

综述

面向国家重大需求 开发建立新研究模型——胰岛类器官模型的研究进展与展望

宋姝莉*, 王璞玥

国家自然科学基金委员会生命科学部, 北京 100085

摘要: 糖尿病是威胁人类健康的一种重大代谢性疾病, 给人们和社会带来了沉重的负担, 对其发病机制的研究和治疗方法的开发是国家的重大需求。随着类器官技术的问世, 胰岛类器官(islet organoid)应运而生且备受关注, 被认为是极具价值的新型糖尿病研究模型。胰岛类器官是基于目前对胰岛发育机制的理解, 通过体外添加诱导因子程序化地激活或抑制发育过程中的特定信号通路, 将干细胞体外诱导分化成具有类似天然胰岛结构和功能的三维细胞培养物。由于胰岛类器官能够在一定程度上体外模拟胰岛的发育过程, 体现其组织结构, 行使分泌多种激素、调控血糖水平的生理功能, 因此具有广泛的应用价值, 已被用于糖尿病发病机制研究、药物筛选和评价以及临床移植治疗等, 显示出良好的应用前景。本文主要总结和介绍胰岛类器官目前的研究进展、应用前景和亟待解决的问题, 并且讨论和展望未来的发展方向。

关键词: 类器官; 胰岛类器官; 糖尿病; 研究模型; 研究进展

Focusing on the major national demands and developing novel research models——the research progress and prospective of islet organoid

SONG E-Li*, WANG Pu-Yue

Department of Life Sciences, National Natural Science Foundation of China, Beijing 100085, China

Abstract: Diabetes is a major metabolic disease and health issue worldwide that imposes a heavy burden. Research on its pathogenesis and development of effective treatments are currently our major national demands. With the advent of organoid technology, islet organoids have emerged and are attracting increasing attention as a promising model for diabetes research. The establishment of islet organoids is based on the current understanding of islet development. With addition of extra induction factors *in vitro* to programmatically activate or inhibit specific signaling pathways during islet development, stem cells can be induced to differentiate into three-dimensional cell cultures that possess structures and functions similar to those of natural islets. Because of their capability to mimic the development of islets *in vitro*, faithfully replicate islet structure, and perform islet physiological functions, islet organoids have been widely used as a valuable tool for the investigation of diabetes pathogenesis, drug screening and evaluation, and clinical transplantation, showing a great potential application. This paper reviews the current research progress, application, and challenges of islet organoids, and discusses the future directions for research on islet organoids.

Key words: organoid; islet organoid; diabetes; research model; research progress

1 糖尿病与胰岛

1.1 糖尿病是一种重大代谢性疾病

葡萄糖是机体的主要能量来源, 其摄取、代谢与储存等各个过程均受到严格调控。当胰岛素分泌

缺陷或机体产生胰岛素抵抗时, 机体代谢发生紊乱, 最终会导致糖尿病。糖尿病以慢性高血糖为主要特征, 常伴随脂肪与蛋白质代谢失常, 长期高血糖可对心脏、眼、肾等器官和组织造成慢性功能损伤。

*Corresponding author. Tel: +86-10-62325489; E-mail: songeli@nsfc.gov.cn

根据国际糖尿病联盟 (International Diabetes Federation, IDF) 发布的最新全球糖尿病地图 (IDF Diabetes Atlas)(第 10 版), 2021 年全球约 5.37 亿成年人患有糖尿病, 每 10 个人中就有 1 个是糖尿病患者^[1]。近年来, 随着我国经济的发展和人们生活水平的提高, 我国的糖尿病患者人数日趋增加, 现已成为世界糖尿病第一大国, 2021 年我国有糖尿病患者 1.41 亿人, 在糖尿病治疗上的花费达 1 653 亿美元^[1,2]。可见, 糖尿病已成为威胁我国乃至全人类生命健康的重大代谢性疾病。因此, 对糖尿病发病机制的研究、治疗药物的筛选和诊疗方案的开发具有重要的科学意义和紧迫的国家需求。

1.2 胰岛素分泌与糖尿病发生密切相关

调控机体血糖水平最重要的激素是胰岛素, 它由胰腺中的胰岛 β 细胞分泌, 因此胰岛和 β 细胞在糖尿病的发生、发展中扮演着重要的角色。自身免疫缺陷引发的胰岛 β 细胞功能损伤和胰岛素分泌不足可导致 1 型糖尿病, 又名胰岛素依赖型糖尿病或青少年发病型糖尿病, 约占糖尿病病例的 10%, 患者最终需依赖胰岛素治疗。长期胰岛素抵抗造成的胰岛 β 细胞功能受损和胰岛素分泌不足引起 2 型糖尿病, 又称非胰岛素依赖型糖尿病或成年人发病型糖尿病, 约占糖尿病病例的 90%, 目前临床上并没有非常有效的干预和治疗手段。胰岛 β 细胞发育或胰岛素信号通路中起关键作用的单个基因突变可导致单基因糖尿病, 约占所有类型糖尿病的 1%~5%, 主要包括年轻人成年型糖尿病 (maturity onset diabetes of the young, MODY) 和新生儿糖尿病 (neonatal diabetes)^[3]。

1.3 胰岛是一个重要的内分泌器官

胰岛是一个细胞组成多样、结构和内部调控错综复杂的重要内分泌器官, 分泌多种激素调控血糖平衡。胰岛主要由分泌胰岛素的 β 细胞组成, 约占胰岛细胞总数的 60%, 此外还有其它 4 种内分泌细胞: α 细胞, 分泌胰高血糖素 (glucagon), 约占 30%; γ 细胞, 分泌胰多肽 (pancreatic polypeptide); δ 细胞, 分泌生长抑素 (somatostatin); ϵ 细胞, 分泌生长激素释放肽 (ghrelin)。胰岛细胞分泌的激素可不经胰腺导管直接进入血液, 然后输送到不同的靶器官发挥作用。虽然分泌激素调控血糖平衡的主要是 α 和 β 细胞, 但已有研究表明 γ 细胞和 δ 细胞均可通过旁分泌作用影响胰岛素的分泌^[4]。除内分泌细胞外, 胰岛中还存在着内皮细胞、神经细胞等其它类型的细

胞, 近年来越来越多的研究表明这些非内分泌细胞对胰岛的激素分泌和运输也起着不可忽视的调控作用^[5,6]。

从结构上讲, 啮齿动物的胰岛通常呈“核心-外套”结构, 即 β 细胞被其它类型的内分泌细胞环绕; 但人类胰岛中各种细胞类型通常是均匀分布, 并且除 β 细胞外的其它内分泌细胞的比例较啮齿动物高^[7]。胰岛中也含有丰富的血管网络, 将胰岛细胞分泌的各种激素运往机体的各个靶器官, 也为胰岛带来氧气和营养物质。虽然胰岛的体积只占胰腺的 1%~2%, 但是供血却占胰腺的 5%~10%^[8]。可见, 胰岛中的血管网络极其丰富, 对维持胰岛的正常功能和使胰岛分泌的激素精确地作用到靶器官起着重要作用。

多年来由于人类胰岛供体稀少、胰岛发育和结构存在物种间的差异以及人类胚胎发育研究的相关伦理限制, 目前在人类胰岛发育中的形态发生、信号调节通路、关键基因和蛋白等众多关键问题上一直未取得显著进展; 对人类胰岛内细胞空间分布、胰岛中血管网络和神经网络分布及其与胰岛细胞的相互作用、内分泌细胞之间及内分泌细胞与其它细胞之间的相互作用及其调节机制等人类胰岛结构与功能的研究有待突破; 胰岛发育异常和功能紊乱与糖尿病的发生、发展之间的关系, 以及关键调控基因及其分子机制仍有待进一步发现。这些关键科学问题的阐释亟需可获得性更高、可操作性更强的新模型的建立和应用。

2 类器官(organoids)是生理学研究的新模型

类器官是一类三维细胞培养物, 通常来源于干细胞或器官祖细胞, 是利用干细胞 (多能干细胞或单能干细胞) 或祖细胞的自我更新及多向 (或单向) 分化潜能, 在体外重建和发育成为具有特定结构和生理功能的组织或器官, 因其具有类似于相应天然组织和器官的结构和功能, 因此被称为类器官^[9]。它能够在一定程度上体外模拟天然组织或器官的发育过程, 体现其组织结构, 行使特定的生理功能, 因此类器官体系自建立以来即被认为是一种具有极大进步和优势的新型生理学研究模型, 具有广泛的应用领域和极大的应用前景 (图 1)。目前, 国内外已经建立了脑、肠、肺、胃、肾、神经、心脏、血管、视网膜和胰岛等多种类器官模型。

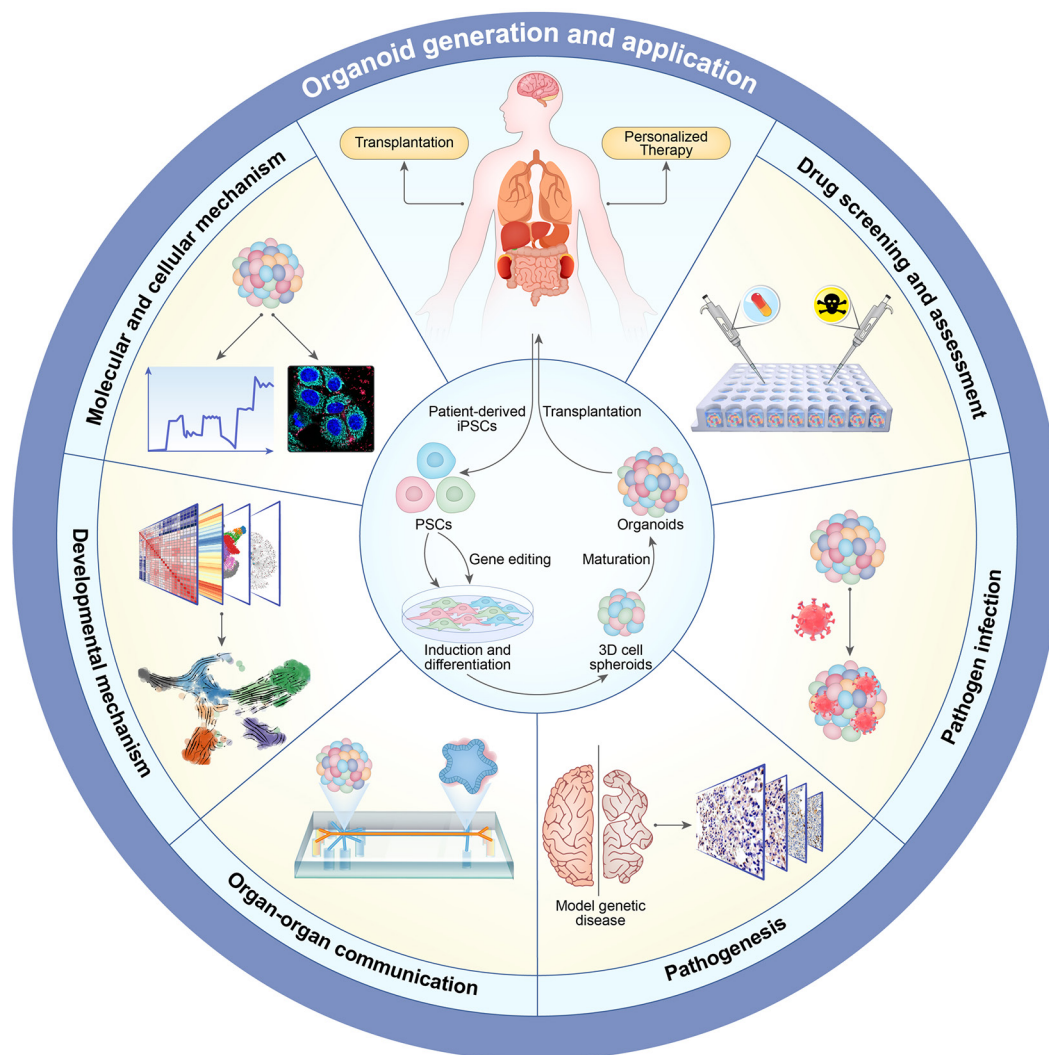


图 1. 类器官的构建及其应用

Fig. 1. The generation and potential application of organoids. iPSCs, induced pluripotent stem cells; PSCs, pluripotent stem cells.

2.1 类器官是一种强大的体外研究模型

由于类器官的体外发育和自组装的形成特性及其具有类似天然组织器官的结构和功能，因此类器官广泛用于生理学、发育生物学、再生医学等领域的研究^[10]。伴随着诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 技术的蓬勃发展，患者来源的类器官可作为一个具有天然疾病缺陷的研究模型，真实反映体内病理状态下的发育缺陷、形态异常、功能障碍等特征^[11]。结合 CRISPR/Cas9 基因编辑等分子生物学技术，类器官也能够更容易、更便捷地用于研究基因水平上的改变对组织器官发育过程和生理功能的影响。

类器官体系可在细胞水平和动物水平之间、二维细胞模型和三维器官模型之间提供一个新的体外

研究平台。相较动物模型，类器官的优势体现在其人性，弥补了人与模式动物之间因器官发育、结构、功能上的差异而造成的实验结果偏差；相较人体器官模型，类器官具有更好的可获得性，并且可实现个性化疾病模型的建立。

肠和脑类器官是建立较早的类器官模型，已在多个领域中得到应用，并产出了多项突破性成果。肠类器官通常由 LGR5⁺ 小肠干细胞体外诱导获得，具有隐窝和绒毛样的空间结构，并能行使离子转运等功能^[12]，已用于研究小肠发育、模拟肠道炎症与感染、分析和鉴定小肠稀有细胞类型等方面^[13, 14]。研究者在脑类器官研究中研发出了类组装体技术，即首先诱导获得大脑不同区域的类器官，然后将其组装到一起，建立空间结构更完整、功能更复

杂的脑类器官, 从而在体外模拟神经回路的建立和研究不同脑区之间的互作交流^[15]。同时, 心脏类器官、视网膜类器官等也发展迅速, 均已能在体外模拟天然器官的部分生理功能, 被用作相应器官的发育模型和疾病研究模型^[16]。

2.2 类器官是一种新的高通量药物筛选模型

由于类器官是组织器官水平上的研究模型, 因此可作为一种新型高通量药物筛选平台, 提供更加接近整体水平的、真实有效的药物效果信息。而且患者来源的类器官能够进一步用于个性化药物有效性、耐受性及不良反应等方面的评估, 促进精准医学和个性化诊疗的发展^[17, 18]。目前荷兰已将患者来源的肠类器官应用于囊性纤维化药物的个性化筛选, 评价个体对特定药物的响应水平^[19, 20]。

2.3 类器官是一种有前景的器官移植模型

在理想情况下, 类器官由于具有天然组织器官类似的功能, 可作为器官移植的新来源。相较细胞移植, 类器官由于具有与天然器官类似的多种细胞类型及组织结构, 移植后能够更加真实、完整地行使接近天然器官的复杂功能。相较天然器官移植, 类器官能够解决供体来源有限的限制。而且, 类器官能够实现自体移植, 从而解决免疫排斥等问题。结合基因编辑和疾病突变修复技术的迅速发展, 有望通过在体外将病理状态的器官改造生成正常的器官, 然后再移植回患者体内, 从而实现基因水平上的疾病个性化和精准化治疗。

3 胰岛类器官(islet organoid)是糖尿病研究的前沿模型

随着类器官技术的问世和胰岛及相关疾病的研究需要, 胰岛类器官也应运而生而且备受关注 and 期待, 被认为是极具价值的类器官模型之一。下面主要从胰岛类器官模型的建立和应用两个方面阐述胰岛类器官模型的最新研究进展。

3.1 胰岛类器官模型的建立

由于胰岛 β 细胞是分泌调节血糖的胰岛素的细胞, 目前胰岛类器官的研发主要聚焦于胰岛 β 细胞的诱导和三维胰岛类器官的建立^[21]。

3.1.1 胰岛 β 细胞的诱导

鉴于干细胞来源的胰岛 β 细胞在糖尿病研究和治疗中的重要作用, 已有多个团队开发出不同的体外诱导胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 分化为胰岛 β 细胞的诱导体系^[22–24]。然而, 这些干细

胞来源的 β 细胞并不成熟, 主要体现在成熟 β 细胞的标志物 NKX6.1 与胰岛素共表达的细胞较少、多激素细胞 (polyhormonal cells) 比例较高且在后续分化中更易分化为 α 细胞, 而非 β 细胞^[25], 且胰岛素阳性的细胞没有表现出明显的葡萄糖刺激的胰岛素分泌 (glucose stimulated insulin secretion, GSIS) 能力, 诱导产物移植到动物体内后调节血糖的能力有限和在体内存活时间短。

近年来, 研究人员对诱导因子做出了一系列调整, 提高了体外诱导效率和诱导产物的成熟度。Melton 团队系统地测试了 70 多种化合物及其 150 多种组合, 提出了一套利用 11 种诱导因子、分为 6 个阶段的诱导策略^[26], 其中每个阶段通过诱导因子的不同组合、不同浓度、不同暴露时间, 按顺序激活或抑制 Wnt、Hedgehog、EGF 等信号通路, 模拟胰岛发育过程中对应发育阶段的微环境, 由此获得的诱导产物中胰岛 β 细胞约占 30%, 并且表达 PDX1、NKX6.1、MAFA 等 β 细胞关键基因; 诱导产物能够在重复的高糖刺激中表现出与原代胰岛相仿的 Ca^{2+} 内流和胰岛素分泌; 电镜下可见诱导产物中具有致密核心大囊泡 (即储存和分泌胰岛素的囊泡), 且数目与原代胰岛 β 细胞内的囊泡数目接近; 将诱导产物移植到有免疫缺陷的糖尿病模型小鼠的肾包膜下后, 能检测到相应的人源胰岛素分泌并能改善小鼠的血糖水平。同时, 诱导产物中存在极少量的 α 细胞和 γ 细胞以及数目不多的多激素细胞。为进一步鉴定该策略的诱导效果, 他们利用单细胞测序技术对诱导产物进行了深入分析, 共鉴定出 β 细胞、 α 细胞、Sox9⁺ 胰腺祖细胞及肠嗜铬细胞 (enterochromaffin cells), 其中 Sox9⁺ 胰腺祖细胞如果继续诱导则倾向于分化为外分泌细胞^[27]。Melton 等也通过拟时间序列分析 (pseudotime analysis) 绘制出细胞分化轨迹, 发现了诱导分化过程中的两个关键节点, 即内分泌细胞的分化起始点和 β 细胞的分化起始点, 其中后一个节点分化出 β 细胞和肠嗜铬细胞^[27]。

有研究者认为, 干细胞来源的胰岛 β 细胞的不成熟是源于细胞在早期诱导阶段的早熟, 尤其是 NGN3 在内分泌前体阶段之前的过早表达^[28]。Rezania 等人通过在胰腺祖细胞及之前阶段的诱导体系中加入维生素 C, 抑制 NGN3 的过早表达, 显著提高了终产物中 NKX6.1⁺/INS⁺ 细胞的比例^[29]。但这些 NKX6.1⁺/INS⁺ 细胞却不能响应葡萄糖刺激

分泌胰岛素,因此他们在常规的诱导阶段之后增加了诱导 β 细胞成熟的阶段,并以终产物中MAFA的表达水平为筛选标准,发现R428是诱导 β 细胞成熟的关键因子;然而,这种维生素C对诱导效率的提升作用在其它多能干细胞系上的作用并不明显^[30]。也有诱导体系通过避免在前期诱导阶段使用BMP通路的抑制剂来抑制诱导过程中的早熟,最终可以提高NKX6.1⁺/PDX1⁺内分泌前体细胞的比例^[30],但同样无法在其它多能干细胞系上重复,而且单细胞测序结果表明该体系应用于某些细胞系上会促进其向小肠方向分化^[31]。由于干细胞诱导中不同批次之间的差异很大,因此类似这样的矛盾结论并不罕见。针对转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、PKC、Hedgehog等许多通路,用某种激活剂或抑制剂干预,在不同细胞系或不同实验室在同一种细胞系上得到的结论都不尽一致^[23,30-33]。

还有研究者认为,体外无法完全模拟体内的发育环境,因而造成诱导产物不够成熟,他们尝试先将ESCs在体外诱导至胰腺内胚层或内分泌前体阶段,再将诱导产物移植到小鼠的肾包膜下并继续在体内发育成为更成熟的胰岛类器官^[24,34]。

近年来,单细胞测序技术的发展使得对胰岛类器官内的细胞类型组成、细胞内的基因表达及信号通路等的鉴定成为可能,这有利于对诱导体系进行更精细的调整并对其诱导结果进行更详细、更深入的分析。研究显示,在诱导至胰腺前体阶段的类器官内用Latrunculin A抑制肌动蛋白(actin)聚集可使该阶段的内分泌细胞比例由不足10%提升至53%,同样地通过将诱导最后一步的ALK5抑制剂替换为极光激酶(aurora kinase)抑制剂ZM447439,可降低胰岛类器官中 α 细胞和 β 细胞内细胞增殖相关基因的表达,从而促进其成熟^[35]。

另外,通过比较移植到小鼠体内前后的胰岛类器官及成人胰岛的单细胞转录组,Augsornworawat等人确定了移植后的成熟胰岛类器官已经与人成体 β 细胞极为相似,并找到了成熟的胰岛类器官较其不成熟的状态所特异性表达的基因,如FAM159B、ITM2B等^[34],这些结果将有利于指导胰岛类器官体外成熟步骤的设计。

3.1.2 三维胰岛类器官的建立

除诱导因子的作用外,三维结构也通过细胞-细胞之间和细胞-细胞外基质之间的相互作用促进细胞的分化和成熟。三维结构的建立主要通过两种

方式实现:基于悬浮培养的方式和基于包埋培养的方式。

基于悬浮培养的建立方式是利用多能干细胞、胰腺祖细胞、内分泌细胞等的自组装特性,通过施加(或不施加)搅动,促进细胞聚集成簇。Melton团队就是采用磁力转瓶培养人多能干细胞,使之聚集成大小约100~200 μm 的胚胎体(embryonic body),继而进行后续诱导^[26]。另有多个团队报道,在不同阶段将诱导产物由二维培养转入三维悬浮培养可在不同程度上影响诱导产物的成熟水平^[29,35,36]。其中,邓宏魁团队研究发现,在前肠后端阶段建立三维结构对诱导效率的提升至关重要^[37],而Millman团队的研究则显示在胰腺前体阶段之后继续进行二维培养,至 β 细胞阶段再转入三维培养,可避免内分泌细胞的过早成熟,进而减少诱导产物中的多激素细胞^[35]。微流控芯片为基于悬浮培养的三维类器官的建立提供了可控性更强、更精确的方式。微流控芯片通过精确控制流速、流量等因素模拟体内液体流动,在体外重建体内细胞发育过程面临的剪应力等物理因素的同时,持续带来诱导因子、带走代谢废物,更真实地重塑了体内细胞所处的微环境,因此利用微流控芯片在灌流条件下培养出的胰岛类器官较相同诱导体系在静态悬浮培养条件下,细胞存活率更高, β 细胞关键基因表达水平更好,胰岛素分泌能力更强,即诱导出的胰岛类器官性能更好、更成熟^[38]。此外,微流控芯片可实现与其它类型细胞或类器官的共培养,用于研究不同胰岛细胞之间或胰岛与肝、小肠等其它器官之间的相互作用^[39]。

基于包埋的培养方式是通过将人多能干细胞或其诱导产物包埋入含细胞外基质成分的支架内,促进细胞-细胞外基质之间相互作用和三维结构组装。大多是通过将细胞包埋入基质胶(matrigel)来实现三维结构的建立,通过调整支架成分,如向基质胶中添加胶原或使用水凝胶(hydrogel)替代基质胶,可促进 β 细胞成熟,提高胰岛类器官内的细胞异质性^[40,41]。进一步在包埋体系中引入间充质干细胞和内皮细胞可提升胰岛类器官内的血管化水平^[42]。

此外,将干细胞来源的胰岛 β 细胞灌流入去细胞的动物胰腺支架,可为细胞提供成分更复杂的细胞外基质网络和血管网络,促进诱导获得的胰岛类器官三维结构和血管化网络的建立以及功能的成熟^[43]。

3.2 胰岛类器官的应用

随着体外诱导技术的成熟以及诱导获得的胰岛类器官功能更接近天然胰岛, 胰岛类器官模型已被陆续应用于基础研究及临床试验领域, 并取得了良好效果。

3.2.1 胰岛类器官应用于胰岛发育机制研究

类器官系统由于在体外重现了器官发育与成熟过程, 是研究器官发育与缺陷的良好模型。结合 CRISPR/CAS9 技术, 研究人员已利用胰岛类器官阐明了 RFX6、MAFB、NGN3 等多个基因调控胰岛发育的机制^[44–46]。而对于 HNF1A、NEUROD1 等多个 MODY 相关基因, 胰岛类器官在体外重现了患者胰岛发育过程中发生的 β 细胞发育异常、细胞生长缓慢、 β 细胞不能响应葡萄糖刺激分泌胰岛素等问题, 揭示了相应基因在疾病发生、发展中的分子机制^[47–49]。

3.2.2 胰岛类器官应用于糖尿病发病机制研究

胰岛类器官由于能在体外行使胰岛功能, 也是糖尿病发病机制研究的新模型, 已被用于多种类型糖尿病的研究。1 型糖尿病患者及 Wolfram 综合征患者来源的胰岛类器官在体外重现了病理状态下 β 细胞出现的内质网应激、胰岛素总量下降等问题^[50–52]。结合 CRISPR/CAS9 技术, KCNQ1、KCNJ11、VDR 等 2 型糖尿病相关基因敲除的 ESCs 来源的胰岛类器官也重现了胰岛素分泌不足、细胞大量凋亡等病理特征^[53, 54]。

3.2.3 胰岛类器官应用于组织器官间交互作用机制研究

多种类器官可以通过类器官芯片相连接, 用于检测和研究不同组织器官间的交流互作。通过肝脏–胰岛类器官芯片, 研究者揭示并模拟了人生理、病理及药物处理条件下的血糖调控特点^[55]。此外, 多器官芯片通过将原代脂肪、肝脏、小肠等组织器官分别与原代胰岛共同培养, 揭示正常和病理状态下多种器官与胰岛的相互作用^[39], 未来该技术与胰岛类器官技术的结合将帮助其摆脱人原代组织来源少的约束, 为病因复杂、涉及多器官互作的疾病 (如 2 型糖尿病) 提供新的、更高水平的体外研究模型。

3.2.4 胰岛类器官用于药物筛选和药效评价

胰岛类器官能够在体外模拟多种类型糖尿病的病理特征, 已有研究将其作为一类新的药物筛选平台, 筛选出了一系列针对特定基因缺陷的、能够在体外逆转糖尿病表型的药物或小分子。研究者在

GLIS3 基因敲除的 ESCs 来源的胰岛类器官中对多个美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准药物库进行药物筛选, 找到了能够抑制 *GLIS3*^{-/-} 胰岛类器官内 β 细胞大量凋亡的药物 galunisertib^[56]。利用 Wolfram 综合征患者来源的胰岛类器官, 研究者则筛选到了逆转其内质网应激相关表型的小分子 4PBA^[50]。对于目前临床上常用的糖尿病药物, 如甲苯磺丁脲、利拉鲁肽等, 都能显著提升 1 型糖尿病患者来源的胰岛类器官的胰岛素分泌能力^[52], 这些结果证明了胰岛类器官作为新兴药物筛选和药效评估平台的可靠性和有效性。

3.2.5 胰岛类器官应用于糖尿病治疗的探索

近年来随着胰岛类器官技术的进步与成熟, 将其应用于糖尿病临床治疗的可行性与可行方案的探索已成为众多团队关注的焦点之一。Du 等研究显示, 将胰岛类器官移植入糖尿病猴模型体内可显著改善实验猴的血糖控制水平, 初步显示出胰岛类器官用于治疗糖尿病的有效性^[37]。2021 年以来, Vertex 公司报道了数例将干细胞来源的胰岛类器官移植于 1 型糖尿病患者的临床试验, 结果显示移植后患者的胰岛素分泌水平显著增强、血糖调控能力明显提高, 可降低对外源胰岛素的依赖, 进一步展现了胰岛类器官在糖尿病治疗中的巨大潜力^[57]。

为提高胰岛类器官移植后的存活率和克服移植后的免疫排斥问题, 科学家们从基因编辑和外裹装置两个方面进行了诸多尝试。第一个方面的尝试主要通过选择性敲除人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 家族的基因或过表达程序性细胞死亡配体 1 (programmed cell death ligand-1, PD-L1)、白细胞介素 10 (interleukin 10, IL-10)、TGF- β 等基因, 降低胰岛类器官的免疫原性和逃避免疫系统^[58–60]; 第二个方面的尝试是将胰岛类器官包裹入特殊的外裹装置, 以避免免疫细胞的直接接触, 从而降低人体的免疫排斥反应^[61, 62]。另有团队发现, 通过将胰岛类器官移植入雄性小鼠睾丸内可建立免疫耐受, 对该环境内细胞因子的分析结果显示, 在诱导体系中加入 IL-2、IL-10、TGF- β 等因子可提高胰岛类器官移植的存活率^[63]。

4 胰岛类器官研究面临的问题及展望

尽管胰岛类器官技术的开发和应用已取得显著进展, 但仍存在一些问题有待改进。下面详述目前胰岛类器官建立中面临的问题和讨论可能的解决路

径,并展望胰岛类器官研究的发展方向。

4.1 目前胰岛类器官建立面临的问题

相较于脑、肺、肠等其他类器官,由于胰岛多细胞组成的结构复杂性以及多激素分泌的功能复杂性,目前胰岛类器官模型的建立和应用中仍有许多关键问题亟待进一步优化。

4.1.1 诱导产物中细胞类型缺失

目前的诱导体系在设计和筛选过程中,多是以尽可能提高胰岛 β 细胞的比例和功能为目标,由此产生的胰岛类器官中其它类型的胰岛细胞数目较少甚至缺失。然而人类胰岛和啮齿动物相比较,一个重要特征是 β 细胞比例较低, α 细胞等比例较高^[27,34]。各胰岛细胞类型间存在复杂的相互调控,因此干细胞来源的胰岛 β 细胞功能不足和诱导获得的胰岛类器官功能较差,可能与诱导产物中缺少其它的细胞类型或不同细胞类型的数目和占比有关。

4.1.2 诱导产物的成熟度和诱导效率仍有待提高

尽管目前的方法获得的胰岛类器官都能够在一定程度上响应葡萄糖刺激分泌胰岛素,但响应刺激的细胞数目通常较少、响应时间有延迟、响应程度比较差。诱导产物中NKX6.1⁺/INS⁺细胞只有约20%~50%,能正常行使功能的细胞则更少^[21,64]。另一方面,诱导产物中含有大量的前体细胞、不成熟细胞、无关细胞及未知细胞^[27,65,66],对诱导产物的整体功能具有潜在影响。此外,目前大部分研究主要关注胰岛类器官分泌胰岛素的水平和调控血糖的能力,但是忽视了胰岛具有分泌胰高血糖素等其他数量少但是功能重要的激素的能力。

4.1.3 诱导产物的血管化水平较差

胰岛因其内分泌器官的特性,是体内血管网络最丰富的器官之一,缺乏血管网络易使其内部的细胞缺乏氧气和营养物质,不仅影响胰岛类器官在体外的功能,也降低了移植后的存活率。现有一些研究通过在诱导过程中加入血管内皮细胞共培养建立胰岛类器官的内部血管^[42],但是其丰富程度以及血管功能的有效性还有待证实和优化。

4.1.4 诱导过程的可重复性不高和批次间差异大

现有的诱导体系多是在实验室常用的ESCs或多能干细胞系基础上开发的,应用于不同个体来源iPSCs时的诱导效率和诱导终产物的性能差异较大,用于患者来源iPSCs的体外诱导往往不能得到理想的效果。因此对于不同细胞系,尤其是不同患者来源iPSCs,需要有针对性地调整诱导体系、开发针

对不同来源细胞的差异化诱导体系以提高诱导终产物的功能,促进胰岛类器官在临床上的个性化应用。

4.2 胰岛类器官研究的展望

为解决目前胰岛类器官研究面临的问题,推动胰岛类器官在基础研究和临床应用中的发展,应该在增进对人类胰腺发育机制理解的基础上,不断优化胰岛类器官的诱导方法和体系,以获得结构和功能更加完备的胰岛类器官模型。

4.2.1 深入理解人类胰腺的发育机制

胰岛类器官是通过体外诱导和培养,以期得到与天然胰岛具有相同生理功能的类器官,因此为了寻找更接近天然发育过程的诱导配方和策略,需要深入理解人类胰腺的发育机制,了解胰腺祖细胞精确的时空分化轨迹和细胞分化路径、不同细胞类型之间的互作和转化以及细胞微环境、发育过程中的调控基因、发育节点、信号通路等关键调控单元。最近,多个研究团队利用单细胞测序技术初步阐明了人类胰腺的早期发育机制,揭示了其中的发育轨迹、信号通路及关键调控因子^[67-69]。但是目前我们所知的仍只是冰山一角,今后仍需对人类胰腺发育全周期(从胰腺祖细胞甚至更早期到成年期功能成熟的胰岛)、多层次(转录组、蛋白组、表观组、代谢组等)的深入解析。

4.2.2 优化胰岛类器官的诱导方法

针对目前胰岛类器官建立中面临的细胞类型缺失、成熟度差和可重复性不高等问题,需要优化诱导配方、改进诱导流程、建立更优的诱导体系,并应注重对诱导产物激素分泌功能的全方位开发和评价。可根据对人类胰腺发育机制的理解,筛选和调整诱导因子的种类、浓度、暴露时间和刺激顺序等条件,优化诱导配方。可尝试在诱导过程中,引入新型生物材料,以模拟体内胰岛的微环境从而提高诱导效率和诱导产物的成熟度。可设计和使用新型自动化诱导和培养的装置,以提高诱导的均一性及纯度。可尝试先分别定向诱导出不同类型的胰岛内分泌细胞(α 细胞、 β 细胞、 γ 细胞、 δ 细胞等),然后将其与内皮细胞和间充质细胞等支持细胞以适当比例混合培养并提供三维培养环境,从而获得各种细胞比例与天然胰岛一致、各种类型细胞功能成熟的胰岛类器官模型。

4.2.3 建立具有血管化网络的胰岛类器官

胰岛类器官内的血管网络对于胰岛类器官的功能有重要影响,因此需要发展建立胰岛类器官内

部血管网络的方法, 建立具有血管化网络的胰岛类器官模型。一是应该注重诱导过程中血管内皮细胞等血管相关细胞类型的诱导; 二是可尝试首先通过组织工程的方法获得去细胞胰腺血管网络支架^[70]或3D打印血管网络支架^[71], 然后将二维诱导的细胞产物和内皮细胞等支持细胞一起灌注于该支架内, 并继续培养成三维胰岛类器官, 以建立具有功能血管网络的胰岛类器官模型。

4.2.4 优化胰岛类器官的体内移植策略

胰岛类器官移植用于治疗糖尿病的尝试中, 有效性和安全性是人们最为关注的问题^[72]。可在胰岛类器官移植的策略和术式等方面展开探索, 如寻找最佳的移植部位和合适的移植当量等, 以提高移植的有效性和安全性; 可开发新的免疫抑制策略, 探索基于自体细胞移植、基因编辑、外裹装置等方法, 以降低免疫排斥和提高移植的存活率; 可建立检测和纯化方法, 去除胰岛类器官中未分化和多潜能细胞等不成熟细胞及杂质, 以及建立新的术后成瘤监测方法, 以提高移植的安全性。

综上所述, 胰岛类器官模型是研究胰岛发育和糖尿病发病机制的新兴强大手段, 同时在药物筛选、器官移植和糖尿病治疗等方面具有广阔的应用前景。然而, 目前胰岛类器官模型的建立和应用中仍存在诸多亟待解决的瓶颈, 需要逐一突破, 建立功能更成熟、更接近天然胰岛的胰岛类器官模型, 为机制研究、药物筛选和临床治疗提供新的模型, 为糖尿病及其相关重大疾病的治疗和干预提供新的思路 and 手段。

参考文献

- Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, Stein C, Basit A, Chan JCN, Mbanya JC, Pavkov ME, Ramachandran A, Wild SH, James S, Herman WH, Zhang P, Bommer C, Kuo S, Boyko EJ, Magliano DJ. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* 2022; 183: 109119.
- Magliano DJ, Boyko EJ; IDF Diabetes Atlas 10th edition scientific committee. IDF Diabetes Atlas [Internet]. 10th ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2021.
- Antosik K, Borowiec M. Genetic factors of diabetes. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2016; 64(Suppl 1): 157–160.
- Briant LJB, Reinbothe TM, Spiliotis I, Miranda C, Rodriguez B, Rorsman P. δ -cells and β -cells are electrically coupled and regulate α -cell activity via somatostatin. *J Physiol* 2018; 596(2): 197–215.
- Aamodt KI, Powers AC. Signals in the pancreatic islet microenvironment influence beta-cell proliferation. *Diabetes Obes Metab* 2017; 19 Suppl 1: 124–136.
- Mandarim-de-Lacerda CA. Pancreatic islet (of Langerhans) revisited. *Histol Histopathol* 2019; 34(9): 985–993.
- Nair G, Hebrok M. Islet formation in mice and men: lessons for the generation of functional insulin-producing beta-cells from human pluripotent stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2015; 32: 171–180.
- Jansson L, Carlsson PO. Pancreatic blood flow with special emphasis on blood perfusion of the islets of Langerhans. *Compr Physiol* 2019; 9(2): 799–837.
- Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 2014; 345(6194): 1247125.
- Drichuis E, Clevers H. CRISPR/Cas 9 genome editing and its applications in organoids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2017; 312(3): G257–G265.
- Clevers H. Modeling development and disease with organoids. *Cell* 2016; 165(7): 1586–1597.
- Zachos NC, Kovbasnjuk O, Foulke-Abel J, In J, Blutt SE, de Jonge HR, Estes MK, Donowitz M. Human enteroids/colonooids and intestinal organoids functionally recapitulate normal intestinal physiology and pathophysiology. *J Biol Chem* 2016; 291(8): 3759–3766.
- Boonekamp KE, Dayton TL, Clevers H. Intestinal organoids as tools for enriching and studying specific and rare cell types: advances and future directions. *J Mol Cell Biol* 2020; 12(8): 562–568.
- Li VSW. Modelling intestinal inflammation and infection using ‘mini-gut’ organoids. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2021; 18(2): 89–90.
- Marton RM, Pasca SP. Organoid and assembloid technologies for investigating cellular crosstalk in human brain development and disease. *Trends Cell Biol* 2020; 30(2): 133–143.
- Tang XY, Wu S, Wang D, Chu C, Hong Y, Tao M, Hu H, Xu M, Guo X, Liu Y. Human organoids in basic research and clinical applications. *Signal Transduct Target Ther* 2022; 7(1): 168.
- Fatehullah A, Tan SH, Barker N. Organoids as an *in vitro* model of human development and disease. *Nat Cell Biol* 2016; 18(3): 246–254.
- Schutgens F, Clevers H. Human organoids: Tools for understanding biology and treating diseases. *Annu Rev Pathol* 2020; 15: 211–234.
- Dekkers JF, Wiegerinck CL, de Jonge HR, Bronsveld I, Janssens HM, de Winter-de Groot KM, Brandsma AM, de Jong NW, Bijvelds MJ, Scholte BJ, Nieuwenhuis EE, van

- den Brink S, Clevers H, van der Ent CK, Middendorp S, Beekman JM. A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat Med* 2013; 19(7): 939–945.
- 20 Berkers G, van Mourik P, Vonk AM, Kruisselbrink E, Dekkers JF, de Winter-de Groot KM, Arets HGM, Marck-van der Wilt REP, Dijkema JS, Vanderschuren MM, Houwen RHJ, Heijerman HGM, van de Graaf EA, Elias SG, Majoor CJ, Koppelman GH, Roukema J, Bakker M, Janssens HM, van der Meer R, Vries RGJ, Clevers HC, de Jonge HR, Beekman JM, van der Ent CK. Rectal organoids enable personalized treatment of cystic fibrosis. *Cell Rep* 2019; 26(7): 1701–1708.e3.
 - 21 Zhang X, Ma Z, Song E, Xu T. Islet organoid as a promising model for diabetes. *Protein Cell* 2022; 13(4): 239–257.
 - 22 D'Amour KA, Bang AG, Eliazar S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, Moorman MA, Kroon E, Carpenter MK, Baetge EE. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2006; 24(11): 1392–1401.
 - 23 Rezaia A, Bruin JE, Riedel MJ, Mojibian M, Asadi A, Xu J, Gauvin R, Narayan K, Karanu F, O'Neil JJ, Ao Z, Warnock GL, Kieffer TJ. Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice. *Diabetes* 2012; 61(8): 2016–2029.
 - 24 Rezaia A, Bruin JE, Xu J, Narayan K, Fox JK, O'Neil JJ, Kieffer TJ. 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(11): 2432–2442.
 - 25 Hrvatin S, O'Donnell CW, Deng F, Millman JR, Pagliuca FW, DiIorio P, Rezaia A, Gifford DK, Melton DA. Differentiated human stem cells resemble fetal, not adult, β cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(8): 3038–3043.
 - 26 Pagliuca FW, Millman JR, Gürtler M, Segel M, Van Dervort A, Ryu JH, Peterson QP, Greiner D, Melton DA. Generation of functional human pancreatic β cells *in vitro*. *Cell* 2014; 159(2): 428–439.
 - 27 Veres A, Faust AL, Bushnell HL, Engquist EN, Kenty JH, Harb G, Poh YC, Sintov E, Gürtler M, Pagliuca FW, Peterson QP, Melton DA. Charting cellular identity during human *in vitro* beta-cell differentiation. *Nature* 2019; 569(7756): 368–373.
 - 28 Johansson KA, Dursun U, Jordan N, Gu G, Beermann F, Gradwohl G, Grapin-Botton A. Temporal control of neurogenin3 activity in pancreas progenitors reveals competence windows for the generation of different endocrine cell types. *Dev Cell* 2007; 12(3): 457–465.
 - 29 Rezaia A, Bruin JE, Arora P, Rubin A, Batushansky I, Asadi A, O'Dwyer S, Quiskamp N, Mojibian M, Albrecht T, Yang YH, Johnson JD, Kieffer TJ. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived *in vitro* from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2014; 32(11): 1121–1133.
 - 30 Russ HA, Parent AV, Ringler JJ, Hennings TG, Nair GG, Shveygert M, Guo T, Puri S, Haataja L, Cirulli V, Blelloch R, Szot GL, Arvan P, Hebrok M. Controlled induction of human pancreatic progenitors produces functional beta-like cells *in vitro*. *EMBO J* 2015; 34(13): 1759–1772.
 - 31 Wesolowska-Andersen A, Jensen RR, Alcantara MP, Beer NL, Duff C, Nylander V, Gosden M, Witty L, Bowden R, McCarthy MI, Hansson M, Gloyn AL, Honore C. Analysis of differentiation protocols defines a common pancreatic progenitor molecular signature and guides refinement of endocrine differentiation. *Stem Cell Reports* 2020; 14(1): 138–153.
 - 32 Nostro MC, Sarangi F, Yang C, Holland A, Elefanty AG, Stanley EG, Greiner DL, Keller G. Efficient generation of NKX6-1+ pancreatic progenitors from multiple human pluripotent stem cell lines. *Stem Cell Reports* 2015; 4(4): 591–604.
 - 33 Kunisada Y, Tsubooka-Yamazoe N, Shoji M, Hosoya M. Small molecules induce efficient differentiation into insulin-producing cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res* 2012; 8(2): 274–284.
 - 34 Augsornworawat P, Maxwell KG, Velazco-Cruz L, Millman JR. Single-cell transcriptome profiling reveals beta cell maturation in stem cell-derived islets after transplantation. *Cell Rep* 2020; 32(8): 108067.
 - 35 Hogrebe NJ, Augsornworawat P, Maxwell KG, Velazco-Cruz L, Millman JR. Targeting the cytoskeleton to direct pancreatic differentiation of human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2020; 38(4): 460–470.
 - 36 Kim Y, Kim H, Ko UH, Oh Y, Lim A, Sohn JW, Shin JH, Kim H, Han YM. 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.
 - 37 Du Y, Liang Z, Wang S, Sun D, Wang X, Liew SY, Lu S, Wu S, Jiang Y, Wang Y, Zhang B, Yu W, Lu Z, Pu Y, Zhang Y, Long H, Xiao S, Liang R, Zhang Z, Guan J, Wang J, Ren H, Wei Y, Zhao J, Sun S, Liu T, Meng G, Wang L, Gu J, Wang T, Liu Y, Li C, Tang C, Shen Z, Peng X, Deng H. Human pluripotent stem-cell-derived islets ameliorate diabetes in non-human primates. *Nat Med* 2022; 28(2): 272–282.
 - 38 Tao T, Wang Y, Chen W, Li Z, Su W, Guo Y, Deng P, Qin J. Engineering human islet organoids from iPSCs using an organ-on-chip platform. *Lab Chip* 2019; 19(6): 948–958.
 - 39 Yin J, Meng H, Lin J, Ji W, Xu T, Liu H. Pancreatic islet organoids-on-a-chip: how far have we gone? *J Nanobiotechnol*

- nology 2022; 20(1): 308.
- 40 Wang W, Jin S, Ye K. Development of islet organoids from H9 human embryonic stem cells in biomimetic 3D scaffolds. *Stem Cells Dev* 2017; 26(6): 394–404.
 - 41 Candiello J, Grandhi TSP, Goh SK, Vaidya V, Lemmon-Kishi M, Eliato KR, Ros R, Kumta PN, Rege K, Banerjee I. 3D heterogeneous islet organoid generation from human embryonic stem cells using a novel engineered hydrogel platform. *Biomaterials* 2018; 177: 27–39.
 - 42 Takahashi Y, Takebe T, Taniguchi H. Methods for generating vascularized islet-like organoids via self-condensation. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2018; 45(1): e49.
 - 43 Wan J, Huang Y, Zhou P, Guo Y, Wu C, Zhu S, Wang Y, Wang L, Lu Y, Wang Z. Culture of iPSCs derived pancreatic β -like cells *in vitro* using decellularized pancreatic scaffolds: A preliminary trial. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 4276928.
 - 44 Zhu Z, Li QV, Lee K, Rosen BP, Gonzalez F, Soh CL, Huangfu D. Genome editing of lineage determinants in human pluripotent stem cells reveals mechanisms of pancreatic development and diabetes. *Cell Stem Cell* 2016; 18(6): 755–768.
 - 45 Zhang X, McGrath PS, Salomone J, Rahal M, McCauley HA, Schweitzer J, Kovall R, Gebelein B, Wells JM. A comprehensive structure-function study of Neurogenin3 disease-causing alleles during human pancreas and intestinal organoid development. *Dev Cell* 2019; 50(3): 367–380.e7.
 - 46 Russell R, Carnese PP, Hennings TG, Walker EM, Russ HA, Liu JS, Giacometti S, Stein R, Hebrok M. Loss of the transcription factor MAFB limits beta-cell derivation from human PSCs. *Nat Commun* 2020; 11(1): 2742.
 - 47 Maxwell KG, Millman JR. Applications of iPSC-derived beta cells from patients with diabetes. *Cell Rep Med* 2021; 2(4): 100238.
 - 48 Romer AI, Singer RA, Sui L, Egli D, Sussel L. Murine perinatal beta-cell proliferation and the differentiation of human stem cell-derived insulin-expressing cells require NEUROD1. *Diabetes* 2019; 68(12): 2259–2271.
 - 49 Cardenas-Diaz FL, Osorio-Quintero C, Diaz-Miranda MA, Kishore S, Leavens K, Jobaliya C, Stanescu D, Ortiz-Gonzalez X, Yoon C, Chen CS, Haliyur R, Brissova M, Powers AC, French DL, Gadue P. Modeling monogenic diabetes using human ESCs reveals developmental and metabolic deficiencies caused by mutations in HNF1A. *Cell Stem Cell* 2019; 25(2): 273–289.e5.
 - 50 Shang L, Hua H, Foo K, Martinez H, Watanabe K, Zimmer M, Kahler DJ, Freeby M, Chung W, LeDuc C, Goland R, Leibel RL, Egli D. β -cell dysfunction due to increased ER stress in a stem cell model of Wolfram syndrome. *Diabetes* 2014; 63(3): 923–933.
 - 51 Maxwell KG, Augsornworawat P, Velazco-Cruz L, Kim MH, Asada R, Hogrebe NJ, Morikawa S, Urano F, Millman JR. Gene-edited human stem cell-derived beta cells from a patient with monogenic diabetes reverse preexisting diabetes in mice. *Sci Transl Med* 2020; 12(540): eaax9106.
 - 52 Millman JR, Xie C, Van Dervort A, Gurtler M, Pagliuca FW, Melton DA. Generation of stem cell-derived beta-cells from patients with type 1 diabetes. *Nat Commun* 2016; 7: 11463.
 - 53 Zeng H, Guo M, Zhou T, Tan L, Chong CN, Zhang T, Dong X, Xiang JZ, Yu AS, Yue L, Qi Q, Evans T, Graumann J, Chen S. An isogenic human ESC platform for functional evaluation of genome-wide-association-study-identified diabetes genes and drug discovery. *Cell Stem Cell* 2016; 19(3): 326–340.
 - 54 Wei Z, Yoshihara E, He N, Hah N, Fan W, Pinto AFM, Huddy T, Wang Y, Ross B, Estepa G, Dai Y, Ding N, Sherman MH, Fang S, Zhao X, Liddle C, Atkins AR, Yu RT, Downes M, Evans RM. Vitamin D switches BAF complexes to protect beta cells. *Cell* 2018; 173(5): 1135–1149.e15.
 - 55 Tao T, Deng P, Wang Y, Zhang X, Guo Y, Chen W, Qin J. Microengineered multi-organoid system from hiPSCs to recapitulate human liver-islet axis in normal and type 2 diabetes. *Adv Sci (Weinh)* 2022; 9(5): e2103495.
 - 56 Amin S, Cook B, Zhou T, Ghazizadeh Z, Lis R, Zhang T, Khalaj M, Crespo M, Perera M, Xiang JZ, Zhu Z, Tomishima M, Liu C, Naji A, Evans T, Huangfu D, Chen S. Discovery of a drug candidate for GLIS3-associated diabetes. *Nat Commun* 2018; 9(1): 2681.
 - 57 Vertex snaps up diabetes stem cell rival. *Nat Biotechnol* 2022; 40(8): 1161.
 - 58 Yoshihara E, O'Connor C, Gasser E, Wei Z, Oh TG, Tseng TW, Wang D, Cayabyab F, Dai Y, Yu RT, Liddle C, Atkins AR, Downes M, Evans RM. Immune-evasive human islet-like organoids ameliorate diabetes. *Nature* 2020; 586(7830): 606–611.
 - 59 Gerace D, Zhou Q, Kenty JH, Veres A, Sintov E, Wang X, Boulanger KR, Li H, Melton DA. Engineering human stem cell-derived islets to evade immune rejection and promote localized immune tolerance. *Cell Rep Med* 2023; 4(1): 100879.
 - 60 Parent AV, Faleo G, Chavez J, Saxton M, Berrios DI, Kerper NR, Tang Q, Hebrok M. Selective deletion of human leukocyte antigens protects stem cell-derived islets from immune rejection. *Cell Rep* 2021; 36(7): 109538.
 - 61 Cooper-Jones B, Ford C. Islet cell replacement therapy for insulin-dependent diabetes. In: *CADTH Issues in Emerging Health Technologies*. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health, 2016–2021.
 - 62 Bochenek MA, Veisheh O, Vegas AJ, McGarrigle JJ, Qi M,

- Marchese E, Omami M, Doloff JC, Mendoza-Elias J, Nour-mohammadzadeh M, Khan A, Yeh CC, Xing Y, Isa D, Ghani S, Li J, Landry C, Bader AR, Olejnik K, Chen M, Hollister-Lock J, Wang Y, Greiner DL, Weir GC, Strand BL, Rokstad AMA, Lacik I, Langer R, Anderson DG, Oberholzer J. Alginate encapsulation as long-term immune protection of allogeneic pancreatic islet cells transplanted into the omental bursa of macaques. *Nat Biomed Eng* 2018; 2(11): 810–821.
- 63 Zhou Q, Li H, Gerace D, Nikolskly I, Wang X, Kenty-Ryu J, Zhang J, Hinderhofer M, Robinson E, Melton DA. Toward improving immunotolerance for stem cell-derived islets. *bioRxiv* 2022. DOI: 10.1101/2022.09.15.508091.
- 64 Jin W, Jiang W. Stepwise differentiation of functional pancreatic beta cells from human pluripotent stem cells. *Cell Regen* 2022; 11(1): 24.
- 65 Balboa D, Barsby T, Lithovius V, Saarimaki-Vire J, Omar-Hmeadi M, Dyachok O, Montaser H, Lund PE, Yang M, Ibrahim H, Naatanen A, Chandra V, Vihinen H, Jokitalo E, Kvist J, Ustinov J, Nieminen AI, Kuuluvainen E, Hietakangas V, Katajisto P, Lau J, Carlsson PO, Barg S, Tengholm A, Otonkoski T. Functional, metabolic and transcriptional maturation of human pancreatic islets derived from stem cells. *Nat Biotechnol* 2022; 40(7): 1042–1055.
- 66 Weng C, Xi J, Li H, Cui J, Gu A, Lai S, Leskov K, Ke L, Jin F, Li Y. Single-cell lineage analysis reveals extensive multimodal transcriptional control during directed beta-cell differentiation. *Nat Metab* 2020; 2(12): 1443–1458.
- 67 Olaniru OE, Kadolsky U, Kannambath S, Vaikkinen H, Fung K, Dharni P, Persaud SJ. Single-cell transcriptomic and spatial landscapes of the developing human pancreas. *Cell Metab* 2023; 35(1): 184–199.e5.
- 68 Yu XX, Qiu WL, Yang L, Wang YC, He MY, Wang D, Zhang Y, Li LC, Zhang J, Wang Y, Xu CR. Sequential progenitor states mark the generation of pancreatic endocrine lineages in mice and humans. *Cell Res* 2021; 31(8): 886–903.
- 69 Ma Z, Zhang X, Zhong W, Yi H, Chen X, Zhao Y, Ma Y, Song E, Xu T. Deciphering early human pancreas development at the single-cell level. *Nat Commun* 2023; 14(1): 5354.
- 70 Goh SK, Bertera S, Olsen P, Candiello JE, Halfter W, Uechi G, Balasubramani M, Johnson SA, Sicari BM, Kollar E, Badylak SF, Banerjee I. Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. *Biomaterials* 2013; 34(28): 6760–6772.
- 71 Chen EP, Toksoy Z, Davis BA, Geibel JP. 3D bioprinting of vascularized tissues for *in vitro* and *in vivo* applications. *Front Bioeng Biotechnol* 2021; 9: 664188.
- 72 Melton D. The promise of stem cell-derived islet replacement therapy. *Diabetologia* 2021; 64(5): 1030–1036.