



从视网膜类器官到“视网膜器官”的思考

许佳, 金子兵*

首都医科大学附属北京同仁医院, 北京市眼科研究所, 北京 100005

* 联系人, E-mail: jinz502@ccmu.edu.cn

收稿日期: 2021-10-18; 接受日期: 2021-12-26; 网络版发表日期: 2022-06-10

国家自然科学基金(批准号: 82101145)和北京市自然科学基金重点课题(批准号: Z200014)资助

摘要 视网膜退行性疾病是引起严重致盲的常见眼科疾病, 目前临床治疗仍是棘手难题. 视网膜组织难以获取且无法培养, 使视网膜相关疾病的机制研究及治疗很困难. 由于动物与人的视网膜存在显著的种属差异, 既往诸多动物实验结果往往难以转化落地而解决实际治疗问题. 视网膜类器官的出现, 成为解决这些问题的新希望. 它使视网膜相关疾病能重现在细胞培养皿中, 用于疾病致病机制及药物筛选研究, 更重要的是可用于细胞移植替代变性的视网膜细胞, 有望使失明患者重见光明. 但也必须认识到视网膜类器官模拟疾病还存在一些亟待解决的问题, 诸如分化稳定性低、缺乏血管及神经免疫细胞等瓶颈问题. 虽然微流控生物反应器系统的应用改善了视网膜类器官的分化和培养, 但当前的技术只能做到“类器官”, 尚未达到“视网膜器官”的标准. 因此, 本文的目的就是对视网膜类器官的应用及存在的问题进行梳理, 思考如何进一步推动发展可用于再生医疗的视网膜器官, 以期更好地推动视网膜疾病的治疗和研究.

关键词 视网膜, 视网膜类器官, 视网膜疾病, 视网膜器官

眼睛虽然是小器官, 却是人类获取信号的重要窗口, 它具有精密的结构使人类能够分辨外界事物和颜色. 视网膜是眼睛的重要结构, 是“成像显示屏”. 视网膜主要由五种神经元类型组成, 即感光细胞(包括视杆细胞(rod cell, RC)和视锥细胞(cone cell, CC)), 水平细胞(horizontal cell, HC), 双极细胞(bipolar cell, BC), 无长突细胞(amacrine cell, AC), 视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC). 视网膜内还有胶质细胞Müller胶质细胞(Müller cell, MC), 星形胶质细胞(astrocyte)和小胶质细胞(microglia, MG)参与其功能整合视觉信息, 一旦损伤将会导致视力不可逆地下降甚至失明. 目前, 视网膜退行性病变, 如年龄相关性黄斑变性(age-re-

lated macular degeneration, AMD)、视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)等, 会导致感光细胞不可逆死亡, 从而影响视力, 甚至导致失明^[1]. 这类疾病在早期阶段, 临床上尚可以针对症状用药物来保护残存的感光细胞; 当疾病发展到晚期感光细胞大部分丢失, 视力不可逆损伤时, 临床治疗仍是棘手难题. 视网膜组织难以获取且无法培养, 使视网膜相关疾病的机制研究及治疗方法很困难. 再加上动物与人基因组的种属差异, 动物实验结果难以转化. 近年来, 视网膜3D培养技术产生的视网膜类器官(retinal organoids, ROs)能够在体外模拟视网膜发育过程, 疾病的发生发展过程用于药物筛选及产生移植所需的感光细胞及组织, 为视

引用格式: 许佳, 金子兵. 从视网膜类器官到“视网膜器官”的思考. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 196–210

Xu J, Jin Z B. From retinal organoids to “retinal organ” (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2023, 53: 196–210, doi: [10.1360/SSV-2021-0276](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0276)

网膜退行性疾病的治疗奠定了基础。

1 视网膜类器官发展历程

视网膜类器官的分化方法是建立在经典发育生物学、细胞解离和重新聚集自组织实验的基础上产生的^[2]。

第一批视网膜类器官是由小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs)制成的, 是Sasai Yoshiki教授课题组^[3]里程碑式的一代自组织3D视杯和小鼠mESCs层叠的神经上皮细胞, 为新一代视网膜模型铺平了道路, 该模型基于在活体发育中更紧密复制的类器官。研究对无血清类胚体漂浮培养类聚集体(serum-free floating culture of embryoid-body-like aggregates with quick reaggregation, SFEBq)方法改进, 培养的骨髓间充质干细胞在低生长因子条件下与Matrigel一起悬浮获得类胚体(embryoid like bodies, EBs), 以提供细胞外基质(extracellular matrix, ECM)。这诱导了视泡中Rax⁺视网膜祖细胞(retinal progenitor cells, RPC)的自发形成, 这些Rax⁺ RPC内陷到具有近端-远端图案的视杯状结构中, 从而分化出视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)和神经视网膜(neural retina, NR), 内陷以顶端凸起的方式进行, 反映了生物力学重建的内在能力^[3,4]。

Sasai Yoshiki教授课题组发现, 视杯的发展是一个自我导向的过程, 不依赖于外部结构的影响。他们的模型有视网膜的六种主要类型的神经元和一种胶质细胞类型, 可以概括视网膜功能的许多方面, 包括形态发生运动、动间核迁移和顶端-基底极性。尽管他们的模型在概括成年小鼠视网膜的所有方面(包括低比例的视锥感光器)并不完美, 但这是产生更可靠的视网膜模型的里程碑, 这些模型概括了小鼠视网膜的活体特征^[3,4]。他们对方案进一步优化使人类胚胎干细胞(human Embryonic stem cell, hESC)衍生的ROs首次得以产生^[5]。与小鼠干细胞来源的视网膜类器官相比, 通过这种方法获得的视网膜培养时间更长, 这是由于不同物种之间妊娠期的固有差异。使用的方法完全基于3D方法, 依赖于细胞信号通路的外在调控。从人胚胎干细胞的单细胞悬液开始, 将细胞等量接种到96孔板的V型孔道中, 然后进行快速聚集, 形成EBs, EBs经过神经诱导, 形成视泡, 随后在悬浮培养中保存, 以成熟为层状

ROs^[5]。Canto-Soler M. Valeria课题组^[6]推广了这一方法的替代方法, 需要较少的细胞信号通路外在调节, 并且主要是在一个自我导向的过程中进行。在他们的体系中, 人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)生长到接近融合, 并在悬浮液中化学或机械地制成小的漂浮聚集体, 形成EBs, 经过神经诱导, 随后的EBs允许视网膜神经上皮的形成, 它可以从孔的底部单独解剖, 也可以在以网格模式对孔进行机械划线后, 将孔的全部内容物抬起, 接下来是对长期悬浮培养的具有分层结构的成熟ROs进行分选应用。这种方法的另一种方式是通过让hiPSCs生长到融合, 而不是产生小的漂浮聚集体, 保持贴壁培养, 从培养基中去除成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)2启动自发分化, 随后促进神经诱导和视网膜神经上皮的形成^[7,8]。Canto-Soler M. Valeria课题组^[6]的方法首次显示出完全层叠的3D iPSC衍生的视网膜组织, 这种视网膜类器官组织也产生了对光刺激有反应的更发达的外节结构。Lowe等人^[9]提出第三种方法, 使用嵌入Matrigel中的hESCs的小聚集体形成单腔上皮囊肿, 这些囊肿随后黏附到培养表面, 形成视网膜祖细胞的集落。Dispase处理促进这些克隆悬浮, 这些克隆在漂浮悬浮培养中形成层状成熟的视网膜类器官。已有研究用hESCs和hiPSCs经所有三种方法成功分化得到视网膜类器官, 目前正在进行持续的修改和优化^[10]。图1^[2,3,5,11~26]总结了干细胞及视网膜类器官的历史发展。

表1^[3,5,6,27~35]汇总了目前视网膜类器官的分化方法。视网膜类器官对于理解视网膜的发育生理学及其相关疾病的致病机制及治疗研究大有裨益。

2 视网膜类器官的应用

2.1 视网膜类器官用于解析人眼的发育过程

人类眼睛发育的研究仅限于对稀缺的人类胎儿组织进行解剖学和形态学分析。随着多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)和类器官技术的出现, 视网膜发育的过程已经被模拟成类器官的3D结构, 在一个细胞培养皿里产生微生理活性系统。视网膜类器官可以在时间和空间背景下模拟人眼发育的相关性, 其产生大规模转录数据集的能力为人类视网膜发生提供了新的见解。最近的研究都发现了以前未知的发育网络和轨

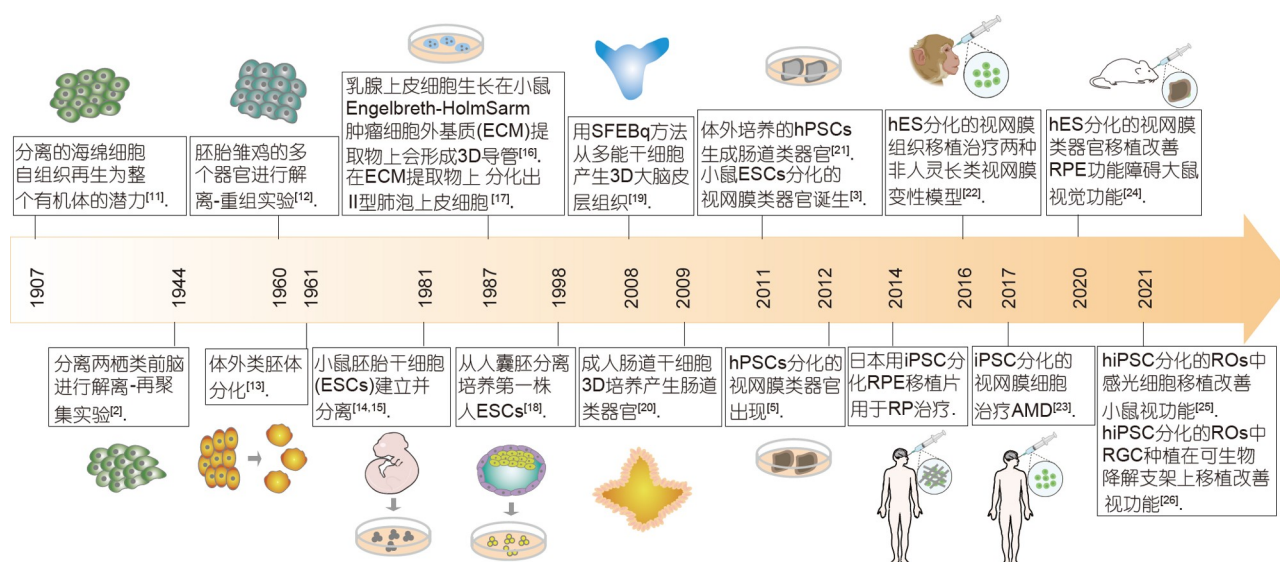


图 1 干细胞及视网膜类器官的历史发展

Figure 1 The development of stem cells and retinal organoids

迹, 并通过与它们在活体部分的比较, 验证和评估了目前能够在体外重现人类视网膜发生的真实性^[36].

视网膜类器官能够描绘出人类眼睛发育早期的分子表达谱, 在大多数PSC来源的视网膜类器官中第一个月就有眼相关转录因子的表达, 并且形成视泡样结构^[6, 37, 38]. Sasai Yoshiki教授课题组^[5]描述了从hPSC衍生的视网膜类器官中, 第24天起观察到(对应于人类胚胎的卡内基第14阶段)内陷和形成视杯结构, 尽管效率比较低, 晚于小鼠多能干细胞衍生的类器官, 这项研究复制了典型的人视网膜特定的形态发生时间表.

已有研究用病人来源hPSC分化的视泡表型来揭示先前未知的早期视网膜发育机制. hPSC分化ROs的视杯阶段中视泡共表达早期NR标记蛋白-视觉系统同源蛋白2(VSX2)和RPE相关转录因子-小眼相关转录因子(microphthalmia-associated transcription factor, MITF)^[39, 40]. VSX2突变与人类和小鼠的小眼球(异常小眼睛)有关, 小鼠的视网膜细胞显著减少, 没有双极细胞^[41, 42]. 因此, VSX2突变患者来源的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)的视网膜类器官显示生长受阻, 并且表达细胞增殖标记蛋白Ki-67的细胞较少^[40], 这些细胞也比NR更有利于向RPE的表型分化, 存活的NR区缺乏双极细胞, VSX2突变的类器官中RPE重要的转录因子MITF及其下游转录靶标多巴色素互变异构酶(dopachrome tautomerase, DCT)和酪氨

酸酶(tyrosinase, TYR)表达上调^[40]. MITF在VSX2之前表达, 并在第30天通过染色质免疫沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)确定VSX2与MITF启动子异构体直接结合, 从而解释了在VSX2突变类器官中观察到的RPE命运偏差^[39]. 作者进一步研究了MITF在hESC来源的视泡模型分化过程中的表达模式, MITF是色素细胞存活和分化的重要调节因子, 他们发现, 除了MITF在视网膜色素上皮发育中的作用外, 它对早期视泡细胞的增殖也是至关重要的^[39]. 这些研究确定了VSX2-MITF在视网膜发育中的相关性及其重要性.

FGF在眼/非眼组织中大量表达, 并已被鉴定为NR候选的表面外胚层分泌诱导剂, FGF3, FGF8, FGF9和FGF19在正常人hESC分化的视网膜类器官中高表达^[40]. 有假说猜测, FGF作用于VSX2的上游介导Mitf的抑制和NR的特异性, 然而在早期VSX2突变的ROs中, 尽管VSX2、光传导调节因子recoverin和双极细胞标记钙结合蛋白5(CABP5)水平增加, 外源的FGF9只能部分挽救疾病表型^[43]. FGF9在人体器官中的表达高峰分别在第10天和第20天, 分别代表眼区和视泡形成时期^[40, 43]. 在视网膜发生早期抑制FGF信号会导致与VSX2突变类似的表型, 但单独阻断FGF或VSX2不足以阻止NR的形成, 具体地说, 在FGF9抑制之后, 正常人hPSC衍生的类器官继续形成NR^[43]. 因此, 也有假说认为FGF和VSX2可能在人类早期视网膜发生中协同

表 1 视网膜类器官分化方法汇总

Table 1 Summary of methods for retinal organoid differentiation

年份	课题组	分化类型
2011	Sasai Yoshiki	用小鼠胚胎干细胞分化自组织3D视网膜类器官 ^[3] .
2012	Sasai Yoshiki	用人类胚胎干细胞分化出自组织的3D视网膜类器官 ^[5] .
2014	Canto-Soler M. Valeria	用hiPSCs分化出自组织的视网膜类器官(结合2D和3D), 无胚状体形成步骤 ^[6] .
2015	Sasai Yoshiki	对人类视网膜组织睫状缘内的干细胞通过BMP4处理进行NR分化, 形成自组织视网膜类器官(结合2D和3D), 有胚状体形成 ^[27] .
2018	Swaroop Anand	使用旋转混匀生物反应器(RWV)培养源自小鼠多能干细胞的视网膜类器官, RWV可以加速和改善类器官的生长和分化, 用于模拟视网膜疾病和评估治疗 ^[28] .
2019	刘伟	将hESC与Matrigel混合形成囊泡, 然后铺板, 贴壁后再用消化酶轻轻消化, 最终分化成富含视锥细胞的视网膜类器官 ^[29] .
2020	李天森	通过刮取(之前是用挑克隆的方法)整个贴壁培养物这种简单且高效的方法形成视网膜类器官 ^[30] .
2020	金子兵	使用CRX-tdTomato标记的hESC进行视网膜类器官分化追踪, 表明在hESC分化视网膜类器官的过程中, 加入COCO(Wnt, TGF-β和BMP通路的多功能拮抗剂)增加了光感受器前体和视锥细胞的分化效率 ^[31] .
2020	Roska Botond	培养优化: 将hiPSC形成的胚状体用琼脂包裹放到不同的孔中, 这样形成的视网膜类器官有更好的核层和突触结构. 技术优化: 用棋盘刮擦方法获得贴壁培养物, 更加省时高效 ^[32] .
2021	Arthur A.B. Bergen	使用含有高浓度生长因子的三维基质培养促进拟胚体形成. 与浮动培养的拟胚体相比, 形态更加结构化 and 组织化, 生成视网膜神经节细胞的时间更短 ^[33] .
2021	Andrew W. Browne	培养优化: 用无剪切力的微流体生物反应器用于视网膜类器官的长期维护培养; 优化芯片设计, 用于计算机模拟和体外评价; 优化物质转运效率, 使每个培养小室中浓度均匀 ^[34] .
2021	Jason S Meyer	技术优化: 针对ROs中缺乏RGC轴突延伸到大脑突触后神经元的问题. 将视网膜类器官组织成具有皮质和丘脑类器官的视觉系统. RGC对环境信号做出反应, 并将轴突深入到组合体中, 对视觉系统的投影进行建模. 此外, 视觉系统中RGC存活率提高, 克服先前视网膜类器官的局限性, 促进对人类视觉系统发育以及这一关键途径的疾病或损伤的研究 ^[35] .

作用, 而非串联作用. 这也突显了视网膜类器官在研究NR发育的信号通路中存在比最初从经典研究中破译的更大的复杂性和可塑性. 视网膜类器官的转录分析已经在祖细胞和分化神经元之间的早期有丝分裂后细胞命运规范中确定了这种可塑性^[37,44,45]. 人iPSC衍生的视网膜类器官有助于揭示VSX2在人类视网膜发育中的作用^[40].

Quinn等人^[46]使用hiPSC分化来源的ROs和人胎儿视网膜来研究*CRB1*(Crumbs homolog-1)和*CRB2*在视网膜发育和早期成熟过程中起始表达. *CRB1*基因突变与一系列视网膜营养不良相关, 包括RP12型和LCA8型^[10]. 他们发现, 在分化的前三个月, *CRB2*是*CRB*家族表达的主要成员; 相反, 典型的*CRB1*蛋白在之后的三个月表达在尖下区域, 这与视网膜在发育中期的成熟相吻合, 视网膜类器官中重现了*CRB1*和*CRB2*的这种表达模式^[46].

甲状腺激素信号对视锥细胞活性和视蛋白表达的

重要作用已被证实. 然而, 视锥细胞分化的确切机制尚不清楚^[10]. 视网膜类器官被用来进一步阐明这一机制. Eldred等人^[47]研究发现, 视网膜通过甲状腺激素降解和激活蛋白的时间表达, 在特异性S或L/M锥体亚型分化中起重要作用. 在视网膜发育的早期, 甲状腺激素水平保持在较低水平, 从而启动向S锥体的分化, 在发育后期, 甲状腺激素水平上升促进特定的L和M锥体细胞分化. 这些类器官模型可用来研究不同基因在眼睛形成和神经视网膜分化中的作用. Takata等人^[48]研究了R-spondin 2(*Rspo2*)和Sine Oculis-Related Homeobox 3(*Six3*)基因的功能, 他们对小鼠*Six3* mPSC来源的和*Six3*条件敲除的 mESC分化的类器官进行分析, 发现*Six3*介导的*Rspo2*抑制对于神经视网膜分化和视泡形态形成是必要的.

Müller胶质细胞在hPSC衍生的培养物中存活良好, 表现出跨越整个NR的典型形态^[49-52]. Müller胶质细胞特异性标记物, 包括细胞视黄醛结合蛋白和波形

蛋白(Vimentin), 在90~200天表达增加^[37,53]。有趣的是, scRNA-seq研究显示, 第90天视网膜类器官衍生的Müller胶质细胞和光感受器聚集在一起, 具有共同的转录图谱^[37]。另一项单独的scRNA-seq研究显示, 在晚期(>26周)的类器官中发现了大量被鉴定为Müller胶质细胞的细胞^[45]。这些研究表明, 尽管在不同的细胞类型中观察到基因表达的差异, 但器官和同期胎儿视网膜之间的细胞类型比例有明显的相似之处。

视网膜发育过程中表达多种bHLH转录因子, 为了进一步探究它们在视网膜发育中的作用, 有研究利用人胚胎干细胞系H9分化的视网膜类器官, 检测bHLH因子ATOH7和Neurog2在RGC发育中的作用。通过单细胞转录分析, 作者发现人类视网膜前体细胞的不同状态, 包括一个准备退出细胞周期的种群, 研究结果表明, ATOH7和Neurog2参与并调控了一个互动的基因网络, 促进视网膜祖细胞通过两个过渡阶段获得有丝分裂后的神经元身份^[54]。

未折叠蛋白(unfolded protein response, UPR)调节因子激活转录因子6(ATF6)的功能缺失变异可导致严重的先天性视力丧失, 如色盲, 其发病机制尚不清楚。为了研究这一点, Jonathan H. Lin课题组^[55]用色盲患者诱导的携带ATF6疾病变体的iPSC和从基因编辑的ATF6缺失的hESCs分化视网膜类器官, 发现色盲患者和ATF6缺失的视网膜类器官不能形成视锥结构, 并伴随视锥转导基因表达的丧失, 而视杆感光细胞发育正常。携带ATF6变异体的色盲患者的自适应光学视网膜成像也显示其没有视锥内/外节结构, 但保留了视杆结构, 与在视网膜类器官中观察到的视锥形成缺陷一致。这些结果表明ATF6是人类视锥感光细胞发育所必需的。

人类视网膜类器官的形态和分子特征, 以及它们在理解人类视网膜及其疾病的发展中的作用研究已经取得了重大进展。具体地说, 已经确定了各种视网膜细胞类型的中间前体细胞, 特别是视锥光感受细胞^[37,45,47,56]。hPSC衍生的视网膜类器官中关键的细胞外基质成分和细胞表面标记的表达比动物模型中的表达更真实^[57]。研究发现, 染色质可及性动力学和mRNA剪接程序在很大程度上模仿人类胎儿和成人样本^[29,58]。其他组学研究, 如蛋白质组分析和代谢组学, 对于证实基因表达数据和推断功能至关重要。

然而, 尽管取得了诸多进展, 该领域仍处于初级阶

段, 有几个限制需要克服。目前的视网膜类器官模型缺乏眼与非眼组织的复杂组织。一些研究声称形成了表面外胚层衍生物、发育不全的晶状体和角膜组织或全角膜类器官, 但截至目前, 这些结构还没有在一个单一的结构中产生^[50,59,60]。在体外, 表面外胚层的形成和内陷很好地概括了视网膜发生早期的诱导信号, 并且可以通过操纵FGF或眼周间充质的迁移来探索^[61,62]。对这些模型的功能可能至关重要是RPE与光感受器的精确匹配、视网膜神经节细胞/中间神经元的存活以及斑疹样区的形成。另外, 视网膜类器官中还缺少对视网膜发育和功能维持有重要作用的小胶质细胞以及血管化系统。虽然已有研究报道, 通过在人视网膜类器官中用“organ-on-a-chip”装置模拟人体血管系统, 器官之间的联系, 使人视网膜类器官更加接近生理状态, 但是跟视网膜正常的发育过程还有一定差距, 有待进一步改进^[63]。

2.2 视网膜类器官用于模拟疾病发展过程研究致病机制

近年来, 已经建立了各种眼病的视网膜类器官。这些模型既可以用于研究潜在的病理机制, 也可以用于治疗目的。表2^[64~78]总结了到目前为止已经开发的一些视网膜疾病的视网膜类器官模型, 然而, 对于类器官模型在疾病建模中的进一步适用性也出现了一些问题。需要考虑的问题包括ROs的发育“年龄”是否对应于患者通常发病的时间, 或者培养微环境是否会加剧类器官培养中的疾病特征, 这些都是将来的研究中需要解决的问题。ROs的不成熟, 对晚期疾病的建模将是一个特别的挑战, 即使在长期的细胞培养之后, 也应该探索添加应激源来诱导衰老表型。此外, ROs仍然是相对幼稚的结构, 缺乏视神经、视网膜血管和小胶质细胞^[10]。

2.3 视网膜类器官用于疾病药物筛选

对于药物研究, 人类视网膜类器官体系有望成为比动物和二维细胞培养模型更真实的人类发育和疾病模型^[10,79]。ROs模型可用于评估临床前药物开发阶段的靶向治疗和药物毒性^[80]。

下文将讨论两个基于ROs的药物研究的例子。视网膜母细胞瘤是眼内最常见的恶性肿瘤, 好发于2~3岁儿童, 且生存率低, 给无数家庭带来沉重负担。该肿

表 2 视网膜疾病的类器官模型

Table 2 Retinal organoid models of retinal diseases

视网膜疾病	基因	视网膜类器官特点	时间	课题组
Leber先天性黑矇 (Leber's congenital amaurosis, LCA)		异常剪接, 纤毛受损, 纤毛发病率降低 ^[64] .	2016 ^[64]	Cheetham E. Michael ^[64]
	<i>CEP290</i> ^[64,65]	纤毛生长异常, 对接母本中心粒只在CEP290 LCA病人的视杆细胞中观察到 ^[65] .	2017 ^[65]	Swaroop Anand ^[65]
	<i>RPE65</i> ^[66]	所有患者的ROs中都有完整的视杆细胞和视锥细胞, 但是没有感光细胞表型, 在患者ROs产生的RPE中, <i>RPE65</i> 表达量显著降低 ^[66] .	2019	钟秀峰
	<i>AIPL1</i> ^[67]	病人ROs中 <i>AIPL1</i> 和 <i>PDE6B</i> 表达减少, 但是没有检测到视网膜变性.	2020	Lukovic Dunja
视网膜色素变性	<i>RHO</i> ^[68]	利用仙台病毒在病人成纤维细胞中诱导无整合的iPSC, 生成患者特异性视杆细胞模型研究由 <i>RHO</i> 突变引起的RP. 患者iPSC分化来源的视网膜细胞中视杆细胞显示出典型的内质网应激特征, 在体外重现了疾病表型.	2012	金子兵
	<i>RPGR</i> ^[69]	与对照组相比, 病人ROs中感光细胞数量, 纤毛长度, 感光细胞相关基因表达明显降低; 且病人ROs中视杆细胞超极化活动的钾电流降低, 表现出明显的电生理活性缺陷, 进一步研究发现, 这种异常表型可以通过CRISPR/Cas9修正部分得以恢复 ^[69] .	2018	金子兵
	<i>CRB1</i> ^[46]	病人ROs中外层限制膜上方的异位感光细胞聚核证明外层限制膜受损 ^[46] .	2019	Wijnholds Jan
	<i>CRB1</i> ^[70]	用病人真皮成纤维细胞构建两株携带 <i>CRB1</i> 复杂杂合突变的iPSC; 两株细胞均表达多能性标记, 显示正常核型, 有分化为三胚层和视网膜类器官的能力 ^[70] .	2021	Samuel McLenachan
	<i>USH2A</i> ^[71]	与对照组相比, 病人ROs在早期阶段表现出显著的缺陷, 包括延迟的视网膜自组织, 视网膜神经上皮异常及视网膜神经祖细胞发育缺陷, 并且感光细胞, Müller细胞和无长突细胞减少, 还有异常的基底膜和紧密连接 ^[71] .	2019	陈建苏
常染色体显性RP	<i>PRPF31</i> ^[72]	与对照组相比, 在透射电镜观察下病人ROs中发现渐进的退行性特征, 包括感光细胞凋亡核增加和存在应激泡; 病人ROs中感光细胞的纤毛有缺陷 ^[72] .	2018	Lako Majlinda
迟发型RP	<i>PDE6B</i> ^[73]	与对照组相比, 在ROs分化第180天之前病人ROs表现相对正常; 然而, 分化230天之后病人ROs有明显缺陷的视杆细胞迁移能力. 此外, 通过GO分析发现在病人ROs中G蛋白偶联受体(GPCR)活性相关基因, GPCR信号传导通路和钙离子结合相关基因富集. 另外, 在患者ROs中发现cGMP水平增加, 可能导致突触连接的形成受损, 并且在患者ROs中发现感光细胞纤毛减少 ^[73] .	2020	金子兵
X连锁的RP(XLRP)	<i>RP2</i> ^[74]	患者ROs在分化第150天的外核层(outer nuclear layer, ONL)中细胞死亡明显增多, 在分化第180天外核层明显变薄, 细胞死亡的发生与视杆细胞成熟和视紫红质表达的时序一致. 研究人员将携带功能性 <i>RP2</i> 基因的AAV注入这些类器官中, 能阻止类器官的变性 ^[74] .	2020	Cheetham E. Michael
青光眼	<i>OPTN</i> ^[75]	患者ROs分化早期阶段不受 <i>OPTN</i> (EK50)突变的影响. 然而, 在分化较晚的成熟阶段, 患者ROs中的视网膜神经节细胞表现出神经突收缩, 兴奋性增加, 自噬失调, 如明显的LC3积聚, 以及ROs内部细胞凋亡增加 ^[75] .	2020	Meyer S. Jason
X连锁的先天性视网膜劈裂(XLRS)	<i>RS1</i> ^[76]	患者ROs表现为视网膜分裂, 外节缺陷, 视黄素产生缺陷, 内质网-高尔基体运输障碍, 感光细胞连接纤毛缺陷 ^[76] .	2019	Chiou Shih-Hwa
视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, RB)	<i>RBI</i> ^[77]	在人类胚胎干细胞进行 <i>RBI</i> 基因的靶向高频突变及敲除后, 分别分化为视网膜类器官, 在ROs定向分化第60天前后出现了肿瘤形成现象. ROs中瘤体细胞在超微结构、体内成瘤性、基因表达谱、甲基化谱、分子信号通路及标记蛋白等方面与视网膜母细胞瘤的特征高度一致 ^[77] .	2020	金子兵
	<i>RBI</i> ^[78]	用携带 <i>RBI</i> 基因突变患者的iPSC分化成视网膜类器官, 移植到小鼠的眼球中, 形成视网膜母细胞瘤, 构建了一种RB疾病模型 ^[78] .	2021	Michael A Dyer

瘤细胞起源尚有争议, 导致临床治疗时间窗口抉择困难, 治疗效果不佳. 解决该肿瘤细胞起源问题首先要建立高度保真、可实时追踪、适合长期培养的人类体外肿瘤模型. 第一项研究中, 科研人员创建了一个晚期视网膜母细胞瘤肿瘤类器官模型(类似于视网膜肿瘤和种子), 用来评估药物引起的细胞周期阻滞及其遗传毒性效应. 该模型被用来比较单一药物和不同药物组合应用的结果. 在第一步中, 他们评估了这个模型的结果是否可以与临床结果相比较. 使用的药物是玻璃体内化疗中常用的药物, 包括马法兰、拓扑替康和甲氨蝶呤, 使用不同浓度和不同(24~72小时)暴露时间. 低剂量马法兰(8和16 $\mu\text{mol/L}$)作用时间延长与大剂量马法兰(32 $\mu\text{mol/L}$)作用相似, 但作用时间较短, 导致S期阻滞, G2/M期减少; 拓扑替康(11 $\mu\text{mol/L}$)能有效减少处于G0/G1期和G2/M期的肿瘤细胞数, 甲氨蝶呤的抗癌效果最差. 甲氨蝶呤减少G0/G1期细胞, 增加亚G1期细胞死亡, 但S期和G2/M期被激活. 此结果与临床结果相当, 表明ROs模型数据具有可信性. 由于拓扑替康和马法兰显示出相似的效果, 人们可能会问, 它们的组合是否将是理想的治疗策略. 因此, 研究人员第二步分析了拓扑替康(11 $\mu\text{mol/L}$)和马法兰(16 $\mu\text{mol/L}$)的联合靶向治疗效果和遗传毒性, 这在临床上是具有挑战性的. 这种结合不仅对视网膜下种子或复发的视网膜肿瘤有深远的影响, 而且还能有效地靶向增殖性肿瘤锥体^[81]. 然而, 马法兰和拓扑替康的联合使用比单独使用马法兰有更强的遗传毒性^[81]. 因此, 这项研究说明了ROs模型在解决治疗挑战方面的有效作用. 此外, 2020年底, 金子兵教授课题组通过视网膜类器官模型研究揭示“眼癌”视网膜母细胞瘤的细胞起源与治疗靶点. 在该研究中, 研究人员将人类胚胎干细胞进行*RBI*基因的靶向高频突变及敲除后, 分别分化为视网膜类器官, 在ROs定向分化第60天前后出现了肿瘤形成现象. ROs中瘤体细胞在超微结构、体内成瘤性、基因表达谱、甲基化谱、分子信号通路及标记蛋白等方面与视网膜母细胞瘤的特征高度一致. 接下来作者通过大量的免疫组化和单细胞测序实验揭示了该肿瘤起源于正在成熟的视锥前驱细胞(maturing cone precursor). 最后, 研究者基于其激活的PI3K-Akt信号通路特征, 通过靶向该通路的激动剂SYK, 成功筛选出两个候选新药. 该研究阐明了视网膜母细胞瘤的细胞起源与治疗靶点, 为亿万儿童带来光明, 也为人类其他癌

症起源和新药筛选开辟了全新的研究思路, 提供了重要借鉴.

在另一项研究中, 研究人员采用miPSC来源的视网膜类器官复制4-羟基他莫昔芬(4-OHT)和己烯雌酚(DES)分别诱导急性细胞死亡的感光细胞变性模型. 此外, 他们还建立了荧光活细胞成像系统, 以评估诱导损伤模型. 这些副作用已经在小鼠视网膜移植实验中得到证实. 因此, ROs可以用来研究药物的副作用. 他们还分析了维生素E(400 nmol/L)和叶黄素(200 nmol/L)作为眼科补充剂治疗感光细胞退行性变的保护作用. 结果显示, 与叶黄素相比, 维生素E在抑制氧化和内质网(endoplasmic reticulum, ER)应激相关基因表达方面效果更好^[82].

由于视网膜类器官能够模拟视网膜中的生理过程和障碍, 它们对药物效果的临床前评估具有很高的应用价值. 总体而言, ROs已被用于几项概念验证药物研究, 结果振奋人心.

2.4 视网膜类器官用于再生医学

目前, 该领域的热点围绕视网膜类器官来源的光感受器细胞疗法的临床试验展开. 多个小组已经证明了体内hPSC来源的光感受器细胞的分离和功能整合^[1,83]. 为了证实和改进这种再生医学方法, 至关重要描述人类视网膜发育的未知错综复杂的情况, 以及如何真实地在视网膜类器官系统中重现这一过程.

多能干细胞可用于提供潜在的无限量的视网膜特定细胞类型. Takahashi Masayo教授课题组^[84]用mESC和miPSC分化来的视网膜类器官作成视网膜移植片移植到视网膜退行性变的小鼠中, 改善了视功能. 来源于hESCs和hiPSCs的视网膜类器官可以作为移植的细胞来源, 既可以是视网膜细胞悬浮液, 也可以作成有组织的视网膜移植片^[85~88]. 大多数研究通常集中在利用ROs作为视杆和视锥感光细胞的来源, 但它们也被用作视网膜神经节细胞和Müller胶质细胞的来源^[8,53,86,87,89]. 2016年, 由于供体和宿主细胞之间的细胞物质转移, 一系列研究强调了重新评估以前的光感受器供体移植研究的必要性^[90~92]. 这些研究强调, 移植的供体光感受器整合和提供功能的倾向比最初认为的更有限, 许多观察到的功能益处可能来自光转导蛋白的供体-宿主转移^[93,94]. 物质转移代表了挽救病变视网膜细胞的一种新的治疗策略^[95,96]. 然而, 对于目前的

光感受器移植实验的评估, 使用大多数光感受器细胞丢失的晚期疾病模型可能更适于细胞整合和功能挽救的评估. 另外, 所采用的细胞移植方法, 无论是细胞悬液还是细胞移植片, 都可能反映出需要治疗的疾病阶段. 在较温和的退化期, 供体细胞悬液可能是有利的. 这是由于供体细胞可以整合到并支持剩余的宿主感光器的预先存在的架构. 然而, 在退化的后期, 几乎没有光感受器残留, 视网膜薄片在存活和与剩余的内视网膜形成突触连接方面可能更理想.

光感受器细胞悬浮液和来源于ROs的视网膜薄片已经被探索用于治疗视网膜疾病的晚期模型, 在这些模型中, 几乎所有的宿主光感受器都已经退化^[10,97]. 有研究人员使用hESC来源的ROs作为健康视网膜组织的来源, 以挽救免疫缺陷的晚期视网膜变性大鼠模型的视功能. 他们发现, 移植ROs来源的视网膜薄片经历了分化和整合, 尽管微环境退化, 视觉功能还是有所改善. 对移植的视网膜薄片的分析显示, 视杆细胞和视锥感受器存在可能来自移植的外节、双极细胞、Müller胶质细胞、无长突细胞和水平细胞. 与远离移植细胞的区域相比, 移植细胞附近突触素免疫反应性的增强暗示了宿主和移植细胞之间潜在的突触连接^[86]. 虽然通过移植具有潜在突触连接的成熟光感受器恢复视功能是非常有希望的, 但在退行性模型中感光功能挽救的评估仍然是有限的. 例如, McLelland等人使用的免疫缺陷大鼠模型以及Takahashi Masayo课题组用的猴模型仍然有残存的感光功能, 因此最终很难将移植植物来源的反应与残存的宿主活动区分开来^[86,97]. 这突出了在选择用于此类实验的退化模型时需要仔细考虑的必要性, 也强调了使用多种方法确认功能的必要性.

CRISPR/Cas9是一种用于纠正患者iPSC系中基因突变的技术, 与来自未纠正的患者系的ROs相比, 分化的ROs表型得到改善. 这已经在RP和XLRs的ROs模型上得到了成功的验证^[69,72,76]. 患者矫正的干细胞可作为自体细胞移植治疗视网膜营养不良的来源. 最后, 在ROs分化过程中, 伴随着RPE的产生. 从ROs中分离的RPE球体或从ROs分选后的剩余细胞培养中产生的RPE球体可以用于生成RPE单层, 或者可以被解剖以形成RPE片^[98]. RPE移植是治疗晚期眼病如RP, AMD和Stargardt病(STGD1)的一种很有前途的策略, 在这些疾病中发现RPE显著丢失^[10,99].

腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)是小的, 对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力的单链DNA病毒, 目前多用于眼部疾病的基因治疗中. 研究人员发现, 在给予AAV2/2-GRK1-ABCA4内含子载体后, 能在STGD1患者来源的ROs中发现ABCA4的表达^[10].

综上, ROs在研究视网膜发育, 模拟视网膜疾病研究其机制, 药物筛选及再生医学上有很大的应用价值(图2).

3 与视网膜类器官技术相关的挑战

尽管如此, 视网膜类器官系统是一项新兴的技术, 仍然需要做大量的工作来开发强大的方案, 更好地模拟视网膜器官(图3). 虽然多能干细胞来源的自组织视网膜类器官在10年多前就首次被报道, 但该领域仍在为ROs细胞组成的广泛异质性问题而苦苦挣扎, 由于多代PSCs的长期培养和繁殖, 可能会引入致癌性和遗传畸变^[100]. 事实上, 已经观察到与肿瘤相关的p53位点的突变数量增加, 这导致更快扩张的肿瘤细胞和PSC培养过度生长; 然而, 在被检查的细胞系中, 大约95%的细胞在经过几年的长期扩增后, 仍然没有肿瘤相关的突变. 此外, 特别是在iPSCs方面, 关于重新编程是否会导致遗传不稳定的问题仍在辩论中^[83]. 此

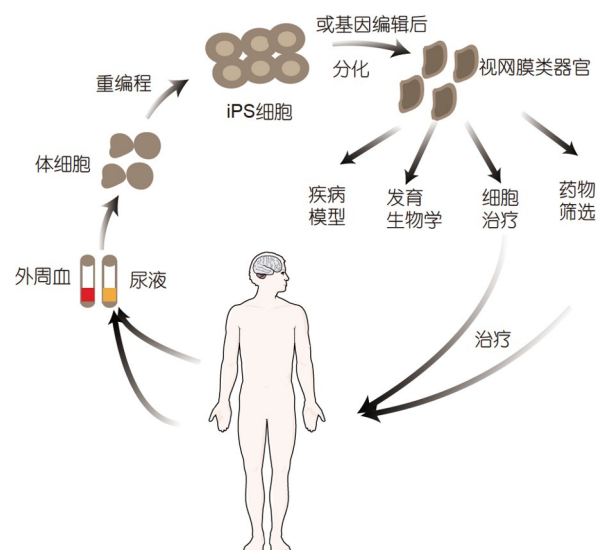


图2 视网膜类器官的应用
Figure 2 The application of retinal organoids

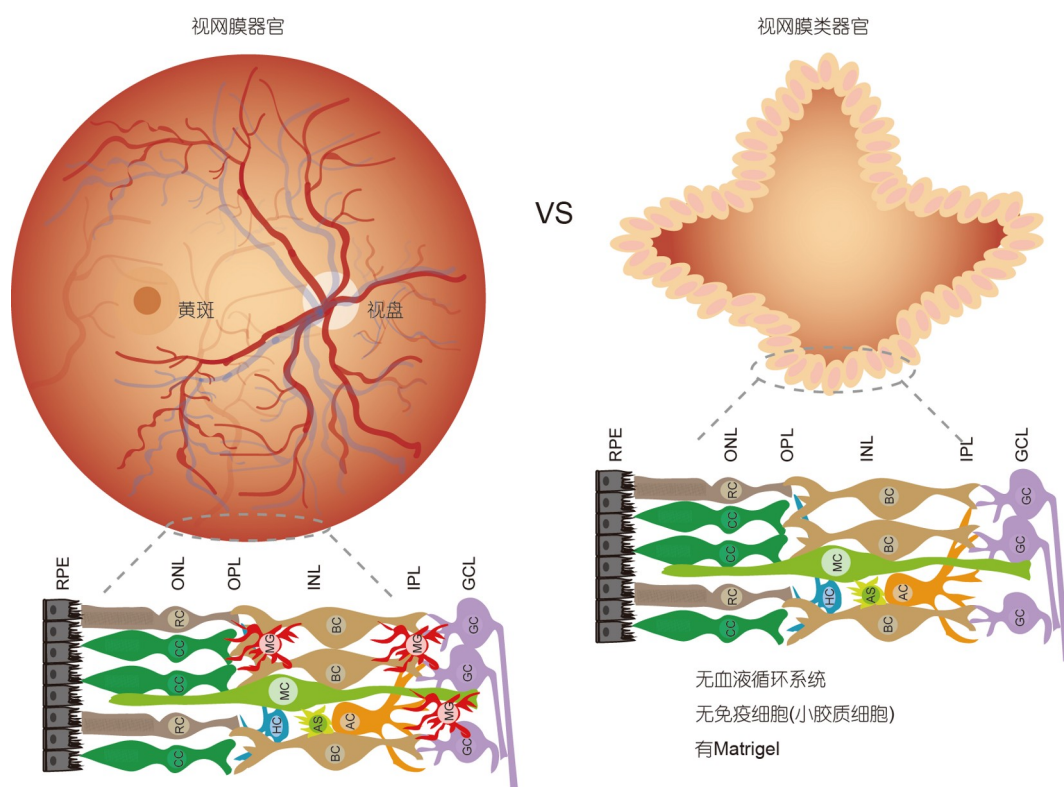


图 3 视网膜器官和视网膜类器官对比图. ONL: 外核层; OPL: 外丛状层; INL: 内核层; IPL: 内丛状层; GCL: 神经节细胞层
Figure 3 Comparisons between retinal organ and retinal organoids. ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer

外, 如果要从患者自己的细胞进行自体移植, 就有必要从基因上纠正导致视网膜疾病的突变. 另外, 由于iPSCs在大多数情况下是从成年体细胞产生的, 它们可能含有累积的体细胞突变, 干扰了来源细胞以外的其他细胞类型的分化 and 功能^[83]. 因此, 应引入全基因组测序技术, 在临床级生产流水线的三个时间点对人类PSC及其衍生物进行质量控制: 选择初始PSC系、生成和维护主细胞库, 以及用于移植到患者体内的最终细胞产品. 很明显, 这些措施所涉及的时间和成本是广泛的. 虽然有人建议应该使用患者来源的iPSCs来避免免疫排斥反应, 但重新编程单个患者来源的体细胞, 从基因上纠正潜在的突变, 将这些细胞分化成视网膜器官以衍生出可移植的光感受器, 以及验证最终的产品所涉及的时间和成本都是非常高的. 如果没有标准化的报告, 现在和将来都很难比较不同实验室的视网膜类器官. 如果类器官技术要进入临床, 这些质量控制措施是至关重要的. Canto-Soler M. Valeria课题组^[101]的一篇论文报道了一项以自动方式定量筛

选视网膜器官中荧光报告表达的技术. 在从其他组织(如肾脏)产生的类器官中, 最近已经实现了类器官的全自动高通量鉴别和分析^[102]. 这些报告表明, 类器官领域正在慢慢解决重复性和可扩展性方面的挑战, 这些挑战必须克服, 以改善研究结果, 并促进转化为临床.

多能干细胞分化的视网膜类器官的引入, 原则上代表了产生可移植的人类光感受器的无限来源. 然而, 与使用这类细胞有关的安全性、免疫学和重复性问题仍然需要解决(表3)^[103,104]. ROs已被用于几项概念验证药物研究, 结果令人振奋. 然而, 在视网膜类器官系统中长期维持免疫细胞的方案尚未建立; 因为缺乏免疫细胞, 不能用于炎症相关药物的筛选. 另外, 在视网膜类器官系统中血液循环系统尚未有效建立, 微流体设备是一种很有前途的工具, 可以整合类器官体内废物清除和营养供应的通道, 并能对实验条件进行独立控制, 但是跟自体的血管循环系统还有差距. 另外截至目前, 对类器官的研究主要依赖于表型读数(即类器官

表 3 视网膜类器官临床转化应用的瓶颈问题
Table 3 Bottlenecks of clinical translational applications by using ROs

视网膜类器官转化的瓶颈问题	可能的解决方案
异质性大	应进行质量控制, 规范生产标准
产量低	优化培养方案, 添加生长因子或应用生物材料提高分化效率
缺乏免疫细胞	可以借鉴脑类器官中融合培养小胶质细胞的方法 ^[103]
缺乏血液循环系统	用微流控或“organ-on-a-chip”装置模拟人体血管系统; 借鉴脑类器官中血管化的方法建立更接近生理情况的循环系统 ^[104]
含有基质胶有安全隐患	开发更好、贴近人的产品

的外观、形状和数量), 然而要完全解析类器官内部的结构成分, 需要集成连续、准确和多功能的功能读数, 这些读数可以高通量的方式自动进行, 以实现基础研究以外的应用. 另外, ROs培养大多使用Matrigel水凝胶作为培养基质, Matrigel是小鼠肉瘤细胞分泌的胶状蛋白混合物, 因其含有外源成分, 难以应用在人的很多治疗中^[105].

总体而言, 视网膜类器官具有巨大的潜力来模拟视网膜发育和视网膜相关疾病的发生发展, 可作为视网膜相关疾病药物筛选的工具, 为细胞移植等再生医学治疗方法提供原材料. 未来可以通过整合血液循环系统和免疫细胞等方式, 不断优化视网膜类器官的分化方法、提高分化的稳定性, 使其更好地应用于视网膜疾病的研究和治疗.

参考文献

1 Jin Z B, Gao M L, Deng W L, et al. Stemming retinal regeneration with pluripotent stem cells. *Prog Retinal Eye Res*, 2019, 69: 38–56

2 Lancaster M A, Knoblich J A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science*, 2014, 345

3 Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*, 2011, 472: 51–56

4 Eiraku M, Sasai Y. Mouse embryonic stem cell culture for generation of three-dimensional retinal and cortical tissues. *Nat Protoc*, 2011, 7: 69–79

5 Nakano T, Ando S, Takata N, et al. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell*, 2012, 10: 771–785

6 Zhong X, Gutierrez C, Xue T, et al. Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs. *Nat Commun*, 2014, 5: 4047

7 Reichman S, Slembrouck A, Gagliardi G, et al. Generation of storable retinal organoids and retinal pigmented epithelium from adherent human iPS cells in xeno-free and feeder-free conditions. *Stem Cells*, 2017, 35: 1176–1188

8 Gonzalez-Cordero A, Kruczek K, Naeem A, et al. Recapitulation of human retinal development from human pluripotent stem cells generates transplantable populations of cone photoreceptors. *Stem Cell Rep*, 2017, 9: 820–837

9 Lowe A, Harris R, Bhansali P, et al. Intercellular adhesion-dependent cell survival and ROCK-regulated actomyosin-driven forces mediate self-formation of a retinal organoid. *Stem Cell Rep*, 2016, 6: 743–756

10 Manafi N, Shokri F, Achberger K, et al. Organoids and organ chips in ophthalmology. *Ocular Surf*, 2021, 19: 1–15

11 Wilson H V. A new method by which sponges may be artificially reared. *Science*, 1907, 25: 912–915

12 Weiss P, Taylor A C. Reconstitution of complete organs from single-cell suspensions of chick embryos in advanced stages of differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1960, 46: 1177–1185

13 Pierce G B, Verney E L. An *in vitro* and *in vivo* study of differentiation in teratocarcinomas. *Cancer*, 1961, 14: 1017–1029

14 Evans M. Origin of mouse embryonal carcinoma cells and the possibility of their direct isolation into tissue culture. *Reproduction*, 1981, 62: 625–631

15 Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc*

- Natl Acad Sci USA, 1981, 78: 7634–7638
- 16 Li M L, Aggeler J, Farson D A, et al. Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 136–140
- 17 Shannon J M, Mason R J, Jennings S D. Functional differentiation of alveolar type II epithelial cells *in vitro*: effects of cell shape, cell-matrix interactions and cell-cell interactions. *Biochim Biophys Acta*, 1987, 931: 143–156
- 18 Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282: 1145–1147
- 19 Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, et al. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell*, 2008, 3: 519–532
- 20 Sato T, Vries R G, Snippert H J, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature*, 2009, 459: 262–265
- 21 Spence J R, Mayhew C N, Rankin S A, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*. *Nature*, 2011, 470: 105–109
- 22 Shirai H, Mandai M, Matsushita K, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal tissue in two primate models of retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E81–E90
- 23 Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, et al. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N Engl J Med*, 2017, 376: 1038–1046
- 24 Lin B, McLelland B T, Aramant R B, et al. Retina organoid transplants develop photoreceptors and improve visual function in RCS rats with RPE dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2020, 61: 34
- 25 Ribeiro J, Procyk C A, West E L, et al. Restoration of visual function in advanced disease after transplantation of purified human pluripotent stem cell-derived cone photoreceptors. *Cell Rep*, 2021, 35: 109022
- 26 Luo Z, Xian B, Li K, et al. Biodegradable scaffolds facilitate epiretinal transplantation of hiPSC-Derived retinal neurons in nonhuman primates. *Acta Biomater*, 2021, 134: 289–301
- 27 Kuwahara A, Ozone C, Nakano T, et al. Generation of a ciliary margin-like stem cell niche from self-organizing human retinal tissue. *Nat Commun*, 2015, 6: 6286
- 28 DiStefano T, Chen H Y, Panebianco C, et al. Accelerated and improved differentiation of retinal organoids from pluripotent stem cells in rotating-wall vessel bioreactors. *Stem Cell Rep*, 2018, 10: 300–313
- 29 Kim S, Lowe A, Dharmat R, et al. Generation, transcriptome profiling, and functional validation of cone-rich human retinal organoids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 10824–10833
- 30 Regent F, Chen H Y, Kelley R A, et al. A simple and efficient method for generating human retinal organoids. *Mol Vis*, 2020, 26: 97–105
- 31 Pan D, Xia X X, Zhou H, et al. COCO enhances the efficiency of photoreceptor precursor differentiation in early human embryonic stem cell-derived retinal organoids. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11: 366
- 32 Cowan C S, Renner M, De Gennaro M, et al. Cell types of the human retina and its organoids at single-cell resolution. *Cell*, 2020, 182: 1623–1640.e34
- 33 Wagstaff P E, Ten Asbroek A L M A, Ten Brink J B, et al. An alternative approach to produce versatile retinal organoids with accelerated ganglion cell development. *Sci Rep*, 2021, 11: 1101
- 34 Xue Y, Seiler M J, Tang W C, et al. Retinal organoids on-a-chip: a micro-millifluidic bioreactor for long-term organoid maintenance. *Lab Chip*, 2021, 21: 3361–3377
- 35 Fligor C M, Lavekar S S, Harkin J, et al. Extension of retinofugal projections in an assembled model of human pluripotent stem cell-derived organoids. *Stem Cell Rep*, 2021, 16: 2228–2241
- 36 O'Hara-Wright M, Gonzalez-Cordero A. Retinal organoids: a window into human retinal development. *Development*, 2020, 147
- 37 Collin J, Queen R, Zerti D, et al. Deconstructing retinal organoids: single cell RNA-seq reveals the cellular components of human pluripotent stem cell-derived retina. *Stem Cells*, 2019, 37: 593–598
- 38 Collin J, Zerti D, Queen R, et al. CRX expression in pluripotent stem cell-derived photoreceptors marks a transplantable subpopulation of early cones. *Stem Cells*, 2019, 37: 609–622
- 39 Capowski E E, Simonett J M, Clark E M, et al. Loss of MITF expression during human embryonic stem cell differentiation disrupts retinal pigment epithelium development and optic vesicle cell proliferation. *Hum Mol Genet*, 2014, 23: 6332–6344

- 40 Phillips M J, Perez E T, Martin J M, et al. Modeling human retinal development with patient-specific induced pluripotent stem cells reveals multiple roles for visual system homeobox 2. *Stem Cells*, 2014, 32: 1480–1492
- 41 Burmeister M, Novak J, Liang M Y, et al. Ocular retardation mouse caused by Chx10 homeobox null allele: impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation. *Nat Genet*, 1996, 12: 376–384
- 42 Ferda Percin E, Ploder L A, Yu J J, et al. Human microphthalmia associated with mutations in the retinal homeobox gene CHX10. *Nat Genet*, 2000, 25: 397–401
- 43 Gamm D M, Clark E, Capowski E E, et al. The role of FGF9 in the production of neural retina and RPE in a pluripotent stem cell model of early human retinal development. *Am J Ophthalmol*, 2019, 206: 113–131
- 44 Cui Z, Guo Y, Zhou Y, et al. Transcriptomic analysis of the developmental similarities and differences between the native retina and retinal organoids. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2020, 61: 6
- 45 Sridhar A, Hoshino A, Finkbeiner C R, et al. Single-cell transcriptomic comparison of human fetal retina, hPSC-derived retinal organoids, and long-term retinal cultures. *Cell Rep*, 2020, 30: 1644–1659.e4
- 46 Quinn P M, Buck T M, Mulder A A, et al. Human iPSC-derived retinas recapitulate the fetal CRB1 CRB2 complex formation and demonstrate that photoreceptors and Müller glia are targets of AAV5. *Stem Cell Rep*, 2019, 12: 906–919
- 47 Eldred K C, Hadyniak S E, Hussey K A, et al. Thyroid hormone signaling specifies cone subtypes in human retinal organoids. *Science*, 2018, 362
- 48 Takata N, Abbey D, Fiore L, et al. An eye organoid approach identifies Six3 suppression of R-spondin 2 as a critical step in mouse neuroretina differentiation. *Cell Rep*, 2017, 21: 1534–1549
- 49 Capowski E E, Samimi K, Mayerl S J, et al. Reproducibility and staging of 3D human retinal organoids across multiple pluripotent stem cell lines. *Development*, 2019, 146
- 50 Mellough C B, Collin J, Queen R, et al. Systematic comparison of retinal organoid differentiation from human pluripotent stem cells reveals stage specific, cell line, and methodological differences. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8: 694–706
- 51 Mellough C B, Bauer R, Collin J, et al. An integrated transcriptional analysis of the developing human retina. *Development*, 2019, 146
- 52 Slembrouck-Brec A, Rodrigues A, Rabesandratana O, et al. Reprogramming of adult retinal Müller glial cells into human-induced pluripotent stem cells as an efficient source of retinal cells. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 1–13
- 53 Eastlake K, Wang W, Jayaram H, et al. Phenotypic and functional characterization of Müller glia isolated from induced pluripotent stem cell-derived retinal organoids: improvement of retinal ganglion cell function upon transplantation. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8: 775–784
- 54 Zhang X, Mandric I, Nguyen K H, et al. Single cell transcriptomic analyses reveal the impact of bHLH factors on human retinal organoid development. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 653305
- 55 Kroeger H, Grandjean J M D, Chiang W C J, et al. ATF6 is essential for human cone photoreceptor development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118
- 56 Phillips M J, Jiang P, Howden S, et al. A novel approach to single cell RNA-sequence analysis facilitates *in silico* gene reporting of human pluripotent stem cell-derived retinal cell types. *Stem Cells*, 2018, 36: 313–324
- 57 Felemban M, Dorgau B, Hunt N C, et al. Extracellular matrix component expression in human pluripotent stem cell-derived retinal organoids recapitulates retinogenesis *in vivo* and reveals an important role for IMPG1 and CD44 in the development of photoreceptors and interphotoreceptor matrix. *Acta Biomater*, 2018, 74: 207–221
- 58 Xie H, Zhang W, Zhang M, et al. Chromatin accessibility analysis reveals regulatory dynamics of developing human retina and hiPSC-derived retinal organoids. *Sci Adv*, 2020, 6: eaay5247
- 59 Foster J W, Wahlin K, Adams S M, et al. Cornea organoids from human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep*, 2017, 7: 41286
- 60 Mellough C B, Collin J, Khazim M, et al. IGF-1 signaling plays an important role in the formation of three-dimensional laminated neural retina and other ocular structures from human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2015, 33: 2416–2430
- 61 Hyer J, Kuhlman J, Afif E, et al. Optic cup morphogenesis requires pre-lens ectoderm but not lens differentiation. *Dev Biol*, 2003, 259: 351–363
- 62 Llonch S, Carido M, Ader M. Organoid technology for retinal repair. *Dev Biol*, 2018, 433: 132–143
- 63 Achberger K, Probst C, Haderspeck J, et al. Merging organoid and organ-on-a-chip technology to generate complex multi-layer tissue models in a human retina-on-a-chip platform. *eLife*, 2019, 8: e46188
- 64 Parfitt D A, Lane A, Ramsden C M, et al. Identification and correction of mechanisms underlying inherited blindness in human iPSC-derived

- p>
optic cups.
- [Cell Stem Cell](#)
- , 2016, 18: 769–781
65 Shimada H, Lu Q, Insinna-Kettenhofen C, et al.
- In vitro*
- modeling using ciliopathy-patient-derived cells reveals distinct cilia dysfunctions caused by
- CEP290*
- mutations.
- [Cell Rep](#)
- , 2017, 20: 384–396
66 Li G, Gao G, Wang P, et al. Generation and characterization of induced pluripotent stem cells and retinal organoids from a Leber’s congenital amaurosis patient with novel
- RPE65*
- mutations.
- [Front Mol Neurosci](#)
- , 2019, 12: 212
67 Lukovic D, Artero Castro A, Kaya K D, et al. Retinal organoids derived from hiPSCs of an
- AIPL1*
- LCA patient maintain cytoarchitecture despite reduced levels of mutant
- AIPL1*
- .
- [Sci Rep](#)
- , 2020, 10: 5426
68 Jin Z B, Okamoto S, Xiang P, et al. Integration-free induced pluripotent stem cells derived from retinitis pigmentosa patient for disease modeling.
- [Stem Cells Transl Med](#)
- , 2012, 1: 503–509
69 Deng W L, Gao M L, Lei X L, et al. Gene correction reverses ciliopathy and photoreceptor loss in iPSC-derived retinal organoids from retinitis pigmentosa patients.
- [Stem Cell Rep](#)
- , 2018, 10: 1267–1281
70 Moon S Y, Zhang D, Chen S C, et al. Generation of two induced pluripotent stem cell lines from a retinitis pigmentosa patient with compound heterozygous mutations in
- CRB1*
- .
- [Stem Cell Res](#)
- , 2021, 54: 102403
71 Guo Y, Wang P, Ma J H, et al. Modeling retinitis pigmentosa: retinal organoids generated from the iPSCs of a patient with the
- USH2A*
- mutation show early developmental abnormalities.
- [Front Cell Neurosci](#)
- , 2019, 13: 361
72 Buskin A, Zhu L, Chichagova V, et al. Disrupted alternative splicing for genes implicated in splicing and ciliogenesis causes
- PRPF31*
- retinitis pigmentosa.
- [Nat Commun](#)
- , 2018, 9: 4234
73 Gao M L, Lei X L, Han F, et al. Patient-specific retinal organoids recapitulate disease features of late-onset retinitis pigmentosa.
- [Front Cell Dev Biol](#)
- , 2020, 8: 128
74 Lane A, Jovanovic K, Shortall C, et al. Modeling and rescue of
- RP2*
- retinitis pigmentosa using iPSC-derived retinal organoids.
- [Stem Cell Rep](#)
- , 2020, 15: 67–79
75 VanderWall K B, Huang K C, Pan Y, et al. Retinal ganglion cells with a glaucoma
- OPTN*
- (E50K) mutation exhibit neurodegenerative phenotypes when derived from three-dimensional retinal organoids.
- [Stem Cell Rep](#)
- , 2020, 15: 52–66
76 Huang K C, Wang M L, Chen S J, et al. Morphological and molecular defects in human three-dimensional retinal organoid model of X-linked juvenile retinoschisis.
- [Stem Cell Rep](#)
- , 2019, 13: 906–923
77 Liu H, Zhang Y, Zhang Y Y, et al. Human embryonic stem cell-derived organoid retinoblastoma reveals a cancerous origin.
- [Proc Natl Acad Sci USA](#)
- , 2020, 117: 33628–33638
78 Norrie J L, Nityanandam A, Lai K, et al. Retinoblastoma from human stem cell-derived retinal organoids.
- [Nat Commun](#)
- , 2021, 12: 4535
79 Bai J, Wang C. Organoids and microphysiological systems: new tools for ophthalmic drug discovery.
- [Front Pharmacol](#)
- , 2020, 11: 407
80 Cora V, Haderspeck J, Antkowiak L, et al. A cleared view on retinal organoids.
- [Cells](#)
- , 2019, 8: 391
81 Saengwimol D, Rojanaporn D, Chaitankar V, et al. A three-dimensional organoid model recapitulates tumorigenic aspects and drug responses of advanced human retinoblastoma.
- [Sci Rep](#)
- , 2018, 8: 15664
82 Ito S I, Onishi A, Takahashi M. Chemically-induced photoreceptor degeneration and protection in mouse iPSC-derived three-dimensional retinal organoids.
- [Stem Cell Res](#)
- , 2017, 24: 94–101
83 Gasparini S J, Llonch S, Borsch O, et al. Transplantation of photoreceptors into the degenerative retina: current state and future perspectives.
- [Prog Retinal Eye Res](#)
- , 2019, 69: 1–37
84 Assawachananont J, Mandai M, Okamoto S, et al. Transplantation of embryonic and induced pluripotent stem cell-derived 3D retinal sheets into retinal degenerative mice.
- [Stem Cell Rep](#)
- , 2014, 2: 662–674
85 Kruczek K, Gonzalez-Cordero A, Goh D, et al. Differentiation and transplantation of embryonic stem cell-derived cone photoreceptors into a mouse model of end-stage retinal degeneration.
- [Stem Cell Rep](#)
- , 2017, 8: 1659–1674
86 McLelland B T, Lin B, Mathur A, et al. Transplanted hESC-derived retina organoid sheets differentiate, integrate, and improve visual function in retinal degenerate Rats.
- [Invest Ophthalmol Vis Sci](#)
- , 2018, 59: 2586
87 Iraha S, Tu H Y, Yamasaki S, et al. Establishment of immunodeficient retinal degeneration model mice and functional maturation of human ESC-derived retinal sheets after transplantation.
- [Stem Cell Rep](#)
- , 2018, 10: 1059–1074
88 Gagliardi G, Ben M’Barek K, Chaffiol A, et al. Characterization and transplantation of CD73-positive photoreceptors isolated from human iPSC-derived retinal organoids.
- [Stem Cell Rep](#)
- , 2018, 11: 665–680

- 89 Miltner A M, La Torre A. Retinal ganglion cell replacement: current status and challenges ahead. *Dev Dyn*, 2019, 248: 118–128
- 90 Santos-Ferreira T, Llonch S, Borsch O, et al. Retinal transplantation of photoreceptors results in donor-host cytoplasmic exchange. *Nat Commun*, 2016, 7: 13028
- 91 Pearson R A, Gonzalez-Cordero A, West E L, et al. Donor and host photoreceptors engage in material transfer following transplantation of post-mitotic photoreceptor precursors. *Nat Commun*, 2016, 7: 13029
- 92 Singh M S, Balmer J, Barnard A R, et al. Transplanted photoreceptor precursors transfer proteins to host photoreceptors by a mechanism of cytoplasmic fusion. *Nat Commun*, 2016, 7: 13537
- 93 Pearson R A, Barber A C, Rizzi M, et al. Restoration of vision after transplantation of photoreceptors. *Nature*, 2012, 485: 99–103
- 94 Santos-Ferreira T, Postel K, Stutzki H, et al. Daylight vision repair by cell transplantation. *Stem Cells*, 2015, 33: 79–90
- 95 Quinn P M J, Wijnholds J. Retinogenesis of the human fetal retina: an apical polarity perspective. *Genes*, 2019, 10: 987
- 96 Santos-Ferreira T F, Borsch O, Ader M. Rebuilding the missing part—a review on photoreceptor transplantation. *Front Syst Neurosci*, 2017, 10
- 97 Tu H Y, Watanabe T, Shirai H, et al. Medium- to long-term survival and functional examination of human iPSC-derived retinas in rat and primate models of retinal degeneration. *Ebiomedicine*, 2019, 39: 562–574
- 98 Liu S, Xie B, Song X, et al. Self-formation of RPE spheroids facilitates enrichment and expansion of hiPSC-derived RPE generated on retinal organoid induction platform. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59: 5659
- 99 Mehat M S, Sundaram V, Ripamonti C, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelial cells in macular degeneration. *Ophthalmology*, 2018, 125: 1765–1775
- 100 Laurent L C, Ulitsky I, Slavin I, et al. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell*, 2011, 8: 106–118
- 101 Vergara M N, Flores-Bellver M, Aparicio-Domingo S, et al. Three-dimensional automated reporter quantification (3D-ARQ) technology enables quantitative screening in retinal organoid. *Development*, 2017, 144: 3698–3705
- 102 Czerniecki S M, Cruz N M, Harder J L, et al. High-throughput screening enhances kidney organoid differentiation from human pluripotent stem cells and enables automated multidimensional phenotyping. *Cell Stem Cell*, 2018, 22: 929–940.e4
- 103 Ormel P R, Vieira de Sá R, van Bodegraven E J, et al. Microglia innately develop within cerebral organoids. *Nat Commun*, 2018, 9: 4167
- 104 Cakir B, Xiang Y, Tanaka Y, et al. Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system. *Nat Methods*, 2019, 16: 1169–1175
- 105 Corrò C, Novellademunt L, Li V S W. A brief history of organoids. *Am J Physiol-Cell Physiol*, 2020, 319: C151–C165

From retinal organoids to “retinal organ”

XU Jia & JIN ZiBing

Beijing Institute of Ophthalmology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100005, China

Retinal degenerative disease is a common ophthalmological disease that causes severe blindness, and difficult to treat in clinics at present. Because retinal tissue is not easy to obtain and cannot be cultured, it is difficult to study the mechanism and treatment of retinal-related diseases. Due to the significant species differences between the retina of animals and humans, the results of many animal experiments in the past were often difficult to be utilized to solve clinical problems. The emergence of retinal organoids has become a new hope for solving these problems. It enables retinal-related diseases to be reproduced in cell culture dishes for research on disease mechanisms and drug screening. More importantly, it can be used for cell transplantation to replace degenerated retinal cells, which is expected to restore sight to the blind. However, we must also recognize that there are still some bottlenecks that need to be solved urgently in retinal organoid simulation diseases, such as the low stability of differentiation, lack of blood vessels and neuroimmune cells. Although the application of micro-millifluidic bioreactor has improved the differentiation of retinal organs, current technology can only achieve a level of “organoids” and has not yet reached the standard of “retinal organ”. Therefore, the purpose of this review is to sort out the applications and existing problems of retinal organoids, and think about how to further promote the development of retinal organoids that can be used for regenerative medicine, in order to better facilitate the treatment and research of retinal diseases.

retina, retinal organoids, retinal disease, retinal organ

doi: [10.1360/SSV-2021-0276](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0276)