

综述

类器官的研究进展

杨桃[#] 孙宇[#] 陈佳佳 刘清桂 王敏君 胡以平* 陈费*

(海军军医大学细胞生物学教研室, 上海 200433)

摘要 类器官是体外培养的由干细胞分化而来的后裔细胞所形成的具有一定空间结构的三维细胞复合体。类器官具有某些与来源器官相似的结构特征和功能特性, 而且能够在体外3D培养体系中稳定扩增。目前, 类器官在生物学基础研究、构建疾病模型、肿瘤研究、组织再生修复、基因治疗以及药物筛选等方面显示出了广阔的应用前景。该综述将简要介绍类器官培养体系的发展, 以及其在生命科学研究中的应用。

关键词 类器官; 干细胞; 三维培养; 再生医学

Advances in Organoid Technology

Yang Tao[#], Sun Yu[#], Chen Jiajia, Liu Qinggui, Wang Minjun, Hu Yiping*, Chen Fei*

(Department of Cell Biology, Naval Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract The organoids are three-dimensional cell complexes with a certain spatial structure formed by *in vitro* cultured descendant cells differentiated from organ-specific stem cells or progenitors. Organoids have certain structural and functional properties similar to those of the source organs. They are capable of stable amplification in 3D (three-dimensional) culture systems. At present, organoids have shown broad application in basic biological research, construction of disease models, tumor research, tissue regeneration and repair, gene therapy, and drug screening. This review will briefly introduce the development of organoid culture systems and their applications in life science research.

Keywords organoids; stem cell; three-dimensional culture; regenerative medicine

类器官(organoids)是在体外用3D培养技术对干细胞或器官祖细胞进行诱导分化形成的在结构和功能上都类似目标器官或组织的三维细胞复合体, 其具有稳定的表型和遗传学特征, 能够在体外长期培养。它在形成过程中再现了体内器官发生的两个事件, 即同类细胞以黏附的方式分类聚集(cell sorting)和空间特异性的细胞谱系定型(spatially restricted

lineage commitment)^[1]。与传统2D细胞培养模式相比, 3D培养类器官包含多种细胞类型, 突破了细胞间单纯的物理接触联系, 形成了更加紧密的细胞间生物通信, 细胞间相互影响、诱导、反馈^[2], 协作发育并形成具有功能的迷你器官或组织, 能更好地用于模拟器官组织的发生过程及生理病理状态, 因而在基础研究以及临床诊疗方面具有广阔的应用前景。

收稿日期: 2018-09-13 接受日期: 2018-11-14

国家自然科学基金(批准号: 31701186)和上海市科委扬帆计划(批准号: 17YF1424400)资助的课题

[#]共同第一作者

*通讯作者。Tel: 021-81870945, E-mail: yphu@smmu.edu.cn; twinkky@163.com

Received: September 13, 2018 Accepted: November 14, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31701186) and Shanghai Sailing Program (Grant No.17YF1424400)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding authors. Tel: +86-21-81870945, E-mail: yphu@smmu.edu.cn; twinkky@163.com

网络出版时间: 2019-04-01 11:45:33

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190401.1145.018.html>

1 类器官研究简史

类器官一词最早于1946年出现在皮样囊肿(dermoid cysts)的研究中^[3], 20世纪60年代后主要用于描述经典发育生物学实验研究中细胞分类聚集和重聚(reaggregation)的器官培养^[4]。类器官研究的第一次热潮是在1965~1985年间, 主要用于探究器官发生(organogenesis)的经典发育生物学实验^[5]。早前学界对于干细胞微环境在干细胞自我更新和分化的调控和诱导方面的作用认识不深, 类器官培养需要大量起始细胞, 而且经常呈现出较低的体外活力, 不能长期培养^[6], 因而其应用一直受限。随着对干细胞微环境认识的加深以及培养体系的改进, 从2009年Sato等^[7]在无间质细胞存在的条件下得到了由肠干细胞培养形成的肠类器官开始, 类器官的研究掀起了第二次热潮并蓬勃发展。

2 类器官的培养体系

体外3D培养类器官的核心就是要了解体内干细胞微环境的组成, 然后在体外培养体系中模拟出这一体内微环境, 诱导干细胞增殖、分化形成特定的器官或组织。这一微环境一般认为由两部分构成。一是与维持干细胞自我更新和增殖分化有关的细胞生长调节因子(细胞因子或某些小分子), 比如EGF(epidermal growth factor)、Noggin和R-spondin等。根据培养的组织不同, 常添加额外的调节因子, 如小肠类器官的培养需要额外添加胃泌素、烟酰胺、TGF- β 抑制剂和p38抑制剂^[8]。其次是模拟干细胞生长微环境的细胞外基质, 比如将细胞培养在基质胶(matrigel)形成的立体空间中, 基质胶可以取代传统培养体系中的饲养层细胞(feeder cells), 为干细胞增殖分化提供三维环境, 促进3D培养的细胞聚集以及产生细胞排列的极性^[9-10]。类器官培养所需要的干细胞可以经流式分选纯化或者直接培养含干细胞的组织片段。类器官培养的主要流程是将获取的干细胞或包含干细胞的组织片段包被于基质胶中, 待其固化后添加合适的培养基, 经数天培养后形成与目的器官结构和功能相类似的细胞群体。到目前为止, 多种器官或组织正常及癌变的类器官培养体系, 比如肠^[7-8]、前列腺^[11-12]、和乳腺等^[13-14]已经建立。

3 类器官的分类

根据干细胞的不同来源, 类器官可简要分为组

织干细胞衍生的类器官、多能干细胞(包括胚胎干细胞和诱导多能干细胞)衍生的类器官和肿瘤干细胞衍生的类器官三种类型。

3.1 组织干细胞衍生的类器官

以Sato等^[7]经典的成年小鼠肠干细胞来源的类器官培养体系为例。小肠上皮分为基底部下凹的隐窝和顶部上凸的绒毛两部分, 隐窝-绒毛结构构成肠上皮的基本单元。隐窝由潘氏细胞、干细胞及其增殖形成的短暂扩增细胞(transit amplifying cells, TA细胞)组成。潘氏细胞与干细胞间隔排列。TA细胞将继续分化, 形成的子代细胞跨越隐窝-绒毛界限时决定细胞分化命运, 分为分泌型的杯状细胞、肠内分泌细胞、潘氏细胞以及吸收型的肠上皮细胞。分化细胞沿隐窝-绒毛轴向迁移, 形成绒毛结构, 最终绒毛顶部的细胞死亡后脱落入肠腔。需要指出的是, 潘氏细胞与其他分化细胞迁移方向不同, 其沿绒毛-隐窝轴向移动, 到达隐窝底部后, 调节干细胞的增殖与分化。

小肠隐窝干细胞的增殖分化受到干细胞微环境的影响。潘氏细胞及周边的间充质细胞分泌多种生长因子, 主要包括EGF(epidermal growth factor)、R-spondin和Noggin蛋白, 调控干细胞的增生与分化。EGF作为有丝分裂原, 在小肠隐窝高表达, 对干细胞和TA细胞的增殖有重要作用^[15]; Wnt信号通路是维持小肠LGR5(leucine-rich repeat containing G-protein-coupled receptor 5)阳性干细胞的干性, 促进干细胞和TA细胞的增殖的主要信号通路, 仅在隐窝区域内高表达, 潘氏细胞分泌的Wnt3a是Wnt配体的主要来源^[16-17]。R-spondin作为LGR5的配体, 与LGR5结合后增强Wnt信号通路, 激活Wnt靶基因, 促进干细胞增殖和分化; BMP(bone morphogenetic protein)信号通路作为Wnt信号通路负调节信号, 能抑制干细胞的更新与增殖^[18]。Noggin是BMP的抑制剂, 能拮抗BMP, 促进隐窝增生^[19]。

如图1所示, 小肠类器官培养首先是获得肠干细胞。Barker等^[9]证明了LGR5可以作为肠干细胞的标志物, 他们发现LGR5阳性的干细胞在体内能长期存活和增殖, 谱系示踪亦发现, LGR5阳性细胞能分化成所有种类的小肠上皮细胞。因此, 利用LGR5做标志物可分离得到小肠干细胞。另外, 由于肠干细胞定位于上皮隐窝, 也可以用分离肠组织得到的隐窝直接培养, 还可以用碎裂的小肠组织(包含间质)

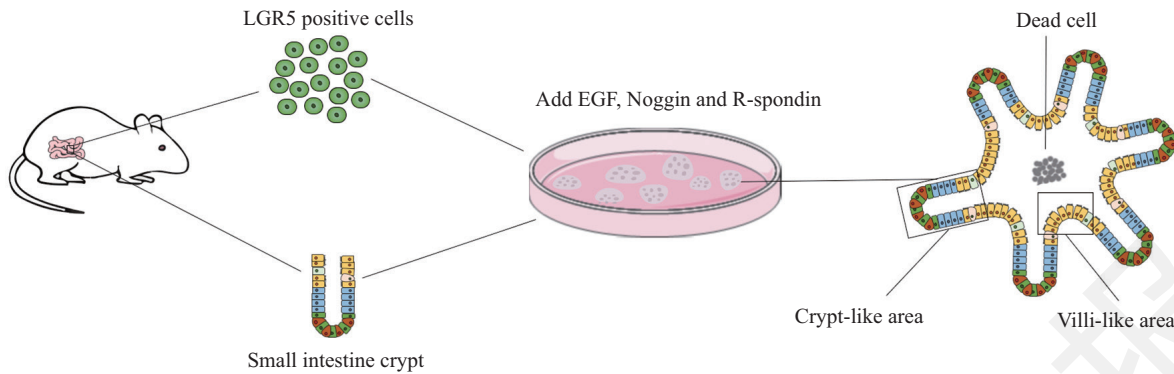


图1 小肠类器官的培养流程

Fig.1 The small intestine organoid culture process

作为干细胞的来源^[10]。其次是模拟小肠干细胞所处的细胞外基质。由于小肠隐窝底部富含层黏连蛋白 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$,用含层黏连蛋白和胶原蛋白的基质胶可以模拟小肠基底膜结构和生理性质,为肠细胞提供三维生长的环境。最后,将LGR5阳性的干细胞或隐窝包被进基质胶,然后加入含EGF、R-spondin和Noggin的培养基进行培养。

在培养期间,干细胞首先增殖形成囊状的球体结构,接着转变成隐窝样的芽状结构并在两周内逐渐形成含肠腔的迷你肠管(mini-gut),肠腔内可见大量死亡脱落的细胞。培养的肠类器官由与正常小肠上皮相同的明显分区化的隐窝-绒毛结构组成,如图1所示,包含所有种类的肠上皮功能细胞,如潘氏细胞、肠上皮细胞、肠内分泌细胞和杯状细胞。在隐窝底部,LGR5阳性的干细胞散在分布于潘氏细胞之间,数量与小鼠活体内的隐窝相似;在隐窝上部,干细胞则增殖形成TA细胞;绒毛区域则是由完全分化的带有刷状缘的肠上皮细胞组成;杯状细胞和肠内分泌细胞则散在分布于整个类器官。形成的类器官各种细胞的组成比例与正常肠上皮相同,表型和遗传性质上也很稳定,经长期连续多次传代培养,未发现表达谱的改变^[7]。

鼠小肠类器官是由单纯的干细胞生长分化而来,是干细胞体外3D培养的里程碑。经这一研究方法的启示,研究人员在小肠类器官培养体系的基础上进行探索和改进,通过添加不同器官生长发育需要的生长因子,先后建立了消化道上皮来源的其他类器官,如肝脏^[20]、胰腺^[21]、结直肠、胃^[22]和胆囊^[23]等,以及非消化道来源的其他上皮组织类器官,如肺^[24]、前列腺^[11]和乳腺^[13]等。

3.2 多能干细胞衍生的类器官

多能干细胞类器官的培养相较于成体干细胞类器官而言,需要先将多能干细胞向相应靶器官所在胚层诱导。以多能干细胞培育肠类器官为例。在肠道的发育过程中,TGF- β 超家族成员中的Nodal信号通路能促进原肠胚向内胚层发育^[25],形成的内胚层进一步发育成包含前肠(foregut)、中肠(midgut)、后肠(hindgut)的原始肠管^[26]。前肠形成口腔、肝脏、胰腺等器官,中肠形成小肠和升结肠,后肠形成直肠和余下的部分结肠。Wnt信号通路和成纤维细胞生长因子(FGF)可以抑制内胚层向前肠分化,从而向中肠和后肠发育^[27-28]。利用这些发育特性,研究人员首先利用Nodal的等效物activin A激活干细胞内TGF- β 信号通路,促使干细胞向内胚层分化。接着再添加FGF4和Wnt3a,使其特异性地向后肠分化,形成后肠球状细胞体。将形成的球状细胞体加入到前文所述的小鼠成体肠干细胞培养体系,即包埋入基质胶,添加EGF、Noggin和R-spondin,结果成功形成包含各种肠上皮细胞的成熟肠类器官^[29-30]。利用这个思路和方法,多能干细胞来源的不同组织特异性类器官相继被建立起来,如胃^[31]、肺^[11]、肝^[11]和肾^[11]等。

3.3 肿瘤干细胞衍生的类器官

在肿瘤研究中,一个重要的难题是许多已经建立的肿瘤模型反应患者真实肿瘤状态的程度较低,许多对肿瘤模型有效的药物最终在临床实践中失败^[35-36],导致很多肿瘤的基础研究成果难以转化为临床实践。目前广泛使用的肿瘤研究模型包括肿瘤细胞系和人源肿瘤组织异种移植模型PDX(patient-derived xenograft)。这两种模型都有其局限性:肿瘤细胞系在体外培养过程中,肿瘤生长的微环境缺少

了细胞基质、非肿瘤细胞等间质成分,会经历对二维培养环境广泛的适应和选择,而且经连续多次传代培养后,其遗传性质可能发生改变,不再能准确反映出原代肿瘤异质性、组织病理表现以及遗传特征;PDX是将患者来源的肿瘤组织移植到免疫缺陷的小鼠体内,依靠小鼠提供的微环境进行生长,相较于肿瘤细胞系,能够保留原代肿瘤的微环境和细胞的基本特性,但是这种模型技术难度大,成本高,培养周期长,限制了它的应用。类器官的培养方法也可以运用于肿瘤组织的培养,形成肿瘤组织来源的类器官。将取得的肿瘤组织直接培养形成类器官,其可以很好地保持肿瘤的特性。另外,也有报道另一种肿瘤类器官培养方法,即是将患者的肿瘤细胞经重编程为多能干细胞,然后再诱导分化形成与原始肿瘤相同的肿瘤细胞,再经体外3D培养形成类器官^[37]。这种方式培养肿瘤类器官的效率取决于癌组织类型或者某种特定的致瘤突变,而且,形成的类器官可能只是肿瘤的亚克隆,失去原代肿瘤的遗传异质性^[38]。肿瘤类器官的培养与成体干细胞来源的类器官培养稍有不同。以人结直肠癌类器官(colorectal cancer organoids)培养为例,因肿瘤组织存在Wnt信号通路持续性激活的突变^[39],培养过程中无需外源性加入Noggin和R-spondin蛋白,而EGF也并非为所有类型肿瘤组织必需^[8]。运用类器官的培养方法,已经有多种癌组织,包括结肠癌^[8,40]、胰腺癌^[21,37]、肝癌^[41]、前列腺癌^[12,42]、乳腺癌^[14]的类器官被建立。这些培养形成的肿瘤类器官在表型和遗传性质上与原始肿瘤组织十分相像,在探究肿瘤形成的机理及治疗上将发挥巨大的作用。

4 类器官的应用

类器官培养作为一个技术体系和研究方式,联合多种新兴实验技术,如单细胞测序和基因编辑等,可以从分子水平、细胞水平和器官水平等不同角度对生命活动带来新的认识。就目前的情况来看,类器官至少在以下几个方面显示出了很好的应用前景。

4.1 细胞分化行为研究的模型

类器官技术可以探究一些传统方法很难解决的发育难题。如脑组织类器官的建立,可以帮助观察神经干细胞独特的分化过程^[43]。同时,类器官技术为细胞功能和行为研究提供了新的思路,诸如分化,重编程等生物现象均可以在类器官模型上进

行研究。Ariyachet等^[44]将经重编程操作后能分泌胰岛素的胃窦上皮培养形成类器官,然后移植到经链脲菌素处理的NSG糖尿病小鼠模型,发现类器官能发挥血糖调节功能。另外,也可以利用类器官来研究干细胞的生物学行为,如寻找新的干性标志^[45]以及探究不同状态干细胞在细胞命运决定和后续分化中发挥的作用^[46]。最后,利用类器官可以研究组织稳态,探究细胞间的相互作用以及细胞外基质对细胞存活和增殖的影响。

4.2 组织结构异常相关疾病研究的模型

类器官与体内器官功能和结构类似,可以用于模拟致病过程,包括感染性疾病、遗传性疾病和退行性疾病等模型。如用幽门螺旋杆菌感染胃类器官,可以探究幽门螺旋杆菌的感染机制^[47];用寨卡病毒感染前脑类器官发现,类器官细胞大量死亡,SOX2⁺神经前体细胞增殖活性降低,类器官体积缩小,脑室扩大,由此成功地模拟出了寨卡病毒感染导致的胎儿小头畸形的过程^[48],为寨卡病毒的防治提供了帮助;另外,研究人员对一患有严重流感的7岁儿童进行全外显子测序,结果发现,其体内干扰素调节因子7的无效突变,导致患者体内I型和III型干扰素减少。而且,由该患者来源的肺类器官产生低水平的干扰素,病毒复制量增加,有力地佐证了这一突变^[49]。这些结果表明,严重的流感也有可能是由免疫系统的单基因突变引起,从而加深了公众对流感防治的认识。

4.3 药物筛选的模型

许多药物在人体内的代谢过程中会对某些敏感器官如肝、肾等造成严重损伤,因此需要临床前药物筛选来评价药物疗效和安全性。传统2D培养的细胞系缺少细胞间的相互作用,具有明显的结构和功能限制性;动物实验有种属差异性,其结果并不能直接用于人类;单一细胞株无法显示个体的异质性。将类器官培养技术引入药物筛选研究,建立不同组织、多个体来源的类器官库,可以高通量、快速地筛选出疗效好、安全性高的药物,减少药物开发成本,还可以兼顾患者个体对药物的敏感性,进而精准用药,促进精准医学的发展。已经有学者用肾类器官评价细胞周期的非特异性阻断药物顺铂的肾毒性^[50],以及用结直肠癌肿瘤类器官研究DNA拓扑异构酶I抑制剂伊利替康的耐药情况^[51]。

4.4 肿瘤发生机制研究的模型

联合基因测序、基因编辑等技术,运用肿瘤类

器官可以在分子水平研究基因突变的相应机制以及特定基因在细胞内的表达差异;同时,在细胞与器官水平可以研究肿瘤生长、转移和免疫逃避等生物学行为。Nadauld等^[52]通过shRNA敲低Cdh1^{-/-}、Tp53^{-/-}小鼠胃类器官*TGFBR2*基因的表达,发现形成的类器官细胞具有明显的侵袭和转移特性,揭示了TGFBR2在癌转移中可能扮演的作用。另外,Matano等^[53]运用CRISPR/CAS9基因编辑技术在正常肠类器官干细胞引入突变基因序列,再将这些干细胞移植到小鼠体内,发现有肠腺瘤的生成。

4.5 组织器官损伤修复的材料来源

临床治疗中,器官移植面临供体短缺以及免疫排斥的难题,如果将患者自身干细胞体外培养形成类器官后再移植回体内,将是解决这一难题的重要举措。Fordham等^[54-55]将鼠小肠类器官移植回小鼠体内,发现类器官可以修复原来损伤的组织并发挥功能。另外,类器官联合基因工程技术也可以进行遗传疾病的治疗,Schwank等^[56]运用CRISPR/CAS9基因编辑技术校正囊性纤维化病人来源的类器官内跨膜转导调节因子序列(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)突变的干细胞,结果发现类器官功能明显恢复。

5 面临的挑战

尽管目前类器官研究取得了长足的进步,但是仍然有一些局限。首先是一些类器官相当于体内器官发育的早期,功能不成熟,如建立的视网膜类器官光感受器细胞对光不敏感。其次,类器官体外培养无法形成血管网络而造成营养供给受限以及物质转运障碍,因此存在类器官体积增长有限、类器官功能不足等问题。针对这些局限,Lancaster等^[43]用螺旋型生物反应器培养体系加强类器官与培养基的营养交换,发现类器官可以达到数毫米直径,Takebe等^[33]用内皮细胞共培养的方式促进血管形成也是一种解决思路,还有学者将类器官移植到宿主体内,发现宿主血管长入类器官^[34]。另外,目前培养类器官常用的基质胶是从EHS(engelbreth-Holm-Swarm)小鼠肉瘤组织中分离获得的一种富含层黏连蛋白和胶原蛋白的胶状蛋白混合物,主要成分是层黏蛋白、IV型胶原和蛋白糖苷肝素硫酸盐,还包含了某些生长因子、基质金属蛋白酶等^[57],广泛运用于多种科研领域。然而,基质胶直接来源于动物肿瘤组

织,成分不明确,产品批次不稳定,对实验对象本身有刺激,极大地限制了其在临床中的应用。因此,开发成分明确、来源安全、生物相容性好的替代材料对类器官走向临床十分重要。目前见诸报道的替代材料包括胶原和水凝胶,它们可以很好地支持类器官的生长而不产生明显的有害作用,是今后发展的方向^[58-59]。最后,目前的技术体系培养下的类器官组织细胞类型较少,缺乏间叶成分,如神经组织和免疫系统,只能反应局部器官或组织的某些生理或病理状态,无法完全模拟全身性的炎症、免疫等反应。如何引入血管、神经等间叶组织,将是未来类器官研究的一个方向。

参考文献 (References)

- 1 Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 2014; 345(6194): 1247125.
- 2 Sasai Y. Next-generation regenerative medicine: organogenesis from stem cells in 3D culture. *Cell Stem Cell* 2013; 12(5): 520-30.
- 3 Smith E, Cochrane WJ. Cystic organoid teratoma: (report of a case). *Can Med Assoc J* 1946; 55(2): 151-2.
- 4 Weiss P, Taylor AC. Reconstitution of complete organs from single-cell suspensions of chick embryos in advanced stages of differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1960; 46(9): 1177-85.
- 5 Clevers H. Modeling development and disease with organoids. *Cell* 2016; 165(7): 1586-97.
- 6 Stoker AW, Streuli CH, Martins-Green M, Bissell MJ. Designer microenvironments for the analysis of cell and tissue function. *Curr Opin Cell Biol* 1990; 2(5): 864-74.
- 7 Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature* 2009; 459(7244): 262-5.
- 8 Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, *et al.* Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 2011; 141(5): 1762-72.
- 9 Montesano R, Schaller G, Orci L. Induction of epithelial tubular morphogenesis *in vitro* by fibroblast-derived soluble factors. *Cell* 1991; 66(4): 697-711.
- 10 Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, *et al.* Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19(10): 971-4.
- 11 Chua CW, Shibata M, Lei M, Toivanen R, Barlow LJ, Bergren SK, *et al.* Single luminal epithelial progenitors can generate prostate organoids in culture. *Nat Cell Biol* 2014; 16(10): 951-961, 951-4.
- 12 Gao D, Vela I, Sboner A, Iaquinata PJ, Karthaus WR, Gopalan A, *et al.* Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell* 2014; 159(1): 176-87.
- 13 Linnemann JR, Miura H, Meixner LK, Irmeler M, Kloos UJ, Hirs-

- chi B, *et al.* Quantification of regenerative potential in primary human mammary epithelial cells. *Development* 2015; 142(18): 3239-51.
- 14 Sachs N, de Ligt J, Kopper O, Gogola E, Bounova G, Weeber F, *et al.* A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity. *Cell* 2018; 172(1/2): 373-86.e10.
- 15 Dignass AU, Sturm A. Peptide growth factors in the intestine. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13(7): 763-70.
- 16 Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, *et al.* Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 2011; 469(7330): 415-8.
- 17 Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, *et al.* Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 1998; 19(44): 379-83.
- 18 He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, Scoville DH, *et al.* BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet* 2004; 36(10): 1117-21.
- 19 Haramis AP, Begthel H, van den Born M, van Es J, Jonkheer S, Offerhaus GJ, *et al.* *De novo* crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* 2004; 303(5664): 1684-6.
- 20 Huch M, Dorrell C, Boj SF, van Es JH, Li VS, van de Wetering M, *et al.* *In vitro* expansion of single Lgr5⁺ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 2013; 494(7436): 247-50.
- 21 Boj SF, Hwang CI, Baker LA, Chio II, Engle DD, Corbo V, *et al.* Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell* 2015; 160(1/2): 324-38.
- 22 Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, *et al.* Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units *in vitro*. *Cell Stem Cell* 2010; 6(1): 25-36.
- 23 Lugli N, Kamileri I, Keogh A, Malinka T, Sarris ME, Talianidis I, *et al.* R-spondin 1 and noggin facilitate expansion of resident stem cells from non-damaged gallbladders. *EMBO* 2016; 17(5): 769-79.
- 24 Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, *et al.* Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(31): 12771-5.
- 25 Siim Pauklin, Ludovic Vallier. Activin/Nodal signalling in stem cells. *Development* 2015; 142(4): 607-19.
- 26 Heath JK. Transcriptional networks and signaling pathways that govern vertebrate intestinal development. *Curr Top Dev Biol* 2010; 90: 159-92.
- 27 McLin VA, Rankin SA, Zorn AM. Repression of Wnt/betacatenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. *Development* 2007; 134(12): 2207-17.
- 28 Dessimoz J, Opoka R, Kordich JJ, Grapin-Botton A, Wells JM. FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis *in vivo*. *Mech Dev* 2006; 123(1): 42-55.
- 29 Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, Kuhar MF, Vallance JE, Tolle K, *et al.* Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*. *Nature* 2011; 470(7332): 105-9.
- 30 Cao L, Gibson JD, Miyamoto S, Sail V, Verma R, Rosenberg DW, *et al.* Intestinal lineage commitment of embryonic stem cells. *Differentiation* 2011; 81(1): 1-10.
- 31 McCracken KW, Catá EM, Crawford CM, Sinagoga KL, Schumacher M, Rockich BE, *et al.* Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature* 2014; 516(7531): 400-4.
- 32 Longmire TA, Ikonomou L, Hawkins F, Christodoulou C, Cao Y, Jean JC, *et al.* Efficient derivation of purified lung and thyroid progenitors from embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2012; 10(4): 398-411.
- 33 Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, *et al.* Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 2013; 499(7459): 481-4.
- 34 Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, Sharmin S, Ogawa M, Sasaki H, *et al.* 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.
- 35 Kamb A. What's wrong with our cancer models? *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4(2): 161-5.
- 36 Caponigro G, Sellers WR. Advances in the preclinical testing of cancer therapeutic hypotheses. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10(3): 179-87.
- 37 Huang L, Holtzinger A, Jagan I, BeGora M, Lohse I, Ngai N, *et al.* Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. *Nat Med* 2015; 21(11): 1364-71.
- 38 Papapetrou EP. Patient- derived induced pluripotent stem cells in cancer research and precision oncology. *Nat Med* 2016; 22(12): 1392-401.
- 39 Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K, Dinh HH, Drummond JA, Fowler G, *et al.* Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; 487(7407): 330-7.
- 40 van de Wetering M, Francies HE, Francis JM, Bounova G, Iorio F, Pronk A, *et al.* Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell* 2015; 161(4): 933-45.
- 41 Broutier L, Mastrogianni G, Verstegen MM, Francies HE, Gavarró LM, Bradshaw CR, *et al.* Human primary liver cancer derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat Med* 2017; 23(12): 1424-35.
- 42 Drost J, Karthaus WR, Gao D, Driehuis E, Sawyers CL, Chen Y, Clevers H. Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. *Nat Protoc* 2016; 11(2): 347-58.
- 43 Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, *et al.* Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 2013; 501(7467): 373-9.
- 44 Ariyachet C, Tovaglieri A, Xiang G, Lu J, Shah MS, Richmond CA, *et al.* Reprogrammed stomach tissue as a renewable source of functional beta cells for blood glucose regulation. *Cell Stem Cell* 2016; 18(3): 410-21.
- 45 Jung P, Sommer C, Barriga FM, Buczacki SJ, Hernando-Mombona X, Sevillano M, *et al.* Isolation of human colon stem cells using surface expression of PTK7. *Stem Cell Rep* 2015; 5(6): 979-87.
- 46 Basak O, van de Born M, Korving J, Beumer J, van der Elst S, van Es JH, *et al.* Mapping early fate determination in Lgr5+ crypt stem cells using a novel Ki67-RFP allele. *EMBO J* 2014; 33(18):

- 2057-68.
- 47 Bartfeld S, Bayram T, van de Wetering M, Huch M, Begthel H, Kujala P, *et al.* *In vitro* expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection. *Gastroenterology* 2015; 148(1): 126-36.e6.
- 48 Qian X, Nguyen HN, Song MM, Hadiono C, Ogden SC, Hammack C, *et al.* Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure. *Cell* 2016; 165(5): 1238-54.
- 49 Ciancanelli MJ, Huang SX, Luthra P, Garner H, Itan Y, Volpi S, *et al.* Life-threatening influenza and impaired interferon amplification in human IRF7 deficiency. *Science* 2015; 348(6233): 448-53.
- 50 Takasato M, Er PX, Chiu HS, Maier B, Baillie GJ, Ferguson C, *et al.* Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* 2015; 526(7574): 564-8.
- 51 Emmink BL, Van Houdt WJ, Vries RG, Hoogwater FJ, Govaert KM, Verheem A, *et al.* Differentiated human colorectal cancer cells protect tumor-initiating cells from irinotecan. *Gastroenterology* 2011; 141(1): 269-78.
- 52 Nadauld LD, Garcia S, Natsoulis G, Bell JM, Miotke L, Hopmans ES, *et al.* Metastatic tumor evolution and organoid modeling implicate TGFBR2 as a cancer driver in diffuse gastric cancer. *Genome Biol* 2014; 15(8): 428.
- 53 Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, *et al.* Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat Med* 2015; 21(3): 256-62.
- 54 Fordham RP, Yui S, Hannan NR, Soendergaard C, Madgwick A, Schweiger PJ, Nielsen OH, *et al.* Transplantation of expanded fetal intestinal progenitors contributes to colon regeneration after injury. *Cell Stem Cell* 2013; 13(6): 734-44.
- 55 Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, *et al.* Functional engraftment of colon epithelium expanded *in vitro* from a single adult Lgr5+ stem cell. *Nat Med* 2012; 18(4): 618-23.
- 56 Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, *et al.* Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* 2013; 13(6): 653-8.
- 57 Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* 2010; 10(9): 1886-90.
- 58 Cruz-Acuña R, Quirós M, Farkas AE, Dedhia PH, Huang S, Siuda D, *et al.* Synthetic hydrogels for human intestinal organoid generation and colonic wound repair. *Nat Cell Biol* 2017; 19(11): 1326-35.
- 59 Jabaji Z, Brinkley GJ, Khalil HA, Sears CM, Lei NY, Lewis M, *et al.* Type I collagen as an extracellular matrix for the *in vitro* growth of human small intestinal epithelium. *PLoS One* 2014; 9(9): e107814.