

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 030019

參展科別 化學

作品名稱 超分子奈米粒子應用於基因治療

得獎獎項

就讀學校 臺北市私立華興中學

指導教師 田廣仁

作者姓名 邱奕智

關鍵詞 超分子奈米粒子、CRISPR/Cas9、基因治療

作者簡介



我是邱奕智，就讀私立華興中學，目前高三。我熱愛英文，因為它在日常生活中很重要，在許多場合都能派上用場。聆聽英文的歌曲是我的嗜好，他可以讓我放鬆心情。化學是我十分感興趣的另一門學問，從小就喜愛閱讀化學相關書籍，增進自己的科學知識。我期許未來能繼續要求自己，比現在更上層樓，朝向我喜愛的領域去發展！

摘要

X 染色體關聯性視網膜裂損症患者，在青少年時期會逐漸喪失視力，主要是因為 RS1 基因突變造成視網膜剝離，目前並沒有藥物達到有效的治療效果，即使最新研發的病毒載體基因療法也沒有效果，雖然在動物模型中具有良好的表現，但是在人體試驗中卻沒有獲得任何顯著的改善成果，推測是實驗模型不夠完善，在本實驗中，我們將會採用幹細胞分化成為視網膜類器官，並搭配上超分子奈米粒子運輸基因編輯材料送入，期許達到治療效果。本研究中以超分子奈米粒子(SMNP)將 CRISPR/Cas9 基因編輯系統及正常 RS1 基因共同運輸進入細胞來達成基因敲入的效果。我們篩選出兩個具有最佳傳遞性之超分子奈米粒子載體(Cas9/sgRNA-plasmid<SMNPs 及 Donor-RS1/GFP-plasmid<SMNPs)並將其應用於細胞中，於其安全編輯位點(AAVS1 locus)實施基因敲入，接著以 PCR 及 Sanger sequence 檢測敲入基因的正確性，並施以免疫螢光法分析 RS1 蛋白表現。結果顯示在細胞當中，RS1/GFP 基因成功敲入 AAVS1 位點中並能有效進行表現，因此我們進而測試該方法是否能應用於 iPSC 分化而成的人類視網膜類器官中，其也成功表現 RS1/GFP 質體引發的綠色螢光蛋白(GFP)，效果也持續接近 40 天。總而言之，我們希望目前的研究結果可以作為未來開發遺傳性疾病基因治療法的藍圖，造福受疾病所困擾的病患。

Abstract

Due to the mutation of RS1 gene, X-linked juvenile retinoschisis patients lose their vision in early days of life. Currently, treatment for the disease is absent. Though several virus vector mediated gene therapies have shown promising effects in animal models, none have demonstrated patient vision improvement in human clinical trials. Suspecting that previous research modules have not been optimized, we've decided to conduct gene therapy via supramolecular nanoparticle vectors (SMNP) in iPSC-derived human retinal organoids to reach therapeutic effect. Herein, supramolecular nanoparticle vectors are used for co-delivery of two DNA plasmids - CRISPR-Cas9 genome-editing system and a therapeutic gene, RS1 – enabling CRISPR/Cas9 knockin of RS1 gene along the HITI strategy. Through small-scale combinatorial screenings, two SMNP vectors, i.e., Cas9/sgRNA-plasmid⊂SMNPs and Donor-RS1/GFP-plasmid⊂SMNPs with optimal delivery performances are identified. The identified SMNP vectors are then employed to carry out CRISPR/Cas9 knockin of RS1/GFP gene into the mouse AAVS1 safe-harbor site in vitro, followed by fluorescence microscopy, polymerase chain reaction (PCR) assay, Sanger sequencing, and quantitative PCR assay to confirm the successful integration of RS1/GFP gene. The results indicate that i) the precise integration of 3.0-kb RS1/GFP gene into the AAVS1 site, and ii) the expression of the integrated RS1/GFP gene in 293 cells, thus demonstrating CRISPR/Cas9 knockin of RS1/GFP gene in vitro. Subsequently, a similar genome editing approach was conducted in a 3D retinal organoid model and the positive GFP expression from the uptake of RS1/GFP plasmids was observed until 40 days post-transfection. Conclusively, the current findings may serve as a blueprint for the development of a unique genomic treatment in treating hereditary diseases.

一、 前言

研究動機

有一部我很喜歡的電影:蜘蛛人, 他有一些很酷炫的超能力, 看似非常的虛幻不實, 但透過科學的角度來思考後, 會發現這位超級英雄其實在某種程度上是符合邏輯的。為了修改蜘蛛人的基因, 咬他的蜘蛛必須在他身體中釋放出一種逆轉濾過性病毒。逆轉濾過性病毒攜帶著基因資訊, 它被嵌入細胞 DNA 裡面。然後細胞讀取新的 DNA 而為其產生特殊功能和蛋白質。然而這逆轉濾過性病毒幾乎得散布到每一個細胞, 而且還得要有能力在每個細胞中為新的、不同的功能編碼。所以儘管理論上來說這是一項有可能實現的技術, 它仍然有許多需要被克服的難題。在 2019 年暑假, 當時剛考完國中會考, 正好有機會到美國拜訪親戚, 我非常幸運地透過親戚們介紹到美國加州大學洛杉磯分校 (UCLA) 分子與醫學藥理學系實驗室參觀及學習一些實驗, 當時實驗室的學長姐們在做奈米材料的的研究, 在探討的是如何把基因送進細胞內進行基因編輯的技術, 這彷彿就是我想像中實現「高科技」蜘蛛人的技術, 就此激發我對研究的興趣。回臺灣後, 因緣際會認識了陽明交通大學的老師們, 在他們的協助下開啟了這趟不平凡的研究之旅。

2020 年諾貝爾化學獎得主 Emmanuelle Charpentier 與 Jennifer Doudna, 他們在 2012 年時發現可以精準地使用 CRISPR/Cas9 基因剪刀來改變動物、植物和微生物的 DNA 這項新穎的技術。此技術可應用於治療遺傳疾病, 更有機會改善癌症療法。其中一種視網膜遺傳性疾病: 先天性視網膜裂損症(X-linked juvenile retinoschisis, XLR5)容易導致患者視網膜剝離而導致視力永久喪失, 讓患者的生活充滿了艱辛與痛苦, 而目前已知 RS1 基因的突變是造成此疾病的原因。查閱文獻發現, 已經通過或在市場上的基因治療方式為利用慢病毒(lentivirus)或是腺相關病毒(adeno-associated virus)進行基因運輸, 但是使用病毒當作載體有很大的風險:慢病毒可能會有其序列隨機嵌入基因體中, 進而導致癌症的發生; 腺相關病毒會受限於表達時間以及不同血清型(serotype)的差異, 影響其治療效果。而且, 採用病毒也很容易造成高度免疫或是發炎反應, 導致患者生命受到脅迫, 造成不可挽回之憾事, 因此, 非病毒載體便有其重要性, 綜觀國內外研究, 最有前瞻性的就屬「奈米粒子」, 它具有克服 DNA 太大的特性, 並且不會有像病毒一樣

的免疫反應發生，同時還可以達到高產量的特性。我們預計利用奈米粒子包裹 CRISPR/Cas9 基因編輯材料，送入到眼睛類器官中達到治療的效果，提供 DNA 更有效率且更安全的運輸模式。

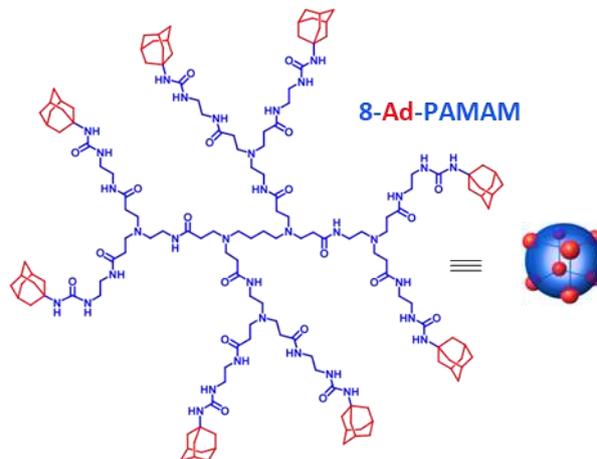
研究目標

- 一、優化奈米材料不同結構單元(分別為 CD-PEI、Ad-PAMAM、Ad-PEG 與 Ad-PEG-TAT)的比例。
- 二、確認奈米材料將質體共同運輸進入細胞後能正確進行基因剪輯。
- 三、確認奈米材料將質體共同運輸進入視網膜類器官後能正確進行基因剪輯

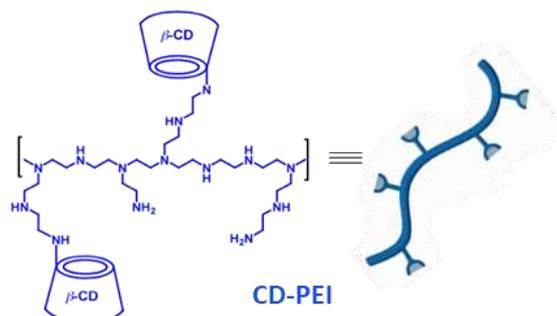
二、 研究材料與方法

奈米材料

Ad-PAMAM (adamantane-grafted polyamidoamine):結構如下圖所示，通常以 8 聚合體形式結合(即 8-Ad-PAMAM)，由於其表面的胺類及內部的醯胺鍵，因此對生物有極高相容性，並作為奈米粒子球型的骨架結構，膠黏劑。



CD-PEI (cyclodextrin-grafted branched polyethylenimine):結構如下圖所示，由胺基和碳脂



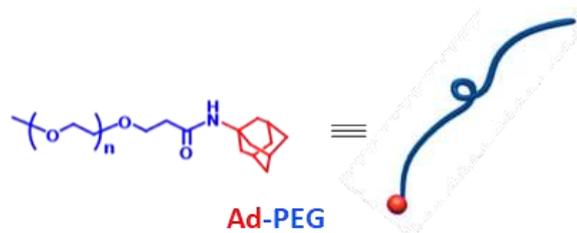
肪族間隔基組成的重複單元，是史上第二個發現的化學性轉染物質，會將 DNA 濃縮成帶正電的顆粒，這些顆粒與細胞表面陰離子物質結合，透過胞吞作用使 DNA 進入細胞

Ad-PEG (Ad-grafted polyethylene glycol):結構如下圖所示，可保護載體 DNA 免於受到免疫系統的攻擊，增加水溶性，以及體內循環時間，具有效保護載體 DNA 作用。

TAT (Trans-Activator of Transcription):為一種細胞穿透性的胜肽，含有精氨酸和賴氨酸兩種帶正電的氨基酸，其胺基酸序列為 (YGRKKRRQRRR)，可以增進穿透細胞效果。

細胞培養

人類 293 細胞株以含 10%胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)及 1%盤尼西林--鏈黴素(Penicillin-



-Streptomycin)的 DMEM(Dulbeco's modified Eagle's medium, Gibco)培養於含 5% CO₂之 37°C 環境。

Plasmid DNA

Cas9/sgRNA-plasmid 是來自 Ralf Kuehn 實驗室並購買於質體分享平台 Addgene (Addgene plasmid # 64216 ; <http://n2t.net/addgene:64216> ; RRID:Addgene_64216)。Donor-RS1/GFP-plasmid 由 GeneCopoeia 購買。

合成 Cas9/sgRNA-plasmid \subset SMNPs

本實驗設計當中共有 18 種不同 Cas9/sgRNA-plasmid \subset SMNPs 配方，該 18 個配方的變動成分：Ad-PAMAM/CD-PEI 比例 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 與 3.0、TAT 1%、6%與 10%；固定成分：Cas9/sgRNA-plasmid、Ad-PEG 與 CD-PEI 濃度分別為 0.01、0.23 與 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。其中，最佳化的配方如下：將 Ad-PAMAM (15 μg)加入含 Cas9/sgRNA-plasmid (1.0 μg), Ad-PEG (23 μg), CD-PEI (10 μg), and Ad-PEG-TAT (1.4 μg)及 2.0 μL DMSO 之 100 μL PBS 中並均勻混合即可使用。

將 Cas9/sgRNA-plasmid \subset SMNPs 運輸至 293 細胞

在進行實驗前 18 小時，於 12 孔盤中每孔加入數量 10^5 細胞，並以去 FBS 細胞培養液培養，讓

細胞同步位於 G0/G1 週期。接著將含 1.0 µg Cas9/sgRNA-plasmid 之 18 種不同 Cas9/sgRNA-plasmid◁SMNPs 配方加入每孔當中，培養 48 小時後進行後續實驗。

T7E1 檢測法

以 GeneArt™ Genomic Cleavage Detection Kit (ThermFisher, A24372)進行 T7E1 檢測法。首先抽取轉染細胞的基因組 DNA(genomic DNA)，接著將 PCR 產物以 AmpliTaq Gold® 360 Master Mix 純化，並以 S1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad)將其變性(denature)及黏著(anneal)。PCR 產物以檢測酶在 37°C作用 1 小時，再進行 2%瓊脂凝膠電泳。

PCR 引子序列如下:

AAVS1_T7E1_F: AATGGGGGTGTGTCACCAGA

AAVS1_T7E1_R: TCCTTCAGGTTCCGTCTTCC

合成 Donor-RS1/GFP-plasmid◁SMNPs

我們採用與上述相似方法合成 Donor-RS1/GFP-plasmid◁SMNPs。比例、配方如上所示，其中，最佳化的配方如下：將 Ad-PAMAM (20 µg)加入含 Cas9/sgRNA-plasmid (1.0 µg), Ad-PEG (23 µg), CD-PEI (10 µg), and Ad-PEG-TAT (1.4 µg)及 2.0 µL DMSO 之 100 µL PBS 中並均勻混合即可使用。

將 Donor-RS1/GFP-plasmid◁SMNPs 運輸至 293 細胞

我們採用與上述相似方法將 Donor-RS1/GFP-plasmid◁SMNPs 轉染至 293 細胞。前置步驟如上所示，在細胞加入 SMNPs 48 小時後，以顯微鏡觀察並紀錄影像，其中，GFP 螢光訊號以配備 CCD 相機(Nikon H550, Japan)的螢光顯微鏡進行量化。

將 Cas9/sgRNA-plasmid◁SMNPs 與 Donor-RS1/GFP-plasmid◁SMNPs 共同運輸至 293 細胞

我們採用與上述相似方法將 Cas9/sgRNA-plasmid◁SMNPs 與 Donor-RS1/GFP-plasmid◁SMNPs 運輸至 293 細胞。將兩最佳配方運輸至細胞 48 小時後改以一般培養液培養 21 天，再以流式細胞儀檢測基因敲入效率，並純化成功敲入 RS1/GFP 基因的細胞。

DNA 抽取及 PCR

將細胞收下並以 PBS 清洗，接著採取廠商所提供方法，以 QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen,

Germany)抽取基因組 DNA(genomic DNA)。獲得基因組 DNA 後以聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)將經整合的 RS1/GFP 基因放大，條件如下: 95°C 10 分鐘 ; 95°C 15 秒、55°C 15 秒、72°C 30 秒，以上三步驟 40 循環 ; 72°C 5 分鐘，再將 PCR 產物以 1.5%凝膠電泳檢測。

PCR 引子序列如下:

左交界(L junction)_F: GTGAACACCTAGGACGCACC

左交界(L junction)_R: TAGGCACCGGTTCAATTGCC

右交界(R junction)_F: TGAGTTTGGACAAACCACAAC

右交界(R junction)_R: CTTCTCCGACGGATGTCTCC

及時定量聚合酶連鎖反應(Quantitative PCR)

將細胞以 800 μ L TRIzol 處理，待其均質化後(homogenized)加入 160 μ L 氯仿(chloroform)，再於 4°C 離心 15 分鐘。將最上面之液態層取出，再加入 400 μ L 異丙醇(isopropanol)，再離心 10 分鐘。將上清液移除，以 75%酒精清洗，再離心 5 分鐘。最後，將上清液移除，待風乾後以 DNase-及 RNase-free 水將其回溶。將獲得的 RNA (1 μ g)以 SuperScript III First-Strand Synthesis kit 反轉錄，所獲得的產物再以 PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)及引子進行 qPCR 檢測分析，並將所獲得的數值以持家基因(housekeeping gene) GAPDH 進行歸一化校正。

qPCR 引子序列如下:

RS1_F_q: GATTGCCAAGGAGGACCCAA

RS1_R_q: GACCTCCCCTGACTCGAAAC

GAPDH_F_q: TGTGAACGGATTTGGCCGTA

GAPDH_R_q: ACTGTGCCGTTGAATTTGCC

免疫螢光染色 (Immunofluorescence staining)

將活細胞以 4% paraformaldehyde 固定，接著以 0.1% Triton X-100 將其通透，再以含 5%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的 PBS 將其阻斷(block)。將細胞以 RS1 (1:500; Abcam)及

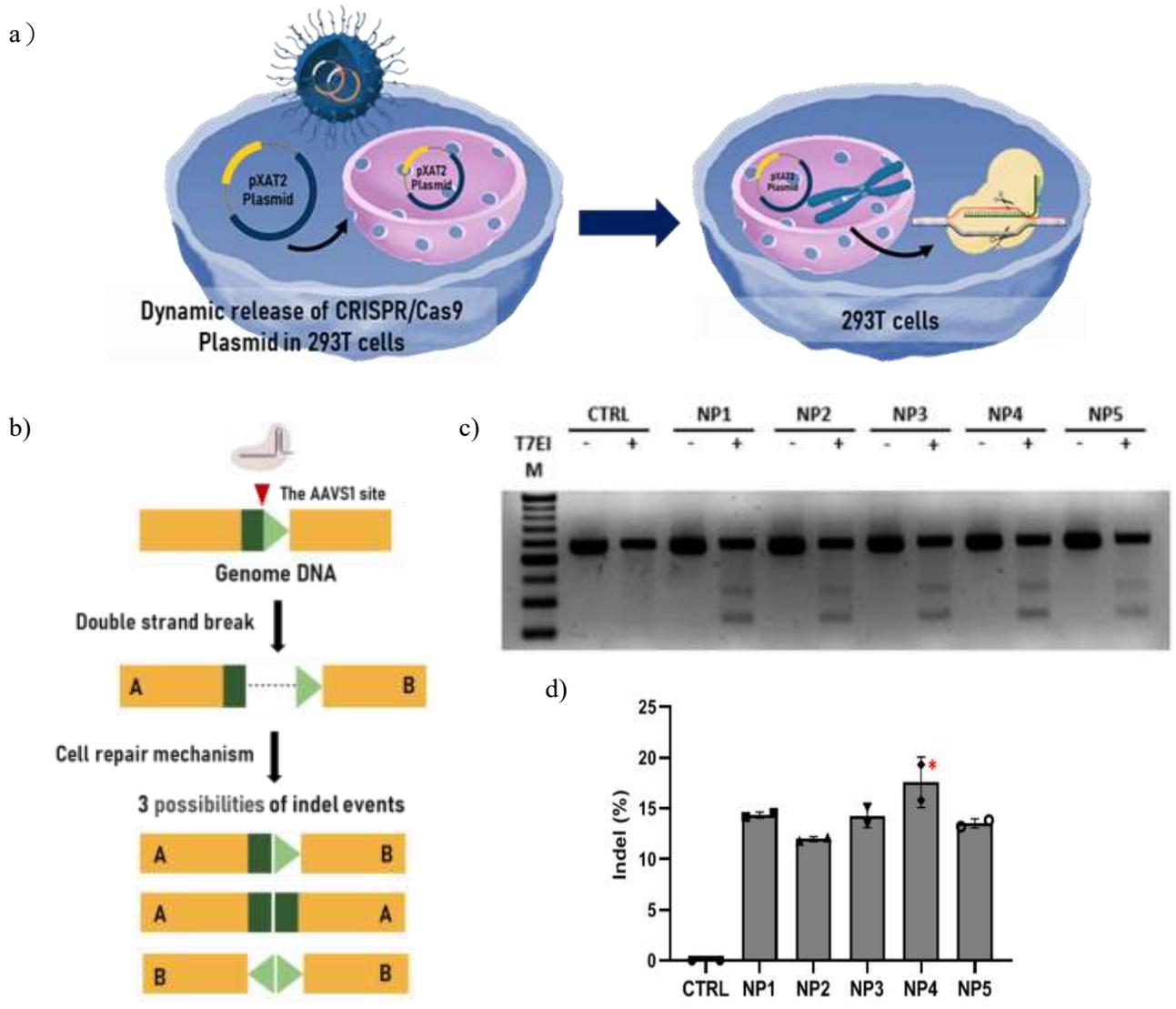
GFP (1:500; Cell Signaling Technology)抗體處理，接著以 PBS 清洗三次，再將細胞以共同接合 (conjugate) FITC (綠)及 Cy3 (紅)的次級抗體處理。DAPI (藍)也被用來將核染色。染色完成的細胞以雷射掃描共軛焦顯微鏡(Olympus)拍攝影像，其中綠光波長為 488 nm，紅光波長為 546 nm。

電子顯微鏡

本研究中使用到掃描式電子顯微鏡(TS-5136MM, TESCAN)及穿隧式電子顯微鏡(Philips CM120)，掃描式電子顯微鏡中的樣本放置於濺鍍金的玻片上，並以 20kV 初始電壓開始加速，穿隧式電子顯微鏡中的樣本放置於鍍碳的銅網格上，以 120kV 初始電壓開始加速。

三、研究結果

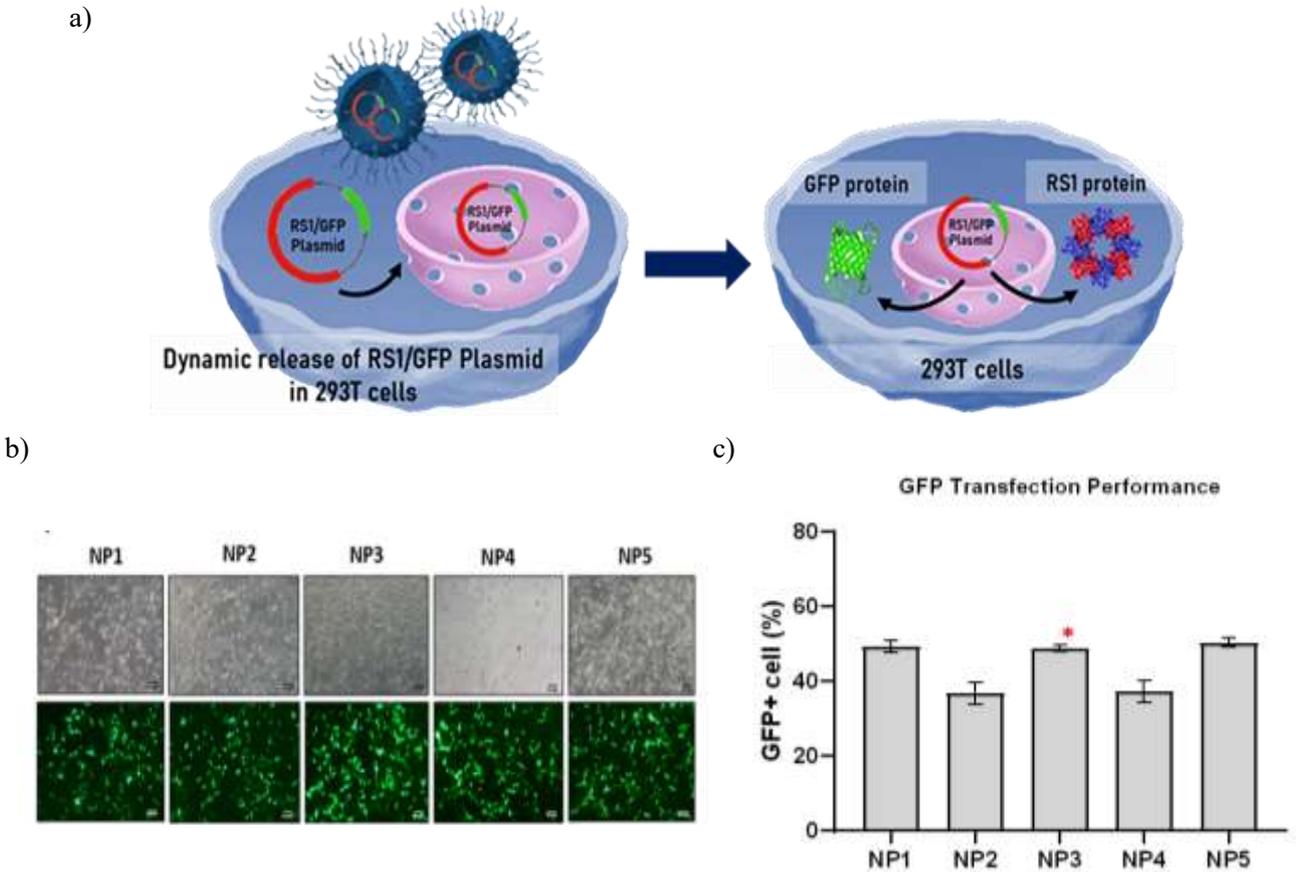
為了尋找出最好的轉染效率，首先我們在 18 個不同的超分子奈米粒子(SMNP)配方中進行掃描式篩選，挑選出最佳化的 Cas9/sgRNA-plasmid \subset SMNPs 配方，在細胞將其攝入後，於 AAVS1 位點製造出一 DSB(圖一 a)，並採取 NHEJ 途徑插入缺失基因(insert and delete, Indel)。該 5 個配方的變動成分: Ad-PAMAM/CD-PEI 比例 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 與 3.0、TAT 1%、6%與 10 %; 固定成分: Cas9/sgRNA-plasmid、Ad-PEG 與 CD-PEI 濃度分別為 0.01、0.23 與 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。進行實驗前，我們在 12 孔盤中，每個孔種入數量為 10^5 的 293 細胞，以去 FBS 的 DMEM 隔夜培養(overnight)，讓細胞呈現飢餓狀態，並同步位於 G0/G1 週期。爾後，我們將 5 種配方分別加入 12 孔盤中(Cas9/sgRNA-plasmid 定量為 1.0 μg)，進行 48 小時培養，接著萃取 genomic DNA，以 T7 endonuclease I (T7E1)檢驗法量化插入缺失基因(indel)的效率(圖一 b)。T7E1 檢驗法會辨識並切割因為插入缺失基因而產生的 DNA 擴增子(amplicon)錯誤配對，在我們的設計當中，原本 570bp 的野生型(wild type)擴增子會被會被裁切為 330bp 與 240bp 兩片段，再以 PCR 檢測(圖一 c)，檢視 CRISPR/Cas9 對於該 18 種配方的作用效率。在所有的配方當中，比例 1.5 的 Ad-PAMAM/CD-PEI 與 6%的 TAT 有最佳的切割效率(17.2%)。



圖一 a)以 CRISPR/Cas9 技術製造出雙鏈斷裂之示意圖。在細胞攝入 Cas9/sgRNA-plasmid 後，在 AAVS1 位點製造出雙鏈斷裂，再經由 NHEJ 途徑所引發的插入缺失基因(Indel)達到基因修復的效果。b)以 T7E1 檢測法量化插入缺失基因的效率之示意圖。c)以電泳檢測兩片段(330、240bp)的表現量，進而得出最佳的 Cas9/sgRNA-plasmid \subset SMNPs 配方。d) 量化結果顯示 NP4 的配方達到最佳基因編輯效果(*)。

接著我們採用與上述相似步驟，篩選出具有最佳運輸效力的 Donor-RS1/GFP-plasmid \subset SMNPs(圖二 a)。5 個配方的變動成分: Ad-PAMAM/CD-PEI 比例 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 與 3.0、TAT 1%、6%與 10%；固定成分: Cas9/sgRNA-plasmid、Ad-PEG 與 CD-PEI 濃度分別為 0.01、0.23 與 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。在將細胞以去 FBS 的 DMEM 隔夜培養後，分別加入 5 種不同

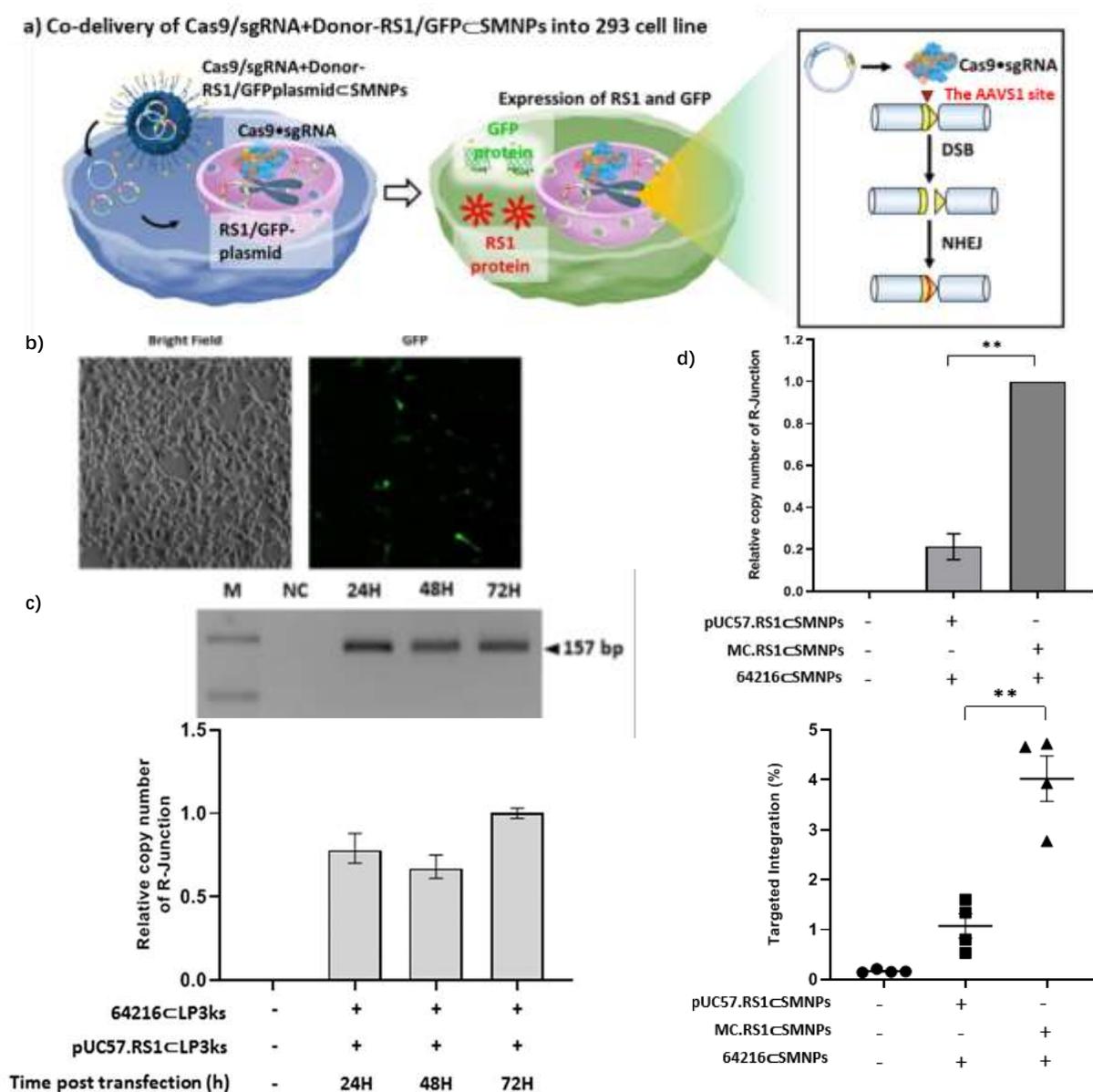
配方, 培養 48 小時, 接著以螢光顯微鏡檢測 GFP (Green fluorescent protein)的表現量(圖二 b)。在 5 種配方當中, NP3 的配方有最佳的表現(50%) (圖二 c)。

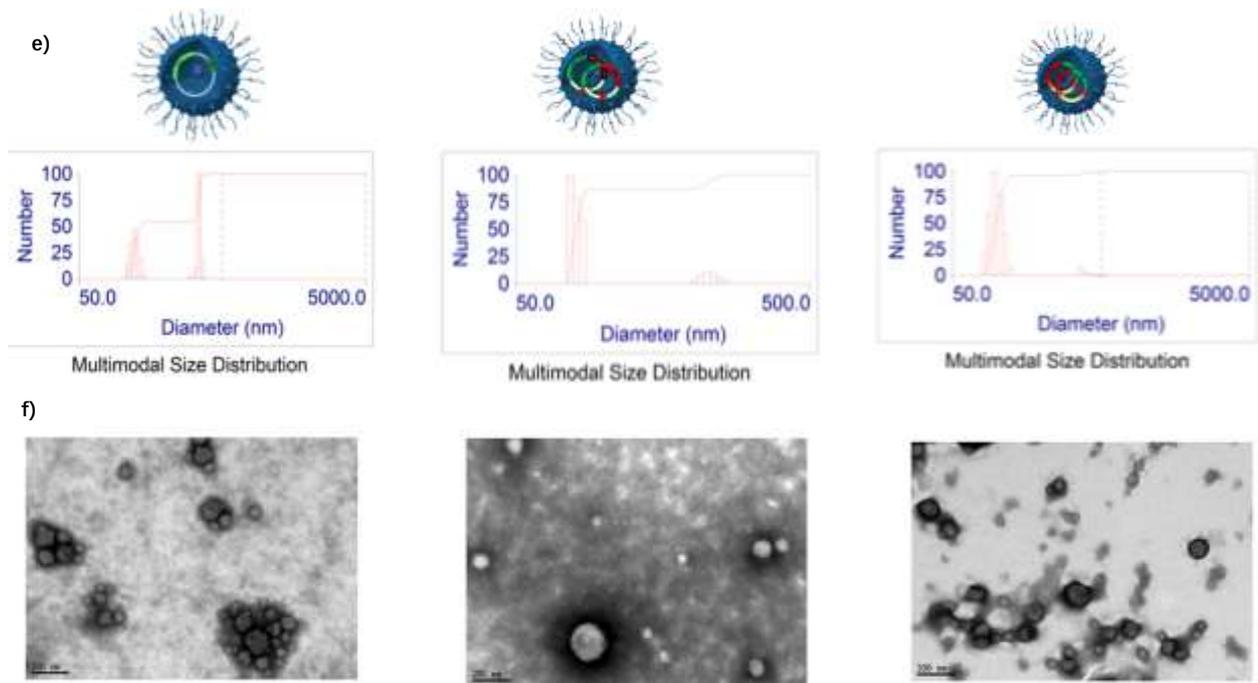


圖二 a)將 293 細胞以 Donor-RS1/GFP-plasmid<SMNPs 進行轉染(transfection)後產生 GFP 之示意圖。b)以螢光顯微鏡檢驗在以 5 種不同 Donor-RS1/GFP-plasmid<SMNPs 配方進行轉染後, 不同配方表現螢光之差異。c)將螢光進行量化分析後, 篩選出具有最佳表現之 Donor-RS1/GFP-plasmid<SMNPs 配方(*)。

在上述兩實驗後, 我們為了簡化使用兩個載體的複雜程序, 因此探討 Cas9/sgRNA 質體和 Donor-RS1/GFP 質體共同包裝到單一個奈米載體中的可行性。根據之前的配方條件, 我們通過將兩個 DNA 質體與奈米粒子進行混合, 製備了 Cas9/sgRNA 質體+RS1/GFP-質體<SMNP, 進行 CRISPR/Cas9 介導的 DNA 切割和 GFP 轉染 (transfection) 研究。結果 (圖 3d、e) 顯示, 這種共同包裝的奈米粒子載體對於 CRISPR/Cas9 介導的 DNA 切割 (5.1%) 和 GFP 轉染

(20%) 效果顯著受損。接著我們以掃描式電子顯微鏡 (SEM)、穿隧式電子顯微鏡 (TEM) 和動態光散射(Dynamic Light Scattering, DLS)分析最佳化後的 Cas9/sgrNA 質體 \subset SMNP、RS1/GFP-質體 \subset SMNP 及 Cas9/sgrNA 質體+RS1/GFP-質體 \subset SMNP (如圖 3f、g 所示), 顯示這兩種優化配方賦予這兩種奈米粒子載體具有窄尺寸分佈的均勻球形形態。共同包裝的奈米粒子則具有更大的尺寸和尺寸分佈, 我們推測這可能是它們性能降低的原因。根據化學計量計算, 我們估計在優化的配方條件下, 每個 Cas9/sgrNA-質體 \subset SMNP 中有 1-2 個 Cas9/sgrNA 質體, Donor-RS1/GFP 質體 \subset SMNP 中則有 2-3 個質體。

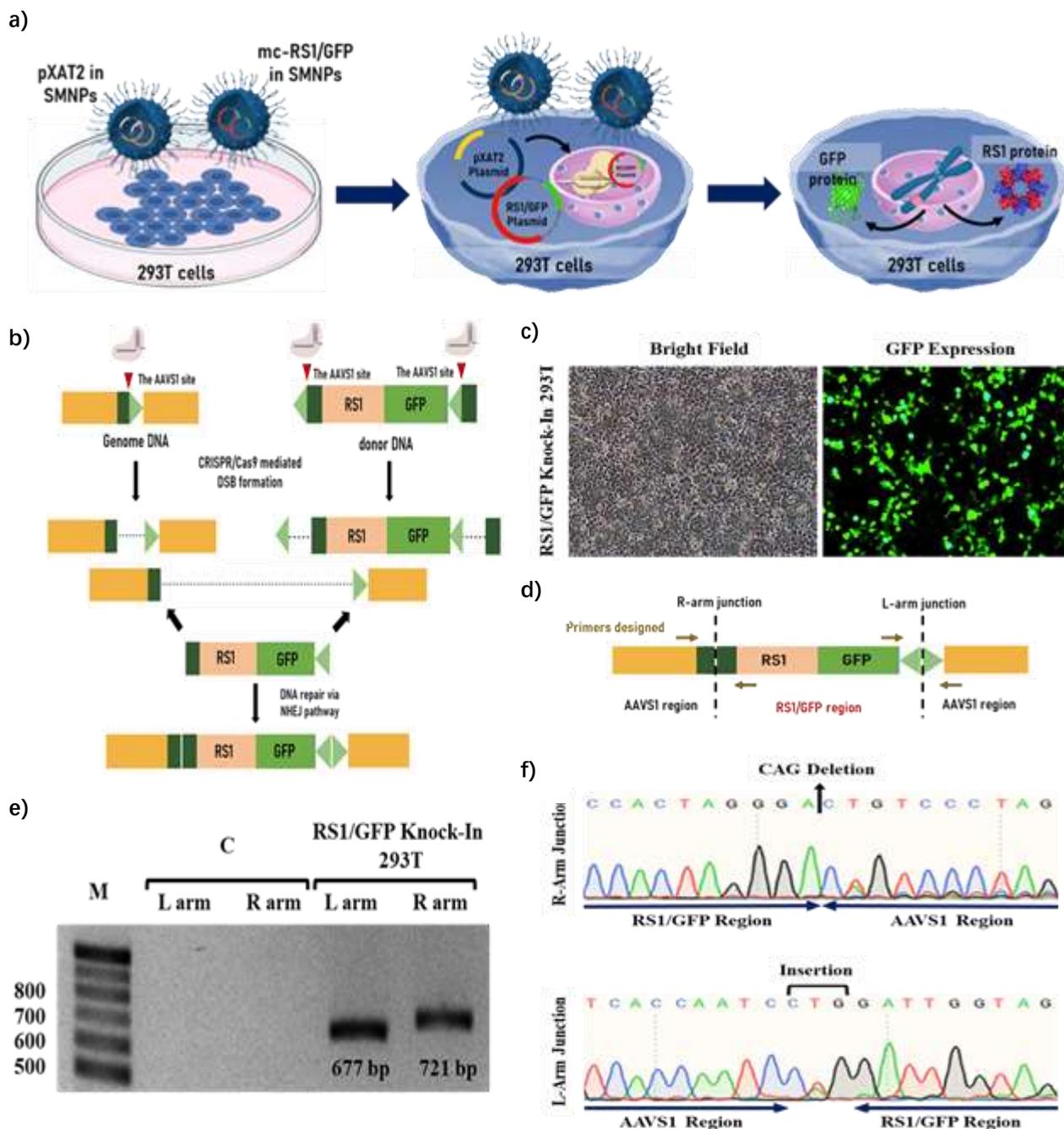




圖三 a)將 293 細胞以 Cas9/sgRNA+DonorRS1/GFP-plasmid cSMNPs 共同處理之示意圖。b)以螢光顯微鏡檢測 293 細胞在轉染後之表現效率。c)以電泳分析不同轉染時間基因插入的效率，並量化其表現。d)以微滴式數字聚合酶連鎖反應測定成功轉染之細胞比率。e) 以動態光散射儀測定 Cas9/gRNA plasmid cSMNP 在穿隧式電子顯微鏡下之動態尺寸 f)穿隧式顯微鏡下 Cas9/gRNA plasmid cSMNP 之影像

在上述兩實驗後，我們將細胞以兩最佳配方共同進行處理(各包含 1.0 μg 之載體)(圖 4a)。在處理後 21 天，將細胞以流式細胞儀檢測基因敲入(knockin)的效率(9.8%)同時純化並取得被敲入 RS1/GFP 的 293 細胞(圖 4b)，接著將其培養放大 20 倍，在這段放大培養的過程當中，細胞也持續並穩定地表現 GFP (圖 4c)。為了進一步應證 RS1/GFP 是否成功經由 NHEJ 途徑敲入 AAVS1 位點當中，我們抽取基因組 DNA(genomic DNA)進行 PCR 及桑格測序法(Sanger analysis)。在經過 PCR 得放大之後兩 DNA 片段:左端 (L-arm junction, 617bp)與右端 (R-arm junction, 748bp)可被電泳檢測辨識(圖 4d)，同時，以桑格測序法結果檢視左右兩端的交界，結果均顯示 RS1/GFP 基因成功經由 NHEJ 途徑敲入細胞的基因當中(圖 4e)。此外，為了確認被敲入 RS1/GFP 基因的細胞是否能正常表現 RS1 基因，我們以 qPCR 檢測，結果顯示，相較於未經處理的 293 細胞，敲入 RS1/GFP 基因的 293 細胞有十分顯著的 RS1 基因表現(圖 4f)。接著以免疫螢光法

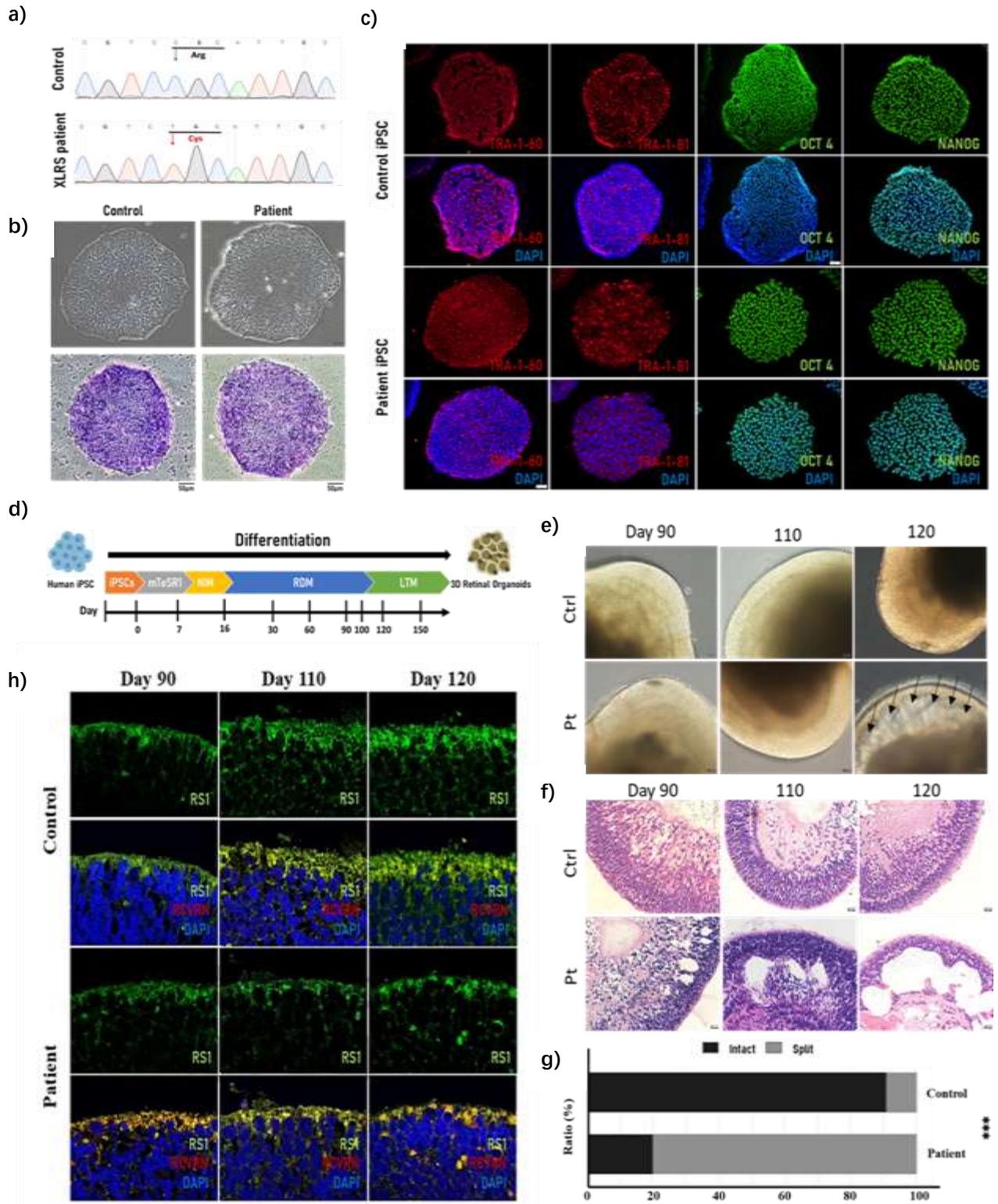
(immunofluorescence) 檢測 RS1 基因能否正常表現 RS1 蛋白質，我們觀察到在成功被敲入 RS1/GFP 基因的 293 細胞有大量紅色螢光表現(該紅色螢光為經免疫沉澱之 RS1 蛋白)(圖 4g) 代表其正常表現 RS1 基因。



圖四 a)將 293 細胞以 Cas9/sgRNA-plasmid+SMNPs 及 Donor-RS1/GFP-plasmid+SMNPs 共同處理之示意圖 b)RS1 基因插入 AAVS1 基因座之示意圖 c)細胞經培養放大 20 倍後以可見光及

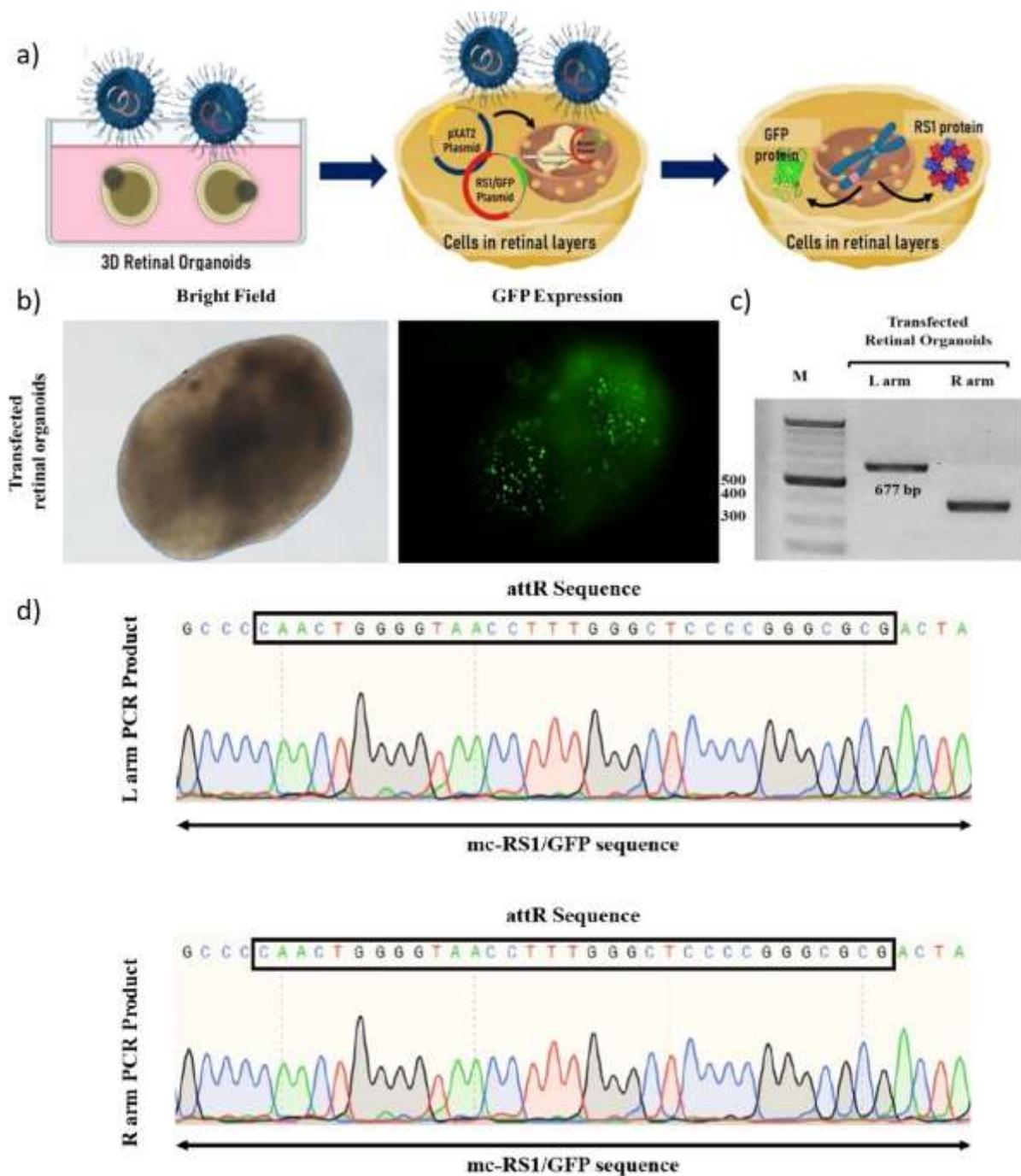
螢光顯微鏡拍攝之顯微照片 d)設計引子並以電泳檢測 RS1 基因插入後左右兩端交界之示意圖 e) 以電泳檢測 RS1 基因插入後左右兩端之交界 f) 以 Sanger 測序法檢測左右兩端交界處之基因序列是否正確

在證明體外 CRISPR/Cas9 介導 RS1 基因敲入 293 細胞是成功的以後，我們接著探討以相同的方式將基因插入至源自於 XLRS 患者的視網膜類器官(organoid)的可能性。在轉染後第 5 天以桑格測序法分別檢測 RS1 基因於健康及 XLRS 病人(圖五 a)，發現兩者皆可正常插入 RS1 基因。接著，為了確認自患者及健康成人取得之細胞，在經過處理後是否能維持其幹細胞特性，我們以鹼性磷酸酶(ALK)染色及免疫螢光染色(IHC)檢測，結果顯示數個幹細胞之標誌，如 Tra-1-60、Tra-1-81、Oct 4 及 NANOG 皆能進行正常表現(圖五 b、c)。接著，我們將所得之誘導幹細胞分化為人類視網膜類器官，再以免疫螢光染色檢測視網膜所會表達得分子記號，如 RCVRN，其結果為陽性，確認了我們分化的有效性(圖五 e、f)。有趣的是，在組織學形態上，自 XLRS 患者所得之幹細胞分化成的人類視網膜類器官同樣發現了層列的現象(圖五 g)，更加證實我們分化的結果。

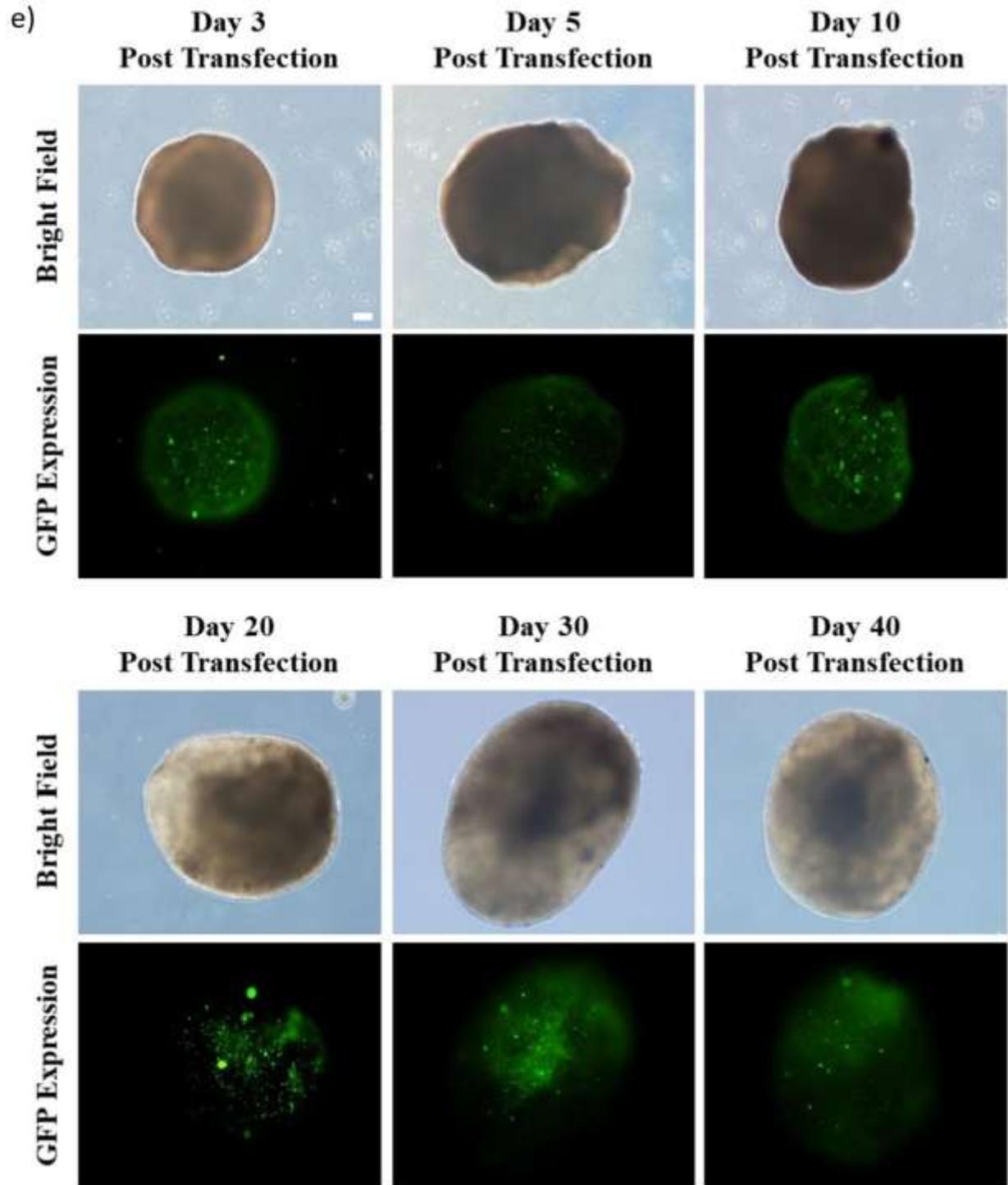


圖五 a) 以桑格測序法分別檢測 RS1 基因於健康及 XLRN 病人之插入情形 b)可見光顯微鏡下 iPSC 之鹼性磷酸酶之染色圖片 c)以免疫螢光染色檢測源自於 XLRN 病人所分化之 iPSC 之 Tra-1-60、Tra-1-81、Oct 4 及 NANOG 表現 d)以 iPSC 分化為人類視網膜類器官之時間軸 e)可見光顯微鏡下健康及 XLRN 病人之 iPSC 細胞分化為人類視網膜類器官之攝影(分別於第 90、110、120 天) f)人類視網膜類器官切片之 H&E 染色(分別於第 90、110、120 天) g)健康及 XLRN 病人視網膜類器官之層裂情形 h)以免疫螢光染色檢測健康及 XLRN 病人 RS1 蛋白及 RCVRN 蛋白之表現(分別於第 90、110、120 天)。

在證明體外 CRISPR/Cas9 介導 RS1 基因敲入 B16 細胞是成功的以後，我們接著探討以相同的方式將基因插入至源自於 XLRN 患者的視網膜類器官(organoid)的可能性。在轉染後第 5 天在轉染的視網膜類器官中觀察到陽性 GFP 信號，證實 RS1/GFP 質體透過奈米分子載體將基因遞送到 XLRN 3D 視網膜類器官中 (圖六 b)。為了進一步驗證治療性 RS1 基因是否在視網膜類器官的基因座中成功整合，我們進行了 PCR 分析。從電泳凝膠中，兩個特徵條帶 (L 臂和 R 臂連接點) 明顯地顯示出來；然而，只有 L 臂連接處顯示出正確的條帶大小(約 677 bp)，而 R 臂連接點顯示出較小的條帶大小 (300-400 bp) (圖六 c)，因此我們以 Sanger 測序法以評估連接序列是否正確。如圖 5d 所示，在 L-arm 和 R-arm 連接處均檢測到一個僅存在於 RS1/GFP 質粒中的獨特 attR 序列，這意味著只有 mc-RS1/GFP 質粒被轉染到患者視網膜類器官中。因此，我們假設 Cas9/sgRNA 質體可能需要比 RS1/GFP 質體需要更多的時間才能轉染到視網膜類器官中。為了優化視網膜類器官中合適的轉染持續時間，我們另外進行了一項時間追蹤性研究，以檢查視網膜類器官中 GFP 信號的維持情況，記錄轉染後視網膜類器官第 3、5、10、20、30 和 40 天的可見光及免疫螢光影像 (圖六 e)。如圖所示，轉染的視網膜類器官在轉染 72 小時後開始顯示 GFP 信號，並在大約 20 天時繼續並顯示出最大的 GFP 表達性能。轉染後第 40 天，GFP 訊號逐漸下降並減弱。



圖六 a)將以 Cas9/sgRNA-plasmid \subset SMNPs 及 Donor-RS1/GFP-plasmid \subset SMNPs 共同送進視網膜類器官之示意圖。b)視網膜類器官在轉染 5 天後之可見光及螢光攝影。c)以電泳檢測左右兩端之交界。d)以桑格測序法檢測左右兩端交界處之基因序列是否正確。



圖六 e)以可見光及應光顯微鏡分別記錄視網膜類器官在轉染後第 3、5、10、20、30、40 天之基因表現情形

四、結論與應用

綜上所述，我們所採取的基因編輯策略(HITI, Homology-Independent Targeted Integration)能成功利用基因編輯技術將正常基因敲入至細胞中，達到基因治療之效果。該 HITI 策略將兩個已預知的 CRISPR/Cas9 切位點整合進 dDNA 中，後續以 CRISPR/Cas9 進行 dDNA 及 genomic DNA (gDNA)之切割時會產生三個 DSB，接著 NHEJ 途徑會將該 dDNA 整合進 gDNA 中，達到基因修復的效果。本研究中首先經由小規模的篩選，在 18 種不同配方中歸納出具有最佳運輸效率之 SMNP 載體，再將其介導運輸入細胞內，進行一連串體外(*in vitro*)的實驗。我們的實驗結果顯示該 RS1/GFP 基因經由 NHEJ 途徑被整合入 293 細胞的 AAVS1 位點當中。此外，我們以創新的視網膜類器官平台，模擬奈米粒子在進入人類的眼球當中所可能面臨的狀況，結果亦顯示我們所設計出的最佳配方奈米粒子能成功將 RS1 基因敲入並且產生免疫螢光，效果持續約 20 天達到高峰，唯之後效力持續遞減，需更多實驗探究其可能原因。

我們的研究成果提供了一個創新的想法：在 NHEJ 途徑的基礎之上開發了一個 HITI 策略，以 SMNP 載體，而非傳統的病毒介導，來達成以 CRISPR/Cas9 所調控之基因敲入，將完整的治療基因整合入原基因內。本文當中所探討的 XLRS，有近兩百個 RS1 基因的突變與其相關，因此，若能將我們所發展出的方法應用於臨床治療，將很可能為許多疾病提供革命性之療法。然而，如何開發適用於人體之安全及可靠的共同運輸性載體仍是一大挑戰，因此我們也預計於未來進行動物實驗以確認其實際在體內(*in vivo*)運作的效力。

五、參考資料

1. Orthwein, S. M. Noordermeer, M. D. Wilson, S. Landry, R. I. Enchev, A. Sherker, M. Munro, J. Pinder, J. Salsman, G. Dellaire, B. Xia, M. Peter, D. Durocher, *Nature* 2015, 528, 422
2. Tantri, T. R. Vrabec, A. Cu-Unjieng, A. Frost, W. H. Annesley, Jr., L. A. Donoso, *Surv. Ophthalmol.* 2004, 49, 214.
3. Lee, K. Lee, S. Panda, R. Gonzales-Rojas, A. Chong, V. Bugay, H. M. Park, R. Brenner, N. Murthy, H. Y. Lee, *Nat. Biomed. Eng.* 2018, 2, 497
4. Cukras, H. E. Wiley, B. G. Jeffrey, H. N. Sen, A. Turriff, Y. Zeng, C. Vijayasarathy, D. Marangoni, L. Ziccardi, S. Kjellstrom, T. K. Park, S. Hiriyanna, J. F. Wright, P. Colosi, Z. Wu, R. A. Bush, L. L. Wei, P. A. Sieving, *Mol. Ther.* 2018, 26, 2282.
5. Paquet, D. Kwart, A. Chen, A. Sproul, S. Jacob, S. Teo, K. M. Olsen, A. Gregg, S. Noggle, M. Tessier-Lavigne, *Nature* 2016, 533, 125
6. P. Papapetrou, A. Schambach, *Mol. Ther.* 2016, 24, 678.
7. A. Ran, P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A. Scott, F. Zhang, *Nat. Protoc.* 2013, 8, 2281
8. Jiang, J. A. Doudna, *Annu. Rev. Biophys.* 2017, 46, 505.
9. A. Rodrigues, E. Shalaev, T. K. Karami, J. Cunningham, N. K. H. Slater, H. M. Rivers, *Pharm. Res.* 2018, 36, 29.
10. G. Schwank, B. K. Koo, V. Sasselli, J. F. Dekkers, I. Heo, T. Demircan, N. Sasaki, S. Boymans, E. Cuppen, C. K. van der Ent, E. E. Nieuwenhuis, J. M. Beekman, H. Clevers, *Cell Stem Cell* 2013, 13, 653
11. Wang, K. J. Chen, S. Wang, M. Ohashi, K. Kamei, J. Sun, J. H. Ha, K. Liu, H. R. Tseng, *Chem. Commun.* 2010, 46, 1851.
12. H. Wang, K. Liu, K. J. Chen, Y. Lu, S. Wang, W. Y. Lin, F. Guo, K. Kamei, Y. C. Chen, M. Ohashi, M. Wang, M. A. Garcia, X. Z. Zhao, C. K. Shen, H. R. Tseng, *ACS Nano* 2010, 4, 6235
13. H. Wang, S. Wang, H. Su, K. J. Chen, A. L. Armijo, W. Y. Lin, Y. Wang, J. Sun, K. i. Kamei, J. Czernin, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 4344.
14. H. Yin, C.-Q. Song, J. R. Dorkin, L. J. Zhu, Y. Li, Q. Wu, A. Park, J. Yang, S. Suresh, A. Bizhanova, *Nat. Biotechnol.* 2016, 34, 328
15. H.-X. Wang, M. Li, C. M. Lee, S. Chakraborty, H.-W. Kim, G. Bao, K. W. Leong, *Chem. Rev.* 2017, 117, 9874
16. H.-X. Wang, Z. Song, Y.-H. Lao, X. Xu, J. Gong, D. Cheng, S. Chakraborty, J. S. Park, M. Li, D. Huang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2018, 115, 4903

17. A. Doudna, E. Charpentier, *Science* 2014, 346, 1258096
18. A. Zuris, D. B. Thompson, Y. Shu, J. P. Guilinger, J. L. Bessen, J. H. Hu, M. L. Maeder, J. K. Joung, Z.-Y. Chen, D. R. Liu, *Nat. Biotechnol.* 2015, 33, 73
19. J. Carlson-Stevermer, A. A. Abdeen, L. Kohlenberg, M. Goedland, K. Molugu, M. Lou, K. Saha, *Nat. Commun.* 2017, 8, 1711.
20. J. Eyquem, J. Mansilla-Soto, T. Giavridis, S. J. van der Stegen, M. Hamieh, K. M. Cunanan, A. Odak, M. Gönen, M. Sadelain, *Nature* 2017, 543, 113.
21. J. H. Lee, K. J. Chen, S. H. Noh, M. A. Garcia, H. Wang, W. Y. Lin, H. Jeong, B. J. Kong, D. B. Stout, J. Cheon, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 4384
22. J.-s. Choi, Y. Zhu, H. Li, P. Peyda, T. T. Nguyen, M. Y. Shen, Y. M. Yang, J. Zhu, M. Liu, M. M. Lee, *ACS Nano* 2016, 11, 153
23. Lee, M. Conboy, H. M. Park, F. Jiang, H. J. Kim, M. A. Dewitt, V. A. Mackley, K. Chang, A. Rao, C. Skinner, *Nat. Biomed. Eng.* 2017, 1, 889.
24. K. Schumann, S. Lin, E. Boyer, D. R. Simeonov, M. Subramaniam, R. E. Gate, G. E. Haliburton, J. Y. Chun, J. A. Bluestone, J. A. Doudna, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2015, 112, 10437
25. K. Suzuki, Y. Tsunekawa, R. Hernandez-Benitez, J. Wu, J. Zhu, E. J. Kim, F. Hatanaka, M. Yamamoto, T. Araoka, Z. Li, M. Kurita, T. Hishida, M. Li, E. Aizawa, S. Guo, S. Chen, A. Goebel, R. D. Soligalla, J. Qu, T. Jiang, X. Fu, M. Jafari, C. R. Esteban, W. T. Berggren, J. Lajara, E. Nunez-Delicado, P. Guillen, J. M. Campistol, F. Matsuzaki, G. H. Liu, P. Magistretti, K. Zhang, E. M. Callaway, K. Zhang, J. C. Belmonte, *Nature* 2016, 540, 144
26. K.-J. Chen, S. M. Wolahan, H. Wang, C.-H. Hsu, H.-W. Chang, A. Durazo, L.-P. Hwang, M. A. Garcia, Z. K. Jiang, L. Wu, *Biomaterials* 2011, 32, 2160.
27. Li, L. Song, X. Liu, X. Yang, X. Li, T. He, N. Wang, S. Yang, C. Yu, T. Yin, *ACS Nano* 2016, 11, 95
28. L. Li, S. Hu, X. Chen, *Biomaterials* 2018, 171, 207.
29. L. Swiech, M. Heidenreich, A. Banerjee, N. Habib, Y. Li, J. Trombetta, M. Sur, F. Zhang, *Nat. Biotechnol.* 2015, 33, 102.
30. Wang, J. A. Zuris, F. Meng, H. Rees, S. Sun, P. Deng, Y. Han, X. Gao, D. Pouli, Q. Wu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016, 113, 2868.
31. Mora-Raimundo, D. Lozano, M. Manzano, M. Vallet-Regí, *ACS Nano* 2019.
32. Wang, L. Zhang, W. Zheng, L. Cong, Z. Guo, Y. Xie, L. Wang, R. Tang, Q. Feng, Y. Hamada, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018, 57, 1491
33. Liu, K. Zhao, C. Wang, Z. Zhang, C. Zheng, Y. Zhao, Y. Zheng, C. Liu, Y. An, L. Shi, *Adv. Sci.* 2019, 6.

34. E. Golding, E. Rosenberg, A. Khalil, A. McEwen, M. Holmes, S. Neill, L. F. Povirk, K. Valerie, J. Biol. Chem. 2004, 279, 15402.
35. K. Alsaiani, S. Patil, M. Alyami, K. O. Alamoudi, F. A. Aleisa, J. S. Merzaban, M. Li, N. M. Khashab, J. Am. Chem. Soc. 2017, 140, 143.
36. Wang, K. J. Chen, T. H. Wu, H. Wang, W. Y. Lin, M. Ohashi, P. Y. Chiou, H. R. Tseng, Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49, 3777.
37. T. Chu, T. Weber, B. Wefers, W. Wurst, S. Sander, K. Rajewsky, R. Kühn, Nat. Biotechnol. 2015, 33, 543
38. Sun, W. Ji, J. M. Hall, Q. Hu, C. Wang, C. L. Beisel, Z. Gu, Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 54, 12029
39. Zhou, H. Cui, L. Ying, X. F. Yu, Angew. Chem. Int. Ed. 2018, 130, 10425
40. Gao, Y. Tao, V. Lamas, M. Huang, W.-H. Yeh, B. Pan, Y.-J. Hu, J. H. Hu, D. B. Thompson, Y. Shu, Nature 2018, 553, 217
41. He, C. Tan, F. Wang, Y. Wang, R. Zhou, D. Cui, W. You, H. Zhao, J. Ren, B. Feng, Nucleic Acids Res. 2016, 44, e85.
42. Liu, J. Du, J. s. Choi, K. J. Chen, S. Hou, M. Yan, W. Y. Lin, K. S. Chen, T. Ro, G. S. Lipshutz, Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 169.
43. Y. Wu, D. Liang, Y. Wang, M. Bai, W. Tang, S. Bao, Z. Yan, D. Li, J. Li, Cell Stem Cell 2013, 13, 659.
44. Wu, H. Yang, P. Colosi, Mol. Ther. 2010, 18, 80.

【評語】 030019

基因治療是現代醫學之中相當重要的一環，對於細胞內試劑的運送，需要更有效的方式，這篇橫跨生醫材料合成，細胞實驗及鑑定，為一跨領域的工作。但學生的實質貢獻不明也離化學主題稍遠，但致力於研究的精神，值得鼓勵。