

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-536557

(P2004-536557A)

(43) 公表日 平成16年12月9日(2004.12.9)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 35/74	A 6 1 K 35/74	A
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 1/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 105 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-544461 (P2002-544461)	(71) 出願人	597025806
(86) (22) 出願日	平成13年11月27日 (2001.11.27)		ワシントン・ユニバーシティ
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月26日 (2003.5.26)		Washington University School of Medicine
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/044332		アメリカ合衆国63130ミズーリ州セント・ルイス、ワン・ブルッキングズ・ドライブ
(87) 国際公開番号	W02002/042328	(71) 出願人	391008951
(87) 国際公開日	平成14年5月30日 (2002.5.30)		アストラゼネカ・アクチエボラーグ
(31) 優先権主張番号	60/252, 901		ASTRAZENECA AKTIEBO LAG
(32) 優先日	平成12年11月27日 (2000.11.27)		スウェーデン国エスエー-151 85セーデルティエ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 哺乳動物の腸に対する共生マイクロフローラの効果を調べるための方法およびそれに基づく胃腸関連疾患の治療

(57) 【要約】

哺乳動物の腸内共生マイクロフローラのコロニー形成に起因する化学変化を調べる方法であって、a) 共生細菌がコロニーを形成した腸内および無菌の腸内で少なくとも1つの遺伝子の遺伝子発現を測定すること、およびb) 共生細菌がコロニーを形成した腸と無菌の腸とで発現レベルが少なくとも2倍異なるa)の遺伝子を同定することを含む方法。この方法により、さらに進んだ評価のための遺伝子が選択され、予防的治療の開発が進む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 共生細菌がコロニーを形成した腸内および無菌の腸内で少なくとも 1 つの遺伝子の遺伝子発現を測定すること、および

b) 共生細菌がコロニーを形成した腸と無菌の腸とで発現レベルが少なくとも 2 倍異なる a) の遺伝子を同定すること

を含む哺乳動物の腸内共生マイクロフローラのコロニー形成に起因する化学変化を調べる方法。

【請求項 2】

ステップ a) の複数の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ分析および / または定量 RTP CR で測定する、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

in vitro 細胞培養物、下等真核生物モデル、または動物モデルからなる群から選択される系内で、b) で同定された遺伝子の機能を調べるステップ c) をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

i) トランスジェニック・ノックアウト、

ii) ドミナント・ネガティブ実験、

iii) 導入遺伝子の過剰発現、

iv) 抗体結合アッセイ、 20

v) 性質の明確な化学薬剤を用いた薬理的介入による、
からなる群から選択される方法を用いて機能を調べる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

共生細菌が *B. Thetaiotaomicron* である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

少なくとも 10 種類の遺伝子の発現を測定し、栄養素の摂取と代謝、ホルモン / 成熟応答、粘膜防御機能、解毒 / 薬剤耐性、腸管神経系 / 筋層の発生または活動、血管形成、細胞骨格 / 細胞外マトリックスの機能または発生、シグナル伝達、または他の細胞機能に関連する遺伝子から選択される前記遺伝子をステップ (a) で測定する、請求項 1 に記載の方法。 30

【請求項 7】

Na^+ / グルコースコトランスポーター (SGLT1)、ラクターゼ・フロリジン - ヒドロラーゼ、腓リパーゼ関連タンパク質 2、コリパーゼ、肝脂肪酸結合タンパク質、絶食誘導脂肪因子 (FIAF)、アポリポタンパク質 A - IV、ホスホリパーゼ B、CYP27 高親和性銅トランスポーター、メタロチオネイン I、メタロチオネイン II、フェリチン重鎖、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ・サブユニット、スクシニル CoA トランスフェラーゼ、トランスケトラゼ、リンゴ酸オキシドレダクターゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アデノシン・デアミナーゼ、オミシン・デカルボキシラーゼ抗酵素、15 - ヒドロキシプロスタグランジン・デヒドロゲナーゼ、GARG - 16、FKBP51、アンドロゲン制御輸精管タンパク質、短鎖デヒドロゲナーゼ、耐熱性抗原、減衰促進因子、重合 Ig 受容体、小型プロリン・リッチ・タンパク質 2a、血清アミロイド・タンパク質 A、CRP - ダクチン (MUC LIN)、ゼータ・プロテアソーム鎖、抗 DNA IgG L 鎖、グルタチオン S - トランスフェラーゼ、P - 糖タンパク質 (mdr1a)、CYP2D2、L - グルタミン酸トランスポーター、L - グルタミン酸デカルボキシラーゼ、小胞関連タンパク質 - 33、システイン・リッチ・タンパク質 2、平滑筋 (腸) アクチン、SM - 20、アンギオゲニン - 4、ゲルゾリン、デストリン、心筋 アクチン、エンド B サイトケラチン、フィブロンネクチン、プロテイナーゼ阻害剤 6、1 タイプ 1 コラーゲン、Pten、gp106 (TB2 / DP1)、rac2、Semcap2、血清およびグルココルチコイド制御キナーゼ、STE20 様タンパク質キナーゼおよび B 細胞ミエロイド・キナーゼ、グルタチオン・レダクターゼ、カルモジュリン、e1f3 サブ 40 50

ユニット、hsc70、オリゴサッカリル・トランスフェラーゼ・サブユニット、フィブリリン、H⁺-輸送ATPアーゼ、およびMsec23をコードする遺伝子からなる群から選択される少なくとも10種類の遺伝子の発現である、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

10種類の遺伝子が、コリパーゼ、減衰促進因子(DAF)、重合IgA受容体、小型プロリン・リッチ・タンパク質2a(Spr r 2 a)、アンジオゲニン-3、アンジオゲニン-4、Pten、CYP2D2、Spr r 2 a、rac2、およびMdr-1をコードする遺伝子を含む、請求項6に記載の方法。

【請求項9】

実質上すべての前記遺伝子の発現を測定する、請求項7に記載の方法。

10

【請求項10】

発現が少なくとも7倍異なる遺伝子をステップ(b)で同定する、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

腸内でアンジオゲニン-4またはコリパーゼが関与する生物化学的経路を評価することを含む、請求項3に記載の方法。

【請求項12】

哺乳動物の消化管内で特定の遺伝子の発現レベルを、治療または予防の目的で変化させる方法であって、請求項1に記載の方法を用いて同定される共生細菌の胃腸管内密度を、前記発現レベルの所望の変化をもたらすように変更することを含む方法。

20

【請求項13】

請求項1の方法を用いて同定される有効な共生細菌を用いて、上皮で発現される血管形成因子を調節することを含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

請求項1に記載の方法を用いて同定される有効な共生細菌を用いて、代謝を調節することを含む、請求項12に記載の方法。

【請求項15】

請求項1に記載の方法を用いて同定される有効な共生細菌を用いて、上皮の防御機能を調節することを含む、請求項12に記載の方法。

【請求項16】

胃腸疾患に薬剤として応用される化合物のスクリーニング方法であって、請求項1に記載の方法を用いて同定される遺伝子産物の活性を調節する能力について前記化合物を評価することを含む方法。

30

【請求項17】

請求項1に記載の方法を用いて同定される遺伝子産物の活性を調節する化合物の治療有効量を投与することを含む、胃腸疾患を治療しまたは予防する方法。

【請求項18】

小型プロリン・リッチ・タンパク質2a(spr r 2 a)またはrac2の活性または量を調節する能力について化合物をアッセイすることを含む、腸の防御機能の欠陥を特徴とする病状の治療または予防に潜在的に有用な化合物をスクリーニングする方法。

40

【請求項19】

腸の防御機能の欠陥を特徴とする病状の治療または予防用薬物の調製における、小型プロリン・リッチ・タンパク質2a(spr r 2 a)またはrac2の活性または量を調節できる化合物の使用。

【請求項20】

小型プロリン・リッチ・タンパク質2a(spr r 2 a)またはrac2の活性または量を調節できる化合物の治療有効量を投与することを含む、腸の防御機能の欠陥を特徴とする病状を治療または予防する方法。

【請求項21】

腸の生態のレギュレーターとして機能する遺伝子を同定するための方法であって、請求項

50

1に記載の方法を応用すること、およびこのような機能にこれまで関連づけられていない発現遺伝子を検出することを含む方法。

【請求項22】

マウスの腸で発現され、配列番号12および25のプライマーを用いて少なくとも部分的に増幅可能である遺伝子によってコードされるアンジオゲニン・タンパク質。

【請求項23】

タンパク質が、図4に示す配列番号29のタンパク質、その対立遺伝子変異体、または配列番号29と同一のアミノ酸配列を少なくとも85%有するタンパク質である、請求項22に記載のタンパク質。

【請求項24】

配列番号29のタンパク質である請求項23に記載のタンパク質。

【請求項25】

請求項22に記載のタンパク質をコードする核酸。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【技術分野】

本発明は、哺乳動物の腸内共生マイクロフローラのコロニー形成に起因する変化を調べるための方法、および得られた情報を消化管の改変および胃腸関連疾患の治療に有用な薬剤の製造および療法に使用することに関する。

【0002】

【背景技術】

哺乳動物一般、特にヒトには、非常に複雑な多量の微生物集団が棲息している。このマイクロフローラ構成成分との接触は、生まれた時に始まる。ヒトの腸には、他のどんな粘膜表面よりも微生物が密集している。したがって、この器官は、マイクロフローラが宿主の生理に顕著な影響を及ぼす可能性が高い部位である。

【0003】

病原性または他の潜在的に有害な侵入微生物の効果は調べられているが(例えば、L. Eckmann等、J. Biol. Chem. 2000、275:14084~14094、D. A. Relman、Science、1999年5月21日:284(5418)1308~10、D. A. Relman、Curr. Opin. Immunol. 2000年4月:12(2):215~8を参照)、共生細菌が通常どのように発生し、どのような生理を示すかについては驚くほどわずかしら知られていない。これは、部分的には、非病原性の微生物が宿主の生態をどのように調節しているかを調査するための明確な実験的に扱いやすい*in vivo*モデル系が不足しているためだけでなく、これら微生物が、消化プロセスなどに有意な影響を与えないという見解が一般的であるためでもある。

【0004】

これまで、*Bacteroides thetaiotaomicron*でコロニーを形成させた成体無菌動物を用いたモデルを使用して、この共生微生物が無菌マウスに導入された後に回腸上皮フコシル化グリカンの産生を制御することが示され、また、この微生物がそれ自身の栄養摂取のためにこれらグリカンの産生を制御する方法が詳細に叙述されてきた(L. Bry等、Science 273、1380、1996; L. V. Hooper等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96、9833(1999))。これ以外、常在菌が腸の遺伝子発現をどのように調節するのか、また、それが宿主の状態にどのように影響するかについては実質的に何もわかっていない。

【0005】

本出願人は、共生マイクロフローラが消化管の生理および成熟を規定するのに大いに寄与することを見出し、これを分子レベルで試験する手段を開発した。

【0006】

【発明の概要】

本発明の第1の態様によれば、哺乳動物の腸内共生マイクロフローラのコロニー形成に起因

10

20

30

40

50

する変化を調べるための方法であって、

a) 共生細菌がコロニーを形成した腸内および無菌の腸内で少なくとも1つの遺伝子の遺伝子発現を測定すること、および

b) 少なくとも1つの共生細菌がコロニーを形成した腸と無菌の腸とで発現レベルが少なくとも2倍異なるa)の遺伝子を同定することを含む方法が提供される。

【0007】

適切には、複数の遺伝子の発現は、後述のDNAマイクロアレイ分析および/または定量RT-PCRによって測定するが、他の従来法を使用することもできる。このような方法の例は、定量ノーザン・プロット法ならびに2個の試料間で異なる遺伝子を検出するPCRを基礎としたアッセイであるリプレゼンティショナル・ディファレンス分析(Representational Differentiation分析)(RDA)(例えば、Odeberg J等、Biomol. Eng. 17、1~9、2000)である。特に、高密度オリゴヌクレオチド・アレイの使用が、マイクロフローラの構成成分によって形成される範囲の腸機能を包括的に分析するために好ましい。

10

【0008】

マイクロアレイ分析は、腸で見られるような複数のタイプの細胞からなる複合組織内の宿主の応答を測定するために使用することができる。所与の微生物に対する宿主細胞の応答を詳細に示すin vivoモデルの価値は、細胞培養に基づくモデルとは異なり、その応答形成に対する系統因子および環境因子の寄与が維持され、無菌実験系で研究できることにある。

20

【0009】

好ましい実施形態では、応答細胞集団はその発現されたmRNA集団を攪乱することなく回収され、そのため微生物に対するその反応の特性を定量的に明らかにすることができる。これは、2つの技術、すなわちレーザー・マイクロダイセクション(laser-capture microdissection)(LCM)と、その後のレーザー捕捉試料の定量分析、例えば定量PCRおよび/またはマイクロアレイ分析とを、組み合わせることにより適切に実施される。

【0010】

本発明の方法を用いると、in vivoの宿主応答を複合組織中の特定の細胞集団に帰属させ、この細胞応答を定量的に記述することが実際に可能になる。腸の生態および宿主の生理の重要ではあるがこれまで価値を認められていなかったレギュレーターとして機能する宿主の遺伝子を同定することができる。原型の消化管内共生生物によるコロニー形成に対する応答に基づいて同定される遺伝子は、治療処置の全く新しい標的となる可能性がある。腸内微生物は、数百万年にわたる膨大な淘汰の外圧を受けて、微生物と宿主の両者がその相互関係から恩恵を得るようにその宿主を操作する微妙ではあるが有効な方法を見出してきた。微生物宿主の遺伝子標的に影響を及ぼす細菌遺伝子産物を同定し試験することにより、化学構造および作用機序がこれまで評価されなかった、または評価できなかった新しい薬剤を得ることができる。

30

【0011】

本発明の方法に使用される無菌の腸および共生細菌がコロニーを形成する腸は、どんな動物モデルのものでもよいが、特に単純な腸-微生物相互作用マウス・モデルが使用される。

40

【0012】

この方法によって、個々の共生細菌の、ならびに必要なならばこれらの組み合わせの効果を調べることが可能になる。

【0013】

本出願人は、免疫-炎症プロセスに関与または関連する遺伝子が、本発明の方法を用いて同定されそうにないことを見出した。このことは、宿主が、B. Thetaiotaomicronなどの消化管内定住微生物をその寿命全体にわたって棲息させる必要があることと矛盾しない。しかし、本発明の方法を使用して、この知見を他の共生細菌で確認す

50

ることができる。

【0014】

次に、このようにして同定した遺伝子とその機能を、例えば消化プロセスに対するその効果を決定するためにさらに調べることができる。このさらに進んだ研究は、例えば任意の従来法を用いて実施することができる。

【0015】

好ましい実施形態では、本方法は、(c) b) で同定された遺伝子の機能をさらに調べるステップをさらに含む。これを実施できる適切な方法には、*in vivo*細胞培養アッセイにおける研究または下等真核生物モデルにおける研究ならびにトランスジェニック動物モデルなどの動物モデルにおける研究が含まれる。

10

【0016】

遺伝子、その関連遺伝子および遺伝子産物が操作および分析に利用可能である限りは、*in vitro*細胞培養アッセイ法によって、動物個体よりも簡単な系での研究が可能になるはずである。

【0017】

酵母(例えば、*Saccharomyces cerevisiae*)、ショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)、線虫(*Caenorhabditis elegans*)などの下等真核生物モデルは、ゲノムおよび多くの場合細胞機能が極めて明確な真核生物である。哺乳動物において研究対象となっている基本的特徴的機能のいくつかは、より単純な真核生命体においても維持されており、そのためそれらが分子的な事象の明確なモデルとして極めて魅力的なものになっている。これらの生物は哺乳動物よりも取り扱いが容易である。

20

【0018】

これらの系においては、この機能は、

i) トランスジェニック・ノックアウト、

ii) ドミナント・ネガティブ実験、

iii) 導入遺伝子の過剰発現、

iv) 抗体結合アッセイ、

v) 性質の明確な化学薬剤を用いた薬理的介入(*Pharmacological intervention*)による、などの方法を用いて調べることができる。

30

【0019】

トランスジェニック・ノックアウト法は、例えば、遺伝子産物が正常に機能しないように遺伝子を欠失または変異させる、または遺伝子を無効にするアンチセンス・オリゴヌクレオチドを導入する組換えDNA技術を用いて、生物内遺伝子を不活性化することに基づいている。後者の場合、遺伝子のメッセンジャーRNA分子(mRNA)に相補的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドを生物内に導入する。遺伝子の転写の所産であるメッセンジャーRNA分子(mRNA)は一本鎖であり、それが二本鎖の場合はタンパク質配列に翻訳することができない。二本鎖RNAはこの相補的断片によって形成され、得られる二本鎖RNA断片がさらにプロセシングされることはない。したがって、この遺伝子からはタンパク質は産生されない。これは通常、一過性の実験として実施される。すなわち、アンチセンス断片を細胞、モデル生物、または哺乳動物モデルに加えると、有効なアンチセンスがある限り遺伝子発現は起こらない。それが消費されると、正常な機能を取り戻し、正常/制御状態が回復されることになる。

40

【0020】

古典的なトランスジェニック・ノックアウト法は、変異を受けた、したがって正常に機能しない遺伝子を胚性細胞株に導入することを基礎としている。次いで、この細胞株を、正常な胚盤胞中に導入し、それによって正常なバックグラウンド由来の、および胚性幹(ES)細胞株由来の生殖細胞からなるキメラ胎児が生成される。数回の交配を経ると、このES細胞由来の変異型対立遺伝子が、生殖細胞中に見られるようになり、したがって子孫に伝達可能になる。

50

【0021】

今回、新しい技術によって、このような突然変異のサイレントで不活性型の遺伝子が可能となり、その結果、発育が完了した時に、成体においてそれらを活性化させることが可能になる。このことは、そのような沈黙突然変異の成獣、特にマウスを、その変異遺伝子の発現を活性化する化学薬剤（ホルモン、抗生物質）に曝すことによって実施される。

【0022】

遺伝子の機能を破壊する別の方法は、ドミナント・ネガティブ実験を実施することである。この場合、標的細胞系譜において極めて高度な発現を可能にするプロモーターの転写調節の下で、欠陥のある遺伝子をモデル生物のゲノム中に導入する。この遺伝子産物を産生し、細胞内の所期の作用部位に輸送すると、この遺伝子産物は正常な遺伝子産物とこれらの部位をめぐって競争することになる。この導入遺伝子はより多量にあり、所期の機能を果たすことができないので、最終的にこの機能が攪乱されることになる。

10

【0023】

特定の系またはモデルにおける遺伝子の過剰発現の効果も調べることができる。この場合、複数の遺伝子コピーを試験生物に導入することも、遺伝子を高度に発現する特定のプロモーターを使用することもできる。

【0024】

導入遺伝子の過剰発現が関与する古典的トランスジェニック実験には、そのモデルには通常は存在しない遺伝子（例えば、ヒト特異的遺伝子をマウスに）を導入して、細胞の機能および/または生理に対するこの遺伝子の効果を評価することが含まれる。必要に応じ、この導入遺伝子を、最適な細胞集団を対象として発現するように、組織特異的プロモーター配列の制御の下に置くことができる。プロモーターは、体全体の全身的発現用のものと、限定された器官部位にある特異的な少数の細胞集団の極めてわずかな分布用のものの両者が存在する。

20

【0025】

遺伝子の効果を調べる他の手段は、遺伝子産物によるタンパク質レベルでの介入である。例えば、抗体結合アッセイを使用して、タンパク質が細胞、モデル生物、または哺乳動物内に存在するかどうかを決定し、かつ/または遺伝子産物に特異的に結合してその機能を抑制して、その所期分子パートナーとの相互作用能力を妨害することができる。

【0026】

性質の明確な化学薬剤を用いた薬理的介入は、遺伝子が、特定のクラスの分子、例えば、Gタンパク質共役受容体、プロテアーゼ、または核内受容体に属することが確認できれば、このタイプの分子の作用薬または拮抗薬として作用することが知られている薬品を用いてその機能を評価することができ、特に有用であろう。

30

【0027】

本発明の方法にはどんな共生細菌でも使用することができる。特にその例としては、*Bacteroides thetaiotaomicron*、大腸菌、*Bifidobacterium infantis*、またはこれらの混合物、または従来法によって飼育された種から得られる完全な回腸および/または盲腸のマイクロフローラがある。本方法での使用に特に適した細菌は、*B. Thetaiotaomicron*である。本出願人は、共生フローラの様々なメンバーが異なる結果をもたらし、種間で高度な特異性を示すことを見出した。

40

【0028】

本発明の方法は、この共生生物が消化管遺伝子の発現に対して予期せぬ範囲の影響を与えることをすでに示した。適切に特許請求された広範な遺伝子の発現は、本発明の方法のステップ(a)で測定される。このような遺伝子の例は、栄養素の摂取と代謝、ホルモン/成熟応答、粘膜防御機能、解毒/薬剤耐性、異物代謝、運動性、腸管神経系/筋層の発生または活動、血管形成、細胞骨格/細胞外マトリックスの機能または発生、シグナル伝達、および他の基本的な細胞機能に関連する遺伝子である。

【0029】

50

研究対象とすることができる栄養摂取および代謝の遺伝子には、 Na^+ / グルコースコトランスポーター (SGLT1) やラクターゼ・フロリジン - ヒドロラーゼ遺伝子などの炭水化物の摂取と代謝に関連する遺伝子、すいりパーゼ関連タンパク質2 (pancreatic lipase-related protein 2)、コリパーゼ、肝脂肪酸結合タンパク質、絶食誘導脂肪因子 (fasting induced adipose Factor) (FIAF)、アポリポタンパク質A - IV、ホスホリパーゼB、CYP27遺伝子などの脂質の摂取と代謝に関連した遺伝子、高親和性銅トランスポーター、メタロチオネインI、メタロチオネインII、フェリチン重鎖遺伝子などの金属の摂取または隔離の遺伝子、またはイソクエン酸デヒドロゲナーゼ・サブユニット、スクシニルCoAトランスフェラーゼ、トランスケトラーゼ、リンゴ酸オキシドレダクターゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子などの細胞エネルギー生成が含まれる。

10

【0030】

ホルモン / 成熟応答に関連する遺伝子の例は、アデノシン・デアミナーゼ、オミシン (omithine) ・デカルボキシラーゼ抗酵素、15 - ヒドロキシプロスタグランジン・デヒドロゲナーゼ、GARG - 16、FKBP51、アンドロゲン制御輸精管タンパク質、短鎖デヒドロゲナーゼ、および耐熱性抗原遺伝子である。

【0031】

粘膜防御機能に関連する遺伝子の例は、減衰促進因子 (decay - accelerating Factor)、重合体Ig受容体、小型プロリン・リッチ・タンパク質2a (small proline - rich protein 2a)、血清アミロイド・タンパク質A、CRP - ダクチン (ductin) (MUCCLIN)、ゼータ・プロテアソーム鎖 (zeta proteasome chain)、および抗DNA IgG L鎖遺伝子である。

20

【0032】

解毒 / 薬剤耐性に関与する適切な遺伝子には、グルタチオンS - トランスフェラーゼ、P - 糖タンパク質 (mdr1a) およびCYP2D2遺伝子が含まれる。腸管神経系 / 筋層の発生または活動に関連する遺伝子の例は、L - グルタミン酸トランスポーター、L - グルタミン酸デカルボキシラーゼ、小胞関連タンパク質 - 33 (vesicle - associated protein - 33)、システイン・リッチ・タンパク質2 (cysteine - richタンパク質2)、平滑筋 (腸) アクチン、およびSM - 20遺伝子である。

30

【0033】

RNアーゼ・スーパーファミリー・メンバーには、いくつかのアンジオゲニンが含まれる。これには、本出願人らがその配列を決定し、腸に特異的で上皮に存在しその発現が微生物叢の構成成分によって制御されているように見える点で特に興味深いことが判明したアンジオゲニン - 4も含まれる。ネズミのアンジオゲニン - 4の配列が、最近報告された (D. E. Holloway等、protein Expression and Purification、(2001)、22:307)。

【0034】

本出願人らは、驚くべきことに、このような一遺伝子、特にアンジオゲニン - 4遺伝子が腸管上皮中で発現され、発現レベルが共生細菌の影響を特に受けることを見出した。

40

【0035】

細胞骨格 / 細胞外マトリックスの機能に関連する遺伝子の例は、ゲルゾリン、デストリン、心筋 アクチン、エンドBサイトケラチン、フィブロネクチン、プロテイナーゼ阻害剤6および1タイプ1コラーゲン遺伝子である。

【0036】

シグナル伝達遺伝子には、Pten、gp106 (TB2 / DP1)、rac2、Semcap2、血清およびグルココルチコイド制御キナーゼ、STE20様タンパク質キナーゼ、およびB細胞ミエロイド・キナーゼ (myeloid kinase) が含まれる。(rac2遺伝子に関連するシグナル経路は、粘膜防御機能に影響することが知られてい

50

る。)

【0037】

最後に、基本的な細胞機能に関連するその他の遺伝子の例は、グルタチオン・レダクターゼ、カルモジュリン、e1F3サブユニット、hsc70、オリゴサッカリル・トランスフェラーゼ・サブユニット(oligosaccharyl transferase subunit)、フィブリラリン、H⁺-輸送ATPアーゼ、およびMsec23遺伝子である。

【0038】

本発明の方法では、適切には、少なくとも10種類のこのような遺伝子がステップ(a)で測定される。上記列挙したすべての遺伝子の発現を測定することが好ましい。

10

【0039】

本発明によれば、発現が少なくとも2倍の遺伝子が同定され、選択されてさらに調べられる。適切には、発現が少なくとも4倍、より適切には少なくとも5倍、さらに適切には7倍、好ましくは9倍の遺伝子がステップ(b)で同定され、選択されてさらに調べられる。

【0040】

B.Thetaiotaomicronのコロニー形成後に本発明の方法を用いてすでに同定されているいくつかの特定の遺伝子は特に興味深い。この遺伝子には、コリパーゼ、減衰促進因子(DAF)、重合体IgA受容体、小型プロリン・リッチ・タンパク質2a(Spr r2a)、{アンジオゲニン-3}Pten、CYP2D2、Spr r2a、r 20
rac2、およびMdr-1が含まれる。この遺伝子には、アンジオゲニン-3に関係し、新たに発見されたタンパク質であるアンジオゲニン-4も含まれる。

20

【0041】

これらの遺伝子は治療上有用な機能を有するかもしれず、したがって、これら1つまたは複数の遺伝子の発現を、研究中の特定の共生細菌がその発現に与える影響を検出するために、本発明の方法で測定することが好ましい。

【0042】

具体的には、本発明の方法により、コリパーゼ、および配列番号12および25(アンジオゲニン-4)などのプライマー(下記表3参照)を用いてその遺伝子を増幅可能であるアンジオゲニンなどのアンジオゲニン類、ならびにSpr r2aおよびrac2の発現を、さらに研究すべきであることが判明した。

30

【0043】

したがって、本発明は、配列番号12および25(アンジオゲニン-4)などのプライマー(下記表3参照)を用いてその遺伝子を増幅可能であるアンジオゲニンが腸内で関与する生化学的経路の評価をさらに含む。

【0044】

別の実施形態では、本発明はコリパーゼが腸内で関与する生化学的経路の評価をさらに含む。

別の実施形態では、本発明はSpr r2aが腸内で関与する生化学的経路の評価をさらに含む。

40

別の実施形態では、本発明はrac2が腸内で関与する生化学的経路の評価をさらに含む。

評価は、上述の方法も含めてどんな適切な方法を用いても実施することができる。

【0045】

本発明の方法を用いた遺伝子の同定、ならびにこれらに関連する生化学的経路のさらに進んだ研究は、胃腸管の疾患または障害の予防的または治療的な処置をもたらすものである。具体的には、共生細菌の存在または非存在によりどの遺伝子が最も影響を受けるか、また、病状、疾患、または障害に関連する生化学的経路にどの遺伝子が関与しているかを明らかにすることで、この病状、疾患、または障害を治すために特定の遺伝子の発現を変化させることを目的とした治療法を開発することが可能になるはずである。あるいは

50

、遺伝子産物によって維持される生化学的経路に薬理的に介入することが可能になるはずである。

【0046】

このことは、適切な共生細菌を投与することによって実施することができる。所望のマイクロフローラの集団を増加させることは、例えば、錠剤、医薬品または栄養補給組成物、さらには生きているヨーグルト培養物などの食品の形で、この細菌を経口投与することによって実施することができる。

具体的には、本発明は、上皮で発現される血管形成因子を、それに変調をもたらす共生細菌のコロニー形成によって調節する方法を提供する。

【0047】

このような方法の別の具体例は、代謝、特に食事性脂質の代謝を調節する方法であり、この方法は、この代謝に効果があることが上述の方法を用いて確認された共生細菌を使用するものである。

さらに別の具体例は、上述の方法を用いて確認された共生細菌を使用して上皮防御機能を調節する方法である。

【0048】

別の例は、血管形成またはシグナル伝達を調節することが本発明の方法を用いて確認された、腸内に存在する共生細菌の集団を調節することによって、腸の腫瘍を予防または治療する方法である。

【0049】

さらに別の態様では、本発明の方法は、消化管内の不適切なレベルの遺伝子発現によって引き起こされた疾患や病状の診断に有用となり得る。ある患者から採取された共生マイクロフローラの分析から、上述のマイクロフローラの個体数の自然変動が大きいことがわかる。しかし、本発明の方法を用いて同定される共生マイクロフローラの量の著しい増加または減少を検出することによって、特定の遺伝子が異常な量で発現し、そのため疾病状態または病状を招いていることを示せるかもしれない。このような病状の治療は、適宜、上述したように共生細菌の量を変化させるか、細菌もしくはヒトの遺伝子産物もしくは誘導体を直接投与するか、この遺伝子産物の化学的もしくは生物学的阻害薬もしくは拮抗薬を用いるなど遺伝子産物をタンパク質レベルで阻止する手段のいずれかによって実施することができる。

【0050】

本発明の方法を一般に使用して、ヒト、および微生物が多数存在するこの世界に棲息する他の無数の種に問われる問題に取り組むことができる。すなわち、細菌は、その宿主の生理と成熟にどのように寄与し、それをどのように調節しているのだろうか。ヒトの場合、我々の祖先とその微生物パートナーの共進化を含む長い淘汰のプロセスの間に発達した複雑な調節メカニズムの組み合わせが、マイクロフローラの構築と維持に関与していることは間違いない。以下に示す結果は、重要な生理機能に関わる遺伝子の発現に対する常在菌種の影響を実証しており、我々の生態を我々の複雑な定住菌群の生態と関連させて考えることの重要性を強調している。

【0051】

この結果は、明確な *in vivo* モデルを使用して、周囲の細胞および環境の影響を維持しながら、微生物に対する複合組織内の指定細胞集団の応答を推定することの実用性も実証している。

【0052】

これらのモデルおよび手法は、ヒトの健康に対する微生物の広範な寄与を評価することを可能にし、治療上有益な微生物産物の同定を可能にする。さらに、これらのモデルおよび手法は、これら宿主 - 微生物の正常な関係が様々な疾患プロセスにどのように影響しているかを明らかにし、何が病原性関係を構成しているかについて新たな展望と定義を提供するはずである。

【0053】

10

20

30

40

50

しかした、本方法は、多数の遺伝子または遺伝子産物が腸組織中で重要な効果を持ち、このような遺伝子または遺伝子産物を患者に有益な方法で標的とするような医薬品を開発できる可能性を高めているように見えることをすでに明らかにしている。このことは、遺伝子産物の活性を調節する化合物をスクリーニングすることによって実施することができる。

【0054】

本発明の別の態様は、腸の生態のレギュレーターとして機能する遺伝子を同定するための方法を含み、この方法は、上述の方法を適用すること、およびこのような機能にこれまでは関連づけられていない発現遺伝子を検出することを含む。

【0055】

したがって、本発明のさらに別の態様は、胃腸疾患の薬剤として応用できる化合物をスクリーニングする方法を含み、この方法は、上述の方法を用いて同定される遺伝子の産物の活性を調節する能力でこの化合物を評価することを含む。

【0056】

本発明のさらに別の態様は、請求項1に記載の方法を用いて同定される遺伝子の産物の活性を調節する化合物の治療有効量を投与することを含む、胃腸疾患を治療または予防する方法である。

【0057】

具体的には、以下に報告する結果に基づいて、本発明は、さらに、小型プロリン・リッチ・タンパク質2a (sprr2a) またはrac2の活性または量を調節する能力によってその化合物を評価することを含む、腸の防御機能の欠陥を特徴とする病状の治療または予防に潜在的に有用な化合物をスクリーニングする方法を提供する。

適切なスクリーニング法は、当業者には明らかにはずである。この化合物は、同定されると腸の防御機能を含む病状の治療または予防に有用である。

【0058】

したがって、本発明のさらに別の態様は、腸の防御機能の欠陥を特徴とする病状の治療または予防用の薬物を調製する際に、小型プロリン・リッチ・タンパク質2a (sprr2a) またはrac2の活性または量を調節できる化合物を使用することを含む。

適切には、この化合物は、医薬品組成物として処方される。このタイプの新規組成物およびその調製は本発明のさらに別の態様を形成する。

【0059】

【発明の詳述】

共生細菌によって調整された腸内の変化を分子レベルで調べるために、正常なマウスおよびヒトの腸マイクロフローラの主要な構成成分である *Bacteroides thetaiotaomicron* を含めた共生細菌を用いて、無菌マウスにコロニーを形成させた。

コロニー形成に対する腸の包括的な転写応答を高密度オリゴヌクレオチド・アレイを用いて詳細に記述し、特異的応答の細胞起源をレーザー・マイクロダイセクションおよびリアル・タイム定量RT-PCRで確立した。

【0060】

以下に示す結果から、共生細菌が多数の遺伝子の発現を調節し、そのいくつかの発現は有意なレベルで調節されることがわかる。これに関係する遺伝子は、栄養素吸収、粘膜防御、および異物代謝を含めた消化管の多様な基本的生理機能に関与する。コロニー形成に関連した遺伝子発現のいくつかの変化が種によって異なることは、常在マイクロフローラ組成の変化によってヒトの生理がどのように影響されるかを強く示唆するものである。

【0061】

また、いくつかの共生生物は生後の発育の移行に、ある役割を演じているように見える。哺乳-離乳の移行に付随する変化は、成体のマウスでは *B. Thetaiotaomicron* によって誘発されたことから、常在菌が生後の消化管の発育に指導的な役割を演じていることが示唆される。

10

20

30

40

50

【0062】

明確な *in vivo* モデルをゲノムに基づく包括的分析と組み合わせると、このように、宿主の生態に対する定住微生物の重要な寄与を確認するための強力な手法となる。

【0063】

Bacteroides thetaiotaomicron は、遺伝子操作可能な嫌気性菌であり、成体マウスとヒト双方の消化管マイクロフローラの主要なメンバーであるので、腸の生態に対する定住細菌の影響を明確にする初期研究用に選択された。また、*B. thetaiotaomicron* は、通常、哺乳 - 離乳移行、すなわち消化管の機能が急速かつ顕著に成熟する時期に、小腸の末端（回腸）にコロニーを形成する（W. E. C. Moore、L. V. Holdeman、*Appl. Microbiol.* 27、961 (1974)、T. Ushijima、M. Takahashi、K. Tatewaki、Y. Ozaki、*Microbiol. Immunol.* 27、985 (1983)）。

10

【0064】

コロニー形成は、宿主の脂質吸収機構の4つの構成成分の発現亢進を含めた協奏的な応答を誘発した。すいりパーゼ関連タンパク質 - 2 (PLRP-2) およびコリパーゼをコードする mRNA は、それぞれ平均4倍および9倍増加した（表1および2）。PLRP-2 は、トリおよびジアシルグリセロール、リン脂質、およびガラクトリピドを加水分解する。コリパーゼは、PLRP-2 活性を増大させる（M. E. Lowe、M. H. Kaplan、L. Jackson-Grusby、D. D'Agostino、M. J. Grusby、*J. Biol. Chem.* 273、31215 (1998)）。また、腸細胞内の脂肪酸輸送に関わる豊富なサイトゾル・タンパク質をコードする L-FABP mRNA が4~6倍に増加し、腸細胞の基底外側表面から分泌されるトリグリセリド・リッチ・リポタンパク質（キロミクロン、VLDL）の主要な成分であるアポリポタンパク質 A IV が誘導された（表1）。

20

【0065】

コロニー形成は、腸の Na⁺/グルコースコトランスポーター (SGLT-1) mRNA 量を増加させた。すいりパーゼ関連タンパク質 - 2 (PLRP-2)、コリパーゼ、肝脂肪酸結合タンパク質 (L-FABP)、およびアポリポタンパク質 A - IV を含めて、宿主の脂質吸収/搬出機構のいくつかの構成成分の発現も協奏的に増加した（下記表1参照）。

脂肪摂食によって抑圧されることが知られている新規な PPAR 標的 (S. Kersten 等、*J. Biol. Chem.* 275、28488 (2000)) である絶食誘導脂肪因子の発現が顕著に減少したことで、コロニー形成されたマウスの脂質摂取が増大したことのさらなる証拠が提供された。

30

【0066】

特にこれら6種類の遺伝子の発現が変化したことは、*B. thetaiotaomicron* が宿主の栄養素吸収/処理能力の増加を誘発することを示し、なぜ無菌のげっ歯動物がその体重を維持するために、通常マイクロフローラを有するげっ歯動物よりも高カロリー摂取が必要であるかを部分的に説明していると考えられる（B. S. Wostman、C. Larkin、A. Moriarty、E. Bruckner Kardoss、*Lab. Anim. Sci.* 33、46 (1983)）。

40

【0067】

また、本出願人は、コロニー形成が食事性金属 (dietary metal) の吸収に関与する4種類の遺伝子の発現に変化をもたらすことを見出した。上皮の高親和性銅トランスポーター (CRT1) mRNA が増加し、一方メタロチオネイン - I、メタロチオネイン - II、フェリチンH鎖 mRNA が減少した（表1）。これらの変化は、コロニー形成が（例えば、CRT1 経路の）重金属吸収能の増加を引き起こし、同時に、重金属を細胞内に隔離する能力 (MT - I / II、フェリチン) の減少を引き起こすことを示唆している。このことは、宿主自身の代謝経路での利用の増加、または微生物との競合のいずれかのために、これらの化合物に対する宿主の要求が増大することを意味する。SGLT

50

- 1、コリパーゼ、L-FABP、およびMT1（と以下に考察する他の8種類のmRNA）の変化は、qRT-PCRで個別に確認された（C. A. Heid、J. Stevens、K. J. Livak、P. M. Williams、Genome Res. 6、986（1996）（下記表2参照））。

【0068】

コリパーゼは、すい臓トリグリセリド・リパーゼおよびPLRP-2の両者の活性を刺激することにより、食事性脂質の代謝に重要な役割を果たす。また、プロコリパーゼ（procolipase）のタンパク質分解切断によって、脂肪摂取の満腹シグナルとして機能するペントペプチド（エンテロスタチン）を生成する（S. Okada、D. A. York、G. A. Bray、Physiol. Behav. 49、1185（1991））。以下に示すB. Thetaiotaomicronのコロニー形成後に見られる発現が有意に増加することは、これまで価値を認められていない、腸管上皮が消化管内定住細菌と共に食事性脂質代謝に寄与する機序を暗示している。

10

【0069】

無傷の粘膜防御は、腸の莫大な数の定住微生物を棲息させるために極めて重要である。その破壊は、宿主に、また管腔のマイクロフローの安定性に有害な免疫応答を起こすことがあり、炎症性腸疾患などの病的状態をもたらす（P. G. Falk等、Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62、1157（1998））。

【0070】

B. Thetaiotaomicronによるコロニー形成は、組織検査から判断して検出可能な炎症反応を起こさないことが判明した（L. Bry、P. G. Falk、T. M. Idtvedt、J. I. Gordon、Science 273、1380（1996））。また、応答に関与する多数の遺伝子の、マイクロアレイ上に表出する認識可能な誘発（または抑圧）もない。B. Thetaiotaomicronを導入してから10日後に、IgAを産生するB細胞の流入が回腸粘膜内で起こる。一方、共生生物によって誘導される同様のIgA応答は、T細胞には無関係であり、防御をより完全なものにすることがわかった（A. J. Macpherson等、Science 288、2222（2000））。

20

【0071】

防御機能に関与する遺伝子は、B. Thetaiotaomicronコロニー形成で観察される遺伝子発現変化の10%（7/71）を占める。マイクロアレイおよびqRT-PCR分析から、IgAを産生するB細胞の流入は、上皮にわたってIgAを輸送する重合体免疫グロブリン受容体（pIgR）の発現の増加を伴うことが明らかになった（表1、2）。上皮の上にある保護粘液層の1成分（MUCLIN；R. C. Delisle等、Am. J. Physiol. 275、G219（1998））と腸粘膜の防御/治療に関与する三葉型ペプチドに対する想定上の受容体（L. Thim、E. Mortz、Regul. Pept. 90、61（2000））の両者をコードするCRP-ダクチン遺伝子の発現も増大した。また、補体によって媒介される細胞崩壊を抑制する（M. E. Medof等、J. Exp. Med. 165、848（1987））、上皮尖端の表面タンパク質である減衰促進因子（DAF）の発現も増加する。pIgR、MUCLIN、およびDAFの発現が同時に亢進されると、細菌の上皮防御膜の通過を妨げるのに役立つはずであり、さらに腸分泌液中に存在する補体成分の微生物による活性化に続いて起こる恐れがある粘膜損傷も防止するはずである。

30

40

【0072】

B. Thetaiotaomicronを用いたコロニー形成によって減衰促進因子（DAF）の発現が5倍になることがわかった。DAFは、腸の上皮細胞の尖端表面上に存在し、補体によって媒介される細胞崩壊を抑制することが知られている（M. E. Medof、E. I. Walter、J. L. Rutgers、D. M. Knowles、V. N. Ussenzeig、J. Exp. Med. 165、848（1987））。DAF、pIgR、MUCLINの発現が同時に亢進されると、細菌の上皮防御膜の通過を妨げるの

50

に役立つはずであり、さらに腸分泌液中に存在する補体成分の微生物による活性化に続いて起こる恐れがある粘膜損傷を防止するはずである。

【0073】

*B. thetaiotaomicron*に対する最も顕著な応答は、小型プロリン・リッチ・タンパク質2 (*spr r 2 a*) mRNAの増加であった(表1)。qRT-PCR分析により、コロニー形成によりこのmRNAが 205 ± 64 倍に増加することが確認された(表2)。*Spr r 2 a*は、扁平上皮細胞の最終分化に関連するタンパク質ファミリーの1メンバーである。*Spr r*類は、角質細胞外被成分として、かつ主要なデスモソーム構成要素の1つであるデスモソームのデスモプラキンに結合する架橋タンパク質として、扁平上皮の防御機能に寄与する(P. M. Steiner t、L. N. Marekov、*mol. Biol. Cell* 10、4247(1999))。コロニー形成は、デスモソーム(デスモプラキン、プラコグロビン、プラコフィリン(*plakophilin*)、プレクチン)またはタイト・ジャンクション(*ZO-1*、オクルディン)に結合する他のタンパク質をコードする遺伝子の発現に顕著な変化(すなわち2倍以上)を生じなかった。

10

【0074】

腸内での*Spr r 2 a*の発現およびその微生物による制御は新規な知見である。扁平上皮防御への*spr r 2 a*の重要な寄与および*B. thetaiotaomicron*に対する*spr r 2 a*発現の劇的な応答はともに、このタンパク質が腸の防御機能に重要な役割を演じていることを示唆している。したがって、これは、特に*Spr r 2 a*が腸内で関与する生化学経路を評価することによって、本発明によるさらに進んだ研究に特に適した標的となる。

20

【0075】

離乳過渡期の顕著な指標は、主要な乳糖のラクトースを加水分解する腸細胞刷子縁酵素であるラクターゼ-フロリジン・ヒドロラーゼ(LPH)の減少である。LPH mRNA量は、従来法で飼育された動物の小腸全体で哺乳期間中に増加し、その後離乳中に回腸で減少する(S. D. Krasinski等、*Am. J. Physiol.* 267、G584(1994))。これら遺伝子の発現に対する共生細菌の効果は、この細菌が有意な影響を及ぼすかどうかを決定するうえで特に興味深い。

【0076】

本発明の方法を用いると、コロニー形成が、血管形成活性が実証されている分泌タンパク質であるアンジオゲニン-3類似のアンジオゲニン-4の発現を亢進する結果となることが見出されている(X. Fu等、*Mol. Cell Biol.* 17、1503(1997))、X. Fu等、*Growth Factors* 17、125(1999))。*B. T thetaiotaomicron*がコロニーを形成すると、配列番号12および配列番号25(アンジオゲニン-4)のプライマー(表1、2)で増幅することによって認識可能な血管形成因子の発現が11倍になることは、血管形成因子の新規な制御方式であることを意味し、したがって、本発明によるさらに進んだ研究の対象とすることができる。

30

【0077】

下記のレーザ・マイクロダイセクション(LCM)実験は、この応答の細胞起源を詳細に叙述している。それによれば、細菌の存在が腸の血管新生に影響することが示唆される。

40

【0078】

消化管は、摂取された多数の毒素および生体異物が最初に接する部位である。これらの化合物の解毒および代謝に対する管腔の細菌および上皮の相対的な寄与度を、従来法で飼育された動物で正確に叙述することは困難であった。無菌マウスに*B. T thetaiotaomicron*でコロニーを形成させると、これらのプロセスに参与するいくつかの遺伝子の発現が減少することが見出された(下記表1)。多様な求電子物質を解毒するグルタチオンS-トランスフェラーゼをコードするmRNAが減少し、それに応じてグルタチオンと抱合された化合物を上皮から搬出する多剤耐性タンパク質-1(*Mdr-1*)が減少する(R. W. Johnstone、A. A. Ruefli、M. J. Smyth、Tr

50

ends Biochem. Sci. 25、1 (2000))。ヒトの薬物酸化代謝に
関与するCYP2D2 (デブリソキン・ヒドロキシラーゼ) (M. Ingelman - S
undberg等、Trends Pharmacol. Sci. 20、342 (199
9))の発現も、コロニー形成により減少する。これらの遺伝子の発現が減少することは
、B. Thetaiotaomicron自体が宿主に有害な化合物の解毒に寄与するこ
とを示唆している。

【0079】

このチトクロムP - 450を欠乏させる遺伝的多型はヒトでは一般的であり、薬物酸化
代謝の変化と関連している (M. Ingelman - Sundberg、M. Oscar
son、R. A. McLellan、Trends Pharmacol. Sci. 20 10
、342 (1999))。これら3つの宿主遺伝子の発現が減少することは、B. the
taiotaomicronなどの共生細菌が宿主に有害となり得る化合物の解毒に寄与
していることを示唆している。このことは、正常なマイクロフローラの構成成分が薬物代謝
に関与する宿主遺伝子を調節でき、個体間のこのような代謝変動がどのようにしてこれら
個体の消化管内定住フローラの差異から生じるかを明示できることを示している。したが
って、これら遺伝子の発現に対する共生細菌の効果を本発明の方法を用いて評価すること
は有用と考えられる。

【0080】

Ptenは、両特異性タンパク質ホスファターゼ・ファミリーの1メンバーである。ヒト
のPTENハプロ不全は、腫瘍形成に対する感受性の増加と関連している (D. J. Ma
rsh等、Hum. Mol. Genet. 7、507 (1998))。また、Pten +
/- < - > Pten + / +キメラ・マウスは、結腸のポリープおよび腺癌を発生する (A
. DiCristofano、B. Pesce、C. Cordon - Cardo、P. P
. Pandolfi、Nat. Genet. 19、348 (1998))。Gp106の
ヒト相同体であるTB2 / DP1は、突然変異すると複数の腸腺腫を発生する遺伝子座の
1構成部分である (R. W. Burt、Adv. Exp. Med. Biol. 470、9
9 (1999))。マイクロフローラの1成分が、配列番号12および25 (アンジオゲニ
ン - 4) などのプライマー (下記表3参照) を用いてその遺伝子が増幅可能である血管形
成因子、PtenおよびGp106などの遺伝子の発現に影響するという発見は、腸細菌
が、消化管の内部で、または外部でさえも腫瘍形成を開始または進行させる一因となりう
る機序を考慮することの重要性を強調するものである。 30

【0081】

腸の運動性は、その腸管神経系 (ENS) によって制御されている。運動活性の調節不全
を伴う過敏性大腸症候群が主要な健康問題であるにもかかわらず、内因子および外因子の
ENS活性に対する相対的寄与度は十分に理解されていない。B. thetaiota
omicronなど共生細菌の消化管生理への影響は、腸管神経系 (ENS) および筋層で
発現される遺伝子に及ぶ。L - グルタミンートトランスポーターおよびグルタミン酸をG
ABAに転化するL - グルタミンートデカルボキシラーゼをコードするmRNAがいずれ
も増加したことから、ENSのグルタミン酸作動性神経に対するコロニー形成に伴う効果
が示唆される (M. T. Liu、J. D. Rothstein、M. D. Gershon 40
、A. L. Kirchgessner、J. Neurosci. 17、4764 (199
7))。神経伝達物質放出に関与するシナプトプレピン結合タンパク質である小胞関連タ
ンパク質 - 33 (P. A. Skehel等、Proc. Natl. Acad. Sci. U
. S. A. 97、1101 (2000))の発現の亢進も見られる。腸管 - アクチンと
システイン・リッチ・タンパク質2の2種類の筋特異的mRNAも同時に増加する。無菌
動物および従来法で飼育された動物のこれまでの電気生理学的研究により、マイクロフロー
ラが消化管の運動性にある役割を果たしていることが示唆された (E. Husebye、
P. M. Hellstrom、T. Midtvedt、Dig. Dis. Sci. 39、
946 (1994))。本発明の方法は、B. thetaiotaomicronなどの
消化管内定住微生物がどのように作用して運動性を調節しているかについて分子的詳細を 50

提供することができる。

【0082】

B. *Thetaiotaomicron* は、通常、離乳中にマウスやヒトの腸にコロニーを形成する (W. E. C. Moore, L. V. Holdeman, Appl. Microbiol. 27, 961 (1974), T. Ushijima, M. Takahashi, K. Tatewaki, Y. Ozaki, Microbiol. Immunol. 27, 985 (1983))。この時期は、マイクロフローラの組成の劇的な変化、および腸管上皮内の一連の重要な発育変化を特徴とする。これらの変化のうちいくつが腸細胞メカニズムによって制御されているか、また、いくつが間充織からまたは(食事性の、微生物の)管腔因子から発せられる外因性シグナルによって制御されているかは不明である。

10

【0083】

発現を分析すると、驚くべきことに、成体無菌マウスの B. *thetaiotaomicron* によるコロニー形成が、従来法で飼育された動物の成熟した腸に通常発生する変化によく似た別の応答を誘発することが明らかとなった。主要な乳糖(ラクトース)を加水分解するラクターゼの発現は、通常離乳期中に減少する (S. D. Krasinski 等, Am. J. Physiol. 267, G584 (1994))。成体無菌マウスの B. *Thetaiotaomicron* によるコロニー形成は、回腸のラクターゼ mRNA の減少をもたらす(下記表1、2)。これらの知見は、生後に出現しつつある正常フローラのメンバーが腸の成熟にどのように寄与しうるかを示している。

【0084】

アデノシン・デアミナーゼ (ADA) およびポリアミン (スペルミン、スペルミジン) は、出生後の腸の成熟に重要な役割を果たす (G. D. Luk, L. J. Marton, S. B. Baylin, Science 210, 195 (1980), J. M. Chinsky 等, Differentiation 42, 172 (1990))。B. *Thetaiotaomicron* のコロニー形成は、ADA およびオルニチン・デカルボキシラーゼ (ODC) 抗酵素をコードする mRNA の5倍未満の増加をもたらすことが判明した。ポリアミン量によってその発現が影響される抗酵素は、ODC の代謝回転の重要なレギュレーターである (J. Nilsson, S. Koskineniemi, K. Persson, B. Grahm, I. Holm, Eur. J. Biochem. 250, 223 (1997))。したがって、抗酵素 mRNA 量の増加は、コロニー形成が回腸のポリアミン合成に影響することを示唆している。これらのデータは、消化管成熟の2クラスのレギュレーターであるアデノシンとポリアミンの合成を制御する遺伝子それ自体が、マイクロフローラのある成分によって調節されることを示しており、消化管の成熟に影響するカスケードの上流エフェクターとして細菌が働くというアイデアに通じるものである。その他下記コロニー形成実験は、他の消化管共生生物がこのような変化の操作能力を持つことを示している。

20

30

【0085】

哺乳 - 離乳移行に付随する消化管成熟の変化は、グルココルチコイドの増加によっても制御されていると考えられている (Physiology of the Gastrointestinal Tract, L. R. Johnson 編 (Raven Press, New York, 1994) 中の S. J. Henning, D. C. Rubin, R. J. Shulman, pp. 584 ~ 586)。以下に記述する B. *thetaiotaomicron* のコロニー形成は、グルココルチコイドによってその転写が抑制されることが知られている2つの遺伝子、すなわち15-ヒドロキシプロスタグランジン・デヒドロゲナーゼ (M. D. Mitchell, V. Goodwin, S. Mesnage, J. A. Keelan, Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 62, 1 (2000)) とグルココルチコイド減弱応答遺伝子 - 16 (glucocorticoid-attenuated response Gene-16) (J. B. Smith, H. R. Herschman, J. Biol. Chem 270, 16756 (1995)) の発現の減少を伴った。また、核内ホルモン

40

50

受容体ファミリー・メンバーとその生成物が相互作用する別の遺伝子であるイムノフィリンFKBP51の発現も減少した(S. C. Nair等、Mol. Cell. Biol. 17、594(1997))。しかし、個々のどの場合でも1/5未満には減少しなかった。したがって、本発明の方法を用いて他の共生細菌を調べて、それらがより重要な効果をもたらすかどうかを見ることができる。

【0086】

上述のとおり、本発明者らは、その遺伝子が上記配列番号12および25のプライマーを用いて増幅可能でありマウスの腸で発現される、アングリオゲニン・ファミリーのある特定のメンバーが、新規であることを発見した。したがって、このタンパク質とそれをコードする遺伝子は、本発明の別の態様を形成する。

10

【0087】

本発明のさらに別の態様は、以下の図4に示す配列番号29のタンパク質、その対立遺伝子変異体、または配列番号29と同一のアミノ酸配列を少なくとも85%持つタンパク質を提供する。

具体的には、本発明は配列番号29のタンパク質を提供する。

さらに別の態様では、本発明は上述のタンパク質をコードする核酸を提供する。

これらのタンパク質は、本発明のスクリーニング・プロセス用標的として有用である。

以下の実施例は本発明を例示するものである。

【0088】

実施例1

7~15週齢無菌NMRI/KIマウスの同年齢のグループを、プラスチック製ノトパイオート隔離装置に12時間の照明サイクルで飼育し、加圧滅菌された固形飼料の食餌(B & K Universal)を自由に採餌させた。オスに野生型B. thetaiotaomicron(VPI-5482菌株)(L. Hooper等(1999)、前掲)を接種した。マウスを10日後、照明を点けて2時間後に屠殺した。末端の1cmの小腸を使用して、押し出した管腔内容物のml当たりのコロニー形成単位数を規定した。

20

【0089】

管腔内容物のML当たり 10^7 以上のコロニー形成単位(CFU)のバクテリアを有するマウスから回腸RNAを単離した[以前の研究から、回腸の活発なコロニーを形成するには10日で十分であり、回腸上皮中のフコシル化グリカンの産生を完全に誘発するには 10^7 CFU/mlが必要であることがわかっている(L. Hooper等(1999)、前掲。L. Bry、P. G. Falk、T. Midtvedt、J. I. Gordon、Science 273、1380(1996))]。

30

【0090】

3個の独立したコロニー形成集団(colonizations)由来の4匹のマウスの小腸末端1cmに隣接する3cmの小腸から、および同年齢同性無菌マウス(n=8)から、RNA(QIAGEN Rneasy Kit)を用いて調製した回腸RNAの全サンプルを、ピオチン化cRNA標的の生成用にそれぞれ等量プールした。C. K. Lee等、Science 285、1390(1999)に概説された方法を用いて、30µgの各細胞RNAプール全体から2つの標的を個別に調製した。

40

【0091】

SYBR greenベースのリアル・タイム定量RT-PCR研究(N. Steuerwald等、Mol. Hum. Reprod. 5、1034(1999))を、下記表3に列記した遺伝子特異的プライマーおよびDNアーゼで処理したRNAを用いて実施した。

【0092】

各アンプリコン用シグナルは、プライマー・ダイマーやゲノムDNAからではなくcDNAに由来することをコントロール実験により確認した。シグナルは、内部参照mRNA(グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ)に対して規格化したものである。この規格化したデータを用いて、無菌およびコロニー形成した回腸中の所与のmRNAを定量

50

した (C_T 分析 ; Bulletin # 2、ABI Prism 7700 SEQUENCE Detection System)。

【 0093 】

【 表 1 】

表 3

遺伝子名	フォワード・プライマー	配列番号	レバース・プライマー	配列番号
Na ⁺ /グルコーストランスポーター(SGLT1)	5'- CAGAGACCCCAATTACTGGAGACA	1	5'- TCGTTGCACAATGACCTGATC	14
コリパーゼ	5'- TGACACCATCCTGGGCATT	2	5'- ACACCCGGTAGTAAATCCCATAAAGG	15
肝脂肪酸結合タンパク質 (L-FABP)	5'- CTCGGGCAAGTACCAATTGC	3	5'- TGTCCCTTCCCTTCTGGATGAG	16
メタロチオネイン I (MT-I)	5'- ATGTGCCCCAGGGCTGTGT	4	5'- AACAGGGTGGAACTGTATAGGAAGAC	17
重台免疫グロブリン受容体 (pIgR)	5'- CTTCCCTCCTGTCTCAGAGGT	5	5'- GGCCTAACTAGGCCAGGCTT	18
減衰促進因子 (DAF)	5'- CAACCCAGGGTACAGGCTAGTC	6	5'- GGTGGCTCTGGACAATGTATTTT	19
小型アロリン・リッチ・タンパク質 2a (spir2a)	5'- CCTTGTCTCCTCCCAAGCG	7	5'- AGGGCATGTTGACTGCCAT	20
多剤耐性タンパク質 (mdr1a)	5'- GCCGCTTCTTCCAAAGTCTACA	8	5'- CGTGTCTCTACTCCCCTTTCC	21
グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)	5'- CATCCAGCTCCTAGAAGCCATT	9	5'- GGGTTGCAGGAACCTTCTTAATTGTA	22
ラクターゼ-フロリジン・ヒドロラーゼ	5'- TTGAAATGGGCCACAGGCT	10	5'- AGCGGACTATGGAGGCGTAG	23
アデノシン・デアミナーゼ (ADA)	5'- GCGCAGTAAAGAAATGGCATT	11	5'- CTGTCTTGAGGATGTCCACAGC	24
アンギオゲニン-4	5'- TCGATTCCAGGTCACCCACTTG	12	5'- CACAGGCAATAACAATATATCTGAAA TCT	25
グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ	5'- TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC	13	5'- AAGATGGTGTGGGCTTCCCG	26

10

20

30

40

50

【0094】

各cRNAを、Unigene Build 4およびTIGRクラスター・データベースからの約25,000個のマウス・ユニーク遺伝子を有するAffymetrix Mu11KおよびMu19Kチップ・セットと、Affymetrixプロトコルに従い交雑させた。各チップから収集したデータを、各チップにわたる全体の蛍光強度が同等(目標強度=150)になるようにスケールリングした。「無菌」と「コロニー形成」の発現レベルを対ごとに比較した。

【0095】

3つの基準、すなわち、GeneChipソフトウェアが「増加」または「減少」の差異のある判定を返した、無菌cRNAまたはコロニー形成cRNAのいずれでもmRNAがGeneChipソフトウェアにより「プレゼント(present)」と呼ばれた、あるいは二重マイクロアレイ・ハイブリダイゼーション(duplicate microarray hybridizations)で差異が観測された、を満たす場合に、2倍以上の差異が記録された。

10

【0096】

118個のプローブ・セットで表されるmRNAが、コロニー形成により、二重マイクロアレイ・ハイブリダイゼーションで規定して少なくとも2倍になった。

【0097】

95個のプローブ・セットで表される転写産物が増加し、一方、23個のプローブ・セットで表される転写産物が減少したことが判明した。これらプローブ・セットの84個で表される遺伝子(71ユニーク遺伝子)を機能グループに割り当て、以下の表1に列記する。この表では、結果は、コロニー形成回腸と無菌回腸とのmRNA量の倍数差として表され、二重マイクロアレイ・ハイブリダイゼーションの平均値である。2個以上の別々のプローブ・セットで表される遺伝子の平均変化倍率を分けて列記する。

20

【0098】

¹ これらのプローブ・セットは、ファミリー・メンバー同士を区別しない。

【0099】

【表2】

表1

コロニー形成に関連した小腸遠位の遺伝子発現の変化

遺伝子	機能	GenBank/TIGR リファレンス	平均 倍率 Δ
栄養素の摂取と代謝			
炭化水素			
Na ⁺ /グルコースコトラン スポーター (SGLT1)	グルコースの摂取	AF163846	+2.4
ラクターゼ・フロリジン- ヒドロラーゼ	ラクトースの加水分解	AA521747	-2.2
脂質			
すいりパーゼ関連 タンパク質2	脂質の代謝	M30687	+4.1
コリパーゼ	脂質の代謝	AA611440	+9.4
肝脂肪酸結合タンパク質	脂質の代謝	Y14660	+4.0、 +5.6
アポリポタンパク質A-IV	脂質の代謝	M13966	+2.2
絶食誘導脂肪因子	脂質代謝の制御	AF278699	-9.0
ホスホリパーゼB	脂質の代謝	TC38683	-2.2
CYP27	コレステロール27- ヒドロキシル化	T025974	-2.2
金属			
高親和性銅トランスポー ター	銅の摂取	AA190119	+2.6
メタロチオネインI	Cu/Znの隔離	V00835	-4.6、 -6.1
メタロチオネインII	Cu/Znの隔離	K02236	-5.7、 -6.3
フェリチンH鎖	鉄の隔離	M24509	-4.5
細胞エネルギー生成			
イソクエン酸脱水素酵素 サブユニット	クエン酸サイクル	U68564	+2.4
チトクロムcオキシダーゼ・ サブユニット1	ミトコンドリアの 電子輸送	TC106691	+2.4
スクシニルCoA トランスフェラーゼ	ケトン体の利用	TC18674	+2.0
トランスケトラーゼ	ペントース・リン酸回路	u05809	+2.4
ホスホグルコン酸 デヒドロゲナーゼ	ペントース・リン酸回路	C81475	+2.8
リンゴ酸 オキシドレダクターゼ	リンゴ酸アスパラギン酸 シャトル	J02652	+6.0

10

20

30

40

【 0 1 0 0 】

【 表 3 】

遺伝子	機能	GenBank/TIGR リファレンス	平均 倍率 Δ
アスパラギン酸 アミノトランスフェラーゼ	リンゴ酸アスパラギン酸 シャトル	J02623	+2.5
ホルモン/成熟応答			
アデノシン・デアミナーゼ	アデノシンの不活性化	M10319	+2.3
オミシン・デカルボキシ ラーゼ抗酵素	ポリアミン量の制御	U52823	+2.4
15-ヒドロキシプロスタグラ ンジン・デヒドロゲナーゼ	プロスタグランジンの 不活性化	U44389	-3.2
GARG-16	グルココルチコイド産生 に対する応答	U43084	-4.0、 -4.5
FKBP51	ステロイド受容体複合体 の成分	U16959	-3.8
アンドロゲン制御輸精管 タンパク質	ステロイド産生	J05663	-3.3、 -3.4
短鎖デヒドロゲナーゼ	ステロイド/レチノイド の代謝	AF056194	-2.2、 -2.8
耐熱性抗原	造血分化マーカー	X53825	+3.0
粘膜防御機能			
減衰促進因子	補体の不活性化	D63679	+5.2
重合体Ig受容体	IgAの経上皮輸送	U06431	+2.3
小型プロリン・リッチ・タ ンパク質2a	架橋タンパク質	AJ005559	+10.6、 +102
血清アミロイドA タンパク質	急性位相応答 (acute phase response)	U60437	+2.8、 +5.4
CRP-ダクチンα (MUCLIN)	ムチン様タンパク質	U37438	+2.4
ゼータ・プロテアソーム鎖	抗原提示	AF019661	+2.8
抗DNA IgG L鎖		U55583	+2.5
解毒/薬物耐性			
グルタチオンS- トランスフェラーゼ	求電子体へのGSHの結合	L06047	-2.4
P-糖タンパク質 (mdr1a)	GSH複合化合物の搬出	M33581	-4.6
CYP2D2	4-ヒドロキシラーゼ	TC36686	-2.6
腸管神経系/筋層			
L-グルタミン酸 トランスポーター	グルタミン酸の摂取	U73521	+4.4
L-グルタミン酸 デカルボキシラーゼ	GABAの産生	M55253	+2.2
小胞関連タンパク質-33	神経伝達物質放出	AF157497	+2.2

10

20

30

40

【 0 1 0 1 】

【 表 4 】

遺伝子	機能	GenBank/TIGR リファレンス	平均 倍率 Δ
システイン・リッチ・タン パク質2	cGMPキナーゼI標的	AA028770	+3.2
平滑筋(腸)γアクチン	収縮性	M26689	+2.3
SM-20	成長因子応答遺伝子	TC33445	+4.8
カルシウム・チャネル5サブ ユニット	カルシウム・チャネルの 制御	AJ272046	-2.2
血管形成			
アンジオゲニン-4	不明	配列番号 29	+10.9
アンジオゲニン関連 タンパク質	不明	U22519	+6.4
アンジオゲニン・ファミ リー1			+2.4、 +6.0、 +7.0
細胞骨格/細胞外 マトリックス			
ゲルゾリン	アクチン結合タンパク質	J04953	+7.9
デストリン	アクチン脱重合因子	W17549	+3.0
心筋αアクチン	収縮性	M15501	+3.4
エンドBサイトケラチン	中間径フィラメント・タ ンパク質	m11686	+3.0
フィブロネクチン	細胞外マトリックス・タ ンパク質	M18194	+2.9、 +3.2
プロテイナーゼ阻害剤6	セリン・プロテアーゼ 阻害剤	U25844	+2.6
mpgc60	セリン・プロテアーゼ 阻害剤	Y11505	+2.5
α1タイプ1コラーゲン	細胞外マトリックス・タ ンパク質	X06753	+2.2、 +4.7
シグナル伝達			
Pten	タンパク質/脂質ホス ファターゼ	U92437	+3.2
gp106 (TB2/DP1)	不明	U28168	+6.9
rac2	ras関連GTP 結合タンパク質	X53247	+7.0
Semcap2	SemaF関連タンパク質	AF061262	-2.9
血清およびグルココルチコ イド制御キナーゼ	セリン/トレオニン タンパク質キナーゼ	AF139638	-2.6
STE20様タンパク質 キナーゼ	セリン/トレオニン タンパク質キナーゼ	AA154321	+2.6

10

20

30

40

【 0 1 0 2 】

【 表 5 】

遺伝子	機能	GenBank/TIGR リファレンス	平均 倍率 Δ
B細胞ミエロイド・キナーゼ	不明	J03023	+2.1
一般的な細胞機能			
グルタチオン・レダクターゼ	還元型グルタチオンの メンテナンス	X76341	+2.9
カルモジュリン	カルシウムの ホメオスタシス	M27844	+2.2
eIF3サブユニット	転写開始	U70736	+2.7
hsc70	ストレス応答	U73744	+2.9
オリゴサッカリル・トランスフェラーゼ・サブユニット	タンパク質の N-グリコシル化	U84211	+3.4
フィブリラリン	リボソームRNA プロセッシング	Z22593	+2.4
H ⁺ -輸送ATPアーゼ	細胞内オルガネラの 酸性化	AA108559	+2.9
Msec23	COPII複合体の成分	AA116735	+2.8
液胞タンパク質 ソーティング35 (vacuolar protein sorting 35)	膜タンパク質の リサイクル	U47024	+2.4

10

20

【0103】

これらの基準を用いて同定された多数の遺伝子が、基本的な腸の機能の調節に関与していることは重要である。すなわち、71種類の遺伝子のうち20種類(28%)は、栄養素の摂取と代謝に分類された。また、すいりパーゼ関連タンパク質2(PLRP-2)、コリパーゼ、肝脂肪酸結合タンパク質(L-FABP)、およびアポリポタンパク質A-I Vを含めて、宿主の脂質吸収/搬出機構のいくつかの構成成分の発現が協奏的に増加した(表1)。脂肪摂食によって抑圧されることが知られている(S. Kersten等、J. Biol. Chem. 275、28488(2000))新規なPPAR γ 標的である絶食誘導脂肪因子の発現が顕著に減少したことで、コロニー形成されたマウスの脂質摂取が増大したことのさらなる証拠が提供された。これら6種類の遺伝子の発現が変化したことは、B. Thetaitaomicronが宿主の栄養素吸収/処理能力の増加を誘発することを示し、なぜ無菌のげっ歯動物がその体重を維持するために、マイクロフローラを有するげっ歯動物よりも高カロリー摂取が必要であることを説明するのに役立つ。

30

【0104】

また、食事性金属の吸収に関与する4種類の遺伝子の発現が変化した。上皮の高親和性銅トランスポーター(CRT1)のmRNAが増加し、一方、メタロチオネイン-I、メタロチオネイン-II、およびフェリチンH鎖mRNAが減少した(表1)。これらの変化は、コロニー形成が(例えば、CRT1経由の)重金属吸収能の増加を引き起こし、同時に、重金属を細胞内に隔離する能力(MT-I/II、フェリチン)の減少を引き起こすことを示唆している。このことは、宿主自身の代謝経路での利用が増加するので、あるいは微生物と競合するので、これらの化合物に対する宿主の要求が増大することを意味する。SGLT-1、コリパーゼ、L-FABP、およびMT1(と以下に考察する他の8種類のmRNA)の変化は、qRT-PCRで個別に確認された(C. A. Heid、J. Stevens、K. J. Livak、P. M. WILLIAMS、Genome Res. 6、986(1996))(表2)。

40

【0105】

これらのうち、B. Thetaitaomicronのコロニー形成により発現が5倍

50

以上異なることが判明した遺伝子は、コリパーゼ、肝脂肪酸結合タンパク質、絶食誘導脂肪因子、メタロチオネインIおよびメタロチオネインII、リンゴ酸オキシドレダクターゼ、Sprr2a、アンギオゲニン-3、アンギオゲニン関連タンパク質、アンギオゲニン・ファミリー、ゲルゾリン、gp106(TB2/DP1)、およびrac2であった。これらのうち、コリパーゼ、絶食誘導脂肪因子、アンギオゲニン3、およびSprr2a遺伝子は、9倍以上異なる発現レベルを示した。

【0106】

B. Thetaiotaomicronに対する宿主応答の注目すべき特徴は、マイクロアレイ上に表出する、免疫-炎症プロセスに關与する多数の遺伝子の、検出可能なまたは変化した発現がないことであった。これには、侵入病原体に対する宿主応答の重要なレギュレーターであるNF-KB制御プロセスに關与する遺伝子が含まれる(D. Elewaut等、J. Immunol. 163, 1457(1999))。これらの応答がないことは、消化管の侵入病原体であるSalmonellaに対するヒト腸上皮細胞系の応答に關する最近のcDNAマイクロアレイ分析で得られた結果と対照的である(L. Eckmann, J. R. Smith, M. P. Housley, M. B. Dwinell, M. F. Kagnoff, J. Biol. Chem. 275, 14084(2000))。In vivo免疫-炎症応答が誘発された形跡がないことは、宿主がB. thetaiotaomicronなどの消化管内定住微生物をその全寿命の間収容する必要があることと矛盾しない。

10

【0107】

コロニー形成は、消化管腫瘍症の発達に關係する2種類の遺伝子PtenとGp106の発現を増加させる(表1)。

20

【0108】

実施例2

さらに進んだ分析では、2つの技術を組み合わせた。第1に、レーザ・マイクロダイセクション(LCM)を使用して、無菌マウスおよびコロニー形成マウスの屠殺直後に採取した回腸の凍結切片から3個の細胞集団を回収した。この3個の集団は、(i)陰か内に存在する上皮(未分化細胞ならびにパネート細胞系譜の分化メンバーを含む腸の増殖区画)、(ii)上皮を覆うじゅう毛(有糸分裂後の腸の他の3つの系譜の分化メンバーを含む)、および(iii)間充織を覆う陰か-じゅう毛単位である(図1)。

30

【0109】

マイクロアレイ分析用RNAを生成するために使用されるマウス群とは別のマウス群についてLCMを実施した。凍結回腸から7μm厚みの切片を切り出し、Arcturus製PixCell IIシステム(レーザ・スポット直径7.5μm)を用いてLCMを実施した。RNA Micro-Isolation Kit(Stratagene)および標準の組織化学的プロトコルを用いて、解剖した細胞集団からRNAを調製した。M R Emmert-Buck等、Science, 274, 998~1001, 1996およびR. F. Bonner等、Science 278:1203~4, 1997に記載の従来法によりレーザ・マイクロダイセクション(LCM)を実施した。

結果を図1に示す。

40

【0110】

第2に、リアル・タイムRT-PCRを使用してレーザ捕捉細胞集団中の特異的RNAを定量した。マイクロアレイ分析用に使用されるマウスとは別の3通りの実験の無菌マウスおよびコロニー形成マウスを用いて、LCM/qRT-PCR分析を実施した。各試料を4回の独立実験で3回繰り返して分析した。個々の測定の平均値±1S.D.を表2に示す。

【0111】

【表6】

表 2

コロニー形成に伴う遺伝子発現変化の
リアル・タイム定量RT-PCRによる研究

遺伝子	(無菌に対する) 倍率 Δ
Na ⁺ /グルコーストランスポーター(SGLT1)	2.6 \pm 0.9
コリパーゼ	6.6 \pm 1.9
肝脂肪酸結合タンパク質 (L-FABP)	4.4 \pm 1.4
メタロチオネインI (MT-I)	-5.4 \pm 0.7
重合体免疫グロブリン受容体 (pIgR)	2.6 \pm 0.7
減衰促進因子 (DAF)	5.7 \pm 1.5
小型プロリン・リッチ・タンパク質2a (sprr2a)	205 \pm 64
多剤耐性タンパク質 (mdr1a)	-3.8 \pm 1.0
グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)	-2.1 \pm 0.1
ラクターゼ-フロリジン・ヒドロラーゼ	-4.1 \pm 0.6
アデノシン・デアミナーゼ (ADA)	2.6 \pm 0.6
アンジオゲニン-4	9.1 \pm 1.8

10

20

30

40

50

【0112】

コリパーゼは、すい臓の外分泌(胞状)細胞によって産生される。腸内での発現は、これまで報告されていない。そこで、LCMおよびリアル・タイムRT-PCR分析を使用して、*B. Thetaiotaomicron*に対するその応答の細胞起源を詳細に叙述する。

【0113】

この結果から、*sprr2a* mRNAは上皮に限られ、そこではその濃度はじゅう毛上の方が陰かよりも7倍高いことがわかる(図1B)。*B. Thetaiotaomicron*は、じゅう毛上皮内で280倍の増加を誘発する。この値は、回腸RNA全体で記録された増加とよく一致する(表2)。*sprr2a* 応答の細胞起源は、それが細菌のコロニー形成に反応して腸上皮防御の強化に関与するという仮説を支持するものである。

【0114】

コリパーゼは、すい臓の外分泌胞状細胞によって産生される。LCM/qRT-PCRから、コリパーゼmRNAも回腸陰か上皮に存在し、そこでは*B. Thetaiotaomicron*のコロニーが形成されるとコリパーゼが10倍になることが明らかになった(図1B)。このことは、回腸RNA全体のマイクロアレイおよびqRT-PCR分析によって検出される増加を説明するものである(表1、2)。コリパーゼは、すい臓トリグリセリド・リパーゼおよびPLRP-2の両者の活性を刺激して食事性脂質の代謝に重要な役割を演じている(M. E. Lowe等、*J. Biol. Chem.* 273、31215(1998))。また、プロコリパーゼのタンパク質分解切断により、脂肪摂取の満腹シグナルとして機能するペントペプチド(エンテロスタチン)が生成する(S. Okada等、*Physiol. Behav.* 49、1185(1991))。コリパーゼ遺伝子制御の分析から、食事性脂質代謝に対する腸上皮(と消化管内定住共生生物)のこれまで価値が認められていなかった寄与が明らかになる。

【0115】

アンジオゲニン-3は、最初にNIH 3T3線維芽細胞中で同定されたが(X. Fu等、*Mol. Cell Biol.* 17、1503(1997))、その細胞起源または制御についてはほとんど知られていない。LCMおよびqRT-PCRから、陰か上皮は、アンジオゲニン-3 mRNAだけでなく新しいタンパク質であるアンジオゲニン-4 mRNAにも特異的な配列番号12および25などのプライマー(上記表3参照)を用いて増幅可能である遺伝子が優勢な部位であり、また、コロニー形成によってこの区画内のそ

の量が7倍に増加する結果となることが明らかになった。この増加は、回腸RNA全体のマイクロアレイおよびqRT-PCR分析で明確になる発現変化を説明するものである(表1、2)。分泌/RNアーゼ/血管形成因子の上皮部位は、微生物コロニー形成に対する多数の宿主応答のエフェクターとして機能する戦略的な部位になっている(例えば、栄養素の吸収/分布の促進/防御機能の増強)。

【0116】

spr2a、コリパーゼ、およびアンジオゲニン-4のLCM/qRT-PCR研究により、in vivo宿主応答を複合組織中の特定の細胞集合に帰属すること、および細胞応答を定量的に記述することの実現可能性が確立される。本出願人らの結果は、応答細胞集団を回収し微生物に対するその反応を定量的に表現するうえで、宿主細胞遺伝子発現に対する微生物の影響を調べるために、どのようにするとin vitroモデルを越えてin vivo系を使用できるかを示すものである。

10

【0117】

無菌マウスのB. Thetaiotaomicronによるコロニー形成は、回腸のLPH mRNA量を(1/5以下にはならないが)減少させる(表1、2)。レーザー捕捉された上皮および間充細胞集団から単離されたRNAの分析から、コロニー形成によって誘発されるLPH mRNA量の減少が、じゅう毛上皮内で主に起こることを確認した(図2)。

無菌マウスとB. Thetaiotaomicronを伴うマウスとの転写産物量の比較から、アンジオゲニン-4の発現がコロニー形成に伴って増加することが明らかとなった。

20

【0118】

実施例1で見られたそのmRNAが11倍誘発されることは、回腸RNA全体のリアル・タイムRT-PCRによって別個に確認された(表2)。アンジオゲニン-3は、最初にNIH 3T3線維芽細胞中で同定された(X. Fu、M. P. Kamps、Mol. Cell Biol. 17、1503(1997))。しかし、LCMおよびリアル・タイムRT-PCR分析により、コロニー形成された回腸では、アンジオゲニン-3用に設計されたプライマーを用いて増幅可能であるmRNAの量が陰か上皮中で最大であることが明らかとなった(回腸じゅう毛および間充織内の値は、それぞれ1/14および1/15である。図2)。しかし、下記実施例4で概説するように、このmRNAは実際にはアンジオゲニン-4 mRNAである。

30

【0119】

コロニー形成後に陰か上皮で観測されるこれらアンジオゲニン-4 mRNA量が7倍の増加になることで、回腸RNA全体のマイクロアレイおよびリアル・タイムRT-PCR分析で明確になった変化が説明される。

上皮で発現されるアンジオゲニン-4の細菌による調節は、血管形成因子を制御するための新規な様式である。

【0120】

実施例3

コロニー形成によりじゅう毛上皮内のラクターゼmRNA量が減少することをLCM/qRT-PCRで確認した(図1B)。発育にしたがって制御されるラクターゼなどの遺伝子の発現変化を規制するのに微生物が役立つかもしれないという考えは、マイクロフローの数個または多数の構成成分がこれらの変化を誘発できるかどうかという問いを提起する。

40

【0121】

このことを検討するために、7~15週齢の無菌NMRI/KIマウスの同年齢グループ(n=4~8匹/グループ)をプラスチック製ノトバイオト隔離装置に12時間の照明サイクルで飼育し、加圧滅菌した固形飼料の食餌(B & K Universal)を自由に取れるようにした。オスに、以下の群、

(i) 無処置(無菌コントロール)、

50

(ii) *B. Thetaiotaomicron* 菌株 VPI-5482 (L. V. Hooper 等、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96、9833 (1999))、

(iii) 正常なヒトの糞便フローラから元来採取された *E. coli* K12、

(iv) 離乳前のヒトおよびマウスの回腸フローラの主要成分であり通常用いられるプロバイオティックである *Bifidobacterium infantis* (ATCC 15697)、

(v) 従来法で飼育されたマウスから採取された「完全な」回腸/盲腸マイクロフローラ (L. Bry 等、Science 273、1380 (1996))

のうちの1つを接種した。

10

別のコントロール・グループは、出生以降従来法で飼育されたマウスからなる。

【0122】

マウスを10日後、照明を点けて2時間後に屠殺した。末端の1cmの小腸を使用してCFU/ml回腸内容物を規定した。この区画に直近の3cmの小腸を用いて、回腸RNA全体を単離した(QIAGEN Rneasy Kit)。

【0123】

qRT-PCRを使用して各グループの回腸ラクターゼmRNA量を比較した(すべての動物が 10^7 CFU/ml回腸内容物を有していた)。結果を図3に示す。

【0124】

3種類のグラム陰性嫌気性菌のいずれかによるコロニー形成は、無菌コントロールに対してラクターゼの発現を同じように減少させた(図3)。この減少は、完全な回腸/盲腸フローラの接種後にも観察された。同じRNAのqRT-PCRから、コリパーゼおよびアンギオゲニン-4の回腸での発現が、3種類すべての生物がコロニーを形成したのちに、回腸/盲腸フローラによって誘発されることが明らかになった(図3)。

20

【0125】

これら元無菌マウス(ex-germ-free mice)の回腸で得られるコリパーゼおよびアンギオゲニン-4のmRNA量は、出生後従来法で飼育された同年齢マウスのそれと同等であった(図3)。

【0126】

これらの知見とは対照的に、コロニー形成に対するsprr2aの応答は、コロニー形成種に依存した。*B. thetaiotaomicron*は、回腸/盲腸フローラによる10日間のコロニー形成に対する応答を繰り返してsprr2a mRNAの顕著な増加をもたらしたが、*B. Infantis*および*E. coli*によるコロニー形成は、mRNA量をほんの無視できるほどしか増加させなかった(図3)。

30

【0127】

生体異物および求電子物質の代謝に協調して作用するMdr1aおよびグルタチオン-S-トランスフェラーゼも、種特異的(かつ協奏的)応答を示した。発現を抑制する*B. Thetaiotaomicron*とは異なり、*E. coli*および*B. infantis*の両者はこれらmRNAの増加を誘発する。これに対し、多成分回腸/盲腸フローラは、無菌コントロールと比較して、いずれのmRNA量にも有意な(すなわち2倍の)変化をもたらさなかった。

40

【0128】

Mdr1a/GST応答は、正常なマイクロフローラの構成成分が、薬物代謝に關与する宿主遺伝子を調節できることの直接の証拠を提供し、薬物代謝の個体間の相違が個体の消化管内定住フローラの違いから一部は生じることを示唆している。

【0129】

実施例4

10日間のコロニー形成が、アンギオゲニン-3の公表された配列から設計されたAffymetrix製プローブ・セットで検出されるmRNAの回腸での11倍の発現増加を伴うことを観測したあとで、本出願人はマウス・アンギオゲニン-3の3 および5

50

末端に特異的なプライマーを設計した。

それらは、

ORF [フォワード・プライマー：

5 - CCTTGGATCCATGGTGA TGA GCCCAGGT TCTTTG

(配列番号27)

これは5 末端にBamHI部位を組み込んである；

リバーズ・プライマー：

5 - CCTTTCTAGACTACGGACTGATAAAAGACTCATCGAAG
G (配列番号28)

これは5 末端にXbaI部位を組み込んである。

10

【0130】

これらのプライマーを、RT-PCRと共に使用して、元無菌NMRIマウスの回腸から調製したRNA由来の438bpの配列を増幅させた。これらのマウスに、従来法で飼育された同じ近交系に属する動物から採取された完全回腸/盲腸フローラで10日間コロニーを形成させた。本出願人は、PCR産物をBamHI/XbaIにより消化されたpGEX-KGにサブクローニングして、ベクター特異的プライマーを用いてその配列を決定した。

【0131】

驚くべきことに、そのORFのヌクレオチド配列は、マウス・アンジオゲニン-3のそれと90%しか同一ではなかった。PCR反応に用いた(アンジオゲニン-3に特異的な)プライマー配列をその産物に組み込んだので、本出願人は、5 - および3 - RACEを用いて、(a)この新しいアンジオゲニンのORFの5 および3 末端の正確な配列を得、(b)そのmRNAの5 および3 非翻訳領域を特定した。その結果、アンジオゲニン-3 mRNAと同一であるヌクレオチド配列はわずか88.3%であることが明らかになった。

20

【0132】

このアンジオゲニン-4タンパク質をコードするヌクレオチド配列を、アンジオゲニン-3配列と並べて、それぞれ配列番号29および30として以下の図4に示す。

【0133】

アンジオゲニン-4は、マウス・アンジオゲニン・ファミリーの他の3種類のメンバーと74~81%のアミノ酸配列が同一である(図5)。アンジオゲニン-4の5 および3 非翻訳領域が、アンジオゲニン-3 mRNAの対応する領域に密接に関係していることが見出された(図4)。

30

【0134】

続いて、様々なマウス・アンジオゲニンmRNAの組織分布の比較分析を実施した。従来法で飼育した成体(12~14週齢)のオスおよびメスNMRIマウスから採取した組織(25組織/マウス)から単離したRNAからcDNAを合成した。各遺伝子発現の相対レベルを定量するために、本出願人は、4種類のマウス・アンジオゲニン・ファミリー・メンバーのそれぞれに特異的なプライマー・セットを設計し(図6、表4)、それらをSYBR-Greenベースのリアル・タイム定量RT-PCR(qRT-PCR)分析に用いた。

40

【0135】

意外なことに、アンジオゲニン-4mRNAは、それが十二指腸から直腸で発現される場合は小腸に制限されていた(図7)。これに対し、アンジオゲニン-1の発現は、肝臓、肺、およびすい臓で最大であり(図8)、一方、アンジオゲニン-3は主に肝臓、肺、すい臓、および前立腺で発現される(図9)。アンジオゲニン関連タンパク質mRNAは、40サイクルのPCR後でさえも調査した全組織で検出されなかった(図10)。

【0136】

したがって、アンジオゲニン-4は、その極めて限定的で腸特異的な発現パターンのため、マウス・アンジオゲニン・ファミリー・メンバーのなかでユニークなものとなっている

50

。

【0137】

これらの知見から、腸内ではアンジオゲニン - 3 よりもアンジオゲニン - 4 の発現が微生物によって制御されることが示唆された。この仮説を直接試験するため、アンジオゲニン - 4 に特異的なプライマーと q R T - P C R を用いて、無菌 N M R I マウスおよび従来法で飼育された N M R I 動物から採取された回腸 / 盲腸フローラで 10 日間コロニー形成させた無菌マウスの小腸の長さ方向に沿ったアンジオゲニン - 4 m R N A 量を比較した。対ごとの比較から、アンジオゲニン - 4 の発現がコロニー形成されたマウスの空腸で最大であり、従来法に従うとこの領域でのアンジオゲニン - 4 の発現が最大 17 倍にまで誘発されることが明らかになった (図 11)。無菌 N M R I マウスを *B . t h e t a i o t a o m i c r o n* だけと 10 日間共生させると (*M o n o - A s s o c i a t i o n*)、アンジオゲニン - 4 の発現が同程度に誘発された (データ示さず)。

10

【0138】

【表 7】

表 4

遺伝子	プライマー	配列番号	配列
アンジオゲニン-4	フォワード	35	5' CTCTGGCTCAGAATGTAAGGTACGA
	リバース	36	5' GAAATCTTTAAAGGCTCGGTACCC
アンジオゲニン-3	フォワード	37	5' CTGGCTCAGGATAACTACAGGTACAT
	リバース	38	5' GCCTGGGAGACCCCTCCTTT
アンジオゲニン-1	フォワード	39	5' AGCGAATGGAAGCCCTTACA
	リバース	40	5' CTCATCGAAGTGGACCGGCA
アンジオゲニン 関連タンパク質	フォワード	41	5' GGTGAAAAGAAAGCTAACCTCTTTC
	リバース	42	5' AGACTTGCTTATTCTTAAATTTTCG

20

【0139】

アンジオゲニン - 4 の生後発育中の発現制御は、その微生物による制御と一致する。次いで、生後 5 日 (P 5) ~ P 30 の無菌および従来法で飼育された N M R I マウス (n = 3 マウス / 日 / グループ) の発育に伴うアンジオゲニン - 4 の発現パターンを評価した (図 9)。アンジオゲニン - 4 の転写産物相対量は、P 20 までいずれのマウス・グループでも比較的低いままであった。この時点以降、無菌動物でわずかに (2 ~ 3 倍) 発現が増加した。これに対し、従来法で飼育された動物では、P 15 から P 30 の間でアンジオゲニン - 4 の発現が 20 倍以上になった。これらの結果から、哺乳 / 離乳移行中にアンジオゲニン - 4 が誘導されることが示唆され、これは消化管内微生物の主な変化と一致する。生後の無菌マウスでアンジオゲニン - 4 が誘導されないことも、微生物叢の構成成分がアンジオゲニン - 4 の発現の制御に重要な役割を演じているという結論と一貫している。

30

40

【0140】

アンジオゲニン - 4 の細胞局在化

これまでのアンジオゲニン・タンパク質発現の細胞起源のレーザ・マイクロダイセクション (L C M) / q R T - P C R による研究 (実施例 2) では、アンジオゲニン - 3 およびアンジオゲニン - 4 の両者を認識するプライマー、および捕捉された陰か上皮、じゅう毛上皮、またはじゅう毛核 (*v i l l u s c o r e*) 由来の間充織集団から単離した R N A を使用した。q R T - P C R 分析から、微生物制御された「アンジオゲニン」が、リーベルキューンかの底部に位置する上皮細胞で産生されることが示された (*H o o p e r* 等、2001)。

【0141】

50

アンジオゲニン - 4 の発現がパネート細胞中で起こるといふ仮説を試験するために、本出願人は、LCMを使用して、(a)弱毒ジフテリア毒素Aフラグメント($tox176$)によってパネート細胞系譜を切断した無菌成体(12週齢)トランスジェニック・マウス(CR2- $tox176$ マウス)(Garabedian等、1997)、および(b)それらの同年齢同性無菌正常同腹子から、空腸陰かの底部に位置する細胞を単離した。アンジオゲニン4特異的プライマーを用いたqRT-PCRにより、正常マウスの陰か底部の上皮細胞から精製されたRNAでアンジオゲニン-4 mRNAレベルがCR2- $tox176$ 同腹子に比べて10倍になることが明らかになった(図10)。

【0142】

従来法で飼育されたNMRIMマウスを用いて追跡調査を実施した。3個の細胞プールをLCMで採取した。すなわち、パネート細胞単体、上部陰かおよびじゅう毛の上皮細胞(パネート細胞を除いた画分)、およびじゅう毛核および陰か周辺領域から回収した間充織である。アンジオゲニン-4 mRNAの分布は、Mom-1遺伝子座の産物であり周知のパネート細胞特異的遺伝子の産物であるホスホリパーゼA2の分布に極めて類似していた(データ示さず)。

【図面の簡単な説明】

【図1】

レーザ捕捉顕微解剖された回腸細胞集団、コロニー形成されたマウス回腸のLCMにおける遺伝子発現のコロニー形成に関連する変化のリアル・タイム定量RT-PCR研究の結果を示す図である。ヌクレオ・ファースト・レッドで切片を染色した。棒目盛 = $25\mu m$ 。

【図2】

レーザ捕捉された細胞集団から単離されたmRNAの量のリアル・タイム定量RT-PCR分析結果を示すグラフである。値は、下記 C_T 分析を用いた無菌間充織内の量に対するものである。各試料の遺伝子産物を3~4回の独立実験で各3回繰り返して分析した。無菌マウスとコロニー形成マウスのペアから得られた代表的な結果(平均値 $\pm 1S.D.$)をプロットしてある。

【図3】

マイクロフローラの様々なメンバーによるコロニー形成に対する宿主応答の特異性を示す実験結果を示すグラフである。示した菌のうちの1つを、または従来法で飼育されたマウス由来の完全な回腸/盲腸フローラ(従来法マイクロフローラ)を無菌マウスに接種した(4)。接種から10日後に $10^7 CFU/ml$ 回腸量でコロニー形成させた動物から調製された回腸RNAをプールし、図示した各mRNA量をリアル・タイム定量RT-PCR(qRT-PCR)で分析した。3回の測定の前平均値($\pm 1S.D.$)をプロットしてある。

【図4】

マウスのアンジオゲニン-4およびアンジオゲニン-3のヌクレオチド配列(それぞれ、配列番号29および30)を並べて示す図である。

【図5】

マウスのアンジオゲニン・ファミリー・メンバーのアミノ酸配列の配列アラインメント(配列番号31~34)を示す図である。

【図6】

マウスのアンジオゲニン・ファミリー・メンバーに特異的なプライマーの位置を示す図である。

【図7】

アンジオゲニン-4 mRNAの組織分布を示すグラフと、アガロース・ゲル分析の結果を示す図である。

【図8】

アンジオゲニン-1 mRNAの組織分布を示すグラフである。

【図9】

定量リアル・タイム R T - P C R 分析後のアンジオゲニン - 3 m R N A の組織分布を示すグラフである。

【図 10】

アンジオゲニン関連タンパク質発現の欠如を示す R T - P C R 分析の結果を示す図である。

【図 11】

小腸内のアンジオゲニン - 4 の発現の微生物による制御に関する実験結果を示すグラフである。

【図 12】

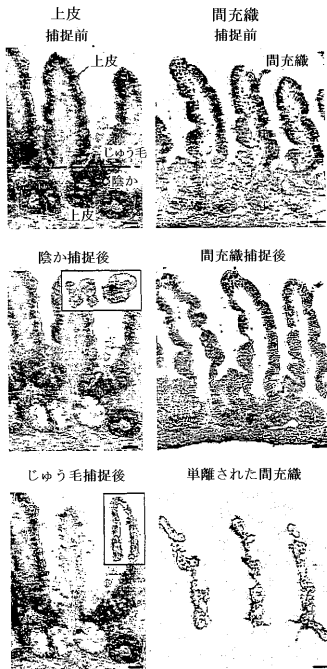
生後発育期間におけるアンジオゲニン - 4 の発現の制御を示すグラフである。

10

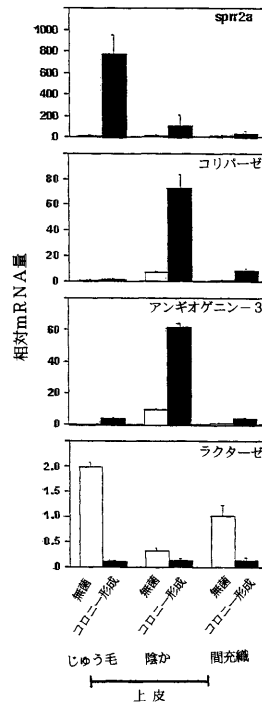
【図 13】

陰か底部 (c r y p t b a s e) から単離した細胞の q R T - P C R 分析による小腸内のアンジオゲニン - 4 発現の細胞局在化を示す棒グラフである。

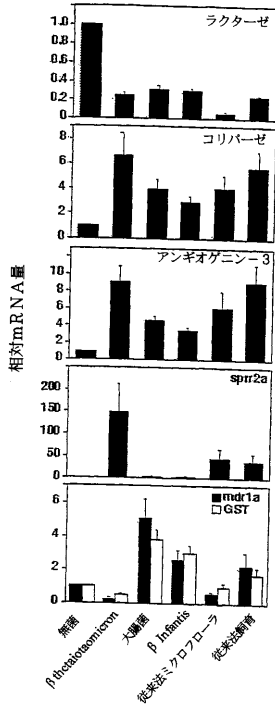
【図 1】



【図 2】



【 図 3 】



【 図 4 】

アンギオゲニン-4および-3のヌクレオチド配列アラインメント

	1	11	21	31	41	51
アンギオゲニン-4	---GAGCTGACCGAAGCCCTGCTCCAGGACACACAGCTGACCTGCTCCGAG					
アンギオゲニン-3	CTCTAGCTTACACCGAGAGCCCTGCTCCAGGACACAGCTGACAC-CATGCCCG					
共通配列	agctt acagc aggaccctgtctccaggagac agctagac c bccc g					
アンギオゲニン-4	61	71	81	91	101	111
アンギオゲニン-3	ATGAGGAGAGAGTCCGACCTTGGATGATCCCTGGAGAGAGTACATGACCCATGT					
共通配列	TTGAGGAGAGAGTCCGACCTTGGAGAGAGTACATGACCCATGT					
アンギオゲニン-4	121	131	141	151	161	171
アンギオゲニン-3	CGTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT					
共通配列	CGTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT					
アンギオゲニン-4	181	191	201	211	221	231
アンギオゲニン-3	GAA--AGTTCGAAAATCTCTCTGACAGCTATGATGACGACGACGACGACGACGAC					
共通配列	AACCTACAGTACATAAATCTCTCTGACAGCTATGATGACGACGACGACGACGAC					
アンギオゲニン-4	241	251	261	271	281	291
アンギオゲニン-3	GACAGATCTGTGAAAGTATGATGAAAGTATGATGAAAGTATGATGAAAGTATGATG					
共通配列	acagatcttg gaagatcttggaag aaagaagctaacctgctggaagaa gtc					
アンギオゲニン-4	301	311	321	331	341	351
アンギオゲニン-3	AACACTCTTACCTCCAGCACCAGAAAACATCAGGACCTCTGTGAAAGAGAAAGAGG					
共通配列	aaacacttct catg caccagaa aacatca ggcactctgtgaa aaaa ggaag					
angiogenin-4	361	371	381	391	401	411
angiogenin-3	CGTTAGGAGAAAACCTCAGATGAAAGTATGATGAAAGTATGATGAAAGTATGATG					
共通配列	CGTTAGGAGAAAACCTCAGATGAAAGTATGATGAAAGTATGATGAAAGTATGATG					
アンギオゲニン-4	421	431	441	451	461	471
アンギオゲニン-3	TCAGAGGGGCTCCCTCCCTCCAGGAGTACAGGAGTACAGGAGTACAGGAGTACAG					
共通配列	AAGAGGGGCTCCCTCCCTCCAGGAGTACAGGAGTACAGGAGTACAGGAGTACAG					
アンギオゲニン-4	481	491	501	511	521	531
アンギオゲニン-3	GTATATGCGGAGAGTATGATGAAAGTATGATGAAAGTATGATGAAAGTATGATG					
共通配列	gtatattgctgtagaagatgagcggcctccagcctccagcctccagcctccagcctccag					
アンギオゲニン-4	541	551	561	571	581	591
アンギオゲニン-3	ACAGCAGCCCTCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC					
共通配列	acagcagccctccagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc					
アンギオゲニン-4	601	611	621	631	641	651
アンギオゲニン-3	ATCCTGGGTCACCTCAGTCTCCAGGAGTACAGGAGTACAGGAGTACAGGAGTACAG					
共通配列	atcctgggtcacctcagtctccagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc					
アンギオゲニン-4	661	671	681	691	701	711
アンギオゲニン-3	CCCTATTCTATGCTCAGAAATTAAGATATCTCAAAACCCATCAAAAACCCATCAAAA					
共通配列	ccctattctatgctcagaaatgaagatattctcaaaa cca aaaaa					
アンギオゲニン-4	721	731	741	751	761	771
アンギオゲニン-3	-----					
共通配列	-----					

【 図 5 】

マウス・アンギオゲニン・ファミリー・メンバーのアラインメント

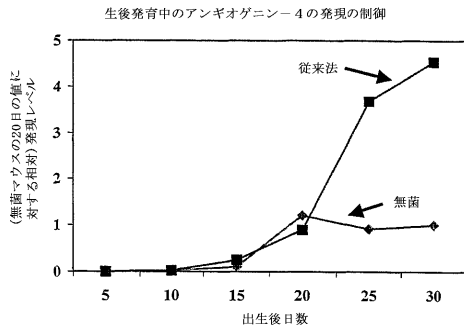
	1	11	21	31	41
アンギオゲニン-4	NTMSPGPIILVFLVGLVVPPTLAQD--MERVEKFLRQHYDAKPKGRDRYIC				
アンギオゲニン-1	MAISPGPIFLVFLVGLVVPPTLAQD--SRVYKFLTQHDADKPKGRDRYIC				
アンギオゲニン-3	NVMSPGSLLVFLVGLVVPPTLAQD--RYIKFLTQHYDAKPKGRDRYIC				
アンギオゲニン RP	NAMSPGPIFLVFLVGLVVPPTLAQD--RYIKFLTQHYDAKPKGRDRYIC				
共通配列	n mspgpl lvf lglvvpplaqd ry kfltgqhydeakpkgrdrvic				
アンギオゲニン-4	51	61	71	81	91
アンギオゲニン-1	ESMMKRRKLTSPKQVNTFIEGTKGNIKAI CGGKGS PVGEMFRISNSPFPQ				
アンギオゲニン-3	ERMKRRKLTSPKQVNTFIEGTKGNIKAI CGGKGS PVGEMFRISNSPFPQ				
アンギオゲニン RP	ESMMKRRKLTSPKQVNTFIEGTKGNIKAI CGGKGS PVGEMFRISNSPFPQ				
共通配列	esmak rkltepkqdvntfieh tk nikaicg gspyy n kis s fq				
アンギオゲニン-4	101	111	121	131	141
アンギオゲニン-1	ITVCTHSGSPFPCGYRAFQDPRVIVIA CEDGPFVHDEFISL*				
アンギオゲニン-3	VTTCKHTGSGPFPCCOVRASGFRVIVIA CEDGPFVHDEFISL*				
アンギオゲニン RP	VTTCTHSGSPFPCGYRAFQDPRVIVIA CEDGPFVHDEFISL*				
共通配列	vtctch gspgppc yre k frviviace gvpvhdefisfap				

【 図 6 】

マウス・アンギオゲニン・ファミリー・メンバーに特異的なプライマーの位置

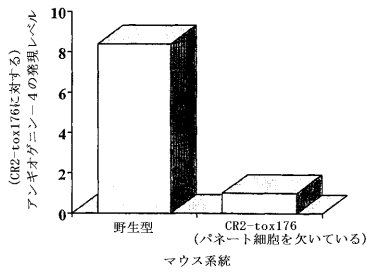
	1	11	21	31	41
アンギオゲニン-4	ATGCAAGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
アンギオゲニン-3	ATGCAAGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
アンギオゲニン RP	ATGCAAGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
共通配列	atgcaagtatg atgcaagtatg atgcaagtatg atgcaagtatg atgcaagtatg				
アンギオゲニン-4	101	111	121	131	141
アンギオゲニン-3	TACCTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
アンギオゲニン-1	TACCTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
アンギオゲニン RP	TACCTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
共通配列	tgacctatgat gatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgat				
アンギオゲニン-4	151	161	171	181	191
アンギオゲニン-3	GAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
アンギオゲニン-1	GAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
アンギオゲニン RP	GAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
共通配列	gaaatgatgat gatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgat				
アンギオゲニン-4	201	211	221	231	241
アンギオゲニン-3	CACTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
アンギオゲニン-1	CACTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
アンギオゲニン RP	CACTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
共通配列	cacctatgat gatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgat				
アンギオゲニン-4	251	261	271	281	291
アンギオゲニン-3	ATGCAAGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
アンギオゲニン-1	ATGCAAGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
アンギオゲニン RP	ATGCAAGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
共通配列	a gpaagcctatgpg aaactt agaatagcaaa tccc cccagc				
アンギオゲニン-4	301	311	321	331	341
アンギオゲニン-3	ATGCAAGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
アンギオゲニン-1	ATGCAAGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
アンギオゲニン RP	ATGCAAGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
共通配列	gtccaccctgagcagca agggggctccc ggcctcagc gta				
アンギオゲニン-4	351	361	371	381	391
アンギオゲニン-3	CACTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
アンギオゲニン-1	CACTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
アンギオゲニン RP	CACTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
共通配列	ccgagcct taagc cccagatctgcatctgctgga aggctt				
アンギオゲニン-4	401	411	421	431	441
アンギオゲニン-3	GGCTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
アンギオゲニン-1	GGCTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
アンギオゲニン RP	GGCTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT				
共通配列	ggcctatgat gatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgat				

【 図 1 2 】



【 図 1 3 】

小腸内のアンジオゲニン-4の発現の細胞局在化：陰か底部から単離した細胞のqRT-PCR分析



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
30 May 2002 (30.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/42328 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/47, C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/US01/44332
- (22) International Filing Date: 27 November 2001 (27.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/252,901 27 November 2000 (27.11.2000) US
- (71) Applicants (for all designated States except US): WASHINGTON UNIVERSITY [US/US]; One Brookings Drive, St. Louis, MO 63130 (US). ASTRAZENCA AB [SE/SE]; S-151 85 Sodertalje (SE).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): GORDON, Jeffrey, Ivan [US/US]; 12 Stacy Drive, St. Louis, MO 63132 (US). HOOPER, Lora, Virginia [US/US]; 8812 Glen Rose Drive, Crestwood, MO 63126 (US). STAPPENBECK, Thaddeus, E., IV [US/US]; Washington University, One Brookings Drive, St. Louis, MO 63130 (US). FALK, Per [SE/SE]; Akeratan 1, S-431 69 Molndal (SE). HANSSON, Lennart [SE/SE]; Heymans vag 13, S-435 43 Pixbo (SE).
- (74) Agent: CRAWFORD, Arthur, R.; Nixon & Vanderbye P.C., Suite 800, 1100 North Glebe Road, Arlington, VA 22201-4714 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/42328 A2

(54) Title: METHOD FOR STUDYING THE EFFECTS OF COMMENSAL MICROFLORA ON MAMMALIAN INTESTINE AND TREATMENTS OF GASTROINTESTINAL-ASSOCIATED DISEASE BASED THEREON

(57) Abstract: a method of investigating chemical changes resulting from commensal microflora colonisation of mammalian intestine which comprises: a) measuring gene expression in commensal bacterium-colonized and germ-free intestine of at least one gene; and b) identifying a gene from a) that has at least a 2-fold difference in expression level between commensal bacterium-colonized and germ-free intestine. The method selects genes for further evaluation, and gives rise to the development of prophylactic treatments.

WO 02/42328

PCT/US01/44332

1

METHOD FOR STUDYING THE EFFECTS OF COMMENSAL MICROFLORA ON
MAMMALIAN INTESTINE AND TREATMENTS OF GASTROINTESTINAL-ASSOCIATED
DISEASE BASED THEREON

5 TECHNICAL FIELD

The present invention relates to methods for investigating changes resulting from commensal microflora colonisation of mammalian intestine, and the use of information obtained in the production of agents and therapies useful in the modification of the digestive tract and in the treatment of gastrointestinal-associated disease.

10BACKGROUND ART

Mammals generally and humans in particular are home to an incredibly complex and abundant ensemble of microbes. Contact with components of this microflora begin at birth. The human intestine is more densely populated with microbes than any other mucosal surface. Therefore, this organ represents a site where the microflora are likely to have a pronounced influence on host physiology.

15 20

Although the effects of pathogenic or other potentially harmful invasive microorganisms have been studied (see for example L. Eckmann et al., J. Biol. Chem. 2000, 275:14084-14094, D. A. Relman, Science, 1999 May 21: 284 (5418) 1308-10, D.A. Relman, Curr. Opin. Immunol. 2000 Apr:12(2):215-8) astonishingly little is known about how commensal bacteria shape normal development and physiology. This is due partly to a paucity of defined, experimentally tractable *in vivo* model systems for examining how nonpathogenic microorganisms regulate host biology, but also to a prevailing view that these microorganisms had no significant impact on for instance the digestive processes.

25 30

A model using adult germ-free animals, colonized with *Bacteroides thetaiotaomicron*, has previously been used to show that this commensal organism regulates production of ileal epithelial fucosylated glycans after it is introduced into germ-

35

WO 02/42328

PCT/US01/44332

2

free mice, and to delineate how the microbe controls production of these glycans for its own nutritional benefit (L. Bry, et al., *Science* 273, 1380, 1996; L. V. Hooper, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9833 (1999). Virtually nothing else is known about
5 how indigenous bacteria modulate intestinal gene expression and how this impact on the host's condition.

The applicants have found that commensal microflora make significant contributions to defining gut physiology and maturation and have developed means for testing this at a
10 molecular level.

SUMMARY OF THE INVENTION

According to a first aspect of the present invention there is provided a method of investigating changes resulting from
15 commensal microflora colonisation of mammalian intestine which comprises:

- a) measuring gene expression in commensal bacterium-colonized and germ-free intestine of at least one gene; and
- b) identifying a gene from a) that has at least a 2-fold
20 difference in expression level between intestines colonised by at least one commensal bacterium and germ-free intestines.

Suitably, multiple gene expression is measured by DNA microarray analysis and/or quantitative RT-PCR as illustrated hereinafter, but other conventional methods may be applied.
25 Examples of such methods include quantitative Northern blotting as well as Representational Differentiation Analysis (RDA) which is a PCR based assay which detects genes that differ between two samples (e.g., Odeberg J, et al., *Biomol. Eng.* 17, 1-9, 2000). In particular, the use of high-density oligonucleotide arrays is
30 preferred for conducting a comprehensive analysis of the range of intestinal functions that are shaped by components of the microflora.

Microarray analysis can be used to measure host responses in a complex tissue composed of multiple cell types, as is found in
35 the intestine. The value of an *in vivo* model for delineating host

WO 02/42328

PCT/US01/44332

3

cellular responses to a given microbe is that, unlike cell culture-based models, the contributions of lineage and environmental factors to shaping the response are preserved, and may be studied in a germfree experimental system.

5 In a preferred embodiment, the responding cell population is recovered without perturbing its expressed mRNA population, so that its reaction to the microbe can be characterized in quantitative terms. This is suitably achieved by combining two techniques, laser-capture microdissection (LCM), followed by
10 quantitative analysis for example quantitative PCR and/or microarray analysis of the laser-capture samples.

Using the method of the invention, it is possible to establish the feasibility of assigning an *in vivo* host response to a particular cell population in a complex tissue, and describing
15 that cellular response in quantitative terms. It may be possible to identify host genes that function as vital but heretofore unappreciated regulators of intestinal biology and host physiology. Genes identified based on their response to
20 colonization by the prototypic gut commensal may represent entirely new targets for therapeutic manipulation. Intestinal microbes have been subjected to great selective pressure over millions of years to find subtle but effective ways of
manipulating their host so that both microbe and host benefit from the relationship. Identifying and testing bacterial gene products
25 that affect their host gene targets may yield new pharmacologic agents whose chemical structures and mechanisms of action would, or could not have been appreciated previously.

The germ-free intestine and the commensal bacterium-colonized intestine used in the method of the invention may be in
30 any animal model, but in particular a simplified mouse model of intestinal-microbial interactions is used.

This method allows the effects of individual commensal bacteria to be studied, as well as combinations of these if required.

35 The applicants have found that genes involved or implicated

WO 02/42328

PCT/US01/44332

4

in the immuno-inflammatory process are not likely to be identified using the method of the invention. This is consistent with the host's need to accommodate resident gut microbes, such as *B. thetaiotaomicron*, for its entire lifespan. The method of the invention however, can be used to confirm this finding with other commensural bacteria.

Genes identified in this way and their function may then be subject to further study in order to determine their effects, for example on the digestive process. The further investigation may be carried out in for example using any of the conventional methods.

In a preferred embodiment, the method further comprises (c) the step of further investigating a gene identified in b) with regard to its function. Suitable methods by which this can be achieved include work in *in vitro* cell culture assays or in lower eukaryotic model organisms as well as in animal models such as transgenic animal models.

In vitro cell culture assay techniques will allow studies in a less complex system than the whole animal where the gene and its associated genes and gene products are available for manipulation and analysis.

Lower eukaryotic model organisms such as yeast (e.g., *Saccharomyces cerevisiae*), the fruit fly (*Drosophila melanogaster*) and the nematode (*Caenorhabditis elegans*) are eukaryotic organisms with very well defined genomes and in many instances cellular function. Several of the basic signaling functions of interest to study in mammals are conserved also in the simpler eukaryotic life forms which makes them very attractive as models for defined molecular events. These organisms are easier to handle than mammals.

In these systems, the function can be studied using methods such as

- i) transgenic knockout;
- ii) dominant-negative experiments;
- iii) transgene overexpression;

WO 02/42328

PCT/US01/44332

5

- iv) antibody binding assay;
- v) by pharmacological intervention using defined chemical agents.

Transgenic knockout methods are based upon inactivation of a gene within an organism, for example using recombinant DNA technology to delete or mutate a gene such that the gene product is dysfunctional, or to introduce an antisense oligonucleotide to silence the gene. In the latter case, antisense oligonucleotides which are complementary to the messenger RNA molecule (mRNA) of the gene are introduced in the organism. The messenger RNA molecule (mRNA) that is the result of transcription of a gene is single stranded and can not be translated into a protein sequence if it is double stranded. Double stranded RNA is formed with the complementary fragment and the resulting double stranded RNA fragment can not be further processed. Thus no protein will be generated from this gene. This is usually done as a transient experiment, i.e., the antisense fragment is added to the cell, model organisms or mammalian model and the gene expression will be silenced as long as there is antisense available. After it is consumed, normal function will be resumed and the normal/control state will be reestablished.

Classical transgenic knockout methods are based on introducing a mutated, and thereby dysfunctional gene into an embryonal cell line. This cell line is then introduced into a normal blastocyst, thereby creating a chimeric fetus consisting of germ cells from the normal background and from the embryonal stem (ES) cell line. Through several rounds of breeding the ES cell-derived mutant allele will be found in the germ cell and thus be transferable to offspring.

New techniques now allow for such mutations to be inherited in a silent and inactive form, so that they can be activated in adult life when development is completed. This is achieved by exposing the adult animal, in particular a mouse, carrying such a silent mutation to a chemical agent (hormone, antibiotic) that will activate expression of the mutated gene.

WO 02/42328

PCT/US01/44332

6

Another way of achieving a disruption of a gene function is by performing a dominant-negative experiment. In this case a gene that is defective is introduced into the genome of the model organism under transcriptional control of a promoter that will allow very high expression in the targeted cell lineage. The product will be produced and transported to the intended site of action in the cell and compete with the normal gene product for these sites. As the transgene is present in higher amounts and is incapable of performing the intended function, the net outcome will be that this function is perturbed.

The effects of overexpression of the gene in a particular system or model may also be studied. In this case, either multiple gene copies may be introduced into the test organism or use can be made of particular promoters which express genes at high levels.

The classical transgenic experiment involving transgene overexpression includes introducing a gene normally absent from the model (e.g., a human-specific gene into mouse) to assess the effects of the gene on cellular function and/or physiology. If required, the transgene may be placed under the control of tissue-specific promoter sequence so that expression is directed to a cell population of choice. Promoters exist both for a generalised expression throughout the body and for very subtle distribution in specific minor cell population in defined areas of an organ.

Other means of studying the effects of genes involve intervention at the protein level with the gene product. For example, antibody binding assays can be used both to determine whether a protein is present in a cell, model organism or mammal and/or to inhibit the function of the gene product by specifically binding to it and interfering with its capacity to interact with its intended molecular partners.

Pharmacological intervention using defined chemical agents may be particularly useful if the gene can be identified as belonging to a specific class of molecules, e.g., G-protein coupled receptors, proteases or nuclear receptors, its functions

WO 02/42328

PCT/US01/44332

7

can be assessed by using chemicals that are known to act as agonists or antagonists for this type of molecules.

Any commensal bacteria may be used in the method of the invention. Particular examples include *Bacteroides*
5 *thetaiotaomicron*, *Escherichia coli*, *Bifidobacterium infantis*, or mixtures thereof, or complete ileal and/or cecal microflora obtained from conventionally-raised species. A particularly suitable bacterium for use in the method is *B. thetaiotaomicron*. The applicants have found that different members of the commensal
10 flora produce different results, indicating a high level of specificity amongst species.

The method of the invention has already revealed an unanticipated breadth of this commensal's impact on gut gene expression. Suitably claim expression of a wide range of genes is
15 measured in step (a) of the method of the invention. Examples of such genes include genes associated with the nutrient uptake and metabolism, hormone/maturational responses, mucosal barrier function, detoxification/drug resistance, xenobiotic metabolism, motility, enteric nervous system/muscular layer development or
20 activity, angiogenesis, cytoskeleton/extracellular matrix function or development, signal transduction and other essential cellular functions.

Nutrient uptake and metabolism genes which may be the subject of study include genes associated with carbohydrate uptake and
25 metabolism such as Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) or lactase phlorizin-hydrolase genes, genes associated with lipid uptake and metabolism such as pancreatic lipase-related protein 2, colipase, liver fatty acid binding protein, fasting induced adipose factor (FIAF), apolipoprotein A-IV, phospholipase B and CYP27 genes, metal
30 uptake or sequestration genes such as high-affinity copper transporter, metallothionein I, metallothionein II or ferritin heavy chain genes, or cellular energy production such as isocitrate dehydrogenase subunit, succinyl CoA transferase, transketolase, malate oxidoreductase and aspartate aminotransferase genes.

35 Examples of genes associated with hormonal/maturational

WO 02/42328

PCT/US01/44332

8

responses include adenosine deaminase, ornithine decarboxylase antizyme, 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase, GARG-16, FKBP51, androgen-regulated vas deferens protein, short chain dehydrogenase and heat-stable antigen genes.

5 Examples of genes associated with mucosal barrier function include decay-accelerating factor, polymeric Ig receptor, small proline-rich protein 2a, serum amyloid A protein, CRP-ductin α (MUCLIN), zeta proteasome chain, and anti-DNA IgG light chain genes.

10 Suitable genes which are involved in detoxification/drug resistance include glutathione S-transferase, P-glycoprotein (mdr1a) and CYP2D2 genes.

15 Examples of genes associated with enteric nervous system/muscular layer development or activity include L-glutamate transporter, L-glutamate decarboxylase, vesicle-associated protein-33, cysteine-rich protein 2, smooth muscle (enteric) gamma actin and SM-20 genes.

20 RNAse super family members include several angiogenins. They also include the angiogenin-4, which the applicants have sequenced and found to be particularly interesting in that it is intestine-specific, epithelial-based and its expression appears to be regulated by components of the microbiota. The sequence of murine angiogenin-4 has recently been published (D.E. Holloway et al., Protein Expression and Purification, (2001), 22:307.

25 The applicants have surprisingly found that one such gene, specifically the angiogenin-4 gene is expressed in intestinal epithelium and that expression levels are particularly affected by commensal bacteria.

30 Examples of genes associated with cytoskeleton/extracellular matrix function include gelsolin, destrin, alpha cardiac actin, endoB cyokeratin, fibronectin, proteinase inhibitor 6 and alpha 1 type 1 collagen genes.

Signal transduction genes include Pten, gp106 (TB2/DPL),

WO 02/42328

PCT/US01/44332

9

rac2, Semcap2, serum and glucocorticoid-regulated kinase, STE20-like protein kinase and B-cell myeloid kinase. (The signal pathway in which rac2 gene is associated is known to have an impact on the mucosal barrier function).

5 Finally, other examples of genes associated with essential cellular functions include glutathione reductase, calmodulin, eIF3 subunit, hsc70, oligosaccharyl transferase subunit, fibrillarin, H⁺-transporting ATPase and Msec23 genes.

Suitably in the method of the invention, at least 10 such
10 genes are measured in step (a). Preferably, expression of all the genes listed above are measured.

In accordance with the invention, genes with at least a 2-fold difference in expression are identified and selected for further study. Suitably, genes for which at least a 4-fold
15 difference, more suitably at least a 5-fold difference, yet more suitably a 7-fold difference and preferably a 9-fold difference in expression are identified in step (b) and are selected for further study.

Some particular genes which have already been identified
20 using the method of the invention following colonisation with *B. thetaiotaomicron* and are of particular interest. These include colipase, decay-accelerating factor (DAF), the polymeric IgA receptor, small proline-rich protein 2a (Sprr2a), (angiogenin-3,) Pten, CYP2D2, Sprr2a, rac2, and Mdr-1. They also include
25 angiogenin-4, a newly discovered protein which is related to angiogenin-3.

These genes may have useful therapeutic functions and thus, the expression of one or more of these genes is preferably measured in the method of the invention in order to detect the
30 impact of the particular commensal bacteria undergoing study on their expression.

In particular, the method of the invention has found that expression of colipase and angiogenins such as the angiogenin whose gene is amplifiable using primers such as SEQ ID NO 12 and
35 25 (see Table 3 hereinafter) which is angiogenin-4, as well as

WO 02/42328

PCT/US01/44332

10

Sprrr2a and rac2 should be subject to further investigation.

Thus, the invention further comprises evaluation of the biochemical pathway in which the angiogenin whose gene is amplifiable using primers such as SEQ ID NO 12 and 25 (see Table 3
5 hereinafter) which is angiogenin-4, participates in the intestine.

In an alternative embodiment, the invention further comprises evaluation of the biochemical pathway in which colipase participates in the intestine.

In an alternative embodiment, the invention further
10 comprises evaluation of the biochemical pathway in which Sprrr2a participates in the intestine.

In an alternative embodiment, the invention further comprises evaluation of the biochemical pathway in which rac2 participates in the intestine.

15 Evaluation can be carried out using any suitable method, including those described above.

Identification of genes using the method of the invention as well as further study of the biochemical pathways associated with these, could lead to prophylactic or therapeutic treatment of
20 disease or disorders of the gastrointestinal tract. In particular, by identifying which genes are most affected by the presence or absence of commensal bacteria and which are involved in a biochemical pathway associated with a condition, disease or disorder, it would be possible to devise treatments aimed at
25 altering expression of a particular gene in order to rectify that condition, disease or disorder. Alternatively, it would be possible to intervene pharmacologically in the pathways maintained by the gene products.

This may be effected by administration of an appropriate
30 commensal bacteria. Increased populations of desirable microflora may be achieved by administration of the bacteria in oral form, such as in the form of tablets, pharmaceutical or nutraceutical compositions or even foodstuffs such as live yoghurt cultures

In particular, the invention provides a method of modulating
35 epithelially-expressed angiogenesis factor by colonisation with a

WO 02/42328

PCT/US01/44332

11

commensal bacteria which effects said modulation.

Another particular example of such a methods is a method of modifying metabolism, in particular of dietary lipids, which method involves use of a commensal bacteria identified using a
5 method as described above, as having an effect on said metabolism.

Yet another particular example is a method of modifying epithelial barrier function using a commensal bacteria identified using the above-described method.

Another example is a method of preventing or treating tumors of the intestine, by modifying the population of commensal
10 bacteria present therein which bacteria have been identified using the method of the invention as modulating angiogenesis, or signal transduction.

In a further aspect, the method of the invention may be useful in diagnosis of disease or conditions caused by
15 inappropriate levels of gene expression in the gut. Analysis of commensal microflora taken from a patient will show a high degree of natural variation in the populations of microflora as discussed above. However, the detection of particularly elevated or reduced
20 levels of commensal microflora identified using the method of the invention may indicate that a particular gene is being expressed at abnormal levels, giving rise to a disease state or condition. Treatment of such conditions may be effected either by altering the levels of the commensal bacteria as appropriate and as
25 discussed above, or by direct administration of a bacterial or human gene product or derivative, or of means to block the gene product at the protein level, such as using chemical or biological inhibitors or antagonists of the gene product.

The method of the invention can be used widely to address a
30 question that applies to humans and innumerable other species that reside in our microbe-dominated world, namely how do bacteria contribute to and regulate the physiology and maturation of their hosts? In the case of humans, assembly and maintenance of a microflora undoubtedly involves intricate combinatorial regulatory
35 mechanisms, developed over the course of a long selective process

WO 02/42328

PCT/US01/44332

12

that involved co-evolution of our predecessors with their microbial partners. The results presented below demonstrate the impact of an indigenous bacterial species on expression of genes that participate in vital physiologic functions, and emphasize the
5 importance of viewing our biology as intertwined with the biology of our complex assemblies of resident bacteria.

The results also demonstrate the practicality of using defined *in vivo* models to deduce the responses of specified cellular populations within complex tissues to microbes, in a
10 manner that preserves the influence of the surrounding cellular and environmental milieu.

These models and approaches will allow the pervasive contribution of microbes to human health to be evaluated and microbial products that are useful therapeutically to be
15 identified. In addition, they should reveal how these normal host-microbial relationships affect various disease processes, and provide new perspectives and definitions about what constitutes a pathogenic relationship.

In addition however, the method has already revealed that a
20 number of genes or gene products appear to have a significant effects in intestinal tissue, giving rise to the possibility that pharmaceuticals could be developed to target such genes or gene products in a manner which is beneficial to a patient. This can be done by screening for compounds which modulate the activity of
25 the gene product.

A further aspect of the invention comprises a method for identifying genes that function as regulators of intestinal biology, said method comprising applying the method as described
30 above and detecting expression genes which have not heretofore been associated with such function.

Thus a further aspect of the invention comprises a method of screening compounds having a pharmaceutical application in a gastrointestinal disease, which method comprises assaying the
35 compounds for their ability to modulate the activity of the product of a gene identified using a method described above.

WO 02/42328

PCT/US01/44332

13

Yet a further aspect of the invention is a method of treating or preventing gastrointestinal disease which method comprises administering a therapeutically effective amount of a compound which modulates the activity of the product of a gene identified using a method according to claim 1.

In particular, on the basis of the results reported hereinafter, the invention further provides a method of screening for a compound potentially useful for treatment or prophylaxis of conditions characterized by a defect in intestinal barrier function which comprises assay of the compound for its ability to modulate the activity or amount of small proline-rich protein 2a (sprr2a) or rac2.

Suitable screening methods would be apparent to the skilled person. Once identified, the compounds are useful in the treatment or prophylaxis of conditions in which intestinal barrier function is comprised.

Thus a further aspect of the invention comprises the use of a compound able to modulate the activity or amount of small proline-rich protein 2a (sprr2a) or rac2 in preparation of a medicament for the treatment or prophylaxis of conditions characterized by a defect in intestinal barrier function.

Suitably, the compounds will be formulated as pharmaceutical compositions. Novel compositions of this type and their preparation form a further aspect of the invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows the results of real-time quantitative RT-PCR studies of colonization-associated changes in gene expression in laser capture microdissected ileal cell populations, LCM of the ileum of a colonized mouse. Sections were stained with nuclear fast red. Bars=25µm.

Figure 2 shows the results of real-time quantitative RT-PCR analyses of mRNA levels in isolated from laser-captured cell populations. Values are expressed relative to levels in germ-free

WO 02/42328

PCT/US01/44332

14

mesenchyme using $\Delta\Delta C_t$ analysis described below. Each gene product per sample was assayed in triplicate in 3-4 independent experiments. Representative results (mean \pm 1 S.D.) from pairs of germ-free and colonized mice are plotted.

5

Figure 3 shows the results of an experiment to illustrate the specificity of host responses to colonization with different members of the microflora. Germ-free mice were inoculated with one of the indicated organisms, or with a complete ileal/cecal flora from conventionally raised mice (Conv. microflora) (4). Ileal RNAs, prepared from animals colonized at $\approx 10^7$ CFU/ml ileal contents 10 days after inoculation, were pooled, and levels of each mRNA shown were analyzed by real time quantitative RT-PCR (qRT-PCR). Mean values (\pm 1S.D.) for triplicate determinations are plotted.

Figure 4 shows the nucleotide sequences of mouse angiogenin-4 and angiogenin-3 in alignment (SEQ ID NOS 29 and 30 respectively).

Figure 5 illustrates the sequence alignment of the amino acid sequences of mouse angiogenin family members (SEQ ID NOS 31-34).

Figure 6 shows the locations of primers specific for mouse angiogenin family members.

25

Figure 7 is a graph illustrating tissue distribution of angiogenin-4 mRNA, together with the results of an agarose gel analysis.

Figure 8 is a graph illustrating tissue distribution of angiogenin-1 mRNA.

Figure 9 is a graph illustrating tissue distribution of angiogenin-3 mRNA following quantitative real-time RT-PCR analysis.

35

WO 02/42328

PCT/US01/44332

15

Figure 10 shows the results of RT-PCR analysis showing the absence of angiogenin-related protein expression.

Figure 11 is a set of graphs showing the results of experiments on the microbial regulation of angiogenin-4 expression in the small intestine.

Figure 12 is a graph showing the regulation of angiogenin-4 expression during postnatal development.

Figure 13 is a block graph showing cellular localization of angiogenin-4 expression in small intestine: qRT-PCR analysis of cells isolated from the crypt base.

15 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In order to study at a molecular level, the changes in the intestine orchestrated by commensal bacteria, germ-free mice were colonised with commensal bacteria including *Bacteroides thetaiotaomicron*, a prominent component of the normal mouse and human intestinal microflora.

Global intestinal transcriptional responses to colonization were delineated using high-density oligonucleotide arrays and the cellular origins of specific responses established by laser capture microdissection and real-time quantitative RT-PCR.

The results illustrated hereinafter, reveal that commensal bacteria modulate expression of a large number of genes, some to significant levels. The genes involved participate in diverse and fundamental physiological functions of the gut, including nutrient absorption, mucosal barrier fortification, and xenobiotic metabolism. The species-selectivity of some of the colonization-associated changes in gene expression emphasizes how human physiology can be impacted by changes in the composition of indigenous microflora.

Furthermore, it would appear that some commensals play a role in postnatal developmental transitions. Changes associated

WO 02/42328

PCT/US01/44332

16

with the suckling-weaning transition were elicited in adult mice by *B. thetaiotaomicron*, suggesting that indigenous bacteria play an instructive role in postnatal gut development.

5 Coupling defined in vivo models with comprehensive genome-based analyses thus provides a powerful approach for identifying the critical contributions of resident microbes to host biology.

10 *Bacteroides thetaiotaomicron* is a genetically-manipulatable anaerobe and was chosen for initial study to define the impact of resident bacteria on intestinal biology because it is a prominent member of both the adult mouse and human gut microflora. Moreover, *B. thetaiotaomicron* normally colonizes the distal small intestine (ileum) during the suckling-weaning transition, a time of rapid and pronounced functional maturation of the gut (W. E. C. Moore, L. V. Holdeman, *Appl. Microbiol.* 27, 961 (1974), T. Ushijima, M. Takahashi, K. Tatewaki, Y. Ozaki, *Microbiol. Immunol.* 27, 985 (1983)).

Colonization elicited a concerted response involving enhanced expression of four components of the host's lipid absorption machinery. mRNAs encoding pancreatic lipase related protein-2 (PLRP-2) and colipase increased an average of 4- and 9- fold, respectively (Tables 1 and 2). PLRP-2 hydrolyzes tri- and diacylglycerols, phospholipids and galactolipids. Colipase augments PLRP-2 activity (M. E. Lowe, M. H. Kaplan, L. Jackson-Grusby, D. D'Agostino, M. J. Grusby, *J. Biol. Chem.* 273, 31215 (1998)). In addition, there was a 4-6-fold increase in L-FABP mRNA, which encodes an abundant cytosolic protein involved in fatty acid trafficking within enterocytes, and an induction of apolipoprotein AIV, a prominent component of triglyceride-rich lipoproteins (chylomicrons, VLDL) secreted from the basolateral surfaces of enterocytes (Table 1).

30 Colonization led to an increase in ileal levels of Na⁺/glucose cotransporter (SGLT-1) mRNA. There was also a concerted rise in expression of several components of the host's lipid absorption/export machinery, including pancreatic lipase-related protein-2 (PLRP-2), colipase, liver fatty acid binding

WO 02/42328

PCT/US01/44332

17

protein (L-FABP), and apolipoprotein A-IV (See Table 1 hereinafter). The prominent decrease in expression of fasting-induced adipose factor, a novel PPAR α target known to be repressed with fat feeding (S. Kersten, et al., *J. Biol. Chem.* **275**, 28488 (2000).), provided further evidence for augmented lipid uptake in colonized mice.

The changes in expression of these 6 genes in particular indicate that *B. thetaiotaomicron* elicits an increased host capacity for nutrient absorption/processing and may provide a partial explanation as to why germ-free rodents require a higher caloric intake to maintain their weight than those with a normal microflora (B. S. Wostmann, C. Larkin, A. Moriarty, E. Bruckner-Kardoss, *Lab. Anim. Sci.* **33**, 46 (1983)).

Additionally, the applicants have found that colonisation produces changes in expression of four genes involved in dietary metal absorption. A high affinity epithelial copper transporter (CRT1) mRNA was increased, while metallothionein-I, metallothionein-II, and ferritin heavy chain mRNAs were decreased (Table 1). These changes suggest that colonization engenders increased capacity to absorb heavy metals (e.g., via CRT1) and a concomitant decreased capacity to sequester them within cells (MT-I/II, ferritin). This implies greater host demand for these compounds, either due to increased utilization by the host's own metabolic pathways or to competition with the microbe. The changes in SGLT-1, colipase, L-FABP, and MT1 (plus 8 other mRNAs discussed below), were independently validated by qRT-PCR (C.A. Heid, J. Stevens, K.J. Livak, P.M. Williams, *Genome Res.* **6**, 986 (1996) (see Table 2 below)).

Colipase plays a critical role in dietary lipid metabolism by stimulating the activity of both pancreatic triglyceride lipase and PLRP-2. Furthermore, proteolytic cleavage of procolipase yields a pentapeptide (enterostatin) that functions as a satiety signal for fat ingestion (S. Okada, D. A. York, G. A. Bray, *Physiol. Behav.* **49**, 1185 (1991)). The significantly elevated expression found following colonisation with *B. thetaiotaomicron*

WO 02/42328

PCT/US01/44332

18

illustrated hereinafter are indicative of a previously unappreciated mechanism by which the intestinal epithelium, together with a resident gut bacterium, contributes to dietary lipid metabolism.

5 An intact mucosal barrier is critical for accomodating the vast population of resident intestinal microbes. Its disruption can provoke an immune response that is deleterious to the host and to the stability of luminal microflora, leading to pathologic states such as inflammatory bowel disease (P. G. Falk, et al.,
10 *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1157 (1998)).

It has been found that colonization with *B. thetaiotaomicron* produces no detectable inflammatory response, as judged by histologic surveys (L. Bry, P.G. Falk, T. Midtvedt, J. I. Gordon, *Science* 273, 1380 (1996). Moreover, there is no discernible
15 induction (or repression) of the many genes, represented on the microarrays, that are involved in responses. An influx of IgA-producing B-cells does occur in the ileal mucosa 10days after introduction of *B. thetaiotaomicron*; similar commensal-induced IgA responses have been shown to be T-cell independent and to enforce
20 barrier integrity (A.J. Macpherson et al., *Science* 288, 2222 (2000).

Genes involved in barrier function account for 10% (7/71) of the changes in gene expression observed with *B. thetaiotaomicron* colonization. Microarray and qRT-PCR analyses revealed that the
25 influx of IgA producing B-cells is accompanied by increased expression of the polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) that transports IgA across the epithelium (Tables 1,2). There is also augmented expression of the CRP-ductin gene, encoding both a component of the protective mucus layer overlying the epithelium
30 (MUCLIN; R.C. DeLisle, et al., *Am. J. Physiol.* 275, G219 (1998)) and a putative receptor for trefoil peptides that participate in fortification/healing of the intestinal mucosa (L.Thim, E. Mørtz, *Regul. Pept.* 90, 61 (2000). Additionally, there is increased expression of decay accelerating factor (DAF), an apical
35 epithelial surface protein that inhibits complement-mediated

WO 02/42328

PCT/US01/44332

19

cytolysis (M.E. Medof, et al, *J. Exp. Med.* **165**, 848 (1987)). Coincident enhancement of pIgR, MUCLIN, and DAF expression should not only help prevent bacteria from crossing the epithelial barrier, but should also prevent mucosal damage that may ensue
5 from microbial activation of complement components present in intestinal secretions.

It has been found that decay accelerating factor (DAF) expression increased 5-fold with colonization using *B. thetaiotaomicron*. DAF is known to be present on the apical surface
10 of intestinal epithelial cells and to inhibit complement-mediated cytolysis (M.E. Medof, E.I. Walter, J.L. Rutgers, D.M. Knowles, V. Nussenzweig, *J. Exp. Med.* **165**, 848 (1987)). The coincident enhancement of DAF, pIgR, and MUCLIN expression should not only
15 help prevent bacteria from crossing the epithelial barrier, but also prevent any mucosal damage that may ensue from microbial activation of complement components present in intestinal secretions.

The most pronounced response to *B. thetaiotaomicron* was an increase in small proline-rich protein-2 (sprr2a) mRNA (Table 1).
20 qRT-PCR analysis established that there is a 205±64-fold elevation in this mRNA with colonization (Table 2). Sprr2a is a member of a family of proteins associated with terminal differentiation of squamous epithelial cells. Sprrs contribute to the barrier functions of squamous epithelia, both as a component of the
25 cornified cell envelope, and as cross-bridging proteins linked to desmosomal desmoplakin, a prominent desmosomal constituent (P. M. Steinert, L. N. Marekov, *Mol. Biol. Cell* **10**, 4247 (1999)). Colonization did not produce a notable change (i.e. two fold or more), in the expression of genes encoding other proteins linked
30 to desmosomes (desmoplakin, plakoglobin, plakophilin, plectin), or tight junctions (ZO-1, occludin).

Sprr2a expression in the intestine and its microbial regulation are novel findings. The critical contribution of sprr2a to the squamous epithelial barrier and the dramatic response of
35 sprr2a expression to *B. thetaiotaomicron* together suggest that

WO 02/42328

PCT/US01/44332

20

this protein plays an important role in intestinal barrier function. It is therefore a particularly suitable target for further investigation in accordance with the invention, in particular by evaluating the biochemical pathway in which Sprr2a
5 participates in the intestine.

A prominent marker of the weaning transition is the decline in lactase-phlorizin hydrolase (LPH), an enterocytic brush-border enzyme that hydrolyzes the principal milk sugar, lactose. LPH mRNA levels rise throughout the small intestine of conventionally raised
10 animals during the suckling period, and then fall in the ileum during weaning (S. D. Krasinski et al., *Am. J. Physiol.* 267, G584 (1994)). The effects of commensal bacteria on expression of these genes in particular may be of interest in determining whether the bacteria have significant impact.

Using the method of the invention, it has been found that colonization results in increased expression of angiogenin-4 which resembles angiogenin-3, a secreted protein with demonstrated angiogenic activity (X. Fu, et al., *Mol. Cell Biol.* 17, 1503 (1997), X. Fu, et al., *Growth Factors* 17, 125 (1999)). The 11-fold
20 increase in expression of the angiogenesis factor recognizable by amplification using primers of SEQ ID NO 12 and SEQ ID NO 25, which is angiogenin-4 (Table 1,2) upon *E. thetaiotaomicron* colonization represents a novel mode of regulation for an angiogenesis factor and so may be the subject of further investigation in accordance
25 with the invention.

Laser capture microdissection (LCM) experiments described below have delineated the cellular origins of this response. This suggests that the presence of bacteria influences intestinal vascularization.

30 The gut is the site of first contact of innumerable ingested toxins and xenobiotics. The relative contributions of luminal bacteria and the epithelium to detoxification and metabolism of

WO 02/42328

PCT/US01/44332

21

these compounds has been difficult to delineate in conventionally-raised mammals. It has been found that colonization of germ-free mice with *B. thetaiotaomicron* results in reduced expression of several genes involved in these processes (Table 1 below). There is a decrease in the mRNA encoding glutathione S-transferase, which detoxifies a variety of electrophiles, and a corresponding decrease in multi-drug resistance protein-1 (Mdr-1), which exports glutathione-conjugated compounds from the epithelium (R. W. Johnstone, A. A. Ruefli, M. J. Smyth, *Trends Biochem. Sci.* 25, 1 (2000)). Expression of CYP2D2 (debrisoquine hydroxylase) involved in oxidative drug metabolism in humans (M. Ingelman-Sundberg, et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 342 (1999), also declines with colonization. Reduced expression of these genes indicates that *B. thetaiotaomicron* may itself contribute to detoxification of compounds that are deleterious to the host.

A genetic polymorphism that produces a deficiency in this cytochrome P-450 is common in humans and associated with altered oxidative drug metabolism (M. Ingelman-Sundberg, M. Oscarson, R. A. McLellan, *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 342 (1999)). The reduced expression of these three host genes suggests that commensal bacteria such as *B. thetaiotaomicron* contributes to the detoxification of compounds that could be deleterious to the host. This indicates that a component of the normal microflora can modulate host genes involved in drug metabolism, and underscore how variations in such metabolism between individuals may arise from differences in their resident gut flora. Consequently, evaluation of the effect on commensal bacteria on expression of these genes using the method of the invention may be helpful

Pten is a member of a family of dual specificity protein phosphatases. *PTEN* haploinsufficiency in humans is associated with increased susceptibility to tumorigenesis (D. J. Marsh et al., *Hum. Mol. Genet.* 7, 507 (1998)). Furthermore, *Pten*^{+/-} ↔ *Pten*^{+/+} chimeric mice develop colonic polyps and adenocarcinoma (A. DiCristofano, B. Pesce, C. Cordon-Cardo, P. P. Pandolfi, *Nat.*

WO 02/42328

PCT/US01/44332

22

Genet. 19, 348 (1998)). The human homolog of Gp106, TBZ/DP1, is a component of a locus which when mutated produces multiple intestinal adenomas (R. W. Burt, *Adv. Exp. Med. Biol.* 470, 99 (1999)). The finding that a component of the microflora affects expression of genes such as the angiogenesis factor whose gene is amplifiable using primers such as SEQ ID NO 12 and 25 (see Table 3 hereinafter) which is angiogenin-4, Pten and Gp106 highlights the importance of considering mechanisms by which intestinal bacteria may contribute to the initiation or progression of tumorigenesis within, or even outside, the gut.

The motility of the intestine is regulated by its enteric nervous system (ENS). The relative contributions of intrinsic and extrinsic factors to ENS activity are poorly understood, despite the fact that irritable bowel syndrome, which involves dysregulated motor activity, is a major health problem. The impact of commensal bacteria such as *B. thetaiotaomicron* on gut physiology extends to genes expressed in the enteric nervous system (ENS) and in the muscular layers. mRNAs encoding the L-glutamate transporter and L-glutamate decarboxylase, which converts glutamate to GABA, are both increased, suggesting a colonization-associated effect on the glutamatergic neurons of the ENS (M. T. Liu, J. D. Rothstein, M. D. Gershon, A. L. Kirchgessner, *J. Neurosci.* 17, 4764 (1997)). Enhanced expression of vesicle-associated protein-33, a synaptobrevin-binding protein involved in neurotransmitter release (P.A. Skehel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 1101 (2000)) is also observed. There is a concomitant increase in two muscle-specific mRNAs: enteric γ -actin and cysteine-rich protein 2. Previous electrophysiological studies of germ-free and conventionally-raised animals have suggested that the microflora plays a role in gut motility (E. Husebye, P. M. Hellstrom, T. Midtvedt, *Dig. Dis. Sci.* 39, 946 (1994)). The method of the invention can provide molecular details about how resident gut microbes, such as *B. thetaiotaomicron*, may act to modulate motility.

WO 02/42328

PCT/US01/44332

23

B. thetaiotaomicron normally colonizes mouse and human intestine during weaning (W. E. C. Moore, L. V. Holdeman, *Appl. Microbiol.* 27, 961 (1974), T. Ushijima, M. Takahashi, K. Tatewaki, Y. Ozaki, *Microbiol. Immunol.* 27, 985 (1983)). This period is
5 characterized by a dramatic shift in the composition of the microflora and by a series of critical developmental changes in the intestinal epithelium. It is unclear how many of these changes are regulated by intrinsic cellular mechanisms, and how many are controlled by extrinsic signals emanating from the mesenchyme, or
10 from luminal (dietary, microbial) factors.

Expression profiling revealed surprisingly that colonization of adult germ-free mice with *B. thetaiotaomicron* elicits other responses that mimic changes which normally occur in the maturing intestine of conventionally-reared animals. Expression of lactase,
15 which hydrolyzes the principal milk sugar (lactose), normally declines during the weaning period (S.D. Krasinski et al., *Am. J. Physiol.* 267, G584 (1994)). Colonization of adult germ-free mice with *B. thetaiotaomicron* produces a decrease in ileal lactase mRNA (Table 1,2 below). These findings indicate how members of the
20 emerging postnatal normal flora may contribute to intestinal maturation.

Adenosine deaminase (ADA) and polyamines (spermine, spermidine) play important roles in postnatal intestinal maturation (G. D. Luk, L. J. Marton, S. B. Baylin, *Science* 210,
25 195 (1980), J. M. Chinsky, et al., *Differentiation* 42, 172 (1990)). It has been found that *B. thetaiotaomicron* colonization produces an increase in mRNAs encoding ADA and ornithine decarboxylase (ODC) antizyme but not a 5-fold increase. The antizyme, whose expression is affected by polyamine levels, is a
30 critical regulator of ODC turnover (J. Nilsson, S. Koskiniemi, K. Persson, B. Grahn, I. Holm, *Eur. J. Biochem.* 250, 223 (1997)); an increase in antizyme mRNA levels therefore suggests that colonization influences ileal polyamine synthesis. These data demonstrate that genes controlling synthesis of two classes of
35 regulators of gut maturation, adenosine and polyamines, are

WO 02/42328

PCT/US01/44332

24

themselves modulated by a component of the microflora, leading to the idea that bacteria serve as upstream effectors of a cascade that affects gut maturation. Other colonization experiments, described below, indicate that other gut commensals have the capacity to engineer such changes.

Changes in gut maturation associated with the suckling-weaning transition are also thought to be regulated by increases in glucocorticoids (S. J. Henning, D. C. Rubin, R. J. Shulman, in *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, L. R. Johnson, Ed. (Raven Press, New York, 1994), pp. 584-586). *E. thetaiotamicron* colonization as described hereinafter was accompanied by reduced expression of two genes whose transcription is known to be suppressed by glucocorticoids: 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (M. D. Mitchell, V. Goodwin, S. Mesnage, J. A. Keelan, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 62, 1 (2000)) and glucocorticoid-attenuated response gene-16 (J. B. Smith, H. R. Herschman, *J. Biol. Chem* 270, 16756 (1995)). Furthermore, there was reduced expression of another gene whose product interacts with nuclear hormone receptor family members, the immunophilin FKBP51 (S. C. Nair et al., *Mol. Cell. Biol.* 17, 594 (1997)). However, the reduction was not greater than 5-fold in any individual case. Thus, other commensal bacteria may be investigated using the method of the invention to see if these could produce a more significant effect.

As mentioned above, the applicants have found that a particular member of the angiogenin family, whose gene is amplifiable using primers of SEQ ID NO 12 and 25 above and is expressed in mouse intestine, is novel. Thus this protein and the gene encoding it forms a further aspect of the invention.

A further aspect of the invention provides a protein of SEQ ID NO 29 as shown in Figure 4 hereinafter, or an allelic variant thereof or a protein which has at least 85% amino acid sequence identity with SEQ ID NO 29.

In particular, the invention provides a protein of SEQ ID NO 29.

WO 02/42328

PCT/US01/44332

25

In yet a further aspect, the invention provides a nucleic acid which encodes a protein as described above.

These proteins are useful as a target for the screening process of the invention.

5 The following Examples illustrate the invention.

Example 1

Age-matched groups of 7-15 week-old germ-free NMRI/KI mice were maintained in plastic gnotobiotic isolators on a 12hour light cycle, and given free access to an autoclaved chow diet (B&K Universal). Males were inoculated with wild-type *B. thetaiotaomicron* (strain VPI-5482) (L. Hooper et al (1999) supra).
10 Mice were sacrificed 10 days later, 2hours after lights were turned on. The distal 1 cm of the small intestine was used to define the number of colony forming units per ml of extruded
15 luminal contents.

Ileal RNA was isolated from mice with $>10^7$ colony forming units (CFU) of bacteria per ml of luminal contents. [Earlier studies had shown that 10 days was sufficient to produce robust colonization of the ileum and that $\approx 10^7$ CFU/ml were necessary for
20 full induction of fucosylated glycan production in the ileal epithelium (L Hooper et al, (1999) supra. L. Bry, P. G. Falk, T. Midtvedt, J. I. Gordon, *Science* 273, 1380 (1996))].

Total ileal RNA samples, prepared from the 3 cm of intestine adjacent the distal 1 cm of the small intestine of 4 mice from 3
25 independent colonizations, and from age- and gender-matched germ-free mice (n=8), using a RNA (Qiagen RNeasy kit), were each pooled, in equal amounts, for generation of biotinylated cRNA targets. Two targets were prepared, independently, from 30 μ g of each total cellular RNA pool, using the method outlined by C. K. Lee, et al.,
30 *Science* 285, 1390 (1999).

SYBR green-based real-time quantitative RT-PCR studies (N. Steuerwaldt al., *Mol. Hum. Reprod.* 5, 1034 (1999)) were performed using the gene-specific primers listed in Table 3 below and DNase-treated RNAs.

35 Control experiments established that the signal for each

WO 02/42328

PCT/US01/44332

26

amplicon was derived from cDNA and not from primer dimers or genomic DNA. Signals were normalized to an internal reference mRNA (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). The normalized data were used to quantitate the levels of a given mRNA in germ-free
5 and colonized ileums ($\Delta\Delta C_T$ analysis; Bulletin #2, ABI Prism 7700 Sequence Detection System).

27

Table 3

gene name	forward primer	SFQ ID NO	reverse primer	SFQ ID NO
Nat ⁺ /glucose cotransporter (SGLT1) colipase	5'- CAGAGACCCCAITTAAGTGGAGC A	1	5'- TCGTTGCACAAITGACCTGATC	14
	5'- TGACACACATCCCTGGGCATT	2	5'- ACAACCGGTAGTAAATCCCATAA AGG	15
liver fatty acid binding protein (L-FABP)	5'- CTCCGGCAAGTACCAATTGC	3	5'- TGTCTTCCCTTTGTGGATGAG	16
metallothionein 1 (MT-1)	5'- ATGTGCCCCAAGGGCTGTGT	4	5'- AACAGGGGTGGAAACTGTATAAGGA AGAC	17
polymeric immunoglobulin receptor (pIgR)	5'- CTTCCCTCTGTCTCTCAAGGT	5	5'- GGCCTAACTAAGCCAGGCTT	18
deacyl acetylating factor (DAF)	5'- CAACCCAGGGTACAGGCTAGTC	6	5'- GGTGGCTCTGGACAATGTAATTTCC	19
small proline-rich protein 2a (spr2a)	5'- CCTTGTCTCCCAAGCG	7	5'- AAGGCATGTGTGACTGCCAT	20
multi-drug resistance protein (mdr1a)	5'- GCGGCTTCTCCAAAAGTCTACA	8	5'- CGTGTCTCTACTCCCGGTTTCC	21
glutathione S-transferase (GST)	5'- CATCCAGCTCCTAGAAAGCCATT	9	5'- GGGTTGCCAGGAACCTTTAATTG TA	22
lactase-phlorizin hydrolase	5'- TTGAATGGCCACACAGGCT	10	5'- AGCGGACTATGGAGGCGTAG	23
adenosine deaminase (ADA)	5'- GGGCAGTAAAGAATGGCATTG	11	5'- CTGTCTTGAAGGATGTCCACAGC	24
angiotensin-4	5'- TCGATTTCCAGTCAACCCTTG	12	5'- CACAGGCAATAACAATAATCT GAAATCT	25
glyceraledehyde 3-phosphate dehydrogenase	5'- TGGCAAAAGTGGAGATTGTTGCC	13	5'- AAGATGGTGAATGGCTTCCCG	26

27

WO 02/42328

PCT/US01/44332

28

Each cRNA was hybridized to Affymetrix MullK and Mul9K chip sets representing ~25,000 unique mouse genes from Unigene Build 4 and the TIGR cluster databases, according to Affymetrix protocols. Data collected from each chip were scaled so that the overall fluorescence intensity across each chip was equivalent (target intensity=150). Pairwise comparisons of 'germ-free' versus 'colonized' expression levels were performed.

A 2-fold or more difference was recorded if three criteria were met: the GeneChip software returned a difference call of "increased" or "decreased", the mRNA was called 'present' by GeneChip software in either germ-free or colonized cRNA, and the difference was observed in duplicate microarray hybridizations.

mRNAs represented by 118 probe sets changed by at least 2-fold with colonization, as defined by duplicate microarray hybridizations.

It was found that transcripts represented by 95 probe-sets were increased, while those represented by 23 probe-sets were decreased. The genes represented by 84 of these probe sets (71 unique genes) were assigned to functional groups and these are set out in Table 1 hereinafter. In this table, results are presented as the fold-difference in mRNA levels between colonized and germ-free ileum and represent average values from duplicate microarray hybridizations. The average fold-changes for genes represented by 2 or more independent probe sets are listed separately.

¹ These probe sets do not distinguish between family members.

30

Table 1
Colonization-associated changes in distal small intestinal gene
expression

Gene	function	GenBank/TIG R Reference	average fold Δ
Nutrient Uptake and Metabolism			
carbohydrates			
Na ⁺ /glucose cotransporter (SGLT1)	glucose uptake	AF163846	+2.4
lactase phlorizin- hydrolase	lactose hydrolysis	AA521747	-2.2
lipids			
pancreatic lipase- related protein 2	lipid metabolism	M30687	+4.1
colipase	lipid metabolism	AA611440	+9.4
liver fatty acid binding protein	lipid metabolism	Y14660	+4.0, +5.6
apolipoprotein A-IV	lipid metabolism	M13966	+2.2
fasting-induced adipose factor	regulation of lipid metabolism	AF278699	-9.0
phospholipase B	lipid metabolism	TC38683	-2.2
CYP27	cholesterol 27- hydroxylation	TC25974	-2.2
metals			
high-affinity copper transporter	copper uptake	AA190119	+2.6
metallothionein I	Cu/Zn sequestration	V00835	-4.6, -6.1
metallothionein II	Cu/Zn sequestration	K02236	-5.7, -6.3
ferritin heavy chain	iron sequestration	M24509	-4.5

WO 02/42328

PCT/US01/44332

30

Gene	function	GenBank/TIG R Reference	average fold Δ
cellular energy production			
isocitrate dehydrogenase subunit	citric acid cycle	U68564	+2.4
cytochrome c oxidase subunit 1	mitochondrial electron transport	TC106691	+2.4
succinyl CoA transferase	ketone body utilization	TC18674	+2.0
transketolase	pentose phosphate pathway	u05809	+2.4
phosphogluconate dehydrogenase	Pentose phosphate pathway	C81475	+2.8
malate oxidoreductase	malate-aspartate shuttle	J02652	+6.0
aspartate aminotransferase	malate-aspartate shuttle	J02623	+2.5
hormonal/maturational responses			
adenosine deaminase	adenosine inactivation	M10319	+2.3
ornithine decarboxylase antizyme	regulation of polyamine levels	U52823	+2.4
15- hydroxyprostaglandin dehydrogenase	prostaglandin inactivation	U44389	-3.2
GARG-16	response to glucocorticoid production	U43084	-4.0, -4.5

WO 02/42328

PCT/US01/44332

31

Gene	function	GenBank/TIG R Reference	average fold Δ
FKBP51	component of steroid receptor complex	U16959	-3.8
androgen-regulated vas deferens protein	steroidogenesis	J05663	-3.3, -3.4
short chain dehydrogenase	steroid/retinoid metabolism	AF056194	-2.2, -2.8
heat-stable antigen	hematopoietic differentiation marker	X53825	+3.0
Mucosal barrier function			
decay-accelerating factor	complement inactivation	D63679	+5.2
polymeric Ig receptor	transepithelial IgA transport	U06431	+2.3
small proline-rich protein 2a	crosslinking protein	AJ005559	+10.6, +102
serum amyloid A protein	acute phase response	U60437	+2.8, +5.4
CRP-ductinα (MUCLIN)	mucin-like protein	U37438	+2.4
zeta proteasome chain	antigen presentation	AF019661	+2.8
anti-DNA IgG light chain		U55583	+2.5
Detoxification/drug resistance			
glutathione S-transferase	GSH conjugation to electrophiles	L06047	-2.4
P-glycoprotein (mdrla)	export of GSH-conjugated compounds	M33581	-4.6

WO 02/42328

PCT/US01/44332

32

Gene	function	GenBank/TIG R Reference	average fold Δ
CYP2D2	4-hydroxylase	TC36686	-2.6
Enteric nervous system/muscular layers			
L-glutamate transporter	glutamate uptake	U73521	+4.4
L-glutamate decarboxylase	GABA production	M55253	+2.2
vesicle-associated protein-33	neurotransmitter release	AF157497	+2.2
cysteine-rich protein 2	cGMP kinase I target	AA028770	+3.2
smooth muscle (enteric) gamma actin	contractility	M26689	+2.3
SM-20	growth-factor responsive gene	TC33445	+4.8
Calcium channel5 subunit	calcium channel regulation	AJ272046	-2.2
angiogenesis			
angiogenin-4	unknown	SEQ ID NO 29	+10.9
angiogenin-related protein	unknown	U22519	+6.4
angiogenin family'			+2.4, +6.0, +7.0
cytoskeleton/extra-cellular matrix			
gelsolin	actin binding protein	J04953	+7.9

WO 02/42328

PCT/US01/44332

33

Gene	function	GenBank/TIG R Reference	average fold Δ
dextrin	actin depolymerizing factor	W17549	+3.0
alpha cardiac actin	contractility	M15501	+3.4
endoB cytokeratin	intermediate filament protein	m11686	+3.0
fibronectin	extracellular matrix protein	M18194	+2.9, +3.2
proteinase inhibitor 6	serine protease inhibitor	U25844	+2.6
mpgc60	serine protease inhibitor	Y11505	+2.5
alpha 1 type 1 collagen	extracellular matrix protein	X06753	+2.2, +4.7
signal transduction			
Pten	protein/lipid phosphatase	U92437	+3.2
gp106 (TE2/DP1)	unknown	U28168	+6.9
rac2	ras-related GTP- binding protein	X53247	+7.0
Semcap2	SemaF-associated protein	AF061262	-2.9
serum and glucocorticoid- regulated kinase	serine/threonine protein kinase	AF139638	-2.6
STE20-like protein kinase	serine/threonine protein kinase	AA154321	+2.6
B-cell myeloid kinase	unkown	J03023	+2.1
general cellular functions			

Gene	function	GenBank/TIG R Reference	average fold Δ
glutathione reductase	maintainance of reduced glutathione	X76341	+2.9
calmodulin	calcium homeostasis	M27844	+2.2
elF3 subunit	translation initiation	U70736	+2.7
hsc70	stress response	U73744	+2.9
oligosaccharyl transferase subunit	protein N-glycosylation	U84211	+3.4
fibrillarin	ribosomal RNA processing	E22593	+2.4
H ⁺ -transporting ATPase	intracellular organelle acidification	AA108559	+2.9
Msec23	component of the COPII complex	AA116735	+2.8
vacuolar protein sorting 35	membrane protein recycling	U47024	+2.4

- Importantly, a large of number of the genes identified using these criteria are involved in modulating fundamental intestinal functions: 20 of the 71 genes (28%) were grouped
- 5 under nutrient uptake and metabolism. There was also a concerted rise in expression of several components of the host's lipid absorption/export machinery, including pancreatic lipase-related protein-2 (PLRP-2), colipase, liver fatty acid binding protein (L-FABP), and apolipoprotein A-IV (Table 1).
- 10 The prominent decrease in expression of fasting-induced adipose factor, a novel PPARγ target known to be repressed with fat feeding (S. Kersten, et al., *J. Biol. Chem.* **275**, 28488 (2000), provided further evidence for augmented lipid uptake in colonized mice. The changes in expression of these 6 genes
- 15 indicate that *B. thetaiotaomicron* elicits an increased host

WO 02/42328

PCT/US01/44332

35

capacity for nutrient absorption/processing and helps explain why germ-free rodents require a higher caloric intake to maintain their weight than those with a microflora.

5 Additionally, there were changes in expression of four genes involved in dietary metal absorption. A high affinity epithelial copper transporter (CRT1) mRNA was increased, while
10 metallothionein-I, metallothionein-II, and ferritin heavy chain mRNAs were decreased (Table 1). These changes suggest that colonization engenders increased capacity to absorb heavy metals (e.g., via CRT1) and a concomitant decreased capacity to sequester them within cells (MT-I/II, ferritin). This implies
15 greater host demand for these compounds, either due to increased utilization by the host's own metabolic pathways or to competition with the microbe. The changes in SGLT-1, colipase, L-FABP, and MT1 (plus 8 other mRNAs discussed below), were independently validated by qRT-PCR (C.A. Heid, J. Stevens, K.J. Livak, P.M. Williams, *Genome Res.* 6, 986 (1996). (Table 2).

20 Of these, genes which were found to have a difference in expression levels of 5-fold or more as a result of *B. thetaiotaomicron* colonisation were colipase, liver fatty acid binding protein, fasting-induced adipose factor, metallothionein I and metallothionein II, malate oxidoreductase, Sprr2a, angiogenin-3, angiogenin-related
25 protein, angiogenin family, gelsolin, gp106(TB2/DP1) and rac 2. Of these, colipase, fasting-induced adipose factor, angiogenin 3 and Sprr2a genes showed a difference in expression levels of 9-fold or more.

30 A notable feature of the host response to *B. thetaiotaomicron* was the absence of detectable or changed expression of the many genes involved in immuno-inflammatory processes that are represented on the microarrays. These include genes involved in the NF- κ B-regulated processes that are critical regulators of host responses to invasive pathogens
35 (D. Elewaut et al., *J. Immunol.* 163, 1457 (1999)). The absence of these responses can be contrasted to results obtained in a recent cDNA microarray analysis of the response of a human

intestinal epithelial cell line to *Salmonella*, an invasive gut pathogen (L. Eckmann, J. R. Smith, M. P. Housley, M. B. Dwinell, M. F. Kagnoff, *J. Biol. Chem.* 275, 14084 (2000)). The lack of evidence for an evoked *in vivo* immuno-inflammatory response is consistent with the host's need to accommodate resident gut microbes, such as *B. thetaiotaomicron*, for its entire lifespan.

Colonization increases expression of two genes implicated in development of gut neoplasia, Pten and Gp106 (Table 1).

10 Example 2

In a further analysis two techniques were combined. First, laser-capture microdissection (LCM) was used to recover three cell populations from frozen sections of ileum harvested immediately after sacrifice of germ-free and colonized mice. The three populations are (i) epithelium present in crypts (the proliferative compartment of the intestine containing undifferentiated cells as well as differentiated members of the Paneth cell lineage); (ii) epithelium overlying villi (containing post-mitotic, differentiated members of the intestine's other three lineages); and (iii) mesenchyme underlying crypt-villus units (Fig. 1).

LCM was performed on groups of mice independent of those used to generate RNA for the microarray analysis. 7µm-thick sections were cut from frozen ileums and LCM conducted using the PixCell II system from Arcturus (7.5µm diameter laser spot). RNA was prepared from dissected cell populations using the RNA Micro-Isolation Kit (Stratagene) and standard histochemical protocols. Laser capture microdissection (LCM) was carried out using conventional methods as described by MR Emmert-Buck et al., *Science*, 274, 998-1001, 1996 and R.F. Bonner et al., *Science* 278:1203-4, 1997.

The results are shown in Figure 1.

Second, real-time RT-PCR was used to quantitate levels of specific mRNAs in the laser captured cell populations. The LCM/qRT-PCR analysis was performed using germ-free and colonized mice from 3 experiments that were independent of those used for microarray profiling.

Each sample was analyzed in triplicate in 4-independent

WO 02/42328

PCT/US01/44332

37

experiments. Mean values for the independent determinations \pm 1 S.D. are shown in Table 2

5 Table 2
Real-time quantitative RT-PCR studies of colonization-
associated changes in gene expression

Gene	Fold A (relative to germ-free)
Na ⁺ /glucose cotransporter (SGLT1)	2.6 \pm 0.9
colipase	6.6 \pm 1.9
liver fatty acid binding protein (L-FABP)	4.4 \pm 1.4
metallothionein I (MT-I)	-5.4 \pm 0.7
polymeric immunoglobulin receptor (pIgR)	2.6 \pm 0.7
decay accelerating factor (DAF)	5.7 \pm 1.5
small proline-rich protein 2a (sprr2a)	205 \pm 64
multi-drug resistance protein (mdr1a)	-3.8 \pm 1.0
glutathione S-transferase (GST)	-2.1 \pm 0.1
lactase-phlorizin hydrolase	-4.1 \pm 0.6
adenosine deaminase (ADA)	2.6 \pm 0.6
angiogenin-4	9.1 \pm 1.8

10 Colipase is produced by the exocrine (acinar) cells of the pancreas. Expression in the intestine had not been reported previously. Therefore, LCM and real-time RT-PCR analysis were employed to delineate the cellular origins of its response to *B. thetaiotaomicron*.

15 The results show that sprr2a mRNA is confined to the epithelium where its concentration is 7-fold higher on the villus compared to the crypt (Fig. 1B). *B. thetaiotaomicron* elicits a 280-fold increase in the villus epithelium. This value is in good agreement with the increase documented in total ileal RNA (Table 2). The cellular origin of the sprr2a
20 response supports the hypothesis that it participates in fortifying the intestinal epithelial barrier in response to bacterial colonization.

WO 02/42328

PCT/US01/44332

38

Colipase is produced by the exocrine acinar cells of the pancreas. LCM/qRT-PCR revealed that colipase mRNA is also present in the ileal crypt epithelium, where it increases 10-fold upon *B. thetaiotaomicron* colonization (Fig. 1B). This accounts for the increase detected by microarray and qRT-PCR analyses of total ileal RNA (Tables 1,2). Colipase plays a critical role in dietary lipid metabolism by stimulating the activity of both pancreatic triglyceride lipase and PLRP-2 (M.E. Lowe, et al., *J. Biol. Chem.* **273**, 31215 (1998). Furthermore, proteolytic cleavage of procolipase yields a pentapeptide (enterostatin) that functions as a satiety signal for fat ingestion (S. Okada, et al., *Physiol. Behav.* **49**, 1185 (1991). Analyses of colipase gene regulation reveal a previously unappreciated contribution of the intestinal epithelium (together with a resident gut commensal) to dietary lipid metabolism.

Angiogenin-3 was originally identified in NIH 3T3 fibroblasts (X. Fu et al., *Mol. Cell Biol.* **17**, 1503 (1997), but little is known about its cellular origins or regulation. LCM and qRT-PCR revealed that the crypt epithelium is the predominant location of a gene amplifiable using primers such as SEQ ID NO 12 and 25 (see Table 3 hereinbefore) which are specific for angiogenin-3 mRNA, but also for the new protein which is angiogenin-4 mRNA and that colonization results in a 7-fold increase in its levels within this compartment. This increase accounts for the change in expression defined by microarray and qRT-PCR analyses of total ileal RNA (Tables 1,2). The epithelial location of a secreted/RNase/angiogenesis factor puts it in a strategic position to function as an effector of a number of host responses to microbial colonization (e.g., enhanced absorption/distribution of nutrients/augmented barrier function).

The LCM/qRT-PCR studies of sprr2a, colipase and angiogenin-4 establish the feasibility of assigning an *in vivo* host response to a particular cell population in a complex tissue, and of describing the cellular response in quantitative terms. In recovering a responding cell population and expressing its reaction to a microorganism in quantitative terms, the

WO 02/42328

PCT/US01/44332

39

applicants results demonstrate how it is possible to move beyond *in vitro* models and use *in vivo* systems to study the impact of a microbe on host cell gene expression.

Colonization of germ-free mice with *B. thetaiotaomicron* produces a decrease in ileal LPH mRNA levels (Table 1,2) (although not by as much as five times). Analysis of RNA isolated from laser-captured epithelial and mesenchymal cell populations established that the colonization-induced reduction in LPH mRNA levels occurs primarily within the villus epithelium (Fig. 2).

Comparison of transcript levels between germ-free and *B. thetaiotaomicron*-associated mice revealed a colonization-associated increase in expression of angiogenin-4.

The 11-fold induction of its mRNA seen in Example 1 was independently validated by real-time RT-PCR of total ileal RNAs (Table 2). Angiogenin-3 was originally identified in NIH 3T3 fibroblasts (X. Fu, M. P. Kamps, *Mol. Cell Biol.* 17, 1503 (1997)). However, LCM and real-time RT-PCR analysis revealed that in colonized ileum, the levels of mRNA which are amplifiable using primers designed for angiogenin-3 are highest in crypt epithelium (values in the ileal villus epithelium and mesenchyme are 14- and 15-fold lower, respectively; Fig. 2). As outlined in Example 4 below however, this mRNA is in fact, angiogenin-4 mRNA.

The 7-fold increase in these angiogenin-4 mRNA levels observed in the crypt epithelium after colonization account for the change defined by microarray and real-time RT-PCR analyses of total ileal RNA.

Bacterial modulation of epithelially-expressed angiogenin-4 represents a novel mode of regulation for an angiogenesis factor.

Example 3

LCM/qRT-PCR established that colonization reduces lactase mRNA levels within the villus epithelium (Fig. 1B). The concept that microbes may help legislate changes in expression of developmentally-regulated genes, such as lactase, raises the question of whether some or many components of the microflora can elicit these changes.

In order to examine this, age-matched groups (n = 4-8 mice/group) of 7-15 week-old germ-free NMRI/KI mice were maintained in plastic gnotobiotic isolators on a 12hour light cycle, and given free access to an autoclaved chow diet (B&K Universal). Males were inoculated with one of the following groups

- (i) Nothing - Germ-free control,
- (ii) *B. thetaiotaomicron* strain VPI-5482 (L.V. Hooper, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 9833 (1999)),
- 10 (iii) *E. coli* K12 which was originally recovered from a normal human fecal flora, (iv) *Bifidobacterium infantis* (ATCC15697), a prominent component of the pre-weaning human and mouse ileal flora and a commonly used probiotic.
- (v) a 'complete' ileal/cecal microflora harvested from
- 15 conventionally-raised mice (L. Bry, et al., *Science* **273**, 1380 (1996))

A further control group comprised mice conventionally raised since birth.

Mice were sacrificed 10days later, 2hours after lights were turned on. The distal 1 cm of the small intestine was used to define CFU/ml ileal contents. The 3 cm of intestine just proximal to this segment was used to isolate total ileal RNA (Qiagen RNeasy kit).

qRT-PCR was used to compare ileal lactase mRNA levels in each group (all animals had $\approx 10^7$ CFU/ml ileal contents). The results are shown in Figure 3.

Colonization with any of the three gram-negative anaerobes elicited an equivalent decline in lactase expression relative to germ-free controls (Fig. 3). This decline was also observed after inoculation of a complete ileal/cecal flora. qRT-PCR of the same RNAs revealed that ileal expression of colipase and angiogenin-4 was induced after colonization of all three organisms, and by the ileal/cecal flora (Fig. 3).

The levels of colipase and angiogenin-4 mRNAs achieved in the ileums of these ex-germ-free mice were comparable to those of age-matched mice that have been conventionally-raised since birth (Fig. 3).

In contrast to these findings, the response of sprr2a to

WO 02/42328

PCT/US01/44332

41

colonization was dependent upon the colonizing species. While *B. thetaiotaomicron* produced a pronounced rise in *spr2a* mRNA that recapitulates the response to a 10day colonization with the ileal/cecal flora, colonization with *B. infantis* and *E. coli* produce only negligible increases in mRNA levels (Fig. 3).

Mdr1a and glutathione-S-transferase, which act in concert to metabolize xenobiotics and electrophiles, also exhibited species-specific (and concerted) responses. Unlike *B. thetaiotaomicron*, which suppresses expression, *E. coli* and *B. infantis* both elicit increases in these mRNAs. In contrast, the multi-component ileal/cecal flora did not produce a significant (i.e., =2-fold) change in levels of either mRNA when compared to germ-free controls.

The *Mdr1a*/GST responses provide direct evidence that components of the normal microflora can modulate host genes involved in drug metabolism, and suggest that variations in drug metabolism between individuals may arise, in part, from differences in their resident gut flora.

Example 4

Following the observation that a 10d colonization was associated with a 11-fold increase in ileal expression of a mRNA detected by an Affymetrix-designed probe-set designed from the published sequence of angiogenin-3, we designed primers specific for the 3' and 5' ends of the mouse angiogenin-3.

There were:

ORF [forward primer:
5'-CCTTGGATCCATGGTGTGATGAGCCAGGT TCTTTG (SEQ ID NO 27)

which incorporates a BamHI site at the 5' end;
reverse primer:
5'-CCTTCTAGACTACGGACTGATAAAGACTCATCGAAG (SEQ ID NO 28)

which incorporates an XbaI site at the 5' end.

These primers were used together with RT-PCR to amplify a 438 bp sequence from RNA prepared from the ileums of ex-germ-free NMRI mice. These mice had been colonized for 10d with a complete ileal/cecal flora harvested from conventionally-raised

WO 02/42328

PCT/US01/44332

42

animals belonging to the same inbred strain. We subcloned the PCR product into BamHI/XbaI digested pGEX-KG and sequenced it using vector-specific primers.

Surprisingly, the nucleotide sequence of the ORF was only
5 90% identical to that of mouse angiogenin-3. Since the primer
sequences used in the PCR reaction (specific for angiogenin-3)
were incorporated into the product, we used 5'- and 3'-RACE to
(a) obtain accurate sequence at the 5' and 3' ends of the ORF
of this new angiogenin, and (b) characterize the 5'- and 3'-
10 untranslated regions of its mRNA. The results revealed only
88.3% nucleotide sequence identity with angiogenin-3 mRNA.

The nucleotide sequence which encodes the angiogenin-4
protein, aligned with the angiogenin-3 sequence is shown
hereinafter in Figure 4 as SEQ ID NO 29 and 30 respectively.

15 Angiogenin-4 has 74 to 81% amino acid sequence identity to
the other 3 members of the mouse angiogenin family (Figure 5).
It was found that the 5' and 3'-untranslated regions of
angiogenin-4 are closely related to the corresponding regions
of angiogenin-3 mRNA (Figure 4).

20 Subsequently a comparative analysis of the tissue
distribution of the various mouse angiogenin mRNAs, was
conducted. cDNA was synthesized from RNAs isolated from
tissues harvested from conventionally raised adult (12-14 week
old) male and female NMRI mice (25 tissues/mouse). To
25 quantitate relative levels of expression of each gene, we
designed primer sets specific for each of the four mouse
angiogenin family members (Figure 6; Table 4) and used them for
SYBR-Green-based real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR)
analyses.

30 Remarkably, angiogenin-4 mRNA was restricted the intestine
where it is expressed from the duodenum to the rectum (Figure
7). In contrast, angiogenin-1 expression is highest in liver,
lung, and pancreas (Figure 8), while angiogenin-3 is expressed
primarily in liver, lung, pancreas, and prostate (Figure 9).
35 Angiogenin-related protein mRNA was undetectable in all tissues
surveyed even after 40 cycles of PCR (Figure 10).

Thus, the highly restricted, intestine-specific pattern of
angiogenin-4 expression makes it unique among mouse angiogenin

WO 02/42328

PCT/US01/44332

43

family members.

These findings indicated that there was microbial-regulation of angiogenin-4 rather than angiogenin-3 expression in the intestine. To test this hypothesis directly; angiogenin-4-specific primers and qRT-PCR were used to compare angiogenin-4 mRNA levels along the length of the small intestine of germ-free NMRI mice and germ-free mice colonized for 10 d with an ileal/cecal flora harvested from conventionally raised NMRI animals. Pair-wise comparisons revealed that expression of angiogenin-4 is highest in the jejunum of colonized mice, and that conventionalization induces up to a 17-fold increase in angiogenin-4 expression in this region (Figure 11). Mono-association of germ-free NMRI mice with *B. thetaiotaomicron* for 10d resulted in a comparable induction of angiogenin-4 expression (data not shown).

Table 4

Gene	Primer	SEQ ID NO	Sequence
angiogenin-4	forward	35	5' CTCTGGCTCAGAATGTAAGGTACGA
	reverse	36	5' GAAATCTTTAAAGGCTCGGTACCC
angiogenin-3	forward	37	5' CTGGCTCAGGATAACTACAGGTACAT
	reverse	38	5' GCCTGGGAGACCCTCCTTT
angiogenin-1	forward	39	5' AGCGAATGGAAGCCCTTACA
	reverse	40	5' CTCATCGAAGTGGACCGCA
angiogenin-related protein	forward	41	5' GGTGAAAAGAAAGCTAACCTCTTTC
	reverse	42	5' AGACTTGCTTATTCTTAAATTCG

Regulation of angiogenin-4 expression during postnatal development is consistent with its microbial regulation

The developmental patterns of angiogenin-4 expression in postnatal day 5 (P5) - P30 germ-free and conventionally raised NMRI mice (n = 3 mice per time point per group) was then assessed (Figure 9). Relative levels of the angiogenin-4 transcript remained relatively low until P20 in both groups of mice. Expression rose slightly (2-3 fold) in germ-free animals after this time point. In contrast, angiogenin-4 expression increased more than 20-fold between P15 and P30 in

WO 02/42328

PCT/US01/44332

44

conventionally-raised animals. These results indicate that angiogenin-4 is induced during the suckling/weaning transition - coincident with a major shift in the gut microbiota. The lack of angiogenin-4 induction in postnatal germ-free mice is also
5 consistent with the conclusion that components of the microbiota play an important role in regulating angiogenin-4 expression.

Cellular localization of angiogenin-4

The previous laser capture microdissection (LCM)/qRT-PCR
10 study of the cellular origins of angiogenin protein expression (Example 2) used primers that recognize both angiogenin-3 and angiogenin-4, and RNAs that had been isolated from captured crypt epithelium, villus epithelium, or mesenchymal populations from the villus core. The qRT-PCR analysis indicated that the
15 microbially-regulated 'angiogenin' was produced in epithelial cells located at the base of crypts of Lieberkuhn (Hooper et al., 2001).

To test the hypothesis that angiogenin-4 expression occurs in Paneth cells, we used LCM to isolate cells located at the
20 base of jejunal crypts from (a) germ-free adult (12 week old) transgenic mice with an attenuated diphtheria toxin-A fragment (*tox176*)-mediated Paneth cell lineage ablation (*CR2-tox176* mice) (Garabedian et al., 1997), and (b) their age and gender-matched germ-free normal littermates. qRT-PCR using angiogenin-
25 4-specific primers revealed that angiogenin-4 mRNA levels are 10-fold higher in RNA purified from crypt base epithelial cells of normal mice compared to *CR2-tox176* littermates (Figure 10).

A follow-up study was conducted using conventionally raised NMRI mice. Three cellular pools were harvested by LCM:
30 Paneth cells alone, epithelial cells from the upper crypt and villus (a Paneth cell-minus fraction), and mesenchyme retrieved from the villus core and the peri-cryptal region. The distribution of angiogenin-4 mRNA closely paralleled the distribution of phospholipase A2 - the product of the *Mom-1*
35 locus and a well-known Paneth cell-specific gene product (data not shown).

WO 02/42328

PCT/US01/44332

45

Claims

1. A method of investigating chemical changes resulting from commensal microflora colonisation of mammalian intestine which comprises:
 - 5 a) measuring gene expression in commensal bacterium-colonized and germ-free intestine of at least one gene; and
 - b) identifying a gene from a) that has at least a 2-fold difference in expression level between commensal
10 bacterium-colonized and germ-free intestine.
2. A method according to claim 1 wherein in step (a) multiple gene expression is measured by DNA microarray analysis and/or quantitative RTPCR.
15
3. A method according to claim 1 which further comprises the step of c) investigating a gene identified in b) with regard to its function, in a system selected from the group consisting or *in vitro* cell culture, lower
20 eukaryotic model organisms or an animal model.
4. A method according to claim 3 wherein the function is studied using a method selected from the group consisting of
 - 25 i) transgenic knockout;
 - ii) dominant-negative experiments;
 - iii) transgene overexpression;
 - iv) antibody binding assay;
 - 30 v) by pharmacological intervention using defined chemical agents.
5. A method according to claim 1 wherein the commensal bacteria is *B. thetaiotaomicron*.
35

6. A method according to claim 1 wherein expression of at least 10 genes is measured and said genes are selected from genes associated with the nutrient uptake and metabolism, hormone/maturational responses, mucosal barrier function, detoxification/drug resistance, enteric nervous system/muscular layer development or activity, angiogenesis, cytoskeleton/extracellular matrix function or development, signal transduction or other cellular functions are measured in step (a).
7. A method according to claim 6 wherein expression of at least 10 genes selected from the group consisting of genes encoding Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1), lactase phlorizin-hydrolase, pancreatic lipase-related protein 2, colipase, liver fatty acid binding protein, fasting induced adipose factor (FIAF), apolipoprotein A-IV, phospholipase B, CYP27 high-affinity copper transporter, metallothionein I, metallothionein II, ferritin heavy chain, isocitrate dehydrogenase subunit, succinyl CoA transferase, transketolase, malate oxidoreductase, aspartate aminotransferase, adenosine deaminase, ornithine decarboxylase antizyme, 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase, GARG-16, FKBP51, androgen-regulated vas deferens protein, short chain dehydrogenase, heat-stable antigen, decay-accelerating factor, polymeric Ig receptor, small proline-rich protein 2a, serum amyloid A protein, CRP-ductin α (MUCLIN), zeta proteasome chain, anti-DNA IgG light chain, glutathione S-transferase, P-glycoprotein (mdr1a), CYP2D2, L-glutamate transporter, L-glutamate decarboxylase, vesicle-associated protein-33, cysteine-rich protein 2, smooth muscle (enteric) gamma actin, SM-20, angiogenin-4, gelsolin, dextrin, alpha cardiac actin, endoB cytokeratin, fibronectin, proteinase inhibitor 6, alpha 1 type 1 collagen, Pten, gp106 (TB2/DP1), rac2, Semcap2, serum and glucocorticoid-regulated kinase, STE20-like protein kinase and B-cell myeloid kinase, glutathione reductase,

WO 02/42328

PCT/US01/44332

47

calmodulin, e1P3 subunit, hsc70, oligosaccharyl transferase subunit, fibrillarlin, H⁺-transporting ATPase and Msec23.

8. A method according to claim 6 wherein said 10 genes include
5 genes encoding colipase, decay-accelerating factor (DAF),
the polymeric IgA receptor, small proline-rich protein 2a
(Sprr2a), angiogenin-3, angiogenin-4, Pten, CYP2D2, Sprr2a,
rac2 and Mdr-1.
- 10 9. A method according to claim 7 wherein expression of
substantially all of said genes is measured.
10. A method according to claim 1 wherein in step (b) a gene
15 for which at least a 7 -fold difference in expression is
identified.
11. A method according to claim 3 which comprises evaluation of
the biochemical pathway in which angiogenin-4 or colipase
20 participates in the intestine.
12. A method of changing the expression levels of a particular
gene within the digestive tract of a mammal for therapeutic
or prophylactic purposes, said method comprises altering
25 the density in the gastrointestinal tract of a commensal
bacteria identified using a method according to claim 1 as
being able to produce the desired change in said expression
level.
13. A method according to claim 12 which comprises modulating
30 epithelially-expressed angiogenesis factor using an
effective commensal bacteria identified using a method of
claim 1.
14. A method according to claim 12 which comprises modifying
35 metabolism using an effective commensal bacteria identified
using a method according to claim 1.

WO 02/42328

PCT/US01/44332

48

15. A method according to claim 12 which comprises modifying epithelial barrier function using an effective commensal bacteria identified using a method according to claim 1.
- 5
16. A method of screening compounds having a pharmaceutical application in a gastrointestinal disease, which method comprises assaying the compounds for their ability to modulate the activity of the product of a gene identified using a method according to claim 1.
- 10
17. A method of treating or preventing gastrointestinal disease which method comprises administering therapeutically effective amount of a compound which modulates the activity of the product of a gene identified using a method according to claim 1.
- 15
18. A method of screening for a compound potentially useful for treatment or prophylaxis of conditions characterized by a defect in intestinal barrier function which comprises assay of the compound for its ability to modulate the activity or amount of small proline-rich protein 2a (sprr2a) or rac2.
- 20
- 25 19. The use of a compound able to modulate the activity or amount of small proline-rich protein 2a (sprr2a) or rac2 in preparation of a medicament for the treatment or prophylaxis of conditions characterized by a defect in intestinal barrier function.
- 30
20. A method of treating or preventing conditions characterized by a defect in intestinal barrier function which method comprises administration of a therapeutically effective amount of a compound which is able to modulate the activity or amount of small proline-rich protein 2a (sprr2a) or rac2.
- 35

WO 02/42328

PCT/US01/44332

49

21. A method for identifying genes that function as regulators
of intestinal biology, said method comprising applying the
method as claimed in claim 1 and detecting expression
5 genes which have not heretofore been associated with such
function.
22. An angiogenin protein encoded by a gene, at least part of
which is amplifiable using primers of SEQ ID NO 12 and 25
10 above, which is expressed in mouse intestine.
23. A protein according to claim 22 wherein the protein is of
SEQ ID NO 29 as shown in Figure 4 hereinafter, or an
allelic variant thereof or a protein which has at least
15 85% amino acid sequence identity with SEQ ID NO 29.
24. A protein according to claim 23 which is of SEQ ID NO 29.
- 20 25. A nucleic acid which encodes a protein according to claim
22.

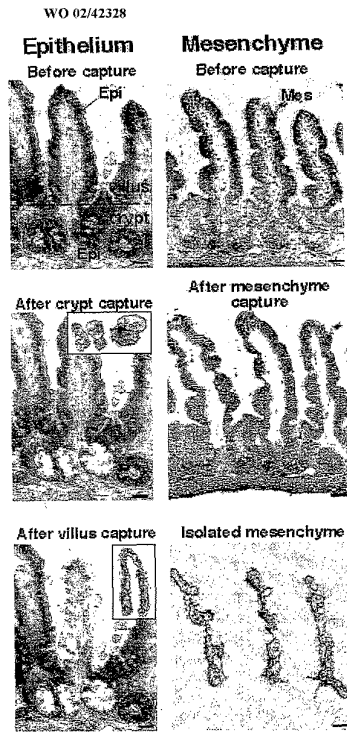


FIGURE 1

WO 02/42328

PCT/US01/44332

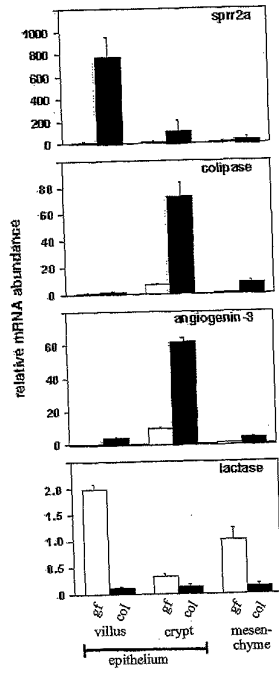


Figure 2

WO 02/42328

PCT/US01/44332

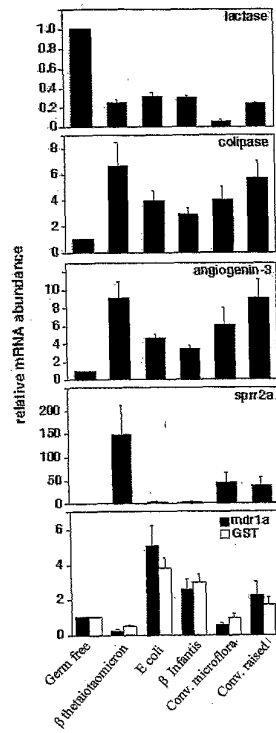


Figure 3

WO 02/42328

PCT/US01/44332

Figure 4:
Angiogenin-4 and -3 nucleotide sequence alignment

	1	11	21	31	41	51	
angiogenin-4	---	GASCTT	GCACCG	AAGACCC	GTCTCC	TAGGCG	CAACAGCTAGAC
angiogenin-3	C	TCTAGCTT	CACACC	CGACCC	CTCTCC	TCCAGG	CGACAGCTAGACA
Consensus		agutt	acacqy	agga	acctt	gttctcc	agagagac c tcccc g
	61	71	81	91	101	111	
angiogenin-4	T	TGGAGG	AAGCTG	CCAGCTT	TGGAA	TCACTG	TGGAGAGATAC
angiogenin-3	T	TGGAGG	AAGCTG	CCAGCTT	TGGAA	TCACTG	TGGAGAGATAC
Consensus		tggagga	aaagctg	gcccagctt	gggaatc	ctgttgg	aaagatg atgagccca g
	121	131	141	151	161	171	
angiogenin-4	C	CTTGTG	TGTTG	TCGTC	TGGTCT	GGTCTG	GGTCTG
angiogenin-3	C	CTTGTG	TGTTG	TCGTC	TGGTCT	GGTCTG	GGTCTG
Consensus		cttbtgt	ttgtt	gttct	gttct	gttct	gttct
	181	191	201	211	221	231	
angiogenin-4	G	AA---	AGGTRC	GA	AAATTC	CTAC	GTACAGCTATG
angiogenin-3	A	ACTAC	AGTAC	ATAA	ATTC	CTAC	GTACAGCTATG
Consensus		a	agqbae	aaaat	ttct	ctagc	actatgatgccaagccaa ggcgqga
	241	251	261	271	281	291	
angiogenin-4	G	ACAGAT	ACTG	GAAG	TGATG	AGGA	AAAGAAAGCTA
angiogenin-3	T	CAGAT	ACTG	GAAG	TGATG	AGGA	AAAGAAAGCTA
Consensus		acagatactg	gaagatg	atgag	aaaga	aaagct	aaacttgccttgc
	301	311	321	331	341	351	
angiogenin-4	A	ACACCT	TTC	CTG	CCAC	CAAG	AAACATC
angiogenin-3	A	ACACCT	TTC	CTG	CCAC	CAAG	AAACATC
Consensus		aacac	ctttat	ctg	ccca	caaga	aaacatc
	361	371	381	391	401	411	
angiogenin-4	C	CTTATG	GA	AAAC	CTT	CA	GAATAGCA
angiogenin-3	C	CTTATG	GA	AAAC	CTT	CA	GAATAGCA
Consensus		cttbtgt	gag	aaact	aga	aaag	aaattctc
	421	431	441	451	461	471	
angiogenin-4	T	CAAG	AGG	TCTCC	CTG	CCCTC	CAAGAGG
angiogenin-3	A	AAAG	AGG	TCTCC	CTG	CCCTC	CAAGAGG
Consensus		a	gaggt	ctcc	g	ccctc	caagag
	481	491	501	511	521	531	
angiogenin-4	G	TATG	CTG	TG	AGAT	TG	CTG
angiogenin-3	G	TATG	CTG	TG	AGAT	TG	CTG
Consensus		gttat	gctt	gtg	aaag	ttg	ctt
	541	551	561	571	581	591	
angiogenin-4	A	CAG	AGG	CCCTG	CG	ACAG	AGCTAGG
angiogenin-3	A	CAG	AGG	CCCTG	CG	ACAG	AGCTAGG
Consensus		acagag	gccc	ctg	cg	acag	agctagg
	601	611	621	631	641	651	
angiogenin-4	M	TACT	GTG	TAC	CCG	TG	TCACG
angiogenin-3	M	TACT	GTG	TAC	CCG	TG	TCACG
Consensus		atnact	ggtt	ca	ctg	ca	ctg
	661	671	681	691	701	711	
angiogenin-4	C	CTCAT	TG	TG	CTG	CA	GAATAGCA
angiogenin-3	C	CTCAT	TG	TG	CTG	CA	GAATAGCA
Consensus		ctt	at	at	at	at	at
	721	731	741	751	761	771	
angiogenin-4	A	AAAA	AAAA				
angiogenin-3	A	AAAA	AAAA				
Consensus		out	at	at	at	at	at

start

stop

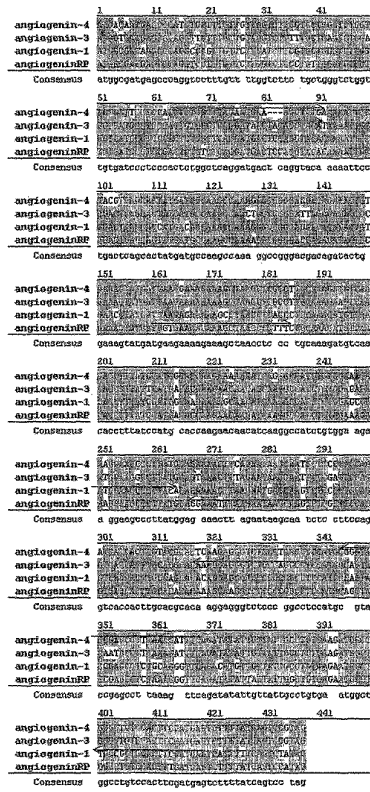
WO 02/42328

PCT/US01/44332

Figure 5:
Alignment of mouse angiogenin family members

	1	11	21	31	41	
angiogenin-4	NTMSPCP	LLVFLV	LGLVVP	PPTLAQ	-NERYEK	FLRQHYDAKPKGRD
angiogenin-1	MAISPGP	LFLVFL	LGLVVP	PPTLAQ	DDSRVTK	FLTOHHDARPKGRD
angiogenin-3	NVHSFSG	LLVFLV	LGLVVP	PPTLAQ	DNRYIK	FLTOHHDARPKGRD
angiogeninRP	MAHSFPG	LFLVFL	LGLVVP	PPTLSQ	DDSRVTK	FLTOHHDARPKGRD
Consensus	m	mspgpl	lvf	lglvvppt	laqd	ry kfl tqhydakpkgrddryc
	51	61	71	81	91	
angiogenin-4	ESMNERK	LTSFCK	DVNTFI	HGTAKM	IRAICG	KKGSFYGEMFRI
angiogenin-1	ERMNERK	LTSFCK	DVNTFI	HGTAKM	IRAICG	KKGSFYGEMFRI
angiogenin-3	ESMNERK	LTSFCK	DVNTFI	HGTAKM	IRAICG	KKGSFYGEMFRI
angiogeninRP	ESMNERK	LTSFCK	DVNTFI	HGTAKM	IRAICG	KKGSFYGEMFRI
Consensus	esmak	xkltspck	dvtntfih	tk	mikaicg	gsyyg n lrs s fq
	101	111	121	131	141	SEQ ID
angiogenin-4	VITCTHS	RGSFP	PPCGYR	AFKFR	YIVLAC	EDGWPVHDESFTSP*
angiogenin-1	VITCTHS	RGSFP	PPCGYR	AFKFR	YIVLAC	EDGWPVHDESFTSP*
angiogenin-3	VITCTHS	RGSFP	PPCGYR	AFKFR	YIVLAC	EDGWPVHDESFTSP*
angiogeninRP	VITCTHS	RGSFP	PPCGYR	AFKFR	YIVLAC	EDGWPVHDESFTSP*
Consensus	vltctth	gsppppc	pya	k	fryiviace	gwpvhdesfisp
						NO
						31
						32
						33
						34

Figure 6:
Locations of primers specific for mouse angiogenin family members

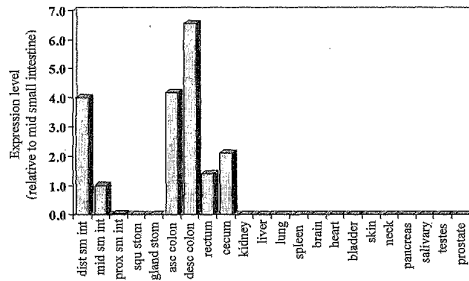


WO 02/42328

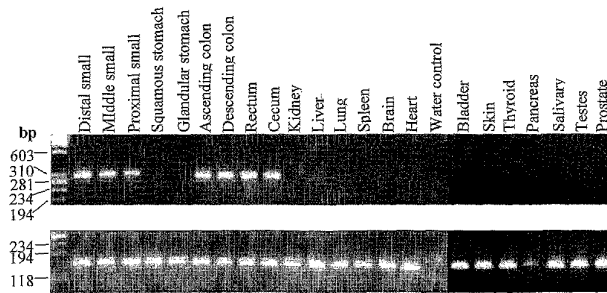
PCT/US01/44332

Figure 7:
Tissue distribution of Angiogenin-4 mRNA

qRT-PCR analysis:



Agarose gel analysis (with Gapdh control)

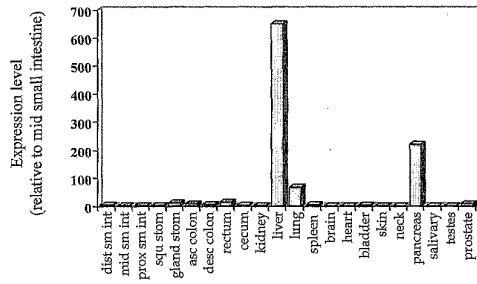


WO 02/42328

PCT/US01/44332

Figure 8:
Tissue distribution of angiogenin-1 mRNA

qRT-PCR analysis:

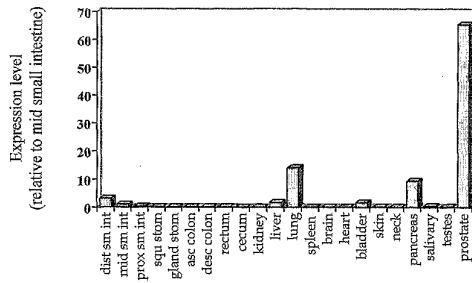


WO 02/42328

PCT/US01/44332

Figure 9:
Tissue distribution of angiogenin-3 mRNA

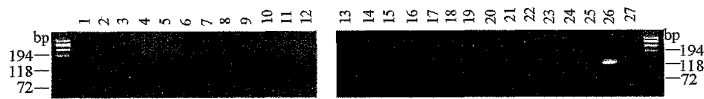
Quantitative real-time RT-PCR analysis:



WO 02/42328

PCT/US01/44332

Figure 10:
RT-PCR analysis showing absence of angiogenin-related protein expression



expected amplicon size: 130 bp

Note that Gapdh expression levels for each of these tissues are shown in Figure 4

- | | | | |
|-----|-------------------|-----|-----------------|
| 1. | distal small | 14. | brain |
| 2. | middle small | 15. | heart |
| 3. | proximal small | 16. | bladder |
| 4. | squamous | 17. | skin |
| 5. | glandular stomach | 18. | trachea/thyroid |
| 6. | ascending colon | 19. | pancreas |
| 7. | descending colon | 20. | salivary gland |
| 8. | rectum | 21. | testes |
| 9. | cecum | 22. | prostate |
| 10. | kidney | 23. | ovary |
| 11. | liver | 24. | uterus |
| 12. | lung | 25. | mammary gland |
| 13. | spleen | 26. | genomic DNA |
| | | 27. | water |

Figure 11:
Microbial regulation of angiogenin-4 expression in the small intestine

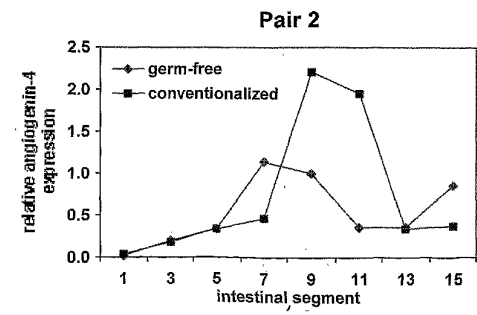
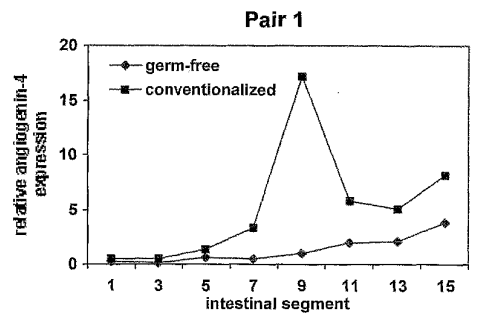


Figure 12
Regulation of angiogenin-4 expression during postnatal development

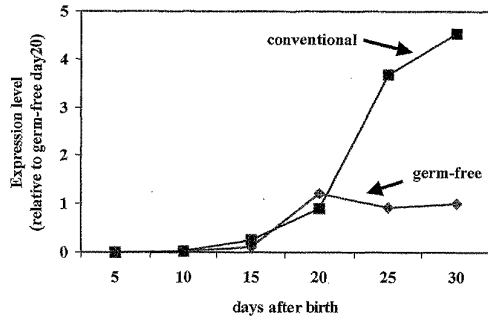
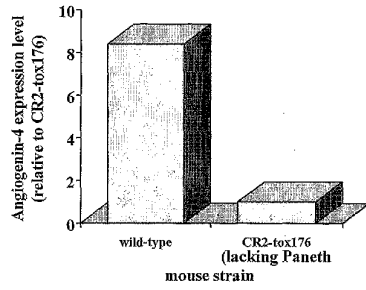


Figure 13
Cellular localization of angiogenin-4 expression in small intestine;
qRT-PCR analysis of cells isolated from the crypt base



【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau(43) International Publication Date
30 May 2002 (30.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2002/042328 A3(51) International Patent Classification: C07K 14/47, (74) Agent: CRAWFORD, Arthur, R.; Nixon & Vanderhye
C12Q 1/68 P.C., Suite 800, 1100 North Glebe Road, Arlington, VA
22201-4714 (US).(21) International Application Number:
PCT/US2001/044332(22) International Filing Date:
27 November 2001 (27.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/252,901 27 November 2000 (27.11.2000) US(71) Applicants (for all designated States except US): WASH-
INGTON UNIVERSITY [US/US]; One Brookings
Drive, St. Louis, MO 63130 (US). ASTRAZENECA AB
[SE/SE]; S-151 85 Sodertalje (SE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): GORDON, Jeffrey,
Ivan [US/US]; 12 Stacy Drive, St. Louis, MO 63132 (US).
HOOPER, Lora, Virginia [US/US]; 8812 Glen Rose
Drive, Crestwood, MO 63126 (US). STAPPENBECK,
Thaddeus, E, IV [US/US]; Washington University, One
Brookings Drive, St. Louis, MO 63130 (US). FALK, Per
[SE/SE]; Akerigatan 1, S-431 69 Molndal (SE). HANS-
SON, Lennart [SE/SE]; Heymans vag 13, S-435 43 Pixbo
(SE).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).Published:
— with international search report(88) Date of publication of the international search report:
19 February 2004For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2002/042328 A3

(54) Title: METHOD FOR STUDYING THE EFFECTS OF COMMENSAL MICROFLORA ON MAMMALIAN INTESTINE
AND TREATMENTS OF GASTROINTESTINAL-ASSOCIATED DISEASE BASED THEREON(57) Abstract: a method of investigating chemical changes resulting from commensal microflora colonisation of mammalian intes-
tine which comprises: a) measuring gene expression in commensal bacterium-colonized and germ-free intestine of at least one gene;
and b) identifying a gene from a) that has at least a 2-fold difference in expression level between commensal bacterium-colonized and
germ-free intestine. The method selects genes for further evaluation, and gives rise to the development of prophylactic treatments.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/44332
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OGAWA HITOSHI ET AL: "Identification of genes involved in mucosal defense and inflammation associated with normal enteric bacteria." AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, vol. 279, no. 3 Part 1 of 2, September 2000 (2000-09), pages 6492-6499, XP002231949 ISSN: 0002-9513	1-3
Y	see Material and methods, "Animals" paragraph and differential display Material and methods and conclusion page 6498 right column --- -/--	4-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 February 2003		Date of mailing of the international search report 11/03/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5516 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-2016		Authorized officer Vix, O

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/44332

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HOOPER LORA V ET AL: "Analyzing the molecular foundations of commensalism in the mouse intestine." CURRENT OPINION IN MICROBIOLOGY, vol. 3, no. 1, February 2000 (2000-02), pages 79-85, XP002231950 ISSN: 1369-5274 page 79, right col. second and third paragraph, pages 81-82 and conclusion page 83 (first paragraph)	1-21
Y	BERNET-CAMARD MARIE-FRANCOISE ET AL: "The human Lactobacillus acidophilus strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 63, no. 7, 1997, pages 2747-2753, XP002231951 ISSN: 0099-2240 see Material and Methods	1-21
Y	UMESAKI YOSHINORI ET AL: "Segmented filamentous bacteria are indigenous intestinal bacteria that activate intraepithelial lymphocytes and induce MHC Class II molecules and fucosyl asialo GM1 glycolipids on the small intestinal epithelial cells in the Ex-germ-free mouse." MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, vol. 39, no. 8, 1995, pages 555-562, XP009006341 ISSN: 0385-5600 pages 556-557, page 561 (right col.)	1-17
X	ERWIN CHRISTOPHER R ET AL: "Analysis of intestinal adaptation gene expression by cDNA expression arrays." JOURNAL OF PARENTERAL AND ENTERAL NUTRITION, vol. 24, no. 6, November 2000 (2000-11), pages 311-316, XP009006275 ISSN: 0148-6071 page 312 and page 314 and page 315 (left col.)	1-9
Y	---	10-17
	---	---

Form PCT/AS0210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/44332

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	XINYU FU ET AL: "E2A-PBX1 INDUCES ABERRANT EXPRESSION OF TISSUE-SPECIFIC AND DEVELOPMENTALLY REGULATED GENES WHEN EXPRESSED IN NIH 3T3 FIBROBLASTS" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 17, no. 3, March 1997 (1997-03), pages 1503-1512, XP002172402 ISSN: 0270-7306 See Fig. 3 with mouse Ang-3 (EF5) sequence (see SWALL entry P97802) showing 81% identity with the protein of SEQ ID N°31.	22-25
Y	WO 00 65095 A (CLONTECH LAB INC) 2 November 2000 (2000-11-02) pages 5-21	1-3
A	--- BRY LYNN ET AL: "A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem." SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 273, no. 5280, 1996, pages 1380-1383, XP000993528 ISSN: 0036-8075 the whole document	1-21
A	--- EP 0 904 784 A (NUTRICIA NV) 31 March 1999 (1999-03-31) the whole document	1-21

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/44332**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 18-20
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 01 A4332

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 18-20

Partial search:

There is no clear SEQ ID or definition for the protein sprra2 or rac3 used in the wording of the claims 18-20. The partial search has been based on this term which is only an internal designation.

It is also to be noted that claims 18-25 have no dependency with the method of claim 1 (a unity problem might be raised in the examination phase).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No.
PCT/US 01/44332

Patent document cited in search report	Publication data	Patent family member(s)	Publication date
WO 0065095	A	EP 1196633 A2 WO 0065095 A2	17-04-2002 02-11-2000
EP 0904784	A	EP 0904784 A1	31-03-1999

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04	4 H 0 4 5
A 6 1 P 3/00	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 37/00	1 0 2

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, P, T, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(74) 代理人 100091731

弁理士 高木 千嘉

(74) 代理人 100080355

弁理士 西村 公佑

(74) 代理人 100110593

弁理士 杉本 博司

(72) 発明者 ジェフリー・アイヴァン・ゴードン

アメリカ合衆国ミズーリ州 6 3 1 3 2 . セントルイス . ステイシードライブ 1 2

(72) 発明者 ローラ・ヴァージニア・フーパー

アメリカ合衆国ミズーリ州 6 3 1 2 6 . クレストウッド . グレンローズドライブ 8 8 1 2

(72) 発明者 サディアス・エフ・スターペンベック・ザ・フォース

アメリカ合衆国ミズーリ州 6 3 1 3 0 . セントルイス . ワンブルッキングズドライブ . ワシントン
・ユニバーシティ

(72) 発明者 ベル・ファールク

スウェーデン国エス - 4 3 1 6 9メルンダール . アーケルガータン 1

(72) 発明者 レンナート・ハンソン

スウェーデン国エス - 4 3 5 4 3ピクスブー . ハイマンズヴァーグ 1 3

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB20 CB01 CB17 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36 FB03

4B024 AA01 AA11 BA80 CA02 CA05 CA12 HA14

4B063 QA06 QA18 QQ08 QQ53 QR36 QR55 QR62 QR77 QS25 QS34

QX02

4C084 AA13 AA17 ZA66 ZA68 ZA69 ZB01 ZC21

4C087 BC30 CA09 ZA66 ZA68 ZA69 ZB01 ZC21

4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004536557A5	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2002544461	申请日	2001-11-27
[标]申请(专利权)人(译)	华盛顿大学 医药华盛顿UNIV学校 阿斯利康(瑞典)有限公司		
申请(专利权)人(译)	华盛顿大学 阿斯利康Akuchieboragu		
[标]发明人	ジェフリーアイヴァンゴードン ローラヴァージニアフーパー サディアスエフスターペンベックザフォース ペルフアールク レンナートハンソン		
发明人	ジェフリー・アイヴァン・ゴードン ローラ・ヴァージニア・フーパー サディアス・エフ・スターペンベック・ザ・フォース ペル・ファールク レンナート・ハンソン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K35/74 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P3/00 A61P9/00 A61P31/00 A61P31/04 C07K14/47 C07K14/515 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N33/15 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	A61P1/00 A61P1/04 A61P3/00 A61P9/00 A61P31/00 A61P31/04 C07K14/515 C12Q1/6883 C12Q2600 /158		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K35/74.A A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P3/00 A61P9/00 A61P31/00 A61P31/04 C07K14/47 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N37/00.102		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045 /DA14 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA05 4B024/CA12 4B024/HA14 4B063/QA06 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR36 4B063 /QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/ZA66 4C084/ZA68 4C084/ZA69 4C084/ZB01 4C084/ZC21 4C087/BC30 4C087/CA09 4C087 /ZA66 4C087/ZA68 4C087/ZA69 4C087/ZB01 4C087/ZC21 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	西村 公佑 杉本博司		
优先权	60/252901 2000-11-27 US		
其他公开文献	JP2004536557A		

摘要(译)

一种检查化学变化由于哺乳动物，一) 共生细菌测量肠内和无菌形成的集落的肠道的至少一个基因的基因表达的肠道共生菌群的定殖的方法，和b) 一种方法，包括鉴定a) 的基因，其中共生细菌定殖的定殖肠和无菌肠的表达水平相差至少2倍。通过该方法，选择用于进一步评估的基因，并且预防性治疗的发展进步。

