

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7097027号

(P7097027)

(45)発行日 令和4年7月7日(2022.7.7)

(24)登録日 令和4年6月29日(2022.6.29)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/19 (2006.01)

A 6 1 K 31/19

Z N A

A 6 1 K 47/61 (2017.01)

A 6 1 K 47/61

A 6 1 P 37/06 (2006.01)

A 6 1 P 37/06

A 6 1 P 3/10 (2006.01)

A 6 1 P 3/10

A 6 1 P 17/06 (2006.01)

A 6 1 P 17/06

請求項の数 17 (全57頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-507125(P2019-507125)

(86)(22)出願日 平成29年8月10日(2017.8.10)

(65)公表番号 特表2019-527714(P2019-527714
A)

(43)公表日 令和1年10月3日(2019.10.3)

(86)国際出願番号 PCT/AU2017/050845

(87)国際公開番号 WO2018/027274

(87)国際公開日 平成30年2月15日(2018.2.15)

審査請求日 令和2年8月7日(2020.8.7)

(31)優先権主張番号 2016903143

(32)優先日 平成28年8月10日(2016.8.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関
オーストラリア(AU)

(73)特許権者 501249191

モナッシュ ユニバーシティ

オーストラリア国 3 8 0 0 ビクトリア
州, クレイトン, ウェリントン ロード

(73)特許権者 317002869

コモンウェルス サイエнтиフィック
アンド インダストリアル リサーチ オ
ーガナイゼーションオーストラリア国オーストラリアン・キ
ャピタル・テリトリー 2 6 0 1, アク
トン, クルニーズ・ロス・ストリート

(74)代理人 100080791

弁理士 高島 一

(74)代理人 100136629

弁理士 鎌田 光宜

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 自己免疫疾患の処置及び予防のための代謝物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体における自己免疫疾患の悪化を遅延させるか若しくは予防するか、又は自己免疫疾患を処置する使用のための、2種以上の短鎖脂肪酸、又はそれらの塩の組み合わせを含む組成物であって、

前記短鎖脂肪酸又はそれらの塩の組合せは、酢酸及び酪酸を含み、前記短鎖脂肪酸又はそれらの塩は、澱粉分子の形状の担体にコンジュゲートされる、組成物。

【請求項 2】

前記組合せは、プロピオン酸又はその塩をさらに含み、該プロピオン酸又はその塩は、澱粉分子にコンジュゲートされる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記自己免疫疾患の処置が、個体における炎症の軽減又は処置を含み、好ましくは、炎症の軽減又は処置には、前記個体において1種以上のプロ炎症性サイトカインの割合を低減すること、又は前記個体において1種以上の抗炎症薬サイトカインの割合を増大させることを含む、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

個体における自己免疫疾患の発症を予防するか又は遅延させる使用のための、2種以上の短鎖脂肪酸、又はそれらの塩の組み合わせを含む組成物であって、

前記短鎖脂肪酸又はそれらの塩の組合せは、酪酸及び酢酸又はそれらの塩であり、前記短鎖脂肪酸又はそれらの塩は澱粉分子の形状で担体にコンジュゲートされている、組成物。

【請求項 5】

前記組合せは、プロピオン酸又はその塩をさらに含み、該プロピオン酸又はその塩は、澱粉分子にコンジュゲートされる、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記個体が自己免疫疾患の発生の危険性があると判定される、好ましくは前記個体が自己免疫疾患の発生の危険性に関連した自己抗体又は炎症性マーカーを有すると判定される、請求項 4 又は 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記自己免疫疾患は、1 型糖尿病、乾癬、関節リウマチ、炎症性腸疾患、セリアック病、自己免疫性肝炎、心筋炎、ループス腎炎、多発性硬化症又は原発性胆汁性肝硬変からなる群から選択される、好ましくは前記自己免疫疾患は、1 型糖尿病である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 8】

前記自己免疫疾患は 1 型糖尿病又は乾癬である、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記組成物は、酢酸と共有結合した澱粉分子と、酪酸と共有結合した澱粉分子との組合せを含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記組成物は、各澱粉分子が、少なくとも 1 個の酢酸分子と、少なくとも 1 個の酪酸分子とにコンジュゲートされた、澱粉分子の組合せを含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 11】

短鎖脂肪酸の組合せを個体の大腸内に送達するための食物薬剤であって、遊離脂肪酸を与えるために、個体の結腸内で加水分解性である結合によって前記短鎖脂肪酸に共有結合された澱粉分子を含み、前記短鎖脂肪酸の組合せは酪酸及び酢酸であり、好ましくは、前記組合せは、さらにプロピオン酸を含み、自己免疫疾患の悪化を遅延させるか若しくは予防するか、又は自己免疫疾患を処置するための、

食物薬剤。

30

【請求項 12】

前記食物薬剤は、酢酸に共有結合した澱粉分子と、酪酸に共有結合した澱粉分子との組合せを含む、請求項 11 に記載の食物薬剤。

【請求項 13】

澱粉の各分子は、少なくとも 1 つの酪酸及び少なくとも 1 つの酢酸分子に共有結合される、請求項 11 に記載の食物薬剤。

【請求項 14】

自己免疫疾患を処置するか又はその悪化を遅延させるための医薬組成物であって、酪酸及び酢酸、又はそれらの塩の組み合わせと、薬学的に許容される賦形剤とを含み、前記酪酸及び酢酸、又はそれらの塩は、前記組成物中の活性成分であり、前記酪酸及び酢酸は澱粉分子の形状の担体にコンジュゲートされる、医薬組成物。

40

【請求項 15】

前記組成物は、酢酸に共有結合した澱粉分子と、酪酸に共有結合した澱粉分子との組合せを含む、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記組成物は、少なくとも 1 つの酢酸分子と、少なくとも 1 つの酪酸分子とにコンジュゲートした澱粉分子を含む、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

1 型糖尿病又は乾癬を処置するため、又は、1 型糖尿病又は乾癬の悪化を遅延させるための、請求項 11 ～ 13 のいずれか一項に記載の食物薬剤、又は、請求項 14 ～ 16 のいづ

50

れが一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、その全容が全体として本明細書に組み込まれるオーストラリア仮特許出願第2016903143号明細書による優先権を主張する。

【0002】

本発明は、自己免疫疾患の処置及び予防のための代謝化合物の組み合わせ及び送達に関する。

【背景技術】

【0003】

本明細書における任意の先行技術に対する参照は、その先行技術が任意の管轄における通常の一般知識の一部をなすか、又はその先行技術が当業者により関連すると理解され、見なされ、及び/若しくは他の先行技術の1つと組み合わせられることを合理的に予想できることの容認又は示唆ではない。

【0004】

自己免疫疾患は、身体内の器官及び組織に対する異常な免疫応答から生じる病理学的状態である。

【0005】

自己免疫疾患の負荷は、有意であり、西洋人口の実質的に少数(2~5%)がこの疾病群に罹患している。女性も特に出産可能年齢において自己免疫疾患に罹患しやすく、そのため、自己免疫疾患は、米国において65歳までの全年齢群で女性の主な死因の1つであると判断されている。

【0006】

自己免疫疾患には治療法が存在せず、現在の治療法は、一般に、疾病に関連する疼痛の管理(例えば、ステロイド又は非ステロイド抗炎症薬を使用した)、又は免疫抑制薬を使用して炎症性応答を軽減することを目指している。免疫抑制医薬品は、法外に高価であり得、多くの患者にとって治療法の利用を低下させている。機能細胞の破壊をもたらす自己免疫疾患(例えば、膵臓細胞が破壊される1型糖尿病)の場合、処置選択肢が更に限定され、外来性インスリン処置が依然として主な処置手法である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

自己免疫疾患を処置及び予防するための改善された方法及び組成物が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、個体における自己免疫疾患の発症を予防するか又は遅延させる方法であって、治療的有効量の2種以上の短鎖脂肪酸、それらのエステル又は塩の組み合わせを個体において提供し、それにより自己免疫疾患の発症を予防するか又は遅延させることを含む方法に関する。

【0009】

本発明の任意の実施形態において、個体は、自己免疫疾患の発生の危険性があると判定され得る。例えば、個体は、自己免疫疾患の発生の危険性に関連した自己抗体又は炎症性マーカーを有し得る。

【0010】

本発明は、個体における自己免疫疾患の悪化を遅延させるか又はそれを処置する方法であって、治療的有効量の2種以上の短鎖脂肪酸、それらのエステル又は塩の組み合わせを個体において提供し、それにより自己免疫疾患の悪化を遅延させるか又はそれを処置することを含む方法も提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 1 】

本発明は、自己免疫疾患の危険性があるか又はそれを有する個体における炎症を軽減又は処置する方法であって、治療的有効量の２種以上の短鎖脂肪酸、それらのエステル又は塩の組み合わせを個体において提供し、それにより個体における炎症を軽減又は処置することを含む方法も提供する。

【 0 0 1 2 】

炎症の軽減又は処置は、個体において１種以上のプロ炎症性サイトカインの割合を低減することを含み得る。更に、炎症の軽減又は処置は、個体において１種以上の抗炎症薬サイトカインの割合を増大させることを含み得る。

【 0 0 1 3 】

本発明は、自己免疫疾患の危険性があるか又はそれを有する個体における自己免疫を予防、軽減又は処置する方法であって、治療的有効量の２種以上の短鎖脂肪酸、それらのエステル又は塩の組み合わせを個体において提供し、それにより個体における自己免疫を予防、軽減又は処置することを含む方法を提供する。

【 0 0 1 4 】

自己免疫を予防、軽減又は処置することは、個体における１種以上の自己抗体の存在量又は存在を低減することを含む。自己抗体は、自己免疫疾患の危険性に関連し得る。

【 0 0 1 5 】

本発明の任意の実施形態において、自己免疫疾患は、１型糖尿病、乾癬、関節リウマチ、炎症性腸疾患、セリアック病、自己免疫性肝炎、心筋炎、ループス腎炎、多発性硬化症又は原発性胆汁性肝硬変からなる群から選択される。

【 0 0 1 6 】

好ましくは、自己免疫疾患は、１型糖尿病である。

【 0 0 1 7 】

本発明の任意の実施形態において、自己抗体は、１型糖尿病の危険性に関連し、膵島自己抗体、インスリン自己抗体及びグルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD）に対する自己抗体並びに膵島特異的グルコース - 6 - ホスファターゼ触媒サブユニット関連タンパク質（IGRP）を含むが、これらに限定されない。

【 0 0 1 8 】

本発明の任意の実施形態において、２種以上の短鎖脂肪酸、それらのエステル又は塩の組み合わせは、酪酸及び酢酸、それらのエステル又は塩の組み合わせを含む。

【 0 0 1 9 】

本発明は、個体におけるⅠ型糖尿病を処置するか又はその悪化を遅延させる方法であって、治療的有効量の酪酸及び酢酸、それらのエステル又は塩を個体において提供し、それによりⅠ型糖尿病を処置するか又はその悪化を遅延させることを含む方法を提供する。

【 0 0 2 0 】

本発明は、個体におけるⅠ型糖尿病の発症を予防するか又は遅延させる方法であって、治療的有効量の酪酸及び酢酸、それらのエステル又は塩を個体において提供し、それによりⅠ型糖尿病の発症を予防するか又は遅延させることを含む方法を提供する。

【 0 0 2 1 】

本発明は、個体におけるⅠ型糖尿病を処置するか又はその悪化を遅延させる方法であって、治療的有効量の酪酸及び酢酸、それらのエステル又は塩を個体の大腸内において提供し、それによりⅠ型糖尿病を処置又は予防することを含む方法も提供する。

【 0 0 2 2 】

本発明は、個体におけるⅠ型糖尿病の発症を予防するか又は遅延させる方法であって、治療的有効量の酪酸及び酢酸、それらのエステル又は塩を個体の大腸内において提供し、それによりⅠ型糖尿病の発症を予防するか又は遅延させることを含む方法も提供する。

【 0 0 2 3 】

本発明の任意の実施形態において、短鎖脂肪酸の組み合わせは、酪酸、及び酢酸、及びプロピオン酸からなる群から選択される。組み合わせは、酪酸及びプロピオン酸、酪酸及び

10

20

30

40

50

酢酸、酢酸及び酪酸、又は酢酸、酪酸及びプロピオン酸であり得る。

【0024】

本発明の任意の実施形態において、酢酸、酪酸及びプロピオン酸から選択される短鎖脂肪酸の組み合わせは、イソ酪酸、*t*-ブチルカルボン酸、ペンタン酸、ヘキサン酸等から選択される追加の短鎖脂肪酸を更に含むことができる。更に、追加の短鎖脂肪酸は、ハロゲン（フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨード）、シアノ、ヒドロキシル、メトキシ、ケト等の1～3つの置換基で置換され得る。有用な置換短鎖脂肪酸の例としては、ヒドロキシ酢酸、ケトプロピオン酸及び4,4-トリフルオロ酪酸が挙げられる。

【0025】

本明細書で使用される用語、アセテート、ブチレート、プロピオネート等は、遊離酸の塩形態又は生理学的環境に応じて遊離酸自体を指す。文脈において、これらは、遊離酸のエステルも指すことができる。

【0026】

本発明の任意の実施形態において、短鎖脂肪酸の組み合わせは、個体の大腸内において提供される。本発明の任意の実施形態において、短鎖脂肪酸の組み合わせは、個体の結腸内において提供される。任意の実施形態において、短鎖脂肪酸の組み合わせは、個体において全身的に（即ち末梢血循環中に）提供される。

【0027】

本発明の任意の実施形態において、短鎖脂肪酸の組み合わせは、前記短鎖脂肪酸を含む食物薬剤又は医薬組成物を個体に経口投与することにより、個体において提供される。食物薬剤は、少なくとも1つの短鎖脂肪酸に共有結合された担体分子を含み得、共有結合は、遊離脂肪酸を個体の結腸内において提供するために、個体の小腸内での分解に抵抗性であるが、結腸内で加水分解性である。好ましくは、担体は、澱粉である。

【0028】

本発明の任意の実施形態において、短鎖脂肪酸の組み合わせの投与は、個体の血液中の短鎖脂肪酸の循環レベルの増大をもたらす。本発明の任意の実施形態において、血液中の増大された短鎖脂肪酸の循環レベルは、持続される（即ち一過性でない）。

【0029】

本発明の任意の実施形態において、短鎖脂肪酸の組み合わせの投与は、個体において短鎖脂肪酸の循環レベルの0.5倍、1倍、2倍、3倍又は4倍以上の増大をもたらす。

【0030】

本発明は、自己免疫疾患の処置又は予防のための医薬組成物であって、酪酸、酢酸及びプロピオン酸（それらのエステル又は塩を含む）の2種以上の組み合わせと、薬学的に許容される賦形剤とを含み、酪酸、酢酸及びプロピオン酸、それらのエステル又は塩の2種以上は、組成物中の活性成分である、医薬組成物も提供する。

【0031】

医薬組成物は、短鎖脂肪酸を個体の大腸内に放出するように適合され得る。

【0032】

医薬組成物は、短鎖脂肪酸を個体の結腸内に放出するように適合され得る。

【0033】

医薬組成物は、胃及び小腸内での分解に抵抗性の腸溶コーティングを含む経口剤形の形態であり得る。腸溶コーティングは、好ましくは、短鎖脂肪酸を大腸、好ましくは結腸の管腔に放出するように設計された経口剤形上の消化抵抗性層である。

【0034】

医薬組成物は、経口剤形、坐薬又は注射用剤形の形態であり得る。

【0035】

本発明は、自己免疫疾患を処置するか又はその発症を予防するか若しくは遅延させるための医薬の製造における酪酸、酢酸及びプロピオン酸の2種以上の使用も含む。

【0036】

本発明は、酢酸、酪酸及びプロピオン酸から選択される2種以上の短鎖脂肪酸を個体の大

10

20

30

40

50

腸内に送達するための食物薬剤であって、遊離脂肪酸を与えるために、個体の結腸内で加水分解性である結合によって短鎖脂肪酸に共有結合された担体を含む、食物薬剤を提供する。

【0037】

担体は、好ましくは、澱粉、ガム、オリゴ糖又はペクチンからなる群から選択される炭水化物である。より好ましくは、担体は、澱粉である。

【0038】

担体が澱粉である場合、好ましくは、澱粉は、少なくとも1つの酪酸及び少なくとも1つの酢酸分子に共有結合される。

【0039】

本発明は、自己免疫疾患の処置又は予防において使用される組み合わせ食物であって、第1の食物薬剤及び第2の食物薬剤の組み合わせを含み、第1の薬剤は、酪酸部分に共有結合された担体分子を含み、第2の薬剤は、酢酸部分に共有結合される担体分子を含み、各薬剤において、部分は、遊離酪酸及び遊離酢酸を与えるために、個体の結腸内で加水分解性である結合によって担体に結合される、組み合わせ食物を提供する。

【0040】

本発明は、1型糖尿病、乾癬、関節リウマチ、炎症性腸疾患、セリアック病、自己免疫性肝炎、心筋炎、ループス腎炎、原発性胆汁性肝硬変及び多発性硬化症からなる群から選択される自己免疫疾患を処置するか又はその悪化を遅延させるための上述した食物薬剤の使用も提供する。食物薬剤は、1型糖尿病、乾癬、関節リウマチ、炎症性腸疾患、セリアック病、自己免疫性肝炎、心筋炎、ループス腎炎、原発性胆汁性肝硬変及び多発性硬化症からなる群から選択される自己免疫疾患の発症を予防するか又は遅延させるためのものでもあり得る。

【0041】

本発明は、個体における1型糖尿病の処置において又はその悪化を遅延させるために使用される食物であって、第1の食物薬剤及び第2の食物薬剤の組み合わせを含み、第1の薬剤は、酪酸部分に共有結合された担体分子を含み、第2の薬剤は、酢酸部分に共有結合される担体分子を含み、各薬剤において、部分は、遊離酪酸及び遊離酢酸を与えるために、個体の結腸内で加水分解性である結合によって担体に結合される、食物も提供する。

【0042】

本発明は、個体における1型糖尿病の発症を予防するか又は遅延させるのに使用される食物であって、第1の食物薬剤及び第2の食物薬剤の組み合わせを含み、第1の薬剤は、酪酸部分に共有結合された担体分子を含み、第2の薬剤は、酢酸部分に共有結合される担体分子を含み、各薬剤において、部分は、遊離酪酸及び遊離酢酸を与えるために、個体の結腸内で加水分解性である結合によって担体に結合される、食物も提供する。

【0043】

本発明は、自己免疫疾患の処置又は予防のための医薬の製造における酪酸、酢酸及びプロピオン酸の2種以上の使用も提供する。自己免疫疾患は、1型糖尿病、乾癬、関節リウマチ、炎症性腸疾患、セリアック病、自己免疫性肝炎、心筋炎、ループス腎炎、多発性硬化症及び原発性胆汁性肝硬変からなる群から選択される。好ましくは、自己免疫疾患は、1型糖尿病である。

【0044】

本発明は、個体における自己免疫疾患を処置するか又はその悪化を遅延させる方法であって、自己免疫疾患は、好ましくは、1型糖尿病であり、方法は、

- 治療的有效量の結腸組成物を含む剤形を個体に投与することであって、前記組成物は、
 - 短鎖脂肪酸の少なくとも2種の組み合わせからなるコアであって、短鎖脂肪酸は、酢酸、酪酸及びプロピオン酸又は薬学的に許容されるそれらの塩若しくはエステルから選択される、コアと、
 - 前記コアを覆う少なくとも1つの消化抵抗性層と
- からなり、

10

20

30

40

50

- 前記消化抵抗性層は、結腸内で崩壊する、投与することと、
 - コアを結腸の管腔内で放出することと
- を含む、方法も提供する。

【0045】

本発明は、個体における自己免疫疾患の発症を予防するか又は遅延させる方法であって、自己免疫疾患は、好ましくは、1型糖尿病であり、方法は、

- 治療的有效量の結腸組成物を含む剤形を個体に投与することであって、前記組成物は、
- 短鎖脂肪酸の少なくとも2種の組み合わせからなるコアであって、短鎖脂肪酸は、酢酸、酪酸及びプロピオン酸又は薬学的に許容されるそれらの塩若しくはエステルから選択される、コアと、

- 前記コアを覆う少なくとも1つの消化抵抗性層と

からなり、

- 前記消化抵抗性層は、結腸内で崩壊する、投与することと、
- コアを結腸の管腔内で放出することと

を含む、方法も提供する。

【0046】

本発明は、結腸組成物であって、

- 酪酸、酢酸及びプロピオン酸又は薬学的に許容されるそれらの塩若しくはエステルから選択される少なくとも2種の短鎖脂肪酸の組み合わせからなるコアと、
- 前記コアを覆う少なくとも1つの消化抵抗性層であって、結腸内で崩壊する、消化抵抗性層と

からなる結腸組成物も提供する。

【0047】

剤形は、表又はカプセルの形態であり得る。好ましくは、コアは、酪酸及び酢酸の両方又は薬学的に許容されるそれらの塩若しくはエステルを含む。剤形は、1型糖尿病、乾癬、関節リウマチ、炎症性腸疾患、セリアック病、自己免疫性肝炎、心筋炎、ループス腎炎、多発性硬化症及び原発性胆汁性肝硬変から選択される自己免疫疾患の処置における使用、又はその発症を遅延させるか若しくは予防するための使用のためである。好ましくは、自己免疫疾患は、1型糖尿病である。好ましくは、自己免疫疾患は、1型糖尿病である。

【0048】

文脈が他に要求しない限り、本明細書で使用される用語「含む (comprise)」並びに「含んでいる」、「含む (comprises)」及び「含まれる」等のこの用語のバリエーションは、更なる添加物、構成成分、整数又はステップを除外することを意図するものではない。

【0049】

本発明の更なる態様及び上記パラグラフに記載される態様の更なる実施形態は、付随する図面を参照して、例として提供される以下の記載から明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】SCFA濃度は、NODマウスにおけるT1Dの発生率と相関する。7週齢の特定の病原フリー (SPF) NOD対SPF NOD.Myd88-/-マウスの (a) 末梢血 (大静脈) 及び (b) 肝門脈血におけるアセテート、ブチレート及びプロピオネートの濃度。Mann-Whitney U検定。データは、平均±SD、n=5を表す。示したデータは、3つの独立実験からのものである。c) 微生物フリー (GF) 対SPF雌NODマウスにおけるT1D発生率。*** $P < 0.001$ 、Mantel-Coxログランク検定。示したデータは、2つの独立実験からのものである。(d) 雌 (F) 及び雄 (M) 5~8及び10~15週齢のNODマウスの末梢血 (大静脈) におけるアセテート、ブチレート及びプロピオネートの濃度。データは、平均±SD、n=5を表す。示したデータは、3つの独立実験からのものである。(e) 5週齢から開始して、飲料水中の200mM酢酸ナトリウム (必要に応じてpHを調整した) で25週間処理した又は処理し

10

20

30

40

50

ないSPF雌NODマウスにおけるT1D発生率。 $*P < 0.0046$ 。(f)飲料水中のアセートで処理した又は処理しない10週齢のNODマウスの膵島炎スコア。方法に記載したように浸潤度を点数化した。NS = 無有意。2つの実験の代表の1つを示す。

【図2】SCFA送達食物は、糖尿病から保護する。(a)HAMS、HAMS A又はHAMS B食物で5週間後のプールした15週齢の雄及び雌NODマウスからの糞便、盲腸内容物、肝門脈血及び末梢(大静脈)血中のアセート、ブチレート及びプロピオネートの濃度。示したデータは、3つの独立実験からのものである。データは、平均 \pm SDを表し、各記号は、生物学的複製を表す。(b)5週齢で開始して、NP、HAMS、HAMS A、HAMS B及びHAMSP食物を5週間給餌した雌NODマウスにおけるT1D発生率。 $***P = 0.0022$ (HAMS A対NP)、 $*P = 0.0476$ (HAMS A対HAMS)、 $*P = 0.042$ (HAMS B対NP)及びNS(HMASP対NP)Mantel-Coxログランク検定。(c)膵島炎に関して点数化した膵島の代表的な画像。右側 - 雌NODマウス5週齢、15週齢及び25週齢の糖尿病性NP給餌；15週齢のHAMS給餌、15週齢のHAMS A給餌及び30週齢のHAMS A給餌後；15週齢のHAMS B給餌及び30週齢のHAMS B給餌後の膵島炎スコア。方法に記載したように浸潤度を点数化した。(d)HAMS A/HAMS B組み合わせ食物を給餌した雌NODマウスにおけるT1D発生率。 $**P = 0.0018$ (15%+15%又は7.5%+7.5%)Mantel-Coxログランク検定。2つ又は3つの実験の代表の1つを示す。NS = 無有意。

10

【図3】アセートは、自己免疫性T細胞の頻度を抑制する。(a)HAMS、HAMS A又はHAMS B食物を給餌した15週齢の雌NODマウスからの脾臓自己反応性IGRP 4量体+CD8+及び(b)BDC2.5 4量体+CD4+T細胞の頻度。TUM及びhu CLIPを4量体対照として各々使用した。 $n = 5 \sim 6$ マウス。示したデータは、3つの独立実験からのものである。(c)NP、HAMS、HAMS A又はHAMS B食物を給餌したNOD.8.3マウスにおける糖尿病発生率。 $***P < 0.0001$ (HAMS A対NP)。示したデータは、2つの独立実験からのものである。(d)(c)のNOD8.3マウスにおけるIGRP 4量体+CD8+T細胞の頻度を示す代表的なプロット。データは、平均 \pm SD、 $n = 5$ を表す。 $***P < 0.001$ 、 $**P < 0.01$ 、 $*P < 0.05$ 。示したデータは、2つの独立実験からのものである。

20

【図4】アセート食物は、B細胞機能及び遺伝子転写に影響を与える。(a)HAMS、HAMS A又はHAMS B食物を給餌した15週齢の雌NODマウスからの脾臓及びパイエル板(PP)におけるIgM+B220+B細胞の頻度及び数を示す累積データ。b)(a)の脾臓IgM+B220+B細胞における1細胞当たりのMHC I及びCD86タンパク質発現の代表的なフローサイトメトリー分析。ラットIgG2aをアイソタイプ対照(黒線)として使用した。 $n = 5 \sim 6$ 。3つの実験の代表の1つを示す。(c)選別した脾臓CD21高CD23低(MZB)及びCD21中CD23高(FOB)細胞上のCD86及びIL12の発現を示すリアルタイムPCR(総IgM+B220+B細胞からゲートした)、 $n = 3$ 。データは、3つの実験の代表の1つ、平均 \pm SEMを表す。(d)(a)のIgM+B220+B細胞に関するRNA-seqの差次的発現を示すMDSプロット、 $n = 4$ 。(e)脾臓総IgM+B220+B細胞内のHAMS B対NPコントラスト(y軸)に対するHAMS A対NPコントラスト(x軸)間の遺伝子発現プロファイル。赤い丸は、HAMS A及びHAMS B食物間で試験した差次的発現に関するFDR < 0.05 を有する発現遺伝子のlog2倍変化を表す。(f)選別脾臓CD21高CD23低(MZB)及びCD21中CD23高(FOB)細胞上のHDAC3の発現を示すリアルタイムPCR(総IgM+B220+B細胞からゲートした)、 $P = 0.0097$ (HAMS A対HAMS B) $n = 3$ 。データは、3つの実験の1つ、平均 \pm SEMを表す。(g)NP、HAMS、HAMS A及びHAMS B給餌NODマウスからのPLNにおけるCFSE標識NOD.8.3 CD8+T細胞の増殖。PLNにおけるCFSE-IGRP+CD8+T細胞の頻度を示す累積データ。 $P = 0.0082$ (HAMS A対HAMS)。データは、平均 \pm SD、 $n = 5 \sim 6$ マウスを表す。 $****P < 0.00$

30

40

50

0.1、*** $P < 0.001$ 、** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ 。3つの実験の代表の1つを示す。

【図5】ブチレートは、糖尿病からの保護に寄与するTreg生物学を向上させる。(a) HAMS、HAMS A又はHAMS B食物を給餌した15週齢の雌NODマウスからの脾臓CD4 + FoxP3 + T細胞の頻度及び数を示す累積データ、 $n = 5$ 。3つの実験の代表の1つを示す。(b) NP、HAMS、HAMS A及びHAMS B給餌雌NODマウスからの総脾臓T細胞を移植したNOD/SCIDマウスにおけるT1D発生率。Mantel-Coxログランク検定**** $P < 0.0001$ (HAMS対NP、HAMS A対HAMS、及びHAMS B対HAMS)。示したデータは、2つの独立実験からのものである。(c) HAMS、HAMS A又はHAMS B食物を給餌したNOD/SCID雌への移植から3週間後のPLN CD4 + FoxP3 + T細胞の頻度及び数を示す代表的なプロット及び累積データ。(d) IL10産生CD4 + Foxp3 + HELIOS + T細胞の頻度。データは、平均 \pm SDを表し、各記号は、個々のマウスを表す。**** $P < 0.0001$ 、** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ 、 $n = 3$ 。示したデータは、2つの独立実験からのものである。(e) HAMS、HAMS A及びHAMS Bを給餌した雌NODマウスからの脾臓CD4 + CD25 - T細胞上で評価した、Foxp3プロモーターにおけるヒストンのアセチル化(H3K9アセチル化及びH4ペンタアセチル化)、 $n = 5$ 。 $P = 0.0027$ (H3K9、HAMS対HAMS B) 及び**** $P < 0.0001$ (H4、HAMS対HAMS B)。IgGアイソタイプ対照を使用して非特異的結合を評価した。任意単位(AU)は、H3結合に対するアセチル化の富化を表す。(f) HAMS、HAMS A又はHAMS B食物を給餌した雌NODマウスのPLNからのCD45RB低CD25 + を発現しているCD4 + T細胞におけるFoxp3、Gata3、Gitr及びSell (CD62L) の単一細胞発現。プールしたマウスから得た単一細胞、 $n = 6$ 。示したデータは、3つの独立実験からのものである。(g) HAMS (赤色ペン図) 及びHAMS B給餌マウス (緑色ペン図) におけるGata3、Gitr及びSell (CD62L) の共発現を示すCD4 + CD45RB低CD25 + Foxp3高PLN T細胞(Bから)のペン図。ペン図内の数は、Gata3、Gitr及びSell (CD62L) を発現するFoxp3高細胞(塗りつぶされた丸)の数を表す。 $n = 30$ 細胞は、個別に選別した。

【図6】アセテートは、部分的にGPR43を介して作用してT1D重症度を制限する。(a) NP、HAMS A又はHAMS B食物を給餌した雌NOD.Gpr43 +/+ 及びNOD.Gpr43 -/- リターメイトにおけるT1D発生率。** $P = 0.0023$ (NOD.Gpr43 +/+ マウス、NP対HAMS A) ; * $P = 0.0392$ (NOD.Gpr43 +/+ マウス、NP__対HAMS) 及び* $P = 0.0179$ (NOD.Gpr43 -/- マウス、NP対HAMS A)。示したデータは、2つの独立実験からのものである。(b) NP又はHAMS A食物を給餌した15週齢のNOD.Gpr43 +/+ 及びNOD.Gpr43 -/- マウスの膵島炎スコア。方法に記載したように浸潤度を点数化した。(c) 脾臓及びPLNのCD4 + FoxP3 + T細胞及び(d) IgM + B220 + B細胞の絶対数を示す累積データ、 $n = 5$ 。示したデータは、3つの独立実験からのものである。(e) NP又はHAMS A食物を給餌した15週齢の雌NOD.Gpr43 +/+ 及びNOD.Gpr43 -/- マウスからのPLN自己反応性IGRP 4量体 + CD8 + 及びIAg7 / BDC2.5 4量体 + CD4 + T細胞の頻度。データは、平均 \pm SD、 $n = 4$ を表す。示したデータは、3つの独立実験からのものである。

【図7】アセテート及びブチレート食物は、LPS、IL-21及びTNFを含むT1D病態形成において重要なパラメーターを改善する。(a) 5週齢のNP給餌雌C57BL/6、Balb/cマウス及び年齢一致NP給餌雌(F) 及び雄(M) NODマウスの結腸におけるOc1n、Tjp1、Muc2及びCdh1、mRNAの倍数変化発現。各食物における対照C57BL/6及びBalb/cマウス、 $n = 4$ 生物学的複製に性差は見られなかった。(b) 15週齢のHAMS、HAMS A又はHAMS B給餌雌NODマウスの結腸におけるOc1nの発現における倍数変化。データは、各食物における平均 \pm

10

20

30

40

50

SEM、 $n = 7$ 生物学的複製を表す。示したデータは、3つの独立実験からのものである。(c) NP、HAMS、HAMSA又はHAMS B食物を給餌した雌の年齢一致NP給餌C57BL/6及び雌NODマウスの末梢血(大静脈)におけるLPSの濃度。データは、各食物における平均 \pm SD、 $n = 3$ 生物学的複製を示す。示したデータは、3つの独立実験からのものである。各食物における年齢一致NP給餌NOD.MyD88-/-マウス、 $n = 4$ 生物学的複製と比較した、15週齢のHAMS、HAMSA又はHAMS B給餌雌NODマウスからの血清中の(d) TNF- α 、IL-21、(e) IL-22及びTGF- β の濃度。データは、平均 \pm SDを表し、各記号は、個々のマウスを表す。*** $P < 0.0001$ 、** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ 。データは、3つの独立実験からのものである。

10

【図8】食物は、微生物生態及び代謝物生産を変化させ、これは、糖尿病保護に寄与する。a) 雌NP、HAMS、HAMSA又はHAMS B形成細菌叢で再コロニー形成したGF NODマウスにおけるT1D発生率。* $P = 0.0204$ (HAMSA対NP) Mantel-Coxログランク検定。(b) 異なる食物に関する糞便移植(FT)後のSPF NODマウス及びGF NODマウスからの糞便における属の分布を示す棒グラフ。 $n = 5 \sim 6$ / グループ。各属は、異なる色で表され、各サンプルにおける相対的存在量に比例する。説明文は、1%を超える相対的存在量を有する属を示す。(c) NP、HAMS、HAMSA又はHAMS B食物を給餌したNODマウスにおけるSCFAアセテート、ブチレート及びプロピオネート及び細菌属間の関係を示すピアソン相関ベースのネットワーク。属を示すノードは、属が属する門により着色される一方、アセテート、ブチレート及びプロピオネートは、赤丸で表される。各属のノードの大きさは、属の相対的存在量に比例する。緑線は正に接続し、青線は、負に相関したノードである。アセテート及びブチレートの両方と正に相関したバクテロイデス(Bacteroides)属は、高アセテート及びブチレート環境内で栄え、おそらく他の正に相関した(緑線)属のモジュールの成長を抑制した。(d) (a)の30週齢のGF再コロニー形成NODマウスのアセテート、ブチレート及びプロピオネートの血清及び盲腸濃度を示す累積データ、 $n = 2$ 。データは、2つの独立実験からの平均として示した。(e) 食物で改変された細菌叢で再コロニー形成した30週齢のGF NODマウスからのPLN CD4+Foxp3+Treg細胞の頻度及び数。(f) HAMS、HAMSA又はHAMS B食物を給餌した15週齢の雌NODマウスにおける糞便代謝物の濃度、 $n = 5$ 。(f) HAMS、HAMSA又はHAMS B食物を給餌した保護された15週齢の雌NODマウスにおける糞便代謝物の濃度、 $n = 2 \sim 5$ 。データは、平均 \pm SEMとして示される。記号は、個々のマウスを表す。*** $P < 0.0001$ 、** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ 。データは、2つの独立実験の組み合わせを表す。

20

30

【図9】(a) 微生物フリー(GF)NOD.MyD88-/-マウス対特定の病原フリー(SPF)NOD.MyD88-/-マウスにおけるT1D発生率；*** $P < 0.0001$ 、Mantel-Coxログランク検定。5週齢の雌SPF及びGF NOD及びNOD.MyD88-/-マウスの(b)糞便におけるアセテート、ブチレート及びプロピオネートの濃度、並びに(c)年齢一致雌及び雄NOD及びC57BL/6マウスの糞便におけるアセテート、ブチレート及びプロピオネートの濃度。全グラフにおいて、データは、平均 \pm SDを表し、各記号は、個々のマウスを表す。(d) NP、HAMS、HAMSA又はHAMS B食物を給餌した15週齢の雌NODマウスの体重。*** $P < 0.0001$ 、** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ 。全データは、3つの独立実験の代表である。

40

【図10】(a、b)(図4a)の脾臓IgM+B220+B細胞における1細胞当たりのMHCI、CD86及びMHCI Iに関する表面タンパク質発現の平均蛍光指数(MFI)+/-DSとしての累積データ。(c) 15週齢のHAMS、HAMSA又はHAMS B給餌雌NODマウスからの脾臓IgM+B220+B細胞における-アクチンに対するC80/B7.1、C80/B7.2、B2M及びPRDM1の発現における倍数変化を示すリアルタイムPCR。(d) NP給餌NODマウス、HAMS、HAMSA又は

50

HAMS B 給餌 NOD マウスの MLN から単離した総 CD8 + T 細胞からの移植 CFSE - IGRP + CD8 + T 細胞の頻度を示す代表的な FACS プロット及び累積データ。データは、各食物における平均 \pm SD、 $n = 6$ 生物学的複製を示す。データは、少なくとも 3 つの独立実験の代表である。

【図 11】(a) HAMS、HAMS A 又は HAMS B 食物を給餌した 15 週齢の雌 NOD マウスの結腸から単離した総 CD4 + T 細胞からの CD4 + FoxP3 + CD103 + T 細胞の頻度及び数を示す累積データ。(b) 脾臓、PLN 及び MNL CD4 + FoxP3 + T 細胞の頻度を示す FACS プロット。データは、平均 \pm SD を表し、各記号は、個々のマウスを表す。 $**P < 0.01$ 。全データは、3 つの独立実験の代表である。

【図 12】(a) C57.B6-*Gpr43*^{-/-} マウスを NOD 株 (NOD.*Gpr43*^{-/-}) に対して 13 世代戻し交配した。完全に戻し交配した後、NOD.*Gpr43*^{-/-} マウスを 70,000 SNPs ゲノムワイドにわたって遺伝子型について同定した。肝臓からの DNA を精製し、Mega-MUGA アレイ (Geneseek, NB) を使用して遺伝子型を同定した。遺伝子型を参照 (C57BL/6) アレル及び NOD ゲノム配列により決定された NOD アレルと比較した (Yalcin et al., 2011)。ノックアウトを FVB バックグラウンド上に生成し、従って、ハプロタイプは、NOD ゲノム (青色) 又は非 NOD ゲノム (赤色) に由来するとして示される。灰色は、C57BL/6 及び NOD が同じ遺伝子型を有する、情報価値のない領域を示す。この図は、各マウス染色体上のハプロタイプの起源の株を示し、各染色体の物理的サイズを X 軸上に示す。この分析により、染色体 7 上のほぼ *Gpr43* 座位の領域を除いて全染色体が NOD 株に由来することが示された。従って、これらのマウスは、染色体 7 上の ~ 19 Mb 及びおよそ 80 ~ 120 Mb に各々マッピングされる *Idd7* 及び *Idd27* 座位を含む全 NOD T1D 易罹患性座位を有する。これにより、本発明者らは、非 NOD 区間内に報告された T1D 易罹患性遺伝子が存在しないことを確認できた。(全グラフにおいて、各記号は、個々のマウスを表す。(NP、HAMS 又は HAMS A 食物を給餌した 15 週齢の雌 NOD.*Gpr43*^{-/-} マウスの (b) 糞便、(c) 盲腸内容物及び (d) 末梢血 (大静脈) におけるアセテート、ブチレート及びプロピオネートの濃度。 $***P < 0.001$ 、 $**P < 0.01$ 、 $*P < 0.05$ (HAMS A 対 HAMS 給餌 NOD.*Gpr43*^{-/-} マウス)。各記号は、個々のマウスを表す。データは、平均 \pm SD として示される。全データは、3 つの独立実験の代表である。

【図 13】(a) NP を給餌した雌 NOD.*Gpr109a*^{-/-} における T1D 発生率。(b) 非重み付き (左パネル) 及び重み付き (右パネル) Unifrac 距離計量に基づいた PCA 図による、NP、HAMS、HAMS A 及び HAMS B 食物を給餌した NOD 及び GF 再コロニー形成 NOD マウスからの糞便の微生物プロファイル分析。異なる食物の細菌群集は、重み付き ($P = 6.2 \times 10^{-5}$) 及び非重み付き ($P < 1 \times 10^{-6}$) Unifrac、1E6 並べ替えの両方及び Adonis 並べ替え多変量統計に基づいて有意に異なっていた。説明文は、NP、HAMS、HAMS A 及び HAMS B 改変細菌叢で再コロニー形成したドナー NOD マウス及び GF NOD マウスからの細菌叢を同じ色で表し、GF 再コロニー形成 NOD マウスをより暗い色で表す。(FT) は、糞便移植を示す。(c) NP、HAMS、HAMS A 又は HAMS B 食物を給餌した NOD マウス及び異なる食物に関する糞便移植 (FT) 後の GF NOD マウスにおける選択された細菌集団の (属レベル) での相対的存在量。データは、平均 \pm SD を表し、各記号は、個々のマウスを表す。 $*P < 0.05$ 。全データは、2 つの独立実験の代表である。

【発明を実施するための形態】

【0051】

健康的な食物の一部としての繊維消費、特に結腸管細菌叢により発酵される抵抗性澱粉の消費の増大は、慢性疾患に対する保護のためのその可能性が認識されている (Macia et al., 2015)。この発酵は、短鎖脂肪酸 (SCFA)、主にアセテート、プロピオネート及びブチレートを生成する。SCFA は、繊維に起因する効果の多くを媒介する可能性があり、それらの供給は、最適な腸機能に重要である。

【 0 0 5 2 】

大腸内の繊維の細菌発酵により生成される S C F A は、多数の方法で腸の健康を促進し得る。例えば、これらの酸は、血流を増大させることにより内臓機能を維持するために重要であり、下痢症における改善された電解質及び流体吸収、腸病原体の増殖を制限する低い結腸 pH の維持及び結腸筋活動の調節に寄与すると考えられている。しかしながら、アセチル化又はブチリル化高アミローストウモロコシ澱粉（それぞれ H A M S A 及び H A M S B として既知）を多く含む食物は、G I 管疾患を有するヒト集団で試験されたが（A n n i s o n e t a l . , 2 0 0 3、F e e h i l l y & K a r a t z a s , 2 0 1 3）、腸内菌共生バランス失調の改善に関して以前記載された殆どの努力は、プロバイオティクスの使用に依存していた。

10

【 0 0 5 3 】

本発明者らは、驚くべきことに、S C F A が消化系外でも役割を有し、特に自己免疫疾患に対する保護に重要な役割を有することを見出した。詳細には、本発明者らは、少なくとも 2 種の異なる S C F A の組み合わせが自己免疫疾患発生から保護し、新規な処置モダリティも提供し得ることを見出した。

【 0 0 5 4 】

従って、第 1 の態様において、本発明は、個体における自己免疫疾患を処置又は予防する方法であって、治療的有効量の 2 種以上の短鎖脂肪酸、それらのエステル又は塩の組み合わせを個体において提供し、それにより自己免疫疾患を処置又は予防することを含む方法に関する。

20

【 0 0 5 5 】

本発明に従って使用される短鎖脂肪酸（S C F A）は、酪酸、酢酸及びプロピオン酸からなる群から選択される。一実施形態において、S C F A の組み合わせは、酢酸及びプロピオン酸の組み合わせである。別の実施形態では、組み合わせは、プロピオン酸及び酪酸である。特に好ましい実施形態では、S C F A は、酪酸及び酢酸である。また更なる実施形態では、S C F A の 3 種の全てが使用される。

【 0 0 5 6 】

短鎖脂肪酸は、ナトリウム、カリウム、カルシウム又はマグネシウム塩として提供され得る。2 種以上の短鎖脂肪酸の 1 つが酪酸の場合、塩は、酪酸ナトリウムであることが好ましい。2 種以上の短鎖脂肪酸の 1 つが酢酸の場合、塩は、酢酸ナトリウムであることが好ましい。

30

【 0 0 5 7 】

いくつかの実施形態において、短鎖脂肪酸は、1 ~ 6 個の炭素の分枝状又は非分枝状アルキルアルコールを有するカルボン酸のエステルとして存在し得る。例えば、短鎖脂肪酸は、エチルエステル、プロピルエステル、ブチルエステル、イソプロピルエステル、t - ブチルエステル、ペンチルエステル又はヘキシルエステルとして存在し得る。

【 0 0 5 8 】

短鎖脂肪酸の組み合わせは、イソブチレート、t - ブチルカルボキシレート、ペンタノエート、ヘキサノエート等から選択される追加の短鎖脂肪酸を更に含むことができる。更に、追加の短鎖脂肪酸は、ハロゲン（フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨード）、シアノ、ヒドロキシル、メトキシ、ケト等の 1 ~ 3 つの置換基で置換され得る。有用な置換短鎖脂肪酸の例としては、ヒドロキシアセテート、ケトプロピオネート及び 4 , 4 - トリフルオロブチレートが挙げられる。

40

【 0 0 5 9 】

2 種以上の短鎖脂肪酸の 1 つが酪酸の場合、酪酸は、ブチレート及びグリセロールからなるエステルであるトリブチリンの形態のプロドラッグとして提供される。

【 0 0 6 0 】

更に、本発明者らは、酢酸及び酪酸が、異なるが相補的な経路で作用して、腸ホメオスタシス、腸細菌生態並びに T r e g の数及び機能を改善することを見出した。例えば、理論に束縛されるものではないが、本発明者らは、酪酸が、アセテートに関して記載されてい

50

るものと異なり且つ向上された T G F 産生を含む T r e g 関連経路を介して作用すると考える。更に、酢酸は、抗原提示細胞、特に B 細胞の効果を改変し、それにより自己免疫性 T エフェクター細胞の頻度を変更するのに特に有用であると考えられる。

【 0 0 6 1 】

従って、特に好ましい実施形態では、本発明は、個体における自己免疫疾患を処置又は予防する方法であって、治療的有効量の酢酸及び酪酸、それらのエステル又は塩を個体において提供し、それにより自己免疫疾患を処置又は予防することを含む方法に関する。

【 0 0 6 2 】

S C F A は、当業者に既知の任意の数の手段により、処置を必要とする個体において提供され得る。例えば、一実施形態において、S C F A は、本明細書に更に記載するように、
10 経口、局所又は全身投与のための医薬製剤で提供される。好ましい実施形態において、本明細書に更に記載するように、医薬製剤は、S C F A を個体の大腸、特に結腸に送達するように適合される。

【 0 0 6 3 】

代替的に、S C F A は、個体の食物の一部として個体において提供され得、それにより、S C F A は、胃腸管の所望の領域内での食物薬物の消化により、消化管の細胞との接触が提供される。好ましい実施形態において、食物薬剤は、本明細書に更に記載されるように結腸内での S C F A の放出を提供する。

【 0 0 6 4 】

本発明の方法は、身体の 1 つ以上の領域内の増大された自己免疫性炎症性応答をもたらす
20 任意の疾病の予防及び / 又は処置に有用である。従って、本発明の方法は、機能障害性 / 無効性の調節性 T 細胞機能、拡張された自己反応性 T エフェクター細胞及び / 又は B 細胞機能障害に関連した疾病の処置に有用である。本発明により予防及び / 又は処置され得る疾病は、1 型糖尿病、乾癬、関節リウマチ、炎症性腸疾患、セリアック病、自己免疫性肝炎、心筋炎、ループス腎炎、原発性胆汁性肝硬変及び多発性硬化症からなる群から選択される自己免疫疾患を含む自己免疫疾患である。

【 0 0 6 5 】

本発明の方法は、1 型糖尿病予防及び処置に特定の有用性を有する。

【 0 0 6 6 】

本明細書で使用される「予防する」、「予防」、「予防的 (p r e v e n t a t i v e)
30 」又は「予防的 (p r o p h y l a c t i c)」は、状態、疾病、疾患若しくは表現型 (異常性又は症状を含む) の発生を防ぐか、又は疾病、疾患若しくは表現型の発生を妨げるか、その発生を防御するか若しくはその発生から保護することを指す。予防を必要とする個体は、自己免疫疾患を発生しやすい可能性がある。例えば、本発明による自己免疫疾患の予防は、疾病の発生の危険性があるとして同定された個体における前記疾病の発症を予防することを含む。個体は、遺伝子検査、環境因子の分析、家族歴又は他の因子により、危険性があるとして同定され得る。

【 0 0 6 7 】

処置を必要とする個体は、本明細書に記載される自己免疫疾患のいずれか 1 つと診断されるか又はその発生の危険性があるものであり得る。本明細書で使用される用語「処置」は、
40 疾病の悪化を最小限にするか又は悪化を遅延させることを含む。例えば、本発明の方法は、疾病の初期徴候を示している個体における疾病の発症を予防するのに有用であり得る。一例として、I 型糖尿病に関連して、疾病の初期徴候を有する個体は、膵島損傷の徴候を示すか、又は膵臓損傷のマーカーである膵島自己抗体を有し得るが、異常な耐糖能を依然として有していない。疾病の更なる悪化は、異常な耐糖能を含み得るが、インスリン処置を依然として必要としていない。当業者は、本発明の方法がこれらの状況のいずれかに
おける I 型糖尿病の処置に有用であることを認識するであろう。

【 0 0 6 8 】

ヒト等の霊長類に加えて、多様な他の哺乳動物を本発明の方法により処置することができる。例えば、雌牛、羊、山羊、馬、犬、猫、モルモット、ラット又は他のウシ、ヒツジ、
50

ウマ、イヌ、ネコ、齧歯類又はハツカネズミ種を含むがこれらに限定されない哺乳動物を処置することができる。

【0069】

医薬製剤

本発明は、自己免疫疾患の処置を必要とする個体に S C F A を送達することを可能にする医薬製剤を提供する。

【0070】

本明細書に記載される医薬製剤は、遊離脂肪酸、エステル若しくは塩の形態の S C F A 又は代替的にアセチル化若しくはブチリル化澱粉等のコンジュゲートとしての S C F A を含み得ることが当業者に理解される。

10

【0071】

本明細書に記載される医薬製剤は、S C F A の単一種又は2種以上の S C F A の組み合わせを含むことができる。例えば、本発明の方法を実行する際、自己免疫疾患の処置を必要とする人は、2種以上の S C F A の組み合わせを含む単一医薬剤形を投与され得る。例えば、剤形は、酢酸及び酪酸、それらの塩又はエステルを含むことができる。代替的に、剤形は、酢酸及びプロピオン酸、それらの塩若しくはエステル又は酪酸及びプロピオン酸及びそれらの塩を含むことができる。また更に、剤形は、酢酸、酪酸及びプロピオン酸（それらの塩又はエステルを含む）の3つの全てを含むことができる。

【0072】

特に好ましい実施形態において、本発明の方法は、治療的有効量の酪酸及び酢酸、それらの塩又はエステルを含む医薬製剤を、それを必要とする個体に投与することによって実行される。

20

【0073】

本発明の方法は、S C F A の単一種を含む1つ以上の医薬剤形の連続的な又は同時の投与を提供することも想定している。

【0074】

本発明の医薬組成物は、例えば、従来の固体又は液体ビヒクル又は希釈剤及び所望の投与モードに適したタイプの医薬添加物（例えば、賦形剤、結合剤、保存剤、安定剤、香味剤等）を使用することにより、医薬製剤の技術分野で周知のもの等の技術に従って処方することができる。

30

【0075】

本発明の医薬組成物は、例えば、錠剤、トローチ、ロゼンジ、水性又は油性懸濁液、分散性散剤又は顆粒、エマルジョン、硬若しくは軟カプセル剤、又はシロップ剤若しくはエリキシル剤として経口使用に好適な形態であり得る。経口使用に意図される組成物は、医薬組成物を製造するための当該技術分野で既知の任意の方法に従って調製することができる。そのような組成物は、甘味剤、香味剤、着色剤及び保存剤からなる群から選択される1つ以上の薬剤を含んで、薬学的に上質であり且つ美味な製剤を提供することができる。錠剤は、錠剤の製造に好適な薬学的に許容される無毒の賦形剤との混合物中に S C F A 活性成分を含む。これらの賦形剤は、例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、乳糖、リン酸カルシウム又はリン酸ナトリウム等の不活性希釈剤；顆粒化及び錠剤崩壊剤、例えばトウモロコシ澱粉又はアルギン酸；結合剤、例えば澱粉、ゼラチン又はアカシア及び滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸又はタルクであり得る。

40

【0076】

遅延放出経口剤形

本発明者らは、驚くべきことに、高投与量のアセテート及びブチレートの組み合わせを対象の下部腸管に送達することが、自己免疫疾患、特に1型糖尿病（T1D）の発生及び悪化に大きく影響することを見出した。本発明の方法及びその方法に使用される医薬製剤は、非常に高いレベルの S C F A が、小腸又は結腸を含む大腸内に提供されることを可能にして、腸ホメオスタシス、腸細菌生態並びに T r e g 数及び機能における改善に直接寄与する。

50

【 0 0 7 7 】

従って、一実施形態において、本発明は、自己免疫疾患の処置又は予防を、それを必要とする個体において行う方法であって、

治療的有効量の 2 種以上の短鎖脂肪酸、それらのエステル又は塩の組み合わせを含む医薬剤形を個体に投与することであって、短鎖脂肪酸は、酪酸及び酢酸及びプロピオン酸からなる群から選択され、医薬剤形は、短鎖脂肪酸を個体の下部胃腸管内に放出するように適合される投与すること

を含み、それにより自己免疫疾患を処置又は予防する、方法に関する。

【 0 0 7 8 】

当業者は、活性薬剤を胃腸管の所望の領域に送達することを促進する遅延放出経口剤形の製造方法に精通しているであろう。従って、一実施形態において、本発明は、2 種以上の S C F A 及び薬学的に有効な賦形剤を含む経口剤形であって、S C F A を大腸内に放出するように適合される、経口剤形に関する。

10

【 0 0 7 9 】

本明細書で使用される用語「遅延放出」は、S C F A の放出が、S C F A の送達の変更が存在しない場合に達成されるであろう位置よりも遠位の、下部 G I 管内の概して予測可能な位置で達成されるように、S C F A を含む医薬組成物を処方することによって達成される S C F A の送達を指す。

【 0 0 8 0 】

本明細書で使用される用語「胃腸管」又は「G I 管」は、消化管、即ち口腔から肛門に延びる長さ約 30 フィートの筋結膜管に関する。本明細書で使用される用語「上部胃腸管」は、頬側口腔、咽頭、食道及び胃を意味する。本明細書で使用される用語「下部胃腸管」は、小腸及び大腸を意味する。

20

【 0 0 8 1 】

本明細書で使用される用語「小腸」は、十二指腸、空腸及び回腸からなる下部胃腸管の部分、即ち胃底の十二指腸括約筋のすぐ遠位の及び大腸の近位の腸管のその部分を意味する。

【 0 0 8 2 】

本明細書で使用される用語「大腸」は、上行結腸、横行結腸、下行結腸、S 状結腸及び直腸を含む、小腸のすぐ遠位であり盲腸で開始する下部胃腸管の部分の意味する。

【 0 0 8 3 】

本発明の特定の実施形態では、小腸又はその特定のセグメント（例えば、十二指腸、空腸又は回腸）への S C F A（遊離酸、塩又はエステル化酸のいずれかとして）の送達を達成することが望ましい可能性がある。なお別の場合、ポース量の S C F A を小腸に送達することが望ましい可能性がある。

30

【 0 0 8 4 】

本発明の特定の実施形態では、大腸又はその特定のセグメント（例えば、上行結腸）への S C F A（遊離酸、塩又はエステル化酸のいずれかとして）の送達を達成することが望ましい可能性がある。なお別の場合、ポース量の S C F A を大腸に送達することが望ましい可能性がある。

【 0 0 8 5 】

一実施形態において、経口剤形は、胃内の分解に抵抗性であるが、胃を退出し、小腸に進入したら溶解する腸溶コーティングを含む。代替的な実施形態では、経口剤形は、胃及び小腸内の分解に抵抗性であるが、剤形が大腸内に到達したら溶解する腸溶コーティングを含む。当業者は、活性成分が胃腸管内の特定の位置で放出されるように、腸溶コーティング材料を使用して医薬剤形中に含まれる活性成分の放出を調節することに精通しているであろう。

40

【 0 0 8 6 】

当業者は、小腸又は大腸内の最終部位及び / 又は送達率が、以下の任意の 1 つ以上を操作することにより、当業者によって十分に制御され得ることを認識するであろう。

(a) コーティングのタイプ、コーティングに添加される賦形剤のタイプ及びレベル、並

50

びにコーティングの不随する所望の厚さ及び透過性（膨潤特性）；

（b）コーティング自体及び／又は被覆された錠剤、粒子、ビーズ若しくは顆粒中の時間依存的条件；

（c）コーティング自体及び／又は被覆された錠剤、粒子、ビーズ若しくは顆粒中のpH依存的条件；

（d）コーティングの溶解速度。

【0087】

自己免疫疾患を患い、その処置を必要としているヒト又は他の哺乳動物は、本発明の特定の実施形態において、前記ヒト又は他の哺乳動物の大腸へのSCFAの送達により問題なく処置され得る。本明細書に記載される剤形は、大腸への放出を達成し、望ましくない口腔、咽頭、食道、胃及び／又は小腸内でのSCFAの放出を防止し、それにより胃腸管内の意図される部位でそれらが放出される前のSCFAの分解を防止する。

【0088】

小腸又は結腸を含む大腸内でのSCFAの標的化放出のための様々な手段は、本発明での使用に好適である。大腸への送達のための手段の非限定的な例としては、pHトリガー性送達システム及び時間依存性送達システムが挙げられる。

【0089】

本発明の一実施形態は、腸管内の特定の所望の地点に到達するまで、胃腸液により破壊されてSCFAを放出することがない物質でSCFAを被覆（又は別様に封入）することを含む。一実施形態において、医薬組成物の遅延放出は、SCFAの錠剤、カプセル、粒子又は顆粒を、pH依存性の、即ち一般に大腸内に存在するが、上部胃腸管（即ち口腔、頬側口腔、咽頭、食道又は胃）又は下部GI管内に存在しないpHで破壊されるか又は溶解する物質で被覆することによって達成される。

【0090】

本発明の一実施形態は、部分的にメチルエステル化したメタクリル酸ポリマーから作製されたpH依存性腸溶コーティング材料を使用して小腸又は大腸に送達される。経口剤形は、活性成分の顆粒又は粒子から形成されている腸溶性圧縮錠剤の形態であり得る。5.0未満のpH（即ち一般に口腔、咽頭、食道、胃に見出される）で不溶性であるが、約pH 5.5～約pH 7.5（即ち小腸及び大腸内に存在する）で可溶性の任意の腸溶コーティングを本発明の実践に使用することができる。例えば、大腸へのSCFAの送達の達成が所望される場合、6.5未満のpHで完全又は部分的に不溶性であるが、pH 6.5超で可溶性の任意の腸溶コーティングが好適である。

【0091】

当業者は、pHが消化管に沿って変動することを認識し、剤形が崩壊して活性成分が胃腸管内の適切な又は所望の位置で放出されることを確実にする好適な腸溶コーティングを決定することができるであろう。

【0092】

単独で又は他のコーティングと組み合わせて、本明細書に記載される処置方法に使用することができる、活性成分の経口剤形及び／又は顆粒、粒子若しくはビーズの被覆における使用に好適なメタクリル酸コポリマーは、陰イオン性カルボキシルポリマーである。ポリマーは、アクリルポリマーであることが特に好ましく、陰イオン性遊離カルボキシル基とエステル基との比が約1：1である部分メチル-エステル化メタクリル酸ポリマーが最も好ましい。

【0093】

特に好適なメタクリル酸コポリマーは、Rohm Pharma GmbH, Weierstadt, West Germanyにより製造されているEudragit L（登録商標）、特にEudragit L-30-D（登録商標）及びEudragit 100-55（登録商標）である。Eudragit L-30-D（登録商標）では、遊離カルボキシル基とエステル基との比は、およそ1：1である。更に、前記コポリマーは、5.5未満、一般に1.5～5.5のpH、即ち一般に上部胃腸管の流体中に存在するpH

10

20

30

40

50

を有する胃腸液に不溶性であるが、5.5を超えるpH、即ち下部胃腸管の流体中に存在するpHで容易に溶解可能であることが知られている。そのようなコポリマーは、小腸内への活性成分の放出を促進することが意図される腸溶コーティングに有用である。

【0094】

代替的なコポリマーは、Rohm Pharma GmbH及びCo. KG, Darmstadt, Germanyにより製造されているEudragit S（登録商標）及びEudragit FS30D（登録商標）である。Eudragit S（登録商標）は、遊離カルボキシル基とエステル基との比がおよそ1:2であるという点のみEudragit L30D-55（登録商標）と異なる。Eudragit S（登録商標）も、Eudragit L30D-55（登録商標）と同様に5.5未満のpHで実質的に不溶性であるが、Eudragit L30D-55（登録商標）と異なり、小腸液中に存在するような5.5~7.0のpHを有するGI流体中で僅かに可溶性である。Eudragit S（登録商標）は、pH7.0以上、即ち一般に末端回腸及び結腸に存在するpHで可溶性である。

10

【0095】

Eudragit S（登録商標）はまた、単独で、遅延放出機構を介して、大腸（末端回腸よりも遠位）で主に開始するSCFA成分の送達を提供するコーティングとして使用することができる。加えて、pH7.0未満の小腸液中で僅かに可溶性のEudragit S（登録商標）は、pH5.5を超える小腸液中で可溶性のEudragit L30D-55（登録商標）と組み合わせて使用して、活性成分を腸管の様々な区域に送達するように処方され得る遅延放出組成物を達成することができ、より多くのEudragit L30D-55（登録商標）が使用されると、より近位で放出及び送達が始まり、より多くのEudragit S（登録商標）が使用されると、より遠位で放出及び送達が始まる。

20

【0096】

コーティングは、可塑剤並びにおそらく着色剤、界面活性剤、タルク及び/又はステアリン酸マグネシウム等の他のコーティング賦形剤（それらの多くは、コーティングの分野で周知である）を含むことができ、また通常含むであろう。特に、陰イオン性カルボキシルアクリルポリマーは、通常、10~25重量%の可塑剤、特にクエン酸トリエチル、クエン酸トリブチル、クエン酸アセチルトリエチル、フタル酸ジブチル、フタル酸ジエチル、ポリエチレングリコール、アセチル化モノグリセリド、プロピレングリコール及びトリアセチンを含むであろう。

30

【0097】

流動床又はバンコーティング等の従来のコーティング技術がコーティングの適用に使用される。コーティングの厚さは、経口剤形が小腸内の送達の所望の部位に到達するまで本質的に無傷のままであることを確実にするのに十分である必要がある。

【0098】

経口剤形は、SCFAの粒子若しくは顆粒を含む被覆圧縮錠剤、又はSCFAの粒子若しくは顆粒を含む軟若しくは硬カプセル（例えば、ゼラチン、澱粉又はヒドロキシプロピルメチルセルロース）（被覆又は非被覆）の形態であり得、それら自体が腸溶コーティングされる。本発明の一実施形態では、錠剤は、圧縮され、錠剤は、腸溶コーティングされる。

40

【0099】

時間依存性送達システム及び細菌酵素トリガー性システム

本発明の別の実施形態では、大腸へのSCFAの送達は、時間依存性送達システムの使用により達成される。胃内容排出後の確立された通過時間を想定すると、SCFA放出（遊離酸又はエステル化酸のいずれかとして）は、大腸の様々なセグメントを標的化することができる。

【0100】

本発明における使用に好適な時間依存性送達システムへのアプローチとしては、Pulsincap（商標）（Scherer DDS, Strathclyde, U.K.）、

50

Time Clock (商標) (Zambon Group, Milan, Italy) 及び SyncroDose (商標) (Penwest, Patterson, NY) 等の装置、並びに経時的に分解して錠剤内容物を放出するヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース又は任意の好適なヒドロゲル等の様々なコーティングが挙げられるが、これらに限定されない。

【0101】

本発明の一実施形態において、大腸への SCFA の送達は、細菌酵素トリガー性システムの使用によって達成される。薬物放出が結腸内の細菌酵素の作用によりトリガーされる経口剤形は、当該技術分野で既知である。本発明での使用に好適な細菌トリガー性送達システムへの様々な手法としては、ジスルフィドポリマー、グリコシドプロドラッグ及びマトリクス/コーティング剤としての多糖類 (Watts & Illum, 1997) が挙げられる。使用に好適な細菌トリガー性送達システムへの更なる手法は、Katsuma et al., 2004) に開示されている。本発明の一実施形態において、結腸標的化送達システム CODES (商標) (Yamanouchi Pharma Technologies, Norman, Okla.) を使用して SCFA を結腸に送達する。このシステムは、SCFA 含む錠剤コア及び糖類を含み、錠剤コアは、Eudragit E (登録商標) 等の酸溶性材料で被覆された後、Eudragit L (登録商標) 等の腸溶コーティングで被覆されている。腸溶コーティングは、胃内での分解から剤形を保護し、続いて胃内容物排出後に小腸内で溶解する。酸溶性コーティングは、剤形が小腸内を進む際に分解から保護する。剤形が大腸に到達した際、局所細菌叢は、錠剤コア中の糖類 (例えば、ラクツロース) を発酵させて、短鎖脂肪酸 (イソブチレート、ブチレート、イソバレレート、バレレート、イソカプロエート及びカプロエート等) とし、次いで、これらは、酸溶性コーティングを溶解してコア錠剤内容物を結腸内に放出する。

【0102】

従って、CODES システムの使用により、それを必要とする個体の結腸へ増大された量の酪酸を提供するなお更なる手段が提供される。従って、また更なる実施形態において、本発明は、治療的有効量の酢酸、そのエステル又は塩を含む医薬剤形を個体に投与することを含む、個体の結腸への SCFA の提供を想定し、剤形は、錠剤コア、糖類、酸溶性腸溶コーティングの形態の内側腸溶コーティング (Eugradit E 等) 及び外側腸溶コーティング酸抵抗性腸溶コーティング (Eudragit L 等) を含む。

【0103】

更なる実施形態において、剤形は、錠剤コア中の治療的有効量の酪酸、そのエステル又は塩も含む。

【0104】

当業者は、圧力依存性システム、CODES (商標) 技術、マイクロスポンジ、ペクチン及びガラクトマンナンコーティング、微生物トリガー性浸透圧システム及びレクチンを含む、SCFA の結腸標的化送達に使用され得る別法に精通しているであろう。

【0105】

経口使用のための製剤は、硬ゼラチンカプセル剤として提示され得、ここで、SCFA は、不活性固体希釈剤、例えば炭酸カルシウム、リン酸カルシウム又はカオリンと混合されるか、又は軟ゼラチンカプセル剤として提示され得、ここで、SCFA は、水又は油媒体、例えばピーナッツ油、流動パラフィン又はオリーブ油と混合される。

【0106】

水性懸濁液は、水性懸濁液の製造に好適な賦形剤との混合物中に SCFA を含むことができる。そのような賦形剤は、懸濁剤、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシ-プロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニル-ピロリドン、トラガカントガム及びアカシアガムであり、分散剤又は湿潤剤は、天然に存在するホスファチド、例えばレシチン、又はアルキレンオキシドと脂肪酸との縮合物、例えばポリオキシエチレンステアレート、又はエチレンオキシドと長鎖脂肪酸族アルコールとの縮合物、例えばヘプタデカエチレンオキシセタノール、又はエチレンオキシド

と、脂肪酸及びヘキシトールから誘導された部分エステルとの縮合物、例えばポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート又はエチレンオキシドと、脂肪酸及びヘキシトール無水物から誘導された部分エステルとの縮合物、例えばポリエチレンモノオレイン酸ソルピタンであり得る。水性懸濁液は、1種以上の保存剤、例えばエチル、又はn-プロピル、p-ヒドロキシベンゾエート、1種以上の着色剤、1種以上の香味剤及び1種以上の甘味剤、例えばショ糖又はサッカリンも含むことができる。

【0107】

油性懸濁液は、植物油、例えばラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油若しくはヤシ油又流動パラフィン等の鉱物油中にSCFAを懸濁させることにより処方され得る。油性懸濁液は、増粘剤、例えば蜜ろう、固形パラフィン又はアセチルアルコールを含むことができる。上記に示したものの甘味剤及び香味剤を添加して美味な経口製剤を提供することができる。これらは、アスコルビン酸等の抗酸化剤の添加により保存され得る。

10

【0108】

水の添加による水性懸濁液の製剤に好適な分散性粉末散剤及び顆粒は、分散剤又は湿潤剤、懸濁剤及び1つ以上の保存剤との混合物におけるSCFAを提供する。好適な分散剤又は湿潤剤及び懸濁剤は、上記に既に言及したものにより例示される。追加の賦形剤、例えば甘味剤、香味及び着色剤も存在することができる。

【0109】

本発明の医薬組成物は、水中油エマルションの形態であり得る。油性相は、植物油、例えばオリーブ油若しくはラッカセイ油、又は鉱物油、例えば流動パラフィン、或いはこれらの混合物であり得る。好適な乳化剤は、天然に存在するガム、例えばアカシアガム又はトラガカントガム、天然に存在するホスファチド、例えば大豆、レシチン及び脂肪酸、並びにヘキシトール無水物から誘導されたエステル又は部分エステル、例えばモノオレイン酸ソルピタン及び前記部分エステルとエチレンオキシドとの縮合物、例えばポリオキシエチレンモノオレイン酸ソルピタンであり得る。エマルションは、甘味剤及び香味剤を含み得る。

20

【0110】

シロップ剤及びエリキシル剤は、甘味剤、例えばグリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール又はショ糖を用いて処方され得る。これらは、粘滑薬、保存剤並びに香味剤及び着色剤も含むことができる。

30

【0111】

直腸坐薬

本発明の方法は、直腸坐薬として提供される医薬剤形を介して大腸内にSCFAを提供することも想定している。従って、特定の実施形態において、本発明の医薬組成物は、SCFAの直腸投与のための坐薬として処方される。これらの製剤は、SCFAを好適な非刺激性賦形剤と混合することにより調製することができ、その賦形剤は、常温で固体であるが、直腸温度で液体であり、従って直腸内で融解して薬物を放出するであろう。そのような材料としては、ココアバター及びポリエチレングリコールが挙げられる。直腸投与は、活性薬剤の経口投与に関連した胃腸管内の腸肝初回通過効果を排除するのに使用することができる。また更なる実施形態では、直腸坐薬は、エステル化加工澱粉として提供されるSCFAを含むことができ、直腸内で加工澱粉を放出した際、澱粉は、消化及びその結果の消化代謝物としてのSCFAの放出のために常在細菌叢に利用可能となる。

40

【0112】

注射用製剤

本発明は、SCFAの全身送達のための注射用医薬製剤の使用も含む。例えば、SCFAは、自己免疫疾患の処置又は予防が必要な個体の血流中へ直接注射され得る。注射は、静脈内又は動脈内注射に適合され得る。代替的な実施形態では、注射用製剤は、局所投与又は血流への遅延放出のいずれかを促進するために皮下注射に適合され得る。

【0113】

本発明の医薬組成物は、無菌注射用水性又は油性懸濁液の形態であり得る。この懸濁液は

50

、上記で言及した好適な分散剤又は湿潤剤及び懸濁剤を使用して、当該技術分野で既知のように処方することができる。医薬組成物はまた、無毒の非経口的に容認可能な希釈剤又は溶媒中の、例えば 1, 3 - ブタンジオールの溶液としての無菌注射用溶液又は懸濁液であり得る。使用できる容認可能なビヒクル及び溶媒は、特に水、リンゲル液及び等張の塩化ナトリウム溶液である。加えて、溶媒又は懸濁媒体として無菌固定油が都合よく使用される。これを目的として、合成モノ又はジグリセリドを含む刺激の少ない任意の固定油が使用され得る。加えて、オレイン酸等の脂肪酸が注射剤の製剤に有用である。

【0114】

本発明の医薬組成物は、投与単位形態で都合よく提示することができ、薬学の分野で周知の方法のいずれかにより調製することができる。全ての方法は、SCFAを薬学的に許容される賦形剤と組み合わせるステップを含み、その賦形剤は、1つ以上の付属成分を構成する。一般に、医薬組成物は、SCFAを均一且つ密接に液体担体若しくは微粉化固体担体又は両方と結合させた後、必要に応じて所望の製剤に成形されることにより調製される。

10

【0115】

本発明の医薬組成物はまた、リポソーム中に処方され得る。当該技術分野で既知のように、リポソームは、一般にリン脂質又は他の脂質物質から誘導される。リポソームは、水性媒体中に分散されたモノ又はマルチメラ水和液晶によって形成されている。リポソームを形成可能な任意の無毒の生理学的に許容される及び代謝可能な脂質を使用することができる。リポソーム製剤は、安定剤、保存剤、賦形剤等を含むことができる。好ましい脂質は、天然及び合成の両方のリン脂質及びホスファチジルコリンである。リポソームの形成方法は、当該技術分野で既知である。

20

【0116】

本発明の医薬組成物は、投与のための使用説明書と共に容器、パック又はディスペンサー内に収容され得る。医薬組成物のSCFA及び場合により追加の活性薬剤は、容器、パック又はディスペンサー内に別個の構成要素として提供されて、使用又は本明細書に記載される本発明の方法において同時に又は異なる時間に別々に又は一緒に摂取され得る。

【0117】

本明細書で使用される用語「薬学的に許容される」は、担体、希釈剤又は賦形剤がそれらのレシピエントに対して有害でないことを意味する。

【0118】

本明細書で特に示さない限り、用語「組成物」及び「製剤」は、交換可能に使用される。

30

【0119】

用語「～の投与及び又は「投与する」は、処置を必要とする個体に提供することを意味すると理解する必要がある。

【0120】

食物薬剤

アシル化高アミロース澱粉は、既知である。例えば、そのような澱粉は、米国特許第 5, 840, 860 号及び Annison et al., 2003 (その全容が参照により本明細書に組み込まれる) に記載されている (実施例 1、3、5、6 及び 8 を特に参照する)。詳細には、アセチル化高アミローストウモロコシ澱粉 (HAMSA)、ブチリル化高アミローストウモロコシ澱粉 (HAMSB) 及びプロピオネート高アミローストウモロコシ澱粉 (HAMSP) は、エステル化脂肪酸を含まない高アミローストウモロコシ澱粉 (HAMS) のように既知である。これらのアシル化澱粉の使用は、個々に既知であるが、これらの澱粉の組み合わせの使用は、今まで想定されていなかった。

40

【0121】

本発明者らは、驚くべきことに、高投与量のアセテート及びブチレートの組み合わせを、食物を介して送達することは、自己免疫疾患、特に 1 型糖尿病 (T1D) の発生及び悪化に高く影響する単純な手法であることを見出した。食物及び細菌代謝物は、T1D 及び他の自己免疫疾患を予防又は処置する医薬手法の非常に有望な代替物を提供する。

【0122】

50

本発明の方法は、非常に高いレベルのSCFAを下部結腸内で放出することを可能にし、これは、食物繊維の摂取のみで得られるものよりも有意に高いレベルである。詳細には、本明細書に記載されるアシル化澱粉は、個体の小腸内での分解に抵抗性であり、通常、食物に見出される澱粉よりも大量の脂肪酸を有するため、本明細書に記載される食物薬剤及び食物は、個体の大腸内への有意により高い用量の短鎖脂肪酸の提供を可能にし、短鎖脂肪酸は、利便性の高い安全な形態で個体によって投与又は摂取され得る。

【0123】

本発明の方法で使用される食物薬剤の調製のための例示的な方法を本明細書に更に記載する。

【0124】

食物代謝物は、腸内の異常又は免疫ホメオスタシスを多くのレベルで修正し、自己反応性T細胞の数を制限し、疾病を予防するように機能する。本発明の1つの重要な特徴は、大量のアセテート、天然産物の食物送達が生動物においてB細胞分子プロファイルの変化を達成することが示されたことである。更に、ブチレートは、アセテートに関して記載されているものとは異なり、Treg関連経路を介してT1Dに対して保護することが見出された。従って、特に高アセテート及びブチレートの組み合わせ処置は、結腸内に存在する細胞のみでなく、免疫系の細胞を操作するための刺激的且つ単純な手段である。

【0125】

腸管細菌叢は、食物の変化に急速に応答し(Faith et al., 2014、Zelante et al., 2013)、特定の食物の長期の使用は、適応変異に起因して、ストレスを受けた及び競争力のない細菌の枯渇と、より高速で成長する新しい株の出現とを可能にする。要約すれば、本発明者らは、食物代謝物の使用に対するアプローチが自己免疫病態形成の崩壊のための新規且つ効果的な手段を提供することを示した。

【0126】

従って、本発明は、2種以上の短鎖脂肪酸を個体の大腸内に送達するための食物薬剤であって、複数の短鎖脂肪酸に共有結合された担体を含み、短鎖脂肪酸は、酢酸、酪酸及びプロピオン酸の2種以上を含み、短鎖脂肪酸は、遊離脂肪酸を与えるために、個体の結腸内で加水分解性である結合によって担体に結合される、食物薬剤を更に提供する。

【0127】

例えば、一実施形態において、担体の各分子は、酢酸及び酪酸部分を含む。代替的な実施形態では、担体の各分子は、酢酸及びプロピオン酸部分又はプロピオン酸及び酪酸部分を含む。更なる実施形態において、担体の各分子は、少なくとも1つの酢酸、少なくとも1つの酪酸及び少なくとも1つのプロピオン酸分子を含む。また更なる実施形態において、担体の各分子は、複数のSCFA部分を含み、SCFAは、酢酸、酪酸又はプロピオン酸の2種以上の組み合わせである。

【0128】

好ましい実施形態において、担体分子は、炭水化物であるが、他の担体を使用できることが当業者により認識されるであろう。炭水化物は、ペクチン、ガム、粘液、セルロース、ヘミセルロース、イヌリン又はオリゴ糖であり得る。炭水化物は、澱粉であることが好ましい。

【0129】

更なる別の好ましい実施形態では、本発明の食物薬剤は、2種の異なるSCFAでアシル化された澱粉分子を含む。例えば、澱粉は、複数の酪酸及び酢酸部分の両方でアシル化され得る。更なる実施形態において、澱粉は、複数の酪酸、酢酸及びプロピオン酸部分でアシル化される。

【0130】

本発明は、様々な置換度を有する様々な担体分子も想定している。例えば、担体が澱粉分子の場合、本発明は、0.05~1.0、好ましくは0.1~0.8の範囲、より好ましくは0.5の置換度を想定している。置換度0.5は、澱粉分子全体の平均で2つのグルコース分子当たり1つの短鎖脂肪酸部分が存在することを意味する。当業者は、短鎖脂肪

10

20

30

40

50

酸部分の存在が澱粉分子の長さに沿って必ずしも均一ではなく、平均の短鎖脂肪酸部分の数を表すことを認識するであろう。当業者は、2つの短鎖脂肪酸部分が澱粉の単一分子上に存在する場合、置換度0.5が、澱粉分子上に等量の各短鎖脂肪酸部分が存在すると仮定して、4分子当たりほぼ1つの1タイプの短鎖脂肪酸を示すことも認識するであろう。

【0131】

組み合わせ食物

本発明は、本明細書に記載される処置方法における使用のために少なくとも2つの食物薬剤を個体において提供することにも関することが認識されるであろう。例えば、食物薬剤は、それぞれ個体の大腸へ単一種の短鎖脂肪酸を送達するためのものであり得、各薬剤は、担体を含み、担体の各分子は、遊離脂肪酸を与えるために、個体の結腸内で加水分解性である結合によって短鎖脂肪酸分子に共有結合される。担体上の各脂肪酸の置換度は、0.1~0.5、好ましくは0.15~0.20である。

10

【0132】

従って、本発明は、組み合わせ食物であって、それを必要とする個体の食物中に2種以上の短鎖脂肪酸を提供するために、上述した2種以上の食物薬剤を含む組み合わせ食物にも関する。

【0133】

好ましくは、組み合わせ食物は、アセチル化澱粉及びブチリル化澱粉の組み合わせを含み、それらの各々は、米国特許第5,840,860号に記載されているように調製される。別の実施形態では、組み合わせ食物は、アセチル化澱粉及びプロピオニル化澱粉の組み合わせを含む。また更なる実施形態では、組み合わせ食物は、ブチリル化澱粉及びプロピオニル化澱粉の組み合わせを含む。

20

【0134】

単一種の短鎖脂肪酸を含む食物薬剤の調製方法は、既知であり、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,840,860号に記載され、更に実施例に記載されている。

【0135】

投与量

本方法は、短鎖脂肪酸の一連の投与量の提供を想定している。用量は、SCFAの投与モード、SCFAが提供される形態（例えば、経口剤形、注射又は食物薬剤として）及び短鎖脂肪酸の意図される作用部位に応じて変動し得ることが認識されるであろう。

30

【0136】

好ましくは、方法が個体の大腸内への短鎖脂肪酸の組み合わせの送達のための経口剤形の投与を含む場合、用量は、1日当たりおよそ0.01mg/kg~100mg/kg、好ましくは1日当たり0.1mg/kg~100mg/kg、より好ましくは1mg/kg~50mg/kgである。最も好ましい実施形態では、酢酸、酪酸又はプロピオン酸の任意の1つの1日用量は、3、4、5、6、7、8及び9mg/kgを含む2mg/kg~10mg/kgである。

【0137】

本発明の方法が、短鎖脂肪酸の組み合わせを大腸内に送達するための食物薬剤又は組み合わせ食物の使用に関する状況では、当業者は、消費される薬剤又は食物の量が、食物の組成及び食物薬剤中に含まれる担体分子に組み込まれた各短鎖脂肪酸の割合に応じて変動することを認識するであろう。

40

【0138】

本方法が、単一担体分子に結合された2つの短鎖脂肪酸の組み合わせを含み、且つ担体が置換度0.4（即ちおよそ2.5分子毎に1短鎖脂肪酸）を有する澱粉である食物薬剤の提供に関する一実施形態において、投与量は、50kg個体の場合、1日当たり澱粉およそ1g~澱粉40g、好ましくは1日当たり澱粉1g~1日当たり澱粉10g（即ち1日当たり0.02g~0.2g/kg）であろう。より好ましくは、用量は、1日当たり2g~8g（1日当たり0.04g/kg~0.16g/kg）であろう。より好ましくは、用量は、50kg個体の場合、1日当たりおよそ3.75gの澱粉分子（即ち0.07

50

5 g / k g / 日)である。これは、澱粉分子中に各短鎖脂肪酸が等しい割合で存在すると仮定した場合、およそ 250 mg ~ 300 mg の各短鎖脂肪酸に対応する。

【0139】

代替的に、本方法は、2種の短鎖脂肪酸を提供するように組み合わせられたアシル化澱粉の2つの形態からなる組み合わせ食物の投与も含み得る。例えば、酢酸で修飾されており、置換度 0.2 (即ち平均で5グルコース分子当たり1酢酸)を有する澱粉は、1日当たり 0.04 g / k g ~ 0.16 g / k g、より好ましくは1日当たり 0.05 g / k g ~ 0.1 g / k g、更により好ましくは 0.075 g / k g / 日の用量で使用され得る。

【0140】

投与

一実施形態において、SCFAは、大腸の細胞をSCFAと接触させるために、個体の大腸内で放出されるように個体において提供される。これは、個体の結腸内でSCFAを放出するように処方された、経口投与のための腸溶性剤形の使用を含む多数の手段により達成することができる。代替的に、SCFAは、直腸投与のための医薬剤形で提供され得る。

【0141】

本発明の医薬組成物は、任意の好適な手段により、例えば錠剤、カプセル剤、顆粒若しくは散剤の形態等で経口的に；舌下に；頬側に；皮下、静脈内、筋内、腹腔内若しくは大槽内注射若しくは注入技術による等、非経口的に（例えば、無菌の注射のための水性若しくは非水性の溶液若しくは懸濁液）；吸入噴霧による等、鼻腔内に；クリーム若しくは軟膏の形態等で局部的に；又は坐薬若しくは浣腸の形態等で直腸内に；無毒の薬学的に許容されるビヒクル又は希釈剤を含む投与量単位製剤で投与することができる。これらは、例えば、即時放出又は持続放出に好適な形態において、例えば皮下インプラント、封入スフェロイド又は浸透圧ポンプ等の装置の使用により投与され得る。

【0142】

代替的な実施形態において、本発明の方法は、本明細書に記載される食物薬剤又は組み合わせ食物を介したSCFAの投与を含む。

【0143】

また更なる実施形態において、本発明は、SCFAの第1の種が1つの投与手段により投与され、SCFAの第2の種が代替的な手段により投与され得るように、2つ以上の投与手段によりSCFAを提供することを想定している。例えば、一実施形態において、本発明は、第1のSCFAを経口剤形の投与により提供し、第2のSCFAを静脈内注射に適合された剤形の静脈内注射により提供することを含み得る。これは、酪酸等の初回通過代謝に感受性のSCFAの投与に特に有用であり得る。しかしながら、当業者は、任意の数の組み合わせを、必要とする個体にSCFAを提供するのに使用できることを認識するであろう（即ち医薬剤形の組み合わせ、食物薬剤の組み合わせ及び医薬剤形又は食物薬剤の組み合わせ）。

【0144】

従って、一実施形態において、本発明は、自己免疫疾患の予防又は処置を、それを必要とする個体において行う方法であって、SCFAの第1の種を含む第1の医薬剤形と、SCFAの第2の種を含む第2の医薬剤形とを個体に投与することを含み、第1の医薬剤形は、非経口注射に適合され、第2の医薬剤形は、経口投与に適合される、方法を含む。

【0145】

好ましい実施形態において、本発明は、自己免疫疾患の予防又は処置を、それを必要とする個体において行う方法であって、酪酸、そのエステル又は塩を含む第1の医薬剤形と、酢酸、そのエステル又は塩を含む第2の医薬剤形とを個体に投与することを含み、第1の医薬剤形は、非経口注射に適合され、第2の医薬剤形は、経口投与に適合される、方法を含む。

【0146】

更なる代替的な実施形態において、自己免疫疾患の予防又は処置を、それを必要とする個体において行う方法であって、酢酸、そのエステル又は塩を含む第1の医薬剤形と、酪酸

10

20

30

40

50

、そのエステル又は塩を含む第2の医薬剤形とを個体に投与することを含み、第1の医薬剤形は、非経口注射に適合され、第2の医薬剤形は、経口投与に適合される、方法を提供する。

【0147】

代替的に、本発明は、自己免疫疾患の予防又は処置を、それを必要とする個体において行う方法であって、酢酸、そのエステル又は塩を含む医薬剤形と、酪酸、そのエステル又は塩を含む食物薬剤とを個体に投与することを含む方法を提供する。医薬剤形は、非経口注射（静脈内又は皮下注射を含む）、経口投与に適合されるか又は直腸坐薬として適合され得る。

【0148】

併用療法

本発明は、本明細書に記載される医薬剤、食物薬剤又は組み合わせ食物を他の方法と組み合わせ使用して、自己免疫疾患の処置又は予防を必要としている個体の大腸に高いレベルのSCFAを提供することを想定している。

【0149】

例えば、本発明の方法は、プレバイオティクス又はプロバイオティクスを含む1種以上の薬剤の、個体への予めの、同時の又は連続した提供を含み、その薬剤は、個体の腸内のマイクロバイオームの組成を変化させるために使用され得る。当業者は、そのようなプレ又はプロバイオティクスが遺伝子改変細菌又は非遺伝子改変細菌を含むことを認識するであろう。

【0150】

更に、本発明はまた、本明細書に記載される医薬剤、食物薬剤又は組み合わせ食物を、自己免疫疾患を予防又は処置する他の方法と組み合わせ使用することを想定している。

【0151】

I型糖尿病の処置に関連して、本発明は、インスリン注射の投与と、本明細書に記載される方法のいずれかによるSCFAの投与とを含む併用療法を想定している。例えば、一実施形態において、本発明は、SCFAの2種以上を、I型糖尿病と診断された個体の大腸内に遅延放出するように適合された経口剤形を、それを必要とする個体に投与することを想定し、ここで、個体は、インスリンの皮下注射を更に受容している。

【0152】

好ましい実施形態において、本発明は、I型糖尿病の処置を、それを必要とする個体において行う方法であって、

治療的有効量の酢酸及び酪酸、それらの塩又はエステルを含む経口剤形であって、酢酸及び酪酸、それらの塩又はエステルは、個体の大腸内に遅延放出するように適合される、経口剤形と、

治療的有効量のインスリンと

を個体に投与することを含み、それにより個体におけるI型糖尿病を処置する、方法に関する。

【実施例】

【0153】

実施例1：動物研究

実験方法

動物及びモデル

NOD/Lt(NOD)、C57BL/6及びNOD.8.3マウスは、Monash Animal Research Platform, Melbourne Australia由来のものであった。両方ともC57BL/6バックグラウンドの、Gpr43-/-マウス(Maslowski, et al., 2009)及びMyD88-/-マウス(Shizuo Akiraから取得)をNODバックグラウンドに対して>10回戻し交配した。GF NODマウスは、Germ Free Unit(Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research

10

20

30

40

50

由来のものであった。NOD.FoxP3-GFPマウス(NOD/ShiLt-Tg(FoxP3-EGFP/cre)1cJbs/Jは、Jackson Laboratory, USA)から取得した。

【0154】

細菌叢を標準化するために、食餌を開始する前に多数のリターからのマウスを混合し、無作為にグループに割り当てた。使用した精製食物は、以前に記載されているAIN93-G食物のバランスのとれた改変物に基づいていた(Bajka et al., 2006)。マウスに3、5又は10週齢で開始して3～5週間給餌した。糞便、血液及び盲腸内容物中のSCFAを以前に記載されているように分析した(Bajka et al., 2006)。以前に記載されているように糖尿病を監視した(Marino et al., 2009)。

10

【0155】

マウスに関する全実験手順は、関連するAnimal Ethics Committee of Monash University, Melbourne, Australiaにより承認されたプロトコルに従って行った。

【0156】

動物食物

対照(LAMS)並びにアセチル化(HAMSA)、プロピオニル化(HAMSP)及びブチリル化(HAMSB)澱粉食物は、以下の成分を含んでいた。

【0157】

20

【表1】

構成成分(g/kgとして)

成分	LAMS	15% HAMSA	15% HAMSP	15% HAMSB
トウモロコシ澱粉 - 3401C	529.5	379.5	379.5	379.5
HAMSA	0	150	0	0
HAMSP	0	0	150	0
HAMSB	0	0	0	150
カゼイン	200	200	200	200
ショ糖	100	100	100	100
ヒマワリ油	70	70	70	70
αセルロース	50	50	50	50
ミネラル Mix AIN 93G	35	35	35	35
ビタミン Mix AIN 93VX	10	10	10	10
L-シスチン	3	3	3	3
重酒石酸コリン	2.5	2.5	2.5	2.5
合計	1000	1000	1000	1000

30

40

【0158】

フローサイトメトリー並びにリポ多糖及びサイトカイン測定

単核細胞の免疫表現性分析は、以下のmAbsを使用した：CD3e(145-2C11)、CD4(RM4-5)、CD25(PC61)、CD8(Ly2)、CD44(IM7)、CD45R/B220(RA3-6B2)、IgM(11/41)、CD45R

50

B (1 6 A)、MHC II (I - A k) (A B k) (1 0 - 3 . 6)、MHC I (H - 2 K d)、CD 8 6 (B 7 - 2) (G L 1)、CD 8 0 (B 7 - 1) (1 6 - 1 0 A 1)、CD 6 2 L (M E L - 1 4)、CD 1 0 3 (2 E 7)、F o x P 3 (F J K - 1 6 s)。アイソタイプ対照は、I g G 1、 ; I g G ; I g G 2 a、 を含んでいた。使用した細胞内タンパク質 : M a r i n o e t a l . , 2 0 1 2 に記載されている I L - 1 0 (J E S 5 - 1 6 E 3)、H E L I O S (2 2 F 6) 及び F o x P 3 を製造業者の転写因子染色プロトコルの通りに検出した (e B i o s c i e n c e、B i o l e g e n d)。全 A b s は、B D B i o s c i e n c e、e B i o s c i e n c e 又は B i o l e g e n d からであった)。染色サンプルを F A C S D i v a ソフトウェア (B D B i o s c i e n c e s) 及び F l o w J o ソフトウェアバージョン 9 . 3 . 2 (T o m y D i g i t a l B i o l o g y) を有する B D L S R I I フローサイトメーターを使用して分析した。脾臓及び P L N T 細胞を P E 標識 I G R P 2 0 6 - 2 1 4 (H - 2 K (d)、V Y L K T N V F L) 4 量体、P E 標識 I A g 7 / B D C 2 . 5 m i (A H H P I W A R M D A) 4 量体で染色した。P E 標識 T U M (H - 2 K (d)、K Y Q A V T T T L) 4 量体及び P E 標識 I A g 7 / ヒト C L I P 8 7 - 1 0 1 (P V S K M R M A T P L L M Q A) 4 量体を M i m o t o p e s P T Y L T D , A u s t r a l i a からペプチドと共に全実験で負の対照として使用した (N I H T e t r a m e r F a c i l i t y , A t l a n t a , U S A から提供)。

【 0 1 5 9 】

T N F を、B D O p t E I A キット (B D B i o s c i e n c e s) を使用した E L I S A により、I L - 2 1 を E L I S A R e a d y - S E T - G o ! キット (e B i o s c i e n c e) を使用した E L I S A により、並びに I L - 2 2 及び T G F を ビオチン化抗体 (B i o l e g e n d) により測定した。血漿リポ多糖 (L P S) を、T o x i n S e n s o r (商標) C h r o m o g e n i c L A L E n d o t o x i n アッセイキット (G e n S c r i p t , U S A I n c .) により製造業者のマニュアルに従って測定した。

【 0 1 6 0 】

細菌 DNA 配列決定及びバイオインフォマティクス

糞便からの細菌ゲノム DNA を、Q I A a m p DNA 便ミニキット (Q I A G E N) を使用して抽出した。DNA サンプルを、細菌 1 6 S r R N A 遺伝子の V 1 - V 3 領域を標的化して、フォワードプライマー 5 ' A G A G T T T G A T C C T G G 3 ' ; 及びリバースプライマー、5 ' T T A C C G C G G C T G C T 3 ' を使用して増幅し、R o c h e 4 5 4 G S F L X + 配列決定装置を使用して配列決定した。

【 0 1 6 1 】

M i c r o b i a l E c o l o g y (Q I I M E) ソフトウェアへの Q u a n t i t a t i v e I n s i g h t s を用いてバイオインフォマティクス分析を行った。P i n t a i l アルゴリズム (A s h e l f o r d e t a l . , 2 0 0 5) を使用してキメラ配列を検出及び除去し、アカシア (B r a g g e t a l . , 2 0 1 2) によりノイズ除去及びエラー修正した。O T U を、Q I I M E の u c l u s t アルゴリズムを使用して 9 7 % 配列同一性で選択した。分類学は、G r e e n g e n e s データベースに対して B L A S T を使用して Q I I M E において割り当てた (D e S a n t i s e t a l . , 2 0 0 6)。E z T a x o n データベースを使用して、代表的 O T U 配列を培養可能な株のデータベースと更に比較した (C h u n e t a l . , 2 0 0 7)。ネットワークを C a l y p s o (<http://cgenome.net/calypso/>) で可視化した。

【 0 1 6 2 】

粘膜固有層 T r e g 細胞単離、養子移植

結腸粘膜固有層リンパ球を以前に記載されたように調製した (A r p a i a e t a l . , 2 0 1 3)。N O D / S C I D マウスへの養子移植のために、N O D マウスに様々な食物を 5 週齢で開始して 1 0 週間給餌した。1 5 週目にマウスを選別し、M i l t e n y i B i o t e c L S M A C S 分離カラムを有する M i l t e n y i B i o t e c P a

10

20

30

40

50

n T Cell IsolationキットIIを使用して、95%純度で総T細胞を脾臓、末梢リンパ節から単離し、NP食物を給餌した8週齢のNOD/SCIDマウスに静脈内注射し、糖尿病発生に関して監視した。Treg変換分析のために、CD3 + B220 - Foxp3 - T細胞を、Influx選別機を使用して選別し(>95%純度)、NP、HAMS、HAMS A及びHAMS B給餌NOD/SCIDマウスにi.vで移植した。NOD.8.3 CD8 + T細胞の養子移植のために、NOD.8.3マウスの脾臓、PLN及びMLNからのリンパ球を、MACS CD8 + T細胞単離キット(Miltenyi Biotech)を使用して精製した。5 × 10⁶ CFSE標識CD8 + T細胞を、NP、HAMS、HAMS A又はHAMS Bを2週間にわたって予め給餌したNODレシピエントに静脈内注射した。マウスは、移植後4日間同じ食物を継続し、その時点で脾臓、PLN及びMLNリンパ球を回収し、CFSE希釈によりCD8 + T細胞増殖に関して分析した。

10

【0163】

病理組織学

標準的な手順を用いて膵臓組織を処理及び染色した。膵島炎点数化のために、膵臓切片を3つの濃度(100 µm離して)で採取した。5 ~ 15マウスからの少なくとも100膵島を点数化した。以下のシステムに従って膵島を類別した：グレード0 - 膵島炎の徴候なし、グレード1 - <25%浸潤、グレード2 - 25 ~ 50%浸潤、グレード3 - 50 ~ 75%浸潤及びグレード4 - >75%浸潤。

【0164】

20

腸内細菌叢の経口経管栄養

糞便及び盲腸内容物を収集し、脱酸素化PBS中に材料100 µgとPBS 1 mlの比で再懸濁した。次いで、混合物をホモジナイズし、1000 rpmで5分間沈降させ、上清を経管栄養に使用した。妊娠GF NODマウス及びそれらの子に、8 ~ 10週齢のHAMS、HAMS A及びHAMS B給餌NODドナーからの200 µlの糞便及び盲腸ミックスを経管栄養した。母親は、妊娠のE18及び出産後2週間にわたりミックスの2つの経口経管栄養を受容した。子は、離乳時(20 ~ 26日齢)、24時間以内にミックスの2つの経口経管栄養を受容した。次いで、子の疾病発生率を追跡した。

【0165】

クロマチン免疫沈降(ChIP)

30

クロマチン免疫沈降(ChIP)を(Thorburn et al., 2015)に記載されているように行った。手短には、選別したCD4 + CD25 - (>95%純度)T細胞を0.6%パラホルムアルデヒド中で固定し、PBSで洗浄した後、NP-40溶解緩衝液(0.5%のNP-40、pH7.4の10 mMのTris-HCl、10 mMのNaCl、10 mMのMgCl₂及びプロテアーゼ阻害剤)で溶解し、次いでSDS溶解緩衝液(1%のSDS、10 mMのEDTA、pH8.1の50 mMのTris-HCl及びプロテアーゼ阻害剤)で溶解した。Bioruptor Next Gen(Diagenode)を使用して、DNAを4で20 secオン、30 secオフの30サイクルで超音波処理した。超音波処理したクロマチン生成物を1%のTriton X-100、20 mMのTris-HCl(pH8.0)、150 mMのNaCl、2 mMのEDTA中で希釈した。ChIPをIgG対照、抗ヒストンH3、抗アセチル-ヒストンH3(Lys9)又は抗過アセチル化ヒストンH4(Penta;K5、8、12、16及び20アセチル化)抗体(Millipore, USA)のいずれかを用いて行った。クロマチンをタンパク質A/G-セファロースで単離し、低塩緩衝液(0.1%のSDS、1%のTriton X-100、pH8.1の20 mMのTris-HCl、150 mMのNaCl及び2 mMのEDTA)、高塩緩衝液(0.1%のSDS、1%のTriton X-100、20 mMのTris-HCl(pH8.1)、500 mMのNaCl及び2 mMのEDTA)で洗浄し、LiCl緩衝液(0.5%のNP-40、0.5%デオキシコール酸塩、pH8.1の10 mMのTris-HCl、1 mMのEDTA及び0.25 MのLiCl)中で希釈した。DNAを溶離緩衝液(1%のSDS及び100 mMのNa

40

50

HCO₃)中に回収し、65℃での高塩処理(200mMのNaCl)により脱架橋し、プロテイナーゼK(40μg/mlのプロテイナーゼK、10mMのEDTA、pH8.1の40mMのTris-HCl)により50℃で処理した。DNAをFoxp3プロモーター(FCTGAGGTTTGGAGCAGAA GGA、R GAGGCAGGTAGAGACAGCATTTG)に特異的なプライマーを使用したqPCR用に単離した。アセチル化の倍数増加をH3に対して示す。

【0166】

リアルタイムPCR分析及びTreg細胞の単一細胞発現解析

結腸からのRNAを抽出し、mRNAの増幅にオリゴ(dT)18プライマーを使用して、BiolineのTetro cDNA合成キットを使用してcDNAに変換した。BioneerのAccupower 2x Greenstar qPCRマスターミックスを使用して、BioradのCfx384リアルタイムシステム上でqPCRを行った。全発現をハウスキーピング遺伝子 - アクチンに対して標準化した。プールしたPLN(n=10マウス)からのCD4+CD45RB低CD25+Treg細胞を個々に96ウェルqPCRプレート(Influx細胞選別機器、BDBiosciences)内に直接選別した。Life Technology Single-cell to CTキットを使用して、製造業者の使用説明書に従って単一細胞PCRを行った。Biomark機器(Fluidigm)を使用して、以前記載されたように(Polo et al., 2012)単一細胞発現解析を行った。結果をLog2Ex = -(Cq[遺伝子] - LOD)として表す。Log2Ex値が負の場合、Log2Ex = 0である。

【0167】

RNA-seq

RNeasy Qiagenキットを使用してRNA抽出を行った。Illumina 100ベースHTモード配列決定化学、Illumina HiSeq 1500レーン当たりバーコード化サンプルを使用して、断片末端読み取りフォーマット(fragment end read format)で、RNAseq配列決定を用いてcRNAを全マウスゲノムアレイにハイブリダイズした。手短には、4食物×4複製由来のRNAサンプルを、単一末端配列決定を用いて1サンプル当たり約2000万読み取りを配列決定した。

【0168】

表1(a)15週齢のHAMSA対HAMS給餌雌NODマウス、HAMS B対HAMS給餌雌NODマウス、及びHAMSA対HAMS B給餌雌NODマウスからの脾臓IgM+B220+B細胞における差次的発現転写産物である。遺伝子発現における平均倍数変化である。q<0.05のFDRカットオフを用いてグループ間の差次的発現遺伝子を規定した。b)RT-PCR発現解析のためのmRNAの増幅に使用したオリゴ(dT)18プライマーのリストである。

【0169】

10

20

30

40

50

【表 2】

a

遺伝子	倍数変化			FDR		
	H v HA	H v HB	HA v HB	H v HA	H v HB	HA v HB
SCAND1	1.038765285	-0.761971898	-1.800737183	0.009681928	0.073246183	4.63E-09
BCL2c	0.534614945	-0.589566465	-1.12418141	0.106615615	0.032634043	3.11E-07
SIK1	-1.206305407	-2.688991855	-1.482686447	0.005951783	1.68E-16	0.00013211
DDIT4	-1.03054346	-2.239445709	-1.208902249	0.003461034	2.64E-17	0.000137753
Nudc	0.025389948	-0.758008984	-0.783398932	0.964870448	0.000186472	0.000291791
DUSP1	1.010796812	2.256518864	1.245722052	0.010466454	9.86E-16	0.000291791
Hspa1b	-0.896237485	-4.701855414	-3.805617929	0.624228295	2.02E-06	0.000453239
Hspa1a	-0.737357947	-4.241367961	-3.504010014	0.705195043	2.77E-05	0.00211719
Bpgm	1.736110063	0.266462255	1.469647808	0.000635759	0.839821929	0.003713543
PLAUR	0.677592143	1.256048653	-0.57845651	0.001150789	5.91E-16	0.005879226
sifn8	-0.264876794	0.343844109	0.608720902	0.486096908	0.284249773	0.009762771
Pydc3	-0.590878226	0.368394563	0.959272789	0.289572828	0.591586016	0.013182284
GNB3	-2.550184011	1.425253743	3.975437755	0.374989511	0.397708401	0.022071431
PEK11A	-0.006217573	-1.433380409	-1.427162836	0.998049711	0.012472856	0.027801206
Pde2a	-0.023928691	0.480204947	0.504133637	0.964225683	0.036431625	0.034039725
Ube2f6	1.420254968	0.37743697	-1.042817998	0.008379746	0.740024467	0.080822966
TMCC2	5.082558393	3.895050929	1.187507464	0.000635759	0.108766891	0.130414757
CD163	2.237908576	0.99071786	-1.247190716	0.005951783	0.415842724	0.184827324
IL10ra	-0.597534123	-1.01103722	-0.413503097	0.035189002	4.44E-07	0.185764333
TRIM10	4.813601067	3.130643978	-1.682957089	0.002041285	0.045608569	0.317759899
Cpo1	-5.799112877	-8.672790674	-2.873677797	0.035189002	0.000233834	0.328908459
Cpb1	-5.09036293	-8.137973982	-3.047611052	0.175199751	0.005176466	0.332962482
Crem	1.618612279	2.091671886	0.473059608	0.000476181	2.31E-09	0.383081947
NR4A1	0.965821305	1.272320876	0.306499571	0.000984664	4.47E-08	0.399552621
DUSP5	-1.142883517	-1.524582305	-0.381698788	0.002041285	2.50E-07	0.407065508
Gda	2.237344604	1.574899514	0.662445091	0.001047466	0.022788387	0.415059631
Ank1	2.531364692	1.839304695	-0.692059997	0.002297301	0.032013499	0.486732105
SLC4A1	4.720822999	3.626282992	-1.094540007	0.001850047	0.009079279	0.505335049
SPTB	3.799103389	2.827882079	-0.971221309	0.004350384	0.030111291	0.513047904
SPTA1	4.401310873	3.304921413	-1.09638946	0.005951783	0.033209623	0.525327496
Epb4.2	4.760517378	3.664031859	-1.096485519	0.008635805	0.033197498	0.564152371
Cd69	-0.782923669	-0.936994531	-0.154070862	0.005726972	4.14E-05	0.676359646
Id3	0.762776968	0.740373181	-0.022403787	0.005951783	0.002482835	0.960273075

10

20

30

【0170】

【表 3】

b

プライマー名	フォワード配列	リバース配列
Actb	ACC AGA GGC ATA CAG GGA CA	CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG
Ocln	TCC GTG AGG CCT TTT GAA	GGT GCA TAA TGA TTG GGT TTG
Tjp1	GCC AGA TAT CTA TCA GAT TGC AAA A	GAT GCC AGA GCT ACG ATG G
Cdh1	ACC GGA AGT GAC TCG AAA TGA TGT	GTT CAG AAC CAC TGC CCT CGT AAT
Muc2	TCC TGA CCA AGA GCG AAC AG	ACA GCA CGA CAG TCT TCA GG
B7-1	TTT CCA GCA ATG ACA GAC AG	CCA TGT CCA AGG CTC ATT CT
B7-2	CAC GAG CTT TGA CAG GAA CA	TTA GGT TTC GGG TGA CCT TG
Prdm1	CAG AGA GCA GAG CAC CTC AG	ACA TGT AGC AAG GCC ATC AA
B2m	CCT TCA GCA AGG ACT GGT CT	TGT CTC GAT CCC AGT AGA CG

40

【0171】

統計的分析

2つの独立グループを比較する統計的有意性を、ノンパラメトリックMann-Whitney U検定(GraphPad Prismソフトウェア、La Jolla、CA, USA)を使用してP値を計算することにより決定した。全食物データに関して以下の比

50

較を行った：(1) N P 対 H A M S、(2) H A M S 対 H A M S A、(3) H A M S 対 H A M S B、(4) N P 対 H A M S A、(5) N P 対 H A M S B。糖尿病発生率研究を K a p l a n - M e i e r 生存プロットとしてグラフ化し、M a n t e l - C o x ロジランク検定を使用して自由度 2 で分析した。*** $P < 0.0001$ 、*** $P < 0.001$ 、** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ 。

【0172】

結果

腸微生物代謝物は、糖尿病に対する保護と関連する

S P F N O D . M y D 8 8 - / - マウスにおける S C F A アセテートの末梢血濃度は、年齢及び性別一致 N O D マウスと比較して非常に上昇した(2 ~ 3 倍)(図 1 a)。これは、S P F N O D . M y D 8 8 - / - マウスの糞便におけるアセテートの高濃度とも一致し(図 9 b)、S C F A 生成細菌と保護との間の正の関係が示唆される。ブチレートも末梢血中で増大していた(図 1 a)が、この代謝物は、通常の条件下でかろうじて検出可能である。S P F N O D マウス(5 ~ 20 μ M)と比較して、肝門脈血中の高濃度のブチレートが S P F N O D . M y D 8 8 - / - マウス(50 ~ 100 μ M)に見出された(図 1 b)。肝門脈血中のアセテート濃度は、末梢血中で観察された結果を支持する。

【0173】

細菌叢由来の S C F A が疾病発生率を変更するか否かを決定するために、G F 条件下で収容した正常な N O D マウスにおける疾病悪化を調べた。糖尿病浸透率は、S P F N O D マウスと比較して G F N O D マウスのコホートでより高く(図 1 c)、これは、糞便中のブチレートの顕著に低い濃度と関連していた(図 9 B)。糞便アセテート濃度は、S P F 及び G F N O D マウス間で有意に変化しないが、遥かに高い濃度の糞便アセテート及びブチレートが G F と比較して S P F N O D . M y D 8 8 - / - マウスで見出された(図 9 b)。

【0174】

膵島における膵島炎は、N O D マウスにおいて約 5 週齢で出現し、顕性糖尿病は、15 ~ 30 週齢で雌の 60 ~ 80 % において生じたが、雄では 20 ~ 30 % のみに生じた。これと一致して、若い雌 N O D マウスは、年齢一致雄 N O D マウスと比較してアセテート及びブチレートの両方の有意により低い末梢血中の濃度を有することが見出された(図 1 d)。糞便 S C F A 濃度における性差は、C 5 7 / B L 6 マウスで見られず(図 9 c)、S C F A の不十分な細菌生成は、雌 N O D マウスに特異的な現象であることが示唆される。

【0175】

アセテートの経口投与(循環中でのその濃度を増大させるために)が疾病悪化を調節できるか否かを決定するために、N O D 雌マウスの飲料水にアセテートを添加した。5 週齢から開始して、アセテート処理は、糖尿病の発生を有意に遅延させた(30 週齢での発生率 40 % 対対照の 70 %)(図 1 e)。10 週齢までに、処置開始から 5 週間後、アセテート処理 N O D マウスは、免疫細胞浸潤を有さないより多くの膵島及び高グレード浸潤(膵島炎スコア 3 又は 4)を有するより少ない膵島を有した(図 1 f)。

【0176】

高アセテート及びブチレート産出食物による S C F A の増大は、T 1 D に対して保護する S C F A の経口投与は、S C F A の循環濃度の急速且つ一過性の上昇を生じるが、食物繊維の細菌発酵を介した結腸からのそれらの持続性吸収と一致しない(T o p p i n g & C l i f f t o n , 2001 及び I l l m a n e t a l . , 1988)。繊維由来の S C F A の組み合わせ効果に加えて、重要な問題は、T 1 D の危険性における個々の S C F A の役割である。従って、アセチル化(H A M S A)又はブチリル化(H A M S B)のいずれかの特殊化高アミローストウモロコシ澱粉(H A M S)食物を使用した。アシル化澱粉(H A M S)は、小腸アミロリシスに大いに抵抗性であり、細菌がそれらの特異的に組み込まれた S C F A を放出する結腸へと通過する。次いで、H A M S は、発酵され、通常の範囲の S C F A が生成される。これらの澱粉は、腸生物学に対する特定の S C F A(即ちアセテート対ブチレート)の効果を評価するための強力なツールであることが証明されてい

10

20

30

40

50

る (Fukuda et al., 2011、Clarke et al., 2008、Bajka et al., 2010)。

【0177】

雌NODマウスにHAMS A又はHAMS B食物を5週間給餌した後、糞便、盲腸内容物 (digesta)、肝門血及び末梢静脈血中のアセテート又はブチレートの濃度は、対照HAMS給餌NODマウスと比較して顕著に増大した (図2a)。これらの結果は、結腸細菌がアセテート及びブチレートの各々を生成することを標的化する高アセテート及びブチレート産出食物の有効な力、及びそれらがどのように高濃度で末梢循環に到達するかを示す。アセテートは、嫌気性発酵の最終生成物と見なされるが、フィーカリバクテリウムブラウスニツツイ (Faecalibacterium prausnitzii) 等のブチレート生成細菌は、アセテートの基本的ユーザーであり得る。これは、HAMS A給餌マウスにおける僅かにより高いブチレート濃度の原因であり得る。同様に、HAMS A及びHAMS B給餌マウスの両方におけるより高い腸プロピオネート濃度は、アセテート又はブチレートの高い送達プロピオネートの細菌生成をフィードバックしたことを示唆する (図2a)。いずれかの食物上のマウスは、HAMS給餌又は非精製 (NP) 食物給餌マウスと同様の体重を有した (図9d)。食物は、門脈又は末梢血におけるプロピオネート濃度を有意に変化させなかった。

10

【0178】

NODマウスにおいて、膵島炎から臨床的糖尿病への悪化に関連した免疫 - 炎症性事象が5~15週齢で生じた (Marino, et al., 2008、Ayyavoo et al., 2013)。インスリン等の抗原に対する自己抗体は、5週目という早期に出現し得、免疫寛容の破綻は、顕性糖尿病の徴候よりかなり前に生じることが示された。

20

【0179】

比較的遅く投与された特殊化高SCFA産出食物がT1Dの発生に影響を与え得るか否かを決定するために、雌NODマウスに10週齢で開始してHAMS、HAMS A又はHAMS Bを5週間給餌し、次いでマウスを対照NP食物に戻し、糖尿病発生率に関して監視した。30週齢までに、NP食物を連続的に給餌した雌NODマウスは、予想された高頻度で糖尿病を発生した (図2b)。HAMS食物は、NP給餌雌NODマウスと比較して糖尿病を有意に遅延させなかった。対照的に、71%のHAMS A給餌及び62%のHAMS B給餌雌NODマウスは、T1Dから保護された (図2b)。代表的な組織診断及び膵島炎点数化により、15週齢のHAMS給餌NODマウスと比較して、年齢一致HAMS A及びHAMS B給餌雌NODマウスは、より多数の浸潤を有さない膵島 (グレード0) 数を有し、30週齢まで維持される差異を有する (図2c) ことが示された。

30

【0180】

NODマウスに、他の食物で行ったものと正確に同じようにHAMS A及びHAMS Bの組み合わせ (15% + 15%) を給餌した。図2dは、この組み合わせ食物を使用して、100%のNODマウスが28週間を通して糖尿病から保護されたことを示す。

【0181】

HAMS A給餌は、自己免疫性T細胞頻度を低下させる

T1Dの病態形成は、自己反応性T細胞による膵島 - 細胞の死滅に関与する。際だったことに、両方の食物、特にアセテート産出HAMS Aは、膵島特異的抗原グルコース - 6 - ホスファターゼ触媒サブユニット関連タンパク質 (IGRP) を認識する脾臓糖尿病誘発性CD8 + T細胞、及び糖尿病誘発性T細胞受容体BDC2.5を保有するCD4 + 細胞の頻度を顕著に低下させた (図3a、b)。IGRP反応性4量体 + CD8 + T細胞の頻度は、対照HAMS給餌NODマウスの約1%からHAMS A給餌マウスの0.2%に低下し (図3a)、BDC2.5反応性4量体 + CD4 + T細胞は、2倍低下した (図2b)。

40

【0182】

NOD 8.3マウスは、10週齢までに発生率約100%で糖尿病を急速に発生した。興味深いことに、HAMS A食物を給餌されたNOD 8.3マウスは、糖尿病の発生に

50

において有意な遅延を示した（図 3 c）。I G P R 反応性 T 細胞の百分率は、H A M S A で顕著に低下したが、H A M S B 給餌 N O D 8 . 3 マウスで低下しなかった（図 3 d）。

【 0 1 8 3 】

B 細胞に対するアセテート効果は、N O D マウスにおいて T 1 D に対して保護する S C F A は、自己反応性 T 細胞増殖を支持する A P C 等の他の細胞タイプに影響を与えることにより、自己免疫性応答を損なう可能性がある。これを試験するために N O D . 8 . 3 マウスに異なる食物を給餌した。N O D . 8 . 3 マウスのコロニーは、I G R P 6 1 を認識する C D 8 + T 細胞クローン N Y 8 . 3 由来の T C R 導入遺伝子を発現するため、1 0 週齢までに発生率約 1 0 0 % で糖尿病を急速に発生する。H A M S A (H A M S B ではない) 食物を給餌された N O D . 8 . 3 マウスは、有意に遅延された糖尿病の発生を示した（図 3 c）。I G R P 反応性 T 細胞の数は、H A M S A で顕著に低下したが、H A M S B 給餌 N O D 8 . 3 マウスで低下しなかった（図 3 d）。H A M S A 給餌 N O D 8 . 3 マウスにおける T r e g 細胞の頻度は、H A M S B 及び H A M S 給餌 N O D 8 . 3 マウスで観察されたものと同様であり（データは示さず）、他の機構が示唆される。抗原提示 B 細胞は、N O D マウスにおける C D 8 + 増殖に重要な役割を有する。B 細胞を欠いた N O D . μ M T (- / -) 又は N O D / S C I D マウスへの N O D 8 . 3 T 細胞の移植は、糖尿病を効率的に移植することに失敗したが、移植は、以前の B 細胞の生着により回復される（Marino et al., 2012、Ziegler et al., 2013）。以前の研究では、B 細胞は、脾臓抗原を C D 4 + 及び C D 8 + T 細胞に直接提示し、T r e g 細胞機能を抑制することにより、N O D マウスにおける疾病を促進することが見出された（Bajka et al., 2010、Laggen et al., 2002、Yamaguchi et al., 2010）。H A M S A 給餌 N O D マウスは、脾臓及びパイエル板における I g M + B 2 2 0 + B 細胞の頻度及び数の低下を示した（図 4 a）。際だったことに、H A M S A 給餌（H A M S B 給餌ではない）N O D マウスの脾臓及び P L N からの I g M + B 2 2 0 + B 細胞は、フローサイトメトリーによって M H C I 及び C D 8 6、A P C に関する同時刺激分子の発現の顕著な低下を示した（図 4 b、1 0 a）。C D 4 0、M H C I I 又は C D 8 0 発現における変化は観察されなかった（図 1 0 b）。これらの知見を実証するために、異なる食物を給餌したマウスからの B 細胞を、遺伝子マイクロアレイを使用して調べた。

【 0 1 8 4 】

タンパク質レベルにおける総 B 細胞の変化を C D 8 0 / B 7 . 1、C D 8 6 / B 7 . 2、B 2 M、P R D M 1 (B l i m p 1) 及び M Y D 8 8 に関する遺伝子発現のレベルで検証した（図 1 0 c）。2 - ミクログロブリン及び M y D 8 8 は、M H C I 発現並びに B 細胞増殖及び分化を調節するための B l i m p 1 に必須である。興味深いことに、H A M S A 及び H A M S B の両方は、I L 1 2 産生成熟周辺帯（M Z B）B 細胞において C D 8 6 発現を低減し（図 4 c）、サブセットは、免疫寛容の変造に関与していた。上記の B 細胞における遺伝子転写産物に関する発現の変化は、アセテート又はブチレート食物が全体的な遺伝子転写に大きい効果を有し得ることを示唆した。N P、H A M S、H A M S A 又は H A M S B 食物を 5 週間給餌した 1 5 週齢のマウスから単離した 9 5 % 純粋な選別脾臓 B 細胞に関して R N A 配列決定を行った。多次元スケーリング分析では、H A M S A 給餌マウスからの I g M + B 2 2 0 + B 細胞は、対照サンプル（H A M S 又は N P）から更に離れ（図 4 d）、発現の増大を支持する可変性の増大を示している。実際に、N P 食物と比較して、2 0 8 遺伝子が H A M S A 及び H A M S B 間で差次的に発現した。1 4 遺伝子は、抗原提示、B C R シグナル伝達、細胞代謝及び細胞傷害性 T 細胞の活性化等の重要な B 細胞機能に関与している（図 4 e 及び表 1 a）。食物 S C F A の増大は、H s p a 1 a 及び H s p a 1 b 等の熱ショックタンパク質遺伝子を下方調節し、増大した尿レベルは、T 1 D を有する子供の進行性腎不全に関連付けられている（Yilmaz et al., 2016）。同様に、H A M S A 及び H A M S B の両方は、I l 1 0 r a の発現を下方調節した。感染症モデルでは、I L 1 0 受容体の遮断により、血漿 B 細胞が有意に減少し、感染症を誘発する。S C F A は、H D A C 活性を阻害し、ヒストンアセチル化を維持する

。H D A C 3 の発現の低下に関連付けられた遺伝子である B 細胞上の G n b 3 の発現の増大が見出された。H D A C 1 及び 2 を欠損したマウスは、破壊された B 細胞の発生、生存及び活性化を示す。H A M S A を給餌されたマウスからの成熟 B 細胞サブセット (M Z B 及び F O B) において、H D A C 3 転写産物の顕著に低下した発現が存在し (図 4 f) 、これは、おそらく本発明者らが観察した遺伝子発現における有意な変化と関連している。これは、M H C I 及び C D 8 6 の発現の低下と相関し、B 細胞が自己抗原を C D 8 + T 細胞に交差提示する能力の低下を説明している。

【 0 1 8 5 】

H A M S A 又は H A M S B が、インビボで N O D マウスにおいて自己反応性 T 細胞増殖を支持する A P C 能力に影響を与えるか否かを試験するために、H A M S 、H A M S A 又は H A M S B を給餌されていた 8 ~ 1 0 週齢の N O D マウスに精製 C F S E 標識 N O D 8 . 3 C D 8 + T 細胞を移植した。従って、N O D 8 . 3 C D 8 + T 細胞の応答は、主として、応答する N O D 8 . 3 T 細胞に対して直接ではなく、A P C s 等の細胞タイプに対する食物効果に関連するはずである。移植から 3 ~ 4 日後、移植脾臓特異的 N O D 8 . 3 C D 8 + T 細胞の増殖を分析し、それらが N P 食物を給餌した N O D マウスの P L N 内で広範に分裂し、H A M S 食物を給餌した N O D マウスの P L N 内でより低い (ただし、有意ではない) 程度で分裂したことが見出された (図 4 g) 。際だったことに、N O D マウスが H A M S A を給餌された場合、自己反応性 N O D 8 . 3 C D 8 + T 細胞は、P L N 内で増殖しなかった。P L N 内での N O D . 8 . 3 T 細胞の増殖は、H A M S B 給餌によって低下されなかった。N O D . 8 . 3 T 細胞は、N P を含む任意の食物グループで M L N 内において増殖しなかったため、T 細胞増殖は、P L N (脾臓自己抗原が排出し、A P C - T 細胞活性化が生じる) に特異的であった (図 1 0 d) 。従って、食物アセテートは、B 細胞の数、それらの表現型に影響を与え、それらがインビボで自己反応性 T 細胞を拡大させる能力に影響を与えると思われる。

【 0 1 8 6 】

ブチレートは、N O D マウスにおけるリンパ組織内の T r e g 数及び機能を調節する S C F A は、T r e g 細胞を調節し、その効果が腸内で証明されたが、T 1 D の発生に重要な他の主要な細胞に対するそれらの効果は不明であった。H A M S A 及び H A M S B 食物を給餌された 1 5 週齢の雌 N O D マウスの T 細胞コンパートメントを試験し、C 5 7 B L / 6 マウスに関して報告されたものと同様に、両方の食物は、腸ホーミング活性化マーカー C D 1 0 3 を発現する C D 4 + F o x P 3 + T r e g 細胞の集団を結腸内で拡大することが見出された (図 1 1 a) 。N O D マウスへの H A M S B の給餌は、肝門脈内の非常に高いレベルのブチレートをもたらした。H A M S 給餌 N O D マウスと比較して、アセテート及びブチレート産出食物の両方は、脾臓 T r e g 細胞の頻度及び数を 2 倍増大させた (図 5 a) 。P L N 及び M L N では、T r e g 細胞の絶対数において頻度の中程度の増大が観察された (図 1 1 b) 。

【 0 1 8 7 】

異なる食物を 1 0 週間給餌された 1 5 週齢の雌 N O D マウスからの > 9 5 % 精製脾臓 T 細胞を、T 及び B 細胞を欠いた雌 N O D / S C I D マウスに移植した。N O D / S C I D レシピエントの使用により、T 細胞に対する食物の任意の効果が調整ドナー T 細胞に完全に起因し得、またその効果が腸ホメオスタシス又は他のシステムに対するアセテート / ブチレートの効果から分離して試験できることが確実にされた。N P 給餌 N O D マウスからの T 細胞は、全レシピエントで急速に糖尿病に移植し、移植後に発症が加速された (図 5 b) 。顕著に対照的に、H A M S B 給餌 N O D マウスからの T 細胞を受容した N O D / S C I D レシピエントの 9 4 % は、移植後に糖尿病から 2 0 週間以上完全に保護された (図 5 b) 。H A M S A 給餌 N O D マウスからの T 細胞は、T エフェクター細胞の頻度に対する H A M S A の効果にも関わらず、完全に保護することができなかった (移植から 2 0 週後に 3 0 % の糖尿病なしマウス) (図 3 a ~ d) 。

【 0 1 8 8 】

H A M S B 調整 T r e g 細胞が、N O D / S C I D マウスで観察された保護を仲介したか

10

20

30

40

50

否かを決定するために、NOD・Foxp3-GFPマウスからの総Foxp3-T細胞を養子移植した。養子移植前にレシピエントNOD/SCIDマウスに異なる食物を2週間給餌し、これらのマウスは、同じ食物に留まり、疾病発生率に関して監視した。移植から3週間後、CD4+T細胞をFoxp3、IL-10及びHELIOSの発現に関して分析した。注目すべきことに、HAMSB給餌NOD/SCIDマウスのみが、Foxp3、IL-10及びHELIOSを発現しているCD4+T細胞の有意な頻度及び数を示した(図5c、d)。

【0189】

末梢Treg細胞(CD4+CD25-)前駆体のFOXP3座位におけるヒストンのアセチル化は、以前に向上されたTreg機能に関連付けられている(Thorburn et al., 2015)。HAMSA及びHAMSB給餌NODマウスで、特に肝門脈内で観察された高濃度のアセテート及びブチレートを想定して(図2a)、高アセテート又はブチレート産出食物を、特に末梢Treg細胞におけるFOXP3座位のヒストン修飾に対するそれらの影響に関してインビボで試験した。HAMSB食物は、脾臓T細胞内のFoxp3プロモーターにおけるH3K9アセチル化及びH4ペンタアセチル化を顕著に増大させたが、HAMSAを増大させなかった(図5e)。末梢Treg細胞前駆体におけるヒストンアセチル化がTreg細胞内のFoxp3発現の増大に関連している否かを調べるために、個別に選別されたCD4+CD45RB低CD25+T細胞(Treg gate)の単一細胞トランスクリプトーム分析を行った。HAMSB給餌NODマウスと比較して、HAMSBのみがFoxp3転写産物発現の増大をもたらした(図5f)。加えて、HAMSB給餌NODマウスのTreg細胞は、Gata3、Gitr及びSell(CD62L)を含む遺伝子転写産物の発現の増大を有し(図5g)、これは、Treg細胞活性化、機能及び遊走に重要である。

【0190】

代謝物感知GPCRs GPR43及びGPR109aは、NOD糖尿病においてマイナーな役割を有する

アセテート及びブチレートに関する主要な代謝物感知GPCRは、GPR43であり、GPR43は、活性化マクロファージ、B細胞及びTreg細胞を含む多様な免疫細胞タイプにより発現されている。アセテート及びブチレートの免疫調節効果がこのGPCRにより仲介されていたか否かを決定するために、C57・Gpr43-/-マウスをNODバックグラウンドに対して13世代、戻し交配した(NOD・Gpr43-/-)(図12a)。NOD・Gpr43+/+対NOD・Gpr43-/-マウス間で疾病発生率における傾向が存在した(しかし、有意差はない)。20週目までに、70%のNOD・Gpr43-/-マウスは、同じ食物のNOD・Gpr43+/+リターメイトと同様に糖尿病を発生していた(図6a)。しかしながら、NOD・Gpr43-/-マウスは、より高い膵島炎症(膵島炎類別1~4)を示し、浸潤のない膵島がより少なかった(<20%)(図6b)。これは、細胞膵島破壊からの保護におけるGPR43の僅かな役割を示唆する。しかしながら、HAMSA食物は、NOD・Gpr43-/-マウスで糖尿病悪化を部分的にのみ遅延させ、これらのマウスは、NP給餌NOD・Gpr43-/-マウスと比較して少ない浸潤膵島を有した(図6a、b)。細胞表現型分析は、NOD・Gpr43-/-マウスが、NOD・Gpr43+/+リターメイトと比較して、脾臓及びPLN内で有意に少ない数のTreg細胞と、より多数のIgM+B220+B細胞とを含むことを示した(図6c、d)。HAMSAは、NOD・Gpr43+/+マウスでTreg細胞を増大させ、自己反応性T細胞を低下させたが、NOD・Gpr43-/-リターメイトでTreg細胞を増大させず、自己反応性T細胞を低下させなかった(図6c~e)。アセチル化澱粉食物は、依然として、15週齢の雌NOD・Gpr43-/-マウスの糞便中で測定して、アセテートを多量に送達することが可能であった(図12b~d)。CRISPR生成NOD・Gpr109a-/-マウスラインにおける疾病発生率は、80%のNOD・Gpr109a-/-マウスがWT NODマウスと同様の速度で糖尿病に進行することを示した(図13a)。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 1 】

アセテート及びブチレートの両方は、NODマウスにおける欠陥のある腸上皮完全性を修正する

ヒト及びマウスにおける自己免疫糖尿病は、「腸漏洩」及び密着結合タンパク質閉塞の低い発現に関連している。雌NODマウスでは、C57BL/6 (Balb/cマウスではない)におけるオクルディン及び他の密着結合マーカーの発現と比較したオクルディン及び他の密着結合マーカーの発現の低下に基づいて、腸壁は、その効果的なバリアを形成する能力が損なわれていることの証拠が存在する(図7a)。対照的に、糖尿病のより低い発生率を有する雄NODマウスは、C57BL/6及びBalb/cマウスと比較して高い密着結合マーカーの発現を有した(図7a)。高アセテート及びブチレート産出食物の給餌は、HAMS給餌NOD対照と比較してNODマウスの結腸内でオクルディンの発現を有意に増大させた(図7b)。上皮腸完全性の保存及び組織炎症を弱める際のSCFAの役割と一致して、HAMS A及び特にHAMS B食物は、C57BL/6マウスにおけるものと同様に血清リポ多糖(LPS)濃度の有意な低下をもたらした(図7c)。

10

【 0 1 9 2 】

循環プロ炎症性サイトカインの増大は、T1Dへの悪化に関連している。HAMS A及びHAMS B食物の両方は、プロから抗炎症薬へのサイトカインプロファイルの切り替えを促進した(図7d、e)。NODマウスにおける糖尿病の発生に必要な2つのサイトカイン、TNF 及びIL-21の血清濃度は、保護NOD.MyD88-/-マウスで観察されたものと同様に、遅延HAMS給餌NODマウス又は保護HAMS A及びHAMS B給餌NODマウスのいずれでも顕著に低下した(図7d)。腸粘膜バリア完全性を維持する腸ホメオスタシス関連サイトカイン、IL-22は、対照HAMS給餌NODマウス及び糖尿病誘発性NP給餌NODマウスと比較して、HAMS A給餌において(図7e)、またより低い程度でHAMS B給餌NODマウスにおいて有意に上昇した。

20

【 0 1 9 3 】

アセテート富化食物は、腸の微生物生態に有益な変化をもたらす

本研究では、HAMS A及びHAMS B食物の保護効果が腸内の特定の細菌の存在量及び/又は多様性の変化に僅かでも起因し得るか否かを試験した。GF NODマウスに、糞便及び盲腸内容物のミックスを用いた経管栄養により、NP、HAMS、HAMS A又はHAMS Bで給餌した15週齢のNODマウスからの腸細菌を再コロニー形成した(図2bに示すように)。次いで、細菌叢再構成NODマウスの全てを同じNP食物上に配置し、糖尿病の発生に関して経時的に監視した。HAMS形成細菌叢で再構成されたGF NODマウスは、SPF HAMS給餌ドナーマウスと比較して疾病発生率の差異を示さなかった(図8a)。しかしながら、HAMS A食物により形成された細菌叢を受容したGF NODマウスは、糖尿病に対して顕著な保護を示し、80%のGF雌NODマウスが30週間を超えて糖尿病なしであった(図8a)。HAMS B形成細菌叢で再コロニー形成されたGF NODマウスは、急速に糖尿病に進行し、HAMS B食物はその効果をブチレートの直接供給により仲介し、腸管細菌叢の変化を介さないことが示唆される。糞便細菌分析は、アセテート及びブチレート産出食物(対照HAMS食物と比較して)の両方が、食物を給餌された15週齢のドナーNODマウス及び年齢一致再コロニー形成GF NODマウスのいずれでも糞便微生物組成の有意な変化をもたらすことを示した(図8b、13b)。HAMS A及びHAMS B給餌ドナーマウスの両方がバクテロイデス(Bacteroides)の存在量の増大を示したにも関わらず(図8c)、GF NODマウスの再コロニー形成後に差異は見出されなかった(図13c)。バクテロイデス(Bacteroides)は、アセテート/ブチレート生成嫌気性細菌であり、ヒト及びマウスではより高いTreg細胞数の誘導に関連している。HAMS A単独は、ドナー及び再コロニー形成GF NODマウス内でラクトバシラス(Lactobacillus)及びパラバクテロイデス(Parabacteroides)の存在量を有意に低下させた(図8c、13c)。HAMS A形成細菌叢を受容したGF NODマウスは、クロストリジウム(Clostridium)属の存在量の増大を示した(図13c)。HAMS

30

40

50

A形成細菌叢で再構成したGF NODマウスは、HAMSA形成細菌叢で再構成されたGF NODマウスと比較して、肝門脈血及び盲腸内容物中で有意により高い濃度のアセテートを有した(図8d)。HAMSA形成細菌叢で再コロニー形成されたGF NODマウスは、PLN中でCD4+Foxp3+Treg細胞の増大を示し(図8e)、Treg生物学におけるアセテートの役割を支持した。このように、HAMSA食物媒介による保護は、細菌群集の全体にわたる変化及びアセテート生成細菌の増殖を生じた。

【0194】

SPF HAMSA給餌NODマウスは、HAMSA給餌NODマウスと比較してグルタメート、グルタミン、ロイシン及びイソロイシンの有意に低い糞便濃度を示した(図8f)。グルタメートは、主にグルタメートデカルボキシラーゼ(GAD)、既知の膵島自己抗原の作用を介して、代謝過程及びストレス応答に重要な役割を有する主要な細菌代謝物である。HAMSA食物を給餌した15週齢のNODマウス及びHAMSA形成細菌叢で再コロニー形成した保護GF NODマウスでグルタメートの低下が見出された(図8f)。ロイシンファミリーのアイソフォームは、HAMSA給餌NODマウスにおいて増大した(図13f)。

【0195】

考察

特殊化したアセチル化又はブチリル化澱粉食物の組み合わせは、NODマウスにおいて自己免疫性糖尿病からの顕著な保護を示した。アセテート及びブチレートの効果は、部分的にのみ重複し、異なる機構が示された。アセテートは、自己反応性T細胞の頻度を低減するのに特に有効であった一方、ブチレートは、Treg細胞の機能の増大に優れていた。本明細書に報告した代謝物手法は、疾病-腸内細菌叢組成及び腸完全性、IL-21及びTNF等の炎症性サイトカイン、欠陥のあるTreg生物学、並びに自己反応性エフェクターT細胞の存在量に寄与するNODマウスにおける欠陥の実質的に全てを修正した。これらの知見は、免疫応答に対する食物、腸細菌及びそれらの代謝物の大きい影響を強調するものである。実際に、重要な免疫サブセット(Tregs、B細胞及びエフェクターT)の頻度及びそれらの遺伝子発現プロファイルを含む多数の免疫パラメーターは、単純に食物/細菌代謝物によって操作されることが示された。

【0196】

HAMSA送達アセテートは、自己免疫性TEフェクター細胞頻度に顕著な効果を有した。これは、APCs、特にB細胞に対するアセテート(ブチレートも同様であるが、その程度は低い)の効果により説明することができる。B細胞は、特定の膵島抗原反応性T細胞とのそれらの相互作用を介して膵島炎から臨床的糖尿病への移行に重要な役割を有する。十分な同時刺激分子を欠くB細胞は、免疫寛容原性であり得る。本発明者らの研究の重要な特徴は、大量のアセテート、天然産物の送達が全動物におけるB細胞分子プロファイルの変化を達成し得ることであった。ブチレートではなくアセテートが末梢B細胞表現型の変化に有効である理由は、ブチレートが典型的には肝臓内で代謝されるため、末梢循環に送達され得るアセテートのレベルが遥かに高いことに関連し得る。しかしながら、アセテートはまた、異なる経路、例えばHdac3転写を下方調節するその能力を介して作用し得る。HAMSA給餌NODマウスにおけるB細胞上の同時刺激分子及びMHCIの下方調節は、IGRP+CD8+の低頻度と相関し(図3a、b)、インビボで自己反応性NOD8.3細胞の拡大を大きく減少させた(図3d)。T1D患者の自己反応性T細胞数は、単純な高アセテート産出食物の送達により劇的に低下し得る。T1D患者の4量体監視により測定される自己反応性T細胞の頻度の低下は、臨床成績を何年も待つのではなく、代謝物の食物が所望の効果を有しているという遥かに迅速な指示を提供することができる。

【0197】

HAMSB調整T細胞(Treg細胞を含む)は、NOD/SCIDレシピエントマウスへの移植後にほぼ完全にT1Dに対して保護した。このように、ブチレートは、アセテートに関して上述されたものと異なり、Treg関連経路を介してT1Dに対して保護する

10

20

30

40

50

。これは、主要な T r e g 細胞遺伝子の転写の増大及び H D A C s の酵素活性を阻害するブチレート（アセテートではない）の能力に関連する可能性がある。以前の研究では、N O D マウスにおける遺伝子欠陥が、P L N 内に局在する特定の T r e g 細胞亜集団に独特に影響し、それらの抑制活性を不完全なものとする事が示された（B u h l m a n n e t a l . , 1 9 9 5）。従って、ブチレートは、P L N（又は末梢）T r e g 細胞の損なわれた抑制機能を修正した可能性がある。H A M S B は、T r e g 細胞機能に重要な T G F 産生を向上させた。加えて、アセテート及びブチレートは、血液及び組織中の炎症性サイトカイン及び L P S の抑制又は T r e g 対 T h 1 7 の分化の制御を介して T r e g 細胞に間接的に影響を与え得る。特に I L - 2 1 は、T 1 D の発生中に重大である。I L - 2 1 は、N O D マウス 8 4 - 8 6 における B 細胞及び自己反応性の細胞傷害性 C D 8 + 細胞の増殖を誘導し、T r e g 細胞分化及び活性を負に調節する。

10

【 0 1 9 8 】

T 1 D 病態形成に対する食物及び代謝物の影響は、腸に対する脾臓又は P L N の近接さに関連し得る。脾臓及び P L N は、腸と直接的なリンパ接続を有し、肝門脈及びおそらく腹腔腔内の高濃度のアセテート又はブチレートの影響を受け得るため、T 1 D は、食物代謝物手法に特に適している可能性がある。免疫細胞は、高アセテート又はブチレート環境（即ち結腸）と P L N、脾臓及び他の場所との間を再循環することも考えられる。

【 0 1 9 9 】

腸内細菌叢を高 S C F A 生産物の 1 つに形成することは、ヒト疾病を予防又は処置する戦略であり得る。S C F A は、共生細菌、特にバクテロイデス（B a c t e r o i d e s）属のメンバーの主要代謝物の 1 つである。本明細書で使用する特殊化した食物は、バクテロイデス（B a c t e r o i d e s）種の数を増大し、T r e g 細胞の数を増大させた。G F 再コロニー形成 N O D マウスにおいてクロストリジウム（C l o s t r i d i u m）属の割合の高い増大が観察され、これらが結腸及び末梢の T r e g 細胞数の拡大に重要であり得ることを示している（図 8 e）。一研究において、ビフィドバクテリウム アドレセンティス（B i f i d o b a c t e r i u m a d o l e s c e n t i s）又はクロストリジウム（C l o s t r i d i u m）クラスター X I V a 又は I V 種（これは、アセテートからブチレートを生成する）等のいずれかのアセテートを生成する細菌種の存在量は、- 細胞自己抗体特異性の数と逆相関した（d e G o f f a u e t a l . , 2 0 1 3）。本発明者らは、H A M S A 食物により選択された腸内細菌叢が他の有益な代謝物経路を促進する可能性を排除するものではない。例えば、アリール炭化水素受容体（A h R）に結合するトリプトファン代謝物を生成する微生物は、腸ホメオスタシス及び T r e g 生物学を向上させる（T h o r b u r n e t a l . , 2 0 1 4、Z e l a n t e e t a l . , 2 0 1 3、L i e t a l . , 2 0 1 1）。腸内菌共生バランス失調を修正する殆どの努力は、プロバイオティクスに依存してきたが、おそらく最適な手段は、本明細書に説明した食物の使用を介して有害な細菌叢組成を修正することである。腸管細菌叢は、食物の変化に急速に応答し（D a v i d e t a l . , 2 0 1 4、K a u e t a l . , 2 0 1 1）、特定の食物の長期使用は、適応変異に起因して、ストレスを受けた及び競争力のない細菌の枯渇と、より高速で成長する新しい株の出現とを可能にする（Z h u a n d Y e , 2 0 0 3、Z h u a n d Y a n g 2 0 0 3）。

20

30

40

【 0 2 0 0 】

分子レベルでは、糖尿病からの保護は、G P R 4 3 等の代謝物感知 G P C R s の関与及び H D A C s の阻害を含む可能性がある。これにより、G P C R s を介した即時シグナル伝達事象及び遺伝子転写の変化が可能となる。G P R 4 3 は、高アセテート産出 H A M S A 食物の保護効果の少なくとも一部を促進した。P L N を含む数個の組織内の T r e g 細胞の数は、N O D . G p r 4 3 - / - マウスにおいて顕著に低下した。G P R 4 3 はまた、アセテート食物が自己反応性効果又は T 細胞頻度を制限する能力に影響を与えた。G P R 4 3 は、後成的機構と協同的に作用することが考えられる。例えば、G P R 4 3 シグナル伝達は、細胞へのアセテートの進入を促進し得る。G P R 4 3 に関する他の主な役割は、腸上皮バリア機能の向上である。G P R 4 3 は、上皮細胞内のインフラマソーム経路の活

50

性化及びプロ腸ホメオスタシスサイトカインIL-18の産生を介してこれを達成する。従って、GPR43は、食物仲介によるT1Dからの保護において数個のレベルで作動する可能性がある。代謝物が免疫応答に影響を与える他の主要な経路は、HDAC阻害である。アセテート送達、インビボでB細胞におけるHdac3転写産物発現を顕著に減少させた。これは、おそらく、選択細胞内のHDAC3欠乏のものと類似した表現型又は以前の研究が抗炎症薬であると示した化学阻害剤若しくはブチレートによるHDAC酵素阻害をもたらすであろう。DCでは、広範なHDAC阻害は、アセテート食物を用いたB細胞において本発明者らが本明細書で観察したものと類似したCD40、CD80及びCD86/96の顕著な下方調節をもたらす。本発明者らの研究はまた、HAMSB/ブチレートが脾臓Treg細胞内のFoxp3座位のプロモーター領域内のヒストンH3アセチル化を向上させることを示した。

10

【0201】

実施例2：2種以上の脂肪酸を含むアシル化澱粉の調製（大規模）

方法：

1) DMSO (24 L) を浸漬ヒーターにより、金属容器内で一定の撹拌下で80℃以上に加熱した。

2) ヒーターを除去し、トウモロコシ澱粉 (440 g) を、家事用ふるいを通して撹拌しているDMSOにゆっくり添加して、均一な分散を確実にした（凝集を避けるために）。混合物を一定に1時間撹拌し、その時点までに全澱粉が溶解して透明な粘性の溶液となった。

20

3) 1-MID (80 mL) と、酢酸 - 85 mL、プロピオン - 132 mL 及び酪酸 170 mL から選択される1、2又は3種の無水物を加えた。

4) 4時間のインキュベーション後、過剰の無水物を3 Lの水の添加により分解し、反応混合物を2容積のエタノールに注いだ。

5) 沈殿したアシル化澱粉生成物をエタノール (80% v/v) で数回洗浄して、DMSO及び他の反応関与体を除去し、温風室内において40℃で乾燥した。

6) 対照澱粉は、1-MID又は無水物を澱粉に添加しない偽手順を経た。

7) 澱粉を微粉末に粉碎し、分析した。

【0202】

結果

30

上記の各アシル化澱粉生成物のDSは、類似していた。ステップ3で1種のみの無水物を使用した場合、アシル化澱粉は、1種のみの短鎖脂肪酸部分を含むことが理解されるであろう。2種の無水物（例えば、酢酸及び酪酸）を使用する場合、アシル化澱粉は、酢酸及び酪酸エステル部分の両方の混合物を含むであろう。3種の無水物を使用する場合、アシル化澱粉は、3種の全脂肪酸部分の混合物を含むであろう。

【0203】

実施例3：SCFA富化食物の製剤

上記の実施例2に詳細した大規模手順により、大量（約500 g）のアシル化澱粉を調製した。

【0204】

40

アセチル化及びブチリル化澱粉の両方を含む組み合わせ食物を調製し、以下の成分を含んでいた。

- ・カゼイン (200 g / kg)
- ・メチオニン (1.5 g / kg)
- ・ショ糖 (50 g / kg)
- ・澱粉 (251.5 g / kg)
- ・トウモロコシ油 (100 g / kg)
- ・ミネラルミックス (35 g / kg)
- ・ビタミンミックス (10 g / kg)
- ・酒石酸コリン (2 g / kg)

50

- ・セルロース (5 0 g / k g)
- ・アセチル化澱粉 (1 5 0 g / k g)
- ・ブチリル化澱粉 (1 5 0 g / k g)

【 0 2 0 5 】

上記の食物におけるアシル化澱粉の百分率は、 3 0 % (1 5 % : 1 5 % アセチル化 : ブチリル化澱粉) である。

【 0 2 0 6 】

以下を含有する代替的な組み合わせ食物を調製し得る。

【 0 2 0 7 】

【表 4 】

10

構成成分(g/kgとして)	
成分	15%/15%
トウモロコシ澱粉 -3401C	229.5
アセチル化澱粉	150
ブチリル化澱粉	150
カゼイン	200
ショ糖	100
ヒマワリ油	70
αセルロース	50
ミネラルミックス AIN 93G	35
ビタミンミックス AIN 93VX	10
L-シスチン	3
酒石酸水素コリン	2.5
合計	1000

20

30

【 0 2 0 8 】

食物を低温押出してペレットとし、乾燥させ、使用前に低温で保管し得る。代替的に、食物は、本明細書に記載されるような食品に含有させるために粉末として調製され得る。

【 0 2 0 9 】

アセテート及びブチレート部分の両方を含むアシル化澱粉 3 0 0 g (短鎖脂肪酸の 1 種のみでアシル化された澱粉 1 5 0 g ではなく) を使用して、同様の食物を調製できることが認識されるであろう。

【 0 2 1 0 】

実施例 4 : アセチル化及びブチリル化澱粉を含む食品

本明細書に記載されるアシル化澱粉は、様々な食品中のサプリメントとして、粉末形態で使用することができる。例えば、

40

A . アセチル化及びブチリル化澱粉を含むラピッド生地 (r a p i d d o u g h) のレシピ :

- ・ 8 0 部の小麦粉
- ・ 1 0 部のアセチル化澱粉
- ・ 1 0 部のブチリル化澱粉
- ・ 2 部の脂肪
- ・ 2 部の塩
- ・ 1 部の改善料
- ・ 2 . 5 部の酵母

50

【 0 2 1 1 】

B．本明細書に記載されるアシル化澱粉を使用して補足できる他の食品：

上述したアシル化澱粉の粉末はまた、パスタソース、リゾット、グレイビー、スープ及びポリッジを含む一連の暖かい食品又は牛乳、シリアル、チョコレート／バニラカスタード、プリン及びジュースを含む冷たい食品に添加することができる。

【 0 2 1 2 】

本明細書に開示及び定義される本発明は、文章若しくは図面に言及されるか又は文章若しくは図面から明らかな代替的な２種以上の個々の特徴の組み合わせの全てに拡張されることが理解されるであろう。これらの異なる組み合わせの全ては、本発明の様々な代替的な態様を構成する。

10

【 0 2 1 3 】

参考文献

Annisson, G., Illman, R. J. & Topping, D. L. Acetylated, propionylated or butyrylated starches raise large bowel short-chain fatty acids preferentially when fed to rats. The Journal of Nutrition 133, 3523 - 3528 (2003).

Arpaia, N., et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. Nature 504, 451 - 455 (2013).

20

Ashelford et al., Appl Environ Microbiol 71: 7724-7736 (2005)

Ayyavoo, A., et al., First-born children have reduced insulin sensitivity and higher daytime blood pressure compared to later-born children. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 98, 1248 - 1253 (2013).

Bajka et al., Br J Nutr. 2006 Aug; 96(2): 276 - 82 (2006)

30

Bajka, B. H., et al. Butyrylated starch increases large bowel butyrate levels and lowers colonic smooth muscle contractility in rats. Nutrition Research 30, 427 - 434 (2010).

Bragg et al., Nature Methods 9, 425-426 (2012)

Buhlmann, J. E., et al. In the absence of a CD40 signal, B cells are tolerogenic. Immunity 2, 645 - 653 (1995).

Chun et al., Int J Syst Evol Microbiol 57: 2259-2261 (2007)

40

Clarke, J. M., et al., Effects of high-amylose maize starch and butyrylated high-amylose maize starch on azoxymethane-induced intestinal cancer in rats. Carcinogenesis 29, 2190 - 2194 (2008).

David, L. A., et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. Nature 505, 559 - 563 (2014).

de Goffau, M. C., et al. Fecal microbiota com

50

position differs between children with beta-cell autoimmunity and those without. Diabetes 62, 1238 - 1244 (2013).

Faith, J. J., et al., Identifying gut microbe-host phenotype relationships using combinatorial communities in gnotobiotic mice. Science Translational Medicine 6, 220ra211 (2014).

Feehily, C. & Karatzas, K. A. Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. J Appl Microbiol 114, 11 - 24 (2013).

10

Fukuda, S., et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. Nature 469, 543 - 547 (2011).

Illman, R. J., et al. Hypocholesterolaemic effects of dietary propionate: studies in whole animals and perfused rat liver. Annals of Nutrition & Metabolism 32, 95 - 107 (1988).

20

Katsuma et al., Journal of Pharm. Sci. 93(5): 1287 - 99 (2004).

Kau, A. L., Ahern, P. P., Griffin, N. W., Goodman, A. L. & Gordon, J. I. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. Nature 474, 327 - 336 (2011).

Lagger, G., et al. Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. Embo J 21, 2672 - 2681 (2002).

30

Li, Y., et al. Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation. Cell 147, 629 - 640 (2011).

Macia, L., et al. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. Nat Commun 6, 6734 (2015).

Marino, E., et al. Marginal-zone B-cells of nonobese diabetic mice expand with diabetes onset, invade the pancreatic lymph nodes, and present autoantigen to diabetogenic T-cells. Diabetes 57, 395 - 404 (2008).

40

Marino, E., et al. CD4(+)CD25(+) T-Cells Control Autoimmunity in the Absence of B-Cells. Diabetes 58, 1568 - 1577 (2009).

Marino, E., et al., B-Cell Cross-Presentation of Autologous Antigen Precipitates Diabetes. Diabetes 61, 2893 - 2905 (2012).

50

Maslowski, K.M., et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemottractant receptor GPR43. *Nature* 461, 1282 - 1286 (2009).

Polo, J.M., et al. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell* 151, 1617 - 1632 (2012).

Thorburn, A.N., Macia, L. & Mackay, C.R. Diet, metabolites, and "western-lifestyle" inflammatory diseases. *Immunity* 40, 833 - 842 (2014).

Thorburn, A.N., et al. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nature Communications* 6, 7320 (2015).

Topping, D.L. & Clifton, P.M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 81, 1031 - 1064 (2001).

Watts, P.J., & Illum, L., *Drug Dev. and Indus. Pharm.*, 23(9): 893 - 917 (1997).

Yamaguchi, T., et al. Histone deacetylases 1 and 2 act in concert to promote the G1-to-S progression. *Genes Dev* 24, 455 - 469 (2010).

Yilmaz, A., et al. Higher urine heat shock protein 70/creatinine ratio in type 1 diabetes mellitus. *Renal Failure* 38, 404 - 410 (2016).

Zelante, T., et al. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* 39, 372 - 385 (2013).

Zhu, C. & Ye, Q. Selection of acetate-tolerant mutants from *Escherichia coli* DH5alpha and the metabolic properties of mutant DA19. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 43, 460 - 465 (2003).

Zhu, Y. & Yang, S.T. Adaptation of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced tolerance to butyric acid in a fibrous-bed bioreactor. *Biotechnol Prog* 19, 365 - 372 (2003).

Ziegler, A.I., et al. The CD19 signalling molecule is elevated in NOD mice and controls type 1 diabetes development. *Diabetologia* 56, 2659 - 2668 (2013).

10

20

30

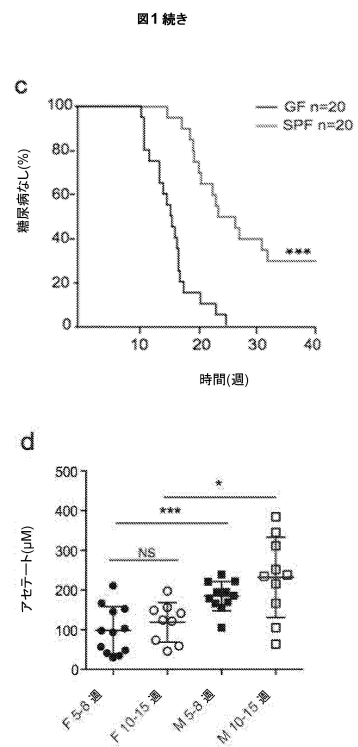
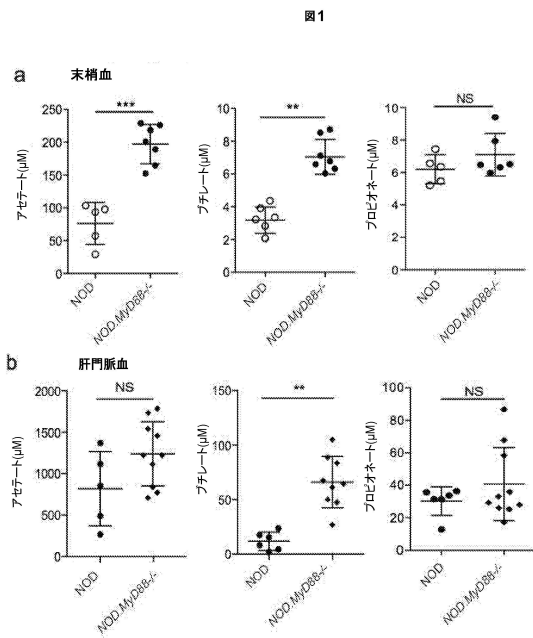
40

50

【図面】

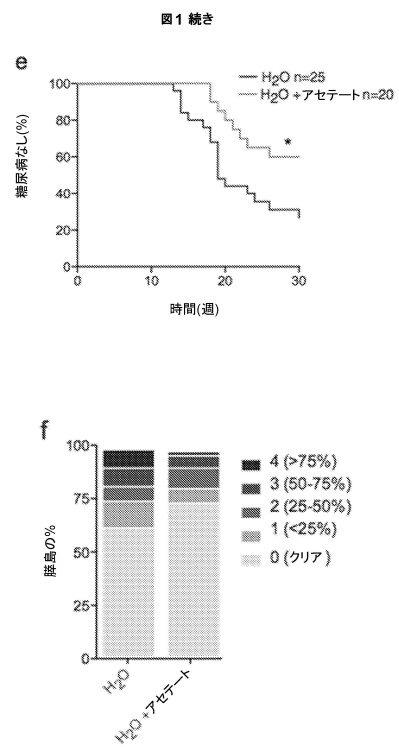
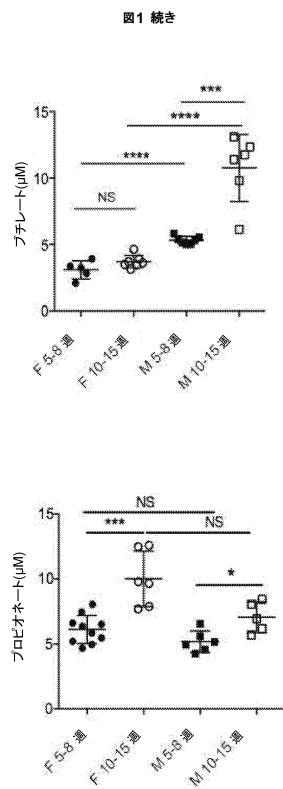
【図 1 - 1】

【図 1 - 2】



【図 1 - 3】

【図 1 - 4】



10

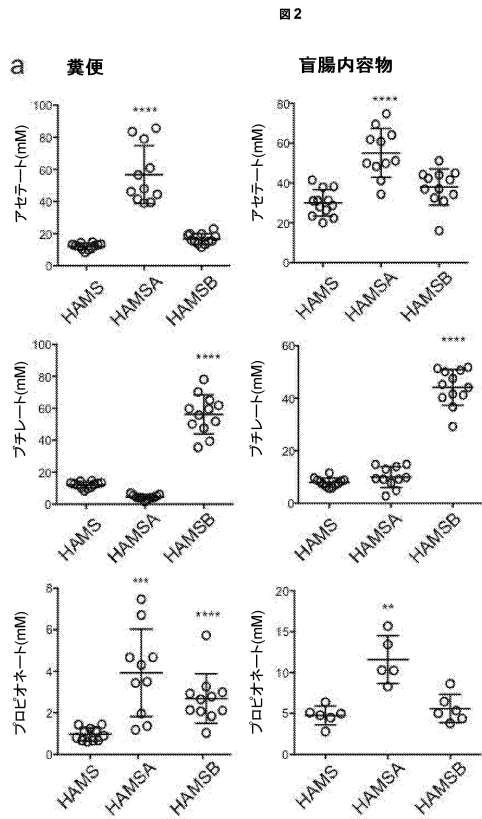
20

30

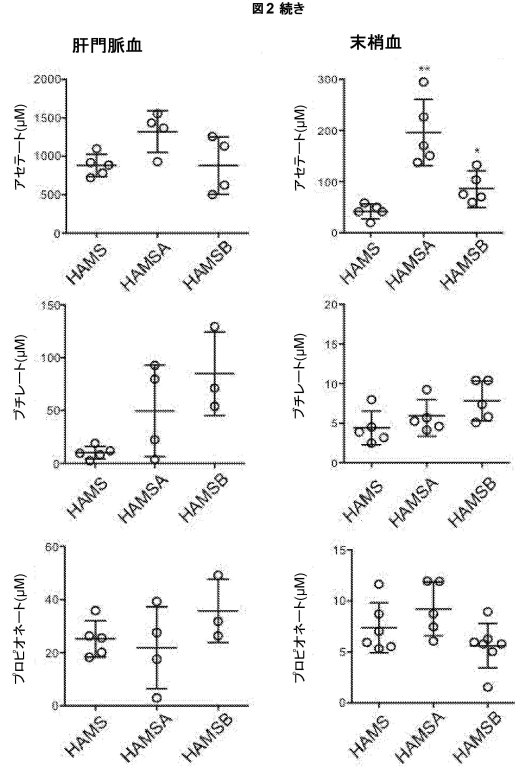
40

50

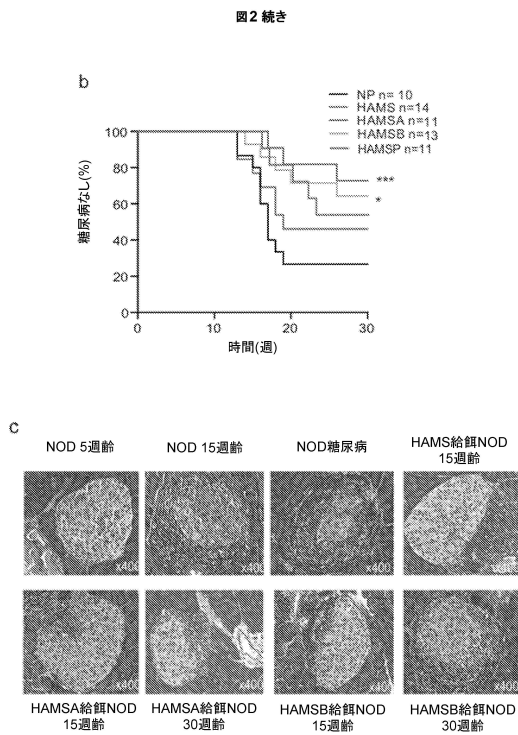
【図 2 - 1】



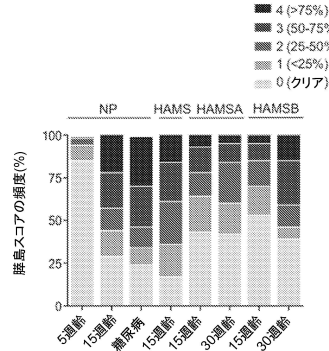
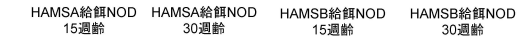
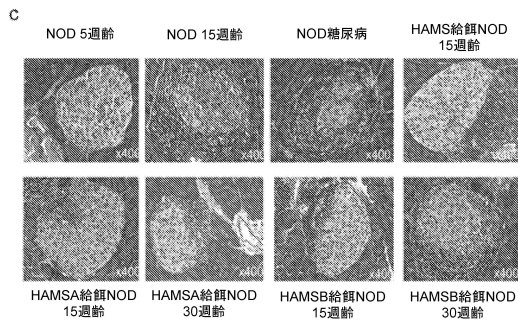
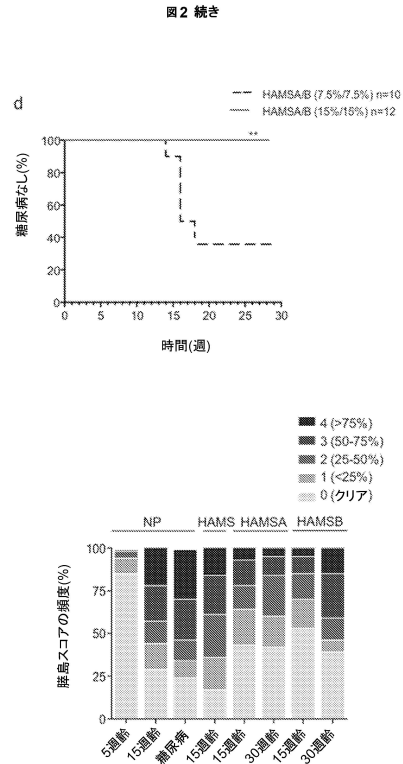
【図 2 - 2】



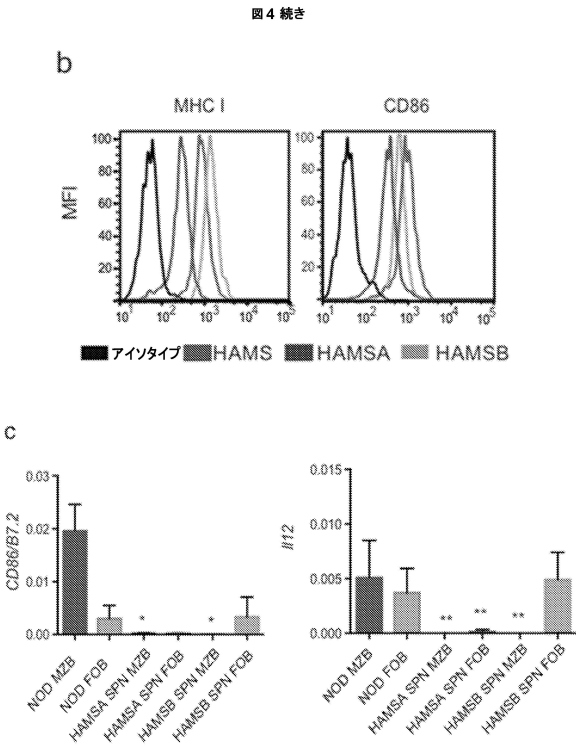
【図 2 - 3】



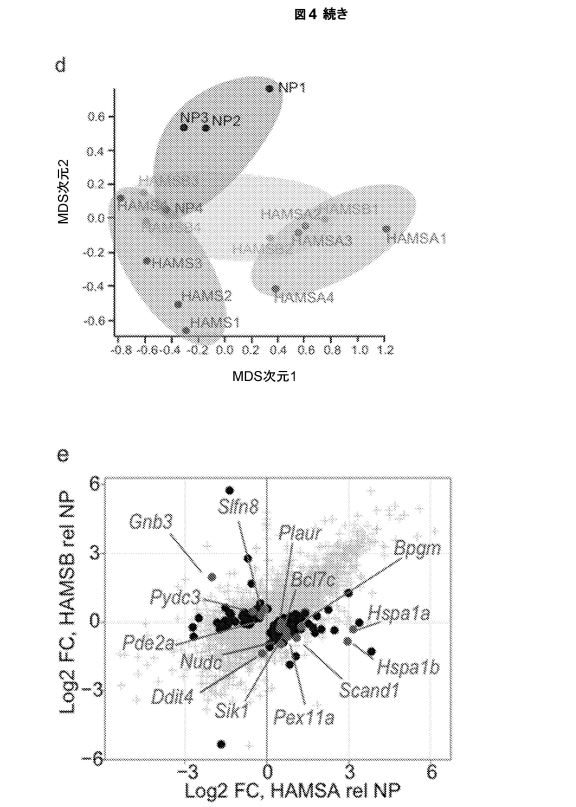
【図 2 - 4】



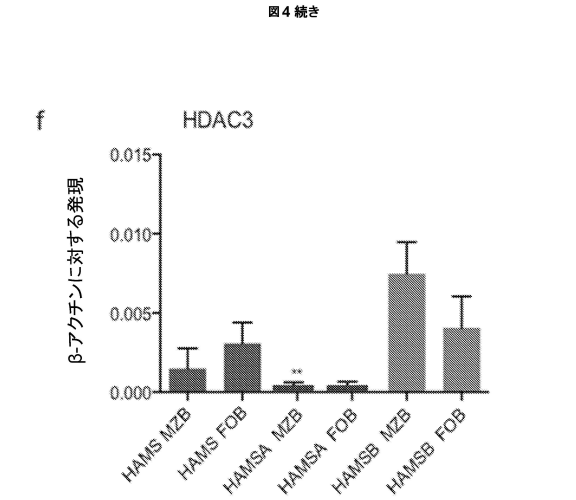
【 図 4 - 2 】



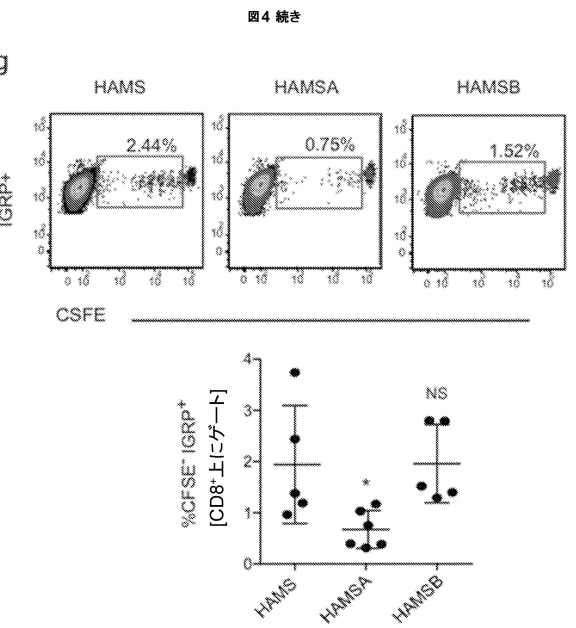
【 図 4 - 3 】



【 図 4 - 4 】



【 図 4 - 5 】



10

20

30

40

50

【図 5 - 1】

【図 5 - 2】

図 5

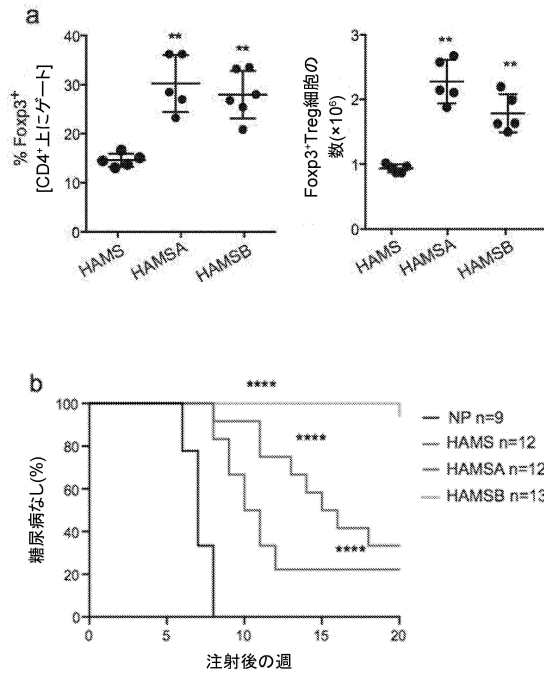
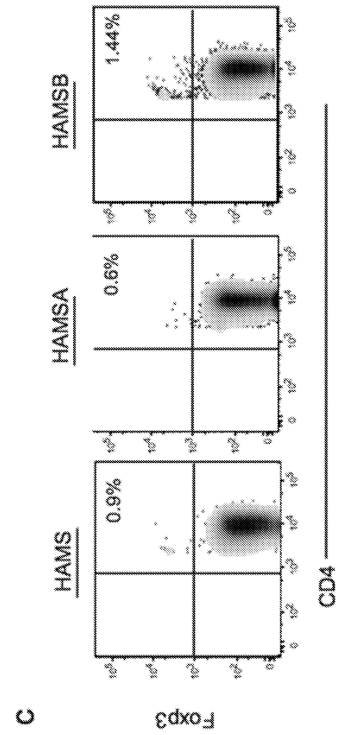


図 5 続き



10

20

【図 5 - 3】

【図 5 - 4】

図 5 続き

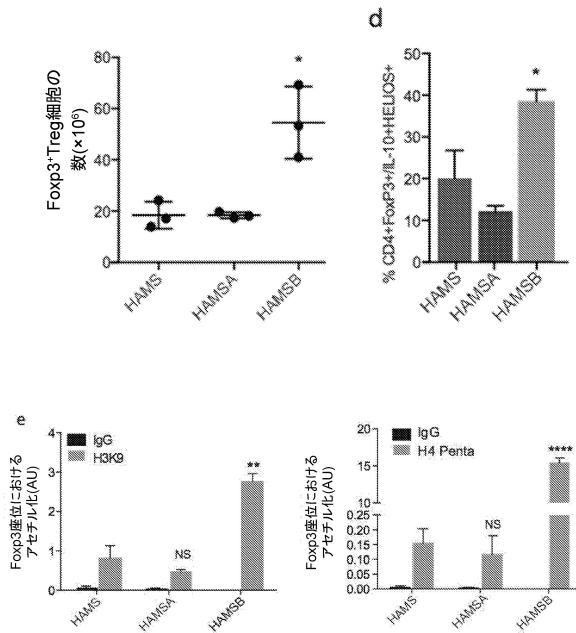
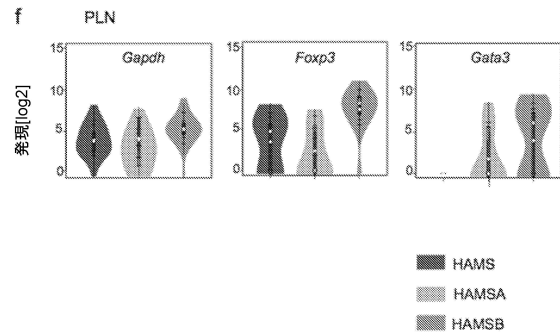
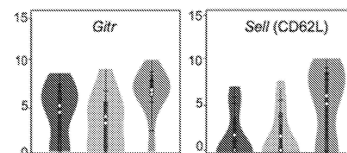


図 5 続き



30

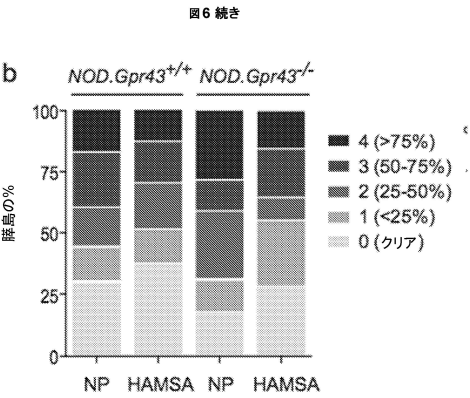
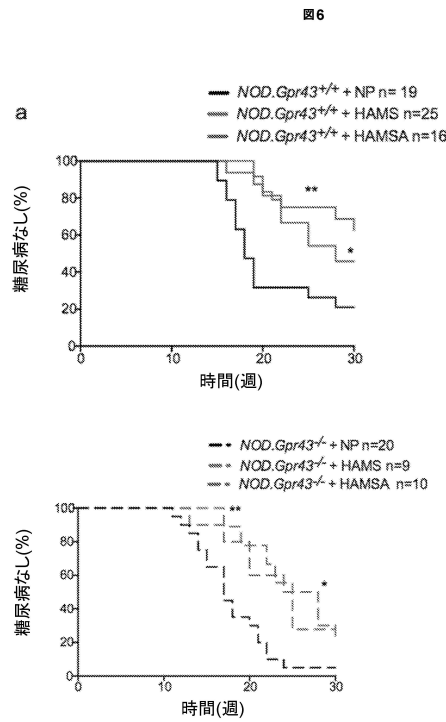


40

50

【 図 6 - 1 】

【 図 6 - 2 】

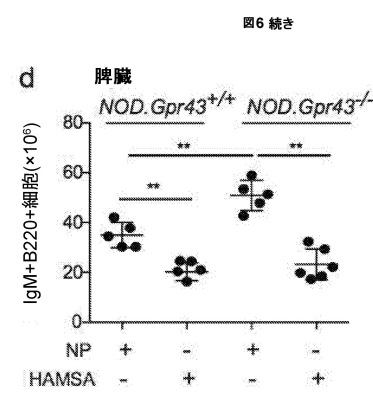
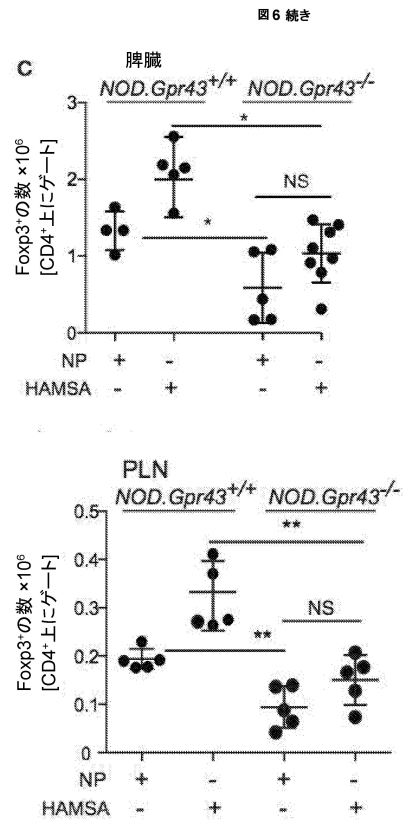


10

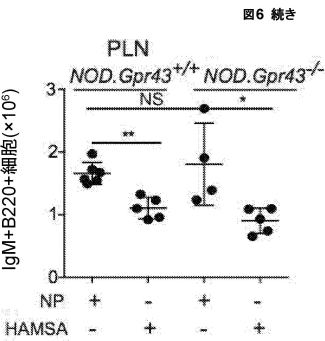
20

【 図 6 - 3 】

【 図 6 - 4 】



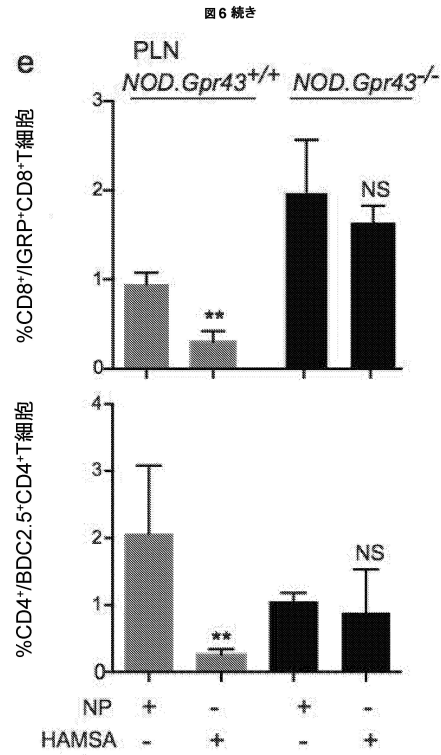
30



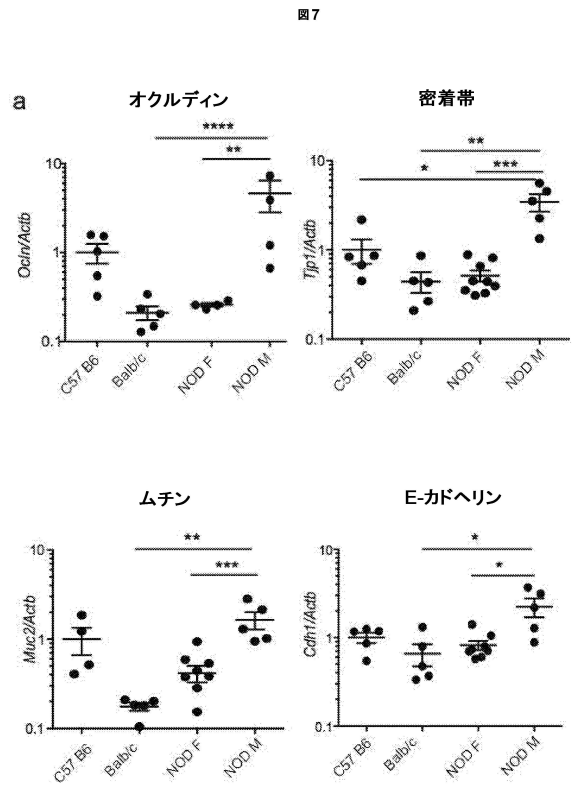
40

50

【 図 6 - 5 】



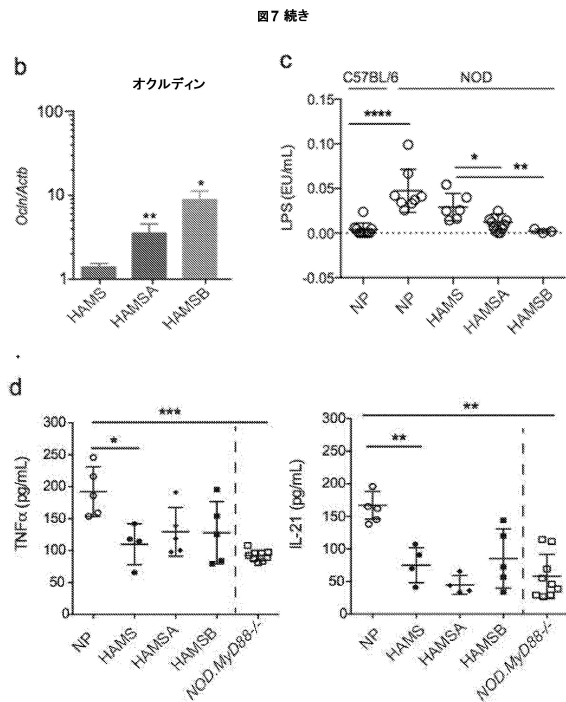
【 図 7 - 1 】



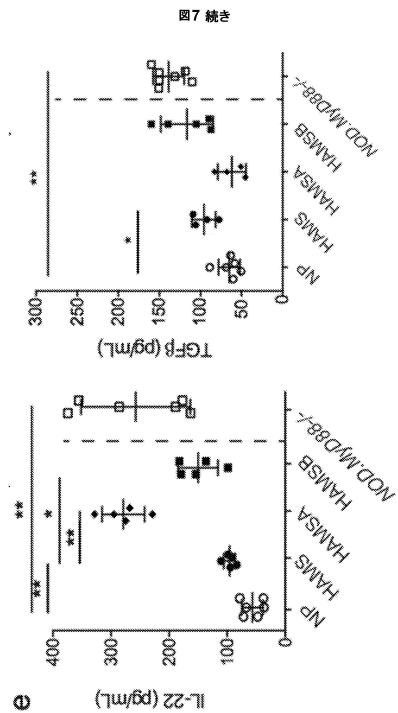
10

20

【 図 7 - 2 】



【 図 7 - 3 】

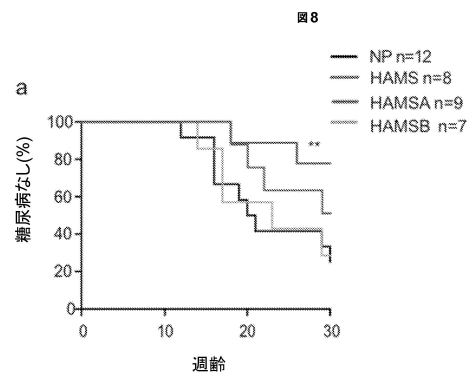


30

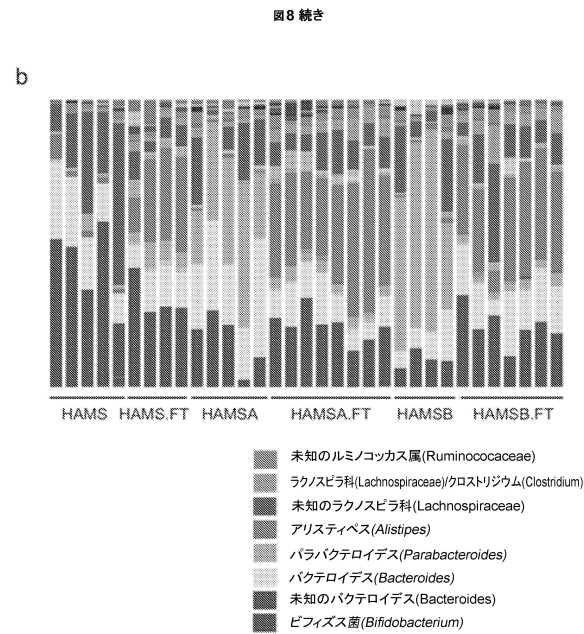
40

50

【 図 8 - 1 】



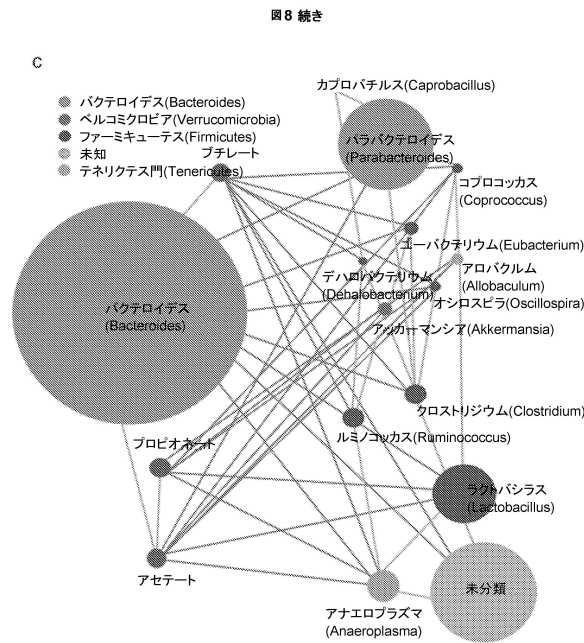
【 図 8 - 2 】



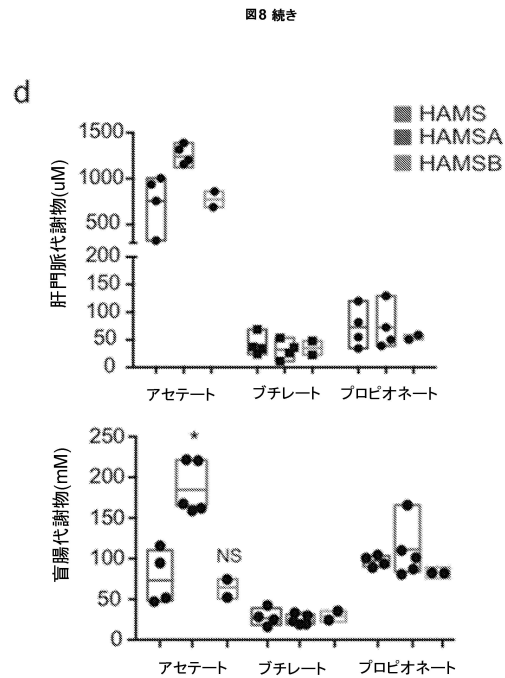
10

20

【 図 8 - 3 】



【 図 8 - 4 】



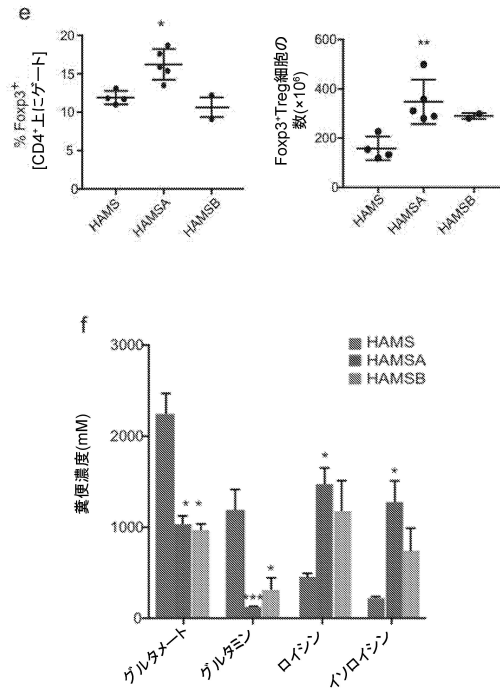
30

40

50

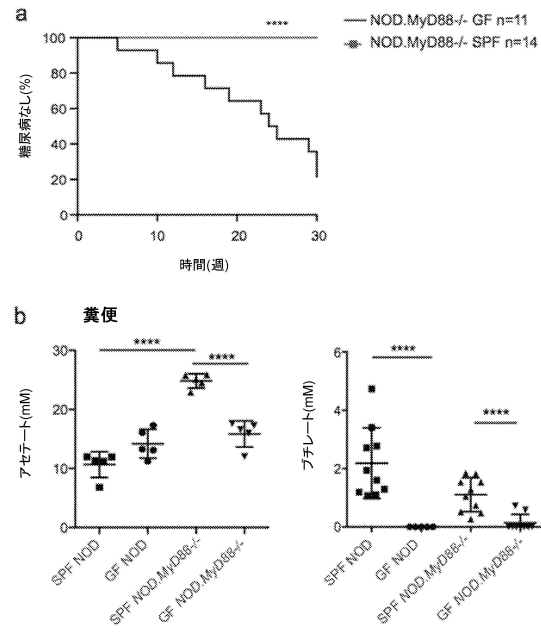
【図 8 - 5】

図 8 続き



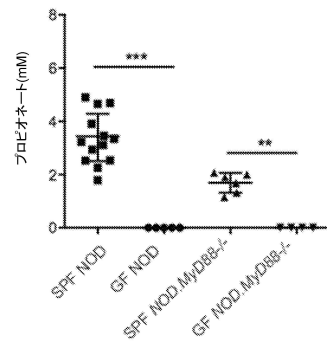
【図 9 - 1】

図 9



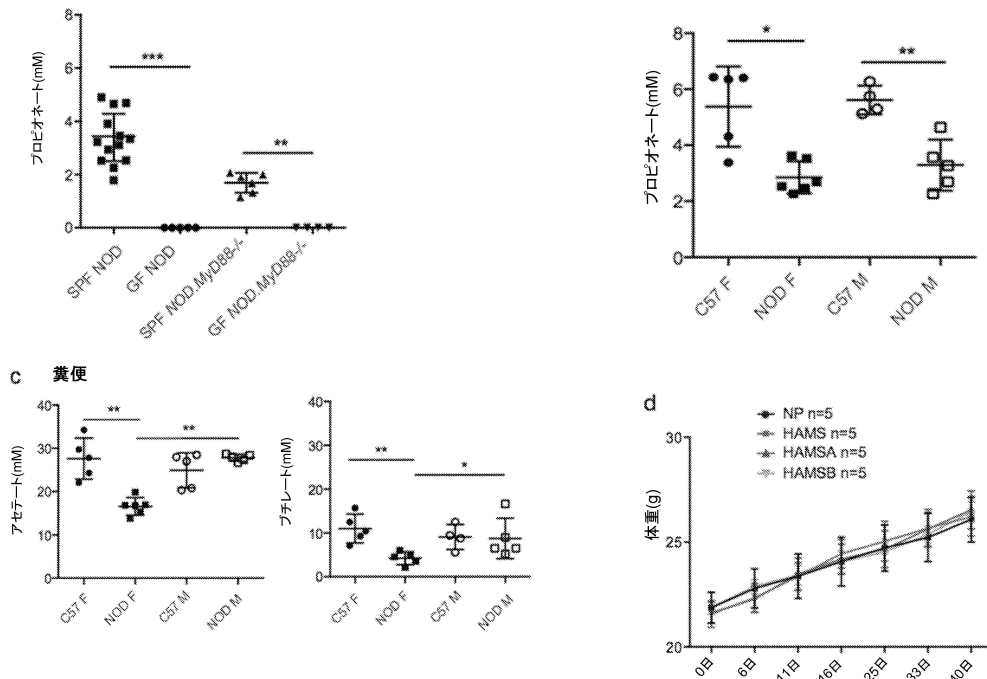
【図 9 - 2】

図 9 続き



【図 9 - 3】

図 9 続き



10

20

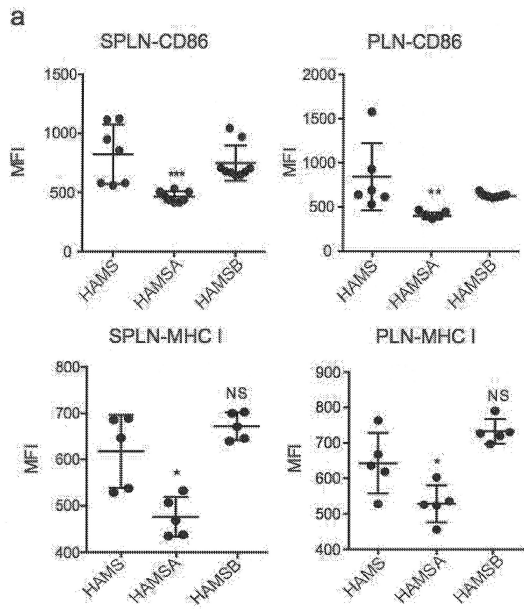
30

40

50

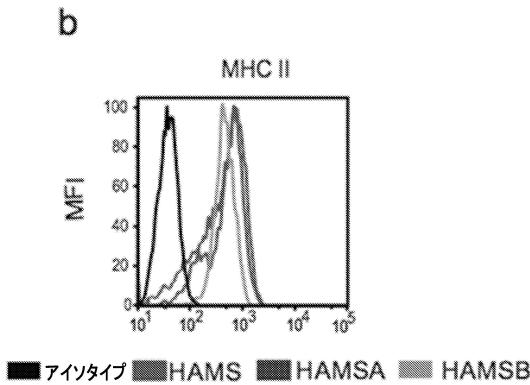
【図 10 - 1】

図10



【図 10 - 2】

図10 続き

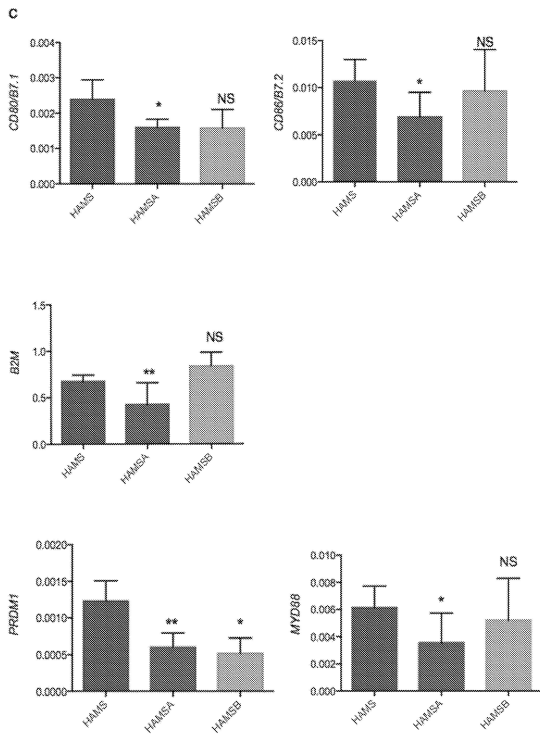


10

20

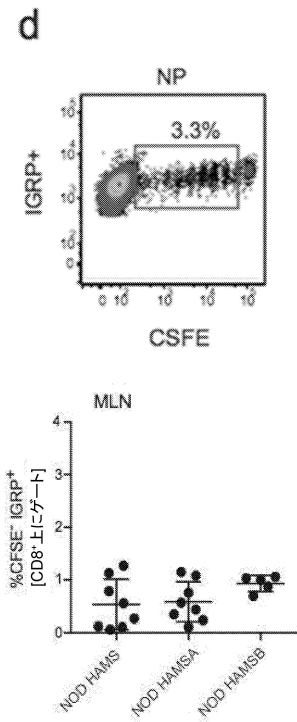
【図 10 - 3】

図10 続き



【図 10 - 4】

図10 続き



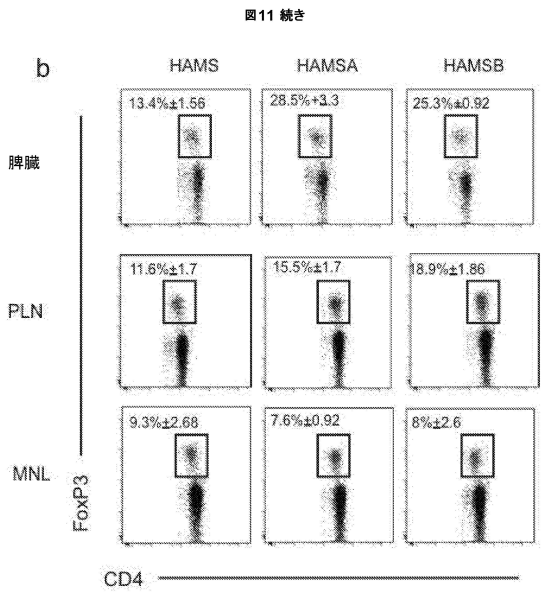
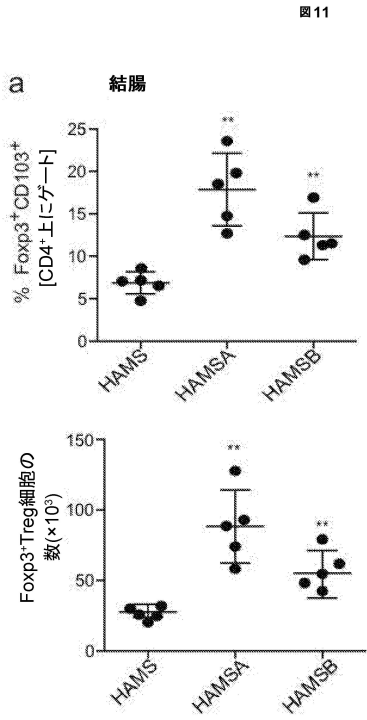
30

40

50

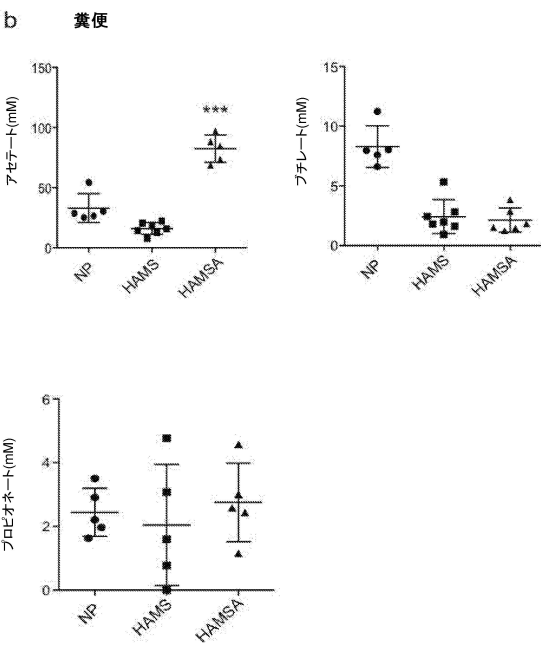
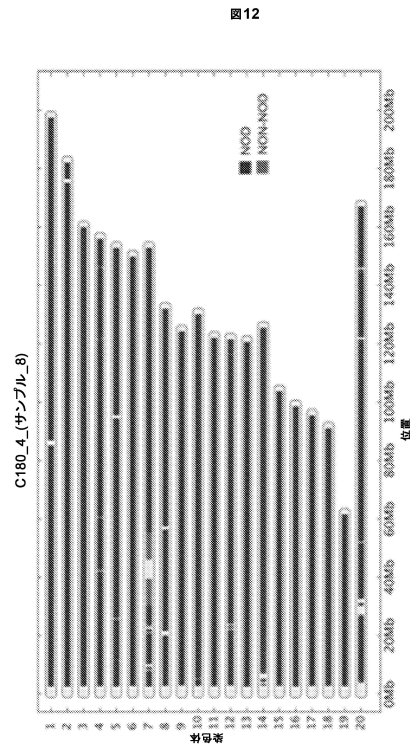
【図 1 1 - 1】

【図 1 1 - 2】



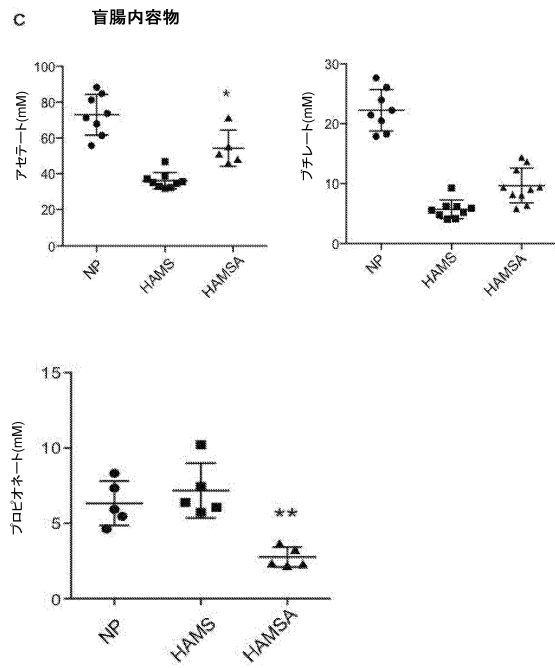
【図 1 2 - 1】

【図 1 2 - 2】



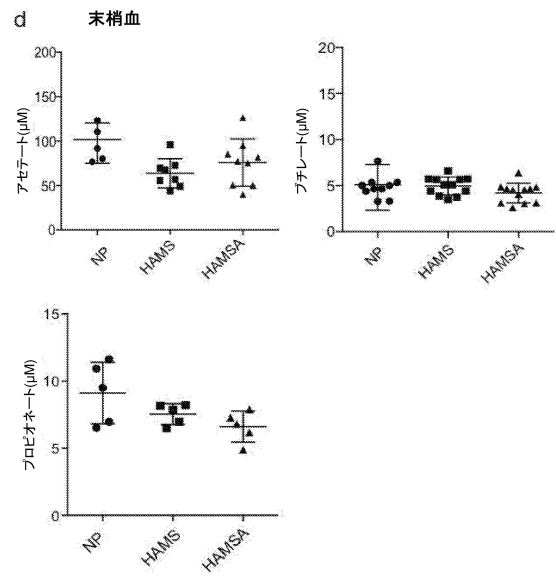
【図 12 - 3】

図 12 続き



【図 12 - 4】

図 12 続き

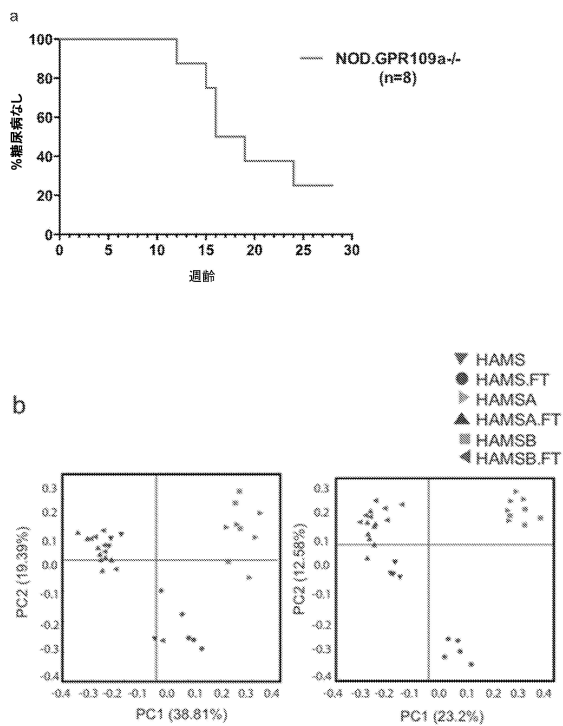


10

20

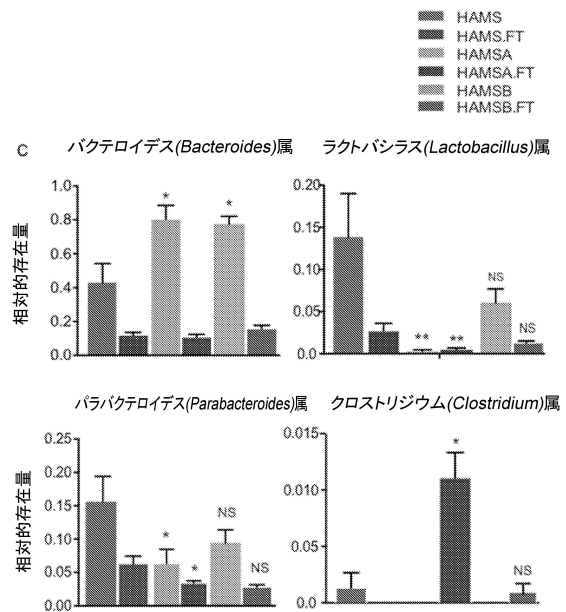
【図 13 - 1】

図 13



【図 13 - 2】

図 13 続き

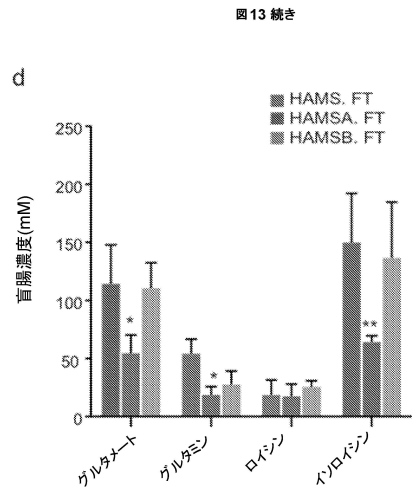


30

40

50

【図 13 - 3】



10

【配列表】

0007097027000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 2 3 L	33/12 (2016.01)	A 2 3 L	33/12	
C 1 2 Q	1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/686	Z
C 1 2 Q	1/6851(2018.01)	C 1 2 Q	1/6851	Z
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z
A 6 1 K	31/215 (2006.01)	A 6 1 K	31/215	
A 6 1 K	47/51 (2017.01)	A 6 1 K	47/51	
A 6 1 K	9/22 (2006.01)	A 6 1 K	9/22	
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08	

(74)代理人 100125070

弁理士 土井 京子

(74)代理人 100121212

弁理士 田村 弥栄子

(74)代理人 100174296

弁理士 富麻 博文

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 マッケイ、チャールズ レイ

オーストラリア国、3 8 0 0 ヴィクトリア州、クレイトン、ウエリントン ロード気付

(72)発明者 モレノ、エリアナ マリノ

オーストラリア国、3 8 0 0 ヴィクトリア州、クレイトン、ウエリントン ロード気付

(72)発明者 ロケット、トレヴァー

オーストラリア国、オーストラリアン キャピタル テリトリー 2 6 0 1、アクトン、クルニーズ
ロス ストリート気付

(72)発明者 クラーク、ジュリー

オーストラリア国、オーストラリアン キャピタル テリトリー 2 6 0 1、アクトン、クルニーズ
ロス ストリート気付

(72)発明者 トッピング、デイヴィッド

オーストラリア国、オーストラリアン キャピタル テリトリー 2 6 0 1、アクトン、クルニーズ
ロス ストリート気付

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 5 / 0 6 6 4 3 3 (W O , A 1)

特表 2 0 0 9 - 5 0 9 9 9 9 (J P , A)

Microbial Ecology in Health and Disease , 2008年 , 20 , p.103-108

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 3 2 7

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0

A 2 3 L 5 / 4 0 - 5 / 4 9

A 2 3 L 3 1 / 0 0 - 3 3 / 2 9

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)