



光感受器修复与再生研究的进展与挑战

郭佃磊*, 汝佳丽, 徐淑娟, 刘春巧*

中山大学中山眼科中心, 眼科学国家重点实验室, 广州 510060

* 联系人, E-mail: guodlei3@mail.sysu.edu.cn; liuchunq3@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2022-04-22; 接受日期: 2022-05-15; 网络版发表日期: 2022-07-07

广东省自然科学基金面上项目(批准号: 2022A1515012515)、眼科学国家重点实验室开放课题(批准号: 303060202400373)和国家自然科学基金青年科学基金(批准号: 32000553)资助

摘要 视觉形成依赖于由光信号转化成电信号并沿视觉通路的级联传递. 光子接收和信号转换是视觉形成的第一步, 由视网膜一类特殊的神经细胞——光感受器(photoreceptor)完成. 该类细胞的丢失将导致不可逆性视网膜退化并最终致盲, 目前尚无有效的治疗手段. 基因治疗技术的发展有望助力部分遗传性视网膜变性疾病的治疗, 以2017年美国FDA批准的首个用于治疗Leber氏先天黑蒙症(Leber congenital amaurosis, LCA)的基因药物LUXTRNA®为里程碑. 然而该药物价格昂贵达85万美元/人, 且治疗窗口狭窄, 仅适用于早期RPE65基因突变导致的视网膜变性. 近年来, 干细胞、诱导多能干细胞分化及内源细胞转分化技术的发展为光感受器再生治疗提供了另一个有希望的途径. 本文综述了当前视网膜退化性疾病的的治疗策略, 并重点讨论了光感受器基因和细胞治疗的研究进展与挑战.

关键词 光感受器, 基因修复, 干细胞, 诱导多能干细胞, 再生, 移植

1 引言

视觉信息是人和动物赖以生存的重要手段, 80%~90%外界信息来自视觉, 视力的丧失给人类带来的恐惧仅次于死亡. 视觉信息的获取是从光感受器接收光子开始: 光经屈光系统(角膜、晶体、玻璃体)聚焦于视网膜, 光子被光感受器捕获启动光信号转导通路, 光信号转化成了化学信号和电信号, 通过二级神经元传导到神经节细胞, 进而产生神经冲动沿视神经传导到大脑视觉皮层成像并产生视觉认知, 完成视觉通路的信息传递. 视觉通路任何环节的结构或功能损伤都

会导致视觉障碍.

光感受器变性坏死是视网膜疾病引发致盲的直接原因. 常见的糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)、老年黄斑变性和遗传性视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)最终都导致光感受器坏死. 遗传性视网膜色素变性的临床发病约为1:4000, 涉及近300个不同基因引起的突变, 影响全球约350万人(我国近30万人), 而老年黄斑变性和糖尿病视网膜病变则更为广泛, 已成为各国亟需解决的医疗难题和科学研究热点^[1]. 目前针对老年黄斑变性和糖尿病视网膜病变引发光感受器丢失的常见治疗方法是服用神经营养因

引用格式: 郭佃磊, 汝佳丽, 徐淑娟, 等. 光感受器修复与再生研究的进展与挑战. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 1023–1040

Guo D L, Ru J L, Xu S J, et al. Advances and challenges in photoreceptor repair and regeneration (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 1023–1040, doi: 10.1360/SSV-2021-0114

子、抗炎抗新生血管生成药物等, 然而这些治疗对遗传性视网膜变性仅有限延缓视力丧失的进程. 近年来, 以腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)为载体的基因修复疗法在遗传性视网膜色素变性的早期治疗中取得了一定进展, 如通过补充野生型*RPE65*基因可部分恢复幼儿LCA的视力^[2]. 然而, 对于视网膜变性晚期严重退化的光感受器, 基因疗法便失去了用武之地. 另外AAV包装基因的容量, 治疗费用等诸多问题, 也限制了基因治疗的普适应用. 光遗传学和眼底植入生物电极^[3]是治疗视网膜变性的另一个发展方向, 但都面临一些需要攻克的技术难题.

细胞治疗是近年发展起来的组织再生疗法, 原理性应用首先在视网膜变性的动物模型中得到了验证. 这项技术通过使用体外ES或iPS分化的光感受器前体细胞替换变性坏死的光感受器, 以达到恢复视力的目的^[4,5]. 相较于其他疗法, 细胞治疗可不依赖于原有突变的光感受器细胞, 因而理论上适用多种视网膜变性疾病. 另外, 自身诱导干细胞分化、内源细胞的转分化结合基因编辑技术使自体修复后再生成为可能, 从而避免免疫排斥反应. 细胞治疗研究已成为光感受器变性治疗领域的一个新热点. 本文将对上述视网膜退行性疾病的主要治疗策略——修复和再生进行归纳总结, 并将重点关注细胞治疗方向的最新研究进展, 讨论其面临的主要困境及可能的解决方案.

2 光感受器与视网膜退行性疾病

2.1 光感受器细胞

眼是视觉系统的重要部分, 负责初步捕捉、处理视觉信息并将其转导至大脑视觉中枢. 眼结构主要包括前节(角膜、结膜、房水、虹膜、睫状体和晶体)以及后节(玻璃体、视网膜、脉络膜和巩膜)(图1A). 视网膜是视觉系统的感光组织, 由神经视网膜皮层和覆于其上的视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)构成. 神经视网膜是由5种神经元通过突触连接构成复杂精细的神经组织, 包括光感受器细胞(photo-receptor cell, PRC)、双极细胞(bipolar cell)、水平细胞(horizontal cell)、无长突细胞(amacrine cell)和神经节细胞(ganglion cell, GC). Müller细胞是唯一来源于视网膜神经上皮的胶质细胞, 此外还有来自免疫系统的小胶质细胞及由视盘迁入视网膜的星型胶质细胞. 光

感受器是接收光子并将其转变为电信号的神经细胞, 根据功能可分为视杆细胞(rod)和视锥细胞(cone). 视杆细胞以视网膜周边居多, 感受弱光刺激, 主司暗视觉和无色觉, 视锥细胞则集中分布在视网膜中央黄斑区, 感受强光刺激并主司明视觉和色觉^[6](图1B).

光感受器区别于其他细胞的明显特征是其顶部接收光子的膜盘叠压形成的杆状或锥状外段(outer segment). 每个外段约有1000个膜盘, 每个膜盘装载约有 $10^5 \sim 10^6$ 个视素蛋白(opsin)分子及其他光转导通路的蛋白(如GNAT1, PDE6B等)(图2A). 以视杆细胞感受弱光刺激为例, 当光线射入视网膜后, 视杆细胞外段的视紫红质(rhodopsin)蛋白被激活, 然后激活G蛋白 α -转导素(transducin). 激活的 α -转导素从G蛋白/转导素复合体解离, 从而激活磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)导致环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)的环磷酸脂键打开, 生成GMP. cGMP的浓度降低使cGMP门控通道关闭, 光感受器膜电位超极化并传到突触末端, 进一步导致神经递质谷氨酸释放减少, 为双极细胞感知, 并最终引发神经节细胞产生动作电位传输到大脑皮层形成视觉^[7](图2B).

视杆细胞的外段每天约更新1/10, 被顶部的RPE细胞吞噬, 并由基底部的新生膜盘补充. 外段本身不具有蛋白和脂类的合成能力, 所需的光转导蛋白和脂类分子需由内段(inner segment, IS)合成和运送. 外段脂膜和蛋白的运输是通过连接内段和外段之间的微管复合装置——纤毛完成. 与多数神经元的初级纤毛相似, 光感受器纤毛为静纤毛, 由基体、连接纤毛和轴丝组成的9束微管结构^[8](图2C). 已发现了许多与光感受器外段发生或蛋白运输相关的纤毛转运蛋白^[9](图2C). 这些蛋白突变也是导致光感受器发生退行变性和死亡的最主要原因^[10].

2.2 视网膜退行性疾病

视网膜退行性疾病是导致失明的一类主要眼病, 包括年龄相关性黄斑病变(age-related macular degeneration, AMD)、青光眼(glaucoma)、糖尿病视网膜病变、视网膜色素变性、Leber氏先天性黑蒙(LCA)等^[11,12]. 视网膜退行性疾病病因复杂, 包括环境、遗传因素及二者的相互作用.

随着人类寿命的延长和老龄化, AMD发病率一直呈增长的趋势(目前约为1.6%). AMD可以分为干性

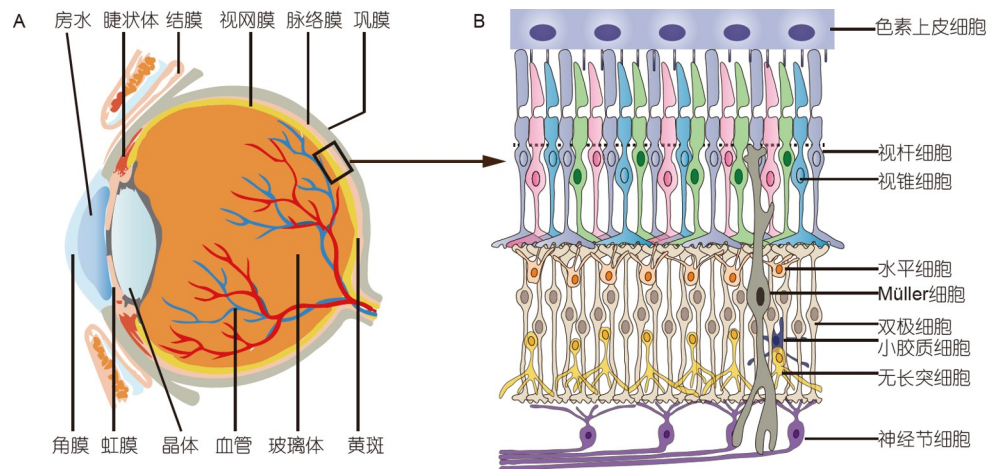


图 1 眼球与视网膜组织解剖结构模式图。A: 眼球的解剖结构; B: 视网膜细胞核层和丛层结构

Figure 1 Schematic illustration of the eyeball structures and retinal tissue. A: Anatomy of the eyeball. B: Retinal nuclear and plexiform structures

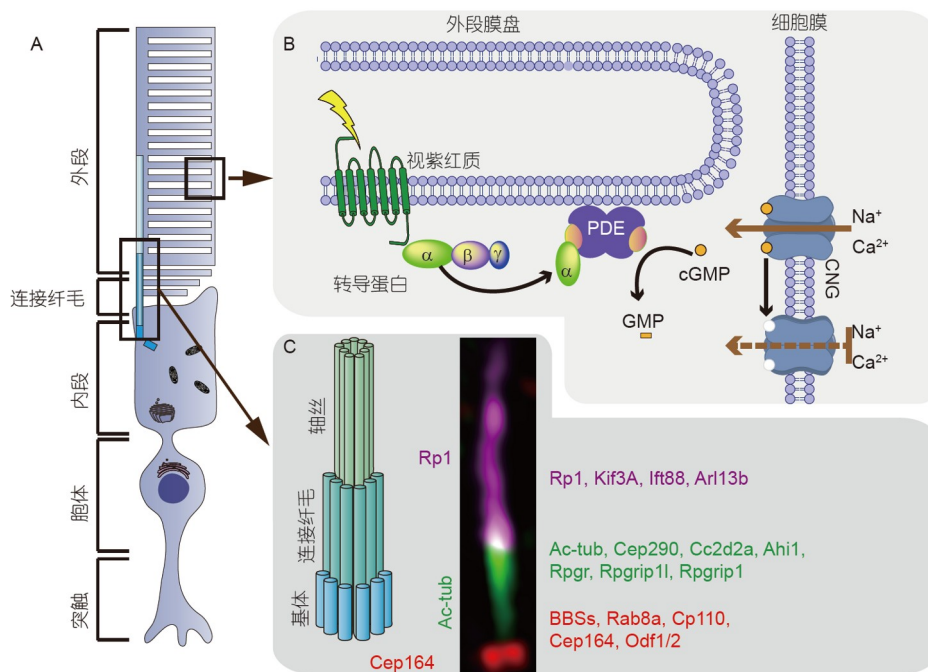


图 2 光感受器——视杆细胞模式图。A: 视杆细胞由纤毛外段、连接纤毛、内段、胞体与突触五部分构成; B: 纤毛外段膜盘及光传导信号通路元件模式图; C: 纤毛微管结构(左)与纤毛蛋白的分子标记(右): 免疫荧光染色分别代表基体(红色, Cep164)、连接纤毛(绿色, Ac-tub)及轴丝(紫色, Rp1)

Figure 2 Schematic illustration of a rod photoreceptor cell. A: The rod photoreceptor consists of five components, including the ciliary outer segment, the connecting cilia, the inner segment, the cell body, and the synaptic terminal. B: The outer segment disc and phototransduction components of a rod photoreceptor. C: Microtubule structure (left) and associated proteins (right) of the connecting cilium compartment: basal body (red, Cep164), connecting cilium (green, Ac-tub), and axoneme (purple, Rp1)

AMD和湿性AMD。干性AMD主要表现为RPE基底层玻璃疣的沉积, RPE受损引发光感受器变性。湿性AMD则是RPE和Bruch's膜受损后, 脉络膜新生血管侵

入视网膜, 异常血管发生渗漏引发炎症反应和细胞坏死^[13]。AMD主要与年龄相关, 同时存在许多遗传高风险因素, 如染色体1q32上的补体因子H(CFH)和10q26

上的*ARMS2/HTRA*为高风险AMD遗传位点。除此之外,吸烟、饮食、氧化应激,免疫系统调节异常等均与AMD发病相关。

青光眼主要损伤视神经与视网膜神经节细胞,导致视觉信号从视网膜向大脑的传递受阻。青光眼是继白内障之后的第二大致盲眼病,2020年全球大约有7600万患者,预计2040年该数目将突破1亿^[14]。青光眼分为原发性青光眼(primary glaucoma)、继发性青光眼(secondary glaucoma)与先天性青光眼(congenital glaucoma)。原发性青光眼又包括原发性开角型青光眼(primary open-angle glaucoma, POAG)、原发性闭角型青光眼(primary angle-closure glaucoma, PACG)和常眼压青光眼(normal-tension glaucoma, NTG)。继发性青光眼包括新生血管性青光眼、色素性青光眼、剥脱综合征性青光眼、葡萄膜炎性青光眼等。上述类型中,继发性青光眼与先天性青光眼病因较为明确,由某些眼部疾病干扰了正常房水循环所致。而先天性青光眼具有明显遗传性因素,如*CYP11B1*, *MYOC*, *LTBP2*, *PITX2*, *FOXCI*, *PAX6*基因突变均与青光眼的发生密切相关。除此之外,原发性青光眼中的POAG是由于小梁网对房水排除的阻力增加导致高眼压,而PACG则是由房角关闭,周边虹膜阻塞小梁网导致眼压升高。常眼压青光眼具体发病机制尚不明确^[15],可能主要由遗传因素主导。

眼血管系统病变是导致视网膜神经退行性变性的另一类主要视网膜疾病。DR新生血管异常增生,血管完整性的破坏致使通透性增加,渗漏引起黄斑水肿。全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)和外显子测序也发现了一些与DR发病相关的致病基因,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、醛糖还原酶(aldose reductase)、促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)和AGEs受体(receptor for advanced glycation endproducts, RAGE)等。

环境、年龄、生活习惯等非遗传因素对AMD、青光眼和DR发病的影响较大。这些因素通过与个体多个基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)(高风险遗传因素)相互作用共同启动和加速疾病的进程。因此,对这类疾病的治疗缺少针对性的手段,临床上多采取治疗症状本身和预防策略,如使用抗VEGF药物抑制DR的新生血管,控制饮食习

惯和戒烟等。

与上述视网膜疾病相较,大部分RP是由明确的单基因突变引发遗传性疾病。RP是不可逆视网膜退行性疾病,由周边视野丢失逐步演变成中心视力的下降致失明^[16]。其临床表现特征是眼底有骨细胞样色素沉积,是光感受器细胞退化引发炎症的结果。根据RP影响的组织范围,病变局限于视网膜组织称为单纯型,如视紫质蛋白的突变导致的RP。然而大约20%~30%的RP患者有全身问题,这种基因突变导致的全身或多种组织细胞的表型,称为综合征型RP,如Usher综合征、Bardet-Biedl综合征等^[16,17]。

RP的遗传基础十分复杂,据统计,目前有280个基因共计316个突变位点与RP发病相关(<https://sph.uth.edu/retnet/>),且这一数值还在继续增加。同一基因或位点的突变产生的临床症状也会由于个体遗传背景的差异表现出异质性^[18]。RP的遗传方式也十分多样,从突变基因的效应上分,可以有功能获得性和缺失性突变两类。而遗传方式上,RP主要有常染色体显性(15%~25%)、常染色体隐性(5%~20%)和X染色体连锁遗传(5%~15%)。线粒体遗传也有报道,此外尚有40%~50%的遗传方式未知^[16]。已发现引发视网膜色素变性的相关基因见表1。

3 光感受器修复研究进展

3.1 基因治疗

2017年美国FDA批准的首个用于治疗遗传性光感受器变性的LUXTURN A®药物为基因治疗发展的一个重要里程碑。该产品为AAV2/2携带广泛性启动子介导*RPE65*基因的表达(AAV2/2-CAG-RPE65),治疗由该基因突变引起的LCA。在三期临床试验中病人接受视网膜下腔注射该产品后均呈现出不同程度的视力改善。除此之外,还有很多遗传性视网膜营养不良或RP的基因药物(如针对*CNGA3*, *CNGB3*, *RPGR*, *ABCA4/5*等突变基因)也正在临床试验中^[16]。基因治疗包括基因增强(gene enhancement)、基因修饰(gene modifying)及光遗传(optogenetic)治疗方法。

(1) 基因增强治疗。基因增强治疗是将表达正常蛋白的cDNA包装进病毒载体,并通过视网膜下腔注射将病毒载体导入视网膜感光细胞和RPE之间(视网膜下腔),病毒感染光感受器并表达正常基因从而恢复其

表 1 RP致病基因

Table 1 Genetic etiologies of retinitis pigmentosa

RP分类	RP遗传方式	致病基因
单纯型RP (非综合征型RP)	视网膜色素变性(常染色体隐性遗传)	<i>ABCA4, AGL5, AHR, ARHGEF18, ARL6, ARL2BP, BBS1, BBS2, BEST1, C2orf71, C8orf37, CERKL, CLCC1, CLRN1, CNGA1, CNGB1, CRB1, CYP4V2, DHDDS, DHX38, EMC1, EYS, FAM161A, GPR125, HGSNAT, IDH3B, IFT140, IFT172, IMPG2, KIAA1549, KIZ, LRAT, MAK, MERTK, MVK, NEK2, NEUROD1, NR2E3, NRL, PDE6A, PDE6B, PDE6G, POMGNT1, PRCD, PROM1, RBP3, REEP6, RGR, RHO, RLBPI, RP1, RP1L1, RPE65, SAG, SAMD11, SLC7A14, SPATA7, TRNT1, TTC8, TULP1, USH2A, ZNF408, ZNF513</i>
	视网膜色素变性(常染色体显性遗传)	<i>ADIPOR1, ARL3, BEST1, CA4, CRX, FSCN2, GUCA1B, HK1, IMPDH1, IMPG1, KLHL7, NR2E3, NRL, PRPF3, PRPF4, PRPF6, PRPF8, PRPF31, PRPH2, RDH12, RHO, ROM1, RP1, RP9, RPE65, SAG, SEMA4A, SNRNP200, SPP2, TOPORS</i>
	视网膜色素变性(X染色体连锁遗传)	<i>OFD1, RP2, RPGR</i>
综合征型RP	视网膜病变综合征(常染色体隐性遗传)	<i>ABCC6, ABHD12, ACBD5, ACO2, ADAMTS18, ADIPOR1, AFG3L2, AH11, ALMS1, CC2D2A, CEP164, CEP290, CLN3, COL9A1, CSPP1, ELOVL4, EXOSC2, FLVCR1, GNPTG, HARS, HGSNAT, HMX1, IFT140, IFT81, INPP5E, INVS, IQCB1, LAMA1, LRP5, MKS1, MTPP, NPHP1, NPHP3, NPHP4, OPA3, PANK2, PCYT1A, PEX1, PEX2, PEX7, PHYH, PLK4, PNPLA6, POC5, POC1B, PRPS1, RDH11, RPGRIP1L, SDCCAG8, SLC25A46, TMEM216, TMEM237, TRNT1, TTPA, TUB, TUBGCP4, TUBGCP6, WDPCP, WDR19, WFS1, ZNF423</i>
	视网膜病变综合征(常染色体显性遗传)	<i>ABCC6, AFG3L2, ATXN7, COL11A1, COL2A1, JAG1, KCNJ13, KIF11, MFN2, OPA3, PAX2, TREX1, VCAN</i>
	视网膜病变综合征(X染色体连锁遗传)	<i>OFD1, TIMM8A</i>
	Bardet-Biedl综合征(常染色体隐性遗传)	<i>ADIPOR1, ARL6, BBIP1, BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS9, BBS10, BBS12, C8orf37, CEP19, CEP290, IFT172, IFT27, INPP5E, KCNJ13, LZTFL1, MKKS, MKS1, NPHP1, SDCCAG8, TRIM32, TTC8</i>
	Usher综合征(常染色体隐性遗传)	<i>ABHD12, ADGRV1, ARSG, CDH23, CEP250, CEP78, CIB2, CLRN1, DFNB31, ESPN, HARS, MYO7A, PCDH15, USH1C, USH1G, USH2A</i>

感光功能(图3A)。常用的基因表达载体为AAV。相比于腺病毒和慢病毒, AAV由于免疫原性低, 能够转导非分裂细胞, 不整合到宿主基因组且能保持较长时间的表达等优点而被广泛使用^[19]。研究表明, 不同血清型AAV转导光感受器的效率不同^[16]。AAV2/5、2/7、2/8和2/9均能有效转导光感受器, 其中AAV2/8是最有效的血清型。尽管以AAV为代表的基因增强疗法为RP病人提供了一种有效可行的治疗方法, 但其转载遗传物质的能力有限。AAV基因组是容量约为4.7 kb的单链线状DNA分子, 其实际可包装cDNA的能力一般小于2.5 kb。而大部分RP致病基因大于2.5 kb, 超出了最大包装容量。如特异表达在光感细胞的连接纤毛轴丝的RP1蛋白, 在常染色体显性RP中突变高达3.5%~10%^[16], 其cDNA全长为6.5 kb, 远超AAV的包装容量。对于长片段cDNA虽有分段包装尝试的报道, 但效率较低^[20]。因此, 目前基因增强疗法只适合治疗部分遗传性RP。

除了运载能力外, AAV载体的持续表达时间有限。以LUXTURN A®为例, 在三期临床试验中, 病人视力改善持续时间从6个月到3年不等。虽然高剂量的AAV药物及反复的视网膜下腔注射能够使携带的基因持续表达更长的时间, 但同时也增加了眼内免疫炎症、视网膜脱离、视网膜破裂和黄斑裂孔的发生风险, 从而诱发光感受器进一步的损伤^[2,16]。为了避免这一窘境, 研究人员曾试图通过改造的AAV载体进行玻璃体腔注射, 以减小对视网膜的物理损伤。通过定向进化策略建立随机变异AAV衣壳蛋白文库筛选转导光感受器细胞的衣壳变种, 发现了一些能够在玻璃体腔注射并穿透内界膜的新的AAV血清型: AAV-PHP.B与AAV2-7m8^[21,22]。同时结合非特异性链酶蛋白酶E消化内界膜, 提高了AAV的穿透感染效率, 但也加重了眼内炎症反应^[23]。除了AAV载体, 研究人员也在探索新的基因表达载体, 如通过使用非病毒载体——DNA纳米颗粒(nanoparticles, NPs)将DNA运送到细胞核进行表达。

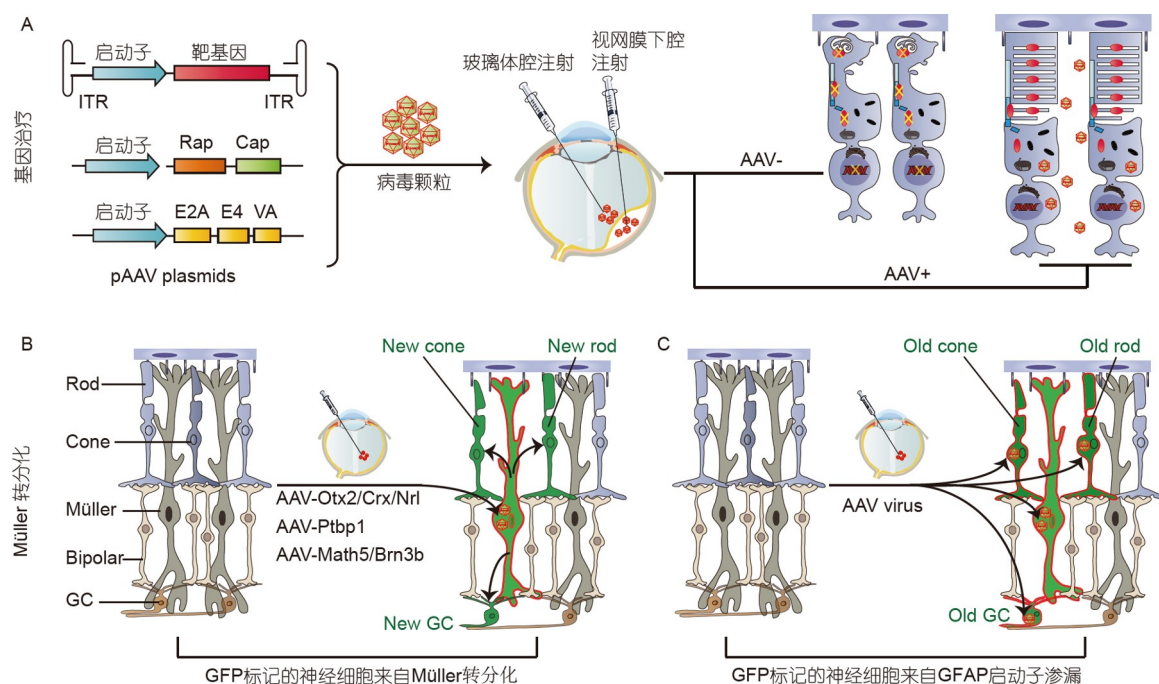


图3 视网膜变性疾病的基因治疗策略及潜在陷阱。A: 基因治疗流程, 携带正常基因的AAV病毒载体经玻璃体腔或视网膜下腔注射感染病变的光感受器(PCR), 与非感染的细胞相比(AAV-), 感染的视杆细胞(AAV+)恢复正常; B, C: Müller细胞转分化为视网膜神经元流程; B: 携带特定转录因子的AAV病毒载体感染Müller细胞使其转分化为视杆细胞、视锥细胞、神经节细胞(GC)等细胞类型; C: GFAP启动子发生泄露感染原有视网膜细胞产生转分化假象

Figure 3 Schematic illustration of gene therapy and the existing pitfalls for treating retinal degenerative diseases. A: Gene therapy. Photoreceptors infected with AAV carrying a normal target gene (AAV+) achieve a normal morphology compared with those of non-AAV infected (AAV-), which degenerate. B, C: Müller cell transdifferentiation. B: Müller cells can be transformed into rods, cones, or ganglion cells after infection with AAV-packed specific transcription factors. C: The observed Müller cell transdifferentiation resulted from leakage of the GFAP promoter

DNA NPs可以由金属、脂类或聚合物组成, 不同的装配方式在NPs的尺寸、电荷和形状上有所不同^[24]。这些NPs的一个显著优势是其转基因能力高达14 kb, 远超AAV载体包装能力。最近的一项研究表明, 在非人灵长类动物中, DNA纳米颗粒能够在玻璃体腔注射后透过内界膜, 驱动目的基因在RPE与光感受器表达^[25]。

AAV载体毒性是另一个关注的问题。已开展的治疗I型脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy type 1, SMA1)、X连锁肌管肌病(X-linked myotubular myopathy, XLMTM)、杜氏肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)、黏多糖贮积症IIIA型(mucopolysaccharidosis type IIIA, MPS IIIA)等遗传性疾病临床试验及治疗中, 全身高剂量静脉注射AAV时常会引发患者严重不良反应甚至死亡的个别案例^[26,27], 很大程度上是由于静脉注射的AAV输送到肝脏进行代谢时引发的肝功能严重受损以及血液系统中免疫细胞对AAV载体衣壳的细胞和体液免疫反应所

致^[27,28]。针对这类问题, Sabeti实验室^[29]筛选出了一种更有效靶向于肌肉组织, 在肝脏中积累更少的MyoAAV衣壳变体。这种变体可在DMD小鼠模型上以AAV9传统注射剂量的1/250~1/100下产生显著治疗效果。在免疫豁免的神经系统中, AAV也具有毒性。Shtrahman实验室^[30]发现携带钙离子指示剂的AAV显微注射小鼠海马齿状回(dentate gyrus, DG)后可引起该区域神经元数量减少, 神经毒性与病毒纯化方式、衣壳血清型(AAV1和AAV8)、启动子(CAG, Syn和CaMKIIa)和表达荧光蛋白无关, 而呈现注射剂量依赖性。

在视网膜疾病治疗上, Cepko团队^[31]发现高剂量(3×10^9 病毒颗粒/每眼)注射携带荧光蛋白的AAV可引起视网膜光感受器外段变短以及RPE细胞的死亡, 且毒性也呈剂量依赖性。不同的是, 他们发现AAV载体毒性与驱动目的基因表达的启动子相关。当以视杆细胞特异性启动子(RHO)替换广泛性启动子(CMV或CAG)后, 高剂量感染下的光感受器外段发育正常。此

外, 尽管AAV基因药物对治疗LCA有效, 无论大小动物模型还是患者的临床试验都出现过严重的眼毒性病例. 综上, AAV载体的研发还有待进一步提高.

(2) 基因修饰治疗. 基因修饰治疗是通过基因编辑方法纠正基因突变的位点. 随着CRISPR-Cas9和其他基因编辑技术的发展, AAV介导的体内基因的定点编辑已实现. CRISPR-Cas9可以通过sgRNA引导的核酶定点剪切基因组DNA双链, DNA双链断裂后有两种修复方式: 同源重组修复和非同源末端连接修复. 理论上AAV介导的CRISPR-Cas9结合插入的DNA模板的同源重组修复可以较为精准地修复突变基因, 但是这种修复机制依赖于有丝分裂, 对于不具有有丝分裂能力的光感受器神经元非常低效^[32]. 同时, AAV介导的CRISPR-Cas9非同源重组修复可能引入随机插入或删除突变, 破坏目标区域的基因, 导致无功能蛋白的产生, 也在一定程度上限制了其应用. 该技术目前对于功能获得性显性突变的治疗, 如对*RHO*常染色体显性RP, 更适合^[33].

FDA目前批准了一项非同源重组基因修饰治疗的临床试验(EDIT-101). 该试验通过CRISPR-Cas9在*CEP290*内含子剪接体引入突变, 终止异常*CEP290*表达以达到治疗LCA10的目的^[34]. 另外CRISPR系统中Cas9蛋白长期表达的毒性以及潜在的脱靶性都有可能诱发免疫反应或肿瘤的发生.

越来越多的基于AAV载体的基因增强和基因修饰的临床试验正在被FDA批准, 但制约二者的技术要素仍然很多: RP突变基因和位点众多, 许多未知, 基因修复药物都需要针对个体进行研发, 治疗面窄, 费用昂贵, 时间周期较长, 都给基因药物的产业化带来困难^[35]. 此外, 基因增强和修饰治疗的时间窗口有限, 这很大程度上取决于这些RP疾病的临床表现和病理进程. 对于某些病程较快的RP患者, 尤其是在光感受器完全丢失后, 基因增强和基因编辑疗法则不再适用.

(3) 光遗传学治疗. 对于晚期RP患者, 通过AAV介导的光遗传疗法恢复患者部分视力是另一个基因治疗的策略. 通过AAV载体在光感受器下游神经元(如双极细胞、神经节细胞)引入光敏蛋白, 从而使残存的非感光细胞获得光敏感性^[36]. 微生物和脊椎动物都有光敏视蛋白, 脊椎动物视蛋白是G蛋白偶联受体, 激活后关闭cGMP门控阳离子通道, 引发光感受器膜电位的改变启动光信号转导通路. 脊椎动物由于光转导通

路蛋白元件繁多且存在细胞类型的特异性, 不适合于光遗传学疗法. 相较之下, 微生物视蛋白是光激活的离子通道, 不依赖于G蛋白偶联受体联级反应或其他蛋白元件, 可直接引发细胞去极化或超极化. 正是因为这个原因, 微生物视蛋白在光遗传策略中普遍应用^[36].

光遗传治疗RP研究的重要里程碑是在*rd1*小鼠模型上用AAV2/2载体将衣藻光敏感通道ChR2(Channelrhodopsin-2)表达于*rd1*神经节细胞, 从而使其获得光敏感性, 产生去极化, 并在大脑视觉皮层产生视觉诱发电位(visual evoked potential, VEP)^[37]. 此后, 研究者通过视网膜下腔或玻璃体腔注射多种微生物光敏蛋白(CatCh, ChrimsonR, ReaChR和eNpHR等)的AAV表达载体, 实现了视锥细胞、双极细胞或神经节细胞的表达, 并恢复了失明小鼠模型的部分视力^[38-40]. 目前基于光敏蛋白ChR2和ChronosFP的光遗传治疗临床试验也正在进行中(NCT02556736, NCT04278131)^[41].

光遗传治疗的一个重要考量是光敏蛋白的特性: 如光敏蛋白电导性, 即光激活时通道打开和关闭的时间及其离子涌入率, 它将影响神经细胞的反应时间和幅度^[42]; 光敏蛋白光反应性, 即光敏蛋白对不同波长光的反应峰值及其响应的最佳刺激光强度——过高的刺激反应或特定的波长均有可能导致视网膜的损伤^[43]; 光敏蛋白稳定性, 即光敏蛋白在反复刺激后对光的反应是否衰减, 这将直接影响光敏蛋白的使用寿命及载体注射次数^[44]; 光敏蛋白安全性, 相比于脊椎动物光敏蛋白, 微生物光敏蛋白具有一定的毒性, 并呈现剂量依赖性. 目前更多的原生态的基因工程光敏通道也正在研发^[45].

光遗传治疗的另一缺陷是很难重新获得光感受器激发而产生的真实视觉特征. 视网膜光感受器在给光或去光的情况下通过双极细胞和神经节细胞形成两条相互拮抗的平行视觉通路(ON和OFF视觉通路). 水平细胞与光感受器相互作用导致横向抑制, 兴奋性双极细胞和神经节细胞与抑制性无长突细胞相互作用, 共同实现了神经节细胞对物体运动空间方位、颜色等多种特征的选择性反应^[46,47]. 晚期RP患者在缺失光感受器后神经元突触连接发生重构或丢失, 通过导入光敏蛋白即使能够使神经元产生光反应, 视网膜成像的空间、明暗的真实情况也会发生改变. 然而, 对于失明的病人来说, 能够产生一定的光反应并有效避开障碍

物已是生活质量的巨大提高。

除上述列举的基因疗法, 通过基因改造使视杆获得视锥细胞的部分特性, 也是一项治疗RP的策略。普遍观察到的现象是视锥细胞比视杆细胞具有较强的抗凋亡能力。通过Cas9系统在小鼠基因敲减*Nrl*使视杆细胞获得部分S视锥细胞的特征, 从而可降低视杆细胞变性速度^[48], 这对黄斑变性的治疗尤为重要。黄斑疾病以视锥细胞的原发性死亡为特征, 如能将视杆细胞异位转化成视锥细胞, 产生新的黄斑区, 则可对治疗产生重要影响。另外, Xue实验室^[49]报道了一种凝集素结合的纳米颗粒, 可以结合在小鼠视网膜光感受器外段并将近红外线转换为可见的绿光。这种方法拓展了哺乳动物的视力范围, 亦可对一些由视素蛋白产生的功能缺失突变进行修复。

3.2 干细胞治疗

干细胞治疗旨在通过外源干细胞移植或内源干细胞激活分化为受损的细胞类型, 重建组织结构和功能。与组织细胞的基因修复治疗相比, 干细胞旨在再生, 因此理论上治疗更加彻底, 不受治疗窗口的限制, 适用于不同原因导致的视网膜变性疾病^[5,50]。

(1) 内源再生。内源成体干细胞发现于多种组织, 如熟知的中枢神经系统的海马和嗅球区。最近研究对此提出质疑, 因此其有无还存有争议。在眼组织中, 晶体内源干细胞已被成功用于治疗先天性小儿白内障^[51]。低等脊椎动物硬骨鱼可以再生受损的视网膜并恢复视觉功能, 再生视网膜由内源性的Müller细胞转分化完成。Fausett等人^[52]研究发现, 在斑马鱼视网膜损伤后Müller细胞被激活, 高表达*Ascl1a*。敲除*Ascl1a*后可阻断*Pax6*的表达以及Müller细胞的增殖, 从而阻止视网膜祖细胞(retinal progenitor cell, RPC)的产生。这些数据暗示*Ascl1a*能够将静止的Müller细胞转化为积极分裂的RPC。过去几十年的寻找并没有发现哺乳动物视网膜干细胞的存在, 然而, 哺乳动物Müller细胞在视网膜损伤后也会被激活, 但*Ascl1a*基因表达并不升高, 正常情况下也无法再生神经元取代丢失的细胞。Jorstad等人^[53]通过在NMDA诱导的小鼠视网膜损伤, 并在Müller细胞中过表达*Ascl1a*, 同时结合组蛋白去乙酰化酶抑制剂(Trichostatin-A, TSA)处理, 发现Müller细胞可以分化成新的神经元, 如双极细胞、无长突细胞等, 但分化效率极低, 没有观察到光感受器细胞的

产生。

多年来, 眼科学领域一直探索如何提高Müller细胞的分化效率, 进而将其应用于RP和其他视网膜退行性疾病的再生治疗。研究的策略主要是从正常发育过程的视网膜神经祖细胞的分化和细胞命运决定入手, 对一些关键的细胞信号通路和转录因子进行分子操作。Takahashi实验室^[54]发现Wnt3a处理的光感受器损伤的视网膜, Müller细胞的增殖和分化可提高20倍以上。Yao等人^[55]发现在没有视网膜损伤的情况下, 通过激活Wnt信号通路 β -catenin或其下游*Lin28*可以激活小鼠Müller细胞增殖。重新激活的Müller细胞再通过AAV过表达视杆细胞特异性转录因子(*Otx2*, *Crx*和*Nrl*)便可诱导出新的视杆细胞, 并应用该策略使先天性失明小鼠模型(*Gnat1^{rd17}*, *Gnat^{cpfl3}*)恢复了部分视觉反应(图3B)。这项研究给Müller细胞再生视锥或者其他特定类型视网膜神经细胞带来希望。然而, 该研究的视觉行为及电生理指标的评估手段都有待进一步确证, Müller细胞分化成光感受器的效率也有待验证。

2020年Yang课题组^[56]通过使用RNA靶向CRISPR系统CasRx在视网膜Müller细胞中敲低*Ptbp1*使Müller细胞转分化为RGCs并投射到相应脑区。通过VEP和小鼠避光行为学检测, NMDA诱导的RGC损伤小鼠部分恢复视觉反应(图3B)。同样, Zhang实验室^[57]通过使用shRNA在视网膜Müller细胞中敲低*Ptbp1*将Müller细胞转分化为视锥细胞, 并通过ERG检测到了*rd10*失明小鼠的明视野反应(图3B)。除此之外, Xiang课题组^[58]通过在Müller细胞过表达转录因子*Math5*与*Brn3b*能够以极高的效率将成熟小鼠Müller重编程成RGCs, 通过膜片钳技术与VEP检测发现其可恢复并改善*Brn3b*缺失突变小鼠的视神经损伤和部分视觉功能(图3B)。

然而, 其后的多位学者对内源Müller细胞转分化提出质疑, 认为再生的PRCs或GCs并非由Müller细胞转分化而来, 而是介导Müller细胞表达的GFAP启动子发生泄露所致^[59,60](图3C)。AAV病毒载体的血清型并非Müller细胞特异, 可感染多种细胞类型, 其携带基因表达的特异性完全取决于GFAP启动子, 一旦发生渗漏则无法区分哪些是转分化的细胞, 哪些是原来存在的细胞。另外, Chen课题组^[61]发现的通过在星形胶质细胞和小胶质细胞过表达*NeuroD1*可将其转分化为神经元。2021年Zhang实验室^[59]通过谱系追踪发现在大脑皮层或者纹状体的星形胶质细胞特异性表达*NeuroD1*

或者敲低*Ptbp1*均无法转化为神经元; Hoang等人^[60]利用谱系追踪和单细胞测序谱系分析发现*Ptbp1*敲除小鼠大脑皮层纹状体星形胶质细胞、视网膜Müller细胞无法转分化为神经元. Peng课题组^[62]利用活细胞成像、严谨谱系追踪和药理学等多个手段对NeuroD1介导的小胶质细胞-神经元重编程现象进行了系统性探索,发现无法重编程.因此,为了确定胶质细胞(Müller)是否可以转分化为神经元(PRCs或GCs),Peng课题组^[62]提出了重编程所需的三个基本原则:(i)通过严谨的谱系追踪及合理对照实验排除存在病毒组织渗漏的可能;(ii)通过明确的活体/活细胞成像观察胶质细胞-神经元的转变过程;(iii)若杀掉该类型的胶质细胞,那么过表达的因子所介导的胶质细胞-神经元转分化将不会发生.他们认为这些是检验胶质细胞能否重编程的金标椎.

(2) 体外视网膜组织、类器官分化与移植.近年来,随着胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)技术的发展,体外特定类型组织、器官的诱导分化已成为再生医学的一个研究热点.尤其是脑和视网膜类器官的体外分化给神经组织的再生提供了另一种可能^[5].

通过ES和iPS诱导分化视网膜神经细胞和组织的研究一直在广泛开展.首先是早期的二维(2D)培养体系,通过使用促神经和视网膜诱导因子(Nodal拮抗剂Lefty-A与Wnt拮抗剂DKK-1),Ikeda等人^[63]于2005年用无血清悬浮培养系统(serum-free culture of embryoid body-like aggregates, SFEB系统)第一次将小鼠ESCs诱导成神经视网膜细胞. SFEB系统可产生大量(25%~30%)共表达Pax6和Rax的视网膜祖细胞,但这些细胞不能有效地分化为光感受器前体细胞.2006年Reh课题组的Lamba等人^[64]在SFEB系统基础上将细胞铺在Matrigel上,通过添加FGF-2和神经分化培养基(B27和N2)将hESCs分化为光感受器前体细胞(约12%细胞表达CRX;约5.75%细胞表达NRL),但最终表达Rho或S-opsin的光感受器细胞小于0.01%.之后的几年里,为了获得更大比例的光感受器细胞,多个课题组转向视网膜类器官的3D分化培养^[65,66].2012年Sasai课题组Nakano等人^[67]使用悬浮培养的方式成功将hESC分化为含有视锥细胞、视杆细胞、神经节细胞、水平细胞、无长突细胞等多层结构的视网膜类器官,并发现Notch通路抑制剂DAPT能够促进光感受器前体细胞

的分化(图4A).2014年Canto-Soler课题组Zhong等人^[68]使用悬浮-贴壁-再悬浮的培养方式,同样将hiPSCs成功分化为具有视网膜分层结构的类器官,并观测到光感受器外段的膜盘结构(分化27周)和微弱光电反应(图4B).至此,体外视网膜类器官分化方法基本得到印证.

不同于啮齿类夜间活动的动物,人视网膜负责明视野与色觉的视锥细胞更重要. AMD就是主要影响视锥细胞密集的黄斑区.许多RP疾病也最终导致视锥细胞的死亡而完全失明.然而正常分化的视网膜类器官或2D分化体系的视锥细胞分化效率极低^[64,67].针对视锥细胞,2020年, Sowden课题组^[69]应用CRISPR/Cas9基因编辑技术,设计了一个NRL缺陷胚胎干细胞,并将其分化为富含S视锥细胞的视网膜类器官.另外, Johnston Jr.课题组Eldred等人^[70]在hESCs分化的视网膜类器官发现短波敏感的视锥细胞(S视锥细胞)的出现先于长波和中波视锥细胞(L/M视锥细胞),且甲状腺激素T3能够促使S视锥细胞向L/M视锥细胞的转化.这为富含大量视锥细胞的视网膜类器官获取提供了可能.显然,上述对于视锥细胞分化的尝试都是建立在对正常发育过程视锥和视杆细胞命运决定机制研究的基础上^[71].将来更多的尝试也必将取决于对光感受器细胞分化的深入理解.

最近眼区多组织器官的分化为再现眼部发育过程的调控机制提供了有力的工具,同时也为使用单一分化系统产生多种眼组织的细胞治疗提供了可能.眼区多组织分化是从2D培养开始的:自组织(self-organized)的眼区祖细胞以分层方式分化为神经外胚层、表皮外胚层、神经嵴细胞层和RPE,模拟了眼睛发育的早期阶段^[72-74].2021年, Isla-Magrané等人^[75]在此基础上将眼区祖细胞分化为3D多眼区器官,包括RPE、视网膜和角膜,并观察了不同细胞类型的区域相互作用.与分化单独的眼类器官相比,这些多眼类器官视网膜区域表现出所有主要视网膜细胞类型,且角膜出现更成熟的上皮细胞.分化的RPE单层细胞顶端有微绒毛,基底外侧有胶原沉积(类似Bruch膜),这是3D单独分化的RPE球所不具备的.

除了ES/iPS可诱导分化眼类器官外,直接编程成纤维细胞并诱导分化为特定类型细胞和组织也取得了较大的进展.这种直接编程的方法具有简捷、快速等优点^[76].目前通过AAV介导表达转录因子或应用小分

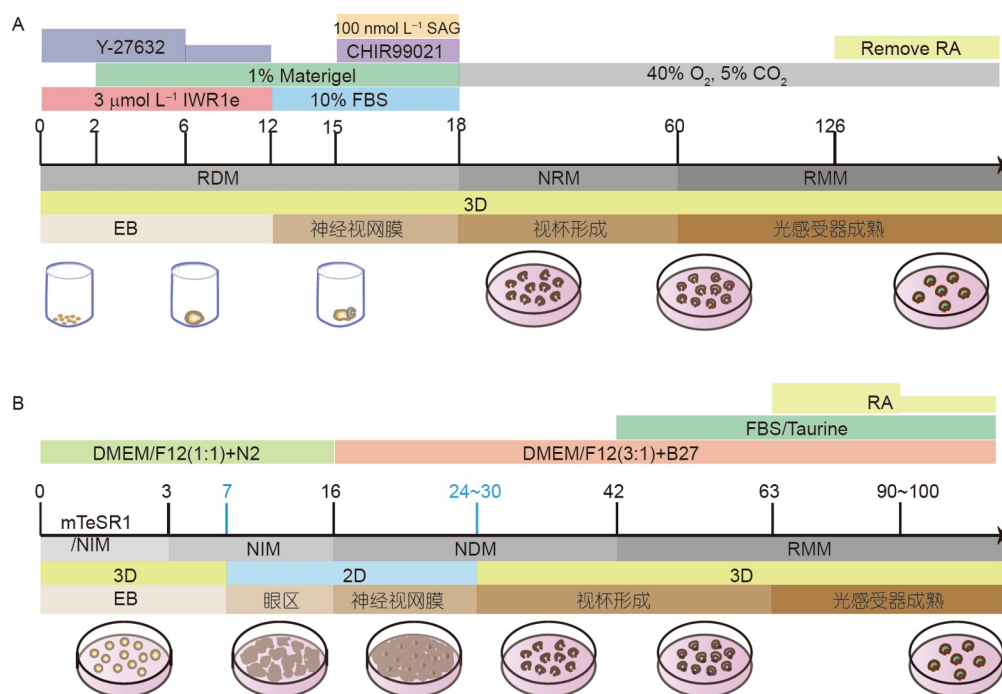


图4 视网膜类器官分化流程图. A: 视网膜类器官体外分化悬浮培养法; B: 视网膜类器官悬浮-贴壁-再悬浮分化示意图

Figure 4 Flowcharts for retinal organoid differentiation from ESCs or iPSCs. A: 3D-suspension culture. B: Suspension-adherent-resuspension culture

子药物、小RNA等方式可将成纤维细胞重编程为心肌细胞^[77]、肝细胞^[78]、神经细胞^[79]、骨细胞等^[76,80]。Jin课题组^[81]利用小分子化合物组合,将成纤维细胞转分化为神经嵴和功能性角膜内皮细胞;2020年Xiang课题组^[82]则利用Ascl1, Brn3b/3a和Isl1(ABI)三因子组合在体外将成纤维细胞重编程为视网膜神经节细胞;Chavala课题组^[83]更是利用5种小分子药物直接将小鼠皮肤细胞重编程为视杆细胞并移植到 $rd1$ 小鼠恢复了部分视力。尽管越来越多特定细胞类型可被直接重编程,转分化效率低下,体外重编程的细胞成熟度不够,不能精确地向期望的细胞亚型分化等都是临床前尚待解决的技术问题。

2006~2010年Lamba等人^[64,84]将来自 $NRL-GFP$ 小鼠的RPC悬液移植到健康小鼠视网膜,RPC较好地整合入光感受器细胞层(图5A)。此后科学家们使用小鼠或人的ESCs/iPSCs来源的RPC移植到视网膜退行性疾病的小鼠模型,发现了不同程度的视力恢复以及供体细胞与受体神经组织的整合^[85~87]。然而最近很多学者对此也提出了质疑,认为这些视功能的改善可能是物质转移的结果,即蛋白质(Rho/GFP)或mRNA等通过外

泌体从供体细胞转移到宿主尚存的光感受器中,挽救部分视觉功能并呈现出整合的假象(图5B)^[88~90]。不过这也提示了移植细胞修复光感受器的另一个机制。

另一项有趣的尝试是将体外分化好的类器官直接移植到受损视网膜。Takahashi实验室^[91]将小鼠iPSC分化的视网膜移植到光感受器完全退化的 $rd1$ 小鼠模型,生成了具有外段成熟的光感受器,并与双极细胞形成突触连接,产生一些视觉恢复(图5C)。此外,该团队还将hESCs分化的视网膜组织移植到视网膜变性的非人灵长类模型中。尽管ERG显示没有明显的视力改善,但他们观察到了移植体存活时间长达5个月之久以及其成熟的迹象^[92]。然而,突触连接的形成及光感受器信号传导还有待进一步验证和评估。值得一提的是,基于多个实验室类器官移植实验取得的成果^[93],2020年日本批准了首个使用hiPSCs视网膜类器官治疗RP患者的临床试验(jRCTa050200027)^[92]。

移植悬浮细胞或类器官都面临很大的挑战。首先悬浮细胞因为经过组织消化,流式分选后再移植,其成活率更差,移植细胞更容易死亡。如果移植来源于预先冻存的悬浮RPC,其移植的死亡率更高。其次在

整合上, 悬浮细胞整合率较低——许多观测到的细胞整合和突触连接都是移植细胞的分泌囊泡与宿主细胞发生融合或细胞质交换的假象. 直接移植类器官虽然细胞存活时间较长, 但供体组织和宿主视网膜相对独立, 移植后形成“双视网膜”或“玫瑰环”结构(图5D)^[94]. 多数“玫瑰环”结构的内层为光感受器, 从而阻断了其与宿主视网膜建立连接.

目前光感受器细胞的移植多集中于视杆细胞, 而视锥细胞治疗更具有挑战性. 首先正常人视网膜类器官视锥细胞分化效率极低, 目前小鼠视网膜视锥细胞流式分选依赖表面抗原分子CD73标记, 但不能有效识别胎儿视网膜和类器官的视锥细胞, 而有效分离类器官中RPC(c-Kit⁺; SSEA⁻)对于视锥细胞较多的人类数量远远不足^[95,96]; 其次, 小鼠移植表达荧光蛋白标记的视锥细胞发现其整合率极低, 可能是由于啮齿类动物富含的视杆细胞不利于视锥细胞整合, 最近的一项研究支持这一推断: 移植小鼠ESC来源的视锥细胞到

Nrl^{-/-}和Prph2^{rd2/rd2}转基因小鼠(富含视锥细胞), 整合率分别为5.3%和2.6%^[97]. 因此, 迫切需要与人类眼生理和解剖结构相似, 富含视锥细胞的非人灵长类动物模型来评估移植光感受器的生存和整合.

4 小结与展望

视网膜是中枢神经系统的重要组成部分, 一直是发育生物学、遗传学、细胞生物学和神经生物学研究的一个经典的模型组织. 近年来, 视网膜在临床疾病的发病机制和治疗研究上更凸显优势. 基因治疗和细胞治疗都率先在视网膜组织上取得进展, 并成为最具应用前景的治疗手段. 然而, 二者涉及的许多技术都有待完善和提高.

4.1 基因修复疗法

(1) 安全、高效的基因药物载体. 广泛应用于基因

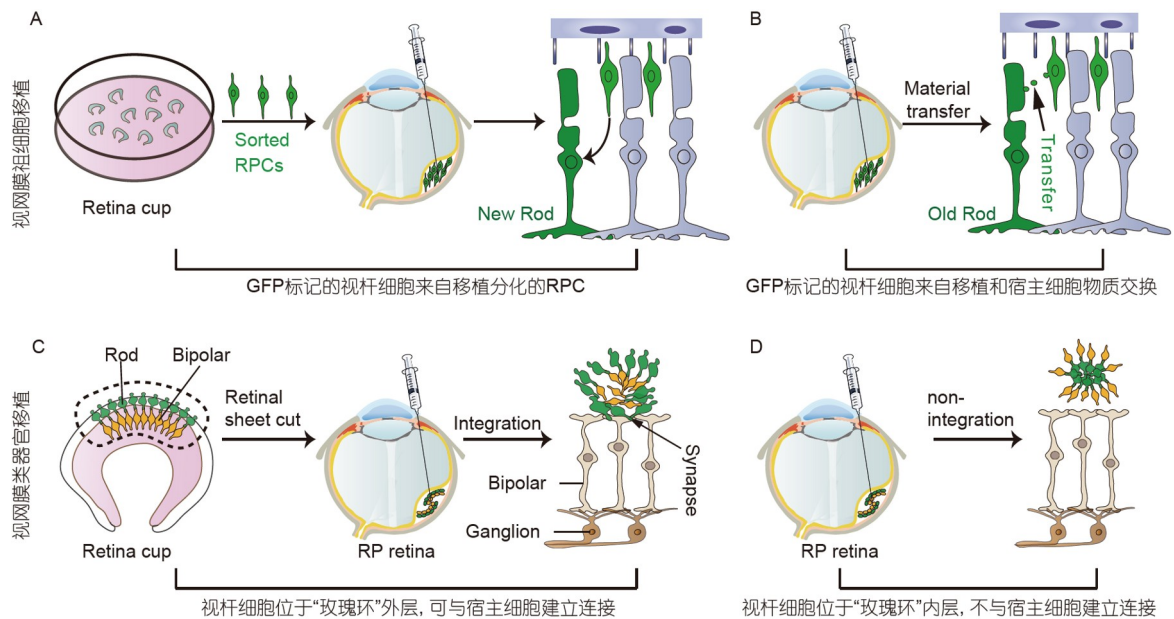


图 5 视网膜变性疾病的细胞治疗策略及潜在陷阱. A, B: 来自于体外分化视网膜类器官祖细胞(RPC)的移植过程. A: 流式分选GFP标记的RPC注射于视网膜下腔分化为成熟视杆细胞并整合; B: GFP标记的整合的视杆细胞为其分泌的外泌体与残存宿主视杆细胞的物质交换的假象; C, D: 移植分化的视网膜类器官. C: 体外分化的视网膜类器官经视网膜下腔注射后出现移植体的光感受器细胞(视杆细胞)与宿主双极细胞建立突触连接; D: 类器官移植经常出现移植的视杆细胞被其他类型视网膜细胞包裹形成玫瑰环结构, 阻碍了视杆细胞与宿主双极细胞的连接

Figure 5 Schematic illustration of stem-cell therapy and the existing pitfalls for treating retinal degenerative diseases. A, B: Transplantation of retinal organoid-derived progenitor cells (RPCs). A: Subretinal-transplanted flow-sorted RPCs from the retinal organoids differentiate into rods and integrate into the host retinal tissue. B: RPC differentiation and integration result from the cytoplasmic material exchange between the transplanted and the host cells through exosomes. C, D: Retinal organoid transplantation. C: Photoreceptors of the transplanted retinal organoids establish synaptic connections with the host bipolar cells after subretinal transplantation. D: Rosette of the transplanted organoids impedes the inner-circle rods with host bipolar cells

增强、基因修饰或光遗传学治疗的AAV病毒载体本身具有组织毒性。发展可降解的、低毒性的、高效率的生物纳米材料载体投放DNA对临床治疗意义重大。因此,寻找合适的基因药物投放载体仍是未来一个重要的研究方向,需要多个跨学科机构的合作完成。

许多基因增强治疗过表达cDNA会产生组织毒性或其他意想不到的效果,基因修饰或编辑虽然有望解决这一难题,但如何提高编辑效率,减少脱靶效应,仍是一个难题。寻找新型编辑器及对现有编辑系统的改造还是当前的一个重点研究方向。

(2) 宿主细胞的存活问题。基因修复依赖于宿主尚存的细胞提供药物的投放窗口(即使这些细胞的功能不正常)。早期的研究试图通过分子操作细胞凋亡来阻止光感受器死亡或延长其存活,但未有突破性的进展。也有报道RP的基因治疗仅能给病人以短暂的光明但不能阻止光感受器的进行性死亡^[2]。尽管如此,延长疾病的光感受器存活时间无疑会给许多临床干预手段包括基因治疗提供时间,因此这一方向的研究应该坚持不懈。

(3) 合适的临床前动物模型。目前用于RP致病机制及临床修复研究的动物模型多为小鼠。然而,小鼠许多RP遗传学模型不能有效模拟人类的RP特征。另外,小鼠视网膜也不存在视锥细胞富集的黄斑区域。由于繁殖周期长,产仔少,遗传操作较复杂等原因,非人灵长类RP的模型目前缺乏。CRISPR联合AAV载体技术的发展使得高效率非人灵长类成体基因敲除和RNA敲减(CasRx系统)成为可能。国内外已有相关非人灵长类模型报道^[98,99]。这方面的持续投入也是基因药物研发必不可少的环节。

(4) 大面积人群精准治疗的研发费用。个体基因突变导致的视网膜变性的特异性致使基因药物也必须是个体或家族特异。因此,基因药物很难做到广谱,最多是携带有同一基因缺失性突变的病人。高昂的药物的研发费用会因较小的适用病群,给家庭经济造成巨大负担,因此从社会层面需要有力的医保系统支持和国家财政投入。

4.2 细胞治疗

(1) 分化和整合效率的提高。无论是细胞治疗和类器官的移植都受制于分化效率的问题。一个最重要的原因是对于细胞分化和去分化的机制掌握不够,体外

分化体系只能部分模拟体内细胞的发育过程。“四因子”诱导iPSCs体系的建立给细胞治疗和重编程提供了框架性的理论指导^[100],然而并不能完全准确地将体细胞恢复到最原始的ESCs的状态,这很可能是影响iPSCs分化效率的一个重要原因。此外,用于分化的ESCs/iPSCs种子细胞不同的株系存在很大的异质性,对分化效率也会产生很大的影响。因此,深入了解发育过程的分化和去分化机制、遗传、表观遗传的相互作用,多种手段联合分化高质量的可移植细胞,是细胞治疗的基石。

另外,大部分移植的细胞无序的堆积于宿主视网膜,最终死亡而被清除,只有很少部分细胞整合并与二级神经元形成真正的突触连接。整合效率低下可能的两个重要原因:一是体外分化的神经细胞缺少细胞极性(polarity),不能定向迁移;二是宿主病变组织局部的微环境对供体细胞或组织的排斥作用。因此,在体外分化研究方面,还需要加入对细胞极性,如细胞的基顶极性(apicobasal polarity)和平面极性(planar cell polarity)的考虑。非经典的Wnt通路在细胞极性建立、细胞迁移、神经元轴突定向生长等生物过程都起重要作用^[101~105],应该成为ESCs/iPSCs体外分化和改善宿主微环境分子模块的一个重要选项。这方面研究还处于空白。

(2) 非自体分化细胞产生的免疫排斥反应及成瘤。最近的几项研究通过组织相容性抗原(MHC/HLA)配型可拓展ESCs细胞的来源和适用病群,避免产生异体细胞移植的免疫排斥反应^[106],然而同样存在争议^[107],未来还需要对这些研究进行细致的检验。另外通过改造ESCs分泌的免疫因子抑制宿主T细胞的激活是避免免疫排斥反应的另一途径。

成瘤性和免疫排斥反应是移植过程的一对矛盾。免疫排斥反应减小成瘤性,但大大影响移植的效率。体外分化神经元移植的成瘤有诸多报道,其中包括ESCs来源的视网膜前体细胞的移植^[108,109]。成瘤的一个重要因素与细胞的分化状态相关。分化程度越低,成瘤的概率越高。目前减少成瘤的手段是通过一些细胞表面的分子标记进行细胞分选,去除分化程度较低或筛选分化程度较高的细胞^[108]。然而,对于任何ESC细胞株,其成瘤的安全性检查必须在非人灵长类完成临床前试验。

(3) iPSCs的基因编辑产生的脱靶效应。通过CRISPR-Cas系统的基因编辑在自体iPSCs修正突变基

因并进行分化移植有望解决免疫排斥的问题。然而, Cas核酶活性和引导RNA的短序列会导致脱靶效应。通过改变Cas酶的剪切活性(如dCas9)^[110], 设计一对引导RNA可相对降低脱靶效率^[111], 寻找高效特异的Cas酶变体可降低脱靶效应^[112], 这些同样适用于基因修复治疗。最后, 所有的脱靶位点事件都应由全基因组测序进行检查, 以保证编辑细胞株的安全可靠。

(4) ESCs和iPSCs的质控。体外培养和分化体系的质量控制程序包括培养基成分、病原体检测、体内成瘤性评估等。生物安全准则也必须随细胞治疗的深入研究和开展逐步建立和完善。目前, 我国已经制定了有关干细胞临床研究的质量标准控制程序, 同时建立了规范的干细胞库(北京干细胞库)^[113,114]。这些领先于

国际的高瞻远瞩先例先行, 都为后续干细胞的临床转化奠定了坚实的基础。

综上, 基因修复和细胞治疗是两个具有广阔应用前景的生物技术手段。基因药物修复偏重于个体治疗, 研发费用较高, 但技术环节相对简单, 而细胞治疗具有更好的普适性, 但技术环节复杂。二者的临床应用应用各有优势, 相互补充, 但不能完全替代。在细胞治疗研究领域, 许多最近发表的重要文章均存在争议, 如移植光感受器前体细胞的整合问题, 内源Müller细胞的再生问题和利用NeuroD1或者敲低Ptbp1将胶质转化为神经元的研究等。争议有利于科学技术发展, 但需要研究者以更严谨的科学态度对待再生医学, 审慎避免科研“陷阱”。

参考文献

- 1 Pfau M, von der Emde L, de Sisternes L, et al. Progression of photoreceptor degeneration in geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration. *JAMA Ophthalmol*, 2020, 138: 1026
- 2 Miraldi Utz V, Coussa R G, Antaki F, et al. Gene therapy for RPE65-related retinal disease. *Ophthalmic Genet*, 2018, 39: 671–677
- 3 Yue L, Weiland J D, Roska B, et al. Retinal stimulation strategies to restore vision: fundamentals and systems. *Prog Retinal Eye Res*, 2016, 53: 21–47
- 4 Gagliardi G, Ben M'Barek K, Goureau O. Photoreceptor cell replacement in macular degeneration and retinitis pigmentosa: a pluripotent stem cell-based approach. *Prog Retinal Eye Res*, 2019, 71: 1–25
- 5 Jin Z B, Gao M L, Deng W L, et al. Stemming retinal regeneration with pluripotent stem cells. *Prog Retinal Eye Res*, 2019, 69: 38–56
- 6 Hoshino A, Ratnapriya R, Brooks M J, et al. Molecular anatomy of the developing human retina. *Dev Cell*, 2017, 43: 763–779.e4
- 7 Gupta M, Ireland A C, Bordoni B. Neuroanatomy, Visual Pathway. StatPearls. Treasure Island (FL). 2022
- 8 Sun J J, Wu Z H, Zhong T. Cilia function in cell signaling and organ development. *Sci Sin Vitae*, 2016, 46: 354–362 [孙建建, 武子涵, 钟涛. 细胞纤毛在信号转导与器官发育中的作用与机制. *中国科学: 生命科学*, 2016, 46: 354–362]
- 9 Baehr W, Hanke-Gogokhia C, Sharif A, et al. Insights into photoreceptor ciliogenesis revealed by animal models. *Prog Retinal Eye Res*, 2019, 71: 26–56
- 10 Guo D, Ru J, Xie L, et al. Tmem138 is localized to the connecting cilium essential for rhodopsin localization and outer segment biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119: e2109934119
- 11 Flaxman S R, Bourne R R A, Resnikoff S, et al. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*, 2017, 5: e1221–e1234
- 12 Rahman F, Zekite A, Bunce C, et al. Recent trends in vision impairment certifications in England and Wales. *Eye*, 2020, 34: 1271–1278
- 13 Tan W, Zou J, Yoshida S, et al. The role of inflammation in age-related macular degeneration. *Int J Biol Sci*, 2020, 16: 2989–3001
- 14 Allison K, Patel D, Alabi O. Epidemiology of glaucoma: the past, present, and predictions for the future. *Cureus*, 2020, 12: e11686
- 15 Balikov D A, Jacobson A, Prasov L. Glaucoma syndromes: insights into glaucoma genetics and pathogenesis from monogenic syndromic disorders. *Genes*, 2021, 12: 1403
- 16 Dias M F, Joo K, Kemp J A, et al. Molecular genetics and emerging therapies for retinitis pigmentosa: basic research and clinical perspectives. *Prog Retinal Eye Res*, 2018, 63: 107–131
- 17 Peterson S M, McGill T J, Puthussery T, et al. Bardet-Biedl Syndrome in rhesus macaques: a nonhuman primate model of retinitis pigmentosa. *Exp Eye Res*, 2019, 189: 107825
- 18 Bruninx R, Lepiece G. Retinitis pigmentosa. *Rev Med Liege*, 2020, 75: 73–74

- 19 Ducloyer J B, Le Meur G, Cronin T, et al. La thérapie génique des rétinites pigmentaires héréditaires. *Médecine/Sciences*, 2020, 36: 607–615
- 20 Kodippili K, Hakim C H, Pan X, et al. Dual AAV gene therapy for duchenne muscular dystrophy with a 7-kb *mini-dystrophin* gene in the canine model. *Hum Gene Ther*, 2018, 29: 299–311
- 21 Dalkara D, Byrne L C, Klimczak R R, et al. *In vivo*-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. *Sci Transl Med*, 2013, 5: 189ra76
- 22 Giannelli S G, Luoni M, Castoldi V, et al. Cas9/sgRNA selective targeting of the P23H Rhodopsin mutant allele for treating retinitis pigmentosa by intravitreal AAV9.PHP.B-based delivery. *Hum Mol Genet*, 2018, 27: 761–779
- 23 Dalkara D, Kolstad K D, Caporale N, et al. Inner limiting membrane barriers to AAV-mediated retinal transduction from the vitreous. *Mol Ther*, 2009, 17: 2096–2102
- 24 Bordet T, Behar-Cohen F. Ocular gene therapies in clinical practice: viral vectors and nonviral alternatives. *Drug Discovery Today*, 2019, 24: 1685–1693
- 25 Ross M, Ofri R. The future of retinal gene therapy: evolving from subretinal to intravitreal vector delivery. *Neural Regen Res*, 2021, 16: 1751
- 26 High-dose AAV gene therapy deaths. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 910
- 27 Hinderer C, Katz N, Buza E L, et al. Severe toxicity in nonhuman primates and piglets following high-dose intravenous administration of an adeno-associated virus vector expressing human SMN. *Hum Gene Ther*, 2018, 29: 285–298
- 28 Flotte T R. Revisiting the “new” inflammatory toxicities of adeno-associated virus vectors. *Hum Gene Ther*, 2020, 31: 398–399
- 29 Tabebordbar M, Lagerborg K A, Stanton A, et al. Directed evolution of a family of AAV capsid variants enabling potent muscle-directed gene delivery across species. *Cell*, 2021, 184: 4919–4938
- 30 Johnston S, Parylak S L, Kim S, et al. AAV ablates neurogenesis in the adult murine hippocampus. *eLife*, 2021, 10: e59291
- 31 Xiong W, Wu D M, Xue Y, et al. AAV *cis*-regulatory sequences are correlated with ocular toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 5785–5794
- 32 Cai Y, Cheng T, Yao Y, et al. *In vivo* genome editing rescues photoreceptor degeneration via a Cas9/RecA-mediated homology-directed repair pathway. *Sci Adv*, 2019, 5: eaav3335
- 33 Bakondi B, Lv W, Lu B, et al. *In vivo* CRISPR/Cas9 gene editing corrects retinal dystrophy in the S334ter-3 rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Ther*, 2016, 24: 556–563
- 34 Maeder M L, Stefanidakis M, Wilson C J, et al. Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nat Med*, 2019, 25: 229–233
- 35 Wang D, Tai P W L, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18: 358–378
- 36 McClements M E, Staurengi F, MacLaren R E, et al. Optogenetic gene therapy for the degenerate retina: recent advances. *Front Neurosci*, 2020, 14: 570909
- 37 Bi A, Cui J, Ma Y P, et al. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron*, 2006, 50: 23–33
- 38 Thyagarajan S, van Wyk M, Lehmann K, et al. Visual function in mice with photoreceptor degeneration and transgenic expression of channelrhodopsin 2 in ganglion cells. *J Neurosci*, 2010, 30: 8745–8758
- 39 Sengupta A, Chaffiol A, Macé E, et al. Red-shifted channelrhodopsin stimulation restores light responses in blind mice, macaque retina, and human retina. *EMBO Mol Med*, 2016, 8: 1248–1264
- 40 Lagali P S, Balya D, Awatramani G B, et al. Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nat Neurosci*, 2008, 11: 667–675
- 41 Sahel J A, Boulanger-Scemama E, Pagot C, et al. Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy. *Nat Med*, 2021, 27: 1223–1229
- 42 Simon C J, Sahel J A, Duebel J, et al. Opsins for vision restoration. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 527: 325–330
- 43 van Norren D, Vos J J. Light damage to the retina: an historical approach. *Eye*, 2016, 30: 169–172
- 44 Pepperberg D R. Bleaching desensitization: background and current challenges. *Vision Res*, 2003, 43: 3011–3019
- 45 Deisseroth K. Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nat Neurosci*, 2015, 18: 1213–1225
- 46 Gauvain G, Akolkar H, Chaffiol A, et al. Optogenetic therapy: high spatiotemporal resolution and pattern discrimination compatible with vision restoration in non-human primates. *Commun Biol*, 2021, 4: 125

- 47 Cehajic-Kapetanovic J, Singh M S, Zrenner E, et al. Bioengineering strategies for restoring vision. *Nat Biomed Eng*, 2022, doi: 10.1038/s41551-021-00836-4
- 48 Yu W, Mookherjee S, Chaitankar V, et al. Nrl knockdown by AAV-delivered CRISPR/Cas9 prevents retinal degeneration in mice. *Nat Commun*, 2017, 8: 14716
- 49 Ma Y, Bao J, Zhang Y, et al. Mammalian near-infrared image vision through injectable and self-powered retinal nanoantennae. *Cell*, 2019, 177: 243–255
- 50 Zhang C J, Ma Y, Jin Z B. The road to restore vision with photoreceptor regeneration. *Exp Eye Res*, 2021, 202: 108283
- 51 Lin H, Ouyang H, Zhu J, et al. Lens regeneration using endogenous stem cells with gain of visual function. *Nature*, 2016, 531: 323–328
- 52 Fausett B V, Gumerson J D, Goldman D. The proneural basic helix-loop-helix gene *ascl1a* is required for retina regeneration. *J Neurosci*, 2008, 28: 1109–1117
- 53 Jorstad N L, Wilken M S, Grimes W N, et al. Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice. *Nature*, 2017, 548: 103–107
- 54 Osakada F, Ooto S, Akagi T, et al. Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. *J Neurosci*, 2007, 27: 4210–4219
- 55 Yao K, Qiu S, Wang Y V, et al. Restoration of vision after *de novo* genesis of rod photoreceptors in mammalian retinas. *Nature*, 2018, 560: 484–488
- 56 Zhou H, Su J, Hu X, et al. Glia-to-neuron conversion by CRISPR-CasRx alleviates symptoms of neurological disease in mice. *Cell*, 2020, 181: 590–603
- 57 Yano D, Funadani R, Uda K, et al. Role of arginine kinase in *Paramecium tetraurelia* (Ciliophora, Peniculida): subcellular localization of AK3 and phosphoarginine shuttle system in cilia. *Eur J Protistol*, 2020, 74: 125705
- 58 Xiao D, Jin K, Qiu S, et al. *In vivo* regeneration of ganglion cells for vision restoration in mammalian retinas. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 755544
- 59 Wang L L, Serrano C, Zhong X, et al. Revisiting astrocyte to neuron conversion with lineage tracing *in vivo*. *Cell*, 2021, 184: 5465–5481
- 60 Hoang T, Kim D W, Appel H, et al. Ptbp1 deletion does not induce glia-to-neuron conversion in adult mouse retina and brain. *bioRxiv*: 2021.10.04.462784
- 61 Guo Z, Zhang L, Wu Z, et al. *In vivo* direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 188–202
- 62 Rao Y, Du S, Yang B, et al. NeuroD1 induces microglial apoptosis and cannot induce microglia-to-neuron cross-lineage reprogramming. *Neuron*, 2021, 109: 4094–4108
- 63 Ikeda H, Osakada F, Watanabe K, et al. Generation of $Rx^+/Pax6^+$ neural retinal precursors from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 11331–11336
- 64 Lamba D A, Karl M O, Ware C B, et al. Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 12769–12774
- 65 Osakada F, Ikeda H, Mandai M, et al. Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 215–224
- 66 Meyer J S, Howden S E, Wallace K A, et al. Optic vesicle-like structures derived from human pluripotent stem cells facilitate a customized approach to retinal disease treatment. *Stem Cells*, 2011, 29: 1206–1218
- 67 Nakano T, Ando S, Takata N, et al. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell*, 2012, 10: 771–785
- 68 Zhong X, Gutierrez C, Xue T, et al. Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs. *Nat Commun*, 2014, 5: 4047
- 69 Cuevas E, Holder D L, Alshehri A H, et al. *NRL*^{−/−} gene edited human embryonic stem cells generate rod-deficient retinal organoids enriched in S-cone-like photoreceptors. *Stem Cells*, 2021, 39: 414–428
- 70 Eldred K C, Hadyniak S E, Hussey K A, et al. Thyroid hormone signaling specifies cone subtypes in human retinal organoids. *Science*, 2018, 362: eaau6348
- 71 Swaroop A, Kim D, Forrest D. Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11: 563–576

- 72 Hayashi R, Ishikawa Y, Katori R, et al. Coordinated generation of multiple ocular-like cell lineages and fabrication of functional corneal epithelial cell sheets from human iPS cells. [Nat Protoc](#), 2017, 12: 683–696
- 73 Mellough C B, Collin J, Khazim M, et al. IGF-1 signaling plays an important role in the formation of three-dimensional laminated neural retina and other ocular structures from human embryonic stem cells. [Stem Cells](#), 2015, 33: 2416–2430
- 74 Susaimanickam P J, Maddileti S, Pulimamidi V K, et al. Generating minicorneal organoids from human induced pluripotent stem cells. [Development](#), 2017, 144: 2338–2351
- 75 Isla-Magrané H, Veiga A, García-Arumí J, et al. Multiocular organoids from human induced pluripotent stem cells displayed retinal, corneal, and retinal pigment epithelium lineages. [Stem Cell Res Ther](#), 2021, 12: 581
- 76 Wang H, Yang Y, Liu J, et al. Direct cell reprogramming: approaches, mechanisms and progress. [Nat Rev Mol Cell Biol](#), 2021, 22: 410–424
- 77 Song K, Nam Y J, Luo X, et al. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. [Nature](#), 2012, 485: 599–604
- 78 Sekiya S, Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. [Nature](#), 2011, 475: 390–393
- 79 Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang Z P, et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. [Nature](#), 2010, 463: 1035–1041
- 80 Yamamoto K, Kishida T, Sato Y, et al. Direct conversion of human fibroblasts into functional osteoblasts by defined factors. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2015, 112: 6152–6157
- 81 Pan S H, Zhao N, Feng X, et al. Conversion of mouse embryonic fibroblasts into neural crest cells and functional corneal endothelia by defined small molecules. [Sci Adv](#), 2021, 7: eabg5749
- 82 Xiao D, Deng Q, Guo Y, et al. Generation of self-organized sensory ganglion organoids and retinal ganglion cells from fibroblasts. [Sci Adv](#), 2020, 6: eaaz5858
- 83 Mahato B, Kaya K D, Fan Y, et al. Pharmacologic fibroblast reprogramming into photoreceptors restores vision. [Nature](#), 2020, 581: 83–88
- 84 Lamba D A, McUsic A, Hirata R K, et al. Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells. [PLoS ONE](#), 2010, 5: e8763
- 85 Pearson R A, Barber A C, Rizzi M, et al. Restoration of vision after transplantation of photoreceptors. [Nature](#), 2012, 485: 99–103
- 86 Gonzalez-Cordero A, West E L, Pearson R A, et al. Photoreceptor precursors derived from three-dimensional embryonic stem cell cultures integrate and mature within adult degenerate retina. [Nat Biotechnol](#), 2013, 31: 741–747
- 87 Tucker B A, Park I H, Qi S D, et al. Transplantation of adult mouse iPS cell-derived photoreceptor precursors restores retinal structure and function in degenerative mice. [PLoS ONE](#), 2011, 6: e18992
- 88 Singh M S, Balmer J, Barnard A R, et al. Transplanted photoreceptor precursors transfer proteins to host photoreceptors by a mechanism of cytoplasmic fusion. [Nat Commun](#), 2016, 7: 13537
- 89 Ortin-Martinez A, Tsai E L S, Nickerson P E, et al. A reinterpretation of cell transplantation: GFP transfer from donor to host photoreceptors. [Stem Cells](#), 2017, 35: 932–939
- 90 Pearson R A, Gonzalez-Cordero A, West E L, et al. Donor and host photoreceptors engage in material transfer following transplantation of post-mitotic photoreceptor precursors. [Nat Commun](#), 2016, 7: 13029
- 91 Mandai M, Fujii M, Hashiguchi T, et al. iPSC-derived retina transplants improve vision in *rd1* end-stage retinal-degeneration mice. [Stem Cell Rep](#), 2017, 8: 69–83
- 92 Uyama H, Mandai M, Takahashi M. Stem-cell-based therapies for retinal degenerative diseases: current challenges in the establishment of new treatment strategies. [Dev Growth Differ](#), 2021, 63: 59–71
- 93 Eberle D, Kurth T, Santos-Ferreira T, et al. Outer segment formation of transplanted photoreceptor precursor cells. [PLoS ONE](#), 2012, 7: e46305
- 94 Assawachananont J, Mandai M, Okamoto S, et al. Transplantation of embryonic and induced pluripotent stem cell-derived 3D retinal sheets into retinal degenerative mice. [Stem Cell Rep](#), 2014, 2: 662–674
- 95 Llonch S, Carido M, Ader M. Organoid technology for retinal repair. [Dev Biol](#), 2018, 433: 132–143
- 96 Zhang Z, Xu Z, Yuan F, et al. Retinal organoid technology: where are we now? [Int J Mol Sci](#), 2021, 22: 10244
- 97 Waldron P V, Di Marco F, Kruczek K, et al. Transplanted donor- or stem cell-derived cone photoreceptors can both integrate and undergo material transfer in an environment-dependent manner. [Stem Cell Rep](#), 2018, 10: 406–421
- 98 Lin Q, Lv J N, Wu K C, et al. Generation of nonhuman primate model of cone dysfunction through *in situ* AAV-mediated CNGB3 ablation. [Mol Ther-Methods Clin Dev](#), 2020, 18: 869–879

- 99 Li S, Hu Y, Li Y, et al. Generation of nonhuman primate retinitis pigmentosa model by *in situ* knockout of RHO in rhesus macaque retina. *Sci Bull*, 2021, 66: 374–385
- 100 Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. *Cell Proliferation*, 2007, 41: 51–56
- 101 Guo D, Ru J, Mao F, et al. Ontogenesis of the tear drainage system requires Prickle 1-driven polarized basement membrane (BM) deposition. *Development*, 2020, 147: dev191726
- 102 Liu C, Lin C, Gao C, et al. Null and hypomorph *Prickle1* alleles in mice phenocopy human Robinow syndrome and disrupt signaling downstream of Wnt5a. *Biol Open*, 2014, 3: 861–870
- 103 Liu C, Lin C, Whitaker D T, et al. Prickle1 is expressed in distinct cell populations of the central nervous system and contributes to neuronal morphogenesis. *Hum Mol Genet*, 2013, 22: 2234–2246
- 104 Liu C, Nathans J. An essential role for frizzled 5 in mammalian ocular development. *Development*, 2008, 135: 3567–3576
- 105 Liu C, Bakeri H, Li T, et al. Regulation of retinal progenitor expansion by Frizzled receptors: implications for microphthalmia and retinal coloboma. *Hum Mol Genet*, 2012, 21: 1848–1860
- 106 Rong Z, Wang M, Hu Z, et al. An effective approach to prevent immune rejection of human ESC-derived allografts. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 121–130
- 107 Aron Badin R, Bugi A, Williams S, et al. MHC matching fails to prevent long-term rejection of iPSC-derived neurons in non-human primates. *Nat Commun*, 2019, 10: 4357
- 108 Lee A S, Tang C, Rao M S, et al. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nat Med*, 2013, 19: 998–1004
- 109 Cui L, Guan Y, Qu Z, et al. WNT signaling determines tumorigenicity and function of ESC-derived retinal progenitors. *J Clin Invest*, 2016, 126: 4061
- 110 Ran F A, Hsu P D, Lin C Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154: 1380–1389
- 111 Fu Y, Sander J D, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 279–284
- 112 Chen J S, Dagdas Y S, Kleinstiver B P, et al. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature*, 2017, 550: 407–410
- 113 Hao J, Ma A, Wang L, et al. General requirements for stem cells. *Cell Prolif*, 2020, 53: e12926
- 114 Hao J, Cao J, Wang L, et al. Requirements for human embryonic stem cells. *Cell Prolif*, 2020, 53: e12925

Advances and challenges in photoreceptor repair and regeneration

GUO DianLei, RU JiaLi, XU ShuJuan & LIU ChunQiao

State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

Vision relies on converting light into electrical signals and sequentially transmitting the electrical signals along a visual pathway. Photon reception and electrical signal conversion is the first step in vision, which is carried out by a specialized type of retinal neuron called the photoreceptor. Loss of photoreceptors leads to irreversible retinal degeneration and blindness, and currently, there is no cure. Gene therapy is expected to relieve some hereditary retinal degenerative diseases. The first and the only by far gene-drug LUXTURN[®] was approved by the US FDA in 2017 for the treatment of Leber congenital amaurosis (LCA). However, the high cost (\$850,000/person) and narrow treatment window make it unavailable for most patients with RPE65 mutations. Recent advances in the differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells and in transdifferentiation of endogenous Müller cells provide hope for regenerating photoreceptors and will provide new routes for treating degenerative retinal diseases. This review focuses on the ongoing development of gene and stem cell therapies, highlighting the current advances and challenges in photoreceptor repair and regeneration.

photoreceptor, gene repair, stem cell, induced pluripotent stem cells (iPSCs), regeneration, transplantation

doi: [10.1360/SSV-2021-0114](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0114)