

令和 5 年 4 月 5 日現在

機関番号：82643

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18366

研究課題名(和文)モデルマウスを用いた、正常眼圧緑内障家系で同定された新規原因遺伝子Xの機能解析

研究課題名(英文)METTL23 mutation alters histone H3R17 methylation in normal-tension glaucoma

研究代表者

潘 洋(PAN, YANG)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・分子細胞生物学研究部・研究員

研究者番号：20866389

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):本研究は顕性NTG家系について全エクソーム解析を行い、新規原因遺伝子METTL23にc.A83G変異を発見しました。この遺伝子変異について、患者iPS細胞やノックインマウス、ノックアウトマウスを使った実験を行いました。その結果、エクソンのスプライシング異常が生じ、H3R17がメチル化されず、TNF- α とIL-1 β の発現量が上昇したことによって、正常眼圧緑内障が発症することを明らかにしました。また、ノックインマウスやノックアウトマウスはNTGの病態を再現することが確認されました。今回世界初となるエピジェネティックスの異常による正常眼圧緑内障の発症機序の解明に成功しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本では開放隅角緑内障の多くが正常眼圧緑内障(NTG)であることが知られています。本研究は顕性NTG家系について全エクソーム解析を行い、新規原因遺伝子METTL23にc.A83G変異を発見しました。ゲノムDNAやヒストンのメチル化は遺伝子発現を制御しており、これを総称してエピジェネティックスと呼んでいます。エピジェネティックスと緑内障との関連は長い間推測されてきましたが、今回世界初となるエピジェネティックスの異常による正常眼圧緑内障の発症機序の解明に成功しました。今回の発見によって、エピジェネティックスと緑内障の関係がさらに明らかにされることが期待されます。

研究成果の概要(英文): Normal-tension glaucoma (NTG) is a heterogeneous disease characterized by RGC death leading to cupping of the optic nerve head and visual field loss at normal IOP. The pathogenesis of NTG remains unclear. Here, we describe a single nucleotide mutation in exon 2 of the METTL23 gene identified in 3 generations of a Japanese family with NTG. This mutation caused mRNA aberrant splicing, which abolished normal protein production and altered subcellular localization. Mettl23-KI (-KO) mice developed a NTG like phenotype. METTL23 is a histone arginine methyltransferase expressed in murine and macaque RGCs. However, the novel mutation reduced METTL23 expression in RGCs of Mettl23-KI mice, which recapitulated both clinical and biological phenotypes. Moreover, our findings demonstrated that METTL23 catalyzed the dimethylation of H3R17 in the retina and was required for NF- κ B-mediated TNF- α and IL-1 β feedback. These findings suggest an etiologic role of METTL23 in NTG.

研究分野: 眼科学関連

キーワード: Genetic diseases Mouse models Ophthalmology iPS cells

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Glaucoma is the most frequent cause of progressive and irreversible blindness and is characterized by optic nerve head cupping and visual field loss. Open-angle glaucoma is the most prevalent glaucoma subtype. The Baltimore Eye Survey reported that over half of the patients with open-angle glaucoma do not have elevated intraocular pressure (IOP), thus meeting the case definition of normal-tension glaucoma (NTG).

Epidemiologic studies have reported a higher NTG prevalence among Asians (52%–92%), especially among Japanese people with NTG (92%) compared with White people (30%–39%), and that Asian Americans had a 159% increased risk of NTG compared with non-Hispanic White individuals, possibly reflecting an increased demographic association and genetic susceptibility. Moreover, 21% of patients with NTG have a family history of glaucoma, further suggesting a genetic predisposition.

The optineurin (OPTN) E50K mutation and TANK-binding protein 1 (TBK1) copy number variations are responsible for familial NTG with autosomal dominant inheritance. However, mutations in these 2 genes account for only 2%–3% of NTG cases, suggesting that additional genes may contribute to NTG.

2. 研究の目的

NTG is an irreversible blinding disease, and the diagnosis is more complex than that of high-pressure forms of glaucoma. The major aim of this research is to identify the novel NTG-causing gene and its tissue-specific mechanism, which will stimulate the development of new diagnostic and therapeutic strategies. As the optic nerve is part of the CNS, our findings may also have implications for the pathogenesis of other neurodegenerative diseases.

3. 研究の方法

WES data and bioinformatics analysis. Preparation and maintenance of human iPSCs. Differentiation and purification of iPSC-RGCs. TA cloning. Cloning of METTL23-expressing plasmids. Western blot. METTL23 intracellular localization assay. Generation of Mettl23-KI and -KO mice. IOP measurement. OCT observation. ERG. Histology and immunofluorescence. Retinal flat-mount and RGC counts. Quantification of optic nerve axons. Purification of METTL23-his6-FLAG protein. In vitro methylation assay. RT-qPCR.

4. 研究成果

Here, we describe a single nucleotide mutation in exon 2 of the methyltransferase like 23 (*METTL23*) gene identified in a three-generation Japanese NTG family. The *METTL23* c.A83G mutation was heterozygous in all of our NTG patients. This allele was transmitted

vertically from the affected parents to affected children, clearly indicating an autosomal dominant inheritance pattern.

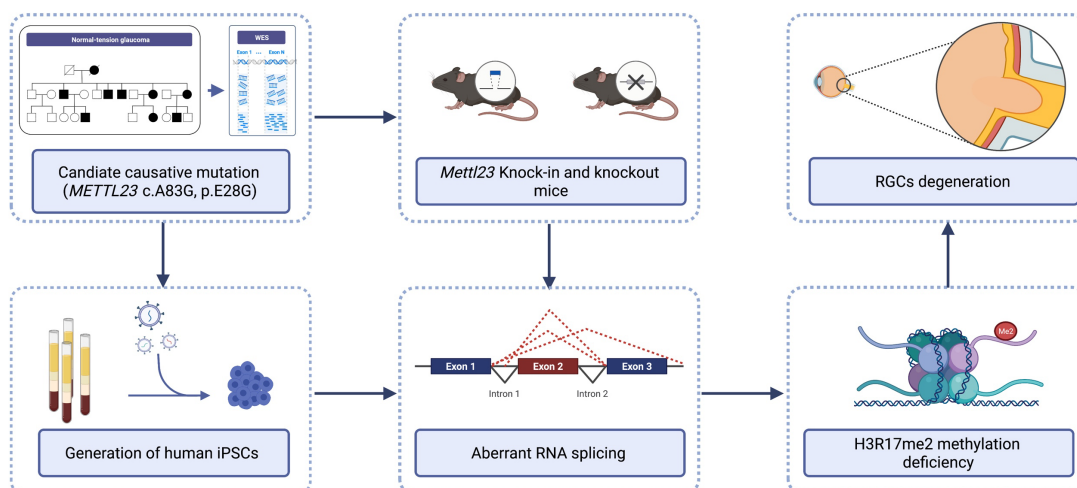
This mutation caused METTL23 mRNA aberrant splicing in exon trapping vector transfected HEK293T cells, the NTG patient-derived iPSCs, and *Mettl23^{H/G}* mice retina, which abolished normal protein production and altered subcellular localization. *Mettl23* knock-in (*Mettl23^{H/G}* & *Mettl23^{G/G}*) and knockout (*Mettl23^{H/-}* & *Mettl23^{-/-}*) mice developed a glaucoma phenotype without elevated IOP.

METTL23 is a histone arginine methyltransferase expressed in murine and macaque RGCs. However, the novel mutation reduced *Mettl23* expression in RGCs of *Mettl23G/G* mice, which recapitulated both clinical and biological phenotypes. Moreover, our findings indicate that METTL23 is expressed in RGCs and is associated with NF- κ B mediated TNF- α and IL-1 β transcription through dimethylation of histone H3R17. Furthermore, both the novel METTL23 c.A83G mutation and deficiency led to RGC loss and optic nerve head axonal degeneration in *Mettl23* knock-in and knockout mice, similar to findings in NTG patients.

A second *METTL23* variant also suspected of affecting splicing (c.84+60delAT) was found in 14 members, reported to be unrelated, of a collection of 1029 Japanese NTG cases and in 8 of 1402 age-matched Japanese controls. No TBK1 copy number variations and OPTN E50K mutation were detected in any NTG patients with the *METTL23* c.84+60delAT variant. The distribution of the allele between the cases and controls suggests a potential contribution to NTG ($P=0.03$, Fisher's exact test or Chi square with Yates correction; $P=0.038$, logistic regression adjusting for age and gender, Supplemental Figure 12), however further work, including analyses in other datasets, will be required to confirm this finding.

The role of histone arginine methylation in pathogenesis of neuronal diseases is being rapidly elucidated; however, to our knowledge, this is the first report of aberrant histone arginine methylation in NTG.

Graphical Abstract



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Pan Yang, Iejima Daisuke, Nakayama Mao, Suga Akiko, Noda Toru, Kaur Inderjeet, Das Taraprasad, Chakrabarti Subhabrata, Guymer Robyn H., DeAngelis Margaret M., Yamamoto Megumi, Baird Paul N., Iwata Takeshi	4. 巻 296
2. 論文標題 Binding of Gtf2i- / transcription factors to the ARMS2 gene leads to increased circulating HTRA1 in AMD patients and in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100456 ~ 100456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100456	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Pan Yang, Suga Akiko, Kimura Itaru, Kimura Chojiro, Minegishi Yuriko, Nakayama Mao, Yoshitake Kazutoshi, Iejima Daisuke, Minematsu Naoko, Yamamoto Megumi, Mabuchi Fumihiko, Takamoto Mitsuko, Shiga Yukihiko, Araie Makoto, Kashiwagi Kenji, Aihara Makoto, Nakazawa Toru, Iwata Takeshi	4. 巻 132
2. 論文標題 METTL23 mutation alters histone H3R17 methylation in normal-tension glaucoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 e153589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI153589	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Pan Yang, Fu Yingbin, Baird Paul N., Guymer Robyn H., Das Taraprasad, Iwata Takeshi	4. 巻 online ahead of print
2. 論文標題 Exploring the contribution of ARMS2 and HTRA1 genetic risk factors in age-related macular degeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Progress in Retinal and Eye Research	6. 最初と最後の頁 101159 ~ 101159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.preteyeres.2022.101159	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ahamed Waseem, Yu Richard Ming Chuan, Pan Yang, Iwata Takeshi, Barathi Veluchamy Amutha, Wey Yeo Sia, Tun Sai Bo Bo, Qiu Beiying, Tan Alison, Wang Xiaomeng, Cheung Chui Ming Gemmy, Wong Tien Yin, Yanagi Yasuo	4. 巻 23
2. 論文標題 HTRA1 Regulates Subclinical Inflammation and Activates Proangiogenic Response in the Retina and Choroid	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10206 ~ 10206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms231810206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Pan Yang
2. 発表標題 The ARMS2 insertion/deletion leads to systemic upregulation of secreted HTRA1 levels in the blood in AMD patients
3. 学会等名 2021 ARVO Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Pan Yang
2. 発表標題 The ARMS2 insertion/deletion leads to increased circulating HTRA1 in AMD patients and in vitro
3. 学会等名 第14回RRM
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Pan Yang
2. 発表標題 Dominant Mutation in METTL23 gene is responsible for Normal tension glaucoma
3. 学会等名 The XXVth Biennial Meeting of the International Society of Eye Research (ISER) 2023 (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Pan Yang
2. 発表標題 METTL23 mutation alters histone H3R17 methylation in normal-tension glaucoma
3. 学会等名 第15回RRM
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Pan Yang
2. 発表標題 Dominant Mutation in X gene is responsible for Normal Tension Glaucoma
3. 学会等名 第1回NH0ネットワーク共同研究 感覚器グループ会議・班会議
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 家族性正常眼圧緑内障の診断補助方法、診断キット及びバイオマーカー	発明者 潘 洋, 岩田 岳, 木村 至	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-075596	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関