

小児期発症の希少難治性肝胆膵疾患における医療水準並びに患者 QOL の向上のための調査研究

## 膵炎関連遺伝子の検査体制確立と保険収載後の動向

研究分担者 清水俊明 順天堂大学小児科 教授  
研究分担者 竹山宜典 近畿大学肝胆膵外科 教授  
研究分担者 正宗 淳 東北大学消化器内科 教授  
研究分担者 鈴木光幸 順天堂大学小児科 准教授  
研究協力者 箕輪 圭 順天堂大学小児科 非常勤助教  
研究協力者 中野 聡 順天堂大学小児科 非常勤助教

### 研究要旨

遺伝性膵炎は平成27年1月から小児慢性特定疾病（慢性消化器疾患、大分類：遺伝性膵炎）に、同年7月には成人の指定難病に認定された。小児慢性特定疾病では「対象基準」が、指定難病では「重症度分類」が医療費助成対象者の認定基準として設定されている。遺伝性膵炎の診断基準には、「*PRSSI* 遺伝子のp. R122Hないしp. N29I変異が認められる」ことが1項目として挙げられているが、令和4年3月までは*PRSSI*遺伝子解析は保険適応外であった。遺伝性膵炎患者の実態把握のためには、診断基準に準じ*PRSSI*遺伝子解析を行い、患者数を正確に把握する必要がある。この問題点を解決するために、ISO認証施設において、*PRSSI*および*SPINK1*遺伝子などを含むターゲットシーケンス（パネルシーケンス）実施体制を整え、保険収載に備えた検査受託システムを立ち上げた。令和4年の診療報酬改定での*PRSSI*遺伝子解析が保険収載され、令和4年4月1日から「かずさDNA研究所」で検査受託が開始された。令和4年4月1日から令和5年3月31日までに18件の解析依頼があった。依頼元は臨床遺伝専門医が所属する遺伝科や小児科が大半を占めていた。

本邦における遺伝性膵炎家系の調査では約3割に膵分泌性トリプシンインヒビター（*SPINK1*）遺伝子変異が認められているが、膵炎発症メカニズムには不明な点も多い。遺伝性膵炎の病態解明の1つとして*SPINK1*遺伝子変異による膵炎発症メカニズム解明のため、膵特異的*Spink1*ノックアウトマウスを作成し、膵炎実験モデルとしての実用性を検証した。

### A. 研究目的

遺伝性膵炎(hereditary pancreatitis)は、家系内に慢性膵炎が多発する稀な疾患である。多くは幼少時から腹痛、悪心、嘔吐などの急性膵炎発作を繰り返し、慢性膵炎に進行する。カチオニックトリプシノーゲン（*PRSSI*）遺伝子変異によるトリプシン活性の持続が膵炎の原因となる。本邦における遺伝性膵炎家系の調査では約3割に膵分泌性トリプシンインヒビター（*SPINK1*）遺伝子変異が認められているが、膵炎発症メカニズムには不明な点も多い。

再発性急性膵炎あるいは慢性膵炎（確診及び正確診）症例で、以下の①～④の4項目のうち①を満たす場合、あるいは②、③、④の全てを満たす場合、遺伝性膵炎と診断される。① *PRSSI* 遺伝子のp. R122H ないし p. N29I 変異が認められる。② 世代にかかわらず、膵炎患者2人以上の家族歴がある。③ 少なくとも1人の膵炎患者は、大量飲酒など慢性膵炎の成因と考えられるものが認められない。④ 単一代の場合、少なくとも1人の患者は40歳以下で発症している。遺伝性膵炎患者の実態把握のため

には、診断基準に基づき保険診療で *PRSSI* 遺伝子検査が行える体制が必要である。本研究班の活動の1つとして令和3年度中に ISO 認証施設において、*PRSSI* および *SPINK1* 遺伝子などを含むターゲットシーケンス（パネルシーケンス）検査体制を整え、まずは非保険検査としての検査受託システムを開始した。令和4年度の研究期間中に、本検査が保険診療内で行えるようになったので、その運用実績を報告する。

また、*SPINK1* 遺伝子変異による膵炎発症メカニズム解明のため、膵特異的 *Spink1* ノックアウトマウスを作出したので、膵炎実験モデルとしての実用性を検証した。

## B. 研究方法

血液から回収したゲノム DNA から、*PRSSI* (protease serine 1)、*SPINK1* (*Kazal* type 1)、*CEL* (carboxyl ester lipase)、*CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)、*CPA1* (carboxypeptidase A1)、*CTRC* (chymotrypsin C)、*TRPV6* (transient receptor cation channel subfamily V member 6 gene)、*CLDN2* (claudin-2)、*CTRB1/CTRB2* (chymotrypsin B1 and B2)、*PNLIP* (pancreatic lipase) 遺伝子のたんぱく質コード領域エクソンとそのイントロン境界部分をハイブリダイゼーションあるいは酵素的増量法 (polymerase chain reaction 法) により濃縮し、次世代シーケンサー（ターゲットシーケンス）による遺伝子配列決定を行い、検査対象遺伝子のたんぱく質コード領域におけるシーケンシングで検出可能な低出現頻度の塩基配列変化の有無を検出した。令和5年度の検査依頼数の集計とその結果を解析した。

膵特異的 *Spink1* ノックアウトマウスは *Pdx-1-Cre* マウスと *Spink1* flox/flox マウス (*Spink1* 遺伝子の exon2, 3 をはさむように loxP 配列を挿入：兵庫医科大学より供与) の交配により作成した。生後90日の時点で犠牲死させ、膵組織像を評価した。

## C. 研究結果

令和4年4月1日に本遺伝子検査は保険収載さ

れ、遺伝カウンセリングが可能な地方厚生局(支)局長に届け出た特定の保険医療機関で実施が可能となった(資料1)。令和4年度内に全国の医療機関から計18件(遺伝科12件、小児科6件)の検査依頼があったが、*PRSSI* または *SPINK1* 遺伝子に既知の変異を認めた例はなかった。

膵特異的 *Spink1* ノックアウトマウスは *Spink1* flox/flox マウスに比べ明らかな体重減少を示さなかったが、生後90日頃までに死亡した。膵組織では腺房細胞の脱落と線維化をみとめ、高倍率視野における腺房細胞領域が有意に減少しており、慢性膵炎の病態に類似すると考えられた。

## D. 考察

今回作成した膵炎関連遺伝子解析パネルでは、10種類の遺伝子変異解析が可能であるが、*PRSSI* と *SPINK1* 遺伝子のみで遺伝情報を取得している。*PRSSI* 遺伝子変異の報告を基本とし、補助診断遺伝子として *SPINK1* 遺伝子解析結果も同時に報告している。遺伝性膵炎における炎症の反復が将来的な糖尿病や膵癌のリスクファクターであることも考慮すると、これらの遺伝子検査が保険診療内で速やかに膵炎の原因が明らかになることで、小児期から膵炎発作予防のための栄養管理や内服治療を積極的に行う意義は大きい。また、医療者サイドの治療方針の決定、および患児および家族の治療継続のための動機付けにも遺伝子診断の有用性は高いと考えられた。

膵特異的 *Spink1* ノックアウトマウスは膵腺房細胞の脱落と線維化を来す膵炎モデルとして利用可能であった。生後90日まで生存する疾患モデル動物として、各種薬剤投与による治療効果の評価などへ応用可能と考えられた。

## E. 結論

令和4年の診療報酬改定で遺伝子検査が保険収載され、ISO 認証施設である「かずさ DNA 研究所」で *PRSSI* 遺伝子、および補助診断遺伝子として *SPINK1* 遺伝子検査が可能となった。新たな膵炎モデルマウスとして、膵特異的 *Spink1* ノックアウト

マウスを樹立した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 箕輪圭, 鈴木光幸, 清水俊明. 血液・腫瘍疾患治療中の症状とその対応 14.急性膵炎. 小児科診療 85: 857-62, 2022
- 2) 齋藤暢知, 鈴木光幸, 清水俊明. 小児急性膵炎の特徴. 消化器・肝臓内科 12: 469-475, 2022
- 3) 中野聡, 平井沙依子, 鈴木光幸. 特集 I 早期慢性膵炎、慢性膵炎をめぐる諸問題 小児慢性膵炎の特徴と遺伝子異常. 消化器・肝臓内科 12: 384-391, 2022

### 2. 著書

- 1) 鈴木光幸. 原因不明の反復性膵炎に対する内視鏡的逆行性胆道膵管造影 (ERCP) 検査は必要か? 小児科診療 Controversy. 中外医学社. 東京. p00-00.

### 3. 学会発表

- 1) Saeko Hirai, Mitsuyoshi Suzuki, Yumiko Sakurai, Satoshi Nakano, Kei Minowa, Toshiaki Shimizu. Co-existence of *TRPV6* variants with other pancreatitis-associated genes affects early-onset chronic pancreatitis 2022.6.22-25 ESPGHAN 54<sup>th</sup> Annual Meeting (Copenhagen, Denmark).
- 2) 平井沙依子, 鈴木光幸, 櫻井由美子, 中野 聡, 齋藤暢知, 箕輪 圭, 清水俊明. TRPV6 バリエーションと他の膵炎関連遺伝子の共存が小児期反復性・慢性膵炎の発症に関与する. 2022.9.30-10.2 第 49 回日本小児栄養消化器肝臓学会(東京)
- 3) 佐々木 滉, 菊田 和宏, 正宗 淳. Association of pancreatitis-related genetic abnormalities with the clinical features of pancreatitis 2022 年 4 月 23 日 第 108 回 日本消化器病学会総会(東京)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし