

## 综述

## 干细胞疾病模型在肝脏代谢疾病研究和药物研发中的应用

吴晓珊<sup>1,2</sup>, 李爽<sup>2</sup>, 丁秋蓉<sup>2,\*</sup><sup>1</sup>华东理工大学药学院, 上海 200237; <sup>2</sup>中国科学院上海营养与健康研究所, 上海 200031

**摘要:** 新药研发的失败率之高众所周知, 其中一个原因是依靠动物实验获得的临床前数据无法真实反映人类生理情况, 不可避免地在药物进入临床试验后产生偏差, 最终可能导致研发失利。基于人诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)或成体干细胞建立的疾病模型一方面提供了大量的细胞原材料; 另一方面, 由于iPSCs或成体干细胞可来源于患者, 因而可准确模拟疾病的遗传背景。因此, 干细胞疾病模型为药物临床前试验提供了更贴近人体生理和病理情况的体外细胞模型。更进一步地, 通过建立群体iPSCs细胞库, 可在体外细胞培养皿内进行人类遗传学研究, 采用全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)及定量性状基因座(quantitative trait locus, QTL)等方法筛选人群中与疾病、药物敏感性差异、细胞毒性差异相关的易感位点, 为特定药物的毒性、易感性人群间差异等提供遗传学基础, 进而为后续临床试验中合适的试验人群的招募提供理论依据。因而, 干细胞疾病模型可潜在辅助新药研发, 提高新药临床前试验的准确率, 降低新药研发的周期和成本。本文以肝脏代谢疾病为对象, 对干细胞来源的肝脏细胞疾病模型在代谢功能方面的生理机制研究、药物筛选和评估等领域进行综述。

**关键词:** 人多能干细胞; 人肝细胞样细胞; 体外肝脏群体队列; 3D类器官; 全基因组关联研究; 定量性状基因座

**中图分类号:** Q485; R333.4

## Applications of stem cell disease models in liver metabolic research and drug development

WU Xiao-Shan<sup>1,2</sup>, LI Shuang<sup>2</sup>, DING Qiu-Rong<sup>2,\*</sup><sup>1</sup>School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; <sup>2</sup>Shanghai Institute of Nutrition and Health, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

**Abstract:** The high failure rate of the new drug development has been well recognized. Relying on the pre-clinical data obtained from animal experiments will inevitably cause a low concordance with human clinical trials, which will eventually lead to new drug development failure. Employing human induced pluripotent stem cells (iPSCs) or adult stem cells to simulate disease models can not only provide an unlimited cell materials, but also faithfully represent the genetic background of a certain disease, when iPSCs or adult stem cells derived from patients with a specific disease genetic variation are applied. In addition, gene editing methods can be used to introduce genetic variants of interest into stem cells to generate disease models. Furthermore, by establishing a cell bank with a population of iPSCs in petri dish, *in vitro* human genetic studies can be carried out in these cells, with GWAS and QTL studies applied to identify genetic variants that are associated with drug sensitivity or cytotoxicity. These efforts may offer valuable information for the recruitment of suitable patients for clinical trials. Therefore, stem cell-derived disease models can provide valuable resources for the pathophysiological studies of diseases as well as the drug development. In this review, we will briefly introduce the development of the liver disease models derived from stem cells and their applications in disease study and drug development.

**Key words:** iPSC; hepatocyte-like cells; *in vitro* human liver population cohorts; 3D organoid; genome-wide association studies (GWAS); quantitative trait locus (QTL)

Received 2020-11-17 Accepted 2021-03-11

Research from the corresponding author's laboratory was supported by grants from China Postdoctoral Science Foundation (No. 2019M661661) and Shanghai Super Postdoctoral Fellow, China (No. 2019115).

\*Corresponding author. Tel: +86-21-54920900; E-mail: qrding@sibs.ac.cn

据统计,过去10年间一个新药研发的成本均值为13.35亿美元,平均需要13年,而新药研发的失败率之高众所周知<sup>[1]</sup>。2015~2017年CMR国际公司(Centre for Medicines Research International Ltd.)发布的药物研发指标数据显示,从项目发起至进入临床I期试验的药物研发成功率低于10%;从临床II期成功推进至临床III期的新药,成功率为1/4左右;而进入临床III期试验的新药成功率为2/3<sup>[2]</sup>。

依靠动物实验获得临床前数据,以预测药物的疗效、毒性及在人体中的药代动力学参数,是新药研发过程中的重要组成部分。但在许多情况下,它们无法复制人体内的药代动力学和生理特性。据2013~2015年间218例临床II期试验失败案例的统计数据显示,主要的失败原因集中在药效及安全性不足上,比例分别高达52%及24%<sup>[3]</sup>。这足以让我们认识到,由于动物和人的种属间差异,不可避免地造成临床前试验预测的偏差,导致很多药物进入临床试验后产生偏差,最终导致药物研发失利。为了更好地预测临床试验的结果,许多学者在研究和开发新型的疾病模型。

## 1 人干细胞疾病模型

目前干细胞疾病模型正处于积极的研发和探索中。干细胞由于具备高度自我更新和定向分化的能力使其成为疾病模拟的可能细胞来源。其中人多能干细胞尤受关注,人多能干细胞主要分为两种:一种是人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs),从早期胚胎(原肠胚期之前)分离而来;第二种是诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs),通过体细胞(患者的皮肤切片或者血液样本等)体外重编程获得。上述两种人多能干细胞都能被用于人类疾病模拟,尤其是iPSCs。iPSCs不仅绕开了hESCs相关的道德和免疫问题,而且当iPSCs来源于具备特定疾病遗传背景的患者时,可被用于相应疾病的模拟。此外,人多能干细胞具有多能性,因而在体外合适的诱导条件下,可以分化为各种类型的体细胞,且其在体外的分化过程可在一定程度上模拟体内发育过程,因而可以模拟疾病的不同发生阶段<sup>[4]</sup>。

除了多能干细胞以外,来自患者自身的成体干细胞也能够自我更新并且可以特化形成某一类型组织的细胞。另外还有绕过iPSCs这个步骤,直接对成熟体细胞进行重新编程,将其直接转分化为其他

类型的成体细胞的方法<sup>[5]</sup>。这些方法同样可以避免hESCs相关的道德和免疫问题,也是目前人体器官再生移植及疾病模型构建的研究热点。

### 1.1 单基因突变的干细胞疾病模型构建

构建干细胞疾病模型的第一种方法是通过将来源于特定疾病遗传背景患者的体细胞进行体外重编程得到患者iPSCs,后期分化为具有特定基因变异的各种疾病相关体细胞类型,进行疾病模拟和机理研究;同时也可以将其与基因编辑结合起来,从而纠正遗传缺陷,为潜在进行自体细胞治疗提供细胞来源。如,Liu等构建了异常蛋白血症(Abetalipoproteinemia, ABL)的疾病模型。ABL是由微粒体甘油三酸酯转移蛋白(microsomal triglyceride transfer protein, MTP)突变引起的脂蛋白代谢的遗传障碍。由ABL患者iPSCs分化而来的人肝细胞样细胞(hepatocyte-like cells, HLCs)和心肌细胞均显示与ABL疾病相关的缺陷,包括载脂蛋白B(apolipoprotein B, apoB)稳定性降低、细胞内脂质积累等表型。在通过CRISPR/Cas9基因编辑纠正MTP46G突变后,这些表型被逆转<sup>[6]</sup>。Schweitzer等报道了特发性帕金森病患者移植自体iPSCs分化而来的中脑多巴胺能祖细胞的研究。该患者的中脑多巴胺能祖细胞是在药品生产管理规范(Good Manufacturing Practice, GMP)条件下生产的,其特征是具有黑质致密部神经元的表型特性;在人源化小鼠模型中进行的测试表明,这些细胞缺乏免疫原性。这些细胞被植入帕金森病患者的大脑后,无需进行免疫抑制。植入18~24个月后,帕金森病患者的临床测量指标稳定或改善<sup>[7]</sup>。类似地,也可以通过采集患者的成体干细胞进行培养诱导体外疾病模型。例如,Huch等使用来自具有纯合Alpha1-抗胰蛋白酶(Alpha1-antitrypsin, A1AT)突变体患者的活检标本在体外培养肝类器官培养物,可以成功地在体外复制A1AT缺乏症的疾病表型<sup>[8]</sup>。

当无法进行患者体细胞收集时,可以通过第二种方法即采用基因编辑技术在野生型hESCs或者iPSCs中引入目标遗传变异,后期同样分化为疾病相关体细胞进行研究。为了证明这种方案的可行性和高效性,Ding等使用hESCs敲除模型对十多个疾病基因进行了疾病机理研究。他们在hESCs中敲除了*SORT1*(编码Sortilin 1)基因。*SORT1*与人血浆低密度脂蛋白胆固醇和冠心病风险相关。通过靶向敲除*SORT1*的外显子2或3,他们证明了两株hESC

细胞系中 SORT1 功能完全丧失, 并确定其分化而来的 HLCs 中的 SORT1 表达减少, 分泌的含 apoB 的颗粒水平降低, 血浆胆固醇水平降低, 这与预期的降低冠心病风险相吻合<sup>[9]</sup>。

## 1.2 全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)驱动的常见变异的干细胞模型构建

除单基因遗传疾病外, 人们已经通过 GWAS 和定量性状基因座 (quantitative trait locus, QTL) 等方法认识到许多常见疾病和特征表型的多基因性, 比如归因于心血管疾病风险的数百个基因座<sup>[10]</sup>。GWAS 和 QTL 方法强调了常见遗传变异对多基因疾病和定量性状的影响。因此, iPSCs 还可以用于构建源自 GWAS 中与疾病性状相关的常见遗传变异的疾病模型。特别是随着 CRISPR/Cas9 系统的广泛应用, 可以在特定的位点进行基因编辑构建单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 致病突变的细胞株。如 Warren 等<sup>[11]</sup> 将 68 例患者的 iPSCs 分化为肝细胞和脂肪细胞, 并通过转录组学和代谢组学特征研究了 1p13 rs12740374 变体对代谢疾病表型的影响。结果观察到 1p13 rs12740374 与分化的肝细胞中脂质蓄积和基因表达之间存在明确的关联, 特别是 SORT1、CELSR2 和 PSRC1 的表达。为了进一步验证该实验结果, 他们使用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术, 在 1p13 携带两个次要等位基因的细胞系中敲除了因果基因 SNP rs12740374, 所得的敲除细胞系携带了 rs12740374 和周围碱基对的缺失。这是它们与同基因亲本野生型细胞系唯一的遗传差异。将野生型和突变后的 iPSCs 分化为 HLCs, 结果观察到野生型 iPSCs 衍生的 HLCs 中 SORT1 的表达增加了 1.3 倍<sup>[11]</sup>。对其他 SNP 的初步研究也证实了其于基因表达的相关性。这些研究结果表明, 基于 iPSCs 的体外人群学研究有望作为 GWAS 验证和研究的工具平台。

## 2 代谢性疾病与肝脏疾病模型

代谢性疾病是指由于体内糖、脂肪、蛋白质、Ca<sup>2+</sup> 等物质的合成代谢和分解代谢障碍而引发的疾病, 主要包括糖尿病、血脂异常、肥胖、高血压、高钙血症和高尿酸血症等<sup>[12]</sup>。代谢性疾病主要可分为以下 2 类: (1) 遗传性代谢性疾病 (inherited metabolic diseases, IMDs): 是由于影响中间代谢途径的基因突变引起的疾病, 比如家族性高胆固醇血症、苯丙酮尿症等<sup>[13]</sup>; (2) 获得性代谢性疾病 (acquired

metabolic diseases, AMDs): 为其他系统性疾病引发的机体代谢异常, 如肝硬化、肝功能不全引起的血糖异常和高胰岛素血症<sup>[14]</sup>。

肝脏是至关重要的代谢器官, 它调节碳水化合物、脂质、蛋白质和微量元素的新陈代谢, 并清除血液中的毒素和异源生物。因此, 许多代谢性疾病累及最早和损害最重的就是肝脏<sup>[13]</sup>。目前, 虽然在许多肝脏代谢类疾病的治疗方面取得了非凡的进步, 但仍然需要对引起肝脏代谢疾病的细胞和分子病理生物学机制进行深入研究, 以提供更有效的治疗方法。

一直以来, 体外肝脏供体的匮乏限制了人们对体外肝脏疾病模型的开发, 同时也极大地限制了肝脏功能、疾病的研究及临床肝脏疾病治疗的进展<sup>[15, 16]</sup>。因此, 目前有大量的研究旨在开发更为可靠的、价格适宜且易于使用的人源肝脏模型。目前这些模型的主要缺点包括: 第一, 新鲜人肝组织供体匮乏, 分离的肝原代细胞生存能力受到限制 (通常 < 48 h)<sup>[17]</sup>。由于供体的缺乏及供体间的差异, 不仅无法进行高通量筛选实验, 也使得整体实验数据难以解释。第二, 体外可用的肝细胞系: 肝癌衍生的细胞系 (如: HepG2 和 HepRG) 和永生化的肝细胞 (采用 hTERT 和 SV40, E6 和 E7 等病毒基因永生化的肝细胞) 与原代肝细胞相比功能有限, 可能无法反映正常的生理情况<sup>[18-21]</sup>。第三, 在肝脏再生的过程中, 对于哪些特定肝细胞类群属于肝干细胞, 目前尚无定论。肝脏中的众多肝细胞均具备可重编程性<sup>[22]</sup>, 它们在肝脏的修复过程中共同起作用<sup>[23-25]</sup>。目前已有许多研究采用含有肝再生期间体内细胞外基质产生的相关因子来扩增原代肝细胞<sup>[16]</sup>。这些体外培养人肝原代细胞的培养基, 大部分都是基于 Huch 等的人肝中胆管来源细胞长期扩增的条件培养基的基础上进行改进和优化而来<sup>[8]</sup>。这些类型的培养基可以让人原代肝细胞以每代 3 倍左右的数量扩增, 可传代次数约为 8 代, 其优势在于扩增后的肝细胞在采用促成熟培养基 3D 培养后, 可以较大程度地恢复肝脏的特异性和肝细胞功能, 但其主要面临的问题是培养基价格昂贵, 肝细胞可扩增代数及数量依然有限等问题<sup>[26]</sup>。所有这些限制因素亟需在体外开发更好和更有效的人类实验模型来解决。

### 2.1 iPSCs 肝脏疾病模型构建

#### 2.1.1 HLCs

将来源于特定疾病遗传背景患者的 iPSCs 诱导

为 HLCs, 可以提供具有特定基因突变的体外肝细胞系, 而无需使用基因编辑工具。目前已经开发了有效的标准化方案, 基于肝脏本体论的三步策略并遵循肝脏发育的自然阶段, 将来自患者的血细胞或人成纤维细胞等多种不同的体细胞重编程而来的 iPSCs 诱导为 HLCs<sup>[27]</sup>。HLCs 的优点在于: (1) 起始人多能干细胞具备较强的增殖能力, 因而可提供大量的细胞原材料供后期基础科研和药物筛选; (2) 起始人多能干细胞在体外分化为肝脏细胞的过程可在一定程度上模拟体内发育过程, 因而可用于模拟肝脏疾病的不同发生阶段; (3) 具备不同个体的遗传背景, 同时具备很强的基因编辑操作性, 提供了一个细胞平台来测试遗传变异的生物学影响<sup>[28]</sup>。

然而, 迄今为止, 尚未从体外获得完全成熟的 HLCs。目前获得的 HLCs 功能仍然不成熟, 在表型上与胎肝细胞更相似: 它们显示出较低的白蛋白生成、细胞色素 P450 酶活性和尿素循环活性, 另外持续表达高水平的甲胎蛋白(肝脏细胞不成熟的标志物)。尽管这些细胞的代谢谱和酶活性可能足以提供毒性测试和药物研究的人体体外模型, 但在 iPSCs 衍生的 HLCs 进入临床应用之前, 必须优化分化方案使之能够完全分化为成熟肝细胞<sup>[29]</sup>。

### 2.1.2 肝脏三维(3D)类器官

干细胞技术的另一项最新进展是可以产生类器官。几种不同来源(iPSCs、胚胎干细胞、成体干细胞和组织来源)的干细胞均可以组成 3D 类器官培养系统<sup>[30]</sup>。3D 培养更好地保留了细胞间接触的优势, 从而使细胞彼此直接相互作用并自我聚集成细胞组织。目前, 大多数方法是基于基质胶培养 iPSCs 衍生的肝类器官或成年肝组织生成的类器官。

由于该类型类器官为干细胞直接定向分化、自组装而形成, 因此可为有关人类发育和器官再生的潜在机制提供有价值的信息, 其在基础生物学研究中的价值突出。与其他模型相比, 小鼠是最常用于探索人类生物学和疾病的动物模型系统之一。然而, 随着 CRISPR-Cas9 介导的精确基因组编辑技术的发展, 解决人类疾病相关问题的常规转基因小鼠模型的生成通常也需要一年多的时间。与动物模型相比, 类器官模型建立研究平台所需的时间更短, 可以在几周或几个月内以很高的成功率建立人类器官培养物, 从而支持使用患者来源的类器官在精准医学中提供强大的个性化数据, 包括个体突变谱和药物反应。此外, 含有多种细胞的类器官、大规模生产类

器官的培养平台、基于类器官的高内涵筛选平台以及微型芯片上的微类器官平台也正在被不断地开发中<sup>[31, 32]</sup>。例如, Takebe 团队开发了 hESC 或 iPSC 衍生的含有 4 种肝脏细胞类型(肝实质细胞、星状细胞、胆管细胞和 Kupffer 细胞)的 3D 肝脏类器官, 用于模拟非酒精性脂肪性肝炎并进行药物筛选<sup>[33]</sup>。Brandenberg 等针对干细胞类器官在基质胶中培养缺乏标准化和质量控制而妨碍了其在工业规模上的常规使用等问题, 开发了用聚乙二醇(PEG)水凝胶膜模制成的 U 形微腔阵列。然后, 通过将所需的生物活性配体与其他惰性凝胶网络缀合改变孔内水凝胶的生物化学性质, 或通过用基质填充微腔等方法, 将组织捕获嵌入 3D U 形微腔阵列中, 从而实现大量类器官的实时分析, 为大规模筛选方法提供了新途径<sup>[34]</sup>。Mun 等针对目前缺乏可以在体外长期保存的生理和病理相关肝模型, 开发了一种培养基 HM, 培养出可扩展且功能成熟的人 iPSCs 衍生的 HLC 类器官。这种可扩增的类器官能自我更新、快速增殖和成熟、低温保存后仍可以长期储存并具备良好的生存能力<sup>[28]</sup>。

由于类器官技术的发展仍处于起步阶段, 仍需克服许多挑战。例如: 在 iPSCs 衍生的类器官中, 广泛的多细胞类型的共培养系统尚未建立。类器官的建立和质量控制尚未全球标准化。另外, 类器官的成本虽然低于小鼠或鱼类模型, 但与传统细胞系、果蝇、酵母或蠕虫模型相比, 它们仍然相对昂贵。

### 2.1.3 3D生物打印模型

生物材料的 3D 打印或 3D 生物打印是一个快速发展的领域, 在组织工程和再生医学中具有潜在的应用价值。生物打印机使用细胞和生物相容性材料作为墨水(生物墨水), 用可控的方式以微米级分辨率来构建代表器官和组织的 3D 结构。最新研究表明, 通过 hESC 和 hiPSCs 分化获得的细胞可作为生物打印的人类 3D 模型的构件, 从而再现真实组织的细胞多样性和细胞结构<sup>[35]</sup>。

尽管采用 3D 打印生物加工方法构建 iPSCs 细胞系统具有巨大潜力, 但目前仅有少数文献描述了基于 iPSCs 的 3D 生物打印构建体, 主要是由于 iPSCs 的一些特殊特征使生物打印对此类细胞具有挑战性。首先, iPSCs 作为单细胞在培养中显示出较差的存活率, 而单细胞解离是大多数生物打印程序中的必要步骤。其次, 由于 iPSCs 作为能够对发育信号做出响应的人多能干细胞, 对环境的细微变

化具有高度的响应能力。第三, iPSCs 由于其上皮特性而倾向于形成簇或集落。当使用基于喷嘴的生物打印方法时, 必须考虑这种倾向<sup>[36]</sup>。

最近 Yu 等报道了通过 3D 打印构建 iPSCs 衍生的肝细胞模型。他们采用了一种方法能在保持细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 支架的结构、机械和生化特性的同时去除细胞, 从而保留天然 ECM 的固有生化成分和超微结构的脱细胞外基质 (decellularized extracellular matrix, dECM)。dECM 具有促进体内组织修复和再生的能力, 还可以指导和调节包括增殖和分化在内的细胞反应。在 3D 打印 iPSCs 衍生的肝细胞模型时, 首先将人 iPSCs 分化为肝实质细胞, 然后将其与组织特异性可光交联的 dECM 生物墨水组合。另外, 他们还设计了概括肝组织的关键组学特征的数字模型, 并将其输入基于数字光处理的快速 3D 生物打印机中, 创建了具有仿生微体系结构的肝组织构建体<sup>[37]</sup>。

总而言之, 3D 生物打印技术和材料的进步为这些方法应用于人类多能干细胞提供了可能性。虽然目前 hiPSCs 衍生的生物打印构建体的例子相对较少, 但可以想象将来会有更多相关应用。

#### 2.1.4 生物工程化模型

将来, 对于慢性肝病、肝脏移植的更永久替代方法可能包括生物工程肝移植。组织工程学策略已被用于构建包括肝脏在内的许多组织的生物替代品。已经试验了各种支架, 主要关注天然器官脱细胞后的异种肝支架。同样, 这些支架的重新细胞化需要大量、易于获得的、功能强大的肝细胞或类肝细胞。迄今为止, 仅对 iPSCs 来源的 HLCs 进行了整个肝支架的再细胞化测试, 异位移植后的结果令人鼓舞。

最近, 匹兹堡大学的 Takeishi 等使用 iPSCs 诱导的人肝细胞、胆管上皮细胞和血管内皮细胞生成了功能型工程化的人微型肝, 其显微结构与肝相似。该团队采用 Triton X-100 将肝脏进行脱细胞, 产生脱去细胞的肝脏支架, 再将转基因的人 iPSCs 衍生的肝细胞、胆管细胞和血管内皮细胞以及间充质基质细胞和成纤维细胞一起移植到空的肝支架中, 对去细胞肝的胆管、实质和血管腔进行再填充重建肝脏的微结构。最后, 将人微型肝移植入免疫缺陷大鼠模型 (*IL2rg*<sup>-/-</sup>) 中后, 在体维持了 4 天的肝脏功能<sup>[38]</sup>。该研究提供了机会来探讨营养和器官结构样微环境在每个 hiPSCs 衍生的肝细胞类型 (肝细

胞、胆管细胞和血管内皮细胞) 中的作用。多细胞成分和营养变化的作用都会影响肝脏的分化和成熟。在组装的 hiPSCs 生物工程肝脏中肝组织仍未成熟, 但某些功能 (尿素的产生) 得到了显著改善。这项研究的局限性在于所用的肝细胞团块小, 并且移植后生成的血管很少。未来的研究关键是 hiPSCs 衍生的肝移植在体内的进一步成熟以及胆小管和肝动脉血流的建立。

以上各类型的肝脏疾病模型 (图 1) 优缺点见表 1。

#### 2.2 肝脏代谢疾病模型

人多能干细胞衍生的肝脏模型为肝病研究提供了新的机会。从患者的体细胞重编程而来的 iPSCs 肝脏模型保留了个体的遗传背景, 包括单基因疾病或由于 SNP 位点差异引起特定疾病的突变。此外, 利用 CRISPR-Cas9 技术有助于准确引入和校正此类基因突变, 以研究其功能、致病性以及靶向疗法的关联。表 2 列出了目前从 iPSCs 衍生而来的肝脏模型进行代谢类疾病研究的一些进展, 不仅包括部分易感基因突变引发的一些常见的遗传型肝脏代谢疾病, 如家族性高胆固醇血症是由 *LDLR*、*APOB* 或 *PCSK9* 基因突变引起的代谢疾病。还包括一些罕见的遗传型代谢疾病, 如 mtDNA 消耗综合症、原发性高草酸尿症 1 型等。此外, 还包括部分不仅与易感基因相关, 还与个体饮食、运动、环境等因素相关的肝脏代谢疾病, 如非酒精性脂肪性肝病的疾病模型。

### 3 采用群体 iPSCs 进行体外遗传学及肝脏代谢功能方面的研究

在 iPSCs 出现之前, 人类遗传学和人类细胞生物学的机制研究是相互独立的领域。人类细胞生物学的分子机制最常使用永生化细胞系进行研究。这些细胞核型异常, 且通常与它们最初起源的原代细胞类型几乎没有相似之处。而人类遗传学的研究主要通过临床中评估各种特征的人类受试者。在过去的十年中, 对大规模临床数据, 通过 GWAS 和 QTL 研究可以寻找到常见 SNP 变异与临床特征和一般性状之间的关联。

目前已有学者开发了来自大型人群的 iPSCs 集合, 他们正在对大量的 iPSCs 进行重新编程并存放以供公众使用, 如 NextGen 联盟。不仅如此, 他们还使用定向分化测试了 iPSCs 提供各类补充细胞资源的能力, 以支持强大的种群基因组学和功能基因

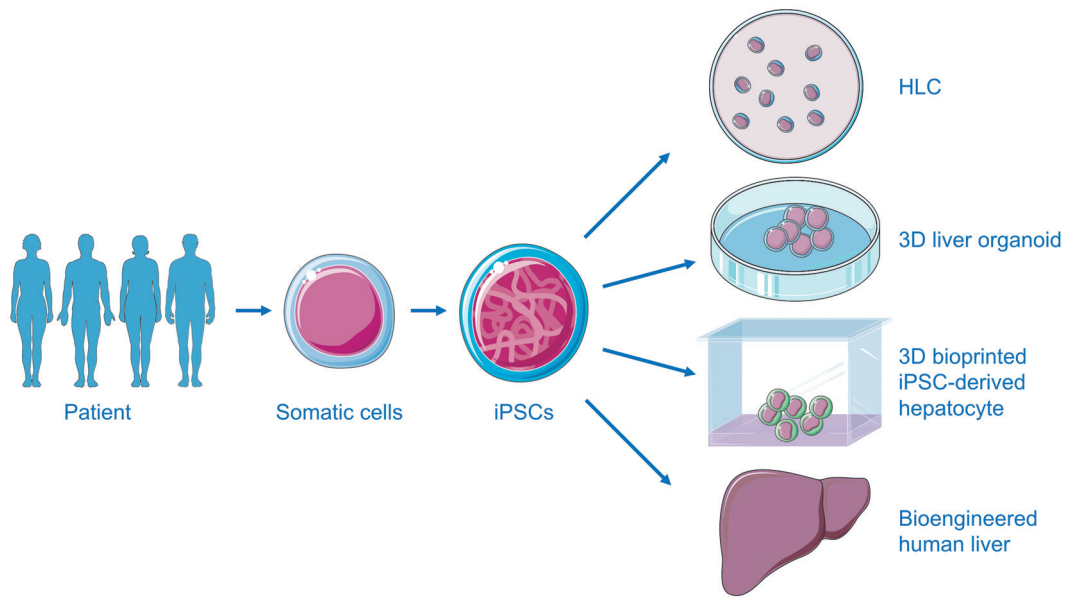


图 1. 人多能干细胞肝脏模型的构建

Fig. 1. Construction of human pluripotent stem cell liver model. iPSCs: induced pluripotent stem cells; HLC: hepatocyte-like cell.

表1. 各类型肝脏模型特点对比

Table 1. Comparison of characteristics of various liver models

	材料获得 难易程度	体系维 持时间	增殖能力	肝脏特异性、 功能保留	基因操纵	全基因 组筛选	模拟复 杂肝病
全肝/活检肝切片 <sup>[17]</sup>	较难	≤48 h	弱	48 h内保留	×	×	√
原代肝细胞 <sup>[17]</sup>	较难	≤48 h	弱	48 h内保留	×	×	√
肝癌衍生的细胞系 <sup>[18, 19]</sup>	容易	长期	强	不足	√	√	×
永生化的肝细胞 <sup>[20, 21]</sup>	容易	长期	强	不足	√	√	×
扩增培养的人肝细胞 <sup>[16, 26]</sup>	容易	长期	强	不足	√	√	×
扩增肝细胞培养的各类器官 <sup>[16]</sup>	容易	长期	弱	保留	√	√	×
转分化肝脏类器官 <sup>[39]</sup>	容易	长期	强	不足	√	√	×
iPSC-HLC <sup>[27]</sup>	容易	长期	强	不足	√	√	×
iPSC-HLO <sup>[28]</sup>	容易	长期	强	不足	√	√	√
3D打印肝脏 <sup>[36]</sup>	容易	长期	强	不足	√	√	√
生物工程肝 <sup>[38]</sup>	容易	长期	弱	不足	√	√	√

iPSC: induced pluripotent stem cell; HLC: hepatocyte-like cell; HLO: hepatocyte-like liver organoids.

组学实验工具包<sup>[47]</sup>。如上文所提及的 Warren 等<sup>[11]</sup>实验已经证明了体外 iPSCs 疾病建模可以模拟单基因或 SNP 变异产生的细胞表型。Pashos 等<sup>[48]</sup>更进一步，通过采集人群 iPSCs 样本进行体外控制数量性状表达位点 (expression quantitative trait locus, eQTL) 研究。这项原理验证研究准确地重塑了体内表型，证实了采用体外方法执行生物学相关的 eQTL 的可行性。他们在 iPSC-HLC 和 iPSC 衍生的心肌细胞 (iPSC-CM) 中均发现了新的 eQTL 基因座，并研究

了相关的部分分子机制。这些研究证明了采用大型人群的 iPSCs 集合进行体外遗传学研究的可行性。

除了可用于开展体外 GWAS、eQTL 研究，大型人群的 iPSCs 集合还可以用于代谢组性状研究及区分功能性细胞类型的研究，即进行代谢组 QTL (metabolome Quantitative Trait Locus, mQTL) 或功能性 QTL (functional Quantitative Trait Locus, fQTL) 研究，以探索常见遗传变异产生的代谢差异或对特定细胞类型的特异性作用。与传统人类遗传学研究相

表2. iPSCs肝脏代谢疾病模型

Table 2. iPSCs-derived liver metabolism diseases model

代谢性疾病	疾病表型及症状	易感基因或病理机制	模型构建	模型表型	参考文献
家族性高胆固醇血症	严重的高胆固醇血症，导致心血管致心血管疾病	LDLR基因突变，导致肝脏清除血浆LDL颗粒的能力下降	患者iPSC-HLC	载脂蛋白B (apoB)颗粒清除下调	[40]
异常蛋白血症 (Abetalipoproteinemia, ABL)	apoB分泌减少，脂肪吸收不良，低胆固醇血症	PCSK9基因突变引起。PCSK9是胆固醇稳态的关键调节因子。PCSK9功能获得(GOF)突变与高胆固醇血症和过早的动脉粥样硬化相关，而PCSK9功能丧失(LOF)突变具有心脏保护作用，但在某些情况下可导致家族性低脂蛋白血症	患者iPSC-HLC	高胆固醇血症个体的iPSC-HLC在培养基中分泌的PCSK9较少，LDL摄取减少；低脂蛋白血症患者的iPSC-HLC，PCSK9分泌减少，LDL摄取增加	[41]
Tangier病(Tangier disease, TD)	减弱胆固醇外流，HDL形成缺陷	脂蛋白代谢的遗传性疾病，是由微粒体甘油三酸酯转移蛋白突变引起	患者iPSC-HLC和CRISPR/Cas9基因编辑纠正MTTPR46G基因后的iPSC-HLC	apoB稳定性降低和脂质在细胞内的积累基因校正后分化出的肝细胞中的脂滴积累减少，疾病表型逆转	[6]
SR-BI 突变	上调 HDL，增加心血管疾病风险	ABCA1基因突变，使得其促进胆固醇和磷脂向HDL前体载脂蛋白A-I (apoA-I)转移，启动HDL生成的作用减弱，引起胆固醇代谢、清除问题，引发动脉粥样硬化	患者iPSC-HLC	ABCA1介导的胆固醇外流减少，HDL生成减少，增加甘油三酯的分泌	[42]
		SCARB1/SR-BI基因突变，SCARB1编码清道夫受体BI类(SR-BI)，它是HDL的主要受体，在肝脏、肾上腺和生殖腺中表达。纯合子SCARB1-P376L的患者SR-BI受体数量下降，对HDL-CE的选择性摄取消除下调，因而具有极高的HDL-CE	患者iPSC-HLC	SR-BI受体丢失，HDL-CE上调	[40, 43]

续表2

代谢性疾病	疾病表型及症状	易感基因或病理机制	模型构建	模型表型	参考文献
NAFLD	脂肪肝、肝硬化、肝癌	病因复杂，其中涉及基因位点包含patatin样磷脂酶结构域的蛋白3 (PNPLA3)，跨膜6超家族成员2 (TM6SF2)，载脂蛋白3 (APOC3)，神经罐(NCAN)和蛋白磷酸酶1个调节亚基3B (PPP1R3B)	患者iPSC-HLO	脂积累，肝硬化相关基因表达	[33]
	肝脏、血浆中的SIRT1水平较低，肝脏脂积累增加	脱乙酰基酶Sirtuin-1 (SIRT-1)对NAFLD的发展起着关键作用，通过代谢调节剂的脱乙酰基作用来调节肝能量代谢。由于脂解作用受损和从头脂肪形成增加，所产生的重新填充的肝脏脂肪积累增加	SIRT-1 敲低的 iPSC-HLC	产生促炎表型的大囊脂肪变性，并且与人类NAFLD肝脏具有相似的脂质和代谢谱	[44]
Wolman病(Wolman disease, WD)	肝细胞中会大量积累脂质，产生脂肪变性、炎症和纤维化	LIPA基因突变导致的溶酶体酸性脂肪酶缺乏	患者iPSC-HLO	观察到明显的脂肪变性和僵硬。发现FGF19可减轻脂肪性肝炎表型并增加类器官的存活率	[33]
mtDNA消耗综合征	肝衰竭	DGUOK 基因缺陷，线粒体内缺乏可用的核苷酸，导致mtDNA拷贝数减少	患者iPSC-HLC	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸可通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 辅激活物1- $\alpha$ 来改善HLC的线粒体功能	[45]
原发性高草酸尿症I型	草酸盐过量产生，草酸盐与钙形成复合物，在尿道中形成不溶性草酸钙盐，最终导致终末期肾脏疾病	罕见的肝脏代谢常染色体隐性遗传疾病，由于过氧化物酶体酶丙氨酸：乙醛酸氨基转移酶(AGT)的功能缺陷所致	PH1-iPSC采用慢病毒对AGT进行遗传修饰后分化为HLC	它们在肝特异性分化过程后在RNA和蛋白质水平上都表现出显著的AGT表达	[46]

LDL: 低密度脂蛋白, low density lipoprotein; HDL: 高密度脂蛋白, high density lipoprotein; iPSC-HLC: 多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)衍生的肝细胞样细胞 (hepatocyte like cell, HLC); NAFLD: 非酒精性脂肪性肝病, non-alcohol fatty liver disease; HDL-CE: 高密度脂蛋白胆固醇; HLO: 肝细胞类器官, hepatocyte-like liver organoids。



比, 该研究设计的显著优势是具备大量的可用于代谢组或功能测定的细胞材料。例如, Warren 等在 iPSC-HLC 和 iPSC-CM 中均进行了 mQTL 和 fQTL 研究, 确定了与细胞内积累的代谢物和电生理特性相关的基因座<sup>[47]</sup>。

#### 4 iPSCs 疾病模型驱动的药物研发

基于 iPSC 衍生的疾病模型和 GWAS、QTL 研究进展, 我们可以描绘其服务于新药研发的蓝图 (图 2)。新药研发分为四期, 在第一个时期即临床前实验阶段就可以采用群体 iPSC-HLC 等模型及 GWAS 和 QTL 研究, 筛选出疾病的易感基因和易感位点, 从而针对这些位点筛选设计新药<sup>[48, 49]</sup>。

在新药研发的第二个时期 (即临床 I 期, 以少数健康志愿者为主要受试对象, 研究新药的安全性和耐受性) 之前, 即可在培养皿中进行 0.5 期试验, 将重点放在细胞毒性筛查上, 即可利用 iPSCs 群体衍生的肝脏、心肌细胞、神经细胞群体筛选排除可能引发肝毒性、心脏毒性、神经系统毒性或其他毒副作用的药物<sup>[50, 51]</sup>。以免在后期更昂贵的临床试验阶段中使用心脏、神经或肝毒性药物。同时, 可以筛选人群中与药物敏感性差异、细胞毒性差异相关的 SNPs 位点并作为临床实验的 0.5 期筛查, 从而有可能提高药物安全性测试的准确性。

尽管目前还没有针对大型 iPSCs 进行真正的 0.5 期临床试验, 但仍有许多模型系统可用于测试心脏、肝或神经毒性的模型系统。如 iPSC-CM 毒性评价模型系统较为常见。因为 iPSC-CM 分化方案在许

多细胞系中都稳定且高效<sup>[52]</sup>。Burnett 等通过来自健康供体的 43 种 iPSC-CM 系列产品, 评估了 137 种化学品 (药品、工业和环境化学品以及食品成分), 并证明了这种基于群体的体外模型在大量药物和化学药品的筛选中, 反映心脏毒性、剂量效应和种群变异方面的可行性<sup>[53]</sup>。另外, 一项药物基因组学研究表明, iPSC-CM 的 RNA 测序可预测对罗格列酮和他克莫司的反应和心脏毒性。该实验可以用作未来基于 iPSCs 的患者分层的模型<sup>[54]</sup>。

关于 iPSCs 应用于肝毒性筛选的方案, 近期 Bircsak 等报道了采用高通量 3D 微流控肝芯片的开发、自动化和验证肝毒性筛查方法。该模型由 iPSCs 衍生的肝细胞 (iHep) 接种于芯片的器官通道的细胞外基质中, 并与内皮细胞和 Kupffer 样免疫细胞共培养。稳定培养 15 天的细胞具备较好的生存力、肝功能和成熟度。采用包含 159 种已知具备初始肝脏相关毒理学研究的小型化合物库用于剂量毒性反应评估, 可根据毒理学优先排序分数对化合物进行筛选和排序。他们发现, 该芯片中表现出毒性的前 30 个化合物数据与先前发布的药物性肝损伤 (drug-induced liver injury, DILI) 分类的数据集基本一致<sup>[55]</sup>。

Kamata 等使用 iPSCs 及其分化而来的神经祖细胞 (neural progenitor cells, NPC) 评估 35 种具有发育神经毒性 (developmental neurotoxicity, DNT) 的化学品。结果表明, iPSCs 和 NPC 对大多数 DNT 化学物质比 Cos-7 和 HepG2 细胞敏感性更强, 该评估和分类方案用于评估 DNT 化学药品和临床前 DNT 测

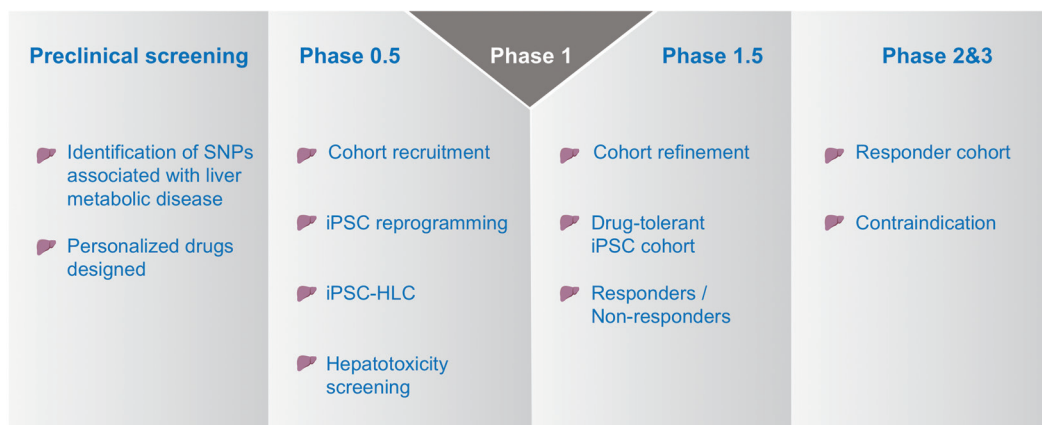


图 2. iPSCs 疾病模型驱动的药物研发

Fig. 2. Drug development driven by iPSCs disease model. iPSC: induced pluripotent stem cell; HLC: hepatocyte-like cell; SNP: single nucleotide polymorphism.

试具备有效性和实用性<sup>[56]</sup>。Vatine 等<sup>[57]</sup>使用器官芯片技术创建了 iPSCs 衍生的脑微血管内皮样细胞、星形胶质细胞和神经元的人类血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 芯片。BBB 芯片准确预测了药物的血脑通透性, 可用于药物神经毒性的测试及疾病造模, 来源于不同个体的 BBB 芯片可以反映个体间药物作用的差异性, 从而有助于支持新药的开发。

在新药研发的第三个时期 (即临床 II 期, 在数百名患者身上进行的药物治疗作用的初步评价) 之前, 通过使用大样本量的 iPSCs 和 iPSCs 衍生的功能细胞进行体外 GWAS 和 QTL 研究。这些研究有可能发现常见遗传变异对细胞表型的影响, 并揭示常见遗传疾病的分子基础。以此为基础, 进行 1.5 期临床试验: 通过对大量 iPSCs 进行测试, 以预先确定可能对药物有反应的患者。即从 1.5 期开始将患者分层筛选, 排除不太可能对给定药物产生反应的患者, 从而将注意力集中在可能有反应的敏感人群上, 达到提高新药临床前实验的准确率, 降低昂贵的临床实验费用的目的<sup>[58]</sup>。例如 Kondo 等利用 iPSCs 衍生的神经元进行药物筛选, 可以区分阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 中的药物高敏反应者和低敏反应者。通过采用家族型 AD (fAD) 患者和散发型 AD (sAD)<sup>[59]</sup> 患者 iPSCs 衍生的神经元, 高通量测试了 1 258 种药物化合物, 以筛选和评估 AD 治疗的候选药物。经过两轮筛选, 发现三种化合物 (溴隐亭、色甘酚和托吡酯) 的混合物可以最有效地降低 fAD 神经元中的致病分子  $\beta$ -淀粉样蛋白 (amyloid  $\beta$ -protein, A $\beta$ ) 的 A $\beta$ 42/40 比值, 但对 sAD 神经元没有影响。这种对不同的药物反应表明 iPSCs 模型可以帮助区分 AD 中的药物高敏反应者和低敏反应者, 实现对患者的分层筛选<sup>[59]</sup>。

## 5 展望

随着干细胞肝脏疾病模型的方案不断改进发展, iPSCs 或成体干细胞衍生而来的肝脏模型已被证明是一种用于研究疾病和药物研发的潜在多功能新工具。更进一步地通过建立群体 iPSCs 细胞库, 采用 GWAS 及 QTL 等方法可以进行体外人类遗传学研究, 用于筛选人群中与疾病、药物敏感性差异、细胞毒性差异相关的疾病易感位点, 用于生理机制研究、药物筛选和评估, 以实现提高新药临床前实验的准确率, 降低耗资巨大的新药研发的周期和本的目的。

## 参考文献

- 1 Wouters OJ, McKee M, Luyten J. Estimated research and development investment needed to bring a new medicine to market, 2009-2018. *JAMA* 2020; 323(9): 844-853.
- 2 Dowden H, Munro J. Trends in clinical success rates and therapeutic focus. *Nat Rev Drug Discov* 2019; 18(7): 495-496.
- 3 Harrison RK. Phase II and phase III failures: 2013-2015. *Nat Rev Drug Discov* 2016; 15(12): 817-818.
- 4 Smith MH. Stem cell definition, classification and research history. *Stem Cell Res* 2011; 2(4): 91-93.
- 5 Hybiak J, Jankowska K, Machaj F, Rosik J, Broniarek I, Zyluk A, Hilderman GC, Malecki A, Los MJ, Urasinska E. Reprogramming and transdifferentiation - two key processes for regenerative medicine. *Eur J Pharmacol* 2020; 882: 173202.
- 6 Liu Y, Conlon DM, Bi X, Slovik KJ, Shi J, Edelstein HI, Millar JS, Javaheri A, Cuchel M, Pashos EE, Iqbal J, Hussain MM, Hegele RA, Yang W, Duncan SA, Rader DJ, Morrissey EE. Lack of MTP activity in pluripotent stem cell-derived hepatocytes and cardiomyocytes abolishes apoB secretion and increases cell stress. *Cell Rep* 2017; 19(7): 1456-1466.
- 7 Schweitzer JS, Song B, Herrington TM, Park TY, Lee N, Ko S, Jeon J, Cha Y, Kim K, Li QZ, Henchcliffe C, Kaplitt M, Neff C, Rapalino O, Seo H, Lee IH, Kim J, Kim T, Petsko GA, Ritz J, Cohen BM, Kong SW, Leblanc P, Carter BS, Kim KS. Personalized iPSC-derived dopamine progenitor cells for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2020; 382(20): 1926-1932.
- 8 Huch M, Gehart H, van Boxtel R, Hamer K, Blokzijl F, Verstegen MM, Ellis E, van Wenum M, Fuchs SA, de Ligt J, van de Wetering M, Sasaki N, Boers SJ, Kemperman H, de Jonge J, Ijzerman JN, Nieuwenhuis EE, Hoekstra R, Strom S, Vries RR, van der Laan LJ, Cuppen E, Clevers H. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell* 2015; 160(1-2): 299-312.
- 9 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.
- 10 Kathiresan S, Srivastava D. Genetics of human cardiovascular disease. *Cell* 2012; 148(6): 1242-1257.
- 11 Warren CR, O'Sullivan JF, Friesen M, Becker CE, Zhang X,

- Liu P, Wakabayashi Y, Moringstar JE, Shi X, Choi J, Xia F, Peters DT, Florido MHC, Tsankov AM, Duberow E, Comisar L, Shay J, Jiang X, Meissner A, Musunuru K, Kathiresan S, Daheron L, Zhu J, Gerszten RE, Deo RC, Vasani RS, O'Donnell CJ, Cowan CA. Induced pluripotent stem cell differentiation enables functional validation of GWAS variants in metabolic disease. *Cell Stem Cell* 2017; 20(4): 547–557.
- 12 Cota-Coronado A, Ramirez-Rodriguez PB, Padilla-Camberos E, Diaz EF, Flores-Fernandez JM, Avila-Gonzalez D, Diaz-Martinez NE. Implications of human induced pluripotent stem cells in metabolic disorders: from drug discovery toward precision medicine. *Drug Discov Today* 2019; 24(1): 334–341.
- 13 Guilder L, Pula S, Pierre G. Metabolic disorders presenting as liver disease. *Paediatr Child Health* 2017; 27(12): 533–539.
- 14 Cheng Z, Zheng L, Almeida FA. Epigenetic reprogramming in metabolic disorders: nutritional factors and beyond. *J Nutr Biochem* 2018; 54: 1–10.
- 15 Azuma H, Paulk N, Ranade A, Dorrell C, Al-Dhalimy M, Ellis E, Strom S, Kay MA, Finegold M, Grompe M. Robust expansion of human hepatocytes in *Fah<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>/Il2rg<sup>-/-</sup>* mice. *Nat Biotechnol* 2007; 25(8): 903–910.
- 16 Zhang K, Zhang L, Liu W, Ma X, Cen J, Sun Z, Wang C, Feng S, Zhang Z, Yue L, Sun L, Zhu Z, Chen X, Feng A, Wu J, Jiang Z, Li P, Cheng X, Gao D, Peng L, Hui L. *In vitro* expansion of primary human hepatocytes with efficient liver repopulation capacity. *Cell Stem Cell* 2018; 23(6): 806–819.
- 17 March S, Ramanan V, Trehan K, Ng S, Galstian A, Gural N, Scull MA, Shlomai A, Mota MM, Fleming HE, Khetani SR, Rice CM, Bhatia SN. Micropatterned coculture of primary human hepatocytes and supportive cells for the study of hepatotropic pathogens. *Nat Protoc* 2015; 10(12): 2027–2053.
- 18 Gerets HH, Tilmant K, Gerin B, Chanteux H, Depelchin BO, Dhalluin S, Atienzar FA. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol Toxicol* 2012; 28(2): 69–87.
- 19 Andersson TB, Kanebratt KP, Kenna JG. The HepaRG cell line: a unique *in vitro* tool for understanding drug metabolism and toxicology in human. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2012; 8(7): 909–920.
- 20 Levy G, Bomze D, Heinz S, Ramachandran SD, Noerenberg A, Cohen M, Shibolet O, Sklan E, Braspenning J, Nahmias Y. Long-term culture and expansion of primary human hepatocytes. *Nat Biotechnol* 2015; 33(12): 1264–1271.
- 21 Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, Inoue Y, Sakaguchi M, Noguchi H, Miyazaki M, Cai J, Tanaka N, Fox JJ, LeBoulch P. Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. *Science* 2000; 287(5456): 1258–1262.
- 22 Kopp JL, Grompe M, Sander M. Stem cells versus plasticity in liver and pancreas regeneration. *Nat Cell Biol* 2016; 18(3): 238–245.
- 23 Sun T, Pikiolek M, Orsini V, Bergling S, Holwerda S, Morelli L, Hoppe PS, Planas-Paz L, Yang Y, Ruffner H, Bouwmeester T, Lohmann F, Terracciano LM, Roma G, Cong F, Tchorz JS. AXIN2<sup>+</sup> pericentral hepatocytes have limited contributions to liver homeostasis and regeneration. *Cell Stem Cell* 2020; 26(1): 97–107.
- 24 Matsumoto T, Wakefield L, Tarlow BD, Grompe M. *In vivo* lineage tracing of polyploid hepatocytes reveals extensive proliferation during liver regeneration. *Cell Stem Cell* 2020; 26(1): 34–47.
- 25 Chen F, Jimenez RJ, Sharma K, Luu HY, Hsu BY, Ravindranathan A, Stohr BA, Willenbring H. Broad distribution of hepatocyte proliferation in liver homeostasis and regeneration. *Cell Stem Cell* 2020; 26(1): 27–33.
- 26 Garnier D, Li R, Delbos F, Fourrier A, Collet C, Guguen-Guillouzo C, Chesne C, Nguyen TH. Expansion of human primary hepatocytes *in vitro* through their amplification as liver progenitors in a 3D organoid system. *Sci Rep* 2018; 8(1): 8222.
- 27 Hannan NR, Segeritz CP, Touboul T, Vallier L. Production of hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2013; 8(2): 430–437.
- 28 Mun SJ, Ryu JS, Lee MO, Son YS, Oh SJ, Cho HS, Son MY, Kim DS, Kim SJ, Yoo HJ, Lee HJ, Kim J, Jung CR, Chung KS, Son MJ. Generation of expandable human pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like liver organoids. *J Hepatol* 2019; 71(5): 970–985.
- 29 Jaafarpour Z, Soleimani M, Hosseinkhani S, Geramizadeh B, Yaghmaei P, Mobarra N, Karimi MH. Overexpression of microRNA-375 and microRNA-122 promotes the differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells. *Biologicals* 2020; 63: 24–32.
- 30 Hendriks D, Clevers H, Artegiani B. CRISPR-Cas tools and their application in genetic engineering of human stem cells and organoids. *Cell Stem Cell* 2020; 27(5): 705–731.
- 31 Kim J, Koo BK, Knoblich JA. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21(10): 571–584.
- 32 Jang KJ, Otieno MA, Ronxhi J, Lim HK, Ewart L, Kodella KR, Petropolis DB, Kulkarni G, Rubins JE, Conegliano D, Nawroth J, Simic D, Lam W, Singer M, Barale E, Singh B, Sonee M, Streeter AJ, Manthey C, Jones B, Srivastava A,

- Andersson LC, Williams D, Park H, Barrile R, Sliz J, Herland A, Haney S, Karalis K, Ingber DE, Hamilton GA. Reproducing human and cross-species drug toxicities using a Liver-Chip. *Sci Transl Med* 2019; 11(517): eaax5516.
- 33 Ouchi R, Togo S, Kimura M, Shinozawa T, Koido M, Koike H, Thompson W, Karns RA, Mayhew CN, McGrath PS, McCauley HA, Zhang RR, Lewis K, Hakozaki S, Ferguson A, Saiki N, Yoneyama Y, Takeuchi I, Mabuchi Y, Akazawa C, Yoshikawa HY, Wells JM, Takebe T. Modeling steatohepatitis in humans with pluripotent stem cell-derived organoids. *Cell Metab* 2019; 30(2): 374–384.
- 34 Brandenberg N, Hoehnel S, Kuttler F, Homicsko K, Ceroni C, Ringel T, Gjorevski N, Schwank G, Coukos G, Turcatti G, Lutolf MP. High-throughput automated organoid culture via stem-cell aggregation in microcavity arrays. *Nat Biomed Eng* 2020; 4(9): 863–874.
- 35 Salaris F, Rosa A. Construction of 3D *in vitro* models by bioprinting human pluripotent stem cells: Challenges and opportunities. *Brain Res* 2019; 1723: 146393.
- 36 Yang H, Sun L, Pang Y, Hu D, Xu H, Mao S, Peng W, Wang Y, Xu Y, Zheng YC, Du S, Zhao H, Chi T, Lu X, Sang X, Zhong S, Wang X, Zhang H, Huang P, Sun W, Mao Y. Three-dimensional bioprinted hepatorganoids prolong survival of mice with liver failure. *Gut* 2021; 70(3): 567–574.
- 37 Yu C, Ma X, Zhu W, Wang P, Miller KL, Stupin J, Koroleva-Maharajh A, Hairabedian A, Chen S. Scanningless and continuous 3D bioprinting of human tissues with decellularized extracellular matrix. *Biomaterials* 2019; 194: 1–13.
- 38 Takeishi K, Collin de l'Hortet A, Wang Y, Handa K, Guzman-Lepe J, Matsubara K, Morita K, Jang S, Haep N, Florentino RM, Yuan F, Fukumitsu K, Tobita K, Sun W, Franks J, Delgado ER, Shapiro EM, Fraunhofer NA, Duncan AW, Yagi H, Mashimo T, Fox IJ, Soto-Gutierrez A. Assembly and function of a bioengineered human liver for transplantation generated solely from induced pluripotent stem cells. *Cell Rep* 2020; 31(9): 107711.
- 39 Sun L, Wang Y, Cen J, Ma X, Cui L, Qiu Z, Zhang Z, Li H, Yang RZ, Wang C, Chen X, Wang L, Ye Y, Zhang H, Pan G, Kang JS, Ji Y, Zheng YW, Zheng S, Hui L. Modelling liver cancer initiation with organoids derived from directly reprogrammed human hepatocytes. *Nat Cell Biol* 2019; 21(8): 1015–1026.
- 40 Cayo MA, Mallanna SK, Di Furio F, Jing R, Tolliver LB, Bures M, Urick A, Noto FK, Pashos EE, Greseth MD, Czarnecki M, Traktman P, Yang WL, Morrissey EE, Grompe M, Rader DJ, Duncan SA. A drug screen using human ipsc-derived hepatocyte-like cells reveals cardiac glycosides as a potential treatment for hypercholesterolemia. *Cell Stem Cell* 2017; 20(4): 478–489.e5.
- 41 Si-Tayeb K, Idriss S, Champon B, Caillaud A, Pichelin M, Arnaud L, Lemarchand P, Le May C, Zibara K, Cariou B. Urine-sample-derived human induced pluripotent stem cells as a model to study PCSK9-mediated autosomal dominant hypercholesterolemia. *Dis Model Mech* 2016; 9(1): 81–90.
- 42 Bi X, Pashos EE, Cuchel M, Lyssenko NN, Hernandez M, Picataggi A, McParland J, Yang W, Liu Y, Yan R, Yu C, DerOhannessian SL, Phillips MC, Morrissey EE, Duncan SA, Rader DJ. ATP-binding cassette transporter A1 deficiency in human induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes abrogates hdl biogenesis and enhances triglyceride secretion. *EBioMedicine* 2017; 18: 139–145.
- 43 Zanoni P, Khetarpal SA, Larach DB, Hancock-Cerutti WF, Millar JS, Cuchel M, DerOhannessian S, Kontush A, Surendran P, Saleheen D, Trompet S, Jukema JW, De Craen A, Deloukas P, Sattar N, Ford I, Packard C, Majumder AA, Alam DS, Di Angelantonio E, Abecasis G, Chowdhury R, Erdmann J, Nordestgaard BG, Nielsen SF, Tybjaerg-Hansen A, Schmidt RF, Kuulasmaa K, Liu DJ, Perola M, Blankenberg S, Salomaa V, Mannisto S, Amouyel P, Arveiler D, Ferrieres J, Muller-Nurasyid M, Ferrario M, Kee F, Willer CJ, Samani N, Schunkert H, Butterworth AS, Howson JMM, Peloso GM, Stitzel NO, Danesh J, Kathiresan S, Rader DJ, Consortium CE, Consortium CE, Consortium GLG. Rare variant in scavenger receptor BI raises HDL cholesterol and increases risk of coronary heart disease. *Science* 2016; 351(6278): 1166–1171.
- 44 Collin de l'Hortet A, Takeishi K, Guzman-Lepe J, Morita K, Achreja A, Popovic B, Wang Y, Handa K, Mittal A, Meurs N, Zhu Z, Weinberg F, Salomon M, Fox IJ, Deng CX, Nagrath D, Soto-Gutierrez A. Generation of human fatty livers using custom-engineered induced pluripotent stem cells with modifiable sirt1 metabolism. *Cell Metab* 2019; 30(2): 385–401.
- 45 Jing R, Corbett JL, Cai J, Beeson GC, Beeson CC, Chan SS, Dimmock DP, Lazcares L, Geurts AM, Lemasters JJ, Duncan SA. A screen using iPSC-derived hepatocytes reveals NAD<sup>+</sup> as a potential treatment for mtDNA depletion syndrome. *Cell Rep* 2018; 25(6): 1469–1484.
- 46 Esteve J, Blouin JM, Lalanne M, Azzi-Martin L, Dubus P, Bidet A, Harambat J, Llanas B, Moranvillier I, Bedel A, Moreau-Gaudry F, Richard E. Generation of induced pluripotent stem cells-derived hepatocyte-like cells for *ex vivo* gene therapy of primary hyperoxaluria type 1. *Stem Cell Res* 2019; 38: 101467.
- 47 Warren CR, Jaquish CE, Cowan CA. The NextGen genetic association studies consortium: a foray into *in vitro* population genetics. *Cell Stem Cell* 2017; 20(4): 431–433.
- 48 Pashos EE, Park Y, Wang X, Raghavan A, Yang W, Abbey D,

- Peters DT, Arbelaez J, Hernandez M, Kuperwasser N, Li W, Lian Z, Liu Y, Lv W, Lytle-Gabbin SL, Marchadier DH, Rogov P, Shi J, Slovik KJ, Stylianou IM, Wang L, Yan R, Zhang X, Kathiresan S, Duncan SA, Mikkelsen TS, Morrisey EE, Rader DJ, Brown CD, Musunuru K. Large, diverse population cohorts of hiPSCs and derived hepatocyte-like cells reveal functional genetic variation at blood lipid-associated loci. *Cell Stem Cell* 2017; 20(4): 558–570.
- 49 Warren CR, Cowan CA. Humanity in a dish: Population genetics with iPSCs. *Trends Cell Biol* 2018; 28(1): 46–57.
- 50 Sayed N, Liu C, Wu JC. Translation of human-induced pluripotent stem cells: from clinical trial in a dish to precision medicine. *J Am Coll Cardiol* 2016; 67(18): 2161–2176.
- 51 Kopljar I, Lu HR, Van Ammel K, Otava M, Tekle F, Teisman A, Gallacher DJ. Development of a human iPSC cardiomyocyte-based scoring system for cardiac hazard identification in early drug safety de-risking. *Stem Cell Reports* 2018; 11(6): 1365–1377.
- 52 Chen IY, Matsa E, Wu JC. Induced pluripotent stem cells: at the heart of cardiovascular precision medicine. *Nat Rev Cardiol* 2016; 13(6): 333–349.
- 53 Burnett SD, Blanchette AD, Grimm FA, House JS, Reif DM, Wright FA, Chiu WA, Rusyn I. Population-based toxicity screening in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2019; 381: 114711.
- 54 Matsa E, Burrige PW, Yu KH, Ahrens JH, Termglinchan V, Wu H, Liu C, Shukla P, Sayed N, Churko JM, Shao N, Woo NA, Chao AS, Gold JD, Karakikes I, Snyder MP, Wu JC. Transcriptome profiling of patient-specific human iPSC-cardiomyocytes predicts individual drug safety and efficacy responses *in vitro*. *Cell Stem Cell* 2016; 19(3): 311–325.
- 55 Bircsak KM, DeBiasio R, Miedel M, Alsehabi A, Reddinger R, Saleh A, Shun T, Verneti LA, Gough A. A 3D microfluidic liver model for high throughput compound toxicity screening in the OrganoPlate(R). *Toxicology* 2021; 450: 152667.
- 56 Kamata S, Hashiyama R, Hana-Ika H, Ohkubo I, Saito R, Honda A, Anan Y, Akahoshi N, Noguchi K, Kanda Y, Ishii I. Cytotoxicity comparison of 35 developmental neurotoxins in human induced pluripotent stem cells (iPSC), iPSC-derived neural progenitor cells, and transformed cell lines. *Toxicol In Vitro* 2020; 69: 104999.
- 57 Vatine GD, Barrile R, Workman MJ, Sances S, Barriga BK, Rahnama M, Barthakur S, Kasendra M, Lucchesi C, Kerns J, Wen N, Spivia WR, Chen Z, Van Eyk J, Svendsen CN. Human iPSC-derived blood-brain barrier chips enable disease modeling and personalized medicine applications. *Cell Stem Cell* 2019; 24(6): 995–1005.
- 58 Pasteuning-Vuhman S, de Jongh R, Timmers A, Pasterkamp RJ. Towards advanced iPSC-based drug development for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* 2021; 27(3): 263–279.
- 59 Kondo T, Imamura K, Funayama M, Tsukita K, Miyake M, Ohta A, Woltjen K, Nakagawa M, Asada T, Arai T, Kawakatsu S, Izumi Y, Kaji R, Iwata N, Inoue H. iPSC-based compound screening and *in vitro* trials identify a synergistic anti-amyloid beta combination for Alzheimer's disease. *Cell Rep* 2017; 21(8): 2304–2312.