

DOI: 10.13376/j.cblls/2015013

文章编号: 1004-0374(2015)01-0083-10



丁秋蓉, 博士, 上海生命科学研究院营养科学研究所研究员。主要从事复杂代谢疾病(如肥胖、2型糖尿病、心血管疾病)分子机制和治疗途径的研究。丁秋蓉博士结合基因组编辑技术和多能干细胞研究,在体外再现了胰岛素抵抗、高血脂、高血糖等代谢疾病的发病过程,建立了多种代谢疾病模型用于高通量药物筛选,并提出了在体内运用基因组编辑技术治疗心血管疾病的基因治疗方案。相应的研究成果在 *Cell Stem Cell*、*Circulation Research* 等杂志发表。该研究组的主要研究方向包括:1) 利用多能干细胞疾病模型,深入解析人类遗传学研究中(如 GWAS)发现的代谢疾病相关遗传变异的分子机制;2) 将多能干细胞分化的人体细胞或组织移植入免疫缺陷型小鼠,建立人源化(肝脏、脂肪)小鼠疾病模型;3) 开发基于干细胞疾病模型的高通量筛选平台,通过小分子化合物文库和 CRISPR/Cas 基因敲除文库筛选,寻找新的治疗药物和基因靶点。

基因组编辑技术在干细胞疾病模型和疾病治疗中的应用

刘改改, 李 爽, 张永贤, 丁秋蓉*

(中国科学院上海生命科学研究院营养科学研究所, 上海 200031)

摘 要: 基于人类多能干细胞 (human pluripotent stem cells, hPSCs) 的疾病模拟体系提供了一个全新的疾病研究平台。携带特定致病突变的 hPSCs 可以通过患者体细胞重编程成诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 获得, 或者通过向野生型 hPSCs 中引入致病突变获得。获得的突变 hPSCs 及其野生型对照细胞株在体外诱导下可以分化为疾病相关体细胞类型, 继而被用于疾病模拟和机理研究。近几年出现的基因组编辑技术使得疾病模拟平台的建立更加高效和优化。主要讨论干细胞疾病模拟领域的进展, 以及基因组编辑技术在干细胞疾病模拟和疾病治疗中的应用。

关键词: 疾病模型; 人类多能干细胞; 基因组编辑; 基因治疗

中图分类号: Q789; Q813 **文献标志码:** A

Genome editing for disease modeling and disease treatment

LIU Gai-Gai, LI Shuang, ZHANG Yong-Xian, DING Qiu-Rong*

(Institute for Nutritional Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: Disease modeling with human pluripotent stem cells (hPSCs) has offered a new platform to study human diseases. Mutant hPSCs can be generated either by reprogramming of patients' somatic cells to get inducible pluripotent stem cells (iPSCs), or by introducing genetic variants into wild-type hPSCs. The emergence of genome-editing technology over the past few years has made it feasible to generate isogenic cell lines with and without disease mutations more efficiently, which can then be differentiated into somatic cell types for the study of

收稿日期: 2014-10-14

*通信作者: E-mail: qrding@sibs.ac.cn

pathophysiology of diseases. In this review, recent advances in disease modeling and the use of genome editing to better understand human biology and develop novel therapeutics are discussed.

Key words: disease modeling; human pluripotent stem cells; genome editing; gene therapy

1 人类多能干细胞平台

基因组测序技术的进步极大地推动了人类遗传学的发展。大规模人群全基因组关联研究 (genome-wide association study, GWAS) 提示很多未知功能的遗传位点与人类不同复杂疾病, 如肥胖、糖尿病、心血管疾病、神经退行性疾病等的发病率有强烈相关性^[1]。如何深入解析这些遗传发现, 深入理解这些遗传信息, 把这些遗传学信息转化为对疾病发生机制的新的认识, 成为目前亟待解决的问题。

对新的遗传学发现的解析需要合适的平台。由于很多疾病相关遗传位点被发现位于相对不保守的基因组非编码区^[1], 因而无法在各种常用模式生物模型上研究, 且各种模式生物和人类在各种生理系统上也存在很大差别, 很多研究成果不能直接用于人类。多种人类转化细胞株被用于研究人类基因功能和疾病发生, 但因为其核型紊乱, 细胞功能表型更接近于癌细胞, 亦不能反映正常细胞调节。人类原代细胞具有人类遗传背景, 可以提供相对符合生理状态的研究平台, 但由于细胞来源不易, 体外培养条件苛刻, 不同供体和不同的分离方法等也会带来不同批次原代细胞之间的表型差异, 因而其应用受到很大限制。

人类多能干细胞由于其自身特性, 提供了一个合适的平台系统来解析这些遗传发现。人类多能干细胞具有以下特点: 1) 携带人类基因组, 可以精确模拟各种疾病相关的遗传位点突变; 2) 可以无限增殖自我更新, 理论上可以无限提供细胞原材料供研究, 并且区别于各种转化细胞系, 多能干细胞具有正常核型; 3) 具有全能性, 在体外合适的诱导条件下, 可以分化为各种体细胞类型, 并且体外的分化过程在一定程度上可以模拟体内发育过程, 因而可以模拟疾病的不同发生阶段。

人类多能干细胞主要分为两种。一种是人类胚胎干细胞 (human embryonic stem cells, hESCs), 直接从早期胚胎中分离出来^[2-3]; 第二种是诱导性多能干细胞 (iPSCs), 通过体细胞体外重编程获得^[4-7]。此外, 还有第三种是通过体细胞核移植 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 技术获得的多能干细胞^[8]。各种多能干细胞都能被用于人类疾病模拟, 尤其是

患者来源的诱导性多能干细胞, 因为其具有患者特有的疾病发生遗传背景而被广泛用于疾病模拟。细胞重编程技术的发展使得目前诱导性多能干细胞的获得更加简单, 患者的皮肤切片^[9-10] 或者血液样本^[11-13] 都可以作为重编程所需的体细胞来源。

利用多能干细胞建立人类疾病模型, 实验成败依赖于严格对照组的建立。在早期利用干细胞进行疾病模拟的研究中, 来源于健康者的诱导性多能干细胞通常被作为疾病组的对照组细胞^[14-18], 但这样的野生型细胞株, 即便来自家庭成员, 也并不能提供严格的对照。突变组和对照组之间存在的表型差异可能来自致病突变, 也可能源于两组细胞系不同遗传背景的影响, 因而不能确定是否和疾病相关。除本身遗传背景不同之外, 不同的 iPSCs 细胞株在各自的体细胞重编程、体外培养和传代过程中可能随机产生各种遗传突变, 包括单核苷酸突变, 以及染色体缺失、移位等^[19-26]。此外, 体细胞来源、重编程方法和传代数目的差异也会导致不同 iPSCs 细胞株表观遗传信息的不同, 同样会影响后期功能表型的检测^[27-34], 因而严格对照组的建立在疾病模拟中至关重要。最严格的对照组被称为“isogenic”对照组, 即对照组和疾病组细胞来源于同样的母细胞株, 两组细胞株之间仅有致病突变基因不同, 其他方面则完全一致, 包括完全相同的遗传背景、培养条件、处理方式等。只有在这种对照组存在的情况下, 研究者才能最大程度控制其他系统差异对疾病表型的影响, 进而建立致病突变和疾病表型的直接联系。

建立严格的对照组目前有两种方案 (图 1): 一种是建立患者 iPSCs, 后期在患者 iPSCs 细胞株中修复致病突变建立对照组; 第二种是在野生型 hPSCs 中引入特定致病突变, 同时以原有的野生型细胞株作为对照组。最优化的研究设计则是两种方案同时进行。建立严格对照组需要高效精确地在全能干细胞系中修复或者引入突变, 近年来基因组编辑技术的快速发展使之得以实现。

2 基因组编辑技术

经典的基因靶向技术是通过同源重组技术将目

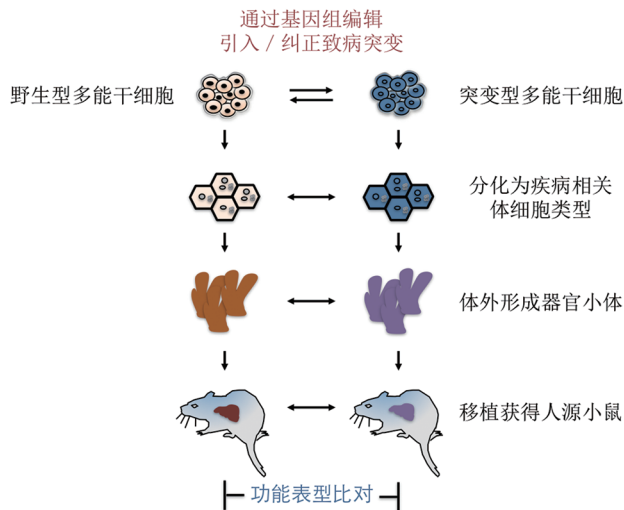


图1 干细胞疾病模型(细胞、器官和人源小鼠三种层面)的建立

标基因敲除或者引入突变^[35-36]。虽然,同源重组技术在小鼠胚胎干细胞中已经被成功用于构建胚胎敲除和敲入小鼠,其在人类全能干细胞中的应用由于重组效率极低而受到限制^[37]。基因组编辑技术领域的发展则解决了这一难题。基因组编辑技术主要包括锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)^[38]、类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector, TALEs)^[39-41]和成簇规律间隔短回文重复序列系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins, CRISPR/Cas)^[42-45]三种技术平台。相比ZFN和TALEN,CRISPR基因组编辑平台中载体的构建更加容易、靶向位点的选择更加灵活、基因组编辑的效率更高、对干细胞毒性较小,因而目前被广泛地用于干细胞基因编辑和疾病模型建立^[46-51]。CRISPR技术可以同时用来靶向多个基因(模拟多个基因突变导致的复杂疾病),完整移除某一段基因组区域(模拟某个基因组区域对疾病的影响),或者在特定基因组位置敲入点突变或者小片段序列,如用于在蛋白质N端或者C端插入Flag肽段标记蛋白(待发表资料)。

基因组编辑技术可以在基因编码区引入移码突变继而敲除基因,也可以通过提供外源DNA模版(双链DNA或者单链DNA)在特定基因组位置引入突变。相对于敲除基因的效率,目前敲入点突变或者敲入特定序列的效率仍然很低,并且在一条染色体序列上敲入突变的同时可能会在另一条染色体上引入移码突变^[51]。由于人类疾病突变大都是点突变

引起,各种GWAS结果也提示很多单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)参与基因调控或者影响基因功能,如何提高敲入突变的效率是这个领域亟需解决的问题。

对于各种基因编辑平台可能存在的脱靶率,现在结论不一,但值得注意的是,脱靶率的高低不仅取决于不同的基因组编辑平台,也同样受靶向序列、细胞类型、基因编辑工具在细胞内的表达时间和强度,甚至脱靶率检测方法等影响。在对CRISPR技术脱靶率的研究中,早期的若干研究结果提示,CRISPR平台可能存在较高的脱靶率^[52-57],但这样的结果大都是在各种转化细胞系中的研究中得到的,并不能完全反应正常细胞系(如hPSCs)中的脱靶情况。笔者所在实验室以及其他同行对经过基因编辑后的若干hPSCs单克隆进行了全基因组测序^[58-59],结果提示CRISPR和TALEN在hPSCs中的脱靶率均很低。虽然对单克隆的全基因组测序不能全面反映脱靶情况,但提示脱靶现象是可以通过增加靶向序列的保守性来避免。有意思的是,相比基因组编辑前的细胞系母株,干细胞单克隆(包括野生型单克隆和突变型单克隆)被发现在体外培养过程中随机获得了若干点突变^[58-60]。这些点突变大都位于非编码区,不会影响蛋白质表达,但也有少数位于基因编码区,从而造成氨基酸突变。由于突变获得的随机性,不同单克隆之间获得的突变不同,因而从这点上考虑,真正意义上的“isogenic”对照组是不存在的。为控制这种随机突变对后期表型检测的影响,利用hPSCs进行体外疾病模拟时,需要多个野生型克隆和多个突变型克隆之间进行同时对比,并且利用其他对照组设计,如在基因敲除克隆中通过引入外源质粒恢复基因表达等综合分析致病突变对表型的影响^[60]。

3 干细胞疾病模型建立

结合基因组编辑技术和多能干细胞的特性建立的各种干细胞疾病模型,为疾病研究提供了一个全新的研究平台,可以在人的特定遗传背景下(相对小鼠等其他模式生物),在更切合生理状态的正常细胞体系中(相对其他各种人转化细胞系),更加精确地再现人类疾病的发病过程。

利用多能干细胞建立体外疾病模型可以通过两种途径(图1)。第一种是获得带有遗传突变的患者体细胞,经由重编程获得患者iPSCs,后期分化为各种疾病相关体细胞类型进行疾病模拟和机理研

究。一个代表性的例子是对早衰症 (Hutchinson-Gilford Progeria syndrome, HGPS) 和维尔纳综合征 (atypical Werner syndrome, AWS) 的疾病模拟^[61]。这两种疾病均是由于 *LMNA* 基因突变所引起的。研究人员获得患者 iPSCs 后, 利用腺病毒导入野生型 *LMNA* 序列, 通过同源重组的方式修正了患者 iPSCs 中的突变, 得到野生型细胞对照组。随后, 患者 iPSCs 和对照组细胞被同时分化为血管平滑肌细胞和纤维母细胞。与修正后的野生型细胞相比, 突变细胞展示了异形核型和细胞衰老等相关表型。第二种建立干细胞模型的方式是在野生型 hPSCs (胚胎干细胞 hESCs 或者 iPSCs) 中引入已知致病突变, 后期同样分化为疾病相关体细胞进行研究^[60]。为了证明这种方案的可行性和高效性, 笔者实验室将与人类代谢疾病相关的 10 多种基因突变分别引入一种或多种全能干细胞系, 随后将细胞株分化为白色脂肪细胞、肝脏细胞、运动神经元细胞等疾病相关细胞类型。利用这个平台, 笔者研究组成功建立了包括 *SORT1* 基因突变引起的人类肝脏细胞脂代谢异常模型和运动神经元退化模型; *AKT2* 基因突变引起的肝脏细胞和脂肪细胞的胰岛素抵抗模型、低血糖模型、脂肪发育不良模型和肥胖导致的炎症模型; *PLIN1* 基因突变引起的脂肪发育不良症等。为进一步观察不同遗传背景是否对致病突变导致的疾病表型产生影响, 在研究 *SORT1* 基因对脂代谢功能影响的实验中, 笔者同时在两株具有不同遗传背景的野生型细胞株中引入突变。后期表型检测提示, 在严格对照组的设立下, *SORT1* 突变引起的脂代谢表型变化在不同细胞株的不同遗传背景下不受显著影响。

上述两种构建方式各有利弊。在前一种构建方式中, 患者的 iPSCs 由于具有除了致病突变之外可能同样对疾病发生起作用的疾病易感遗传背景, 因此被认为可以更真实地反应疾病生理状态, 但患者体细胞的获得、细胞的重编程以及后期对 iPSCs 克隆的质量验证都需要耗费大量的时间和精力。同时, 在细胞重编程过程中可能引入若干不可控因素, 甚至同一株体细胞所获得的不同 iPSCs 克隆之间可能会存在很大差异^[19-26], 因而表型的可靠鉴定需要在获得的 iPSCs 克隆中通过基因组编辑的方式修复原有致病突变获得严格对照组后进行比对。后一种构建方式细胞株遗传背景的选择相对随意, 无需经过患者筛选和细胞重编程过程, 因而可以在已经建立的稳定细胞株中引入已知的致病突变。此外, 在同

一株细胞中 (即在同一个遗传背景下) 还可以并行引入各种不同的致病突变, 继而可以对不同致病突变导致的疾病表型进行横向比较, 因此也具有相当优势。

最优化的实验设计是利用两种构建方式同时进行疾病模拟, 继而能对致病突变和致病表型之间的必要性和充分性同时进行验证。一项经典的例子是对 *LRRK2* 基因上的 G2019S 突变的研究, 此突变与帕金森病发病有关^[62]。研究人员构建了来自患者的突变 iPSCs, 并通过同源重组修复了该点突变, 得到相应的对照组细胞。研究人员随后将两组细胞分化为神经干细胞 (neural stem cells, NSCs)。突变组神经元干细胞在持续了 12 次传代培养后出现核畸形的特性, 并且分化为神经细胞的能力受损, 而该表型在修正后的野生基因型神经元干细胞中并未出现。同时, 研究人员将 *LRRK2* 基因上的 G2019S 突变插入野生型的人胚胎干细胞中, 发现插入突变后的 hESCs 分化的神经干细胞表现出与患者 iPSCs 分化的神经干细胞相同的核畸形和分化缺陷表型, 提示两种途径进行疾病模拟的一致性。更有趣的是, 研究人员在患者神经元干细胞中发现的核畸形现象之前并未在病例特征中报道, 而该表型随后在患者身上得到证实, 提示利用干细胞模型在模拟研究人类疾病方面独特的优势。

干细胞疾病模拟体系发展至今仍然有很大的空间需要提高。目前主要存在的问题是各种现有的体细胞分化平台不够成熟。虽然理论上多能干细胞在体外合适的刺激信号下可以定向分化为各种体细胞类型, 但由于对体内发育过程知晓有限, 加上体外培养体系不能完全模拟体内发育系统, 因而分化出的各种体细胞类型大都处在发育过程中的前体细胞或者不成熟细胞阶段, 不具备体内成熟细胞的全部生理功能^[63-66], 如体外分化得到的肝脏细胞大量表达不成熟肝脏细胞的分子标志物, 如甲胎蛋白 (α -fetoprotein, AFP); 同时, 解毒功能 (如 CYP450 酶活性) 等也远远达不到体内成熟肝脏细胞的水平^[64]。这要求研究人员在利用干细胞建立疾病模拟平台时需要格外小心, 一是需要通过改良分化平台和体外培养体系, 或通过后期细胞筛选, 使分化后细胞更接近体内细胞水平; 二是在疾病模型建立之前, 需要充分检测分化的细胞在疾病表型所涉及的细胞功能方面是否健全。如果分化后的细胞本身在某细胞功能方面存在缺陷, 那便不适合用于研究和这方面细胞功能相关的疾病表型。

体外干细胞分化平台不成熟的另一方面体现在分化后的细胞不是均一 (homogeneous) 的细胞群体, 而是相对杂合 (heterogeneous)。即使在严格细胞对照组之间, 甚至同一株细胞在不同批次的分化实验之间, 分化得到的细胞群体都可能出现较大的波动, 因此给表型的观察和实验重复带来困难。不同的细胞株之间也同时存在不同胚层和不同体细胞类型分化方向的倾向性^[29], 而细胞株的性别差异也可能影响疾病表型的体现^[67]。因此, 为更好地控制各种系统不稳定性对疾病模拟的影响, 实验设计时需要考虑所选用的细胞株是否适宜, 同时考虑多种严格的对照组设计, 并且尽可能通过细胞分子标志物筛选等方式筛选出相对单一类型的细胞进行研究, 如通过 HB9 报告基因筛选运动神经元^[68]、通过白蛋白 (albumin) 报告基因或者去唾液酸糖蛋白受体 (asialoglycoprotein receptor, ASGPR) 表达筛选成熟肝脏细胞^[69]等。

另一个需要提高的方面在于现有的体细胞分化平台只能覆盖一小部分细胞类型, 目前的体外培养体系也大都都是单个细胞类型的定向分化和培养。考虑到人类疾病的发生和发展大都涉及到多种细胞类型、多种器官之间的交流, 现有的干细胞疾病模拟平台需要向多细胞系统、三维培养体系等更符合生理状态的方向发展。

目前对分化平台的优化大抵分为两个方向。一个优化方向是在分化过程中, 通过系统分析每一步得到的细胞类型, 然后相应调整体外分化条件 (如生长因子组合、使用剂量等), 有针对性地优化体外分化步骤, 从而使得到的细胞更加接近体内成熟细胞。通过这种方法改良细胞分化步骤已经取得相当进展。在肝脏细胞分化中, 研究人员可以得到相对均一的肝脏细胞群体, 并能更好控制不同细胞株分化成肝脏细胞过程中存在的分化效率差异^[70]。同样, 通过优化分化平台得到的胰岛 β 细胞功能更加完善, 能像体内成熟 β 细胞一样正常应对血糖变化产生胰岛素从而调节血糖^[71]。另一种优化方向是改良培养体系, 如利用 3D 培养和多细胞培养产生器官小体, 将细胞移植到小鼠体内构建人源小鼠等方式。关于这一方面内容, 将在后面的一个章节详细阐述。

4 体外器官小体疾病模型和人源小鼠模型

近年干细胞分化领域的一个突破是发现在特定的体外 3D 培养条件下, 不同类型的细胞可以通过自组织 (self-organization) 的方式形成类似人体器官

的小体样结构, 如肠道结构 (intestinal tissue)^[72]、视杯结构 (optic cup)^[73]、肝脏结构 (liver organoid)^[74]、大脑结构 (cerebral organoid)^[75]、肾脏结构 (kidney structure)^[76-77] 等, 提示可以通过器官小体形成的方式将干细胞疾病模型从单一细胞模型发展到器官小体模型 (图 1)。一些成体干细胞也被证明可在体外特定的培养体系中形成小体结构, 模拟疾病的发生^[78-80]。由于多能干细胞具有可以在体外分化各种细胞类型的全能性, 因而更具有特殊的优势。具有特定致病突变的多能干细胞可以分化为具有相同遗传背景的不同体细胞类型, 然后在合适的体外培养条件下形成具有致病突变的器官小体, 从而可以在多细胞器官组织水平上模拟疾病 (图 1)。笔者实验室将携带 *AKT2E17K* 组成型激活突变、*AKT2* 基因敲除及野生型三种基因型细胞株在体外同时分化为肝细胞内胚层前体细胞、间质层干细胞和静脉血管内皮细胞, 然后通过体外 3D 混合培养获得三种基因型的肝脏小体结构^[74]。相比体外分化的单一肝细胞, 获得的肝脏小体结构具有更健全的糖脂代谢功能, 提示器官小体结构相比单细胞能更好地重现疾病的生理状态 (待发表资料)。当然, 通过器官小体模拟疾病的体系还需要进一步稳定优化, 多种细胞类型的引入可能增加疾病模拟体系的不稳定性, 需要严格控制可能引入的各种系统误差。

构建人源小鼠是优化现有干细胞疾病模拟平台的另一方向。基本的思路是将体外分化的体细胞类型移植到免疫缺陷型小鼠中, 一方面利用小鼠作为一个“天然细胞培养箱”, 体外分化得到的未成熟的细胞群体在小鼠体内可以进一步成熟, 后期继而可以通过将移植的细胞再次从小鼠体内分选出来做表型观察; 另一方面, 将携带致病突变的细胞移植到小鼠体内, 可以在整体动物模型上观察携带人类遗传背景的突变型细胞对整体生理表型和其他器官组织功能的影响 (图 1)。

构建这样的人源小鼠模型需要相当一段时间的摸索。不同器官或者细胞的人源小鼠模型的构建难易程度也会存在较大差异, 并且整体表型的反应需要人源细胞的移植达到足够的效率, 从而排除小鼠自身细胞的干扰。笔者实验室正在建立的是肝脏细胞人源小鼠和脂肪细胞人源小鼠模型。肝脏人源小鼠模型的构建已经相对成熟, 人源的原代肝脏细胞能在 *Fah* 基因缺失的小鼠品系中高效移植。移植后得到的人源小鼠的超过 70% 的肝细胞是人源肝脏

细胞,因而具有人源化的血脂代谢,是研究人类心血管疾病的较好的动物模型^[81-82]。目前的研究集中在如何将多能干细胞分化得到的肝脏细胞高效移植入小鼠。这样的人源肝脏小鼠可以用于研究各种基因突变对肝脏器官功能继而对整体代谢的影响。同时,构建人源肝脏小鼠的优化过程本身也会给未来利用体外分化的肝脏细胞作为供体移植治疗肝脏疾病提供有益参考信息。另外,笔者实验室还致力于将体外分化的人类脂肪细胞植入 *Rag2^{-/-}:IL2R γ ^{-/-}:A-Zip* 无脂肪免疫缺陷型小鼠中建立人源脂肪小鼠模型,研究携带遗传突变的人类脂肪对整体代谢的影响。类似的小鼠还有人源造血干细胞小鼠^[83]、人源胰脏小鼠^[71]等。

5 基因组编辑技术和干细胞疾病模型在疾病治疗方面的应用

多能干细胞构建的多种疾病模型一方面可以用来研究疾病发生的分子机制;另一方面也提供了大量原材料作为药物或遗传筛选平台,寻找或验证能够逆转疾病表型的小分子药物或新的基因靶点。一些基于干细胞疾病模型的小分子筛选已经取得了令人瞩目的成果^[68,84-85],而各种现有的遗传筛选平台,比如基于慢病毒系统的 CRISPR 基因敲除文库,同样可以用于干细胞疾病模型上,以寻找能逆转疾病表型的新的基因靶点(图2)。

另一个同样令人憧憬的应用是利用基因组编辑技术直接在患者体内修复致病突变或者敲除特定基因,从而达到治疗疾病的疗效。相比于传统的小分子药物、单抗制剂,或者 RNA 干扰制剂,这种治

疗方案由于可以从根本上纠正或者改良基因组序列,从而可能达到一次治疗终身受益的疗效。

在临床测试中已经取得一定成功的例子是利用锌指酶技术敲除艾滋患者血液 T 细胞或者 CD4 造血干细胞中的艾滋病毒受体 CCR5,从而治疗艾滋病^[86-88]。通过基因组编辑技术体外修复囊性纤维化(cystic fibrosis)患者小肠成体干细胞中的致病突变也被证明可行^[78]。可以想象,未来结合干细胞和基因组编辑技术治疗疾病的一种新的方案是获得患者的成体干细胞或者诱导性全能干细胞,体外通过基因组编辑技术修复致病突变,然后分化为相应体细胞或器官类型,再将修复后健康的体细胞或器官移植入患者体内,替代原有的病态细胞组织行使功能(图3A)。

利用基因组编辑技术治疗疾病的另一种方案是将基因组编辑材料直接体内靶向导入特定体细胞,在特定体细胞类型中直接敲除不利基因或修复致病突变(图3B)。笔者所在实验室通过小鼠的前期实验提示,向肝脏中直接导入靶向 *Pcsk9* 基因的 CRISPR 材料,一次注射便可以减少血浆中的 90% 的 PCSK9 蛋白,降低血液中 35%~40% 的胆固醇含量,这样的效果预期在人群上可以降低 40%~90% 的心脏病发病率^[89]。另一项研究同样来自小鼠,研究人员证明可以通过体内同时导入 CRISPR 材料和 DNA 模板,从而修复原有致病突变达到治疗疾病的效果^[90]。当然,在真正能将该体系用于临床治疗之前需要保证在这一系列过程中不会随机引入致癌突变、基因编辑的靶向特异性和修复点突变的高效性以及后期安全高效的体内移植等。

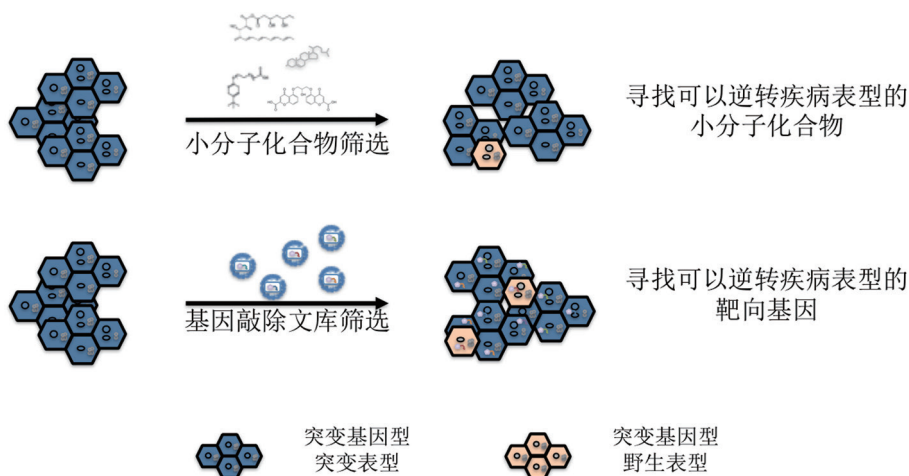


图2 干细胞疾病模型用于小分子化合物和基因敲除文库等高通量筛选

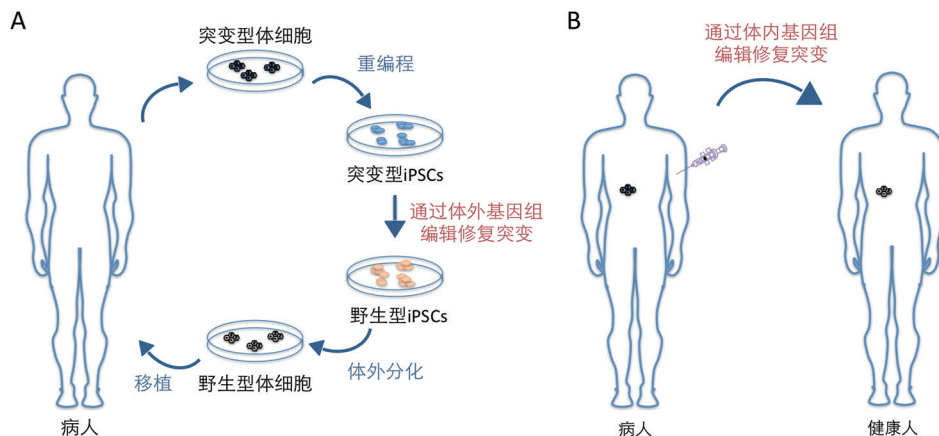


图3 基因组编辑和干细胞技术应用于体外和体内疾病治疗

6 展望

利用干细胞平台和基因组编辑技术的结合在体外或者体内模拟人类疾病, 虽然不能完全取代其他传统疾病研究模型, 但可以作为一个新的独特的平台, 与其他平台很好互补。随着各种干细胞下游分化平台的建立和成熟、体外培养体系的优化以及基因组编辑技术的开发, 相信两种平台的结合将会给研究人类疾病, 寻找正确的药物靶点, 有效地进行药物筛选, 为人类疾病的治疗带来崭新的机遇。

[参 考 文 献]

- [1] The NHGRI GWAS Catalog [EB/OL]. [2013-12-01]. <http://www.genome.gov/gwastudies/>
- [2] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282(5391): 1145-7
- [3] Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(4): 399-404
- [4] Park IH, Zhao R, West JA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 2008, 451(7175): 141-6
- [5] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131(5): 861-72
- [6] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-20
- [7] Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(1): 101-6
- [8] Tachibana M, Amato P, Sparman M, et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 2013, 153(6): 1228-38
- [9] Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 2008, 321(5893): 1218-21
- [10] Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 2008, 134(5): 877-86
- [11] Loh YH, Hartung O, Li H, et al. Reprogramming of T cells from human peripheral blood. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(1): 15-9
- [12] Seki T, Yuasa S, Oda M, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(1): 11-4
- [13] Staerk J, Dawlaty MM, Gao Q, et al. Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(1): 20-4
- [14] Ebert AD, Yu J, Rose FF, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, 2009, 457(7227): 277-80
- [15] Lee G, Papapetrou EP, Kim H, et al. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature*, 2009, 461(7262): 402-6
- [16] Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza SL, et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature*, 2010, 465(7299): 808-12
- [17] Brennand KJ, Simone A, Jou J, et al. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2011, 473(7346): 221-5
- [18] Sun N, Yazawa M, Liu J, et al. Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy. *Sci Transl Med*, 2021, 4(130): 130ra47
- [19] Maysar Y, Ben-David U, Lavon N, et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(4): 521-31
- [20] Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I, et al. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(1): 106-18

- [21] Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, et al. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature*, 2011, 471(7336): 58-62
- [22] Gore A, Li Z, Fung HL, et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2011, 471(7366): 63-7
- [23] Aapken SM, Nisler BS, Newton MA, et al. Karotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(4): 313-4
- [24] Martins-Taylor K, Nisler BS, Taapken SM, et al. Recurrent copy number variations in human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(4): 488-91
- [25] Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, et al. Targeted gene correction of $\alpha 1$ -antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2011, 478(7369): 391-4
- [26] Ji J, Ng SH, Sharma V, et al. Elevated coding mutation rate during the reprogramming of human somatic cells into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 2012, 30(3): 435-40
- [27] Kim K, Doi A, Wen B, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2010, 467(7313): 285-90
- [28] Polo JM, Liu S, Figueroa ME, et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(8): 848-55
- [29] Bock C, Kiskinis E, Verstappen G, et al. Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell*, 2011, 144(3): 439-52
- [30] Lister R, Pelizzola M, Kida YS, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2011, 471(7336): 68-73
- [31] Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, et al. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet*, 2011, 7(5): e1002085
- [32] Bar-Nur O, Russ HA, Efrat S, et al. Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet β cells. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(1): 17-23
- [33] Kim K, Zhao R, Doi A, et al. Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(12): 1117-9
- [34] Ruiz S, Diep D, Gore A, et al. Identification of a specific reprogramming-associated epigenetic signature in human induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(40): 16196-201
- [35] Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, et al. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination. *Nature*, 1985, 317(6034): 230-4
- [36] Thomas KR and Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 1987, 51(3): 503-12
- [37] Zwaka TP and Thomson JA. Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(3): 319-21
- [38] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 636-46
- [39] Christian M, Cermak T, Doyle EL, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 2010, 186(2): 757-61
- [40] Bogdanove AJ, Voytas DF. TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science*, 2011, 333(6051): 1843-6
- [41] Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 143-8
- [42] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819-23
- [43] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6123): 823-6
- [44] Jinek M, East A, Cheng A, et al. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*, 2013, 2: e00471
- [45] Cho SW, Kim S, Kim JM, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3), 230-2
- [46] Cermak T, Doyle EL, Christian M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(12): e82
- [47] Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, et al. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 731-4
- [48] Sanjana NE, Cong L, Zhou Y, et al. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nat Protoc*, 2012, 7(1): 171-92
- [49] Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(5): 460-5
- [50] Bultmann S, Morbitzer R, Schmidt CS, et al. Targeted transcriptional activation of silent oct4 pluripotency gene by combining designer TALEs and inhibition of epigenetic modifiers. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(12): 5368-77
- [51] Ding Q, Regan SN, Xia Y, et al. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(4): 393-4
- [52] Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 822-6
- [53] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 827-32
- [54] Mali P, Aach J, Stranges PB, et al. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 833-8
- [55] Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-

- programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 839-43
- [56] Cradick TJ, Fine EJ, Antico CJ, et al. CRISPR/ Cas9 systems targeting β -globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(20): 9584-92
- [57] Cho SW, Kim S, Kim Y, et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res*, 2014, 24(1): 132-41
- [58] Veres A, Gosis BS, Ding Q, et al. Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(1): 27-30
- [59] Smith C, Gore A, Yan W, et al. Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(1): 12-3
- [60] Ding Q, Lee YK, Schaefer EA, et al. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(2): 238-51
- [61] Liu GH, Suzuki K, Qu J, et al. Targeted gene correction of laminopathy-associated LMNA mutations in patient-specific iPSCs. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(6): 688-94
- [62] Liu GH, Qu J, Suzuki K, et al. Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2. *Nature*, 2012, 491(7425): 603-7
- [63] Lee G, Chambers SM, Tomishima MJ, et al. Derivation of neural crest cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, 2012, 5(4): 688-701
- [64] Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology*, 2010, 51(1): 297-305
- [65] Ahfeldt T, Schinzel RT, Lee YK, et al. Programming human pluripotent stem cells into white and brown adipocytes. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(2): 209-19
- [66] Lian X, Zhang J, Azarin SM, et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc*, 2013, 8(1): 162-75
- [67] Mekhoubad S, Bock C, de Boer AS, et al. Erosion of dosage compensation impacts human iPSC disease modeling. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(5): 595-609
- [68] Yang YM, Gupta SK, Kim KJ, et al. A small molecule screen in stem-cell-derived motor neurons identifies a kinase inhibitor as a candidate therapeutic for ALS. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(6): 713-26
- [69] Basma H, Soto-Gutiérrez A, Yannam GR, et al. Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. *Gastroenterology*, 2009, 136(3): 990-9
- [70] Loh KM, Ang LT, Zhang J, et al. Efficient endoderm induction from human pluripotent stem cells by logically directing signals controlling lineage bifurcations. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(2): 237-52
- [71] Pagliuca FW, Millman JR, Gürtler M, et al. Generation of functional human pancreatic β cells *in vitro*. *Cell*, 2014, 159(2): 428-39
- [72] Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*. *Nature*, 2011, 470(7332): 105-9
- [73] Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*, 2011, 472(7341): 51-6
- [74] Takebe T, Sekine K, Enomura M, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, 2013, 499(7459): 481-4
- [75] Lancaster MA, Renner M, Martin CA, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 2013, 501(7467): 373-9
- [76] Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, et al. Redefining the *in vivo* origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(1): 53-67
- [77] Takasato M, Er PX, Becroft M, et al. Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(1): 118-26
- [78] Schwank G, Koo BK, Sasselli V, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*, 2013, 3(6): 653-8
- [79] Karthaus WR, Iaquinta PJ, Drost J, et al. Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures. *Cell*, 2014, 159(1): 163-75
- [80] Gao D, Vela I, Sboner A, et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell*, 2014, 159(1): 176-87
- [81] Azuma H, Paulk N, Ranade A, et al. Robust expansion of human hepatocytes in *Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-}* mice. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(8): 903-10
- [82] Strom SC, Davila J, Grompe M. Chimeric mice with humanized liver: tools for the study of drug metabolism, excretion, and toxicity. *Methods Mol Biol*, 2010, 640: 491-509
- [83] Cosgun KN, Rahmig S, Mende N, et al. Kit regulates HSC engraftment across the human-mouse species barrier. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(2): 227-38
- [84] Lee G, Ramirez CN, Kim H, et al. Large-scale screening using familial dysautonomia induced pluripotent stem cells identifies compounds that rescue IKBKAP expression. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(12): 1244-8
- [85] Yamashita A, Morioka M, Kishi H, et al. Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes. *Nature*, 2014, 513(7519): 507-11
- [86] Perez EE, Wang J, Miller JC, et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4⁺ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(7): 808-16
- [87] Holt N, Wang J, Kim K, et al. Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(8): 839-4
- [88] Tebas P, Stein D, Tang WW, et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N*

- Engl J Med, 2014, 370(10): 901-10
- [89] Ding Q, Strong A, Patel KM, et al. Permanent alteration of PCSK9 with *in vivo* CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ Res*, 2014, 115(5):488-92
- [90] Yin H, Xue W, Chen S, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 551-3