



基于CRISPR/Cas9基因编辑技术的人类遗传疾病基因治疗相关研究进展

门可^{1†*}, 段醒妹^{1,2†}, 杨阳¹, 魏于全¹

1. 四川大学华西医院肿瘤中心, 四川大学生物治疗国家重点实验室, 成都 610041;

2. 四川省医学科学院四川省人民医院个体化药物治疗四川省重点实验室, 成都 610072

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: mendingbob@hotmail.com

收稿日期: 2017-09-20; 接受日期: 2017-10-10; 网络版发表日期: 2017-11-16

国家自然科学基金(批准号: 81502677, 81602699, 81123003)、四川省科技支撑计划(批准号: 2015FZ0040)和四川省卫生和计划生育科研课题(批准号: 16PJ488)资助

摘要 CRISPR/Cas9系统(常间回文重复序列丛集/常间回文重复序列丛集关联蛋白系统)为靶向基因编辑提供了强大的技术手段. 利用序列特异性sgRNA的引导, CRISPR/Cas9系统能够精准地在目标DNA的确切位置导入双链切口. 与已有的基因编辑手段相比, 该系统具有更优异的简便性、特异性和有效性. 目前, 大量涉及体内外多物种的CRISPR/Cas9基因编辑研究已充分展示了该技术的巨大潜力, 为基于该技术的疾病治疗研究和临床应用带来了希望. 基于CRISPR/Cas9基因编辑技术所介导的非同源性末端连接和同源性DNA修复作用, 近期多个研究工作已经成功应用该技术修复了包括点突变和基因组缺失等在内的遗传疾病相关基因组缺陷. 本综述将总结近期有关利用CRISPR/Cas9基因编辑技术治疗人类遗传性疾病的相关临床前研究进展.

关键词 CRISPR/Cas9, 基因编辑, 遗传性疾病, 基因治疗

在过去十几年中, 遗传性疾病的研究主要围绕遗传差异这一焦点展开, 并已经取得了巨大的进展^[1]. 第二代基因测序技术的出现和发展极大地推动了基因组水平的相关研究, 大量与人类重大疾病相关的遗传缺陷已被成功鉴定出来^[1-3]. 其中, 基因组序列的各种缺陷, 如小规模序列突变、基因缺失以及大规模染色体重排等得到了深入的探索和研究^[2,4,5]. 这些研究进展打破了传统研究手段在遗传性疾病研究中的限制, 为基因治疗打开了新的大门^[1].

II型CRISPR/Cas系统编码具有核酸酶活性的标志性Cas9蛋白, 且在三类CRISPR/Cas系统(I~III)中具有相对简单的核糖蛋白复合物构成, 因此对其机理和应用的研究受到了高度重视^[6,7]. 在该系统中, CRISPR/Cas9核酸酶在长20 nt的sgRNA引导下准确识别、并直接剪切目标基因^[8-10]. 与ZFN和TALEN等基因编辑手段相比, CRISPR/Cas9的显著优点包括更加简单、易编辑、更加高效、更低成本以及多靶点同时进行基因编辑的潜力^[9,11]. 截至目前, 该系统已经

引用格式: 门可, 段醒妹, 杨阳, 等. 基于CRISPR/Cas9基因编辑技术的人类遗传疾病基因治疗相关研究进展. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1130-1140, doi: [10.1360/N052017-00169](https://doi.org/10.1360/N052017-00169)

英文版见: Men K, Duan X M, He Z Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated correction of human genetic disease. Sci China Life Sci, 2017, 60: 447-457, doi: [10.1007/s11427-017-9032-4](https://doi.org/10.1007/s11427-017-9032-4)

被成功应用于多个物种的基因编辑研究, 在包括果蝇(*Drosophila melanogaster*)^[12]、线虫(*Caenorhabditis elegans*)^[13,14]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[15-17]、小鼠(*Mus musculus*)^[8,18,19]、大鼠(*Rattus norvegicus*)^[20]以及人类(*Homo sapiens*)^[8,11,21-23]细胞的基因组编辑研究中展现出了令人兴奋的潜力。

CRISPR/Cas9系统在目的基因的特定位置引入双链切割后, 细胞可通过两种主要的方式对该缺口进行修复。其中, 非同源性末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)是最为活跃的修复机制, 该修复途径具有极大的随机性, 往往导致双链缺口区域的碱基缺失、插入或移码突变; 另一方面, 而利用外源性修复模板提供特定参照, 同源性DNA修复(homology directed repair, HDR)则会在目标区域按照既定目标进行准确的修复^[11], 从而为实现单个碱基或大片段的插入和替换提供了可能。更重要的是, 相较于其他现有的大部分基因治疗策略, CRISPR/Cas9技术对基因组的改变效应是可遗传的。通过永久性地移除基因缺陷, 即可实现对致病基因的彻底修复, 实现持久、稳定的治疗效果^[22]。因此, 近年来, CRISPR/Cas9介导的基因编辑技术已经逐步在人类遗传性疾病的治疗研究中得到了越来越深入的尝试和广泛的应用。

本综述将归纳近期有关CRISPR/Cas9基因编辑技术介导的人类遗传性疾病基因治疗的研究进展, 重点讨论相关治疗策略、给药方式的设计思路, 并初步分析相关临床治疗前景。

1 修正策略

CRISPR/Cas9基因编辑技术的多种相关功能已经在基因治疗研究中展现出巨大的潜力。通过在目标DNA引入双链缺口, CRISPR/Cas9基因编辑系统可以通过介导NHEJ或HDR作用, 产生不同类型的基因插入、剪切或敲除, 从而实现对目标基因组序列的定向或非定向改变。该过程为利用CRISPR/Cas9技术修复特定基因缺陷的基因治疗研究创造了机会。

1.1 点突变修复

外显子测序和全基因组测序极大地促进了在罕见遗传性疾病中筛查和鉴定全新的单基因突变^[1,24,25]。研究显示, 很大比例的遗传疾病是由相关致病基因特

定外显子的点突变而造成的。而在转录过程中, 基因的点突变将促使特殊剪切或终止信号的产生, 导致对应mRNA或蛋白产物的减少或功能不全。因此, 通过CRISPR/Cas9系统在点突变位置附近引入DNA双链切口, 利用后续的同源或非同源修复作用, 可以实现对突变引起的家族遗传疾病进行不同程度的修正和治疗。

2014年, Yin等人^[26]报道了利用CRISPR/Cas9技术介导的HDR来修复*Fah*基因点突变治疗遗传性高酪氨酸血症(type I hereditary tyrosinaemia, HTI)的研究。I型遗传性高酪氨酸血症是一种由*Fah*点突变导致的致死性的遗传性疾病, 该基因所编码的延胡索酰乙酰乙酸水解酶是体内酪氨酸代谢途径中最后一个参与者^[26-28]。该突变一般源自HTI病人*Fah*基因第8号外显子上的G→A点突变, 导致基因转录时直接略过第8号外显子, 生成欠稳定的截短性FAH蛋白产物。该缺陷的FAH蛋白进一步引起毒性代谢产物在肝细胞蓄积, 导致肝损伤和全身性毒性。针对该突变, Yin等人设计了多个靶向*Fah*基因第8号外显子的gRNA, 并将之与Cas9核酸酶构建于同一个质粒上共表达。上述CRISPR/Cas9编辑质粒与包含了野生型序列的199 nt单链脱氧核苷酸(single strand oligonucleotides, ssODN)修复模板被一同注射到*Fah*5981SB小鼠(携带与人HTI相同点突变)体内。为了评价体内基因编辑效果, 作者选取了包括基因测序、*Fah*⁺细胞免疫组化分析、mRNA定量PCR和体重监测等一系列方法进行验证。经过单次治疗后的小鼠的体重得到成功维持, 显示治疗有效地保护了肝脏。同时, 作为成功修复的直接证据, 作者成功地从CRISPR/Cas9治疗组小鼠体内获得包含第8号外显子全长序列的PCR条带, 并通过测序证实A→G碱基的准确修复, 提示部分肝细胞中的第8~9号外显子之间恢复了正常的表达行为。这个创新性的研究展示了CRISPR/Cas9技术在成功修复体内基因点突变的能力, 为CRISPR/Cas9治疗基因缺陷疾病提供了有力的证据。

相关治疗策略也在类似的家族遗传性疾病的基因治疗研究中进行了尝试。例如, 通过对新生小鼠静脉注射分别表达CRISPR/Cas9系统和DNA模板的腺相关病毒(adeno-associated viral vector, AAV), 杨阳等人^[29]成功地在体内修复了小鼠*OTC*基因第4号外显子上的G→A点突变, 实现对新生小鼠高氨血症的有效治疗。Bassuk等人^[30]将CRISPR/Cas9系统应用于

编辑X连锁视网膜色素变性患者来源的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs), 该类患者所携带的*RPGR*基因具有c.3070G→T点突变. 该体外基因编辑研究的修复率达到13%. 此外, HDR介导的点突变修复策略同样在 β 地中海贫血^[9,31]、慢性肉芽肿^[32]、杜氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)^[33]、镰刀型贫血^[34]以及重症免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)^[35]等其他疾病上得到了应用.

在上述研究中, 对目的基因点突变位点的修复效率不尽相同. 通常认为, 虽然基因序列的修复效率与HDR的效率呈正相关, 但是, 后者在细胞内的发生概率总的来说较低(小于10%). 因此, 设计和选择合适的gRNA和修复模板尤为重要. gRNA在基因组上的结合位点与CRISPR/Cas9系统的特异性和有效性密不可分. 在*Fah*点突变修复的研究例子中, Yin等人^[26]设计了3个靶向第8号外显子不同位置的gRNA. 这些sgRNA的结合区域均直接覆盖点突变位点, 从而有利于双链切口与之更加临近, 增加了借助HDR和模板进行修复时的准确性. Long等人^[33]在DMD的基因编辑治疗研究中也选取了覆盖点突变部位的gRNA. 不过, 对于CRISPR/Cas9系统来讲, gRNA的选择受到PAM序列的严格约束. 因此, 在一些研究案例中, 较优的靶部位可能位于突变位点的临近区域而非直接覆盖之. 这种情况下的CRISPR/Cas9系统被证明同样具有较高的点突变修复效率. 例如, 杨阳等人^[29]在*OTC*基因修复研究中, 在位于突变位点上游和下游20~40 bp的范围内分别设计了3个sgRNA, 并通过SURVEYOR实验筛选出剪切效率最高的sgRNA, 而HDR介导的修复作用工作良好. 如前所述, 即使CRISPR/Cas9系统具备产生较高剪切效率的能力, 但细胞内HDR的发生概率通常很低. 因此, 部分CRISPR/Cas9产生的双链切口会不可避免地通过NHEJ机制被修复, 导致体内基因编辑体有较大概率产生不可预知的结果. 正是基于以上考虑, 杨阳等人通过将sgRNA的靶点设计于修复位点相邻的内含子区域, 可以有效阻止当NHEJ占上风时可能产生的进一步编码序列的随机突变, 导致剩余*OTC*基因功能的进一步缺失. 另一方面, 在治疗SCID的基因编辑研究中, Chang等人^[35]在*JAK3*基因的第14号外显子点突变位点附近设计了6个gRNA, 其中4个的修复效率高达73.3%, 而其余2个几乎无效. 值得一提的是, 后

2个sgRNA的结合区域离突变位点更远, 提示相关修复效率的高低也可能与所选取的gRNA与突变位置距离远近有一定关联.

除此之外, 在HDR介导的点突变修复中, 模板的设计策略, 如两端同源臂的长度和模板的种类也与CRISPR/Cas9介导的点突变修复效率高低密切相关. 目前已报道的相关治疗研究所运用的模板形式多样, 其中, ssODN最为常见但长度各异. 例如, Yin等人^[26]使用了长达199 nt的包含野生型序列和同源臂的ssODN; Bassuk等人^[30]使用了162 nt长的ssODN作为HDR介导的*RPGR*基因修复模板; Yoshimi等人^[2]使用更短的88 nt ssODN修复*TyrC*基因的点突变. 一般来讲, 同源臂和结合区域的长度取决于所需引入片段的长度, 更大的修复片段可能需要更长的同源臂. 此外, dsODNs和DNA质粒也被用作修复模板参与HDR过程. 例如, Huang等人^[34]使用质粒模板提供野生型*HBB*基因序列来治疗SCID, Song等人^[9]构建了左臂长5 kb、右臂长3 kb的质粒模板修复*HBB*基因. 通常情况下, 供体质粒在使用前需先经过限制性内切酶线性化, 再导入细胞内发挥模板作用. 虽然使用ssODN模板^[23,36,37]和dsDNA模板^[38]在HDR介导的基因编辑研究中均有大量应用报道, 但尚无强有力的证据证明何种形式更适合点突变修复. 同时, 由于将大片段的基因序列插入到靶区域相较于小片段更加困难, 而各基因的修复策略又不尽相同, 因此, HDR修复模板的选择还需视具体情况而定.

1.2 基因缺失修复

除点突变外, 遗传性疾病的另一重要致病原因为基因组不同大小片段的碱基缺失, 其缺失范围小到单一碱基、大到整个外显子水平. 这类基因缺陷通常会导致可读框移码、外显子跳跃或终止信号的引入, 产生错误或残缺的蛋白产物, 从而影响其功能. 类似于点突变的修复, 通过利用细胞的HDR作用, 结合适当的修复模板, CRISPR/Cas9基因编辑技术也已经被尝试用于该类型的遗传疾病的治疗研究.

其中一个典型的例子即是DMD的治疗. DMD是一种由位于X染色体上的*Dmd*基因的突变而引起的严重肌肉退化性疾病^[39,40]. 这些突变包括*Dmd*基因的小规模碱基缺失或部分外显子的大规模丢失, 最终导致转录过程中可读框的移码, 产生功能残缺的肌萎缩蛋白

(dystrophin)^[41]. 虽然包括AAV传输^[42]、慢病毒传输^[41]以及“睡美人”转座子系统(sleeping beauty transposon)^[43]等在内的手段已经被用于DMD基因治疗的相关研究, 但Dmd基因较大的序列长度在很大程度上阻碍了治疗性基因的有效递送. 因此, 力争恢复全长肌萎缩蛋白编码基因序列的治疗努力仍然极具挑战^[44]. 同时, 一项临床前研究结果发现, 通过调控肌萎缩蛋白mRNA的剪切样式、实现对相关外显子区域转录的有意“忽略”(即外显子跳跃), 可实现短暂、但部分有效的治疗效果. 该发现也为DMD的治疗提供了潜在的策略^[45].

因此, 使用具有可遗传效应的基因编辑技术修复DMD所涉及的基因缺陷被广泛认为是一种理想的治疗手段, 并已经得到了多个研究团队的尝试. 例如, 利用CRISPR/Cas9系统介导的HDR功能, Li等人将编码Dmd基因第44号外显子的全长序列敲入病人来源的iPSCs细胞中, 以替换基因组内原有的序列, 实现蛋白质编码区的恢复. 该系统首先在第45号外显子中引入双链切口, 随后由含有两个同源臂和1个完整的第44号外显子序列片段组成的载体为供体模板进行修复. 通过分析从编辑后iPSC分化得到的骨骼肌细胞, 作者检测到了含有完整、非突变第44号外显子序列的肌萎缩蛋白mRNA, 证实所插入的第44号外显子与后续的第45号外显子得以正常依次表达, 展示了该策略在DMD治疗中的潜力.

基于CRISPR/Cas9技术的基因敲入修复方法也已被应用于其他遗传缺陷疾病的治疗研究中. Schwank等人使用CRISPR/Cas9技术介导的HDR作用修复了囊性纤维化患者来源的肠干细胞中的CFTR基因. CFTR基因的突变会导致其第11号外显子中的苯丙氨酸缺失(CFTR F508 del), 进而导致蛋白产物错误折叠、内质网滞留以及CFTR蛋白的过早降解^[46]. 为了修复CFTR基因的上述3 bp缺失, 作者将靶向第11号外显子或第11号内涵子区域的不同sgRNA与编码野生型CFTR序列的模板质粒共同导入细胞, 并通过后续筛选和富集得到准确修复的单克隆. 类似地, 来自两个独立课题组的研究人员也分别报道了使用CRISPR/Cas9技术来修复导致 β -地中海贫血的HBB基因中的4 bp缺失^[31,37], 而Wu等人^[23]则修复了导致了白内障发病的Crygc基因第3号外显子中的1 bp缺失.

在上述研究中, 目标基因通过基因编辑介导的同源性修复得以正常表达, 实现了功能完全恢复. 对于

CRISPR/Cas9系统而言, 无论需敲入的基因片段大小如何, 一条sgRNA足以将双链切口和插入缺失(indel)引入所需位置以诱导后续的HDR作用. 所设计的sgRNA的识别位点通常位于突变位点的相邻区域(当然PAM序列的选择也需要被考虑在内). 另一方面, 前文已经提到, 对于HDR模板而言, 质粒DNA和ssODN各有优劣^[2]. 值得注意的是, 从基因导入的角度来看, 在不同长度基因敲入的研究中, ssODN更多地被应用于涉及受精卵或胚胎直接显微注射的相关研究手段中, 而很少涉及利用电转的传输方法. 而多个研究报道指出, 在使用CRISPR/Cas9系统的小鼠基因编辑研究中, ssODN形式的供体模板在HDR介导的基因敲入时体现出了更高的修复效率^[23,36-38]. 当用ZFN技术进行编辑时, ssODN寡核苷酸也较大型的dsDNA质粒更有效^[47]. 然而, 据研究所知, 目前尚缺乏系统性的比较研究来分析这两种模板形式在CRISPR/Cas9系统、特别是不同片段长度的基因敲入应用中的优劣. 与点突变相比, 通过HDR作用将长度为几个、几十个甚至几百个碱基的DNA片段整合到靶位点显得更为困难和复杂^[2], 因此需要根据实际情况来选择模板. 此外, 尽管确切的HDR介导的修复机制仍然未知, 但ssODN和dsDNA各自在修复双链切口时的作用机理很可能也不尽相同^[48,49]. 因此, 需要更多的针对ssODN和dsDNA的系统性研究来分析二者之间的优劣, 进而作出更加权威和客观的判断.

1.3 外显子切除

CRISPR/Cas9系统还能够通过让多个gRNA同时发挥作用从而引入多个双链切口来实现对目的基因进行大片段切除. 特殊情况下, 使用CRISPR/Cas9技术进行外显子的切割也能够为相关疾病的基因治疗提供独特的治疗思路.

DMD为这一策略在遗传性缺陷疾病治疗中的实施提供了一个很好的例子. 如上所述, DMD是一种导致进行性肌营养不良的严重X连锁疾病. 目前已证实, 不同类型的基因突变参与了DMD产生, 其中, Dmd基因的一个或多个外显子的大片段缺失突变最为常见. 除了敲入缺失的Dmd基因片段的策略之外, DMD同时还是单基因遗传性疾病中可通过剪除其基因内部不重要的区域来实现功能修复的重要实例之一^[45,50]. 例如, Dmd基因的第45~55号外显子突变常见区域中的基因

序列缺失会导致产生截短的、但具有部分功能的肌萎缩蛋白^[40]。具有这种类型基因突变的患者通常是无症状的或体现出“贝克肌营养不良症”样的轻度症状,其严重程度远低于DMD^[40]。这一发现促使研究人员对于开发基于“外显子跳跃”策略的重大兴趣。该策略通过调控mRNA剪切行为,有意地“略过”特定外显子的转录,实现在mRNA水平将可读框恢复到正常顺序,从而将DMD症状转化为较轻的贝克尔样表型^[50]。基于这一概念, Ousterout等人尝试直接使用CRISPR/Cas9基因编辑技术,通过相关外显子的直接切除来治疗DMD。他们设计了两条用于识别第45~55号外显子外侧内含子区域的sgRNA,用于编辑DMD患者来源的骨骼成肌细胞。该系统成功地在相应区域产生了一截大片段的基因组删除,所剪下的序列长度达到336 kb,范围覆盖第45~55号的外显子中的所有常见突变热点,有效地解决60%以上的DMD基因突变^[45,51,52]。尽管该治疗策略会导致肌萎缩蛋白的第45~55号外显子区域缺失,但它有效地恢复了细胞中肌萎缩蛋白的表达,仍然具有积极的治疗意义。通过富集基因编辑后的细胞并植入免疫缺陷小鼠,能在体内成功观察到人肌萎缩蛋白的表达,提示明显的治疗成果。同样, Xu等人^[53]也成功地使用一对分别识别小鼠*Dmd*基因中第20和23号内含子的gRNA,实现在小鼠模型体内对第21号(181 bp)、第22号(146 bp)和第23号外显子(213 bp)的全部切除。此外,通过对DMD模型小鼠的X染色体长达23 kb片段的切除,作者还成功地恢复了小鼠体内骨骼肌纤维膜肌萎缩蛋白的表达。

上述研究利用对基因组中完整的外显子区域的大规模切除,有效实现了缺陷功能的恢复,成功展示了DMD治疗的新思路。与通过NHEJ或HDR产生indel从而修复基因缺陷的策略相比,该方法的主要优点是目标基因编辑后的蛋白质产物是可预测的,并已经在“贝克肌营养不良症”的转化诱导研究中得到证实。与通过indel介导的修复相比,该策略可有效避免每次编辑修复过程中在目标区域产生新的、不可预测的表型。此外,该方法无需使用任何形式的供体模板予以辅助,因此可极大地降低临床应用过程中的成本和实施难度。然而,从另一个方面来看,多个双链切口的引入不可避免地增加了对基因编辑系统准确性的严格要求,以降低意外染色体重排的产生概率。

1.4 修复染色体重排

除点突变、基因缺失以及外显子功能缺失之外,染色体倒置和重排也是导致遗传疾病的重要原因。CRISPR/Cas9基因编辑系统同样也已经被应用于纠正和修复该类型的基因缺陷。其中最具代表性的例子是A型血友病的治疗。A型血友病是由人*F8*基因突变所引起的X连锁遗传性疾病,由于该基因编码凝血因子VIII,其突变直接导致VIII因子关联的凝血功能障碍。在绝大部分严重的A型血友病案例中,将近1/2是由于*F8*基因的第1和第22号内含子中的两个大型片段(140和600 kb)发生染色体片段重排产生^[54,55]。该重排源自DNA双链缺口的修复过程中偶然错误发生的非等位基因同源重组。针对该种基因缺陷, Park等人使用同时含有2套gRNA的CRISPR/Cas9系统,将A型血友病患者来源的iPSC中的这两个大型重排区域同时恢复到正常顺序。其结果表明,分化自编辑后iPSC细胞的内皮细胞在体外成功完整表达*F8*基因,同时,血友病小鼠模型体内的*F8*基因缺陷得到有效修复,展示了基于基因编辑细胞治疗的理论可行性。

在应用于基因治疗研究之前, CRISPR/Cas9介导的染色体重排手段最早被用于人类疾病动物模型的建立。真实地小鼠体内重现导致肿瘤发生和发展的染色体融合或重排情况,将为临床用药的有效性和敏感性提供强有力的支撑^[56-58]。最近,由Maddalo和Blasco分别领导的两个独立的研究小组^[57,59]通过CRISPR/Cas9基因编辑手段成功地在小鼠体内建立了由*Eml4-Alk*基因重排而驱动的肺癌模型。Choi和Meyerson^[60]也成功地利用CRISPR/Cas9技术在小鼠体内重现了包括*CD74-ROS1*, *EML4-ALK*和*KIF5B-RET*在内的多个驱动肺癌发生发展的染色体重排现象。这些研究为建立准确的疾病基因模型以及基因缺陷研究方法提供了更加灵活和简便的策略。此外,上述相关A型血友病的治疗研究成果也开创性地证明, CRISPR/Cas9基因编辑技术可以有效修复患者来源的iPSC细胞中的染色体倒置或大片段重排。该成果为同样涉及染色体倒置的亨特综合征^[61]和癌症^[62]等其他遗传疾病的治疗提供了潜在的手段和新的希望。

2 CRISPR/Cas9系统导入策略

除治疗策略之外,成功而高效的CRISPR/Cas9系

统导入途径也对相关疾病的治疗效果起着决定性的作用. 截至目前, 已有多个研究成功展示了运用不同传输手段对各种形式的CRISPR/Cas9基因编辑系统予以传输的实例, 均取得了不同程度的治疗效果. 在这些研究中, iPSC细胞的编辑和诱导、体内系统性传输以及受精卵的显微注射3种策略的应用得到了较多的关注.

2.1 基于iPSC细胞的基因编辑

iPSC技术的出现和迅速发展为个体化细胞治疗带来了新的希望^[63-67]. iPSC作为一种独特的、可分化的多功能细胞来源, 可通过其潜在的强大分化能力修复损伤或患病组织, 进而实现对广泛疾病的治疗^[68,69]. 基因编辑手段通过对iPSC细胞的基因改造, 能够实现对iPSC细胞的分化前修饰, 进而获得更为优化的细胞功能. 因此, iPSC和CRISPR/Cas9技术的结合也为遗传疾病的治疗带来了新的思路 and 希望^[70]. 编辑和制备具有患者个体特异性的iPSC细胞作为个体化再生医学的长期目标, 将为生理功能研究、药物筛选、治疗效果评估以及基于基因修复的细胞替代疗法提供特有的平台^[71,72].

近期研究表明, 经过基因编辑的患者特异性iPSC为 β -地中海贫血、SCID、视网膜色素变性和A型血友病等遗传性疾病的治疗提供了创新的策略. 例如, Xie等人^[31]利用CRISPR/Cas9技术修复了 β -地中海贫血患者来源的iPSC细胞中*HBB*基因的突变. 通过筛选编辑后的iPSC并进一步使其分化为成红血细胞, 所获得的细胞群表现出对*HBB*基因的正常表达. 同时, 取自患者自身体细胞的iPSC细胞为基因编辑和修复提供了丰富的细胞来源, 而所获得的iPSC可以进一步分化为可用于自体移植的造血干细胞和祖细胞(hematopoietic stem/progenitor cell, HSPC), 为后续体内研究提供了良好基础. 这种方法将有效地避免诸如同种异体移植所带来的免疫排斥反应或由病毒载体引入的基因整合等安全性问题^[31].

类似的, Li等人^[44]在源自DMD患者的iPSC中进行了3种不同的基因编辑尝试, 最终成功获得分化为可表达全长肌萎缩蛋白的骨骼肌细胞. 利用SCID患者来源的特异性iPSC细胞, Chang等人^[35]通过CRISPR/Cas9技术修复了*JAK3*基因突变, 并成功恢复了T细胞的正常发育功能. 类似的基因治疗策略也被成功应用于从

A型血友病^[55]和视网膜色素变性^[30]患者体内分离得到的iPSC中. 上述基于CRISPR/Cas9技术的研究为利用患者来源的iPSC细胞开展更为先进的细胞和基因治疗提供了理论基础. 该疗法不仅可省去免疫抑制药物的使用, 同时通过与CRISPR/Cas9技术介导的多种基因修复策略相结合, 还能实现对缺陷基因和功能的精准修复, 获得“叠加”的治疗效果^[71].

2.2 体内系统性传输

为了实现基于CRISPR/Cas9技术的体内基因编辑, 包括静脉注射^[73]、肺内注射^[59]、眼球后静脉注射^[74]和前额叶皮质注射^[75]等在内的技术手段已被用于基因编辑组分的体内传递. 其中, 借助相关策略在小鼠体内引入基因敲除、重排以及敲入等的研究手段最为常见. 这些研究成果进一步促进了体内系统性传输CRISPR/Cas9系统治疗人类遗传性疾病的相关研究尝试.

如前文所述, I型遗传性高酪氨酸血症是一种由FAH蛋白缺乏引起的遗传疾病. 该疾病导致肝细胞中有毒代谢物的积累, 进而产生严重的肝损伤^[28]. 前期研究表明, 通过AAV载体静脉输送野生型*Fah*基因序列可在小鼠体内实现稳定的基因修复, 但是, 其传输载体AAV所涉及的基因组整合特性是一个不可回避的安全问题^[28]. 另一方面, 有研究报道称肝脏中已获得*Fah*基因修复的肝细胞相对于非编辑细胞具有选择性增殖优势, 其细胞群可通过逐步分裂扩增实现最终重建肝脏功能^[28]. 受此提示, Yin等人^[26]通过尾静脉高压注射法将*Fah*基因靶向的CRISPR/Cas9系统质粒和对应ssODN修复模板导入酪氨酸血症小鼠中(*Fah*^{mut/mut}), 以期在肝脏中进行基因修复治疗. 通过对治疗后小鼠的肝脏样本和包括天冬氨酸转氨酶和丙氨酸氨基转移酶在内的血清标志物的分析, 作者观察到了CRISPR/Cas9系统对肝脏中*Fah*突变的成功修复, 实现对因FAH蛋白缺乏而引起的肝损伤的有效治疗. 在该研究中, CRISPR/Cas9系统的体内递送通过尾静脉高压注射法实现. 该方法通过尾静脉快速注射大体积的质粒DNA溶液, 从而简单而高效地实现目的基因的肝组织分布^[76]. 近年来, 通过尾静脉高压注射法传输治疗基因到肝组织的相关机制已经得到了深入的研究^[77], 并已经被应用于包括HBV^[78]和血友病^[79]在内的多种基于质粒DNA的基因治疗研究中. 在Yin等人的工作中, 尾静脉高压注射

的方法促进了CRISPR/Cas9质粒复合物在小鼠体内对肝组织的有效递送, 实现 $0.40\% \pm 0.12\%$ 的体内基因修复率, 体现出一定的应用潜力。然而, 由于对人体血液循环施加过重的负载容易引起心脏功能的损伤, 并导致短暂的心衰^[77], 因此借助全身血液循环系统的尾静脉高压注射手段在人体内实施的可行性较低。虽然啮齿类动物对该副作用耐受性较好, 但对于患者来讲可能并不安全。因此, 从临床应用的观点来看, 尚有待于进一步开发更安全的CRISPR/Cas9系统体内导入手段。

在另一项体内治疗研究案例中, 为了纠正类似的基因突变以实现治疗目的, 杨阳等人^[29]将*OTC*基因靶向的CRISPR/Cas9系统通过静脉注射导入到*OTC*缺陷的新生小鼠中。在该研究中, 他们将源自金黄色葡萄球菌的CRISPR/Cas9系统(SaCas9)整合到两个AAV8载体中, 一个载体用于SaCas9的表达, 另一个提供相应gRNA和修复模板。为了能够更好地评估在小鼠生长过程中*OTC*基因的修复所产生的治疗作用, 其作者巧妙地使用新生小鼠进行试验。其结果表明, 肝脏*OTC*酶活性随着编辑后细胞群的增殖扩增, 在第3~8周的观察区间内获得了明显的恢复。在上述研究中, 作者使用了8型腺相关病毒载体(AAV8)作为基因编辑系统的体内肝脏递送系统。不同血清型的腺相关病毒能够作为针对不同人体组织的基因递送载体而提供长期而强大的基因导入能力^[80-82]。目前已有部分基于AAV的基因治疗产品被批准进入临床使用^[83,84]。而经门静脉注射后, AAV8病毒载体被报道可感染小鼠肝脏中90%~95%的细胞^[84]。通过使用高度肝脏亲和力的AAV8载体, 杨阳及其同事在利用CRISPR/Cas9技术实现肝脏代谢疾病的基因治疗研究中实现了突破。其较高的体内修复效率同时还得益于在细胞不断分裂的背景下, AAV载体对SaCas9系统和修复模板高效而持续的整合表达。

除了上述研究外, AAV载体也已被成功地应用在多个CRISPR/Cas9介导的体内基因编辑研究中, 展现出令人印象深刻的效果和潜力^[73,85,86]。不过, 关于该载体的进一步应用仍然存在一些值得关注的问题。例如, 多个临床前和临床研究显示, AAV8载体对小鼠肝脏的基因传输效率比人体高20倍, 推测在人体内的应用可能达不到动物模型相同理想的效果^[87-90]。使用AAV载体的另一担忧是其宿主基因组整合能力, 而该能力并非是实施CRISPR/Cas9基因编辑所必需的, 且有可能导致免疫系统毒性或基因组损伤。不过即便如此,

上述研究依然成功地为体内静脉传输CRISPR/Cas9系统介导治疗人类致死性代谢疾病提供了令人信服的理论和实践依据。

2.3 受精卵显微注射

受精卵显微注射技术已经被广泛应用于各种动物模型的建模中。目前, 大多数转基因动物均是通过将目的基因引入受精卵实现, 相关的技术和支撑学科也得到了长足的发展^[91]。通过将CRISPR/Cas9系统注射到受精卵或早期胚胎中, 可以实现对生物个体包括生殖细胞在内的所有细胞基因组的编辑^[22]。理论上, 这种方法可实现对所有体细胞和生殖细胞的永久性改变, 从而成功将编辑后的基因型稳定遗传给后代。因此, 受精卵注射的传输手段已经被应用于基于CRISPR/Cas9技术的动物建模和体内基因治疗中。

例如, 为了修复*Crygc*基因的突变, Wu等人^[23]将CRISPR/Cas9系统以mRNA和gRNA复合物的形式, 通过显微注射导入小鼠的受精卵细胞中。其所编辑的受精卵取自携带白内障致病基因的*Crygc*^{-/-}小鼠与野生型小鼠的杂交后代。在22只新生幼仔中, 作者鉴定得到了10只携带编辑后*Crygc*基因的小鼠, 而其中4只小鼠成功通过HDR诱导的等位基因修复, 避免了白内障表型的产生。在DMD的治疗研究中, Long等人^[33]将组成CRISPR/Cas9系统的mRNA, gRNA和ssODN同源修复模板共同注射到小鼠受精卵中, 以纠正*mdx*缺陷小鼠染色体中的*Dmd*基因突变。其所获得的11个后代中, 有7只小鼠被检测到在*Dmd*的第23号外显子上发生了HDR介导的基因修复, 另外4只小鼠含有由NHEJ介导的可读框内终止密码子移除。其研究结果表明, CRISPR/Cas9技术介导的受精卵基因编辑可产生具有不同基因型的后代, 其目标基因*Dmd*的修复率范围为2%~100%。更为有趣的是, 通过进一步深入研究发现, 所获得的基因修复效果还具有时间依赖的特征, 并且该现象只有在骨骼肌中才能观察到。以上研究表明, 利用CRISPR/Cas9系统对受精卵进行基因编辑在相关疾病的基因治疗研究中体现出了较高的安全性和有效性。

一些表现为系统性呈现的遗传性基因疾病(如囊性纤维化或遗传性线粒体疾病)、单基因病变但影响广泛的遗传性基因疾病(如肌营养不良)或治疗手段难以触及的遗传性基因疾病(如亨廷顿氏病中涉及的基

底神经节)的治疗对于基于体细胞的治疗方法来说可能往往具有较大挑战性^[33]. 因此, 针对受精卵或胚胎的基因组编辑很可能会为上述疾病的治疗提供更好的选择. 然而, 即使将伦理学考量放在一边, 多个关键的问题仍然限制着在人体上实施基于受精卵的基因编辑. 例如, 有研究显示, 在通过显微注射、并已经实现了基因组编辑的细胞在进一步有丝分裂时, 所得到的子代细胞的基因组之间仍然可能出现基因型的异质性^[33,92], 这使得对基因编辑所产生的后代的表型进行合理预测和控制变得困难. 同时, 虽然CRISPR/Cas9系统可通过显微注射成功导入并实施编辑, 但其编辑效率并不完全可控, 导致所产生的后代可能为嵌合子, 即有一部分体细胞和生殖细胞可能并不具有编辑后的基因组成^[92]. 此外, 还有部分学者报道称将CRISPR/Cas9系统直接注射到受精卵中可能降低生物个体产生健康后代的几率^[23]. 更重要的是, 目前, 在人体上进行生殖细胞或受精卵内的基因组编辑是被广泛禁止的^[33,92]. 因此, 必须制定更为明确的伦理准则, 进一步通过多种角度讨论基因组编辑对社会影响^[33]. 然而, 如果单从技术层面上看, 现有的基于小鼠受精卵的基因编辑研究仍然表明CRISPR/Cas9介导基因治疗巨大潜力.

3 展望

CRISPR/Cas9技术为编辑特定基因提供了强大的工具, 目前正在遗传疾病的治疗中展现出了巨大的应用潜力. 不论是通过体内系统性给药(如使用疾病动物模型)或离体递送(如体外iPSC细胞编辑), 使用CRISPR/Cas9技术来纠正基因缺陷的体内外相关研究已取得显著的进步, 为临床应用基因编辑的手段进行遗传病基因治疗带来了更多希望. 同时, 后续的相关研究将会在CRISPR/Cas9基因编辑技术用于基因治疗的有效性、特异性和安全性问题上开展更为深入的研究, 进一步挑战相关技术难点. 这些挑战包括但不限于: (i) 开发更优的基因传递系统用于CRISPR/Cas9系统的体内递送; (ii) 进一步发掘AAV和新型非病毒基因载体的应用潜力; (iii) 在CRISPR/Cas9系统的设计过程中提高HDR介导的基因修复的效率, 减少NHEJ导致的非目标突变; (iv) 以及进一步评估不同治疗和给药途径对于基因编辑系统的组织特异性的影响. 此外, 基于基因编辑的临床前研究还应特别关注CRISPR/Cas9系统的脱靶问题. 尽管存在这些挑战, CRISPR/Cas9基因编辑技术的快速发展将最终促进人类遗传疾病基因治疗的不断进步.

参考文献

- 1 Veltman J A, Brunner H G. *De novo* mutations in human genetic disease. *Nat Rev Genet*, 2012, 13: 565–575
- 2 Yoshimi K, Kaneko T, Voigt B, et al. Allele-specific genome editing and correction of disease-associated phenotypes in rats using the CRISPR-Cas platform. *Nat Commun*, 2014, 5: 4240
- 3 Ott J, Kamatani Y, Lathrop M. Family-based designs for genome-wide association studies. *Nat Rev Genet*, 2011, 12: 465–474
- 4 Beckmann J S, Estivill X, Antonarakis S E. Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. *Nat Rev Genet*, 2007, 8: 639–646
- 5 Frazer K A, Murray S S, Schork N J, et al. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet*, 2009, 10: 241–251
- 6 Zhang X, Wang S. From the first human gene-editing to the birth of three-parent baby. *Sci China Life Sci*, 2016, 59: 1341–1342
- 7 Zhang D, Li Z, Yan B, et al. A novel RNA-guided RNA-targeting CRISPR tool. *Sci China Life Sci*, 2016, 59: 854–856
- 8 Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819–823
- 9 Song B, Fan Y, He W, et al. Improved hematopoietic differentiation efficiency of gene-corrected beta-thalassemia induced pluripotent stem cells by CRISPR/Cas9 System. *Stem Cells Dev*, 2015, 24: 1053–1065
- 10 Zhang D, Li J F. DNA-guided genome editing tool. *Sci China Life Sci*, 2016, 59: 740–741
- 11 Mali P, Yang L, Esvelt K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339: 823–826
- 12 Yu Z, Ren M, Wang Z, et al. Highly efficient genome modifications mediated by CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. *Genetics*, 2013, 195: 289–291
- 13 Dickinson D J, Ward J D, Reiner D J, et al. Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nat Methods*, 2013, 10: 1028–1034
- 14 Friedland A E, Tzur Y B, Esvelt K M, et al. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods*, 2013, 10: 741–743

- 15 Chang N, Sun C, Gao L, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res*, 2013, 23: 465–472
- 16 Hwang W Y, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 227–229
- 17 Jao L E, Wente S R, Chen W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 13904–13909
- 18 Cho S W, Kim S, Kim J M, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 230–232
- 19 Gao X. Model animals and their applications. *Sci China Life Sci*, 2015, 58: 319–320
- 20 Li W, Teng F, Li T, et al. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 684–686
- 21 Jinek M, East A, Cheng A, et al. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*, 2013, 2: e00471
- 22 Savic N, Schwank G. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Trans Res*, 2016, 168: 15–21
- 23 Wu Y, Liang D, Wang Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 659–662
- 24 Bamshad M J, Ng S B, Bigham A W, et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet*, 2011, 12: 745–755
- 25 Gilissen C, Hoischen A, Brunner H G, et al. Unlocking Mendelian disease using exome sequencing. *Genome Biol*, 2011, 12: 1
- 26 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: 551–553
- 27 Azuma H, Paulk N, Ranade A, et al. Robust expansion of human hepatocytes in *Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-}* mice. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 903–910
- 28 Paulk N K, Wursthorn K, Wang Z, et al. Adeno-associated virus gene repair corrects a mouse model of hereditary tyrosinemia *in vivo*. *Hepatology*, 2010, 51: 1200–1208
- 29 Yang Y, Wang L, Bell P, et al. A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 334–338
- 30 Bassuk A G, Zheng A, Li Y, et al. Precision medicine: genetic repair of retinitis pigmentosa in patient-derived stem cells. *Sci Rep*, 2016, 6: 19969
- 31 Xie F, Ye L, Chang J C, et al. Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and *piggyBac*. *Genome Res*, 2014, 24: 1526–1533
- 32 Flynn R, Grundmann A, Renz P, et al. CRISPR-mediated genotypic and phenotypic correction of a chronic granulomatous disease mutation in human iPS cells. *Exp Hematol*, 2015, 43: 838–848.e3
- 33 Long C, McAnally J R, Shelton J M, et al. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science*, 2014, 345: 1184–1188
- 34 Huang X, Wang Y, Yan W, et al. Production of gene-corrected adult beta globin protein in human erythrocytes differentiated from patient iPSCs after genome editing of the sickle point mutation. *Stem Cells*, 2015, 33: 1470–1479
- 35 Chang C W, Lai Y S, Westin E, et al. Modeling human severe combined immunodeficiency and correction by CRISPR/Cas9-enhanced gene targeting. *Cell Rep*, 2015, 12: 1668–1677
- 36 Wang H, Yang H, Shivalila C S, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153: 910–918
- 37 Yang H, Wang H, Shivalila C S, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 154: 1370–1379
- 38 Carbery I D, Ji D, Harrington A, et al. Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2010, 186: 451–459
- 39 Hoffman E P, Brown R H, Kunkel L M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 1987, 51: 919–928
- 40 Ousterout D G, Kabadi A M, Thakore P I, et al. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun*, 2015, 6: 6244
- 41 Pichavant C, Aartsma-Rus A, Clemens P R, et al. Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. *Mol Ther*, 2011, 19: 830–840
- 42 Okada T, Takeda S I. Current challenges and future directions in recombinant AAV-mediated gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Pharmaceuticals*, 2013, 6: 813–836
- 43 Filareto A, Parker S, Darabi R, et al. An *ex vivo* gene therapy approach to treat muscular dystrophy using inducible pluripotent stem cells. *Nat Commun*, 2013, 4: 1549
- 44 Li H L, Fujimoto N, Sasakawa N, et al. Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Rep*, 2015, 4: 143–154

- 45 Aartsma-Rus A, Fokkema I, Verschuuren J, et al. Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat*, 2009, 30: 293–299
- 46 Cheng S H, Gregory R J, Marshall J, et al. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*, 1990, 63: 827–834
- 47 Chen F, Pruett-Miller S M, Huang Y, et al. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. *Nat Meth*, 2011, 8: 753–755
- 48 Weiner A, Zauberman N, Minsky A. Recombinational DNA repair in a cellular context: a search for the homology search. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7: 748–755
- 49 Huertas P. DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17: 11–16
- 50 Lu Q L, Yokota T, Takeda S I, et al. The status of exon skipping as a therapeutic approach to duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther*, 2011, 19: 9–15
- 51 Aartsma-Rus A, Kaman W E, Weij R, et al. Exploring the frontiers of therapeutic exon skipping for Duchenne muscular dystrophy by double targeting within one or multiple exons. *Mol Ther*, 2006, 14: 401–407
- 52 Aoki Y, Yokota T, Nagata T, et al. Bodywide skipping of exons 45–55 in dystrophic mdx52 mice by systemic antisense delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 13763–13768
- 53 Xu L, Park K H, Zhao L, et al. CRISPR-mediated genome editing restores dystrophin expression and function in *mdx* mice. *Mol Ther*, 2016, 24: 564–569
- 54 Graw J, Brackmann H H, Oldenburg J, et al. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 488–501
- 55 Park C Y, Kim D H, Son J S, et al. Functional correction of large factor VIII gene chromosomal inversions in hemophilia A patient-derived iPSCs using CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 213–220
- 56 Sharpless N E, DePinho R A. The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5: 741–754
- 57 Maddalo D, Machado E, Concepcion C P, et al. In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature*, 2014, 516: 423–427
- 58 Pirazzoli V, Nebhan C, Song X, et al. Acquired resistance of EGFR-mutant lung adenocarcinomas to afatinib plus cetuximab is associated with activation of mTORC1. *Cell Rep*, 2014, 7: 999–1008
- 59 Blasco R B, Karaca E, Ambrogio C, et al. Simple and rapid *in vivo* generation of chromosomal rearrangements using CRISPR/Cas9 technology. *Cell Rep*, 2014, 9: 1219–1227
- 60 Choi P S, Meyerson M. Targeted genomic rearrangements using CRISPR/Cas technology. *Nat Commun*, 2014, 5: 3728
- 61 Bondeson M L, Dahl N, Malmgren H, et al. Inversion of the *IDS* gene resulting from recombination with IDS-related sequences in a common cause of the Hunter syndrome. *Hum Mol Genet*, 1995, 4: 615–621
- 62 Nikiforova M N, Stringer J R, Blough R, et al. Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. *Science*, 2000, 290: 138–141
- 63 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663–676
- 64 Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, 2007, 318: 1920–1923
- 65 Park I H, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 2008, 134: 877–886
- 66 Raya A, Rodríguez-Pizà I, Guenechea G, et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, 460: 53–59
- 67 Mukherjee S, Thrasher A J. iPSCs: unstable origins? *Mol Ther*, 2011, 19: 1188
- 68 Avior Y, Sagi I, Benvenisty N. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17: 170–182
- 69 Chen Z G, Zhang Y A. Cell therapy for macular degeneration—first phase I/II pluripotent stem cell-based clinical trial shows promise. *Sci China Life Sci*, 2015, 58: 119–120
- 70 Kimbrel E A, Lanza R. Current status of pluripotent stem cells: moving the first therapies to the clinic. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14: 681–692
- 71 Robinton D A, Daley G Q. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 2012, 481: 295–305
- 72 Trounson A, DeWitt N D. Pluripotent stem cells progressing to the clinic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17: 194–200
- 73 Ran F A, Cong L, Yan W X, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 2015, 520: 186–191
- 74 Ding Q, Strong A, Patel K M, et al. Permanent alteration of PCSK9 with *in vivo* CRISPR-Cas9 genome editing. *Circul Res*, 2014, 115: 488–492

- 75 Platt R J, Chen S, Zhou Y, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 2014, 159: 440–455
- 76 Sebestyén M G, Budker V G, Budker T, et al. Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein injection. I. Hepatocyte uptake of various molecules. *J Gene Med*, 2006, 8: 852–873
- 77 Suda T, Liu D. Hydrodynamic gene delivery: its principles and applications. *Mol Ther*, 2007, 15: 2063–2069
- 78 Morrissey D V, Lockridge J A, Shaw L, et al. Potent and persistent *in vivo* anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 1002–1007
- 79 Olivares E C, Hollis R P, Chalberg T W, et al. Site-specific genomic integration produces therapeutic Factor IX levels in mice. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 1124–1128
- 80 Inagaki K, Fuess S, Storm T A, et al. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther*, 2006, 14: 45–53
- 81 Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, et al. Analysis of AAV serotypes 1–9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther*, 2008, 16: 1073–1080
- 82 Asokan A, Schaffer D V, Samulski R J. The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. *Mol Ther*, 2012, 20: 699–708
- 83 Mingozzi F, High K A. Therapeutic *in vivo* gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet*, 2011, 12: 341–355
- 84 Piras B A, Drury J E, Morton C L, et al. Distribution of AAV8 particles in cell lysates and culture media changes with time and is dependent on the recombinant vector. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2016, 3: 16015
- 85 Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, et al. *In vivo* interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 102–106
- 86 Shinmyo Y, Tanaka S, Tsunoda S, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using *in utero* electroporation. *Sci Rep*, 2017, in press, doi: 10.1002/cpns.26
- 87 Davidoff A M, Gray J T, Ng C Y C, et al. Comparison of the ability of adeno-associated viral vectors pseudotyped with serotype 2, 5, and 8 capsid proteins to mediate efficient transduction of the liver in murine and nonhuman primate models. *Mol Ther*, 2005, 11: 875–888
- 88 Kay M A, Manno C S, Ragni M V, et al. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet*, 2000, 24: 257–261
- 89 Lisowski L, Dane A P, Chu K, et al. Selection and evaluation of clinically relevant AAV variants in a xenograft liver model. *Nature*, 2014, 506: 382
- 90 Manno C S, Pierce G F, Arruda V R, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med*, 2006, 12: 342–347
- 91 Smith K R. Gene therapy: the potential applicability of gene transfer technology to the human germline. *Int J Med Sci*, 2004, 1: 76–91
- 92 Porteus M H, Dann C T. Genome editing of the germline: broadening the discussion. *Mol Ther*, 2015, 23: 980–982