

## CRISPRa: ゲノムワイドCRISPR遺伝子活性化による転写アップレギュレーションスクリーニング

Carlos le Sage & Benedict CS Cross

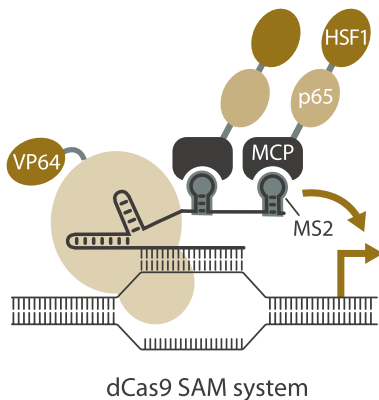
Horizon Discovery, 8100 Cambridge Research Park, Waterbeach, Cambridge, CB25 9TL, United Kingdom

### はじめに

CRISPR-Cas9を使用したプール化スクリーニングの変革的影響に基づいて、研究者たちは触媒活性が不活性化Cas9 (dCas9) を開発し、遺伝的出力の調整に使用できることを実証しました。これらのシステムは、それぞれCRISPRi (干渉) およびCRISPRa (活性化) として知られています。

Horizon Discoveryは、ヒトの全ゲノムCRISPR-Cas9ノックアウトとCRISPRi-dCas9プラットフォームの両方を開発し、両方のシステムの能力の実証として、機能喪失型スクリーニングを通じたBRAF阻害剤ベムラフェニブに対する耐性遺伝子を同定しました。

ここでは、ヒト全ゲノムCRISPRaプラットフォームを紹介し、その有効性を、ベムラフェニブ細胞増殖抑制条件下での機能喪失スクリーニングを通じて同定されたものと相補的な耐性遺伝子を同定することによって実証します。転写を数桁レベルで強化する機能は新しい手法であり、CRISPRaによって駆動される機能獲得プラットフォームに基づく耐性メカニズムを探索する機会を研究者に提供するものです。



dCas9 SAM system

図1. HorizonのCRISPR遺伝子活性化、またはCRISPRaスクリーニングプラットフォームは、触媒活性を不活性化したCas9とSynergistic Activation Mediator (SAM) システムを使用します (Konermann et al, 2015)。

### プラットフォーム設計

CRISPRaスクリーニングには、図1で前述したFeng Zhang研究室のSynergistic Activation Mediator (SAM) システム (Konermann et al, 2015) を使用しました。このシステムは、dCas9-VP64を発現するレンチウイルスベクター、MS2-p65-HSF1を発現するレンチウイルスベクター、および、U6プロモーター駆動のガイドRNAカセット (MS2-p65-HSF1の活性化モジュールへの結合を容易にするために改変されたtracrRNAを備えています) を含むレンチウイルスベクターで構成される3コンポーネントプラットフォームです。Horizonは、Horlbeck et al (2016) による最新の改良ガイドRNA設計に基づいて、ヒト全ゲノムguideRNAライブラリーを構築しました。この第2世代のhCRISPRaライブラリーには、合計19,050の遺伝子をターゲットとする遺伝子あたり5つのガイドRNAが含まれています。

### 概念実証スクリーニング

概念の証明として、ゲノムワイドのポジティブ選択スクリーニングを実行し、ベムラフェニブ耐性 (PLX-4032) に関連する遺伝子を同定しました。ベムラフェニブはBRAFキナーゼ阻害剤で、BRAF V600E機能獲得型変異を有するA375メラノーマ細胞で細胞増殖抑制作用があることが示されています (Davies et al, 2002; Flaherty et al, 2010; Shalem et al, 2014)。

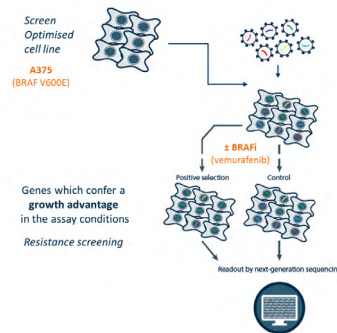


図2. スクリーニング概略

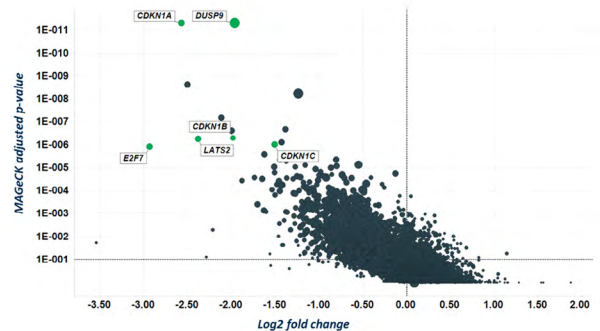
CRISPRaスクリーニングによりベムラフェニブに対する耐性をモニタリングし、プラットフォームのパフォーマンスを評価しました。

16日間のベムラフェニブ処理後、スクリーニング完了後のペレットを採取し各ガイドRNAの相対量を次世代シーケンシングによって測定しました。

### CRISPRaスクリーニングプラットフォームの検証

最初に、DMSOコントロールで処理した細胞のガイドRNAの存在量を、プラスミドライブラリーで処理した細胞のガイドRNAの存在量と比較し、主に細胞周期の負の調節に大きく関与する遺伝子が著しくドロップアウトすることを観察しました。これらの結果は、細胞分裂の遮断を制御する遺伝子の過剰活性化に対する予想される応答と一致し、遺伝子座特異的遺伝子発現増幅を生成するこのプラットフォームの能力の貴重な品質管理測定を提供します。

図3. CRISPRaスクリーニングの過程で選択的にドロップアウトする遺伝子



過剰発現すると、細胞の生存に有害な影響を引き起こすことが予想され、それゆえスクリーニングで“ドロップアウト”する細胞周期のインヒビターが特定されました。

## CRISPRaスクリーニングヒット同定

遺伝子レベルのヒット識別は、各遺伝子をターゲットとするそれぞれのガイドの同化スコアを使用して行われました。ベムラフェニブ耐性は、主に受容体チロシンキナーゼ (RTK)、Gタンパク質共役受容体およびインテグリン (ITG) シグナル伝達経路に関与する遺伝子の活性化の増強によって付与されました。これらの経路の活性化は、BRAFキナーゼシグナル伝達の抑制を回避するもので、以前に公開されたデータ (Konermann et al, 2015) と一致します。

さらに、これまでゲノムワイドなスクリーニングで特定されていなかったこれらのメカニズムのそれぞれの経路の遺伝子が、概念実証スクリーニングで同定されました。

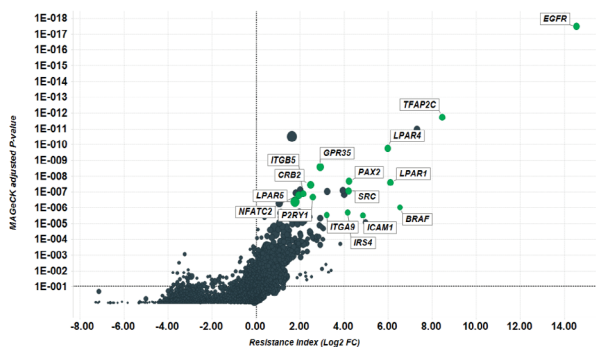


図4: ベムラフェニブについてのCRISPRaスクリーニング分析からのデータで、各遺伝子のlog2倍濃縮と関連するp値を示しています。強調表示されたヒットは、旧ライブラリーを使用したCRISPRaスクリーニングによって既に以前に識別および検証されているものです (Konermann et al, 2015)。

重要なことは、選択された耐性のトップヒットの個々のガイドRNAの評価では、うまく機能しなかったガイドRNAはごくわずかであることです。それは総体的にCRISPRaの堅牢性を示し、ベムラフェニブへの耐性につながる遺伝子発現を効果的にアップレギュレートする能力を反映しています。

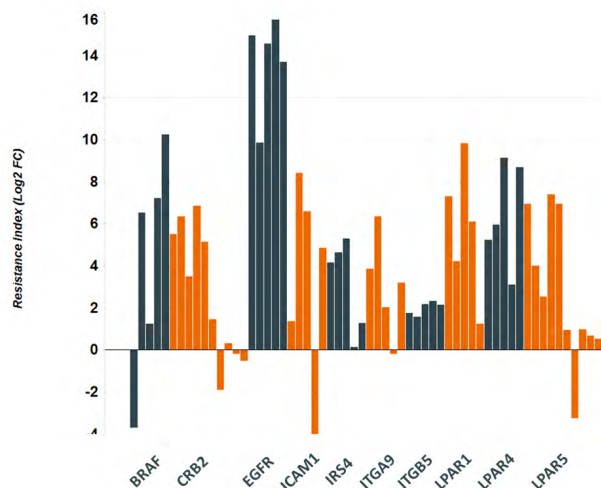


図5: CRISPRa ベムラフェニブスクリーニング分析のデータ: 選択した各遺伝子レベルのヒットをターゲットとする各ガイドのlog2倍濃縮を示しています。

同じ実験パラダイムを評価している以前に実施されたスクリーニングとHorizonの最新のデータセットを比較すると、Konermann et al (2015) によって同定されたすべての遺伝子もHorizonのスクリーニングで同定され

ており、優れたレベルで一致していることが明らかになりました。全般として、比較されたこの新しいプラットフォームを使用したことにより、各ヒットの堅牢性とマグニチュードは増強されました (Horlbeck et al, 2016)。

さらに、私共のスクリーニングでは、検証済みのヒットと同じ遺伝的経路に該当するか、治療法開発の新たな機会を表す等の、多数の追加のヒットが特定されました。

GENE	RRA Score	p-value	FDR	Rank	LogFC
EGFR*	3.11E-18	2.64E-07	0.000825	1	14.097
TFAP2C	2.47E-12	2.64E-07	0.000825	2	8.4113
GENE	1.32E-11	2.64E-07	0.000825	3	7.5401
GENE	8.51E-11	2.64E-07	0.000825	4	1.385
LPAR4	1.25E-10	2.64E-07	0.000825	5	5.9706
GPR35	2.29E-09	2.64E-07	0.000825	6	2.8763
GENE	2.05E-08	7.93E-07	0.00165	7	4.1775
LPAR1	2.63E-08	7.93E-07	0.00165	8	5.9617
CRB2	2.79E-08	7.93E-07	0.00165	9	2.2622
GENE	6.79E-08	1.32E-06	0.002166	10	1.8138
SRC	1.05E-07	1.59E-06	0.002166	11	4.1304
GENE	1.34E-07	1.85E-06	0.002166	12	3.7063
GENE	1.36E-07	1.85E-06	0.002166	13	2.2585
ITGB5*	1.38E-07	1.85E-06	0.002166	14	2.1651
LPAR5	1.49E-07	1.85E-06	0.002166	15	2.0537
GENE	1.61E-07	1.85E-06	0.002166	16	3.8346
P2RY1	2.43E-07	2.38E-06	0.002621	17	2.4375
GENE	2.66E-07	2.64E-06	0.00275	18	1.7958
GENE	5.12E-07	2.91E-06	0.002866	19	3.1365
GENE	7.70E-07	3.44E-06	0.003218	20	1.4929
GENE	1.17E-06	7.67E-06	0.006836	21	1.1072
ITGA9	1.57E-06	9.78E-06	0.007807	22	3.1412
GENE	1.66E-06	1.03E-05	0.007807	23	1.7808
GENE	1.68E-06	1.03E-05	0.007807	24	1.4059
RAPGEF6	1.71E-06	1.08E-05	0.007807	25	1.9992

表1: 将来の検証のために、以前に同定されたヒット (緑色) と新規遺伝子 (匿名; GENE) を示したヒットIDテーブル

\* CRISPRiで感受性ヒットとして識別された遺伝子

## 概要

私たちは、概念実証アプローチを使用し、新しいCRISPRa-dCas9プラットフォームがBRAF阻害剤であるベムラフェニブに対する耐性を生み出す能力を調べました。以前にベムラフェニブ治療に対する耐性を付与することが示されているすべての検証済み遺伝子を特定することができました。

この新しいCRISPRaプラットフォームでは、機能獲得の表現型を研究できるだけでなく、機能喪失と機能獲得の両方の分析によって影響を受ける遺伝子ネットワークを評価することにより、CRISPRiおよびCRISPR-KOベースの機能的ゲノムスクリーニングを補完できるようになります。

## 方法

A375メラノーマ細胞を、dCas9-VP64レンチウイルスに感染させた後、MS2-p65-HSF1レンチウイルスに感染させました。両方とも細胞あたりのコピー数を高めるために高いMOIでウイルスを感染させました。最後に、低いMOIでCRISPRaライブラリレンチウイルスに感染させ、細胞ごとに単一のコンストラクトが確実に組み込まれるようにしました。レンチウイルス導入細胞は、非形質導入細胞を排除するために抗生物質で選択しました。その後、スクリーニング投与フェーズが開始され、細胞集団は、ベムラフェニブ (2μM) またはコントロール (DMSO) を含む培地で、それぞれ2連で処理しました。コントロール処理した細胞が集団倍加16に達したとき、最終ペレットを収集し、ゲノムDNAを抽出し、各条件でのガイドRNA存在量をNGSで計測しました。

## References

- Davies et al., Nature. 2002 Jun 27;417(6892):949-54
- Flaherty et al., N. Engl. J. Med. 2010 Aug 26;363(9):809-19
- Horlbeck, M. A. et al., eLife. 2016; 5
- Konermann, S. et al., Nature. 2015;517(7536):583-8
- Shalem et al., Science. 2014 Jan 3;343(6166):84-7

For more information

ホライゾン・ディスカバリー株式会社  
[horizondiscovery.com/contact-us](http://horizondiscovery.com/contact-us)

©2022 Horizon Discovery Group Ltd and its affiliated companies. All rights reserved.

PerkinElmer is a trademark of PerkinElmer, Inc., registered in the United States and other countries. Horizon Discovery is a trademark mark of Horizon Discovery Ltd. Dharmacon is a trademark of Dharmacon, Inc., All PerkinElmer, Inc., Horizon Discovery Ltd and Dharmacon, Inc. trademarks are used with permission. Other product names and brand names may be trademarks or registered trademarks of their respective owners.

B036-2007-v2

**horizon**  
 a PerkinElmer company