

令和 4 年 9 月 6 日現在

機関番号：82402

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15256

研究課題名(和文) Study of ATRX mediated telomere maintenance in neuroblastoma by using genome editing technology (CRISPR/Cas9)

研究課題名(英文) Study of ATRX mediated telomere maintenance in neuroblastoma by using genome editing technology (CRISPR/Cas9)

研究代表者

AKTER JESMIN (AKTER, JESMIN)

地方独立行政法人埼玉県立病院機構埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・臨床腫瘍研究所・技師

研究者番号：70795830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ATRX変異は予後不良な神経芽腫(NB)でしばしば見られる。ATRX欠損がDNAのG-quadruplex形成による複製ストレスやDNA傷害に關与するとの報告はあるが、NBにおける詳細は不明である。本研究では、2つのNB細胞株でCRISPR/Cas9法によるATRXのノックアウト実験を行い、TP53野生型NB細胞では2本鎖DNA切断と複製ストレスによるDNA傷害応答が増加したのに対し、TP53欠損株ではG4 DNA helicasesやFANCD2の活性化を介してDNA修復や複製フォークの安定性が調節され、ATRX欠損により誘発される複製ストレスが抑えられることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ATRX変異は予後不良な神経芽腫(NB)でしばしば見られる。本研究から、ATRXがゲノムの完全性を維持していること、ATRX欠損神経芽腫細胞の複製ストレスによるDNA傷害が、TP53欠損によりDNA修復機構と複製フォークの安定化により緩和されること、その機構にFANCD2タンパク質が主要な役割を果たすことが示された。このことから、FANCD2がATRXが欠損した神経芽腫に対する治療標的となりうることを示唆された。このように本研究の成果から、神経芽腫の腫瘍発生におけるATRX遺伝子変異の意義についての理解が深まり、高リスク神経芽腫に対する個別化医療のための重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Genetic aberrations are frequently present in the ATRX gene in older high-risk neuroblastoma (NB) patients with very poor clinical outcomes. Its loss-of-function strongly linked to replication stress (RS) and DNA damage through G-quadruplex (G4) DNA secondary structures. However, limited information is available on ATRX alteration-related NB tumorigenesis. We herein knocked out ATRX in MYCN-amplified (NGP) and single copy (SK-N-AS) NB cells with wild-type (wt) and truncated TP53 at the C terminus, respectively, using CRISPR/Cas9 systems. We revealed that ATRX depletion in TP53 wt NB cells was associated with an increased frequency of DSBs and a subsequent RS-induced DNA damage response, which was impaired by the loss of p53 through the activation of G4 DNA helicases or the FA DNA repair pathway protein, FANCD2. Therefore, it indicates that p53 deficiency limits ATRX loss-induced RS/and genome instability in NB cells by regulating DNA repair mechanisms and replication fork stability.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：神経芽腫 ATRX TP53 FANCD2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Neuroblastoma (NB) is the most common pediatric extracranial solid tumor of the sympathetic nervous system, accounts for 8 - 10% of all childhood cancers and 15% of deaths from pediatric cancer. The chromatin remodeling factor ATRX is a tumor suppressor gene, and plays a key role in genome integrity by promoting replication-fork stability and homologous recombination (HR) DNA repair. Somatic mutations of the ATRX gene are recurrently present in older patients and advanced stage-NBs. Moreover, its loss of function facilitates the alternative lengthening of telomeres (ALT) pathway in tumor cells, and strongly related to DNA damage and replicative stress. However, limited information is available on ATRX alteration-related NB tumorigenesis. More recently several findings indicate that ATRX deficiency has been linked to replication stress and DNA damage by way of G-quadruplex (G4) DNA secondary structure.

神経芽腫 (Neuroblastoma, NB) は小児の頭蓋外固形腫瘍のなかで最も高頻度 (全小児がん発症の約 8-10%) にみられる交感神経系腫瘍であり、小児の腫瘍死の 15% を占める。クロマチンリモデリング因子のひとつで、がん抑制遺伝子である ATRX 遺伝子は、複製フォークの安定化と相同組換え (HD) DNA 修復を促進することにより、ゲノムの完全性 (genome integrity) の維持に重要な働きを果たしている。ATRX 遺伝子の体細胞変異は年長児の進行神経芽腫でしばしば見られ、その機能の喪失が、腫瘍細胞でのテロメア長伸長 (alternative lengthening of telomeres, ALT) の促進と DNA 傷害や複製ストレスに強い関連性があることが知られている。しかしながら、ATRX 遺伝子の変異に関与する神経芽腫の腫瘍発生のメカニズムについては依然として不明な点が多い。また、最近の報告では、ATRX の欠損が DNA の G-quadruplex といわれる 2 次構造による複製ストレスや DNA 傷害に関係していることが明らかになってきた。

2. 研究の目的

In this study, our primary objective is to analyzing the link between ATRX loss of function and ALT pathway in NB, which will be remarkable clue for the development of ALT-related targets, and may contribute to the individualized treatment for high-risk NB cases.

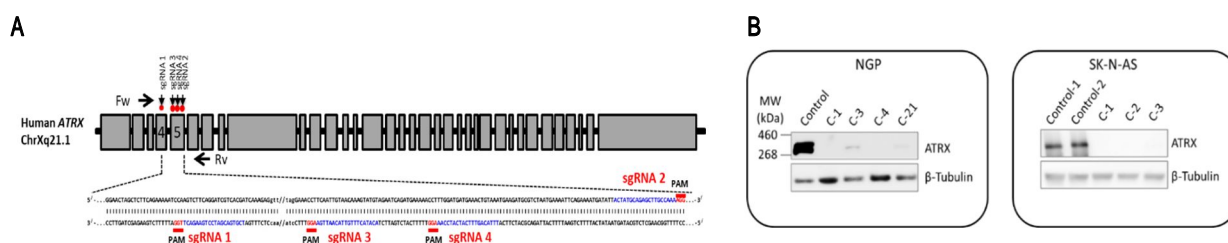
以上の背景から、本研究では神経芽腫における ATRX の機能欠損と ALT パスウェイとの関係について詳細に解析することにより、ALT が起こっている腫瘍に対する治療標的を開発するための有用な手がかりを得て、高リスク神経芽腫症例に対する個別化医療への発展に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

To define the role of inactivating ATRX mutations in carcinogenesis, we herein knocked out (KO) ATRX in MYCN-amplified (NGP) and MYCN single copy (SK-N-AS) NB cells with wild-type (wt) and truncated TP53 at the C-terminus, respectively, using CRISPR/Cas9 technologies. Other methods that we used in our study is Telomere PNA FISH, C-circle analysis, APB assay, Immunofluorescence, Western blot, Agilent 8x60K oligonucleotide microarrays, gene set enrichment analysis (GSEA), WST-8 assay, colony formation, and gene knock-down.

腫瘍発生における ATRX 不活化変異の機能について明らかにするため、我々は CRISPR/Cas9 技術を用いて、神経芽腫細胞株で ATRX のノックアウト実験を行った。細胞株は、MYCN 遺伝子増幅あり、TP53 遺伝子野生型の NGP 細胞株と、MYCN 遺伝子非増幅、TP53 遺伝子 C 末欠損である SK-N-AS 細胞株の 2 種類を用いた。

Figure 1



Generation of ATRX KO in NB cells. Targeted genomic deletion within the human ATRX

locus (Figure 1A). Western blots show the depletion of ATRX protein expression in cell lysates prepared from Cas9 control (Ctrl) and *ATRX* KO (C-1, C-3, C-4, and C-21) NGP and (C-1, C-2, and C-3) SK-N-AS cells (Figure 1B).

図1 CRISPR/Cas9による *ATRX* ノックアウト (KO) 細胞株の作製

図1A: NGP細胞における *ATRX* のウェスタンブロット。Control: Cas9 コントロール、C-1, C-3, C-4, C-21: *ATRX* KO。図1B: SK-N-AS細胞における *ATRX* のウェスタンブロット。Control-1, -2: Cas9 コントロール、C-1, C-2, C-3: *ATRX* KO。

Figure 2

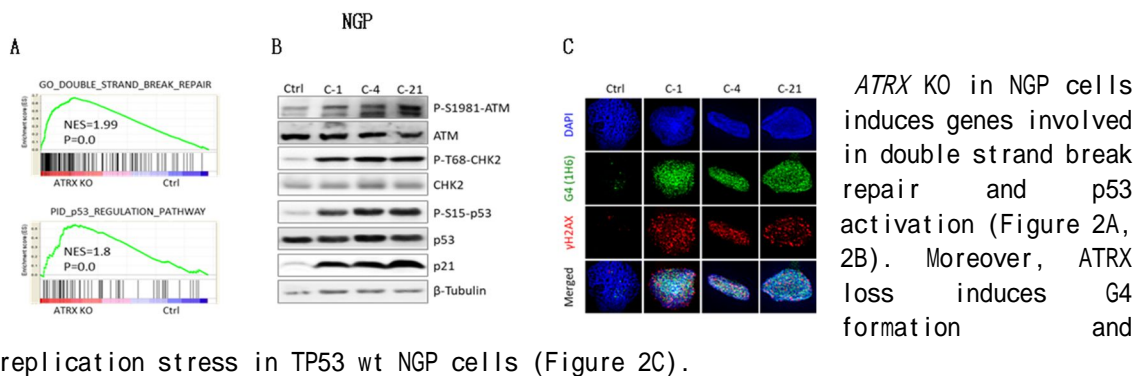


図2 *ATRX* ノックアウト (KO) 細胞株における遺伝子発現の変化

図2A、2B: NGP細胞における *ATRX* のノックアウトにより、二本鎖切断修復や p53 活性化に關与する遺伝子群の発現が誘導された。図2C: *ATRX* の欠失により G4 の形成と複製ストレスが野生型 TP53 の NGP 細胞にて観察された。

Figure 3

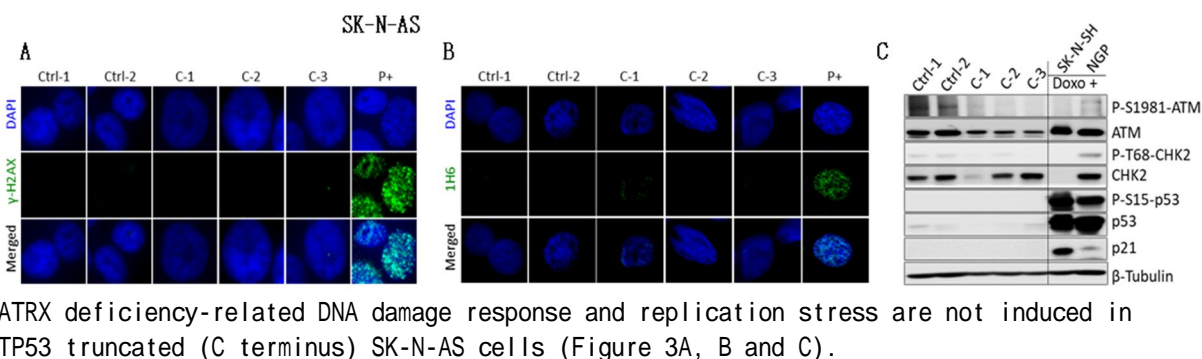


図3 *ATRX* 欠損により引き起こされる DNA 傷害応答と複製ストレスは、TP53 欠損細胞株では誘導されなかった

Figure 4

p53 deficiency limits *ATRX* loss-induced replication stress and genome instability through the FA pathway protein, FANCD2.

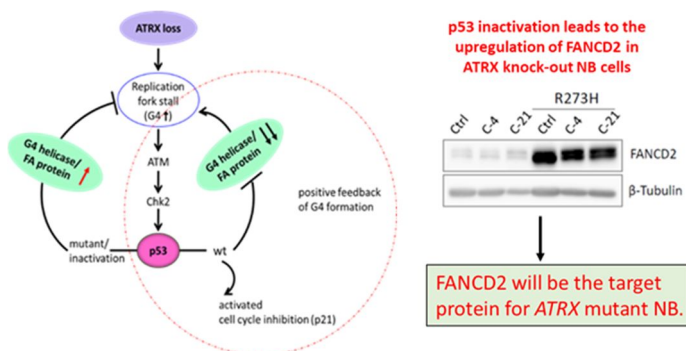


図4 *ATRX* 欠損により引き起こされる複製ストレスとゲノム不安定性は、TP53 欠損細胞株では FANCD2 タンパク質の発現増強を介して誘導されないことが明らかになった。*ATRX* が欠損した神経芽腫細胞における p53 の不活化は FANCD2 の発現を増加させることから、FANCD2 が *ATRX* 変異をもつ神経芽腫において治療標的となりうることを示された。

た。

4 . 研究成果

In our study *ATRX* KO NGP clones proliferated slowly compared to control and became differentiated but *ATRX* KO SK-N-AS clones did not. GSEA analysis of microarray data indicated that gene-set related to DNA double-strand break repair, DNA damage response, negative cell cycle regulation, G2M checkpoint and, p53 pathway activation were enriched in NGP clones. By *in vitro* analysis, *ATRX* loss results in increased expression of phosphorylated histone variant H2AX (gamma-H2AX), a canonical marker for double-stranded breaks, indicating the accumulation of endogenous DNA damage in NGP clones but not in SK-N-AS clones. Using a monoclonal antibody known to recognize G4 structures *in situ* (1H6), we found that *ATRX* loss promotes G4 accumulation only in *TP53* wt isogenic *ATRX* KO NGP clones, suggesting that replication stress occurred at genomic loci prone to G4 formation. The accumulation of DNA damage activated the ATM/Chk2/p53 pathway, leading to cell cycle arrest in NGP clones. Interestingly, *ATRX* loss did not induce replication stress related to DNA damage response in *TP53*-truncated SK-N-AS clones. Moreover, lentiviral-mediated p53 inactivation abrogated cell cycle arrest and reduced G4 accumulation in NGP clones. The loss of p53 also induced G4 DNA helicases or Fanconi anemia group D2 protein (FANCD2) with *ATRX* deficiency, suggesting that *ATRX* maintained genome integrity and p53 deficiency attenuated replication stress-induced DNA damage in NB cells featuring inactivated *ATRX* by regulating DNA repair mechanisms and replication fork stabilization. We also studied the hallmarks of ALT, including ALT-associated PML bodies and presence of extrachromosomal telomeric DNA (e.g. c-circle) in these subclones, and found that *ATRX* loss alone is not sufficient for ALT activation. This study was published in nature publishing group, ‘ ‘Oncogenesis’ ’ journal, 2021. During our study, we also gathered knowledge about how do telomere abnormalities regulate the biology of neuroblastoma, and published a review article in MDPI journal, ‘ ‘Biomolecule’ ’, 2021.

ATRX をノックアウトさせた NGP 細胞は対照細胞株に比較して細胞増殖は遅く、分化傾向を示したが、*ATRX* をノックアウトさせた SK-N-AS 細胞ではその現象は見られなかった。マイクロアレイを用いた GSEA 解析では、*ATRX*-KO NGP 細胞では DNA 二本鎖切断修復、DNA 傷害応答、細胞周期調節抑制、G2M チェックポイント、p53 パスウェイ活性化などに関与する遺伝子群がエンリッチされていた。in vitro 解析では、*ATRX* 欠損 NGP 細胞では、二本鎖切断のマーカである phosphorylated histone variant H2AX (gamma-H2AX) の発現上昇がみられたが、*ATRX* 欠損 SK-N-AS 細胞ではみられなかった。G4 構造を検出するモノクローナル抗体 1H6 を用いると、*ATRX* 欠損は *TP53* 野生型の *ATRX* KO NGP においてのみ G4 構造の蓄積がみられたことから、複製ストレスは G4 が形成される傾向にあるゲノム部位で起こっていると示唆された。NGP 細胞における DNA 障害の蓄積は ATM/Chk2/p53 パスウェイを活性化し、細胞周期の停止へとつながっていく。興味深いことに、*ATRX* の欠損は *TP53* が途中で欠けた SK-N-AS 細胞では複製ストレスによる DNA 障害応答を誘導しない。また、NGP 細胞でレンチウイルスにより p53 を不活化させると、細胞周期停止は解除され、G4 構造の蓄積は減少した。*ATRX* が欠損した細胞で p53 を欠損させると、G4 DNA ヘリカーゼや FANCD2 タンパク質は増加した。このことから、*ATRX* がゲノムの完全性を維持していること、そして、*ATRX* の欠損が関与する神経芽腫細胞の複製ストレスによる DNA 傷害が、*TP53* が欠損することで DNA 修復機構と複製フォークの安定化により緩和されることが示唆された。さらに我々は、これらの細胞株において、ALT が関連する PML body や c-circle などの染色体外テロメア DNA など、ALT の特徴を調べ、*ATRX* 欠損のみでは ALT の活性化に十分ではないことを確認した。

本研究の成果はネイチャーパブリッシンググループの科学雑誌 *Oncogenesis* (2021 年) に掲載された。また、本研究が関連する過去の論文報告や知見をとりまとめ、「テロメア異常がどのように神経芽腫のバイオロジーを制御しているか」とのタイトルで総説論文として *Biomolecule* (2021 年) に掲載した。(論文リスト参照)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Mohammad Sazzadul Islam, Ryo Takano, Tomoki Yokochi, Jesmin Akter, Yohko Nakamura, Akira Nakagawara & Yasutoshi Tatsumi	4. 巻 19:542
2. 論文標題 Programmed expression of pro-apoptotic BMCC1 during apoptosis, triggered by DNA damage in neuroblastoma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-019-5772-4	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 Zhenghao Li, Hisanori Takenobu, Amallia Nuggetsiana Setyawati, Nobuhiro Akita, Masayuki Haruta, Shunpei Satoh, Yoshitaka Shinno, Koji Chikaraishi, Kyosuke Mukae, Jesmin Akter, Ryuichi P. Sugino, Atsuko Nakazawa, Akira Nakagawara, Hiroyuki Aburatani, Miki Ohira & Takehiko Kamiyo	4. 巻 37(20)
2. 論文標題 EZH2 regulates neuroblastoma cell differentiation via NTRK1 promoter epigenetic modifications	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 2714-2727
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-018-0133-3	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 Akter Jesmin, Katai Yutaka, Sultana Parvin, Takenobu Hisanori, Haruta Masayuki, Sugino Ryuichi P., Mukae Kyosuke, Satoh Shunpei, Wada Tomoko, Ohira Miki, Ando Kiyohiro, Kamiyo Takehiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Loss of p53 suppresses replication stress-induced DNA damage in ATRX-deficient neuroblastoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogenesis	6. 最初と最後の頁 73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41389-021-00363-6	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 Akter Jesmin, Kamiyo Takehiko	4. 巻 11
2. 論文標題 How Do Telomere Abnormalities Regulate the Biology of Neuroblastoma?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1112~1112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom11081112	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 Takatori Atsushi、Hossain MD. Shamim、Ogura Atsushi、Akter Jesmin、Nakamura Yohko、Nakagawara Akira	4. 巻 11
2. 論文標題 NLRR1 Is a Potential Therapeutic Target in Neuroblastoma and MYCN-Driven Malignant Cancers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 669667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2021.669667	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 AKTER JESMIN
2. 発表標題 p53 deficiency limits ATRX loss induced replication stress and genome instability in neuroblastoma cells
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 AKTER JESMIN
2. 発表標題 Genetic inactivation of ATRX can induces ATM dependent DNA damage response in neuroblastoma (NB) cells
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 AKTER JESMIN
2. 発表標題 ATM/CHK2/P53 PATHWAY INACTIVATION IS REQUIRED FOR ATRX-MUTATION-RELATED TUMORIGENESIS
3. 学会等名 国際小児腫瘍学会の第50回大会 (SIOP), 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yutaka Katai, Akter Jesmin
2. 発表標題 CRISPR-Cas9システムを用いた神経芽腫におけるATRX欠損の影響
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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1件

国際研究集会 国際小児腫瘍学会の第50回大会 (SIOP), 2018	開催年 2018年 ~ 2018年
--	----------------------

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
---------	---------