

課題名：消化器癌(消化管, 肝, 膵等)における炎症と癌に関わるヒト疾患モデルマウスの作製と解析(平成21年2月2日より5年間).

尚, 本研究ではヒト材料を扱う実験は行わないため, 生命倫理上及び法令上の問題は生じない.

マウスの樹立

条件的カテプシンD欠損マウス(*CtsD^{F/F}*)マウスは順天堂大学 内山博士より譲渡していただいた. *CtsD^{F/F}* マウスと *Spink3^{Cre/+}* マウス⁵⁾ を交配して, 膵腺房細胞特異的カテプシンD欠損マウスを樹立した.

条件的 *p62* 欠損マウス(*p62^{F/F}*)マウス⁶⁾ は筑波大学 石井博士, 藤博士より譲渡していただいた. *Ptf1a^{Cre/+}* マウスは筆者らの研究室において樹立した⁷⁾. *p62^{F/F}* マウスと *Ptf1a^{Cre/+}* マウスを交配し, 膵臓特異的 *p62* 欠損(*p62^{pan}*)マウスを樹立した.

急性膵炎誘発実験

セルレイン膵炎; 8週齢の♂を使用し, セルレイン50 µg/kg を7回腹腔内投与した.

CDE 膵炎; 5-6週齢の♀を使用した. 一晚絶食にしたのち, コリン/メチオニン欠損食(Harlan Laboratories)と0.5%エチオニン(Sigma)水を48時間摂食, 飲水させた.

HE 染色, 電顕(内山先生, 倉敷中央病院; 能登原憲司先生), 血清アミラーゼ活性, トリプシン活性, 炎症性サイトカイン mRNA の定量, オートファジー関連タンパクの定量を行った.

C. 研究結果

カテプシンD欠損マウスの解析

カテプシンDの発現パターンの解析

マウス膵臓では胎生18.5日から成獣に至るまで, カテプシンDが発現していることを確認した.

膵腺房細胞特異的カテプシンD欠損マウスの樹立

CtsD^{F/F} マウスと *Spink3^{Cre/+}* を交配して, 膵腺房細胞特異的カテプシンD欠損マウス(*CtsD^{F/F}; Spink3-cre*)を樹立した. このマウスはメンデルの法則に従って, 出生し, その後の

成長も野生型と差を認めなかった. 定量PCR法ではカテプシンDの発現抑制に伴い, カテプシンBの発現に差が見られなかったが, カテプシンLの発現が増加することが明らかとなった. このマウスは正常に生育し, 生理的条件下では異常は認めなかった.

セルレイン膵炎の重症度評価

次に8週齢のマウスを用いて, セルレイン膵炎モデルを行った. *CtsD^{F/F}; Spink3-cre* では壊死細胞が多く, 病理学的スコア(浮腫, 炎症細胞の浸潤, 細胞質の変性, 壊死)が, 野生型よりも有意に高かった. また血清アミラーゼ活性と共に, 膵内トリプシン活性が高値であった. *CtsD^{F/F}; Spink3-cre* は野生型と比較して, 膵炎が重症化した.

その原因を明らかにするために, カテプシンB及びLのウエスタンブロッティングを行ったところ, カテプシンLの活性化が抑制されていることが明らかになった. カテプシンLはトリプシノーゲン及びトリプシンの両方を不活化するとされている. つまり, カテプシンDの欠損によって, カテプシンLの活性化が抑制された結果, 膵炎が重症化する可能性が示唆された.

p62 欠損マウスの解析

p62^{pan} マウスの樹立

p62^{F/F} マウスと *Ptf1a^{Cre/+}* マウスを交配した. *Ptf1a* は膵臓前駆細胞で発現する転写因子で, *p62^{pan}* マウスの膵臓では *p62* タンパクが欠失していることを確認した. *p62^{pan}* マウスはメンデルの法則に従って生まれ, その後の成長にも特に異常は見られなかった. つまり, *p62* は膵臓発生に影響しないことが明らかとなった.

飢餓刺激によるオートファジー誘導実験

8週齢の *p62^{F/F}* マウスと *p62^{pan}* マウスに飢餓(24時間)を加えて, 膵臓を観察した. 共に飢餓による正常なオートファジーが誘導されることを確認した.

セルレイン膵炎の重症度とオートファジー

セルレインを腹腔内投与し, 急性膵炎の惹起刺激を行った. *p62^{pan}* マウスでは LC3-II の亢進が見られ, オートファジーに由来する巨大な

空胞(オートファジー不全を示唆), トリプシノーゲンの活性化, 膵炎が重症化(炎症性サイトカインの上昇)が確認された。

CDE 膵炎の重症度とオートファジー

CDE 膵炎でも *p62^{pan}* マウスではオートファジーの誘導に異常が見られ, *p62* 欠損がオートファジーの異常を引き起こし, トリプシノーゲンの活性化を介して, 膵炎を重症化させている可能性が示唆された。

D. 考察

本研究課題においては, カテプシン D 及び *p62* の欠損が急性膵炎発症で誘導されるオートファジーに異常を来すことで, 急性膵炎が重症化することが明らかとなった。

カテプシン D が欠損するとカテプシン B(トリプシノーゲンを活性化)及び L(トリプシノーゲン, トリプシンを不活化)の活性化(前駆体が切断され, 活性型となる)に異常を来し, トリプシノーゲンの活性化, 急性膵炎発症に関わっていると考えられるが, カテプシン D が直接トリプシノーゲンまたはトリプシンに作用している可能性もある。これらのカテプシンはリソソーム内に局在しているが, どのようなメカニズムで, お互いに作用しあっているのか, また, トリプシノーゲンの活性化, 不活化を制御しているのか, 等はこれから解明していくべき課題である。

p62 に関しては, オートファジー以外にも様々なシグナル伝達に関わっているため, 特に急性炎症の制御も含め, さらに検討が必要である。

E. 結論

急性膵炎の発症, 重症化にはオートファジー-リソソーム系が関与しており, オートファジー, リソソーム酵素の制御が今後の課題である。

F. 参考文献

1. Steer ML, Meldolesi J, Figarella C. Pancreatitis. The role of lysosomes. *Digestive Diseases and Sciences* 1984; 29: 934-938.
2. Halangk W, Lerch MM, Brandt-Nedelev B,

Roth W, Ruthenbueger M, Reinheckel T, Domschke W, Lippert H, Peters C, Deussing J. Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest* 2000; 106: 773-781.

3. Mareninova OA, Hermann K, French SW, O'Konski MS, Pandol SJ, Webster P, Erickson AH, Katunuma N, Gorelick FS, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Impaired autophagic flux mediates acinar cell vacuole formation and trypsinogen activation in rodent models of acute pancreatitis. *J Clin Invest* 2009; 119: 3340-3355.
4. Wartmann T, Mayerle J, Kahne T, Sahin-Toth M, Ruthenburger M, Matthias R, Kruse A, Reinheckel T, Peters C, Weiss FU, Sandler M, Lippert H, Schulz HU, Aghdassi A, Dummer A, Teller S, Halangk W, Lerch MM. Cathepsin L inactivates human trypsinogen, whereas cathepsin L-deletion reduces the severity of pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 2010; 138: 726-737.
5. Sakata K, Ohmuraya M, Araki K, Suzuki C, Ida S, Hashimoto D, Wang J, Uchiyama Y, Baba H, Yamamura K. Generation and analysis of serine protease inhibitor Kazal type 3-Cre driver mice. *Exp Anim* 2014: in press.
6. Harada H, Warabi E, Matsuki T, Yanagawa T, Okada K, Uwayama J, Ikeda A, Nakaso K, Kirii K, Noguchi N, Bukawa H, Siow RC, Mann GE, Shoda J, Ishii T, Sakurai T. Deficiency of *p62/Sequestosome 1* causes hyperphagia due to leptin resistance in the brain. *J Neurosci* 2013; 33: 14767-14777.
7. Semba K, Araki K, Matsumoto K, Suda H, Ando T, Sei A, Mizuta H, Takagi K, Nakahara M, Muta M, Yamada G, Nakagata N, Iida A, Ikegawa S, Nakamura Y, Araki M, Abe K, Yamamura K. Ectopic expression of *Ptf1a* induces spinal defects, urogenital defects, and anorectal malformations in Danforth's short tail mice. *PLoS Genet* 2013; 9: e1003204.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohmuraya M, Sugano A, Hirota M, Takao-ka Y, Yamamura K. Role of Intrapancreatic SPINK1/Spink3 Expression in the Development of Pancreatitis. *Front Physiol* 2012; 3: 126.
- 2) Piao X, Komazawa-Sakon S, Nishina T, Koike M, Piao JH, Ehlken H, Kurihara H, Hara M, Van Rooijen N, Schutz G, Ohmuraya M, Uchiyama Y, Yagita H, Okumura K, He YW, Nakano H. c-FLIP maintains tissue homeostasis by preventing apoptosis and programmed necrosis. *Sci Signal* 2012; 5: ra93.
- 3) Ozaki N, Ohmuraya M, Ida S, Hashimoto D, Ikuta Y, Chikamoto A, Hirota M, Baba H. Serine protease inhibitor Kazal type 1 and epidermal growth factor receptor are expressed in pancreatic tubular adenocarcinoma, intraductal papillary mucinous neoplasm, and pancreatic intraepithelial neoplasia. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2013.
- 4) Nakagawa Y, Yamamoto T, Suzuki K, Araki K, Takeda N, Ohmuraya M, Sakuma T. Screening methods to identify TALEN-mediated knockout mice. *Exp Anim* 2014; 63: 79–84.
- 5) Sakata K, Ohmuraya M, Araki K, Suzuki C, Ida S, Hashimoto D, Wang J, Uchiyama Y, Baba H, Yamamura K. Generation and analysis of serine protease inhibitor Kazal type 3-Cre driver mice. *Exp Anim* 2014: in press.
- 6) 大村谷昌樹, 廣田昌彦. 膵臓の構造と機能. 小俣政男・千葉勉監修. 専門医のための消化器病学 第2版. 医学書院. 2013; 568–570.
- 2) Masaki Ohmuraya, Kenji Notohara, Kimi Araki, Masahiko Hirota, Ken-ichi Yamamura. Insufficient Levels of Serine Protease Inhibitor Kazal (SPINK) Produced by Partial Expression of SPINK1 in *Spink3* Deficient Pancreas Result in Permanent Pancreatic Tissue Damage. *Digestive Disease Week 2012. San Diego Convention Center (San Diego, CA). 2012.5.18–24.*
- 3) 大村谷昌樹, 能登原憲司, 廣田昌彦. ヒト *SPINK1* 遺伝子ノックインマウスの樹立と解析, 第43回日本膵臓学会大会. 山形. 2012年6月28–29日
- 4) 大村谷昌樹, 橋本大輔, 坂田和也, 能登原憲司, 馬場秀夫. カテプシンDによる腺房細胞内トリプシン活性化機構の解析 第44回日本膵臓学会大会. 仙台. 2013年7月25–26日
- 5) Ohmuraya M, Li Z, Yamamura K. Autophagic cell death by SPINK insufficiency induces chronic inflammation in the pancreas. 45th Annual Meeting of the European Pancreatic Club, Kongresshaus Zurich (Zurich, Switzerland). 2013.6.26–29.
- 6) Ohmuraya M, Notohara K, Yamamura K. p62/SQSTM1 Is Involved in the Mechanism of Acute Pancreatitis. 44th Annual Meeting of the American Pancreatic Association, Eden Roc Hotel (Miami, FL). 2013.10.30–11.2.

2. 学会発表

- 1) 大村谷昌樹, 廣田昌彦. X染色体不活性化による遺伝子改変慢性膵炎モデルマウスの樹立, 第42回日本膵臓学会大会. 弘前. 2011年7月29–30日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

遺伝子改変マウスを用いて急性膵炎発症の分子メカニズムの解明を目指す

研究報告者 大西洋英 秋田大学大学院医学系研究科消化器内科学 教授

共同研究者

真嶋浩聡（秋田大学大学院医学系研究科消化器内科学）

【研究要旨】

IRF2KO マウスの膵臓では調節性外分泌障害が起こり、酵素顆粒が腺房細胞内に充満し、オートファジーの亢進、トリプシンの異所性活性化が生ずる。つまり、このマウスの膵臓は急性膵炎の初期像を模倣するモデルである。腺房細胞の t-SNARE の発現に異常がみられるが、この分子は IRF2 の直接的な標的遺伝子ではない。cDNA マイクロアレイや real-time PCR 等を駆使して、IRF2 の標的遺伝子の同定を試みた。その結果、2 種類のカルシウム結合蛋白が候補として残り、現在解析を進めている。

Vesicle-associated membrane protein 7 (VAMP7)/tetanus neurotoxin-insensitive vesicle associated membrane protein (TI-VAMP) は、SNARE 蛋白の一種である。小胞と細胞膜の結合、後期エンドゾームとライソゾームの癒合だけでなく、オートファジーにも関与している。そこで、膵特異的 VAMP7/TI-VAMP KO マウスを作成し、実験的膵炎における VAMP7/TI-VAMP の役割を検討した。オートファジーは抑制されなかったが、トリプシンの活性化が亢進し、膵炎が重症化した。VAMP7/TI-VAMP は膵炎に対して保護作用を有すると考えられ、その分子メカニズムの解明が重要である。

A. 研究目的

インターフェロン(IFN)誘導遺伝子の転写を制御する因子として IFN 制御因子 (Interferon Regulatory Factor (IRF)) があり、現在 9 種の遺伝子からなるファミリーを形成している (IRF-1~9)。その中のインターフェロン制御因子 2 (IRF2) を欠失したマウスの膵腺房細胞では、頂端側細胞膜上に存在する SNARE 蛋白質 (t-SNARE) に変異が生じる結果、調節性外分泌障害が起こり、細胞内に酵素顆粒が充満し、オートファジーや細胞内でのトリプシン活性化が生じる¹⁾。IRF2 は転写因子であり、SNARE 蛋白の転写を直接制御していることが予想されたが、どうもそうではない。

Vesicle-associated membrane protein 7 (VAMP7)/tetanus neurotoxin-insensitive vesicle associated membrane protein (TI-VAMP) は SNARE 蛋白の一種である。極性を持った細胞や神経細胞の分泌における小胞と細胞膜の結合、後期エンドゾームやライソゾームの癒合に関与している^{2,3)}。最近、オートファジーに

も関与していることが報告された^{4,5)}。オートファジーは急性膵炎においてトリプシンの異所性活性化に重要な役割を果たしている^{6,7)}。

そこで、我々はこれらの遺伝子改変マウスを用いて急性膵炎発症の分子メカニズムの解明を目指して研究を行った。

B. 研究方法

1. IRF2KO マウスを用いて、IRF2 の直接的な標的遺伝子の同定を目指す

① cDNA マイクロアレイを用いた *Irf2*^{+/-}、*Irf2*^{-/-} 膵の遺伝子発現レベルの比較および候補遺伝子群の抽出。

② 膵腺房細胞株 AR42J 細胞 (IRF2 過剰発現, ドミナントネガティブ IRF2 過剰発現, コントロール) における発現の比較 (Real-time PCR) による候補遺伝子の絞り込み。

③ 野生型マウスにおける急性膵炎発症時の発現の変化 (Real-time PCR, 免疫組織化学) による候補遺伝子の絞り込み。

2. VAMP7/TI-VAMP マウスを用いて、膵

炎発症における VAMP7/TI-VAMP の役割の検討

Vamp7^{fllox/X} マウスは理化学研究所バイオリソースセンターより購入した⁸⁾. *Spink3-Cre* マウスは熊本大学生命資源研究・支援センター技術開発分野 大村谷昌樹先生より御供与頂いた. *Vamp7^{fllox/Y}* (*Vamp7^{F/Y}*), *Vamp7^{fllox/Y}* *Spink3-Cre* (*Vamp7^{4panc}*) マウスを作成し, これらのマウスにセルレイン (5 μ g/kg) を 1 時間ごとに 7-12 回腹腔内投与を行い, セルレイン膵炎を惹起した. 血清アミラーゼ値, 組織学的所見, 活性化トリプシン値, オートファジー関連因子の量的変化 (ウエスタンブロット, 免疫組織化学) 等を時間経過と共に比較検討した.

動物実験はすべて, 秋田大学バイオサイエンス安全委員会の承認を受け (承認番号 I-2019), 秋田大学動物実験規程に基づき施行した.

C. 研究結果

1. IRF2KO マウス

① *Irf2*^{-/-} マウスで発現レベルが高度に変化する遺伝子群の同定

Irf2^{+/-}, *Irf2*^{-/-} 膵の遺伝子発現レベルの変化を cDNA マイクロアレイを用いて検討した. 全膵および単離腺房における比較より, *Irf2*^{-/-} 膵で発現が高度に変化する遺伝子群 (亢進 39 個, 低下 7 個) を同定した (表 1). この中に IRF2 の直接的な標的遺伝子が存在し, 膵炎発症に関与しているものと考えられる.

②③ 遺伝子の絞り込み

ラット膵腺房細胞株 AR42J 細胞にレトロウイルスを用いて, IRF2 を過剰発現させた細胞 (GFPirf2), DNA 結合部位のみを過剰発現さ

せたドミナントネガティブ細胞 (GFPirf2dn), コントロール細胞 (GFPcont) を樹立した. IRF2 の直接的な標的遺伝子であれば, この細胞株において, *Irf2*^{-/-} 膵で発現が亢進する候補遺伝子は GFPirf2dn 細胞で発現が亢進し, GFPirf2 細胞で発現が低下すると予想される.

野生型マウスにセルレイン膵炎を惹起すると IRF2 の発現は低下する¹⁾. 膵炎発症に関与し IRF2 で直接制御されている遺伝子であれば, *Irf2*^{-/-} 膵で発現が亢進している遺伝子はセルレイン膵炎でも発現が亢進し, *Irf2*^{-/-} 膵で発現が減弱している遺伝子はセルレイン膵炎でも発現が低下することが予想される.

①で同定された遺伝子群の中でこれらの条件を全て満たしたものは, RIKEN cDNA 1810009 J06 gene (trypsinogen 4) と S100 ファミリー, アネキシンファミリーに属する 2 種類のカルシウム結合蛋白の計 3 個であった. 実際 S100 ファミリーに属する分子を免疫組織学的に検討すると, *Irf2*^{-/-} マウスにみられる著明な発現上昇が, コントロールマウスに急性膵炎を発症させた際にも同様に認められた (図 1).

2. VAMP7/TI-VAMP KO マウス

セルレインを投与しない *Vamp7^{4panc}* マウスの膵臓は, *Vamp7^{F/Y}* マウスや野生型マウスと比較しても形態学的に異常を認めなかった. セルレイン膵炎の発症に伴い, 血清アミラーゼ値は増加したが, 両群間で差を認めなかった. 活性化トリプシンは *Vamp7^{4panc}* マウスで早期から有意に増加し (図 2), 膵炎の組織学的スコア (浮腫, 出血, 壊死, 好中球浸潤) も高値であった. LC3-I, II や p62 の発現に両群間で差はみられなかった. 電子顕微鏡像でも空胞形成等において有意な差を認めず, オートファジーに差

表 1 *Irf2*^{+/-}, *Irf2*^{-/-} マウスの全膵および単離腺房の遺伝子発現比較.

Total records		Dispersed acini		
: 45037		$2^4 \leq$	$2^1 \leq$	
Total	$2^4 \leq$	14	21	2011
pancreas	$2^1 \leq$	25	438	
		1063		

Total records		Dispersed acini		
: 45037		$\leq 2^{-4}$	$\leq 2^{-1}$	
Total	$\leq 2^{-4}$	4	7	1416
pancreas	$\leq 2^{-1}$	3	274	
		974		

Affimetrix 社, Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて, 発現比較を行った. 表中の数字は *Irf2*^{+/-} マウスと比較して発現が大きく変化した遺伝子の数を表す (左図: 亢進, 右図: 低下). その中でも特に発現変化が大きい遺伝子群を太枠で囲った.

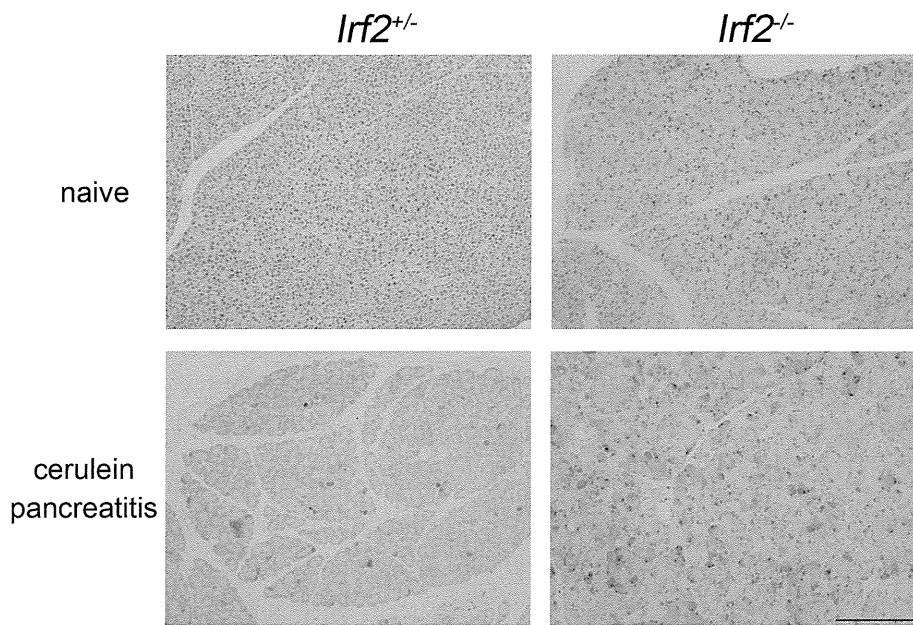


図1 S100 ファミリー分子の免疫組織学的検討。
Irf2^{+/-}, *Irf2*^{-/-}マウスの生理的条件下, セルレイン膵炎発症時の膵臓を用いて免疫染色を行った (Bar = 200 μ m).

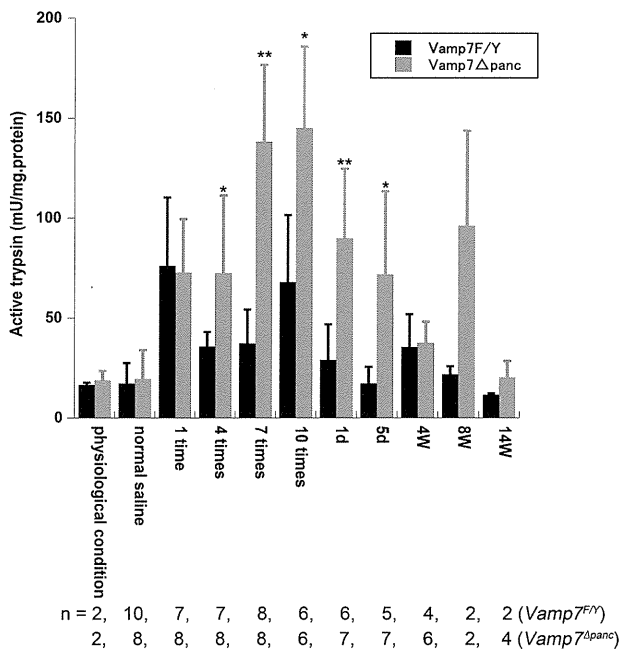


図2 セルレイン膵炎における活性化トリプシン量の時間的变化。
 セルレイン (5 μ g/kg) を1時間ごとに1-10回腹腔内投与を行い, セルレイン膵炎を惹起した. 1d以降はセルレイン10回投与後の日数を表す. 下段は解析に用いたマウスの数を表す. 高さ, 平均標準 \pm 偏差; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ (Student's *t* test) を表す.

を認めなかった.

D. 考察

野生型マウスに実験的急性膵炎を惹起すると, 膵炎発症早期に IRF2 の発現低下がみら

れ¹⁾, IRF2 は膵炎発症にも重要な役割を果たしていることが予想される. IRF2 は転写因子であり, SNARE 蛋白を直接制御している可能性が考えられるが, mRNA とタンパクの発現には逆の相関がみられ, SNARE 蛋白は IRF2 の直接的なターゲットではない. そこで, IRF2 の直接的な標的遺伝子の同定を試みた. cDNA マイクロアレイを用いて発現が大きく変化する遺伝子群を検出し, 膵炎モデルや AR42J *in vitro* モデルでの mRNA の発現変化を基に候補遺伝子の絞り込みを行った. 最終的に trypsinogen 4 と2種類のカルシウム結合蛋白が残った. trypsinogen 4 は急性膵炎発症への関与が当然考えられる遺伝子である. カルシウムシグナルは膵臓に限らず, 全ての外分泌機構において重要な役割を果たしている. このシグナル伝達経路に異常を起こせば, 外分泌異常, 膵炎発症に関与することが容易に想像される. そこで, 現在この二つの因子に着目し遺伝子改変マウスを作成して, 急性膵炎発症との関連から解析を進めている.

既報から考えると VAMP7/TI-VAMP KO マウスではオートファジーが抑制され, 膵炎が軽減すると予想された. しかし, VAMP7/TI-VAMP KO マウスにおいてオートファジーは抑制されることなく, 膵炎は逆に増悪した.

VAMP7/TI-VAMP は膵炎に対して抑制的に働いていると考えられる。VAMP7/TI-VAMP KO マウスの膵臓では、膵炎に際してトリプシンの活性化が早期から亢進しており、そのために膵炎が重症化したものと考えられた。VAMP7/TI-VAMP が存在しないことによってトリプシンの活性化がなぜ亢進するのか、細胞内で生じている分子メカニズムの解明が重要である。

E. 結論

急性膵炎モデル *Irf2*^{-/-} マウスを利用して、急性膵炎発症に関与する IRF2 の標的遺伝子の絞り込みを行った。二種類のカルシウム結合タンパクが候補遺伝子として残り、解析を進めている。

VAMP7/TI-VAMP KO マウスにセルレイン膵炎を惹起すると、トリプシンの異所性活性化が亢進し、膵炎が重症化した。VAMP7/TI-VAMP は急性膵炎に対して保護的な作用を有している。

F. 参考文献

1. Mashima H, Sato T, Horie Y, Nakagawa Y, Kojima I, Ohteki T, Ohnishi H. Interferon Regulatory Factor-2 Regulates Exocytosis Mechanisms Mediated by SNAREs in Pancreatic Acinar Cells. *Gastroenterology* 2011; 141: 1102-1113.
2. Galli T, Zahraoui A, Vaidyanathan VV, Raposo G, Tian JM, Karin M, Niemann H, Louvard D. A novel tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells. *Mol Biol Cell* 1998; 9: 1437-1448.
3. Advani RJ, Yang B, Prekeris R, Lee KC, Klumperman J, Scheller RH. VAMP-7 mediates vesicular transport from endosomes to lysosomes. *J Cell Biol* 1999; 146: 765-776.
4. Moreau K, Ravikumar B, Renna M, Puri C, Rubinsztein DC. Autophagosome precursor maturation requires homotypic fusion. *Cell* 2011; 146: 303-317.

5. Moreau K, Renna M, Rubinsztein DC. Connections between SNAREs and autophagy. *Trends Biochem Sci* 2013; 38: 57-63.
6. Hashimoto D, Ohmuraya M, Hirata M, Yamamoto A, Suyama K, Ida S, Okumura Y, Takahashi E, Kido H, Araki K, Baba H, Mizushima N, Yamamura K. Involvement of autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells. *J Cell Biol* 2008; 181: 1065-1072.
7. Mareninova OA, Hermann K, French SW, O'konski MS, Pandol SJ, Webster P, Erickson AH, Katunuma N, Gorelick FS, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Impaired autophagic flux mediates acinar cell vacuole formation and trypsinogen activation in rodent models of acute pancreatitis. *J Clin Invest* 2009; 119: 3340-3355.
8. Sato M, Yoshimura S, Hirai R, Goto A, Kunii M, Atik N, Sato T, Sato K, Harada R, Shimada J, Hatabu T, Yorifuji H, Harada A. The role of VAMP7/TI-VAMP in cell polarity and lysosomal exocytosis in vivo. *Traffic* 2011; 12: 1383-1393.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mashima H, Sato T, Horie Y, Nakagawa Y, Kojima I, Ohteki T, Ohnishi H. Interferon Regulatory Factor-2 Regulates Exocytosis Mechanisms Mediated by SNAREs in Pancreatic Acinar Cells. *Gastroenterology* 2011; 141: 1102-1113.
- 2) 真嶋浩聡, 大西洋英. 遺伝子改変マウスを用いた急性膵炎研究の現状と今後の展望. *膵臓* 2012; 27: 584-592.
- 3) 真嶋浩聡, 大西洋英. 膵線維化の病態. *肝胆膵* 2012; 65: 329-336.
- 4) 真嶋浩聡, 大西洋英. インターフェロン制御因子 IRF-2 は膵調節性外分泌に重要な役割を果たし, 急性膵炎モデル IRF2KO マウスを用いて膵炎発症の分子メカニズムの解明を目指す. 分子生物学が可能とした個別化医療 第19回浜名湖シ

ンポジウム記録集 2012: 106-114.

- 5) 真嶋浩聡, 大西洋英. 慢性膵炎モデルにおいて, 膵線維化には腺房細胞ではなく骨髄系細胞の RelA/p65 が必要である. Review of Gastroenterology & Clinical Gastroenterology and Hepatology 2012; 7: 48-55.
- 6) 真嶋浩聡, 大西洋英. 膵線維化と膵星細胞. SURGERY FRONTIER 2013; 20: 320-323.
- 7) 真嶋浩聡, 大西洋英. 急性膵炎の発症のメカニズム ~細胞内では何が起きているか~. 胆と膵 2013; 34: 1035-1041.
- 8) 大西洋英. 糖尿病と膵疾患 G. I. Research 2013; 21: 255-259.
- 9) 真嶋浩聡, 大西洋英. I κ B α の欠失は RelA を活性化し, Spi2A の亢進を介して急性膵炎を減弱させる. Review of Gastroenterology & Clinical Gastroenterology and Hepatology 2013; 8: 26-30.
- 10) 真嶋浩聡, 大西洋英. IRF2KO マウスを用いて, 膵炎発症のメカニズムの解明を目指す. アルコールと医学生物学 in press

2. 学会発表

- 1) Mashima H, Sato T, Ohteki T, Ohnishi H. The pancreas of Irf2^{-/-} mice presented a very early feature of acute pancreatitis and a milder response in cerulein-induced pancreatitis. DDW2011. Chicago. 2011.5.
- 2) 真嶋浩聡, 大西洋英. Irf2^{-/-}膵は急性膵炎早期のモデルであり, 実験的膵炎に対しては耐性を示す(ワークショップ: 膵の炎症と線維化研究の最近の進歩). 第42回日本膵臓学会大会. 弘前. 2011年7月
- 3) 真嶋浩聡, 大西洋英. 急性膵炎初期像を模倣するモデル動物 IRF2KO マウスにおける膵再生及び線維化の解析(ワークショップ: 膵の再生と線維化—progenitor cell・stellate cellの役割—). 第53回日本消化器病学会大会. 福岡. 2011年10月
- 4) Mashima H, Ohnishi H. Searching for the primary target of IRF2 in regulated exocytosis in the pancreas. Annual meeting of

American Gastroenterological Association, Digestive Disease Week 2012. San Diego (USA). 2012.5.

- 5) 真嶋浩聡, 大西洋英. 急性膵炎モデルIRF2KO マウスを用いた急性膵炎原因遺伝子へのアプローチ. 第98回日本消化器病学会総会. 東京. 2012年4月
- 6) 真嶋浩聡, 大西洋英. IRF2KO マウスを用いた急性膵炎原因遺伝子へのアプローチ. 第43回日本膵臓学会大会. 山形. 2012年7月
- 7) 真嶋浩聡, 大西洋英. IRF2KO マウスを用いて, 膵炎発症のメカニズムの解明を目指す. 第32回アルコール医学生物学研究会, シンポジウム [アルコールと消化器疾患]. 東京. 2013年1月
- 8) 真嶋浩聡, 大西洋英. IRF2KO マウスを用いて, 膵炎発症のメカニズムの解明を目指す. 第50回日本臨床分子医学会学術集会. 東京. 2013年4月
- 9) 真嶋浩聡, 大西洋英. 急性膵炎における VAMP7 の役割. 第44回日本膵臓学会大会. トピックスセッション. 仙台. 2013年7月

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

Ⅱ. 慢性膵炎

1) 共同研究プロジェクト

慢性膵炎の実態に関する全国調査

研究報告者 下瀬川徹 東北大学病院 病院長・教授

共同研究者

廣田衛久，正宗 淳，菊田和宏（東北大学病院消化器内科）

木村憲治（国立病院機構仙台医療センター消化器内科），辻 一郎（東北大学大学院公衆衛生学）

栗山進一（東北大学分子疫学分野）

【研究要旨】

慢性膵炎は非可逆性・進行性の疾患であり，悪性新生物の合併率が高く，患者の平均寿命は国民一般より短く予後の悪い難病である．2009年に慢性膵炎の臨床診断基準が改訂された．慢性膵炎患者の実態把握と疫学的解析を目的とし，2011年1年間に医療機関を受療した慢性膵炎患者を対象として新しい診断基準による初めての全国調査を行った．1次調査は全国の内科（消化器科を含む），外科（消化器外科を含む）を標榜する診療科から層化無作為抽出法にて4,175科を選定し，郵送法にて行った．有効回答は1,884科より得られ，回収率は45.1%であった．1次調査結果より，2011年1年間の慢性膵炎の推定受療患者は66,980人（95%信頼区間59,743～74,222人），人口10万人あたりの推定患者数は52.4人であった．また，2011年1年間の新規発症慢性膵炎患者数は17,830人（95%信頼区間14,567～21,088人），人口10万人あたりの推定新規発症患者数は14.0人であった．2次調査では，1,953人分（男性1,515名，女性383名，不明55）の調査票が回収され，集計された（回収率23.7%）．診断は，確診81.9%，準確診6.6%，早期0.3%，早期疑い0.1%，臨床疑診5.5%，不明5.6%であった．改訂基準の診断は旧基準との比較から妥当と思われた．早期症例が極めて少数であったが，臨床疑診症例に ERCP や EUS がほとんど行われていないために診断されていない可能性がある．確診・準確診・早期症例を合わせた1,734例の年齢の中央値は63歳（男性：63歳，女性：65歳），男女比は4.6：1であった．男女合わせた成因はアルコール性67.5%，特発性20.0%，その他12.5%．男女別の成因では，男性ではアルコール性が最も多く75.7%，続いて特発性13.4%，その他10.9%であったのに対し，女性では特発性が最も多く51.0%，続いてアルコール性29.5%，その他19.5%であった．

A. 研究目的

2009年に本研究班，日本膵臓学会，日本消化器病学会により慢性膵炎臨床診断基準2009が公表された¹⁾．この診断基準は，2001年に作成された診断基準を基に確診，準確診の画像所見をより厳密にする，セクレチン試験などの現在は行われなくなった検査を診断項目から外す，臨床症状のある準確診症例を確診に格上げする，「早期慢性膵炎」の診断基準を盛り込むなどが行われ，大きく改訂された．特に世界に先駆けて作成された「早期慢性膵炎」の診断基準は，確診・準確診と診断された時点では既に非可逆性進行性の疾患である慢性膵炎の予後を飛躍的に改善することを目的に作成されており，今後の慢性膵炎診療を大きく変えることが

期待されている．

慢性膵炎の全国疫学調査はこれまで6回行われており，今回は診断基準改定前の2007年1年間の受療患者を対象に行われた．今回は診断基準改定後はじめての調査となる．今回の調査では，慢性膵炎の受療患者数や新規発症患者数の推移など実態把握を行うとともに，これまでの診断基準による診断と比較することにより，改訂診断基準の妥当性の評価も行う．また，慢性膵炎患者の成因等の実態を以前に行われた全国調査結果と比較し，慢性膵炎の患者数や発症率の変化，成因の変化を調べることを目的とする．

B. 研究方法

調査対象は2011年1月1日から2011年12月31日までに慢性膵炎で調査対象診療科を受療した患者である。調査対象となる診療科は全国の内科(消化器内科を含む)、外科(消化器外科を含む)を標榜する16,814診療科より層化無作為抽出法により抽出した4,175科を対象とした。抽出層は大学病院, 一般病院500床以上, 400-499床, 300-399床, 200-299床, 100-199床, 99床以下で, 抽出率はそれぞれ100%, 100%, 80%, 40%, 20%, 10%, 5%である。特に膵疾患患者の集中する施設を特別階層とし全病院を調査対象とした。調査は1次調査と2次調査からなり, 両調査とも郵送法である。1次調査にて患者ありと返答のあった病院を2次調査の対象として, 2次調査票を郵送した。1次調査による受療患者数の推定には厚生省特定疾患の疫学調査班による全国疫学調査マニュアル²⁾を用いた。2011年の日本の総人口は127,799,000人(10月1日の推定数)として計算した。

(倫理面への配慮)

本研究は東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会にて承認(承認番号2012-1-429)された後に1次調査が行われた。2次調査にあたっては, 患者の個人情報に留意し, 患者個人名, 生年月日, 施設IDなど患者個人を特定できる可能性のある情報は調査票に記載しない。対象施設にて任意に調査票ごとに重複しないように(施設IDとは異なる)番号をつけてもらい, その対応表は対象施設で保管してもらうようにし

た。実施は「疫学調査に関する倫理指針」(平成14年6月17日文科科学省・厚生労働省, 平成16年12月28日全部改正)にしたがって行った。

C. 研究結果

1. 1次調査

2012年6月12日に調査対象4,175科へ1次調査票を郵送した。慢性膵炎の診断は, 慢性膵炎臨床診断基準2009¹⁾により行い, 確定例, 準確定例および早期例を調査の対象とした。1次調査においては慢性膵炎の2011年1年間の受療患者数, 新規発症数, 有病率, 新規発症率を推定した。1次調査は2回再依頼を行った後, 2012年10月31日に返信された分までで締め切りとした。1次調査票を送付した4,175科のうち1,884科より有効な回答が得られた。回答率は45.1%であった(表1)。2011年1年間に全国の医療機関を受療した慢性膵炎患者は推定66,980人(95%信頼区間59,743~74,222人), 人口10万人当たりの慢性膵炎有病患者率は52.4人と推定された。2011年1年間の新規発症慢性膵炎患者数は推定17,830人(95%信頼区間14,567~21,088人), 人口10万人当たりの慢性膵炎新規発症者は14.0人と推定された(表2)。

2. 2次調査

1次調査により患者ありと返信のあった708診療科に対し2013年2月28日に2次調査票を発送した。2013年6月28日を1次締め切り, その後2回再依頼を行い, 9月30日を最終締め切りとした。計308診療科より返信を得ることができ, 回答率は43.5%であった。2次調査により2,032名分の調査票が集められたが, デー

表1 層化抽出法による対象科の選定と回答率

対象病院	登録件数	対象件数	抽出率(%)	有効回答	回答率(%)	最終抽出率(%)
特別階層病院	487	487	100	209	42.9	42.9
大学病院	391	391	100	264	67.5	67.5
500床以上	865	865	100	424	49.0	49.0
400-499床	799	640	80	286	44.7	35.8
300-399床	1,506	603	40	210	34.8	13.9
200-299床	1,903	381	20	158	41.5	8.3
100-199床	5,291	529	10	220	41.6	4.2
99床以下	5,572	279	5	113	40.5	2.0
計	16,814	4,175	22.0	1,884	45.1	9.9

表 2 2011年慢性膵炎全国疫学第1次調査結果

慢性膵炎推定受療患者数： 66,980(95%信頼区間：59,743～74,222人)
慢性膵炎有病患者率(2011年)： 52.4人/人口10万人
新規発症慢性膵炎推定受療患者数： 17,830(95%信頼区間：14,567～21,088人)
慢性膵炎発病患者率(2011年)： 14.0人/人口10万人

タの不備や重複等により、そのうち79名(3.9%)分を除外した。最終的に1,953名分のデータの解析を行った。

報告された慢性膵炎患者の診断は、確定例1,600人(81.9%)、準確定例128人(6.6%)、早期例6人(0.3%)、早期疑い2人(0.1%)、臨床疑診例107人(5.5%)、不明110人(5.6%)であった。慢性膵炎臨床診断基準2001(旧基準)³⁾による診断と改定基準の診断を比較したところ、確定例はほぼ変化がなかったのに対し、旧基準による準確定例の約1/3が確定に診断が格上げされた(図1)。早期慢性膵炎と診断された症例はわずか0.3%であり予想より少なかった。早期慢性膵炎症例は旧基準で臨床疑診とされた症例に一定の割合で存在すると推定されていたが、旧基準で臨床疑診とされた症例のうち早期慢性膵炎の診断に必須である ERCP または EUS のどちらも施行されていない症例が82.1%を占めた。したがって、早期慢性膵炎が診断されていない主な要因として、診断目的の ERCP が行われなくなってきたことと、EUS が臨床現場に十分に普及していない現状が示唆された。今後、EUS を施行する医療施設が増え、早期画像所見が浸透することにより早期慢性膵炎が診断される機会が増加すると予想される。

確定例・準確定例・早期例を合わせた患者1,734人は男性1,385人、女性302人、性別不明47人、男女比は4.6：1、年齢の中央値は63歳。男性の年齢の中央値は63歳、女性の年齢の中央値は65歳であった。早期慢性膵炎6人の男女比は2：1、年齢の中央値は56.5歳であった。確定例・準確定例・早期例における主治医が推定した慢性膵炎の成因を集計した。主治

診断基準2001	診断基準2011	
確定	→ 確定	99.4%
	→ 準確定	0.5%
	→ その他	0.1%
準確定	→ 確定	11.3%
	→ 確定	35.6%
	→ 準確定	49.7%
	→ 早期	0.6%
	→ 臨床疑診	2.9%
臨床疑診	→ 確定・準確定	23.0%
	→ 早期	1.6%
	→ 早期疑い	1.1%
	→ 臨床疑診	46.7%
	→ その他	27.5%

図 1 慢性膵炎臨床診断基準改定による診断の変化

表 3 慢性膵炎確定・準確定例・早期例1,734症例の成因

成因	患者数(%)	男性患者数(%)	女性患者数(%)
アルコール性	1,171(67.5)	1,048(75.7)	89(29.5)
特発性	347(20.0)	185(13.4)	154(51.0)
胆石性	22(1.3)	12(0.9)	9(3.0)
急性膵炎	37(2.1)	27(1.9)	10(3.3)
高脂血症	15(0.9)	10(0.7)	5(1.7)
自己免疫性膵炎	12(0.7)	12(0.9)	0(0)
慢性腎不全	6(0.3)	6(0.4)	0(0)
遺伝性	6(0.3)	5(0.4)	1(0.3)
家族性	5(0.3)	4(0.3)	1(0.3)
薬剤性	1(0.1)	1(0.1)	0(0)
その他	66(3.8)	39(2.8)	24(7.9)
不明	46(2.7)	36(2.6)	9(3.0)

医がアルコール性と推定した患者は全体の67.5%と最も多かった。男性では75.7%で最も多かったのに対し女性では29.5%。特発性と推定された患者は全体で20.0%。男性では13.4%であったのに対し、女性では51.0%で最も多かった(表3)。

D. 考察

2009年に慢性膵炎の臨床診断基準が改訂され、確定・準確定の画像所見が厳格化され、より進行した症例が確定・準確定として診断されるようになった。同時に、早期慢性膵炎の診断

基準が制定され、これまでできなかった早期症例の診断が可能になった。この診断基準の改訂により、早期症例に断酒・禁煙などの治療介入を行うことで予後を飛躍的に改善できる可能性があり、これまで診断されていた確診・準確診症例では非可逆性・進行性とされてきた慢性膵炎の診療に大きな変化が出てくることが期待されている。

まず、改訂された診断基準の診断の妥当性を検討するために旧基準との診断の比較を行った。これにより、旧基準による確診例はほぼ100%、改訂基準でも確診と診断され、確診例ではほぼ診断が変化しなかった。ごく少数例の変化は、膵実質内の単発の石灰化で慢性膵炎確診とされていたような症例であり、改訂により画像診断がより厳格化されたことによる診断の変化であり妥当であると思われた。今回の調査の限界として、旧基準では慢性膵炎として診断されていたが、改訂基準で除外された自己免疫性膵炎と閉塞性膵炎については、今回の調査の対象から外れており、このため旧基準で診断された患者と新基準で診断された患者の正確な比較にならないことである。しかし、このような症例が除外されたことでより厳格な診断となっており、改訂基準による確診症例の診断については問題がないと思われた。準確診症例は、病状の進行により確診に診断が変化した症例を除き、約1/3が確診に診断が変化した。これは準確診の画像所見に加え、反復する上腹部痛発作、血中尿中の膵酵素値の異常、膵外分泌障害の3項目のうち2項目を満たせば確診に診断が格上げされるという、診断基準の改訂による。これに伴い準確診症例は減少し、準確診例が全体に占める比率は、前回の9.2%から6.6%に減少した。臨床疑診症例の中に多くの早期慢性膵炎症例が含まれていると期待されていたが、現状では早期慢性膵炎と診断される症例は極めて少なかった。これは前述のように、早期慢性膵炎診断に必須である、ERCPとEUSの両方とも行われていない臨床疑診症例が大多数を占めるため診断される機会がなかったからである。ERCPは診断目的に行われる機会が減少しており、EUSは一般病院ではまだ浸透し

ていない検査であるためであろう。今後、EUSが一般臨床現場に普及することで早期症例が診断される機会が増加する可能性がある。臨床疑診症例の約23%がその後確診または準確診に進行し、そのうちの半数以上が早期から確診または準確診に進行した。したがって、おそらく臨床疑診症例の少なくとも15%から25%程度は早期慢性膵炎か、または早期慢性膵炎に進行する症例と考えられ、このような症例に積極的にEUS検査が行われることで早期症例が診断されると思われる。このように、改訂基準による慢性膵炎の診断については妥当であると考えられるが、EUSあるいはERCPが診断の必須条件である早期慢性膵炎については、現時点では十分に診断されていない医療現場の現状が明らかとなった。

慢性膵炎の全国調査はこれまで6回行われており、今回が7回目である。前回調査は2007年の患者を対象に本研究班により行われた。前回の推定受療患者数は47100人(95%信頼区間40,200~54,000人)、人口10万人当たりの慢性膵炎有病患者率は36.9人と推定された。また、新規発症患者数は推定15,200人(95%信頼区間12,900~17,600人)、人口10万人あたりの推定新規発症患者数は11.9人であった⁴⁾。1990年以降に行われた全国調査による人口10万人あたりの有病率と発病率の比較を図2に示すが、慢性膵炎患者の有病率は増加していることが明らかである。また、発病率についても高い水準を維持している。成因については表3に示すが、アルコール性が全体の67.5%、男性の75.7%、女性の29.5%を占めた。前回の全国

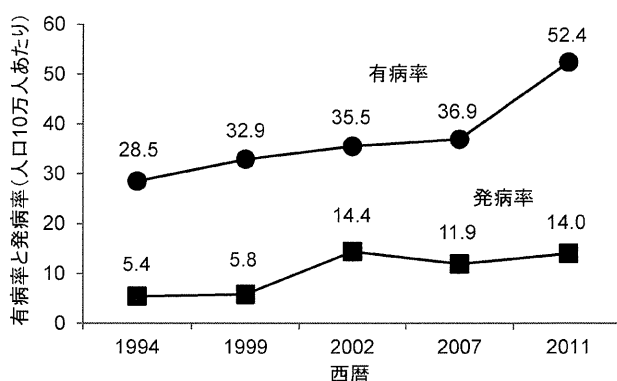


図2 慢性膵炎有病率と発病率の推移

調査はアルコール性が全体の64.8%，男性の73.2%，女性の27.4%であったので，男女とも増加している．年齢の中央値は全体が63歳，男性が63歳，女性が65歳であった．これは前回調査が，年齢の中央値は全体で60歳，男性60歳，女性61歳であったことと比較すると3-4歳高くなっており慢性膵炎患者の高齢化がすすんでいる．高齢患者が増加していることと，全体の患者数増加には関連があると思われる．この点については，平成25年度報告書で詳述する．

E. 結論

2011年1年間の慢性膵炎患者の実態把握を目的に，慢性膵炎全国調査を行った．1次調査では，慢性膵炎受療患者数は推定66,980人(95%信頼区間59,743~74,222人)，人口10万人当たりの有病患者率は推定52.4人であった．2011年1年間の慢性膵炎新規発症患者数は人口10万人あたり推定14.0人であった．2次調査では，1,953人分の調査票が回収された．改訂基準での慢性膵炎の診断は妥当である．確診例・準確診例・早期例を合わせた慢性膵炎患者の男女比は4.6：1，年齢の中央値は63歳(男性63歳，女性65歳)，成因はアルコール性67.5%，特発性20.0%，胆石性1.3%であった．慢性膵炎患者は高齢化がすすみ，かつ増加している．

F. 参考文献

1. 厚生労働省難治性膵疾患に関する調査研究班，日本膵臓学会，日本消化器病学会．慢性膵炎臨床診断基準2009．膵臓．2009；24：645-646．
2. 橋本修二．全国疫学調査に基づく患者数の推計方法．大野良之編．難病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル．名古屋：厚生省特定疾患難病の疫学調査班．1994；12-24．
3. 日本膵臓学会．日本膵臓学会慢性膵炎臨床診断基準2001．膵臓．2001；16：560-561．
4. 下瀬川徹，廣田衛久，正宗 淳，濱田 晋，木原康之，佐藤晃彦，木村憲治，辻 一郎，栗山進一．慢性膵炎の実態に関する全国調査．厚生

労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業難治性膵疾患に関する調査研究 平成20年度～平成22年度 総合研究報告書．2011；185-189．

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

謝辞

本調査にあたり，多数の施設の先生方のご協力を賜り厚く御礼申し上げます．ご協力頂きました施設は以下のとおりです．付記して感謝の意を表します．

九州大学病院肝臓膵臓胆道内科，藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院消化器内科，関西医科大学付属枚方病院消化器肝臓内科，都立駒込病院内科，信州大学病院消化器内科，北九州総合病院総合内科，山形大学第一外科(消化器・乳腺甲状腺・一般外科)，京都府立医科大学消化器内科，自治医科大学消化器外科，仙台医療センター消化器内科，倉敷中央病院消化器内科，東京大学医学部附属病院消化器内科，名古屋大学医学部附属病院消化器内科，東邦大学医療センター大森病院消化器内科，名古屋第一赤十字病院消化器内科，東北大学病院消化器内科，京都大学医学部附属病院消化器内科，広島大学病院総合内科総合診療科，西森医院内科・消化器内科，神戸大学病院消化器内科，札幌厚生病院第2消化器科，岐阜大学医学部附属病院消化器内科，伊那中央病院救命救急センター，聖隷横浜病院消化器内科，京都府立医科大学附属北部医療センター消化器内科，津軽保健生活協同組合健生病院内科，横浜市立大学附属市民総合医療センター高度救命救急センター，諏訪赤十字病院救急科，伊勢赤十字病院外科・消化器科・内科，呉医療センター消化器内科，社会医療法人仁愛会浦添総合病院消化器内科，山形大

学第2内科，福島県立医科大学肝胆膵・移植外科・消化器リウマチ膠原病内科，東京医科大学茨城医療センター消化器外科，群馬大学医学部附属病院病態総合外科学，防衛医科大学校病院消化器内科，北里大学メディカルセンター外科，埼玉医科大学総合医療センター肝胆膵外科，埼玉医科大学病院消化器一般外科・消化器内科・肝臓内科，埼玉医科大学国際医療センター消化器内科，東京慈恵会医科大学附属柏病院外科，東京医科歯科大学消化器内科，北里研究所病院外科，慶應義塾大学病院一般・消化器外科，昭和大学病院消化器・一般外科，東京慈恵会医科大学附属病院肝胆膵外科，東京慈恵会医科大学附属第三病院外科，東邦大学医療センター大橋病院外科・消化器内科，日本医科大学消化器外科，東海大学八王子病院消化器内科，北里大学東病院消化器内科，聖マリアンナ医科大学消化器・一般外科，福井大学附属病院消化器内科，山梨大学医学部付属病院第1外科・第1内科，愛知医大病院消化器内科，京都大学医学部附属病院肝胆膵・移植外科，大阪大学医学部附属病院消化器外科・消化器内科，大阪医科大学一般・消化器外科，関西医科大学香里病院内科，兵庫医科大学外科，和歌山県立医科大学消化器内科・第2内科，鳥取大学医学部附属病院機能病態内科学・消化器総合外科，岡山大学病院消化器内科，川崎医科大学附属川崎病院総合内科学2，川崎医科大学糖尿病・代謝・内分泌内科，広島大学病院消化器・代謝内科，山口大学消化器・腫瘍外科学，香川大学医学部付属病院消化器神経内科，愛媛大学医学部附属病院第3内科，高知大学消化器内科，久留米大学病院消化器内科，産業医科大学第一外科，福岡歯科大学医科歯科総合病院消化器外科，福岡大学筑紫病院消化器内科，産業医科大学若松病院消化器内科，長崎大学移植・消化器外科，大分大学医学部附属病院消化器・小児外科・消化器内科，九州大学病院別府病院免疫内科・外科，宮崎大学附属病院第1外科，鹿児島大学病院消化器・乳腺甲状腺外科・消化器内科，北海道がんセンター消化器内科，市立函館病院消化器外科，手稲溪仁会病院消化器病センター・消化器内科，八戸市立市民病院消化器

科，岩手県立中央病院消化器科，山形県立中央病院内科，星ヶ丘病院内科，茨城県立中央病院消化器内科，那須赤十字病院消化器内科，さいたま赤十字消化器内科，亀田総合病院消化器内科，東京病院消化器内科，東京都済生会中央病院消化器内科，東京厚生年金病院消化器内科，虎の門病院消化器内科，NTT東日本関東病院消化器内科，関東労災病院消化器内科，横須賀共済病院消化器内科，新潟県立がんセンター消化器外科，新潟市民病院消化器外科，金沢医療センター消化器科，石川県立中央病院消化器内科，福井赤十字病院外科，長野赤十字病院消化器内科，岐阜市民病院消化器内科，浜松医療センター消化器外科，聖隷三方原病院消化器内科，安城更生病院外科，市立四日市病院消化器内科，市立長浜病院消化器内科，大津赤十字病院消化器科，京都第二赤十字病院消化器内科，大阪成人病センター肝胆膵内科，大阪府立急性期・総合医療センター外科・消化器内科，大阪市立総合医療センター肝胆膵外科，大阪厚生年金病院外科，財団法人浅香山病院内科，南岡山医療センター内科，岡山済生会総合病院外科，津山中央病院内科，県立広島病院消化器外科，広島市立広島市民病院外科，JA広島総合病院外科，愛媛県立中央病院消化器外科，高知医療センター消化器外科，福岡東医療センター消化器肝臓内科，九州厚生年金病院内科，王子総合病院消化器内科，仙台赤十字病院消化器内科，東北厚生年金病院消化器内科，白河厚生総合病院第一内科，芳賀赤十字病院消化器内科，済生会川口総合病院消化器内科，埼玉協同病院消化器科，千葉西総合病院消化器内科，関東中央病院消化器内科，独立行政法人国立病院機構相模原病院消化器科，神奈川県立がんセンター消化器内科，済生会新潟第二病院消化器科，福井県済生会病院内科，長野市民病院消化器外科，鹿教湯病院リハビリテーション科，協立総合病院内科，鈴鹿中央総合病院消化器内科，舞鶴医療センター消化器科，第二岡本総合病院消化器内科，市立岸和田市民病院外科，市立伊丹病院消化器内科，公立八鹿病院外科，呉共済病院消化器内科，関門医療センター消化器内科，徳島赤十字病院消化器科，高松市民病院外科，住友別

子病院消化器内科，国立病院機構九州がんセンター消化器肝胆膵内科，小倉医療センター消化器内科，済生会八幡総合病院外科，白十字病院肝臓内科，社会医療法人製鉄記念八幡病院糖尿内科，佐賀県立病院好生館消化器外科，国保水俣市立総合医療センター消化器内科，宮崎県立延岡病院外科，帯広第一病院消化器内科，盛岡友愛病院消化器内科，公立刈田総合病院外科，仙台厚生病院消化器外科，太田福島総合病院外科，東葛病院内科，千葉愛友会記念病院内科，総合大雄会病院消化器内科，済生会滋賀県病院消化器科，愛生会山科病院内科，河内総合病院循環器科・消化器科，協和会協立病院外科，玉造厚生年金病院消化器科，山口労災病院消化器科内科，特定医療法人茜会昭和病院内科，唐津赤十字病院外科，社会医療法人敬愛会中頭病院外科，南部徳洲会病院内科，北海道済生会小樽病院内科，市立横手病院消化器内科，三宿病院消化器科，東大和病院消化器科，富山県済生会富山病院内科，独立行政法人国立病院機構福井病院外科，菊川市立総合病院内科，市立柏原病院内科，医療法人春秋会城山病院消化器内科，彩都友誼会病院内科，宝塚第一病院外科，下関市立豊浦病院消化器内科，医療法人医誠会都志見病院内科・外科，丸山病院内科，相生会宮田病院内科，聖フランシスコ病院内科，荒尾市民病院外科，健康保険人吉総合病院消化器内科，宮崎市郡医師会病院外科，済生会川内病院内科，ひまわり会札幌病院内科，涌谷町国保病院内科，宮城利府掖済会病院外科，本荘第一病院消化器科，神栖済生会病院内科，医療法人社団福田会福田記念病院外科，上武呼吸器科内科病院内科，宏愛会第一病院外科，医療法人壽鶴会菅野病院内科，医療法人社団徳成会八王子山王病院内科，医療法人社団悦伝会目白病院外科，大滝病院内科，社会保険桜ヶ丘総合病院内科，医療法人甲友会西宮協立リハビリテーション病院内科，和歌山生協病院外科，佐賀社会保険病院消化器内科，医療法人社団信洋会石山病院精神科・内科，医療法人宮原病院内科，医療法人健寿会黒木病院外科，三重大学医学部附属病院肝胆膵・移植外科，東京医科大学病院消化器内科，杏林大学外科(消化器・一般)，福島県立医

科大学会津医療センター消化器内科，栗原市立栗原中央病院内科，藤田保健衛生大学総合外科・膵臓外科，神戸大学病院消化器内科，東京医科大学茨城医療センター消化器内科，奈良県立医科大学消化器総合外科，市立室蘭総合病院外科，総合病院土浦協同病院外科，武蔵野赤十字病院外科，三重中央医療センター消化器科，京都第二赤十字病院外科，福岡赤十字病院肝臓内科，札幌厚生病院外科，東北薬科大学病院外科，聖隷佐倉市民病院外科，北九州市立八幡病院外科，地方独立行政法人那覇市立病院外科，同樹会苫小牧病院外科，貝塚病院外科

慢性膵炎遺伝子解析の全国展開

研究報告者 下瀬川徹 東北大学病院 病院長・教授

共同研究者

正宗 淳，桑 潔，中野絵里子（東北大学病院消化器内科）
五十嵐良典（東邦大学医学部内科学講座消化器内科（大森）），乾 和郎（藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院消化器内科学）
川 茂幸（信州大学総合健康安全センター），木村 理（山形大学医学部外科学第一講座）
田妻 進（広島大学病院総合内科・総合診療科），能登原憲司（倉敷中央病院病理検査科）
平野賢二（東京大学消化器内科），増田充弘（神戸大学大学院医学研究科消化器内科学分野）
宮川宏之（札幌厚生病院第2消化器科）

【研究要旨】

本研究は膵炎関連遺伝子異常を網羅的に解析し，わが国における膵炎関連遺伝子異常の意義を明らかにすることが目的である．解析対象遺伝子として，既知の主要な膵炎関連遺伝子7個に加え，全エクソーム解析により膵炎関連候補遺伝子8個，他の膵消化酵素32個や酵素阻害蛋白11個，その他の候補11個とした．次世代シーケンサーを用いて，52例の膵炎患者を対象に網羅的解析を行い，既知の膵炎関連遺伝子について評価することができた．また未知の膵炎関連遺伝子としての候補を絞り込むことが可能であった．

A. 研究目的

膵炎に関連する遺伝子変異としては，これまでトリプシンとその阻害蛋白に焦点が当てられ，いくつかの関連遺伝子が報告されている．1996年に遺伝性膵炎の疾患遺伝子としてカチオニックトリプシノーゲン(*PRSS1*)が初めて報告された[1]．膵分泌性トリプシンインヒビター(*SPINK1*)は，膵腺房細胞で生成される内因性のトリプシンインヒビターであり，その遺伝子異常を伴う若年性膵炎が報告されている[2]．また慢性膵炎に保護的に働くアニオニックトリプシノーゲン(*PRSS2*)の p.G191R 多型が報告され[3]，新たな膵炎関連遺伝子としてキモトリプシン C(*CTRC*)の遺伝子異常も同定されている[4]．

これまで本研究班でも，遺伝性膵炎の疾患遺伝子である *PRSS1* 遺伝子変異や，膵炎に対し保護的に働く *PRSS2* 遺伝子多型を報告している[5]．また *SPINK1* の2種類の主要な遺伝子異常，すなわち p.N34S 変異と IVS3+2T>C 変異が家族性膵炎や特発性膵炎と強く関連することや，稀な *CTRC* の遺伝子異常についても

報告している[6]．しかし，既知の遺伝子異常を認めない慢性膵炎症例も多く，膵炎関連遺伝子の全体像は未だ解明されていない．

一方，DNA 配列決定技術の進歩は著しい．2005年より市販が開始された，いわゆる“次世代シーケンサー”は，ナノレベルでの超状並列化により，従来のキャピラリーシーケンサー数百台分のデータ生産量を1台で賄える．また，蛋白質を符号化している mRNA の翻訳領域，すなわちエクソーム領域の総和はゲノムの1.5%を占めるのみであるが，このエクソーム領域の異常により遺伝病の85%以上を説明できるとされている．近年，次世代シーケンサーによる全エクソーム解析により，いくつかの疾患遺伝子が解明されており，非常に有用なツールと考えられる．

本研究の目的は膵炎関連候補遺伝子を網羅的に解析し，わが国における膵炎関連遺伝子異常の意義を明らかにすることである．

B. 研究方法

1. 次世代シーケンサーによる全エクソーム

解析

既知の遺伝子異常を認めない、遺伝性もしくは家族性膵炎の3家系7症例を対象として全エクソーム領域の網羅的解析を行った。具体的には Sure-Select Human All Exon Kit V4 (Agilent 社) を用いて、エクソン領域の DNA 断片のみを濃縮した。シーケンスには illumina 社の HiSeq2000 を用い、リード長 101bp の paired-end reads により解読した。得られたシーケンスデータについて UCSC hg19 を標準ゲノム配列とし novoalign によりマッピングした。マッピング結果から gatk によりバリアントコールを行い、信頼性を評価した上でフィルタリングすることで、変異を絞り込んだ。

2. 次世代シーケンサーによる膵炎関連候補遺伝子の網羅的解析

対象患者は膵炎患者 52 例で、男性 32 例と女性 14 例であった。受診時の平均年齢は 38.0 ± 22.3 歳。成因の内訳は遺伝性が 3 例、家族性が 2 例、特発性慢性膵炎 29 例、特発性急性膵炎 16 例、アルコール性慢性膵炎 1 例、アルコール性急性膵炎が 1 例であった。解析する遺伝子は、既知の膵炎関連遺伝子を含め、多数の膵消化酵素や酵素阻害蛋白を網羅した。また、全エクソーム解析によって抽出した 8 つの候補遺伝子も対象として追加した。解析する対象遺伝子は以下のとおりである。

主要な膵炎関連遺伝子

カチオニックトリプシノーゲン (*PRSS1*)
アニオニックトリプシノーゲン (*PRSS2*)
膵分泌性トリプシンインヒビター
(*SPINK1*)

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*)

キモトリプシン C (*CTRC*)

カルシウム感知受容体 (*CASR*)

カルボキシペプチダーゼ A1 (*CPA1*)

全エクソーム解析による候補遺伝子

膵特異的発現蛋白	2 個
細胞内 Ca 濃度関連蛋白	2 個
ユビキチン-プロテアソームシステム関連蛋白	2 個
ER 関連蛋白	2 個

膵消化酵素	32 個
酵素阻害蛋白	11 個
その他	11 個

各候補遺伝子について、HaloPlex を用いて DNA の目的領域を抽出・濃縮した。すなわちゲノム上の特定領域を 120-mer のロングオリゴ RNA を用いてハイブリダイゼーションし、目的領域を精製し、PCR により増幅した。その後 DNA を 200~300 bp 程度に断片化し、illumina 社の MiSeq により遺伝子配列を決定した。具体的には両端に 2 種類のアダプターを結合。アダプター配列を利用してフローセル上に結合させ、ブリッジ増幅を繰り返して、クラスターを形成させた。1 塩基伸長と蛍光の読み取りステップを繰り返すことにより、フローセル上で並列的な大量のシーケンスを行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析においては、東北大学医学部医学系研究科倫理委員会の承認を得て実施した (承認番号 2011-260)。また患者および家族に対して検査の内容を十分説明し文書による同意を得た上で行った。

C. 研究結果

1. 総リード数 12.3 億リード、1 症例あたり平均 1.7 億リードを読み取った。ターゲット領域の平均 depth は 109~214 と良好であった (表 1)。各症例のエクソン領域にそれぞれ約 25,000 個の variant を認め、そのうち dbSNP135 と 1000 Genomes Project で同定されていない新規の異常は、各例それぞれ約 1,100 個前後であった。このうち非同義変異で、かつ各家系で共通している遺伝子を候補として検出したところ、1,348 個の遺伝子が候補遺伝子として検出された。各候補遺伝子については、その機能、発現部位、変異による疾患の有無などを確認し、最終的に膵消化酵素 1 個 (*CPA1*)、膵に特異的発現を認める候補を 2 個、細胞内カルシウム濃度に関連する候補 2 個、ユビキチンプロテアソーム関連 2 個、ER stress 関連 2 個を同定した。このうち、最も有力な候補と考えられた膵消化酵素 *CPA1* のミスセンス変異は 1 家系 3

表1 マッピング結果

	Family A			Family B		Family C	
	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6	Case 7
Read	194.582.068	167.789.816	280.751.436	159.770.364	142.172.112	150.747.834	139.938.832
mapped read	193.775.944	167.009.649	279.541.521	159.093.798	141.562.928	150.119.839	138.352.897
read w/o duplicate	124.834.691	113.399.055	184.065.099	104.305.507	92.822.218	101.806.428	96.818.065
% read w/o duplicate	64.42	67.90	65.85	65.56	65.57	67.82	69.98
read on target region	84.870.329	76.463.463	123.260.158	70.389.588	62.936.088	69.152.046	65.851.993
Enrichment (%)	67.99	67.43	66.97	67.48	67.80	67.93	68.02
Mean depth	148.04	133.19	214.88	122.57	109.52	120.56	114.91
% target region > =50x	78.93	75.85	85.70	74.05	70.17	73.68	72.44
% target region > =100x	56.70	51.56	70.37	48.10	42.70	47.31	45.24

表2 既知の肺炎関連遺伝子の解析結果

遺伝子名	Exonic Function	AACChange	dbSNP135	遺伝子異常保有者
PRSS1	nonsynonymous SNV	NM_002769: c. G623C: p. G208A	rs 189270875	52人中3人(5.8%)
CFTR	nonsynonymous SNV	NM_000492: c. G3468T: p. L1156F	rs 139729994	52人中7人(13.5%)
CFTR	nonsynonymous SNV	NM_000492: c. C4357T: p. R1453W	rs 4148725	52人中4人(7.7%)
CFTR	nonsynonymous SNV	NM_000492: c. G4056C: p. Q1352H	rs 113857788	52人中5人(9.6%)

症例全てに同定された。本遺伝子は共同研究により新規の肺炎関連遺伝子として報告された。

2. Miseqを用いた遺伝子解析の結果、対象遺伝子のエクソン領域には725個の遺伝子異常や多型を同定した。そのうち同義変異を除いた393個の遺伝子異常や多型を抽出した。疾患の発症に影響度の高い異常は低頻度アレルのものが多くことから、1000 Genomes Projectでアレル頻度が0.25未満のもの203個を選択的に抽出した。さらに read 数不足や読み間違いを除外した結果、候補として133個の遺伝子を抽出した。

主要な肺炎関連遺伝子については、PRSS1のp.G208A多型は52人中3人(5.8%)に同定された(表2)。健常な日本人の遺伝子情報としてHuman Genetic Variation Browser (<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/>) (以下HGVB)のデータを用いると、同遺伝子異常は840人中14人(1.7%)であった。またCFTRのp.R1453W多型は52人中4人(7.7%)、p.Q1352H多型は52人中5人(9.6%)であり、HGVBのデータではそれぞれ1144人中42人(3.7%)と1153人中58人(5.0%)であった。解析患者数が52人と少なく統計学的有意差はなかったが、いずれも健常者よりも高い傾向である

表3 候補ⅢのSNV

病 因	患者数	遺伝子異常保有者(hm)	頻 度	P値(参考値)
全慢性肺炎	n=191	9(1)	4.7%	0.046
アルコール性	n=91	2(0)	2.8%	>0.99
遺伝・家族性	n=26	4(1)	15.4%	0.003
特発性	n=74	3(0)	4.1%	0.23
健常対照者*	n=1113	24(0)	2.2%	—

hm: homozygous

* Human Genetic Variation Browser の本邦健常者のデータ

ことが確認できた。そこで、HGVBのデータと比較し、P値が1.0程度以下である遺伝子異常5つを候補として抽出した。この5つの遺伝子につき、慢性肺炎多数例で検討した結果、候補Ⅲの遺伝子異常は遺伝性・家族性肺炎26例中4例(15.4%)に同定された(表3)。一方、参考データであるが、HGVBによると本邦の健常者では1113人中24人(2.2%)の頻度であった。また候補Ⅴについては特発性慢性肺炎では69人中20人(29.0%)、慢性肺炎全体で188人中45人(23.9%)に同定された。一方、HGVBでは、健常者1169人中206人(17.6%)の頻度であった(表4)。

表4 候補VのSNV

病 因	患者数	遺伝子異常 保有者 (hm)	頻 度	P値 (参考値)
全慢性膵炎	n=188	45(2)	23.9%	0.043
アルコール性	n=94	19(0)	20.2%	0.57
遺伝・家族性	n=25	6(0)	24.0%	0.43
特発性	n=69	20(2)	29.0%	0.02
健常対照者*	n=1169	206(7)	17.6%	—

hm: homozygous

* Human Genetic Variation Browser の本邦健常者のデータ

D. 考察

慢性膵炎は多遺伝子疾患であり、いくつかの疾患関連遺伝子が報告されている。本研究班の重要な課題として、わが国における膵炎関連遺伝子異常の解明と遺伝子異常の効率的なスクリーニング系の確立がある。本研究では、次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析により、新たな膵炎関連遺伝子であるカルボキシペプチダーゼ A1 (CPA1) を同定した。また本邦の慢性膵炎患者において膵炎関連遺伝子異常を網羅的に解析した。

従来のキャピラリーシーケンサーによる遺伝子変異の検出には多大な経費や時間、労力を要する。またマイクロアレイを用いた全ゲノム関連解析 (GWAS) ではアレル頻度の低い遺伝子変異は現在の方法では検出できないという問題がある。次世代シーケンサーによる全エクソーム解析は、これらの問題を打開する有効な解析手法であり、SNP アレイでは検出できなかった稀な変異を同定することが可能と考えられる。問題としては全エクソーム解析で検出された多数の遺伝子異常を、どのような条件でフィルターをかけて絞り込むのが難しいと言える。今回、新規の遺伝子異常で、かつアミノ酸置換を伴うことや、家系別の遺伝様式などからフィルタリングした。さらに抽出された候補遺伝子について、その発現部位や機能、遺伝子変異による既知の疾患の有無などを確認することで、新規の膵炎関連遺伝子 CPA1 の絞り込みが可能であった。

さらに、近年デスクトップ型の新型機種 MiSeq が発売され、シーケンシング時間の短縮と1ランあたりの試薬コストの大幅な削減が

可能となった。本学の遺伝病学分野にも2012年3月から導入され、今回、同機種にて解析を行った。この新型機種の導入により、ランニングコストが抑えられ、多検体の解析が可能となった。実際に Miseq により52例の膵炎症例を解析した結果、多数の候補遺伝子を同時に解析可能であった。また、HGVB のデータと比較し遺伝子異常5つを未知の膵炎関連遺伝子の候補として絞り込むことが可能であった。

E. 結論

膵炎の遺伝学的な診断体系を構築することはわが国の慢性膵炎の病因や病態を理解する上で大変重要である。本研究により膵炎関連遺伝子異常の効率的なスクリーニング系を確立する基礎となるデータがつけられた。

F. 参考文献

- Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet.* 1996; 14: 141-145.
- Witt H, Luck W, Hennies HC, Classen M, Kage A, Lass U, et al. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet;* 2000; 25: 213-216.
- Witt H, Sahin-Tóth M, Landt O, Chen JM, Kähne T, Drenth JP, et al. A degradation-sensitive anionic trypsinogen (PRSS2) variant protects against chronic pancreatitis. *Nat Genet;* 2006; 38: 668-673.
- Rosendahl J, Witt H, Szmola R, Bhatia E, Ozsvári B, Landt O, et al. Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet;* 2008; 40: 78-82.
- Kume K, Masamune A, Takagi Y, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Satoh A, Hirota M, Hamada S, Shimosegawa T. A loss-of-function p.G191R variant in the anionic trypsinogen (PRSS2) gene in Japanese patients with pan-