

5. Exome Variant Server ESP5400 (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>)に登録されていない変異
6. In-house control exome (n=253) に認められない変異

2 症例以上で共通してバリエントが認められた遺伝子を抽出し、優先順位のたかいものから Sanger 法による確認を行った。家族構成員の検体の得られた家系に関しては、表現型との segregation を検証した。

C. 研究結果

2 症例以上に共通してバリエントが認められた遺伝子の個数は合計 505 遺伝子であった。(下記は内訳)

- 12 症例共通 : 1 遺伝子
- 8 症例共通 : 1 遺伝子
- 7 症例共通 : 1 遺伝子
- 6 症例共通 : 2 遺伝子
- 5 症例共通 : 7 遺伝子
- 4 症例共通 : 26 遺伝子
- 3 症例共通 : 74 遺伝子
- 2 症例共通 : 393 遺伝子

さらにこれらのバリエントの内、まず 4 症例以上に共通する 38 個の遺伝子に注目した。二つの病原性の予測サイト Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) と Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>) を用いて、病原性がないと判定されたバリエントを除外すると、27 遺伝子に絞り込まれた。(下記は内訳)

- 7 症例共通 : 2 遺伝子
- 5 症例共通 : 3 遺伝子
- 4 症例共通 : 9 遺伝子
- 3 症例共通 : 7 遺伝子
- 2 症例共通 : 6 遺伝子

家族構成員の検体と罹患情報が得られた症例に関しては、家族内での segregation を確認したが、検証できた 3 遺伝子に関しては segregation に矛盾があり、除外された。

D. 考察

発端者 27 名のエキソーム解析により、候補遺伝子 505 遺伝子を抽出した。更に病原性の予測により 11 遺伝子を除外、家系内の segregation の矛盾により 3 遺伝子を除外した(残り 491 候補遺伝子)。今後も引き続き検証を継続していく。

E. 結論

現行のエキソーム解析では、責任遺伝子の同定には至っていないが、検証すべき候補遺伝子も多く残されているため、引き続き検証を進めていく。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

*Miyake N[#], Yano S[#] (# denotes equal contribution), Sakai C, Hatakeyama H, Shiina M, Watanabe Y, Bartley J, Abdenur JE, Wang RY, Chang R, Tsurusaki Y, Doi H, Saito H, Ogata K, Goto Y, *Matsumoto N. Mitochondrial complex III deficiency caused by a homozygous *UQCRC2* mutation presenting with neonatal-onset recurrent metabolic decompensation. Hum Mut (in press)

Tsurusaki Y, Kobayashi Y, Hisano M, Ito S, Doi H, Nakashima M, Saito H, Matsumoto N, Miyake N. The diagnostic utility of exome sequencing in Joubert syndrome related disorders. J Hum Genet (in press)

Yamashita S, Miyake N, Matsumoto N, Osaka H, Iai M, Aida N, Tanaka Y. Neuropathology

- of Leukoencephalopathy with Brainstem and Spinal Cord Involvement and High Lactate caused by a homozygous mutation of DARS2. *Brain Dev* (in press)
- Nonoda Y, Saito Y, Nagai S, Sasaki M, Iwasaki T, Matsumoto N, Ishii M, Saito H. Progressive diffuse brain atrophy in West syndrome with marked hypomyelination due to SPTAN1 gene mutation. *Brain Dev* (in press)
- Miyatake S, Murakami A, Okamoto N, Miyake N, Saito H, *Matsumoto N. A De Novo Deletion at 16q24.3 Involving ANKRD11 in a Japanese Patient With KBG Syndrome. *Am J Med Genet Part A* (in press)
- Higashiyama Y, Doi H, Wakabayashi M, Tsurusaki Y, , Miyake N, Saito H, Ohba C, Fukai R, Miyatake S, Koyano S, Suzuki Y, Kuroiwa Y, Matsumoto N. A novel homozygous *SCARB2* mutation causes late-onset progressive myoclonus epilepsy without renal failure. *Mov disord* (in press)
- Ikegawa S, Nakashima M, Matsumoto N. TGF- β and Genetic Skeletal Diseases. "TGF β in Human Disease" edited by Moustakas A and Miyazawa K. Springer (submitted)
- Tsurusaki Y[#], *Kosho T[#] (# denotes equal contribution), Hatasaki K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Doi H, Saito H, Miyake N, *Matsumoto N (*: co-correspondence). Exome sequencing identifies an *OFDI* mutation in a family of X-linked lethal congenital malformation syndrome: delineation of male Oral-facial-digital syndrome type 1. *Clin Genet* 83(2):135-144, 2013
- Kimura-Ohba S, Kagitani-Shimono K, Hashimoto N, Nabatame S, Okinaga T, Murakami A, Miyake N, Matsumoto N, Osaka H, Hojo K, Tomita R, Taniike M, *Ozono K. A case of cerebral hypomyelination with spondylo-epi-metaphyseal dysplasia. *Am J Med Genet Part A* 161A(1):203-207, 2013
- Yoneda Y, Haginoya K, Kato M, Osaka H, Yokochi K, Arai H, Kakita A, Yamamoto T, Otsuki Y, Shimizu S, Wada T, Koyama N, Mino Y, Kondo N, Takahashi S, Hirabayashi S, Takanashi J, Okumura A, Kumagai T, Hirai S, Nabetani M, Saitoh S, Hattori F, Yamazaki A, Subo Y, Nishiyama K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N, Saito H. Phenotype spectrum of *COL4A1* mutations: porencephaly to schizencephaly. *Ann Neurol* 73(1):48-57, 2013
- Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Kosho T, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kaname T, Naritomi K, Kawame H, Wakui K, Fukushima Y, Homma T, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Mizuno S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Shiina M, Ogata K, Ohta T, Niikawa N, Miyatake S, Okada I, Mizuguchi T, Doi H, Saito H, *Miyake N, *Matsumoto N (*: co-corresponding). Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet* 44(4):376-378, 2012
- *Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saito H, *Matsumoto N (*:

- co-corresponding). *KDM6A* point mutations cause Kabuki syndrome. *Hum Mut* 34 (1): 108-110, 2012
- Miyake N[#], Elcioglu NH[#] (# denotes equal contribution), Iida A, Isguven P, Dai J, Murakami N, Takamura K, Cho T-J, Kim O-H, Nagai T, Ohashi H, Nishimura G, Matsumoto N, Ikegawa S. *PAPSS2* mutations cause autosomal recessive brachyolmia. *J Med Genet* 49(8): 533-538, 2012
- Miyatake S, Miyake N, Doi H, Ogata K, Kawai M, Matsumoto N. A novel SACS mutation in a Japanese family with atypical phenotype of autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *Intern Med* 51: 2221-2226, 2012
- Sakai H, Suzuki S, Mizuguchi T, Imoto K, Doi H, Kikuchi M, Tsurusaki T, Saitsu H, Miyake N, Masuda M, Matsumoto N. Rapid detection of gene mutations responsible for non-syndromic aortic aneurysm and dissection using two different methods: resequencing microarray technology and next-generation sequencing. *Hum Genet* 131: 591-599, 2012
- Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawauchi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, Matsumoto N. Homozygous c.14576G>A Variant of *RNF213* Predicts Early-Onset and Severe Form of Moyamoya Disease. *Neurology* 78: 803-810, 2012
- Yoneda Y, Haginoya K, Arai H, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Osaka H, Kato M, Matsumoto N, Saitsu H. *De novo* and inherited mutations in the gene encoding a type IV collagen $\alpha 2$ chain (*COL4A2*) cause porencephaly. *Am J Hum Genet* 90 (1):86-90, 2012
- Kondo Y, Saitsu H, Miyamoto T, Nishiyama K, Tsurusaki T, Doi H, Miyake N, Ryoo N-K, Kim JH, Yu KS, *Matsumoto N. A family of oculofaciocardiodental syndrome (OFCD) with a novel *BCOR* mutation and genomic rearrangements involving *NHS*. *J Hum Genet* 57(3): 197-201, 2012
- Saitsu H, Kato M, Matsumoto N. Haploinsufficiency of *STXBPI* and Ohtahara syndrome. *Jasper's basic mechanism of the epilepsies*, 4th edition, edited by Noebels J, Avoli M, Rogawski M, Olsen RW, and Delgado-Escueta AV. Oxford University Press Page 824-834, 2012
- Yoneda Y, Saitsu H, Touyama M, Makita Y, Miyamoto A, Hamada K, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Ogata K, Naritomi K, Matsumoto N. Missense mutations in the DNA-binding/dimerization domain of *NFIX* cause Sotos-like syndrome. *J Hum Genet* 50(3): 207-211, 2012
- Tsurusaki Y, *Saitoh S, Tomizawa K, Sudo A, Asahina N, Shiraishi H, Ito J, Tanaka H, Doi H, Saitsu H, Miyake N, *Matsumoto N (* denotes co-corresponding). A *DYNC1H1* mutation causes a dominant spinal muscular atrophy with lower extremity

- predominance. *Neurogenet* 13(4):327-332, 2012
- Saitsu H, Osaka H, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N. A girl with early-onset epileptic encephalopathy associated with microdeletion involving *CDKL5*. *Brain Dev* 34(5): 364-367, 2012
- Hamdan FF[#], Saitsu H[#] (# denotes equal contribution), Masuko K, Gauthier J, Dobrzeniecka S, Spiegelman D, Lacaille JC, Décarie JC, Matsumoto N, Rouleau GA, Michaud JL. Mutations in *SPTANI* in intellectual disability and pontocerebellar atrophy. *Eur J Hum Genet* 20 (7): 796-800, 2012
- Saitsu H[#], Kato M[#] (# denotes equal contribution), Shimono M, Senju A, Tanabe S, Kimura T, Nishiyama K, Yoneda Y, Kondo Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N. Association of genomic deletions in the *STXBPI* gene with Ohtahara syndrome. *Clin Genet* 81(4): 399-402, 2012
- Motobayashi M, Nishimura-Tadaki A, Inaba Y, Kosho T, Miyatake S, Niimi T, Nishimura T, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Koike K. Neurodevelopmental features in 2q23.1 microdeletion syndrome: Report of a new patient with intractable seizures and review of literature. *Am J Med Genet Part A* 158 (4): 861-868, 2012
- Osaka H, Takagi A, Tsuyusaki Y, Wada T, Iai M, Yamashita S, Shimbo H, Saitsu H, Salomons GS, Jakobs C, Aida N, Shinka T, Kuhara T, Matsumoto N. Contiguous deletion of *SLC6A8* and *BAP31* in a patient with severe dystonia and sensorineural deafness. *Mol Genet Metab* 106(1): 43-47, 2012
- Writzl K, Primec ZR, Stražišar BG, Osredkar D, Pečarič-Meglič N, Kranjc BS, Nishiyama K, Matsumoto N, Saitsu H. Early onset West syndrome with severe hypomyelination and coloboma-like optic discs in a girl with *SPTANI* mutation. *Epilepsia* 53(6): e106-110, 2012
- Saitsu H, Kato M, Koide A, Goto T, Fujita T, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N. Whole exome sequencing identifies *KCNQ2* mutations in Ohtahara syndrome. *Ann Neurol* 72(2): 298-300, 2012
- Saitsu H, Kato M, Osaka H, Moriyama N, Horita H, Nishiyama K, Yoneda Y, Kondo Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N. *CASK* aberrations in males with Ohtahara syndrome and cerebellar hypoplasia. *Epilepsia* 53(8): 1441-1449, 2012
- Terao Y, Saitsu H, Segawa M, Kondo Y, Sakamoto K, Matsumoto N, Tsuji S, Nomura Y. Diffuse central hypomyelination presenting as 4H syndrome caused by compound heterozygous mutations in *POLR3A* encoding the catalytic subunit of polymerase III. *J Neurol Sci* 320(1-2): 102-105, 2012
- Miyatake S, Touho H, Miyake N, Ohba C, Doi H, Matsumoto N. Sibling cases of Moyamoya disease with different *RNF213* genotypes

and varying clinical course and severity.
J Hum Genet 57(12):804-806, 2012

Saitsu H, Kato M, Matsumoto N.
Haploinsufficiency of *STXBPI* and Ohtahara
syndrome. Jasper's basic mechanism of
the epilepsies, 4th edition, edited by
Noebels J, Avoli M, Rogawski M, Olsen RW,
and Delgado-Escueta AV. Oxford University
Press Page 824-834, 2012

Yoneda Y, Haginoya K, Arai H, Yamaoka S,
Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Yokochi K,
Osaka H, Kato M, Matsumoto N, Saitsu H. De
Novo and Inherited Mutations in COL4A2,
Encoding the Type IV Collagen α 2 Chain
Cause Porencephaly. Am J Hum Genet.
90(1):86-90, 2012

2. 学会発表

2012 Illumina Asica Pacific Scientific Summit
[Exome analysis in mendelian disorders]
Naomichi Matsumoto (Invited speaker)
(Sheraton Mirage Resort & Spa Gold Coast,
Gold Coast, Austraria, April 24, 2012)

神戸大学大学院医学研究科講義・松本直通「遺
伝性疾患のエクソーム解析」・2012年5月
29日・神戸大学医学部

第5回みやこ小児神経臨床懇話会(特別講演)・
松本直通・「小児神経疾患における遺伝子研
究の新潮流」2012年6月9日・メルパルク
京都

2012 イルミナ次世代シーケンサーユーズー
フォーラム・松本直通(招待講演)・「遺伝性
疾患のエクソーム解析」・2012年6月20日・
東京国際フォーラム

European Human Genetics Conference 2012
Naomichi Matsumoto “Genetic
abnormalities in Coffin-Siris
syndrome” (poster) (Nuremberg
Conference Center, Nuremberg, Germany,
June 24-24, 2012)

次世代シーケンス拠点班(松本班)講演会 松
本直通「次世代シーケンスを用いた遺伝性
疾患へのアプローチ」2012年7月10日・
大宮ソニックシティ・大宮

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター学術セ
ミナー 松本直通「遺伝性疾患のエクソ
ーム解析」・2012年7月13日・埼玉医科大学

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服
研究事業「次世代遺伝子解析装置を用いた
難病研究」平成24年度第1回公開ワークシ
ョップ・松本直通「遺伝性難治疾患の網羅
的エクソーム解析拠点の構築」2012年9月
6日・京都大学医学研究科芝蘭会館

第34回日本生物学的精神医学会・シンポジウ
ム1・松本直通(シンポジスト)「自閉症ス
ペクトラムとてんかんに着目したゲノム解
析」2012年9月28日・神戸国際会議場

厚生労働科学研究費・難治性疾患克服研究事業
神経変性疾患に関する調査研究班・「病態に
根ざしたALSの新規治療開発」分科班・平
成24年度ワークショップ・松本直通「次世
代シーケンサーを活用した遺伝性疾患の網
羅的エクソーム解析」2012年10月5日・
東京(シェーンバッハサボー)

Translational Genomics Conference 2012
Naomichi Matsumoto (Keynote speaker)
Exome sequencing in mendelian disorders.
(Hyatt Reagency Jeju, Jeju, Korea, Oct 13,

2012)

Center, San Francisco, CA, USA

生命医薬情報学連合大会 2012・松本直通 (招聘講演)「遺伝性疾患のエクソーム解析」平成 24 年 10 月 17 日・東京(タワーホール船堀)

平成 24 年度脳科学戦略推進プログラム成果報告会・松本直通「発達障害に関わる分子異常探索」2012 年 11 月 21 日・京都リサーチパーク・京都

人類遺伝学会第 57 回大会・ランチョンセミナー 1 松本直通「遺伝性疾患の効率的な次世代シーケンス解析」(アジレント共催) 2012 年 10 月 25 日・京王プラザホテル(東京)

平成 24 年度脳科学戦略推進プログラム課題 F 発達障害研究チーム第二回分科会・松本直通「発達障害に関わる分子異常探索」2012 年 11 月 22 日・京都リサーチパーク・京都

The 57th annual meeting, Japanese Society of Human Genetics・Naomichi Matsumoto (Symposist) “Isolation of genes causative for genetic diseases by next generation sequencer” in Symposium 5 entitled “Next Generation Sequencing for disease-genome analysis”. Oct 25, 2012 at Keoi Plaza Hotel, Tokyo

The 12th annual meeting of East Asian Union of Human Genetics Societies. Matsumoto Naomichi (oral presentation) “Medelian exome” Nov 29, 2012 at Seoul National University Hospital, Seoul, Korea.

ゲノム解析懇話会(トランスジェニック共催)・松本直通「次世代シーケンスを用いた疾患ゲノム解析」2012 年 10 月 25 日・京王プラザホテル(東京)

第 152 回染色体研究会・特別講演・松本直通「エクソーム解析」2012 年 12 月 1 日・東京医科大学病院・東京

人類遺伝学会第 57 回大会・基本講座・いまさら聞けない「遺伝医学」・松本直通 (講師)「次世代シーケンサー入門」2012 年 10 月 26 日・京王プラザホテル(東京)

精神・神経疾患研究開発費 23-5「筋ジストロフィーおよび関連疾患の診断・治療開発を目指した基盤研究」平成 24 年度「西野班」班会議特別講演・松本直通「遺伝性疾患のエクソーム解析」2012 年 12 月 8 日・JA 共済ビル・東京

新学術領域研究「転写サイクル」平成 24 年度第 1 回領域会議・松本直通「SWI/SNF 複合体異常が来す Coffin-Siris 症候群」2012 年 10 月 29 日・長崎大学医学部良順会館

第 35 回日本分子生物学会年会ワークショップ・精神のオミックス(オーガナイザー内匠透・松本直通)松本直通「発達障害におけるゲノム解析:次世代技術を用いて」(シンポジスト) 2012 年 12 月 13 日・福岡国際会議場・福岡

American Society of Human Genetics Meeting 2012. Matsumoto N, Tsurusaki Y, Miyake N Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome November 8, 2012 at Moscone

Advans 研究会 2012・招聘講演・松本直通「遺伝性疾患のエクソーム解析」2012 年 12 月 15 日ホテルグランドパレス・東京

三宅紀子、鶴崎美徳、Desheng Liang、Lingqian Wu、松本直通、人類遺伝学会第 57 回大会・一般口演・臨床遺伝学 3 「X 連鎖性を疑われたがミトコンドリア遺伝病であった一難聴家系の解析」2012 年 10 月 27 日・京王プラザホテル(東京)

3. 知的財産権の出願・登録状況

PCT/JP2012/83113 松本直通／鶴崎美徳／三宅紀子・コフィンーシリス症候群の検出方法・平成 24 年 12 月 20 日

PCT/JP2012/77903 才津浩智／松本直通・孔脳症又は脳出血のリスクを予測する方法・平成 24 年 10 月 29 日

特願 2012-180356・松本直通／三宅紀子・ミトコンドリア複合体 III 欠乏症の確定診断法・平成 24 年 8 月 16 日

特願 2012-136 松本直通／鶴崎美徳／三宅紀子・コフィンーシリス症候群の検出方法・平成 24 年 1 月 4 日

平成24年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

過剰運動<hypermobility>症候群類縁疾患における病態解明

分担研究課題：テネイン X 欠損患者の血清におけるプロテオミクス解析の試み

研究分担者 松本 健一 島根大学総合科学研究支援センター 生体情報・RI 実験分野

研究要旨：過剰運動（hypermobility）症候群（HMS）（ICD-9 分類 728.5 ICD-10 分類 M35.7）は、全身での複数ヶ所の関節過可動を示す症候群であり、関節過可動から関節脱臼をきたす。また、HMS は、結合組織疾患である III 型（関節可動亢進型）Ehlers-Danlos 症候群（EDS）などと類似性が高く、結合組織に関わる複数の原因による遺伝性疾患と考えられている。一方、III 型 EDS の原因遺伝子は 2003 年まで明らかになっていなかったが、Zweers らにより、細胞外マトリックス（ECM）のテネインファミリーに属するテネイン X（TNX）遺伝子のヘテロ変異によるハプロ不全により、III 型 EDS を発症することが報告され、初めて III 型 EDS の原因遺伝子の一つが明らかにされた。分担者は 1992 年に TNX を最初に同定したグループの一つで、それ以来、TNX の機能解析を進めてきた。昨年度の研究において、研究分担者のグループで開発した特異性の高い 2 種類の TNX 抗体を利用したサンドイッチ酵素免疫測定（ELISA）法を用いて、HMS 患者の血清濃度の測定を行ったところ、完全に TNX が欠損している 2 名の兄妹を見出した。本年度は、TNX ホモ欠損に伴う血清プロテオームの変化を明らかにするために、TNX ホモ欠損のこの兄妹 2 名の血清を用いて、健常人血清に比べて、発現量に差のある蛋白質の同定をプロテオミクス解析により試みた。解析したサンプル数がまだ少ないが、これまでのところ、Panther ソフトウェアによるパスウェイ解析を行ったところ、blood coagulation パスウェイに属する 6 種類の蛋白質（plasma kallikrein, coagulation factor XII, plasminogen, heparin cofactor 2, prothrombin, antithrombin-III）の発現減少が明らかとなった。

A. 研究目的

過剰運動（hypermobility）症候群（HMS）は、全身での複数ヶ所の関節過可動を示す症候群である。また、結合組織疾患である III 型（関節可動亢進型）Ehlers-Danlos 症候群（EDS）などと類似性も高く、結合組織に関わる複数の原因による遺伝性疾患と考えられている。昨年度の研究により、TNX 抗体を用いたサンドイッチ酵素免疫測定（ELISA）法で、HMS 患者の血清濃度の測定を行ったところ、完全に TNX が欠損している 2 名の兄妹（#69, #72）を見出した。この内、#69 は HMS であるが、関節可動亢進や皮膚の脆弱性・過伸展性や瘢痕の存在などから古典型（I 型）EDS 類似所見を呈している。一方、#72 はこれまでのところ、関節や結合組織の異常は見受けられない。

本年度の研究においては、TNX ホモ欠損に伴う血清プロテオームの変化を明らかにするために、TNX ホモ欠損の兄妹 2 名（#69, #72）の血清を用いて、健常人血清に比べて、発現量に差のある蛋白質の同

定を発現差異プロテオミクス解析により試みた。

B. 研究方法

TNX ホモ欠損に伴う血清プロテオームの変化を明らかにするために、TNX ホモ欠損の兄妹 2 名（#69, #72）の血清を得た（研究代表者 日本医科大学 医学部 渡邊淳 准教授より供与）。一方、健常人血清としては、数百人より採血された市販の混合血清を用いた。まず、血清中に多量に存在するアルブミンや免疫グロブリン（IgG）を、アルブミン・IgG 除去スピンカラムにより除去した。次に、TNX 欠損血清サンプルと健常人血清サンプルを、変性、還元、アルキル化、トリプシン消化後、各々異なる isobaric tag for absolute and relative quantitation（iTRAQ）試薬により標識を行い、標識された各々のサンプルを混ぜた。次に、過剰量の iTRAQ の除去とペプチドの分画のために、陽イオン交換クロマトグラフィーを行い、6 分画に分けた。次に、各分画をナノ液体クロマトグラフィー（Nano LC）により 171 分画に分け、matrix-assisted

laser desorption ionization (MALDI) 用マトリックス溶液である α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA) と混ぜながら、直接 MALDI-time of flight (TOF)/TOF プレートに自動滴下した。次に、MALDI-TOF/TOF 質量分析器で mass spectrometry (MS/MS) 解析を行った。その MS/MS 解析結果に基づき、ProteinPilot ソフトウェアを用いて発現変動血清蛋白質の同定・定量を行なった。尚、各蛋白質の健常人血清中蛋白質量に対する TNX 欠損血清中蛋白質量の相対量 (TNX 欠損血清中/健常人血清中) の算出のために iTRAQ 比を用いた。また、同定された蛋白質のパスウェイ解析や機能分類解析には、Panther software (version 8.0) (<http://www.pantherdb.org/>) を用いて行った。

C. 研究結果

健常人血清中に比べて、TNX ホモ欠損の兄妹 2 名 (#69, #72) の血清中において発現差異を示す蛋白質の網羅的プロテオミクス解析を行ったところ、2 名の血清中で共に発現変動蛋白質として出現した 72 個の蛋白質を同定した (ただし、IgG とアルブミンを除く)。その内、iTRAQ 比が 1.3 倍以上 (健常人血清中に比べて、TNX 欠損血清中において、1.3 倍以上に増加) の蛋白質は 2 個で、一方、iTRAQ 比が 0.77 倍未満 (健常人血清中に比べて、TNX 欠損血清中において、0.77 倍未満に減少) の蛋白質は 35 個であった。TNX 欠損血清中において増加した高値 5 個の蛋白質は、hemoglobin subunit α (10.92 倍)、hemoglobin subunit β (6.16 倍)、apolipoprotein A-IV (1.16 倍)、plasma protease C1 inhibitor (1.11 倍)、apolipoprotein(a) (1.09 倍) で、一方、TNX 欠損血清中において減少した低値 5 個の蛋白質は、complement C1r subcomponent (0.37 倍)、transthyretin (0.46 倍)、plasma kallikrein (0.46 倍)、apolipoprotein A-II (0.48 倍)、coagulation factor XII (0.48 倍) であった。次に、iTRAQ 比が 1.3 倍以上を示した増加蛋白質 2 個と iTRAQ 比が 0.77 倍未満を示した減少蛋白質 35 個の、関与すると想定されるパスウェイ解析と機能分類を Panther software を用いて行ったところ、パスウェイ解析では 6 個の減少蛋白質 (plasma kallikrein, coagulation factor XII, plasminogen,

heparin cofactor 2, prothrombin, antithrombin-III) が blood coagulation 経路に同定された。また、機能分類解析では hydrolase に減少蛋白質の 14 個 (plasma kallikrein, coagulation factor XII 等) が、protease に 14 個 (plasma kallikrein, coagulation factor XII 等) が、defense/immunity protein に 13 個 (haptoglobin, C4b-binding protein α chain 等) が、transfer/carrier protein に 13 個 (transthyretin, apolipoprotein A-II 等) が、receptor に 10 個 (C4b-binding protein α chain, complement component C9 等) が分類された。

D. 考察

TNX ホモ欠損のサンプル数がこれまで 2 名からしか得られていず、今回解析したサンプル数はまだ少なく最終的なことは言えない。また、この 2 名においては、EDS 症状の有無の相違があるため得られたデータの解釈には難しいところもある。しかしながら、健常人血清蛋白質と比べて 2 つのサンプルで共通に出現した発現変動蛋白質を解析したため、少なくとも TNX 欠損に伴う発現変動蛋白質を解析したものと考えることができる。

TNX ホモ欠損血清蛋白質と健常人血清蛋白質の比較により、TNX ホモ欠損に伴い発現減少する 6 個の蛋白質が blood coagulation パスウェイに同定されたことは興味深い。また、TNX ホモ欠損血清において健常人血清蛋白質に比べて、変動蛋白質として同定された 72 個の蛋白質の多くが、発現減少蛋白質 (iTRAQ 比が 0.77 倍未満の減少蛋白質は 35 個) として同定された。現在のところ、これらの生体内での意味は分からないが、更にサンプル数を増やし検討をする必要がある。また、我々は TNX 欠損マウスも保有しているので、TNX 欠損マウスを用い EDS や HMS 様症状の有無や、組織・血清プロテオーム解析も今後行ない、今回の患者データと合わせて考える必要がある。

E. 結論

本研究において、TNX 欠損に伴う血清プロテオームの変動を明らかにするために、TNX ホモ欠損の兄妹 2 名 (#69, #72) の血清蛋白質と健常人血清蛋白質との比較による発現差異プロテオミクス解析を行なった。その結果、健常人血清中と比較して、TNX 欠損の兄妹 2 名の血清中において共に発現変動蛋白質として出現した 72 個の蛋白質を同定した。最も TNX 欠損血清中で増加した蛋白質は hemoglobin subunit $\cdot\cdot$ (10.92 倍) で、一方、最も減少したのは complement C1r subcomponent (0.37 倍) であった。Panther ソフトウェアによるパスウェイ解析を行ったところ、blood coagulation パスウェイに属する蛋白質 (plasma kallikrein, coagulation factor XII, plasminogen, heparin cofactor 2, prothrombin, antithrombin-III) の減少が明らかとなった。今後、さらにサンプル数を増やし検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

学術論文

Ken-ichi Matsumoto. Phosphorylation of extracellular matrix tenascin-X detected by differential mass tagging followed by nanoLC-MALDI-TOF/TOF-MS/MS using ProteinPilot software. *Connect. Tissue Res.* 53: 106-116, 2012.

Ken-ichi Matsumoto, Tomoko Maniwa, Tetsuya Tanaka, Kazumi Satoh, Hideki Okunishi, and Teiji Oda. Proteomic analysis of calcified abdominal and thoracic aortic aneurysms. *Int. J. Mol. Med.* 30: 417-429, 2012.

Teiji Oda, Kouji Shimizu, Akane Yamaguchi, Kazumi Satoh, and Ken-ichi Matsumoto.

Hypothermia produces rat liver proteomic changes as in hibernating mammals but decreases endoplasmic reticulum chaperones. *Cryobiology* 65: 104-112, 2012.

Ken-ichi Matsumoto, Kazumi Satoh, Tomoko Maniwa, Asuka Araki, Riruke Maruyama, and Teiji Oda. Noticeable decreased expression of tenascin-X in calcific aortic valves. *Connect. Tissue Res.* 53: 460-468, 2012.

総説

松本健一. エーラス・ダンロス症候群の原因遺伝子の一つのテネイシン X. 臨床化学, 日本臨床化学会, 42: 22-29, 2013.

松本健一. 大動脈弁石灰化と細胞外マトリックス・テネイシン X. *Vascular Medicine*, 先端医学社, 9: 印刷中, 2013.

2. 学会発表

学会発表

松本 健一、佐藤 和美、馬庭 朋子、丸山 理留敬、織田 禎二. 石灰化大動脈弁における細胞外マトリックス・テネイシン X の発現量の顕著な減少. 第 44 回日本結合組織学会学術大会 第 59 回マトリックス研究会大会 学術集会 (平成 24 年 6 月、於東京)

松本 健一、佐藤和美、馬庭朋子、織田禎二. 石灰化大動脈弁組織の発現差異プロテオミクス解析. 第 85 回日本生化学会大会 (平成 24 年 12 月、於福岡)

研究会発表

松本健一. 石灰化大動脈弁における発現差異プロテオミクス解析～テネイシン X などのコラーゲン線維調節蛋白質の協調的発現減少～. 第 2 回テネイシンフォーラム (平成 24 年 11 月、於東京)

他大学での招待講演

松本 健一.

マトリセルラー蛋白質に属するテネイシン X の機能.

和歌山医科大学内講演会 (平成24年9月、於和歌山)

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

実用新案登録：なし

IV. 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
渡邊淳, 島田隆	Ehlers-Danlos 症候群	遠藤文夫	先天代謝異常ハンドブック	中山書店	東京	2013	410-411
渡邊淳, 島山未来, 島田隆	過剰運動症候群		日本臨牀別冊 新領域別症候群シリーズ 20 先天代謝異常症候群 (第2版) 下 病因・病態研究, 診断・治療の進歩	日本臨牀社	大阪	2012	727-730
Watanabe A, Orimo H, Takeshi ta T, Shimada T	renatal diagnosis of severe perinatal (lethal) hypophosphatasia. Prenatal Diagnosis - Morphology Scan and Invasive Methods	Richard Choy	Prenatal Diagnosis	In Tech	Croatia	2012	
Kosho T	Discovery and delineation of dermatan 4-O-sulfotransferase-1 (D4ST1)-deficient Ehlers-Danlos syndrome	Oiso N, Kawada A	Current Genetics in Dermatology	InTech	Croatia	in press	
Kosho T, Mizumoto S, Sugahara K.	Carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-O) sulfotransferase 14 (CHST14)	Taniguchi N, Honke K, Fukuda M, Narimatsu H, Yamaguchi Y,	Handbook of glycosyltransferases and related genes	Springer	New York	submitted	
Miyake N, Kosho T, Matsumoto N.	Ehlers-Danlos syndrome associated with glycosaminoglycan abnormalities.		Progress in heritable soft tissue disease	Springer	New York	in press	

古庄知己	Marfan症候群, Ehlers-Danlos症候群	『小児内科学』『小児外科』編集委員会	小児内科増刊号・小児疾患の診断治療基準第4	東京医学社	東京	2012	850-853
古庄知己	エーラスダンロス症候群		別冊日本臨床・新領域別症候群シリーズNo.20・先天異常症候群第2版(下)	日本臨床社	大阪	2012	721-726
古庄知己	きこえと遺伝子2	宇佐美真一		金原出版	東京	2012	
古庄知己	保因者診断とその進め方	福嶋義光	遺伝子医学MOOK別冊「遺伝カウンセリングハンドブック」	メディカルドゥー	大阪	2011	70-71
古庄知己	検査実施の妥当性(カンファレンスと倫理委員会)	福嶋義光	遺伝子医学MOOK別冊「遺伝カウンセリングハンドブック」	メディカルドゥー	大阪	2011	162-163
古庄知己	18トリソミー症候群	大関武彦, 古川漸, 横田俊一郎, 水口雅	今日の小児治療指針15版	医学書院	東京	2012	180-181
古庄知己	Ehlers-Danlos症候群	大関武彦, 古川漸, 横田俊一郎, 水口雅	今日の小児治療指針15版	医学書院	東京	2012	186
*Saitu H, Kato M, Matsumoto N	Haploinsufficiency of STXBP1 and Ohtahara syndrome	Noebels J, Avoli M, Rogawski M, Olsen Res, 4th edition W, and Delgado-Escueta AV	Jasper's basic mechanism of the epilepsy	Oxford University Press	New York	2012	824-834
Ikegawa S, Nakashima M, Matsumoto N	TGF-β and Genetic Skeletal Disease	Moustakas A and Miyazawa K	TGFβ in Human Disease	Springer	New York	submitted	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
渡邊 淳, 佐々木元子, 島田 隆	Ehlers-Danlos 症候群	小児科臨床		in press	2013
Masuno M*, Watanabe A*, Banyan Than Naing, Shimada T, Fujimoto W, Ninomiya S, Ueda Y, Kondou E, Yamanouchi Y, Ouchi K, Kuroki Y	Ehlers-Danlos Syndrome, Vascular Type: A Novel Missense Mutation in <i>COL3A1</i> Gene	Congenit Anom	52	207-210	2012
Sugano H, Matsu moto T, Miyake K, Watanabe A, Iijima O, Migita M, Narisawa S, Millán JL, Fukunaga Y, Shimada T	Successful gene therapy <i>in utero</i> for lethal murine hypophosphatasia	Hum Gene Ther	23	399-406	2012
Takeichi N*, Miodorikawa S*, Watanabe A, Banyan Than Naing, Tamamura H, Kano T, Sugihara H, Nissato S, Saito Y, Aita Y, Ishii K, Igarashi T, Kawakami Y, Haraha H, Ikeda T, Shimizu K, Suzuki S, Shimano H, Kawamoto M, Shimada T, Watanabe T, Oikawa S, Takekoshi K.	Identical germline mutations in the <i>TMEM127</i> gene in 2 unrelated Japanese patients with bilateral pheochromocytoma	Clin Endocrinol	77	707-714	2012
Kosho T, Kuniba H, Tanikawa Y, Hashimoto Y, Sakurai H	Natural history and parental experiences of children with trisomy 18 based on a questionnaire given to a Japanese Trisomy 18 Parental Support Group	Am J Med Genet A		in press	

<p><u>Kosho T</u>, Okamoto N, Ohashi H, Tsurusaki Y, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kawame H, Homma T, Tanabe S, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Ohta T, Niikawa N, Mizuno S, Kaname T, Naritomi K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Miyatake S, Mizuguchi T, Saitu H, Miyake N, Matsumoto N</p>	<p>Clinical correlations of mutations affecting six components of the SWI/SNF complex: detailed description of 21 patients and a review of the literature</p>	<p>Am J Med Genet A</p>		<p>in press</p>	
<p>Tsurusaki Y[#], <u>Kosho T</u>[#] (# denotes equal contribution), Hatasaki K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Doi H, Saitu H, Miyake N, *Matsumoto N (*: co-correspondence)</p>	<p>Exome sequencing identifies an <i>OFD1</i> mutation in a family of X-linked lethal congenital malformation syndrome: delineation of malformations and Oral-facial-digital syndrome type 1</p>	<p>Clin Genet</p>	<p>83(2)</p>	<p>135-144</p>	<p>2012</p>
<p>Kondo E, Nishimura T, <u>Kosho T</u> (corresponding author), Inaba Y, Mitsuhashi S, Ishida T, Baba A, Koike K, Nishihino I, Nonaka I, Furukawa T, Saito K</p>	<p>Recessive RYR1 mutations in a patient with severe congenital nemaline myopathy with ophthalmoplegia identified through massively parallel sequencing</p>	<p>Am J Med Genet A</p>	<p>158A(4)</p>	<p>772-8</p>	<p>2012</p>
<p>Motobayashi M, Nishimura-Tadaka A, Inaba Y, <u>Kosho T</u> (corresponding author), Miyatake S, Niimi T, Nishimura T, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Koike K</p>	<p>Neurodevelopmental features in 2q23.1 microdeletion syndrome: Report of a new patient with intractable seizures and review of literature</p>	<p>Am J Med Genet Part A</p>	<p>158 (4)</p>	<p>861-868</p>	<p>2012</p>

Narumi Y, Shiohara M, Wakui K, Hama A, Kojima S, Yoshikawa K, Amano Y, <u>Kosho T</u> , Fukushima Y	Myelodysplastic syndrome in a child with 15q24 deletion syndrome	Am J Med Genet A	158A(2)	412-6	2012
古庄知己	結合組織疾患-Marfan症候群とEhlers-Danlos症候群	内分泌・糖尿病・代謝内科	34 (3)	210-220	2012
Yoneda Y, Hagiwara K, Arai H, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Osaka H, Kato M, <u>Matsumoto N</u> , *Saito H	De novo and inherited mutations in the gene encoding a type IV collagen $\alpha 2$ chain (COL4A2) cause porencephaly	Am J Hum Genet	90 (1)	86-90	2012
Sakai H, Suzuki S, Mizuguchi T, Imoto K, Doi H, Kikuchi M, Tsurusaki T, Saito H, Miyake N, Masuda M, * <u>Matsumoto N</u>	Rapid detection of gene mutations responsible for non-syndromic aortic aneurysm and dissection using two different methods: resequencing microarray technology and next-generation sequencing	Hum Genet	131	591-599	2012
Kondo Y, Saito H, Miyamoto T, Nishiyama K, Tsurusaki T, Doi H, Miyake N, Renjo N-K, Kim JH, Yu KS, * <u>Matsumoto N</u>	A family of oculofaciocardiodental syndrome (OFCD) with a novel BCOR mutation and genomic rearrangements involving NHS	J Hum Genet	57(3)	197-201	2012
Yoneda Y, Saito H, Touyama M, Makita Y, Miyamoto A, Hamada K, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Ogata K, Naritomi K, * <u>Matsumoto N</u>	Missense mutations in the DNA-binding/dimerization domain of NFIX cause Sotos-like syndrome	J Hum Genet	50(3)	207-211	2012
Saito H, Osaka H, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, <u>Matsumoto N</u>	A girl with early-onset epileptic encephalopathy associated with microdeletion involving CDKL5	Brain Dev	34(5)	364-367	2012

Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawachi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, * <u>Matsumoto N</u>	Homozygous c.14576G>A Variant of RNF213 Predicts Early-Onset and Severe Form of Moyamoya Disease	Neurology	78	803-810	2012
*Hamdan FF#, Saitsu H# (# denotes equal contribution), Masuko K, Gauthier J, Dobrzeniecka S, Spiegelman D, Lacaille JC, Décarié JC, <u>Matsumoto N</u> , Rouleau GA, Michaud JL	Mutations in SPTAN1 in intellectual disability and pontocerebellar atrophy	Eur J Hum Genet	20 (7)	796-800,	2012
Saitsu H#, Kato M# (# denotes equal contribution), Shimono M, Senju A, Tanabe S, Kimura T, Nishiyama K, Yoneda Y, Kondo Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, <u>Matsumoto N</u>	Association of genomic deletions in the STXBP1 gene with Ohtahara syndrome	Clin Genet	81(4)	399-402	2012
Motobayashi M, Nishimura-Tadaki A, Inaba Y, *Kurosho T, Miyatake S, Niimi T, Nishimura T, Wakui K, Fukushima Y, <u>Matsumoto N</u> , Koike K	Neurodevelopmental features in 2q23.1 microdeletion syndrome: Report of a new patient with intractable seizure and review of literature	Am J Med Genet Part A	158 (4)	861-868	2012

Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Kosho T, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kaname T, Naritomi K, Kawame H, Wakui K, Fukushima Y, Homma T, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Mizuno S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Shina M, Ogata K, Ohta T, Niikawa N, Miyatake S, Okada I, Mizuguchi T, Doi H, Saitsu H, *Miyake N, *Matsumoto N (*: co-corresponding)	Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome	Nat Genet	44(4)	376-378	2012
*Osaka H, Takagi A, Tsuyusaki Y, Wada T, Iai M, Yamashita S, Shimbo H, Saitsu H, Salomons GS, Jakobs C, Aida N, Shinka T, Kuhara T, <u>Matsumoto N</u>	Contiguous deletion of SLC6A8 and BAP31 in a patient with severe dystonia and sensorineural deafness	Mol Genet Metab	106(1)	43-47	2012
Writzl K, Primec ZR, Stražišar B, G, Osredkar D, Pečarič-Meglič N, Kranjc BS, Nishiyama K, <u>Matsumoto N</u> , Saitsu H	Early onset West syndrome with severe hypomyelination and coloboma-like optic discs in a girl with SPTAN1 mutation	Epilepsia	53(6)	e106-110	2012
Saitsu H, Kato M, Koide A, Goto T, Fujita T, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, <u>Matsumoto N</u>	Whole exome sequencing identifies KCNQ2 mutations in Ohtahara syndrome	Ann Neurol	72(2)	298-300	2012

*Saito H, Kato M, Osaka H, Moriyama N, Horita H, Nishiyama K, Yoneda Y, Kondo Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, <u>Matsumoto N</u>	CASK aberrations in males with Ohtahara syndrome and cerebellar hypoplasia	Epilepsia	53(8)	1441-1449	2012
Miyake N#, Elcioglu NH# (# denotes equal contribution), Iida A, Isguven P, Dai J, Murakami N, Takamura K, Cho T-J, Kim O-H, Nagai T, Ohashi H, Nishimura G, <u>Matsumoto N</u> , Ikegawa S	PAPSS2 mutations cause autosomal recessive brachyolmia	J Med Genet	49(8)	533-538	2012
*Terao Y, Saito H, Segawa M, Kondo Y, Sakamoto K, <u>Matsumoto N</u> , Tsuji S, Nomura Y	Diffuse central hypomyelination presenting as 4H syndrome caused by compound heterozygous mutations in POLR3A encoding the catalytic subunit of polymerase III	J Neurol Sci	320(1-2)	102-105	2012
Miyatake S, Miyake N, Doi H, Ogata K, Kawai M, * <u>Matsumoto N</u>	A novel SACS mutation in a Japanese family with atypical phenotype of autosomal recessive spastic ataxia of	Intern Med	51	2221-2226	2012
Yamashita S, Miyake N, <u>Matsumoto N</u> , Osaka H, Iai M, Aida N, Tanaka Y.	Neuropathology of Leukoencephalopathy with Brainstem and Spinal Cord Involvement and High Lactate caused by a homozygous mutation of DARS2	Brain Dev			in press
*Nonoda Y, Saito Y, Nagai S, Shinohara M, Iwasaki T, <u>Matsumoto N</u> , Ishii M, Saito H	Progressive diffuse brain atrophy in West syndrome with marked hypomyelination due to SPTAN1 gene mutation	Brain Dev			in press