

16S rRNA 遺伝子を標的としたアンプリコン配列の解析による
パンクレリパーゼ投与マウスの腸内細菌叢の解析
Analysis of intestinal microbiota of pancrelipase treated mice
by 16S rRNA gene amplicon sequencing

京都大学化学研究所化学生命科学研究領域 西山 拓輝

膵消化酵素補充剤は、慢性膵炎患者等において膵外分泌不全により不足している消化酵素を補充することで食物の消化不良を緩和する薬である。本薬剤の主な作用機序は食物消化の補助だと考えられている。しかし、慢性膵炎モデルマウスを用いた研究では本疾患の発生に腸内細菌が関わっていることが示唆されており^{1,2}、慢性膵炎患者と健常者の間で腸内細菌叢の細菌組成が異なることが知られている^{3,4}。従って、膵消化酵素補充剤は消化不良の改善に加え、腸内細菌叢の組成にも影響する事で治療効果を発揮するとの仮説を立てた。本研究は近畿大学の櫻井俊治博士のグループと行った共同研究であり、実験は櫻井俊治博士等が行い、計算機解析・解釈は筆者が行った。

本仮説の検証のため、パンクレリパーゼ(膵消化酵素補充剤)投与群とコントロール群のマウスを用意した。これらの各個体の盲腸、横行結腸、糞便から腸内細菌の 16S rRNA 遺伝子を抽出し、PCR で増幅したアンプリコンの配列を次世代シーケンサー (Illumina MiSeq) で解析した。取得した遺伝子配列をリファレンスデータベースの遺伝子配列と比較し、配列一致度が 97%以上の遺伝子配列を同じ操作的分類群に分類した。これらの操作的分類群を基に各サンプルの細菌組成の類似度(β多様性)を weighted UniFrac 距離⁵を用いて評価した。また、同じ生物学的分類が割り当てられた操作的分類群を 1 つにまとめ、DESeq2 の negative binomial Wald test⁶により有意に変動した生物学的分類群を同定した。

各サンプル間のβ多様性を評価し、主座標分析で解析した結果、パンクレリパーゼ投与群とコントロール群の間に腸内細菌叢の細菌組成が大きく異なることが分かった。さらに、10 個の生物学的分類群の相対頻度がパンクレリパーゼ投与群とコントロール群の間に有意(FDR < 0.1)に変化していた。これらの内、腸内壁の保護に役立つことが知られている *Akkermansia muciniphila*⁷ の相対頻度がパンクレリパーゼ投与群において最も顕著に増加していた。本研究は、既存の作用機序に加え腸内細菌叢の細菌組成の変化を引き起こすことで膵消化酵素補充剤が効果を発揮することを示唆した。

参考文献:

1. A. Ochi, A.H. Nguyen, A.S. Bedrosian, et al., MyD88 inhibition amplifies dendritic cell capacity to promote pancreatic carcinogenesis via Th2 cells, J. Exp. Med. 209 (2012)

1671e1687.

2. T. Watanabe, Y. Sadakane, N. Yagama, et al., Nucleotide-binding oligomerization domain 1 acts in concert with the cholecystokinin receptor agonist, cerulein, to induce IL-33-dependent chronic pancreatitis, *Mucosal Immunol.* 9 (2016) 1234e1249.
3. S.M. Jandhyala, A. Madhulika, G. Deepika, et al., Altered intestinal microbiota in patients with chronic pancreatitis: implications in diabetes and metabolic abnormalities, *Sci. Rep.* 7 (2017) 43640.
4. M. Signoretti, R. Roggiolani, C. Stornello, et al., Gut microbiota and pancreatic diseases, *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 63 (2017) 399e410.
5. C. Lozupone, R. Knight, UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 8228e8235.
6. M.I. Love, W. Huber, S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, *Genome Biol.* 15 (2014) 550.
7. C. Grander, T.E. Adolph, V. Wieser, et al., Recovery of ethanol-induced *Akkermansia muciniphila* depletion ameliorates alcoholic liver disease, *Gut* (2017), <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313432>.

発表論文(謝辞あり):

H. Nishiyama, T. Nagai, M. kudo, Y. Okazaki, Y. Azuma, T. Watanabe, S. Goto, H. Ogata, Supplementation of pancreatic digestive enzymes alters the composition of intestinal microbiota in mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495 (2018) 273-279