

# 基因组编辑技术在干细胞疾病模型建立和精准医疗中的应用

韦余达, 李爽, 刘改改, 张永贤, 丁秋蓉

中国科学院上海生命科学研究院营养科学研究所, 上海 200031

**摘要:** 精准医疗强调针对不同个体定制个性化治疗方案, 其推行需要精准疾病模型的建立。人类干细胞因其具有多能性而成为体外不同类型的成体细胞和器官小体的潜在来源, 其强增殖能力保证了充足原材料用于科研分析和大规模药物筛选。基因组编辑技术(尤其是 CRISPR/Cas9 技术)的快速发展使得在人多能干细胞和成体干细胞中进行高效基因组编辑成为可能。两者的有效结合能建立起针对不同遗传致病背景的“个性化”疾病模型, 有利于深入解析不同遗传突变的致病机制和开发高针对性的精准医疗方案。本文对基因组编辑技术在人类干细胞中的应用以及利用干细胞疾病模型模拟罕见病和肿瘤发生的研究进行了综述。

**关键词:** CRISPR/Cas9 技术; 人多能干细胞; 人成体干细胞; 罕见病模型; 肿瘤模型

## Use of genome editing tools in human stem cell-based disease modeling and precision medicine

Yuda Wei, Shuang Li, Gaigai Liu, Yongxian Zhang, Qiurong Ding

*Institute for Nutritional Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Shanghai 200031, China*

**Abstract:** Precision medicine emerges as a new approach that takes into account individual variability. The successful conduct of precision medicine requires the use of precise disease models. Human pluripotent stem cells (hPSCs), as well as adult stem cells, can be differentiated into a variety of human somatic cell types that can be used for research and drug screening. The development of genome editing technology over the past few years, especially the CRISPR/Cas system, has made it feasible to precisely and efficiently edit the genetic background. Therefore, disease modeling by using a combination of human stem cells and genome editing technology has offered a new platform to generate “personalized” disease models, which allow the study of the contribution of individual genetic variabilities to disease progression and the development of precise treatments. In this review, recent advances in the use of genome editing in human stem cells and the generation of stem cell models for rare diseases and cancers are discussed.

**Keywords:** CRISPR/Cas9; human pluripotent stem cells; adult stem cells; rare disease modeling; cancer modeling

收稿日期: 2015-05-29; 修回日期: 2015-07-01

基金项目: 上海市浦江人才计划(编号: 15PJ1409200)资助

作者简介: 韦余达, 硕士研究生, 专业方向: 干细胞肿瘤疾病模型。E-mail: ydwei@sibs.ac.cn

通讯作者: 丁秋蓉, 博士, 研究员, 研究方向: 干细胞与转化医学。E-mail: qrding@sibs.ac.cn

DOI: 10.16288/j.yczs.15-239

网络出版时间: 2015-7-2 15:28:35

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150702.1528.001.html>

2015 年初随着美国总统奥巴马宣布开展实施精准医疗计划(Precision medicine initiative), 精准医疗立刻引起国内外各界的高度关注, 其基本概念是根据个体不同遗传背景和健康状态制定个体化的疾病预防和治疗方案<sup>[1]</sup>。精准医疗的实现需要大规模基因组测序支持, 同时也需要有效的实验和药物筛选平台的建立, 后者将有助于对遗传测序数据的深入解析, 和针对不同致病遗传背景的个性化治疗方案研发。

基因组编辑技术(Genome editing technology)结合人多能干细胞(Human pluripotent stem cells, hPSCs)以及成体干细胞生物学, 提供了一个独特的实验平台体系, 可用于建立“个性化”疾病模型供遗传突变分析和大规模药物筛选。目前, 常用的基因组编辑技术主要包括锌指核酸酶(Zinc finger nucleases, ZFNs)<sup>[2]</sup>、类转录激活因子效应物核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALENs)<sup>[3~7]</sup>和成簇规律间隔短回文重复序列系统(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins, CRISPR/Cas)<sup>[8~11]</sup>(图 1)。相比 ZFN 和 TALEN, CRISPR 技术由于载体构建简单、靶向位点选择灵活、靶向效率更高, 被广泛用于各类细胞和模式动物的基因组编辑<sup>[12]</sup>。在模拟人类疾病方面, 人多能干细胞和成体干细胞由于自身干细胞特性具有一些明显优势: (1)拥有人类

基因组, 结合基因组编辑技术, 可用于精确模拟人类疾病遗传背景; (2)具有多能性, 在外界合适的诱导条件下, 可以定向分化为各种体细胞类型和类器官小体(Organoids), 并且一定程度上体外分化过程能反应体内正常发育过程, 可用于观察疾病发生的中间状态; (3)具有无限增殖和自我更新能力, 同时区别于各种转化细胞系, 具有正常核型, 提供了大量更符合生理状态的细胞用于研究和药物筛选。“个性化”疾病模型的建立有助于深入解析不同遗传突变的致病机制和开发高针对性的精准医疗方案。本文对基因组编辑技术在人类干细胞中的应用以及利用干细胞疾病模型模拟罕见病和肿瘤发生的研究展开综述。

## 1 干细胞基因组编辑

各种基因组编辑技术在人多能干细胞和成体干细胞中的应用目前已经比较成熟。基因组编辑技术可以在基因组特定位点进行精确的靶向性剪切, 形成 DNA 双链缺口(DNA double-stranded breaks, DSBs), 细胞通过非同源性末端连接(Non-homologous end joining, NHEJ)或者同源重组(Homology-directed repair, HDR)对断裂 DNA 进行修复。利用这一生物过程, 研究人员可以: (1)通过在基因编码区引入移码突变进行靶向敲除基因; (2)通过外源模板(单链或

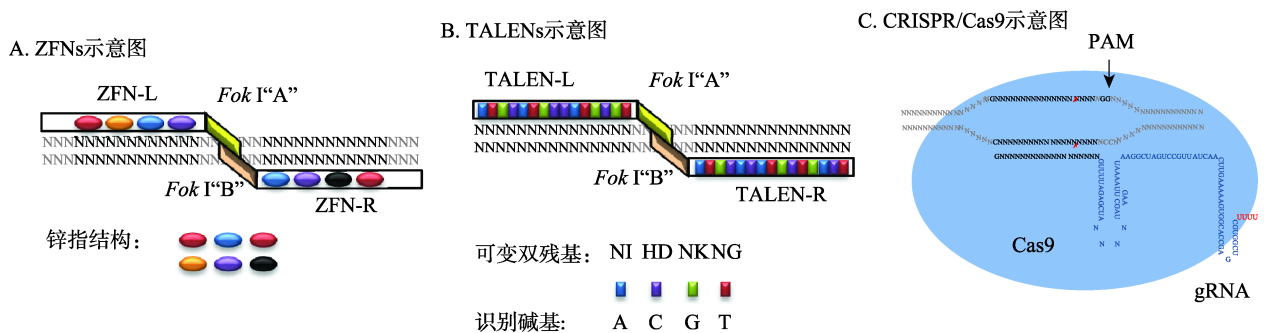


图 1 常用基因组编辑工具

A: 锌指核酸酶(ZFN)示意图。ZFN 由锌指结构(Zinc finger domains)组成, 不同的锌指结构识别特异核苷酸模块; 两个独立的 DNA 结合域(ZFN-L 和 ZFN-R)分别识别特定 DNA 序列片段, FokI “A”和 FokI “B”代表 FokI 核酸内切酶的两个结构域, 在间隔合适情况下结构域二聚化产生核酸内切酶活性, 对 DNA 双链进行切割。B: 类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)示意图。TALEN 的 DNA 结合域由 15~18 个重复单元组成, 每个重复单元特异识别单个核苷酸, 重复单元序列中特定位置的两个氨基酸(Repeat-variable di-residue, RVD)决定识别碱基的特异性; 两个独立的 DNA 结合域(TALEN-L 和 TALEN-R)分别识别特定 DNA 序列片段, FokI 酶二聚化后产生核酸内切酶活性, 对 DNA 双链进行切割。C: 成簇规律间隔短回文重复序列系统(CRISPR/Cas)示意图。CRISPR/Cas 由 Cas9 核酸酶和 gRNA 组成, Cas9 识别基因组序列中的 PAM(Protospacer adjacent motif, PAM), gRNA 中长为 20 bp 的引导序列决定靶向特异性; 当基因组上位于 PAM5'端的 protospacer 序列与 gRNA 中的引导序列互补时, Cas9 对 DNA 双链进行切割。

者双链 DNA)定点敲入点突变、小肽段序列(如 FLAG 小肽)、以及基因编码框(如荧光报告基因);(3)通过同时靶向多个位点引入染色体结构变异,包括染色体区域缺失(Deletion)、插入(Insertion)、重复(Duplication)、易位(Translocation)和倒位(Inversion)(图 2)<sup>[13-25]</sup>。

相比 ZFN 和 TALEN,CRISPR 技术的靶向效率更高。Ding 等<sup>[14]</sup>同时利用 TALEN 和 CRISPR 两种基因编辑平台,在相同的干细胞株中对相同/相近基

因组位点进行靶向,并对不同平台的靶向活性进行了横向比较。CRISPR 显示出比 TALEN 更高更稳定的活性,实验中所有 CRISPRs 的靶向效率均大于 50%。相比通过 NHEJ 过程引入移码突变进行基因敲除的效率,通过 HDR 重组敲入特定点突变或者特定序列的效率低很多。考虑到细胞在 DNA 修复过程中 NHEJ 和 HDR 是两个相互拮抗的过程,多个研究组通过体外筛选找到小分子化合物对 NHEJ 过程

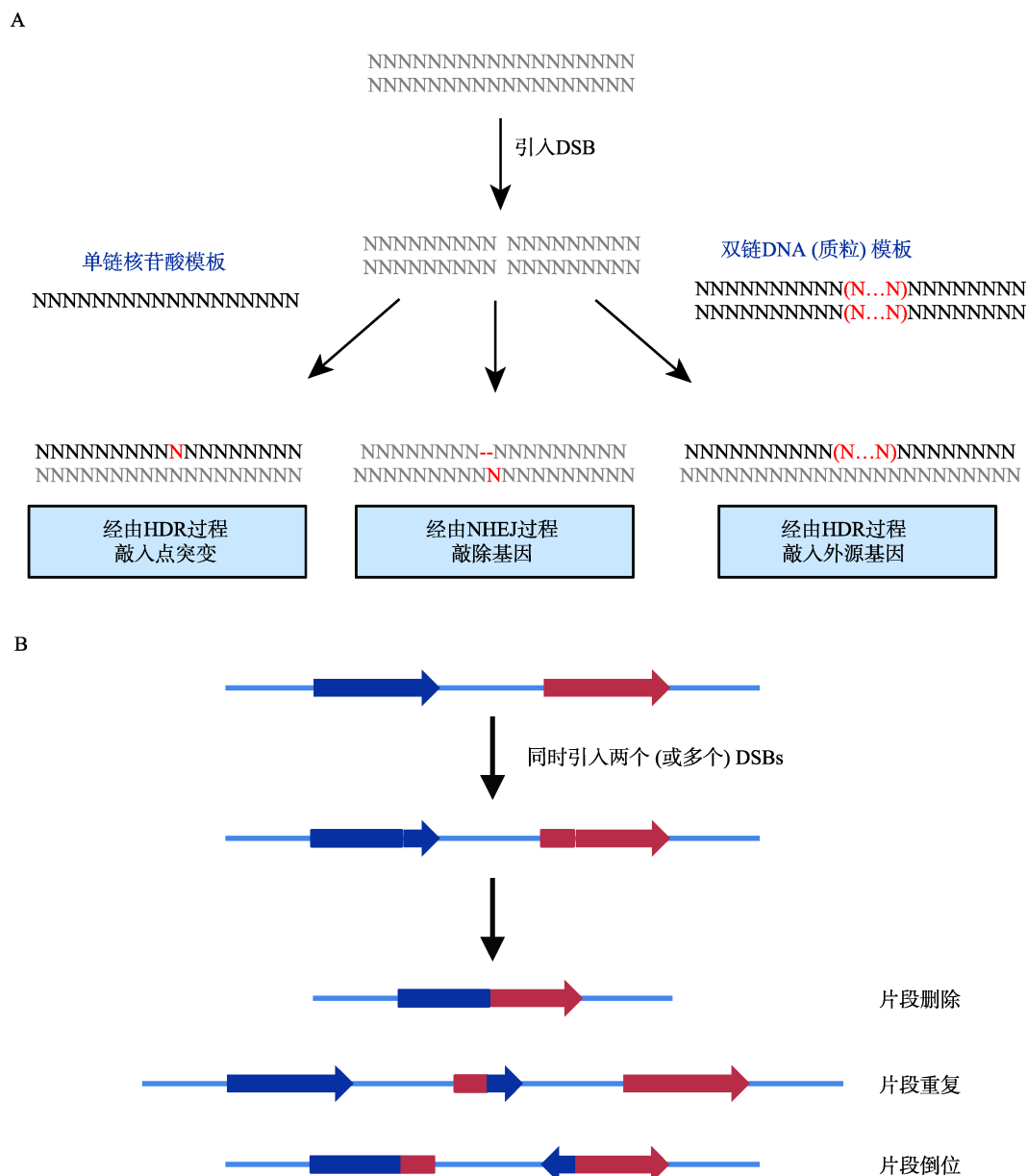


图 2 干细胞基因组编辑

A: 基因敲除和基因敲入。利用基因编辑工具在基因组特定位置精确引入 DSB 诱发细胞进行 DNA 修复。细胞通过 NHEJ 过程引入移码突变敲除基因(中);在提供外源模板(单链或者双链 DNA)的情况下通过 HDR 过程定点敲入点突变(左)或者大片段外源基因(右)。B: 染色体结构变异。通过在细胞中同时引入两个或多个 DSBs 诱导细胞发生染色体结构变异。

进行抑制,从而达到了增强 HDR 过程而提高定点敲入效率的目的<sup>[26~28]</sup>。

脱靶率是基因靶向过程中受到广泛关注的另外一个问题。值得注意的是,脱靶率的高低不仅取决于不同的基因编辑平台,也同样受靶向序列、细胞类型、基因编辑工具在细胞内的表达时间和强度,以及脱靶率的检测方法等影响。目前对于各种基因组编辑平台脱靶率的比较还没有确切的结论,而在各种转化细胞系中对脱靶率的研究结果不能直接反应正常细胞系(如 hPSCs)中的脱靶情况。对 CRISPR 和TALEN 靶向后得到的若干单克隆干细胞株进行的全基因组测序分析提示两者在 hPSCs 中的脱靶率均很低<sup>[29~31]</sup>。由于受测序单克隆的数量限制,该结果不能全面反映脱靶情况,但提示脱靶现象是可以通过提高靶向序列的保守性、控制基因编辑蛋白表达强度和时间来避免。有意思的是,虽然没有脱靶造成的非特异性突变,但相比干细胞母株,编辑后的单克隆(包括野生型和基因突变型)仍然被发现存在若干新的点突变。这些点突变附近序列和靶向序列没有相似性,因此推测是在细胞培养和传代中随机发生,其中少数点突变被发现位于基因编码区从而造成氨基酸突变<sup>[13,29~31]</sup>。这种随机点突变的发生提示真正意义上的“isogenic”对照组是不存在的。为降低这种随机突变对后期疾病表型检测的影响,利用干细胞进行体外疾病模拟时,需要多个野生型和突变型克隆同时比对,并利用多种对照组设计(如在基因敲除克隆中通过引入外源质粒恢复基因表达等)综合分析致病遗传因素对疾病的影响。

## 2 干细胞“个性化”疾病模型的建立

干细胞疾病模型的“个性化”主要表现在致病遗传背景的“个性化”。同样的疾病表型可以是多种不同的遗传致病突变产生,而不同的致病突变由于其发病机理不尽相同而需要相应的预防和治疗方案,即所谓的“个性化”治疗。干细胞疾病模型的建立可以通过两种途径:一种途径是获得患者的诱导性多能干细胞(Induced pluripotent stem cells, iPSCs)或者成体干细胞,体外直接分化培养后进行疾病模拟。这种疾病模型的建立往往需要通过基因组编辑技术修复原细胞株中的致病突变获得更为严格的野生型对照组细胞。另一种途径是在野生型干细胞株中引

入已知的致病突变进行疾病模拟。后者可以跳过前者操作过程中可能需要的极其漫长的患者筛选(尤其是罕见病患者)、体细胞重编程和 iPSCs 质量检测等过程,而可以直接通过基因组编辑技术快速引入致病突变,并且可以在同一株细胞中(即在同一个遗传背景下)并行引入不同的致病突变,对不同致病突变导致的疾病表型进行横向比较。

### 2.1 罕见病疾病模型建立

罕见病是指那些发病率极低、多数由于特定基因缺陷导致的疾病,对它的研究属于典型的精准医学研究范畴。针对罕见病的研究,将有助于提高人们对基础疾病致病机理的认识,发现新的治疗方案。

目前,干细胞罕见病模型主要是模拟单基因突变疾病。建立成功的罕见病模型需要通过基因组编辑技术获得严格的对照组,即对照组和实验组细胞株遗传背景之间的差异只存在于致病基因的突变;随后实验组和对照组细胞同时体外分化为疾病相关体细胞类型,用于致病机理研究和药物筛选(图 3)。典型的例子包括: *AKT2* 基因突变引起的肥胖低血糖代谢病症模拟<sup>[13]</sup>; *PLIN1* 基因突变引起的脂肪发育不良病症模拟<sup>[13]</sup>; *LMNA* 基因突变引起的早衰症(Huntchinson-Gilford Progeria syndrome, HGPS)和维尔纳综合征(Atypical Werner syndrome, AWS)模拟<sup>[18]</sup>; *AIAT* 基因突变引起的 alpha1-抗胰蛋白酶缺乏症模拟<sup>[19]</sup>; *LRRK2* 基因 G2019S 突变引起的帕金森病模拟<sup>[22]</sup>; *SOD1* 基因突变引起的运动神经元退化疾病模拟<sup>[32]</sup>等。Musunuru<sup>[33]</sup>在另一篇综述中对上述疾病模型进行了详细讨论。

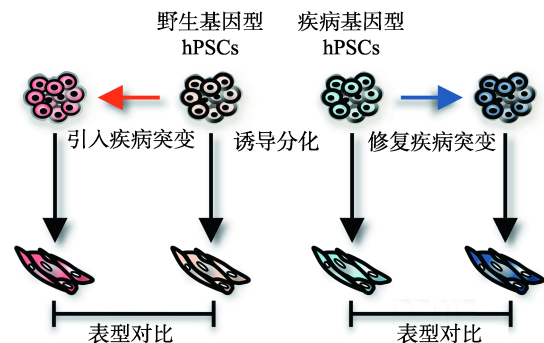


图 3 干细胞罕见病模型

通过基因组编辑技术在野生基因型多能干细胞中引入致病突变(左),或者在病人疾病基因型诱导多能干细胞中修复致病突变(右)建立严格对照组和基因突变组;同时分化为疾病相关体细胞类型后进行疾病机理研究和针对性药物筛选。

## 2.2 肿瘤疾病模型建立

肿瘤诱因往往是多种基因突变的同时发生,而不同类型肿瘤,甚至不同个体的同类型肿瘤,都具有自身的基因印记、肿瘤标记物和基因突变类型。针对特定的基因突变类型设计相应的治疗方案在一些肿瘤治疗中已经取得显著成效,如针对 *HER2* 突变的乳腺癌治疗、针对 *EGFR* 突变的肺癌治疗等。现有的大规模癌症基因组学数据为人们更全面分析肿瘤发生的遗传因素提供了海量信息,而如何综合解析这些信息,从中筛选出肿瘤发生的主要驱动分子作为药物靶点成为肿瘤精准治疗的关键。因此,建立和人体肿瘤发生高相似度、高特异性的体外肿瘤模型至关重要,一方面可以提供更直接准确的平台用于肿瘤发生机理研究和早期肿瘤诊断标识物筛选;另一方面也可以提供更有效的体外细胞平台用

于抗癌药物筛选。

在最近的多项研究中,干细胞疾病模型被用于模拟肿瘤发生(图 4)。一种方案是利用病人来源的 iPSCs 对遗传突变相对清晰的肿瘤或者肿瘤前期病症进行模拟。一项研究来自 Kotini 等<sup>[34]</sup>对骨髓增生异常综合征(Myelodysplastic syndrome, MDS)的疾病模拟和解析<sup>[34]</sup>。MDS 主要致病因素是发生在第 7 号染色体上 20 Mb 的染色体大片段缺失。他们从 MDS 病人中获得突变的造血细胞,经重编程得到携带片段缺失的 MDS iPSCs;并且同时利用病人体内依然存在的正常造血细胞获得野生型 iPSCs 对照组。相对正常 iPSCs,突变型细胞在体外分化后表现出造血干细胞的分化功能异常。他们进一步在野生型细胞株中引入相同的 20 Mb 染色体片段缺失,并观察到类似的疾病表型;随后对缺失的 20 Mb 染色体片段

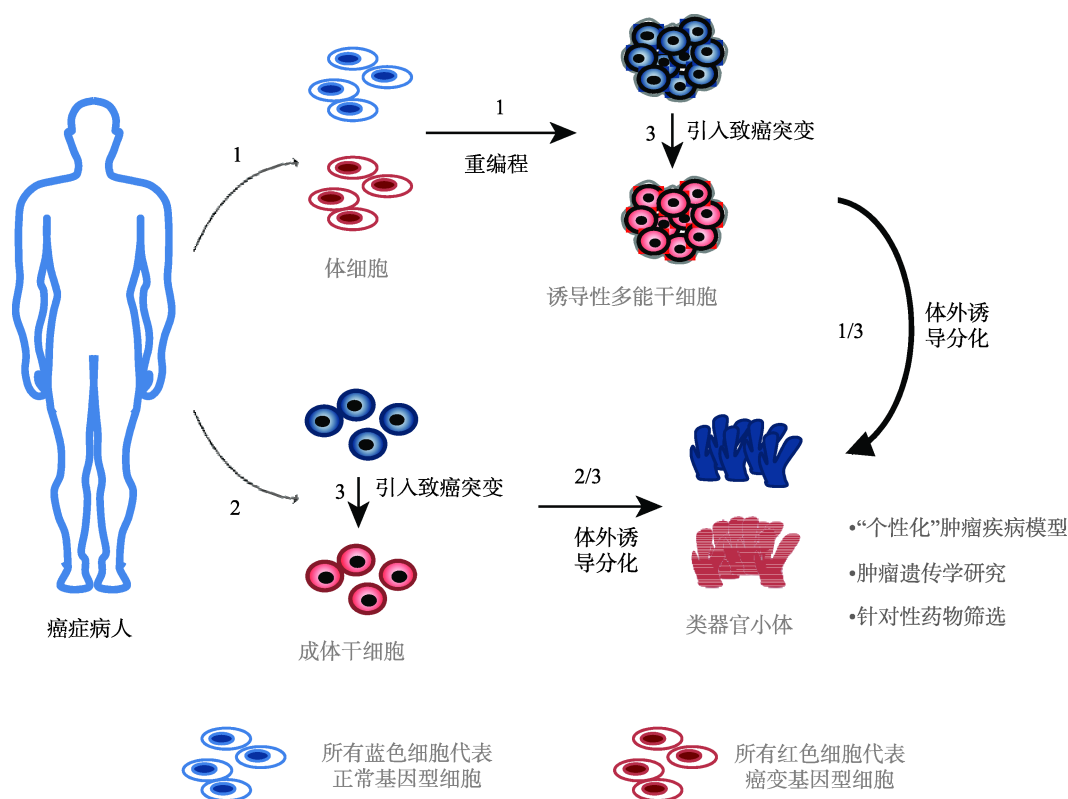


图 4 干细胞肿瘤模型

途径 1: 由病人肿瘤组织中分离出癌变基因型体细胞, 同时以正常基因型体细胞作为对照组, 重编程后分别得到正常和癌变基因型 iPSCs, 体外进一步分化后得到特定体细胞类型或者类器官小体; 途径 2: 由病人肿瘤组织中分离出癌变基因型成体干细胞, 同时以正常成体干细胞作为对照组, 体外直接培养和诱导分化, 得到特定体细胞类型或者类器官小体; 途径 3: 在正常 iPSCs 或者成体干细胞中引入致癌基因突变, 获得癌变基因型 iPSCs 或成体干细胞, 体外分化得到特定体细胞类型或者类器官小体。得到的癌变体细胞或者类器官小体可以用于癌前病变观察, 肿瘤遗传学和致癌机理研究, 并可作为“个性化”肿瘤模型进行针对性药物筛选。



中包含的多个基因进行了表型回复筛选,找出了其中多个关键致病基因。这个研究充分展示了基于人多能干细胞的疾病模型在模拟疾病和探究疾病发病机制中的应用价值。另一项工作来自 Lee 等<sup>[35]</sup>对 *p53* 基因突变导致的李-佛美尼综合症(Li-Fraumeni syndrome, LFS)研究。他们将病人来源的 iPSCs 以及相对应的野生型对照组 iPSCs 体外分化得到间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)和成骨细胞(Osteoblasts, OBs)。对细胞进行表达谱和功能分析后,他们发现 LFS 是由 *p53* 基因过度活化导致,并且 *p53* 的过度活化引起突变成骨细胞中 *H19* 印迹基因表达显著下降,抑制干细胞向成骨细胞的分化。研究成果揭示了 LFS 的致病分子机制,并提示 *H19* 和 *p53* 可以作为潜在药物靶点。同时因为 LFS 是骨肉瘤(Osteosarcoma, OS)发生的前期病症, LFS iPSCs 疾病模型可用于观察在相对遗传背景更复杂的骨肉瘤发生早期时的细胞内变化,为寻找骨肉瘤的早期诊断标志物和发生机制提供了一个独特的细胞模型。

对遗传突变背景复杂的肿瘤的体外模拟相对更具挑战,尤其目前对大多数肿瘤的遗传诱发因素研究仍处于探索阶段。作为验证性实验,两个研究组同时选择了对诱发基因突变相对清晰的结直肠癌(Colorectal cancer, CRC)进行模拟<sup>[36,37]</sup>。他们在体外培养的人类正常肠道成体干细胞中通过 CRISPR/Cas 技术陆续引入 4 个结肠癌基因突变(*APC*、*P53*、*KRAS* 和 *SMAD4*)后建立了结直肠癌类器官模型。研究发现获得四重突变的细胞能耐受抑癌药物 Nutlin-3,发生染色体数量异常,体外能不依赖于任何干细胞巢蛋白因子(Niche factor)生长,并且在植入小鼠体内后形成浸润性肿瘤,某种程度上反映了人类结直肠癌的体内发展。在另一个验证性实验中, Kim 等<sup>[38]</sup>对从病人癌组织中获得的原代胰腺导管癌细胞(Pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)进行重编程获得 PDAC iPSCs,同时利用癌旁组织细胞获得野生型 iPSC 对照组。随后他们将癌变和癌旁 iPSCs 注射入小鼠中形成畸胎瘤,在 PDAC iPSCs 形成的畸胎瘤中成功观察到胰腺上皮内瘤变(Pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN)等 PDAC 的癌前病变现象。另外,癌变的成体干细胞也可被直接用于肿瘤模型的建立。在最近的一项研究中, van de Wetering 等<sup>[39]</sup>通过直接培养肿瘤病人的癌变肠道成体干细胞,体

外诱导分化后获得具有病人特定癌变遗传背景的结直肠癌类器官模型。初步的分析显示病人来源的类器官肿瘤模型能真实反应患者体内肿瘤的多个重要特征,而这些具有病人“个性化”遗传背景的类器官模型可以被直接用于基因突变研究和针对性的药物筛选。随着体外类器官培养技术的进步,这样的肿瘤模型将会广泛的应用到对更多肿瘤类型的研究中。

### 2.3 目前存在的问题

干细胞疾病模拟体系目前存在的问题主要体现在各种现有的体细胞分化平台不够成熟和稳定<sup>[40~42]</sup>。体外分化得到的体细胞一方面大都处于发育过程中的前体细胞阶段,不能完全反应体内细胞的生理状态;另一方面不是均一的细胞群体。在严格细胞对照组之间,甚至同一株干细胞株在不同批次、不同操作者处理之间,分化得到的细胞群体都存在较大差异,因此给疾病表型的观察和实验重复带来困难。因而实验设计时需要考虑多种对照组设计,并且尽可能通过细胞分子标识物分选等方式筛选出相对单一类型的细胞群体进行研究,控制体外分化带来的系统误差对实验结果的影响。

干细胞疾病模拟系统存在的另一个局限性在于目前的体细胞分化只能覆盖一小部分细胞类型,体外培养方式也大都都是单个细胞类型的 2D 培养。考虑到疾病的发生涉及多个细胞类型、多个组织器官的交互影响,现有的干细胞疾病模拟平台需要向 3D 培养、多细胞、多组织器官等更符合生理状态的方向发展。

值得庆幸的是,目前多能干细胞或者成体干细胞在体外进行类器官小体培养的体系发展迅速。在体外 3D 培养条件下,通过合适生长因子诱导后,细胞可以通过自组织(self-organization)的方式形成多种器官小体,如肠小体<sup>[43]</sup>,视杯结构<sup>[44]</sup>,肝脏小体<sup>[45]</sup>,脑小体<sup>[46]</sup>,肾脏小体<sup>[47,48]</sup>和胃小体<sup>[49]</sup>等。这样的器官小体培养体系会日益成熟,而更多的成体细胞分化平台也会被研发建立,相信未来干细胞疾病模拟系统将能从器官水平更真实的模拟人体疾病发生。

## 3 展 望

精确疾病模型的建立在疾病机理探究和新的治疗方案开发过程中至关重要。基因组编辑技术和多

能干细胞结合建立的干细胞疾病模型, 为疾病研究提供了一个全新的研究平台, 能在人的特定遗传背景下(相对小鼠等其他模式生物), 在更切合生理状态的正常细胞体系中(相对其他各种转化细胞系), 更加精确的再现人类疾病的发生过程。随着各种干细胞体外分化平台的建立和成熟, 体外培养体系的优化, 基因组编辑技术的进一步发展, 针对不同遗传致病背景的干细胞“个性化”疾病模型将为精准医疗提供独特的研发平台, 助力于新的更具针对性的药物开发。

## 参考文献

- [1] Collins FS, Varmus H. A new initiative on precision medicine. *N Engl J Med*, 2015, 372: 793–795. [DOI]
- [2] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 636–646. [DOI]
- [3] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1501. [DOI]
- [4] Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1509–1512. [DOI]
- [5] Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 2010, 186(2): 757–761. [DOI]
- [6] Miller JC, Tan SY, Qiao GJ, Barlow KA, Wang JB, Xia DF, Meng XD, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar EJ. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2010, 29(2): 143–148. [DOI]
- [7] Zhang F, Cong L, Lodato S, Kosuri SK, Church GM, Arlotta P. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat Biotechnol*, 2010, 29(2): 149–153. [DOI]
- [8] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823. [DOI]
- [9] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826. [DOI]
- [10] Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma EB, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife*, 2013, 2, e00471. [DOI]
- [11] Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 230–232. [DOI]
- [12] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157(6): 1262–1278. [DOI]
- [13] Ding QR, Lee YK, Schaefer EAK, Peters DT, Veres A, Kim K, Kuperwasser N, Motola DL, Meissner TB, Hendriks WT, Trevisan M, Gupta RM, Moisan A, Banks E, Friesen M, Schinzel RT, Xia F, Tang A, Xia YL, Figueroa E, Wann A, Ahfeldt T, Daheron L, Zhang F, Rubin LL, Peng LF, Chung RT, Musunuru K, Cowan CA. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(2): 238–251. [DOI]
- [14] Ding QR, Regan SN, Xia YL, Oostrom LA, Cowan CA, Musunuru K. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(4): 393–394. [DOI]
- [15] Zou JH, Maeder ML, Mali P, Pruett-Miller SM, Thibodeau-Beganny S, Chou BK, Chen GB, Ye ZH, Park IH, Daley GQ, Porteus MH, Joung JK, Cheng LZ. Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(1): 97–110. [DOI]
- [16] Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, Gao Q, Mitalipova M, DeKaveler RC, Katibah GE, Amora R, Boydston EA, Zeitler B, Meng XD, Miller JC, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jaenisch R. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(9): 851–857. [DOI]
- [17] Hockemeyer D, Wang HY, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Casady JP, Cost GJ, Zhang L, Santiago Y, Miller JC, Zeitler B, Cherone JM, Meng XD, Hinkley SJ, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jaenisch R. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 731–734. [DOI]
- [18] Liu GH, Suzuki K, Qu J, Sancho-Martinez I, Yi F, Li M, Kumar S, Nivet E, Kim J, Soligalla RD, Dubova I, Goebel A, Plongthongkum N, Fung HL, Zhang K, Loring JF, Laurent LC, Izpisua Belmonte JC. Targeted gene correction of laminopathy-associated *LMNA* mutations in patient-specific iPSCs. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(6): 688–694. [DOI]

- [19] Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, Varela I, Liu PQ, Paschon DE, Miranda E, Ordóñez A, Hannan NRF, Rouhani FJ, Darche S, Alexander G, Marciniak SJ, Fusaki N, Hasegawa M, Holmes MC, Di Santo JP, Lomas DA, Bradley A, Vallier L. Targeted gene correction of  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2011, 478(7369): 391–394. [DOI]
- [20] An MC, Zhang NZ, Scott G, Montoro D, Wittkop T, Mooney S, Melov S, Ellerby LM. Genetic correction of Huntington's disease phenotypes in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2012, 11(2): 253–263. [DOI]
- [21] Liu GH, Qu J, Suzuki K, Nivet E, Li M, Montserrat N, Yi F, Xu XL, Ruiz S, Zhang WQ, Wagner U, Kim A, Ren B, Li Y, Goebel A, Kim J, Soligalla RD, Dubova I, Thompson J, Yates J III, Esteban CR, Sancho-Martinez I, Izpisua Belmonte JC. Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2. *Nature*, 2012, 491(7425): 603–607. [DOI]
- [22] Reinhardt P, Schmid B, Burbulla LF, Schöndorf DC, Wagner L, Glatza M, Höing S, Hargus G, Heck SA, Dhingra A, Wu GM, Müller S, Brockmann K, Kluba T, Maisel M, Krüger R, Berg D, Tsytisura Y, Thiel CS, Psathaki OE, Klingauf J, Kuhlmann T, Klewin M, Müller H, Gasser T, Schöler HR, Sternecker J. Genetic correction of a LRRK2 mutation in human iPSCs links parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes in gene expression. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(3): 354–367. [DOI]
- [23] Hou GZ, Zhang Y, Propson NE, Howden SE, Chu LF, Sontheimer EJ, Thomson JA. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(39): 15644–15649. [DOI]
- [24] Lee HJ, Kim E, Kim JS. Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases. *Genome Res*, 2010, 20(1): 81–89. [DOI]
- [25] Lee HJ, Kweon J, Kim E, Kim S, Kim JS. Targeted chromosomal duplications and inversions in the human genome using zinc finger nucleases. *Genome Res*, 2012, 22(3): 539–548. [DOI]
- [26] Yu C, Liu YX, Ma TH, Liu K, Xu SH, Zhang Y, Liu HL, La Russa M, Xie M, Ding S, Qi LS. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(2): 142–147. [DOI]
- [27] Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K, Kühn R. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 543–548. [DOI]
- [28] Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, Ingram JR, Ploegh HL. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of non-homologous end joining. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 538–542. [DOI]
- [29] Veres A, Gosis BS, Ding QR, Collins R, Ragavendran A, Brand H, Erdin S, Cowan CA, Talkowski ME, Musunuru K. Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(1): 27–30. [DOI]
- [30] Smith C, Gore A, Yan W, Abalde-Atristain L, Li Z, He CX, Wang Y, Brodsky RA, Zhang K, Cheng LZ, Ye ZH. Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(1): 12–13. [DOI]
- [31] Suzuki K, Yu C, Qu J, Li M, Yao XT, Yuan TT, Goebel A, Tang SW, Ren RT, Aizawa E, Zhang F, Xu XL, Soligalla RD, Chen F, Kim J, Kim NY, Liao HK, Benner C, Esteban CR, Jin YB, Liu GH, Li YR, Izpisua Belmonte JC. Targeted gene correction minimally impacts whole-genome mutational load in human-disease-specific induced pluripotent stem cell clones. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(1): 31–36. [DOI]
- [32] Kiskinis E, Sandoe J, Williams LA, Boulting GL, Moccia R, Wainger BJ, Han S, Peng T, Thams S, Mikkilineni S, Mellin C, Merkle FT, Davis-Dusenbery BN, Ziller M, Oakley D, Ichida J, Di Costanzo S, Atwater N, Maeder ML, Goodwin MJ, Nemesh J, Handsaker RE, Paull D, Noggle S, McCarroll SA, Joung JK, Woolf CJ, Brown RH, Eggan K. Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant *SOD1*. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(6): 781–795. [DOI]
- [33] Musunuru K. Genome editing of human pluripotent stem cells to generate human cellular disease models. *Dis Model Mech*, 2013, 6(4): 896–904. [DOI]
- [34] Kotini AG, Chang CJ, Boussaad I, Delrow JJ, Dolezal EK, Nagulapally AB, Perna F, Fishbein GA, Klimek VM, Hawkins RD, Huangfu D, Murry CE, Graubert T, Nimer SD, Papapetrou EP. Functional analysis of a chromosomal deletion associated with myelodysplastic syndromes using isogenic human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(6): 646–655. [DOI]
- [35] Lee DF, Su J, Kim HS, Chang B, Papatsenko D, Zhao RY, Yuan Y, Gingold J, Xia WY, Darr H, Mirzayans R, Hung MC, Schaniel C, Lemischka IR. Modeling familial cancer with induced pluripotent stem cells. *Cell*, 2015, 161(2): 240–254. [DOI]



- [36] Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, Sato T. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat Med*, 2015, 21(3): 256–262. [DOI]
- [37] Drost J, van Jaarsveld RH, Ponsioen B, Zimmerlin C, van Boxtel R, Buijs A, Sachs N, Overmeer RM, Offerhaus GJ, Begthel H, Korving J, van de Wetering M, Schwank G, Logtenberg M, Cuppen E, Snippert HJ, Medema JP, Kops GJPL, Clevers H. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature*, 2015, 521(7550): 43–47. [DOI]
- [38] Kim J, Hoffman JP, Alpaugh RK, Rhim AD, Reichert M, Stanger BZ, Furth EE, Sepulveda AR, Yuan CX, Won KJ, Donahue G, Sands J, Gumbs AA, Zaret KS. An iPSC line from human pancreatic ductal adenocarcinoma undergoes early to invasive stages of pancreatic cancer progression. *Cell Rep*, 2013, 3(6): 2088–2099. [DOI]
- [39] van de Wetering M, Francies HE, Francis JM, Bounova G, Iorio F, Pronk A, van Houdt W, van Gorp J, Taylor-Weiner A, Kester L, McLaren-Douglas A, Blokker J, Jaksani S, Bartfeld S, Volckman R, van Sluis P, Li VSW, Seepo S, Sekhar Pdamallu C, Cibulskis K, Carter SL, McKenna A, Lawrence MS, Lichtenstein L, Stewart C, Koster J, Versteeg R, van Oudenaarden A, Saez-Rodriguez J, Vries RGJ, Getz G, Wessels L, Stratton MR, McDermott U, Meyerson M, Garnett MJ, Clevers H. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell*, 2015, 161(4): 933–945. [DOI]
- [40] Lee G, Chambers SM, Tomishima MJ, Studer L. Derivation of neural crest cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, 2012, 5(4): 688–701. [DOI]
- [41] Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li JX, Battle MA, Duris C, North PE, Dalton S, Duncan SA. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology*, 2010, 51(1): 297–305. [DOI]
- [42] Ahfeldt T, Schinzel RT, Lee YK, Hendrickson D, Kaplan A, Lum DH, Camahort R, Xia F, Shay J, Rhee EP, Clish CB, Deo RC, Shen T, Lau FH, Cowley A, Mowrer G, Al-Siddiqi H, Nahrendorf M, Musunuru K, Gerszten RE, Rinn JL, Cowan CA. Programming human pluripotent stem cells into white and brown adipocytes. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(2): 209–219. [DOI]
- [43] Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, Kuhar MF, Vallance JE, Tolle K, Hoskins EE, Kalinichenko VV, Wells SI, Zorn AM, Shroyer NF, Wells JM. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*. *Nature*, 2010, 470(7332): 105–109. [DOI]
- [44] Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, Kawada M, Sakakura E, Okuda S, Sekiguchi K, Adachi T, Sasai Y. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*, 2011, 472(7341): 51–56. [DOI]
- [45] Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, Zhang RR, Ueno Y, Zheng YW, Koike N, Aoyama S, Adachi Y, Taniguchi H. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, 2013, 499(7459): 481–484. [DOI]
- [46] Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, Homfray T, Penninger JM, Jackson AP, Knoblich JA. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 2013, 501(7467): 373–379. [DOI]
- [47] Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, Sharmin S, Ogawa M, Sasaki H, Nishinakamura R. Redefining the *in vivo* origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(1): 53–67. [DOI]
- [48] Takasato M, Er PX, Becroft M, Vanslambrouck JM, Stanley EG, Elefanty AG, Little MH. Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(1): 118–126. [DOI]
- [49] McCracken KW, Catá EM, Crawford CM, Sinagoga KL, Schumacher M, Rockich BE, Tsai YH, Mayhew CN, Spence JR, Zavros Y, Wells JM. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature*, 2014, 516(7531): 400–404. [DOI]

(责任编辑: 王晓群)