

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.22.046

· 专论与综述 ·

基于修饰 CCR5 基因的艾滋病基因治疗进展 *

郭思达¹ 周 艳² 姜春来^{2△}

(1 吉林大学化学学院 吉林 长春 130012; 2 吉林大学生命科学学院 吉林 长春 130012)

摘要: 艾滋病药物治疗主要障碍是难以彻底清除病毒、副作用大、成本高且需长期用药。CCR5 是 HIV 侵染的主要辅助受体, 缺陷型 CCR5(CCR5 Δ 32)的 CD4⁺T 细胞对 R5 嗜性 HIV-1 病毒感染有高度抵抗力。通过骨髓移植 CCR5 Δ 32 干细胞到患者体内可以降低 HIV 病毒载量至无法检出水平, 同时可维持 T 细胞数目在正常范围内。但由于 CCR5 Δ 32 基因缺失的人群所占比例少、配型困难等问题, CCR5 Δ 32 干细胞移植无法广泛用于艾滋病的临床治疗。通过锌指核酸酶(ZFNs)或类转录激活因子效应物核酸酶(TALENs)两种方法可以将自体细胞 CCR5 基因人为部分缺失, 将产生的 CCR5 缺陷细胞回输体内可阻断 HIV-1 入侵途径, 稳定 CD4 细胞群体并最终清除病毒。而脐带血干细胞具有对配型要求低等优点, 使其作为修饰的靶细胞具有广阔的应用前景。

关键词: 艾滋病; 基因治疗; CCR5 基因; 脐带血

中图分类号: R593.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)22-4372-02

Developing of CCR5 as Target for HIV-1 Gene Therapy*

GUO Si-da¹, ZHOU Yan², JIANG Chun-lai^{2△}

(1 Jilin University College of Chemistry, Changchun, Jilin, 130012, China;

2 Jilin University College of Life Science, Changchun, Jilin, 130012, China)

ABSTRACT: The main obstacles to HIV eradication with highly active antiretroviral therapy (HAART) contain severe side effects and high cost of treatment. The viral entry is mediated by specific interaction of the viral envelope (Env) glycoprotein with CCR5 co-receptor which is an endogenous chemokine receptor on CD4⁺T cells. Cells which are homozygosity for the CCR5 Δ 32 confer highly resistance to HIV-1 infection (R5 type). Bone marrow transplant from the homozygote CCR5 Δ 32 mutation to HIV-1 infected patients can reduce HIV viral load to undetectable level and maintain CD4⁺T cell population. Because of the low rate of CCR5 Δ 32 mutation and difficult to matching, CCR5 Δ 32 defected hematopoietic stem cell transplantation cannot be widely used in AIDS clinical treatment. However, using Zinc Finger Nucleases (ZFNs) and transcription activator-like effector nucleases (TALENs) to modify CCR5 gene and reinfuse into the body has shed a light on the HIV treatment strategies. It can resist the infection of CCR5-tropic HIV-1, stabilize CD4⁺T-cell counts and finally eliminate HIV-1. Because cord blood stem cell transplantation has advantages such as lower requirements of matching than bone marrow transplantation, thus makes it a target cell for gene modifying therapy with great application prospect.

Key word: AIDS; Gene therapy; CCR5 gene; Cord blood

Chinese Library Classification(CLC): R37 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)22-4372-02

引言

据联合国艾滋病规划署 2012 年报告^[1],截至 2011 年底全世界有 3400 万名已知艾滋病病毒感染者,2011 年新增艾滋病病毒感染者 250 万,与艾滋病相关的死亡人数达 170 万。我国约有 78 万人感染艾滋病病毒。

艾滋病是由人类免疫缺陷病毒(HIV)感染引起,已发现 HIV-1 和 HIV-2 两种亚型。HIV 主要感染 CD4⁺T 细胞。目前仍没有有效的疫苗控制病毒的传播。在治疗方面传统的高效逆转录病毒疗法(HAART)虽可抑制艾滋病的发展,但仍有许多缺点:如可造成肝肾等器官功能衰竭;体内病毒无法完全清除;费用较高;需要终身服药等。在基因治疗方面,由于天然存在部分

缺失 CCR5 辅助受体的个体,所以 CCR5 目前是基因治疗的主要靶点。

1 基于 CCR5 基因缺失的干细胞移植

1996 年底,几个研究组同时发现 CCR5 蛋白是 HIV 侵染的辅助受体^[2,3]。同一年,也发现 CCR5 基因缺失 32 个与胞外第二环结构相关的核苷酸(CCR5 Δ 32)导致读码框架错位^[4],使表达提前终止。而此种缺失对 HIV-1 感染有高度抵抗力。CCR5 Δ 32 在欧洲人频率约为 10%,非洲人中为零,亚洲仅少量分布,中国鲜有发现^[5]。因此通过基因疗法人为造成 CCR5 受体的缺失,可阻断 HIV-1 入侵途径,在治疗艾滋病上具有一定的优势。

Hütter^[6]等(2009)报道,将取自 CCR5 Δ 32 捐献者的骨髓细

* 基金项目:中央高校基本科研业务经费(201200003)

作者简介:郭思达(1993-),女,本科,电话:18204318039, E-mail: guosida93@gmail.com

△ 通讯作者:姜春来, E-mail: jiangcl@jlu.edu.cn

(收稿日期:2013-10-20 接受日期:2013-11-18)

胞移植到另一名同时患有白血病和艾滋病的患者身上,经过彻底摧毁受体免疫系统两次骨髓移植,患者不仅白血病完全治愈,在各类组织中也未检测到 HIV。这位被称为“柏林病人”的患者在此后 5 年里,虽未服用抗逆转录药物,却无复发迹象^[7]。该病人的彻底治愈为控制艾滋病燃起了新的希望。但骨髓移植疗法也面临一些问题:1) CCR5 Δ 32 基因缺失的人很少,匹配几率更小;2) 寻找配型、检查 CCR5 Δ 32 缺失和骨髓移植代价都很高;3) 需用放疗抑制排异反应,死亡率约为 26%,手术风险大^[8];4) 艾滋病已成为慢性病,骨髓移植仅在治疗急性白血病等情况下才考虑;5) 可能发生多种并发症,“柏林病人”的治疗对脑部造成了影响,出现了短时记忆方面问题^[9]。

2 修饰 CCR5 基因的主要方法

2.1 锌指核酸酶(ZNFs)

锌指核酸酶技术是根据靶序列设计,可通过其特异性锌指结构域(ZF)识别 CCR5 基因,非特异性核酸酶结构域(FokI)作用于 CCR5 位点使其断裂,再经 DNA 双链断裂、非同源性末端接合修复,人为修饰 CCR5 蛋白表达,得到对 HIV 抗性的细胞。2008 年 Perez 等^[10]用腺病毒携带 ZFN 敲除 PM1 细胞的 CCR5 基因。HIV-1 感染后随培养时间增加,ZFN 修饰的 T 细胞比例增加。52 天后,ZFN 修饰的 T 细胞占 78%,也证实 ZFN 修饰 T 细胞对 R5 嗜性的 HIV-1 具有长期、稳定的抵抗力。之后在小鼠体内也证明了该方法的可行性。

Kim HJ 等^[11](2009)针对人类 CCR5 基因的 33 个位点,应用模块组合法设计合成了 208 个 ZFNs 单体,测试了 315 对 ZFNs 的定点编辑效率,结果发现 44% 的 ZFNs 可以在体外有效地切割目标 DNA,而且四个锌指结构域串联的 ZFN 的切割效率(26%)显著高于三个锌指结构域串联的 ZFNs(9.1%)。Lei^[12]等(2011)利用杆状病毒载体表达 ZFNs,敲除人细胞系和人胚胎干细胞(hESc)的效率分别为 10%和 5%,且修饰后的 hESc 核型正常并具有多潜能性。Holt 等^[13](2011)优化 ZFNs 敲除人类造血干/祖细胞(HSPCs)中 CCR5 基因方法,平均突变率达到 17%。并将改造的干细胞导入 NSG 小鼠中并攻毒。发现含有修饰后细胞的小鼠病毒载量显著下降,T 细胞总数得以维持,表明 ZNFs 修饰自体造血干细胞能长时间控制 HIV-1 的体内增殖。

基于此技术,Sangamo 公司等通过优化 ZFNs 的 FokI 酶,筛选获得了可阻断人类 T 细胞中 40-60% CCR5 基因的 ZFN(SB-728-T, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01543152),目前已经完成临床 I 期试验,正在进行 II 期试验^[14]。临床 I 期试验结果显示^[15,16]:1) SB-728-T 在这群病人治疗中安全性良好,有轻微可逆的移植反应症状;2) ZFN-CCR5 修饰细胞在体内能进行增殖并持续整个试验过程,(平均大于 337 天,区间 115-561);3) 可观察到修饰细胞进入肠道粘膜(活跃 HIV 的病毒库之一);4) 所有受试者在整个试验过程均表现 CD4⁺T 总数增加,CD4⁺/CD8⁺ 比例正常。说明该疗法具有疗效。

2.2 类转录激活因子效应物核酸酶(TALENs)

类转录激活因子效应物(TALE)从植物病原菌黄单胞菌属(Xanthomonas)分离得到,包括 N 端分泌信号、中央 DNA 结合域、C 端核定位信号和转录激活位点^[17]。TALE 作为 DNA 结合区域与作为切割域的内切核酸酶(FokI)相连,形成 TALENs。与

ZFNs 原理类似但 TALENs 可识别较长的序列,在识别靶点的特异性方面比 ZFN 更有优势,TALENs 可以直接应用 4 个 RVD (NI,HD,NN 和 NG)按照识别序列进行设计,无需筛选,组装完成后即可进行活性验证,构建更加方便、快捷。

Mussolino 等^[18]分别设计了靶向人 CCR5 的 TALENs 和 ZFNs,结果发现 TALENs 对 CCR5 的切割效率为 17%,对 CCR2 基因切割效率为 1%,ZFNs 对 CCR5 的切割效率为 14%,而对 CCR2 的切割达到了 11%,CCR2 切割程度反映了两者的毒性,表明 TALENs 的毒性比 ZFNs 小。由于 ZFNs 中的锌指结构广泛分布于各种生物中,并常见于人体,免疫原性很小,而 TALE 来源于植物病原菌,人体细胞对其是否会产生免疫反应还有待进一步的实验证实。

上述研究表明通过构建 CCR5 缺陷的 CD4⁺T 细胞,在体内和体外都证实了其对 HIV-1 感染的抗性,为在人体内清除病毒,进而治愈艾滋病提供了可能。

3 修饰脐带血干细胞在艾滋病治疗上的应用前景

随着锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)及类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)等技术的建立和发展,将病人自体干细胞修饰成 CCR5 缺陷,再回输体内的治疗方法无疑具有广阔的应用前景。由于脐带血移植对 HLA 配型的要求比骨髓移植低,病人成活几率相对较高,能部分缓解骨髓移植的问题。

鉴于以上,考虑通过 ZFNs 或 TALENs 改造新生儿脐带血中的造血干细胞,得到类似“柏林病人”获得的没有排异反应的 CCR5 缺陷造血干细胞。保存这些干细胞,为自己或其他配型相符的人所用,可作为治疗艾滋病的一种方法。此方法比寻找天然 CCR5 缺陷干细胞更容易;干细胞比 CD4⁺T 细胞易于增殖分化,全能性更好;比骨髓干细胞更容易配型成功;加之脐带血尚未被病毒侵染且活性较高,能提高基因疗法成功率。

临床试验中可先用高效联合抗逆转录病毒疗法(HARRT)控制病毒数量,再将修饰后的自体脐带血回输体内,并定期监控改造过细胞所占比例与治疗效果。随时了解治疗进展情况,防止修饰干细胞失活。当患者体内 CCR5 缺陷细胞达到一定比例,无需服用抗逆转录药物。CCR5 缺陷干细胞可不断产生 CCR5 缺陷免疫细胞,而 CCR5 缺陷 T 细胞可清除血液中的 HIV-1,达到功能性治愈要求。而对于已经整合到细胞上的病毒 DNA,可考虑对已达到功能性治愈要求的患者,用药物促进前病毒的转录促使病毒释放,达到同时清除病毒和被感染细胞的目的或抑制感染记忆 T 细胞的增殖,使病毒随细胞凋亡而清除,可能随时间推移实现彻底治愈。

4 问题与展望

综上,以 CCR5 为靶点的基因治疗,为彻底治愈艾滋病提供了可能。但仍有安全性问题需要考虑。1) CCR5 在免疫系统中发挥着一定的作用,它的缺失是否会影响机体的免疫功能;2) ZFNs 和 TALENs 技术可以造成脱靶、毒性等可导致细胞癌变等严重后果;3) 仅对 CCR5 嗜性的 HIV-1 病毒有效,可能导致其它类型 HIV 病毒流行的增加;4) 干细胞也需要更有效的培养方法,对于其应用于临床试验,样品的质量控制等相应法规尚未出台。

(下转第 4381 页)

- Ubiquitination of RIP1 regulates an NF-kappaB-independent cell-death switch in TNF signaling [J]. *Curr Biol*, 2007, 17 (5): 418-424
- [37] Tili E, Michaille J J, Cimino A, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock [J]. *J Immunol*, 2007, 179(8): 5082-5089
- [38] Rossato M, Curtale G, Tamassia N, et al. IL-10-induced microRNA-187 negatively regulates TNF-alpha, IL-6, and IL-12p40 production in TLR4-stimulated monocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(45): E3101-E3110
- [39] Shaked I, Meerson A, Wolf Y, et al. MicroRNA-132 potentiates cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase[J]. *Immunity*, 2009, 31(6): 965-973
- [40] Iliopoulos D, Hirsch H A, Struhl K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation[J]. *Cell*, 2009, 139(4): 693-706
- [41] Wu L, Fan J, Belasco J G. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(11): 4034-4039
- [42] Boomer J S, To K, Chang K C, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure [J]. *JAMA*, 2011, 306 (23): 2594-2605
- [43] Markus B, Peter A W. The inflammatory response in sepsis [J]. *Trends in Immunology*, 2013: 34(3):129-136
- [44] Pauley K M, Cha S, Chan E K. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases[J]. *J Autoimmun*, 2009, 32(3-4): 189-194
- [45] Iliopoulos D, Kavousanaki M, Ioannou M, et al. The negative costimulatory molecule PD-1 modulates the balance between immunity and tolerance via miR-21 [J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(6): 1754-1763

(上接第 4373 页)

参考文献(References)

- [1] http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/JC2434_WorldAIDSday_results_en.pdf
- [2] Atchison R E, Gosling J, Monteclaro F S, et al. Multiple extracellular elements of CCR5 and HIV-1 entry: dissociation from response to chemokines [J]. *Science*, 1996, 274(5294): 1924-1926
- [3] Deng H K, Liu R, Ellmeier W, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1 [J]. *Nature*, 1996, 381: 20
- [4] Samson M, Libert F, Doranz B J, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR5 chemokine receptor gene [J]. *Nature*, 1996, 382(6593): 722-725
- [5] Martinson J J, Chapman N H, Rees D C, et al. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion [J]. *Nature genetics*, 1997, 16(1): 100-103
- [6] Hütter G, Nowak D, Mossner M, et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation [J]. *New England Journal of Medicine*, 2009, 360(7): 692-698
- [7] Hütter G, Thiel E. Allogeneic transplantation of CCR5-deficient progenitor cells in a patient with HIV infection: an update after 3 years and the search for patient no. 2 [J]. *Aids*, 2011, 25(2): 273-274
- [8] Gooley T A, Chien J W, Pergam S A, et al. Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation [J]. *New England Journal of Medicine*, 2010, 363(22): 2091-2101
- [9] Hütter G, Ganepola S. Eradication of HIV by transplantation of CCR5-deficient hematopoietic stem cells [J]. *The Scientific World Journal*, 2011, 11: 1068-1076
- [10] Perez E E, Wang J, Miller J C, et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases [J]. *Nature biotechnology*, 2008, 26(7): 808-816
- [11] Kim H J, Lee H J, Kim H, et al. Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly [J]. *Genome research*, 2009, 19(7): 1279-1288
- [12] Lei Y, Lee C L, Joo K I, et al. Gene editing of human embryonic stem cells via an engineered baculoviral vector carrying zinc-finger nucleases [J]. *Molecular Therapy*, 2011, 19(5): 942-950
- [13] Holt N, Wang J, Kim K, et al. Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo [J]. *Nature biotechnology*, 2010, 28(8): 839-847
- [14] Richnond. Sangamo Presents New Clinical Data at the 20th CROI (Atlanta) 2013, Demonstrating Persistent Immune System Improvements After Treatment With ZFN Therapeutic® SB-728-T[C]. Atlanta, Sangamo Biosciences Press, 2013
- [15] Sangamo BioSciences Announces Plans to Initiate a Second Clinical Trial of CCR5-ZFP Therapeutic to Treat HIV/AIDS [C]. Atlanta, Sangamo Biosciences Press, 2009
- [16] Sangamo Biosciences Press Release: Sangamo BioSciences Announces Presentation of Groundbreaking Clinical Data From ZFN Therapeutic for HIV/AIDS at ICAAC[C]. Atlanta, Sangamo Biosciences Press, 2011
- [17] Bogdanove A J, Schornack S, Lahaye T. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense [J]. *Current opinion in plant biology*, 2010, 13(4): 394-401
- [18] Mussolino C, Morbitzer R, Lütge F, et al. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity [J]. *Nucleic acids research*, 2011, 39(21): 9283-9293