

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.02.009

肿瘤免疫研究新平台——肿瘤组织微环境类器官研究进展

The new platform for tumor immunity research: progress in organoid study of tumor tissue microenvironment

罗建华 综述;刘秋燕 审阅(海军军医大学 免疫学研究所暨医学免疫学国家重点实验室,上海 200433)

[摘要] 肿瘤免疫研究新平台——肿瘤组织微环境类器官,因其保留了体内肿瘤微环境(TME)的特征,在肿瘤免疫治疗领域的应用有明显的优势。根据是否需要添加外源免疫细胞以及基质细胞可以将模拟TME的类器官模型分为初始TME类器官培养模型(native TME model)和重建TME类器官培养模型(reconstituted TME model)两种。介绍两种模型的体外培养方法和其在肿瘤免疫治疗临床前研究中的应用,如鉴定生物标志物、评估免疫联合治疗策略的疗效、制备肿瘤特异性T细胞和筛选免疫治疗新方法等,并对该平台目前存在的短板和局限性以及未来的发展前景等进行初步分析和展望,以期为该领域研究提供参考和帮助。

[关键词] 类器官;恶性肿瘤;肿瘤微环境;肿瘤免疫;免疫治疗

[中图分类号] R73-35;R730.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2022)02-0142-08

以CAR-T和PD-1/PD-L1阻断治疗为代表的免疫疗法已经成为继手术、放化疗和靶向治疗之外的肿瘤患者尤其是晚期肿瘤患者治疗的重要手段^[1-2]。基础研究及临床前的体外细胞学实验和体内荷瘤动物模型是肿瘤免疫治疗策略筛选的重要平台,当前的细胞学实验大都采用肿瘤细胞系单独或与免疫细胞2D(two-dimensional)培养或共培养模式,这类培养模式虽然使用便利,但肿瘤细胞系在传代培养过程中,不可避免存在染色体、基因组甚至表型的突变或变异;另外,2D培养模式不能准确反应肿瘤细胞体内立体生长模式及肿瘤细胞与免疫细胞在体内时空上的分布特征和互作模式^[3]。对于体内动物肿瘤模型,人源的细胞系仅能接种于免疫缺陷小鼠,免疫缺陷小鼠因免疫细胞亚群缺失,无法评价某疗法对免疫系统的影响;而基于肿瘤患者肿瘤组织所建立的患者来源移植瘤(patient-derived xenograft, PDX)模型则存在制模周期较长、肿瘤样本需求量大、免疫相容性和移植成功率低^[4-5],以及肿瘤患者来源的肿瘤细胞本身的异质性、多样性和个体化特性等限制,因而免疫细胞亚群以及肿瘤微环境的复杂性在上述模型中均不能得到有效体现,故目前常规的体内外实验均不足以概括人类肿瘤的复杂生物学特征,且无法完全模拟肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)的复杂性,以及对药物反应预测的准确性并不高、肿瘤学临床试验的成功率也偏低^[6]。因此,急需构建新的具有免疫细胞和免疫功能完整的体内外组织培养模型,以便开发新的免疫疗法、解决当前治疗方案的局限性和耐药机制等问题。

类器官(organoid)是利用干细胞、成体细胞或者

肿瘤组织细胞模拟其在体内的生长环境并在体外进行3D(three-dimensional)培养得到的具有一定空间结构以及组织形态的器官样结构^[7-10]。肿瘤患者来源的类器官(patient-derived organoid, PDO)根据其培养模式的不同主要可分为两种,一种是不含免疫细胞的肿瘤细胞类器官;另一种是包含浸润免疫细胞亚群的肿瘤组织微环境类器官^[11-16]。第二种肿瘤组织类器官保留了患者肿瘤组织和癌旁组织的肿瘤微环境特征^[17],应用优势明显,如肿瘤细胞、免疫细胞和基质细胞可以完全来自同一患者、可以实现在体外增殖传代、能够较为完整地保留肿瘤的异质性,以及有利于个体新抗原的发现等^[18];还可以体外进行基因敲除、过表达、突变,甚至可进行表观遗传调控等操作而用于大规模药物和精准治疗的筛选等^[19-20],凸显其在肿瘤免疫治疗领域应用的优势^[21]。该模型体外大规模扩增后可进一步接种到实验动物如免疫缺陷小鼠或人源化小鼠体内,虽然也存在PDX模型的短板,但构建成功率、制备周期及所需资金成本均大为改善和降低^[22]。因此,PDO模型为研究免疫细胞与肿瘤细胞相互作用提供了可行方案,未来能够极大地推进和提升肿瘤免疫治疗的进程^[23-25]。本文主要聚焦包含浸润免疫细胞亚群的肿瘤组织微环境类器官,对其培养方法及应用进行梳理,并对其当前存在的问题以及未来可能的发展前景进行初步探讨,以期为该领域的研究提供参考。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.31770966;No. 31570869)

[作者简介] 罗建华(1993—),女,博士生,主要从事肿瘤免疫和免疫治疗研究。E-mail: LuojianhuaCPU@163.com

[通信作者] 刘秋燕, E-mail: liuqy@immuno.org

1 肿瘤组织微环境类器官培养模型

TME除了肿瘤细胞本身(包括休眠的肿瘤细胞、增殖/活化的肿瘤细胞及肿瘤干细胞等),还包含大量多种非肿瘤细胞成分,如基质细胞、内皮细胞、驻留或侵袭的血管结构和种类繁多的免疫细胞亚群网络^[17]。TME中各种细胞之间相互制衡决定着肿瘤的发生、进展和转移结局,是影响肿瘤免疫治疗策略是否有效的关键^[26-28]。模拟肿瘤免疫微环境以求最真实、最快速、最简单评价免疫治疗效果并从中筛选出临床可能受益的靶向人群是肿瘤免疫治疗领域亟待解决的重点和难点。此外,免疫细胞和肿瘤细胞在TME中相互作用的模式、介导肿瘤发生器官定向转移机制、调控转移微环境形成的关键细胞亚群和调控分子的筛选和鉴定亦需要可靠的体外共培养平台支撑^[28]。根据是否需要添加外源免疫细胞以及基质细胞可以将模拟TME的类器官模型分为初始TME类器官培养模型(native TME model)和重建TME类器官培养模型(reconstituted TME model)两种^[16],下面将从培养方案、特点及适用性等角度对两种模型进行介绍。

1.1 初始TME类器官培养模型

初始TME类器官培养模型的建立是基于“肿瘤组织整体培养”,即保留经消化或切碎的原始肿瘤组织中的全部细胞用于培养^[29]。其特点是培养的肿瘤细胞团块中也包含除肿瘤细胞以外的所有内源性的免疫细胞以及基质细胞。该模型目前已建立了微流控培养和气液界面培养两种培养方案^[16]。

1.1.1 微流控培养方案 微流控(microfluidic)是将微纳米级别的生物反应器和化学反应器相组合,通过精确操控流体,以实现将样品的培养、分离及检测集成在几平方厘米芯片上的科学技术^[30]。微流控类器官培养是肿瘤微球利用特殊的3D微液流培养设备(来自不同实验室的3D微液流培养设备因专利申请故有所不同,但基本原理大致一样,即利用生物树脂材料为肿瘤微球提供支架,将肿瘤微球吸附或者半流动培养在细胞培养小室,外侧通过进样管路输送培养基,小室和培养基由选择性半透膜相隔,进样管路满足控制培养基换液、添加其他细胞因子及试剂的需求),在胶原蛋白凝胶中以3D方式生长增殖,凝胶外侧充盈不同组织类器官特异性培养基,在提供营养物质带走细胞代谢废物的同时为肿瘤类器官的培养提供合适pH环境和生长压力。具体操作是将肿瘤组织消化或者切碎后的微球体与胶原蛋白混合后注入微流控中央凝胶区,培养基添加到液流管路

中^[31]。

该培养模式极大程度上保留了肿瘤组织内源性的免疫细胞亚群,有研究^[30]将具有器官特征的肿瘤细胞球体(直径为40~100 μm)和胶原蛋白凝胶一起在微流控设备中培养5~9 d后,用流式细胞术分析免疫细胞亚群谱发现,肿瘤类器官中依然留存包括B细胞、单核细胞、DC、髓源抑制性细胞和肿瘤相关巨噬细胞等多种类型免疫细胞亚群,为研究肿瘤细胞与免疫细胞相互作用提供了可能性。此外,还可以利用该类器官培养体系,向该体系的培养基中外源性地加入拟研究的靶向免疫细胞亚群,如CAR-T细胞,用以研究和探讨CAR-T对肿瘤细胞以及其他免疫细胞的影响,以评价CAR-T的抗癌效应和免疫调控机制^[32]。微流控类器官共培养体系提供可控量化的操作模式,在实现肿瘤细胞和免疫细胞各亚群共生的基础上,甚至还可以外源性建立血管膜层,增强组织免疫细胞血管相互作用,更利于研究肿瘤免疫微环境模拟真实肿瘤情况。但该培养方案需要特殊微液流装置,在应用上也受到一定程度的限制^[16,30]。

1.1.2 气液界面(air liquid interface, ALI)培养方案 ALI培养方案无需使用特殊装置,因此实用性更高。ALI培养模式的特点是将肿瘤组织包埋在含有胶原蛋白凝胶的Transwell小室中,小室放置在器皿内,器皿中加入类器官特异性培养基,培养基通过可渗透的小孔扩散到小室内,而包埋肿瘤组织的胶原蛋白凝胶层暴露在气体中,使细胞能够得到足够的氧气供应,因此称为ALI培养法^[33]。该方案在培养初期,小室和器皿都需要添加培养基,当肿瘤类器官数量扩增后,移除小室培养基,使得胶原蛋白凝胶暴露在气体中^[34]。

目前,ALI方法已经广泛用于肿瘤患者活检来源的癌组织细胞的培养,如黑色素瘤、肾细胞癌和非小细胞肺癌等。ALI肿瘤类器官不仅保留了原始肿瘤的遗传与组织学特征,还保留了TME中的肿瘤实质、间质、成纤维细胞以及多种肿瘤组织浸润的免疫细胞亚群,其中包括辅助性T细胞(helper T cell, Th)、细胞毒性T细胞(CTL)、调节性T细胞(regulatory cell, Treg)和耗竭T细胞(exhausted T cell, Tex)、B细胞、NK细胞和巨噬细胞等^[17]。有研究^[23]利用该培养模式,培养了来自71例肿瘤患者的110份活检肿瘤样本类器官,TCR组分析结果显示类器官中T细胞的TCR谱与原始肿瘤一致,证明该培养模式能够有效地模拟肿瘤微环境的体生长环境。此外,TREGUNNA等^[35]利用该培养模式评估免疫检查点(checkpoint blockade, ICB)抑制剂如派姆单抗

(pembrolizumab)的治疗效果,与临床试验结果一致,也进一步证实了该培养方案用于免疫治疗方案评估

的真实性和可行性。初始TME类器官培养模式见图1。

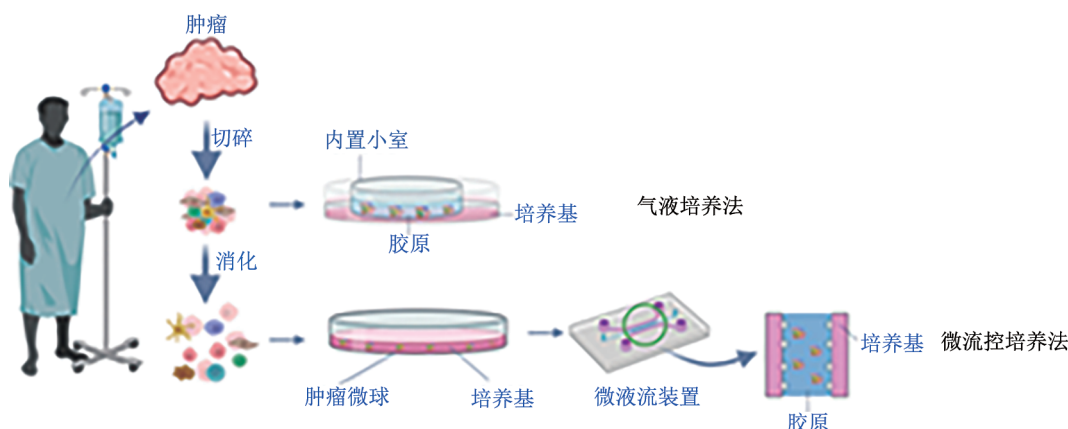


图1 初始TME类器官培养模型示意图

1.2 重建TME类器官培养模型

与上述初始TME类器官培养模型不同,重建TME类器官培养模型仅包含肿瘤细胞,缺乏基质细胞以及免疫细胞;需要外源性的添加免疫细胞如PBMC、原代淋巴细胞、TIL、CAR细胞和DC才能研究肿瘤细胞和免疫细胞的相互作用^[22]。但该培养方案操作简单,肿瘤组织类器官组成单一且易于富集培养、成功率较高^[5]。具体操作是在培养基下方的3D基质胶内培养肿瘤组织细胞,培养基根据肿瘤组织特异性补充各种生长因子或信号通路抑制剂以维持肿瘤细胞的自我更新和分化,通常包括

Wnt3a、R-spondin、EGF和骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)抑制剂Noggin等^[27,36]。通过外周血淋巴细胞与肿瘤类器官共培养可获得肿瘤反应性T细胞。该重建TME类器官培养模式较初始TME培养模式操作简单,如初始TME培养模式中的培养基既要考虑到器官特异性肿瘤组织细胞营养所需,还要添加免疫细胞存活和增殖所需的营养因子。但是,该重建TME类器官培养模式中免疫细胞会随着时间的推移逐渐丢失,即使补充了IL-2、IL-7和IL-15等细胞因子,CD45⁺淋巴细胞活力的维持时间也不会超过2个月^[16,37]。重组TME类器官培养模式见图2。

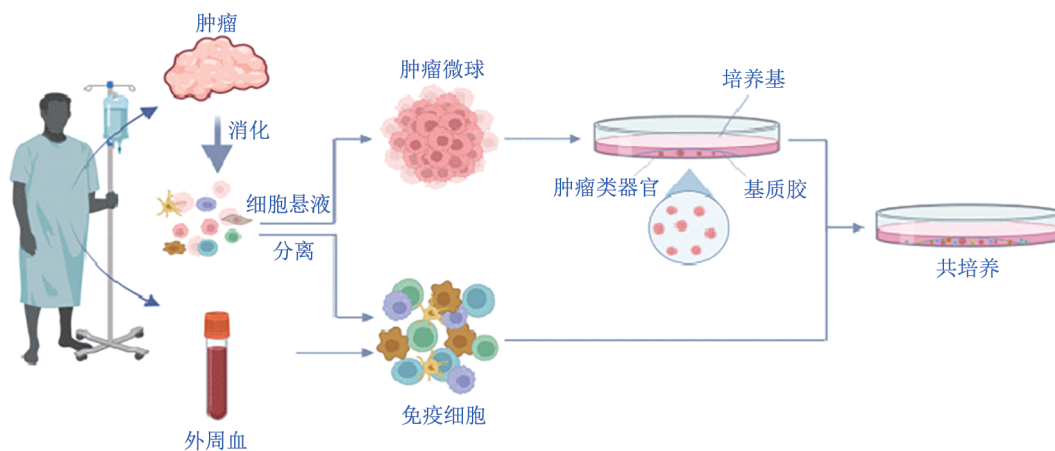


图2 重组TME类器官培养模型示意图

2 肿瘤微环境类器官在肿瘤免疫研究中的应用

随着研究的进展,患者来源的各类肿瘤组织(切除的原位癌、癌旁组织及转移瘤、活检组织、腹水及胸水等)样本均可以用于构建肿瘤组织微环境类器官^[38],当前已成功建立了前列腺癌、食管癌、肝癌、胰

腺癌、胃癌、子宫内膜癌及乳腺癌等组织的类器官培养体系,不但能够进行扩增、传代、冻存和复苏等体外操作构建类器官生物银行^[34,39],还能通过原位、皮下或静脉接种构建荷瘤实验动物模型,广泛应用于肿瘤免疫研究中^[25]。基因组学外显子测序结果^[11,19,40]表明,不同来源的肿瘤类器官均保留了原发肿瘤组织

的基因型特征,体外培养的TME类器官可以充分反映肿瘤组织的异质性,为TME类器官的基础研究和临床前应用奠定了基础。下面将从生物标志物鉴定、联合治疗策略评估及免疫治疗新方法筛选等几个方面对TME类器官在肿瘤免疫研究中的应用进行简单介绍。

2.1 用于生物标志物的鉴定

肿瘤的发生是大量突变不断累积的结果,少数导致肿瘤进展的驱动突变由于肿瘤异质性难以识别^[41]。同时建立来源于肿瘤患者的正常组织类器官和肿瘤组织类器官,其中正常组织类器官遗传信息相对稳定,适合作为研究肿瘤突变对照模型,通过比较肿瘤类器官和相应组织类器官基因表达情况即可推断出可能的驱动突变^[42]。患者对于肿瘤免疫治疗的响应存在差异,多种生物标志物包括PD-L1表达、CD8⁺TIL密度^[43]、错配修复缺陷(mismatch repair-MMR)、微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)、肿瘤负荷(tumor mutationalburden, TMB)^[44]、肿瘤新抗原表位和TCR克隆性以及免疫基因特征均有助于对患者的临床反应性进行预测^[45]。PDO模型在保留了肿瘤细胞特征的情况下,利用多组学技术可实现肿瘤标志物发掘,对寻找新的癌症预后生物标志物提供更多可能性,为肿瘤精准治疗和个体化治疗提供靶标^[46]。KONG等^[47]利用重建TME类器官方案培养原发性肝癌组织类器官,通过转录组学分析发现,EUBE2S和DTYMK等分子在肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)和C1QBP在胆管细胞癌(cholangiocarcinoma, CC)中高表达时患者预后较差;LENZ等^[48]确定了黏膜相关淋巴瘤易位蛋白1(MALT1)蛋白酶、含有半胱天冬酶募集结构域的蛋白11(CARD11)的突变与弥漫性B细胞淋巴瘤的进展高度相关。

2.2 用于免疫联合治疗策略的评估

肿瘤治疗在临床上往往选择多种免疫疗法的组合,利用多个免疫检查点(如PD-1、CTLA-4、LAG-3、TIM-3和VISTA)及免疫抑制细胞群(如Treg)的独特生物学特性联合化学疗法、放射疗法以及通过抑制血管生成治疗肿瘤^[48],而来源于患者的肿瘤类器官因具有与患者同样的基因型表型、突变潜能而成为临床前癌症治疗方法的试金石^[49]。类器官可以较为真实地反映患者体内表型、基因型和特定基因功能的特征以及组织多种生理和病理变化,为优化患者联合治疗方案制定提供了可靠的筛选平台^[2]。PAULI等^[50]利用重建TME类器官培养方案培养结直肠癌类器官,发现阿法替尼和组蛋白去乙酰化酶抑制剂联合治疗能够显著抑制肿瘤生长,疗效优于奥沙利铂

单药治疗。5-氟尿嘧啶(5-FU)、叶酸和奥沙利铂联合用药是当前转移性结直肠癌患者治疗的标准方案,而大多数患者在治疗过程中会产生继发性耐药。以往研究表明肿瘤干细胞与结直肠癌的化学耐药有关,抑制肿瘤干细胞信号通路如Wnt、Notch和Hedgehog通路可有效提高癌症患者的生存率。为了解耐药产生的潜在机制并筛选结直肠癌适用药物,USUI等^[51]构建了结直肠癌患者来源的高表达LGR5和CD44的肿瘤干细胞类器官用以研究肿瘤干细胞相关信号的抑制剂是否能够提高化疗药物的敏感性,研究结果表明,Hedgehog信号抑制剂(AY9944和GANT61)与抗癌药物联合治疗能够抑制肿瘤细胞干性、减少类器官集落生成、逆转耐药,显著提高患者疗效。

2.3 用于肿瘤特异性T细胞的制备

恶性细胞表现出足够的免疫原性是免疫治疗的先决条件,培养在基质胶中的类器官,虽然缺乏免疫组分,但可以作为抗原来源筛选肿瘤反应性T细胞^[52]。BRANDENBERG等^[53]利用ALI类器官培养模型在补充有IL-2、抗CD28和抗PD1的培养基中,通过将NSCLC患者来源肿瘤类器官与自体PBMC的共培养,筛选了对正常细胞无细胞毒作用、而能够特异性杀伤肿瘤细胞的CD8⁺T细胞^[52]。

此外,为了评估氨基双膦酸盐(aminobisphosphonate, BP)的抑癌效果,ZUMWALDE等^[54]构建BP治疗后的乳腺癌类器官,发现与未治疗组相比,V δ 2⁺T细胞在类器官中聚集增加,之后利用重建TME类器官培养模型,将患者来源的PBMC与乳腺癌类器官共培养并给予低浓度BP以刺激并扩增V δ 2⁺T细胞,将上述扩增培养的V δ 2⁺T细胞与患者新生肿瘤细胞共孵育显示,V δ 2⁺T细胞IFN- γ 分泌显著增加,细胞毒性作用显著增强,提示BP可增强V δ 2⁺T细胞的免疫监视功能及消除新生肿瘤细胞。以上结果表明,可以利用肿瘤类器官技术平台制备和扩增肿瘤特异性效应T细胞,增强机体抗肿瘤特异性免疫应答^[52]。

2.4 用于免疫治疗新方法的筛选和评估

肿瘤的异质性是肿瘤患者个体化精准治疗的重要原因。以往的研究主要是应用肿瘤细胞系在体外可无限增殖这一特点筛选癌症药物,但在传代过程中肿瘤细胞对2D环境逐渐适应和选择丢失亲本肿瘤异质性,不能评估抗肿瘤药物疗效与安全性,而PDX模型培养周期长且费用昂贵^[55]。肿瘤类器官体外突变与体细胞突变一致,能够保证与患者相同的药物敏感性,且该模型在体外能够稳定传代、大量扩增,因此可以用于高通量化疗药物的筛选,比PDX模型

更具有代表性,是预测不同患者与治疗反应性的合理工具^[56];并且来源于同一患者的肿瘤组织和正常组织都可以培养成类器官,对两者同时进行药物敏感性试验和药物毒性测试,可以筛选出特异性杀伤肿瘤细胞而对正常细胞无毒性的药物,从而减少药物产生的不良反应^[57]。

此外,在胰腺癌的治疗中,通过胰腺癌类器官筛选得到的奥沙利铂和光动力联合疗法较单一疗法相比,抗肿瘤功效显著增强,且未增加毒副作用。同样肿瘤组织类器官模型亦可应用于CAR-T以及CAR-NK细胞免疫疗法的筛选和评估^[58],SCHNALZGER等^[59]利用ALI结直肠癌类器官模型评价了靶向EGFRvIII⁺的CAR-NK92细胞对结直肠癌的抗癌效应,结果显示,该细胞能够特异性杀伤EGFRvIII⁺的结直肠癌类器官,而对正常组织细胞无杀伤活性,提示类器官-免疫细胞共培养系统可用于评估正常和肿瘤类器官中CAR介导的肿瘤特异性细胞毒性。

3 TME类器官应用存在的缺陷和限制

3.1 肿瘤免疫微环境重塑困难

免疫微环境是由细胞毒性淋巴细胞、肿瘤浸润的DC、Treg、TAM、MDSC等多种免疫细胞组成的复杂系统,肿瘤免疫微环境随时空变化一直处于动态发展中且高度异质,不同肿瘤类型以及不同个体患者之间均存在差异^[7,22,43],如何维持类器官培养过程中免疫微环境使其与在体微环境保持一致有待于进一步完善和优化^[60-61]。常用的ALI类器官培养模式维持了氧气供应及适宜氧梯度,有助于类器官生存;但ALI培养仍无法解决类器官培养免疫细胞组分维持时间短的问题^[62]。究其原因可能与基质细胞耗竭迅速,从而使肿瘤细胞-免疫细胞-基质细胞相互作用难以维持有关^[5]。

3.2 肿瘤类器官较正常上皮组织生长缓慢

在肿瘤组织类器官培养过程中,正常上皮细胞的生长速度较肿瘤细胞快,从而使其在培养环境中占据优势,进而抑制肿瘤类器官的生长发育。因此,取材时应最大程度地避免污染正常上皮细胞。此外,不同肿瘤组织来源类器官应控制不同大小。例如胶质母细胞瘤类器官应严格控制在0.5 mm以下^[43]。部分肿瘤类器官若培养体积过大会引起氧气和营养物质逐渐无法在类器官内部扩散,最终导致中心坏死,从而影响后续应用^[63-64]。

3.3 影响肿瘤类器官成功构建的因素

当前建立的较为成熟的POD模型还仅限于上皮来源的肿瘤组织,其他类型肿瘤如血液瘤尚未建立

成熟模型。肿瘤类器官构建是否成功与肿瘤组织的种类、来源、细胞生长阶段等多种因素有关^[65]。不同组织类型类器官所需培养条件不尽相同,与组织来源高度相关,培养基中生长因子或小分子抑制剂对类器官中的基因表达和信号通路、药物以及免疫治疗的敏感性有显著影响,需要进一步研究解决^[30,54,58,66-67]。不同类型肿瘤类器官构建的成功率差异显著,其中结直肠癌成功率最高,可达90%以上,卵巢癌和胰腺癌次之,可分别达到85%或75%~85%,而肝癌和前列腺癌则较低,仅有30%和15%~20%^[65,67-69]。有研究^[53]发现尚有部分类器官不能在体外长期扩增。此外,不同实验室来源的同一组织类器官的培养基组分不同,目前尚无统一的培养方案标准,因此不同取样批次以及不同实验室培养方案均有差异,需要对培养条件持续改良^[16]。另外,还存在细胞外基质胶阻碍药物渗透,进而影响类器官在药物筛选中的应用,需要研发新型细胞基质胶等问题^[69,70]。

4 总结与展望

肿瘤类器官除保留亲本肿瘤组织的基因组学和遗传学特性、异质性、传代稳定、可体外大量扩增等优点之外,还可进行基因编辑操作,避免了伦理问题^[12],因此该平台在肿瘤患者免疫联合治疗策略的评估、免疫治疗新方法的筛选及生物标志物的鉴定等方面优势明显,从而使患者个体化精准治疗成为可能。此外,液体活检来源的肿瘤类器官,取材不受肿瘤部位限制,可在肿瘤进展的不同阶段或用药前后随时动态观测,肿瘤类器官技术实现了肿瘤生长过程的可视化^[71]。类器官培养技术结合器官芯片技术,对TME多个组分进行搭配,旨在研究这种微流控系统中各组分间信息交流,对类器官的培养做到可控可重复,并在一定程度上实现类器官脉管化。结合4D成像技术能够动态监测不同细胞亚群之间的活细胞间相互作用,对于研究共培养系统中的免疫动力学尤其重要^[31]。肿瘤类器官培养结合细胞生物学以及微加工和微流体技术,构建的organ-on-chip(OoC),以及tumor-on-chip(ToC),是在微流控设备(也称为“芯片”)上培养的一类器官,其3D仿生基质中还可共同培养肿瘤细胞、基质细胞和免疫细胞^[72]。ToC技术实验成本低,未来有望实现高通量药物测试,有效区分免疫疗法应答与非应答患者,定义有效剂量与确定联合治疗方案^[30]。

综上,肿瘤类器官培养对深入了解肿瘤免疫系统、肿瘤免疫治疗具有开创性意义。相信随着该领域的研究进展,更加完善便利的类器官培养模式会

大量涌现,类器官也将成为未来基础研究和临床前研究中不可或缺的新平台。

[参考文献]

- [1] PARK J H, RIVIÈRE I, GONEN M, *et al.* Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(5): 449-459. DOI:10.1056/NEJMoa1709919.
- [2] LARKIN J, CHIARION-SILENI V, GONZALEZ R, *et al.* Five-year survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma[J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(16): 1535-1546. DOI: 10.1056/NEJMoa1910836.
- [3] SUNG P J, RAMA N, IMBACH J, *et al.* Cancer-associated fibroblasts produce netrin-1 to control cancer cell plasticity[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(14): 3651-3661. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2952.
- [4] JESPERSEN H, LINDBERG M F, DONIA M, *et al.* Clinical responses to adoptive T-cell transfer can be modeled in an autologous immune-humanized mouse model[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1-10. DOI:10.1038/s41467-017-00786-z.
- [5] TSAI S, MCOLASH L, PALEN K, *et al.* Development of primary human pancreatic cancer organoids, matched stromal and immune cells and 3D tumor microenvironment models[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 1-13. DOI:10.1186/s12885-018-4238-4.
- [6] QUAIL D F, JOYCE J A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis[J]. *Nat Med*, 2013, 19(11): 1423-1437. DOI:10.1038/nm.3394.
- [7] FUJII M, MATANO M, TOSHIMITSU K, *et al.* Human intestinal organoids maintain self-renewal capacity and cellular diversity in niche-inspired culture condition[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(6):787-793. DOI:10.1016/j.stem.2018.11.016.
- [8] SATO T, VRIES R G, SNIPPERT H J, *et al.* Single LGR5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche [J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 262-265. DOI:10.1038/nature07935.
- [9] KARTHAUS W R, IAQUINTA P J, DROST J, *et al.* Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures[J]. *Cell*, 2014, 159(1): 163-175. DOI: 10.1016/j.cell.2014.08.017.
- [10] JUNG P, SATO T, MERLOS-SUÁREZ A, *et al.* Isolation and *in vitro* expansion of human colonic stem cells[J]. *Nat Med*, 2011, 17(10): 1225-1227. DOI:10.1038/nm.2470.
- [11] HILL S J, DECKER B, ROBERTS E A, *et al.* Prediction of DNA repair inhibitor response in short-term patient-derived ovarian cancer organoids[J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(11): 1404-1421. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-0474.
- [12] KOPPER O, DE WITTE C J, LÖHMUSSEAR K, *et al.* An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity[J]. *Nat Med*, 2019, 25(5): 838-849. DOI: 10.1038/s41591-019-0422-6.
- [13] ZHANG S, IYER S, RAN H, *et al.* Genetically defined, syngeneic organoid platform for developing combination therapies for ovarian cancer[J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(2): 362-383. DOI:10.1158/2159-8290.CD-20-0455.
- [14] OGAWA J, PAO G M, SHOKHIREV M N, *et al.* Glioblastoma model using human cerebral organoids[J]. *Cell Rep*, 2018, 23(4): 1220-1229. DOI:10.1016/j.celrep.2018.03.105.
- [15] STEELE N G, CHAKRABARTI J, WANG J, *et al.* An organoid-based preclinical model of human gastric cancer[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2019, 7(1): 161-184. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2018.09.008.
- [16] YUKI K, CHENG N, NAKANO M, *et al.* Organoid models of tumor immunology[J]. *Trends Immunol*, 2020, 41(8): 652-664. DOI:10.1016/j.it.2020.06.010.
- [17] NEAL J T, LI X N, ZHU J J, *et al.* Organoid modeling of the tumor immune microenvironment[J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1972-1988. DOI: 10.1016/j.cell.2018.11.021.
- [18] XU H X, LYU X D, YI M, *et al.* Organoid technology and applications in cancer research[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 116 [2021-09-29]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30219074/>. DOI:10.1186/s13045-018-0662-9.
- [19] HUBERT C G, RIVERA M, SPANGLER L C, *et al.* A three-dimensional organoid culture system derived from human glioblastomas recapitulates the hypoxic gradients and cancer stem cell heterogeneity of tumors found in vivo[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(8): 2465-2477. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-15-2402.
- [20] DROST J, VAN BOXTEL R, BLOKZIJL F, *et al.* Use of CRISPR-modified human stem cell organoids to study the origin of mutational signatures in cancer[J]. *Science*, 2017, 358(6360): 234-238. DOI:10.1126/science.aao3130.
- [21] YE W R, LUO C, LI C L, *et al.* Organoids to study immune functions, immunological diseases and immunotherapy[J]. *Cancer Lett*, 2020, 477(2020): 31-40. DOI:10.1016/j.canlet.2020.02.027.
- [22] ZHOU Z L, VAN DER JEUGHT K, FANG Y Z, *et al.* An organoid-based screen for epigenetic inhibitors that stimulate antigen presentation and potentiate T-cell-mediated cytotoxicity[J]. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5(11): 1320-1335. DOI: 10.1038/s41551-021-00805-x.
- [23] VLACHOGIANNIS G, HEDAYAT S, VATSIOU A, *et al.* Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers[J]. *Science*, 2018, 359(6378): 920-926. DOI:10.1126/science.aao2774.
- [24] TANAKA J, MISHIMA K. *In vitro* three-dimensional culture systems of salivary glands[J]. *PatholInt*, 2020, 70(8): 493-501. DOI: 10.1111/pin.12947.
- [25] SACHS N, DE LIGT J, KOPPER O, *et al.* A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity[J]. *Cell*, 2018, 172(1/2): 373-386. DOI:10.1016/j.cell.2017.11.010.
- [26] BELTRA J C, MANNE S, ABDEL-HAKEEM M S, *et al.* Developmental relationships of four exhausted CD8⁺ T cell subsets reveals underlying transcriptional and epigenetic landscape control mechanisms[J]. *Immunity*, 2020, 52(5): 825-841. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.04.014.
- [27] BIFFI G, ONI T E, SPIELMAN B, *et al.* IL1-induced JAK/STAT signaling is antagonized by TGFβ to shape CAF heterogeneity in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(2): 282-301. DOI:10.1158/2159-8290.cd-18-0710.
- [28] D'ALTERIO C, BUONCERVELLO M, IERANÒ C, *et al.* Targeting CXCR4 potentiates anti-PD-1 efficacy modifying the tumor microenvironment and inhibiting neoplastic PD-1[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 1-13. DOI:10.1186/s13046-019-1420-8.

- [29] GARRETA E, KAMM R D, CHUVA DE SOUSA LOPES S M, *et al.* Rethinking organoid technology through bioengineering[J]. *Nat Mater*, 2021, 20(2): 145-155. DOI:10.1038/s41563-020-00804-4.
- [30] SONTHEIMER-PHELPS A, HASSELL B A, INGBER D E. Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips[J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(2): 65-81. DOI:10.1038/s41568-018-0104-6.
- [31] AO Z, CAI H W, HAVERT D J, *et al.* One-stop microfluidic assembly of human brain organoids to model prenatal cannabis exposure[J]. *Anal Chem*, 2020, 92(6): 4630-4638. DOI:10.1021/acs.analchem.0c00205.
- [32] DENG J H, WANG E S, JENKINS R W, *et al.* CDK4/6 inhibition augments antitumor immunity by enhancing T-cell activation[J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(2): 216-233. DOI:10.1158/2159-8290.CD-17-0915.
- [33] MATANO M, DATE S, SHIMOKAWA M, *et al.* Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids[J]. *Nat Med*, 2015, 21(3): 256-262. DOI: 10.1038/nm.3802.
- [34] BEUMER J, GEURTS M H, LAMERS M M, *et al.* A CRISPR/Cas9 genetically engineered organoid biobank reveals essential host factors for coronaviruses[J/OL]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5498 [2021-09-29]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34535662/>. DOI: 10.1038/s41467-021-25729-7.
- [35] TREGUNNA R. Neoadjuvant anti-CTLA4 and anti-PD-1 blockade in advanced urothelial cancer[J/OL]. *Nat Rev Urol*, 2020, 17(12): 658 [2021-09-29]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33173210/>. DOI:10.1038/s41585-020-00399-0.
- [36] LAU H C H, KRANENBURG O, XIAO H P, *et al.* Organoid models of gastrointestinal cancers in basic and translational research [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(4): 203-222. DOI: 10.1038/s41575-019-0255-2.
- [37] SEBRELL T A, HASHIMI M, SIDAR B, *et al.* A novel gastric spheroid co-culture model reveals chemokine-dependent recruitment of human dendritic cells to the gastric epithelium[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2019, 8(1): 157-171. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2019.02.010.
- [38] GUAN Y, ENEJDER A, WANG M Y, *et al.* A human multi-lineage hepatic organoid model for liver fibrosis[J/OL]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6138 [2021-09-29]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34686668/>. DOI:10.1038/s41467-021-26410-9.
- [39] CALANDRINI C, SCHUTGENS F, OKA R, *et al.* An organoid biobank for childhood kidney cancers that captures disease and tissue heterogeneity[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1-14. DOI: 10.1038/s41467-020-15155-6.
- [40] JACOB F, SALINAS R D, ZHANG D Y, *et al.* A patient-derived glioblastoma organoid model and biobank recapitulates inter- and intra-tumoral heterogeneity[J]. *Cell*, 2020, 180(1): 188-204. DOI:10.1016/j.cell.2019.11.036.
- [41] YOSHIDA T, KATES M, FUJITA K, *et al.* Predictive biomarkers for drug response in bladder cancer[J]. *Int J Urol*, 2019, 26(11): 1044-1053. DOI:10.1111/iju.14082.
- [42] LI G L, MA S, WU Q Y, *et al.* Establishment of gastric signet ring cell carcinoma organoid for the therapeutic drug testing[J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 1-8. DOI:10.1038/s41420-021-00803-7.
- [43] BOSELLO S, DE LUCA G, FERRACCIOLI G. Troponin in stable ischemic heart disease and diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(20): 1977-1978. DOI:10.1056/nejmc1511645.
- [44] LEE V, LE D T. Efficacy of PD-1 blockade in tumors with MMR deficiency[J]. *Immunotherapy*, 2016, 8(1): 1-3. DOI: 10.2217/int.15.97.
- [45] MCGRANAHAN N, FURNESS A J, ROSENTHAL R, *et al.* Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade[J]. *Science*, 2016, 351(6280): 1463-1469. DOI:10.1126/science.aaf1490.
- [46] DE JONG J O, LLAPASHTICA C, GENESTINE M, *et al.* Cortical overgrowth in a preclinical forebrain organoid model of CNTNAP2-associated autism spectrum disorder[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1-14. DOI:10.1038/s41467-021-24358-4.
- [47] KONG J, LEE H, KIM D, *et al.* Network-based machine learning in colorectal and bladder organoid models predicts anti-cancer drug efficacy in patients[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1-13. DOI: 10.1038/s41467-020-19313-8.
- [48] LENZ G, DAVIS R E, NGO V N, *et al.* Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma[J]. *Science*, 2008, 319(5870): 1676-1679. DOI:10.1126/science.1153629.
- [49] DOI T, MURO K, ISHII H, *et al.* A phase I study of the anti-CC chemokine receptor 4 antibody, mogamulizumab, in combination with nivolumab in patients with advanced or metastatic solid tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(22): 6614-6622. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-19-1090.
- [50] PAULI C, HOPKINS B D, PRANDI D, *et al.* Personalized *in vitro* and *in vivo* cancer models to guide precision medicine[J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(5): 462-477. DOI:10.1158/2159-8290.CD-16-1154.
- [51] USUI T, SAKURAI M, UMATA K, *et al.* Hedgehog signals mediate anti-cancer drug resistance in three-dimensional primary colorectal cancer organoid culture[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 1098 [2021-09-29]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29642386/>. DOI: 10.3390/ijms19041098.
- [52] DIJKSTRA K K, CATTANEO C M, WEEBER F, *et al.* Generation of tumor-reactive T cells by co-culture of peripheral blood lymphocytes and tumor organoids[J]. *Cell*, 2018, 174(6): 1586-1598. DOI:10.1016/j.cell.2018.07.009.
- [53] BRANDENBERG N, HOEHNEL S, KUTTLER F, *et al.* High-throughput automated organoid culture *via* stem-cell aggregation in microcavity arrays[J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4(9): 863-874. DOI: 10.1038/s41551-020-0565-2.
- [54] ZUMWALDE N A, HAAG J D, SHARMA D, *et al.* Analysis of immune cells from human mammary ductal epithelial organoids reveals V δ ²⁺ T cells that efficiently target breast carcinoma cells in the presence of bisphosphonate[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2016, 9(4): 305-316. DOI:10.1158/1940-6207.CAPR-15-0370-T.
- [55] RIEDL A, SCHLEDERER M, PUDELKO K, *et al.* Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT-mTOR-S6K signaling and drug responses[J]. *J Cell Sci*, 2017, 130(1): 203-218. DOI:10.1242/jcs.188102.
- [56] GANESH K, WU C, O'ROURKE K P, *et al.* A rectal cancer organoid platform to study individual responses to chemoradiation [J]. *Nat Med*, 2019, 25(10): 1607-1614. DOI:10.1038/s41591-019-0584-2.
- [57] LOONG H H F, WONG A M, CHAN D T M, *et al.* Patient-derived

- tumor organoid predicts drugs response in glioblastoma: a step forward in personalized cancer therapy? [J]. *J Clin Neurosci*, 2020, 78: 400-402. DOI:10.1016/j.jocn.2020.04.107.
- [58] SCHUSTER S J, SVOBODA J, CHONG E A, *et al*. Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(26): 2545-2554. DOI:10.1056/NEJMoa1708566.
- [59] SCHNALZGER T E, DE GROOT M H, ZHANG CC, *et al*. 3D model for CAR-mediated cytotoxicity using patient-derived colorectal cancer organoids[J/OL]. *EMBOJ*, 2019, 38(12): e100928 [2021-09-29]. <https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/embj.2018100928>. DOI: 10.15252/embj.2018100928.
- [60] BUSSLINGER G A, LISSENDORP F, FRANKEN I A, *et al*. The potential and challenges of patient-derived organoids in guiding the multimodality treatment of upper gastrointestinal malignancies [J/OL]. *Open Biol*, 2020, 10(4): 190274 [2021-09-29]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32259456/>. DOI:10.1098/rsob.190274.
- [61] WALLIN J J, BENDELL J C, FUNKE R, *et al*. Atezolizumab in combination with bevacizumab enhances antigen-specific T-cell migration in metastatic renal cell carcinoma[J]. *Nat Commun*, 2016, 7(1): 1-8. DOI:10.1038/ncomms12624.
- [62] DROST J, CLEVERS H. Organoids in cancer research[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(7): 407-418. DOI:10.1038/s41568-018-0007-6.
- [63] LAWLOR K T, VANSLAMBROUCK J M, HIGGINS J W, *et al*. Cellular extrusion bioprinting improves kidney organoid reproducibility and conformation[J]. *Nat Mater*, 2021, 20(2): 260-271. DOI:10.1038/s41563-020-00853-9.
- [64] HEIDARI-KHOEI H, ESFANDIARI F, HAJARI M A, *et al*. Organoid technology in female reproductive biomedicine[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2020, 18(1): 1-19 DOI: 10.1186/s12958-020-00621-z.
- [65] PRIOR N, INACIO P, HUCH M. Liver organoids: from basic research to therapeutic applications [J]. *Gut*, 2019, 68(12): 2228-2237. DOI:10.1136/gutjnl-2019-319256.
- [66] OOTANI A, LI X N, SANGIORGI E, *et al*. Sustained *in vitro* intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche [J]. *Nat Med*, 2009, 15(6): 701-706. DOI:10.1038/nm.1951.
- [67] WEEBER F, OOFST S N, DIJKSTRA K K, *et al*. Tumor organoids as a pre-clinical cancer model for drug discovery[J]. *Cell Chem Biol*, 2017, 24(9): 1092-1100. DOI:10.1016/j.chembiol.2017.06.012.
- [68] HOMICKO K. Organoid technology and applications in cancer immunotherapy and precision medicine[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2020, 65: 242-247. DOI:10.1016/j.copbio.2020.05.002.
- [69] TURCO M Y, GARDNER L, HUGHES J, *et al*. Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium[J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(5): 568-577. DOI:10.1038/ncb3516.
- [70] HEGDE P S, CHEN D S. Top 10 challenges in cancer immunotherapy[J]. *Immunity*, 2020, 52(1): 17-35. DOI:10.1016/j.immuni.2019.12.011.
- [71] EGUCHI T. Organoids and liquid biopsy in oral cancer research[J/OL]. *J Clin Med*, 2020, 9(11): 3701 [2021-09-29]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33218071/>. DOI:10.3390/jcm9113701.
- [72] PAGGI C A, TEIXEIRA L M, LE GAC S, *et al*. Joint-on-chip platforms: entering a new era of *in vitro* models for arthritis[J/OL]. *Nat Rev Rheumatol*, 2022: 1-15[2021-09-29]. <https://www.nature.com/articles/s41584-021-00736-6>. DOI: 10.1038/s41584-021-00736-6.

[收稿日期] 2021-09-29

[修回日期] 2022-02-05

[本文编辑] 阮芳铭