

ヒト初代制御性B細胞におけるアレイ化CRISPRノックアウトスクリーニング

Manolis Gialitakis, Catherine Tarrade, Nicola McCarthy and Cristina Ghirelli

Horizon Discovery, 8100 Cambridge Research Park, Cambridge, UK

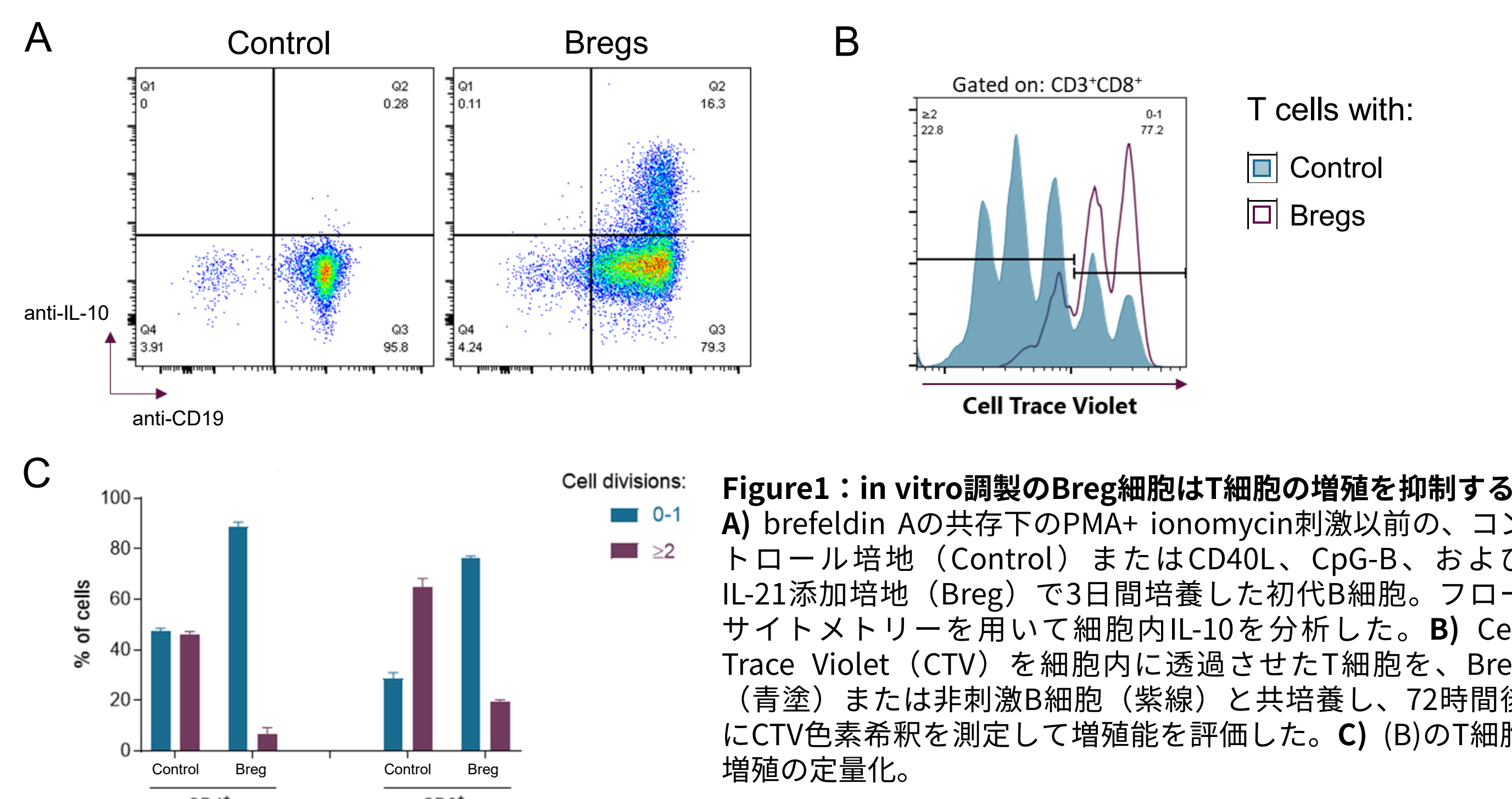
Introduction

CRISPRノックアウト (CRISPRko) スクリーニングは、標的特定と生物学的プロセスに関わるメカニズム解明に広く使用されています。ヒト初代細胞でのスクリーニングは不死化細胞株と比較してより優れたヒト病態モデルを提供します。

健康人ドナーから単離した初代B細胞を用いて、我々は制御性B細胞 (Breg) におけるCRISPRを介したゲノム編集キパビリティを開発しました。Bregは自己免疫疾患の発症や免疫を抑制するがん微小環境の形成に関与するサイトカインであるインターロイキン10 (IL-10) を産生します。我々はin vitroでBreg分化プロトコルを確立し、コンセプト検証としてIL-10産生の調節因子を探索するアレイ化CRISPRkoスクリーニングを実施しました。IL-10制御に関わるいくつかのパスウェイと重要因子の同定に成功し、ヒット遺伝子数種のフォローアップを行いその効果を検証しました。

1次スクリーニングでは、ウェルごとのリードアウトでIL-10産生に対する遺伝子欠失の影響を評価しました。Bregに対するアレイ化CRISPRkoスクリーニングの可能性を最大限に実証するために、T細胞の増殖阻害がBregの抑制性の機能的リードアウトとして働くような共培養アッセイを開発しました。

初代B細胞から機能的な制御性B細胞 (Breg) への分化



Bregのゲノム編集

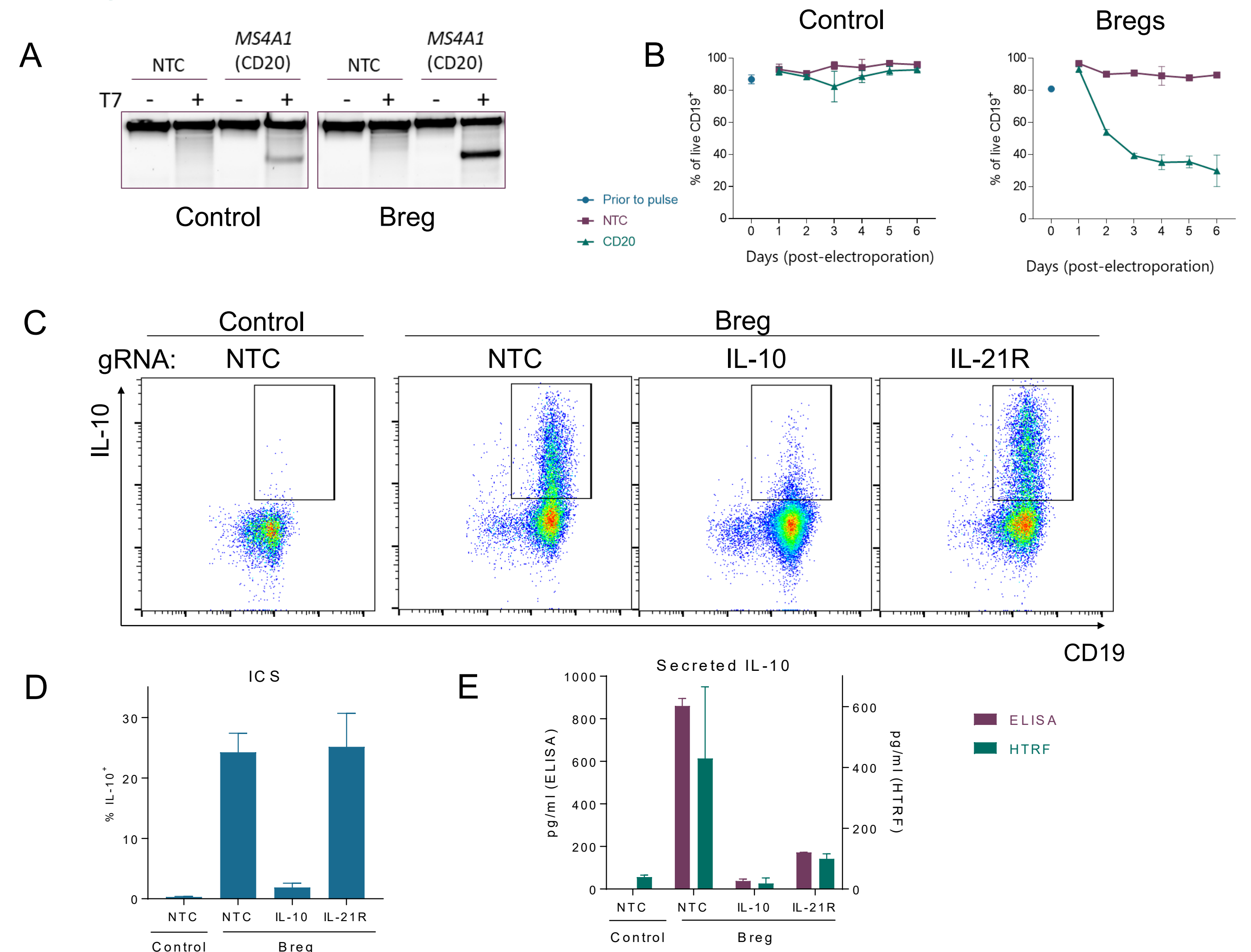


Figure 2: ヒト初代B細胞における効率的なゲノム編集
A) Figure 1記載の手法で培養したControl B細胞またはBreg細胞を、MS4A1 (CD20)コード遺伝子を標的とする化学合成crRNA-tracrRNA、またはNon-Targetingコントロール (NTC) + Cas9でゲノム編集を実施した。T7エンドヌクレアーゼアッセイを用いて編集効率の分析を実施した。**B)** 化学合成crRNA-tracrRNAおよびCas9複合体を導入後の各時間 (X軸) におけるCD20+ B細胞の割合。**C)** IL-10発現のフローサイトメトリー分析結果**D)** (C)の定量化。**E)** (C, D)のサンプル上清中の分泌IL-10のELISAおよびHTRFを測定した。

初代B細胞におけるコンセプト検証アレイ化スクリーニング

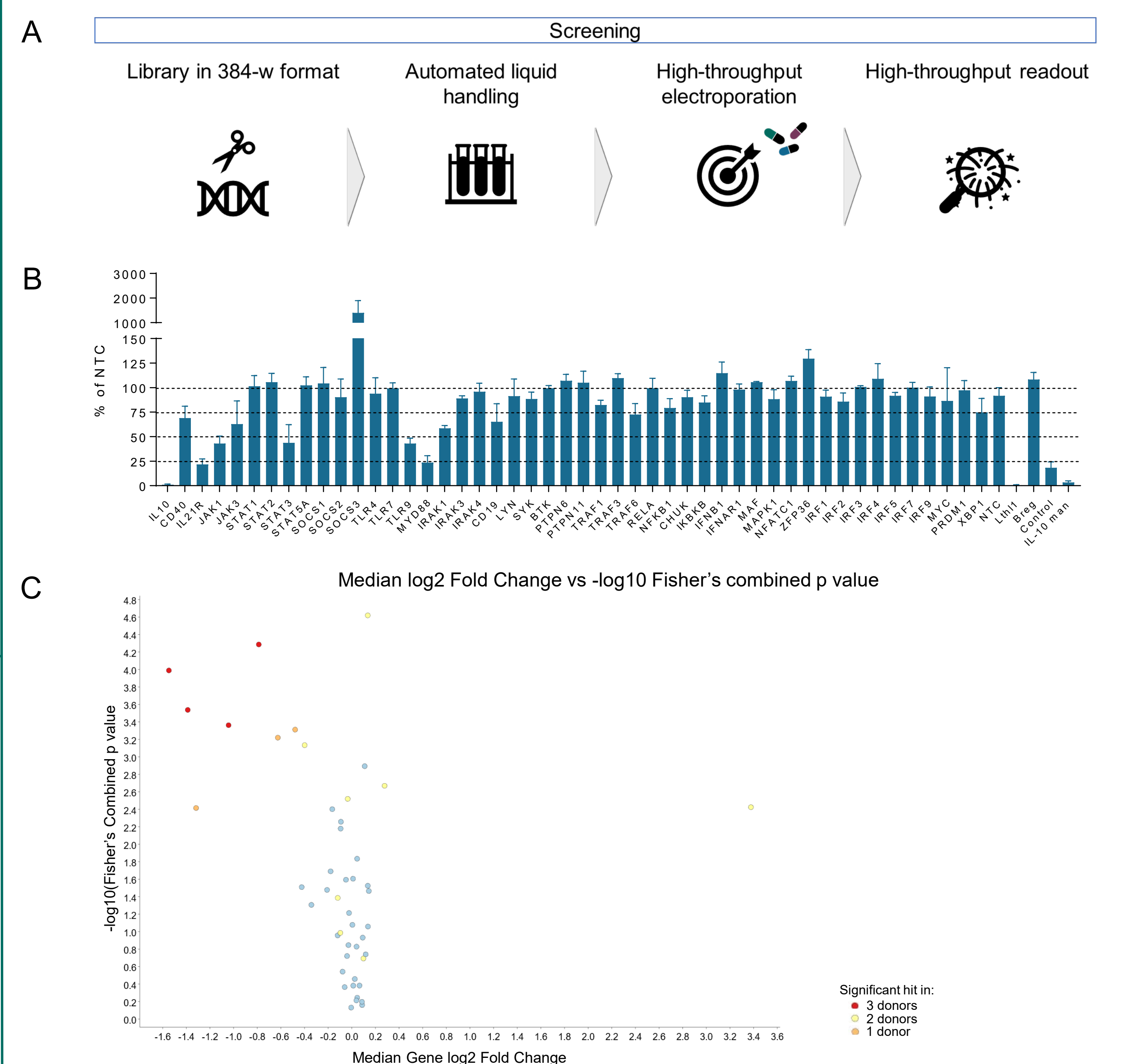


Figure 3: BregにおけるIL-10産生のレギュレーターのアレイ化スクリーニング
A) リードアウトとして生存率とIL-10産生を用いたBreg細胞のアレイ化スクリーニングの概要 (半自動化)。**B)** Breg編集細胞の培養上清中のIL-10分泌量。**C)** 分泌IL-10のlog2 fold changeの中央値 (X軸) vs p値 (Y軸) のボルケーノプロット。3名全ドナーで統計的に有意なヒットは赤、2名のドナーによるものは黄色、1名のドナーによるものはオレンジで表示した。

ゲノム編集されたBregを使用した複雑なリードアウト

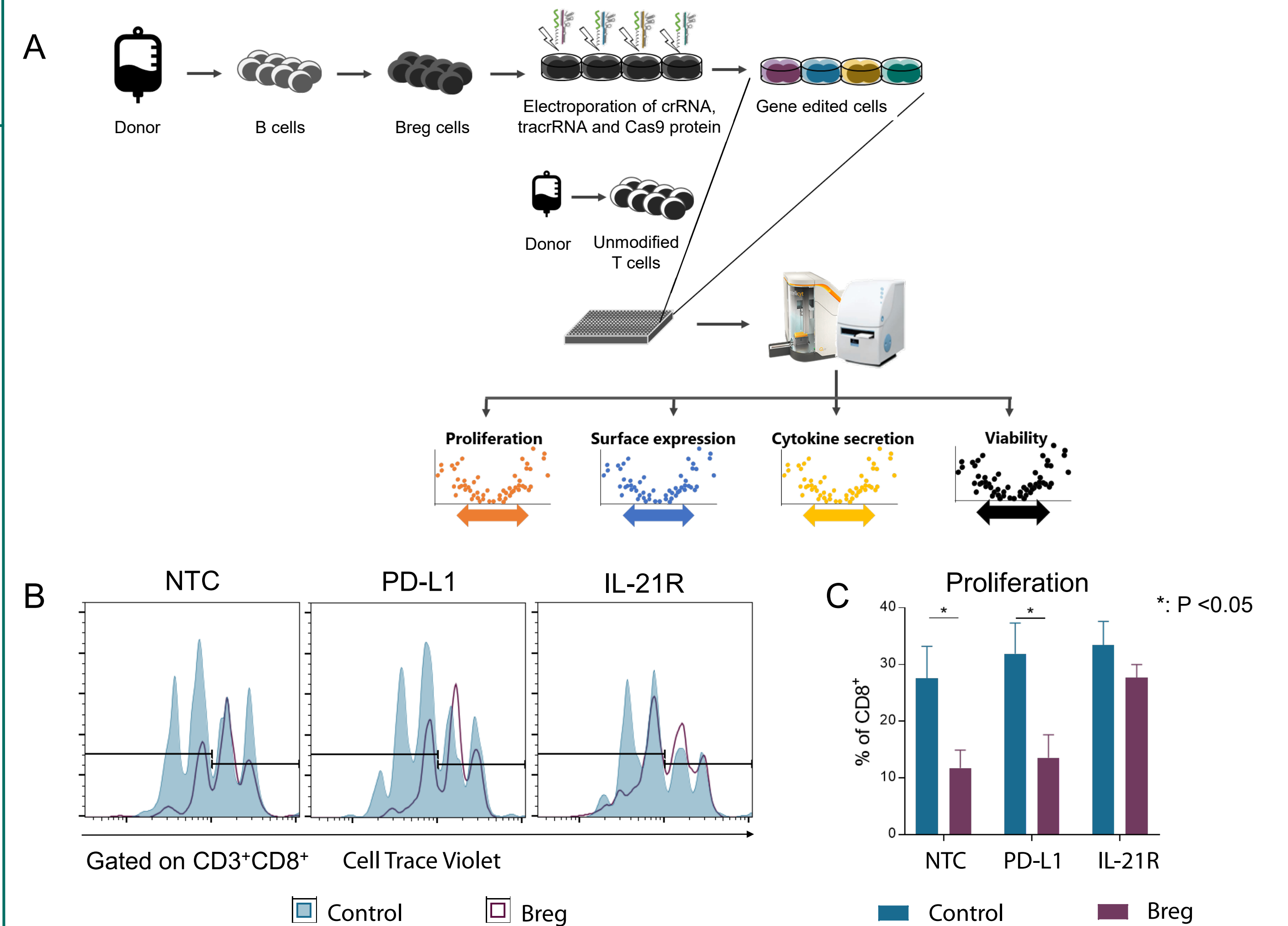


Figure 4: T細胞のBreg抑制にはIL-21R発現が必要
A) ゲノム編集されたBreg細胞は、Breg抑制のメカニズム検討のためのT細胞との共培養など、より複雑なアッセイに使用可。**B)** 未刺激のB細胞 (青塗) またはBreg細胞 (紫線) と共培養した場合のT細胞増殖評価のためのCTV色素希釈測定。PD-L1ではなくIL-21受容体の欠損は、Breg細胞によるT細胞の抑制に影響する。**C)** 2回以上細胞分裂したB細胞の割合を定量化。

Conclusion

このプラットフォームにより、クラススイッチ組換えの調節またはBregを抑制または活性化する化合物などの、B細胞生物学の他の側面の研究が可能になることが期待されます。