

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6662775号
(P6662775)

(45) 発行日 令和2年3月11日 (2020.3.11)

(24) 登録日 令和2年2月17日 (2020.2.17)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 35/744	(2015.01)	A 6 1 K 35/744	Z N A
A 6 1 K 35/747	(2015.01)	A 6 1 K 35/747	
A 6 1 K 35/742	(2015.01)	A 6 1 K 35/742	
A 6 1 K 35/74	(2015.01)	A 6 1 K 35/74	A
A 6 1 K 39/39	(2006.01)	A 6 1 K 39/39	

請求項の数 8 (全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-533172 (P2016-533172)
(86) (22) 出願日	平成26年11月21日 (2014.11.21)
(65) 公表番号	特表2016-539119 (P2016-539119A)
(43) 公表日	平成28年12月15日 (2016.12.15)
(86) 国際出願番号	PCT/IB2014/066249
(87) 国際公開番号	W02015/075688
(87) 国際公開日	平成27年5月28日 (2015.5.28)
審査請求日	平成29年11月17日 (2017.11.17)
(31) 優先権主張番号	13306597.9
(32) 優先日	平成25年11月21日 (2013.11.21)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)
(31) 優先権主張番号	61/907,076
(32) 優先日	平成25年11月21日 (2013.11.21)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)

(73) 特許権者	508061930
	アンスティテュ ギュスタブ ルシ
	フランス国, エフ-94800 ビルジ
	フ, リュ カミュー デスラン 39
(74) 代理人	100099759
	弁理士 青木 篤
(74) 代理人	100123582
	弁理士 三橋 真二
(74) 代理人	100092624
	弁理士 鶴田 準一
(74) 代理人	100114018
	弁理士 南山 知広
(74) 代理人	100117019
	弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学療法に対する応答性のマーカーとしての微生物叢組成物、及び癌処置の有効性を改善するための微生物モジュレーター（プレ、プロ又はシンバイオティクス）の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌患者に投与されるシクロホスファミドでの抗腫瘍薬処置に対するアジュバントとしての使用のための、生きたエンテロコッカス・ヒラエ細菌を含むプロバイオティクス組成物。

【請求項 2】

ラクトバチルス・ジョンソニー、セグメント細菌（S F B）、ポルフィロモナス、バーンシエラ、ホールデマニア、及びその混合物から成る群から選択される細菌を更に含む、請求項 1 に記載の使用のための、請求項 1 に記載のプロバイオティクス組成物。

【請求項 3】

前記組成物がエンテロコッカス・ヒラエを含み、さらに、ポルフィロモナス、バーンシエラ、及びホールデマニアから成る群から選択される少なくとも 1 つの菌株を含む、請求項 1 に記載の使用のための、請求項 1 又は 2 に記載のプロバイオティクス組成物。

【請求項 4】

前記エンテロコッカス・ヒラエ菌株が、番号 I - 4815 として、2013 年 1 月 7 日に Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C N C M) に寄託された菌株である、請求項 1 に記載の使用のための、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のプロバイオティクス組成物。

【請求項 5】

前記プロバイオティクス組成物が経口投与のために処方される、請求項 1 に記載の使用

のための、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のプロバイオティクス組成物。

【請求項 6】

前記プロバイオティクス組成物が、処置を必要としている患者にシクロホスファミドでの抗腫瘍薬処置の投与後に投与される、請求項 1 に記載の使用のための、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のプロバイオティクス組成物。

【請求項 7】

前記患者が、前記プロバイオティクス組成物中に存在する種の低出現を伴う微生物叢失調を患っている、請求項 1 又は 6 に記載の使用のための、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のプロバイオティクス組成物。

【請求項 8】

請求項 1 又は 6 に記載の使用のための、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のプロバイオティクス組成物であって、当該プロバイオティクス組成物が、処置を必要としている患者に広域スペクトルの抗生物質の処置後に投与される、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は抗癌処置の分野に関する。特に、本発明は、癌処置の有効性における微生物叢の役割に関係し、そして、患者が癌処置の恩恵を受ける可能性が高いか判定する方法、並びに処置を必要としている患者における斯かる処置の有効性を改善するプロバイオティクスを提供する。

【背景技術】

【0002】

従来の癌処置は、患者の腫瘍性細胞を根絶するための化学療法、外科手術、ホルモン療法、及び / 又は放射線処置の組み合わせを伴う。癌化学療法は、複製細胞を殺滅する薬剤であって、できれば、その殺滅が、作用物質が患者の正常細胞を殺滅するより速い薬剤の使用に基づいている。外科手術は、腫瘍バルクを削減するのに使用されるが、しかし、一旦癌が転移すると、わずかな効果しかない。放射線は局部だけで有効である。これらのアプローチのすべてが、著しい欠点、及び感染症にかかりやすくなるなどの追加リスクをもたらす。

【0003】

癌療法への更なるアプローチは、腫瘍自体を標的とすることよりむしろ又はそれに加えて免疫系を標的とすること（「免疫療法」）である。

しかしながら、検出及び処置の進歩にもかかわらず、多くの治療プロトコールが生存率に対してわずかしか貢献しておらず、斯かる処置の費用対効果やクオリティオブライフに与える影響が問われている。最近、従来の化学療法ベース及び放射線療法ベースの癌処置の抗腫瘍効果に対する先天性及び順応性免疫系の重要な貢献が説明された（Kroemer et al., 2013; Zitvogel et al., 2008）。

【0004】

腸の共生細菌が哺乳類の免疫を大きく構築していることは、現在十分に確立されている（Hooper et al., 2012）。細菌生態系の不均衡を引き起こす腸微生物叢失調は、慢性炎症又は局所的な免疫抑制を促進することによって結腸発癌を助長する能力がある一部の細菌の過剰に通じる（Grivennikov et al., 2012; Wu et al., 2009）。しかしながら、非消化器癌への微生物叢失調の影響は未知である。

【0005】

抗癌化学療法剤は、抗生物質での処置を必要とする 2 つの合併症、粘膜炎（細菌トランスロケーションに関連している消耗性粘膜関門傷害）及び好中球減少症の原因となることが多く、そしてそれが、今度は微生物叢失調をもたらす可能性がある（Ubeda et al., 2010; van Vliet et al., 2010）。

そのため、（相乗効果でなくても）化学療法及び / 又は放射線や免疫などの処置の間の建設的な相互作用に有利に働く、改善された癌処置の開発に関して切迫した需要が存在す

10

20

30

40

50

る。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

これに関連して、発明者らは、シクロホスファミド（CTX）がマウスの小腸微生物叢の組成物を変更し、グラム⁺細菌のうちの選択種の二次リンパ器官への移行を引き起こすことを観察した。そこでは、これらの細菌が「病害性」Tヘルパー17（pTh17）細胞と免疫記憶Th1免疫応答の一部の産生を刺激する。発明者らはまた、抗生物質で処置してグラム⁺細菌を殺滅した無菌マウス又は宿主が、pTh17細胞が養子移植されない限り、低下したpTh17応答及びCTXに対する相対化学療法抵抗性を示すことを実証した。そのうえ、微生物叢失調は、他の抗癌化学療法剤（アントラサイクリン系やオキサリプラチンなど）の活性を妨げた。これらの結果は、抗癌性免疫応答を構築する際の腸微生物叢の決定的役割を明らかにする。これらの結果、並びに腸微生物叢と抗腫瘍薬処置との相互作用に関連する他の結果は、最近のいくつかの刊行物で再検討されている（Dzutsev et al., 2014; Viaud et al., Cancer Res., 2014; Viaud et al., Cell Death Differ., 2014 and Viaud et al., Oncoimmunology, 2014）。

10

【0007】

本発明は、癌患者に投与される抗腫瘍薬処置へのアジュバントとして使用できるプロバイオティクス組成物を提供し、ここで、前記プロバイオティクス組成物は、エンテロコッカス・ヒラエ（*Enterococcus hirae*）、ラクトバチルス・ジョンソニー（*Lactobacillus johnsonii*）、セグメント細菌（SFB）、ポルフィロモナス（*Porphyromonas*）、バーンシエラ（*Barnesiella*）、ホールデマニア（*Holdemania*）及びその混合物の中から選択される細菌を含む。

20

本発明の別の態様は、癌を患っている患者を処置するための、個人に投与すると前記個人の腸微生物叢のフィルミクテス（*firmicutes*）/バクテロイデテス（*bacteroidetes*）比を低下させる、SFB及び/又はポルフィロモナス科（*Porphyromonadaceae*）を特に増大させる、及び/又はクロストリジウム属第IV群を減少させる化学療法薬と抗生物質組成物の組み合わせの使用である。

【0008】

本発明はまた、前記患者に投与した化学療法薬の抗癌効果を増強するように患者の腸微生物叢を調節するための先に記載したものなどの抗生物質組成物の使用に関する。

30

エンテロコッカス・ヒラエ、ラクトバチルス・ジョンソニー、エンテロコッカス・フェカリス（*Enterococcus faecalis*）、セグメント細菌（SFB）、ポルフィロモナス、バーンシエラ、ホールデマニア、及びその混合物から成る群から選択される細菌の断片を含む免疫原性組成物、並びに癌患者に投与される抗腫瘍薬処置へのアジュバントとしてその使用もまた本発明の一部である。

本発明は更に、細胞組成物、及び化学療法薬と組み合わせた養子細胞移植におけるその利用に係る。

【0009】

第一の細胞組成物は、先に記載のプロバイオティクス組成物又は免疫原性組成物で生体外においてパルスされた抗原提示細胞（APC）を含み、及び第二の細胞組成物は、癌患者由来のT細胞を先に規定した第一の細胞組成物と生体外で接触させるプロセスによって得られた免疫記憶T細胞を含む。

40

本発明はまた、化学療法に対して優れた応答者である可能性が高い患者を同定するインビトロにおける方法であって、前記患者でTLR4、NOD1、及びNOD2の機能性を測定することを含み、ここで、前記患者が機能的なTLR4及び/又はNOD1及び/又はNOD2を欠いている場合、該患者が化学療法に対する優れた応答者として同定される方法を提供する。

【0010】

本発明はまた、インビトロにおける、癌患者が抗腫瘍薬処置の恩恵を受けるかどうか決

50

定する方法であって、以下のステップ：

(i) 例えば、十二指腸又は回腸粘膜の生検検体、又は患者からの糞便サンプルから得た、前記患者からの適切な生物学的サンプルから癌処置の具体的状況の中で「好ましくない」細菌、例えば、前記患者の腸微生物叢の種パラバクテロイデス・ディスタノニス (*Parabacteroides distasonis*) 及びフェカリバクテリウム・ブラウスニッツイー (*Faecalibacterium prausnitzii*)、並びに属ゲミガー (*Gemmiger*)、アリスチペス (*Alistipes*) 及びクロストリジウム属クラスタ I V を含む又はそれらから成る群由来の細菌、の相対量を測定し；

(i i) 腸微生物叢失調の存在又は不存在を決定すること、
を含み、ここで、「好ましくない」細菌の過剰発現を伴った腸微生物叢失調が、該患者が抗腫瘍薬処置に対する優れた応答者でないことを示す、方法を提供する。

10

【 0 0 1 1 】

本発明はまた、インビトロにおける、癌患者に関して抗腫瘍薬処置を続けるべきか又は中止されるべきか決定する方法であって、以下のステップ：

(i) 前記患者からの生物学的サンプル、例えば、前記抗腫瘍薬処置の開始から 3 ~ 9 週間、好ましくは 6 ~ 9 週間後に入手した血液サンプルなどから、少なくとも 1 つの片利共生種の細菌に対する、例えば *L* . ジョンソニー、*E* . ヒラエ、及び / 又は *E* . フェカリスに対する免疫記憶 C D 4 ⁺ T 細胞応答を分析し；

(i i) C D 4 ⁺ T 細胞応答を分析するそれぞれの片利共生種について、応答を以下のカテゴリ：

20

- 免疫記憶 C D 4 ⁺ T 細胞応答なし；
- T h 1 0 表現型の免疫記憶応答；
- T h 1 表現型の免疫記憶応答、

のうちの 1 つに分類することを含み、ここで、T h 1 表現型の免疫記憶応答が少なくとも 1 つの片利共生種に関して観察される場合、該抗腫瘍薬処置が続けられ、そして、斯かる応答の不存在では、該抗腫瘍薬処置が中止される、方法を提供する。

【 0 0 1 2 】

応答の分類は、例えば、生体外における再刺激アッセイにおいて処置前後のサイトカイン分泌を比較することによって行われる。

本発明はまた、インビトロにおける、患者に投与されたネオアジュバント抗腫瘍薬処置の生物学的効果を決定する方法であって、以下のステップ：

30

(i) 例えば、患者由来の十二指腸又は回腸粘膜の生検検体から得られた、前記患者由来の適切な生物学的サンプルから、前記微生物叢中の、ラクトバチルス及びビフィドバクテリウム属を含めた第一群由来の細菌の相対量を測定し、

(i i) 同じ生物学的サンプルから、前記腸微生物叢中の、パラバクテロイデス・ディスタノニス、フェカリバクテリウム・ブラウスニッツイー、ゲミガー、アリスチペス及びクロストリジウム属クラスタ I V を含めた第二群由来の細菌の相対量を測定し；

(i i i) 第一群由来の細菌の存在量と第二群由来の細菌の存在量の間の比を計算すること、

を含み、ここで、前記比が予定された閾値を超えている場合、結果は、ネオアジュバント抗腫瘍薬処置が T - b e t / T h 1 局所的及び全身的免疫応答を引き起こしたことを示す方法に係る。

40

【 0 0 1 3 】

本発明の別の目的は、T - b e t / T h 1 局所的及び全身的免疫応答を誘発するために抗悪性腫瘍薬と組み合わせて使用するための、ラクトバチルス・ジョンソニー (特に菌株 C N C M 1 - 4 8 2 3) 及びエンテロコッカス・ヒラエ (特に菌株 C N C M 1 - 4 8 1 5) 及びエンテロコッカス・フェカリスから成る群から選択されるプロバイオティクス菌株、並びにそれを含んでいる組成物である。

【 0 0 1 4 】

本発明はまた、癌を処置するための抗腫瘍薬処置と組み合わせて、前記癌患者において

50

、IL-1、IL-6、及びIL-23の混合物の存在下で未感作CD4⁺T細胞を刺激することによって癌患者から得られた細胞を養子細胞移植することにも関係する。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1A】図1：シクロホスファミドは腸粘膜構造を破壊する。(A~B)．C57BL/6未処置マウスにおけるNaCl(Co)、CTX又はドキシソルピシン(Doxo)処置48h後の小腸上皮のヘマトキシリン-エオシン染色(A)。示した炎症病巣の数/mm(B、左のパネル、Aにくさび形で示した)、水腫を反映する粘膜固有層の厚さ(B、中央パネル、Aに#で示した)及び低下した絨毛の長さ(B、右のパネル、Aにくさび形で示した)を、CTX又はDoxo処置マウス由来の5個の回腸で100個の絨毛/回腸について評価された。

10

【図1B】図1：シクロホスファミドは腸粘膜構造を破壊する。(A~B)．C57BL/6未処置マウスにおけるNaCl(Co)、CTX又はドキシソルピシン(Doxo)処置48h後の小腸上皮のヘマトキシリン-エオシン染色(A)。示した炎症病巣の数/mm(B、左のパネル、Aにくさび形で示した)、水腫を反映する粘膜固有層の厚さ(B、中央パネル、Aに#で示した)及び低下した絨毛の長さ(B、右のパネル、Aにくさび形で示した)を、CTX又はDoxo処置マウス由来の5個の回腸で100個の絨毛/回腸について評価された。

【図1C】(C)．典型的なムチン含有杯細胞を含んでいる回腸絨毛の代表的な顕微写真を、ビヒクル及びCTX又はDoxoで処置したマウスにおいて示す(左のパネル)。杯細胞の数/絨毛を、両化学療法剤について右のパネル内で数えた。

20

【図1D】(D)．パネート細胞の特異染色が2つの代表的な免疫蛍光法顕微写真に示されている(D、左のパネル)。パネート細胞の定量化を、24~48時間にNaCl(Co)又はCTXで処置されたマウスから採取した6個の回腸におけるリゾチーム陽性クラスタの平均面積を計測することによって実施した。

【図1E】(E)．18時間にCTXで処置されたマウスからの十二指腸及び回腸粘膜固有層細胞におけるリゾチームM及びRegIII γ 転写レベルの定量的PCR(qPCR)分析。3つの独立した実験からの連結した3~4匹のマウス/群の正規化されたCTの平均 \pm SEM。

【図1F】(F)．2用量のCTX後18時間における4kDaのフルオレセインイソチオシアネート(FITC)-デキストラン血漿蓄積を計測するインビボにおける腸透過性アッセイ。4つの独立した実験からのすべてのデータを示すグラフであって、それぞれのドットが1匹のマウスを表す(n=13~15)。データをt-検定で分析した。*、p<0.05、**、p<0.01、***、p<0.001。

30

【図2A】図2：シクロホスファミドは、粘液関連微生物叢失調及び二次リンパ器官における微生物の細菌トランスロケーションを誘発する。(A~B)．CTX又はDoxo後48時間に、未処置マウスからの腸間膜リンパ節(mLN)及び脾臓細胞を、好気性及び嫌気性条件下で培養し、そして、NaCl(Co)(n=10~16)、CTX(n=12~27)又はDoxo(n=3~17)(3~4つの実験)で処置された各マウスからコロニーを数え(A)、質量分析法によって同定し(B)。NaCl対照では、細菌同定の試みがほとんど失敗し、67%のラクトバチルス・ムリヌス(Lactobacillus murinus)を得た(未掲載)。データをt-検定で分析した。

40

【図2B】図2：シクロホスファミドは、粘液関連微生物叢失調及び二次リンパ器官における微生物の細菌トランスロケーションを誘発する。(A~B)．CTX又はDoxo後48時間に、未処置マウスからの腸間膜リンパ節(mLN)及び脾臓細胞を、好気性及び嫌気性条件下で培養し、そして、NaCl(Co)(n=10~16)、CTX(n=12~27)又はDoxo(n=3~17)(3~4つの実験)で処置された各マウスからコロニーを数え(A)、質量分析法によって同定し(B)。NaCl対照では、細菌同定の試みがほとんど失敗し、67%のラクトバチルス・ムリヌス(Lactobacillus murinus)を得た(未掲載)。データをt-検定で分析した。

50

【図2C】(C) . 微生物組成(属レベル)を、未処置マウス及びB16F10腫瘍担持体の回腸及び盲腸からの16S rRNA遺伝子の454パイロシークエンシングによって分析した。主成分分析(PCA)は、マウス微生物叢(各ドットは1匹のマウスを表す)の固有のクラスタが処置(NaCl:Co、灰色のドット;CTX処置、黒色のドット)に依存していることを明らかにした。モンテカルロ順位検定を、これらのクラスタの有意性を評価するために適用した。

【図2D】(D) . 小腸粘膜に関連している様々な細菌群の定量的PCR(qPCR)分析を、CTX若しくはNaCl(Co)処置、未処置、又はMCA205癌担持マウスに対して実施した。絶対値を、全細菌、ラクトバチルス属、エンテロコッカス属、及びクロストリジウム属第IV群について計算し、サンプルの希釈及び重量によって標準化した。検量線を、各細菌群からの既知濃度のゲノムDNAの段階希釈から、閾値サイクル(Ct)対細菌数(CFU)をプロットすることによって作製した。点線より下の点は検出閾値未満であった。データを、線形モデル又は一般化線形モデルで分析した。*、 $p < 0.05$ 、**、 $p < 0.01$ 、***、 $p < 0.001$ 、ns、有意ではない。

【図3A】図3:CTX誘発pTh17エフェクター及び免疫記憶Th1応答は腸微生物叢に依存した。(A) . 無菌(GF)又は従来の特定病原菌未感染(SPF)状態(左のパネル)で育て、そして、ATB又はバンコマイシン(Vanco)(右のパネル)で処置した又は処置していないCTX対NaCl処置動物からの脾細胞を、48h、抗CD3⁺抗CD28⁺Abを使用して架橋した。IL-17をELISAによって評価した。2~9匹のマウス/群を含む2~3の実験が示され、各ドットが1匹のマウスを表している。

【図3B】(B) . 特定の粘膜細菌の数と脾臓Th17特徴との相関関係。各ドットは、腫瘍を担持していない(丸いドット)、B16F10メラノーマ(ダイヤモンド形のドット)又はMCA205肉腫(四角いドット)を担持している1匹のマウスを表し、白抜きのドットはNaCl処置マウスを特徴とし、そして、塗りつぶしたドットはCTX処置動物を示す。

【図3C】(C) . ATB又は対照としての水の投薬計画下、NaCl又はCTX処置のいずれかの7日間後に癌非担持マウスから採取した脾細胞の細胞内分析。2~8の独立した実験における、IFN⁺Th17細胞、ROR⁺CD4⁺T細胞の中のT-bet⁺細胞及びCCR6⁺CD4⁺T細胞の中のCXCR3⁺細胞のパーセンテージの平均 \pm SEM、そして、各ドットが1匹のマウスを表す。

【図3D】(D) . ATB処置後に、指示した細菌種を口腔内再構成した(orally-reconstituted)未処置マウスから、CTX処置の7日間後に採取した総脾細胞の細胞内染色。

【図3E】(E) . CTX又はNaCl(Co)処置の7日間後、脾臓CD4⁺T細胞を、24時間、低減した量の細菌と共に添加した骨髓樹状細胞(BM-DCs)により生体外で再び刺激した。ELISAによって観察されたIFN⁺放出を示している。試験されたマウスの総数のうちの(NaClベースライン閾値に基づく)応答マウスの数を示す(n)。統計的比較は対応のあるt-検定に基づいた。データを、回帰又は線形モデル及び修正ケンドールタウからの相関分析を用いて分析した。*、 $p < 0.05$ 、***、 $p < 0.001$ 、ns、有意ではない。

【図4A】図4:バンコマイシンは、化学療法の殺腫瘍活性に必須であるCTX誘発性pTh17分化を鈍化させる。(A) . 広域スペクトルATBでの3週間にわたる前処置後に、DBA2マウスにP815肥満細胞腫を接種し(0日目)、6日目にCTX(矢印)で処置し、そして、腫瘍増殖を観察した。腫瘍増殖動態を図13Aに示し、そして、屠殺時点での無腫瘍マウスのパーセンテージを11~14匹のマウス/群から成る2つの実験について示す。

【図4B】(B) . MCA205肉腫を、適宜セグメント細菌(SFB)の単独群叢を伴った特定病原菌未感染(SPF)又は無菌(GF)マウスに0日目に接種し、CTX(矢印)で処置し、そして、増殖動態について観察した(平均 \pm SEM)。2~3の実験のうちの代表的な1つの実験(n=5~8匹のマウス/群)がGFマウスについて示され、そ

10

20

30

40

50

して、2つの統合された実験 ($n = 14$ 匹のマウス / 群) は S P F マウスについて示されていた。

【図4C】(C) . パンコマイシン又はコリスチンによる3週間のコンディショニング後に、C57BL/6マウスにMCA205肉腫を接種し(0日目)、12~15日目にCTXで処置し(矢印)、そして、腫瘍増殖を観察した。2つの独立した実験 ($n = 15 \sim 20$ 匹のマウス / 群) からの連結データがコリスチン処置について示されており、そして、1つの代表的な実験 ($n = 6$ 匹のマウス / 群) がパンコマイシン処置について示されている。

【図4D】(D) . 8週齢のKP (KrasLSL-G12D/WT; p53^{Flx/Flx}) マウスに、肺腺癌を引き起こすために鼻腔内滴下によってCreリコンビナーゼ (AdCre) を発現するアデノウイルスを与えた(d0)。AdCre後d77にマウスのサブグループ (「Chemo+Vanco」) にパンコマイシンが開始された。パンコマイシン開始1週間後に、CTXベースの化学療法が、化学療法 (「Chemo」) しか受けていないマウス又は並行してパンコマイシン (「Chemo+Vanco」) を受けているマウスにi.p.で適用された。マウスは、d84、d91、及びd98に化学療法を受けた。対照群は未処置のままであった (「Co」)。データは、全肺腫瘍体積 (平均 \pm SEM) の発展がd73~d100の間の非侵襲性造影によって6~12匹のマウス / 群において評価されたことを示す。

【図4E】(E) . 図3Cのとおり、樹立された(15~17日)MCA205腫瘍を担持する無処置又はパンコマイシン処置マウス由来の脾臓内のpTh17の細胞数を、CTX処置の7日後に測定した。各ドットは、統合された2つの実験からの1匹のマウスを表す。

【図4F】(F) . CD3⁺及びCD4⁺IFN γ ⁺T細胞のフローサイトメトリー分析を、水又はパンコマイシンで処置されたマウスにおける18日目の樹立されたMCA205腫瘍 (CTXの8日後) から摘出した生きたCD45⁺腫瘍浸潤リンパ球 (TILs) にゲーティングすることによって実施した。各ドットは、最大で4つの統合された実験からの1匹のマウスを表す。

【図4G】(G) . 水又はパンコマイシンによって3週間前処置されたWTマウスにおいて樹立されたMCA205腫瘍をCTXと一緒に注射し(矢印)、そして、腫瘍増殖を観察した。CTX後7日目の時点で、300万個の生体外発生したTh17又はpTh17 CD4⁺T細胞を静脈内に注射した。2~10匹のマウス / 群を含む最大3つの実験を統合した。データを、t-検定、線形モデル又は一般化線形モデルのいずれかで分析した。*、 $p < 0.05$ 、**、 $p < 0.01$ 、***、 $p < 0.001$ 、ns、有意ではない。

【図5A】図5: CTX後の24又は48hの微生物叢失調の欠如。(A) . 様々な時点 (CTX後0、24、48時間) における16S rRNA遺伝子の高性能454パイロシーケンシングによって評価された腸微生物叢の全体的な組成。各列は、t0 (CTX注射前)、t24及びt48 (CTX後24及び48時間) の1匹のマウスの小腸粘膜微生物叢由来のデータを表す。異なった属の代表性に関する正のグラジエント (Log₁₀変換の色分け地図) が示されている。統計的分析: t0~t24又はt48時間の間でns。

【図5B】(B~C) . クロストリジウム属クローン40及びL.ロイテリ (L.reuteri) に関するパイロシーケンシングデータの詳細な例。材料と方法に詳述されている時間外のラクトバチルス属量のqPCR分析。

【図5C】(B~C) . クロストリジウム属クローン40及びL.ロイテリ (L.reuteri) に関するパイロシーケンシングデータの詳細な例。材料と方法に詳述されている時間外のラクトバチルス属量のqPCR分析。

【図6】図6: CTX処置されたマウスの回腸における細菌属の配分。NaCl (Co) 及びCTX処置動物からの小腸内の属の相対量のLog₁₀変換の色分け地図。CTX治療前に、動物のサブグループに腫瘍を接種した(TB+)。微生物叢全体のうちの0.05%超を示す細菌属だけを提示する。相対量データに対する適用されたLog₁₀変換

10

20

30

40

50

を、材料と方法の項の微生物叢で説明した。非特異的クラスタリング法を色分け地図構築のために適用した。各属の C o と C T X の間のパーセンテージの平均デルタを、細菌属を順序づけするために計算した。C T X は、C T X 処置動物の粘液において、4 つの属及び群がその中に配分するファーミキューテス (Firmicutes) 門の細菌群 (クロストリジウム属 クラスタ X 1 V a、ロゼブリア (Roseburia)、未分類ラクノスピラ (Lachnospiraceae)、コプロコッカス (Coprococcus)、表 2) の低減を引き起こした。C T X はまた、スピロヘータ門 (Spirochaetes phylum) ($p = 0.016$)、特にトレボネーマ属 (Trepone genus) の割合の低減にも関連していた (N a C 1 群における 0.025% 対 C T X 群における 0% 、 $p = 0.016$)。種のレベルでは、ある細菌は、C T X 後に過剰 (ラクトバチルス・ロイテリ (Lactobacillus reuteri) など) であるか、又は不足 (ラクノスピラ科から及びクロストリジウム属 クラスタ X 1 V a からのクロストリジウム属 クローン 40 や他の酪酸産生菌など) であった (図 2 B)。セグメント細菌 X 7 7 8 1 4 (S F B) は、対照と比べて C T X で処置したマウスにおける一貫した濃縮を明らかにしなかった (C T X における 7.95% の S F B 対 ビヒクル対照における 0.83% 、 $p = 0.08$ 、表 2)。ウイルコクソン検定: *、T B⁻ 群における C o 対 C T X において $p < 0.05$ 、†、T B⁺ 群における C o 対 C T X において $p < 0.05$ 。

【図 7 A】図 7: 小腸細菌種と相関がある十二指腸固有層における C D 1 0 3⁺ C D 1 1 b⁺ 及び T h 1 7 細胞の喪失と脾細胞の T h 1 極性化。(A): 小腸の L P における樹状細胞 (D C) サブセット。C T X 注射後 0 日目、3 日目、及び 7 日目の小腸及び大腸の L P における様々な D C サブセットのフローサイトメトリー分析及び定量化。グラフは、2 つの連結された実験における 7 匹のマウス / 時点の D C に関するパーセンテージの平均 + S E M を図示する。大腸 D C サブセットは、C T X によって影響を受けなかった (未掲載)。データをマンホイットニー t - 検定によって分析した。(B ~ C): C T X 7 日後の T h 1 7 細胞の変化。

【図 7 B】(B): N a C 1 対 C T X で処置したマウスから採取した、十二指腸及び回腸の L P から分離したリンパ球のフローサイトメトリー分析。グラフは、8 つの独立した実験からの連結データを図示し、そして、各ドットは 1 つの実験を表す。統計的比較はウイルコクソン検定に基づいた。

【図 7 C】(C): 左のパネル: N a C 1 対 C T X の処置されたマウスにおける回腸の蛍光抗体染色の顕微鏡写真の画像。T C R⁺ 細胞を、抗 T C R A b を使用して緑色 (Alexa Fluor488) に染色し、そして、C D 3⁺ T 細胞を、抗 C D 3 A b を使用して青色 (Alexa Fluor647) に染色した。右のパネル: 陽性細胞のカウントを、3 個の回腸における 1 0 0 の絨毛に対して 2 人の別々の研究者によって実施した。

【図 7 D】(D): C T X 注射後 7 日目における脾細胞の T h 1 極性化。C T X 対 N a C 1 処置動物からの脾細胞を、G F 又は従来の S P F 条件 (左のパネル) において培養し、そして、A T B 又はバンコマイシン (右のパネル) で処置した又は処置していないものを、48 h、抗 C D 3⁺ 抗 C D 2 8 A b s を使用して架橋した。I F N のレベルを、E L I S A によって 48 時間の上清において観察した。2 ~ 9 匹のマウス / 群を含む 3 つの実験を示し、そして、各ドットが 1 匹のマウスを表す。(C) 及び (D) からのデータを t - 検定で分析した。

【図 7 E】(E): 図 3 C のものと同様であるが、未処置、B 1 6 F 1 0 又は M C A 2 0 5 腫瘍担持細胞においてそれぞれの細菌群と図 6 (C) に示した I F N 分泌プロファイルの間の相関関係を分析した。

【図 7 F】(F): C T X 後 7 日目にて図 3 C で数えた脾臓 p T h 1 7 細胞のフローサイトメトリー分析の代表的なドットプロット。*、 $p < 0.05$ 、**、 $p < 0.01$ 、n s、有意ではない。

【図 8 A】図 8: ドキソルピシンは、脾臓における p T h 1 7 細胞を誘発せず、腫瘍増殖を低減するために腸の片利共生を必要としない。(A ~ B): ドキソルピシン (D o x o) は C D 4⁺ T 細胞を産生する脾臓 I L - 1 7 を誘発しない。D o x o を、指示した用量 (A) 又は 2 m M にて 5 0 μ l の固定用量 (体重 2 0 g のマウスでは 3 m g / k g) (B

10

20

30

40

50

）にてマウスに i . p . 注射し、そして、脾細胞を 7 日後に採取して、48 時間の抗 CD 3 / 抗 CD 28 架橋に应答した IL - 17 産生 (A , B) 又は CD 4 ⁺ T - b e t ⁺ R O R t ⁺ 表現型を有する細胞の頻度を評価するためにフローサイトメトリーによって測定した (B) 。 100 mg / kg の用量で使用するシクロホスファミド (C T X) は、正の対照として使用された。適宜、制御性 T 細胞を抗 CD 25 A b の注射 (250 g 、 D o x o 投与の 1 又は 3 日前) によって枯渇させ、そして、無関係なアイソタイプ対照 A b を対照として使用した。

【図 8 B】図 8 : ドキソルビシンは、脾臓における p T h 17 細胞を誘発せず、腫瘍増殖を低減するために腸の片利共生を必要としない。 (A ~ B) . ドキソルビシン (D o x o) は CD 4 ⁺ T 細胞を産生する脾臓 IL - 17 を誘発しない。 D o x o を、指示した用量 (A) 又は 2 mM にて 50 μ l の固定用量 (体重 20 g のマウスでは 3 mg / kg) (B) にてマウスに i . p . 注射し、そして、脾細胞を 7 日後に採取して、48 時間の抗 CD 3 / 抗 CD 28 架橋に应答した IL - 17 産生 (A , B) 又は CD 4 ⁺ T - b e t ⁺ R O R t ⁺ 表現型を有する細胞の頻度を評価するためにフローサイトメトリーによって測定した (B) 。 100 mg / kg の用量で使用するシクロホスファミド (C T X) は、正の対照として使用された。適宜、制御性 T 細胞を抗 CD 25 A b の注射 (250 g 、 D o x o 投与の 1 又は 3 日前) によって枯渇させ、そして、無関係なアイソタイプ対照 A b を対照として使用した。

【図 8 C】 (C) . 特定病原菌未感染 (S P F) 、抗生物質 (A T B) 処置、及び無菌マウスにおける樹立された M C A 205 に対するドキソルビシンの抗癌効果。腫瘍増殖 (平均粒径 \pm S E M) の動態を、4 ~ 6 匹の動物 / 群を含んでいる 2 ~ 3 つの統合された実験で図示する。データを、t - 検定、線形モデル又は一般化線形モデルで分析した。 * 、 p < 0 . 05 、 * * 、 p < 0 . 01 、 * * * 、 p < 0 . 001 、 n s 、有意ではない。

【図 9】図 9 : 未処置又は癌担持マウスの糞便からの細菌の喪失における広範囲 A T B の有効性。糞便を、未処置のままであったか又は様々な時点において広範囲 A T B で処置されたマウスから新たに採取し、好気性又は嫌気性条件のための血液寒天平板、並びにエンテロコッカス特異的増殖のための D C O 寒天平板 (BioMerieux) 上で平板培養した。培養 48 h 後に、単離されたコロニーを数えた。それぞれの異なった実験のすべてのマウスを、このように観察しスコア化した。1 つの代表的な観察を示す。

【図 10】図 10 : C T X 誘発 p T h 17 分化は、N o d 1 / 2 ではなく、M y d 88 に依存する。 (A) . (抗 CD 3 、 CD 8 、 I F N γ 、及び IL - 17 A b s を用いた細胞内及び細胞外染色を使用して) P M A / イオノマイシンと共に 4 時間再刺激された N a C l 対 C T X で処置した W T (図 3 C のように) 及び N o d 2 ^{-/-} 対 M y d 88 ^{-/-} マウスから採取したリンパ球のフローサイトメトリー分析。グラフは、2 つの独立した実験からの IL - 17 ⁺ CD 4 ⁺ T 細胞の中の I F N γ ⁺ 陽性細胞の平均パーセンテージを明らかにし、そして、各ドットは 1 匹のマウスを表す。 (B) . N o d 1 及び N o d 2 は、C T X によって誘発された腫瘍増殖減退のための不必要である。5 及び 12 日目の C T X 投与前に、M C A 205 腫瘍を W T 又は N o d 1 ^{-/-} N o d 2 ^{-/-} マウスにおいて樹立した。腫瘍増殖動態 (平均 \pm S E M) を 5 匹の動物 / 群で観察した。2 つの独立した実験では同様の結果を得た。データを、t - 検定、線形モデル又は一般化線形モデルで分析した。 * * * 、 p < 0 . 001 、 n s 、有意ではない。

【図 11】図 11 : C T X 後の共生細菌に対する免疫化。 (A ~ C) . C T X 後の近交系マウスにおける C B i r T g T 細胞の回復。100 万個の未処置 B 6 . C D 45 . 1 ⁺ C B i r 1 T C R T g CD 4 ⁺ T 細胞を、未感作 CD 45 . 2 W T レシピエント近交系マウスにおいて i . v . で養子移植し、そのマウスを、1 日後に N a C l 又は C T X で処置し、そして、脾細胞の F A C S 分析及び C B i r 1 特異的ペプチドによる生体外再刺激のために 7 日後に屠殺した。CD 45 . 1 細胞のゲーティングにより、C B i r 1 T g T 細胞の回復又は増殖のパーセンテージを分析すること (A 、 5 匹の動物についての平均 \pm S E M) 、そして、6 h のリンモリブデン酸 / イオノマイシン活性化後の細胞内染色を使用した IL - 17 及び I F N γ 産生を分析することを可能にした。代表的なドット

10

20

30

40

50

プロットは、Bにおける1匹の動物について示されている。脾細胞を、24 h、C B i r l 特異的ペプチド又は対照の無関係なペプチドで再刺激した。市販のE L I S Aでは、血清中のI F N の濃度を観察した(C)。4~5匹の動物/群を含んでいる3つの実験を実施した。マンホイットニーのt - 検定: * *, $p < 0.01$ 。

【図12】図12: 樹状細胞によって加工及び提示された移行細菌は、生体外において未感作C D 4 + T細胞の極性化をもたらす。移行細菌を用いたT h 1 7 / T h 1細胞の生体外分化。様々な細菌によってもたらされたB M D C sと未感作C D 4 + Tとの間の4日間にわたるクロストーク。市販のE L I S AによるI L - 1 7 (左)又はI F N (右)サイトカイン濃度の観察。各ドットは三連ウェルで実施した1つの試験管内における実験を表す。11個の実験を実施し、且つ、明らかにした。t - 検定: *, $p < 0.5$, * *, $p < 0.01$, n s、有意ではない。

10

【図13】図13: 腸微生物叢は化学療法効果に影響する。(A). A T Bによる細菌の喪失が、樹立された肥満細胞腫の化学感受性を低減した。6日目に、広範囲A T Bで3週間前処置した又はしていないP 8 1 5担持D B A 2マウスに、100 mg / k gのC T Xをi . p .に接種し、そして、腫瘍増殖を屠殺まで観察した。増殖動態は、3つのうちの代表的な実験における水対A T Bで処置されたマウスにおいてそれぞれの個々のマウスについて示した。(B). パンコマイシンは、M C A 2 0 5肉腫に対するC T Xの有効性を低減した。10日目に、パンコマイシンで3週間前処置したか又はしていないM C A 2 0 5担持C 5 7 B L / 6マウスに、100 mg / k gのC T Xをi . p .に接種し、そして、腫瘍表面積並びに腫瘍拒絶反応率を1カ月間にわたって観察した。増殖動態は、2つのうちの1つの代表的な実験における水対パンコマイシンで処置されたマウスにおいてそれぞれの個々のマウスについて示す一方で、無腫瘍マウスのパーセンテージを括弧内に示す。

20

【図14】図14: パラバクテロイデス・ディスタノニスと化学療法抵抗性。(A). パラバクテロイデス・ディスタノニスの単独群叢を伴ったことで、樹立された肉腫の化学療法抵抗性を誘導した。従来どおり飼育したマウスを、広域抗生物質(A T B)で2週間処置し、7日間、M C A 2 0 5を接種し、そして、ドキソルビシンで処置した。この特定の実験では、糞便には、V I T E K (登録商標)自動化システム及びM A L D I - T O Fを用いてP . ディスタノニスと同定された1種類の単一細菌種が混入していた。腫瘍増殖動態(平均 \pm S E M)は、P . ディスタノニス混入に組み合わせたA T Bが生体内における癌の化学療法抵抗性状態を誘発したことを明らかにした($n = 4 \sim 5$ 匹のマウス/群)(B)。従来どおり飼育されたマウスを、3~4週間、A T Bで処置し、4日間、M C A 2 0 5を移植し、次に、糞便を単独コロニー化したP . ディスタノニスを経口的に接種した。腫瘍接種後6日目には、マウスをドキソルビシンで処置した。ドキソルビシン後(平均 \pm S E M)、P . ディスタノニス再構成又は非再構成A T B処置マウスの間の腫瘍増殖動態を、8~12匹のマウス/群で観察した。データを、線形モデル又は一般化線形モデルで分析した。* $p < 0.05$, * * * $p < 0.001$ 。

30

【図15】図15: C T X誘発脾臓C D 4 + T細胞と比較した生体外産生T h 1 7及びp T h 1 7の転写プロファイリング。未感作T細胞を、組み換えマウスI L - 1 (10 ng / m l) + I L - 6 (10 ng / m l) + I L - 2 3 (20 ng / m l) (「P T h 1 7」細胞の場合)又はr T G F - (2.5 ng / m l) + I L - 6、(「T h 1 7」細胞の場合)のいずれかの存在下、或いは不存在下(T h 0)、抗C D 3及び抗C D 2 8 A b sに対するプレート結合抗体で刺激した。インビトロ産生p T h 1 7、T h 1 7細胞(A)又はN a c l若しくはC T X後の生体外採取した脾臓由来C D 4 + T細胞(B)に関する転写プロファイルを示す。T h 1対T h 1 7極性化を規定する転写因子及びサイトカインを検出する特異的プローブを用いて定量的R T - P C Rを実施した。

40

【図16】図16: パンコマイシン抵抗性微生物の微生物叢。未処置のままか又はパンコマイシンで処置した腫瘍担持体からの糞便の片利共生を、材料と方法で指定したように平板培養し、カウントし、同定して耐性コロニーの数を分析した。2つの異なった動物飼育施設において実施された2つの独立した実験(CGFL, Dijon対IGR, Villejuif)の結果を

50

示す。

【図17】図17：抗生物質は、17腫瘍浸潤性リンパ球の化学療法で誘発された蓄積に影響する。IL-17産生腫瘍浸潤性細胞のフローサイトメトリー表現型決定のために、MCA205肉腫を、10日目に化学療法で処置し、そして、18日目に採取した。生きたCD45⁺白血球中のTCR⁺IL-17⁺のパーセンテージを、バンコマイシン又は広範囲ATBで処置した各群で示す。各群は6~21匹のマウスを含んでいた。スチューデントt'検定：**、 $p < 0.01$ 、***、 $p < 0.001$ 。

【図18】図18：ニワトリOVAに対する初代細胞のTh1及びTc1免疫応答は、野性型未処置マウスにおける抗生物質投薬計画で影響を受けない。C57B1/6マウスを、広範囲抗生物質(ATB)、コリスチン(Coli)又はバンコマイシン(Vanco)を含めた様々な抗生物質の処方で8~10日間前処置し、糞便を培養することによって種々の時点にて観察し、i.p.CTX投与の3日後に、50 μ gのPoly(I:C)と混合した1mgのOVAを用いて足蹠において免疫した。ワクチン後5日目に、膝窩及び鼠頸部流入領域リンパ節を採取し、そして、それぞれ1mg及び10 μ g/mlのOVAタンパク質(左のパネル)又はSIINFELペプチド(右のパネル)で再刺激した。IFN放出を、72時間の時点でELISAによって上清中で観察した。各ドットは1匹のマウス、且つ、インビトロ再刺激の三連ウェルの平均を表す。統計的分析を、抗原再刺激なしに対して比較する対応のないt検定を実施して、Ag特異的エフェクター/免疫記憶応答をとらえた。**、 $p < 0.01$ 、***、 $p < 0.001$ 、ns：有意ではない。

【図19】図19：化学療法を使用した肺の腺癌を担持するKPマウスの処置。8週齢KP(KrasLSL-G12D/WT、p53^{Flx/Flx})マウスに、肺腺癌を引き起こすように鼻腔内滴下によってCreリコンビナーゼを発現するアデノウイルス(Ad-cre)を与えた(d0)。マウスには、未処置のままか(Co)又は0.25mg/mlのバンコマイシンの不存在下(Cheмо)又は存在下、化学療法(d84、d91、及びd98)を与えた(Cheмо+Vanco)(Ad-cre後d77に開始し実験終了まで、飲料水中に混合した；抗生物質含有水を隔週で置き換えた)。A.腫瘍体積を、先に記載した非侵襲性造影(コルテス-Retamozら、Immunology、2012)によって麻酔下のマウスにおいてd73及び100に定量化した(化学療法の「前」及び「後」に相当する)。データは2つの時点の間の全肺腫瘍体積(平均 \pm SEM)における絶対変化を示す。注意すべきは、抗生物質がこの疾患の自然な進行に影響を全く与えないことである(未掲載)。B.CD8/Treg比を、それぞれの群から得られた摘出肺組織サンプルのフローサイトメトリー測定によって測定した。無腫瘍マウス群(腫瘍なし)もまた調査された。各群n=6匹のマウス；*、 $p < 0.05$ 、**、 $p < 0.01$ (対応のない両側t検定)。

【図20A】図20：癌患者の共生細菌に対するCTX誘発Th1及びTh10免疫応答。規定された細菌を3時間負荷し、抗生物質で中和し、次に、(DCへの分化のため)GM-CSF+IL-4中で培養し、そして、様々な時点の自家血液から精製したCD4⁺CD45RO⁺T細胞(1:2比にて)と共に3日間インキュベートした、患者の自己単球を使用した生体外再刺激アッセイ(0日目：CTX前、12~46日目：CTX後、NSCLC：非肺小細胞癌)。A.ELISAを使用して、サイトカイン放出(IFN、TNF、IL-10)を観察した。CTX前後の時点の間で少なくとも2倍増のIFN分泌を示した患者の数(A、左のパネル)及びパーセンテージ(A、右のパネル)。B.Th1免疫応答を生じた3つのケースの例示；患者3は、L.ジョンソニー+E.ヒラエに対して発揮された強いTh1免疫を生じた。

【図20B】B.Th1免疫応答を生じた3つのケースの例示；患者3は、L.ジョンソニー+E.ヒラエに対して発揮された強いTh1免疫を生じた。

【図20C】C.1ケースはE.フェカリスに対する強いTh1免疫を伴った。

【図20D】D.2つのケースは対照的にTh1/Th10特異的応答を伴った。B~Dは、CTX投与前後のそれぞれ個人の患者の250,000個の免疫記憶CD4⁺T細胞

の40h上清中のサイトカインレベルを示す。

【図21】図21：比較対照（化学療法なし）対新アジュバント化学療法後を比較した、16SrRNAパイロシーケンシング後の全患者の回腸の単離株レベルに対する主成分分析法。

【図22】図22：ランダムフォレスト分析：化学療法を受けた又は受けていない、或いは結腸癌を担持している患者間の主たる特徴的な属。ネオアジュバントのオキサリプラチンベースの化学療法による6人の患者と治療前の7人の患者からの分析。

【図23】図23：対照（化学療法なし）対新アジュバント化学療法後の間で有意に異なった主たる属。

【図24】図24：ラクトバチルス属、ビフィドバクテリウム、及びクロストリジウム属第IV群の配分。化学療法で処置された又は処置されていない大腸癌患者の中の回腸。

【図25】図25：E．ヒラエの単独群叢を伴った後のTH1及びpTH17免疫応答。C57BL/6マウスを、バンコマイシン、ストレプトマイシン、アンピシリン、及びコリスチン（広範囲ATB投薬計画）で14日間処理し、続いて15日目に100mg/kgのCTXの単回ip注射によって処置し、そして、22日目の脾細胞のフローサイトメトリー分析前の16日目に 10^9 個の細菌（グラフで例示される）を経口摂取させた。A～C．pTH17細胞のフローサイトメトリー分析。生きた脾細胞のゲートにおいてIFNとIL-17（左のパネル）又はCXCR3とCCR6（右のパネル）を発現するか又は同時発現するCD4⁺T細胞。5匹のマウス/群を含んでいる3つの個々の実験からの連結データ。Anova統計的分析：* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

【図26】図26：CTXで処置されたMCA205に対する抗癌プロバイオティクス活性。C57BL/6マウスを、バンコマイシン、ストレプトマイシン、アンピシリン及びコリスチン（広範囲ATB投薬計画）で14日間処置し、MCA205肉腫をsc接種し、次に、21日目に100mg/kgのCTXの単回ip注射で処置し、そして、22日目に 10^9 個の細菌（グラフで例示される）を経口摂取させた。腫瘍増殖動態を1カ月にわたり隔週で観察した。A．実験の設定。B．陽性（ATBなしCTX）及び、陰性対照（ATBありCTX）群の腫瘍増殖。C～F．E．ヒラエ若しくはL．ジョンソニー又はそれらの両方（カクテル）の経口強制飼養の存在下での腫瘍増殖動態。F．5匹のマウス/群を含んでいる3つの実験から連結データ。Anova統計的分析：* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

【図27】図27：E．ヒラエはOVA特異的な抗腫瘍免疫応答を引き起こす。CD45.1⁺C57BL/6マウスを、バンコマイシン、ストレプトマイシン、アンピシリン及びコリスチン（広範囲ATB投薬計画）で14日間処置し、MCA205-OVA肉腫をsc接種し、次に、21日目に100mg/kgのCTXの単回ip注射によって処置し、そして、22日目に 10^9 個のE．ヒラエ（グラフAで例示される）を経口摂取させた。24日目に、 10^6 個のCD45.2⁺OTIITransジェニックT細胞をiv移植し、そして、レシピエント（CD45.1、B）又はドナー（CD45.2）CD4⁺Tリンパ球のフローサイトメトリー分析のために、8日後にマウスを屠殺した。B．脾細胞の数（左のパネル）、Ki67⁺CD4⁺T細胞のパーセンテージの測定（中央パネル）、及びATBあり若しくはなしのCTX後の宿主におけるpTH17。C．脾臓におけるCD45.2⁺、Ki67⁺又はCD44⁺発現によって調べたドナーT細胞の回復。D．Cと同様であるが、腫瘍ベッドにおいて絶対数を数えることによる。代表的な実験を、統計的分析のためのスチューデントt'検定を用いて示す。* $p < 0.05$ 。

【図28】図28：E．ヒラエは、E7特異的抗腫瘍免疫応答を引き起こす。A．実験の設定。広範囲ATBで前処置されたマウスにおける皮下TCI接種、そして、SBxT-E7とCTX（+/- E．ヒラエの単独群叢を伴う）の組み合わせを使用した腫瘍移植後7日目の治療法。B～C．2つの実験における、代表的な腫瘍増殖動態及び完全な腫瘍根絶のパーセンテージ。D．脾臓のD^b-E739-47四量体結合CD8⁺T細胞の観察。2つの実験からの結果を示す。統計的分析のAnova検定。* $p < 0.05$ 。

10

20

30

40

50

【図29】図29：異なった公的ライブラリーからの一連のE・ヒラエ単離株のパルスフィールド電気泳動。これらのクローンの間には、配列類似性の管理された階層的なクラスタリングはなかった。クローン13144 - 13147は、異種治療法（CTLA4遮断、CTX）後にマウス脾細胞からGustave Roussy動物飼育施設において単離された。今後又は先に使用した1つの単離株は、この図中で「13144 Villejuif」と記載され、番号I - 4815として、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes（CNCM）で2013年11月7日に寄託されたエンテロコッカス・ヒラエ（*Enterococcus hirae*）菌株に相当する。

【図30】図30：生体内における様々なE・ヒラエの差別的な免疫原性。C57BL/6マウスを、バンコマイシン、ストレプトマイシン、アンピシリン及びコリスチン（広範囲ATB投薬計画）で14日間処置し、15日目に100mg/kgのCTXの単回ip注射によって処置し、そして、22日目の脾細胞のフローサイトメトリー分析前の16日目に 10^9 個の細菌（クローン708対クローンCNCM I - 4815）を経口摂食させた。正の対照は前処理ATBなしにCTXで処置されたマウスによって表される。A～C、TH1、Tc1又はpTH17細胞のフローサイトメトリー分析。生きたCCR6⁺CD4⁺T脾細胞のゲートにおけるIFN γ 又はCXCR3を発現するCD4⁺TH1細胞（A、左と右のパネル）、IFN γ を発現するCD8⁺Tc1（B）又はCXCR3を発現するCD4⁺pTH17細胞（C）。5匹のマウス/群を含んでいる3つの個々の実験からの連結データ。ANOVA統計的分析：* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

【図31】図31：抗微生物ペプチドの放出の促進による、NOD受容体が妨げる細菌トランスロケーションの誘発及びpTH17細胞の感作。A、様々なマウス背景におけるCTX治療後48時間の脾細胞における細菌コロニーのカウント。C57BL/6 WT又はNOD1 \times NOD2 \times マウスから採取した脾細胞（左のパネル）と腸間膜LN（中央パネル）を、48時間、嫌気性条件で培養した。増殖した細菌をカウントし（コロニー数/プレート及び陽性プレートの頻度/動物（右のパネル））そして、細菌同定のために質量スペクトロメトリーによって最終的に特徴づけした。B、pTH17細胞のフローサイトメトリー分析。WT対NOD1又はNOD2欠損マウスの生きたIL-17⁺T脾細胞のゲートにおけるIFN γ を同時発現するCD4⁺T細胞。C、Bと同様ではあるが、グラフの上部に整列した実験設定に従ってNOD作動薬（MDP及びTridAP）で処置したWT動物で実施した実験。D、Cに整列した実験設定によるマウスの糞便中のリポカリン-2のELISA観察。代表的な実験はA及びDについて示されている。3匹のマウス/群を含んでいる2～3の個々の実験からの連結データを、B～Cに示す。ANOVA統計的分析：* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

【図32】図32：LPSは、E・ヒラエ+L・ジョンソニーがpTH17細胞を惹起する能力に対して阻害的役割を担う。A～C、脾臓におけるTH1（A）、Tc1（B）及びpTH17（C）細胞の惹起に関するTLR4作動薬とグラム陽性菌の比較。図25に実験設定を記載したが、2回繰り返される500 μ g/マウスの投薬でのLPSの経口投与の有無を追加した。生きた脾細胞のゲートにおけるIFN γ とIL-17を同時発現するCD4⁺T細胞のフローサイトメトリー解析。5匹のマウス/群を含んでいる3つの個々の実験からの連結データ。ANOVA統計的分析：* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

【図33】図33：様々な遺伝子欠損宿主における肉腫増殖に対するCTXの相対的有効性。WT（A）、NOD1（B）、NOD2（C、左のパネル）、CARD9（C、中央パネル）、RIP2（C、右のパネル）、NOD1 \times NOD2（D、左のパネル及び右のパネル）欠損マウスにおいて、100mg/kgのipにて7日おきにCTXを投与した。各グラフは1つの代表的な増殖動態の5つの腫瘍/群の平均を示す。学生t検定：* $p < 0.05$ 。

【図34】図34：E・ヒラエ+L・ジョンソニーの群叢から成る抗癌性プロバイオティクス活性におけるTLR4作動薬の阻害作用。CD45.1⁺C57BL/6マウスを、

バンコマイシン、ストレプトマイシン、アンピシリン及びコリスチン（広範囲 A T B 投薬計画）で 14 日間処置し、M C A 205 - O V A 肉腫を s c 接種し、次に、21 日目（及び 29 日目）に 100 mg / kg の C T X の単回 i p 注射によって処置し、そして、22 日目に 500 µg / マウスの L P S (A) 又は 10⁹ 個の細菌（E . コリ (E . coli) ）を経口摂取させた。腫瘍増殖動態を 1 カ月にわたり隔週で観察した。陽性（A T B なし C T X ）及び陰性（A T B あり C T X ）対照を示す。E . ヒラエ + L . ジョンソニー⁺ / - E . コリ又は L P S の経口強制飼養の存在下での腫瘍増殖動態 / 5 匹のマウス / 群の平均。代表的なグラフは A 及び B に示され、そして、5 匹のマウス / 群を含んでいる 2 つの実験からの E . コリ + L P S の連結データは C に示されている。スチューデント t ' 検定： * p < 0 . 05。

10

【図 35 A】図 35：C T X で処置された又は処置されていない W T 対 N O D 1 x N O D 2 欠損マウスの便からの遺伝子単位複製配列の 16 s r R N A のパイロシーケンシングの主成分分析。A . P C A . 便を、未処置 C 57 B L / 6 非腫瘍担持体において C T X 接種後 7 日目に採取した。4 ~ 5 匹の動物 / 群からの糞便について配列決定した。遺伝子欠損マウスの P B S 及び C T X 治療法間の有意な結果を示す p 値を、グラフについて示す。

【図 35 B】B . 二重 K O マウスにおいて C T X 治療法後に過剰発現した科の詳細。バクテロイデス門の科構成員の大部分の分析。4 つの群の間の多様性及び相違点に関する色分け地図（左のパネル）の表示は、右のパネルに示された統計的分析に示したように、C T X 治療法によるラクノスピラを犠牲にしたポルフィロモナス科の富化が強調された。

20

【図 35 C】C . パーンシエラ、ホールデマニア、及びポルフィロモナスに関する、二重 K O マウスにおける C T X 治療法後の O T U の詳細。

【図 36 A】図 36：C T X で処置された又は処置されていない W T 対 N O D 1 x N O D 2 欠損マウスからの小腸のバイオフィームに関する遺伝子単位複製配列の 16 s r R N A のパイロシーケンシングの主成分分析。A . P C A . 回腸のバイオフィームを、未処置 C 57 B L / 6 非腫瘍担持体における C T X 接種後 7 日目に採取した。4 ~ 5 匹の動物 / 群からの小腸について配列決定した。遺伝子欠損マウスの P B S 及び C T X 治療法間の有意な結果を示す p 値を、グラフについて示す。B . 4 つの群の間の多様性及び相違点に関する色分け地図の表示は、表 1 に示された統計的分析に示したように、C T X 治療法によるエリシペロトリクス (Erysipelotrichaceae) を犠牲にしたクロストリジウム科（ほとんど S F B、表 4）の富化が強調された。

30

【図 36 B】B . 4 つの群の間の多様性及び相違点に関する色分け地図の表示は、表 1 に示された統計的分析に示したように、C T X 治療法によるエリシペロトリクス (Erysipelotrichaceae) を犠牲にしたクロストリジウム科（ほとんど S F B、表 4）の富化が強調された。

【図 37】図 37：片利共生 E . ヒラエと病原性細菌ウェルシュ菌 (Clostridium perfringens) の組み合わせ。図 26 と同じ実験設定ではあるが、C . パーフリングェンスを同じように経口強制飼養によって導入した。腫瘍増殖動態を 1 カ月にわたり隔週で観察した。A . 2 つの群 E . ヒラエ対ウェルシュ菌についての腫瘍増殖。B . E . ヒラエ + プランタルム (L . plantarum) 対 E . ヒラエ + ウェルシュ菌の経口強制飼養の存在下の腫瘍増殖動態。5 匹のマウス / 群を含んでいる 2 つの実験を示す。A n o v a 統計的分析： * p < 0 . 05。

40

【図 38】図 38：C T X を組み合わせた抗癌ワクチンは、腸のグラム陰性菌に依存した持続的な抗癌免疫を促進する。A . 実験の設定。C 56 B L / 6 マウスを、広範囲 A T B （アンピシリン、コリスチン、ストレプトマイシン）又はバンコマイシン（グラム⁺細菌のみを殺滅）又はコリスチン（グラム⁻細菌のみを殺滅）で 9 日間処置し、C T X (100 mg / kg) の単回 i p 注射を与え、続いて 3 日後に C p G アジュバント中の O V A タンパク質（又は見せかけのワクチン）のワクチン接種を与えた。A T B を 20 日後に終了し、そして、動物は 1 カ月間観察下で未処置のままにした。50 日目に、すべてのマウスに、10 x 回の M C 38 - O V A^{d i m} 腫瘍細胞 s c の M T D から成る致死量で再感作し

50

た。B. 動物を、腫瘍増殖に基づいてスコア化した（皆無又は弱い免疫記憶T細胞応答を特徴とした）。無腫瘍マウスのパーセンテージを、5匹のマウス/群を含む2つの実験について記録した。*ANOVA検定： $p < 0.05$ 。

【図39】図39：CTXの有効性に対するATB投薬計画の効果。異なったATB投薬計画（Zhang Y et al. Toxicology and Applied Pharmacology 277 (2014) 138-145）を、腫瘍接種及び13日おきのCTX治療法の15日前に投与した。腫瘍増殖を、キャリアを用いて1週間に2度観察した。プロトコールは、ファーマキ्यूテスを低減することを報告し、最も特に、ファーマキ्यूテス/バクテロイド比（ネオマイシン+セファロチン又はバンコマイシン+イミペナムの組み合わせなどの）を最終的に低下させるクロストリジウム科が（パネルC～D）CTX誘発抗癌効果を改善する場合があること、その一方で、シフロキサシン（ciprofloxacin）は効果的でなかった（対照的に、バクテロイデテスの顕著な抑制を引き起こした）（パネルB）ことを報告した。注意すべきは、ネオマイシン+セファロチンの組み合わせがSFBの代表性を増大させる場合がある一方で、vanc + イミペナムはポルフィロモナスの代表性を増強したことである。各実験は、5匹のマウスから成る数個の群を含んでいる。*ANOVA検定： $p < 0.05$ 。

【発明を実施するための形態】

【0016】

好ましい実施形態の詳細な説明

当該テキストでは、以下の一般的な定義が使用されている：

腸微生物叢

（以前、腸内フローラ又は微生物フローラと呼ばれた）「腸微生物叢」は、動物界（ヒト、動物、昆虫など）に属するいずれかの生物体の腸内に生きる微生物集団を示す。各個人は独特な微生物叢組成を有するが（合計400～500の別個の細菌種/個人に対して、60～80の細菌種がサンプル採取集団の50%超を占める）、いつも同様の主たる生理機能を満たし、且つ、個人の健康に直接的な影響を有する：

【0017】

- ・胃と小腸が消化することができない特定の食料（主に非消化性繊維）の消化に貢献する。
- ・いくつかのビタミン（B及びK）の産生に貢献する。
- ・他の微生物からの攻撃性から保護し、そして、腸粘膜の完全性を維持する。
- ・適切な免疫系の発生において重要な役割を果たす。
- ・健康で、様々な、そして、平衡を保った腸微生物叢は本来の腸の機能を確保するのに重要である。

【0018】

身体の正常機能及びそれが達成する様々な機能に参加する腸微生物叢の主要な役割を考慮すると、それは今では「臓器」とみなされる。しかしながら、新生児は無菌で生まれるので、それは「獲得性」の臓器である；すなわち、腸のコロニー形成は、出産直後始まり、その後発展する。

腸微生物叢の発生は出産時に始まる。子宮内は無菌であり、新生児の消化管は母親（膣、皮膚、乳房など）、送達が行われる環境、空気などからの微生物によって急速にコロニー形成される。三日目から、腸微生物叢の組成は、乳児がどのように給養されているかに直接依存している：乳児用調製粉乳で給養された新生児と比較して、母乳で育てられた新生児の腸微生物叢は、例えば、主にビフィドバクテリアによって占められている。

【0019】

腸微生物叢の組成は、出産から高齢まで一生を通じて発展し、それは異なった環境的影響の結果である。腸微生物叢のバランスは、加齢過程の間に影響を受ける可能性があり、そして、結果的に、高齢者は若い成人と実質的に異なった微生物叢を有する。

優位な腸微生物叢の全般的な組成は、健康な人々のほとんどで同様であり（4種類の主たる門、すなわち、ファーマキ्यूテス、バクテロイデテス、アクチノバクテリア（Actinobacteria）、及びプロテオバクテリア（Proteobacteria））、種レベルでの組成は、非

常に個人化されていて、個人の遺伝的、環境、及び食事に大きく影響される。腸微生物叢の組成は、一時的又は恒久的に食物成分に順応するようになり得る。例えば、日本人の人々は、彼らの微生物叢が海洋細菌から取得した特異的酵素のおかげで海草（彼らの日常食の一部）を消化する。

【 0 0 2 0 】

微生物叢失調

それは変化に順応し、且つ、高いレジリエンス能力を有するが、腸微生物叢組成の不均衡はいくつかの特別な状況で生じ得る。これは「微生物叢失調」と呼ばれ、腸内における潜在的「有害」と既知の「有益な」細菌の間の不均衡、又は主たる細菌群の組成と多様性の観点から「健康な」微生物叢と見なされるものからのいずれかの偏りである。微生物叢失調は、機能性腸疾患、炎症性腸疾患、アレルギー、肥満及び糖尿病などの健康問題につながり得る。それはまた、細胞傷害性の処置又は抗生物質処置などの処置との因果関係でもあり得る。

10

【 0 0 2 1 】

特定の微生物叢失調は、病原性状況に依存することに注目され得る。例えば、クローン病（慢性炎症性腸疾患）の患者は、ファーミキューテス門に属す細菌の低いパーセンテージ及び多様性を有する、ほとんどがクロストリジウム・レプトム（*leptum*）（クラスターⅤ）群の微生物叢を示す（Manichanh et al., 2006; Sokol et al., 2006）。一般に、ラクノスピラ科の細菌が減少しているパーセンテージが観察される。そのうえ、これらの患者の粘液関連微生物叢は、ビフィドバクテリウム及びラクトバチルス属の細菌が枯渇しており、接着性且つ侵襲性の表現型（AIEC）を有するエシェリキア・コリの特定の株などの潜在的病原細菌が高いレベルに向かう（Darfeuille-Michaud et al. 2011, 2004; Jossens et al., 2011）。

20

【 0 0 2 2 】

それと反対に、肥満及び代謝異常を患っている患者は、彼らの糞便中でファーミキューテス門に属する細菌のより高い割合及び低いレベルのエシェリキア・コリを有する（Ley et al., 2005; Turnbaugh et al., 2009）。これらの患者におけるE. コリの高い割合は、肥満手術後に起こる体重減少及び低レベルの血清レプチンに関連している（Furet et al., 2010）。

【 0 0 2 3 】

しかしながら、結腸直腸癌（CRC）の患者では、腸内微生物の微生物叢失調は、バクテロイド属細菌種の富化、並びにフェカリバクテリウム及びロゼブリア属に属する種の減少に関連する（Sobhani et al., 2011; Wu et al., 2013）。具体的には、フゾバクテリウム及びカンピロバクター属が、CRC患者の糞便と粘液の両方で一貫して増加するのがわかった。

30

【 0 0 2 4 】

癌との関連において、「有益である」又は「好ましい」細菌は、事実上、ラクトバチルス及びビフィドバクテリウムであり、そして、「有害である」又は「好ましくない」細菌は、事実上、種パラバクテロイデス・ディスタノニス及びフェカリバクテリウム・ブラウスニツイー、属ゲミガー、アリスチペス及びクロストリジウム・クラスターⅤ（クロストリジウム・レプトム群）である。

40

【 0 0 2 5 】

抗腫瘍薬処置

「抗腫瘍薬処置」は、本明細書中では、外科手術以外のあらゆる癌の処置を示す。それらには、化学療法、ホルモン療法、生物療法、及び放射線療法が含まれる。

化学療法

「化学療法」は、1若しくは複数の「化学療法薬」を用いた癌処置と本明細書中に規定される。化学療法薬は、ほとんどの癌細胞の主な特性の1つである急速に分裂する細胞を殺滅するように作用する化学分子である。化学剤にはいくつかのカテゴリが存在する：

- アルキル化剤（以下でさらに規定する）；

50

- メベンダゾール、コルヒチンなどの紡錘体阻害剤；

【0026】

- 有糸分裂阻害剤（タキサン（パクリタキセル（タキソール（登録商標））、ドセタキセル（タキソテレ（登録商標）））及びピンカアルカロイド（例えばピンクリスチン、ピンブラスチン、ピノレルピン、ピンデシン）を含む）；

- 細胞傷害性／抗腫瘍抗生物質：アントラサイクリン（例えばドキソルビシン、ダウノルビシン、アドリアマイシン、イダルビシン、エピルビシン及びミトキサントロン、バルルビシン）、ストレプトマイセス（例えばアクチノマイシン、プレオマイシン、マイトマイシン、プリカマイシン）など；

- 代謝拮抗物質（ピリミジン類似体（例えばフルオロピリミジン類似体、5 - フルオロウラシル（5 - FU）、フロクシウリジン（FUDR）、シトシンアラビノシド（シタラビン）、ゲムシタピン（ジェムザール（登録商標））、カペシタビン；プリン類似体（例えば、アザチオプリン、メルカプトプリン、チオグアニン、フルダラビン、ペントスタチン、クラドリビン、カペシタビン、クロファラビン）；葉酸類似体（例えばメトトレキサート、葉酸、ペメトレキセド、アミノプテリン、ラルチトレキセド、トリメトプリム、ピリメタミン）など；

【0027】

- トポイソメラーゼ阻害剤（例えば：カンプトテシン：イリノテカン、トポテカン、アムサクリン、エトポシド、エトポシドホスファート、テニポシド）；

- DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤：2' - デオキシ - 5 - アザシチジン（DAC）、5 - アザシチジン、5 - アザ - 2' - デオキシシチジン、1 - [] - D - アラビノフラノシル - 5 - アザシトシン、ジヒドロ - 5 - アザシチジン；

- 血管破壊剤、フラボン酢酸誘導体、5, 6 - ジメチルキサンテノン - 4 - 酢酸（DMXAA）及びフラボン酢酸（FAA）など；

【0028】

- 他の化学療法薬、アプロピタント、ボルテゾミブ（ベルケイド（登録商標））、Millenium Pharmaceuticals）、メシル酸イマチニブ（グリベック（登録商標））、カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、タモキシフェン、ゲフィチニブ、エルロチニブ、カルボキシアミドトリアゾール、エファプロキシラル、チラパザミン、キシシトリン、チマルファシン、ピンフルニンなど。

【0029】

アルキル化剤

「アルキル化剤」は、タンパク質、RNA、及びDNAを含めた多くの分子をアルキル化するそれらの能力のためそのように命名されている。それらのアルキル基を介してDNAに共有するこの能力は、細胞アポトーシスを引き起こすので、それらの抗癌効果の主要原因である。アルキル化剤は、細胞のサイクルから独立した薬物なので、それらの効果は通常用量依存性である。

アルキル化剤のサブタイプは、ナイトロジェンマスタード、ニトロソ尿素、テトラジン、アジリジン、及び非古典的アルキル化剤である。ナイトロジェンマスタードとしては、メクロールエサミン、シクロホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、イホスファミド、及びブスルファンが挙げられる。ニトロソ尿素としては、N - ニトロソ - N - メチルウレア（MNU）、カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）及びセムスチン（MeCCNU）、フォテムスチン及びストレプトゾトシンが挙げられる。テトラジンとしては、ダカルバジン、ミトゾロミド及びテモゾロミドが挙げられる。アジリジンとしては、チオテパ、マイトマイシン、及びジアジクオン（AZQ）が挙げられる。非古典的アルキル化剤としては、プロカルバジン及びヘキサメチルメラミンが挙げられる。

【0030】

本願を通じて、プラチナベースの化学療法薬（「プラチナ類似体」とも呼ばれる）及びアルキル化剤と同様の様式で機能する「アルキル化様作用物質」は「アルキル化剤」のカテゴリに含まれる。これらの作用物質は、アルキル基を有しないが、それにもかかわらず

10

20

30

40

50

、DNAに損害を与える。それらは、DNA修復を妨げるようにDNAを恒久的に調整する。本明細書中に規定するアルキル化剤のこのサブカテゴリの例は、プラチナ、シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン、オキサリプラチン、サトラプラチン及びトリプラチン四硝酸塩である。

【0031】

生物療法

抗癌「生物療法」は、直接癌細胞を標的とするか、又は癌細胞に対して作用する体の免疫系を刺激（「免疫療法」）することによって癌を処置するために、生きた生物、生物から得られた物質、又は斯かる物質の実験室製造バージョンの使用を伴う。生物療法としては、モノクローナル抗体（癌細胞表面を標的とするもの、例えば、リツキシマブ及びアレムツズマブ；抗CTLA4 Mabs、イピリムバブなど；標的増殖因子：ペバシズマブ、セツキシマブ、パニツムマブ及びトラスツズマブ；抗PD-1 Mabs；抗Tim3 Mabs、抗ICOS Mabsを含む）、免疫抱合体（例えば、⁹⁰Y-イブリツモマブ・チウキセタン、¹³¹I-トシツモマブ、及びアド-トラスツズマブ・エムタンシン）、サイトカイン（IFNなどのインターフェロン；IL-2、IL-11、G-CSF、GM-CSFなどのインターロイキンを含む）、処置用ワクチン（例えば、Sipuleucel-T（プロベンジ（登録商標））、細菌バチルスカルメット-ゲラン、癌殺滅ウイルス、遺伝子療法、並びに養子細胞T細胞移植が挙げられる。

10

【0032】

プロバイオティクス、プロバイオティクス、及びシンバイオティクス

「プロバイオティクス」は、健康に有益であると主張された方法で消化器系における細菌の増殖及び/又は活性を刺激する非消化性食品構成要素である。通常、それらは、腸微生物叢の組成及び/又は活性の両方における特有の変化を可能にする選択的発酵構成要素である。

20

【0033】

「プロバイオティクス」は、消費されたときに、健康の利益が主張される微生物である。プロバイオティクスは、ヨーグルト、ダイズヨーグルト中などの特に活性な生きた培養菌が加えられた発酵食品の一部として又は補助食品として一般的に消費される。一般に、プロバイオティクスは、腸微生物叢がそのバランス、完全性、及び多様性を保つ（又は再発見する）助けとなる。プロバイオティクスの効果は通常、系統依存性である。

30

【0034】

「シンバイオティクス」は、相乗作用、したがって、シンバイオティクスの形態でプロバイオティクスとプレバイオティクスを組み合わせた栄養補助食品を指す。プレバイオティクスとプロバイオティクスを組み合わせ使用することが、シンバイオティクと説明されることが多いが、United Nations Food & Agriculture Organization (FAO)は、正味の健康利益が相乗的である場合にだけ「シンバイオティク」という用語が使用されることを推奨している。

【0035】

癌、処置など

本明細書中に使用される場合、「癌」とはすべてのタイプの癌を意味する。特に、癌は固形癌又は非固形癌である。癌の限定されることのない例は、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、肺癌、膵臓癌及び結腸癌、肉腫、リンパ腫、メラノーマ、白血病、生殖細胞癌並びに芽細胞腫などの癌腫又は腺癌である。

40

本明細書中に使用される場合、「処置する」、「処置」、及び「処置すること」という用語は、癌、特に固形腫瘍の進行、重症度、及び/又は継続のいずれかの低減又は改善を指す；例えば、乳癌において、1若しくは複数の治療法の投与から生じるその1若しくは複数の症状の軽減を指す。

【0036】

必要であるときには、他の定義が以下で指定される。

第一の態様によると、本発明は、癌患者に投与される抗腫瘍薬処置にアジュバントとし

50

て使用するための、エンテロコッカス・ヒラエ、ラクトバチルス・ジョンソニー、セグメント細菌（SFB）、ポルフィロモナス、バーンシエラ、ホールデマニア、及びその混合物から成る群から選択される細菌を含むプロバイオティクス組成に関係する。

【0037】

本発明のプロバイオティクス組成物の好ましい実施形態によると、前記組成物は、エンテロコッカス・ヒラエと、ポルフィロモナス、バーンシエラ、及びホールデマニアの中から選択される少なくとも1つの菌株を含む。上記組成物のためのエンテロコッカス・ヒラエの好ましい菌株は、番号I - 4815で2013年11月7日にCollection Nationale de Cultures de Microorganismes（CNCM）に寄託された菌株である。斯かる組成物は、番号I - 4823で2013年11月15日にCollection Nationale de Cultures de Microorganismes（CNCM）に寄託されたラクトバチルス・ジョンソニー菌株LJFS001Bなどのラクトバチルス・ジョンソニー菌株を有利にさらに含み得る。

10

【0038】

上記のプロバイオティクス組成物は、有利に経口投与のために処方され、そして、栄養補助食品又は機能性食品として投与され得る。当業者は、生きた又は死滅した微生物を包含し得る、栄養補助食品（例えば、丸薬、錠剤など）として又は飲料、発酵ヨーグルトなどの機能性食品として提供され得る様々な処方を知っている。

【0039】

好ましい実施形態によると、本発明によるプロバイオティクス組成物は、抗腫瘍薬処置の投与、例えば、前記患者へのシクロホスファミド（CTX）などの化学療法薬の投与の後に、処置を必要としている患者に投与される。例えば、プロバイオティクス組成物は、CTX用量と同じ日に投与されても、又は処置の数日後に投与されてもよい。機械のように規則正しいCTX投与の場合には、プロバイオティクス組成物は、毎日、それぞれのCTX摂取後に又は同時であっても投与されうる。あるいは、本発明によるプロバイオティクス組成物は、抗腫瘍薬処置の投与前に処置を必要としている患者に投与される。

20

いくつかの化学療法薬（特にCTX）は、抗癌ワクチンに対して効果的なアジュバントとして記述されている。本発明によるプロバイオティクス組成物の特に有用な適用は、さらに癌ワクチンの有効性を増強するための、斯かる化学療法薬と組み合わせたその利用である。

【0040】

癌患者を処置するための方法であって、前記患者に単独で又は抗癌ワクチンと組み合わせて、化学療法薬を投与する前又はその後に、プロバイオティクス微生物組成物、例えば先に記載したものなどを投与することを含む方法もまた、本発明の一部である。

30

上記組成物は、抗腫瘍薬処置、例えば（単独又は抗腫瘍ワクチンと組み合わせた）化学療法などで処置された任意の患者に適切に投与され得るが、それらは前記プロバイオティクス組成物中に存在する種の過少出現を伴う微生物叢失調を有する患者において特に有用である。

【0041】

本発明の別の態様は、癌を処置するために前記個人に投与したときに、個人の腸微生物叢においてフィルミクテス/バクテロイデス比を低下させる、具体的には、SFB及び/又はポルフィロモナス科を増強し、及び/又はクロストリジウム属第IV群を減少させる化学療法薬と抗生物質組成物の組み合わせの使用である。特定の実施形態によると、抗生物質組成物は、バンコマイシンとイミペナムの組み合わせを含むか又はそれらから成る。別の特定の実施形態によると、抗生物質組成物は、ネオマイシンとセファロチンの組み合わせを含むか又はそれらから成る。有利なことには、先に記載したように抗生物質組成物と組み合わせで使用される化学療法薬は、シクロホスファミド（CTX）である。

40

【0042】

本明細書中に使用される場合、「組み合わせ」という用語は、2つ以上作用物質の使用を指す（例えば、バンコマイシン+イミペナム及びCTX）。「組み合わせ」という用語の使用は、処置薬が患者に投与される順序を制限しないが、化学療法薬より先に又はそれ

50

と同時に抗生物質のカクテルを投与するのが望ましい。例えば、バンコマイシンとイミペナムは、C T Xの前（例えば24時間、48時間、72時間、96時間、1週間に、2週間、3週間、4週前）、規則的に又は何度か（例えば、毎日）、好ましくは抗腫瘍薬処置を投与する前の3～7日間、投与され得る。有利なことには、抗生物質組成物は、前記化学療法薬（C T Xなど）の効果を最適化するように患者の腸微生物叢を調節するために、化学療法薬の投与前に投与される。したがって、本発明は、癌患者を処置するための方法であって、（単独又は抗癌ワクチンと組み合わせた）化学療法薬を投与する前に、フィルミクテス/バクテロイデス比を低下させる、具体的には、前記個人に投与されたときに個人の腸微生物叢中の、S F B及び/又はポルフィロモナス科を増強し、及び/又はクロストリジウム属第ⅠⅤ群を減少させる抗生物質組成物を投与することを含む方法を提供する。

10

【0043】

本発明はまた、前記患者に投与される化学療法薬の抗癌効果を増強するためのアジュバント療法として、フィルミクテス/バクテロイデス比を低下させる、具体的には、前記個人に投与されたときに、個人の腸微生物叢中のS F B及び/又はポルフィロモナス科を増強し、及び/又はクロストリジウム属第ⅠⅤ群を減少させる抗生物質組成物の使用に係する。実際には、以下の実験部分で例示されるように、例えばC T Xなどの化学療法薬の抗癌効果を増強するために、抗生物質及び/又はプロバイオティクスの使用によって患者の腸微生物叢を調節することは、有用であり得る。バンコマイシン+イミペナムやネオマイシン+セファロチンなどの抗生物質組成物は、この目的に特に有用である。

20

本発明の別の目的は、癌患者に投与される抗腫瘍薬処置に対するアジュバントとしての使用のための、エンテロコッカス・ヒラエ、ラクトバチルス・ジョンソニー、エンテロコッカス・フェカリス、セグメント細菌（S F B）、ポルフィロモナス、バーンシエラ、ホールデマニア、及びその混合物から成る群から選択される細菌の断片を含む免疫原性組成物である。

【0044】

好ましい実施形態によると、免疫原性組成物は、エンテロコッカス・ヒラエの断片、より好ましくは菌株C N C M I - 4815の断片を、ポルフィロモナス、バーンシエラ、及びホールデマニアから成る群から選択される少なくとも1つの菌株の断片と一緒に含む。

30

本発明による免疫原性組成物は、皮下又は筋肉内投与のために好ましくは処方される。それらは、有利なことには、処置に対するアジュバント効果を有する免疫応答を誘発するために、C T Xなどの化学療法薬の投与の前に、同時に又は後で投与され得る。

本発明は更に、化学療法薬と組み合わせた養子細胞移植の際の細胞組成物及びその利用に係する。患者から様々な免疫細胞型を得るための技術、及び斯かる細胞を生体外でパルス又は教育するための技術は、当業者に周知である。斯かる技術は、とりわけ、Cauxら(1996)、Sallust (1994)、Palucka (2013)、Vanlint (2014)、Arrntzen (2008)、及びLesterhuis (2008)による説明されている。本発明による第一の細胞組成物は、先に記載のとおりプロバイオティクス組成物又は免疫原性組成物を用いて生体外でパルスした、樹状細胞(D C)などの抗原提示細胞(A P C)を含む細胞組成物である。好ましい実施形態によると、細胞組成物中に存在する抗原提示細胞はまた、腫瘍抗原を用いて生体外でパルスされた。

40

【0045】

本発明による細胞組成物は、養子細胞移植を抗腫瘍薬処置に組み合わせることによって、癌を処置するのに特に有用である。臨床状況によって、医師は斯かる細胞組成物をどのように投与するか決める。特に、これらの組成物は、節内注射、静脈内注射又は皮下注射によって投与されてもよい。

【0046】

本発明の別の養子細胞移植法によると、上記A P C組成物は、患者に教育T細胞、特に免疫記憶T細胞を再注入する前に、患者から得られたT細胞を生体外で「教育する」ため

50

に使用できる。したがって、上述のとおり、癌患者からのT細胞をAPC組成物と生体外で接触させること含むプロセスによって得られた免疫記憶T細胞を含む細胞組成物もまた、本発明の一部である。斯かるT細胞組成物は、有利なことには、単独で又は抗腫瘍性ワクチン接種と組み合わせて投与される、化学療法（特にCTX投与）などの抗腫瘍薬処置の効果を増強するためのアジュバントとして養子細胞移植において使用され得る。樹状細胞に関する場合、T細胞は、臨床状況によって、節内注射、静脈内注射又は皮下注射によって投与され得る。

【0047】

本発明はまた、化学療法薬の抗癌活性を改善することができるT細胞を生体外で取得するための方法であって、エンテロコッカス・ヒラエ、ラクトバチルス・ジョンソニー、セグメント細菌（SFB）、ポルフィロモナス、バーンシエラ、及び/又はホールデマニアからの樹状細胞（DC）提示ペプチドを用いてポリクローナルT細胞株又は大量の自己T細胞を生体外で増加させることを含む方法に関連する。

本発明の別の態様は、化学療法に対する優れた応答者である可能性が高い患者を同定するインビトロにおける方法であって、前記患者においてTLR4、NOD1、及びNOD2の機能性を測定することを含み、ここで、前記患者が、機能的なTLR4及び/又はNOD1/CARD4（rs2006847、rs2066844、rs2066845、rs2066842、ND（1）+32656、rs2075820、...）及び/又はNOD2/CARD15（p.R702W、p.G908R、p.Leu1007fsX1008など）を欠いている場合、該患者が化学療法（アントラサイクリン系及びオキサプラチン、及び放射線療法以外のすべて）に対する優れた応答者と同定される。2つの同時分離一塩基変異多型（SNP）-Asp299Gly及びThr399Ile-は、TLR4をコードする遺伝子内で同定された。これらのSNPは、白人の個人の約10%に存在し、いくつかの感染症で明確に関連するのがわかった。この方法の特定の実施形態において、これらのSNPのうち的一方又は両方の存在又は不存在は、例えば、PCRによって又は当業者によって知られているその他の方法によって決定される。

【0048】

別の実施形態によると、本発明は癌患者が抗腫瘍薬処置の恩恵を受けるかどうかをインビトロにおいて決定する方法であって、以下のステップ：

（i）前記患者からの適切な生物学的サンプルから、癌及び化学療法の具体的状況の中で「好ましくない」細菌、例えば前記患者の腸微生物叢中の種パラバクテロイデス・ディスタノニス及びフェカリバクテリウム・プラウスニツイー、属ゲミガー、アリスチペス、及びクロストリジウム属クラスタIV（群クロストリジウム・レブツム；Collinsらによってクロストリジウム属細菌の分類学説明に記載のとおり）からの細菌を含むか又はそれらから成る群からの細菌、の相対量を測定し；適宜、同じ生物学的サンプルにおいて、癌及び化学療法の具体的状況の中で「好ましい」細菌、例えば属ラクトバチルス及びビフィドバクテリウムからの細菌、の相対量も決定し；例えば、ファームキ्यूテス/（バクテロイダレス）の比の低下が観察される場合、科ポルフィロモナス科、SFB...からの細菌の存在もまた測定され；

（ii）腸微生物叢失調の存在又は不存在を決定すること、を含み、

【0049】

ここで、ステップ（i）で挙げられた分類群からの「好ましくない」細菌の過剰発現を伴った腸微生物叢失調が、患者が抗腫瘍薬処置に対して優れた応答者にならないことを示す方法に係る。

先の内容では、「相対量」は生物学的サンプル中の細菌の総数のパーセンテージとして特定の分類学レベル（門から種まで）の細菌数と規定される。この相対量は、例えば、これらの細菌に割り当てられている、サンプル中に存在する16SrRNA遺伝子配列のパーセンテージを計測することによって、評価できる。それは、当業者によって知られている任意の適切な技術、例えば以下の実験の項に記載の454パイロシークエンシング及び

これらの特定の細菌 16S rRNA 遺伝子マーカーの定量的 PCR、又は細菌群に特異的な任意の遺伝子の定量的 PCR、によって計測できる。

【0050】

当該テキストにおける、「処置に対する優れた応答者」とは、「応答者」又は「感受性のある」患者、又は言い換えれば、この処置から「恩恵を受ける」患者とも呼ばれ、癌に罹患していて、且つ、この処置を受けた後に、臨床的に有意な癌の軽減を示すか又は示すであろう患者を指す。疾患の臨床データは、免疫型関連応答基準 (irRC)、WHO 又は RECIST 評価基準などの当該技術分野で認識されている基準に従って評価され得る。

【0051】

特定の実施形態によると、生物学的サンプルは、患者から得られた十二指腸又は回腸粘膜の生検検体（好ましくは大きい生検検体）のバイオフィルムである。例えば、この生検検体は、膵臓、胃、胆道又は結腸癌の特定の外科手術中に得ることもできた。

任意のタイプの癌に関する別の実施形態によると、生物学的サンプルは、患者から入手された検便である。このサンプルは、診断の時点で又は例えば、処置の開始を決める前の任意の時点で採取されてもよかった。

【0052】

先に規定されるような「好ましくない」菌の過剰発現を伴った腸微生物叢失調が観察されるとき、これは、患者が抗腫瘍薬処置を始める前又は前記の処置のアジュバントとして腸微生物叢のバランスをとるために処置（例えば、化学療法の前 / 開始時のプレバイオティクス又はプロバイオティクス投与）を必要とすることを示す。したがって、抗腫瘍薬処置を始める前の期間中（例えば、数週間）に、（プレ又はプロバイオティクスを提供する）患者の投薬計画に適合させるように決定されてもよい。

【0053】

別の態様によると、本発明は、抗腫瘍薬処置が癌患者のために続けられるべきか又は中止されるべきかインビトロにおいて決定する方法であって、以下のステップ：

(i) 抗腫瘍薬処置の開始から少なくとも 3 週間後、好ましくは抗腫瘍薬処置の開始から 6 ~ 9 週間後（3 サイクルの化学療法に相当）に得られた前記患者からの生物学的サンプルから、少なくとも 1 つの片利共生種の細菌（好ましくは少なくとも 2、より好ましくは少なくとも 3、4 つ以上の片利共生）に対して向けられた免疫記憶 CD4⁺ T 細胞応答を分析し；

【0054】

(ii) CD4⁺ T 細胞応答が分析されるそれぞれの片利共生種について、応答を以下のカテゴリ：

- 免疫記憶 CD4⁺ T 細胞応答なし；
- Th10 : Tr1 / Tre g 表現型の免疫記憶応答；
- Th1 表現型の免疫記憶応答、

のうちの 1 つに分類することを含み、

【0055】

ここで、Th1 表現型の免疫記憶応答が少なくとも 1 つの片利共生種に関して観察される場合、該抗腫瘍薬処置が続けられ、そして、斯かる応答の不存在では、抗腫瘍薬処置が中止されるか又は適切なプロバイオティクスで補われる（以下を参照のこと）、方法に関係する。

【0056】

この薬力学的アッセイは、この化学療法がアジュバント免疫応答及び臨床利益を引き起こす可能性があるかどうか、化学療法の 3 ~ 9 週後（化学療法の 1 ~ 3 サイクル）、好ましくは化学療法の 6 ~ 9 週後（2 ~ 3 サイクル）に予測するために特に有用である。

【0057】

応答を分類するために、IL-2、TNF、IFN 及び IL-10 の分泌が生体外再刺激アッセイで評価される。好ましい実施形態において、処置の数週間後のサイトカイ

10

20

30

40

50

ン分泌特性を処置前に観察したものと比較するために、最初のアッセイは処置開始前におこなわれる。これらのアッセイは、例えば、規定した細菌を添加し、そして、自家血液から精製されたCD4⁺CD45RO⁺T細胞とインキュベートした患者の自己単球を使用して実施され得る。特に処置の前後に得られた結果と比較したときに、それがTh1表現型の応答であった場合、すなわち、再刺激がIL-2、TNF及びIFNの有意な分泌及びIL-10の低い分泌を引き起こした場合、応答が第三の(好ましい)カテゴリに分類される。一般的に、Th1表現型の応答を有している患者にとって、(処置前と比較して)IFNの少なくとも2倍増の分泌が処置後に観察される。第一のカテゴリ(免疫記憶CD4⁺T細胞応答なし)は、処置後の再刺激アッセイにおける有意なサイトカイン分泌の不存在に該当するのに対し、第二のカテゴリは、処置後の再刺激アッセイにおけるIL-10分泌が処置前に観察されたものより優れている応答に該当している。

10

【0058】

上記の方法の特定の実施形態によると、ラクトバチルス・ジョンソニー、エンテロコッカス・ヒラエ及びエンテロコッカス・フェカリスの中から選択される少なくとも2つの種に対する免疫記憶CD4⁺T細胞応答が分析される。好ましくは、これらの2つに対する、より好ましくはこれらのすべてに対する応答が評価される。

この薬力学的方法の1つの特に有利な態様は、それが血液サンプルを使用して行われるということである。もちろん、どんな種類の癌を患っている患者のためにおこなわれ得る。

【0059】

20

第三の態様によると、本発明は、インビトロにおける、患者に投与されたネオアジュバント抗腫瘍薬処置の生物学的効果を決定する方法であって、以下のステップ：

(i) 前記患者からの適切な生物学的サンプルから、前記微生物叢中の「好ましい」細菌の相対量を測定し；

(ii) 同じ生物学的サンプルから、前記腸微生物叢中の「好ましくない」細菌の相対量を測定し；

(iii) 好ましい細菌の存在量と好ましくない細菌の存在量との間の比を計算すること、
を含み、

ここで、前記比が予定された閾値を超えている場合、結果は、ネオアジュバント抗腫瘍薬処置がT-bet/Th1局所的及び全身的免疫応答を引き起こしたことを示す方法に關係する。

30

【0060】

上記の方法を実施するために、「好ましい」細菌は、属ラクトバチルス及びビフィドバクテリウムを含む又はそれらから成る群からの細菌であってもよく、そして、「好ましくない」細菌は、種パラバクテロイデス・ディスタノニス及びフェカリバクテリウム・ブラウスニツイー、並びに属ゲミガー、アリスチペス及びクロストリジウム・クラスターEV(クロストリジウム・レブツム群)を含む又はそれらから成る群からの細菌であってもよい。

【0061】

40

当業者は、各群(例えば、パイロシークエンシング又は定量的PCR)からの細菌の相対量を測定するのに使用される技術に依存する、且つ、患者の各群の定義に依存する適切な閾値を決定する。実際、すべての癌患者について独特な閾値を決定することができないので、比は、患者の健康や食習慣を含めたいくつかの因子を考慮して正しく評価されなければならない。

【0062】

上記方法を実施するために、生物学的サンプルは、好ましくは、患者から得られた十二指腸又は回腸粘膜の生検検体からの(好ましくは大きい生検検体からの)バイオフィルムである。例えば、この生検検体は、脾臓、胃、胆道又は結腸癌における特定の外科手術中に得てもよい。

50

重要なことには、先に記載した方法は、化学療法、生物療法、放射線療法、ホルモン療法などを含めた、先に規定される任意の抗腫瘍薬処置に対する癌患者の応答性を予測又は診断するために実施される。特に、これらの方法は、癌患者に関して、化学療法の、より特に、先に引用したものなどのアルキル化剤又は白金塩、及び/又は抗腫瘍ワクチンを用いたものの、(潜在的)利益を評価するのに特に有利に使用され得る。以下の実験データは、シクロホスファミド(実施例1、3及び4)、ドキシソルピシン(少なくとも図14を参照のこと)及びオキサリプラチン(実施例2)によって誘発された免疫応答に対する微生物叢の役割を明確に記載している。興味深いことに、実施例3~5は、マウスにおいて得られた結果がヒトに対して推定される可能性があることを示す。実験データは、「有益な」微生物叢もまたアントラサイクリン(図8)による処置の効率に対してプラスの影響を有し、且つ、明らかに、フェカリバクテリウム・プラウスニッツイーなどの免疫調整の役割を有する細菌種が腸微生物叢中に多すぎる場合、これらの細菌は薬剤効率にマイナスの影響を与えることを示す。

10

【0063】

本発明はまた、癌を処置するために、T-bet/Th1局所的及び全身的免疫応答を引き起こすために抗悪性腫瘍薬と組み合わせて使用するための、ラクトバチルス・ジョンソニー、エンテロコッカス・ヒラエ、及びエンテロコッカス・フェカリスから成る群から選択されるプロバイオティクス菌株にも関連する。

本発明によるプロバイオティクスの例は、番号I-4823で2013年11月15日にCollection Nationale de Cultures de Microorganismes(CNCM)に寄託されたラクトバチルス・ジョンソニー菌株LJFS001B、及び番号I-4815で2013年11月7日にCollection Nationale de Cultures de Microorganismes(CNCM)に寄託されたエンテロコッカス・ヒラエ菌株EHFS001である。

20

【0064】

好ましい実施形態によると、本発明によるプロバイオティクス菌株は経口投与のために処方される。当業者は、生きた又は死滅した微生物類を含み得る、且つ、栄養補助食品(例えば、丸薬、錠剤など)として又は飲料、発酵ヨーグルトなどの機能性食品として提供され得る様々な処方を知っている。

本発明はさらに、癌患者を処置するための、抗腫瘍薬処置と組み合わせた斯かるプロバイオティクスの使用に関連している。

30

【0065】

本明細書中に使用される場合、「組み合わせ」という用語は、2つ以上の作用物質(例えば、プロバイオティック株と化学療法薬)の使用を指す。「組み合わせて」という用語の使用は、治療法が患者に投与される順序を限定しないが、抗腫瘍薬処置の前又はそれと同時にプロバイオティック株を投与するのが望ましい。例えば、プロバイオティック株は、抗腫瘍薬処置が投与される前に規則的又は何度か(例えば、毎日)、抗悪性腫瘍薬に先立って(例えば、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、又は12週間前に)投与され得る。

【0066】

40

好ましい実施形態によると、本発明によるプロバイオティクス菌株は、化学療法薬又は生物学的免疫療法と組み合わせて、例えばアルキル化剤又は免疫療法による処置と組み合わせて使用される。

少なくとも、番号I-4823で2013年11月15日にCollection Nationale de Cultures de Microorganismes(CNCM)に寄託されたラクトバチルス・ジョンソニー菌株LJFS001B(図26A)、及び/又は番号I-4815で2013年11月7日にCollection Nationale de Cultures de Microorganismes(CNCM)に寄託されたエンテロコッカス・ヒラエ菌株EHFS001(図26B)を含んでいる組成物もまた本発明の一部である。本発明による組成物は、栄養補助食品(例えば、丸薬、錠剤、シロップなど)の形態であっても、又は飲料、発酵ヨーグルトなどの機能性食品の形態であっ

50

てもよい。プロバイオティクスはこれらの組成物中で優先的に生存している。

【0067】

別の態様によると、本発明は、前記患者を処置するための、優先的に化学療法（例えば、アルキル化剤を用いる）又は免疫療法（例えば、抗腫瘍ワクチン、．．．）などの抗腫瘍薬処置と組み合わせ、癌患者から得られたCD4⁺T細胞由来の「病原性」Th17（pTh17）細胞の養子細胞移植に関連する。例えば、CD4⁺未感作T細胞を血液から得、次に、増幅し、そして、pTh17表現型（例えば、IL-1、IL-6、IL-21、IL-23、及び適宜IL-1b+IL-9の存在下）並びにTCR架橋（抗CD3/抗CD28 Abでコートしたビーズなど）に都合がよいサイトカインの存在下、生体外で刺激した。先に記載したように、pTh17細胞は、Th1細胞（転写因子T-betの核発現、IFNの細胞質発現、及びケモカイン受容体CXCR3の表面露出）及びTh17細胞（ROR γ t、IL-17及びCCR6の発現）の顕著な特徴を共有する。細胞の表現型は、患者へのそれらの移植前に制御される。必要であれば、生体外で得られた細胞は、pTh17表現型を呈するものだけを保有するように選別される。

【0068】

本発明の他の特徴はまた、本発明の枠組みの中で実施され、且つ、その範囲を制限せずに必要な実験的支援と共にそれを提供する生物学的アッセイに付け加える説明の過程でも明らかになる。

【実施例】

【0069】

実施例1：腸微生物叢はシクロホスファミドの抗癌性免疫効果を調節する - マウス研究材料と方法

注意：相容れない適用がない限り、当該実施例に記載のある材料と方法は、他の実施例で使用されたものでもある。

【0070】

動物と腫瘍モデル。すべての動物実験を、フランス及びヨーロッパの法律及び規制を遵守して実施した。マウスを7～14週齢で使用した。WT SPF C57BL/6J及びDBA2/Jマウスを、Harlan, Charles River又はJanvierから入手し、そして、特定病原菌未感染条件（SPF）内に保持した。Nod1^{-/-}Nod2^{-/-}及びNod2^{-/-}C57BL/6JマウスはI. Gomperts Boneca (Institut Pasteur, France) によって提供され、Myd88^{-/-}C57BL/6JマウスはB. Ryffel (CNRS, France) によって提供され、及びC57BL/6J無菌マウスはCDTA (Orleans, France) 又はInstitut Pasteurから入手し、そして、無菌のアイソレータ内で維持した。MCA205、B16F10（C57BL/6Jマウスの同系）及びP815（DBA2/Jマウスの同系）を、10%のFCS、2mMのL-グルタミン、100 IU/mlのペニシリン/ストレプトマイシン、1mMのピルビン酸ナトリウム、及びMEM非必須アミノ酸（Invitrogen）含有RPMI 1640中で37、5%CO₂にて培養した。0.5～1×10⁶個のMCA205、0.3×10⁶個のB16F10又は0.8×10⁶個のP815腫瘍細胞を右側部にs.c.で接種した。腫瘍が35～60mm²に達したときに、ドキソルビシン（Doxo）の腫瘍内投与（2mM、50μl）又はCTXの腹腔内接種（100mg/kg体重）によって化学療法を実施した。

【0071】

化学療法を使用した肺腺癌担持KPマウスの処置。8週齢のKrasLSL-G12D/WT; p53^{Flox}/Floxマウスに、鼻腔内滴下によってCreリコンビナーゼを発現するアデノウイルスを与えた（d0と規定）。Creリコンビナーゼシステムは、肺のいくつかの体細胞内で発癌性Kras（KrasG12D）を活性化し、そして、p53を非活性化する；グレード3及び4の腺癌は～d70で目に見えるようになる（Cortez-Retamozo et al., 2013）。マウスは、未処置のままのか、又は0.25mg/mlバンコマイシンの不存在又は存在下（d77に開始し実験終了まで飲料水中に混合して；抗生物質含有水は隔週で置き換えた）、化学療法（d84、d91、及びd98）を与えた

。腫瘍体積を、先に記載した断層撮影技術 (Cortez-Retamozo et al., 2013) によって麻酔下のマウスで、d 73 及び 100 に定量した (「プレ」及び「プロ」化学療法に相当)。データは、2つの時点の間の全肺腫瘍体積 (平均 ± S E M) の絶対変化を示す。

【0072】

試薬。シクロホスファミド (C T X) (エンドキサン、Baxter) は Institut Gustave Roussy によって提供された。塩酸ドキシソルピシン (D 1 5 1 5) 及びフルオレセインイソチオシアナートデキストラン (F I T C デキストラン) (4 6 9 4 4、4 k D a) を Sigma Aldrich から入手した。C D 3、C X C R 3 (C X C R 3 - 1 7 3)、C D 4 (G K 1 . 5)、C D 8 (5 3 - 6 . 7)、T C R (G L - 3)、I L - 1 7 (e B i o 1 7 B 7)、I F N (X M G 1 . 2)、T - b e t (4 B 1 0)、R O R t (A F K J S - 9)、C D 4 5、C C R 6 (1 4 0 7 0 6) に対する抗マウス抗体を BioLegend、e Bioscience、及び R&D から入手した。生存染色のための L I V E / D E A D 定着性黄色染色蛍光色素を Invitrogen / Molecular Probes から購入した。すべての細胞を、F l o J o (Tree Star) ソフトウェアを用いた C y a n (Beckman Coulter) 又は F A C S C A N T O I I (B D) フローサイトメータにより分析した。

【0073】

抗生物質プロトコール。マウスを、腫瘍移植前の 2 ~ 3 週間、抗生物質で処置し、そして、実験終了まで続けた。アンピシリン (1 m g / m l) + ストレプトマイシン (5 m g / m l) + コリスチン (1 m g / m l) (Sigma Aldrich) の混合物、又はバンコマイシン (0 . 2 5 m g / m l) 又は コリスチン (2 = 2 1 e j . 1 0 3 U / m l) だけを無菌の飲料水中に加えられた。溶液とボトルを 1 週間に 2 ~ 3 回交換した。抗生物質活性を、盲嚢 (拡張) のレベルで観察される巨視的な変化によって、並びに B H I + 1 5 % グリセロール中に再懸濁した糞便ペレットを血液寒天平板及び嫌気性血液寒天平板上で、それぞれ好気性条件向けの 5 % の C O ₂ を用いて 3 7 にて 4 8 h 又は嫌気性条件で培養することによって、分析した。図 4 に示した実験で、バンコマイシンは異なった片利共生種 (E . コリ及びクロストリジウム属の別の種など、図 1 6) に向かって片利共生細菌のレパートリーを偏らせたが、コリスチンは E . フェカリスの増殖を促進した。

【0074】

細菌の分離、培養、及び識別。腸間膜リンパ節と脾臓を、無菌的に摘出し、P B S 中で打ち崩し、そして、好気性及び嫌気性増殖のために C O S 寒天平板 (BioMerieux) 上で平板培養した。培養の 4 8 h 後に、単一コロニーを単離し、そして、- 8 0 にてグリセロール中に保存した。

【0075】

未処置マウス又は N a C l 若しくは C T X、バンコマイシン若しくは広域抗生物質 (A T B) (アンピシリン + ストレプトマイシン + コリスチン) で処置した腫瘍担持体からの糞便の段階希釈物を、C O S 寒天平板上で平板培養し、そして、4 8 h 後に、単一コロニーを単離し、グラム染色を実施した。具体的な細菌の識別を、形態学的試験と V I T E K (登録商標) 自動化システムによる分析 (BioMerieux, France) とを組み合わせ実施し、そして、Pasteur Institute, Paris, France. で実施した質量分析法 (T O F - M A L D I、以下を参照のこと) によって確認した。

【0076】

実験に使用される P . ディスタノニスは、長期間の広範囲 A T B で処置された S P F マウスの糞便から単離され、そして、先に記載したように同定された。試験管内実験のために、E . ヒラエ、E . フェカリス、及び E . コリを B H I 培地 (Fluka analytical) 中で培養し、一方で、L . ジョンソニー、L . プランタルム及び L . ムリヌスは M R S 培地 (B D) 中で 3 7 にて、増殖が指数関数的になったときに、それらが O D ₆₀₀ = 1 に達するまで培養した。L . ロイテリを、3 7 にて 4 8 h、嫌気性条件で C O S 寒天平板上に培養した。投薬量を評価できるように、菌調製物の段階希釈物を平板培養した。E . コリ M C I 0 6 1、E . フェカリス J H 2 - 2、及び L . プランタルム N C I M B 8 8 2 6 は親切なことに I . Gomperts Boneca, Institut Pasteur, France によって提供された。P

．ディスタノニスを、嫌気性条件で48 h、COS寒天平板上で培養し、次に、コロニーを $OD_{600} = 1$ に達するまでPBS中に再懸濁した。

【0077】

細菌の識別をMALDI-TOF分析と16S rRNA遺伝子配列決定法でおこなった。MALDI-TOF MS分析法を次のように準備した細胞でおこなった。菌株をMRS寒天上で37℃にて一晚培養した。約5～10 mgの細胞を、300 µlの無菌の超純水及び900 µlの無水エタノール中に再懸濁し、チューブを軽くたたくことによって均質化し、13000 gで2分間遠心分離し、そして、上清を捨てた。それに続いて、50 µlのギ酸をペレットに加え、攪拌し、その後、50 µlのアセトニトリルを添加した。混合物を、13000 gで2分間、再び遠心分離した。1マイクロリットルの上清をMALDI-TOFサンプルプレート上にスポットし、そして、室温で風乾した。各サンプルを1 µlの(HCCA)マトリックス溶液(Bruker Daltonics ref 201344: 50%アセトニトリル-2.5%トリフルオロ酢酸中の4-ヒドロキシ桂皮酸の飽和溶液)で覆い、そして、室温で風乾した。計測は、flexcontrolソフトウェア(バージョン3.0)を使用したAutoflex質量分析計(Bruker Daltonik GmbH, Germany)を用いて実施した。スペクトルを、正の直線モード(レーザー周波数、200 Hz、イオン源1、20 kVの電位; イオン源2、18.4 kVの電位; レンズ電位、9.1 kV、質量範囲、2000～20000 Da)で記録した。自動化データ解析において、未加工スペクトルを既定の設定を用いてMALDI BioTyper 2.0ソフトウェア(Bruker Daltonik GmbH, Germany)を使用して加工した。試験した菌株からの16S rRNA遺伝子を、ユニバーサルプライマーA、5'-AGAGTTTGATCA TGGCTCAG-3' (配列番号1) (8～27位、エシェリキア・コリのナンバリング)及びH、5'-AAGGAGGTGATCCAAACCGCA-3' (配列番号2) (1541～1522位) (Bottger, 1989)を使用したPCRによって、GeneAmp (登録商標)サーマルサイクラー(Perkin-Elmer, Wellesley, MA)及び以下の: 94℃にて4分、25サイクルの94℃にて1分、57℃にて1分、72℃にて2分、そして、72℃にて5分の最終的な伸長ステップを伴うパラメーターにより増幅した。PCR作製した単位複製配列の配列決定を、プライマーA、H、及び他の2つの配列決定プライマー(E. コリナンバリングシステム): B、5'-CTCCTACGGGAGGCGAGCAGGT-3' (配列番号3)、339～358位; 及びG、5'-GCATGTGGTTTAAATTCGA-3' (配列番号4)、947～964位を使用してGATC Companyによって実施した。16S rRNAをコードする遺伝子のほとんど完璧な配列を、ソフトウェアBioNumericsバージョン6.6 (Applied-Maths, Belgium)を使用して構築し、その後、NCBI BLASTプログラムによりブラスト処理した。

【0078】

腸組織の組織像と免疫蛍光法。小腸全体(十二指腸、空腸、及び回腸)を摘出し、糞便内容物を掃除し、そして、4%のPFA中で1 h固定した。組織の再水和を15%のスクロース中で1 h、そして30%のスクロース中で一晚実施した。実験によって、小腸を全体的に丸めるか又は小片になるまで細断し、次に、最適なカッティング温度(OCCT)化合物(Sakura)に包埋し、急速冷凍し、そして、縦又は横6 µmの切片を調製した。

【0079】

組織学分析のために、縦切片をヘマトキシリンとエオシンによって対比染色した。組織学的定量分析法のために、炎症性病巣、変化した絨毛、及び粘膜固有層の厚さを各部分についてスコア化し、それと同時に、杯細胞の数を各絨毛についてカウントした。パネート細胞のカウントのために、縦切片を、0.5%のトリトンで15分間、透過処理し、そしてそれを、0.1%のトリトン、5%の血清、及び1%のBSAの溶液で1 hブロックした。次に、リゾチームタンパク質に対するウサギポリクローナル抗体(1:500で1 h、Thermo Scientific)及びヤギ抗ウサギIgGのAlexa Fluor 488 Fragment(1:300で1 h、Molecular Probes)を使用した。すべてのステップを室温で実施した。リゾチーム陽性面積を、モザイク像に対してHistolabソフトウェア(Micro vision Instr

uments) を使用して定量化した。パネート細胞の定量を、リゾチーム陽性クラスター (パネート細胞の群) の平均面積、並びにそれらのクラスターの放出 / μm^2 、を計測することで実施した (未掲載)。

【0080】

腸の白血球の蛍光抗体法。TCR⁺と TCR⁻ T細胞の定量化のために、横切片を0.1%のトリトン及び10%のヤギ正常血清の溶液で1hブロックした。次に、切片を、ハムスター抗 TCR (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ O/N 4、BD Pharmingen) 及び二次抗体としてのヤギ抗ハムスター A488 (7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で45分、Jackson ImmunoResearch)、又はハムスター抗マウス CD3 A647 (5 g/ml で2h、Biolegend) を用いて免疫染色した。各切片について、全細胞、TCR⁺ CD3⁺ 及び CD3⁺ 細胞の数をカウントして、TCR⁺と TCR⁻ T細胞のパーセンテージを決定した。

10

【0081】

生体内における腸透過性アッセイ。腸のバリア完全性を、FITC-デキストラン (4 kDa、Sigma Aldrich) の透過性によって評価した。100又は200 mg/kgのNaCl又はCTXのi.p.注射の14時間後に、マウスを4時間絶食させ、次に、0.6 mg/g体重 (NaCl中に80 mg/ml、NaCl/CTX処置の18h後) にてFITC-デキストランを経口的に摂取させた。3~4h後、マウスを安楽死させ、そして、心臓の穿刺によって放血させた。血漿FITCレベルをそれに続いて分光蛍光光度計を使用して決定した ($e_x / e_m = 485 / 535 \text{ nm}$)。

20

【0082】

小腸からの粘膜固有層細胞の分離。十二指腸及び回腸の全体を採取し、パイアー斑、並びにすべての脂肪部分及び糞便内容物を取り除いた。全長に沿った第一の長軸方向でそれらを切り、次に、1~2cmの長さの小片に横方向に切ることによって、小さな断片を得た。上皮内リンパ球 (IELs) を取り除いた後に、腸の小片をさらに切り、粘膜固有層細胞 (LPCs) を単離するために、振盪しながら37℃にて40分間、0.25 mg/mlのコラゲナーゼV III及び10 U/mlのDNアーゼIと共にインキュベートした。消化後に、腸の小片を細胞濾過器で潰した。FACS分析のために、細胞懸濁液を2100 RPMにて20分のパーコールグラジエントにかけ、同時にRNA抽出のために、細胞をRLTバッファー (Qiagen) 中で直接溶解し、そして、-80℃にて凍らせた。

30

【0083】

CTXで処置した小腸の樹枝状細胞サブセットの分析。

マウス脾臓及びリンパ節からの細胞懸濁液を、コラゲナーゼ及びDNアーゼで60分間消化し、それに続いて70 μm のメッシュを通して裏漉しすることによって調製した。結腸及び小腸のリンパ球を、先に記載したとおり (Schlitzer et al., 2013) 単離した。要するに、結腸及び小腸を、37℃にて振盪しながら5 mMのEDTA及び2 mMのDTTを含むPBSで消化した。最初の消化後、結腸及び小腸組織の小片を、RPMI培地を含んでいるコラゲナーゼ/Dnase中で30分間消化した。組織小片を70 μm のメッシュを通してさらに裏漉しした。フローサイトメトリー分析のために、細胞懸濁液を、以下の表面マーカー: CD11c (N418)、CD11b (m1/70)、Ly6c (HK1.4)、MHCクラスII (M5/114.15.2)、CD24 (M1/69)、CD64 (X54-5/7.1)、CD317 (ebi o927)、CD45 (30F11)、F4/80 (C1:A3-1)、CD8 (53-6.7)、に対する抗体で染色した。DAPIを死細胞を除外するのに使用した。抗体を、eBioscience、BD Biosciences又はBioLegendからそれぞれ購入した。細胞集団に次のようにゲートをかけた: 小腸 (移動画分): CD103⁺ DC (CD45⁺ CD11c⁺ MHC-II⁺ CD103⁺ CD24⁺)、CD11b⁺ CD103⁺ (CD45⁺ CD11c⁺、MHC-II⁺ CD103⁺ CD11b⁺ CD24⁺)、CD11b⁺ (CD45⁺ CD11c⁺ MHC-II⁺ CD11b⁺ CD24⁺)、炎症性DC (CD45⁺ CD11c⁺ MHC-II⁺ CD11b⁺ CD64⁺ Ly6c⁺)、大腸: CD103⁺ DC (C

40

50

D45⁺ CD11c⁺ MHC-II⁺ CD103⁺ CD24⁺)、CD11b⁺ (CD45⁺ CD11c⁺ MHC-II⁺ CD11b⁺ CD24⁺)、炎症性DC (CD45⁺ CD11c⁺ MHC-II⁺ CD11b⁺ CD64⁺ Ly6c⁺)。

【0084】

微生物叢の再構成。SFBのGFマウスへの接種のために、糞便ペレットを、殺菌試験管を用いてSFB単独定着マウスから回収した。糞便ペレットを水中に均質化することによって得た200 µlの懸濁液の経口強制飼養によって、定着を実施した。効果的な定着を腫瘍接種前にまず確認した。

【0085】

E. ヒラエ、L. ジョンソニー、及びL. ブランタルムを、BHI (Fluka analytical) 及びMRS (BD) ブロスそれぞれで37 °Cにて一晩培養した。細菌を遠心分離し、一度洗浄し、そして、1のOD (600 nm) にて無菌PBS中に再懸濁し、そしてそれは1 × 10⁹ コロニー形成ユニット (CFU) / mlに相当する。それぞれの菌懸濁液の等容積を混合して、1 × 10⁹ 細菌 / mlのそれぞれの細菌型の均一な割合の懸濁液を得た。L. ロイテリをCOS寒天平板上、嫌気性条件で37 °Cにて48 h培養した。P. ディスタノニス定着のために、マウスをアンピシリン / ストレプトマイシン / コリスチン (ATB) の混合物で4週間処置し、そして、MCA205接種後4日、200 µlのPBS中に10⁹ CFUを経口的に接種をした。他の実験のために、ATB後2 ~ 3週間、処置を中止し、そして、CTX投与1日後そして、懸濁液処置0 ~ 3日後、マウスに10⁹ CFUのE. ヒラエ + L. ジョンソニー又はL. ブランタルム又はL. ロイテリを経口的に強制飼養した。

【0086】

TCRとT細胞の試験。架橋実験のために、(赤血球溶解後) 1ウェルあたり2 × 10⁵ 個の総脾細胞を、抗CD3 mAb (145-2C11) (1ウェルあたり0.5 µg; eBioscience) 及び/又は抗CD28 mAb (37.51) (2 µg / ml; BD) で前もってコートしたMaxiSorpプレート (Nunc) でインキュベートした。上清を、マウスIL-17A (eBioscience) とIFN-γ (BD) について48 hにELISAによってアッセイした。TIL分析において、腫瘍を取り出し、小片になるまで細断し、そして、Liberase TM (Roche) 及びDNアーゼIで37 °Cにて30分間、消化した。シリジブランジャーで消化した組織をつぶし、そして、100 µmの細胞濾過器を通して濾過することによって、単一細胞懸濁液を得た。菌体内に関して、細胞を50 ng / mlのPMA、1 µg / mlのイオノマイシン及びBD Golgi STOP (商標) と共に37 °Cにて4 hインキュベートした。膜染色後に、細胞を、eBioscienceのFoxP3 / 転写因子染色バッファーセットを使用して抗IL-17A、IFN-γ、Tbet、及びRORγtを用いて染色した。

【0087】

インビトロにおけるT細胞の極性化と増殖。Th17細胞 (病原性又は制御性Th17) の養子移植。未感作CD4⁺ T細胞 (CD4⁺ CD62Lhi) をC57BL / 6 WTマウスの脾臓及びリンパ節から得た。次に、細胞をフローサイトメトリー (BD Aria II with FACSDiva Software) によって適切に選別した。単離したT細胞数の純度は常に95%を超えていた。未感作T細胞を、組み換えマウスIL-1 (10 ng / ml)、IL-6 (10 ng / ml)、及びIL-23 (20 ng / ml) (pTh17) 又はTGF-β (2.5 ng / ml) 及びIL-6 (Th17) (Miltenyi) のいずれかの存在下、CD3 (145-2C11、µg / の2 ml) 及びCD28 (ポリビニール-1、µg / の2 ml) に対するプレート結合抗体で刺激した。制御性Th17 (Th17) をTGF-β (2.5 ng / ml) 及びIL-6の分化から得たのに対し、病原性Th17 (pTh17) をIL-1、IL-6及びIL-23におけるインキュベーションから得た。マウスに3 × 10⁶ 個のT細胞を静脈内に注射した。インビトロにおけるT細胞の感作。骨髄由来樹状細胞 (BMDCs) をC57BL / 6マウス的大腿骨及び頸節から作出し、J558上清 (40 ng / mlのGM-CSF含有)、10%のFCS、100 IU

10

20

30

40

50

/ml のペニシリン/ストレプトマイシン、2 mM の L - グルタミン、50 μ の 2 - メルカプトエタノール (Sigma-Aldrich) 含有 Iscove's 培地 (Sigma-Aldrich) 中で 8 日間培養し、3 ~ 4 日ごとに分割した。8 日目に、BMDCs を、抗生物質を含まない適切な培地中で 37 °C にて 1 h、1 : 50 の MOI (感染多重度) の分離細菌株と共に感染させた。次に、細胞を PBS で洗浄し、ゲンタマイシン (50 mg/ml) を補った完全培地中でインキュベートし、細胞外の細菌を殺滅した。24 h 後に、BMDCs を脾臓及びリンパ節から精製した未感作 CD4⁺CD62L⁺T 細胞 (Miltenyi) と一緒に 1 : 1 の比で 4 日間培養した。次に、培養上清を IL-17 及び IFN γ について ELISA によってアッセイした。CD4⁺T 細胞の免疫記憶応答。BMDCs を、先に記載した様々な細菌用量 (細胞 : 細菌の比 1 : 2、1 : 10、及び 1 : 50) で感染させ、そして 24 h 後に、CTX 又は NaCl で処置した C57BL/6 マウスの脾臓から精製した CD4⁺T 細胞 (Miltenyi) と共に 1 : 1 で培養した。24 h 後に、培養上清を IL-17 と IFN γ について ELISA によってアッセイした。

【0088】

養子 T 細胞移植。B6.CBir1 TCRトランスジェニック (CBir1 Tg) マウス (Cong et al., 2009) を、Birmingham の University of Alabama の Animal Facility において作出し、そして、飼育した。すべての実験は、Institutional Animal Care 及び Use Committee of the University of Alabama at Birmingham によってレビューされ、そして、承認された。CD4⁺T 細胞を、抗マウス CD4 磁性ビーズを使用して B6.CBir1 TCR Tg マウスから単離した。簡単に言えば、脾細胞を、二度洗浄し、抗 CD4 磁性ビーズと共に 4 °C にて 30 分インキュベートし、次に、磁場によって分離した。フローサイトメトリーによって確認すると、細胞の 95 % 超が CD4⁺T 細胞であった。100 万個の CBir1 Tg T 細胞 (CD45.1⁺) を、化学治療法の 2 日後に、CTX 又は NaCl で処置した未処置類遺伝子性 (CD45.2⁺) マウスに i.v. により養子移植し、そして、フローサイトメトリー分析及び生体外脾細胞再刺激のために、移植後 5 ~ 7 日目に脾臓を採取した。フローサイトメトリー分析を、モネンジンの存在下での PMA/イオノマイシン再刺激の 5 h 後の細胞内 IL-17⁺ 又は IFN γ 細胞のパーセンテージを正確に評価するために CD45.1⁺ 細胞に対してゲートをかけた。他の脾細胞を、100 万個/ml にて 24 ウェル平底プレート内、三連でインキュベートし、1 μ g/ml の CBir1 ペプチド 455 - 475 (DMATEMVKYSNANILSQAGQ) あり又はなしで培養し、そして、上清を抗 IFN γ 特異的な市販の ELISA を使用して分析した。

【0089】

抗微生物ペプチド測定のための定量的 RT-PCR。粘膜固有層細胞を、CTX 後 18 h の十二指腸、回腸、及び結腸から単離し、そして、全 RNA 抽出及びゲノム DNA 除去を、製造業者の取扱説明書に従って、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) で実施した。回腸又は十二指腸の全 RNA 抽出及びゲノム DNA 除去を、製造業者の取扱説明書に従って、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) で実施した。次に、全 RNA を、ランダムプライマー (Promega, Charbonnières, France) 及び Deoxynucleoside Triphosphate Set、PCR グレード (Roche Diagnostics, Meylan, France) の存在下、SuperScript III Reverse Transcriptase and the RNaseOUT (商標) Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Life Technologies, Saint Aubin, France) を用いて cDNA に逆転写した。RegIII (Mm00441127__m1) 及び LysM (Mm01612741__m1) 関連遺伝子の発現を、TaqMan (登録商標) Gene Expression Assays using the Universal Master Mix II on a StepOnePlus (商標) Real-Time PCR System (Life Technologies, France) を使用して分析した。定量的 RT-PCR データを、2^{-C_t} 法を用いてハウスキーピング遺伝子ペプチジルプロリルイソメラーゼ A (Ppia) の発現レベルに対して標準化した。

【0090】

共生細菌に対する細菌 DNA 抽出、454 パイロシーケンシング、及び定量的 PCR

。全DNAを、物理的溶解及び化学的溶解の両方を使用して、先に記載したように (Lepage et al., 2005; Seksik et al., 2003) 粘膜サンプル (~ 50 - 100 µg) から抽出した。DNA濃度と完全性を、エチジウムブロマイド含有1%アガロースゲルによる電気泳動によって視覚的に、及びNanodrop施設 (Thermo Scientific) を使用することによって分光光度測定的に測定した。

【0091】

微生物叢組成物を、細菌16S rRNA遺伝子のV3 - V4領域を標的とした454パイロシークエンシング (GS FLX Ti technology) によって評価した (V3 fwd: 5' TACGGTAGGCAGCAG3'、配列番号5; V4 rev: 5' GGACTACCAAGGGTATCTAAT3'、配列番号6)。配列を、バーコード、PCRプライマー、及び最短配列長300pb、最低塩基品質閾値27、最長ホモポリマー長6に調整した。得られた配列を、RDPデータベース (リリース10、アップデート31) を使用して異なった分類学レベル、門から属までに割り当てた (Cole et al., 2009)。配列を、QIIME (Caporasoら、2010) 及びcdhit (李とGodzik、2006) を使用して97%の同一性にてOTUs (操作的分類単位又はファイロタイプ) へとさらにクラスタ化した。OTUsを、Seqmatch (RDP) 及びBlastall (NCBI) を使用して最も近い分類的近縁及び関連細菌種に割り当てた。各OTUsと他の分類学レベル (門から属まで) の相対量を各サンプルについて計算して、複数の個人を通じた様々なサンプリングレベルを考慮した。調整後に、各OTUs (又は他の分類学レベル) にクラスタ化された配列の数を、それぞれ個人のそれぞれの特徴に関する相対寄与を表す割合に変換した。色分け地図表示のために、log₁₀変換を相対量データ行列に適用し、そしてそれが、サンプルの相対量の1%未満を構成し得る群落のメンバーに影響するサンプル間の類似点又は相違点を可視化できる。様々なマウス微生物叢の主成分分析法を、細菌属組成物に基づいて計算した。それぞれのクラスタ化結果のロバスト性を、モンテカルロ順位検定 (n = 10000反復、p < 0.05) (Romesburg, 1985) を使用して評価した。細菌数に関するさらなる洞察を得るために、定量的PCRを適用した。標的化qPCRシステムを、(すべての細菌領域、クロストリジウム・レプツム群 (Mayeurら、2013) を標的とするシステムについて、又はSybrGreen (ラクトバチルス/リューコノストック/ペディオコッカス群 (Mayeurら、2013)、エンテロコッカス群 (フューレら、2009)、SFB (陰ら、2013) 及びTM7 (Hugenholtzら、2001) を標的とするシステムについて) Taqman技術を使用して適用した。SFB及びTM7又はクロストリジウム群XIVの相対量のCTX特異的調節が、CTX後7日目の時点で全く観察されなかった (未掲載)。定量的PCRを、ソフトウェアバージョン1.2.3 (Applied Biosystems) を餅田ABI 7000 Sequence Detection Systemを使用して実施した。増幅及び検出を、先に記載したDNAサンプルの適切な希釈物10 µlを含んでいる終量25 µlの二連で、TaqMan Universal PCR 2_MasterMix (Applied Biosystems) 又はSYBR-Green PCR 2_Master Mix (Applied Biosystems) のいずれかを使用して実施した。増幅を、以下のランピングプロファイル: 95 にて10分間を1サイクル、続いて95 にて30秒間、60 にて1分間を40サイクル、を使用して実施した。SYBR-グリーン増幅のために、溶解ステップを加えた (Yin et al., 2013)。細菌群の定量化のために、検量線を、各群の代表からの既知濃度のゲノムDNAの段階希釈物から作り出した。検量線を、閾値サイクル (Ct) 対細菌量 (CFU) でプロットングすることによって作り出した。細菌の総数 (CFU) を平均した検量線から補完した。

【0092】

定量的PCR分析による養子移植Th17細胞の特徴づけ。T細胞からの全RNAはTrizol (Invitrogen) と共に抽出した。100 ~ 300 ngのRNAを、M-MLV逆転写酵素、ランダムプライマー、及びRNaseOUT阻害剤 (Invitrogen) によってcDNAに逆転写した。cDNAを、Fast7500検出システム (Applied Biosystems, France) においてSYBRグリーンリアルタイムPCRキット (Applied Biosystems

10

20

30

40

50

を用いたリアルタイムPCRによって定量化した。相対mRNA値をCt法で測定した。値をシクロフィリンAに対して表した。使用されるオリゴヌクレオチドの配列を、以下に記載する。

【0093】

【表1】

遺伝子	順方向	配列番号	逆方向	配列番号
<i>Actin</i>	ATGGAGGGGAATACAGCCC	7	TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT	8
<i>Cd3e</i>	CCAGGATACTGAGGGCATGT	9	CTTATCAGTTGGCGTTTGGG	10
<i>Cd4</i>	CCTGTGCAAGAAGCAGAGTG	11	GTTCTGCTGATCCCCCTTCC	12
<i>Ppia</i>	GGCCGATGACGAGCCC	13	TGTCCTTGGAACTTTGTCTGCAA	14
<i>Eomes</i>	CAGCACCACTCTACGAACA	15	CGCCACCAAACTGAGATGAT	16
<i>Foxp3</i>	CTCGTCTGAAGGCAGAGTCA	17	TGGCAGAGAGGTATTGAGGG	18
<i>Gata3</i>	AGGATGTCCCTGCTCTCCTT	19	GCCTGCGGACTCTACCATAA	20
<i>Ifng</i>	TGAGCTCATTGAATGCTTGG	21	ACAGCAAGGCGAAAAAGGAT	22
<i>Il10</i>	TGTCAAATTCATTTCATGGCCT	23	ATCGATTTCTCCCTTGTA	24
<i>Il17a</i>	TGAGCTTCCCAGATCACAGA	25	TCCAGAAGGCCCTCAGACTA	26
<i>Rorc</i>	GGTGATAACCCCGTAGTGGA	27	CTGCAAAGAAGACCCACACC	28
<i>Tbx21</i>	ATCCTGTAAATGGCTTGTGGG	29	TCAACCAGCACCAGACAGAG	30
<i>Tgfb</i>	CAACCCAGGTCCTTCCTAAA	31	GGAGAGCCCTGGATACCAAC	32

表1：Th17細胞発現プロファイルを特徴づけするのに使用したオリゴヌクレオチド

【0094】

生命情報工学と統計。回帰及び負の二項配分によってそれぞれ比較した割合及び計数データの例外では、それらの本来の尺度又は対数尺度でのパラメーターに対する処置の影響を評価するために、直鎖モデリングを適用した。モデル残基の系統的な検査法及び各方法それぞれへの診断ツールの適用では、データの適切な当てはめを確認した。細菌内容物に対する腫瘍及びCTX処置の影響を、先に記載した検出した測定値から成るのではなく、最尤法によって推測した(Helsel, 2005)。両パラメーターで未検出となる可能性を考慮して、ケンドールのタウ(Newton and Rudel, 2007)を、ブートストラッピング(B = 1999)で見積もられた回帰直線の標準誤差バンドに満足するIL-17/IFNと細菌との間の相関研究のために計算した。同様の結果を、データへの同じ手順の適用、非検出が除外されたサンプル、及びp値の決定を含めた、さらなる妥当性検討によって得た。腫瘍増殖モデリングを、ログ未加工腫瘍表面に対する線形混合効果モデリングによって実施した(Demidenko, 2006; Sugar et al., 2012)。報告したp値は、腫瘍増殖スロープと切片(対数尺度にて)の両方が着目の処置群の間で同じである、連帯した試験から得られた。明確さのために、試験の結果は、 $p < 0.05$ の有意差が見られた比較についてのみ与えられる。1回のサンプリング時点での事後対検定では、グラフに関して報告した効果を確認した。腫瘍面積に有意差がないものは処置時点で処置群間を強調したことに注意する。「腫瘍の存在/不存在と腫瘍増殖」の発現率をFirthのペナルティー付き尤度のロジスティック回帰と比べた(Heinze, 2006)。報告したすべての検定が、両側検定であり、且つ、有意であると見なされた：*、 $p < 0.05$ 、**、 $p < 0.01$ 、***、 $p < 0.001$ 、ns、有意ではない。

【0095】

結果

当該実施例において、小腸微生物叢に対するCTXの影響、及び抗腫瘍免疫応答に対するその後の効果を説明した。

腸上皮バリアの炎症状況は、未処置マウスにおいて、骨髓非破壊的用量のCTX又はアントラサイクリン系ドキソルビシンを用いた処置後48時間で特徴づけられた。両剤とも、粘膜固有層(LP)における小腸絨毛の短縮、上皮バリアの不連続、組織間腔の水腫、及び単核細胞の巣状滞留を引き起こした(図1A~B)。化学療法後、杯細胞及びパネー
ト細胞の数は、それぞれ絨毛(図1C)及び陰窩(図1D)で増加した。抗菌酵素リゾチ
ーム(殺微生物性ペプチドRegIIIでなく)は、CTXで処置したマウスの十二指
腸で上方制御された(図1E)。経口的投与されたフルオレセインイソチオシアネート
(FITC)デキストランは、CTX後18hで血液中(Yang et al., 2013)で検出可能
になり、腸透過性の増大を確認した(図1F)。腸バリアの破損は、CTX後48hで良
好に検出可能であった腸間膜リンパ節及び脾臓への>50%のマウスにおける共生細菌の
有意な移行を伴い、ドキソルビシン処置後にそれは少なくなった(図2A)。ラクトバチ
ルス・ジョンソニー(>40%の場合で増殖)、ラクトバチルス・ムリヌス及びエンテロ
コッカス・ヒラエを含めた数種類のグラム⁺細菌種が、これらのリンパ器官から培養され
る場合がある(図2B)。

10

【0096】

次に、腸微生物叢の全体的な組成を、高速大量処理454パイロシークエンシングと、
それに続く領域細菌及び特有の細菌群を標的とする定量的PCRによって分析した。CT
Xは初期時点(24~48h、図5)にて主要な微生物叢失調の原因とならなかったが、
CTXは、その投与後1週間で皮下癌(すなわち、転移性B16F10メラノーマ及び非
転移性MC-A205肉腫)を担持しているマウスの小腸(しかし盲囊については変更しな
い)の微生物組成を有意に変更した(図2C、図5)。患者の糞便サンプルに関する以前
の報告(Zwiehner et al., 2011)と一致して、CTXは、CTX処置動物の粘液にお
いて4つの属及び群(クロストリジウム属クラスタXIVa、ロゼブリア、未分類ラク
ノスピラ、コプロコッカス、表2)の中に配分するファーミキューテス門(図5)からの細
菌種の低減を誘発した。

20

【0097】

【表 2】

門	属	第 1 単離配列の名称	全ての動物				腫瘍担持体			
			AN	S	ab	Co	CT	p 値	Co	CT
Firmicutes	Unclassified_Clostridiaceae 1	Segmented filamentous bacterium	X77814	1.000	0.93	0.95	0.083	0.58	0.55	
Firmicutes	Lactobacillus	Lactobacillus reuteri; LU3	AY735106	1.000	0.13	0.24		0.02	0.14	0.048
Firmicutes	Clostridium XIVa	Butyrate-producing bacterium S44/1	AY395314	0.908	1.37	0.21	0.045	1.78	0.20	0.046
Firmicutes	Clostridium XIVa	Butyrate-producing bacterium M62/1	AY305309	0.920	0.43	0.07	0.056	0.54	0.06	0.049
Firmicutes	Clostridium XIVa	Clostridium sp. Culture-41	AB622820	0.933	0.39	0.10	0.045	0.32	0.08	0.046
Firmicutes	Clostridium XIVa	Rumen bacterium NK4A66	GU124467	0.872	0.26	0.07	0.046	0.34	0.10	0.080
Firmicutes	Roseburia	Roseburia intestinalis; XB6B4	AM055815	0.827	0.24	0.02	0.032	0.26	0.00	0.016
Firmicutes	Roseburia	Roseburia faecis (T); M72/1	AY305310	0.910	1.20	0.35	2.00	0.41	0.095	
Firmicutes	Unclassified_Lachnospiraceae	Clostridium sp. Clone-49	AB622849	0.973	1.04	0.07	0.066	1.61	0.09	0.052
Firmicutes	Unclassified_Lachnospiraceae	Clostridium sp. A9	DQ789119	0.942	0.70	0.23	0.045	0.96	0.27	0.024
Firmicutes	Unclassified_Lachnospiraceae	Lachnospiraceae bacterium 14-2	DQ789124	0.868	0.67	0.05		0.95	0.02	0.028
Firmicutes	Unclassified_Lachnospiraceae	Clostridium sp. Clone-40	AB622844	0.977	0.25	0.05		0.42	0.02	0.026
Firmicutes	Unclassified_Lachnospiraceae	Lachnospiraceae bacterium 807	AB700365	0.900	0.08	0.08		0.11	0.01	0.043
Firmicutes	Unclassified_Lachnospiraceae	Clostridium sp. Culture-54	AB622823	0.968	0.09	0.03	0.064	0.13	0.04	0.049
Firmicutes	Unclassified_Lachnospiraceae	Clostridium sp. ASF502	AF157053	0.943	0.10	0.01	0.022	0.17	0.00	0.016
Firmicutes	Unclassified_Lachnospiraceae	Clostridium sp. Clone-33	AB622843	0.885	0.07	0.02	0.046	0.10	0.00	0.016
Firmicutes	Coprococcus	Coprococcus catus; L8	AB361624	0.827	0.16	0.03		0.20	0.03	0.052
Bacteroidetes	Tannerella	Tannerella forsythia; OB071	JN713185	0.581	0.06	0.02		0.10	0.02	0.028

表 2：種レベルでの C T X 誘発粘膜微生物叢における微生物叢失調

C T X 処置 (C T X) と N a C I 処置マウス (C o) との間で示された有意に示差的な細菌種の平均相対量を示す。これらの配列の分類学的結び付きも加える (門及び属レベル)。フィロタイプ (O T U) 決定に続いて、フィロタイプ重心はそれらの最も近縁の単離株に割り当てられる (RDP Seqmatch データベース)。すべての動物を一緒に比較し、そして、腫瘍担持体をさらに識別した。AN: NCB I 受託番号、S a b _ S c o r e: 重心配列と指示単離株との間の R D P 類似性スコア。ウィルコクソン検定 p 値。

【0098】

定量的 P C R を、C T X 対ビヒクル処置した未処置及び癌担持マウスからの小腸粘膜中のすべての細菌及び標的とした群の細菌 (ラクトバチルス、エンテロコッカス、クロストリジウム・レプツム クラスター I V 群) の細菌数を決定するために適用した。腫瘍担持体では、C T X 後 7 日間の小腸の総細菌量、並びにクロストリジウム・レプツムの細菌数は影響を受けなかった (図 2 D)。しかしながら、C T X 処置はラクトバチルス属とエンテロ

10

20

30

40

50

コッカスの存在量の低減につながった（図2D）。要するに、これらのデータは、明白なグラム⁺細菌種の選択的移行と、その後の小腸微生物叢の有意な変化を引き起こすCTXの能力を明らかにする。

【0099】

CTX後7日間の微生物叢失調と同時に、CD103⁺CD11b⁺樹状細胞（図7A）及びTCR⁺CD3⁺T細胞（図7B）が転写因子ROR γ tを発現する頻度は、分離組織（図7B）及びインサイツ蛍光抗体染色（図7C）のフローサイトメトリーによって明らかにされるように、（結腸ではなく）小腸の粘膜固有層（LP）で有意に減少した。ROR γ tは、Th17細胞（インターロイキン-17、IL-17を生じさせる）の産生のために必要であり、そして、腸常駐と全身的Th17応答との間の強い連結は、関節、脳又は脾臓（Ghiringhelli et al., 2004; Lee et al., 2011; Wu et al., 2010）に影響する自己免疫疾患との関連を確立した。先行研究（Michaud et al., 2011; Viaud et al., 2011）を確認して、CTXは、Th1（インターフェロン- γ [IFN γ]産生）及びTh17（図3A、図7D）に向かう脾臓CD4⁺T細胞の極性化を引き起こした。この効果はドキソルピシンに関して見られなかった（図8）。腸微生物叢は、CTXに対応して未感作CD4⁺T細胞のIL-17産生菌への転換を連動させるのに不可欠であった。実際、TCRによって刺激された脾細胞による生体外IL-17放出は、特定病原菌未感染（SPF）マウスのCTX処置によって増大したが、無菌（GF）マウスではそうならなかった（図3A、左のパネル）。広域抗生物質（ATB、コリスチン、アンピシリン、及びストレプトマイシンの組み合わせ、図9）による腸の滅菌もまた、IL-17（図3A、右のパネル）のCTX刺激された分泌を抑え、そして、TCR刺激された脾細胞によるIFN γ も抑えた（図7D）。グラム⁺細菌に特異的な抗生物質（Rice, 2006）であるバンコマイシンによるマウスの処置もまた、CTX誘発Th17転換を低減した（図3A、右のパネル）。従来のSPFマウスでは、小腸粘膜（図2D）で計測されたラクトバチルス属及びSFBの数は、脾細胞のTh1とTh17の極性化とプラスに関連したが（図3B、図7E）、クロストリジウム属クラスタIVとは関連しなかった（図3B）。要するに、これらの結果は、腸粘膜（及び時折リンパ器官）に存在する特定の微生物と、CTX処置によって誘発されたTh応答の極性との間の特異的関連を示す。

【0100】

CTXは「病原性」Th17（pTh17）細胞の頻度を増強し、そしてそれは、脾臓内の、Th1細胞（転写因子T-betの核発現、IFN γ の細胞質発現、及びケモカイン受容体CXCR3の表面露出）及びTh17細胞（ROR γ t、IL-17及びCCR6の発現）の顕著な特徴を共有する（Ghoreschi et al., 2010; Lee et al., 2012）（図7F、図3C）。同様に、この応答は腸微生物叢に依存した（図3C）。そのうえ、pTh17細胞の増大は、骨髄分化の一次応答遺伝子88（MyD88）の発現を必要として、そしてそれは、トール様受容体の下流にシグナル伝達し（図10A）、且つ、いくつかの腫瘍モデルにおける抗癌化学療法の治療学的な成功に必要である（Apetoh et al., 2007）。対照的に、2つのパターン認識受容体（ヌクレオチド結合オリゴマー化ドメイン含有（Nod1）及びNod2）は、脾臓pTh17細胞におけるCTX誘発性上昇及びCTXの腫瘍増殖遅延効果に不必要であった（図10B）。これらの結果は、CTXが抗癌効果と互いに関連して、腸内細菌とMyD88にかかわる複雑な回路網を通してpTh17細胞を刺激する能力を確立する。pTh17細胞の頻度への一般的効果を超えて、CTXは、共生細菌に対してTCRによって制限された抗原特異的免疫反応を引き起こした（図11）。したがって、発明者らは、CTXに対応して二次リンパ器官に移行したグラム⁺細菌種が、未感作CD4⁺T細胞をTh1又はTh17に向かって分極する場合があるかどうか対応した（図2A）。L・ジョンソニーとE・ヒラエの両方が、骨髄由来の樹状細胞の存在下で生体外における未処置CD4⁺T細胞のTh1とTh17細胞への分化を刺激した一方で、トール様受容体4を賦活する精製した細菌性リボ多糖（LPS）又はE・コリの両方が、わずかな効果を有した（図12）。そのうえ、経口的に摂取したL・ジョンソニー及びE・ヒラエは、ATBで処置したSPFマウスの脾臓でのpTh17細胞

のプールの再構成容易にしたが、*L*、*プランタルム*（移行実験で検出されなかった細菌、図2B）でも*L*、*ロイテリ*（図3D）でもなかった。*L*、*ジョンソニー*に対するTh1免疫記憶応答は、CTXを受けたマウスの50%で一貫して検出されたが（図3E）、対照マウスでは検出されず、骨髄由来の樹状細胞でのCD4⁺T細胞のインビトロ再刺激が*L*、*ジョンソニー*（そして*E*、*ヒラエ*をより少ない程度までだが、他の片利共生又は病原性細菌ではなかった）を増加させた。これらの結果は、特定のセットのグラム⁺片利共生細菌の移行が、pTh17細胞及びTh1細菌特異的な免疫記憶T細胞応答のCTX駆動蓄積を媒介し得ることを示す。

【0101】

共生細菌はCTX後に腸及び全身性免疫を調節するので、発明者らはさらに、CTX媒介腫瘍増殖阻害に対する抗生物質の効果进行调查した。広域スペクトルATBでの長期間の処置は、CTXがシンジェニックDBA2マウスにおいて確立したP815肥満細胞腫を治癒する能力を低下させる（図4A型、図13A）。そのうえ、MCA205肉腫に対してCTXによって媒介される抗癌効果は、SPFマウスと比較してGFで低下した（図4B、左及び中央のパネル）。CTXがグラム⁺細菌の移行をほとんど引き起こす、及びグラム⁺細菌が脾臓Th1/Th17極性化と相関するという観察によって動かされ、発明者らは、いくつかのATB投薬計画の能力、すなわち、バンコマイシン（グラム⁺細菌を枯渇させる）及びコリスチン（ほとんどのグラム⁻細菌を枯渇させる）がCTXの腫瘍増殖阻害効果を妨げる能力を比較した。バンコマイシン、及びそれほどではないにせよコリスチンは、MCA205肉腫に対するCTXの抗腫瘍効果を低下させる（図4C、図13B）。制御性p53欠失に連動した発癌性K-Rasによって駆動された自所肺発癌のトランスジェニック腫瘍モデルを使用して（Cortez- Retamozo et al., 2013）、CTXベースの化学療法レジメンの抗腫瘍効果に対するバンコマイシンの阻害的役割を確認した（図4D）。バンコマイシンはまた、脾臓におけるpTh17のCTX誘発蓄積を妨げ（図4E）、且つ、腫瘍浸潤性CD3⁺T細胞及びTh1細胞の頻度を低減した（図4F）。

【0102】

ATBで処置したほとんどのSPFマウスの糞便は通常培養できる細菌を含んでいないが（図9）、一部のマウスは、腸制御性T細胞のレパートリーの一部を維持すること、及び局所的な抗炎症効果を媒介することが報告された種であるパラバクテロイデス・ディスタノニスの増殖を経験することがあった（Geuking et al., 2011; Kverka et al., 2011; Lathrop et al., 2011）。この細菌混入は、樹立されたMCA205肉腫に対する免疫原性化学療法（ドキソルビシン）の不全に関連していた（図14A）。そのうえ、P・ディスタノニスをを用いたATB滅菌処置マウスの実験的なコロニー再形成は、ドキソルビシンの抗癌効果を低下させ（図14B）、微生物叢失調が抗癌療法を拒絶することを実証した。最終的に、LPにおけるTh17細胞分化を促進する（Hooper et al., 2012; Lee et al., 2012; Wu et al., 2010）SFBを用いた癌担持GFマウスの単独定着はまた、CTXの腫瘍増殖阻害効果にも有害な影響を有した（図4B、右のパネル）。

【0103】

前述の結果は、腸微生物叢における特定のCTX誘発変化である、脾臓でのpTh17細胞の蓄積と、化学療法の成功との間の関連を強調する。これらの現象間の直接的な因果関係を証明するために、発明者らは、バンコマイシンで処置したマウスにTh17又はpTh17集団を養子移植し、そして、CTX媒介性腫瘍増殖遅延を回復させるそれらの能力を評価した。生体外で増殖したpTh17は、CTX誘発した脾臓CD4⁺T細胞によって生体内で発現されたものと同様の遺伝子発現のパターンを呈した（図15）。Th17細胞ではなく、pTh17だけがCTX媒介性処置効果に対するバンコマイシンの負の影響を取り戻すことができた（図4G）。これらの結果は、CTX媒介性抗癌免疫応答のためのpTh17細胞の重要性を強調する。

【0104】

腸微生物叢と細胞の抗癌性免疫との連結についてさらなる洞察を得るために、2つの異なる実験的アプローチを使用した。

最初に、発明者らは、K - R a s 及び P 5 3 の発癌活性化から生じた自発性非小細胞肺癌の微小環境に対するバンコマイシンの影響を分析し、そして、C T X ベースの化学療法で処置した。彼らは、化学療法後の抗腫瘍 C T L s の動員に重要であることが知られている。17 細胞による化学療法で処置した腫瘍床の浸潤に対するバンコマイシンの影響を分析した (Ma et al., 2011)。バンコマイシン又は広域スペクトル A T B で処置したマウスでは、水で処置した化学治療法レシピエントとは対照的に、腫瘍床は治療後の 17 を欠いていた (図 17)。

【 0 1 0 5 】

第二に、彼らは、様々な抗生物質投与計画を用いて腸微生物叢に影響を与えることが、ポリ (I : C) に T L R 3 作動薬を組み合わせ、そして、C T X を受けた、抗生物質で処置された又は未処置マウスのフッドパッドに注射された、幅広く試験されているモデル抗原 (ニワトリオボアルブミン及びその免疫優性 H - 2 ^b 制限性エピトープ) に対する T h 1 又は T c 1 一次免疫反応の惹起が妨げられることがあるか分析した。使用した抗生物質はいずれも、が流入領域リンパ節細胞による I F N 産生を阻害することができなかった。同様に、O V A の H - 2 ^b によって制限された S I I N F E K L 免疫優性ペプチドを用いた再刺激によって誘発された I F N 分泌がバンコマイシンで処置したマウスにおいて維持され、T h 1 (又は T c 1) 免疫応答が腸微生物叢によって影響を受けないことを示した (図 18)。そのように、このモデルにおいて、抗生物質が媒介した共生細菌の排除が C D 8 ⁺ / F o x p 3 比の低下 (図 20) と鈍化した T h 1 応答 (図 4) を伴った同族の抗腫瘍免疫応答 (エフェクターメモリ T I L s) の調節をもたらす先天性免疫 (腫瘍内微小環境における 17 の細胞の喪失) のレベルの低下を引き起こす。

【 0 1 0 6 】

上皮細胞、腸微生物叢及び腸管免疫間の複雑な相互作用を統制する詳細な分子機序の多くがいまだに解読されていないが、当該試験は、化学療法が誘発した抗癌免疫応答に対する腸微生物叢の予想外の影響を明らかにする。上記データは癌処置中の抗生物質薬物療法に関連した新たな危険性、並びに腸微生物叢を操作することの潜在的な治療的有用性を明確に示している。

【 0 1 0 7 】

実施例 2 : 腸微生物叢はシクロホスファミドの抗癌性免疫効果を調節する - ヒト腫瘍形成を模倣する前臨床モデルの結果。

(T. Jacks, Cell 2012 によって最初に記載されたように) 制御性 P 5 3 欠失に結合した発癌性 K - R a s によって駆動された自所 N S C L C のトランスジェニック腫瘍モデルを、オキサリプラチンと C T X の組み合わせの抗腫瘍効果に対するバンコマイシンベースの抗生物質療法の阻害的役割を試験するのに使用した。ヒト腫瘍形成を模倣するこの前臨床モデルでは、バンコマイシンによるグラム陽性細菌の根絶が C T X ベースの化学療法の有効性を低下さ (図 19 A 及び図 4 D)、低下した腫瘍内 C D 8 ⁺ T エフェクター / F o x p 3 ⁺ 制御性 T 細胞比 (図 19 B) と相関するという概念が正当であると確認された。

これにより、グラム陽性細菌が、C T X 誘発抗癌免疫応答及び腫瘍体積低減に関する最適な有効性に必要であると思われる。

【 0 1 0 8 】

実施例 3 : ヒトでの結果 : 癌患者の共生細菌に対して向けられたシクロホスファミド誘発 T H 1 及び T H 1 0 免疫応答。

マウスと同様にヒトにおいても C T X が二次リンパ組織への細菌トランスロケーションを引き起こすことをさらに実証するために、発明者らは、規則的なシクロホスファミド (C T X) での処置前後の進行性癌患者の一群の細菌に特異的な、末梢血中での、免疫記憶 C D 4 ⁺ T h 1 細胞応答を評価した。観察した応答には、エンテロコッカス (E . ヒラエ及び E . フェカリス、C T X を受けたマウスにおいて両方とも免疫原性)、ラクトバチルス属 (L . ジョンソニーとそれほどでもないが L . プランタルム)、及び E . コリに対するものが含まれた。結果を、C T X + アバスチンで処置した移行性卵巣癌を患っている 6 人の患者 (Viaud et al., 2011)、D C ベースのエキソソームフェーズ I I ワクチントラ

10

20

30

40

50

イアル前に C T X で処置した 3 人の N S C L C (非小細胞肺癌) 患者 (Chaput et al., 2006)、及び C T X によって先行した標的化免疫療法のフェーズ I トライアルに組み入れられた 2 人の黒色腫患者 (Chaput et al., 2013) から得た。これらの 11 人の患者のうち、6 人 (54 %) がエンテロコッカスに対して、2 人が L . ジョンソニーに対して (18 %)、2 人 (18 %) が E . コリに対して免疫記憶 T h 1 応答を発現し他のに対して、彼らのうちのひとり (9 %) が L . プランタルムに対して細胞免疫反応を高めた (図 20)。興味深いことに、一部の個人が、E . フェカリス (高い I L - 10 及び低い I F N 産生、患者 5 及び 6 の場合) に対して T h 10 免疫応答を発揮した (すなわち、癌進行に関連していることが多い I L - 10 放出)。

【 0 1 0 9 】

概要では、サイトカイン放出の 3 つのパターン：

(i) サイトカイン放出なし、すなわち、片利共生への免疫記憶応答がない；(i i) T h 10 表現型の免疫記憶応答；及び (i i i) T h 1 表現型の免疫記憶応答、がこれらの実験条件で観察された。

【 0 1 1 0 】

発明者らは、3 パターンだけが化学療法の恩恵を受けると予想し、そして、彼らは現在、この抗片利共生細菌の免疫応答を臨床結果と関連させている。この薬力学的アッセイは、3 ~ 6 週 (1 ~ 2 サイクルの化学療法) 後に斯かる C T X ベースの化学療法がアジュバント免疫応答及び臨床上の利益を引き起こすかどうか予測するために有用である。

【 0 1 1 1 】

実施例 4：ヒト結果：オキサリプラチンベースの化学療法は、腸微生物叢における細菌種の配分の変化、及び腸微生物叢による T - b e t 転写の増大を引き起こす。

原発結腸癌、膵臓癌又は胃癌のデバルキング外科手術中、十二指腸 (胃及び膵臓腫瘍のため) 又は回腸 (右結腸癌のため) に接触することは想像できる。斯かる場合、粘膜サンプルは、掻き取り、そして、採取されてもよく (16 S r R N A 遺伝子パイロシーケンシング分析及び先に記載した異なった分類学レベルにおける粘膜微生物叢組成の説明のために)、並びに (q R T - P C R のための R N A z o l 中で) 凍ったまま維持され得る又は (免疫組織化学分析のための) パラフィン包埋組織の状態であり得る粘液であってもよい。

【 0 1 1 2 】

この外科手術は、化学療法 (アジュバント化学療法) 前又は化学療法 (新アジュバント化学療法) 後に実施され得る。

当該実施例では、右結腸癌 (ネオアジュバントオキサリプラチンベースの化学療法中の 6 人の患者及び治療前の 7 人の患者) を手術した患者からの回腸粘膜を分析し、回腸微生物叢の組成、並びに結腸癌を担持する患者において、化学療法を既に受けた (C h e m o) 又は受けなかった (対照) を意味する、アジュバント対新アジュバント化学療法の場合に、異なった属及び種の代表株 (単離株) の相対的喪失又は獲得を比較した。

【 0 1 1 3 】

種 (第 1 の相対単離株) レベルでの細菌の配分は、化学療法後の回腸において有意に異なっていた (主成分分析法、モンテカルロ検定、 $p = 0.018$) (図 21)。

マウスのように、化学治療法は、ほとんどすべての患者においてクロストリジウム属クラスタ IV に属する種、より詳しく述べると、属ドレア (Dorea)、コプロコッカス (Coprococcus)、ラクノスピラ、ゲミガー、アリスチペス、及び細菌種フェカリバクテリウム・ブラウスニツイー (図 22 と 23、表 3) から細菌の減少を誘発した。対照的に、ビフィドバクテリウム及びラクトバチルス属の細菌は、化学療法後に増加する傾向があった (表 3、図 24)。

【 0 1 1 4 】

10

20

30

40

【表 3】

細菌種	AV Chemo	AV_Control	SD Chemo	SD_Control	t 検定 p 値	分類_属
Bacteroidescaecae_JCM19498_EU136686	3,828	0,135	4,519	0,190	0,056	バクテロイデス
Flavonifractorplautii_17_GU1968170	0,712	0,109	0,767	0,162	0,065	フラボニフラクター
Bifidobacteriumlongum_JMAUF0091_X12813_JQ805709	0,530	0,029	0,553	0,076	0,067	ビフィドバクテリウム
Biophilawadsworthia_L35148	0,195	0,023	0,242	0,061	0,092	ビロフィラ
ClostridiumspAP4_JX101685	0,112	0,024	0,109	0,064	0,090	未分類_ルミノコッカス
unidentifiedbacterium_CCCM26_AY654952	0,097	0,015	0,115	0,026	0,088	未分類_クロストリジウム
ClostridiaceaeBacteriumFH042_A8298771	0,053	0,000	0,070	0,000	0,068	アナエロバクサス
bacteriumNLAzC328_JQ608041	0,027	0,000	0,038	0,000	0,079	バクテロイデス
AlistipesNM105A004_EU189022	0,000	0,023	0,000	0,024	0,028	アリスティペス
Doreaformicigenans_SaLBH10_JN093132	0,000	0,034	0,000	0,027	0,006	ドレア
Bacteroidesuniformis_JCM5828T_AB050110	0,009	0,090	0,024	0,104	0,068	バクテロイデス
Clostridiumleptum_DSM753T_AJ305238	0,006	0,195	0,015	0,166	0,011	クロストリジウム I V
butyrateproducingbacteriumSR1_1_AY305321	0,115	0,318	0,207	0,215	0,097	ブラウシア
ClostridiaceaeBacteriumDJF_LS13_EU728741	0,050	0,260	0,074	0,177	0,013	ドレア
Clostridiumnannantium_LA1_EU089964	0,043	0,294	0,077	0,325	0,070	クロストリジウム X I
ClostridiaceaeBacteriumoraltaxoni32_VO026_HM099644	0,005	0,306	0,012	0,445	0,098	アセチビブリオ
unidentifiedbacteriumdioneBSV28_AJ229190	0,068	0,443	0,126	0,521	0,091	未分類_細菌
butyrateproducingbacteriumA2231_AJ270484	0,047	0,438	0,087	0,438	0,039	コプロコッカス
BacteroidesspdkLV2_JF813174	0,278	0,893	0,262	0,589	0,027	バクテロイデス
Gemmigerformicilis_ATCC27749_X256_GU562446	0,121	1,264	0,198	1,421	0,057	ゲミカ
Alistipesputredinis_JCM16772_AB554232	0,000	1,171	0,000	1,319	0,037	アリスティペス
bacteriumIARFR184_KC153191	1,199	3,993	1,288	3,686	0,083	Uncl ラクノスピラ
Faecalibacteriumprausnitzii_A2165_AJ270469	1,167	4,820	1,585	3,226	0,020	フェカリバクテリウム

表 3 : C h e m o 処置患者と未処置患者との間で $p < 0.01$ を有する差別的に示された細菌種 (単離株)

【 0 1 1 5 】

発明者らはまた、回腸の腸微生物叢の 16 S r R N A のパイロシーケンシング分析及び並列して、化学療法を受けた又は受けていない患者の粘膜で検出可能なサイトカイン及び転写因子の転写プロファイリングを調査した。この調査を、同じ患者からの回腸粘膜から q R T - P C R によって実施した。R O R t 及び I L - 1 7 は両群においてそれほど異なっていなかったが、T - b e t は化学療法後に上方制御され、そして、化学療法後に高

10

20

30

40

50

レベルのビフィドバクテリウムとラクトバチルス属を有する2人の患者ではT-bet転写産物は他の患者と比べてかなり高く、pTH17 T細胞応答が処置によって発揮されたことが示唆された。

【0116】

実施例5：E・ヒラエはPTH17/TH1細菌であり、単独又はラクトバチルス（L・ジョンソニー）と連動してプロバイオティクス抗癌効果を誘導する。

細菌特異的な病原性TH17免疫応答の感作に対する異なった細菌種（具体的には、CTX後脾臓に移行できる細菌種）の影響を分析するために、発明者らは15日間広範囲ATBでC57BL/6マウスを処置し（糞便を滅菌した）、CTX（100mg/kg）の注射と、それに続く 10^9 個のE・ヒラエ± 10^9 個のL・ジョンソニーの経口強制飼養を実施した。細菌の単独定着又は二重定着後6日間、 $CD3^+CD4^+ROR\gamma t^+$ 又は $CCR6^+$ T細胞（以降「TH17」と呼ぶ）（図25B）から生じることがある、並びに、真正 $CD3^+CD4^+IFN\gamma^+$ 又は $CXCR3^+$ T細胞（以降TH1細胞と呼ぶ）（図25C）をもたらず場合がある、TH17細胞の中の $IFN\gamma^+$ 又は $CXCR3^+$ T細胞（以降「pTH17」と呼ぶ）（図25A）に焦点を合わせたフローサイトメトリ解析のために脾細胞を採取した。得られたデータは、L・ジョンソニーではなく、E・ヒラエがCTX後の脾臓においてTH1及びpTH17応答を媒介する優位な細菌であることを明らかにし、そしてそれはL・ジョンソニーの存在下でさらに拡大される場合がある（図25A、25C）。加えて、発明者らは現在、小腸中のグラム陽性細菌のカクテル（L・ジョンソニー+E・ヒラエ）の存在と、全身的pTH17細胞の単なる惹起だけではなく（図25）、ATBで処置したマウスにおけるCTX誘発抗腫瘍の部分的回復（図26）との間の因果関係について証拠を挙げている。

【0117】

実施例6：E・ヒラエは生体内における抗癌性免疫応答を促進した。

E・ヒラエに対する同族TH応答が、抗癌T細胞応答を促進する場合があるかどうか調査するために、2つの異なった前臨床モデルがセットアップした。最初に、オブアルブミン抗原（OVA）を発現するように遺伝子を組み換えられた腫瘍細胞株（線維肉腫MC-A205 OVA）を（又は対照として生理的食塩水）、14日間の広範囲ATB治療後にs.c.移植した。動物には、OVA₃₂₃₋₃₃₉特異的MHCクラスII-制御性OTII TCR遺伝子組み換えT細胞を養子移植し、そして、CTX（又は生理的食塩水）で処置した。発明者らは、脾臓及び腫瘍床における同種同系 $CD45.1^+$ T細胞及び類遺伝子性 $CD45.2^+$ OTII細胞の伸長及び活性化に対するE・ヒラエの経口強制飼養の「臨床的」影響を観察した（図27Aに提示した実験設定）。脾臓では、彼らは、pTH17細胞の蓄積で伴った（図27B、右のパネル） $CD4^+$ T細胞（図27B、中央パネル）の少なくとも一部の増殖による、宿主（ $CD45.1^+$ ）脾細胞（図27B、左のパネル）のE・ヒラエ誘発伸長を確認した。実際、彼らは、E・ヒラエが媒介した細胞分裂、蓄積、及び脾臓（図27C）における $CD45.2^+$ OTII細胞を養子移植した免疫記憶T細胞への分化を実証した。そのうえ、 $CD45.2^+$ T細胞を腫瘍床から取り戻し、 $CD44$ 分子を入手し、そして、E・ヒラエの経口摂取と関連して宿主TILsとほとんど同じくらい効率的に増殖した（図27D~F）。

【0118】

第二に、臨床的に関連しているマウスモデルを模倣するために、ヒトパピローマウイルス16（HPV16）E7（F. Sandoval et al, 2013）を発現するTCI細胞を使用して頭頸部及び肺癌の独自の同所性モデルを設定し、そして、報告した。粘膜ベクターとしてE7抗原（SBxT-E7）に連結した志賀毒素のBサブユニットで構成した非複製的送達系を使用したマウスに予防注射することによって、腫瘍退縮を得る場合がある。Vingertらは、胸部LN（そしてマクロファージでない）に存在する $CD103^+DC$ を標的とした鼻腔内ワクチン接種だけが粘膜インテグリン（ $CD49a$ 及び $CD103$ ）を発現する多官能性D^b-E7₃₉₋₄₇四量体結合 $CD8^+$ T細胞を惹起する場合があると報告した（B. Vingert et al, 2006）。この実験の実験設定を図28Aに示す。s.c. TC

Iモデルでは、腫瘍増殖は $S B \times T - E$ 7及び $C T X$ の組み合わせで有意に低減され、最終的に完全な腫瘍根絶につながる(図28B~C)。ワクチンの有効性に対する広範囲 $A T B$ の負の影響は図28B~Cで示され、ここで、それらの $T C I$ 腫瘍を完全に拒絶する動物のパーセンテージが劇的に低減した。次に、脾臓における多官能性 $D^{b} E 7 3 9 - 4 7$ 四量体結合 $C D 8^{+} T$ 細胞の伸長に対する E ・ヒラエの経口強制飼養の「臨床的」影響を観察した。実際、 E ・ヒラエは、非 $A T B / C T X$ 処置した正の対照に示したように(図28D)、それらの腫瘍を拒絶したマウス(しかし他には存在しない)の $D^{b} E 7 3 9 - 4 7$ 四量体結合 $C D 8^{+} T$ 細胞の伸長を復元した。

【0119】

要するに、腸殺菌処置マウスへの E ・ヒラエの単独定着は、 $C T X$ 誘発抗癌免疫応答を部分的に復元し、癌進行を阻止した状態を維持し得る。

10

【0120】

実施例7： E ・ヒラエの様々なクローンの間の比較($P T H 1 7$ について、 $C A C O - 2$ の抗アポトーシス効果について)。

最大で13個の他の E ・ヒラエ単離株/クローンを試験して、生体内におけるそれらの特異な免疫原性及び斯かる「抗癌プロバイオティクス」特性を媒介する能力を分析した。 E ・ヒラエの様々なクローンの細菌ゲノムパターンの整列を、パルスフィールドゲル電気泳動($P F G E$)(図29)で分析し、発明者らによって最初に単離されたクローン(クローン「Villejuif」、番号 $I - 4 8 1 5$ で2013年11月7日にCollection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur, Paris($C N C M$))に寄託)がゲノム配列の点で多くの他のものと異なっていることを明らかにした。1つのヒト単離株(クローン708)が、クローン $C N C M I - 4 8 1 5$ (図30)よりさらにすばらしい $T H 1$ 及び $T c 1$ 可能性を呈した。しかしながら、クローン708は、 $C T X$ で処置した樹立 $M C A 2 0 5$ 肉腫の抗癌性プロバイオティクス効果に関して $C N C M I - 4 8 1 5$ クローンよりよく働かなかった(未掲載)。種々の E ・ヒラエ単離株間の配列及び機能の差は、 E ・ヒラエ又は E ・コリの $C T X^{+ / -}$ 種々クローンに晒した $C a c o - 2$ 上皮性腸細胞株から $L D H$ 放出(細胞死の特徴)及びヒト $\alpha 2$ デフェンシン分泌を観察することを目的とした試験管内におけるアッセイで確認した。クローン $C N C M I - 4 8 1 5$ 及びクローン708は、おそらく抗微生物ペプチド $\alpha 2$ デフェンシンの産生を促進することによって $C T X$ 誘発 $C a c o 2$ 細胞死を予防し得るが、 E ・コリはそれができなかった(未掲載)。

20

30

【0121】

実施例8： $T L R 4$ 、 $N O D 1$ 、及び $N O D 2$ は、 $C T X$ 媒介性細菌トランスロケーション、 $P T H 1 7$ 惹起、及び殺腫瘍活性を妨げる。

どの腸免疫チェックポイントが、アルキル化剤による治療中の細菌トランスロケーションをチェックし続け得るのか分析するために、発明者らは、脾臓 $p T H 1 7$ 細胞の惹起と $M C A 2 0 5$ 担持 $C 5 7 B L / 6$ マウスにおける $C T X$ によって促進された腫瘍制御における腸の恒常性を調整する主要なパターン認識受容体の役割を調査した。

【0122】

E ・ヒラエ及び L ・ジョンソニーの増殖を可能にすること(Viaud et al., Science Nov. 2013)が主に知られている嫌気性条件で脾臓から細菌コロニーを培養することによって分析される細菌トランスロケーションは、 $N O D 1 \times N O D 2^{- / -}$ において促進された(図31A)。加えて、 $C T X$ 投与に続く脾臓 $p T H 1 7$ 細胞の感作は、 $N O D 2^{- / -}$ マウスにおいて増大した(一方で、野性型($W T$)マウスと比較して、 $M y d 8 8^{- / -}$ 動物においてそれは無効化された)(Viaud et al. Science 2013)(図31B)。遺伝子欠損動物を使用して得られたこれらの知見によると、発明者らは、医薬模倣物(pharmacomimetics)、すなわち、 $N O D 1$ 、 $N O D 2$ 、ペプチドグリカンミラミルジペプチド、及び $T r i D A P$ のリガンド、を使用してこれらの効果を表現型模写し、そしてそれは、便で抗微生物ペプチドリポカリン-2の放出を促進することによって局所的に作用し(図31D)、その結果、脾臓における $C T X$ 媒介性 $p T H 1 7$ を低減した(図31C)。

40

50

【0123】

これらの結果は、広範囲 A T B で処置したマウスが、E . ヒラエの経口強制飼養によって再構成され、腸間膜 L N における細菌トランスロケーションの動的観察前の C T X で処置される別の実験システムで確認された。この設定では、E . ヒラエコロニーの頻度が m L N において C T X 後に回復し、且つ、嫌気性条件における増殖の発生が T L R 4、N O D 1、及び N O D 2 K O マウスにおいて増強されるのが、実際に示された（未掲載）。従って、A T B で処置したレシピエントにおける C T X 誘発 p T H 1 7 細胞の惹起と、それに続くグラム⁺細菌の経口強制飼養は、T L R 4 作動薬（L P S 又は E . コリ）の存在下で劇的に低減し（図 3 2 A）、その一方で C T X 誘発 T H 1 及び T c 1 細胞は影響を受けなかった（図 3 2 B）。

10

【0124】

C T X によって媒介される免疫依存性抗肉腫効果は、W T 対応物（図 3 3 A ~ C）と比べて、単独ノックアウトマウス（N O D 1、N O D 2、R I P 2 又は C A R D 1 5）で改善されなかったが、N O D 1^{-/-} x N O D 2^{-/-} マウスにおいて有意に高められた（図 3 3 D ~ E）。そのうえ、A T B で処置したマウスにおいて、外因性 E . コリ又は L P S を、E . ヒラエ + L . ジョンソニーを含む経口強制飼養に提供することは、グラム⁺細菌の抗癌性プロバイオティクス効果が著しく低下させ、T L R 4 シグナル伝達に移行を妨げ、そのため p T H 1 7 蓄積と、その後の抗癌効果を妨げるという概念を裏付ける（図 3 4 A ~ B）。

【0125】

20

実施例 9：N O D 1^{-/-} x N O D 2^{-/-} マウスにおける有益な微生物叢失調は、増強された C T X の殺腫瘍活性に関連した。

W T 対 N O D 1^{-/-} x N O D 2^{-/-} 未処置マウスから採取した小腸及び便の両方のバイオフィルム由来の 1 6 S r R N A 遺伝子単位複製物のパイロシーケンシング分析を、C T X 又は P B S 投与の 7 日後に実施した。原理座標解析は、細菌群集構造が W T 対遺伝子欠損マウスからの C T X 群間の有意な違いを明らかにした（門及び属に関する図 3 5 ~ 3 6、O T U に関する表 4）。主にセグメント細菌に起因する（表 4）小腸（S I）におけるクロストリジウム科の（図 3 6 A ~ B）、及び S I におけるエリシペロトリクス

30

の相対喪失を伴う（図 3 6 A ~ B）、便中のポルフィロモナス科の（主にバーンシエラ）（図 3 5 A ~ B）、及び P B S（図 3 5 A - B）と比較した C T X 受容 N O D 1^{-/-} x N O D 2^{-/-} 未処置マウスの糞便中のラクノスピラの過剰発現があった。

E . ヒラエ + ウェルシュ菌の二重定着を用いた A T B 滅菌処置マウスの再構成は、C T X で処置したマウスにおける付加的 / 相乗的抗癌性プロバイオティクス効果を媒介した（図 3 7）。哺乳動物では、E . ヒラエの、非病原性細菌クロストリジウム属、例えば S F B、バーンシエラ又はホールデマニアなどとの組み合わせは、E . ヒラエ + ウェルシュ菌の組み合わせと同じくらい効果的であって、毒性がより低い。

【0127】

【表 4】

FDR	OTU	1st hit Sub score	1st hit sequence (nm)	Sub score relative	sequence name (nt)	門	綱	平均				p 値 (t 検定)			
								WT_CTX	WT	DKO_CTX	DKO_CTX vs WT	WT_CTX vs DKO_CTX	DKO_CTX vs WT	WT_CTX vs DKO_CTX	DKO_CTX vs WT
Increased in DKO_CTX	dr000055	0.791	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	unclassified "Bacteroides"	0.548	0.079	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000057	0.734	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000059	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000060	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000061	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000062	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000063	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000064	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000065	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000066	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000067	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000068	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000069	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000070	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000071	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000072	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000073	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000074	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000075	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000076	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000077	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
Decreased in DKO_CTX	dr000078	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000079	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000080	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000081	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000082	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000083	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000084	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000085	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000086	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000087	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
Increased in DKO_CTX	dr000088	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000089	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000090	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000091	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000092	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000093	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000094	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000095	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000096	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000097	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000
	dr000098	0.699	uncloned_bactium_1	0.679	Gammaglutamate bacillus (JF713) ATCC 25411	Bacteroides	Bacteroides	0.000	0.000	21.386	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000

表 4

【 0 1 2 8 】

実施例 10 : グラム陰性菌は抗癌性免疫記憶 T 細胞応答に必須である。

より優れた抗癌性応答を呈した NOD 1 × NOD 2 二重ノックアウトマウスにおいて単離されたグラム陰性 OTU の過剰発現を考慮に入れて、発明者らは長期で CTX に関連して使用される OVA ベースの癌ワクチンを使用した作り出される長期保護状態にあるグラム陰性菌の役割に取り組んだ。広範囲 ATB は、OVA 操作腫瘍細胞と共に致死攻撃に

10

20

30

40

50

対して癌ワクチンの長期保護を妨げた。興味深いことに、バンコマイシンは、ワクチンが動物を免疫することを妨げることなく、一方でグラム陰性菌を殺滅するコリスチンはそうした(図38)。CTXは腫瘍ワクチンを賦活するためにグラム陰性腸アジュバントを動員し得ると結論づけられる。

【0129】

実施例11：CTX媒介性抗癌効果を改善する抗生物質の投薬計画。

NOD遺伝的欠損によって媒介又は強化される微生物叢失調はCTXの治療学的な成功を改善し得るので、発明者らは、Zhang Y et al. (2014) に記載の異なったATB投薬計画が腫瘍増殖に明確に影響し得るかどうかに取り組んだ。実際、プロトコールは、ファーマキューテスが減少することを報告し、最も特に、ファーマキューテス/バクテロイド比(ネオマイシン+セファロチン又はバンコマイシン+イミペナムの組み合わせなど)(図39C~D)を最終的に、減少させるクロストリジウム科は、CTXが誘発する抗癌効果を改善し得るが、それに対し、シフロキサシン(対照的に、バクテロイデテスの顕著な抑制を引き起こした)は効果的でなかった(図39B)。注意すべきは、ネオマイシン+セファロチンの組み合わせはSFB出現を増大させる可能性があり、それに対して、vanc o +イミペナムはポルフィロモナスのそれを増強した(Zhang Y et al., 2014)。

【0130】

参考文献

【0131】

【化 1】

- Apetoh, L. et al. (2007) Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*, 13, 1050-1059.
- Arntzen EH, (2008), *Cancer Immunol Immunother* 57 (10): 1559
- Bottger, E.C. (1989) Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiol Lett*, 53, 171-176.
- Caporaso, J.G. et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*, 7, 335-336. 10
- Chaput, N. et al. (2013) Phase I clinical trial combining imatinib mesylate and IL-2: HLA-DR NK cell levels correlate with disease outcome. *Oncoimmunology*, 2, e23080.
- Chaput, N. et al. (2006) Dendritic cell derived-exosomes: biology and clinical implementations. *J Leukoc Biol*, 80, 471-478.
- Caux C et al. (1996), *J Exp Med*, 184 (2): 695.
- Cole, J.R., et al. (2009) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*, 37, D141-145.
- Cong, Y. et al. (2009) A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 19256-19261. 20
- Cortez-Retamozo, V. et al. (2012). Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 2491-2496.
- Cortez-Retamozo, V. et al. (2013). Angiotensin II drives the production of tumor-promoting macrophages. *Immunity*, 38, 296-308.
- Darfeuille-Michaud, A. et al. (2004) High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 127, 412-421.
- Demidenko, E. (2006) The assessment of tumour response to treatment. *Journal of the royal statistical society series C-applied statistics*, 55, 365.
- Dzutsev A, et al. (2014) The role of the microbiota in inflammation, carcinogenesis, and cancer therapy. *Eur J Immunol*. 2014 Oct 18. doi: 10.1002/eji.201444972. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25328099. 30
- Furet, J.P. et al. (2009). Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Ecol*, 68, 351-362.
- Furet, J.P., et al. (2010). Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes*, 59, 3049-3057.
- Geuking, M.B., et al. (2011) Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity*, 34, 794-806. 40
- Ghiringhelli, F., et al. (2004) CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol*, 34, 336-344.

【 0 1 3 2 】

【化2】

- Ghoreschi, K. et al. (2010). Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature*, 467, 967-971.
- Grivennikov, S.I. et al. (2012). Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*, 491, 254-258.
- Heinze, G. (2006) A comparative investigation of methods for logistic regression with separated or nearly separated data. *Stat Med*, 25, 4216-4226.
- Helsel, D.R. (2005) *Nondestructive Data Analysis; Statistics for censored environmental data.* . John Wiley and Sons, USA, NJ, 10
- Hooper, L.V. et al. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336, 1268-1273.
- Hugenholtz, P., et al. (2001) Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain Bacteria with no known pure-culture representatives. *Appl Environ Microbiol*, 67, 411-419.
- Joossens, M., et al. (2011). Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*, 60, 631-637.
- Kroemer, G., et al. (2013). Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol*, 31, 51-72.
- Kverka, M., et al. (2011) Oral administration of Parabacteroides distasonis antigens attenuates experimental murine colitis through modulation of immunity and microbiota composition. *Clin Exp Immunol*, 163, 250-259. 20
- Lathrop, S.K., et al. (2011). Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature*, 478, 250-254.
- Lee, Y., et al. (2012). Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol*, 13, 991-999.
- Lee, Y.K., et al. (2011). Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 Suppl 1, 4615-4622.
- Lepage, P., et al. (2005). Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis*, 11, 473-480. 30
- Lesterhuis WJ, (2008) *Crit Rev Oncol Hematol*, 66, 118
- Ley, R.E., et al. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 11070-11075.
- Li, W. and Godzik, A. (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22, 1658-1659.
- Ma, Y., et al. (2011). Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *J Exp Med*, 208, 491-503.
- Manichanh, C., et al. (2006) Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, 55, 205-211.
- Mayeur, C., et al. (2013). Faecal D/L lactate ratio is a metabolic signature of microbiota imbalance in patients with short bowel syndrome. *PLoS One*, 8, e54335. 40
- Michaud, M., et al. (2011). Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science*, 334, 1573-1577.

【0133】

【化 3】

- Newton, E. and Rudel, R. (2007) Estimating correlation with multiply censored data arising from the adjustment of singly censored data. *Environ Sci Technol*, 41, 221-228.
- Palucka K, (2013) *Curr Opin Immunol* 25 (3): 396
- Rice, L.B. (2006) Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *Am J Infect Control*, 34, S11-19; discussion S64-73.
- Romesburg, H.C. (1985) Exploring, confirming and randomization tests. *Computers and Geosciences*, 11, 19.
- Sallusto F, (1994) *J Exp Med* 179: 1109.
- Sandoval F. et al. (2013), Mucosal imprinting of vaccine-induced CD8(+) T cells is crucial to inhibit the growth of mucosal tumors. *Science translational medicine* 5, 172ra20.
- Schlitzer, A., et al. (2013). IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity*, 38, 970-983.
- Seksik, P., et al. (2003) Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*, 52, 237-242.
- Sobhani, I., et al. (2011). Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One*, 6, e16393.
- Sokol, H., et al. (2006) Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 12, 106-111.
- Sugar, E., et al. (2012). Reporting of preclinical tumor-graft cancer therapeutic studies. *Cancer Biol Ther*, 13, 1262-1268.
- Turnbaugh, P.J., et al. (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457, 480-484.
- Ubeda, C., et al. (2010). Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest*, 120, 4332-4341.
- Vanlint S, (2014) *Cancer Immunol Immunother*, 63 (9): 959.
- van Vliet, M.J., et al. (2010). The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. *PLoS Pathog*, 6, e1000879.
- Viaud, S., et al. (2011). Cyclophosphamide induces differentiation of Th17 cells in cancer patients. *Cancer Res*. 71(3), 661-665.
- Viaud, S. et al. (2013), The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science* 342(6161): 971-6.
- Viaud S, et al. (2014). Harnessing the intestinal microbiome for optimal therapeutic immunomodulation. *Cancer Res*. 2014 Aug 15;74(16):4217-21. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0987. Epub 2014 Jul 29. PubMed PMID: 25074615.
- Viaud S, et al. (2014). Gut microbiome and anticancer immune response: really hot Sh*t! *Cell Death Differ*. 2014 May 16. doi: 10.1038/cdd.2014.56. [Epub ahead of print] Review. PubMed PMID: 24832470.

10

20

30

40

【 0 1 3 4 】

【化4】

- Viaud S, et al. (2014). Why should we need the gut microbiota to respond to cancer therapies? *Oncoimmunology*. 2014 Jan 1;3(1):e27574. Epub 2014 Jan 17. PubMed PMID: 24800167; PubMed Central PMCID: PMC4006853.
- Vingert B. et al. (2006). The Shiga toxin B-subunit targets antigen in vivo to dendritic cells and elicits anti-tumor immunity. *European journal of immunology* 36, 1124.
- Wu, H.J., et al. (2010). Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity*, 32, 815-827.
- Wu, N., et al. (2013). Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. *Microb Ecol*, 66, 462-470.
- Wu, S., et al. (2009) A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med*, 15, 1016-1022.
- Yang, J., et al. (2013). The changes induced by cyclophosphamide in intestinal barrier and microflora in mice. *Eur J Pharmacol*, 714, 120-124.
- Yin, Y., et al. (2013). Comparative analysis of the distribution of segmented filamentous bacteria in humans, mice and chickens. *Isme J*, 7, 615-621.
- Zhang Y et al. (2014) *Toxicology and Applied Pharmacology* 277: 138-145.
- Zitvogel, L., et al. (2008) Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol*, 8, 59-73.
- Zwiehler, J., et al. (2011). Changes in human fecal microbiota due to chemotherapy analyzed by TaqMan-PCR, 454 sequencing and PCR-DGGE fingerprinting. *PLoS One*, 6, e28654.

10

20

【図 1 A】



FIGURE 1A

【図 1 B】

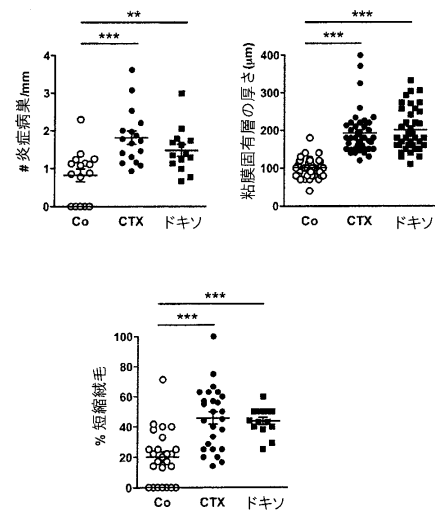


FIGURE 1B

【図 1 C】

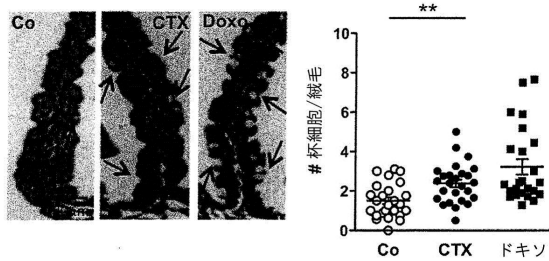


FIGURE 1C

【図 1 E】

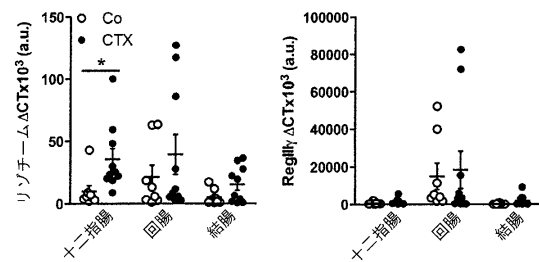


FIGURE 1E

【図 1 D】

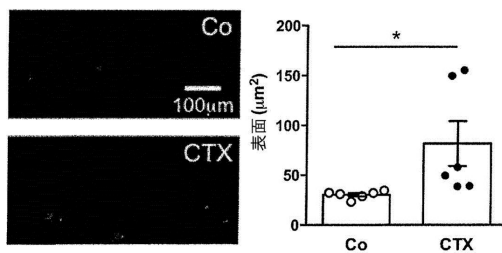


FIGURE 1D

【図 1 F】

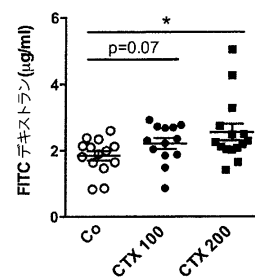


FIGURE 1F

【図 2 A】

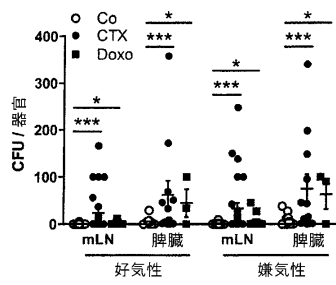


FIGURE 2A

【図 2 B】

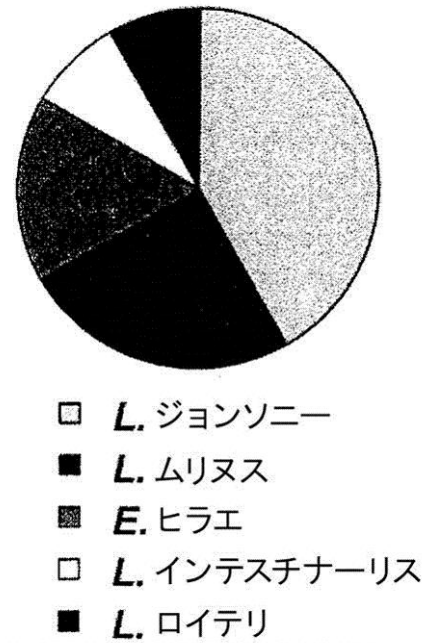


FIGURE 2B

【図 2 C】

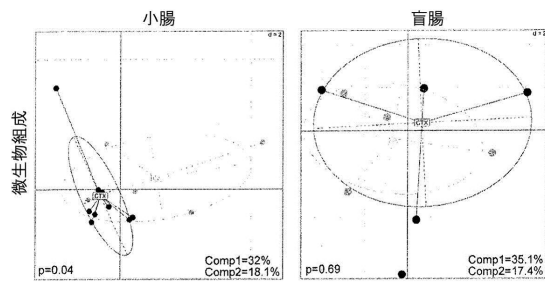


FIGURE 2C

【図 2 D】

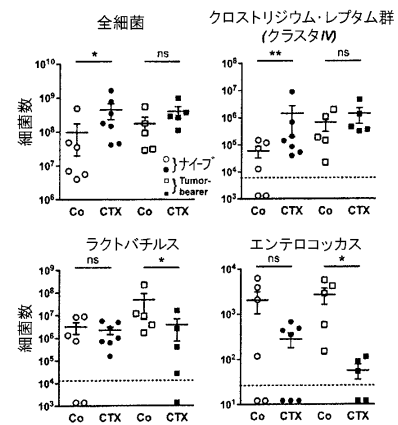


FIGURE 2D

【図 3 A】

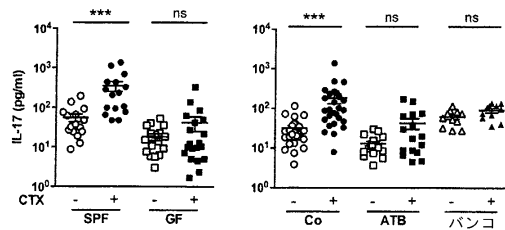


FIGURE 3A

【図 3 B】

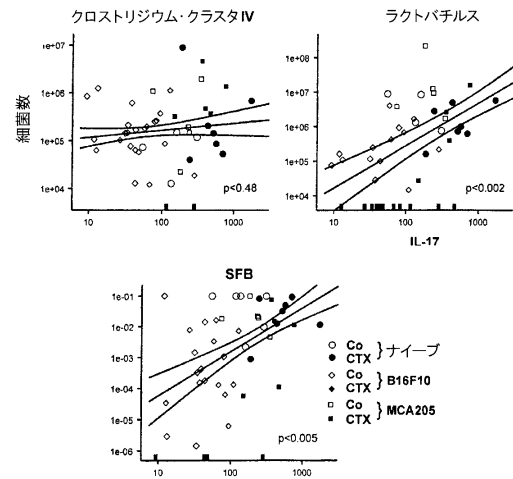


FIGURE 3B

【図 3 C】

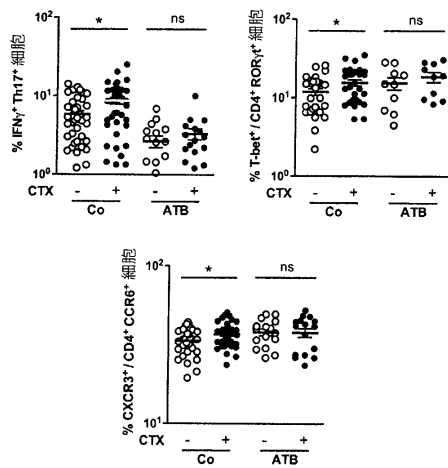


FIGURE 3C

【図 3 D】

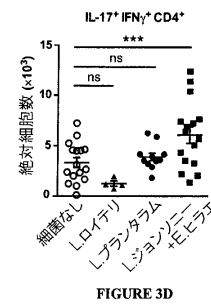


FIGURE 3D

【図 3 E】

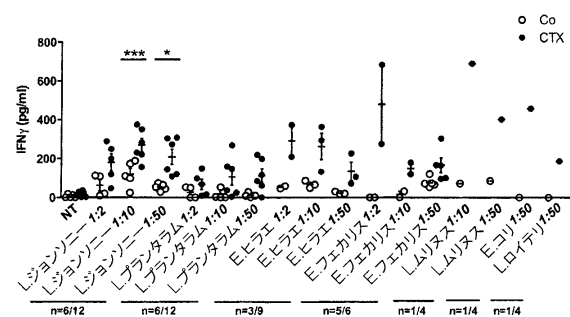


FIGURE 3E

【図 4 A】

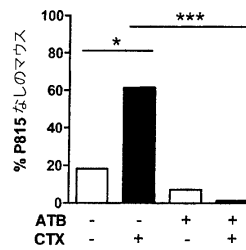


FIGURE 4A

【図 4 C】

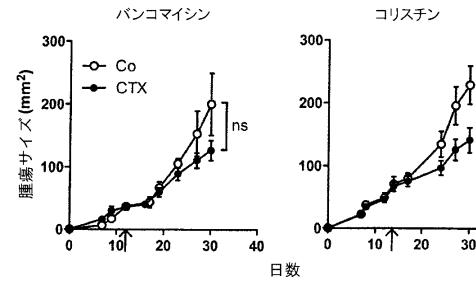


FIGURE 4C

【図 4 B】

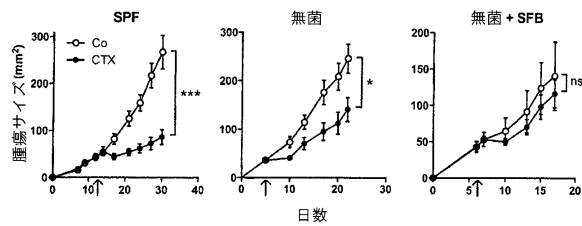


FIGURE 4B

【図 4 D】

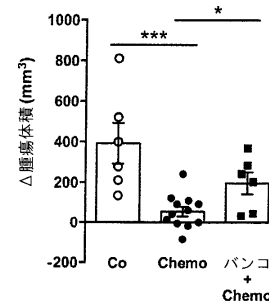


FIGURE 4D

【図 4 E】

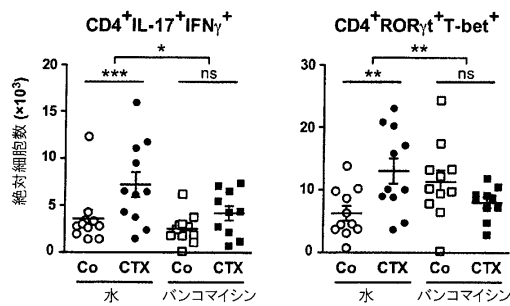


FIGURE 4E

【図 4 G】

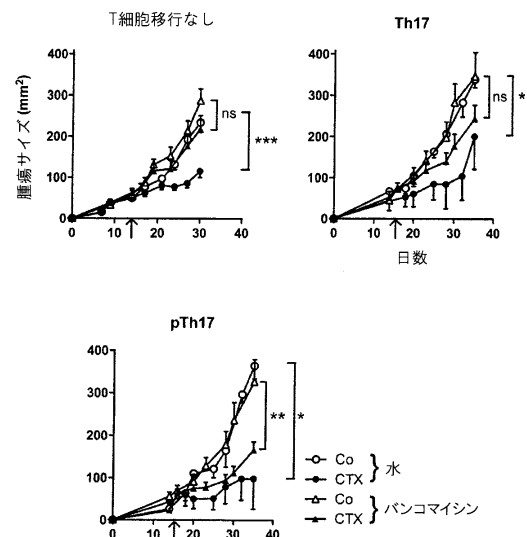


FIGURE 4G

【図 4 F】

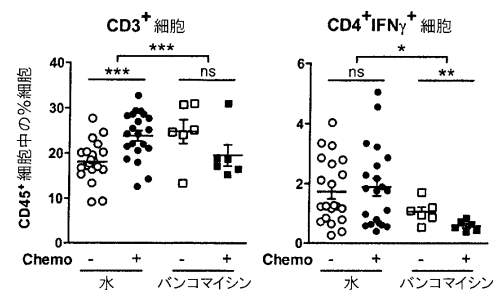


FIGURE 4F

【図 5 A】

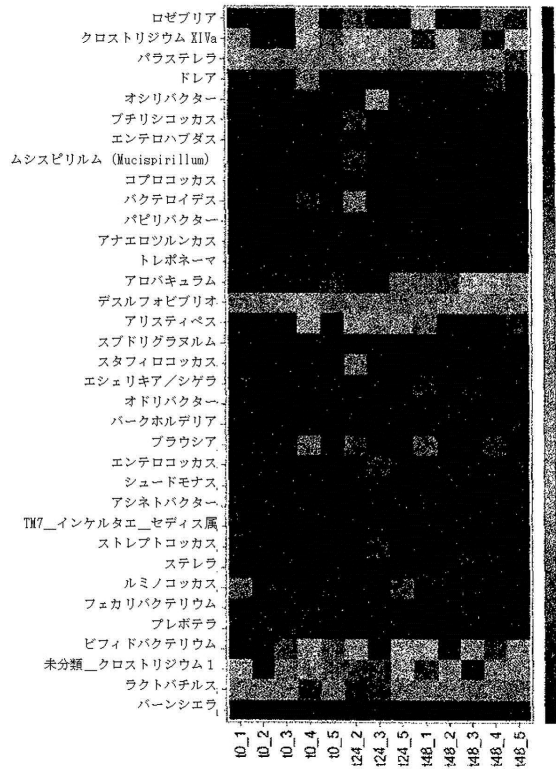


FIGURE 5A

【図 5 B】

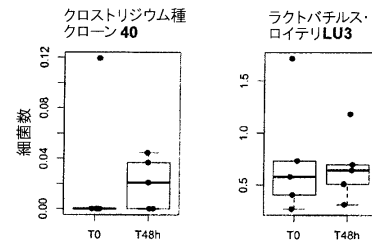


FIGURE 5B

【図 5 C】

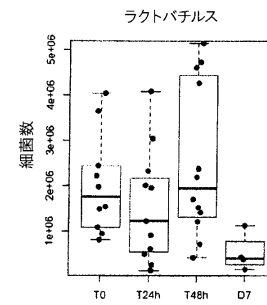


FIGURE 5C

【図 6】

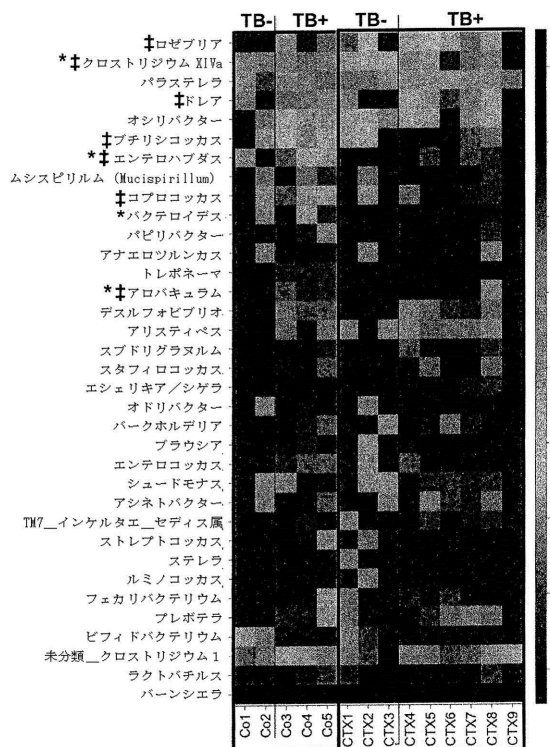


FIGURE 6

【図 7 A】

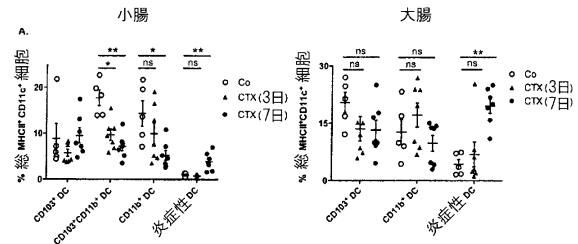


FIGURE 7A

【図 7 B】

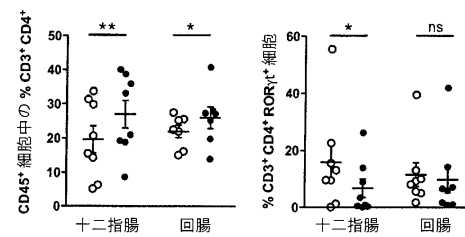


FIGURE 7B

【図 7 C】

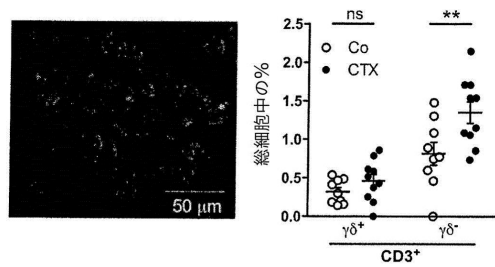


FIGURE 7C

【図 7 D】

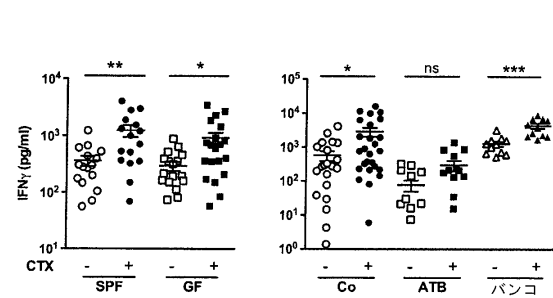


FIGURE 7D

【図 7 E】

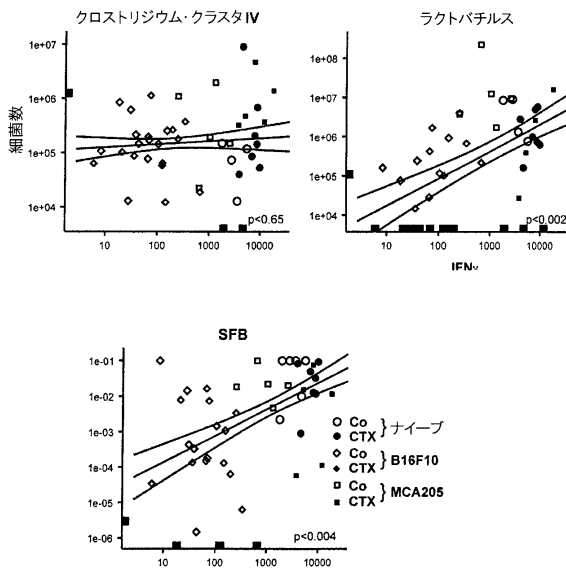


FIGURE 7E

【図 7 F】

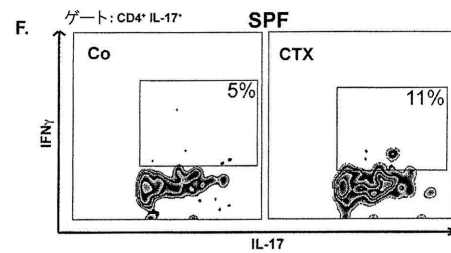


FIGURE 7F

【図 8 A】

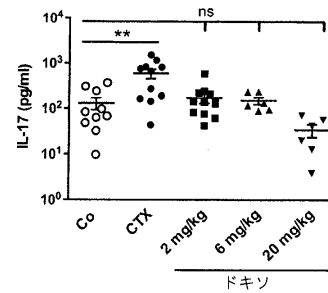


FIGURE 8A

【図 8 B】

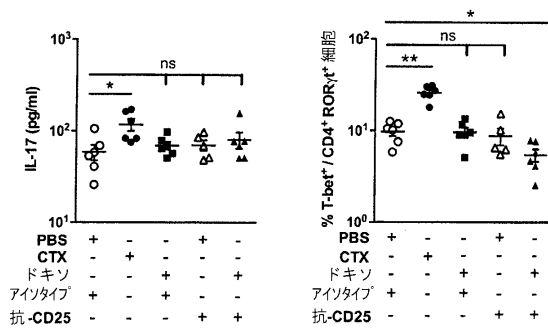


FIGURE 8B

【図 8 C】

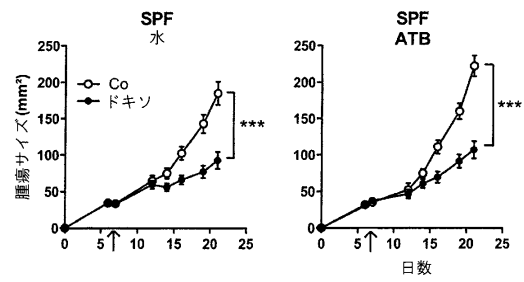


FIGURE 8C

【図 9】

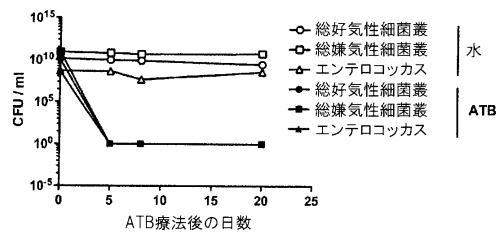


FIGURE 9

【図 1 1】

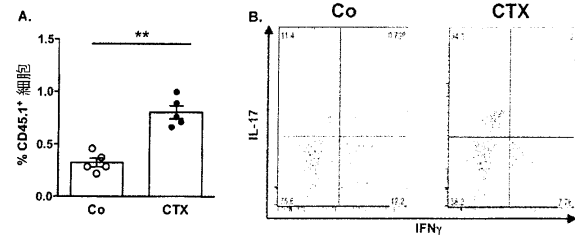


FIGURE 11

【図 1 0】

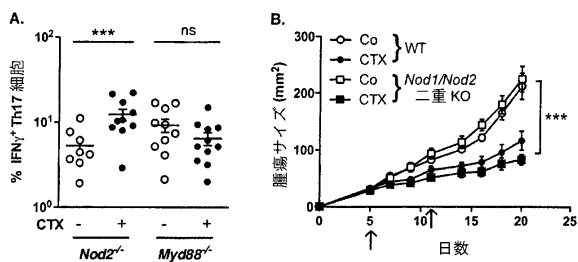


FIGURE 10

【図 12】

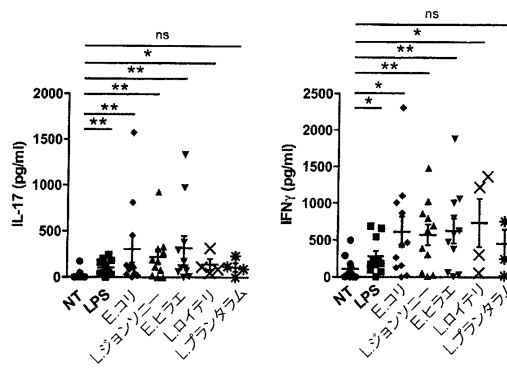


FIGURE 12

【図 13】

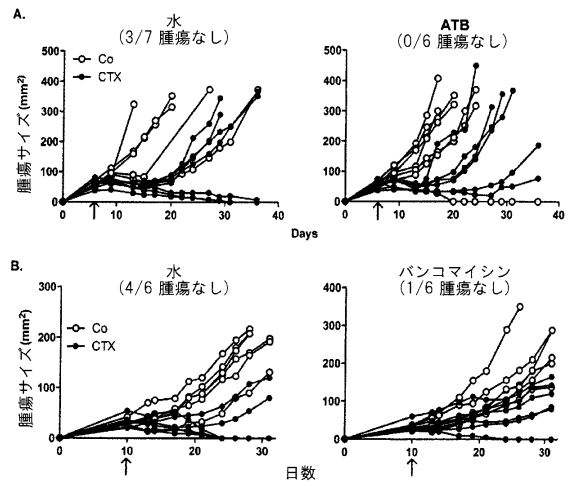


FIGURE 13

【図 14】

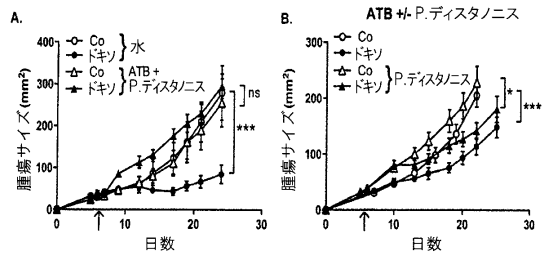


FIGURE 14

【図 16】

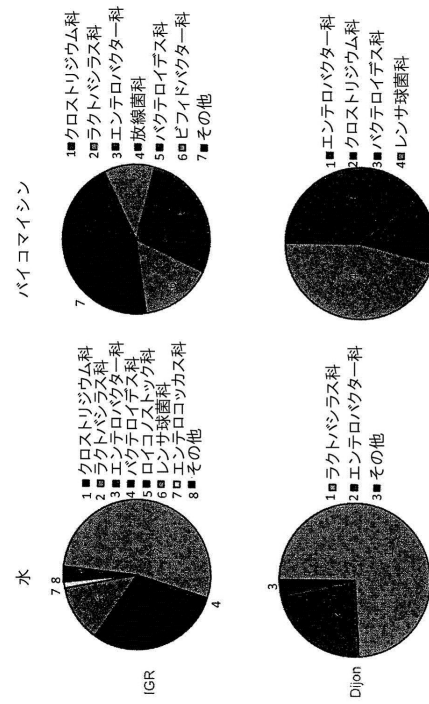


FIGURE 16

【図 15】

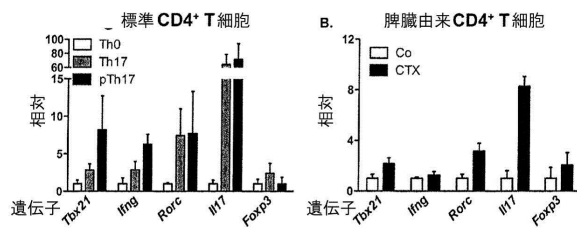


FIGURE 15

【図 17】

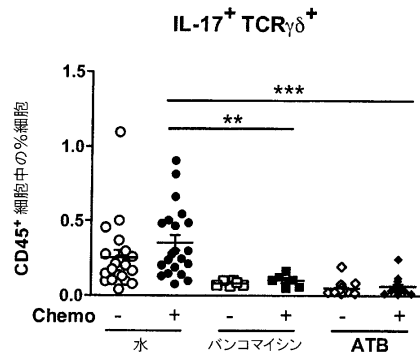


FIGURE 17

【図 19】

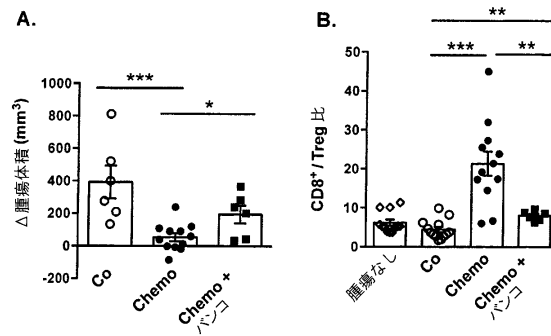


FIGURE 19

【図 18】

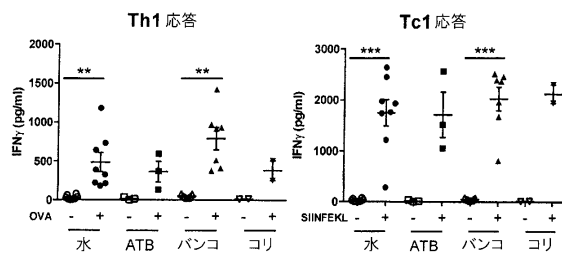


FIGURE 18

【図 20 A】

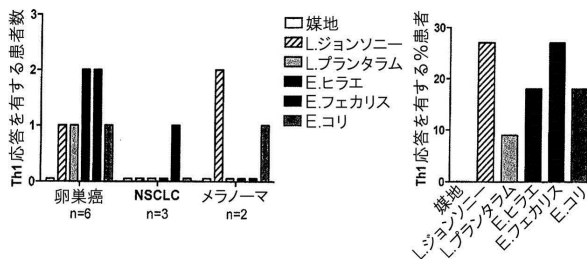


FIGURE 20A

【図 20 B】

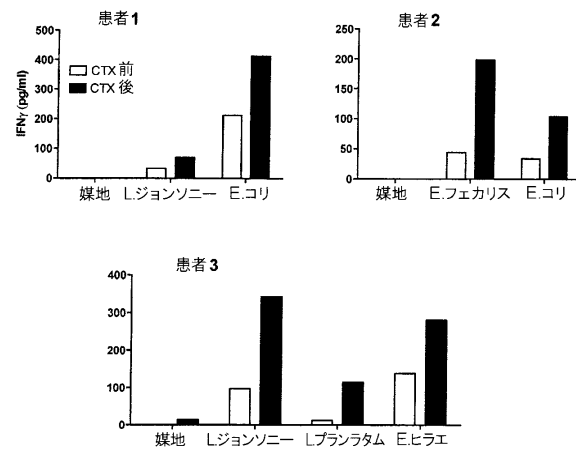


FIGURE 20B

【 図 2 0 C 】

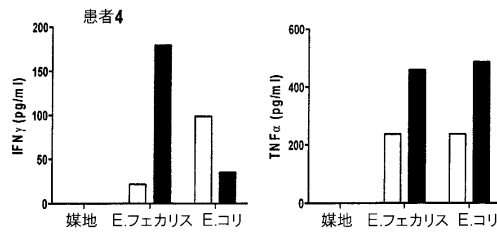


FIGURE 20C

【 図 2 0 D 】

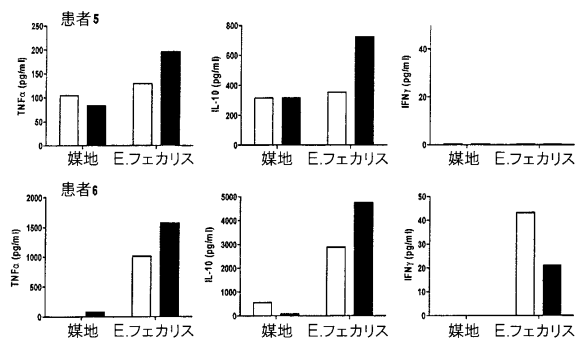


FIGURE 20D

【 図 2 2 】

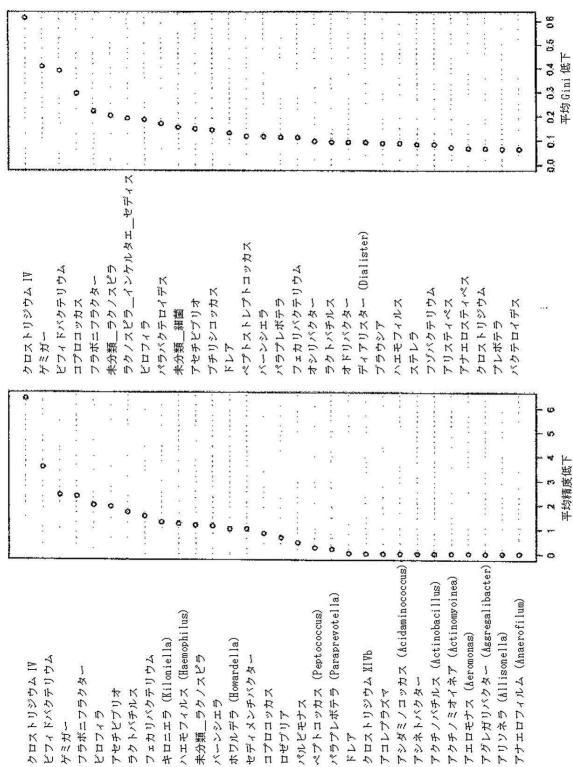


FIGURE 22

【 図 2 1 】

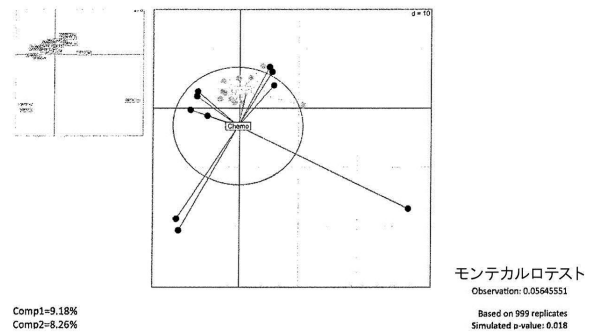


FIGURE 21

【 図 2 3 】

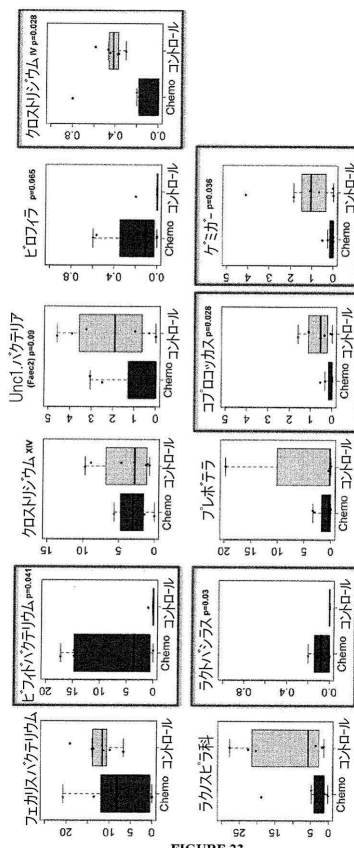


FIGURE 23

【 図 2 4 】

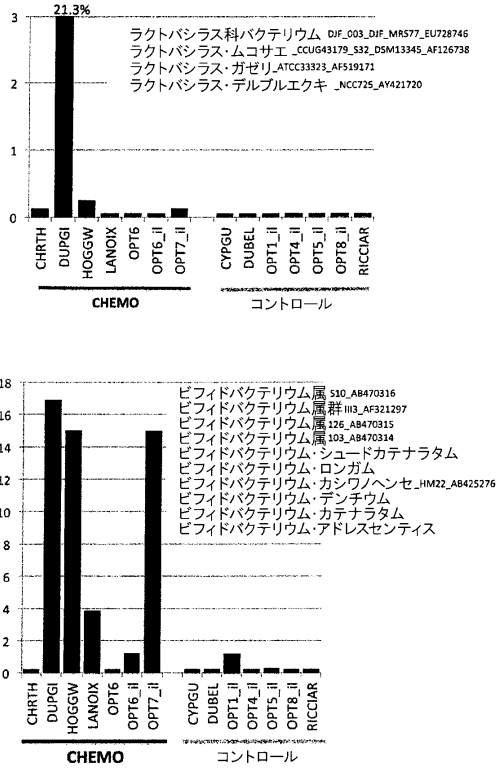


FIGURE 24

【 図 2 5 】

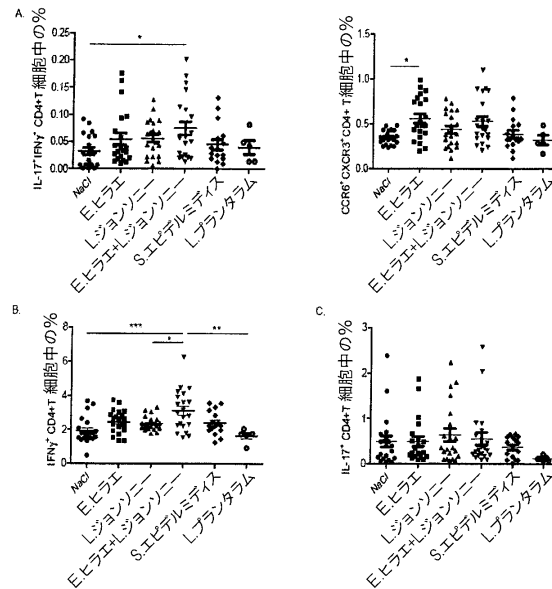


FIGURE 25

【 図 2 6 】

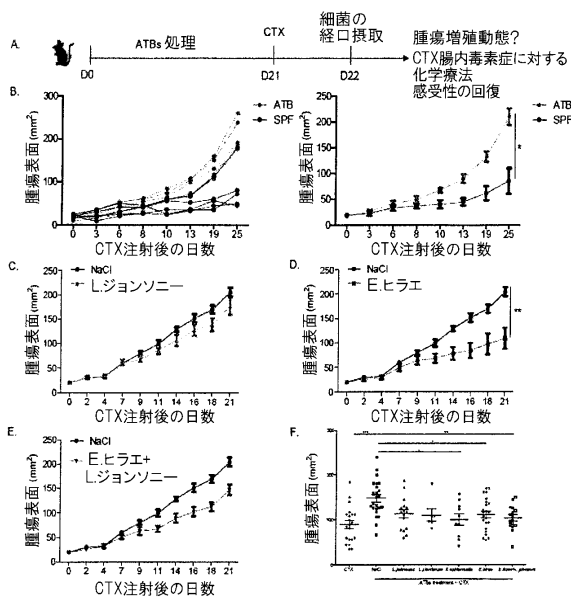


FIGURE 26

【 図 2 7 】

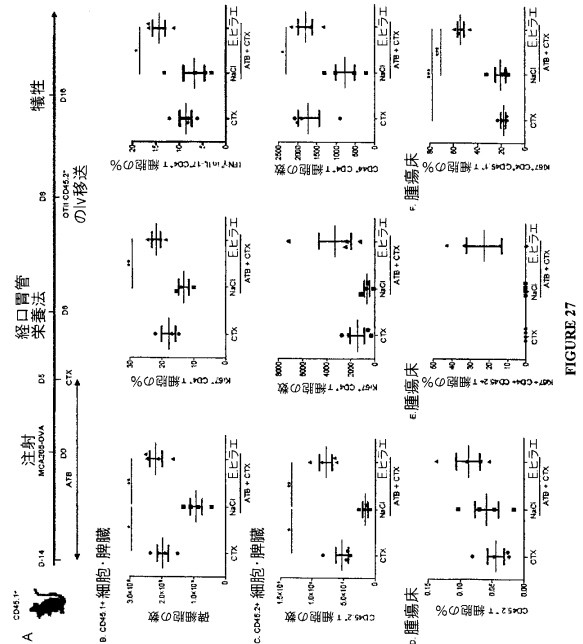


FIGURE 27

【図 28】

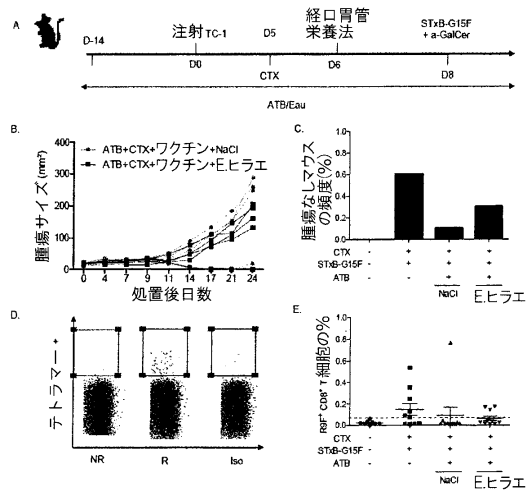


FIGURE 28

【図 29】

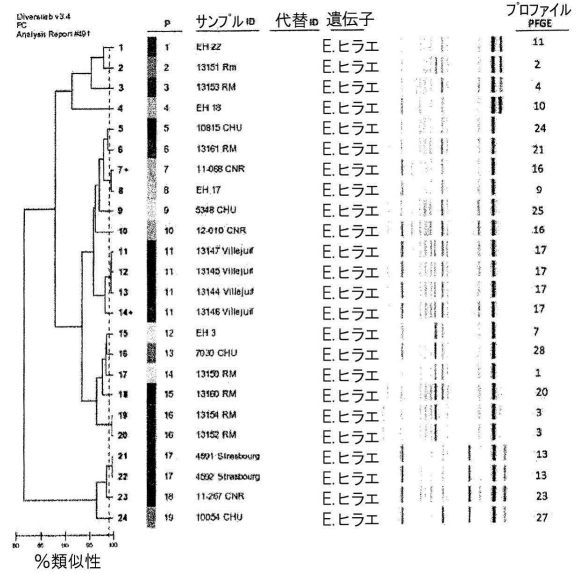


FIGURE 29

【図 30】

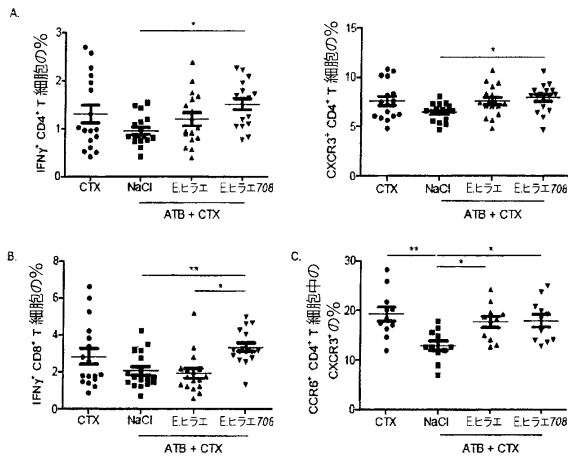


FIGURE 30

【図 31】

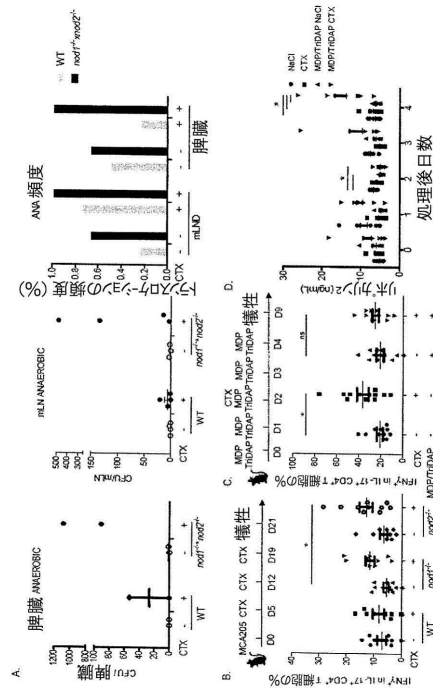


FIGURE 31

【図 3 2】

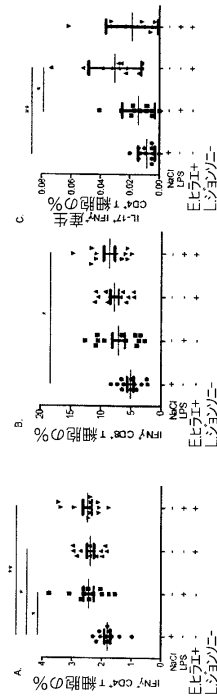


FIGURE 32

【図 3 3】

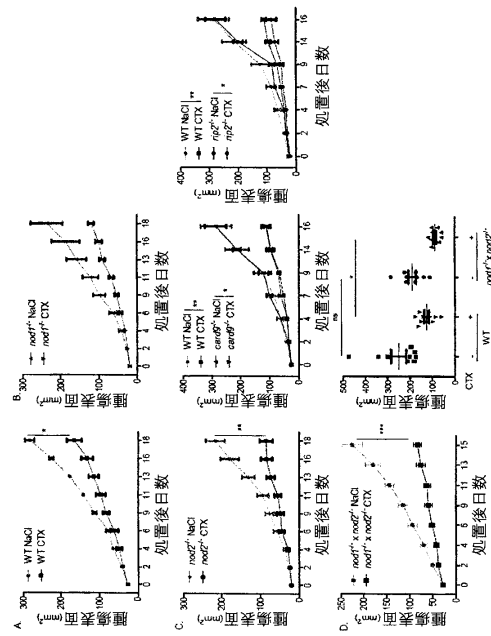


FIGURE 33

【図 3 4】

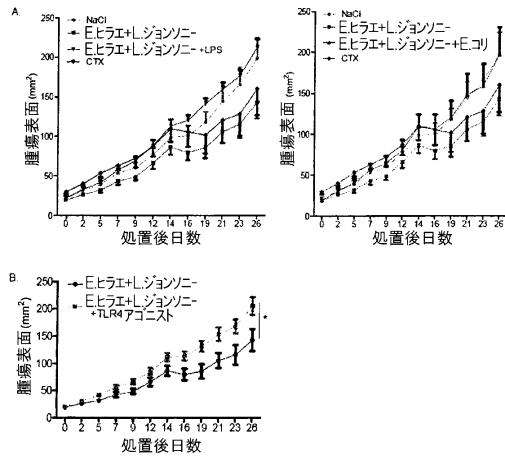


FIGURE 34

【図 3 5 A】

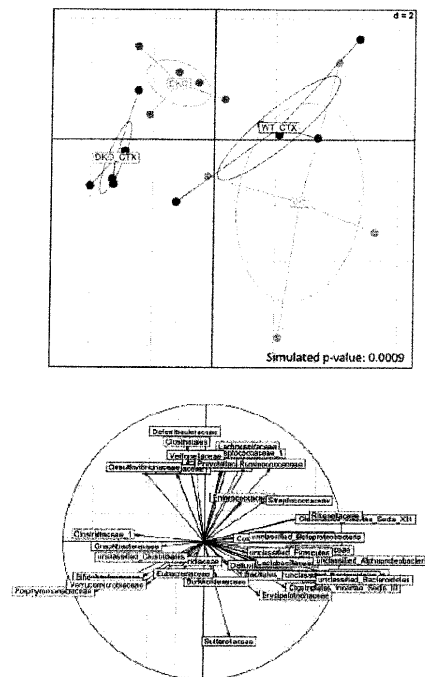
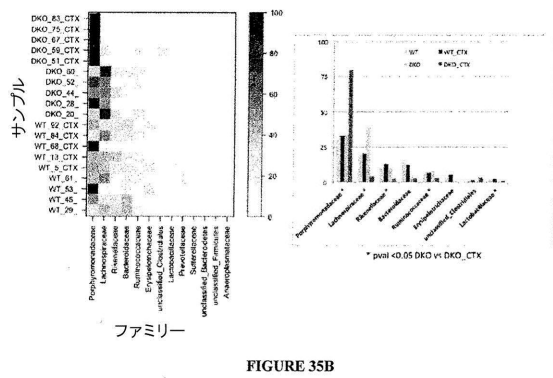
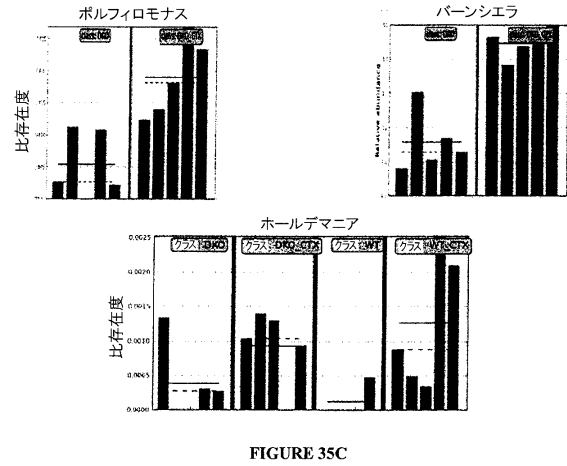


FIGURE 35A

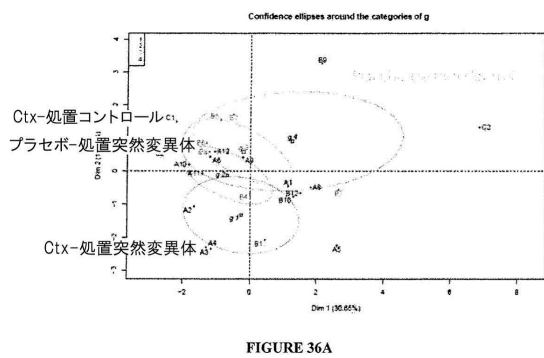
【図 3 5 B】



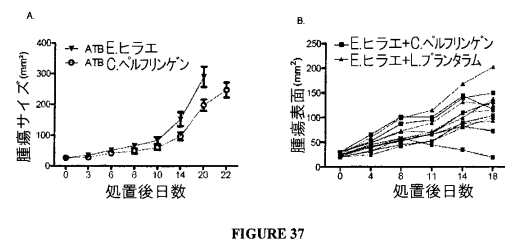
【図 3 5 C】



【図 3 6 A】

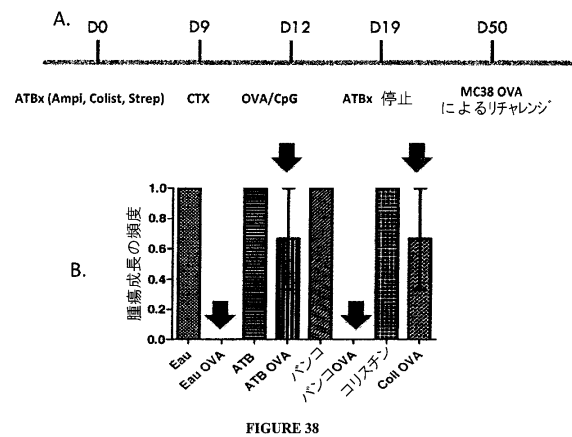
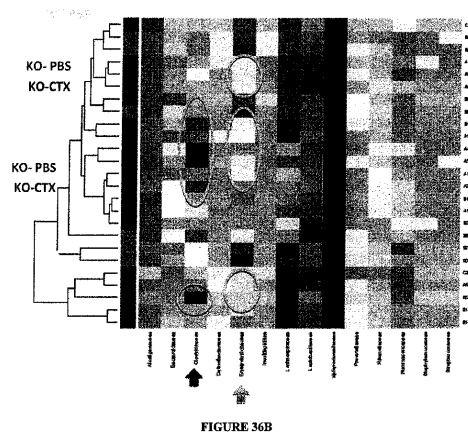


【図 3 7】



【図 3 8】

【図 3 6 B】



【図 39】

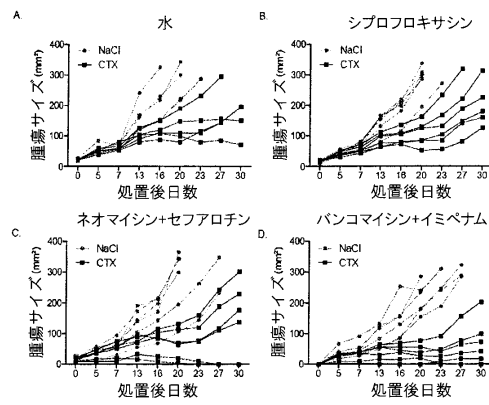


FIGURE 39

【配列表】

0006662775000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	31/675 (2006.01)	A 6 1 K	31/675
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 2 1
C 1 2 N	1/20 (2006.01)	C 1 2 N	1/20 A

微生物の受託番号 CNCM CNCM I-4815

微生物の受託番号 CNCM CNCM I-4823

前置審査

(74)代理人 100173107
弁理士 胡田 尚則

(72)発明者 ロランス ジボジェル
フランス国, エフ - 7 5 0 0 6 パリ, アブニユ デュ オプセルバトワール, 1 4

(72)発明者 イボ ゴンペールテ ボネカ
フランス国, エフ - 9 4 4 0 0 ビトリ シュル セーヌ, シュマン サン マルタン 2 6, メ
ゾン 1

(72)発明者 パトリシア レバジェ
フランス国, エフ - 9 2 3 2 0 シャティヨン, リュ シャトーブリアン 3

(72)発明者 ソフィ ビオー
フランス国, エフ - 7 5 0 1 2 パリ, ブールバール ポニアトースキ 6 1

(72)発明者 ロマン ダイル
フランス国, エフ - 9 4 8 0 0 ビルジュイフ, リュ エドワール トロンブレ 9

審査官 鳥居 福代

(56)参考文献 特表 2 0 1 2 - 5 0 2 9 9 6 (J P , A)
特表 2 0 1 0 - 5 2 6 5 3 9 (J P , A)
特開平 1 0 - 0 2 9 9 4 6 (J P , A)
Infection and Immunity, 1 9 9 2 年, Vol.60, No.9, pp.3664-3672
European Journal of Pharmacology, 2 0 1 3 年 6 月 1 8 日, Vol.714, pp.120-124

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8
A 6 1 K 3 1 / 3 3 - 3 3 / 4 4
A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)