

· 综述 ·

血友病A的定点基因治疗研究进展*

吴 涌*

暨南大学附属深圳市宝安区妇幼保健院妇幼医学研究所 (广东 深圳 518101)

【摘要】约80%~85%的血友病患者为血友病A(hemophilia A, HA), 目前还没有根治疗法。临床上通过定期输注血浆来源的或者重组的凝血因子VIII浓缩蛋白行替代治疗。如果不进行定期治疗, HA患者常可因关节内反复出血而导致关节炎。重度患者甚至可因颅内自发出血而危及生命。自从F8在四十年前被成功克隆以来, HA的基因治疗研究最常使用的方案是随机导入一个功能性的F8表达框。随着近些年基因编辑技术的快速发展, 定点基因治疗正逐渐成为一个重要的研究策略。

【关键词】血友病A; 基因治疗; 基因编辑

【中图分类号】R554+.1

【文献标识码】A

【基金项目】深圳市科技创新委员会项目(编号: JCYJ20180305164623090)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2022.10.048

Progress in Targeted Gene Therapy for Hemophilia A*

WU Yong*

Medical Research Institute, Shenzhen Baoan Women's and Children's Hospital, Jinan University, Shenzhen 518101, Guangdong Province, China

Abstract: Hemophilia A (HA), without a radical cure, constitutes 80%-85% of all hemophiliac cases. Current treatments are based on intravenous infusion of plasma-derived or recombinant FVIII concentrates. HA patients suffer from recurrent bleeding into joints without conventional treatment, causing chronic synovitis. In severe patients (FVIII<1%), hemorrhage into the brain can develop, causing early mortality. Since the cloning of F8 nearly 40 years ago, introduction of a functional F8 cassette has become the main strategy for HA gene therapy studies. With the rapid development of editing, targeted gene therapy for HA offers an alternative over gene replacement strategies.

Keywords: Hemophilia A, Gene Therapy, Gene Editing

血友病A(hemophilia A, HA)是由于人凝血因子VIII基因(F8)缺陷导致的X连锁出血性遗传病, 在活产男婴中的发病率约为1/10000-1/5000。临床上根据凝血因子VIII活性, 可将其分为重度(活性<1%)、中度(1%~5%活性)和轻度(5~30%活性)患者^[1]。血友病A可因反复关节内出血而导致不同程度残疾, 重型患者甚至可能由于颅内自发出血而危及生命^[2-3]。目前尚无成熟的根治疗法, 临床上主要通过定期输注血液来源的或者重组的凝血因子VIII行替代治疗。大部分严格接受替代疗法的患者可以享受正常人的生活, 但此疗法价格昂贵, 在中国这样的发展中国家甚至有大量血友病A患者终身未接受过任何治疗。

由于HA是一种循环系统单基因遗传病, 在正常人体内, 凝血因子VIII的含量也不需要很精确的调控。针对重度HA患者, 仅需将凝血因子含量提高到可检测水平(1%)以上, 就能将其转变成中度患者, 大幅提高生活质量。由于这些特性, 导致HA成为了基因治疗研究的经典疾病模型^[4]。甚至早在世纪初的基因治疗研究热潮中, 就有研究者开展了HA的基因治疗人体试验^[5]。

F8于1984年被成功克隆, 在过去的近四十年中, HA的基因治疗研究取得了巨大进展^[6]。但是绝大部分研究采取的策略都是将治疗F8表达框导入细胞^[4]。治疗基因多随机插入到基因组当中, 也有以不整合的附加体形式游离存在于细胞中。这样的选择一定程度上取决于技术以及效率的限制, 其不足之处也是显而易见的。治疗基因的表达受到整合位点染色质环境的影响, 由于整合位点是不确定的, 所以治疗基因的表达强度并不能得到保证。更严重的情况是治疗基因有一定几率会插入原癌基因, 导致细胞出现异常增殖, 这在早期的基因治疗研究中已有前车之鉴。而对于不整合的方案, 附加体在细胞增殖中并不会像染色体那样倍增, 因此会随着时间的推移而被稀释, 从而无法获得长期治疗效果^[7]。

随着各种人工核酸酶(artificial nucleases)技术的兴起和成熟, 同源重组的效率可以获得指数级的提高^[8-10]。近年来有一些学者开始尝试基因打靶的方式来定点整合治疗基因或者直接修复缺陷的内源F8。HA的定点基因治疗有不同的技术路线, 本综述将

分别介绍目前该研究方向所取得的一些进展。

1 定点基因添加 这类策略适用于所有突变类型的HA患者, 就是将完整的治疗基因表达框通过基因打靶的方式定点整合至预先设计好的基因组位点。这类策略一方面避免了随机整合的不安全因素, 另一方面由于一般会选择转录活跃的区域, 可以确保治疗基因整合后有一定的转录活性。另外, 可以通过使用比较强的启动子, 以进一步增强治疗基因的表达^[11]。比如, 2006年刘雄昊等就报道了将CMV-BDDF8表达框定点整合至人核糖体DNA区。由于该区域是转录活跃区, 并且人正常二倍体细胞有数百个核糖体DNA拷贝, 因此这个策略可以同时获得较高的定点整合效率以及基因表达强度。定点整合后, 治疗基因可以在细胞系中长期表达^[12]。

2 利用内源性强启动子

如果以单拷贝的形式整合到细胞中, 治疗基因的表达量一般都比较有限。因此大量研究的焦点都是想方设法提高治疗基因的表达。其中一个效果显著的策略就是使用强启动子, 代表性的方法是将无启动子的治疗基因定点整合到肝细胞白蛋白(Alb)启动子的下游。因为肝脏每天合成多达12~20g的白蛋白, 占血浆总蛋白的50%, 因此Alb显然是一个很强的肝细胞特异性启动子, 同时肝细胞还具有其他细胞无法比拟的蛋白分泌能力。因此, 上述策略理论上可以获得较高的治疗基因表达及产物分泌效率。

这个策略最早是斯坦福大学的Kay课题组在血友病B的基因治疗研究中使用的^[13]。费城儿童医院的High课题组在HA模型鼠中测试了这一策略, 可以纠正HA小鼠的临床表型^[14]。

这种方法虽然整合效率不高, 但是治疗基因的蛋白表达量相当可观, 是一个很有前景的方案, 后续也有其他课题组发表了一些跟随研究^[15]。

虽然已发现的F8致病突变类型已超过3000种, 但在重度HA患者中约有一半都是由两种大片段染色体倒位突变所致, 分别是22号内含子倒位和1号内含子倒位。这两种倒位的机制比较类

【第一作者】吴 涌, 男, 助理研究员, 主要研究方向: 遗传性疾病的诊治。E-mail: yongwu.cn@gmail.com

【通讯作者】吴 涌

似, 都是由于F8内部以及外部存在同源序列, 在雄性配子生成过程中, 同源序列会诱发重组进而导致染色体倒位。两种染色体倒位的结果都是将186kb的F8分成了方向相反的两段, 完全破坏F8导致重度HA表型^[16-18]。由于这两种倒位的患者数量在HA中占比最高, 并且都是重度表型, 本课题组研究了这两种突变的特点, 分别设计了针对性的基因修复策略。

在22号内含子倒位突变中, 倒位的片段长达600kb, 将F8分成了141kb和45kb的两段。由于基因内的断裂点位于22号内含子, 因此F8的26个外显子中有22个都包含在141kb部分, 而另外长达45kb的部分仅包含627bp的编码序列。因此我们将这627bp和一个外源polyA元件通过基因打靶的方式定点整合至22号外显子下游, 从而完全修复突变的F8。我们在HA患者来源的iPSCs中验证了这个策略, 并使用TALENs来促进基因打靶效率, 可以获得50%以上的相对打靶效率。进一步将基因修复后的iPSCs定向分化为间充质干细胞和内皮细胞, 均可以检测到这些细胞获得了表达并分泌FVIII的能力^[19]。

1号内含子倒位的断裂点位于1号内含子, 因此对于2~26号外显子部分来说, 仅缺少1号外显子和启动子。而1号外显子中仅包含146bp的编码序列, 此外再整合一个启动子即可完全修复F8。本课题组建立了一株模拟1号内含子倒位突变的HA模型鼠, 然后使用腺相关病毒将肝特异性强启动子和146bp的编码序列定点插入到模型鼠肝细胞的2号外显子上游。注射治疗一个月之后, HA模型鼠的肝脏获得了表达并分泌功能性FVIII的能力, 并且HA疾病表型得到了有效纠正^[7]。

3 其它策略

首尔国立大学的Kim课题组针对两种倒位突变设计了特殊的治疗策略。由于这两类突变的直接原因都是特定染色体片段发生了倒位, 因此Kim课题组通过使用CRISPR/Cas9来定点切割染色体以诱导倒位片段再次发生倒位, 从而使F8能够正常表达。针对1号内含子倒位, 作者直接在同源序列内部切割, 以诱发同源序列再次发生重组。对于22号内含子倒位, 则在倒位片段两侧分别切割, 倒位的片段会有一定的概率以非同源末端连接的方式发生倒位。他们分别制备了两种突变HA病人来源的iPSCs, 通过上述方法诱导倒位, 再把成功发生倒位的细胞克隆分化成内皮细胞。修复后的内皮细胞能够表达F8, 将内皮细胞输注到HA模型鼠体内后, 对HA疾病表型有一定改善, 但治疗效果非常有限, 大部分小鼠仍然会在剪尾试验中死亡^[20]。这种策略目前还停留在概念阶段, 因为要分别促使140kb、600kb的片段发生倒位, 虽然在实验室中确实能成功获得这样的细胞克隆, 但是效率极其低下, 对于临床应用来说还是不现实的。

另外, 也有一些针对F8散发突变的基因治疗研究。例如F8中的B区功能并不重要, 理论上B区部分缺失不会影响FVIII功能, 因此在大多数HA基因治疗中使用的都是B区缺失的F8。在人类基因突变数据库(HGMD)中已报道的发生在B区的突变有近500种, 但是其中约90%会导致移码突变导致严重的HA表型^[16]。本课题组在临床中就发现了一例14号外显子发生了4bp缺失的HA重度患者, 我们培养了该患者的尿液上皮细胞并将其诱导成iPSCs。再使用CRISPR/Cas9技术联合单链寡核苷酸(single-stranded oligodeoxynucleotide, ssODN)在突变位点附近再切除14bp。这样F8在B区总共缺少了18bp的编码序列, 可以纠正移码突变。纠正后的iPSCs分化成内皮细胞后可以表达并分泌功能性的FVIII蛋白, 并且移植到HA模型鼠体内可以纠正HA表型^[21]。

4 展望

在HA基因治疗中, 以往的完整F8表达框替代的策略最显著的优点是适用于任何F8突变类型的患者。其不足之处一方面是随机整合导致的安全性担忧和表达强度的不确定性。附加体方案又存在长期疗效的问题。而且由于F8太大, 全长186kb, 即使使用B区缺失的BDD-F8, 编码序列也有约4.4kb, 过大的基因表达框势必会降低导入效率。

而定点基因编辑技术, 特别是直接修复突变的基因具有诸多优点。基因发生了突变, 犹如人的一个肢体受伤, 只要把损伤处修复好即可, 理论上另外安装一个完整的肢体当然可以替代功能, 但并不能说是完美的策略。

定点基因治疗可以很大程度上规避安全性和基因沉默的问题。如果突变的基因拷贝能够在原位得到修复, 则理论上可能得到跟正常人类类似的结果。另外, 如果能够充分利用患者已突变的基因拷贝, 则可能通过较小的序列改动就可以修复严重的突变。序列改动越小, 则基因编辑的效率越高, 这更增加了这一策略的可行性。

F8的突变类型已超过3000种, 但约一半的重度患者都是由两种倒位突变导致^[16]。由于80%以上的血友病患者为HA, 仅15%左右为HB, 而50%~60%的HA为重度患者, 据此推算仅仅两种突变的HA的患者数量就和HB的患者总数相当。笔者认为专门针对这两种倒位突变设计合理、高效的基因治疗策略是非常有价值的。因此本综述花费了较多篇幅进行讲述。这两种突变倒位的片段分别长达140kb和600kb, 而本课题组设计的定点修复策略仅通过定点整合几百bp的小片段就可原位修复这类大片倒位。

早几十年的HA基因治疗几乎全部使用随机整合策略。近些年才逐渐有一些定点基因治疗的研究。唯一的瓶颈就是基因定点整合的效率还有待提高。但是基因编辑技术目前正处于黄金发展期, 相信最终的突破很快就会到来。因此笔者认为, HA定点基因治疗是一个非常前景的研究方向。

参考文献

- [1] Batty P, Lillcrap D. Advances and challenges for hemophilia gene therapy [J]. Hum Mol Genet, 2019, 28(R1): R95-R101.
- [2] 杨松, 吴德红, 牛贤奎, 等. 血友病性关节炎的X线和MRI分析[J]. 罕少疾病杂志, 2008, 15(3): 41-44.
- [3] 焦根龙, 李志忠, 赵明杰, 等. 血友病性关节炎合并色素沉着绒毛结节性滑膜炎1例误诊治疗体会[J]. 罕少疾病杂志, 2009, 16(5): 53-55.
- [4] Zhou M, Hu Z, Zhang C, et al. Gene Therapy for hemophilia a: Where we stand [J]. curr gene ther, 2020, 20(2): 142-151.
- [5] Roth D A, Tawa N E Jr, O'Brien J M, et al. Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A [J]. N Engl J Med, 2001, 344(23): 1735-1742.
- [6] Vehar G A, Keyt B, Eaton D, et al. Structure of human factor VIII [J]. Nature, 1984, 312(5992): 337-342.
- [7] Luo S, Li Z, Dai X, et al. CRISPR/Cas9-Mediated in vivo genetic correction in a mouse model of hemophilia A [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 672564.
- [8] Waugh D S, Sauer R T. Single amino acid substitutions uncouple the DNA binding and strand scission activities of Fok I endonuclease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(20): 9596-9600.
- [9] Miller J C, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing [J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(2): 143-148.
- [10] Ran F A, Cong L, Yan W X, et al. In vivo genome editing using staphylococcus aureus Cas9 [J]. Nature, 2015, 520(7546): 186-191.
- [11] Liu X, Wu Y, Li Z, et al. Targeting of the human coagulation factor IX gene at rDNA locus of human embryonic stem cells [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37071.
- [12] Liu X, Liu M, Xue Z, et al. Non-viral ex vivo transduction of human hepatocyte cells to express factor VIII using a human ribosomal DNA-targeting vector [J]. J Thromb Haemost, 2007, 5(2): 347-351.
- [13] Barzel A, Paulk N K, Shi Y, et al. Promoterless gene targeting without nucleases ameliorates haemophilia B in mice [J]. Nature, 2015, 517(7534): 360-364.
- [14] Sharma R, Anguela X M, Doyon Y, et al. In vivo genome editing of the albumin locus as a platform for protein replacement therapy [J]. Blood, 2015, 126(15): 1777-1784.
- [15] Zhang J P, Cheng X X, Zhao M, et al. Curing hemophilia A by NHEJ-mediated ectopic F8 insertion in the mouse [J]. Genome Biol, 2019, 20(1): 276.
- [16] Stenson P D, Mort M, Ball E V, et al. The human gene mutation database: Towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies [J]. Hum Genet, 2017, 136: 665-677.
- [17] Bagnall R D, Waseem N, Green P M, et al. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A [J]. Blood, 2002, 99(1): 168-174.
- [18] Lakich D, Kazazian H H, Antonarakis S E, et al. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A [J]. Nature Genetics, 1993, 5(3): 236-241.
- [19] Wu Y, Hu Z, Li Z, et al. In situ genetic correction of F8 intron 22 inversion in hemophilia A patient-specific iPSCs [J]. Sci Rep, 2016, 6: 18865.
- [20] Park C Y, Kim D H, Son S S, et al. Functional correction of large factor VIII gene chromosomal inversions in hemophilia A patient-derived iPSCs using CRISPR-Cas9 [J]. Cell Stem Cell, 2015, 17(2): 213-20.
- [21] Hu Z, Zhou M, Wu Y, et al. ssODN-Mediated In-Frame deletion with CRISPR/Cas9 restores FVIII function in hemophilia A-Patient-Derived iPSCs and ECs [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 17: 198-209.

(收稿日期: 2021-12-25) (校对编辑: 姚丽娜)