



造血干细胞基因治疗: 进展与挑战

张健萍¹, 程涛^{1,2,3,4*}, 张孝兵^{1,2,3,5*}

1. 中国医学科学院&北京协和医学院血液病医院(血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020;

2. 中国医学科学院干细胞医学中心, 天津 300020;

3. 北京协和医学院干细胞与再生医学系, 天津 300020;

4. 肿瘤医学协同创新中心, 天津 300020;

5. Department of Medicine, Loma Linda University, Loma Linda, CA 92350, USA

* 联系人, E-mail: chengtao@ihcams.ac.cn; zhangxbhk@gmail.com

收稿日期: 2017-08-30; 接受日期: 2017-09-26; 网络版发表日期: 2017-12-14

国家重点研发计划(批准号: 2016YFA0100600)、科技部重大基础研究项目(批准号: 2015CB964902)、国家自然科学基金(批准号: 81500148, 81400150)、中国医学科学院医学与健康科技创新工程服务“一带一路”战略先导科研专项(批准号: 2017-I2M-B&R-04)和中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费(批准号: 2016ZX310184-3)资助

摘要 造血干细胞具有自我更新和分化为各类血细胞的潜能, 一直被认为是最理想的基因治疗靶细胞之一。近年来, 基于慢病毒载体的造血干细胞基因治疗逐渐进入临床。同时, 随着CRISPR-Cas9等基因编辑技术的不断发展, 第二代造血干细胞精准基因治疗研究已经取得重要进展, 预计将逐渐开始临床转化。但目前, 造血干细胞基因编辑还面临一些问题亟待解决, 尤其是精准编辑效率还需要大幅度提高。

关键词 造血干细胞, 基因治疗, 基因编辑, CRISPR, Cas9-sgRNA

1 造血干细胞移植

异体骨髓移植和造血干细胞移植是20世纪最重要的医学革命之一, 第一次使恶性肿瘤不再是绝症, 而变成可以治愈的疾病。造血干细胞移植已经常规地用于治疗白血病等多种恶性血液疾病, 同时也可以用来治疗血液系统非恶性遗传病, 如地中海贫血等。但是, 异体造血干细胞移植仍然存在一些问题, 例如, (i) 组织相容性抗原HLA完全匹配的供者常常难以找到, 因此相当一部分病人不能受惠于这一治疗方案; (ii) 干细胞移植预处理方案和移植后产生的急性移植排斥宿主病(host versus graft reaction, GVHD)可能导致10%~20%

的病人在治疗过程中死亡。另外, 慢性GVHD使相当一部分病人生活质量降低。因此, 异体造血干细胞移植主要适用于危及生命的疾病。为解决上述问题, 人们提出了一个替代方案: 首先纯化病人自体的携带变异基因的造血干细胞, 在体外短暂培养并且导入正常基因和相应表达调控元件后, 再把干细胞移植入病人体内。这一治疗方法被称为造血干细胞基因治疗。

2 利用造血干细胞进行基因治疗的优势

造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)在基因治疗领域具有巨大的应用潜力, 因为基因改良后的造

引用格式: 张健萍, 程涛, 张孝兵. 造血干细胞基因治疗: 进展与挑战. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1323-1335

Zhang J P, Cheng T, Zhang X B. Hematopoietic stem cell gene therapy: progress and challenges (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2017, 47: 1323-1335, doi: 10.1360/N052017-00268

血干细胞植入后可替换原有造血和免疫系统. 随着造血干细胞鉴定、分离、纯化及移植技术的成熟, 以造血干细胞为靶细胞的基因治疗技术经过20多年的研究开发和不断优化, 已经逐渐进入临床, 并且取得了初步成功.

自从基因治疗的概念提出以来, 造血干细胞一直被认为是最理想、最有发展前景的靶细胞^[1]. 造血干细胞基因治疗的优势在于: (i) 造血干细胞不仅能够自我更新, 而且能够分化成各种类型血细胞, 因此少量的转基因造血干细胞植入后就能够维持终生, 重建整个造血和免疫系统, 从而一次性治愈疾病, 避免了多次治疗的麻烦. (ii) 由于多种先天性或遗传性疾病包括血液系统疾病、免疫相关疾病和代谢类疾病等的发生与造血干细胞有关, 已有的治疗方案也多依赖于异基因干细胞移植或输血等. 同样地, 这些疾病患者也可以接受自体造血干细胞基因治疗. (iii) 造血干细胞获得渠道广泛, 既可以从动员的外周血中或骨髓中获得, 也可以从脐带血中获得. 通过短暂的体外培养进行基因治疗操作后, 就可以移植给患者. (iv) 造血干细胞分离纯化技术、体外培养技术和移植技术以及基因编辑技术的不断优化改良为造血干细胞基因治疗提供了技术保障; (v) 经过基因改造或编辑的造血干细胞移植给患者后, 目的基因表达产物可以通过血液循环到达靶器官. 同时造血干细胞可以分化成各种成熟血细胞, 如T、B淋巴细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞、粒细胞、巨核细胞和红细胞等, 可随血液循环分布于全身, 有利于治疗各种系统性疾病.

3 造血干细胞基因治疗的基本原理和步骤

造血干细胞可以自我更新, 一旦植入成功, 这些细胞以及所有子代细胞都会表达治疗性基因, 从而永久性治愈疾病. 逆转录病毒载体可以成功地把转基因整合到造血干细胞基因组上. 早期使用的伽玛逆转录病毒载体(Gammaretroviral vector)基因转导效率偏低, 同时存在较大安全隐患^[2]. 目前大部分干细胞基因治疗采用慢病毒载体. 慢病毒载体是从人类免疫缺陷病毒-1 (human immunodeficiency virus 1, HIV-1)来源的一种转基因载体. 相比一般的逆转录病毒载体, 慢病毒载体具有独特的优势: (i) 与伽玛逆转录病毒载体不同, 不需要经历细胞分裂和细胞核膜破裂过程, 慢病毒载体就可以进入细胞核和整合到基因组上, 因此对分裂细胞和非分裂细胞都具有感染能力, 从而使基因转导效率大幅度提高^[3]. (ii) 伽玛逆转录病毒主要整合到转录调控区域, 因此有较高的几率激活致癌基因, 而慢病毒载体主要整合到内含子区域^[4]. 大量研究表明, 使用慢病毒载体使基因治疗安全性提高3~5倍^[5,6]. 但是所有的整合型载体都存在潜在安全问题. 过去十年, 随着定点基因编辑技术的快速发展成熟, 尤其是简单高效的CRISPR-Cas9技术的异军突起, 造血干细胞基因治疗的安全性问题有望得到完全解决.

自体造血干细胞基因治疗分为4步(图1): (i) 富集和纯化患者的造血干细胞; (ii) 体外造血干细胞基因修饰/编辑, 包括利用慢病毒体外转导或者利用锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)/TALEN核酸酶(transcription activator-like effector nuclease)/CRISPR

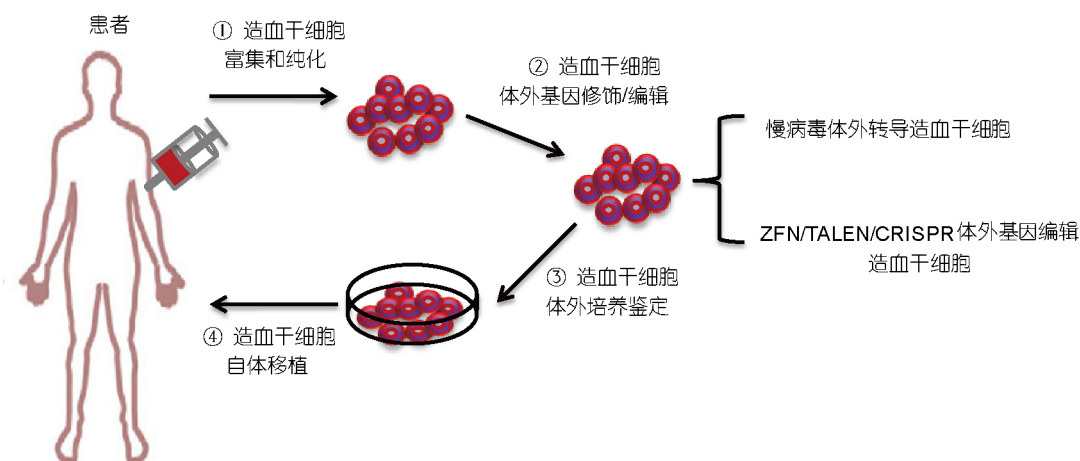


图1 自体造血干细胞基因治疗示意图^[7](网络版彩图)

(clustered regularly interspersed short palindromic repeat)等基因编辑技术体外修饰造血干细胞; (iii) 经基因修饰或编辑的造血干细胞的体外鉴定; (iv) 自体造血干细胞移植。

4 基于病毒载体的造血干细胞基因治疗在临床治疗中取得初步成功

造血干细胞移植可以治愈维-奥德里奇综合征(Wiskott-Aldrich syndrome, WAS)、X-连锁严重联合免疫缺陷(X-linked severe combined immunodeficiency, SCID-X1)和 β -地中海贫血(β -thalassaemia)等疾病^[8], 然而异基因造血干细胞移植具有相当大的并发症风险和死亡率, 特别是对HLA配型不合的患者, 即使是在少数HLA匹配的家庭捐助中, 并发症风险仍然较大^[9]。而以自体造血干细胞为靶细胞的基因治疗, 不会产生免疫排斥和GVHD等, 因此造血干细胞基因治疗可以解决部分医疗需求, 尤其是当没有HLA完全匹配的造血干细胞捐赠者可用时。基于慢病毒载体的造血干细胞基因治疗方案已经用于治疗多种重型遗传性疾病, 如免疫和血液系统疾病WAS, SCID-X1^[10-12]、 β -地中海贫血^[8]等, 以及神经退行性疾病肾上腺脑白质营养不良(adrenoleukodystrophy, ALD)和存储异染性脑白质病变(metachromatic leukodystrophy, MLD)^[13-15]等(表1)。

WAS是一种X染色体连锁隐性遗传, 原发性免疫缺陷病。致病原因是位于X染色体(Xp11.2~11.23)上的用于组装免疫突触所需的细胞骨架接头的WAS基因突变^[21], 导致血小板和免疫细胞的功能异常。多年以来, 治疗WAS唯一的方法是异体造血干细胞移植^[22-24]。Braun等人^[25]首先尝试利用伽玛逆转录病毒载体对WAS患者进行自体造血干细胞基因治疗。该方法能够使患者免疫功能得到改善。然而, 在9名接受治疗的患者中, 有7人因插入突变引发急性白血病。在随后的临床试验中, 人们开始转而使用更加安全的慢病毒载体。最近, 两个基于慢病毒载体(LV-w1.6 WASp)的治疗方案取得了初步成功^[10,11]。这两项研究的结果都显示了显著的临床效益, 而且没有发现肿瘤恶性转化或者单克隆细胞持续扩增的证据。更新的报道指出, 治疗20个月后, 表达WAS基因的细胞不断扩增, 在T细胞、B细胞和髓系细胞群中发现多个克隆^[17]。病人在停止使用免疫抑制剂和外源免疫球蛋白治疗后检测

发现, 血管炎性标志物得到改善, 表明这一基于慢病毒载体的治疗方案具有明显疗效。

SCID-X1是由于免疫细胞发育所必需的共用细胞因子受体IL2RG (interleukin-2 receptor γ chain)突变而导致免疫系统发育和功能缺陷^[26,27]。在一个有20名无匹配供者的SCID-X1患儿参与的临床试验中, 首先利用基于小鼠(*Mus musculus*)莫洛尼(氏)白血病病毒(Moloney leukemia virus, MLV)的伽玛逆转录病毒载体转导患儿自体的CD34⁺骨髓细胞, 然后患儿接受了自体造血干细胞移植。在这一治疗方案中, MLV载体表达IL2RG, 同时在长末端重复(long terminal repeat, LTR)中包含病毒增强子序列。这些临床试验的治疗效果(产生了T细胞的重组)和无病生存率类似于HLA匹配的异体造血干细胞移植^[28,29]。然而, 在20个接受治疗的病人中, 有5个发生了插入突变, 激活了原癌基因LMO2或CCND2等, 引发T细胞急性淋巴细胞白血病^[2,30,31]。为减少插入突变的产生, 后续的实验中使用了删除病毒增强子序列的自失活型伽玛逆转录病毒载体^[12]。在该临床研究中, 共招募了9名患有SCID-X1的男孩, 进行自体CD34⁺造血干细胞基因治疗。12~38个月的随访表明, 9个孩子中有8个仍然存活。一名病人在基因改造的T细胞重建前, 死于腺病毒感染。在剩下的8名患者中, 有7名患者的外周血T细胞恢复了正常功能, 病人保持健康状态^[12]。

β 血红蛋白病, 如镰刀细胞贫血和 β 地中海贫血, 都是由血红蛋白的组成成分 β -globin (HBB)珠蛋白亚基突变而导致的成人血红蛋白(adult hemoglobin, HbA)异常。目前根治 β 血红蛋白病的方法主要是异基因造血干细胞移植。携带功能正常的 β 珠蛋白基因在异体造血干细胞成功植入后, 可不断分化为功能正常的红系祖细胞, 持续形成功能正常的红细胞。但异体造血干细胞移植供者难求, 而且异基因造血干细胞移植具有一定的死亡率, 特别是对HLA配型不合的患者, 即使是在少数HLA完全匹配的家庭捐助中, 发病风险仍然较大^[9]。而如果将患者自体造血干细胞利用基因编辑技术修复或者过表达正常(或者抗镰刀型病变的)HBB基因就可以治愈 β 血红蛋白病。美国蓝鸟(Bluebird)公司作为基因治疗领域的先驱, 已经开发出LentiGlobin BB305等基因治疗产品, 用于治疗输血依赖性 β 地中海贫血和重度镰状细胞病。LentiGlobin BB305是表达HBB (T87Q)基因的慢病毒载体, 可将抗镰刀型病变的

表 1 病毒载体介导的造血干细胞基因治疗临床应用(改自文献[16])

疾病类型	载体及治疗策略	病人数量	追踪时间(月)	病人状况及临床结果	临床试验编号	参考文献
WAS	慢病毒载体,体外转基因到CD34 ⁺ 细胞	7	10~60	所有病人均存活 转基因细胞稳定植入 疗效持久;安全性好	NCT01515462	Aiuti 等人 ^[10]
				6个病人存活, 1个病人死于预先存在的感染 转基因细胞稳定植入 疗效持久;安全性好	NCT01347242 NCT01347346 NCT02333760	
		7	9~42	8个病人存活, 1个病人死于腺病毒感染 转基因细胞稳定植入	NCT01410019 NCT01175239	Hacein-Bey Abina 等人 ^[11] 、 Morris 等人 ^[17]
				7个病人疗效持久安全性好, 1个病人植入失败后接受了造血干细胞移植	NCT01129544	
SCID-X1	自失活型伽玛逆转录病毒载体, 体外转基因到CD34 ⁺ 细胞	9	12~39	2个病人实现转基因细胞稳定植入, 1个病人不再依赖于输血 1个病人植入失败, 然后接受了救援细胞	N/A	Cavazzana-Calvo 等人 ^[18] 、 BlueBird Bio 公司
β 血红蛋白病(镰刀细胞贫血和β地中海贫血)	慢病毒载体, 体外转基因到CD34 ⁺ 细胞	3	24~72	转基因细胞稳定植入 2个病人不再依赖于输血, 安全性好	NCT02151526	Ribeil 等人 ^[19]
		5	1~6	转基因细胞稳定植入 在可评价的2个病人不再依赖于输血, 安全性好	NCT01745120	BlueBird 公司
		4	54~101	所有病人的转基因细胞稳定植入, 并且安全 3个病人的疗效持久	N/A	Cartier 等人 ^[13] 、Cartier 等人 ^[14]
ALD	慢病毒载体, 体外转基因到CD34 ⁺ 细胞	17	21.6~42	15个病人的疗效持久 1个病人由于病情恶化死亡, 1个病人接受异体造血干细胞移植后死亡	NCT01896102	Eichler 等人 ^[20] 、BlueBird 公司
MLD	慢病毒载体, 体外转基因到CD34 ⁺ 细胞	20	3~60	所有病人的转基因细胞稳定植入, 并且安全 所有在发生症状前开始治疗的婴儿患者疗效持久	NCT01560182	Biffi 等人 ^[15]

β 珠蛋白基因导入到患者自体造血干细胞中,然后将这些基因修饰的细胞再回输至患者体内,以恢复合成正常血红蛋白的能力^[32].这一疗法能够使地中海贫血患者彻底摆脱输血.2014年12月,蓝鸟公司在美国血液学协会(american society of hematology, ASH)年会上公布了初步结果:4名患者在接受这种治疗后,连续3个月不需要输血.LentiGlobinBB305也可以用来治疗镰刀细胞贫血症(sickle cell disease, SCD),第一例患者在治疗后15个月的追踪结果最近发表在《新英格兰医学杂志》上^[19].结果显示,在造血干细胞移植38天和91天后,该患者中性粒细胞和血小板数量渐趋恢复正常.功能正常的HBB的比例在移植后逐渐增加,15个月时已占 β 珠蛋白总量的48%.随着正常 β 珠蛋白比例的增加,移植后88天患者就停止了输血.自从接受造血干细胞移植后,该患者在15个月里没有出现任何SCD的症状.相比之下,在他接受治疗之前,平均每年会有1.6次SCD症状的爆发,需要住院抢救.

造血干细胞基因治疗的适应症还包括一些非血液系统遗传性疾病,如ALD等.ALD是一种脂质代谢障碍疾病,系X染色体连锁隐性遗传,因编码过氧化物酶体半转运蛋白ALD的基因*ABCD1* (ATP-binding cassette, subfamily D member 1)基因缺陷所致^[33].*ABCD1*基因突变引起超长链多不饱和脂肪酸异常降解,主要影响肾上腺和神经系统功能,全球男婴发病率为两万分之一.CALD (cerebral adrenoleukodystrophy)是ALD的致命形式,会导致患者神经细胞的保护鞘分解、进行性脑损害和最终死亡.目前,CALD唯一有效的治疗方法是异基因造血干细胞移植,然而这种方法会引起并发症,包括植入失败和GVHD等.自体造血干细胞基因治疗可以克服以上缺点,已被作为异体造血干细胞移植的替代治疗方法^[16].2009年,4个ALD患者接受了基因治疗,首先采集自体CD34⁺造血干细胞,然后利用慢病毒载体CG1711-hALD将*ABCD1*导入细胞内,最后进行自体造血干细胞移植^[13].其中两名患者在基因治疗后,检测到功能性*ABCD1*蛋白表达,病情趋于稳定.蓝鸟公司也开发了用于治疗CALD的Lenti-D载体.该疗法利用Lenti-D慢病毒载体将正常*ABCD1*基因导入自体造血干细胞内,再移植回患者体内.在一项名为Starbeam的全球性、多中心、试验性基因治疗研究中^[20],研究人员评估了该疗法治疗CALD的有效性和安全性.截止到2017年4月25日,17名患者中有16

人结束了中期研究实验(治疗后已达24个月或停止治疗).结果发现,88%的患者仍然存活,并且没有主要功能性残疾(MFD)症状.在CALD中,MFD症状包括6个严重缺陷:失去语言沟通能力、皮质盲(大脑视皮质中枢功能障碍引起的黑朦)、鼻胃管喂养、完全性失禁、轮椅依赖和丧失自主运动能力.

综上所述,随着载体技术的不断发展,基于自失活病毒载体的造血干细胞基因治疗方案在地中海贫血、镰刀细胞贫血、肾上腺脑白质营养不良等的临床试验中已经展示了显著的初期治疗效果.在监管机构认证批准后,有望扩大临床试验规模或直接进入临床治疗.但这些治疗方案在10~20年后的长期安全性依然不可预测,因此基因治疗学家一直没有停止对更加安全的基因治疗策略的探索.

5 基于基因编辑技术的第二代造血干细胞基因治疗在临床前研究中取得积极进展

基因编辑技术是利用靶向核酸酶对基因组进行靶向修饰的遗传工程技术,是当今生命科学领域的研究热点.人工/靶向核酸酶主要包含ZFN, TALEN核酸酶以及CRISPR系统中的Cas9酶,其中TALEN技术和CRISPR-Cas9技术分别在2012, 2013和2015年被*Science*杂志评为十大年度科学突破之一.这些技术作为基因编辑的重要工具受到越来越多的关注,也为造血干细胞基因治疗领域注入了新的生机.基因编辑技术的关键点是在基因组的特定位点产生双链DNA断裂,然后利用生物体内的DNA损伤修复机制,包括非同源末端连接(non-homologous end-joining, NHEJ)和同源重组(homologous recombination, HR)等,对目标DNA序列进行编辑,实现基因敲除、定点修复、基因敲入、染色体重排等操作^[34-38].新近出现的CRISPR-Cas9基因编辑系统最为简单高效,已被广泛运用到生命科学基础研究和临床医学研究中.自2007年以来,人们利用基因编辑技术在造血干细胞基因治疗的研究中不断取得进展.

基因编辑后的造血干细胞可治疗多种疾病,包括先天性或遗传性血液系统疾病、免疫相关疾病和代谢类疾病等.人自体CD34⁺造血干祖细胞可从病人的骨髓或者动员的外周血中获得,然后通过体外培养,在细胞因子刺激下实现预扩增后,利用ZFN, TALEN或者

CRISPR-Cas9等DNA编辑工具来纠正或敲除与CD34⁺细胞中特定基因。初步研究表明, 造血干细胞基因编辑有望用于治疗HIV, SCD, β 地中海贫血、SCID-X1和X-连锁慢性肉芽肿病(X-linked chronic granulomatous disease, X-CGD)等(表2)。

艾滋病(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)由HIV感染引起。HIV能够寄生在人体免疫细胞中, 其过度繁殖会破坏正常的免疫功能。CCR5细胞膜蛋白是HIV-1入侵机体细胞的主要辅助受体之一。因此利用基因编辑方法, 破坏CCR5基因, 就可以阻止HIV病毒入侵, 从而有望治愈艾滋病。2009年, 一位同时患有艾滋病和白血病的患者在接受异体造血干细胞移植时, 由于供体的HSC为纯合的CCR5基因自然缺失, 使得患者的HIV转为阴性, 这一意外发现掀起了通过敲除CCR5基因来根除艾滋病的研究热潮^[52]。在自体造血干细胞中敲除CCR5基因, 为治愈HIV提供了一个高效、低毒、普适的方案。

2010年, 通过DNA核转染法将靶向CCR5基因的ZFN导入人CD34⁺造血干祖细胞后, CCR5基因敲除效率在总细胞中为17%, 在干细胞中为11%。实验中将基因编辑的人CD34⁺细胞移植入免疫缺陷小鼠, 18周后在骨髓中所检测到的人CD45⁺细胞内CCR5基因敲除效率反映了HSC的敲除效率^[39,53]。2013年, 通过重组腺病毒载体AAV将靶向CCR5基因的ZFN导入人CD34⁺细胞, 群体细胞中的CCR5基因敲除效率为26%~31%, 而移植28周后检测到的干细胞敲除效率为3%左右^[40]。2014年, 通过DNA核转染CRISPR-Cas9质粒系统敲除CCR5基因发现, 共转染两个sgRNA可增加基因敲除效率, 在群体细胞中CCR5敲除效率为19%~26%^[41]。随后发现, 共转染两个末端修饰过的化学合成的sgRNA在CD34⁺细胞中基因敲除效率高达43%^[42]。2017年, 我国科学家陈虎和邓宏魁研究组^[45]通过电转Cas9质粒和一对sgRNA, 在造血干细胞中敲除效率达32%。功能研究发现, CCR5基因敲除的造血干细胞植入免疫缺陷小鼠后, 能够阻断HIV感染。这些研究结果预示了利用CRISPR-Cas9等基因编辑技术有望治愈艾滋病。

β 血红蛋白病除了可用转基因方法来治疗外, 还可以通过造血干细胞基因敲除来治疗, 因为如果患者表达一定水平的胎儿血红蛋白(fetal hemoglobin, HbF)就可降低 β 血红蛋白病病情的严重程度, 提示可以通过增加患者体内HbF的含量来缓解 β 血红蛋白病的症

状^[54]。过去十几年, 一系列的研究证实, *BCL11A*基因是发育过程中关闭胎儿 γ 珠蛋白表达的关键转录因子, 因此如果在患者自体造血干细胞中通过敲除*BCL11A*基因或者敲除*BCL11A*红系特异性增强子, 可以重启 γ 珠蛋白表达, 进而增加胎儿血红蛋白HbF的比例, 从而缓解 β 血红蛋白病病情^[55,56]。

在造血干细胞基因治疗领域, 最接近临床转化的两大应用可能是: 利用基因编辑技术破坏HIV病毒的辅助受体CCR5来治疗艾滋病^[57]以及破坏*HBB*的阻遏基因*BCL11A*^[58]来治疗镰刀细胞贫血。这两大应用都涉及基因敲除, 基因编辑效率相对较高。而基因敲入效率就低很多, 因为在人为制造双链DNA断裂后, 还要引入DNA模板指导细胞进行修复, 从而实现精确基因插入。如果能够进一步提高基因编辑技术在造血干祖细胞中纠正突变或添加DNA序列的能力(即提高基因敲入效率), 将显著扩大基因编辑技术的应用范围。

基因敲入是由HDR (homology-directed repair)介导的, 需要同时在细胞中引入靶向核酸酶和指导同源重组修复的DNA模板。这两个组分只需要短暂的出现, 就可以对基因组进行永久性的修改。可以利用可瞬时表达的运载工具, 包括核酸(DNA, mRNA和寡核苷酸)和一些病毒载体(IDLV、腺病毒Ad, AAV)等运载两个组分到细胞中进行基因编辑。这些运载工具已经成功地应用于多种细胞系和某些原代细胞中, 但它们在造血干祖细胞中的应用具有一定的挑战性, 尤其是用于插入一个全长基因时, 效率低下。起初, 人们对人脐带血CD34⁺细胞中的*IL2RG*基因进行编辑改造时, 是通过利用IDLV导入ZFN和同源重组模板DNA, 但基因编辑效率低于0.1%^[46]。最近, 通过联合转入ZFN mRNA和IDLV同源重组模板, 在造血干祖细胞中*PPP1R12C*内含子1(又称为AAVS1位点)或*IL2RG*外显子插入GFP效率达5%左右, 在最原始的造血干祖细胞或者具有长期造血重建能力的干细胞中的基因编辑效率为~2%^[47,59]。而利用同样的方法来修复*HBB*基因突变, 即通过电转导入ZFN mRNA和寡核苷酸模板或者通过IDLV导入同源重组模板, 在免疫缺陷小鼠内检测到的HSC编辑效率仅为0.2%~2.1%^[48]。这些结果表明, 在造血干细胞中的基因插入效率与编辑位点有关。

进一步的技术改良包括使用AAV6导入同源重组模板。Porteus研究组^[60]通过筛选10种AAV血清型发现, AAV6转染造血细胞的效率最高。因此, 新近的研究主

表2 基因编辑技术在临床前造血干细胞基因治疗中的应用

疾病类型	靶点	方法	编辑方式	基因编辑效率	参考文献
AIDS	人CD34 ⁺ HSPC的CCR5基因	通过DNA核转导入ZFN	NHEJ 敲除	敲除效率在总细胞中为17%, 在免疫缺陷小鼠移植18周后干细胞中为11%	Holt等人 ^[39]
AIDS	人CD34 ⁺ HSPC的CCR5基因	通过重组腺病毒载体 (adeno-associated viral vector, AAV)导入ZFN	NHEJ敲除	群体细胞中的敲除效率为26%~31%, 而移植28周后检测到的干细胞 敲除效率为3%左右	Li等人 ^[40]
AIDS	人CD34 ⁺ HSPC的CCR5基因	通过DNA核转导入CRISPR-Cas9	NHEJ敲除	在群体细胞中CCR5敲除效率 为19%~26%	Mandal等人 ^[41]
AIDS	人CD34 ⁺ HSPC的CCR5基因	通过核转染或电转转导 Cas9-sgRNA复合物	NHEJ敲除	使用两个sgRNA的敲除效率 为43% (TIDE assay)	Hendel等人 ^[42]
AIDS	人CD34 ⁺ HSPC的CCR5基因	通过衣壳改造的腺病毒载体 转导ZFN和TALEN	NHEJ敲除	敲除效率在总细胞中为8%~13%, 在免疫缺陷小鼠移植6周后检测 到的祖细胞中为8%~12%	Saydaminova等人 ^[43]
AIDS	人CD34 ⁺ 和胎肝HSPC的 CCR5基因	通过电转导入ZFN mRNA, 通 过AAV6导入模板DNA	HDR 敲入	在动员后外周血CCR5位点敲 入效率为17%~26%, 胎肝中敲 入效率为19%~43%	Wang等人 ^[44]
AIDS	人CD34 ⁺ HSPC的CCR5基因	通过电转Cas9质粒和一对sgRNA	NHEJ敲除	在造血干细胞中敲除效率达32%	Xu等人 ^[45]
SCID-X1	人脐带血CD34 ⁺ 细胞 IL2RG基因	通过整合酶缺失的慢病毒载体 (integrase-defective lentiviral vector, IDLV) (非整合型慢病毒载体) 导入ZFN和模板DNA	HDR敲入	在干祖细胞中的基因编辑 效率低于0.1%	Lombardo等人 ^[46]
SCID-X1	人脐带血或骨髓来源CD34 ⁺ 细胞的PPP1R12C内含子1 或IL2RG外显子5	通过电转导入ZFN mRNA, 通 过IDLV (非整合型慢病毒载 体)导入模板DNA	HDR敲入	敲入GFP效率为5%左右, 在具有 长期造血重建能力的干细胞中 的基因编辑效率为~2%	Genovese等人 ^[47]
SCD	人CD34 ⁺ HSPC的HBB基因	通过电转导入ZFN mRNA和模板 寡核酸或通过IDLV导入模板	HDR敲入	在免疫缺陷小鼠体内检测到的HSC 编辑效率仅为0.2%~2.1%	Hoban等人 ^[48]
SCD	人CD34 ⁺ HSPC的SCD SNP	通过电转导入Cas9-sgRNA复 合物和ssDNA模板	HDR敲入	群体细胞基因编辑效率32%, 在 免疫缺陷小鼠体内检测到的 HSC编辑效率2%~4%	DeWitt等人 ^[49]
SCD	人CD34 ⁺ HSPC的HBB基因	通过电转导入Cas9 (RNP或 mRNA)和sgRNA, 通过AAV6 导入模板DNA	HDR敲入	移植后16周检测到的干细胞基 因编辑效率为3.5%	Dever等人 ^[50]
X-CGD	gp91phox转基因到人CD34 ⁺ HSPC的AAVS1安全港位点	通过电转导入ZFN mRNA, 通 过AAV6导入模板DNA	HDR敲入	群体细胞基因敲入效率55%, 免 疫缺陷小鼠移植后检测到的 HSC编辑效率12%	De Ravin等人 ^[51]

要使用AAV6导入基因插入模板。2016年, Porteus研究组^[50]通过电转导入Cas9蛋白/mRNA和sgRNA对人镰刀细胞贫血致病基因突变*HBB*进行了基因编辑。他们利用AAV6导入表达GFP的同源重组模板DNA, 移植后16周检测到的干细胞基因编辑效率为3.5%。使用类似的方法, 通过电转ZFN mRNA, 在造血干细胞的*CCR5*和*AAVS1*位点进行基因插入, 最高效率可达5%~10%^[44,51]。这些结果再次表明, 精确插入效率与编辑位点的染色质的开放程度密切相关, 因为在HSC中, *HBB*位点处于关闭状态, 基因编辑难度较高; 而*CCR5*和*AAVS1*位点处于开发状态, 因此基因编辑效率相对较高。

为提高基因编辑效率, 本研究组设计了具有自主知识产权的新型双切载体, 使定点精准基因插入效率提高5~10倍^[61]。双切载体是在传统质粒模板的同源重组臂的两端接上Cas9-sgRNA的识别序列。本研究组尚未发表的数据表明, 这一方法在多种不同细胞的多个不同位点都能够大幅度提高基因编辑效率, 显示了这一方法的普适性。另外新近的一篇论文报道指出, 类似的方法可以在不同的实验室和不同的实验系统中完全重现^[62]。预期利用新的方法设计精准基因插入引导模板, 有可能大大提高造血干细胞的基因编辑效率。

还有其他方法可以提高造血干细胞的基因编辑效率, 例如, 在体外培养过程中, 如果加入可促进细胞扩增和干性维持的因子dmPGE2和SR1等, 基因敲入效率可提高2倍^[47]。另外, 新近报道显示, 通过使用化学修饰的sgRNA以及把它与模板DNA连接在一起, 可提高HDR效率3倍^[63]。

现有的治疗方案都是HSC在体外编辑后再植入体内。由于体外造血干细胞基因操作成本很高, 一些研究人员多年来一直试图在体内原位实现干细胞基因编辑, 但效率极低, 没有任何应用价值。然而最近两篇报道让人们看到了体内造血干细胞基因编辑的希望。如果未来能够直接在体内实现干细胞基因编辑, 就会极大地降低成本, 减少治疗副作用。体内编辑的难点在于怎样有效地把基因编辑组分导入靶细胞中。在目前的体内基因编辑实验中, 研究人员利用AAV作为载体传送这些分子, 但由于大部分人对AAV病毒已经产生了免疫力, 使得AAV载体无法发挥作用。此外, 利用AAV载体表达靶向核酸酶还有脱靶风险。为了更好地进行体内基因编辑, 科学家们一直在寻找合适的传载体。一种方法是使用可形成三链复合物的多肽

核酸(peptide nucleic acid, PNA)。PNA的骨架是重复排列的甘氨酸, 由多肽键组合而成, 碱基与骨架之间由亚甲基化学键相连。由于PNA没有DNA或RNA上的磷酸基团, 因此PNA与DNA之间不产生电性相斥, 使两者之间的结合强度大于DNA与DNA。另外, 肽核酸基团构象不同于普通核酸, 不易被蛋白酶或者核酸酶水解, 且碱基配对特异性极强, 稳定性高。新近的研究发现表明, 在地中海贫血小鼠中, 通过纳米颗粒递送改良的PNA后, 原位修复了造血干细胞中的致病基因, 疾病症状明显改善^[64]。这种方法虽然在小鼠实验中取得了初步成功, 但由于小鼠和人在造血干细胞生物学上的巨大差异, 最终能否运用于临床还难以预料。另一种方法是利用纳米金颗粒运送CRISPR组件, 具体操作为: 将纳米金颗粒作为核心, 依次将同源重组模板DNA, Cas9和sgRNA复合物结合在周围, 最后在外包裹上一层具有保护性质的聚合物使其更加稳固。将结合有不同的CRISPR组件的纳米颗粒, 原位注射到需要基因编辑的部位, 颗粒会被细胞内吞, 进而释放出CRISPR相关组件, 进入细胞核, 发挥基因编辑的功能^[65]。但这种方法是否适合于体内造血干细胞编辑, 还有待进一步研究。

综上所述, 过去几年在利用基因编辑技术改造造血干细胞方面的研究取得了可喜的进展, 为进一步的技术创新和产品开发以及临床转化奠定了坚实的基础。

6 造血干细胞基因编辑存在的问题及潜在解决方案

造血干细胞基因编辑的临床应用仍然面临许多问题。首先是转基因载体的有效性和安全性, 需要通过进一步优化载体设计, 提高靶向准确性^[66-68], 提高在干细胞中基因编辑的效率。其次, 需要考虑所用载体能够尽量降低或避免激活细胞的先天免疫和适应性免疫反应。另外, 还要通过载体改造保证转基因的长期持续的高表达, 并且能够尽量模拟内源基因表达调控模式。对于基于CRISPR-Cas9的造血干细胞基因编辑来说, 目前最关键的问题包括: 在HSC中尤其是长期重建造血干细胞中的精准基因编辑效率依然较低, 电转后细胞存活率较低, 以及基因组非特异性切割等。

本研究组尚未发表的数据表明, 在最优条件后, 在

人诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)和人红白血病细胞系(K562)中进行大片段基因精准插入的效率可达到30%以上,但是目前要实现在人原代造血干细胞中进行高效基因编辑还存在很多困难.为积极推进造血干细胞基因编辑治疗的临床转化,本研究组认为需要重点思考如下4个问题,才能把握造血干细胞基因编辑技术创新的方向.

(1) Cas9-sgRNA切割位点与染色质的可及性(accessibility)密切相关.对于染色质处于开放的区域,其切割效率通常会显著高于染色质关闭的区域.而某些需要进行基因编辑的位点在造血干细胞中处于关闭状态,如镰刀细胞贫血病的靶基因*HBB*.潜在的解决办法包括:怎样使关闭的染色质区域暂时性地处于开放状态.在某些情况下可以考虑进行异位基因插入,选择在造血干细胞中和分化的功能细胞中都处于开放的区域进行基因编辑.过去几年,用于检测染色质开放区域的ATAC-Seq技术的发展为寻找这样的位点提供了方便的工具^[69~71].

(2) 长期重建造血干细胞(long term haematopoietic stem cell, LT-HSC)通常处于静息状态.大量研究表明,处于细胞周期G₀/G₁期的细胞主要通过NHEJ进行修复,而同源重组修复的效率比处在S/G₂期的细胞至少要低一个数量级^[72,73],这为在造血干细胞中进行大片段精准基因插入带来严重考验.未来或许需要找到一种特殊的方法让造血干细胞暂时进入细胞周期,同时又不影响造血干细胞的植入能力.

(3) 如何有效促进造血干细胞的体外扩增以及提高造血干细胞的植入能力,是有助于提高基因编辑效率的重点所在.近期有报道使用不同的小分子和细胞因子组合提高造血干细胞体外扩增和造血干细胞植入率,利用这些因子组合有望进一步提高基因编辑效率.2010年,两个研究组分别报道了芳烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)拮抗剂SR1^[74]和Notch配体激活剂^[75]能够有效促进人造血干祖细胞的体外扩增.2011年, North研究组^[76]报道, dmPGE2可提高造血干细胞的植入能力.2014年, Sauvageau^[77]研究组报道了小分子化合物UM171能够促进造血干细胞的体外扩增和体内植入能力.本研究组在2014年报道了抗氧化剂NAC能够促进人造血干细胞在小鼠中的植入^[78]. Eaves研究组^[79]在2017年系统研究了5个细胞因子组合SCF, FLT3L, IL-3, IL-6和G-CSF对人造血干细胞体外

培养过程中存活和干性的影响.通过对培养条件的优化,人造血干细胞在体外培养21天后,依然能够植入免疫缺陷鼠.在造血干细胞体外基因编辑的过程中,利用以上小分子和细胞因子组合有望进一步提高基因编辑效率.

(4) 造血干细胞的固有或先天免疫反应.要实现精确基因编辑,必须导入基因修复DNA模板.在进化过程中,细胞为了对抗外源病原体,产生了复杂的细胞质内模式识别机制.一旦DNA进入细胞质,模式识别机器很快识别外源DNA,引发强烈免疫反应^[80].这种免疫反应存在于人体几乎所有的细胞中,尤其是免疫细胞以及这些细胞的前体细胞造血干细胞.目前的解决办法是用AAV载体把DNA模板导入细胞核,这样可以逃避细胞浆中的免疫识别机制.但是AAV载体本身在人体内也会引起一定的免疫反应,同时向造血干细胞中导入数以万计的模板拷贝可能存在安全隐患.目前还没有很好的解决办法.未来可能需要深入研究造血干细胞对进入细胞的外源DNA的识别机制,然后通过各种药物抑制免疫反应,这样有望大幅度提高细胞存活率.

关于造血干细胞基因编辑治疗的安全性,目前需要重点考虑两个方面.(i) Cas9-sgRNA的脱靶切割问题.人们已经在设法解决这一问题.研究表明,通过开发新的Cas9变异体,脱靶切割几率可以下降几个数量级,这样非特异性切割所导致的安全隐患可以降低到可接受范围^[81].(ii) 开发安全的无毒害的预处理方案.为使基因编辑的造血干细胞实现成功植入,必须有效清除骨髓微环境中的造血干细胞.目前通常使用离子辐射和具有干细胞毒性的化疗药物.但这些预处理方案对病人会造成很大伤害,有长期致癌风险,并且可能增加病人在治疗过程中的死亡率.科学家已经开发出了几种解决方案,未来或许有望使用没有毒性的预处理方法.这些策略包括使用抗体直接杀伤病人体内的造血干细胞,如通过抗c-Kit抗体联合使用CD47抗体可促进造血干细胞植入^[82],或者利用CD45抗体偶联皂草毒素蛋白(saporin, SAP)杀伤造血细胞^[83].另外还发现,移植前食用缺乏缬氨酸的饮食会大大降低自体造血干细胞的数量^[84].

如果未来几年能够找到创造性的方法解决上述难题,将为造血干细胞基因治疗大规模临床应用铺平道路.

致谢 感谢中国医学科学院&北京协和医学院血液病医院(血液学研究所)胡林萍助理研究员在撰写造血干细胞体外扩增方面给予的建议.

参考文献

- 1 Anderson W F. Prospects for human gene therapy. *Science*, 1984, 226: 401–409
- 2 Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang G P, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*, 2008, 118: 3132–3142
- 3 Naldini L, Blömer U, Gallay P, et al. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 1996, 272: 263–267
- 4 Mitchell R S, Beitzel B F, Schroder A R W, et al. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol*, 2004, 2: e234
- 5 Biffi A, Bartolomeae C C, Cesana D, et al. Lentiviral vector common integration sites in preclinical models and a clinical trial reflect a benign integration bias and not oncogenic selection. *Blood*, 2011, 117: 5332–5339
- 6 Modlich U, Navarro S, Zychlinski D, et al. Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors. *Mol Ther*, 2009, 17: 1919–1928
- 7 Prakash V, Moore M, Yáñez-Muñoz R J. Current progress in therapeutic gene editing for monogenic diseases. *Mol Ther*, 2016, 24: 465–474
- 8 Gennery A R, Slatter M A, Grandin L, et al. Transplantation of hematopoietic stem cells and long-term survival for primary immunodeficiencies in Europe: Entering a new century, do we do better? *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 126: 602–610.e11
- 9 Copelan E A. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, 2006, 354: 1813–1826
- 10 Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science*, 2013, 341: 1233151
- 11 Hacein-Bey Abina S, Gaspar H B, Blondeau J, et al. Outcomes following gene therapy in patients with severe Wiskott-Aldrich syndrome. *JAMA*, 2015, 313: 1550
- 12 Hacein-Bey-Abina S, Pai S Y, Gaspar H B, et al. A modified γ -retrovirus vector for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, 2014, 371: 1407–1417
- 13 Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae C C, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science*, 2009, 326: 818–823
- 14 Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae C C, et al. Lentiviral hematopoietic cell gene therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Methods Enzymol*, 2012, 507: 187–198
- 15 Biffi A, Montini E, Lorioli L, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science*, 2013, 341: 1233158
- 16 Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature*, 2015, 526: 351–360
- 17 Morris E C, Fox T, Chakraverty R, et al. Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome in a severely affected adult. *Blood*, 2017, 130: 1327–1335
- 18 Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature*, 2010, 467: 318–322
- 19 Ribeil J A, Hacein-Bey-Abina S, Payen E, et al. Gene therapy in a patient with sickle cell disease. *N Engl J Med*, 2017, 376: 848–855
- 20 Eichler F, Duncan C, Musolino P L, et al. Hematopoietic stem-cell gene therapy for cerebral adrenoleukodystrophy. *N Engl J Med*, 2017, 377: 1630–1638
- 21 Notarangelo L D. Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125: S182–S194
- 22 Pai S Y, DeMartiis D, Forino C, et al. Stem cell transplantation for the Wiskott-Aldrich syndrome: a single-center experience confirms efficacy of matched unrelated donor transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 2006, 38: 671–679
- 23 Pai S Y, Notarangelo L D. Hematopoietic cell transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome: advances in biology and future directions for treatment. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2010, 30: 179–194
- 24 Moratto D, Giliiani S, Bonfim C, et al. Long-term outcome and lineage-specific chimerism in 194 patients with Wiskott-Aldrich syndrome treated by hematopoietic cell transplantation in the period 1980–2009: an international collaborative study. *Blood*, 2011, 118: 1675–1684
- 25 Braun C J, Boztug K, Paruzynski A, et al. Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome--long-term efficacy and genotoxicity. *Sci Transl Med*, 2014, 6: 227ra33

- 26 Noguchi M, Yi H, Rosenblatt H M, et al. Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell*, 1993, 73: 147–157
- 27 Puck J M, Deschènes S M, Porter J C, et al. The interleukin-2 receptor gamma chain maps to Xq13.1 and is mutated in X-linked severe combined immunodeficiency, SCIDX1. *Hum Mol Genet*, 1993, 2: 1099–1104
- 28 Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, Basile G S, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 2000, 288: 669–672
- 29 Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, et al. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, 2010, 363: 355–364
- 30 Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 2003, 302: 415–419
- 31 Howe S J, Mansour M R, Schwarzwaelder K, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest*, 2008, 118: 3143–3150
- 32 Negre O, Eggimann A V, Beuzard Y, et al. Gene therapy of the $\beta^{A(T87Q)}$ -Globin gene. *Hum Gene Ther*, 2016, 27: 148–165
- 33 Moser H W. Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain*, 1997, 120: 1485–1508
- 34 Lisa Li H, Nakano T, Hotta A. Genetic correction using engineered nucleases for gene therapy applications. *Dev Growth Differ*, 2014, 56: 63–77
- 35 Palant N J, Dudzinski D. Zinc finger nucleases: looking toward translation. *Gene Ther*, 2013, 20: 121–127
- 36 Joung J K, Sander J D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 14: 49–55
- 37 Gaj T, Gersbach C A, Barbas Iii C F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotech*, 2013, 31: 397–405
- 38 Gupta R M, Musunuru K. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *J Clin Invest*, 2014, 124: 4154–4161
- 39 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: 839–847
- 40 Li L, Krymskaya L, Wang J, et al. Genomic editing of the HIV-1 coreceptor CCR5 in adult hematopoietic stem and progenitor cells using zinc finger nucleases. *Mol Ther*, 2013, 21: 1259–1269
- 41 Mandal P K, Ferreira L M R, Collins R, et al. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 643–652
- 42 Hendel A, Bak R O, Clark J T, et al. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 985–989
- 43 Saydaminova K, Ye X, Wang H, et al. Efficient genome editing in hematopoietic stem cells with helper-dependent Ad5/35 vectors expressing site-specific endonucleases under microRNA regulation. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2015, 2: 14057
- 44 Wang J, Exline C M, DeClercq J J, et al. Homology-driven genome editing in hematopoietic stem and progenitor cells using ZFN mRNA and AAV6 donors. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 1256–1263
- 45 Xu L, Yang H, Gao Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated CCR5 ablation in human hematopoietic stem/progenitor cells confers HIV-1 resistance *in vivo*. *Mol Ther*, 2017, 25: 1782–1789
- 46 Lombardo A, Genovese P, Beausejour C M, et al. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 1298–1306
- 47 Genovese P, Schirotti G, Escobar G, et al. Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. *Nature*, 2014, 510: 235–240
- 48 Hoban M D, Cost G J, Mendel M C, et al. Correction of the sickle cell disease mutation in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*, 2015, 125: 2597–2604
- 49 DeWitt M A, Magis W, Bray N L, et al. Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. *Sci Transl Med*, 2016, 8: 360ra134–360ra134
- 50 Dever D P, Bak R O, Reinisch A, et al. CRISPR/Cas9 β -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature*, 2016, 539: 384–389
- 51 De Ravin S S, Reik A, Liu P Q, et al. Targeted gene addition in human CD34⁺ hematopoietic cells for correction of X-linked chronic granulomatous disease. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 424–429
- 52 Hütter G, Nowak D, Mossner M, et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, 2009, 360: 692–698
- 53 Maeder M L, Gersbach C A. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Mol Ther*, 2016, 24: 430–446
- 54 Forget B G. Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, 850: 38–44
- 55 Bauer D E, Orkin S H. Hemoglobin switching's surprise: the versatile transcription factor BCL11A is a master repressor of fetal hemoglobin.

- [Curr Opin Genet Dev](#), 2015, 33: 62–70
- 56 Traxler E A, Yao Y, Wang Y D, et al. A genome-editing strategy to treat β -hemoglobinopathies that recapitulates a mutation associated with a benign genetic condition. [Nat Med](#), 2016, 22: 987–990
- 57 Tebas P, Stein D, Tang W W, et al. Gene editing of *CCR5* in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. [N Engl J Med](#), 2014, 370: 901–910
- 58 Xu J, Bauer D E, Kerenyi M A, et al. Corepressor-dependent silencing of fetal hemoglobin expression by BCL11A. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2013, 110: 6518–6523
- 59 Doulatov S, Notta F, Laurenti E, et al. Hematopoiesis: a human perspective. [Cell Stem Cell](#), 2012, 10: 120–136
- 60 Ellis B L, Hirsch M L, Barker J C, et al. A survey of *ex vivo/in vitro* transduction efficiency of mammalian primary cells and cell lines with Nine natural adeno-associated virus (AAV1–9) and one engineered adeno-associated virus serotype. [Virol J](#), 2013, 10: 74
- 61 Zhang J P, Li X L, Li G H, et al. Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. [Genome Biol](#), 2017, 18: 35
- 62 Yao X, Wang X, Hu X, et al. Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. [Cell Res](#), 2017, 27: 801–814
- 63 Lee K, Mackley V A, Rao A, et al. Synthetically modified guide RNA and donor DNA are a versatile platform for CRISPR-Cas9 engineering. [eLife](#), 2017, 6: e25312
- 64 Bahal R, Ali McNeer N, Quijano E, et al. *In vivo* correction of anaemia in β -thalassemic mice by γ PNA-mediated gene editing with nanoparticle delivery. [Nat Commun](#), 2016, 7: 13304
- 65 Lee K, Conboy M, Park H M, et al. Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA *in vivo* induces homology-directed DNA repair. [Nat Biomed Eng](#), 2017, 1: 889–901
- 66 Lisowski L, Dane A P, Chu K, et al. Selection and evaluation of clinically relevant AAV variants in a xenograft liver model. [Nature](#), 2013, 506: 382–386
- 67 Martino A T, Basner-Tschakarjan E, Markusic D M, et al. Engineered AAV vector minimizes *in vivo* targeting of transduced hepatocytes by capsid-specific CD8⁺ T cells. [Blood](#), 2013, 121: 2224–2233
- 68 Girard-Gagnepain A, Amirache F, Costa C, et al. Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs. [Blood](#), 2014, 124: 1221–1231
- 69 Kescu C, Arslan S, Singh R, et al. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. [Nat Biotechnol](#), 2014, 32: 677–683
- 70 Wu X, Scott D A, Kriz A J, et al. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. [Nat Biotechnol](#), 2014, 32: 670–676
- 71 Buenrostro J D, Wu B, Chang H Y, et al. ATAC-seq: a method for assaying chromatin accessibility genome-wide. [Curr Protoc Mol Biol](#), 2015, 109: 21–29
- 72 Orthwein A, Noordermeer S M, Wilson M D, et al. A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells. [Nature](#), 2015, 528: 422–426
- 73 Escribano-Díaz C, Orthwein A, Fradet-Turcotte A, et al. A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. [Mol Cell](#), 2013, 49: 872–883
- 74 Boitano A E, Wang J, Romeo R, et al. Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. [Science](#), 2010, 329: 1345–1348
- 75 Delaney C, Heimfeld S, Brashem-Stein C, et al. Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. [Nat Med](#), 2010, 16: 232–236
- 76 Goessling W, Allen R S, Guan X, et al. Prostaglandin E2 enhances human cord blood stem cell xenotransplants and shows long-term safety in preclinical nonhuman primate transplant models. [Cell Stem Cell](#), 2011, 8: 445–458
- 77 Fares I, Chagraoui J, Gareau Y, et al. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. [Science](#), 2014, 345: 1509–1512
- 78 Hu L, Cheng H, Gao Y, et al. Antioxidant *N*-acetyl-*L*-cysteine increases engraftment of human hematopoietic stem cells in immune-deficient mice. [Blood](#), 2014, 124: e45–e48
- 79 Knapp D J H F, Hammond C A, Miller P H, et al. Dissociation of survival, proliferation, and state control in human hematopoietic stem cells. [Stem Cell Rep](#), 2017, 8: 152–162
- 80 Paludan S R, Bowie A G. Immune sensing of DNA. [Immunity](#), 2013, 38: 870–880
- 81 Kleinstiver B P, Pattanayak V, Prew M S, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. [Nature](#),

- 2016, 529: 490–495
- 82 Chhabra A, Ring A M, Weiskopf K, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in immunocompetent hosts without radiation or chemotherapy. *Sci Transl Med*, 2016, 8: 351ra105
- 83 Palchaudhuri R, Saez B, Hoggatt J, et al. Non-genotoxic conditioning for hematopoietic stem cell transplantation using a hematopoietic-cell-specific internalizing immunotoxin. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 738–745
- 84 Taya Y, Ota Y, Wilkinson A C, et al. Depleting dietary valine permits nonmyeloablative mouse hematopoietic stem cell transplantation. *Science*, 2016, 354: 1152–1155

Hematopoietic stem cell gene therapy: progress and challenges

ZHANG JianPing¹, CHENG Tao^{1,2,3,4} & ZHANG Xiao-Bing^{1,2,3,5}

1 State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology and Blood Disease Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China;

2 Center for Stem Cell Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300020, China;

3 Department of Stem Cell & Regenerative Medicine, Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China;

4 Collaborative Innovation Center for Cancer Medicine, Tianjin 300020, China;

5 Department of Medicine, Loma Linda University, Loma Linda, CA 92350, USA

Hematopoietic stem cells possess the capacity of self-renewal and differentiation into all lineages of blood cells and have been recognized as one of the most ideal cells for gene therapy. Over the last decade, significant progress has been made in lentiviral vector-based hematopoietic stem cell gene therapy, and long-term success has been achieved in some clinical trials. The recent advent of the CRISPR-Cas9 genome editing technology has galvanized the field of gene therapy, and emerging on the horizon is targeted gene therapy by precise genome editing. However, to fulfill the vision of the second-generation hematopoietic stem cell gene therapy, further innovation is imperative to considerably increase the efficiency of precision genome editing in long-term hematopoietic stem cells.

hematopoietic stem cells, gene therapy, genome editing, CRISPR, Cas9-sgRNA

doi: [10.1360/N052017-00268](https://doi.org/10.1360/N052017-00268)