

3回目の治療 (治療既往が1回および2回の場合は14頁まで記入不要です.)

治療時期 年 月 日

この治療は先生の所属している医療機関で行われましたか. はい ・ いいえ

治療を行った医療機関: _____ ←

治療前の腎機能

正常 ・ 血清クレアチニン値異常 ・ 透析 ・ 不明

→ おわかりになれば, 血清クレアチニン値 _____ mg/dl

治療適応となった症状

・ 自覚的症状が主であり, 他覚的所見が乏しい症状. (複数選択可)

腹部膨満 ・ 腹痛 ・ 呼吸困難 ・ 食欲不振 ・ 運動制限
その他 (_____)

・ 治療前の Performance Status

- PS 0 (発病前と同じ日常生活が制限なく行える)
- PS 1 (激しい活動は制限されるが, 軽い家事や事務作業は行える)
- PS 2 (歩行や身の回りのことはできるが作業はできない. 日中の50%以上は起居)
- PS 3 (限られた身の回りのことしかできない. 日中の50%以上は就床)
- PS 4 (身の回りのことが全くできない, 終日就床)
- 不明

・ 他覚的所見を伴う病態 (複数選択可)

栄養障害 ・ 嚢胞内出血 ・ 嚢胞内感染 ・ 閉塞性黄疸
 嚢胞破裂 ・ 腹水 ・ 食道静脈瘤 ・ 下大静脈圧迫
 肝障害 ・ 肝不全 ・ その他 (_____)

↓ ↓
おわかりになれば, 血清 Bil 値 _____ mg/dl, PT% _____ %

治療方法 (同時期に複数の治療が行われた場合, 複数選択可)

嚢胞内容穿刺吸引 ・ 嚢胞開窓 ・ 肝切除 ・ 肝移植 ・ 肝動脈塞栓
その他 (_____)

この後に治療内容の詳細についての質問がありますので、前項で選択された治療についてご記入をお願いします。その後、治療経過・合併症と治療効果についてご回答下さい。

(a) 嚢胞内容穿刺吸引

治療嚢胞数 ・ ・ ・ ・ ・

治療嚢胞の最大径 ・ ・ ・ ・

嚢胞内へ注入した薬剤

・ ・
 ・ ・ ・

同一嚢胞に対して同時期 (2ヶ月程度の間) に何回治療を行いましたか。

・ ・ ・ ・

(b) 嚢胞開窓術

手術方法 ・ ・ ・

開窓した嚢胞数 ・ ・ ・ ・ ・

手術時間 分 出血量 ml

術後在院日数 日 在院死亡 ・

(c) 肝切除術

術式名

手術時間 分 出血量 ml 摘出肝重量 g

術後在院日数 日 在院死亡 ・

切除後残肝機能および残肝容積の術前評価方法について記載して下さい。
(例：ICGが正常であるため、右葉切除は可能と判断した。)

ったもの、ドレーン留置のない場合は、穿刺排液を必要としたもの。

*2 肝不全：治療後 5 日目に降にプロトロンビン活性が 50%以下、あるいは血清ビリルビン値が 3mg/dl 以上。

合併症ありの場合、その処置について以下に該当する項目があれば選択して下さい。（複数選択可）

該当項目なし

輸血 ・ 経皮的穿刺ドレナージ* ・ 創の再縫合 ・ 集中治療室管理

開腹手術 ・ 人工呼吸器管理 ・ 透析（血液浄化療法を含む）

局所麻酔下の治療 ・ 全身麻酔下の治療 ・ 不明

*経皮的穿刺ドレナージ：腹水、胆汁漏、膿瘍、胸水などの治療

合併症についてコメントがありましたらお願いします。

▶治療効果について

治療効果はありましたか。（先生の印象で結構です）

有 ・ 無 ・ 不明

→ 『有』の場合：効果継続期間 _____ 年 _____ ヶ月間

現在も効果継続中であれば右枠にチェックをお願いします。

治療効果判定に客観的な指標（PS、嚢胞の大きさ、腹囲など）を用いておられましたら、指標とされている項目ならびに治療前後の指標の変化をご記入下さい。

追加事項, ご意見など.. PCLD@md.tsukuba.ac.jp へもどうぞ

多発性肝嚢胞症の病型

I 型

嚢胞数は 10 個程度で，肝内の分布は比較的限局しており，2 区域以上の正常肝容積がある．10cm 以上の大型嚢胞がある．



16

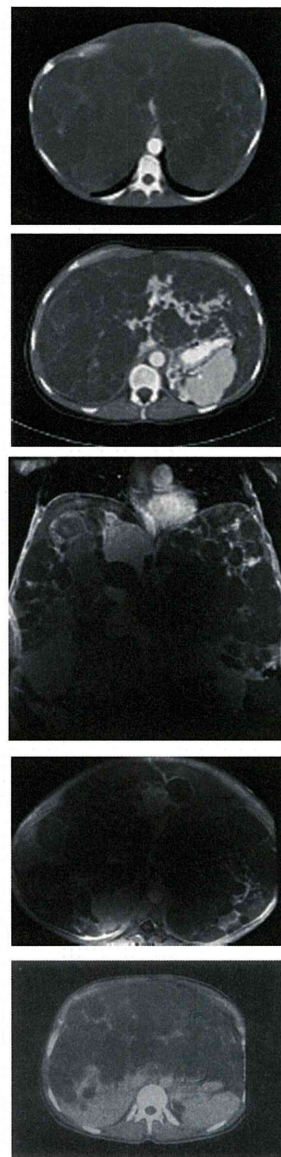
II 型

小型～大型の嚢胞が肝内にびまん性に分布し，正常肝容積が 1 区域以上残存している．



III 型

小型～大型の嚢胞が肝内にびまん性に分布し，正常肝容積が 1 区域より少ない．



参考文献 *Hepatology* 2010;52:2223
Ann Surg 2009;250:112
Ann Surg 1997;225:286

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
「多発肝のう胞症に対する治療ガイドライン作成と試料バンクの構築」
分担研究報告書

多発肝のう胞症試料バンクの構築と収集試料の品質解析に関する研究

研究分担者 野口 雅之 筑波大学 医学医療系 診断病理 教授
研究協力者 加野 准子 筑波大学 医学医療系 診断病理 講師

研究要旨

前年度の当該事業において難治性良性肝疾患である多発肝のう胞症（Polycystic Liver Disease；PLD）を対象に，病因解明や効果的な治療法を確立するための調査や研究を効率よく積極的に行うことができるように患者の臨床情報や手術検体などの試料（組織）を収集する PLD 試料バンクを構築した．全国の肝疾患を専門とする医療施設の中で PLD の切除もしくは移植を行った 4 施設より 12 症例の試料を収集・保存することができた．

当該事業で実施した PLD 患者の実態調査をもとに，治療の有無や治療法についての詳細を検証して肝切除などの治療を実施した医療施設に対して PLD 試料のバンキングへの協力を依頼した．これまでの 12 症例の試料に加えて，のう胞内溶液やホルマリン固定組織などを含む試料を追加して収集・保存した．収集した試料より DNA を抽出して，Polymerase Chain reaction（PCR）等の分子生物学的解析に使用することができるか否かを検証した．試料は複数の医療施設から収集したものであり，組織の採取から標本作製までの過程は施設により異なる．しかし，収量に差はあったものの，何れの試料からも PCR に十分な量の DNA を抽出することができた．抽出した DNA を鋳型として，ハウスキーピング遺伝子である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）遺伝子のプライマーを用いた PCR を施行したところ，全ての症例で増幅が確認され，解析材料として利用できる可能性が高いことが明らかになった．

A. 研究目的

PLD は難治性良性肝疾患であり，のう胞の増加や巨大化のために圧迫症状や腹囲の増大が生じ，長期にわたって生活に支障をきたすため，時として肝移植を必要とする．国内外における報告は症例報告が数編あるのみであり，本疾患についての病態の詳細は明らかになっておらず，有効な治療法も確立していない．PLD の実態を把握して治療方針を定めるためにも患者基本情報や治療のために採取した組織や血液等を利用して研究を進める必要がある．しかし，まれな疾患であるために研究や調査のために十分な数の試料（組織，血液等）や情報の入手が困難である．そこで，平成 22 年度難治性疾患克服研究事業において，PLD の情報・組織バンクを構築することを目的として，全国の医療機関を対象にしたアンケート調査と既

存組織の収集を行った。国内 4 施設の医療機関において、12 症例の PLD 既存組織があることが分かり、これらの施設より組織提供及び研究協力への承諾を得た。筑波大学で手術検体の収集・管理を行っているつくばヒト組織バイオバンクのシステムを活用して構築した PLD 試料バンクで協力施設から提供された PLD 組織をバンキングした。今年度は、PLD 患者の血液やのう胞液等も収集して試料数を増やすとともに収集した試料や情報を利用して、組織形態を分類する病理学的な解析、発現遺伝子の特徴を調べる分子生物学的な解析を行うことを目的とした。

B. 研究方法

本研究は、PLD の診断・治療に必要な研究を効率的に進めることができるように血液やのう胞液も含めた PLD 試料の収集とその品質の解析を行い、PLD 試料バンクの充実を図った。

1. 試料の収集

1) PLD 試料の収集

平成 22 年度に行った PLD 患者数調査（一次調査）の結果に基づき、現在患者を診ている 164 施設に対して治療法や経過等の詳細を把握するための二次調査を行った。調査結果より、PLD 既存試料を保管している医療施設に試料提供の協力を依頼した。

2) 肝のう胞試料の収集

PLD 試料に対するコントロール試料として、単発性の肝のう胞試料を収集した。2000 年から 2010 年までの間に筑波大学附属病院において病理解剖を行った症例の中で肝のう胞と診断された 13 症例のホルマリン固定パラフィン包埋薄切切片を収集した。

2. 試料の品質解析

1) DNA の抽出

収集したホルマリン固定パラフィン包埋薄切切片より DNA アイソレーター PS キット（和光純薬 #295-52401）を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA の濃度を NanoVue Plus（GE Healthcare）で定量した。

2) PCR の施行

抽出した DNA を鋳型として GAPDH 遺伝子の PCR を施行した。DNA は 20ng～250ng を使用した。PCR primer は Table 1 に示した。鋳型 DNA に対して Forward primer 0.2 μ M, Reverse primer 0.2 μ M, dNTPs 0.2mM, Takara Ex Taq 1.25U の割合で混合し、(90 $^{\circ}$ C 30sec) 1 cycle, (95 $^{\circ}$ C 5sec, 60 $^{\circ}$ C 31sec) 40 cycles の条件で増幅した。

（倫理面への配慮）

試料の研究利用に対して同意が得られた既存試料を連結不可能匿名化して、収集・管理した。研究用に試料を収集・管理することに関しては、既に筑波大学内の倫理委員会において承認を得た。本研究の遂行においては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平

成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) を遵守した。

C. 研究結果

1. 試料の収集

1) PLD 試料の収集

これまでに PLD の治療を行い、既存試料が保管されている 7 施設より 18 症例 (22 検体) の試料を収集した。そのうち 16 検体はホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 薄切切片であり、2 検体はのう胞液、1 検体は血液であった (Table 2)。

PLD-1 から PLD-16 までの症例は、過去に治療を行った手術症例の既存試料であり、病理診断に使用された標本の残余試料であった。PLD-1 (検体 A-1) と PLD-15,16 (検体 E-1) は肝切除、それ以外の症例は肝移植を行った症例であった。PLD-17 から PLD-19 は、最近治療を行った症例であり、治療前に患者に試料の研究利用について同意を得て穿刺吸引で回収したのう胞液と血液検査の残りの血液を収集することができた。

収集した PLD 試料においてもこれまでに報告されているように女性患者の割合が多かった。

2) 単発性肝のう胞試料の収集

2000 年から 2010 年までの間に筑波大学附属病院において病理解剖を行った症例の中で肝のう胞と診断された 13 症例のホルマリン固定パラフィン包埋薄切切片を収集した (Table 3)。主診断は症例によって異なるが、全ての症例において肝のう胞を含む肝組織を試料として収集した。LC-2 及び LC-3 は同一症例であった。

2. 試料の品質解析

1) DNA の抽出

PLD 試料及び単発性肝のう胞試料から抽出した DNA の収量を Table 4 に示した。

PLD 試料は協力施設より、ホルマリン固定パラフィン包埋薄切切片の状態を送付された。PLD-3 及び PLD-5 は 5 μm それ以外の試料は 2 μm の厚さで薄切されていた。1 枚の切片から抽出した DNA の収量を Table 4 に示した。症例により多少違いがあるが、切片 1 枚あたりの体積は約 0.15 mm^3 であった。DNA の収量も症例によってそれぞれ異なり、施設間によっても差があった。肝のう胞試料は病理解剖症例であったが、PCR の施行に十分量の DNA を得ることができた。

2) PCR の施行

病理解剖症例の単発性肝のう胞組織より抽出した DNA を鋳型として GAPDH 遺伝子の PCR を施行した結果を Figure 1 に示した。増幅長の 110bp 付近にバンドが確認された。この他の症例についても同様にバンドが確認できた。

D. 考察

今年度は PLD 試料バンクで保存する試料数を増やすとともに試料を利用した研究を遂行

することを目的とした。

PLD 患者の詳細を把握するために行った二次調査の結果、各施設で行われた治療法が明らかになり、これまでに PLD 試料の提供を受けた協力施設以外にも既存試料を保管している施設が存在することが分かった。これらの施設に試料提供の協力を依頼したところ、あらたに 3 施設より 6 症例の試料をバンキングすることができた。収集した試料は 2 症例を除いて全てホルマリン固定パラフィン包埋薄切切片であったため、Hematoxylin Eosin (HE) 染色や免疫組織化学染色を用いた解析には適しているが、遺伝子解析等の分子生物学的解析には必ずしも適していない。そこで、収集した試料から遺伝子解析に必要な DNA を抽出することができるか否かを検証した。協力施設から提供された PLD 試料及びコントロールとして使用した病理解剖症例の単発性肝のう胞試料のいずれからも 2 μ m 厚の薄切切片 1 枚から 200ng ~5 μ g の DNA を抽出することができた。収量に差が生じている原因として、PLD 試料は多施設より収集したものであり、組織の固定時間等の標本作製の過程が異なることが考えられた。単発性肝のう胞試料は病理解剖症例であったため、組織を採取するまでの時間や組織が固定されるまでの状態が症例により異なるため、得られた DNA 量にも差があったと考えられた。また、のう胞液からも大量の DNA を抽出することができた。のう胞液の細胞診標本からはあまり多くの細胞は確認できなかったが、血液検体用の DNA 抽出キットを用いて抽出を行ったところ、遺伝子解析に十分量の DNA を抽出することができた。これより、のう胞液も分子生物学的研究に有効に利用できることがわかった。PLD の治療は穿刺吸引が最も多く行われているため、のう胞液をバンキングすることでより多くの症例を研究対象として結果を検証することができる。次年度ものう胞液のバンキングを継続して行うことで、PLD の治療ガイドライン作成のための基盤研究を推進することが可能になった。

次に抽出した DNA について、PCR に使用できる品質が保たれているかを調べた。ホルマリン固定材料から抽出した DNA は断片化が進んでおり、PCR による増幅ができない場合がある。そこで、抽出した DNA を用いてハウスキーピング遺伝子 (GAPDH) の PCR を実施した。バンキングした全ての症例で GAPDH 遺伝子の PCR が可能であった。これより、ホルマリン固定試料から抽出した DNA であっても、今回施行した 110bp 程度の増幅長の PCR は可能であることが示唆された。今後、収集した試料を利用して PLD 関連遺伝子の解析を行う場合も primer 設計や増幅長を工夫することで遺伝子の全長をカバーした解析が可能であると考えられた。

E. 結論

- 1) PLD 試料バンクにおいて、全国 7 施設の医療機関より血液やのう胞液を含む 22 検体の試料を収集することができ、ある程度まとまった数の試料を確保できた。
- 2) 収集したホルマリン固定試料やのう胞液から遺伝子解析に十分な量の DNA を抽出することができた。
- 3) 薄切切片 1 枚から抽出された DNA 量は切片の大きさとは必ずしも相関せず、提供施設によって異なる事が判明した。
- 4) 収集したホルマリン固定試料から抽出した DNA を用いて PCR の施行が可能であった。

5) のう胞液も研究試料として有効活用できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
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
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Table 1 GAPDH 遺伝子に対する primer pair

Forward primer	5' AACTGTTTTTCAGGCCTGCTC 3'	Amplicon 110 bp
Reverse primer	5' CAAGCTCCTTGATTCCATCC 3'	

収集した試料より抽出した DNA を用いて PCR を施行できるか否かを検証するためにハウスキーピング遺伝子である GAPDH 遺伝子に対する PCR primer を設計した。

Table 2 PLD 試料バンクで保存している試料

試料 No.	検体 No.	施設	性別	試料状態
PLD-1	A-1	A	女	FFPE 切片
PLD-2	A-2	A	女	FFPE 切片
PLD-3	B-1	B	女	FFPE 切片
PLD-4	B-1	B	女	FFPE 切片
PLD-5	B-2	B	男	FFPE 切片
PLD-6	B-2	B	男	FFPE 切片
PLD-7	C-1	C	男	FFPE 切片
PLD-8	C-2	C	女	FFPE 切片
PLD-9	C-3	C	女	FFPE 切片
PLD-10	C-4	C	女	FFPE 切片
PLD-11	C-5	C	女	FFPE 切片
PLD-12	C-6	C	女	FFPE 切片
PLD-13	C-7	C	女	FFPE 切片
PLD-14	D-1	D	女	FFPE 切片
PLD-15	E-1	E	女	FFPE 切片
PLD-16	E-1	E	女	FFPE 切片
PLD-17	F-1	F	女	のう胞液
PLD-18	F-2	F	男	のう胞液
PLD-19	F-2	F	男	血液
PLD-20	G-1	G	女	FFPE 切片
PLD-21	G-2	G	男	FFPE 切片
PLD-22	G-3	G	女	FFPE 切片

既存試料が保管されている 7 施設より 18 症例 (22 検体) の試料を収集した。多くの試料がホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin Fixed Paraffin Embedded: FFPE) 切片であった。

Table 3 コントロール試料として収集した単発性肝のう胞試料

試料 No.	主診断	性別	試料状態
LC-1	肝不全	男	FFPE 切片
LC-2	子宮頸癌	女	FFPE 切片
LC-3	子宮頸癌	女	FFPE 切片
LC-4	三重癌（膀胱癌、前立腺癌、肺癌）	男	FFPE 切片
LC-5	混合性結合組織病	女	FFPE 切片
LC-6	間質性肺炎	女	FFPE 切片
LC-7	多重癌	女	FFPE 切片
LC-8	胎児水頭症	女	FFPE 切片
LC-9	肺癌	女	FFPE 切片
LC-10	悪性リンパ腫	女	FFPE 切片
LC-11	ALS	女	FFPE 切片
LC-12	肺炎	男	FFPE 切片
LC-13	重複悪性腫瘍	男	FFPE 切片

PLD 試料に対するコントロール試料として、病理解剖症例より単発性の肝のう胞試料を収集した。

Table 4 収集した試料から抽出した DNA の収量

a. PLD 試料から抽出した DNA の収量

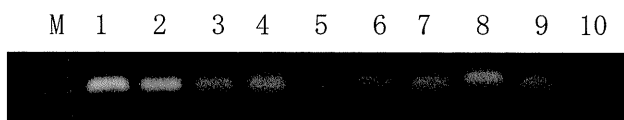
試料 No.	抽出した DNA 量 (μg)
PLD-1	0.198
PLD-2	2.30
PLD-3	0.336
PLD-5	0.282
PLD-7	1.64
PLD-8	5.84
PLD-9	2.61
PLD-10	3.68
PLD-11	0.945
PLD-12	2.64
PLD-13	2.20
PLD-14	3.19
PLD-16	32.9

b. 単発性肝のう胞試料から抽出した DNA の収量

試料 No.	抽出した DNA 量 (μg)
LC-1	1.37
LC-2	0.900
LC-3	0.870
LC-4	0.900
LC-5	0.870
LC-6	1.23
LC-7	3.60
LC-8	4.19
LC-9	2.87
LC-10	0.930
LC-11	0.705
LC-12	0.381
LC-13	0.645

2 μm 厚 (PLD-3 及び PLD-5 は 5 μm 厚) の薄切切片 1 枚の切片及びのう胞液 10ml から抽出した DNA の収量を示した。

Figure 1 抽出した DNA を用いた GAPDH 遺伝子の PCR



M: DNA size maker

1, 2: A549 cell line DNA (positive control)

3: LC-1 45ng

4: LC-8 139ng

5: LC-13 21ng

6: LC-5 29ng

7: LC-11 95ng

8: LC-9 29ng

9: LC-3 29ng

10: DNA free(negative control)

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
「多発肝のう胞症に対する治療ガイドライン作成と試料バンクの構築」
分担研究報告書

多発肝のう胞症試料バンクにバンキングした試料を用いた遺伝子変異解析

研究分担者	竹内 朋代	筑波大学 医学医療系 診断病理 助教
研究協力者	坂下 信悟	筑波大学 医学医療系 診断病理 講師
研究協力者	李 冬平	筑波大学 医学医療系 診断病理 研究員
研究協力者	島田 康子	筑波大学 医学医療系 診断病理 研究員

研究要旨

多発肝のう胞症（Polycystic Liver Disease ; PLD）の病態を把握して治療ガイドラインを作成するために PLD 試料バンクで収集した試料を利用して，PLD との関連が示唆されている遺伝子の変異解析を行った．PLD の発症例の多くは常染色体優性遺伝によるもので，その半数が多発性嚢胞腎（PKD）に合併している．近年，腎病変を伴わない PLD の原因遺伝子として protein kinase C substrate 80K-H（PRKCSH）と SEC63 が同定され，オランダやフィンランドの PLD 患者の家系で複数の遺伝子変異が報告されている．本邦の症例においても同様に遺伝子変異が認められるか調べた．まず，PLD 試料バンクで収集したホルマリン固定パラフィン包埋薄切切片から DNA の抽出及び GAPDH 遺伝子の PCR が施行できることを確認した．次に既知文献を参考に PRKCSH 遺伝子の Open Reading Frame（ORF）の全長をカバーするプライマーセットを設計して，抽出した DNA について PCR を施行した．解析に使用した PLD 試料は複数の医療施設から収集したものであり，PCR による増幅が認められない試料もあった．PCR プライマーを再設計して検証したところ，全長が 200bp 程度であればホルマリン固定試料から抽出した DNA においても PCR の施行が可能であることが分かった．ORF が 6500bp の sec63 遺伝子についても増幅長が 200bp 程度になるようにプライマーペアの設計を行った．

A. 研究目的

PLD は希少な疾患で病態の詳細はわかっておらず，国内外における報告は症例報告が数編のみである．近年，PLD の原因遺伝子として PRKCSH と sec63 が同定された．オランダ，フィンランド及び北アメリカの PLD 患者の家系で複数の遺伝子変異が報告されたが，変異の種類は人種によって様々であった．国内においては，PRKCSH 並びに sec63 遺伝子の変異解析を含めて PLD 患者の試料を使った遺伝子解析の報告はなされていない．本研究は，前年度の難治性疾患克服研究事業で構築した PLD 試料バンクに集積した組織を活用して，日本の PLD 患者における PRKCSH 遺伝子及び sec63 遺伝子の変異を解析することを目的とした．

B. 研究方法

1. PRKCSH 遺伝子の変異を解析するためのプライマー設計

海外における遺伝子変異解析の文献を参考にして、プライマー設計ソフトを使って PRKCSH 遺伝子の ORF の全長をカバーするプライマーを設計、作製した (Table 1, 2).

2. sec63 遺伝子の変異を解析するためのプライマー設計

海外における遺伝子変異解析の文献を参考にして、プライマー設計ソフトを使って sec63 遺伝子の ORF の全長をカバーするプライマーを設計、作製した (Table 3, 4).

3. PCR の施行

作製した PLD 関連遺伝子のプライマーを用いて、PLD 試料バンクで保存している試料から抽出した DNA の PCR を行った.

4. DNA シークエンスにおける変異解析

PRKCSH 遺伝子のプライマーを用いた PCR で明瞭なバンドが確認できた 2 症例を選びダイレクトシークエンスを行った. (症例: PLD1 及び PLD10, プライマー: エクソン 7) PCR 産物を精製して、ダイレクトシークエンスを行った. 解析は、株式会社バイオマトリックス研究所の受託 DNA シークエンスサービスを利用した. 塩基配列のホモロジー検索には DNADynamo を使用した.

C. 研究結果

1. PRKCSH 遺伝子の変異を解析するためのプライマー設計

PRKCSH 遺伝子の遺伝子座は 19p13.2 であり、ORF は 1581bp である. Glucosidase II β subunit をコードして、タンパクは protein kinase C の基質として知られている酸性リンタンパクであることがわかっている. 18 のエクソンを持ち、エクソン 6 及び 7 の変異が多く報告されていた (Figure 1). 既知文献を参考にしてエクソン 1 から 17 にかかる ORF の全長をカバーできるプライマーを設計した. ホルマリン固定試料から抽出した DNA を使用することを考慮して各プライマーペアの増幅長が 200bp 程度になるようにした.

2. sec63 遺伝子の変異を解析するためのプライマー設計

sec63 遺伝子の遺伝子座は 6q21 であり、ORF は 6500bp である. sec61 及び sec62 と複合体を形成して、小胞体のタンパク移行装置として働くことが知られている. 21 のエクソンを持ち、エクソン 8 及び 17 の変異が多く報告されていた (Figure 2). 既知文献を参考にしてエクソン 1 から 21 にかかる ORF の全長をカバーできるプライマーを設計した. ホルマリン固定試料から抽出した DNA を使用することを考慮して各プライマーペアの増幅長が 200bp 程度になるようにした.

3. PCR の施行

作製した PRKCSH 遺伝子のプライマーを用いて、PLD 試料バンクで保存している試料から抽出した DNA の PCR を行った。エクソン 5 (154bp), エクソン 7 (187bp) 及びエクソン 11 (161bp) のプライマーを用いた PCR は試料 (症例) の種類に関わらず、施行した試料のほぼ全てで増幅が確認できた。エクソン 2 (223bp), エクソン 3 (216bp) 及びエクソン 4 (229bp) は PCR 産物の一部を用いて second PCR を行うことで、一度の PCR では増幅が認められない症例においても増幅を確認することができた。一方、エクソン 9 (153bp), エクソン 10 (155bp), エクソン 12 (208bp), エクソン 13 (190bp) は多くの症例で増幅が確認できなかった。症例別に PCR 効率を比較すると、PLD1 (70.6%, 12/17), PLD2 (76.5%, 13/17), PLD10 (70.6%, 12/17) 及び PLD14 (82.4%, 14/17) の効率が高かった。プライマーの種類や症例 (試料) の種類により、PCR の効率に差があることがわかった (Table 5, Figure 3)。

4. DNA シークエンスにおける変異解析

PRKCSH 遺伝子のプライマーを用いた PCR で明瞭なバンドが確認できた PLD1 及び PLD10 について PCR 産物を精製して、ダイレクトシークエンスを行った。Forward と Reverse の両方のプライマーを用いてシークエンスを行うことで、増幅長全ての塩基配列を読むことができた。野生型 PRKCSH との相同性を検証したところ、変異は認められなかった (Figure 4, 5)。

D. 考察

PLD は希少性の高い難治性良性肝疾患であり、腹部膨満のために肝移植を行う症例も報告されている。病態については、女性に多い疾患であること、多発性嚢胞腎に合併してみられることが多いということが分かっている以外に、詳細は不明である。本研究では、最終的には治療ガイドラインを作成することを目標として、前年度までにバンキングした組織の遺伝子変異解析を行った。腎病変を伴わない PLD の原因遺伝子として PRKCSH 及び SEC63 遺伝子が同定された。変異の種類は人種によって様々で、家族歴のある患者の PRKCSH の変異は 20.7%, sec63 の変異は 5.7%報告されていた。

まず、それぞれの遺伝子に対する PCR プライマーを設計、作製した。これまでに報告されている変異は複数の箇所にわたり、頻度もまちまちであったため、遺伝子の ORF の全長をカバーできるようにエクソンごとにプライマーセットを設計した。PCR に用いる DNA はホルマリン固定試料より抽出したサンプルになるため、DNA の断片化が進んでいることも考えられた。そこで、増幅される PCR 産物の全長が 200bp 程度になるようにした。

PRKCSH 遺伝子のプライマーを用いて PCR を行った結果、エクソン 5 (154bp), エクソン 7 (187bp) 及びエクソン 11 (161bp) では多くの症例で明瞭な増幅バンドが認められ、プライマーの設計や PCR の条件が至適であることが想定された。今回設計したプライマーの中で 200bp 以上の PCR 産物が増幅されるエクソン 2 (223bp), エクソン 3 (216bp) 及びエク

ソン 4 (229bp) は一度の PCR ではバンドが確認できなかったが、PCR 産物の一部を用いて second PCR を行うことで、増幅を確認することができた。これより、PCR 産物が 200bp 以上になる場合には second PCR が有効であることが示唆された。一方でエクソン 9 (153bp)、エクソン 10 (155bp)、エクソン 12 (208bp)、エクソン 13 (190bp) は多くの症例で増幅が確認できなかった。このように場所によって PCR 効率の悪いプライマーもあり、これらはプライマーを再設計して検証する必要があると考えられた。症例別に PCR 効率を比較すると、PLD1 (70.6%, 12/17)、PLD2 (76.5%, 13/17)、PLD10 (70.6%, 12/17) 及び PLD14 (82.4%, 14/17) はエクソンの場所に関わらず、PCR の効率が高かった。今回使用した症例は、多施設から提供を受けて保管した検体であるため、手術で検体が摘出されてからホルマリン固定標本が作製されるまでの過程が施設間で異なることが考えられた。従って、標本から抽出した DNA の質も症例によって差が生じたと考えられた。症例によって PCR 効率に違いもあり、これは多施設から症例を収集している試料バンクの性質によるものであると考察された。PRKCSH 遺伝子について概ね PCR の至適条件が決定できたので、PCR 産物を用いたダイレクトシーケンスが可能であるか検証した。PCR で明瞭なバンドが確認できた PLD1 及び PLD10 について PCR 産物を精製して、ダイレクトシーケンスを行った。片側のプライマーのみで行った場合、全長が解読できていない箇所もあった。しかし、Forward と Reverse の両方のプライマーを用いてシーケンスを行うことで、増幅長全ての塩基配列を読むことができた。今後、正確な塩基配列を特定して変異の有無を調べるためには、両方のプライマーを使用する必要があることがわかった。今回、シーケンスを行った 2 症例からは PRKCSH 遺伝子のエクソン 7 における変異は認められなかった。これまでに報告されている変異の頻度を考慮するとさらに多くの症例を調べる必要があると考えられた。

sec63 遺伝子についても同様に ORF 全長をカバーするプライマーを各エクソンに対して設計した。現時点では、PCR の施行を行っていないが、PRKCSH 遺伝子の解析と同様に PCR を行い増幅が認められないものについては second PCR の施行やプライマーの再設計等の工夫をして最終的には変異の有無を検証する予定である。

今年度の研究において PLD 試料バンクで保管している試料を利用して、DNA 抽出、PCR 及びダイレクトシーケンスが可能であることが確認できたので、次年度以降も引き続き解析を行い変異の有無を調べる予定である。

E. 結論

- 1) PLD 関連遺伝子の PRKCSH 及び sec63 について ORF の全長をカバーする PCR プライマーを作製した。
- 2) PRKCSH 遺伝子に対する PCR の至適条件を決定することができた。
- 3) PRKCSH 遺伝子の PCR において増幅する場所や症例により PCR 効率が異なることが分かった。
- 4) ダイレクトシーケンスを行った 2 症例について PRKCSH 遺伝子のエクソン 7 に変異は認められなかった。

5) PLD 試料バンクで保管している試料を利用して、DNA 抽出、PCR 及びダイレクトシーケンスが可能であることが確認できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし