



胰岛类器官研究进展

陶玉^{1†}, 陈心怡^{1†}, 俞清¹, 曾艺^{1,2*}

1. 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海 200031;

2. 国科大杭州高等研究院, 杭州 310024

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: yzeng@sibcb.ac.cn

收稿日期: 2022-03-07; 接受日期: 2022-05-18; 网络版发表日期: 2022-07-20

科技部重点研发计划(批准号: 2020YFA0509002)、中国科学院战略性先导科技专项(批准号: XDA16020200)和国家自然科学基金(批准号: 31830056, 31861163006)资助

摘要 糖尿病被列为对人类健康威胁最大的三类疾病之一, 是全球重点关注的公共卫生问题。目前的药物治疗无法从根源上恢复血糖的自主调节。异体胰岛移植能够有效控制糖尿病患者的血糖, 但由于尸体胰岛的来源有限, 如何在体外获得大量胰岛素分泌细胞是糖尿病移植治疗的关键。近年来, 类器官(organoid)培养技术日益发展, 给再生医学研究和疾病治疗带来了新思路。胰岛类器官不仅为探究胰岛发育、糖尿病发病机制和治疗策略提供了体外模型, 也为糖尿病的细胞治疗提供了新的细胞来源。本文综述了胚胎干细胞、诱导性多能干细胞、转分化细胞和成体干细胞等不同来源的胰岛类器官的研究进展, 并探讨如何优化胰岛类器官的培养条件以助力糖尿病的研究与治疗。

关键词 胰岛类器官, 糖尿病, β 细胞, 多能干细胞, 胰岛成体干细胞

胰岛分布在胰腺中。胰岛的功能是分泌激素, 动态地调节体内葡萄糖水平。胰岛中的 β 细胞, 也称为朗格汉斯细胞, 是人和其他脊椎动物体内唯一能够合成和分泌胰岛素的细胞, 而胰岛素是体内唯一能够降低血糖的激素, 由此可见胰岛 β 细胞在维持体内葡萄糖稳态平衡中的关键作用^[1]。

在2021年, 全球有5.4亿糖尿病患者, 平均每10个成年人(20~70岁)中有一位确诊的糖尿病患者。这个数字预计在2030年上升到6.4亿(www.diabetesatlas.org)。糖尿病主要有一型和二型两种类型。一型糖尿病主要是由于胰岛 β 细胞被破坏, 导致胰岛素分泌量绝对不

足。二型糖尿病患者身体的细胞对胰岛素的敏感性不高, 因此 β 细胞必须制造更多的胰岛素来控制血糖水平, 最终导致 β 细胞衰竭。总之, β 细胞衰竭、胰岛素分泌不足是所有糖尿病发展的最终结局^[1]。

随着生物医学的发展, 细胞治疗展现出强大的潜力来替代传统的糖尿病治疗方式。目前, 胰岛和全胰腺移植可以有效地补充重症病人体内的 β 细胞数量, 帮助维持其血糖稳态^[2]。但由于供体器官来源的局限, 研究者们一直在积极寻求其他细胞来源, 例如在体外培养产生具有胰岛素分泌能力的类 β 细胞。近十余年来, 科学家们探究了多种在体外扩增诱导产生胰岛 β

引用格式: 陶玉, 陈心怡, 俞清, 等. 胰岛类器官研究进展. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 140–160

Tao Y, Chen X Y, Yu C Q, et al. Advances in islet organoids (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2023, 53: 140–160, doi: [10.1360/SSV-2022-0031](https://doi.org/10.1360/SSV-2022-0031)

细胞的方法。胚胎干细胞、诱导性多能干细胞、胰岛成体干细胞等都具有在体外增殖并分化产生胰岛素分泌细胞或胰岛类器官的潜能(图1)。本文将综述这些策略从提出到逐步优化的过程, 探讨胰岛类器官实际应用于糖尿病的研究与治疗的可能。

1 胰岛的发育

胰腺是集合了内、外分泌两种组织的器官。外分泌组织包括腺泡和导管, 其功能是分泌和运输含有多

种消化酶的胰液; 内分泌组织也称胰岛, 是紧实的内分泌细胞团簇, 分布在外分泌组织之间。小鼠(*Mus musculus*)的胰岛呈典型的球状结构, 其中 β 细胞占胰岛细胞数量的60%~80%, 多分布在胰岛球的内部, 周围被 α 细胞、 δ 细胞和PP细胞环绕, 这些细胞分别通过分泌胰岛素(insulin)、胰高血糖素(glucagon)、生长抑素(somatostatin)和胰多肽(pancreatic polypeptide)四种内分泌激素, 共同参与血糖调节^[3]。在人胰岛中, β 细胞约占胰岛细胞总量的55%。有别于小鼠胰岛, 人胰岛中 α 、 δ 和PP细胞散在地分布在胰岛中, 而非环绕在胰岛

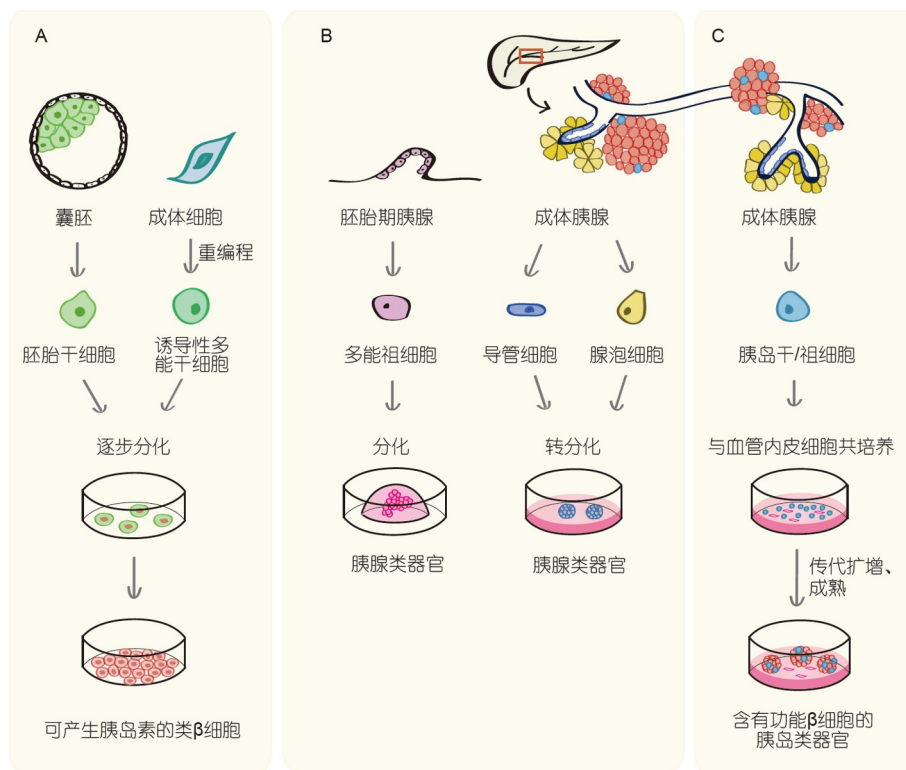


图 1 不同的细胞来源产生的胰岛类 β 细胞。A: 来自囊胚内细胞团的胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和经成体细胞重编程而来的诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)是现阶段最常用于体外产生类 β 细胞的细胞来源。ESCs/iPSCs在多种外源生长因子和信号通路调控因子的诱导下逐步分化形成胰岛类 β 细胞。B: 胚胎胰腺祖细胞在体外的基质胶中扩增并形成胰岛类器官。这种类器官常呈现类似体内胰腺的分支形态, 细胞组成类型较为多样(左)。来自成体胰腺外分泌系统的导管细胞和腺泡细胞, 在体内损伤条件下获得转分化形成胰岛内分泌细胞的能力。在体外, 导管细胞的培养可以形成胰腺类器官, 这些类器官主要由类外分泌细胞组成, 仅产生很少量的胰岛类 β 细胞(右)。C: 小鼠的成体胰腺中存在胰岛干/祖细胞, 其在体外与内皮细胞共培养, 可以通过传代进行长期扩增, 分化形成胰岛类器官。这些类器官包含所有内分泌细胞类型(α 细胞、 β 细胞、 δ 细胞和PP细胞), 其中功能性 β 细胞约占80%

Figure 1 Generation of islet β -like cells *in vitro* from different cell sources. A: The embryonic stem cells (ESCs) derived from the inner cell mass of blastocysts and the induced pluripotent stem cells (iPSCs) reprogrammed from adult cells are the two common sources for generating islet β -like cells *in vitro*. Through stepwise differentiation, ESCs/iPSCs are induced into islet β -like cells via various growth factors and signaling pathway regulators. B: The embryonic pancreatic progenitor cells can be grown in Matrigel *in vitro* to form pancreatic organoids, which often exhibit branched morphology with various differentiated cell types (left). *In vivo*, both duct cells and acinar cells from the adult pancreatic exocrine tissue can transdifferentiate into islet endocrine cells under injury. *In vitro*, duct cells can form pancreatic organoids that contain a majority of exocrine duct cells and rare endocrine β -like cells (right). C: The adult pancreatic islet stem/progenitor cells in the adult mouse pancreas can be isolated, cultured, and expanded to form islet organoids that contain all endocrine cell types with about 80% being functional β cells

球体的外周^[4,5]。

胰腺起源于内胚层。以小鼠胰腺的胚胎发育过程为例, 在胚胎期第9.0天(embryonic day, E), 胰腺原基从前肠内胚层的背侧、腹侧隆起, 分别形成“背胰芽”(dorsal pancreatic bud)和“腹胰芽”(ventral pancreatic bud)^[6,7]。在E9.5~12.5的初级转变(primary transition)过程中, 胰腺多能干细胞增殖活跃, 形成有层次的、定性的胰腺上皮。胰芽生长迅速并分支形成管网结构, 背侧和腹侧的胰腺原基逐渐融合形成胰腺的主导管^[8]。在E13.5时, 胰腺发育的次级转变(secondary transition)开始发生, 此时活跃的分化浪潮使得细胞开始进入不同的胰腺细胞命运决定^[8~10]。胰腺管腔的极化尖端产生外分泌腺泡的前体祖细胞, 而管腔主干部分的细胞具有形成外分泌导管细胞、内分泌细胞的双潜能干性。其中一些细胞上调内分泌祖细胞标志基因——转录因子Ngn3(Neurogenin 3)的表达, 起始向内分泌方向分化的命运决定, 随后迁移、脱离导管, 形成簇状的胰岛^[11,12]。

2 从胚胎干细胞和诱导性多能干细胞获得β细胞

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)、诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)具有类似早期胚胎细胞的特征, 有着强大的增殖能力和分化潜能。利用这类细胞的多能性进行定向分化并得到大量可移植β细胞的技术具有可观的应用前景^[13]。

Assady等人^[14]在2001年观察到, 人的ESCs(human ESCs, hESCs)在体外自发分化产生的细胞团含有多种细胞类型, 其中便存在能分泌胰岛素的细胞。此后, 多项研究致力于诱导多能干细胞定向分化成胰岛素分泌细胞。在体外诱导hESCs形成定形内胚层细胞研究的基础上^[15], D'Amour等人^[16]在2006年建立了体外诱导多能干细胞形成内分泌细胞的方案。通过添加各类诱导因子, 对hESCs进行阶段性培养, 定向地诱导多能干细胞经历胚胎胰岛发育的路径——经过中内胚层、定形内胚层、原始肠管到后前肠的状态, 形成胰腺祖细胞。在各个诱导阶段, 培养的细胞能够成功表达各分化阶段标志性的转录因子, 并最终产生能够表达胰岛素、胰高血糖素、生长抑素蛋白的内分泌细胞^[16](图1A)。进一步地, Kroon等人^[17]的工作展示了由hESCs诱导产生的胰腺内胚层细胞(表达标志基因*PDX1*,

FOXA2, *HNF6*, *NKX6.1*)在被移植到小鼠体内30天后能够分化为内分泌细胞, 且移植物成熟后具有分泌胰岛素、响应血糖刺激、挽救糖尿病模型小鼠血糖的能力。然而, 这些开创性工作得到的细胞与胚胎期胰岛细胞更相似, 而非成体胰岛细胞, 具体表现于得到的细胞大比例为多激素共表达细胞, 不能一致表达成熟β细胞的标志基因^[18,19]。这些细胞在移植后需要3~4月才能成熟^[17,20], 且移植物存在致癌风险^[21]。如何提高多能干细胞向胰岛素分泌细胞分化的诱导效率, 如何提高目标细胞的产量, 如何去除诱导产物中的副产物以及如何提高细胞的胰岛素分泌水平成为了被重点关注的问题。

在过去的十几年中, 一系列工作对体外诱导分化步骤进行了优化, 显著提高了逐步分化的效率。在逐步诱导的过程中, 处于不同成熟阶段的细胞混合在同一培养体系中, 标志性基因的表达可以指示细胞的分化状态, 并使通过流式细胞技术对目标细胞进行富集成为可能。在多年工作的积累下, 一系列标志性基因的表达定义了不同阶段的细胞。例如, *CXCR4*, *SOX17*^[22], *CD177*^[23]标志着定形内胚层细胞, *PDX1*, *NKX6.1*^[24]和*CD142*^[25]标志着胰腺前体细胞, 而*CD49a*特异地在已分化的β细胞中表达^[26]。使用这些标志基因, 可以在逐步诱导过程中富集处于特殊阶段的细胞类型, 同时去除在移植中可能致癌的未分化细胞。在2011年, Basford等人^[27]和Micallef等人^[28]在hESCs细胞系中建立了一种方便的工具, 他们在胚胎干细胞系中敲入了*INS-GFP*(由胰岛素启动子驱动的绿色荧光蛋白)报告系统, 可以直观而便捷地富集已启动胰岛素基因表达的细胞, 为筛选体系提供了便利。

分化标志性基因的发现和胰岛素报告体系的建立使得体外筛选诱导分化因子更加便利。一种优化培养液因子的思路是对胰腺发育过程中起着重要作用的因子和信号通路进行操纵。关于成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、转化生长因子(transforming growth factor-β, TGF-β)家族、Notch、Wnt、音猬因子(sonic hedgehog, Shh)等信号在体内胰腺发育过程中的作用已被系统地综述^[29], 与之对应地, 这些信号在体外诱导多能干细胞向胰岛内分泌细胞的过程中也起着重要的作用^[30]。视黄酸(retinoic acid)^[31]、FGF10^[16,32]、BMP抑制剂^[33,34]、Shh抑制剂^[16]被用于诱导定形内胚层向胰腺祖细胞的分化。甲状腺激

素^[35]、TGF- β 抑制剂^[32,36]和Notch抑制剂^[37,38]在体外培养中促进了向内分泌谱系的分化。

在2014年, Pagliuca等人^[35]改进了体外诱导胰腺祖细胞产生成熟内分泌细胞的步骤。在Schulz等人^[39]发表的诱导分化步骤的基础上, 延长了诱导产生NKX6.1⁺/PDX1⁺胰腺祖细胞的时间以扩大祖细胞类群, 并系统性地测试了超过70种细胞因子、化合物, 筛选出促进胰腺祖细胞分化的培养条件。胰腺祖细胞在这种方案下分化为内分泌前体细胞, 再进一步产生干细胞衍生的 β (stem cell-derived- β , SC- β)细胞, 后者能够在体外条件下响应糖刺激并包装胰岛素分泌颗粒, 且这类细胞中大部分是单激素分泌细胞。SC- β 细胞在移植后能够更快地成熟, 将在血清中检测到人胰岛素的时间缩短到了两周。该研究中使用的秋田小鼠(NRG-Akita)是胰岛细胞慢性缺失的糖尿病模型小鼠, 在接受移植时空腹血糖在200 mg/dL左右, 为轻度高血糖。对照组小鼠的血糖逐渐恶化, 在12周时接近600 mg/dL, 而SC- β 细胞的移植可以阻止秋田小鼠血糖的恶化, 并在12周后使其血糖降低到正常水平(<150 mg/dL), 但仍有1/6的小鼠在移植4个月后死亡^[35]。

同年, Rezaei等人^[20]优化的诱导分化方案能够高效地(2:1)从hESCs诱导得到NKX6.1⁺/INSULIN⁺细胞^[40]。他们先前的工作提出了一种四步诱导方案, 得到的PDX1⁺胰腺祖细胞在移植到体内后可以分化成熟, 于移植30周后起到血糖调节功能。Rezaei等人^[40]首先优化了前四阶段的步骤, 以防止前体细胞提前分化产生多激素细胞, 随后转入气-液双相培养环境, 再经三步诱导产生与成熟 β 细胞具有类似表达谱(*INS*, *MAFA*, *NKX6.1*等)的第七阶段(Stage 7, S7)细胞。S7细胞在移植到非糖尿病小鼠体内后4周内成熟并产生胰岛素。移植到链脲霉素(streptozotocin, STZ)诱导的急性胰岛 β 细胞损失糖尿病模型小鼠体内后, S7细胞在40天后使小鼠血糖恢复到了正常值。但同时也发现与原代 β 细胞相比, S7细胞对葡萄糖的响应速度更慢且程度微弱, 尚不能完全模拟胰岛细胞的功能。

除了从发育生物学已有的知识中寻找灵感, 无偏见的高通量筛选是得到有助于诱导分化的小分子化合物的高效途径。Chen等人^[41]的工作使用高通量筛选系统, 测试了超过5000种化合物对于诱导hESCs形成胰腺细胞的作用, 并最终发现了(-)-吡啶内酰胺V((-)-indolactam V), 一种PKC激活剂, 可以帮助诱导PDX1⁺胰

腺祖细胞的产生。Ghazizadeh等人^[42]在后续工作中发现小分子H1152通过对ROCKII的抑制促进胰腺祖细胞向INS⁺ β 细胞的成熟。Ma等人^[43]聚焦于对胰腺前体细胞的扩增, 通过对化学小分子的筛选, 发现含溴结构域和额外终端域家族蛋白抑制剂I——BET151显著提高了PDX1⁺/NKX6.1⁺胰腺祖细胞的得率。不局限于体内发育生物学的发现, 这些通过高通量筛选得到的小分子拓宽了体外诱导胰腺内分泌细胞的思路。目前已知有大量小分子化合物在诱导分化的每个步骤起着关键的作用, 其背后的生物学意义也值得深究^[44,45]。

然而, “得到能够分泌胰岛素的细胞”并不是唯一要解决的问题。在体内, 胰岛具有紧实的球状结构, 四种内分泌细胞有序地分布, 分泌不同的激素以正、负反馈的形式共同参与血糖调节。胰岛中血管和神经支配丰富, 同时也接受来自细胞外基质的调节信号。如何能得到高度模拟胰岛结构的类器官、最好地执行调节血糖的功能, 是下一个要解决的问题。在2007年, Puri和Hebrok^[46]观察到在小鼠胚胎发育时期, 散在的 β 细胞会发生迁移形成更大的细胞簇。接着有研究认为胰岛内分泌细胞的聚集伴随着内分泌细胞的成熟和激素表达的增加^[47]。在2016年, Kim等人^[48]发现体外的SC- β 细胞在解离后也能自主聚集成细胞簇, 与聚集前相比, 聚集后细胞中成熟 β 细胞标记基因(如*PDX1*, *NKX6.1*和*MAFA*)的表达被激活, 且响应糖刺激的能力更强。他们认为这可能与 β 细胞葡萄糖传感器基因(*SLC2A1*, *GCK*)和间隙连接基因(*CDH1*, *CX36*)在聚集后表达水平升高有关。Nair等人^[49]认为细胞聚集促进了 β 细胞线粒体的代谢成熟。与聚集前相比, 球状类胰岛器官中细胞与氧化磷酸化、蛋白质分泌、TCA循环相关的基因表达显著上调, 内分泌祖细胞标志基因*Ngn3*的表达降低, 同时与 β 细胞成熟相关的基因*NEUROD1*, *PAX6*, *MAFB*和*SLC30A8*表达更高。聚集成簇的大小也会对细胞状态产生影响^[50,51]。Velazco-Cruz等人^[52]提出的方案将平均约364 μm 直径的细胞簇缩小到平均约172 μm ; Nair等人^[49]使用Aggrewells将细胞簇限制到100 μm 大小以优化胰岛类器官的状态。除此之外, 使用可操控孔隙大小的水凝胶(hydrogel)^[51,53]或3D打印^[54]的方法也可以诱导SC- β 细胞成簇、控制细胞簇的大小。

胰腺基质、血管以及神经网络是内分泌细胞所处环境的重要组成部分, 参与调控胚胎期胰腺内分泌细

细胞的分化成熟^[3,55-57]。生态位补齐使体外培养的细胞具有更好的功能。先前的工作将小鼠或人胰岛消化成组织块或单细胞后与血管内皮细胞、间充质干细胞^[58]、羊膜上皮细胞^[59]等其他细胞混合,经“自组织”(self-organizing)形成球状的类器官,这种类器官在移植后有着强于未处理胰岛的功能。神经元或神经嵴干细胞能在体外或共移植中促进 β 细胞的增殖和存活^[60-62]。共培养体系也被引入到SC- β 胰岛类器官的培养中。最常用于与SC- β 细胞共培养的是血管内皮细胞^[53,63]和间充质细胞^[63],这些共培养的细胞被认为通过旁分泌^[53,64,65]或促进细胞簇聚集^[66]的方式来改善胰岛类器官的功能。

SC- β 细胞为糖尿病相关研究提供了模型,相关工作在Maxwell和Millman^[67]的综述中已被详细总结。对于研究在啮齿动物 β 细胞中不表达的基因,例如*SIX2*,人来源的SC- β 细胞提供了难得的研究模型^[52]。更重要的意义在于,SC- β 细胞使糖尿病患者的自体移植成为可能。Millman等人^[68]将I型糖尿病患者的皮肤成纤维细胞诱导产生iPSCs,进一步诱导分化为SC- β 细胞,这些细胞与非糖尿病患者的SC- β 细胞相比没有显著的差异,同样可以分泌胰岛素。对于单基因突变导致的Wolfram型糖尿病,使用CRISPR/Cas9基因编辑系统纠正患者来源的iPSCs中的*WFS1*基因突变,编辑后的SC- β 可在移植后挽救糖尿病小鼠血糖^[69]。这些案例为糖尿病的治疗提供了新的希望。

多能干细胞逐步分化成SC- β 细胞的方法依然要面对诱导后细胞异质性和成熟的问题。多项针对SC- β 细胞的单细胞测序都发现培养细胞的分化是不同步的,分化产物中存在着处于胰腺祖细胞、内分泌祖细胞或内分泌细胞阶段的多个亚群^[26,70-72]。除此之外,多项研究在诱导分化细胞的单细胞测序中均发现了一群具有肠道细胞特征的非胰腺细胞^[26,71,72]。2014年的一项研究发现,hESCs分化得到的SC- β 细胞更类似于胎儿的 β 细胞——多种激素表达阳性而非仅表达胰岛素的细胞,缺乏对糖刺激的响应能力,缺少成熟 β 细胞相关基因的表达,不能与成人 β 细胞的功能相比^[19]。最近对移植前后SC- β 细胞的单细胞测序也发现,移植后 β 细胞成熟相关基因如*INS*, *MAFA*, *MNX1*等上调,错误表达的基因如*CHGA*, *MAFB*, *GCK*, *GLUT1*等下调^[72],证明SC- β 细胞在移植后才能进一步完成成熟过程。

自从发现多能干细胞在体外具有产生胰岛内分泌

细胞的潜能,二十年来的工作逐步建立起了从多能干细胞诱导分化产生胰岛素分泌细胞的步骤。体内外的基础研究以及单细胞测序进一步剖析了胰岛内分泌细胞增殖、分化、成熟的过程,培养液因子的优化、三维培养方法的建立、共培养策略等改良方案使“分泌胰岛素的细胞”逐步转变为具有与体内胰岛类似结构的胰岛类器官。最近的研究同样致力于进一步改良胰岛类器官的电生理、转录谱以及代谢特征,使胰岛类器官更加接近成人胰岛^[73]。同时,多能干细胞衍生的诱导得到的胰腺内胚层细胞已被用于I型糖尿病的临床研究。由ViaCyte^[74,75]和Vertex^[76]两家公司分别开展的I/II期临床实验已得到了初步的结果,由微囊封装的多能干细胞产生的胰腺内胚层前体细胞在移植后能够存活并产生胰岛素分泌细胞。由多能干细胞诱导产生胰岛类器官的方法还在持续发展并走进临床。

3 用胚胎组织培养类器官

在胚胎发育时期,原始胰腺上皮中存在胰腺多能干细胞。在初次转变之前,*Pdx1*, *Ptf1a*, *Sox9*分别标记的多能干细胞能在谱系示踪中贡献到胰腺导管细胞、腺泡细胞、胰岛内分泌细胞三种胰腺谱系的细胞^[77-79]。因此,胚胎胰腺中的多能干细胞具有形成胰腺类器官的潜能。

Greggio等人^[80]将E10.5小鼠的胚胎胰腺细胞取出并在基质胶上进行3D培养,通过操纵培养基的成分组成,这些胰腺祖细胞成功扩增并形成了类似体内胰腺分支的结构。通过细胞标志物分析,发现这些类器官中各类细胞的组成及分布与体内E14.5~18.5的胰腺相似,且其中的胰腺前体细胞标志物*Pdx1*, *Sox9*, *Hnf1b*和*Nkx2.2*的平均表达水平与E10.5胰芽中分离得到的上皮细胞相近。类似地,Sugiyama等人^[81]通过体外培养小鼠E11.5的*Sox9*⁺胰腺祖细胞成功得到了可以自我增殖且具有多向分化潜能的胰岛类器官。人类的胚胎胰腺组织细胞也能够在基质胶提供的3D培养体系中扩增并传代,但其中超过80%的细胞为导管细胞,仅有约0.5%的细胞为INS⁺细胞,在移植到非糖尿病小鼠体内后仅能够产生少量(~1.5%)的胰岛素分泌细胞,且在高血糖小鼠体内没有产生内分泌细胞^[82]。胚胎胰腺组织细胞虽然能在体外扩增并形成具有类似胰腺结构的自组织细胞团(图1B),但内分泌细胞产率极低是这类培

养方法的共性问题。

4 从成年组织培养类器官

β 细胞新生是指在体内由胰腺或胰岛的干/祖细胞分化形成新的 β 细胞,与之对应的是 β 细胞的自我复制。在过去的几十年里出现了大量与胰岛干/祖细胞有关的研究。在新生期,啮齿动物的胰岛细胞仍然会增殖,但增殖速率低于胚胎期^[83-86]。一些证据显示,在这一阶段,新生的 β 细胞是由不分泌激素的内分泌前体细胞分化而来的。这些细胞位于新生胰岛的周围,表达细胞角蛋白19(cytokeratin 19, CK19),具有类似导管细胞的特性,并比已分化的胰岛细胞的复制更活跃^[87]。这类细胞在出生一周后消失,尚未有形态学证据证明该类前体细胞在一周后依然存在。

在很长一段时间内,在生理条件下,研究者们都没有找到成年的啮齿动物胰腺 β 细胞来源于特定的干细胞或祖细胞的直接证据。基于早期的小鼠谱系示踪、标记增殖细胞的实验结果,一种被普遍接受的想法是,出生后胰岛细胞数量的维持主要依赖于自我复制^[88-90]。2004年,Dor等人^[88]使用RIP(rat insulin promoter,大鼠胰岛素启动子)-CreER转基因驱动的谱系示踪实验来追踪胰岛 β 细胞,发现RIP标记的细胞比例不会随着时间的推移被稀释,因此认为没有新的胰岛 β 细胞来源于干细胞。随后另一项研究也发现,每一个被RIP标记的克隆在一个月后可长至5个细胞大小,两个月后升至7~8个细胞^[91]。这些由RIP标记的克隆形成实验被认为是成熟的、功能性的 β 细胞自我复制的证据。Teta等人^[89]借鉴了其他器官的研究经验,认为干细胞应当存在连续分裂,于是使用氯脱氧尿苷(CldU)和碘脱氧尿苷(IdU)双标记方法来寻找连续分裂的细胞,结果发现只有极少数的 β 细胞存在连续分裂。这一系列实验让寻找胰岛成体干细胞的人折戟而返。因为没有发现特定的胰岛干细胞或是新生细胞生态位,人们开始相信, β 细胞的自我复制是其主要的增殖方式。

然而,这些研究的局限性在于它们将成体胰岛中所有启动RIP表达的细胞都认为是具有功能的 β 细胞,但越来越多的证据表明并非如此^[92]。在2011年,Smukler等人^[93]发现RIP-CreER标记细胞的后代里除了有 β 细胞,还有 α 、 δ 和PP细胞,提示RIP-CreER不仅标记了成熟 β 细胞,还有可能“意外地”标记了干细胞。这群干

细胞与成熟的 β 细胞性质不同,只表达低水平的胰岛素、低表达或不表达葡萄糖转运体2(glucose transporter-2, Glut2)。值得注意的是,RIP-CreER这一工具也有技术上的缺陷,据报道,在没有他莫昔芬诱导的情况下,RIP-CreER也会发生泄漏引起非特异的同源重组^[94],这为谱系示踪实验带来了非常大的本底误差,即一开始就标记上非 β 细胞。无独有偶,虽然胰岛素蛋白的表达和分泌能够忠实地定义 β 细胞,但单凭Insulin mRNA的表达或其启动子的活动不能准确地、忠实地区分 β 细胞与其他细胞。这导致利用Insulin启动子(Ins2-CreER)介导的示踪实验不能区分 β 细胞与其他细胞(包括干细胞)的贡献,导致的结果是将干细胞的贡献归入 β 细胞。这也许是2021年Zhao等人^[95]的Ins2-DreER示踪实验结果依然不支持胰岛干细胞存在的原因。但也有一些研究认为低表达胰岛素基因的细胞可能是具有多能性的内分泌前体细胞^[93,96]。Gribben等人^[97]提供了支持胰岛干细胞存在的证据,他们使用胰岛素启动子(Ins1-CreERT)介导的示踪系统发现,在成年开始追踪后的第1个月和第6个月,标记的 β 细胞比例从78%下降到了66%。被标记细胞比例的稀释意味着在成年胰岛中、正常生理状态下 β 细胞存在自我增殖以外的产生途径。

在尚未找到胰岛干细胞之前,科学家们早已观察到胰腺细胞在损伤修复时具有可塑性,这种转分化潜能为从成体胰腺组织获得内分泌细胞提供了另一种可能。

Thorel等人^[98]观察在体内 β 细胞发生极大量的损失时, α 细胞会转分化形成胰岛素分泌细胞。Pax4^[99],Pdx1^[100]和Mafk^[101]的过表达,Dnmt1和Arx的缺失^[102],或是组蛋白甲基转移酶抑制剂(adox, adenosine dialdehyde)的处理^[103]均能够诱导 α 细胞重编程形成胰岛素分泌细胞。

在胰腺导管结扎(partial duct ligation, PDL)和部分胰腺切除术(partial pancreatectomy, PPx)的胰腺损伤模型实验中,多项研究发现了共表达淀粉酶(amylase,腺泡细胞标记物)和胰岛素的细胞,提示了胰腺外分泌腺泡细胞在损伤条件下的可塑性^[104-107]。Zhou等人^[108]利用腺病毒感染,在体内使成熟的腺泡细胞重新表达Ngn3, Mafk和Pdx1,实现了腺泡细胞向类 β 细胞的重编程转变。在体外培养体系中,Minami等人^[109]成功地从成年小鼠的胰腺腺泡细胞得到了胰岛素分泌细胞,证

明了腺泡细胞在体外也存在转分化成类 β 细胞的潜能。

成年的导管细胞也被认为可以在特殊条件下获得胚胎期特性, 经上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程产生内分泌细胞^[110]。在体内实验中, 严重损伤的诱导会改变导管细胞的可塑性, 促使 β 细胞新生的出现^[111~113]。Wang等人^[114]发现, PDL后导管细胞可以转分化产生新的 β 细胞, 并使得大鼠(Norway rat)胰腺中 β 细胞数量增加。Bonner-Weir等人^[115]在对成年大鼠进行90% PPx后, 观察到手术组的胰腺小导管发生增殖, 并能分化成新的胰岛和外分泌组织。利用Cre-loxP系统进行示踪实验, Inada等人^[116]发现原本标记胰腺导管细胞的CAH⁺细胞, 在PDL后能更多地贡献到结扎部位的胰岛中; Xu等人^[117]使用另一个导管标记物CK19进行示踪, 结果显示在PDL之后CK19⁺的导管细胞会激活Ngn3的表达并产生能分泌胰岛素的细胞。值得注意的是, Gribben等人^[97]在最近的研究中发现正常生理状态下小鼠胰腺导管上存在同时表达Ngn3和Somatostatin的细胞类群。使用Hnf1b-CreERT工具对胰腺导管细胞进行谱系示踪, 可以在成年小鼠胰岛中发现表达Insulin和Somatostatin的后代内分泌细胞, 提示在非损伤条件下, 胰腺外分泌细胞也有产生内分泌后代的可能。

这种胰腺外分泌导管细胞形成内分泌细胞的可塑性在体外培养中得到进一步的展现。Bonner-Weir等人^[118]使用成年人的胰腺导管上皮细胞进行体外培养, 发现有类似胰岛的细胞群出现, 诱导后可以分化成分泌胰岛素的 β 细胞。作为多个器官中的成体干细胞标记物, Lgr5在损伤再生的胰腺导管中表达, 而Lgr5⁺的导管细胞能在体外产生胰腺外分泌组织类器官, 在移植诱导后分化出导管和内分泌细胞^[119]。Jin等人^[120]发现, 成年小鼠胰腺SOX9⁺/CD133⁺导管细胞可以在基质胶上形成含有类导管、腺泡和内分泌样细胞的环状克隆。在RSPO1(R-Spondin 1)蛋白的诱导作用下, 将其传代到水凝胶中培养, 这些克隆可以转变为致密的形态, 并产生具有能够响应糖刺激、分泌胰岛素能力的类 β 细胞。

也有研究者尝试对人外分泌组织细胞进行重编程得到胰岛素分泌细胞, 在体外过表达Pdx1, Ngn3, MafA和Pax4^[121]或是活化的MAPK和STAT3^[122]组合, 使混杂多种细胞的胰腺外分泌组织在体外转分化成胰岛素分泌细胞。

除了胰腺组织细胞外, 肝^[123]、肠^[124~127]、胃^[124]等其他组织器官细胞被报道能够被诱导产生胰岛素分泌细胞。成纤维细胞也能够不经历多能状态被直接重编程为胰腺谱系的细胞^[128,129]。这些方法为胰岛类器官培养的细胞起源拓宽了选择。

然而, 使用非胰岛组织细胞诱导产生的类器官中往往混杂着非内分泌谱系细胞, 例如非胰腺谱系细胞、类导管细胞、类腺泡细胞等, 内分泌细胞占总细胞数量的比例很低, 在现有条件下很难作为大量诱导胰岛素分泌细胞的方法(图1B)。

最近的一项研究为小鼠胰岛成年干/祖细胞的存在提供了直接证据^[130]。Wang等人^[130]通过单细胞测序, 在成年小鼠的胰腺中发现了一个新的细胞类群。这群细胞特异性表达Procr(Protein C receptor)这一表面分子标记, 不表达已知的成熟内分泌细胞的标志基因。使用Procr-CreER;R26-confetti小鼠进行三个月的体内谱系示踪, 结果显示, 成年小鼠胰岛的Procr⁺细胞在体内正常生理条件下形成的克隆逐渐增大, 且能产生所有4种内分泌细胞, 展示了其增殖和分化的能力。结合Scavuzzo等人^[131]和Byrnes等人^[132]E14.5时期小鼠的胰腺单细胞测序的数据分析可知, 胚胎期Ngn3⁺的内分泌前体细胞中有一个亚群与Procr⁺细胞相对应, 具有相似的EMT特性且表达特征基因如Procr, Rspo1和Hoxa5等。在胚胎期的胰腺里, Ngn3⁺内分泌前体细胞可能代表的是一种瞬时细胞状态类型。虽然大多数Ngn3⁺内分泌前体细胞在成熟后就失去了其前体状态, 但其中的一个亚群可能在形态发生完成后依然保持干/祖细胞的特性, 它们不再表达Ngn3, 但依旧保留了EMT特征和Procr, Rspo1和Hoxa5等标记基因。Ngn3-Cre介导的谱系示踪实验支持了这一观点, 成年后Procr⁺胰岛细胞是胚胎期Ngn3⁺内分泌前体细胞的后代^[130]。

Wang等人^[130]将Procr胰岛干细胞从小鼠体内分离并培养在人工基质胶中, 并在培养体系中添加内皮细胞(图1C), 该共培养体系显著增强了Procr胰岛细胞的克隆形成效率, 培养28天后, 胰岛素在这些克隆、类器官中的表达水平依然较低, 但经过三轮高、低糖刺激后, 胰岛素的表达显著增加。同时, ELISA分析显示, 经过葡萄糖刺激后的类器官培养液中胰岛素和C肽的分泌量达到了新鲜胰岛分泌量的25%和40%。有趣的是, 由此种方法养成的类器官中, 大部分细胞是 β 细胞,

被 α 、 δ 和PP细胞包围在中间,这种分布模式与体内的胰岛是相似的(图2)。Procr干/祖细胞在培养中分化成 β 细胞的分化轨迹也可以通过单细胞转录组分析来说明。这些类器官至少可以被传代20次、保持生长状态超过6个月。将传代后的类器官移植到由STZ诱导形成的糖尿病模式小鼠的肾包膜中,监测到糖尿病小鼠的血糖得到了改善。在移植等量细胞的类器官或新鲜胰岛后1周,小鼠的血糖均可从超过20 mmol/L恢复到10 mmol/L以下。且与移植新鲜胰岛小鼠相比,移植类器官小鼠的血糖、血清胰岛素水平没有明显的差别。

胰岛成体干细胞的发现为胰岛生物学的研究翻开新篇章,让研究者有机会针对这类干细胞,开发在体内原位或是体外扩增 β 细胞的方法。Wang等人^[130,133]建立的一套从Procr细胞分化得到内分泌细胞的可控流程,拓宽了人们在体外获得 β 细胞的思路。而成体干细胞在体内胰岛发育与稳态维持中的作用尚需更多的探索^[134]。只有成体干细胞对 β 细胞新生的贡献得到量化,才能真正了解成体干细胞在胰岛发育和稳态维持中的生物学意义。值得注意的是,“成体干细胞的分化”和“ β 细胞复制”两种理论并不互斥。成体干细胞处于细胞谱

系的最上游,其逐步分化产生的成熟 β 细胞的过程很可能涉及“ β 细胞复制”的步骤。这两种贡献模式是否有上下游关系需要更多的实验研究来阐明。

5 未来展望

无论是以ESCs/iPSCs、胰腺组织细胞还是胰岛成体干细胞为起点,以上多项工作已经初步实现了在体外培养得到有胰岛素分泌能力的类 β 细胞或胰岛类器官(表1)。非常多研究者为了胰岛类器官培养方法的优化发展做出了贡献,很遗憾无法一一详述。然而,在目前的胰岛类器官培养体系中,依然存在着一些共性的问题:胰岛类器官的成熟往往需要长时间的诱导或依赖于体内移植,与新鲜胰岛的胰岛素分泌水平、葡萄糖响应能力之间还有明显的差距。此外,在实际的移植应用中,ESCs/iPSCs的致癌风险、基质胶的生物成分、胰岛类器官的免疫原性以及移植后存活概率等问题仍亟待解决。想要进一步让胰岛类器官在临床移植上具有替代胰岛的实用价值,还有多方面的问题需要优化、解决(图3)。

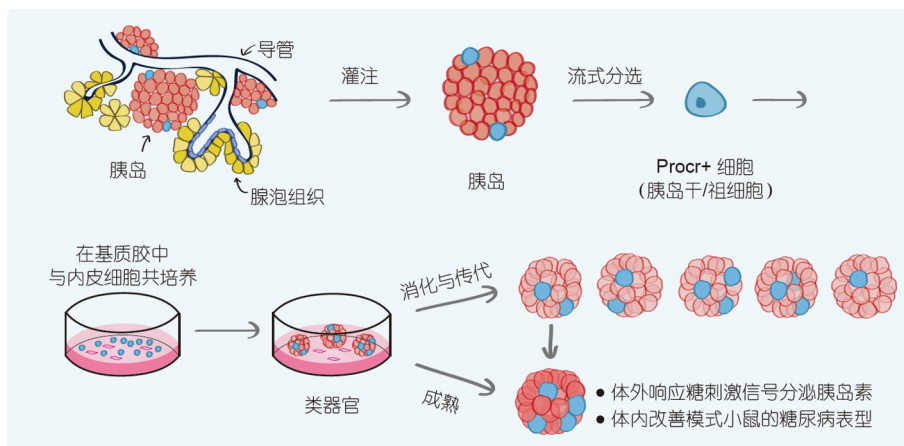


图 2 分离小鼠胰岛Procr成体干/祖细胞并在体外培养获得胰岛类器官。在小鼠胰腺组织中,胰岛被外分泌腺泡组织和导管组织包裹,仅占细胞总量的1%。通过从胰管灌注消化液的方式,可以使胰岛从胰腺中分离。通过流式细胞术,利用膜表面标记Procr富集成体干/祖细胞,在基质胶中与内皮细胞共培养得到由Procr细胞增殖形成的胰岛类器官。这些类器官可以通过传代实现数量扩增;在任何培养代次,可以通过延长培养时间、高低糖浓度刺激等手段使类器官达到成熟状态。成熟的胰岛类器官中包含功能性 β 细胞,能够在体外响应糖刺激信号分泌胰岛素,也能在移植后在体内发挥降糖功能、改善 I 型糖尿病模式小鼠的糖尿病表型。

Figure 2 Isolation of mouse pancreatic islet Procr adult progenitor cells for islet organoids culture *in vitro*. In mouse pancreatic tissue, islets are embedded among exocrine acinar and ductal tissue, accounting for only 1% of the total pancreatic cells. Islets can be separated from the pancreas by perfusion. Using the membrane surface marker Procr, the adult islet progenitor cells are enriched by fluorescence-activated cell sorting (FACS), followed by coculturing with endothelial cells in Matrigel to form islet organoids. The number of the organoids can be expanded by passaging, and the maturity can be induced in any passage by prolonged culture and a series of high and low glucose stimulation, etc. The mature organoid contains functional β cells that can secrete insulin in response to glucose stimulation, and reverse diabetes phenotype in type I diabetic model mice upon transplantation.

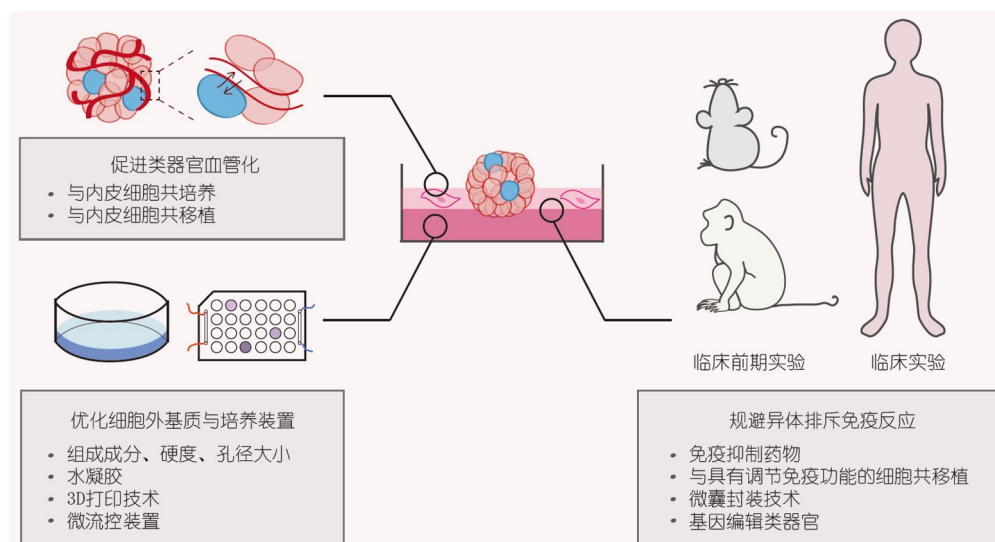


图3 胰岛类器官培养的优化。类器官的血管化可以使细胞更好地获取氧气、营养以及其他信号, 提高胰岛类器官的成熟水平和移植后成活率; 培养基质的工程化和去生物成分化可以提高类器官培养环境的可控性及安全性; 在胰岛类器官移植的应用中, 需要考虑移植后的异体免疫排斥反应, 除了现行的免疫抑制药物治疗法, 优化的手段包括与具有调节免疫功能的细胞共移植, 使用微囊技术进行封装以及通过基因编辑改变移植物的免疫原性等

Figure 3 Optimization of islet organoid culture. Firstly, vascularization provides better oxygen and nutrient uptake and other stimulative signals for the organoid cells, improving the organoid's post-transplantation survival rate. Secondly, using a synthetic matrix that contains no bioactive materials improves the controllability of the matrix and the safety of the organoids. Thirdly, allogeneic graft rejection by the recipient should be avoided when it comes to the transplantation of islet organoids. Besides the current immunosuppressive drug therapy, optimizing methods include co-transplantation with immune regulatory cells, use of encapsulation technologies and gene-editing to alter the immunogenicity of the organoid cells, etc.

5.1 培养基质优化

为了提高培养环境的可控性, 并规避生物材料在移植中的安全性问题, 人工添加化学成分的水凝胶被认为具有替代基质胶的潜力。

多种胰岛类器官的培养方法依赖于基质胶。为类器官培养提供三维环境的基质胶最早由Orkin等人^[142]从Engelbreth-Holm-Swarm小鼠肉瘤中提取, 是一种成分复杂的天然细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 其主要成分是层黏连蛋白, 也富含多种胶原、聚糖和生长因子。由于基质胶的成分复杂且无法保证生产批次间的稳定性, 且尚未被批准在临床移植中使用, 多项工作尝试使用化学合成的水凝胶替代基质胶。目前, 聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)、聚乳酸(poly(lactic acid, PLA)、聚ε-己内酯(poly(ε-caprolactone), PCL)、聚乙烯醇(poly(vinyl alcohol), PVA)、聚丙交酯共乙交酯(poly(lactide-co-glycolide), PLG)等多种材料合成的人工水凝胶被用于培养类器官^[143]。人工合成的水凝胶成分明确, 批次间质量稳定, 同时具有生物相容性和低细胞毒性, 可以为类器官的培养提供生长基

质。但化学合成的水凝胶中缺少生物成分, 还需要额外添加细胞因子和基质蛋白来模拟体内ECM环境。Greggio等人^[80]尝试使用与层黏连蛋白1交联的PEG水凝胶代替基质胶作为胰腺类器官的培养基质, 发现层黏连蛋白在水凝胶中的添加对于胰腺类器官祖细胞的维持十分重要, 且较软的(~250 Pa)凝胶硬度更利于胰腺类器官的生长。具有微孔结构的水凝胶也可作为控制胰岛类器官大小的“模具”。人多能干细胞(human pluripotent stem cells, hPSCs)在悬浮培养中自发聚集成的细胞团块并不能提供最优的细胞-细胞、细胞-基质间联系, Youngblood等人^[51]使用PLG和PEG-马来酰亚胺合成了具有250~400 μm大小微孔的水凝胶, 使在其中培养类器官具有可控的细胞密度和体积/面积比例。也有研究认为支持介质会影响胰腺类器官的成熟状态, 在Jin等人^[120]的研究中, CD133⁺Sox9⁺的胰腺祖细胞能在基质胶中扩增形成克隆, 但难以产生成熟的内分泌细胞, 而转移到含有层黏连蛋白的水凝胶中后, 类器官更倾向于向内分泌细胞分化。类似地, Candiello等人^[53]使用阿米卡星(Amikacin hydrate)和聚(乙

二醇)二缩水甘油醚(poly(ethyleneglycol) diglycidyl ether, PEGDE)合成了一种新型水凝胶Amikagel, 并将从hESCs诱导得到的胰腺祖细胞分别在Amikagel和Matrigel上培养, 发现细胞在Amikagel能自发聚集成圆形集落, 并逐渐转化为具有ECM的胰腺类器官。同时认为, 与Matrigel相比, Amikagel培养得到的胰腺类器官有着更高的成熟度, 能更好地响应糖刺激。以上的几项工作证明, 人造水凝胶可以为胰岛类器官提供增殖、分化与成熟的环境, 且对水凝胶成分的优化可以改良胰岛类器官的状态。除此之外, 3D打印技术^[54]和微流控芯片技术^[144]也已在胰岛类器官的培养中做出了初步的尝试, 为更好地模拟体内基质环境提供了更多的可能。

5.2 血管化类器官

血管内皮细胞是胰岛生态位的重要组成部分。在胚胎发育时期, 血管内皮细胞响应胰岛上皮分泌的VEGF信号并在内分泌细胞的发育、分化中起诱导作用^[145,146]。在体外, 血管内皮细胞和胰岛类器官在共培养中会出现自发的聚集, 由iPSCs诱导得到的胰岛类器官表达更高的 β 细胞特征基因、具有更强的胰岛素分泌和葡萄糖响应能力^[147,148]。Talavera-Adame等人^[148]观察到, 在类器官与内皮细胞的接触界面上, 胰岛素原和PDX1的表达水平更高, 这预示了血管内皮细胞对胰岛细胞成熟有诱导作用。最近, Wang等人^[130]的研究将Procr胰岛干细胞与血管内皮细胞共培养, 使用简单的培养因子组合, 在基质胶中就可以完成从祖细胞扩增到胰岛素分泌细胞分化的成熟过程。

β 细胞在移植后, 由于长时间缺少氧气和营养供应, 会出现高比例的损失^[149], 与血管内皮细胞的共培养被认为是解决这些问题的有效策略。在多种模式动物的新鲜胰岛移植中, 加入血管内皮细胞或内皮祖细胞被认为可以加快重构移植胰岛中的血液运输、增加 β 细胞的存活率, 以更好、更快地改善接受者的血糖^[150~152]。Takahashi等人^[58]开发的体外自主聚集系统, 可以将组织碎片或类器官与人脐静脉内皮细胞、人间充质干细胞混合, 形成血管化的基团。他们发现, 在移植后7天, 血管化的移植胰岛中有着与体内胰岛相当的血管面积, 且血管中存在血液循环; 而单独移植的胰岛很难建立血管重塑, 细胞数量逐渐减少。

5.3 规避免疫排斥

在异体胰岛移植中, 移植物引起的免疫排斥和受体的自身免疫攻击会影响移植细胞的存活^[153]。如何解决移植后的免疫排斥、再次自身免疫攻击也是胰岛类器官应用于临床前必须要解决的问题。

尸体来源的胰岛移植疗法已经提供了很多临床经验。埃德蒙顿方案提出的西罗莫司(Sirolimus)、他克莫司(tacrolimus)、达利珠单抗(Daclizumab)联合使用策略, 可以实现无糖皮质激素的免疫抑制, 已被应用于临床胰岛移植^[154]。为了规避移植在门静脉中与血液直接接触引起的凝血、补体级联反应, 移植到肾囊、肌肉、胃黏膜和脾脏等部位的可能性也正在被探索^[155]。然而, 目前接受胰岛移植治疗的患者依然需要终身服用免疫抑制性药物。

微囊封装技术有推动胰岛类器官应用于临床移植的潜力。微囊封装技术指使用具有生物相容性的材料封装移植物, 通过物理屏障防止免疫排斥, 以提高移植物的存活能力。使用微囊封装改善移植胰岛存活的技术进展已被Desai和Shea^[156]、Scharp和Marchetti^[157]完整地综述。目前, 使用改良海藻酸盐封装的胰岛最长可在啮齿动物体内存活一年并改善糖尿病模型小鼠的血糖^[158], 同样在狗^[159]、猪^[160]等大动物中也取得了一些成功。Vegas等人^[161]使用改良海藻酸盐微囊封装SC- β 细胞, 移植物可以在无免疫抑制治疗的糖尿病模型小鼠体内存活174天并恢复其血糖调节能力。目前, Via-Cyte和Semma/Vertex等公司已经开始进行临床实验, 推动微囊封装的SC- β 细胞于临床上的应用。

与具有免疫调节能力的细胞共移植能够为移植物提供保护。调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)能够分泌抑炎性细胞因子, 例如转化生长因子(TGF- β)、白介素10(interleukin-10, IL-10)、白介素35(interleukin-35, IL-35)等, 吸收白介素2(interleukin-2, IL-2), 减少其他T细胞增殖, 通过配体、受体结合抑制T细胞活化或诱导目标细胞凋亡^[162]。几年来的多项临床试验也显示了Treg移植在治疗自身免疫疾病和预防免疫排斥中的潜力^[163]。在具有免疫能力的小鼠体中, 将Treg与胰岛共同移植可以延长移植物的存活率, 恢复自身免疫型糖尿病小鼠的血糖^[164,165]。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)也拥有免疫调节的能力。MSCs能分泌前列腺素2

表 1 类β细胞和胰岛类器官的培养方法

Table 1 Methods of generating β-like cells and islet organoids

细胞来源	参考文献	培养策略	贡献	体外表型和功能	移植后表型和功能
hESCs	Assady等人 ^[14]	自发分化	发现hESCs能自发分化为胰腺内分泌谱系的细胞	60%~70%的胚状体在自发分化14天后产生INS ⁺ 细胞(细胞数量占比为1%~3%)	—
hESCs	D'Amour等人 ^[15]	逐步诱导分化	建立了高效的由多能干细胞逐步分化成内胚层细胞的步骤	以80%的诱导分化效率得到定形内胚层细胞,为后续提高内分泌细胞分化效率打下了基础	—
hESCs	D'Amour等人 ^[16]	逐步诱导分化	最早建立了由多能干细胞逐步诱导分化形成胰岛素分泌细胞的步骤	在内分泌细胞阶段分化15天后,7.3%的细胞为INS ⁺ .培养基中可检测到C肽且C肽的释放受KCl调控	—
hESCs	Kroon等人 ^[17]	逐步诱导分化	证明多能干细胞分化而来的胰腺内胚层细胞在移植到小鼠体内后具有形成胰岛素分泌细胞的功能	体外分化至胰腺上皮祖细胞阶段,在该阶段表达激素的细胞比例很低	胰腺上皮祖细胞在移植3个月后,0.5×10 ⁷ ~1×10 ⁷ 个细胞产生胰岛素和C肽的能力与约3000个人类胰岛类似.移植物成瘤率为2.2%
hESCs	Cho等人 ^[135]	逐步诱导分化	发现β细胞素和烟酰胺能诱导向胰腺前体细胞和内分泌细胞的分化	β细胞素和烟酰胺的添加诱导了PDX1基因的表达和β细胞的分化.胰岛素RNA水平很低,但检测到了C肽	—
hESCs; mESCs	Chen等人 ^[41]	逐步诱导分化	通过高通量化学筛选发现了能高效诱导多能干细胞向胰腺谱系分化的小分子(-)-吡啶内酰胺V	(-)-吡啶内酰胺V提高了PDX1 ⁺ 胰腺上皮前体细胞的诱导效率,产生的INS ⁺ 细胞比例提升(从0.2%到0.5%),且INS ⁺ 细胞中同时表达GCG的双激素阳性细胞比例大大降低(从75.2%到19.5%)	移植物中存在INS ⁺ /C肽 ⁺ 的双阳性细胞.移植12周后成瘤率33.3%
I型糖尿病患者体细胞来源的iPSCs	Maehr等人 ^[136]	逐步诱导分化	建立了由糖尿病患者体细胞来源的iPSCs细胞系并将其诱导分化成胰腺内分泌细胞	能产生INS ⁺ 细胞,C肽释放受葡萄糖刺激调控	—
hESCs; iPSCs	Zhang等人 ^[137]	逐步诱导分化	优化了诱导分化步骤,使用EGF以提高胰腺前体细胞的扩增	约25%的细胞为INS ⁺ ,胰岛素和C肽的释放能响应糖刺激	—
hESCs	Mfopou等人 ^[138]	逐步诱导分化	发现头蛋白、视黄醇和成纤维细胞生长因子能诱导胰腺谱系细胞的分化	头蛋白、视黄醇和成纤维细胞生长因子的组合抑制了肝脏谱系而以50%~80%的效率诱导了胰腺谱系细胞的分化	—
hiPSCs	Nostro等人 ^[32]	逐步诱导分化	TGF-β和WNT信号在诱导分化中起关键作用	在培养第22天INS ⁺ 细胞比例约为6.7%,但大多数细胞是多激素阳性的	—
hESCs	Rezania等人 ^[20]	逐步诱导分化	诱导分化产物在糖尿病模型小鼠体内产生成熟的胰岛样细胞并恢复小鼠血糖	在内分泌前体细胞阶段分化4天后,98%的细胞表达PDX1,86%的细胞表达NKX6.1	在移植后14周检测到C肽,STZ诱导的糖尿病小鼠在移植后32周血糖恢复正常.移植前40%的内分泌细胞为双激素阳性,移植3个月后95%的胰岛素分泌细胞为单激素阳性
hESCs; hiPSCs	Pagliuca等人 ^[35]	逐步诱导分化; 悬浮培养	提高了单激素阳性细胞的生成效率	七步诱导产生的细胞胰岛素酶原、胰岛素分泌能力约为成人β细胞的0.03和0.029倍,其分泌能响应多轮葡萄糖刺激	移植到免疫缺陷小鼠体内后两周开始检测到胰岛素分泌,移植到秋田小鼠体内12周后使其血糖处于正常水平

(表1续1)

细胞来源	参考文献	培养策略	贡献	体外表型和功能	移植后表型和功能
hESCs	Rezania等人 ^[40]	逐步诱导分化; 气-液双相培养	以2:1的高效率从hESCs 诱导得到NKX6.1 ⁺ /INS ⁺ 细胞	七步诱导产生的INS ⁺ / MAFA ⁺ 细胞中与胰岛素 分泌和β细胞成熟相关基因 的转录水平与人胰岛相似, 但无法快速对糖刺激做出反应	移植到非糖尿病小鼠体内 后4周内成熟并产生胰岛素, 移植到STZ诱导的糖尿病模 型小鼠体内40天后恢复小 鼠血糖
I 型糖尿病 患者皮肤成 纤维细胞来 源的hiPSCs	Millman等人 ^[68]	逐步诱导分化; 悬浮培养	从 I 型糖尿病患者的组织 细胞诱导分化产生了有功能 的胰岛素分泌细胞	I 型糖尿病患者来源的hiPSCs 分化产生C肽 ⁺ /NKX6.1 ⁺ 细胞 的比例、分泌胰岛素和响应糖 刺激的能力与健康人来源的 hiPSCs无差异	移植后效果无差异
hESCs	Ghazizadeh等 人 ^[42]	逐步诱导分化; 悬浮培养	通过高通量化学筛选发现 了促进胰岛素分泌细胞产生 和成熟的小分子ROCK 抑制剂H1152	H1152提高了INS ⁺ 细胞的产生 效率(从约12.2%到29.8 %)和 胰岛素分泌水平	移植到STZ诱导糖尿病的小 鼠体内, H1152处理的细胞 能在10天内降低其血糖. 约 5个月移植物中60%左右的 细胞为INS ⁺
hiPSCs; 胰岛组织碎 片	Takahashi等 人 ^[58]	与间充质细胞、 内皮细胞混合并 自组织成细胞簇	含有基质细胞的胰岛类器官在 移植后有着更强的存活能力	与单独培养的胰岛相比, 共培 养胰岛的基因表达谱更类似于 新鲜胰岛	共培养胰岛内的血管面积 在移植后7天达到与新鲜胰 岛类似的水平, 将糖尿病小 鼠在的移植后存活率从40% 提升到90%
hESCs	Nair等人 ^[49]	逐步诱导分化; Aggrewells诱导重 聚集	通过重聚集促进内分泌 细胞的成熟	培养第20天产生45%~50%的 INS ⁺ 细胞, 约54.8%的C肽 ⁺ 单 激素阳性细胞, 富集激素分泌 细胞并重聚集后C肽分泌对糖 刺激和KCl刺激有反应	移植后三天能检测到 葡萄糖反应的C肽分泌, 并能维持30周. 48天后移 植物主要由单激素分泌 细胞组成, 能缓解STZ小鼠 血糖的升高
hESCs	Rosado-Olivieri 等人 ^[139]	逐步诱导分化; 悬浮培养	发现了Hippo信号通路对胰腺 细胞分化的调控作用, 抑制YAP能 促进内分泌前体细胞的分化	在胰腺前体细胞到内分泌 细胞的诱导阶段加入YAP 抑制剂, 可提高NKX6.1 ⁺ 细胞的产生率(从约29% 到50%)	YAP的抑制降低了移植物 中SOX9 ⁺ 细胞的比例(从约 17%到3%), 降低了非内分 泌细胞产生的风险
hESCs; hiPSCs	Mahaddalkar等 人 ^[23]	逐步诱导分化; 悬浮重聚集	发现在逐步分化过程中由 CD177标记的定形内胚层细胞 能在体外更高效、更特异地分 化为胰腺祖细胞	最终产物中约62%的细胞 为INS ⁺ /NKX6.1 ⁺ , 其中10% 为多激素阳性的. 胰岛素 分泌量受糖刺激调控	—
hESCs	Weng等人 ^[140]	逐步诱导分化; 悬浮培养	通过单细胞测序揭示了 诱导分化过程中的转录调控, 并精准改良了诱导因子在各 分化阶段的使用	在胰腺前体细胞阶段使用 ROCKII抑制剂, 在内分泌前体 细胞阶段使用 NOTCH抑制剂, 以及在内分泌细胞阶段去除 TGF-β抑制剂能优化分化和成 熟过程	—
hiPSCs	Yoshihara等 人 ^[63]	逐步诱导分化; 悬浮培养; 结冷胶3D培养; 内皮细胞、脂肪 干细胞共培养	形成了具有逃逸免疫攻击能力 的胰岛类器官	50%~60%的细胞共表达胰岛 素和β细胞标志物	过表达PD-L1的胰岛类 器官在免疫功能正常 的糖尿病小鼠中恢复 葡萄糖稳态达到50天. IFNγ诱导PD-L1表达的 胰岛类器官在免疫功能 正常的糖尿病小鼠中恢复 葡萄糖稳态约40天
hESCs; hiPSCs	Ma等人 ^[43]	逐步诱导分化; 悬浮培养	通过高通量筛选发现了在诱导 分化过程中促进胰腺祖细胞扩 增的小分子I-BET151, 使胰腺祖 细胞能持续传代扩增	得到了可传代超过35次 的胰腺祖细胞, 其分化产生 的每1000个内分泌细胞含 有约 1.248 ng C肽和 8.93 ng胰岛素, 且其释放 能响应糖刺激	移植后3天能检测到响应葡 萄糖的C肽分泌, 并能维持 12周. STZ诱导的糖尿病模 型小鼠在移植后2周血糖开 始降低, 在3周恢复到正常 水平

(表1续2)

细胞来源	参考文献	培养策略	贡献	体外表型和功能	移植后表型和功能
hESCs; hiPSCs	Balboa等人 ^[73]	逐步诱导分化; 悬浮培养; Matrigel培养; 微孔板聚集	优化了逐步分化策略, 提高了内分泌细胞的成熟水平	在经过6周的成熟后得到了40%的胰岛素单阳性细胞, <5%的INS ⁺ /GCG ⁺ 双阳性细胞, 约4%的SST ⁺ 细胞和约6.5%的肠嗜铬样细胞. 类器官具有葡萄糖响应的、与成人胰岛水平相似的胰岛素分泌能力	移植到正常血糖小鼠体内1个月可检测到循环C肽, 受体小鼠在STZ处理下有更好的血糖调控能力
hiPSCs	Du等人 ^[141]	逐步诱导分化; 悬浮培养	提高了内分泌祖细胞向激素分泌细胞的分化效率, 移植到灵长类糖尿病模型动物体内并改善了其血糖	最后阶段的聚集体中含有约60%的β细胞、11%的α样细胞、7%的δ样细胞、4%的胰腺祖细胞和15%的肠嗜铬细胞	糖尿病模型恒河猴在移植后15周时平均外源性胰岛素需求下降了49%
人肝干细胞样细胞	Navarro-Tableros等人 ^[123]	自发分化; 鱼精蛋白诱导的细胞聚集	从肝组织细胞诱导产生胰岛内分泌细胞	产生约51.9%的INS ⁺ 细胞, 约31.8%的INS ⁺ /GCG ⁺ 双阳性细胞, C肽水平约为人胰岛的1/20, 对高低糖刺激有反应	SCID糖尿病模型小鼠在移植1周后血糖恢复, 并能维持8周
鼠Procr ⁺ 胰岛内分泌祖细胞	Wang等人 ^[130]	Matrigel培养; 血管内皮细胞共培养	在成年小鼠胰岛中发现了由Procr标记的胰岛内分泌祖细胞, 且Procr细胞能在体扩增、分化成胰岛素分泌细胞	培养28天、经3轮葡萄糖刺激后的类器官培养液中胰岛素和C肽的分泌量达到了新鲜胰岛分泌量的25%和40%	移植1周后STZ诱导的糖尿病小鼠血糖恢复到正常值

(PGE2)、吡啶胺2,3-双加氧酶(IDO)、转化生长因子(TGF-β)、一氧化氮(NO)、白介素10(IL-10)等抑炎因子, 对抗原呈递和免疫细胞的增殖、成熟进行调控^[166,167]. 在小鼠模型中, MSCs共移植方法被证实能够改善移植胰岛的功能^[168~170]. 共移植的MSCs可能通过调节局部天然免疫细胞的抗原呈递能力^[170]、抑制T细胞的增殖和活化, 从而抑制淋巴细胞在移植部位的浸润^[168,170]. 在灵长类模型中, 与MSCs的共移植同样延长了同种异体胰岛在移植后的存活时间, 研究者认为这可能与MSCs促进了Treg生成有关^[171]. 这些在胰岛移植中的尝试, 同样可以运用到胰岛类器官的移植中.

通过基因编辑技术操纵胰岛类器官中免疫识别相关分子的表达也为规避免疫排斥提供了一种可能. 在转基因猪-食蟹猴异体胰岛移植中, 人补体调节蛋白CD46的过表达有效限制了移植后补体介导的免疫排斥, 使移植植物能够长期(>12个月)存活并维持受体血糖^[172,173]. 与尸体胰岛、转基因猪相比, 干细胞衍生的胰岛类器官更容易进行基因编辑. 免疫检查点蛋白细胞程序性死亡-配体1(programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1)可以与细胞毒性T细胞上的受体程序性死亡受体1(programmed cell death protein 1, PD-1)结合, 从而诱导其程序性死亡, 对免疫攻击进行负调控. Yoshihara等人^[63]使用过表达PD-L1的慢病

毒感染iPSCs细胞, 经逐步诱导产生人胰岛类器官. 移植到具有正常免疫能力的糖尿病小鼠体内后, 过表达PD-L1的胰岛类器官能够使小鼠血糖恢复正常超过50天, 而对照组小鼠的血糖在移植后10天就开始上升. 除了对已知的免疫调控基因进行操控外, Cai等人^[174]设计了一种无偏向筛选体系, 对NOD一型糖尿病模型小鼠来源的NIT-1β细胞系的19050个基因进行突变, 随后将突变细胞移植到NOD小鼠体内. 通过对存活细胞进行分析, 找到了与自身免疫相关的基因*Rnls*, 并发现*Rnls*的突变可以保护β细胞免受自身免疫攻击.

如今, 已有多种策略可在体外培养得到有功能的胰岛类器官. 研究者的要求已不仅仅是得到能够产生胰岛素的细胞, 而是要得到具有糖响应能力、完整三维结构、在移植后能长期维持血糖的“人工胰岛”. 对体内胰岛发育、成熟的分子机制研究往往能够为胰岛类器官的体外培养提供灵感, 血管、间充质等组成体内胰岛生态位的组织细胞启发了体外胰岛类器官共培养的策略. 随着单细胞测序技术的发展, 也越来越清楚胰岛类器官在体外的分化路径, 方便了研究者对类器官成熟的操纵. 跨学科技术的应用也存在着巨大的潜力, 高通量筛选和芯片技术拓宽了培养液因子的选择, 材料技术带来的新型水凝胶使类器官的培养条件更加可控, 生物相容性微囊也为体内移植带来了新的思路.

目前, 胰岛类器官已成功恢复糖尿病小鼠和糖尿病非人灵长类动物^[141]的血糖(如表1), 在人类 I 型糖尿病患者体内的临床试验也已在开展^[74-76], 胰岛类器官在临床移植中的潜力刚刚开始展现。

参考文献

- Hardikar A A. Pancreatic Islet Biology. Cham: Springer International Publishing, 2016
- Lysy P A, Weir G C, Bonner-Weir S. Making β cells from adult cells within the pancreas. *Curr Diab Rep*, 2013, 13: 695–703
- Pan F C, Wright C. Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Dev Dyn*, 2011, 240: 530–565
- Brissova M, Fowler M J, Nicholson W E, et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem*, 2005, 53: 1087–1097
- Cabrera O, Berman D M, Kenyon N S, et al. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 2334–2339
- Pictet R L, Clark W R, Williams R H, et al. An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Dev Biol*, 1972, 29: 436–467
- Wessells N K, Cohen J H. Early pancreas organogenesis: morphogenesis, tissue interactions, and mass effects. *Dev Biol*, 1967, 15: 237–270
- Rutter W J, Kemp J D, Bradshaw W S, et al. Regulation of specific protein synthesis in cytodifferentiation. *J Cell Physiol*, 1968, 72: 1–18
- Jørgensen M C, Ahnfelt-Rønne J, Hald J, et al. An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocr Rev*, 2007, 28: 685–705
- Merino P L H. Developmental biology of the pancreas. *Cell Biochem Biophys*, 2004, 40: 127–142
- Miyatsuka T, Kosaka Y, Kim H, et al. Neurogenin3 inhibits proliferation in endocrine progenitors by inducing Cdkn1a. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 185–190
- Desgraz R, Herrera P L. Pancreatic neurogenin 3-expressing cells are unipotent islet precursors. *Development*, 2009, 136: 3567–3574
- Latres E, Finan D A, Greenstein J L, et al. Navigating two roads to glucose normalization in diabetes: automated insulin delivery devices and cell therapy. *Cell Metab*, 2019, 29: 545–563
- Assady S, Maor G, Amit M, et al. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes*, 2001, 50: 1691–1697
- D'Amour K A, Agulnick A D, Eliazer S, et al. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 1534–1541
- D'Amour K A, Bang A G, Eliazer S, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 1392–1401
- Kroon E, Martinson L A, Kadoya K, et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 443–452
- Bruin J E, Erenner S, Vela J, et al. Characterization of polyhormonal insulin-producing cells derived *in vitro* from human embryonic stem cells. *Stem Cell Res*, 2014, 12: 194–208
- Hrvatin S, O'Donnell C W, Deng F, et al. Differentiated human stem cells resemble fetal, not adult, β cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 3038–3043
- Rezania A, Bruin J E, Riedel M J, et al. Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice. *Diabetes*, 2012, 61: 2016–2029
- Hentze H, Soong P L, Wang S T, et al. Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res*, 2009, 2: 198–210
- Wang P, Rodriguez R T, Wang J, et al. Targeting SOX17 in human embryonic stem cells creates unique strategies for isolating and analyzing developing endoderm. *Cell Stem Cell*, 2011, 8: 335–346
- Mahaddalkar P U, Scheibner K, Pfluger S, et al. Generation of pancreatic β cells from CD177⁺ anterior definitive endoderm. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 1061–1072
- Rezania A, Bruin J E, Xu J, et al. Enrichment of human embryonic stem cell-derived NKX6.1-expressing pancreatic progenitor cells accelerates the maturation of insulin-secreting cells *in vivo*. *Stem Cells*, 2013, 31: 2432–2442
- Kelly O G, Chan M Y, Martinson L A, et al. Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem

- cells. [Nat Biotechnol](#), 2011, 29: 750–756
- 26 Veres A, Faust A L, Bushnell H L, et al. Charting cellular identity during human *in vitro* β -cell differentiation. [Nature](#), 2019, 569: 368–373
- 27 Basford C L, Prentice K J, Hardy A B, et al. The functional and molecular characterisation of human embryonic stem cell-derived insulin-positive cells compared with adult pancreatic beta cells. [Diabetologia](#), 2012, 55: 358–371
- 28 Micallef S J, Li X, Schiesser J V, et al. INS GFP/w human embryonic stem cells facilitate isolation of *in vitro* derived insulin-producing cells. [Diabetologia](#), 2012, 55: 694–706
- 29 Gittes G K. Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review. [Dev Biol](#), 2009, 326: 4–35
- 30 Nostro M C, Keller G. Generation of beta cells from human pluripotent stem cells: potential for regenerative medicine. [Semin Cell Dev Biol](#), 2012, 23: 701–710
- 31 Jiang W, Shi Y, Zhao D, et al. *In vitro* derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. [Cell Res](#), 2007, 17: 333–344
- 32 Nostro M C, Sarangi F, Ogawa S, et al. Stage-specific signaling through TGF β family members and WNT regulates patterning and pancreatic specification of human pluripotent stem cells. [Development](#), 2011, 138: 861–871
- 33 Cheng X, Ying L, Lu L, et al. Self-renewing endodermal progenitor lines generated from human pluripotent stem cells. [Cell Stem Cell](#), 2012, 10: 371–384
- 34 Wandzioch E, Zaret K S. Dynamic signaling network for the specification of embryonic pancreas and liver progenitors. [Science](#), 2009, 324: 1707–1710
- 35 Pagliuca F W, Millman J R, Gürtler M, et al. Generation of functional human pancreatic β cells *in vitro*. [Cell](#), 2014, 159: 428–439
- 36 Rezanian A, Riedel M J, Wideman R D, et al. Production of functional glucagon-secreting α -cells from human embryonic stem cells. [Diabetes](#), 2011, 60: 239–247
- 37 Shih H P, Kopp J L, Sandhu M, et al. A Notch-dependent molecular circuitry initiates pancreatic endocrine and ductal cell differentiation. [Development](#), 2012, 139: 2488–2499
- 38 Russ H A, Parent A V, Ringler J J, et al. Controlled induction of human pancreatic progenitors produces functional beta-like cells *in vitro*. [EMBO J](#), 2015, 34: 1759–1772
- 39 Schulz T C, Young H Y, Agulnick A D, et al. A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. [PLoS ONE](#), 2012, 7: e37004
- 40 Rezanian A, Bruin J E, Arora P, et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived *in vitro* from human pluripotent stem cells. [Nat Biotechnol](#), 2014, 32: 1121–1133
- 41 Chen S, Borowiak M, Fox J L, et al. A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage. [Nat Chem Biol](#), 2009, 5: 258–265
- 42 Ghazizadeh Z, Kao D I, Amin S, et al. ROCKII inhibition promotes the maturation of human pancreatic beta-like cells. [Nat Commun](#), 2017, 8: 298
- 43 Ma X, Lu Y, Zhou Z, et al. Human expandable pancreatic progenitor-derived β cells ameliorate diabetes. [Sci Adv](#), 2022, 8: eabk1826
- 44 Thakur G, Lee H J, Jeon R H, et al. Small molecule-induced pancreatic β -like cell development: mechanistic approaches and available strategies. [Int J Mol Sci](#), 2020, 21: 2388
- 45 Ma X, Zhu S. Chemical strategies for pancreatic β cell differentiation, reprogramming, and regeneration. [Acta Biochim Biophys Sin](#), 2017, 49: 289–301
- 46 Puri S, Hebrok M. Dynamics of embryonic pancreas development using real-time imaging. [Dev Biol](#), 2007, 306: 82–93
- 47 Jeon J, Correa-Medina M, Ricordi C, et al. Endocrine cell clustering during human pancreas development. [J Histochem Cytochem](#), 2009, 57: 811–824
- 48 Kim Y, Kim H, Ko U H, et al. Islet-like organoids derived from human pluripotent stem cells efficiently function in the glucose responsiveness *in vitro* and *in vivo*. [Sci Rep](#), 2016, 6: 35145
- 49 Nair G G, Liu J S, Russ H A, et al. Recapitulating endocrine cell clustering in culture promotes maturation of human stem-cell-derived β cells. [Nat Cell Biol](#), 2019, 21: 263–274
- 50 Velazco-Cruz L, Song J, Maxwell K G, et al. Acquisition of dynamic function in human stem cell-derived β cells. [Stem Cell Rep](#), 2019, 12: 351–365

- 51 Youngblood R L, Sampson J P, Lebiada K R, et al. Microporous scaffolds support assembly and differentiation of pancreatic progenitors into β -cell clusters. *Acta Biomater*, 2019, 96: 111–122
- 52 Velazco-Cruz L, Goedegebuure M M, Maxwell K G, et al. SIX2 regulates human β cell differentiation from stem cells and functional maturation *in vitro*. *Cell Rep*, 2020, 31: 107687
- 53 Candiello J, Grandhi T S P, Goh S K, et al. 3D heterogeneous islet organoid generation from human embryonic stem cells using a novel engineered hydrogel platform. *Biomaterials*, 2018, 177: 27–39
- 54 Song J, Millman J R. Economic 3D-printing approach for transplantation of human stem cell-derived β -like cells. *Biofabrication*, 2016, 9: 015002
- 55 Nair G, Hebrok M. Islet formation in mice and men: lessons for the generation of functional insulin-producing β -cells from human pluripotent stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, 2015, 32: 171–180
- 56 Reinert R B, Cai Q, Hong J Y, et al. Vascular endothelial growth factor coordinates islet innervation *via* vascular scaffolding. *Development*, 2014, 141: 1480–1491
- 57 Borden P, Houtz J, Leach S D, et al. Sympathetic innervation during development is necessary for pancreatic islet architecture and functional maturation. *Cell Rep*, 2013, 4: 287–301
- 58 Takahashi Y, Sekine K, Kin T, et al. Self-condensation culture enables vascularization of tissue fragments for efficient therapeutic transplantation. *Cell Rep*, 2018, 23: 1620–1629
- 59 Lebreton F, Lavallard V, Bellofatto K, et al. Insulin-producing organoids engineered from islet and amniotic epithelial cells to treat diabetes. *Nat Commun*, 2019, 10: 4491
- 60 Phelps E A, Cianciaruso C, Santo-Domingo J, et al. Advances in pancreatic islet monolayer culture on glass surfaces enable super-resolution microscopy and insights into beta cell ciliogenesis and proliferation. *Sci Rep*, 2017, 7: 45961
- 61 Olerud J, Kanaykina N, Vasylovska S, et al. Neural crest stem cells increase beta cell proliferation and improve islet function in co-transplanted murine pancreatic islets. *Diabetologia*, 2009, 52: 2594–2601
- 62 Grouwels G, Vasylovska S, Olerud J, et al. Differentiating neural crest stem cells induce proliferation of cultured rodent islet beta cells. *Diabetologia*, 2012, 55: 2016–2025
- 63 Yoshihara E, O'Connor C, Gasser E, et al. Immune-evasive human islet-like organoids ameliorate diabetes. *Nature*, 2020, 586: 606–611
- 64 Jaramillo M, Mathew S, Mamiya H, et al. Endothelial cells mediate islet-specific maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitor cells. *Tissue Eng Part A*, 2015, 21: 14–25
- 65 Guo T, Landsman L, Li N, et al. Factors expressed by murine embryonic pancreatic mesenchyme enhance generation of insulin-producing cells from hESCs. *Diabetes*, 2013, 62: 1581–1592
- 66 Takebe T, Enomura M, Yoshizawa E, et al. Vascularized and complex organ buds from diverse tissues via mesenchymal cell-driven condensation. *Cell Stem Cell*, 2015, 16: 556–565
- 67 Maxwell K G, Millman J R. Applications of iPSC-derived beta cells from patients with diabetes. *Cell Rep Med*, 2021, 2: 100238
- 68 Millman J R, Xie C, Van Dervort A, et al. Generation of stem cell-derived β -cells from patients with type 1 diabetes. *Nat Commun*, 2016, 7: 11463
- 69 Maxwell K G, Augsornworawat P, Velazco-Cruz L, et al. Gene-edited human stem cell-derived β cells from a patient with monogenic diabetes reverse preexisting diabetes in mice. *Sci Transl Med*, 2020, 12: eaax9106
- 70 Petersen M B K, Azad A, Ingvorsen C, et al. Single-cell gene expression analysis of a human ESC model of pancreatic endocrine development reveals different paths to β -cell differentiation. *Stem Cell Rep*, 2017, 9: 1246–1261
- 71 Wesolowska-Andersen A, Jensen R R, Alcántara M P, et al. Analysis of differentiation protocols defines a common pancreatic progenitor molecular signature and guides refinement of endocrine differentiation. *Stem Cell Rep*, 2020, 14: 138–153
- 72 Augsornworawat P, Maxwell K G, Velazco-Cruz L, et al. Single-cell transcriptome profiling reveals β cell maturation in stem cell-derived islets after transplantation. *Cell Rep*, 2020, 32: 108067
- 73 Balboa D, Barsby T, Lithovius V, et al. Functional, metabolic and transcriptional maturation of human pancreatic islets derived from stem cells. *Nat Biotechnol*, 2022, doi: 10.1038/s41587-022-01219-z
- 74 Ramzy A, Thompson D M, Ward-Hartstonge K A, et al. Implanted pluripotent stem-cell-derived pancreatic endoderm cells secrete glucose-responsive C-peptide in patients with type 1 diabetes. *Cell Stem Cell*, 2021, 28: 2047–2061.e5

- 75 Shapiro A M J, Thompson D, Donner T W, et al. Insulin expression and C-peptide in type 1 diabetes subjects implanted with stem cell-derived pancreatic endoderm cells in an encapsulation device. *Cell Rep Med*, 2021, 2: 100466
- 76 Vertex Announces FDA . Clearance of investigational new drug (IND) application for VX-880, a novel cell therapy for the treatment of Type 1 diabetes (T1D). Vertex Newsroom. <https://news.vrtx.com/press-release/vertex-announces-fda-clearance-investigational-new-drug-ind-application-vx-880-novel>. Accessed February 7, 2021
- 77 Gu G, Dubauskaite J, Melton D A. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3⁺ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development*, 2002, 129: 2447–2457
- 78 Obata J, Yano M, Mimura H, et al. p48 subunit of mouse PTF1 binds to RBP-Jκ/CBF-1, the intracellular mediator of Notch signalling, and is expressed in the neural tube of early stage embryos. *Genes Cells*, 2001, 6: 345–360
- 79 Seymour P A, Freude K K, Tran M N, et al. SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 1865–1870
- 80 Greggio C, De Franceschi F, Figueiredo-Larsen M, et al. Artificial three-dimensional niches deconstruct pancreas development *in vitro*. *Development*, 2013, 140: 4452–4462
- 81 Sugiyama T, Benitez C M, Ghodasara A, et al. Reconstituting pancreas development from purified progenitor cells reveals genes essential for islet differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 12691–12696
- 82 Loomans C J M, Williams Giuliani N, Balak J, et al. Expansion of adult human pancreatic tissue yields organoids harboring progenitor cells with endocrine differentiation potential. *Stem Cell Rep*, 2018, 10: 712–724
- 83 Kaung H L. Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Dev Dyn*, 1994, 200: 163–175
- 84 McEvoy R C, Madson K L. Pancreatic insulin-, glucagon-, and somatostatin-positive isle cell populations during the perinatal development of the rat. II. Changes in hormone content and concentration. *Neonatology*, 1980, 38: 255–259
- 85 McEvoy R C. Changes in the volumes of the A-, B-, and D-cell populations in the pancreatic islets during the postnatal development of the rat. *Diabetes*, 1981, 30: 813–817
- 86 Wang R N, Bouwens L, Klöppel G. Beta-cell proliferation in normal and streptozotocin-treated newborn rats: site, dynamics and capacity. *Diabetologia*, 1994, 37: 1088–1096
- 87 Bouwens L, Wang R N, De Blay E, et al. Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas. *Diabetes*, 1994, 43: 1279–1283
- 88 Dor Y, Brown J, Martinez O I, et al. Adult pancreatic β-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*, 2004, 429: 41–46
- 89 Teta M, Rankin M M, Long S Y, et al. Growth and regeneration of adult β cells does not involve specialized progenitors. *Dev Cell*, 2007, 12: 817–826
- 90 Salpeter S J, Klein A M, Huangfu D, et al. Glucose and aging control the quiescence period that follows pancreatic beta cell replication. *Development*, 2010, 137: 3205–3213
- 91 Brennand K, Huangfu D, Melton D. All β cells contribute equally to islet growth and maintenance. *PLoS Biol*, 2007, 5: e163
- 92 Jiang F X, Morahan G. Pancreatic stem cells remain unresolved. *Stem Cells Dev*, 2014, 23: 2803–2812
- 93 Smukler S R, Arntfield M E, Razavi R, et al. The adult mouse and human pancreas contain rare multipotent stem cells that express insulin. *Cell Stem Cell*, 2011, 8: 281–293
- 94 Liu Y, Suckale J, Masjkur J, et al. Tamoxifen-independent recombination in the RIP-CreER mouse. *PLoS ONE*, 2010, 5: e13533
- 95 Zhao H, Huang X, Liu Z, et al. Pre-existing beta cells but not progenitors contribute to new beta cells in the adult pancreas. *Nat Metab*, 2021, 3: 352–365
- 96 Seaberg R M, Smukler S R, Kieffer T J, et al. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 1115–1124
- 97 Gribben C, Lambert C, Messal H A, et al. Ductal Ngn3-expressing progenitors contribute to adult β cell neogenesis in the pancreas. *Cell Stem Cell*, 2021, 28: 2000–2008
- 98 Thorel F, Népote V, Avril I, et al. Conversion of adult pancreatic α-cells to β-cells after extreme β-cell loss. *Nature*, 2010, 464: 1149–1154
- 99 Collombat P, Xu X, Ravassard P, et al. The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into α and subsequently β

- cells. *Cell*, 2009, 138: 449–462
- 100 Yang Y P, Thorel F, Boyer D F, et al. Context-specific α -to- β -cell reprogramming by forced Pdx1 expression. *Genes Dev*, 2011, 25: 1680–1685
 - 101 Xiao X, Guo P, Shiota C, et al. Endogenous reprogramming of alpha cells into beta cells, induced by viral gene therapy, reverses autoimmune diabetes. *Cell Stem Cell*, 2018, 22: 78–90
 - 102 Chakravarthy H, Gu X, Enge M, et al. Converting adult pancreatic islet α cells into β cells by targeting both Dnmt1 and Arx. *Cell Metab*, 2017, 25: 622–634
 - 103 Bramswig N C, Everett L J, Schug J, et al. Epigenomic plasticity enables human pancreatic α to β cell reprogramming. *J Clin Invest*, 2013, 123: 1275–1284
 - 104 Bertelli E, Bendayan M. Intermediate endocrine-acinar pancreatic cells in duct ligation conditions. *Am J Physiol-Cell Physiol*, 1997, 273: C1641–C1649
 - 105 Lardon J, Huyens N, Rooman I, et al. Exocrine cell transdifferentiation in dexamethasone-treated rat pancreas. *Virchows Archiv*, 2004, 444: 61–65
 - 106 Gu D, Lee M S, Krah T, et al. Transitional cells in the regenerating pancreas. *Development*, 1994, 120: 1873–1881
 - 107 Gu D, Arnush M, Sarvetnick N. Endocrine/exocrine intermediate cells in streptozotocin-treated Ins-IFN- γ transgenic mice. *Pancreas*, 1997, 15: 246–250
 - 108 Zhou Q, Brown J, Kanarek A, et al. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. *Nature*, 2008, 455: 627–632
 - 109 Minami K, Okuno M, Miyawaki K, et al. Lineage tracing and characterization of insulin-secreting cells generated from adult pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 15116–15121
 - 110 Al-Hasani K, Pfeifer A, Courtney M, et al. Adult duct-lining cells can reprogram into β -like cells able to counter repeated cycles of toxin-induced diabetes. *Dev Cell*, 2013, 26: 86–100
 - 111 Van de Casteele M, Leuckx G, Baeyens L, et al. Neurogenin 3⁺ cells contribute to β -cell neogenesis and proliferation in injured adult mouse pancreas. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e523
 - 112 Criscimanna A, Speicher J A, Houshmand G, et al. Duct cells contribute to regeneration of endocrine and acinar cells following pancreatic damage in adult mice. *Gastroenterology*, 2011, 141: 1451–1462.e6
 - 113 Pan F C, Bankaitis E D, Boyer D, et al. Spatiotemporal patterns of multipotentiality in *Ptf1a*-expressing cells during pancreas organogenesis and injury-induced facultative restoration. *Development*, 2013, 140: 751–764
 - 114 Wang R N, Klöppel G, Bouwens L. Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia*, 1995, 38: 1405–1411
 - 115 Bonner-Weir S, Baxter L A, Schuppin G T, et al. A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas: a possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes*, 1993, 42: 1715–1720
 - 116 Inada A, Nienaber C, Katsuta H, et al. Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 19915–19919
 - 117 Xu X, D'Hoker J, Stangé G, et al. β cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell*, 2008, 132: 197–207
 - 118 Bonner-Weir S, Taneja M, Weir G C, et al. *In vitro* cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 7999–8004
 - 119 Huch M, Bonfanti P, Boj S F, et al. Unlimited *in vitro* expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. *EMBO J*, 2013, 32: 2708–2721
 - 120 Jin L, Feng T, Shih H P, et al. Colony-forming cells in the adult mouse pancreas are expandable in Matrigel and form endocrine/acinar colonies in laminin hydrogel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 3907–3912
 - 121 Lima M J, Muir K R, Docherty H M, et al. Suppression of epithelial-to-mesenchymal transitioning enhances *ex vivo* reprogramming of human exocrine pancreatic tissue toward functional insulin-producing β -like cells. *Diabetes*, 2013, 62: 2821–2833
 - 122 Lemper M, Leuckx G, Heremans Y, et al. Reprogramming of human pancreatic exocrine cells to β -like cells. *Cell Death Differ*, 2015, 22: 1117–1130
 - 123 Navarro-Tableros V, Gai C, Gomez Y, et al. Islet-like structures generated *in vitro* from adult human liver stem cells revert hyperglycemia in diabetic SCID mice. *Stem Cell Rev Rep*, 2019, 15: 93–111

- 124 Ariyachet C, Tovaglieri A, Xiang G, et al. Reprogrammed stomach tissue as a renewable source of functional β cells for blood glucose regulation. [Cell Stem Cell](#), 2016, 18: 410–421
- 125 Chen Y J, Finkbeiner S R, Weinblatt D, et al. *De novo* formation of insulin-producing “neo- β cell islets” from intestinal crypts. [Cell Rep](#), 2014, 6: 1046–1058
- 126 Talchai C, Xuan S, Kitamura T, et al. Generation of functional insulin-producing cells in the gut by *Foxo1* ablation. [Nat Genet](#), 2012, 44: 406–412
- 127 Bouchi R, Foo K S, Hua H, et al. FOXO1 inhibition yields functional insulin-producing cells in human gut organoid cultures. [Nat Commun](#), 2014, 5: 4242
- 128 Li K, Zhu S, Russ H A, et al. Small molecules facilitate the reprogramming of mouse fibroblasts into pancreatic lineages. [Cell Stem Cell](#), 2014, 14: 228–236
- 129 Zhu S, Russ H A, Wang X, et al. Human pancreatic beta-like cells converted from fibroblasts. [Nat Commun](#), 2016, 7: 10080
- 130 Wang D, Wang J, Bai L, et al. Long-term expansion of pancreatic islet organoids from resident Procr⁺ progenitors. [Cell](#), 2020, 180: 1198–1211
- 131 Scavuzzo M A, Hill M C, Chmielowiec J, et al. Endocrine lineage biases arise in temporally distinct endocrine progenitors during pancreatic morphogenesis. [Nat Commun](#), 2018, 9: 3356
- 132 Byrnes L E, Wong D M, Subramaniam M, et al. Lineage dynamics of murine pancreatic development at single-cell resolution. [Nat Commun](#), 2018, 9: 3922
- 133 Wang J, Wang D, Chen X, et al. Isolation of mouse pancreatic islet Procr⁺ progenitors and long-term expansion of islet organoids *in vitro*. [Nat Protoc](#), 2022, 17: 1359–1384
- 134 Misra P S, Nostro M C. Islet-resident endocrine progenitors: a new hope for beta cell PROCRation? [Cell Stem Cell](#), 2020, 26: 471–473
- 135 Cho Y M, Lim J M, Yoo D H, et al. Betacellulin and nicotinamide sustain PDX1 expression and induce pancreatic β -cell differentiation in human embryonic stem cells. [Biochem Biophys Res Commun](#), 2008, 366: 129–134
- 136 Maehr R, Chen S, Snitow M, et al. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2009, 106: 15768–15773
- 137 Zhang D, Jiang W, Liu M, et al. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. [Cell Res](#), 2009, 19: 429–438
- 138 Mfopou J K, Chen B, Mateizel I, et al. Noggin, retinoids, and fibroblast growth factor regulate hepatic or pancreatic fate of human embryonic stem cells. [Gastroenterology](#), 2010, 138: 2233–2245
- 139 Rosado-Olivieri E A, Anderson K, Kenty J H, et al. YAP inhibition enhances the differentiation of functional stem cell-derived insulin-producing β cells. [Nat Commun](#), 2019, 10: 1464
- 140 Weng C, Xi J, Li H, et al. Single-cell lineage analysis reveals extensive multimodal transcriptional control during directed beta-cell differentiation. [Nat Metab](#), 2020, 2: 1443–1458
- 141 Du Y, Liang Z, Wang S, et al. Human pluripotent stem-cell-derived islets ameliorate diabetes in non-human primates. [Nat Med](#), 2022, 28: 272–282
- 142 Orkin R W, Gehron P, McGoodwin E B, et al. A murine tumor producing a matrix of basement membrane. [J Exp Med](#), 1977, 145: 204–220
- 143 Liu H, Wang Y, Cui K, et al. Advances in hydrogels in organoids and organs-on-a-chip. [Adv Mater](#), 2019, 31: 1902042
- 144 Tao T, Wang Y, Chen W, et al. Engineering human islet organoids from iPSCs using an organ-on-chip platform. [Lab Chip](#), 2019, 19: 948–958
- 145 Lammert E, Cleaver O, Melton D. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. [Science](#), 2001, 294: 564–567
- 146 Pierreux C E, Cordi S, Hick A C, et al. Epithelial: endothelial cross-talk regulates exocrine differentiation in developing pancreas. [Dev Biol](#), 2010, 347: 216–227
- 147 Augsornworawat P, Velazco-Cruz L, Song J, et al. A hydrogel platform for *in vitro* three dimensional assembly of human stem cell-derived islet cells and endothelial cells. [Acta Biomater](#), 2019, 97: 272–280
- 148 Talavera-Adame D, Woolcott O O, Ignatius-Irundayam J, et al. Effective endothelial cell and human pluripotent stem cell interactions generate functional insulin-producing beta cells. [Diabetologia](#), 2016, 59: 2378–2386
- 149 Jansson L, Carlsson P O. Graft vascular function after transplantation of pancreatic islets. [Diabetologia](#), 2002, 45: 749–763
- 150 Oh B J, Oh S H, Jin S M, et al. Co-transplantation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells improves revascularization and organization in islet grafts. [Am J Transplant](#), 2013, 13: 1429–1440

- 151 Coppens V, Heremans Y, Leuckx G, et al. Human blood outgrowth endothelial cells improve islet survival and function when co-transplanted in a mouse model of diabetes. [Diabetologia](#), 2013, 56: 382–390
- 152 Kang S, Park H S, Jo A, et al. Endothelial progenitor cell cotransplantation enhances islet engraftment by rapid revascularization. [Diabetes](#), 2012, 61: 866–876
- 153 Atkinson M A, Roep B O, Posgai A, et al. The challenge of modulating β -cell autoimmunity in type 1 diabetes. [Lancet Diabetes Endocrinol](#), 2019, 7: 52–64
- 154 Shapiro A M J, Lakey J R T, Ryan E A, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. [N Engl J Med](#), 2000, 343: 230–238
- 155 Bottino R, Knoll M F, Knoll C A, et al. The future of islet transplantation is now. [Front Med](#), 2018, 5: 202
- 156 Desai T, Shea L D. Advances in islet encapsulation technologies. [Nat Rev Drug Discov](#), 2017, 16: 338–350
- 157 Scharp D W, Marchetti P. Encapsulated islets for diabetes therapy: history, current progress, and critical issues requiring solution. [Adv Drug Deliver Rev](#), 2014, 67–68: 35–73
- 158 Duvivier-Kali V F, Omer A, Parent R J, et al. Complete protection of islets against allojection and autoimmunity by a simple barium-alginate membrane. [Diabetes](#), 2001, 50: 1698–1705
- 159 Soon-Shiong P, Feldman E, Nelson R, et al. Long-term reversal of diabetes by the injection of immunoprotected islets. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 1993, 90: 5843–5847
- 160 Dufrane D, Goebbels R M, Saliez A, et al. Six-month survival of microencapsulated pig islets and alginate biocompatibility in primates: proof of concept. [Transplantation](#), 2006, 81: 1345–1353
- 161 Vegas A J, Veiseth O, Gürtler M, et al. Long-term glycemic control using polymer-encapsulated human stem cell-derived beta cells in immune-competent mice. [Nat Med](#), 2016, 22: 306–311
- 162 Schmidt A, Oberle N, Krammer P H. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. [Front Immun](#), 2012, 3: 51
- 163 Romano M, Fanelli G, Albany C J, et al. Past, present, and future of regulatory T cell therapy in transplantation and autoimmunity. [Front Immunol](#), 2019, 10: 43
- 164 Gołąb K, Kizilel S, Bal T, et al. Improved coating of pancreatic islets with regulatory T cells to create local immunosuppression by using the biotin-polyethylene glycol-succinimidyl valeric acid ester molecule. [Transplant Proc](#), 2014, 46: 1967–1971
- 165 Graham J G, Zhang X, Goodman A, et al. PLG scaffold delivered antigen-specific regulatory T cells induce systemic tolerance in autoimmune diabetes. [Tissue Eng Part A](#), 2013, 19: 1465–1475
- 166 Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. [Nat Rev Immunol](#), 2008, 8: 726–736
- 167 Zhao Q, Ren H, Han Z. Mesenchymal stem cells: immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. [J Cell ImmunoTher](#), 2016, 2: 3–20
- 168 Ding Y, Xu D, Feng G, et al. Mesenchymal stem cells prevent the rejection of fully allogeneic islet grafts by the immunosuppressive activity of matrix metalloproteinase-2 and -9. [Diabetes](#), 2009, 58: 1797–1806
- 169 Figliuzzi M, Bonandrini B, Silvani S, et al. Mesenchymal stem cells help pancreatic islet transplantation to control type 1 diabetes. [World J Stem Cells](#), 2014, 6: 163
- 170 Li F R, Wang X G, Deng C Y, et al. Immune modulation of co-transplantation mesenchymal stem cells with islet on T and dendritic cells. [Clin Exp Immunol](#), 2010, 161: 357–363
- 171 Berman D M, Willman M A, Han D, et al. Mesenchymal stem cells enhance allogeneic islet engraftment in nonhuman primates. [Diabetes](#), 2010, 59: 2558–2568
- 172 Van der Windt D J, Bottino R, Casu A, et al. Long-term controlled normoglycemia in diabetic non-human primates after transplantation with hCD46 transgenic porcine islets. [Am J Transplant](#), 2009, 9: 2716–2726
- 173 Bottino R, Wijkstrom M, van der Windt D J, et al. Pig-to-monkey islet xenotransplantation using multi-transgenic pigs. [Am J Transplant](#), 2014, 14: 2275–2287
- 174 Cai E P, Ishikawa Y, Zhang W, et al. Genome-scale *in vivo* CRISPR screen identifies RNLS as a target for beta cell protection in type 1 diabetes. [Nat Metab](#), 2020, 2: 934–945

Advances in islet organoids

TAO Yu¹, CHEN XinYi¹, YU Cissy Qing¹ & ZENG Arial Yi^{1,2}

1 CAS Center for Excellence in Molecular Cell Science, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

2 School of Life Science, Hangzhou Institute for Advanced Study, University of Chinese Academy of Sciences, Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310024, China

Diabetes mellitus is a major public health issue and has an increasing pandemic prevalence. There is no existing treatment or medication that can cure the disease. Clinical islet transplantation has the potential to cure diabetes, yet the profound donor shortage hinders the widespread implementation of this therapy. Therefore, generating β cells *in vitro* represents an area of increasing interest. Advances in stem cell culture have made it possible to derive *in vitro* 3D tissues, called organoids. Organoid technology can be used to model organ development and diseases, and it also opens up new avenues for regenerative medicine, providing a new cell source for islet transplantation. Here, we describe current efforts aimed at generating β -like cells and islet organoids using embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, transdifferentiated cells, and adult stem cells. In addition, we discuss the remaining hurdles and optimization strategies for the clinical application of islet organoids.

islet organoid, diabetes mellitus, β cell, pluripotent stem cells, adult islet stem cells

doi: [10.1360/SSV-2022-0031](https://doi.org/10.1360/SSV-2022-0031)