

ヒト初代免疫細胞におけるプール化 / アレイ化 CRISPRノックアウトスクリーニング

Verena Brucklacher-Waldert, Bronwyn Joubert, Giles Pergl-Wilson, Sapna Vyas, Glynn Martin, Ben Cross, Philippe Collin, Nicola McCarthy, Simon Scrace, Cristina Ghirelli

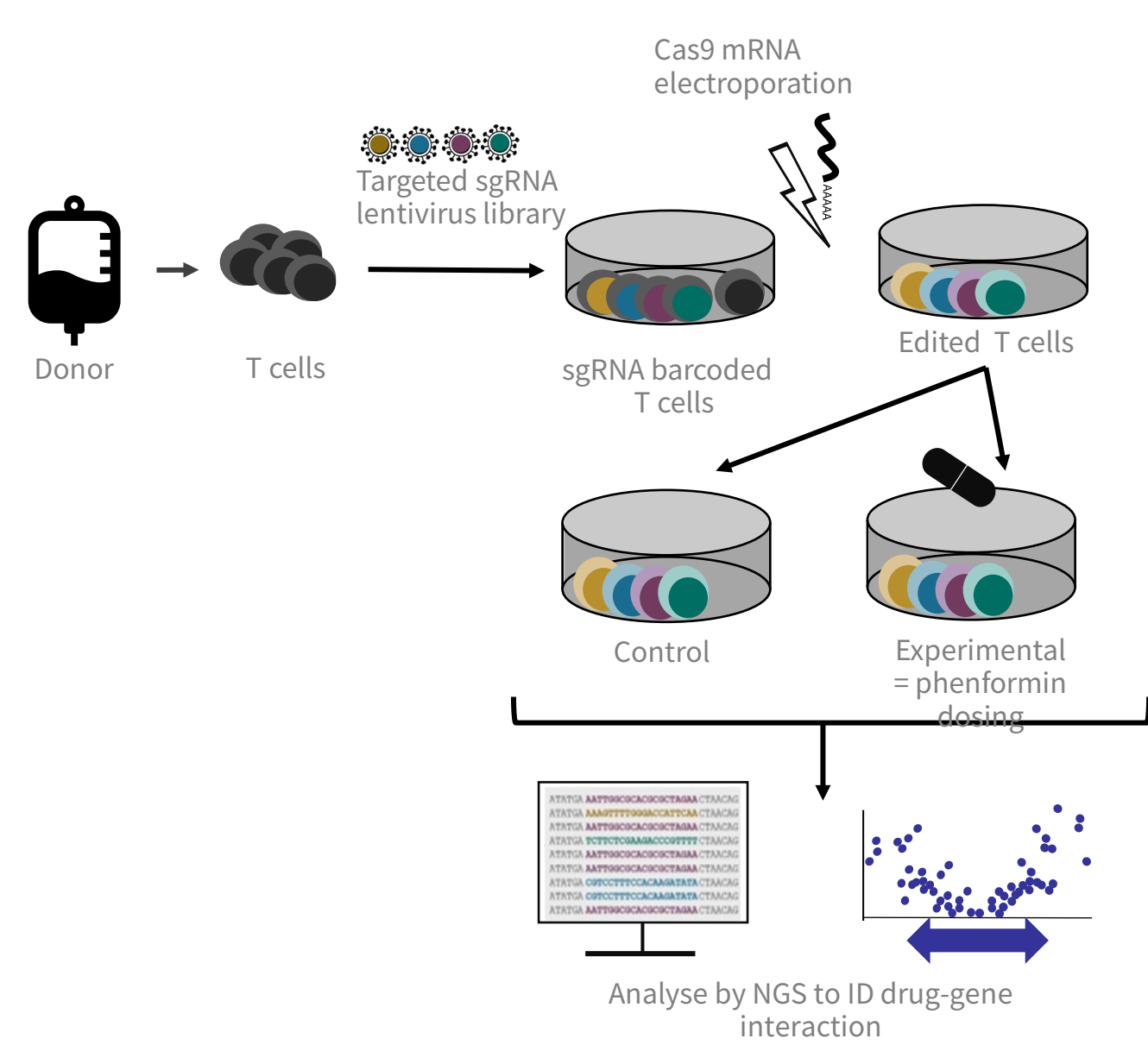
Horizon Discovery Ltd, 8100 Cambridge Research Park, Waterbeach, Cambridgeshire, UK, CB25 9TL

Introduction

ヒト初代免疫細胞のCRISPRノックアウト (CRISPRko) スクリーニングは、細胞背景における臨床に関連する生物学的クエスチョンに答えます。このようなスクリーニングで同定された新規性が高いとされる標的または生物学的挙動は、臨床へのしっかりとしたトランスレーションを促進し、開発にかかるコストや期間を短縮します。また、プール化およびアレイ化CRISPRスクリーニングは異なるクエスチョンに対処します。つまり、プール化スクリーニングは細胞集団レベルでの遺伝子欠損の影響の分析に効果的である一方で、アレイ化スクリーニングでは個別遺伝子をウェルごとに分析でき、複数の表現型解析の実施により適しています。このポスターでは、プール化またはアレイ化プラットフォームを使用して実施したヒト免疫細胞のCRISPRスクリーニングを比較します。

プール化CRISPRkoスクリーニング

ex vivoヒトT細胞におけるプール化CRISPRノックアウトスクリーニングを内因性代謝に関わる482の遺伝子を標的とする4,815の短いシングルガイドRNA (sgRNA) ライブラリー、およびコントロールガイドRNA (152の遺伝子を標的とする2,442のガイドと100のnon-targetingガイドRNA) を用いて実施した。



フレッシュなCD3+ T細胞を健康人ドナーから単離し、抗CD3および抗CD28抗体で刺激、プール化sgRNAライブラリーを形質導入した。

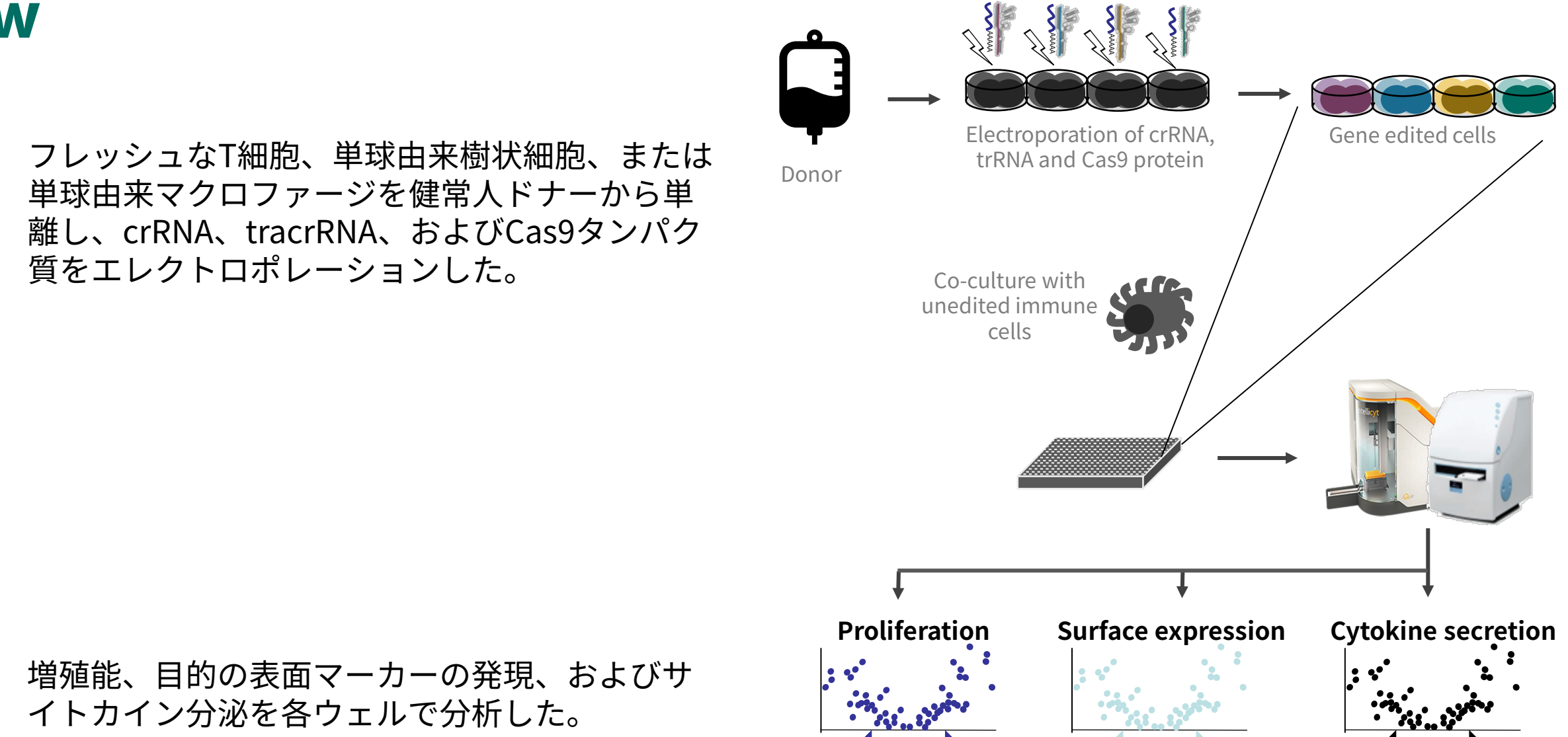
CRISPR-Cas9でゲノム編集した細胞集団のプールはphenformin存在下で17日間培養した (Birsoy et al., 2015)。

次世代シーケンサー (NGS) で各サンプル中のsgRNAの相対的存在量を定量化した。各サンプルはプラスミドライブラリーに対して正規化した。RRA (Li et al., 2014) またはZスコア (Wang et al., 2017) のいずれかを使い比較分析した。

Workflow

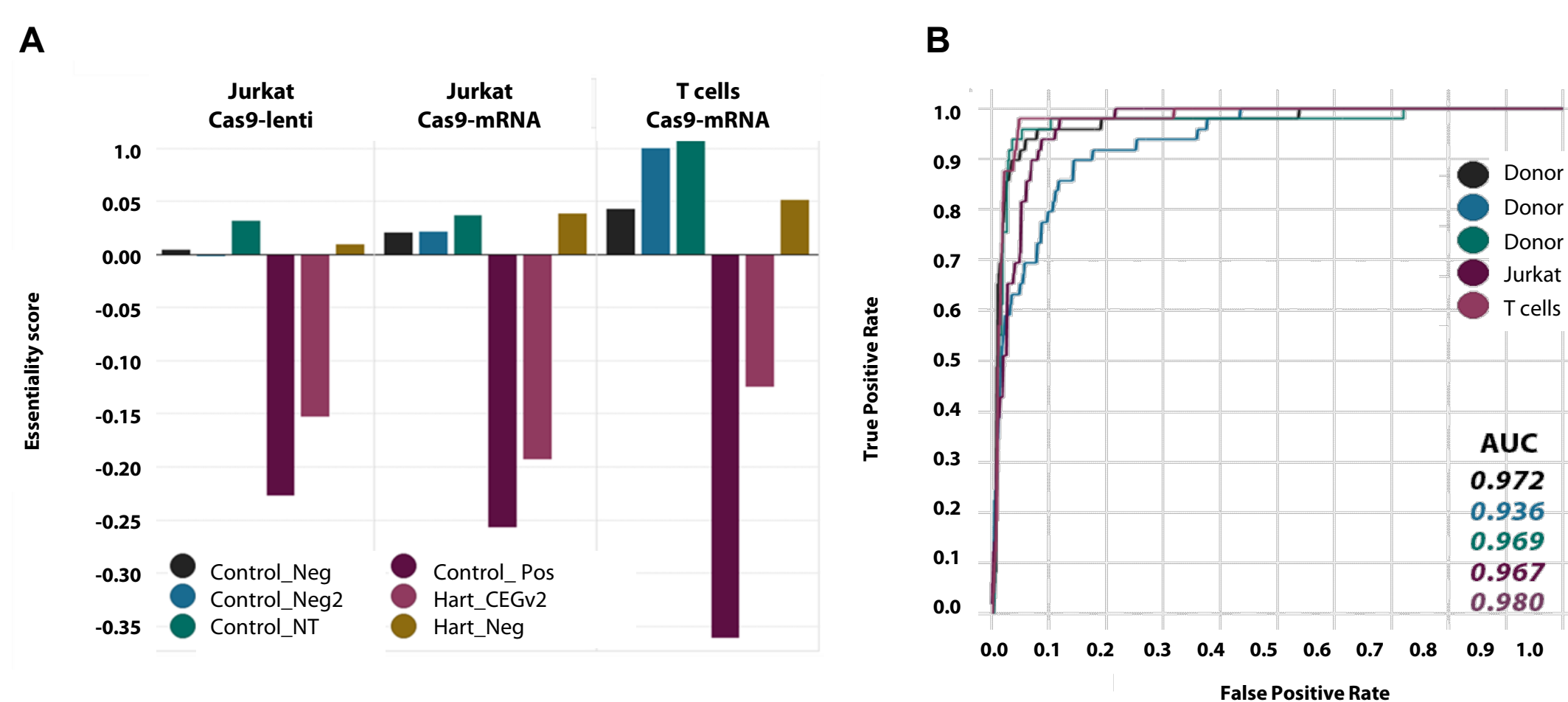
アレイ化CRISPRkoスクリーニング

ex vivoヒトT細胞におけるアレイ化CRISPRノックアウトスクリーニングのコンセプト検証研究として、T細胞の増殖能力または骨髄細胞のT細胞増殖を誘導する能力に実質的に影響を与えることが既知であるノックアウト遺伝子を選択した。



増殖能、目的の表面マーカーの発現、およびサイトカイン分泌を各ウェルで分析した。

Figure 1 | ライブラリーの性能分析

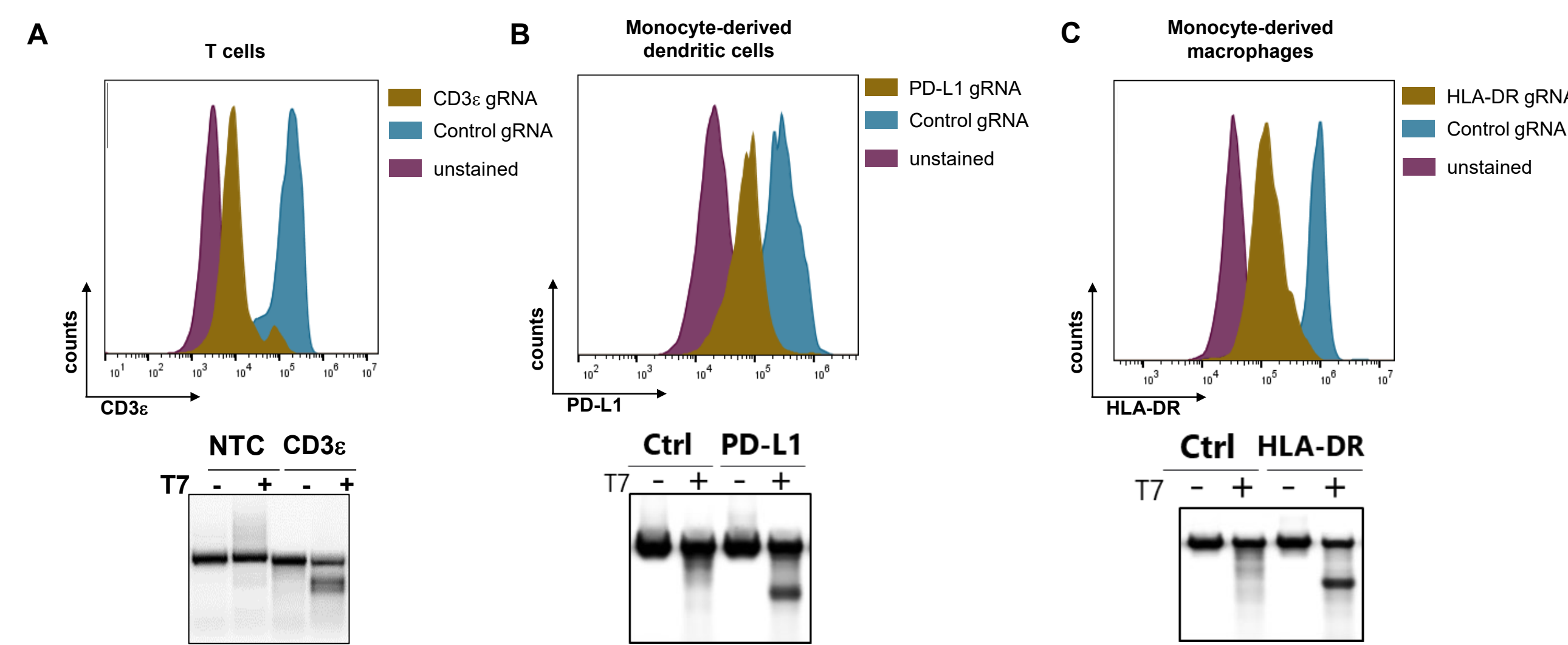


ライブラリーの性能を評価するために、3名のドナー、および初代T細胞全体 (プール) をJurkat T細胞と比較してコントロール遺伝子の挙動のダイナミクスを評価した。論文公表のコントロール遺伝子 (Cross et al., 2016) とHart et al., (2016) によって記載されたものを使用した。

- レンチウイルスとエレクトロポレーションを組み合わせたアプローチを使用してスクリーニングしたコントロール遺伝子の性能は、初代T細胞の方がJurkat細胞よりも優った。ガイドRNAとCas9の両方を同時に導入するall-in-one vectorを使用した過去のJurkat細胞を用いたCRISPRスクリーニングデータと比較しても初代T細胞の方が優った。
- 異なるドナーから分離されたT細胞からのデータをプールすると、真陽性の必須遺伝子 (ROC曲線) の統計的検出力が向上した。

ゲノム編集性能

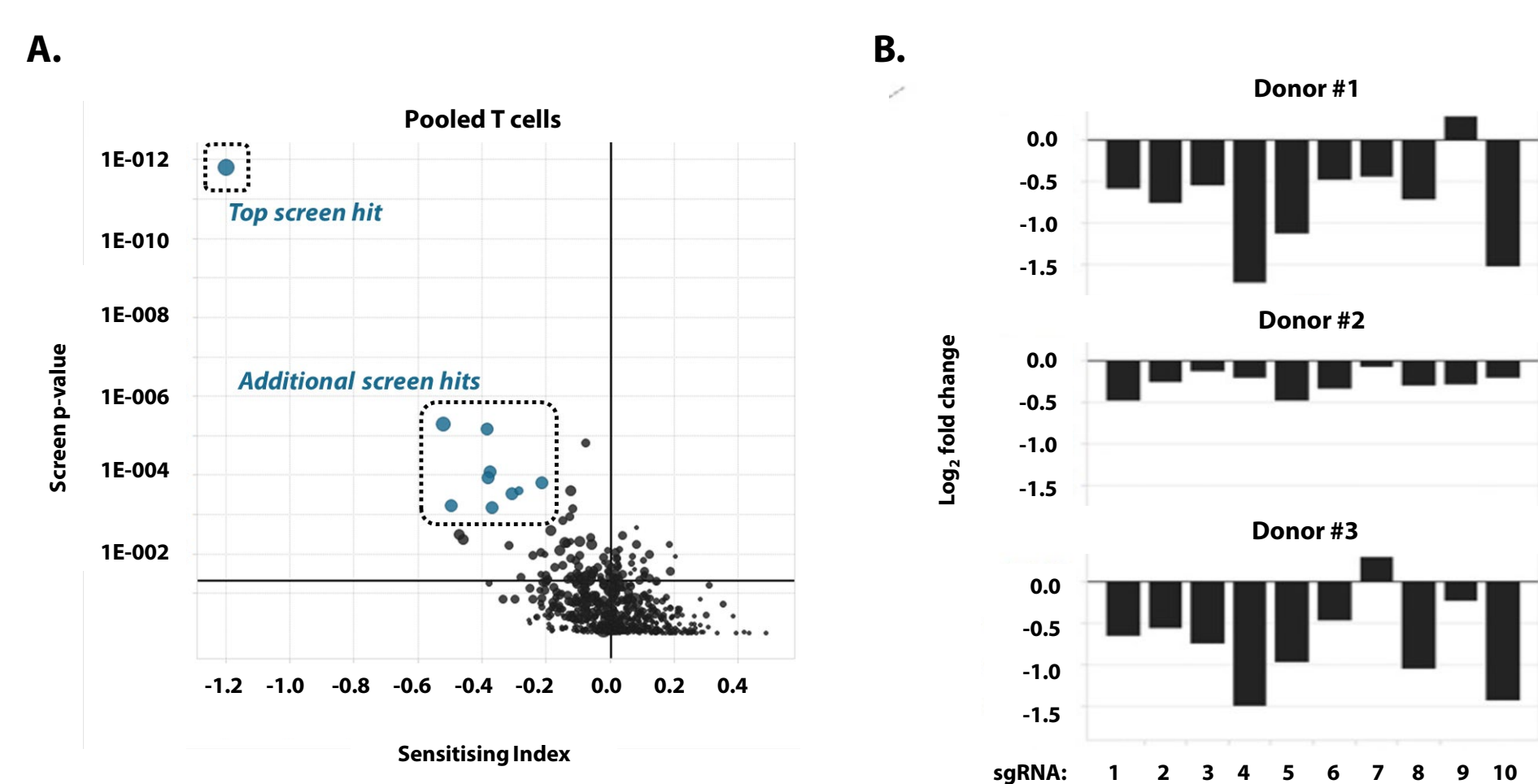
Figure 3 | トランスフェクション効率の分析



刺激したT細胞、単球由来樹状細胞、単球由来マクロファージにおける標的遺伝子のノックアウトの効果を評価した。FACS分析とT7エンドヌクレアーゼアッセイの両方を用いて、アレイ化CRISPRスクリーニングで使用されるアッセイエンドポイントを模倣的に再現した。

関連する標的ガイドRNAをトランスフェクションした細胞は、コントロールガイドRNAをトランスフェクションした細胞と比較して、標的タンパク質の発現が減少しており (A、B、Cのそれぞれで茶と青のトレースを比較)、標的サイトでのゲノム編集を確認した。

Figure 2 | 薬剤-遺伝子相互作用解析とHit calling

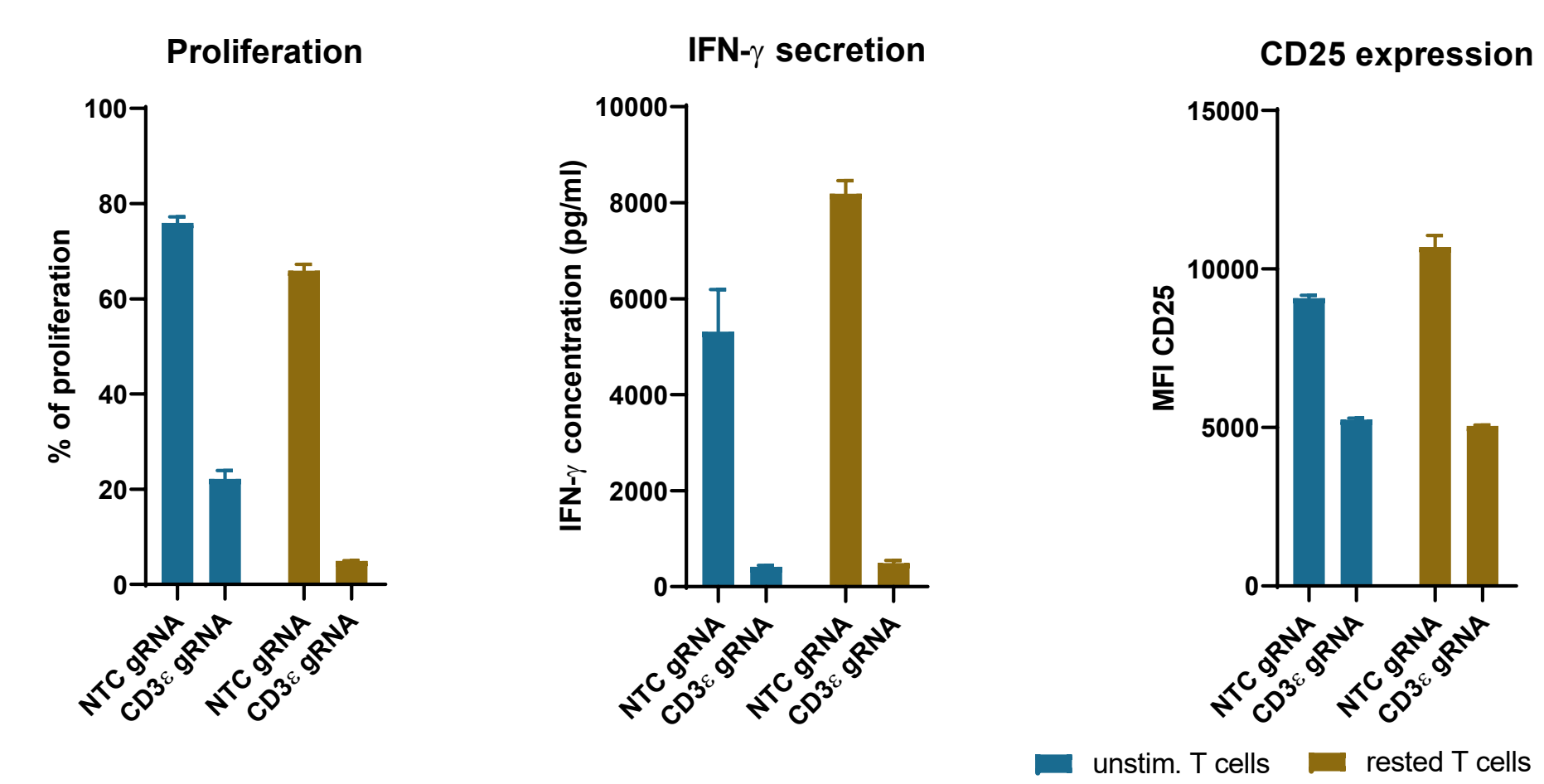


薬剤-遺伝子相互作用スクリーニングからのデータ評価により、コントロール細胞と比較してphenformin処理細胞から喪失した遺伝子を特定した (sensitivity analysis)。

- GOT1* 遺伝子の欠失は、初代T細胞における重要な感受性因子であり、Birsoy et al., (2015) によって発表されたJurkat T細胞のデータと一致した。さらに、この分析で欠失時にphenforminの細胞毒性を増すような遺伝子をさらに同定した。
- GOT1* を標的とするライブラリーガイドは、Replicate間で良好な再現性をもち一貫性のある結果であった。ドナー#2においてガイド脱落が抑えられドナー間変動がみられるものの、ドナー#2を排除してもヒット数は実質的に変化しなかった。

スクリーニング結果

Figure 4 | 多重化されたコンセプト検証のアッセイのリードアウト



コンセプト検証のアッセイでは、384ウェルプレートで、CRISPR-Cas9ゲノム編集T細胞を未編集の単球由来樹状細胞と5日間共培養した後、FACSおよびHTRF技術を使用してマルチプレックスなエンドポイントのリードアウト測定を行い、T細胞の増殖と活性化におけるCD3e発現の欠失の影響を検討した。

未刺激で編集されたCD4+ T細胞 (青色) は、CellTrace™ (Thermo Fisher Scientific) 希釈法では、CD3eの非存在下で、増殖能の減少、分泌インターフェロンガンマ (IFN-g) の減少、およびCD25発現レベルの減少した。同様の結果は、休止期のCD4+ T細胞 (茶棒) についても確認された。

Conclusions

初代T細胞におけるプール化CRISPR-Cas9スクリーニングは、レンチウイルスとエレクトロポレーションを組み合わせたアプローチを採用することで可能です。これらのアッセイは新規の潜在的な遺伝子ヒットを判別する有用な方法を提供します。検証された場合、新規性の高い創薬標的を提供できます。一方で、初代免疫細胞におけるアレイ化CRISPR-Cas9スクリーニングは、より複雑な共培養アッセイのエンドポイントが使用可能であり、遺伝子欠損の影響を評価できます。このアプローチは、プール化レンチウイルスアプローチでは実施不可能となる未刺激のT細胞のスクリーニングも可能にします。