

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6835858号  
(P6835858)

(45) 発行日 令和3年2月24日(2021.2.24)

(24) 登録日 令和3年2月8日(2021.2.8)

(51) Int. Cl.	F I
<b>C 1 2 N 1/20 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/20 E
<b>A 6 1 P 11/00 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/20 A
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 11/00
<b>A 6 1 K 35/744 (2015.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 0 5
	A 6 1 K 35/744

請求項の数 8 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2018-539107 (P2018-539107)  
 (86) (22) 出願日 平成29年1月27日 (2017.1.27)  
 (65) 公表番号 特表2019-503189 (P2019-503189A)  
 (43) 公表日 平成31年2月7日 (2019.2.7)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/051839  
 (87) 国際公開番号 W02017/129787  
 (87) 国際公開日 平成29年8月3日 (2017.8.3)  
 審査請求日 令和2年1月24日 (2020.1.24)  
 (31) 優先権主張番号 1650656  
 (32) 優先日 平成28年1月27日 (2016.1.27)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 フランス (FR)  
 微生物の受託番号 CNCM CNCM 1-4969

(73) 特許権者 510257488  
 アンスティテュー・ナショナル・ドゥ・ラ  
 ・ルシェルシュ・アグロノミク  
 INSTITUT NATIONAL D  
 E LA RECHERCHE AGRO  
 NOMIQUE  
 フランス、エフー75338パリ・セデッ  
 クス07、リュ・ドゥ・ルニヴェルシテ1  
 47番  
 (74) 代理人 100145403  
 弁理士 山尾 憲人  
 (74) 代理人 100122301  
 弁理士 富田 憲史  
 (74) 代理人 100157956  
 弁理士 稲井 史生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 呼吸器疾患を予防および／または処置するための薬剤としての細菌株

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コレクシオン・ナショナル・デ・キュルチュール・ドゥ・ミクロオルガニズム (CNC M、フランス75724パリ・セデックス、リュ・デュ・ドクトゥール・ルー25番) に番号 I - 4969 のもと寄託されたエンテロコッカス種菌株。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の菌株および少なくとも 1 つの薬学的に許容される添加物を含む、医薬組成物。

【請求項 3】

菌株が不活性化されていることを特徴とする、請求項 2 に記載の組成物。

10

【請求項 4】

菌株が熱不活性化されていることを特徴とする、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

菌株が抽出物の形態で存在することを特徴とする、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 6】

呼吸器疾患の処置および／または予防における使用のための、請求項 2 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記菌株で処置されていない患者と比較して、前記菌株で処置された患者において Th 2 サイトカインの発現が増大されないか、または減少することを特徴とする、請求項 6 に

20

記載の使用のための組成物。

【請求項 8】

処置される患者が子供であることを特徴とする、請求項 6 または 7 に記載の使用のための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

序論

健常な肺は無菌であり、上気道のみ細菌がコロニー形成すると長い間信じられていた。しかしながら、2010年に初めて、まずは喘息および慢性閉塞性肺疾患（COPD）を有する患者における、その後健常個体における肺細菌叢が記載された。 10

【0002】

文献における利用可能なデータは主に、メタゲノム研究に由来する[1, 2, 3]。実際、健常肺における細菌負荷は腸の細菌負荷より少なくとも1桁低い。これらの菌株の多くは固体培地でのサンプルの培養に基づく従来の技術により検出できない。しかしながら、シーケンシング技術の進歩により、16S rRNAをコードする遺伝子のシーケンシングにより細菌株を同定することが可能となった。こうして、肺微生物叢は比較的大きな多様性の細菌種から成ることが示された。分類学上の観点から、呼吸管において同定されている最も多い門はプロテオバクテリア、ファーミキューテスおよびバクテロイデスである。最も一般的な属はシュドモナス、ストレプトコッカス、プレボテラ、フソバクテリア、ペイヨネラ、ヘモフィラスおよびナイセリアである（Hilty et al., PLoS One. 5(1):e8578, 2010; Erb-Downward et al., PLoS One. 6(2):e16384, 2011）。 20

【背景技術】

【0003】

微生物叢によるコロニー形成は免疫および健康に対して極めて大きな影響を有する。この分野の研究は純培養（無菌）マウスの使用により促進された。まだ肺の常在微生物で肺免疫に対する有益な効果と関連付けられているものはない。多くの文献が存在する腸と異なり、肺細菌の微生物叢は依然としてほとんど記載されておらず、呼吸器上皮に対するその影響および新生児における免疫の発達は革新的な課題である。 30

【0004】

呼吸器疾患は呼吸器系に影響を与え、その機能障害を引き起こす。世界保健機関（WHO）による2012年に発表された統計によれば、それは2010年における世界中の5歳未満の子供の主な死因となっている。多くの呼吸器感染を引き起こす病原体は空気および/または直接接触により感染する。呼吸器管疾患およびその症状を処置および予防するための効率的かつ容易な組成物の使用が当分野で必要とされている。 40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】 Sibley CD, Grinwis ME, Field TR, Eshaghurshan CS, Faria MM, et al. (2011) Culture Enriched Molecular Profiling of the Cystic Fibrosis Airway Microbiome. PLoS ONE 6: e22702 40

【非特許文献 2】 Gollwitzer E, Saglani S, Trompette A, Yadava K, Sherburn R, et al. (2014) Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. Nature medicine 20: 642-647

【非特許文献 3】 Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, et al. (2011) Analysis of the Lung Microbiome in the "Healthy" Smoker and in COPD. PLoS ONE 6

【非特許文献 4】 Erb-Downward JR, Huffnagle GB, and Martinez FJ (2012) The Microbiota in Respiratory Disease. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 185: 1037-1038 50

【非特許文献5】Yun Y, Srinivas G, Kuenzel S, Linnenbrink M, Alnahas S, et al. (2014) Environmentally determined differences in the murine lung microbiota and their relation to alveolar architecture. PLoS One 9: e1134

【非特許文献6】Jang S, Kim H, Kim Y, Kang M, Kwon J, et al. (2012) Asthma Prevention by Lactobacillus Rhamnosus in a Mouse Model is Associated With CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T Cells. Allergy, asthma & immunol research 4: 150-156

【非特許文献7】Kim H, Kim Y, Lee S, Kang M, Yu H, et al. (2013) Effects of Lactobacillus rhamnosus on asthma with an adoptive transfer of dendritic cells in mice. Journal of applied microbiology 115: 872-879

【発明の概要】

10

【0006】

説明

本発明は呼吸器疾患、特に喘息の新規な処置に関する。本発明の特定の目的はそれらの予防である。

【0007】

より具体的には、本発明者らはエンテロコッカス種の特定の株が喘息のような呼吸器疾患の処置および/または予防において極めて有利な特性を有することを示した。

【0008】

実際に、この特定の菌株は慢性アレルギー性喘息の動物モデルにおいて体重減少を制限またはさらに予防する。このモデルにおいて、この特定の菌株を与えられた動物の肺は、炎症の徴候をほとんどまたは全く示さず、これは前記細菌の保護効果を示す。処置された動物の肺上皮は健康な動物と同一の厚さを有し、一方それらの上皮細胞は正常細胞と極めて類似しているように見える。さらに、本発明の菌株はある特定のTh1サイトカインの発現を増大させるが、Th2サイトカインの発現は増大させず、特定の場合において減少させることすらあり得る。

20

【0009】

第一の態様において、本発明は呼吸器疾患の予防および/または処置の特性を有するエンテロコッカス種菌株に関する。より具体的には、本発明はコレクシオン・ナショナル・デ・キュルチュール・ドゥ・ミクロオルガニズム(CNCM)(フランス75724パリ・セデックス、リュ・デュ・ドクトゥール・ルー25番)に2015年4月14日に番号I-4969のもと寄託されたエンテロコッカス種菌株に関する。

30

【0010】

菌株I-4969は、例えば当業者に既知の生育培地(例えば、ブレインハートインフュージョン(BHI)培地)で2~3日、30~37の温度で、pHを調製してまたは調製せずに培養することにより、産生される。細菌細胞を含む発酵培養液を回収する。培養液はそのまま、濃縮してまたは凍結乾燥して使用され得る。有利に、細菌は例えば、遠心分離によって回収され、その後適当な緩衝液、例えばPBS(リン酸緩衝化食塩水)中で再懸濁される。細菌濃度はフローサイトメーターまたは別の相当する方法により確立できる。

【0011】

40

本発明の菌株は、ある特定のTh1サイトカインの発現を増大させるが、Th2サイトカインの発現は増大させず、特定の場合において減少させることすらあり得る点で特に有利である。実際に多くの呼吸器疾患、特にアレルギー性喘息においてTh2サイトカインが発現することは、当業者に知られている(Atamas et al., F1000 Biol Rep. 2013;5:3)。しかしながら、Th1サイトカインがTh2経路に対して阻害効果を有することもまた、知られている。理論により縛られることを願わないが、本発明の細菌による誘発されるTh1サイトカインの発現は、Th2応答の低活性化により、呼吸器疾患、特に喘息の影響を緩和するとの証拠がある。実際に、本発明者らは本発明の細菌がTh2応答を活性化せず、またはTh2応答活性化を減少させ、喘息誘発性の成長遅延から保護することを観察した。

50

## 【0012】

本明細書で使用される用語「Th1経路」または「Th1応答」および「Th2経路」または「Th2応答」とは、それぞれナイーブT細胞のTh1またはTh2リンパ球への分化の過程をいう。細胞応答および細胞毒性に対する免疫応答を指示する活性化CD4Tリンパ球集団は「Th1CD4Tリンパ球」と称される。同様に、「Th2CD4Tリンパ球」は、本発明の意味の範囲内において、抗体の産生を伴う体液性応答に対する免疫応答、および極端な場合にはIgEの合成を指示する活性化CD4Tリンパ球集団に相当する。

## 【0013】

本明細書で使用される用語「サイトカイン」とは、免疫応答において重要な役割を果たす小型の分泌型制御タンパク質のファミリーをいう。サイトカインは細胞間の伝達に関与し、例えば、細胞生存および増殖のような多くの細胞機能ならびに多くの遺伝子の発現の誘発を調節する。サイトカインは多くの細胞型により産生され得る。

10

## 【0014】

本明細書で使用される用語「Th1サイトカイン」とは、Th1CD4Tリンパ球(IL-2、IFN およびTNF)によりまたはTh1経路(IL-12p70)の活性化を示す同じ状況における他の細胞型により産生されるサイトカインをいう。本明細書で使用される用語「Th2サイトカイン」とは、Th2CD4Tリンパ球(IL-4、IL-5、IL-10およびIL-13)によりまたはTh2経路(TSLP)の活性化を示す同じ状況における他の細胞型により産生されるサイトカインをいう。

20

## 【0015】

本明細書で使用される用語「過剰発現」および「増大された発現」とは、目的の遺伝子、特にTh1サイトカイン遺伝子の、例えば本発明の細菌で処置されていない対照のような基準対照における前記遺伝子の発現と比較して増大された発現をいう。本明細書で使用される用語「発現」とは、センス鎖(mRNA)の転写および安定な蓄積をいう。発現はまた、mRNAのポリペプチドへの翻訳を含む。特定の実施態様において本明細書で使用される用語「増大された」とは、量が多い、例えば元の量よりわずかに多い量、あるいは元をはるかに超える量、および特にその間の全ての量を意味する。あるいは、「増大」とは、増大した量または活性と比較される量または活性より少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%または20%多い量または活性を示し得る。用語「上昇した」、「よりも多い」および「増大された」は、本明細書において互換的に使用される。

30

## 【0016】

本明細書で使用される表現「Th2応答の減少」または「Th2応答の低活性化」とは、目的の遺伝子、特にTh2サイトカイン遺伝子の、例えば本発明の細菌で処置されていない対照のような基準対照における前記遺伝子の発現と比較した遺伝子の発現の減少をいう。特定の実施態様において本明細書で使用される用語「減少」とは、量が少ない、例えば元の量よりわずかに少ない量または元の量よりはるかに少ない量、および特にその間の全ての量をいう。あるいは、「減少」とは、減少した量または活性と比較される量または活性より少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%または20%少ない量もしくは活性を示し得る。用語「減少した」、「よりも小さい」、「より少ない」および「低下した」は本明細書において互換的に使用される。

40

## 【0017】

本明細書で使用される、前記「対照」は、患者、動物モデルまたはインビトロ細胞モデルであり得る。好ましくは、「対照」は患者である。本明細書で使用される用語「患者」は、呼吸器疾患、特に喘息を有するヒト対象をいう。

## 【0018】

別の態様において、本発明はまた、菌株I-4969および少なくとも1つの薬学的に

50

許容される添加物を含む医薬組成物に関する。

【0019】

不活性化細菌は生存している細胞と同等の効果を誘発し、従って呼吸器疾患の予防および/または処置の性質もまた有する。

【0020】

本発明の特定の実施態様によって、医薬組成物中に存在する I - 4969 株は不活性化菌株である。本明細書で使用される表現「不活性化菌株」とは、増殖および/または分裂できない細菌株をいう。優先的に、不活性化された菌株は代謝活性を有さない。しかしながら、本発明の不活性化菌株はなお Th2 活性化経路を抑制できる。すなわち、不活性化細菌の投与は Th2 経路の活性化に減少をもたらす。

10

【0021】

細菌不活性化技術は当業者に既知である。例は熱不活性化、UV または 線照射、酸処理、過酸化水素処理などを含む。本発明の細菌は熱処理により、優先的に不活性化される。

【0022】

本発明の医薬組成物において菌株 I - 4969 の抽出物を使用することは、特に有利である。本明細書で使用される「抽出物」とは、1 または数細菌株の溶解により得られる何らかの細胞物質をいう。有利に、本発明の抽出物は 1 回または数回のさらなる抽出および/または精製工程に供されている。優先的に、抽出物は単一の菌株から得られ; さらに優先的には前記菌株は本発明の I - 4969 である。

20

【0023】

溶解は当業者に既知の全ての方法: アルカリ溶解、超音波による溶解、高圧溶解(フレンチプレス)などによって実施され得る。細胞溶解によって得られた抽出物はその後、さらなる抽出および/または精製工程に供され得る。これらは、当業者に既知のこのような抽出物のあらゆる通常の処理を含み得る: とりわけ、遠心分離(例えば、細胞質から原形質膜を分離するため)、濾過、沈殿および種々の細胞成分の分離(例えば、多くのタイプのクロマトグラフィーの 1 つを用いて)などが言及され得る。それらの各々の工程で得られた種々の抽出物の各々は、プロ Th2 分子経路を抑制できる限り、本発明の方法において使用され得る。

【0024】

本発明の組成物は呼吸器疾患の処置に有用である。

30

【0025】

本明細書で使用される「処置するための」、「処置された」、「処置」ならびに類似の用語は、対象における障害(例えば、呼吸器疾患、特に喘息)および/またはそれに伴う症状の軽減または改善をいう。これは排他的ではないが、障害または状態の処置は病理、状態またはそれに付随する症状が完全に排除されることを必要としないことに留意すべきである。

【0026】

本明細書で使用される「予防するための」、「予防」ならびに類似の用語は、対象における障害(例えば、呼吸器疾患、特に喘息)および/またはそれに付随する症状を発症するリスクの抑制をいう。

40

【0027】

本明細書で使用される用語「対象」とは、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ヤギ、ブタ、ヒツジおよび非ヒト霊長類を含む本明細書に記載の処置から利益を享受し得るあらゆる哺乳動物をいう。より具体的には、ヒト対象は、本明細書において「患者」という。前記患者はいずれの年齢群に属してもよく、すなわち、患者は子供、青年または成人であり得る。子供は呼吸器疾患、特に喘息の影響をより受けやすいことが知られている。好ましい実施態様において、本発明による患者は子供である。

【0028】

用語「呼吸器疾患」とは、本発明の意義の範囲において、呼吸器系の疾患または呼吸器

50

障害を引き起こす疾患をいう。

【0029】

より具体的に、本発明の組成物は炎症性呼吸器障害、例えば喘息（軽度、中程度または重度）、例えば気管支、アレルギー性、内因性、外因性、運動誘発性、薬物誘発性（アスピリンおよびNSAIDを含む）および粉塵誘発性喘息、ステロイド抵抗性喘息、感染性および好酸球性気管支炎を含む気管支炎、慢性閉塞性気管支肺炎のような慢性閉塞性肺疾患（COPD）、嚢胞性線維症、特発性間質性肺炎、特発性肺線維症、間質性特発性肺炎、抗新生物療法に合併する線維症を含む肺線維症、ならびに結核およびアスペルギルス症および他の真菌感染を含む慢性感染；肺移植の合併症；脈管炎および肺血管系の血栓性障害および肺高血圧（肺動脈高血圧を含む）；炎症性および分泌性呼吸器管状態および医原性咳に関連する慢性咳の処置を含む鎮咳活性；薬剤誘発性鼻炎および血管運動神経性鼻炎を含む急性および慢性鼻炎；枯草熱を含む通年性および季節性アレルギー性鼻炎；鼻ポリープ症；風邪および呼吸器多核体ウイルス、インフルエンザ、コロナウイルス（特にSARS）およびアデノウイルスによる感染症を含む急性ウイルス感染、肺水腫、肺塞栓、肺炎、肺サルコイドーシス、珪肺症、農夫肺および関連疾患；過敏性肺炎、呼吸不全、急性呼吸窮迫症候群、気腫、慢性気管支炎、結核および肺癌の処置および/または予防に有用である。

10

【0030】

特に、本発明の使用および組成物は、喘息、COPDおよび鼻炎の予防および処置を含む。より具体的には、本発明の使用および組成物は喘息の予防および処置に関する。本発明者らは、熱失活させたときであっても、I-4969株が疾患の症状の発症前に投与されたとき、喘息を予防することにおいて特に有効であることを示した。従って、本発明の菌株の使用およびそれを含む組成物は、特に、この病状の素因があることが知られている対象（例えば、喘息を発症する家族性素因を有する対象）における喘息の発症を予防するために有効に使用される。

20

【0031】

本明細書で使用される用語「喘息」とは、呼吸管の可逆的な閉塞により特徴付けられる慢性炎症性肺疾患をいう。より具体的に、喘息は多くの細胞（特に肥満細胞、好酸球およびTリンパ球）がカスケード過程における役割を果たす気管支粘膜の慢性炎症性症候群である。炎症は壁腫脹を伴う気管支平滑筋収縮（気管支収縮）を引き起こす。これは気管支の直径減少をもたらす、従って空気の流れの制限をもたらすが、これは少なくとも一部は（自然にまたは治療効果により）可逆的である。炎症はまた、多様な刺激に対する気道反応性の付随する増大をもたらす。さらに、炎症は粘液の過分泌をもたらす。本疾患は、喘鳴、咳、息切れ（呼吸困難）の形の発作によりそれ自体顕在化する。

30

【0032】

本発明の医薬組成物は菌株I-4969に加えて、1種または数種の薬学的に許容される添加物を含む。

【0033】

本明細書で使用される表現「薬学的に許容される添加物」とは、個体への投与が顕著に有害な影響を伴わない添加物をいう。薬学的に許容される添加物は当業者に既知である。

40

【0034】

本明細書で使用される表現「薬学的に許容される添加物」は全ての溶媒、緩衝液、生理食塩水、分散媒、コーティング剤、抗真菌剤および抗細菌剤、等張剤および吸収遅延剤ならびに生理学的に適合性の類似物を含む。添加物は所望の医薬形態および投与様式により、当業者に既知の通常の添加物から選択される。このように、担体のタイプは意図とする投与経路により選択される。種々の実施態様において、担体は静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、局所、経皮または経口投与に適切である。薬学的に許容される溶媒は、無菌水溶液剤または分散剤および無菌注射溶液剤または分散剤の即時調製のための無菌粉末を含む。薬学的に活性な物質のための媒体および薬剤の使用は当分野において既知である。静脈内灌流のための典型的な医薬組成物は、250 mLの無菌リンガー溶液および100 mgの

50

組合せ剤を含むように製造され得る。非経腸経路により投与され得る化合物を製造するための方法は当業者に知られているかまたは明らかであり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1985), and the 18th and 19th editions of this handbookに極めて詳細に記載されている。

【0035】

本発明の組成物は治療有効量で患者に投与される。本明細書で使用される「治療有効量」とは、呼吸器疾患、特に喘息に対する治療的または予防的活性を観察するのに必要な量、特に症状の改善を観測するのに必要な量をいう。投与される I - 4969 細菌の量および処置期間は処置される対象の生理学的状態、処置される関節炎の性質、選択されるペプチドおよび使用される投与方法に基づいて当業者により評価される。本発明により使用される細菌株は単回投与または複数回投与で投与され得る。

10

【0036】

このように、当業者は医薬品の製造または薬学的もしくは獣医学的処置の確立において一般的に考慮される基準に基づいて、本発明の組成物投与の経路および様式、ならびに最適な投与レジメンおよび薬学的形態を選択するための最良の方法を理解する。好ましくは、これらの化合物は全身、特に静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内もしくは皮下、経口または局所的（ゲル剤、エアロゾル剤、滴剤の方法により）に投与される。適切な投与の単位形態は、錠剤、軟カプセル剤または硬カプセル剤、散剤、顆粒剤および経口溶液剤または懸濁液剤のような経口形態；舌下、口腔、気管内、眼内、鼻腔内、吸入投与形態；局所、経皮、皮下、筋肉内または静脈内投与形態；直腸投与形態；およびインプラントを含む。局所適用のために、本発明の化合物はクリーム剤、ゲル剤、軟膏剤またはローション剤で使用され得る。

20

【0037】

経腸、経口、非経腸（例えば、皮下、皮内または筋肉内）または粘膜（例えば、鼻腔内、舌下、腔内、経皮）経路により組成物を投与することは、本発明によって特に有利である。より好ましくは、本発明の医薬組成物は、いくつかの機会に投与され、時間とともに広がる。その投与様式、投薬レジメン、および最適な薬学的形態は、患者に適応した処置の確立において一般的に考慮される基準、例えば患者の年齢または体重、患者の年齢または体重、患者の一般的な状態、処置に対する耐性、および観察された副作用を考慮して決定される。

30

【0038】

本発明の医薬組成物において、活性成分は一般に用量単位で製剤される。例えば、生存 I - 3699 細菌を投与するとき、用量単位は、1日1回または数回の連日投与で、1用量単位につき  $10^2 \sim 10^5$  cfu、有利には  $10^3 \sim 10^5$  cfu、好ましくは  $10^3 \sim 10^4$  cfu を含む。さらに、細菌抽出物を患者に投与するとき、用量単位は、1日1回または数回の連日投与で、1用量単位につき 2.5 ~ 500 mg、有利には 10 ~ 250 mg、好ましくは 10 ~ 150 mg 含む。これらの用量は平均的な状態の例であるが、より高いまたはより低い用量が適切である特定の場合が存在し得る；このような用量はまた、本発明に属する。通常の実施では、各患者に対する適切な投与量は、投与様式および前記患者の年齢、体重および応答に従って医師により決定される。

40

【0039】

本発明は以下の実施例を利用してより詳細に記載される。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】無菌（GF）肺は、異なる恒常性にもかかわらず、完全に機能的である。（A）肺を固定し、パラフィンでコーティングし、5  $\mu$ m の切片に切断した。肺切片をヘマトキシリン・エオジン・サフロン（HES）で染色し、スライドスキャナーおよび Case Viewer ソフトウェアを用いて写真撮影した。代表的な部分を群ごとに示す。（B）30  $\mu$ g の総肺タンパク質中のフェリチンを測定した。データは個体毎に、かつ平均  $\pm$  標準偏差として示す。（C）mRNA 量を 2 - Ct として表し、HPRT mRNA の Ct

50

(cycle threshold)と比較したmRNAのCt ( Ct )から計算される。データは個体毎に、かつ平均±標準偏差として示す。(D)肺タンパク質からの抗アクアポリン-4およびTLR4のウェスタンブロット。(E)肺細胞をモノクローナル抗体(mAb)またはアイソタイプ対照で標識し、フローサイトメトリーにより分析した。形質細胞様樹状細胞(pDC)はCD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup> mPDCA1<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>細胞として同定された。樹状細胞は、2つの主要な樹状細胞サブグループ: CD11b<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup> (CD11b)およびCD11b<sup>-</sup> CD103<sup>+</sup> (CD103)を規定することを可能にするCLH I I<sup>high</sup>からCD11c<sup>+</sup>細胞の選択およびCD11bおよびCD103発現の分析により分析した。データはn = 6マウスの平均±標準偏差に対応する。全てのデータは2つの独立した実験において得られた。

10

## 【0041】

【図2】HDM誘発性喘息はGFマウスにおいて悪化しない。(A)HDMを伴う喘息を誘発するためのプロトコル。(B)気管支肺胞洗浄(BAL)に存在する細胞をカウントし、細胞遠心分離し、メイ・グリュンワルド・ギムザで染色した。好酸球をカウントし、全BAL細胞の%として表した。BALにおけるサイトカインIL-5および血清IGEの量はELISAにより測定した。データは平均±標準偏差に対応する。(C)各呼吸器リンパ節(RLN)からの細胞を単離し、HDM添加または非添加RPMIで72時間培養した。サイトカインIL-5およびIL-10の上清レベルをELISAによって測定した。同一のマウスについてのRPMI±HDM値は点線により結ばれる。(D)肺組織学は、図1について記載したように行った。代表的な切片を群ごとに示す。

20

【図3】肺微生物叢はHDM誘発性喘息の間に変化する。(A)BALまたは肺ホモジネートをyhBHIプレートで24時間インキュベートし、コロニー形成単位(cfu)をBAL 1mLにつきまたは肺1gにつきカウントした。(B)プロトコルの実験的設計およびプロトコルの様々な日における肺細菌カウントの結果。肺ホモジネートをyhBHIプレートで24時間インキュベートし、総コロニー形成またはスタフィロコッカスのコロニー形成を肺1gにつきカウントした。(C)肺外植片の存在下で菌株を共インキュベートした。製造者の指示に従って、サイトカインIL-5、IL-10、IL-12p70、IL-17a、IFN およびTSLPを定量した。「培地」:無菌培養培地対照。

## 【0042】

【図4】細菌介入は喘息の特徴を調節し得る。(A)プロトコルの実験的設計(B)マウスを毎日体重測定する。成長曲線はマウスの体重(-2日の初期体重に対して標準化した)の平均±標準偏差に対応する。成長曲線を比較するためにANOVAにおけるテューキー多重比較法を使用した。

30

【図5】Th2特性はCNCM I-4969により減少する。(A)気管支肺胞洗浄(BAL)に存在する細胞カウントし、細胞遠心分離し、メイ・グリュンワルド・ギムザで染色した。好酸球をカウントし、全BAL細胞の%として表した。(B)BALにおけるサイトカインIL-5の量および血清IGEの量をELISAにより測定した。データは平均±標準偏差に対応する。(C)各呼吸器リンパ節(RLN)からの細胞を単離し、HDM添加または非添加RPMIで72時間培養した。サイトカインIL-5およびIL-10の上清レベルをELISAによって測定した。同一のマウスについてのRPMI±HDM値は点線により結ばれる。

40

【図6】CNCM I-4969は肺炎症から保護するが、CNCM I-4970は肺炎症を増大させる。(A)5ミクロンの肺切片をヘマトキシリン・エオジン・サフロン(HES)または反応性アルシアンブルー/過ヨウ素酸-シッフ(PAS)で染色した。(B)各肺切片について肺上皮の厚さを測定した。

## 【0043】

【図7】一緒に投与したとき、CNCM I-4969および4970は中程度の炎症プロファイルを誘発する。(A)マウスを毎日体重測定する。成長曲線はマウスの体重(-2日の初期体重に対して標準化した)の平均±標準偏差に対応する。成長曲線を比較するためにANOVAにおいてテューキー多重比較法を使用した。(B)気管支肺胞洗浄(B

50

AL) に存在する細胞をカウントし、細胞遠心分離し、メイ・グリュンワルド・ギムザで染色した。好酸球をカウントし、全BAL細胞の%として表した。(C) 各呼吸器リンパ節(RLN)からの細胞を単離し、HDM添加または非添加RPMIで72時間培養した。サイトカインIL-5の上清レベルをELISAによって測定した。同一のマウスについてのRPMI±HDM値は点線により結ばれる。(D) 5ミクロンの肺切片をヘマトキシリン・エオジン・サフロン(HES)または反応性アルシアンブルー/過ヨウ素酸-シッフ(PAS)で染色した。

【図8】熱不活性化細菌株CNCM I-4969は喘息のマウスにおける体重増加を促進し、従って喘息による成長遅延からそれらを保護する。マウスを毎日体重測定する。成長曲線はマウスの体重(-2日の初期体重に対して標準化した)の平均±標準偏差に対応する。成長曲線を比較するためにANOVAにおいてテューキー多重比較法を使用した。

【図9】熱不活性化細菌株CNCM I-4969は血液IgEにおける減少を誘発しない。サイトカインIgEの血清レベルをELISAにより測定した。データは平均±標準偏差に対応する。

【実施例】

【0044】

### 1. 実験方法

細菌株CNCM I-4969を接種したマウスにおける喘息の進行に対する効果

細菌株、培地、生育条件

ホモジナイザー(Ultraturax(IKA)またはTissue Lysor(Qiagen))を用いてマウスの肺ホモジネートから肺細菌株を単離した。それらその後yhbHI、M17、MRSまたはマンニトール塩寒天培地で、好氣的条件下、37で24~48時間または好氣的条件下、Fretterチャンパーで、37で5日間生育させた。単離された菌株を16%グリセロール中、-80で凍結させた。各菌株の特性を質量スペクトルおよび16S RNAのPCRシーケンシングにより確認した。選択された菌株をコレクション・ナショナル・デ・キュルチュール・ドゥ・ミクロオルガニズム(CNCM)に寄託した。従って、本発明の菌株は参照番号CNCM I-4969のもと寄託された。この菌株は、最初はストレプトコッカスとして特徴付けられたことに留意するべきである。しかしながら、後の質量スペクトル試験は、この細菌がエンテロコッカス種のファミリーに属することを示した。さらに、スタフィロコッカス・シウリ(Staphylococcus sciuri)株(CNCM I-4970)は同一のスクリーニングで単離された。

【0045】

動物および関連する方法

本動物実験は番号01553.01のもと、COMETHEA倫理委員会により承認された。SPF C57BL/6マウスをJanvier(フランス、ル・ジュネスト=サン=ティスル)から入手した。それらを我々の動物生育施設(IERP、INRA、ジュイ=アン=ジョザまたはVIB、ヘント)においてFELASA SPF条件下で交配させ、飼育した。GF C57BL/6マウスをCDTA(CNRS、フランス、オルレア)または社内繁殖(INRA、ジュイ=アン=ジョザ)により得た。それらをAnaxem動物施設(INRA、ジュイ=アン=ジョザ)のTrexlerアイソレータ(Calhenne、フランス、ヴェリジー)で無菌条件下で交配させ、飼育した。HDMによるアレルギー性喘息の誘発のために、7日齢の仔マウスに10µLの全体積中に1µgのHDM(Greer)またはLPSを含まないPBS(Lonza)を与えた。1週間後、それらに10µgのHDM(またはPBS)を5日連続で与えた。いくつかの実験において、5日齢の仔マウスに全体積10µLのPBS中1×10<sup>6</sup>細菌を1日おきに与えた。

【0046】

サンプル回収

ケタミンおよびキシラジンを過剰投与することによりマウスを屠殺した。気管支肺胞洗浄(BAL)を先に記載されたように(Roux et al., 2011)、PBS 1mM EDT

10

20

30

40

50

Aを用いて右葉で実施した。BAL上清を凍結させ、-20℃で保存した。BAL細胞を顕微鏡スライド(スーパーフロスト)上で細胞遠心分離(Cytospin 5)し、その後メイ・グリュンワルドおよびギムザで染色した。右葉は、フローサイトメトリーのために、またはTissue Lysarでホモジナイズした後、ゲル化培地のプレート上の細菌カウントのために使用した。フローサイトメトリーについて、細胞を単離するために右葉および呼吸器リンパ節(RLN)(頸部、乳様突起および縦隔)を1mg/mLのコラゲナーゼDおよび0.5mg/mLのDNAアーゼIで処理した。左肺葉をRNAを抽出するために使用するまで-80℃で保持した。あるいは、組織学的試験の前に肺を4%パラホルムアルデヒド(PFA)で固定し、パラフィンでコーティングした。

【0047】

10

組織学

5ミクロンの肺切片をヘマトキシリン・エオジン・サフロン(HES)または反応性アリシアンブルー/過ヨウ素酸-シッフ(PAS)で染色し、Case Viewerソフトウェアプログラムを用いて写真撮影した。

【0048】

q-RT-PCRによる遺伝子発現の分析

NucleoSpin(登録商標)RNA Kit(Macherey Nagel)を使用して肺ホモジネートから全RNAを抽出した。製造者の指示に従って、ランダムプライマーおよび逆転写酵素(High-Capacity cDNA Archive Kit, Life Technologies SAS(サン・トバン、フランス)によるApplied Biosystem)を用いた逆転写によりcDNAを得た。使用されたプライマー(Sigma-Aldrich, Eurogentec)は、付表1に列挙される。q-RT-PCR反応は、AbiPrism 7000 System(Applied Biosystem)およびTakyon<sup>TM</sup> ROx SYBR Master Mix(Eurogentec)を用いて各遺伝子について3回繰り返した。データを7000 System SDSプログラム(Applied Biosystem)を用いて分析し、サイクル閾値(Ct)値を決定した。メッセンジャーRNA(mRNA)発現をCt法を用いて計算し、mHPRT発現と関連付けた。

20

【0049】

ウェスタンブロット

30

先に記載されたように(Deschemin et al., 2015)、タンパク質抽出および免疫ブロット実験を実施した。使用された抗体は、抗マウスTLR4(sc-30002, Santa Cruz);抗アクアポリン-4(sc-20812, Santa Cruz)および抗-アクチン(Sigma AC-74、製品番号A5316)である。使用された第二抗体は抗ヤギ(Calbiochem)または抗ウサギ(Jackson ImmunoResearch Laboratories)抗体であった。

【0050】

フローサイトメトリー

抗CD32/CD16抗体で飽和させた後、細胞を、mPDCA1(JF05-1C2.4.1、FITC-コンジュゲート)、MHCII(IA/IE、2G9またはM5/114.15.2、FITCまたはEP)、CD103(M290または145-2D11、PE)、CD86(GL1、FITC)、CD11b(M1/70、PerCP Cy5.5)またはCD11c(HL3、ビオチンまたはBV786)に対するモノクローナル抗体(mAb)とインキュベートした。T細胞標識のために、細胞をCD4(L3T4またはRM4-5、FITCまたはPECy7)、CD45.2(104、A780)、CD3(145-2C11、PerCP Cy5.5)およびCD8(Ly2、53-6.8、ビオチンまたはAPC)に対する抗体とインキュベートした。mPDCA1(Miltenyi Biotec)を除いて、全てのmAbはBD Biosciencesから得た。抗体-ビオチンを標識するために、APC-コンジュゲートストレプトアビジン(BD Biosciences)を使用した。少なくとも $2 \times 10^6$ 事象がAcc

40

50

uriまたはFortessa FACS (BD Biosciences) を用いて得られ、これはその後FlowJo Software v7.5プログラム(Tree Star Inc)で分析された。

【0051】

サイトカインおよびIgのELISA

製造者の指示に従って、サイトカインIL-5、IL-10、IL-12p70、IL-17aおよびIFN (Mabtech) TSLP (Ready-SET-Go, eBioscience) をELISAにより定量した。製造者の指示に従って、種々のマウスから血清におけるIgEおよびIgG1を測定した(Ready-SET-Go, eBioscience)。

10

【0052】

統計的分析

ノンパラメトリックマン・ホイットニー検定(2群の比較、n=4)またはテューキー多重比較法(>2群)を用いて、対のない値(GraphPad Prism software)を比較した。有意は、\* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; および\*\*\*\* p<0.0001で表される。

【0053】

熱不活性化細菌株CNCM I-4969を接種したマウスにおける喘息進行に対する効果

先に記載したように、CNCM69培養物( $10^8$  cfu/mL)を得て、その後これらは場合によりウォーターバスで100°Cで10分間インキュベートした。この処理の後、熱処理の有効性を検証するために、培養物をyHBI寒天培地に24時間37°Cで分散させた。熱処理後に細菌は生育せず、一方熱ショックを受けていないチューブについては培養物が生育した(37°Cで24時間後)。

20

【0054】

HDMの存在下で菌株を投与し、喘息を引き起こすためのプロトコルを本願の図2Aに示す。接種されたCNCM69株は場合により熱処理で不活性化されている以外、上記と同一の動物接種方法を使用した。

【0055】

さらに、場合により熱処理により不活性化されていてよい菌株CNCM69を接種した2群のHDMマウスにおいて、血清IgE量をELISAにより測定した。アッセイプロトコルは図5Bの説明に先に記載したとおりである。

30

【0056】

2. 結果

呼吸器疾患に対する宿主感受性を調節することができる肺常在細菌を単離するために、仔マウスにおける誘発された喘息のモデルを使用した。異なる恒常性にもかかわらず、無菌(GF)マウスの肺は機能的であることが初めて示された(図1)。アレルギー性喘息が誘発されたとき、対照と比較してGFマウスでは悪化しなかった(図2)。

【0057】

仔マウスにおけるアレルギー性喘息の誘発後、肺微生物叢が変化する。実際に、肺炎症が始まるとき、肺1gあたり培養した細菌の数が有意に増加する(図3A)。特定の細菌は特にこの増加に加わるが、他の細菌は処置動物と対照間で有意に変化しない(図3B)。この結果は、喘息のような呼吸器病理は肺常在細菌集団の変化に関連することを示す。

40

【0058】

初期にコロニー形成した仔マウス肺細菌を、生後極早期(3日)から離乳(3週間)まで単離した。これらの細菌は生存しており、酸素の非存在下または存在下で培養され得る。

【0059】

1菌株を、番号CNCM I-4969のもと、CNCMに寄託した。この細菌は免疫調節特性を有する。これらの初期にコロニー化した細菌を肺切片で共培養するとき、EL

50

I S A により測定される免疫応答が使用される細菌によって異なるため、強力かつ特異的な組織応答を誘発する。例えば、T h 1 ( I F N 、 I L - 1 2 p 7 0 )、T h 2 ( T S L P ) および抗炎症性サイトカイン ( I L - 1 0 ) の分泌を、C N C M I - 4 9 6 9 および実験室において単離された他の呼吸器細菌 ( 大腸菌 ( E . c o l i ) 株およびプロテウス・ミラビリス ( Proteus mirabilis ) ) を含む種々の細菌の存在下で測定した。

【 0 0 6 0 】

我々の結果は初期にコロニー形成する肺細菌である細菌 C N C M 6 4 9 6 9 は免疫調節特性を有することを示す ( 下表 )。

【 表 1 】

菌株		エキス <sup>®</sup> 機能スクリーニング <sup>®</sup> (PCLS、図3)	喘息中のインビボ <sup>®</sup> 進行 (図1)
A	N/A	Th1	変化なし
B	N/A	Th1	変化なし
CNCM I-4969	ストレプトコッカス	Th1	変化なし
CNCM I-4970	N/A	Th2	増加

10

【 0 0 6 1 】

この態様は以下に記載のようにマウスにおいてインビボで菌株 I - 4 9 6 9 を試験することにより、より詳細に研究された。

20

【 0 0 6 2 】

我々の結果は C N C M 4 9 6 9 を与えられた仔マウスは喘息による生育遅延から保護されることを示す ( 図 4 )。

【 0 0 6 3 】

以下の表および図 8 は仔マウスの生育遅延に対するこの保護は、この熱不活性化菌株 C N C M 4 9 6 9 の接種後もまた維持されることを示す。

【表 2 - 1】

テューキー多重比較法	平均差	q	有意か p<0.05か	概要	差の95% CI
PBS対HDM	0.1584	8.100	適	***	0.07633~0.2406
PBS対CNCM I-4969 + PBS	0.01299	0.6639	否	n s	-0.06912~0.09510
PBS対CNCM I-4969 + HDM	0.07679	3.925	否	n s	-0.005323~0.1589
PBS対熱不活性化CNCM I-4969 + PBS	0.02078	1.062	否	n s	-0.06133~0.1029
PBS対熱不活性化CNCM I-4969 + HDM	-0.01388	0.8631	否	n s	-0.09899~0.06523
HDM対CNCM I-4969 + PBS	-0.1455	7.436	適	***	-0.2276~-0.06335
HDM対CNCM I-4969 + HDM	-0.08166	4.174	否	n s	-0.1638~0.0004534
HDM対熱不活性化CNCM I-4969 + PBS	-0.1377	7.037	適	***	-0.2198~-0.05555
HDM対熱不活性化CNCM I-4969 + HDM	-0.1753	8.963	適	***	-0.2574~-0.09322

10

20

【表 2 - 2】

CNCM I-4969 + PBS対CNCM I-4969 + HDM	0.0638	3.261	否	n s	-0.01831~0.1459	
CNCM I-4969 + PBS対熱不活性化CNCM I-4969 + PBS	0.007792	0.3984	否	n s	-0.07432~0.08990	10
CNCM I-4969 + PBS対熱不活性化CNCM I-4969 + HDM	-0.02987	1.527	否	n s	-0.1120~0.05224	
CNCM I-4969 + HDM対熱不活性化CNCM I-4969 + PBS	-0.05601	2.863	否	n s	-0.1382~0.02610	
CNCM I-4969 + HDM対熱不活性化CNCM I-4969 + HDM	-0.09367	4.788	適	*	-0.1758~-0.01156	20
熱不活性化CNCM I-4969 + PBS対熱不活性化CNCM I-4969 + HDM	-0.03766	1.925	否	n s	-0.1198~0.04445	30

## 【0064】

我々はその後、数個の免疫および炎症パラメータを分析した。我々は、細菌CNCM 4970が血中のIgE（この型の免疫グロブリンはアレルギー反応の間増大する）の量を増大させることを観測した（図5B）。培地のみまたはHDMを含む培地で、インピット口で呼吸器神経節細胞を再刺激することにより、我々はTh2サイトカインがCNCM 4969を与えられたものについて増加が有意に低いことを認めた（図5C）。他方で、種々の生理学的パラメータが示すように、肺炎症はCNCM I-4969の存在下で減少する（図6）。対照的に、菌株CNCM I-4970はこの炎症を悪化させる。我々は、細菌CNCM 4969はTh2徴候を減少させ、生育遅延から保護し、喘息に対する保護特性を与えると結論づける。

## 【0065】

さらに、熱不活性化菌株CNCM 4969を接種されたマウスにおける血液IgE量のアッセイ後に得られた結果はこの量が減少しないことを示し、これはTh2徴候が増加しないことを示す（図9）。

## 【0066】

熱不活性化CNCM 4969細菌について、我々はまた、喘息に対する保護特性を与えると結論づけることができる。

## 【0067】

我々が実施した第二の実験により、第一の実験の体重曲線を確認する。この第二の実験

10

20

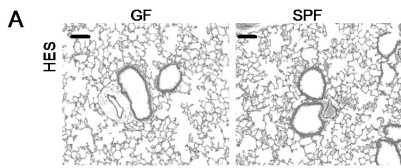
30

40

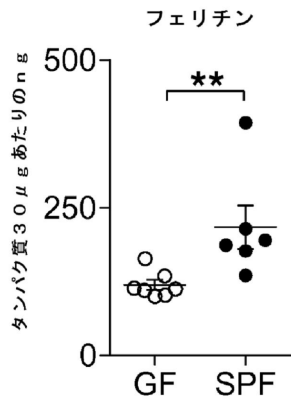
50

のために、より多くの仔マウスを入手し、2種の細菌併用(図7)；熱不活性化細菌の群を追加することができた。体重曲線および血液IgEアッセイに基づいて、我々の結果は、CNCM 4969または70のみで観測された結果と比較して、併用投与された2種の細菌が中間プロファイルを誘発することを示す。

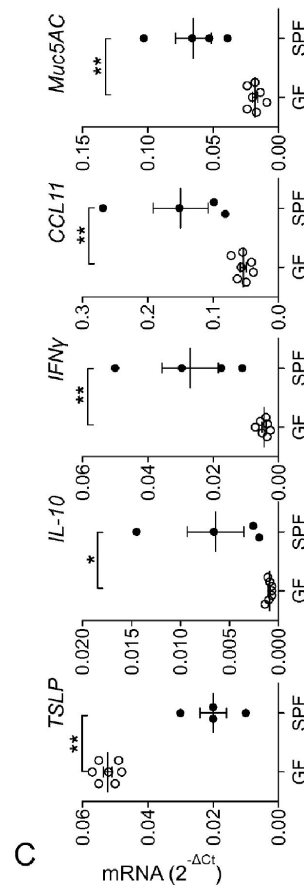
【図1A】



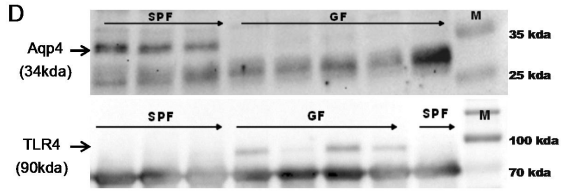
【図1B】



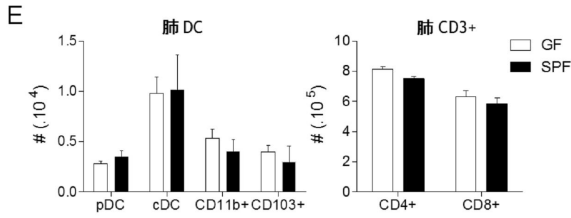
【図1C】



【図 1 D】

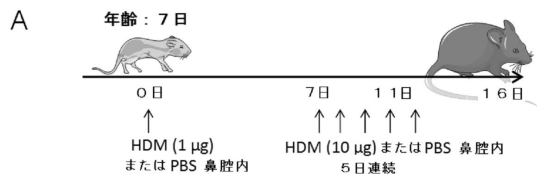


【図 1 E】

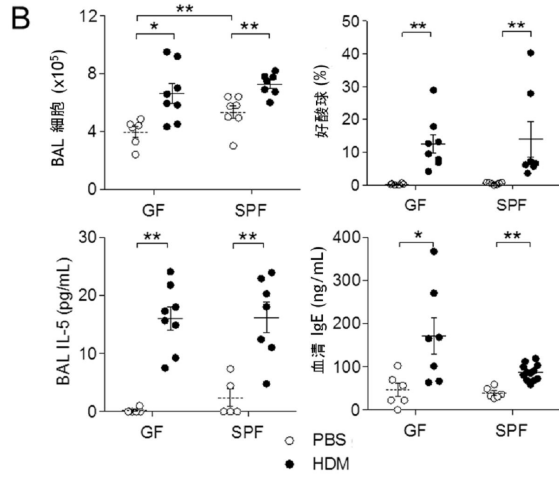


【図 2 A】

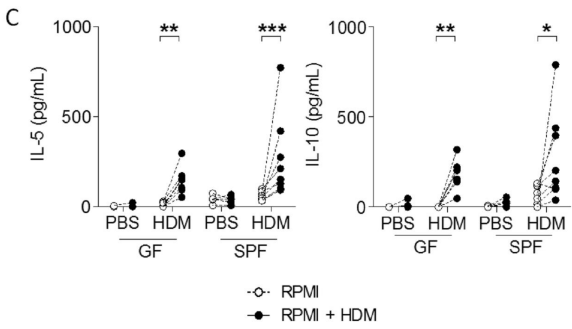
Figure 2



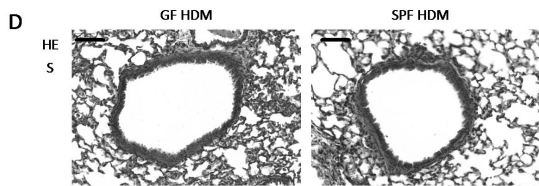
【図 2 B】



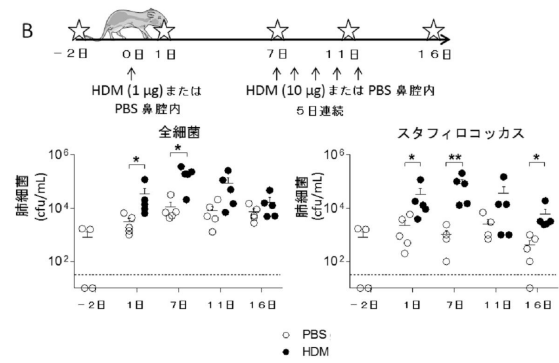
【図 2 C】



【図 2 D】

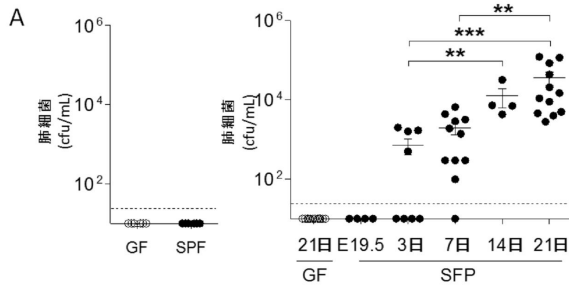


【図 3 B】

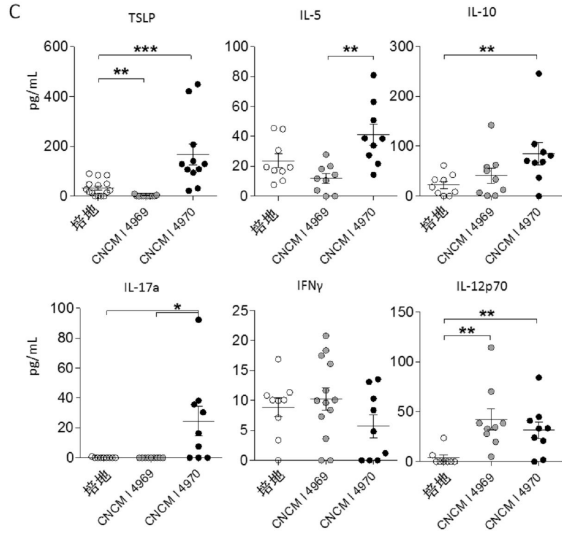


【図 3 A】

Figure 3

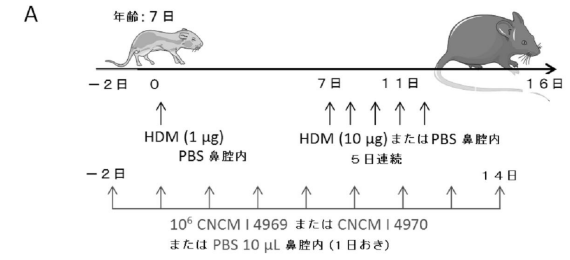


【 図 3 C 】

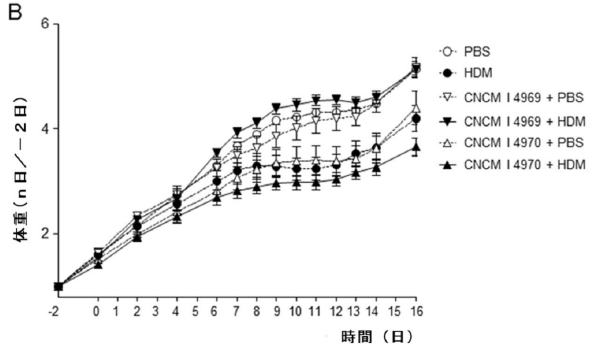


【 図 4 A 】

Figure 4

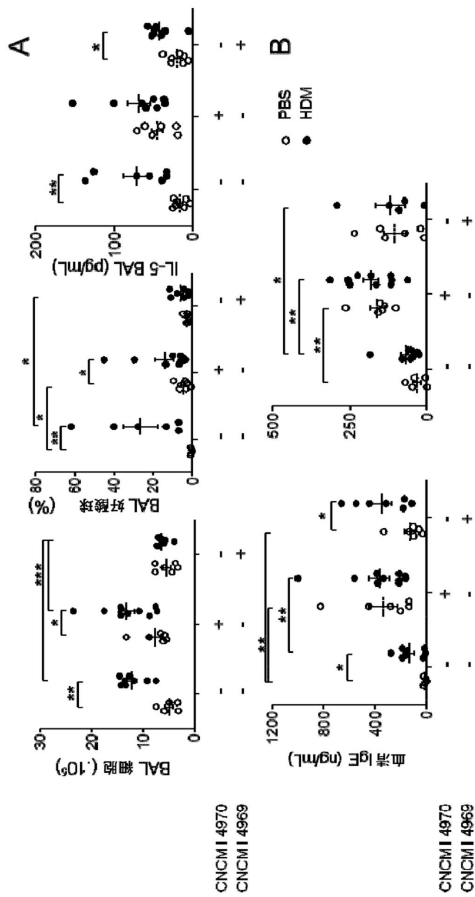


【 図 4 B 】

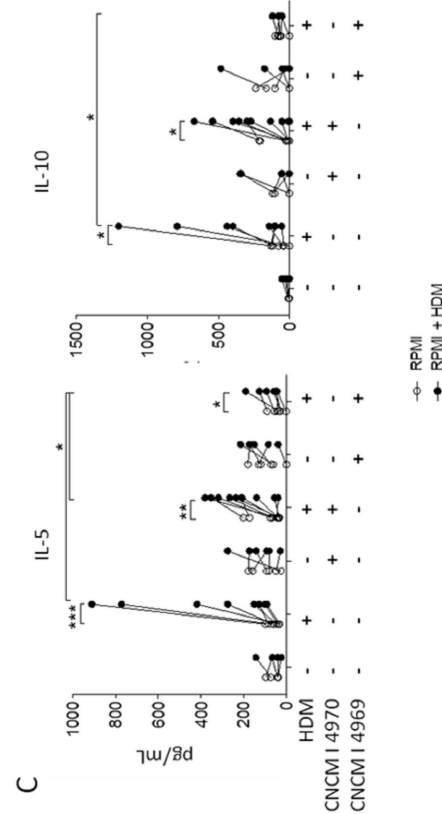


【 図 5 A - B 】

Figure 5



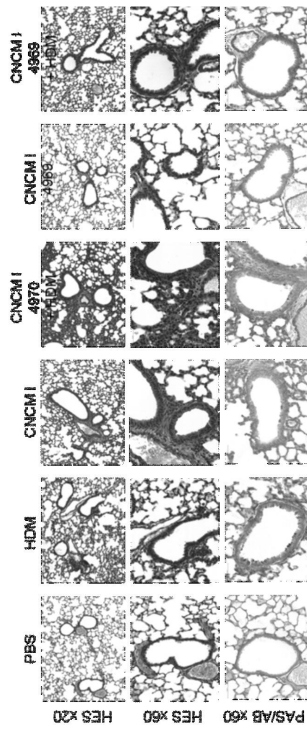
【 図 5 C 】



【 図 6 A 】

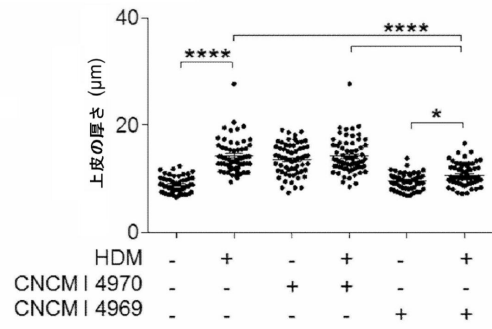
Figure 6

A



【 図 6 B 】

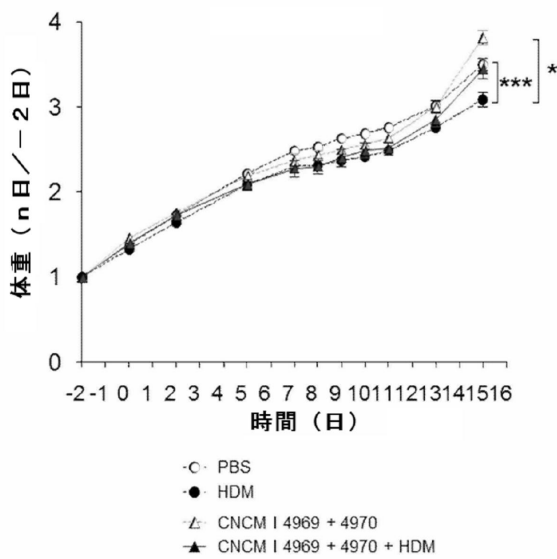
B



【 図 7 A 】

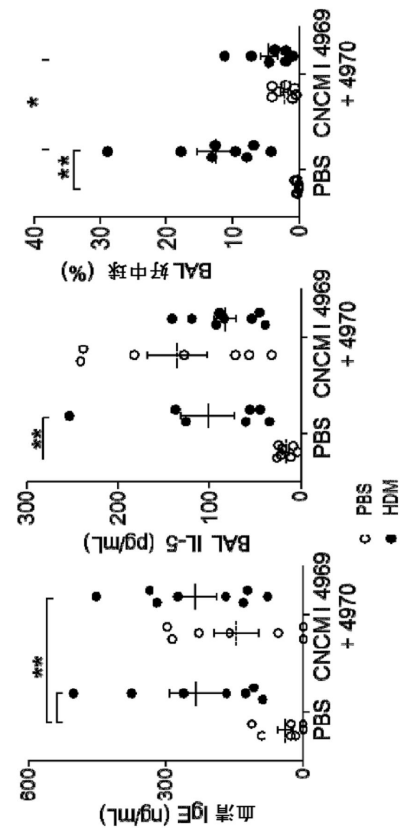
Figure 7

A



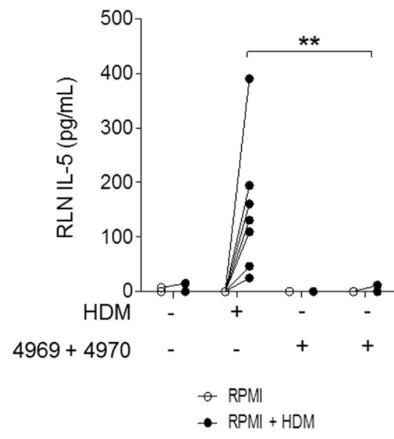
【 図 7 B 】

B



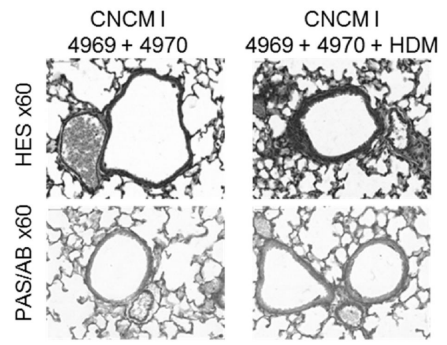
【 図 7 C 】

C



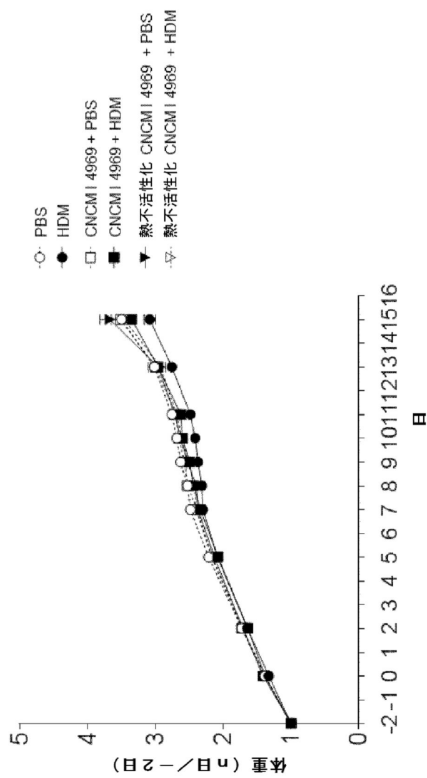
【 図 7 D 】

D



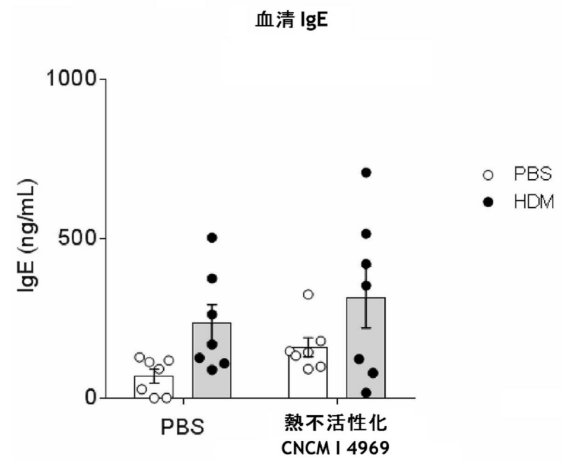
【 図 8 】

Figure 8



【 図 9 】

Figure 9



## フロントページの続き

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 ミュリエル・トマ

フランス91430イニー、リュ・ジュール・フェリー39番

(72)発明者 オード・ルモ - ブリジオン

フランス37360サンブランケ、ルート・ドゥ・サンブランケ20番

(72)発明者 フィリップ・ランジェラ

フランス78140ヴェリジー、リュ・アンリ・ラプールダン2番

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 International Journal of Molecular Medicine, 2012年, Vol.30, pp.248-254

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014年, Vol.111, No.2, pp.805-810

PLoS Pathogens, 2015年, Vol.11, No.7, e1004923, pp.1-5

British Journal of Nutrition, 2013年, Vol.109, pp.S35-S50

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 15/90

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

PubMed