

# CRISPR-Cas9 スクリーニング： 創薬を前進させる強力なアプローチ

## Introduction

機能ゲノミクススクリーニングが可能になったことで、複雑な生物学的疑問を解決するための、オープンエンドで仮説を生み出すような研究が活発化している。CRISPR-Cas9スクリーニングでは、最大数千の遺伝子の並列改変をハイスループットで行い、遺伝子機能と生物学的経路の相互作用を探索する。このプラットフォームは、効率的なホモ接合性遺伝子ノックアウトを可能にすることで高い再現性を示し、機能ゲノミクスの評価におけるゴールドスタンダードとなっている。

CRISPR-Cas9スクリーニングでは、ゲノムの摂動を作成し、定義された表現型反応を測定し、結果を統計解析して遺伝子破壊と測定された表現型との関連を同定する必要がある。CRISPR-Cas9スクリーニングは、偏りのない全ゲノムスクリーニング、あるいは特定の遺伝子ターゲットに焦点を当てたスクリーニングのいずれでも、創薬パイプラインの複数の段階を進めることができる。CRISPR-Cas9スクリーンは、創薬の標的遺伝子や遺伝子相互作用の同定と確認、潜在的な合成致死関係の発見、治療薬に対する細胞の生物学的反応の判定、さらには患者の層別化まで可能であるため、どの患者が治療戦略に対して最も受容的であるか、あるいは抵抗力があるかに関する情報を提供する。

創薬パイプラインは、作用機序の研究から患者の層別化、さらには臨床データ結果のさらなる明確化まで、CRISPR-Cas9スクリーニングから多くのことを得ることができる。プール化とアレイ化、どちらのスクリーニングフォーマットを用いるか、またCRISPR-Cas9テクノロジーを選択するかは、問われる問題、試験する材料、必要とされる機能的リードアウトによって決まる。



## CRISPR-Cas9スクリーニングはどのように機能するのか？

CRISPRスクリーニングは、研究者が変異細胞集団の因果関係を評価し、全身レベルでの生物学的パスウェイに対する遺伝的変異の影響を決定することを可能にする強力な調査ツールである。CRISPRスクリーニングは、シングルガイドRNA (sgRNA) とペアになったCas9の力を利用するもので、sgRNAの標的ゲノム部位において二本鎖切断を作り出すことを利用としている。細胞のDNA修復はエラーを起こしやすい性質があるため、最終的には遺伝子機能の特定の喪失をもたらす突然変異が生じる。CRISPRスクリーニングは、ノックアウト (KO) 作製だけにとどまらない。両方のヌクレアーゼ部位が触媒的に不活性化されたCas9 (dead Cas9, dCas9) を利用することで、遺伝子発現を調節することも可能である。dCas9はDNAと結合する能力を保持しているため、指定された遺伝子の転写開始部位またはその近傍にdCas9をリクルートするシングルガイドRNA配列を用いて、遺伝子発現の抑制または活性化のいずれかによる調節が可能となる。

これにより、CRISPRスクリーニングツールキットは多様化し、研究者が答えようとしている疑問に応じて、CRISPRスクリーニングを機能喪失や機能獲得の読み出しを評価するために拡張できるようになった。CRISPR遺伝子転写抑制（CRISPR interference: CRISPRi）は、機能喪失（loss-of-function: LoF）スクリーニングツールであり、dCas9を定義された遺伝子座に標的化し、転写をブロックする。dCas9を転写抑制因子に融合させることで、サイレンシングがさらに強化される。CRISPRkoとCRISPRiの2つの機能喪失（loss-of-function）スクリーニングを並行して行うことは、それぞれのCRISPRスクリーニング技術に特有のヒットを同定するだけでなく、オルソログ技術によるヒットを直接検証することができ、特に有益であることが明らかとなった。

#### CRISPRiは以下のことに応用できる：

- 増幅された遺伝子座における遺伝子抑制効果の研究
- 薬剤性の影響をより詳細にモデル化する
- hypomorphicな変異と部分的LoFのシミュレーション
- 必須遺伝子の抑制効果の研究
- 非タンパク質コード領域（lncRNAなど）を対象とする
- オルソログツールによるKOやRNAiの検証

CRISPR遺伝子転写活性化(CRISPR activation: CRISPRa)では、CRISPR-dCas9が遺伝子活性化因子をsgRNA指向性遺伝子座に特異的にターゲティングする。CRISPRaシステムは、標的遺伝子座に活性化因子を導入し、遺伝子発現を増強する。CRISPRaスクリーニングは、単独のツールであるだけでなく、CRISPRi LoF評価と並行して用いることもできる。CRISPR-Cas9スクリーニング技術により、遺伝子の挙動を直接検証することで、これらのアプローチとの組み合わせスクリーニングにより、スクリーニング結果をさらに強化することができる。

#### CRISPRaは次のような用途に応用できる：

- 遺伝子を活性化する効果の研究
- 非タンパク質コード領域（lncRNAなど）をターゲットにする
- 逆機能オルソログツールによるLoFの検証
- ネットワーク解析のためのデュアルスクリーニング

## プール化スクリーニングとアレイ化スクリーニング

プール化スクリーニングは、CRISPRの構成要素を単一の細胞プールに大量に投与し、編集された集団を作り出すプロセスである。このアプローチはスケーラブルであり、全ゲノムスケールにも容易に対応できる。しかし、読み出し能力には限界があり、アッセイには通常、数週間という長い時間が必要となる。プール化スクリーニングは、摂動や治療が細胞のフィットネスや増殖にどのような影響を与えるかといった疑問に答えるのに有益である。ディープシーケンスで測定されたガイドRNAの数量のリードアウトがあれば、どの摂動細胞が集団から失われたのか、あるいは濃縮されたのかを観察することは容易である。生存率リードアウトを用いたプール化スクリーニングは、薬剤-遺伝子相互作用だけでなく、遺伝的相互作用の調査にも利用できる。

表現型プール化スクリーニングは、抗体染色やレポーター細胞を利用することによっても可能で、プールされた編集細胞集団から定義された集団を選別し、ディープシーケンスによってガイドRNAの存在量を調べることができる。表現型スクリーニングの用途としては、バイオマーカー解析、遺伝子機能と細胞分化の関連づけ、毒性やアポトーシスの評価などがある。

アレイ化スクリーニングはより個別化されたもので、各サンプルを別々に見て、より詳細な情報を得る。例えば、特定の条件下でのみ遺伝子を発現する細胞を調べるようなものである。アレイ化スクリーニングはマルチウェルプレートで行われ、高いスループットと自動化が可能である。各ウェルには個々の摂動が含まれ、この配置は多重または多重リードアウトに適しており、より複雑なモデルの可能性がある。これらのアッセイは、プール化スクリーニングの長いアッセイ時間に比べ、48-144時間という短い時間枠を示す。

Table 1: CRISPRスクリーニングアプローチの概要

プール化スクリーニング	アレイ化スクリーニング
プールされた編集細胞集団	ウェルごとの個々の摂動
全ゲノムレベルのスクリーニングまで	低～高スループット
限定的リードアウト (NGS連動)	複数または多重リードアウト
増殖または表現型解析 (例：FACS)	複雑な増殖モデルが可能 (例：3D、共培養)
長いアッセイタイムポイント	短いアッセイタイムポイント (48～144時間)

## CRISPRスクリーニングの複雑なモデルへの応用

複雑なCRISPRスクリーニングモデルは、臨床により関連した科学的背景を提供することができる。これには、スフェロイドやオルガノイドのような3Dモデルも含まれ、免疫学や共培養スクリーニングパラダイム、*ex vivo*や*in vivo*での検証、コンビナトリアルディスカバリー、単一細胞のトランスクリプトームリードアウトと個々の摂動を関連付ける単一細胞RNAseqの研究にも使用できる。それぞれの複雑なモデルへの応用には、CRISPRコンポーネントを提供し、答えを求める研究課題に基づいたスクリーニングを実行するためのカスタマイズされたアプローチが必要である。

### 3Dモデル

3Dモデルは、腫瘍やその他の疾患における複雑な細胞間相互作用をより正確に再現する。スフェロイドやオルガノイドを利用した3Dスクリーンは、より包括的な評価を可能にし、臨床に強く関連するデータをもたらす。

### 初代T細胞モデル

CRISPRスクリーニングでは、プライマリーモデルを使用することもできる。例えば、代理モデルとは異なり、プライマリーT細胞を使用することで、生物学的能力を完全に反映させることができる。

### in Vivoモデル

CRISPRスクリーニングを*in vivo*で行い、腫瘍増殖に対するゲノム摂動の影響を調べることができる。これを*in vitro*スクリーニングと組み合わせることで、*in vivo*環境に特異的な表現型反応を同定することができる。

### 組み合わせモデル

コンビナトリアルCRISPRスクリーニングは、2つの遺伝子座に同時にCRISPR摂動を生じさせるために定義されたガイドの組み合わせを用いて試験することができる。このテストは、依存関係の発見、機能的パラログの検証、冗長遺伝子ファミリーの調査に役立つ。しかし、並行して研究できる遺伝子摂動の数には限界があり、スクリーニング形式の選択に制限が生じる。

## シングルセルモデル

シングルセルRNAseq連動CRISPRスクリーニングは、CRISPR編集ごとに非常に豊富なトランスクリプトームデータを提供できる複雑なアプリケーションである。また、マルチプレックスアッセイフォーマットで実施することで、それぞれの摂動から得られるリードアウトを濃縮することも可能である。シングルセルCRISPRスクリーニングは、プールされた編集集団を使用し、高スループットを可能にし、全トランスクリプトームリードアウトを個々の摂動にリンクさせることにより、プール化CRISPRスクリーニングとアレイ化されたCRISPRスクリーニングの長所を組み合わせたものである。この技術は、複雑な生物学的現象をモニターし、包括的なデータセットを提供し、複雑で多重化された表現型シグネチャーの探索を可能にする。

## CRISPRスクリーニングに関する考察

どのCRISPRスクリーニングフォーマットを使用するかを計画する際には、複数の考慮事項が必要である。

### 1. モデルタイプ

最初に考慮すべきことは、スクリーニングの動機と、どのようなモデルタイプが最適かということである。二次元がん細胞株が目下の疑問に対する答えを与えてくれるのか、それとももっと複雑なモデルが必要なのか。選択したモデルの細胞数の可用性は、細胞がレンチウイルス導入に適しているかどうかと同様に、スクリーニング形式の選択に大きく影響する。非レンチウイルス導入法も可能であるが、スクリーニングの規模に影響する可能性がある。

### 2. ライブラリー

次に考慮すべきことは、偏りのない全ゲノムスクリーニングか、特定のタンパク質セットに注目したサブライブラリーか、あるいはフォローアップ標的検証を行うかである。利用するライブラリーの規模によって、どのスクリーニングアプローチをとるかが決まる。

### 3. テクノロジー

どのような形のCRISPR技術が研究課題に取り組みの適切かを決定する。例えば、CRISPR koやCRISPRiを用いたLoFスクリーニングを用いるべきか、CRISPRaを用いた機能獲得スクリーニングを用いるべきか、あるいはクロスバリデーションヒットの可能性を提供することで信頼性を強化するために、並行して行われるCRISPR技術の組み合わせを利用すべきか。

#### 4. 治療

研究課題の目的は、スクリーニングのフォーマットを決定するのに役立つ。例えば、異なる細胞背景を比較する遺伝的相互作用スクリーニングなのか、1つ以上の化合物による治療に対する反応を調べる薬物-遺伝子相互作用スクリーニングなのか。

#### 5. リードアウト

NGSや表現型など、必要とされる読み出しのタイプを決定することは、どのスクリーニングアプローチが適切かを決定するのに役立ち、標的の質問に答えるためのテラーメイドのオプションを可能にする。

モデル、ライブラリー、テクノロジー、治療法、リードアウトに関する理論的根拠を組み合わせることで、研究者は、プール化、アレイ化、シングルセルスクリーンなど、どのフォーマットを使用するかを事前に計画し、機能ゲノミクスの研究に不可欠なデータアウトプットを用いて、高度に最適化された効率的なCRISPRスクリーニング実験を実施することができる。

## Summary

CRISPRスクリーニングは、ゲノムワイドな遺伝子機能解析を可能にする。典型的なCRISPRスクリーニングのワークフローは、sgRNAライブラリーのデザイン、CRISPR試薬による細胞導入、アッセイによるスクリーニング、リードアウト、およびヒットの同定を含む。CRISPRko、CRISPRa、CRISPRi技術を用いたCRISPRスクリーニングにより、研究者は数百から数千の遺伝子の生物学的活性を調べ、特定の生物学的経路に重要な遺伝子を同定し、創薬標的を見つけ、患者を層別化し、その他多くの重要な生物学的応用に光を当てることができる。

不死化細胞株、初代細胞、あるいは複雑なモデルを用いて、CRISPRスクリーニングをプール化、アレイ化、あるいは単一細胞スクリーニングとして、目標、スケジュール、予算に優先順位をつける柔軟なライブラリーとフォーマットで実施することができる。これにより、研究要件を満たす最も強固で効率的なスクリーニング方法を見つけることができる。

This whitepaper was based on a webinar presented by Joanna Gawden-Bone (Manager, Cell-Based Screening, Revvity).

The Revvity logo is displayed in a lowercase, sans-serif font. It is positioned in the bottom right corner of the page, above a yellow wavy graphic element that spans the width of the page.