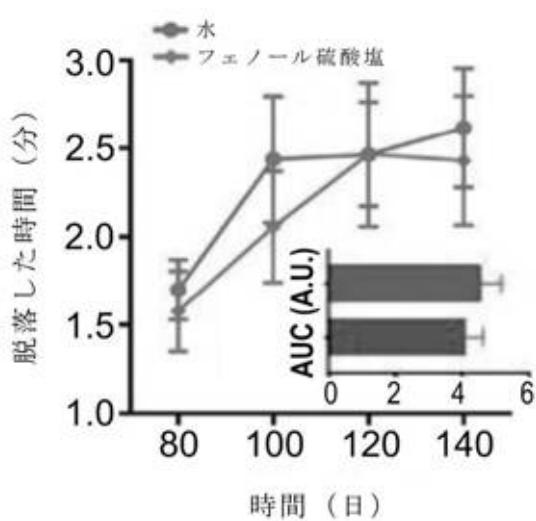


図 2 4 E

【図 2 4 F】

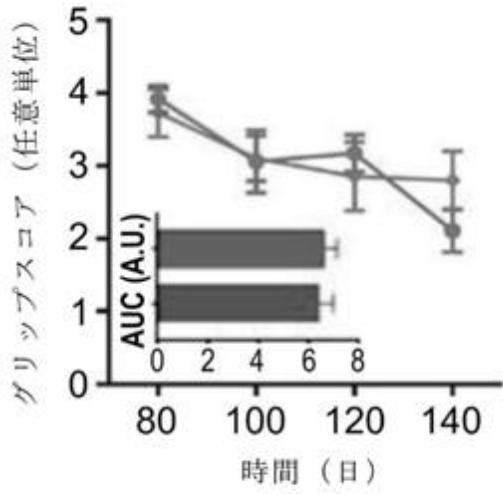


図 2 4 F

【図 2 4 G】

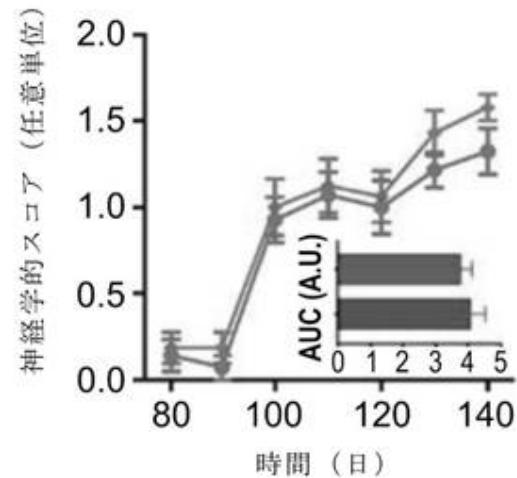


図 2 4 G

【図 2 5 A - B】

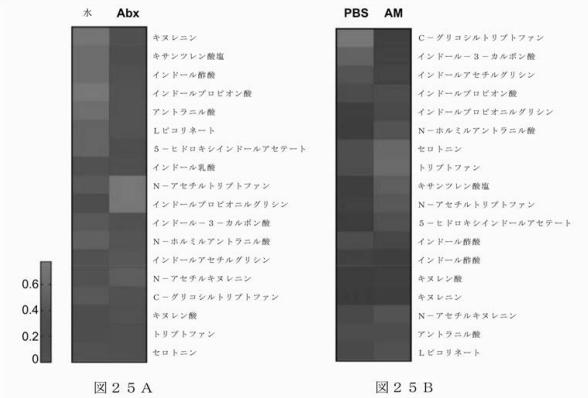


図 2 5 A

図 2 5 B

20

30

40

50

【図 2 6 A】

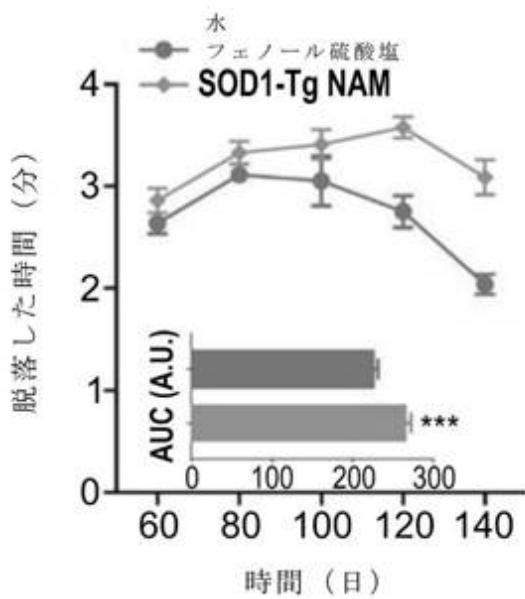


図 2 6 A

【図 2 6 B】

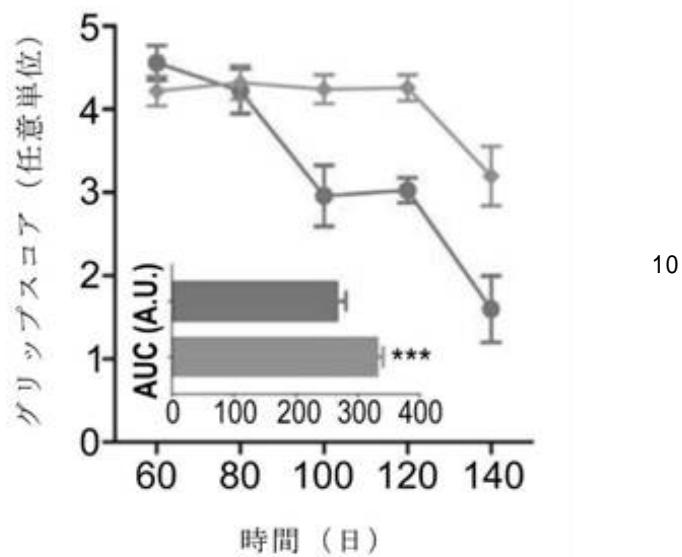


図 2 6 B

20

【図 2 6 C】

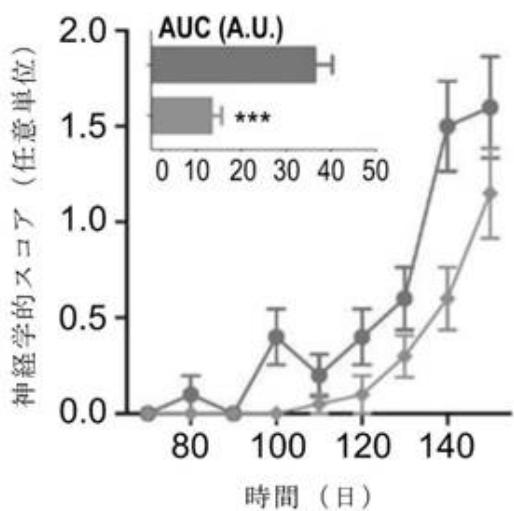


図 2 6 C

【図 2 6 D】

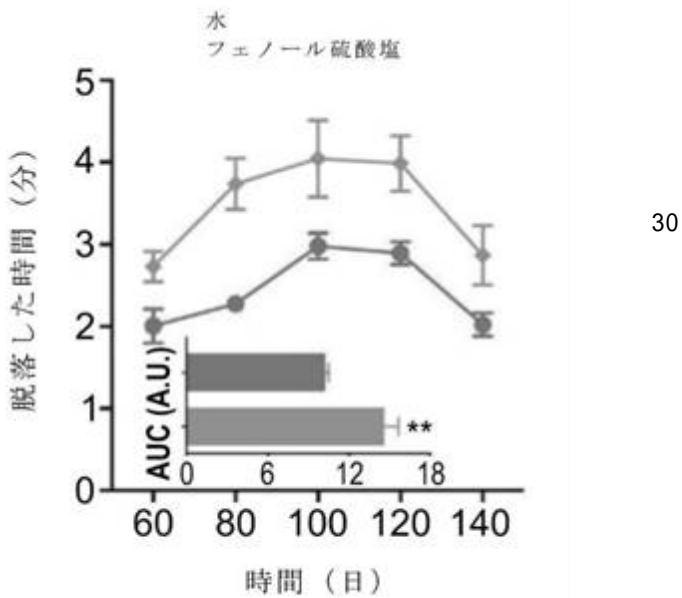


図 2 6 D

40

50

【図 2 6 E】

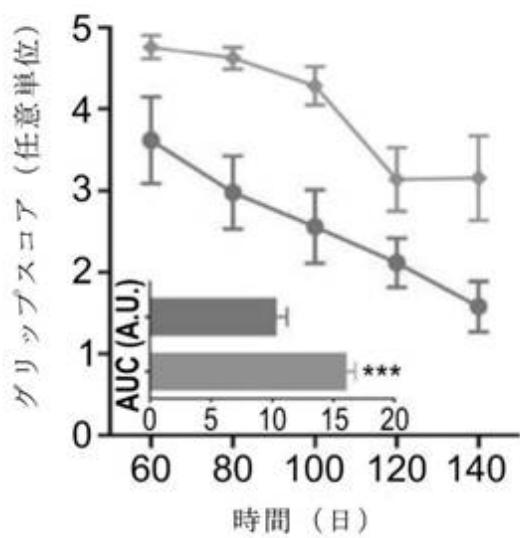


図 2 6 E

【図 2 6 F】

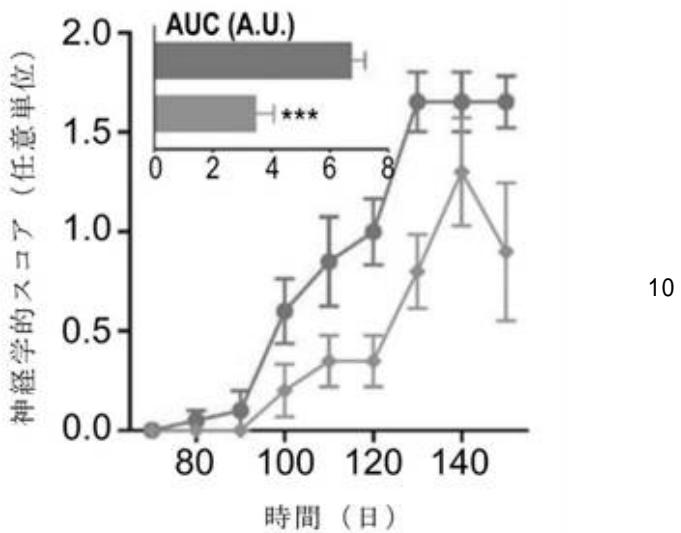


図 2 6 F

20

【図 2 6 G】

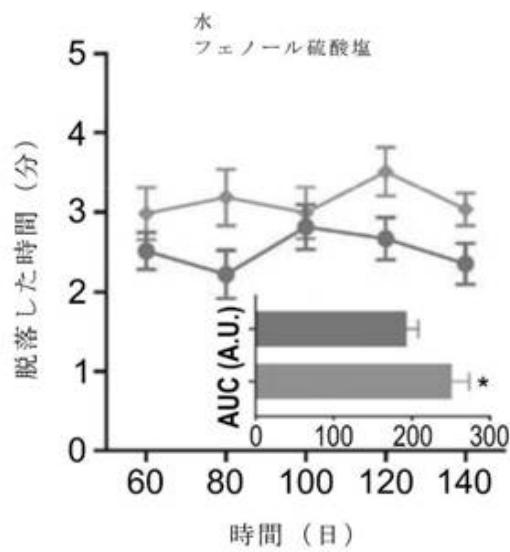


図 2 6 G

【図 2 6 H】

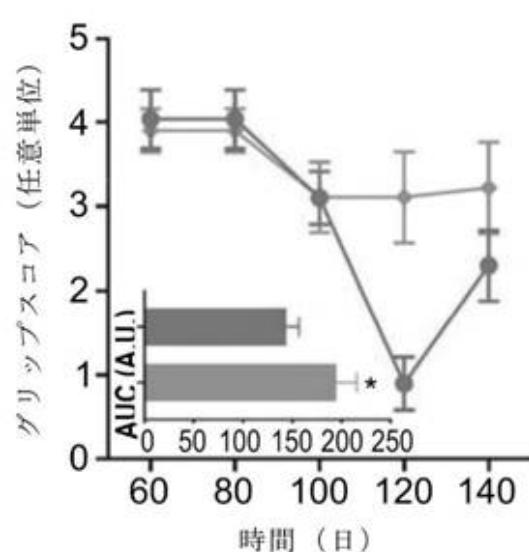


図 2 6 H

40

50

【図 2 6 I】

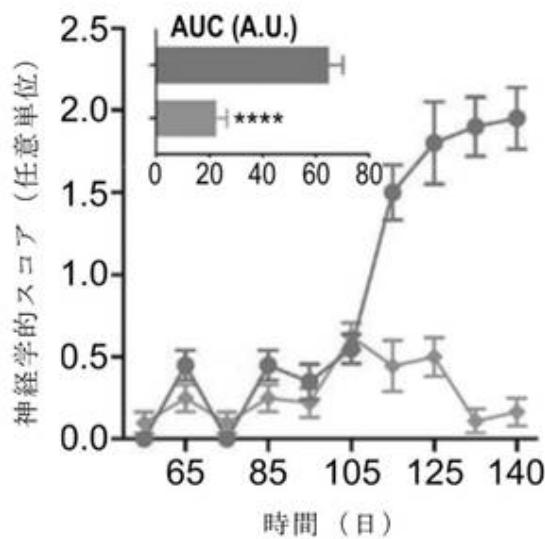


図 2 6 I

【図 2 7 A】

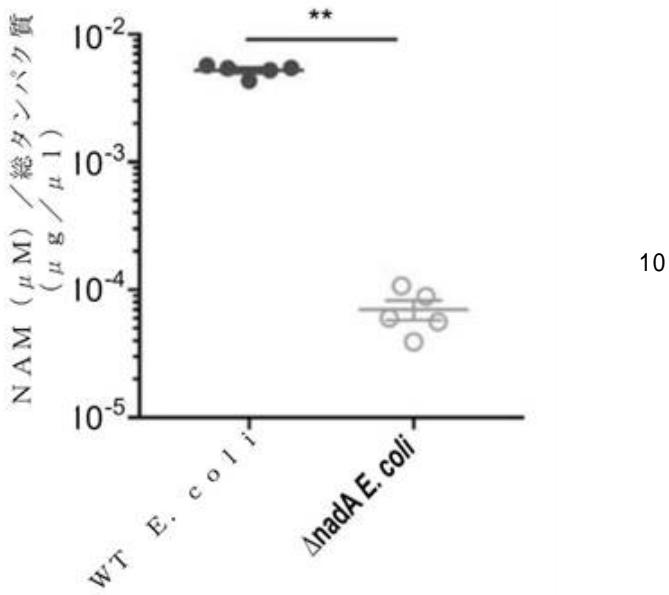


図 2 7 A

【図 2 7 B】

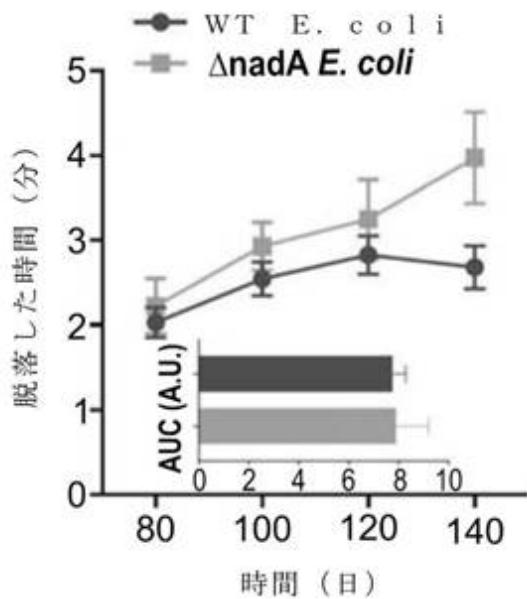


図 2 7 B

【図 2 7 C】

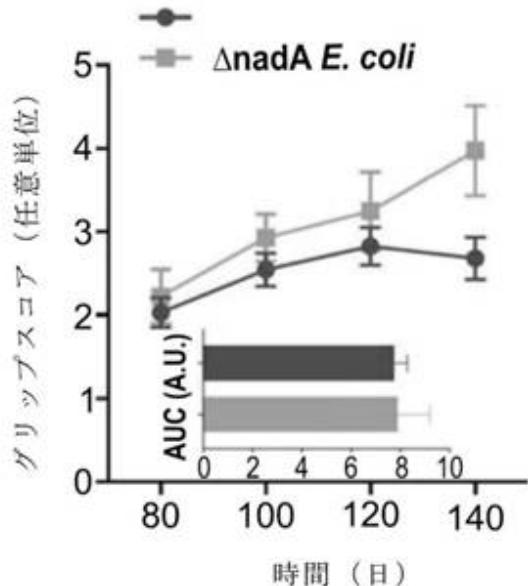


図 2 7 C

【図 28】

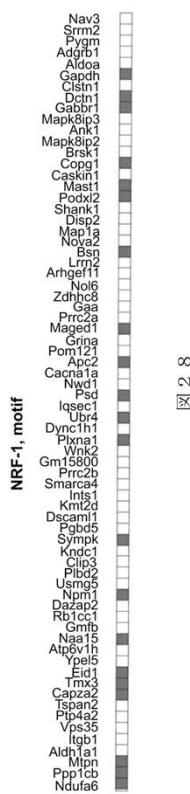


図 28

【図 29 A】

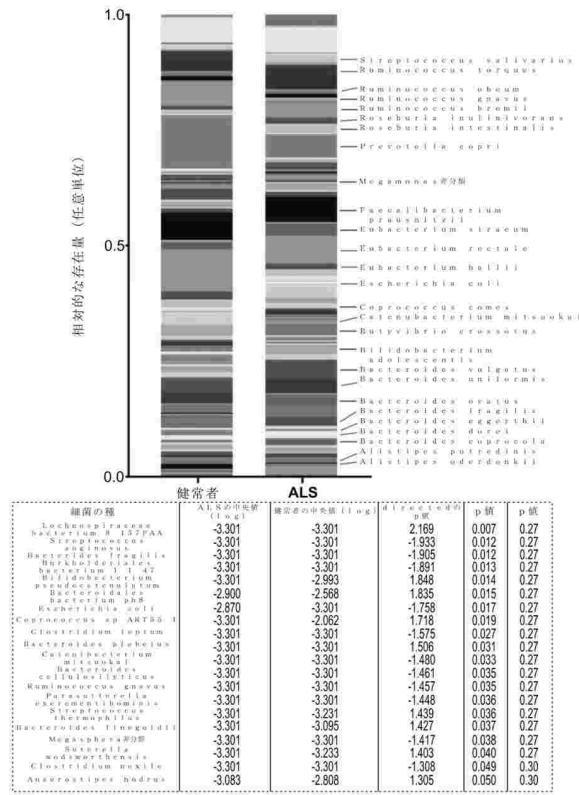


図 29 A

10

20

30

【図 29 B】

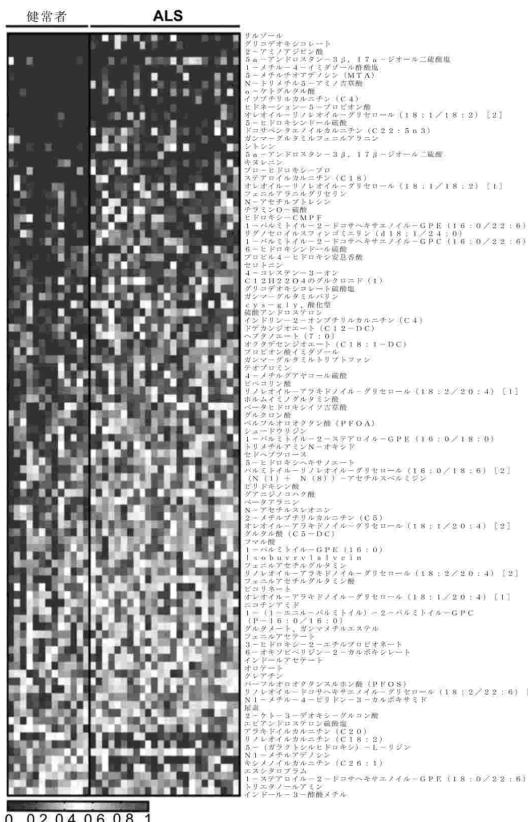


図 29 B

40

50

【配列表】

0007520820000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

イスラエル(IL)

(72)発明者 エリナヴ， エラン

イスラエル国 7680400 マツケレート バティア， ハゲフェン ストリート 16

(72)発明者 セガル， エラン

イスラエル国 4730168 ラマト - ハシャロン， ナックスホーン ストリート 40

審査官 梅田 隆志

(56)参考文献 国際公開第2017/060391 (WO, A1)

国際公開第2018/119048 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

A61K 35/00 - 35/768

A61P 1/00 - 43/00

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)

CAPplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)