

プール化ライブラリーを使用したCRISPRによる表現型スクリーニングは、癌治療における相乗的な併用療法を同定する

Pooled Phenotypic CRISPR Screening enables the identification of synergistic drug combinations for cancer therapy

David Walter, Ceri Wiggins, Nicola McCarthy, Benedict Cross & Jonathan Moore

単一薬剤療法はしばしば臨床的ベネフィットが限られている。そのため、治療効果を最大化する薬剤併用療法アプローチを同定するために、既存の薬剤と相乗作用するターゲットを同定することが重要である。ホスファチジルイノシトール-4,5-ビスホスフェート3-キナーゼ (PI3K) 阻害剤などの抗がん剤は、しばしば細胞死ではなく増殖停止を引き起こす (Elkabetz et al 2013)。生存した残存腫瘍細胞のいくつかは、その抗がん剤にすでに耐性であるか、耐性の生じる可能性がある (Klempner, Myers, and Cantley 2013)。このような状況の中で細胞死を誘発するターゲットの同定は、癌細胞を排除し、薬物耐性の発生を予防または遅延させるために使用できる可能性がある。

プール化CRISPR-Cas9ノックアウトスクリーニングは、新薬ターゲット同定のための貴重なツールである。しかしながら、既定の薬物の存在下で細胞死を引き起こす遺伝子欠失を探すことによって潜在的な新しい治療的相互作用を見出すことは困難である。ネガティブ選択スクリーニングは、コントロールの未処理集団と比較して、処理集団からのsgRNA配列の欠失に依存する。ガイドRNAの欠失はsgRNAライブラリーのカバレッジによって制限されるため、ガイドRNA量の微妙ではあるが有意な変化を検出するのは困難である。さらに重要なことに、ネガティブ選択ドロップアウト・スクリーニングは、細胞周期停止を引き起こす遺伝子喪失と、細胞死を引き起こす遺伝子喪失を区別することができない。なぜならば、どちらも細胞増殖における細胞の喪失となるためである。

CRISPRスクリーニングの強力な適応は、プール化NGS-linkedスクリーニング戦略と表現型測定との組み合わせによって提供される。この組み合わせ技術を使用することによるスクリーニング戦略は、バイオマーカーシグナルのリードアウトとそれに続けて行うソーティングされた細胞集団のディープシーケンシングによって、複雑な生物学的応答を引き起こす遺伝子の検出を目標としている。Horizon Discovery社はこれまでにFACSを使用したアプローチを開発しており、本アプリケーションノートでは、磁気ビーズを使用したCRISPRを使用した細胞死に基づくポジティブ選択スクリーニングも展開できることを示す。

トリプルネガティブ乳癌細胞株においてPI3K阻害剤との相乗効果を示すターゲットの探索

トリプルネガティブ乳癌 (Triple Negative Breast Cancer; TNBC) 細胞株にPI3K阻害剤を処理しても、処理された細胞の大部分において強力な細胞死を誘導しない。そこで、MDA-MD-231細胞をpan PI3K阻害剤GDC-0941で24時間低血清条件下で処理し、次いで細胞をAnnexin V陽性およびAnnexin V陰性の2つの集団に分類した。これらの2つの集団のsgRNA存在量についてNGSを用いて分析した (図1)。

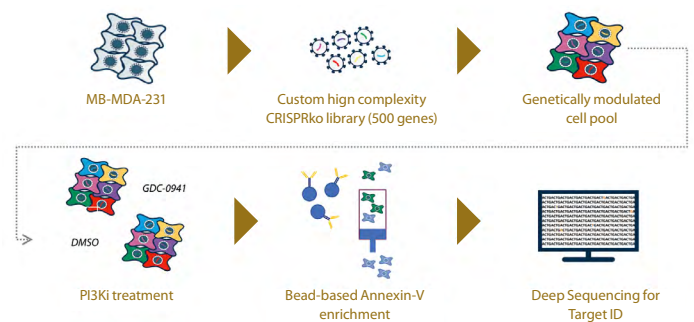


図1. CRISPR細胞死スクリーニングのセットアップ (Arroyo et al 2016) 死細胞集団におけるsgRNA数を解析することで、pan PI3K阻害剤GDC-0941の存在下で細胞死を誘導するsgRNAを同定し、薬剤併用療法に適したターゲットの同定が可能にする。

Log₂倍率変化に基づいたアネキシンV陽性集団におけるもっとも濃縮された遺伝子の疾患アノテーション分析は、乳癌に関連する上位22の濃縮された遺伝子のうちの6つと最も関連する疾患として乳腺新生物を明らかにした (図2)。EGFRは、PI3K-AKT経路阻害剤との既知の相乗的ターゲットであり、この組み合わせは現在臨床試験中である。Target 9は、アポトーシス促進タンパク質BADを阻害するキナーゼをリン酸化することによって細胞生存を促進する。

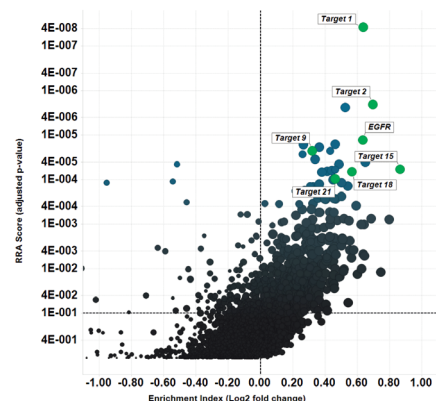


図2. トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) 細胞株MDA-MB-231におけるCRISPR細胞死スクリーニングは、pan PI3K阻害剤GDC-0941と相乗作用する既知および新規ターゲットを明らかにした。

各遺伝子について、Roust Ranking Aggregation (RRA)スコアでプロットしたところ、正のLog₂倍率変化が観察されたものがあった。これは、ターゲット遺伝子の欠失が細胞死を促進することを示す (Li et al 2014)。

いくつかの潜在的なヒットについてのガイドRNAの分析は、ガイドRNAが細胞死スクリーニングにおいて一貫して機能し、アネキシンV陽性細胞の選択がPI3K阻害剤と相乗作用する潜在的な薬物ターゲットを同定するための堅牢な方法であることを示した(図3)。

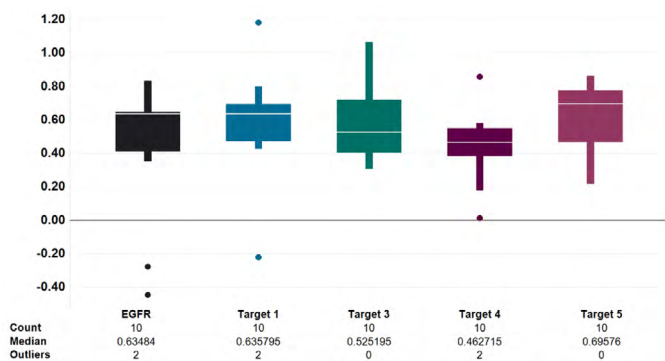


図3. 細胞死スクリーニングにおけるガイドRNA分析

PI3K阻害の存在下でのアネキシンV陽性細胞集団における上位5つの濃縮した遺伝子をターゲットとするガイドRNAの分析は、10のガイドRNAのうち少なくとも8つのガイドRNAにおいて一貫したsgRNA挙動を示した。

細胞死のスクリーニングは、pan PI3K阻害剤GDC-0941の存在下で低血清条件下で生存していた細胞の分析も可能にした。この細胞集団で濃縮したガイドRNAの分析により、6つの腫瘍抑制因子(ターゲット1C、ターゲット5C、ターゲット8C、ターゲット10C、ターゲット13C、ターゲット14C)が同定された(図4)。このことは、PI3K阻害に回答した細胞死の誘導にこれらの遺伝子が必要であることを示している。これらの所見は、癌細胞株における細胞死の誘導に、多くの腫瘍抑制因子が影響を及ぼすという知見に一致している。

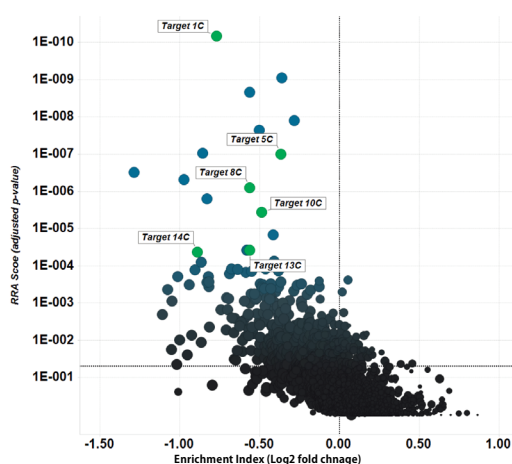


図4. GDC-0941の存在下での細胞死誘導に必要とされる既知および新規のターゲットを明らかにしたCRISPR細胞死スクリーニング

負のlog₂倍率変化は、ターゲット遺伝子の機能喪失は、細胞死から保護することを示している。

まとめと結論

ネガティブ選択スクリーニング、すなわち細胞集団からの細胞の喪失(従ってガイドRNAの喪失)を、アネキシンV発現を用いた死細胞の陽性選択に変えることにより、TNBC細胞株におけるPI3K阻害と潜在的に相乗作用する遺伝子の同定が可能となった。このスクリーニングはまた、低血清条件下でGDC-0941の存在下における細胞死誘導に必要とされる遺伝子を同定した。このアプローチは、PI3K阻害剤と相乗的に作用する既知の相互作用や、これまで細胞死の誘導に関連しているとは見なされていなかった新規相互作用を同定した。これらの知見は、新薬の組み合わせの同定を助け、単剤PI3K阻害剤に対する薬剤耐性の開発の一助となるとと思われる。

方法

「druggable」ゲノムを標的とするHorizon Discovery社の最適化されたCRISPRレンチウイルスライブラリー(Cross et al 2016)にMDA-MD-231細胞を低感染多重度(MOI)で感染させた。感染した細胞を0.5μg/mLピューロマイシンで3日間選択し、その後細胞をさらに10日間増殖させた後、細胞を低血清濃度(2%FBS)を含むメディアムに移した。24時間後、細胞を、1μMのGDC-0941およびDMSOでさらに24時間処理した。アネキシンV陽性の死細胞およびアネキシンV陰性細胞を、磁気アネキシンVマイクロビーズおよび陽性選択LSカラム(Miltenyi Biotec)を用いて精製した。全てのサンプルからゲノムDNAを単離し、sgRNA配列をPCRにより増幅し、各サンプル中のsgRNA存在量をNGSにより分析した。MAGeCKはヒットコールに使用された(Li et al 2014)。

References

- Arroyo, Jason D. et al. 2016. "A Genome-Wide CRISPR Death Screen Identifies Genes Essential for Oxidative Phosphorylation." *Cell Metabolism* 1–11. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.017>).
- Cross, Benedict C. S. et al. 2016. "Increasing the Performance of Pooled CRISPR–Cas9 Drop-out Screening." *Scientific Reports* 6(1):31782. Retrieved (<http://www.nature.com/articles/srep31782>).
- Elkabetz, M. et al. 2013. "MTORC1 Inhibition Is Required for Sensitivity to PI3K P110 Inhibitors in PIK3CA-Mutant Breast Cancer." *Science Translational Medicine* 5(196):196ra99–196ra99. Retrieved (<http://stm.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scitranslmed.3005747>).
- Jacobsen, Kirstine et al. 2017. "Convergent Akt Activation Drives Acquired EGFR Inhibitor Resistance in Lung Cancer." *Nature Communications* 8(1):410. Retrieved (<http://www.nature.com/articles/s41467-017-00450-6>).
- Klempner, S. J., A. P. Myers, and L. C. Cantley. 2013. "What a Tangled Web We Weave: Emerging Resistance Mechanisms to Inhibition of the Phosphoinositide 3-Kinase Pathway." *Cancer Discovery* 3(12):1345–54. Retrieved (<http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/2159-8290.CD-13-0063>).
- Li, Wei et al. 2014. "MAGeCK Enables Robust Identification of Essential Genes from Genome-Scale CRISPR/Cas9 Knockout Screens." *Genome Biology* 15(12):554. Retrieved (<http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-014-0554-4>).
- She, Qing-Bai et al. 2016. "Integrated Molecular Pathway Analysis Informs a Synergistic Combination Therapy Targeting PTEN/PI3K and EGFR Pathways for Basal-like Breast Cancer." *BMC cancer* 16:587. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27484095>).
- Yi, Yong Weon et al. 2013. "Inhibition of the PI3K/AKT Pathway Potentiates Cytotoxicity of EGFR Kinase Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer Cells." *Journal of cellular and molecular medicine* 17(5):648–56. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23601074>).

For more information

ホライゾン・ディスカバリー株式会社
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.

B009-1811-v3

horizon
 a PerkinElmer company