

## 综述

# 诱导多能干细胞联合CRISPR/Cas9在遗传病中的研究进展和应用

田芯媛<sup>1,2</sup> 张钊<sup>1</sup> 孙小红<sup>3</sup> 惠玲<sup>1\*</sup><sup>1</sup>甘肃省妇幼保健院医学遗传中心, 甘肃省出生缺陷与罕见病临床研究中心, 兰州 730050;<sup>2</sup>甘肃中医药大学公共卫生学院, 兰州 730000; <sup>3</sup>兰州市妇幼保健院, 兰州 730000)

**摘要** 规律成簇的间隔短回文重复序列/相关蛋白核酸酶(regular clustering of short palindrome repeats/Cas9, CRISPR/Cas9)技术联合应用诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)可以在体外建立各种遗传病模型, 研究疾病发生的分子机制或进行高通量药物筛选, 还可以纠正致病突变, 为细胞和基因替代疗法、个性化再生医学和活体生物医学的发展奠定研究基础, 但二者结合应用仍存在很多问题尚待解决。该文主要对近年iPSC和CRISPR/Cas9技术的发展以及二者结合在人类遗传病建模、细胞和基因替代治疗以及生物传感器应用中的最新进展进行综述, 并探讨面临的技术挑战和解决方法。

**关键词** iPSC; CRISPR/Cas9; 遗传病; 疾病建模; 基因治疗

## Research Progress and Application of iPSC Combined with CRISPR/Cas9 in Genetic Disease

TIAN Xinyuan<sup>1,2</sup>, ZHANG Chuan<sup>1</sup>, SUN Xiaohong<sup>3</sup>, HUI Ling<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Gansu Provincial Clinical Research Center for Birth Defects and Rare Diseases, Medical Genetics Center, Maternity and Childcare Hospital of Gansu, Lanzhou 730050, China; <sup>2</sup>School of Public Health, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; <sup>3</sup>Maternity and Childcare Hospital of Lanzhou, Lanzhou 730000, China)

**Abstract** The CRISPR/Cas9 (regular clustering of short palindrome repeats/Cas9) technology combined with iPSC (induced pluripotent stem cell) can establish various genetic disease models to study the molecular mechanism of disease occurrence or perform high-throughput drug screening. It can also correct disease-causing mutations, laying a research foundation for the development of cell and gene therapy, personalized regenerative medicine and living biomedicine. However, there are still many problems to be solved in the combination of the two. In this paper, the latest progress of iPSC and CRISPR/Cas9 technology are summarized, as well as the com-

收稿日期: 2023-02-27 接受日期: 2023-05-22

甘肃省科技厅创新基地及人才计划(批准号: 21JR7RA680)、兰州市科技计划(批准号: 2021-1-182、2022-5-81)和兰州市人才创新创业项目(批准号: 2018-RC-42)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0931-5188561, E-mail: zyhuil@hotmail.com

Received: February 27, 2023 Accepted: May 22, 2023

This work was supported by the Science and Technology Department of Gansu Province Innovation Base and Talent Program (Grant No.21JR7RA680), Lanzhou Science and Technology Plan (Grant No.2021-1-182, 2022-5-81) and Lanzhou Talent Innovation and Entrepreneurship Project (Grant No.2018-RC-42)

\*Corresponding author. Tel: +86-931-5188561, E-mail: zyhuil@hotmail.com

combination of the two in human genetic disease modeling, cell and gene replacement therapy, and the applications of biosensor. At the same time, the great challenges and solutions are also discussed.

**Keywords** iPSC; CRISPR/Cas9; genetic disease; disease modeling; gene therapy

遗传性疾病又称遗传病, 病因是各种基因或染色体缺陷。一直以来, 许多遗传病都难以被深入研究, 因为不仅在基因组水平上存在各种变异, 而且蛋白质在人体内的功能也具有多样性, 更关键的是由于伦理问题无法通过人体进行任何实验研究。因此, 很多实验动物模型被广泛应用, 但大部分仍不能完美再现遗传病的所有遗传和表型特征。直到2006年TAKAHASHI等<sup>[1]</sup>通过逆转录病毒载体, 将表达四种多能性转录因子POU结构域5类转录因子1(POU class 5 homeobox 1, Pou5f1, 又称Oct3/4)、性别决定区域Y(sex determining region Y, SRY)转录因子2(SRYbox transcription factor 2, Sox2)、Krüppel样因子4(Krüppel-like factor 4, Klf4)和骨髓细胞瘤病致癌因子(cellular-myelocytomatosis viral oncogene, c-Myc)(统称为OSKM)的基因引入小鼠成纤维细胞, 使成纤维细胞转化为具有多向分化潜能的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)。iPSC具有无限增殖和自我更新的能力, 在特定条件下培养能够定向分化为大量可供移植的体细胞类型, 可用于细胞治疗或者组织再生治疗, 还可用于疾病建模以模拟遗传病临床表征和研究致病机制, 同时也克服了使用胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)及其衍生物进行临床移植所面临的伦理和免疫相容性问题。

通过对体内细胞进行基因组编辑, 我们可以纠正大多数遗传病患者的致病基因突变, 提供挽救生命的治疗方法<sup>[2]</sup>。基因组编辑能改变目的基因序列, 实现定点突变、敲除或插入等精准操作, 最终改变细胞结局和生物特征。2013年, 第三代基因编辑系

统规律成簇的间隔短回文重复序列/相关蛋白核酸酶(regular clustering of short palindrome repeats/Cas9, CRISPR/Cas9)技术成功应用于哺乳动物细胞<sup>[3]</sup>, 随后开启了基因编辑技术井喷式发展的时代。利用iPSC进行相对高效安全的基因组编辑, 这已在基础研究和临床应用上体现出强大的优势。本文介绍了iPSC和CRISPR/Cas9在一些方面的技术革新, 对二者结合在人类遗传病建模、细胞和基因替代治疗以及生物传感器应用方面的最新进展进行了综述, 并探讨了其面临的巨大挑战和解决方法。

## 1 iPSC在遗传病中的研究进展和临床应用

### 1.1 iPSC技术概况

随着体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)和ESCs融合的发现, 人们证实了存在可以消除表观遗传记忆的重编程因子<sup>[4]</sup>。理论来讲, 只要给予适当的诱导, 人体(包括遗传病患者)内分化成熟的体细胞, 基本上都可以通过强制表达OSKM等特定转录因子而被重编程为iPSC。很多不同类型的体细胞<sup>[5-10]</sup>可以被诱导建立起模拟正常人和患者的iPSC, 而不同来源的体细胞在获取方式和重编程效率上存在显著差异(表1)。经综合比较, 羊水来源细胞是目前生成iPSC的最佳原代细胞。原代细胞的起源会影响后续的重编程和定向诱导分化, 不同来源的iPSC在多向分化潜能和基因表达调控水平上也存在差异, 这可能是因为重编程过程会保留来源细胞中组织特异性基因的表达并抑制相关的残余甲基化标记, 因此iPSC更容易分化成其来源的组织细胞。

目前, 根据体细胞的种类和重编程因子的表达水

表1 iPSC常用原代细胞来源的比较

Table 1 Comparison of commonly used primary cells source of iPSC

原代细胞来源 Primary cells source	优点 Advantages	缺点 Shortcoming
Urine derived cells	Easy access	Long culture cycle, low purification
PBMC	Easy access	Low efficiency
Fibroblasts	High efficiency, high purity	Sampling trauma
Amniotic fluid derived cells	High efficiency, short culture cycle, high purity	Sampling difficulty

平,可以灵活选择生成iPSC所需要的重编程因子<sup>[11]</sup>。一般采用Sox2、Klf4、Oct3/4和c-Myc组合<sup>[1]</sup>或者Oct4、Sox2和Klf4组合。外源转录因子OSKM可抑制体细胞特性的表达,同时激活多能性相关基因(pluripotency-associated genes, *PAG*)的增强子和启动子并触发其转录和表达,从而逐步实现重编程<sup>[12]</sup>。其中c-Myc作为原癌基因表达产物,有一定的致癌性,表达活跃会增加iPSC来源的肿瘤形成风险,因此可以用无转化活性的L-Myc将其替代<sup>[13]</sup>,或者使用具有抑癌作用的microRNA(例如miR-302可维持人类干细胞的多能性)<sup>[14]</sup>、表观遗传修饰物或者分化相关因子等从功能上取代c-Myc<sup>[15-16]</sup>。目前,在不影响治疗质量和安全性的前提下,细胞核重编程策略包括使用病毒或非病毒载体的整合型或非整合型转移系统。腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)的免疫原性很低,其保留的病毒结构几乎对人体没有致病性,因此使用AAV非整合型重编程载体系统既不会引起严重的免疫反应,又大幅度提高了安全性。近年来,随着细胞核重编程技术的日益精进,化学修饰的信使核糖核酸(chemically modified messenger RNA, cmRNA, 又称modRNA)作为备选载体,可以消除插入突变的风险、无病毒残留、提高重编程效率,是一种安全有效的核酸治疗和再生医学工具,越来越多地被应用于体内基因递送<sup>[17-18]</sup>。cmRNA的化学修饰即在体外使用化学修饰的碱基合成mRNA,可以提高稳定性,降低免疫原性。

## 1.2 iPSC在遗传病中的研究进展和临床应用

在心血管疾病的背景下,利用人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cell, hiPSC)来源的心肌细胞(iPSC-CMs)可以建立疾病模型,来评估药物安全性<sup>[19]</sup>。除此之外,基于iPSC的疾病模型还可应用于内皮细胞疾病(包括家族性肺动脉高压)、平滑肌细胞疾病(包括Williams-Beuren综合征和马凡综合征),研究疾病发生的分子机制和细胞替代疗法的潜力,并可辅助进行高通量药物筛选<sup>[20]</sup>。类器官是由多种细胞类型组成的三维(3D)结构,存在与器官相似的结构和微环境,使用hiPSC衍生的3D类器官来研究人类疾病可以更好地解释所涉及到的生物过程,也可以在体外展现药物反应的情况。研究者已经探索了从iPSC中发育生成三维化血管和功能性肝脏器官的可能性,模拟了人体器官内部的细胞组织结构,再现了器官内部形成的生理条件。例如,

使用iPSC技术培养肝细胞样细胞,促进个性化再生医学的发展,对于严重肝病的治疗、药物筛选、肝移植和基础研究都是有利的<sup>[21]</sup>。2019年,日本的研究团队将来自捐献者的皮肤细胞重编程为iPSC,然后培养成角膜组织完成了全球首例移植手术<sup>[22]</sup>。

## 2 CRISPR/Cas9在遗传病中的研究进展和临床应用

### 2.1 CRISPR/Cas9基因编辑技术概况

2012年,人们首次发现Cas9核酸酶<sup>[23-24]</sup>具有RNA引导的靶序列识别和蛋白质介导的DNA切割作用。随后一系列研究<sup>[3,25-27]</sup>都证实了其在真核细胞中可以进行定向基因组编辑。目前发现,自然产生的CRISPR/Cas系统有两类:第一类,使用多蛋白复合物进行核酸切割;第二类,使用单蛋白效应区域进行切割。Cas9属于第二类,改造效率优于ZFNs和TALENs,是目前应用最广泛的基因组编辑工具。CRISPR/Cas9系统分为两部分:①sgRNA,由CRISPR RNA(crRNA)和反式激活crRNA(tracrRNA)整合而成,其中crRNA与目标序列碱基互补配对特异性识别DNA位点,依赖于sgRNA上20 bp的间隔序列和目标序列上特异的PAM(proto-spacer adjacent motif)短序列;tracrRNA可与Cas9形成复合物;②Cas9酶,进行DNA切割。为了提高基因编辑效率,人们大力研究Cas9、Cas12、Cascade和Cas13的变体,比如嗜热链球菌Cas9(St1Cas9)、金黄色葡萄球菌Cas9(SaCas9)和化脓性链球菌Cas9(SpCas9)的三种变体,它们能够识别不同的PAM短序列<sup>[28-31]</sup>,扩展Cas9介导的基因组编辑应用中的靶向序列库。除此之外,CRISPR/Cas系统还发展了很多其他应用,例如进行转录活性调控<sup>[32-33]</sup>、表观遗传修饰<sup>[34-36]</sup>、RNA编辑<sup>[36]</sup>和核酸检测<sup>[36]</sup>。这些新进展极大地推进了研究者对生物过程的探索进程,加强了人们对基因编辑的理解,并推动了基于CRISPR/Cas系统的工具在基因或细胞治疗中的临床应用。从第一代重组锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)、第二代转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)到第三代CRISPR/Cas9系统,基因编辑效率不断提高、成本逐渐降低、应用范围日益扩大。这些技术都是通过诱导DNA双链断裂(double-strand break, DSB)并在特定的基因组位置激活细胞内的异源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同

源重组修复(homology directed repair, HDR)两种修复机制,从而实现遗传修饰的。但是NHEJ容易引起随机插入、缺失导致基因变异,保真度不高;而HDR需要同源模板的激活才能顺利进行,效率较低。对于CRISPR/Cas9系统来说,CRISPR-CAS酶、相关的sgRNA和任何DNA修复模板都必须导入靶细胞发挥作用。目前应用最广的导入方法是在体外通过电穿孔将RNPs导入细胞,但是如何高效导入仍是基因组编辑的一大瓶颈。现在已经涌现出很多可以直接导入CRISPR/Cas9 RNP复合物的新方法,例如利用分子工程增强特定细胞类型的靶向性<sup>[37]</sup>、提高细胞穿透效率<sup>[38]</sup>、利用超负荷多肽,比如丝氨酸羧肽酶(serine carboxypeptidases, SCP)及其类蛋白来介导Cas9蛋白和sgRNA的传递等。新兴的蛋白质工程和合成化学技术也为基因组编辑酶提高编辑效率、特异性和免疫原性优化了实验方案<sup>[39]</sup>。与前两代基因编辑技术相比,CRISPR/Cas9系统具有无物种限制、靶向精确性高、可实现对靶基因多个位点同时敲除、载体构建简单等优点,但是仍旧存在“脱靶效应”的问题。

2016年,单碱基编辑(base editing, BE)技术大放异彩,实现了既不引起DNA双链断裂又无需同源模板的单个碱基替换,具有高效安全、特异性强、副产物少和脱靶效应低等优势,有效规避了前三代基因编辑技术的不足<sup>[31]</sup>。BE主要通过脱氨酶、Cas9突变体(不具备DNA双链切割功能)和sgRNA的复合物进行单个碱基编辑<sup>[40]</sup>: ①sgRNA, 引导复合物靶向目标序列; ②脱氨酶, 进行脱氨基。目前已开发的单碱基编辑器包括: 将碱基C替换为T的胞嘧啶碱基编辑(CBE)技术<sup>[31]</sup>, 将碱基A替换为G的腺嘌呤碱基编辑(ABE)技术<sup>[40]</sup>, 以及最新开发的将C-G碱基颠换的CGBEs技术<sup>[41-42]</sup>。2019年, ANZALONE等<sup>[43]</sup>报道了先导编辑(prime editor, PE), 它是由引物编辑向导RNA(prime edit guide RNA, pegRNA)表达的逆转录酶和Cas-nickase核酸酶结合而成的,能够在任意位置实现12种不同的碱基替换方式,还可以实现单个或多个碱基的插入或缺失。因此BE和PE可以修复因点突变和碱基插入或缺失造成的遗传病,应用范围更加广阔,但其精准度和生物应用安全性仍有待优化。

## 2.2 CRISPR/Cas9在遗传病中的研究进展和临床应用

随着CRISPR/Cas9技术的发展,生物医学研究发生了革命性的变化,大多数细胞都可以进行有针

对性和特异性的基因组修饰。CRISPR/Cas9作为一种基因组编辑工具,其适用性从单基因编辑到多重基因工程、基因表达调控和全基因组筛选,除了用于基因功能分析外,还可用于基因治疗、疾病诊断、靶向药物开发和动物模型的构建。

从开发更有效的基因编辑工具,到治疗遗传性疾病,CRISPR/Cas9开始从一个基础研究工具成功迈入临床应用。将外来基因拷贝导入含有受损或突变基因的靶细胞中以治疗各种疾病的方法被称为基因疗法。使用CRISPR/Cas9系统进行多重靶向基因组工程是一种相对容易的方法,因为比起为每个特定靶基因开发基于蛋白质的识别序列,设计sgRNA显然更容易更高效<sup>[44]</sup>。2016年中国提出了首个CRISPR/Cas9人体临床试验,10例肺癌患者计划接受自身免疫细胞注射,其中PDI基因由CRISPR/Cas9进行编辑<sup>[45]</sup>。2017年南京大学启动了CRISPR/Cas9治疗侵袭性胃癌、淋巴瘤和鼻咽癌患者的临床试验,这是CRISPR/Cas9首次应用于口腔和颅面领域<sup>[46]</sup>。2019年最新报道了应用CRISPR/Cas9技术成功治愈1例先天性黑朦10型的常染色体隐性眼遗传病,这项治疗是全球首个在患者体内进行CRISPR基因编辑完成给药,是一项具有里程碑意义的临床试验的一部分,表明了基因疗法应用于遗传病的可行性<sup>[47]</sup>。在亨廷顿舞蹈症、帕金森病和阿尔茨海默病的模型系统中进行测试,发现等位基因特异性的CRISPR/Cas系统可以灭活疾病等位基因,而且以基因特定区域为靶点使用CRISPR/Cas系统可以调节与这些神经退行性疾病相关基因的表达水平<sup>[48]</sup>。CRISPR/Cas基因编辑系统具有纠正单基因疾病的潜力,近年来,建立在CRISPR/Cas系统上的单碱基编辑技术不断被开发,在治疗单基因遗传病方面拥有光明的前景。2020年,2名β地中海贫血症患者和1名镰状细胞病患者,在骨髓干细胞经过基因编辑回输体内后,对于输血的需求大幅减轻,同时缓解了重症危象,证明CRISPR/Cas9系统有初步治疗β地中海贫血和重度镰状细胞病的功效<sup>[49]</sup>,这项临床试验的成功,是CRISPR基因编辑的一个巨大胜利,标志着使用CRISPR治疗疾病不再是一个理论上的想法,而几乎是一个肯定的治疗方法。2021年,英国伦敦大学研究人员首次将CRISPR药物注射到一种罕见遗传病——转甲状腺素蛋白淀粉样变性患者的血液中,促使突变基因失活,发现其中3人的肝脏几乎停止产生有毒的蛋白质<sup>[50]</sup>,这种疗法

意味着将基于CRISPR/Cas9的基因编辑治疗剂注射到血液中,并在某个器官或组织上找到治疗靶点,这种疗法在灭活、修复或替换身体任何部位的致病基因方面,终于迈出了关键的第一步。最近两年,这些新的突破逐渐使得人类比以往任何时候都更接近于开发出彻底治愈遗传病的方法。

### 3 iPSC联合CRISPR/Cas9技术在遗传病中的应用

#### 3.1 疾病建模

使用CRISPR/Cas9编辑iPSC,可以产生具有相同遗传背景的细胞模型,用于评估表型差异和下游效应,甚至可以改变基因表达和定点转录调控的范围。2014年,中国团队从*DISC1*移码突变的精神分裂症患者中获得iPSC,并通过CRISPR/Cas9技术纠正致病突变产生正常的iPSC,分别进行诱导分化为神经元细胞,对比发现*DISC1*突变导致iPSC来源的前脑神经元突触小泡释放缺陷,揭示了精神疾病相关突变导致人类神经元突触缺陷和转录失调,为精神疾病的分子和突触病因学提供了新的见解<sup>[51]</sup>。还有研究团队从眼遗传病相关基因突变的患者身上获得iPSC,构建体外视网膜类器官小体模型,并用CRISPR/Cas9纠正致病突变后发现视网膜小体的结构和功能均有所好转<sup>[52]</sup>。阿尔茨海默病是老年人痴呆症最常见的病种,目前尚无有效的治疗方法,但最新的一项研究利用iPSC和CRISPR/Cas9技术建立*APOE3Ch*野生型和纯合突变型来源的阿尔茨海默病脑组织模型,然后通过病理观察和单细胞RNA测序,证实了*APOE3Ch*纯合突变对于阿尔茨海默病的发生和发展具有抗性,可保护患者使其神经退行性病变更轻、发病较晚,为包括阿尔茨海默病在内的一系列微管相关蛋白异常导致的神经元疾病开发新的治疗方法奠定了基础<sup>[53]</sup>。除此之外,利用iPSC定向诱导分化出造血干/祖细胞,并通过荧光激活细胞分选分析观察造血过程中的表型差异,可了解骨髓增殖性肿瘤(myeloproliferative neoplasm, MPN)的遗传学发病机制,并针对MPN的化合物作出疗效评估<sup>[54]</sup>。最近两年,利用CRISPR/Cas9结合iPSC来复制不同疾病的体外模型以研究遗传病致病机制,并为后续治疗提供基础的研究已层出不穷,比如先天性肌无力综合征(*DOK7*基因突变)<sup>[55]</sup>、囊性纤维化(*CFTR*基因突变)<sup>[56]</sup>、GLUT1缺乏综合征(*SLC2A1*基因突变)<sup>[57]</sup>

等,充分说明这两种技术现已趋于成熟,且二者联用在包括遗传病在内的各种难治性疾病领域中均已得到广泛应用,此后探索新的疗法也不再是纸上谈兵。

为了更深入地了解细胞功能和疾病的生理病理过程,更有效地探索疾病的治疗方法,基因编码的生物传感器应运而生。它可以用于实时监测正常或病理条件下细胞生物过程中的信使分子、代谢物和酶活性,并将信号转换为定量数据,从而评估某些分子对病理学发展的影响。STELLON等<sup>[58]</sup>利用CRISPR/Cas系统将基因编码的荧光生物传感器(genetically encoded fluorescent biosensors, GEFBs)敲入iPSC AAVS1位点,由此产生的iPSC可以分化成不同谱系的细胞,且细胞中还保留了GEFB的表达,从而实现在不同的疾病模型中监测细胞通路活动,使得活细胞内的细胞过程变得可视化和量化。USTY-ANTSEVA等<sup>[59]</sup>分别建立了携带*SOD1*基因突变和正常未突变的两种iPSC并将其插入生物传感器,检测和评估与肌萎缩侧索硬化症相关的病理过程,从而研究疾病运动神经元的损伤机制。显然,在iPSC或类器官结构中表达基因编码的生物传感器可以使我们获得患者来源细胞中信号传递的信息,加深对驱动疾病表型的细胞内信号通路的认知,为活体生物医学研究提供新的平台。

#### 3.2 细胞和基因替代疗法

干细胞治疗具有巨大的应用潜力,因为干细胞可无限增殖,且能够分化成体内大多数细胞类型,这些特性都使得细胞和基因治疗成为可能。正常人iPSC分化成的组织细胞移植到患者体内可能会引起免疫排斥反应,THONGSIN等<sup>[60]</sup>研究显示,使用CRISPR/Cas9系统建立*B2M*基因纯合敲除的iPSC,消除HLA-I类分子的表达,可以大大降低iPSC的免疫原性,为细胞治疗提供现成的同种异体细胞产品原型。

2016年,CRISPR/Cas9纠正了1例*MYO7A*复合杂合耳聋患者iPSC中的突变位点c.4118C>T,校正后的iPSC保持了细胞的多能性和正常核型,诱导分化后的毛细胞样细胞也表现出立体纤毛样突起,其电生理功能与正常毛细胞相似,这些结果有助于以iPSC和CRISPR/Cas9为基础的遗传病基因治疗的发展<sup>[61]</sup>。2020年,ITO等<sup>[62]</sup>使用CRISPR/Cas9技术校正了隐性营养不良性大疱性表皮松解症特异的iPSC致病突变,并使用piggyBac转座子系统使校正后的iPSC基因组中没有残留的基因片段,证明这种方法可以建

立皮肤遗传病的基因和细胞疗法, 以供将来临床应用。黏多糖病(mucopolysaccharidosis, MPS)是一组罕见的遗传病, 其特征是部分降解的糖胺多糖在细胞内积聚而导致神经变性, 有研究团队设计特定的gRNA, 联合应用iPSC与基因组编辑技术, 目的是精确纠正10个MPSs的已知致病突变, 可能会为MPSs提供长期或根治性的治疗<sup>[63]</sup>, 但现有疗法的局限性仍旧阻碍了MPS的疗效, 未来的工作重点或许仍将集中在提高基因组编辑的效率和保真度, 以及提高基因组编辑载体在体内向中枢神经系统的递送效率上。

对于由血液系统发育和/或功能改变引起的单基因遗传性疾病, 当前减轻或治愈镰状细胞疾病的策略是对特定位点进行基因组编辑, 收集患者的自体造血干细胞和祖细胞, 通过同源定向修复纠正HbB中的突变或者重新激活 $\gamma$ -珠蛋白的表达, 然后将编辑后的细胞回输进骨髓<sup>[64-66]</sup>。在此基础上, 通过无创性手段取得患者外周血并从中提取外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)或者取得患者尿液中的上皮细胞重编程产生iPSC, 然后将其定向诱导分化为造血干细胞, 再经过CRISPR/Cas9基因编辑, 有望根治这些血液系统遗传病。神经性疾病是影响大脑和神经系统功能的疾病的总称, 全世界有多达10亿人受到影响, 囊括了从先天性神经发育障碍(例如自闭症)到与年龄相关的神经退化性病变(例如阿尔茨海默病)。这些疾病大多数都没有根治方法, 对症治疗是缓解的主要手段。但是目前iPSC和基因编辑技术的蓬勃发展, 使得细胞替代疗法作为可根治神经性疾病的最优解, 正在迅速崛起和发展, 可以采用健康的或者经过基因编辑校正的iPSC分化出的神经细胞来补充死亡和受损的组织, 比如现在的热门研究领域: 帕金森病的多巴胺能神经元替代治疗和阿尔茨海默症的神经元亚型移植等<sup>[67-68]</sup>。

#### 4 面临的挑战与解决方法

CRISPR/Cas9结合iPSC为治疗难治性遗传病提供了广阔的技术平台, 但也存在着很多限制其使用的难题。一方面, iPSC具有无限增殖的潜力, 然而由于未分化成熟的iPSC细胞残留、重编程因子表达活跃或者iPSC体外培养发生基因突变等因素, 有发生畸胎瘤的概率, 而这种潜在的致癌性风险不仅取决于未分化的人iPSC的数量, 还取决于来源细胞系的

特征<sup>[69]</sup>。早在2020年就有中国团队发现miR-302可以在G<sub>1</sub>-S转换期通过抑制细胞周期蛋白E-CDK2和D-CDK4/6的细胞周期通路而抑制iPSC的致瘤性, 同时miR-302还能沉默癌症干细胞标记基因*BMI-1*以促进肿瘤抑制基因*p16INK4a*和*p14/p19Arf*的表达<sup>[70]</sup>。2022年, 日本的研究团队发现R-17F抗体可识别未分化iPSC上的特异性鞘糖脂聚糖, 并对iPSC表现出选择性细胞毒性, 因此可以使用R-17F抗体去除残留未分化的iPSC而规避致瘤风险<sup>[71]</sup>。最新一项研究结果表明, 将表达酵母胞嘧啶脱氨酶-尿嘧啶磷酸核糖转移酶(yeast cytosine deaminase-uracil phosphoribosyl transferase, yCD-UPRT)的iPSC定向诱导分化为神经干/祖细胞, 经CRISPR/Cas9介导进行基因组编辑后使yCD-UPRT稳定高效表达, 在给予5-氟胞嘧啶后可以选择性地消除未分化成熟的神经干/祖细胞, 同时保留相邻神经元结构, 安全地应用于再生医学, 而无需担心肿瘤发生<sup>[72]</sup>。

另一方面, iPSC每株细胞从DNA甲基化、mRNA和蛋白质丰度到多能性、分化倾向和细胞形态, 都存在着异质性, 阻碍了下游应用。目前可以考虑采用单细胞分析技术, LANG等<sup>[73]</sup>应用基于FACS的纯化方法对细胞类型进行纯化, 使用批量和单细胞基因表达相结合的方法对*GBA*基因N370S变异患者来源iPSC衍生的多巴胺神经元进行研究, 不仅可消除细胞异质性的影响, 还能揭示疾病机制和发现潜在的治疗靶点, 而这种方法也适用于其他疾病。在细胞治疗的过程中可能还会遇到免疫排斥的问题, 一般同种异体移植的排斥反应需要使用免疫抑制剂来克服, 但副作用明显, 减少排斥反应的方法有: ①HLA配型; ②敲除iPSC中的*B2M*基因, 使MHC-I类分子灭活; ③使用自体iPSC及其衍生移植体等。一项对人类细胞模型的回顾研究表明神经元与小胶质细胞(中枢神经系统固有的免疫细胞)等非神经性细胞群相互作用, 可能会降低CRISPR和AAV系统的免疫原性, 扩大脑部类器官的应用<sup>[74]</sup>。

CRISPR/Cas9还存在一个客观缺陷, 即脱靶效应, 因为CRISPR/Cas9系统附着在基因组的多个位点上, 可能会对非目标DNA片段进行错误切割, 发生偏离目标的脱靶突变。脱靶突变可破坏基因组稳定性而改变和阻碍基因功能, 或激活癌基因诱导细胞死亡, 从而影响CRISPR/Cas9-iPSC系统的效率。脱靶的多少一定程度上取决于Cas9/sgRNA质粒转染的量以

及sgRNA与Cas9的比例,可以利用sgRNA在线设计工具和生物信息学手段,将sgRNA序列与参考基因组序列进行同源性比对预测脱靶位点,然后对其进行全基因组测序以检测是否会发生脱靶突变。2020年,美国科学家将组装获得的Lenti-gRNA-Puro质粒和Cas9 sgRNA经BsmBI酶切后,用T4 DNA连接酶连接,得到最终的质粒文库,利用质粒文库去量化数千个CRISPR/Cas9系统中sgRNAs的效率,训练用于检测脱靶效应设计的机器学习算法,开发出一个新的sgRNA设计工具,在实验设计、数据质量和计算建模方面均有所改进,该工具可以通过网址<http://crispr.wustl.edu>免费访问<sup>[75]</sup>。这项研究在预测脱靶效应方面取得了进步,但由于目前研究者对CRISPR/Cas9系统产生脱靶效应的机制不甚了解,所以如何解决脱靶突变给基因编辑带来的负面影响仍旧是一个难题。与其他CRISPR/Cas9递送方法相比,Cas9 RNP瞬时电穿孔递送的基因组工程在编辑效率方面具有显著优势,很大程度上可以实现靶向位点序列的正确替换,并且没有额外的插入缺失<sup>[76]</sup>。CHOI等<sup>[77]</sup>曾利用CombiSEAL技术构建了包含948种突变组合的Sp-Cas9文库,并成功筛选出了一个SpCas9变体,即Opti-SpCas9,可以在不损失Cas9酶活性及靶点选择范围的前提下降低脱靶效应,大幅度提高了其保真性,但在靶位点的切割速率上却有明显降低。根据早期研究可知,Cas9蛋白的非催化结构域REC3是可识别PAM远端3 nt碱基错配以防止脱靶效应的关键区域<sup>[78-79]</sup>,目前已有研究通过在REC3结构域引入点突变来降低Cas9蛋白的脱靶效应<sup>[80]</sup>。2022年,研究者通过结构解析揭示了Cas9蛋白产生脱靶效应的两种分子机制:①PAM远端第12~14位点的碱基错配无法阻碍REC3结构域转变成扭曲构象而使得Cas9活化,导致发生脱靶效应;②PAM远端第18~20位点的碱基错配会形成独特构象,与RuvC结构域的特定位点稳定结合并促进Cas9活化从而产生脱靶效应,在这两项机制的研究基础上又开发出了兼具低脱靶效应和高切割速率双重优势的Cas9突变体,即SuperFi-Cas9,这极大地促进了CRISPR/Cas9基因编辑技术的深度优化,也支持了其在临床治疗中的广泛应用<sup>[81]</sup>。

## 5 结语与展望

iPSC技术与CRISPR/Cas9系统的联合应用,是近年来最具发展潜力和功能丰富性的工具,正在促

进遗传病领域从疾病建模的基础研究向细胞和基因替代治疗、类器官移植的临床应用过渡。目前,可利用iPSC定向分化为具有患者特异基因背景的细胞,将其作为类器官发育、疾病建模和细胞治疗研究的最佳工具,为后续研究遗传病的发生机制和疾病发展等提供可靠有效的平台,同时对患者来源iPSC中的致病突变进行CRISPR/Cas9基因编辑为后续细胞和基因替代疗法提供细胞来源,为罕见遗传病的治疗提供新思路,这些也是目前遗传病治疗领域的研究热点和难点。目前,iPSC联合CRISPR/Cas9技术在一些更为复杂的临床应用(比如从用于白血病和其他血液疾病的iPSC中分化出造血干细胞、培养用于治疗肝功能衰竭的肝脏器官或者治疗肾功能衰竭的肾脏器官等)中也取得了稳定进展。而以microRNA分子开关、cmRNA载体、BE、PE、RNPs复合物、dCas9、3D类器官、动物嵌合体 and 生物传感器等为代表的新技术的出现和不断革新,将进一步加固和拓展基于iPSC的临床应用。相信在不久的将来,iPSC结合CRISPR/Cas9技术将会在难治病、罕见病的治疗上持续创造新的希望和奇迹。

## 参考文献 (References)

- [1] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-76.
- [2] DOUDNA J A. The promise and challenge of therapeutic genome editing [J]. *Nature*, 2020, 578(7794): 229-36.
- [3] MALI P, YANG L, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-6.
- [4] KARAGIANNIS P, TAKAHASHI K, SAITO M, et al. Induced pluripotent stem cells and their use in human models of disease and development [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(1): 79-114.
- [5] XUE Y, CAI X, WANG L, et al. Generating a non-integrating human induced pluripotent stem cell bank from urine-derived cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e70573.
- [6] SUN H, WANG Z, ZHANG Q, et al. Generation of induced pluripotent stem cell line (ZZUi027-A) derived from skin fibroblasts from a Parkinson's disease patient with RAB39B gene mutation [J]. *Stem Cell Res*, 2021, 55: 102454.
- [7] WU H, WANG G, GAO E, et al. Generation of the induced pluripotent stem cell line (NCKDi004-A) from a 17-year-old patient with Alport syndrome carrying a homozygous mutation in COL4A3 gene [J]. *Stem Cell Res*, 2021, 56: 102557.
- [8] SONG B, CHENG Y, CAO D, et al. Generation of induced pluripotent stem cell line GZHCi006-A from amniotic fluid-derived cells with deletion 14q syndrome [J]. *Stem Cell Res*, 2021, 53: 102315.
- [9] NOVAK A, LORBER A, ITSKOVITZ-ELDOR J, et al. Modeling catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia using

- induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *Rambam Maimonides Med J*, 2012, 3(3): e0015.
- [10] RIM Y A, NAM Y, PARK N, et al. Different chondrogenic potential among human induced pluripotent stem cells from diverse origin primary cells [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 9432616.
- [11] 沙杭, 艾民, 张清华, 等. *Sox2*、*Klf4*、*Oct4*、*c-Myc*基因重编程人皮肤成纤维细胞的实验研究[J]. *山东医药*(SHA H, AI M, ZHANG Q H, et al. Research on umbilical cord matrix cells reprogrammed by *Sox2*, *Klf4*, *Oct4* and *c-Myc* genes [J]. *Shandong Medicine Journal*), 2011, 51(49): 9-11.
- [12] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. A developmental framework for induced pluripotency [J]. *Development*, 2015, 142(19): 3274-85.
- [13] NAKAGAWA M, TAKIZAWA N, NARITA M, et al. Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(32): 14152-7.
- [14] SUGAWARA T, KAWAMOTO Y, KAWASAKI T, et al. A single allele of the hsa-miR-302/367 cluster maintains human pluripotent stem cells [J]. *Regen Ther*, 2022, 21: 37-45.
- [15] LIN S L, YING S Y. Mechanism and method for generating tumor-free iPS cells using intronic microRNA miR-302 induction [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 936: 295-312.
- [16] XIAO X, LI N, ZHANG D, et al. Generation of induced pluripotent stem cells with substitutes for yamanaka's four transcription factors [J]. *Cell Reprogram*, 2016, 18(5): 281-97.
- [17] 谢路远, 盛小伍, 周晓, 等. 化学修饰mRNA在细胞重编程、组织工程和肿瘤基因治疗中的研究进展[J]. *肿瘤药学*(XIE L Y, SHENG X W, ZHOU X, et al. Research progress of chemically modified mRNA in cell reprogramming, tissue engineering and tumor gene therapy [J]. *Anti-Tumor Pharmacy*), 2020, 10(2): 132-8.
- [18] BADIEYAN Z S, EVANS T. Concise review: application of chemically modified mRNA in cell fate conversion and tissue engineering [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(8): 833-43.
- [19] THOMAS D, CUNNINGHAM N J, SHENOY S, et al. Human-induced pluripotent stem cells in cardiovascular research: current approaches in cardiac differentiation, maturation strategies, and scalable production [J]. *Cardiovasc Res*, 2022, 118(1): 20-36.
- [20] YE L, NI X, ZHAO Z A, et al. The application of induced pluripotent stem cells in cardiac disease modeling and drug testing [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2018, 11(5): 366-74.
- [21] ZHANG L, PU K, LIU X, et al. The application of induced pluripotent stem cells against liver diseases: an update and a review [J]. *Front Med*, 2021, 8: 644594.
- [22] 蔡璐. 全球首例iPS细胞角膜移植手术[J]. *科学世界*(CAI L. The world's first iPS cell corneal transplant [J]. *Science World*), 2019, 10: 6.
- [23] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-21.
- [24] GASIUNAS G, BARRANGOU R, HORVATH P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(39): E2579-86.
- [25] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-23.
- [26] HWANG W Y, FU Y, REYON D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227-9.
- [27] CHO S W, KIM S, KIM J M, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 230-2.
- [28] KLEINSTIVER B P, PREW M S, TSAI S Q, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities [J]. *Nature*, 2015, 523(7561): 481-5.
- [29] CEBRIAN-SERRANO A, DAVIES B. CRISPR-Cas orthologues and variants: optimizing the repertoire, specificity and delivery of genome engineering tools [J]. *Mamm Genome*, 2017, 28(7/8): 247-61.
- [30] HIRANO S, NISHIMASU H, ISHITANI R, et al. Structural basis for the altered PAM specificities of engineered CRISPR-Cas9 [J]. *Mol Cell*, 2016, 61(6): 886-94.
- [31] KOMOR A C, KIM Y B, PACKER M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage [J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-4.
- [32] SHALEM O, SANJANA N E, ZHANG F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9 [J]. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(5): 299-311.
- [33] DOMINGUEZ A A, LIM W A, QI L S. Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(1): 5-15.
- [34] THAKORE P I, BLACK J B, HILTON I B, et al. Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation [J]. *Nat Methods*, 2016, 13(2): 127-37.
- [35] ADLI M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1911.
- [36] PICKAR-OLIVER A, GERSBACH C A. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(8): 490-507.
- [37] ROUET R, THUMA B A, ROY M D, et al. Receptor-mediated delivery of CRISPR-Cas9 endonuclease for cell-type-specific gene editing [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(21): 6596-603.
- [38] YIN J, WANG Q, HOU S, et al. Potent protein delivery into mammalian cells via a supercharged polypeptide [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(49): 17234-40.
- [39] VAN HAASTEREN J, LI J, SCHEIDELER O J, et al. The delivery challenge: fulfilling the promise of therapeutic genome editing [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 845-55.
- [40] GAUDELLI N M, KOMOR A C, REES H A, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage [J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-71.
- [41] KURT I C, ZHOU R, IYER S, et al. CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(1): 41-6.
- [42] ZHAO D, LI J, LI S, et al. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(1): 35-40.
- [43] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA [J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-57.
- [44] DOUDNA J A, CHARPENTIER E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096.
- [45] CYRANOSKI D. CRISPR gene-editing tested in a person for the

- first time [J]. *Nature*, 2016, 539(7630): 479.
- [46] NORMILE D. China sprints ahead in CRISPR therapy race [J]. *Science*, 2017, 358(6359): 20-1.
- [47] 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 [J]. *Nat Med*, 2019, 25(2): 229-33.
- [48] SHIN J W, LEE J M. The prospects of CRISPR-based genome engineering in the treatment of neurodegenerative disorders [J]. *Ther Adv Neurol Disord*, 2018, doi: 10.1177/1756285617741837.
- [49] FRANGOUL H, HO T W, CORBACIOGLU S. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and  $\beta$ -Thalassemia. Reply [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(23): e91.
- [50] GILLMORE J D, GANE E, TAUBEL J, et al. CRISPR-Cas9 *in vivo* gene editing for transthyretin amyloidosis [J]. *N Engl J Med*, 2021, 385(6): 493-502.
- [51] WEN Z, NGUYEN H N, GUO Z, et al. Synaptic dysregulation in a human iPSC cell model of mental disorders [J]. *Nature*, 2014, 515(7527): 414-8.
- [52] LI Y P, DENG W L, JIN Z B. Modeling retinitis pigmentosa through patient-derived retinal organoids [J]. *STAR Protoc*, 2021, 2(2): 100438.
- [53] MAZZARINO R C, PEREZ-CORREDOR P, VANDERLEEST T E, et al. APOE3 Christchurch modulates tau phosphorylation and  $\beta$ -catenin/Wnt/Cadherin signaling in induced pluripotent stem cell-derived cerebral organoids from Alzheimer's cases [J]. *bioRxiv*, 2023, doi: 10.1101/2023.01.11.523290.
- [54] LIU C, IMAI M, EDAHIRO Y, et al. Establishment of isogenic induced pluripotent stem cells with or without pathogenic mutation for understanding the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms [J]. *Exp Hematol*, 2023, 118: 12-20.
- [55] ZHANG S, OHKAWARA B, ITO M, et al. A mutation in DOK7 in congenital myasthenic syndrome forms aggregates in cultured cells, and reduces DOK7 expression and MuSK phosphorylation in patient-derived iPSC cells [J]. *Hum Mol Genet*, 2023, 32(9): 1511-23.
- [56] SUZUKI S, CHOSA K, BARILLÀ C, et al. Seamless gene correction in the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator locus by vector replacement and vector insertion events [J]. *Front Genome Ed*, 2022, 4: 843885.
- [57] PERVAIZ I, ZAHRA F T, MIKELIS C M, et al. An *in vitro* model of glucose transporter 1 deficiency syndrome at the blood-brain barrier using induced pluripotent stem cells [J]. *J Neurochem*, 2022, 162(6): 483-500.
- [58] STELLON D, TRAN M T N, TALBOT J, et al. CRISPR/Cas-mediated knock-in of genetically encoded fluorescent biosensors into the AAVS1 locus of human-induced pluripotent stem cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2549: 379-98.
- [59] USTYANTSEVA E I, MEDVEDEV S P, VETCHINOVA A S, et al. A platform for studying neurodegeneration mechanisms using genetically encoded biosensors [J]. *Biochemistry*, 2019, 84(3): 299-309.
- [60] THONGSIN N, WATTANAPANITCH M. Generation of B2M bi-allelic knockout human induced pluripotent stem cells (MUSIi001-A-1) using a CRISPR/Cas9 system [J]. *Stem Cell Res*, 2021, 56: 102551.
- [61] TANG Z H, CHEN J R, ZHENG J, et al. Genetic correction of induced pluripotent stem cells from a deaf patient with MYO7A mutation results in morphologic and functional recovery of the derived hair cell-like cells [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(5): 561-71.
- [62] ITOH M, KAWAGOE S, TAMAI K, et al. Footprint-free gene mutation correction in induced pluripotent stem cell (iPSC) derived from recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) using the CRISPR/Cas9 and piggyBac transposon system [J]. *J Dermatol Sci*, 2020, 98(3): 163-72.
- [63] CHRISTENSEN C L, ASHMEAD R E, CHOY F Y M. Cell and gene therapies for mucopolysaccharidoses: base editing and therapeutic delivery to the CNS [J]. *Diseases*, 2019, 7(3): 47.
- [64] 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 [J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(360): 360ra134.
- [65] CHANG K H, SMITH S E, SULLIVAN T, et al. Long-term engraftment and fetal globin induction upon BCL11A gene editing in bone-marrow-derived CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem and progenitor cells [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2017, 4: 137-48.
- [66] WU Y, ZENG J, ROSCOE B P, et al. Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells [J]. *Nat Med*, 2019, 25(5): 776-83.
- [67] FREDERIKSEN H R, DOEHN U, TVEDEN-NYBORG P, et al. Non-immunogenic induced pluripotent stem cells, a promising way forward for allogeneic transplantations for neurological disorders [J]. *Front Genome Ed*, 2020, 2: 623717.
- [68] MARTON R M, IOANNIDIS J P A. A Comprehensive analysis of protocols for deriving dopaminergic neurons from human pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(4): 366-74.
- [69] YASUDA S, KUSAKAWA S, KURODA T, et al. Tumorigenicity-associated characteristics of human iPSC cell lines [J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0205022.
- [70] LIN S L, CHEN J S, YING S Y. MiR-302-mediated somatic cell reprogramming and method for generating tumor-free iPSC cells using miR-302 [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2115: 199-219.
- [71] MIYAZAKI T, HANAMATSU H, ONODERA T, et al. Establishment of the removal method of undifferentiated induced pluripotent stem cells coexisting with chondrocytes using R-17F antibody [J]. *Regen Med*, 2022, 17(11): 793-803.
- [72] IMAI R, TAMURA R, YO M, et al. Neuroprotective effects of genome-edited human iPSC cell-derived neural stem/progenitor cells on traumatic brain injury [J]. *Stem Cells*, 2023, 41(6): 603-16.
- [73] LANG C, CAMPBELL K R, RYAN B J, et al. Single-cell sequencing of iPSC-dopamine neurons reconstructs disease progression and identifies HDAC4 as a regulator of parkinson cell phenotypes [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(1): 93-106.e6.
- [74] MARTON R M, PAŞCA S P. Organoid and assembloid technologies for investigating cellular crosstalk in human brain development and disease [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(2): 133-43.
- [75] HIRANNIRAMOL K, CHEN Y, LIU W, et al. Generalizable sgRNA design for improved CRISPR/Cas9 editing efficiency [J]. *Bioinformatics*, 2020, 36(9): 2684-9.
- [76] SCHUMANN K, LIN S, BOYER E, et al. Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(33): 10437-42.

- [77] CHOI G C G, ZHOU P, YUEN C T L, et al. Combinatorial mutagenesis en masse optimizes the genome editing activities of SpCas9 [J]. *Nat Methods*, 2019, 16(8): 722-30.
- [78] CHEN J S, DAGDAS Y S, KLEINSTIVER B P, et al. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy [J]. *Nature*, 2017, 550(7676): 407-10.
- [79] LIU M S, GONG S, YU H H, et al. Engineered CRISPR/Cas9 enzymes improve discrimination by slowing DNA cleavage to allow release of off-target DNA [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3576.
- [80] KLEINSTIVER B P, PATTANAYAK V, PREW M S, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects [J]. *Nature*, 2016, 529(7587): 490-5.
- [81] BRAVO J P K, LIU M S, HIBSHMAN G N, et al. Structural basis for mismatch surveillance by CRISPR-Cas9 [J]. *Nature*, 2022, 603(7900): 343-7.