

Organoïden als in-vitromodel: mini-organen in het laboratorium

Organoids as an in vitro model: mini-organs in the lab

drs. E. Driehuis,^{1,2} prof. dr. H. Clevers^{1,2,3}

SAMENVATTING

Het groeien van organoïden, driedimensionale (3D) structuren gekweekt vanuit adulte, embryonale of geïnduceerde pluripotente stamcellen (respectievelijk ASC's, ESC's of iPSC's), wordt steeds meer toegepast in wetenschappelijk onderzoek. Organoïden behouden zowel structurele als functionele eigenschappen van het orgaan waaruit ze zijn gekweekt en kunnen worden gegroeid uit vele verschillende organen, gezond of ziek. Deze kweekmethode biedt de mogelijkheid om functies van weefsels van individuele patiënten te onderzoeken in het laboratorium. Daarom kan dit model, dat kan worden gezien als 'missing link' tussen 2D-cellijnen en proefdiermodellen, een brug slaan tussen fundamenteel laboratoriumonderzoek en de behandeling van patiënten. Voor deze toepassing zijn vooral ASC-organoïden geschikt. Organoïden gegroeid vanuit patiëntenweefsel in het laboratorium lijken te voorspellen of de patiënt gaat reageren op bepaalde medicijnen. Dit is reeds aangetoond voor cystische fibrose, terwijl een groeiend aantal studies ook toepassing bij oncologische patiënten ondersteunt. Zo laat recent werk zien dat geneesmiddelgevoeligheid van tumor-organoïden in het laboratorium overeenkomt met de respons van de tumor in de kliniek. Dit gegeven impliceert dat organoïden een waardevolle rol kunnen spelen bij 'personalized' kankerbehandeling.

In dit artikel geven wij een overzicht wat organoïden zijn, welke toepassingen ze hebben en hoe deze techniek – in onze ogen – kan bijdragen aan het oncologisch onderzoek.

(NED TIJDSCHR ONCOL 2018;15:244-51)

SUMMARY

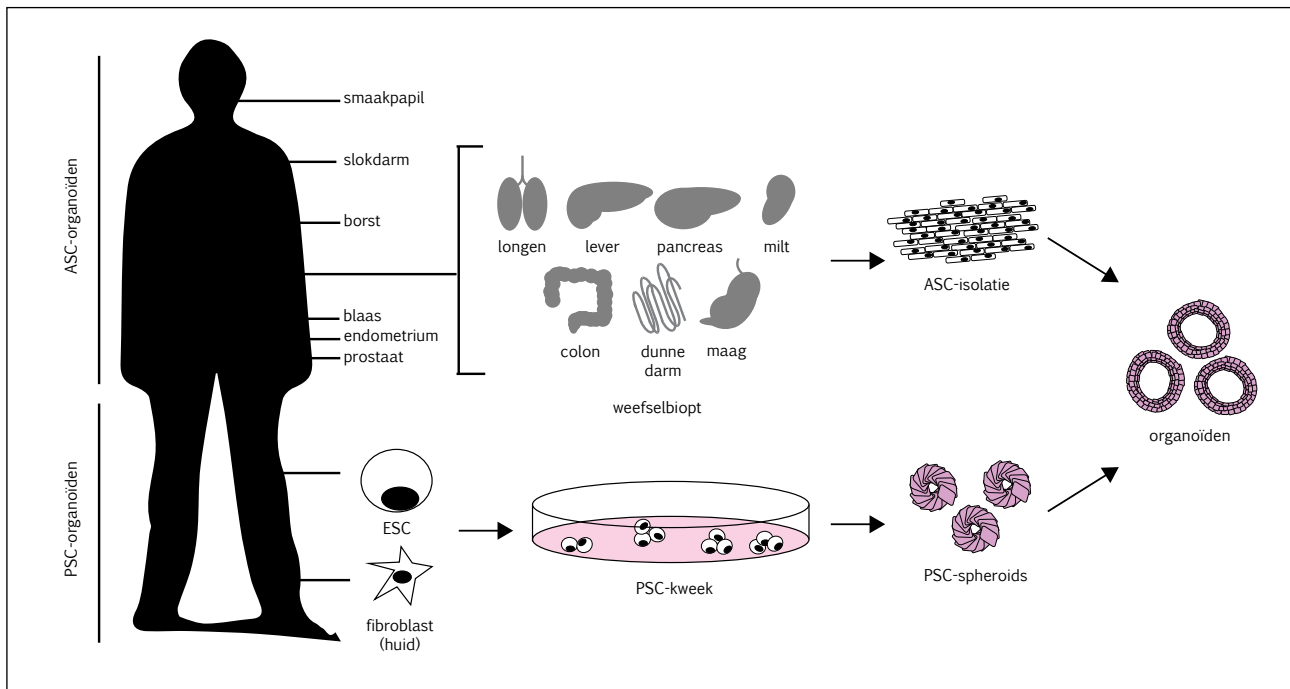
Organoids, three-dimensional (3D) structures cultured from adult, embryonal or induced pluripotent stem cells (ASCs, ESCs or iPSCs), have become widely used in scientific research. These structures, that retain both functional and structural characteristics of the tissue of origin, can nowadays be established from many different tissues, diseased or healthy. This type of culture allows for the study of patient-specific tissues and their function in the lab. Organoids, especially ASC-derived organoids, also hold great potential for clinical application. First, patient-derived organoids have been shown to predict patient response. This has been proven for cystic fibrosis and appears to hold for cancer as well. Recent publications reveal a correlation between the drug response of tumor-organoids and the tumor response in the clinic. This suggests that organoids hold great potential for personalized medicine. In this article, we would like to provide an overview of what organoids are, how they can be used, and how – in our opinion – they might contribute to oncology research.

¹Oncode Instituut, Hubrecht Instituut, Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen (KNAW), Utrecht, ²Universitair Medisch Centrum (UMC) Utrecht, ³Prinses Maxima Centrum, Utrecht. H. Clevers is hoogleraar Moleculaire Genetica aan de Universiteit Utrecht en arts, groepsleider bij het Hubrecht Instituut en bestuurslid van het Prinses Maxima Centrum voor Kinderoncologie. E. Driehuis is Master of Science en promovenda in de groep van H. Clevers, werkzaam in het Hubrecht Instituut (KNAW). Correspondentie graag richten aan mw. dr. E. Driehuis, Hubrecht Instituut, Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, tel.: 06 20 87 91 55, e-mailadres: e.driehuis@hubrecht.eu

Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: geen gemeld.

Trefwoorden: organoïden, 'personalized medicine', stamcel

Keywords: organoids, personalized medicine, stem cell



FIGUUR 1. Organoïden kunnen worden gekweekt uit ASC's en PSC's. ASC-organoïden kunnen direct vanuit weefsel worden gekweekt, maar ook vanuit specifieke celpopulaties (bijvoorbeeld Lgr5-positieve stamcellen uit de darm), die bijvoorbeeld door middel van het sorteren van cellen worden verkregen. Na isolatie worden de cellen in Matrigel of BME opgenomen en gegroeid op media met - afhankelijk van het celtype - een specifieke combinatie van groeifactoren. PSC-organoïden kunnen zowel vanuit ESC's als iPSC's worden gegroeid. De laatste kunnen bijvoorbeeld worden gemaakt vanuit huidfibroblasten, zoals aangegeven in dit figuur. Afhankelijk van het differentiatieprotocol dat wordt toegepast, kunnen de stamcellen naar verschillende celtypen differentiëren. Figuur aangepast vanuit referentie 57.

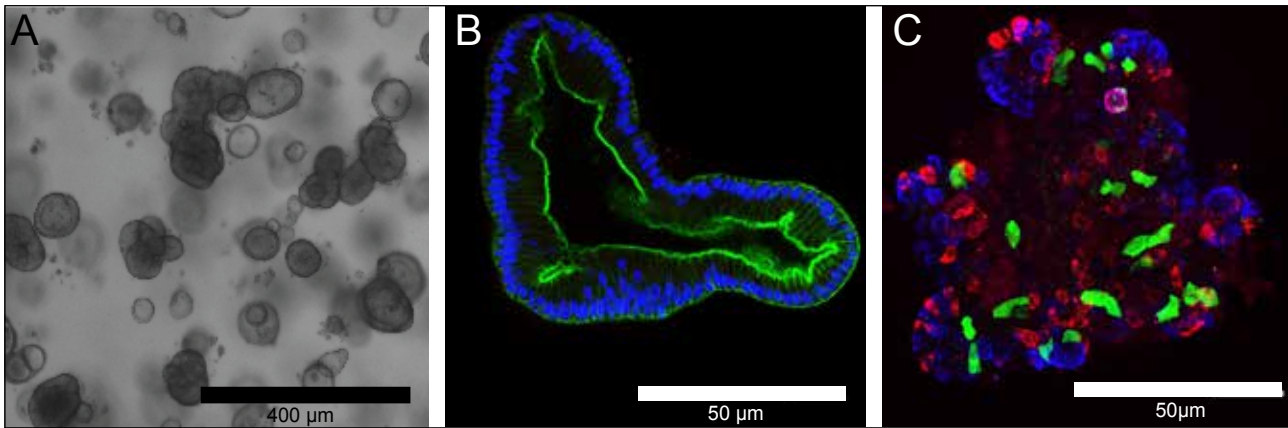
ASC=adulte stamcel, PSC=pluripotente stamcel, ESC=embryonale stamcel.

STAMCELLEN

Er bestaan twee soorten stamcellen. Pluripotente stamcellen (PSC's) bestaan in de natuur slechts kortstondig na de bevruchting en kunnen alle celtypen van het menselijk lichaam maken. Deze natuurlijke PSC's kunnen uit een vroeg embryo worden geïsoleerd en onder gedefinieerde kweekcondities vrijwel oneindig worden geëxpandeerd in het laboratorium als zogenoemde 'embryonale stamcellen'.¹ Shinya Yamanaka liet in 2006 zien dat een relatief simpele genetische manipulatie van huidcellen van volwassenen een synthetische versie van deze PSC's kan genereren. Yamanaka noemde deze stamcellen 'induced pluripotent stem cells', oftewel iPS-cellen.² Adulte stamcellen (ASC's) zijn gespecialiseerd en kunnen slechts de celtypen produceren van het orgaan waarin ze resideren. Ze zijn orgaanspecifiek en komen in vrijwel al onze organen voor. Daar zijn ze een leven lang verantwoordelijk voor het in stand houden van 'hun' orgaan: ze vervangen door middel van celdeling alle cellen die verloren gaan door bijvoorbeeld slijtage of ziekte. Er bestaan vele tientallen typen ASC's. Vele daarvan moeten nog worden ontdekt.

ORGANOÏDEN

Organoïden, hier gedefinieerd als driedimensionale, zelf-organiserende structuren gegroeid vanuit stamcellen, stellen wetenschappers in staat orgaanstructuur en -functie te bestuderen in kweek.³⁻⁵ Tien jaar geleden rapporteerden Sasai en collega's dat PSC's in een petrischaal onder de juiste condities uitgroeiden tot 3D-hersensstructuren.⁶ Rond dezelfde tijd lieten Sato et al. in het Hubrecht Instituut zien dat organoïden ook kunnen worden gemaakt vanuit het darmepitheel van een volwassen muis. Deze structuren werden opgegroeid uit ASC's en bleken alle celtypen te bevatten die in het darmepitheel van de muis voorkomen.⁷ Sindsdien heeft dit onderzoeksveld zich razendsnel ontwikkeld. Organoïden kunnen worden opgedeeld in twee groepen: organoïden gegroeid vanuit PSC's en die gegroeid vanuit ASC's. Organoïden gekweekt uit PSC's kunnen alle celtypen van alle kiemlagen bevatten. PSC-organoïden zijn onder andere beschreven voor de hersenen, retina, schildklier, nier, darm, maag, long en lever.⁸⁻¹⁴ Welk celtype deze structuren uiteindelijk bevatten, is afhankelijk van het differentiatieprotocol waaraan de cellen worden blootgesteld en



FIGUUR 2. Humane darmorganoïden. **A.** Humane darmorganoïden zoals gezien door een lichtmicroscop. De epitheelcellen groeien onder deze condities uit tot ronde structuren die bestaan uit vele cellen. Deze structuren noemen we organoïden. **B.** Humane darmorganoïden, aangekleurd met behulp van immunofluorescentie voor de celkern (DAPI, in blauw), actine-filamenten (F-actin, in groen). **C.** Muizendarmorganoïden, aangekleurd met behulp van immunofluorescentie voor de volgende celtype-specifieke markers: hormoonproducerende cellen (chromogranin A, in rood), tuftcellen (Dclk1, in groen), panethcellen (lysozym, in blauw). μm =micrometer.

welk orgaan men beoogd na te bootsen in vitro. Aangezien organoïden kunnen worden gekweekt uit humane cellen, bieden PSC-organoïden de unieke mogelijkheid om de embryonale ontwikkeling van een (deel van) een orgaan na te bootsen in vitro.

Organoïden gekweekt uit ASC's bevatten alleen epitheelcellen van het orgaan van origine van de gebruikte ASC's. Dit komt doordat epitheliale ASC's bij deling enkel epitheelcellen kunnen genereren, in tegenstelling tot ESC's of iPSC's. Organoïden afkomstig van ASC's zijn beschreven voor de darm, maag, speekselklier, slokdarm, pancreas, lever, borst, long, prostaat, smaakpapil, ovarium en blaas (zie *Figuur 1*).^{7,15-26} ASC-organoïden zijn zeer geschikt om weefsel-specifieke stamcellenplasticiteit te onderzoeken en – met het oog op 'personalized medicine' – waardevol om tumormateriaal van patiënten in kweek te expanderen.

Organoïden lijken, meer dan conventionele 2D-cellijnen, op het orgaan waaruit ze zijn gekweekt. Ten eerste zijn organoïden, met hun 3D-organisatie en de meerdere celtypen die ze kunnen bevatten, een betere weerspiegeling van de structuur van het in-vivo-orgaan. *Figuur 2* laat zien hoe darmorganoïden er door de lichtmicroscop uitzien en hoe men verschillende celtypen in deze structuren kan visualiseren. Ten tweede kunnen deze structuren langdurig groeien zonder genetische of fenotypische verandering. Dit was tot dusver onmogelijk: klassieke 2D-cellijnen hebben altijd een immortalisatiestap nodig (lees maligne ontaarding). Om deze redenen kunnen mini-orgaantjes als de 'missing link' tussen 2D-cellijnen en proefdiermodellen worden gezien.

ORGANOÏDEN IN HET ONCOLOGISCH ONDERZOEK

In dit artikel wordt de bijdrage van organoïden aan fundamenteel onderzoek besproken. Daarna wordt ingegaan op de potentie van de kweektechniek voor translationeel en klinisch oncologisch onderzoek. Omdat juist ASC-organoïden geschikt zijn voor deze twee toepassingen, zal de rest van dit artikel zich richten op dit type organoïden. Dit betekent echter niet dat PSC-organoïden ons niet meer kunnen leren over het ontstaan of behandelen van kanker. Zo hebben Crespo en collega's recentelijk iPSC-organoïden gekweekt van patiënten met familiale adenomateuze polyposis. Deze organoïden gedroegen zich anders dan dezelfde structuren, maar dan gegroeid uit weefsel van gezonde controles.²⁷ Vervolgens werden deze mini-organen gebruikt om te zoeken naar medicijnen die dit verschil konden corrigeren.

GENETISCHE MODIFICATIE VAN MINI-ORGANEN

Organoïden kunnen genetisch worden gemodificeerd om zo het effect van oncogene mutaties te onderzoeken. Voor genetische modificatie wordt met name CRISPR/CAS9 gebruikt, van origine een bacterieel verdedigingsmechanisme tegen virussen, dat is aangepast om het genoom van eukaryote cellen te modificeren. Met behulp van deze techniek kan op elke plek in het genoom iedere gewenste genetische verandering worden geïntroduceerd.^{28,29} Eén jaar na de introductie van deze techniek werd gedemonstreerd dat CRISPR/CAS9 ook in organoïden kan worden toegepast.³⁰ Sindsdien zijn veel studies gepubliceerd die aangeven dat de combinatie

van deze twee technieken veel waardevolle inzichten geeft. Zo lieten twee studies uit 2016 zien dat met CRISPR achter-eenvolgens vier veelvoorkomende oncogene mutaties konden worden geïntroduceerd in gezonde, humane colon-organoiden, waardoor het proces van carcinogenese in vitro werd nagebootst.^{31,32} Volgens het 'Vogelgram' werden één voor één de meest beschreven mutaties geïntroduceerd: een activerende mutatie in *KRAS* en vervolgens inactiverende mutaties in respectievelijk *APC*, *TP53* en *SMAD4*.³³ Zoals verwacht resulteerde de introductie van deze genetische veranderingen erin dat de cellen zich als tumorcellen gingen gedragen. Zo werden ze genetisch instabiel, expandeerden onafhankelijk van groeifactoren (resultierend in ongeremde groei) en ontstonden tumoren na transplantatie in muizen. Bovendien lieten deze tumoren verschillende gradaties van kwaadaardigheid zien, afhankelijk van welke mutaties waren geïntroduceerd. Doordat de mutaties één voor één werden geïntroduceerd in de darm-organoiden, kon het effect van individuele mutaties worden bestudeerd. Een bijkomend voordeel is dat de onderzoeker op deze manier bepaalt wanneer een oncogene genetische verandering wordt geïntroduceerd, waardoor ook de kortetermijneffecten van de verandering kunnen worden beschreven.

Ook andere toepassingen van CRISPR in organoiden zijn gerapporteerd. Zo is CRISPR/CAS9 gebruikt om het effect van 'tumor growth factor- β ' (TGF- β)-signalering op tumorprogressie in sereuze en tubulaire poliepen te onderzoeken.³⁴ De auteurs van dit werk wilden onderzoeken of TGF- β een andere rol had bij tubulaire dan bij sereuze poliepen. Aangezien het kweken van sereuze poliepen niet succesvol bleek, gebruikten de onderzoekers CRISPR om een veelvoorkomende activerende mutatie in *BRAF* (*V600E*) te introduceren in gezonde cellen. Aangezien sereuze poliepen altijd *BRAF*-mutaties bevatten, werd op deze manier een in-vitro-model voor dit type poliepen gecreëerd.^{35,36} Als model voor tubulaire poliepen werden biopten van deze laesies in kweek gebracht. Vervolgens werden de cellen geïncubeerd met TGF- β en werd gezien dat de groei van tubulaire poliep-cellen werd geremd, terwijl de *BRAF*-gemuteerde cellen juist bleken te gaan groeien in de aanwezigheid van TGF- β .

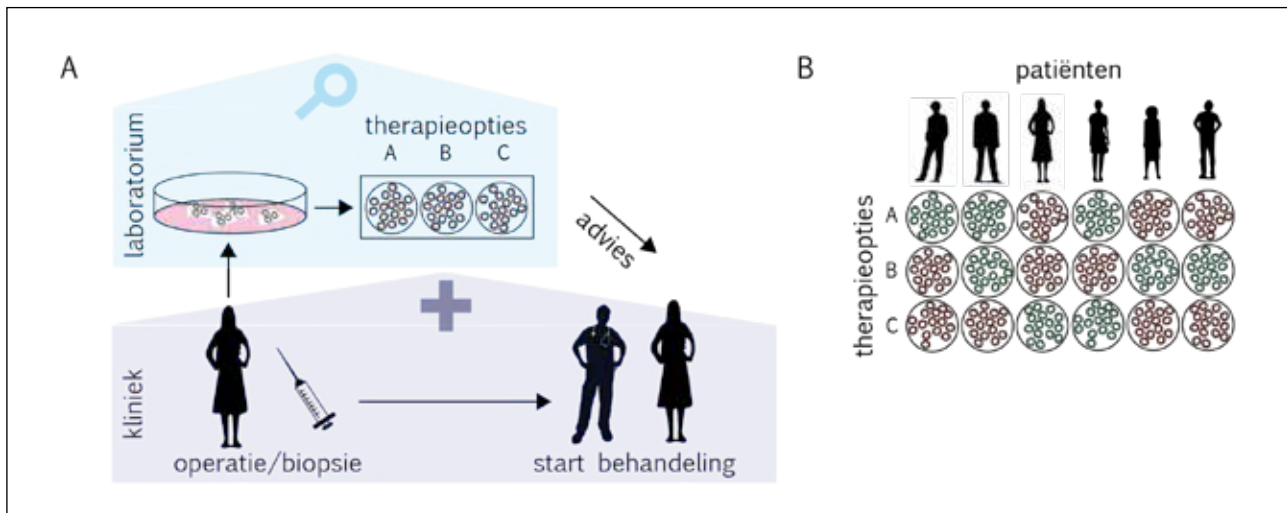
HET ONTRAFELN VAN TUMORHETEROGENEITEIT

Het groeien van organoiden geeft de mogelijkheid om elke individuele (stam)cel uit een tumor te expanderen tot een klonale lijn die vervolgens kan worden gekarakteriseerd. Op deze manier kunnen organoiden worden gebruikt om tumorheterogeniteit te bestuderen, zoals in een zeer recente publicatie over drie verschillende darmtumoren.³⁷ In deze studie werden van klonale organoïdlijnen het genoom gese-

quenced en de mutatiestatus vastgesteld. Daarnaast werd van elke lijn de gevoeligheid voor verschillende chemotherapeutica bepaald. Uit dit werk kwam naar voren dat er grote verschillen bestaan in mutatiestatus en therapiegevoeligheid, niet alleen tussen de tumoren, maar met name ook tussen verschillende (stam)cellen binnen dezelfde tumor. Als ontvullende observatie werd gerapporteerd dat in elke geteste tumor, voor elk getest darmkanker geneesmiddel, al cellen aanwezig waren die resistent zijn tegen dit middel. Deze aanpak biedt de mogelijkheid om de biologische veranderingen onderliggend aan deze heterogeniteit te ontrafelen en de resistente cellen nader te bestuderen in het laboratorium. Een dergelijke aanpak was niet mogelijk geweest met 2D-cellijnen, aangezien de efficiëntie van het opzetten van cellijnen vanuit een tumor zeer laag is. Dit werk illustreert hoe organoiden onderzoekers de mogelijkheid geven nieuwe onderzoeksvragen te stellen die voordat deze technologie was ontwikkeld niet konden worden beantwoord.

ORGANOÏDEN IN EEN LEVENDE BIOBANK

In de afgelopen jaren is het aantal organoïd-biobanken sterk toegenomen. Een dergelijke biobank bevat een verzameling genetisch en/of functioneel gekarakteriseerde organoïd-lijnen met daaraan gekoppelde medische en/of genetische gegevens van de donoren. Er zijn organoïd-biobanken van slokdarm-, maag-, lever-, darm-, borst-, endometrium-, pancreas- en blaaskanker, en biobanken van metastasen van colon-, prostaat- en borsttumoren.^{26,38-50} Om dergelijke organoïden te kweken, kan gebruik worden gemaakt van tumorresectiemateriaal, biopten of 'circulating tumor cells'. Met een dergelijke biobank kan een scala aan interessante vragen worden beantwoord. Zo kan bijvoorbeeld het verband tussen genetische heterogeniteit en geneesmiddelrespons worden onderzocht. Een recent gepubliceerde studie heeft laten zien dat de respons van mammacarcinoom-organoiden op bepaalde medicijnen kon worden gekoppeld aan onderliggende genetische veranderingen. Zo kon bijvoorbeeld gevoeligheid van organoiden voor de PARP-remmer niraparib worden gecorreleerd aan de aanwezigheid van *BRCA*-mutaties in deze cellen. Bovendien werd in deze studie gedemonstreerd dat de gevoeligheid van de gekweekte tumorcellen voor het medicijn behouden blijft na transplantatie in muizen. Bovendien werd gevonden dat in de drie gevallen waarbij klinische respons kon worden vergeleken met de in-vitro-organoïdrespons, deze twee met elkaar correleerden.⁴⁵ Een pancreas-biobank, die begin dit jaar werd gepubliceerd, werd gebruikt om het groeiedrag van de cellen in het laboratorium te relateren aan genetische veranderingen.⁴⁷ Zo bleek dat organoïd-lijnen met bepaalde mutaties konden groeien in afwezigheid van WNT-ligand, een groei-



FIGUUR 3. Organoïden en hun toepassingen in de oncologie. **A.** Organoïden kunnen worden gekweekt vanuit tumorweefsel (verkregen vanuit resectiemateriaal of een biopsie). Na expansie kunnen hierop verschillende medicijnen worden getest. Indien wordt aangetoond dat organoïden een voorspellende waarde hebben, zou de arts deze respons in de toekomst kunnen meenemen bij de keuze voor een behandelingschema voor de individuele patiënt. **B.** In de toekomst is het denkbaar dat een scala van therapieën wordt getest op organoïden gekweekt vanuit het tumormateriaal van elke individuele patiënt om zo voor elke patiënt de juiste therapie te selecteren. Op deze manier kunnen organoïden bijdragen aan 'personalized medicine'.

factor die noodzakelijk is om organoïden uit normaal pancreasweefsel te laten groeien. WNT-signalen zijn essentieel voor veel stamcellen om te voorkomen dat ze differentiëren en daarmee hun stamcelcapaciteit verliezen. De wetenschappers ontdekten dat sommige tumor-organoïden niet zonder externe, aan de kweek toegevoegde, WNT-signalen konden doorgroeien, maar dat andere organoïd-lijnen 'zelfvoorzienend' waren geworden. Hier kan een parallel worden getrokken met darmtumoren, die vaak een APC-mutatie bevatten en daardoor ook onafhankelijk worden van WNT-signalen. Een andere belangrijke conclusie was dat het gedrag van de organoïden in kweek voorspellend was voor de prognose van de patiënt.

ORGANOÏDEN ALS VOORSPELLER VAN KLINISCHE RESPONS

Het kweken van organoïden geeft wetenschappers de mogelijkheid patiëntmateriaal in het laboratorium op te kweken en te onderzoeken. Zo kan men in het laboratorium het effect van vele verschillende medicijnen op de cellen van de patiënt testen, om zo te onderzoeken welk middel het beste werkt alvorens een behandeling te starten. Inmiddels is voor cystische fibrose (CF) aangetoond dat de in-vitro-reactie van de organoïden op een medicijn voorspellend blijkt voor de klinische respons.⁵¹ In de Nederlandse registratie van het nieuwe CF-middel Orkambi® is opgenomen dat iedere patiënt met een positieve organoïd-test dit geneesmiddel vergoed krijgt. Organoïden lijken ook bij oncologische patiën-

ten een voorspellende waarde te hebben: Vlachogiannis en collega's zetten organoïden op vanuit 110 biopsies, waarbij in een klein aantal van deze werd laten zien dat de organoïden gekweekt uit een gemetastaseerde colorectale tumor dezelfde respons lieten zien als de patiënt in de kliniek, die met hetzelfde medicijn werd behandeld.⁵² Dit onderzoek impliceert dat organoïden, ook bij het behandelen van tumoren, een voorspellende waarde hebben en mogelijk in de toekomst kunnen bijdragen aan 'personalized medicine' (zie *Figuur 3*). Daarnaast kan de kweekmethode mogelijk worden gebruikt voor het vinden van geneesmiddelen voor patiënten die resistent blijken tegen standaardtherapie.

ORGANOÏDEN-STUDIES IN DE NEDERLANDSE ONCOLOGIE

In Nederland zijn inmiddels twee protocollen vergelijkbaar met de studie van Vlachogiannis et al.⁵² In de TUMOROID-studie (NL49002.031.14) worden patiënten met een gemetastaseerd coloncarcinoom, mammacarcinoom of niet-kleincellig longcarcinoom gevraagd een metastasebiopsie af te staan voor aanvang van de behandeling.⁵³ De therapie die de patiënt vervolgens krijgt, wordt in het laboratorium ook getest op de uit de metastase gekweekte organoïden. Op deze manier kan een inschatting worden gemaakt van de voorspellende waarde van organoïden in deze klinische setting.⁵³ Verder is sinds maart 2018 de OPTIC-studie (NL61668.041.17) open, waarbij biopsies van patiënten met gemetastaseerd colorectaal carcinoom voor start van de eer-

ste lijn worden opgegroeid en op eenzelfde manier een vergelijking wordt gemaakt tussen de respons van de organoïden en die van de patiënt. Ook de OPTIC-studie wordt uitgevoerd om het voorspellend vermogen van organoïden in een klinische setting te valideren, maar een verschil met de TUMOROID-studie is dat deze studie zich voornamelijk richt op eerstelijnspatiënten.

Naar ons weten zijn dit de enige klinische studies die op dit moment in Nederland open zijn om de voorspellende waarde van organoïden te valideren. Wel is er op het moment een aantal klinische studies waarbij de DNA-mutatiestatus van de patiënt wordt gekoppeld aan respons op de ingezette therapie. Deze studies (zoals de DRUP en CPCT) zijn potentieel uit te breiden met het kweken van organoïden om de voorspellende waarde van gedetecteerde mutaties te vergelijken met die van de organoïden.

Tot slot wordt er een studie vergelijkbaar met de hierboven genoemde studies opgezet, gecoördineerd vanuit het UMC Utrecht, waarbij de therapierespons van patiënten met plaveiselcelcarcinomen in het hoofd-halsgebied wordt bestudeerd. Voorafgaand aan de behandeling zullen organoïden worden opgegroeid uit bipten of resectiemateriaal, die vervolgens in het laboratorium worden blootgesteld aan de therapie die de patiënt in de kliniek krijgt (cisplatine, carboplatine of anti-EGFR-antilichaam cetuximab, gecombineerd met radiotherapie). Het doel van deze studie is te bepalen of organoïden de respons van de patiënt kunnen voorspellen, om zo bij te dragen aan 'personalized medicine'. Dit is een interessante studie, omdat op dit moment voor deze tumoren geen goede biomarkers bestaan om patiëntenrespons te voorspellen, voorafgaand aan therapie.

DE TOEKOMST VAN ORGANOÏDEN: KRITISCHE KANTTEKENINGEN

Het kweken van organoïden kent ook beperkingen. Zo worden de structuren gegroeid in een gel die rijk is aan extracellulaire matrixeiwitten, zoals 'basement membrane extract' (BME), ook wel matrigel genoemd. In deze omgeving kunnen de organoïden groeien als 3D-structuren, waarbij deze gel als in vitro basale lamina fungeert. Bovendien worden organoïden gekweekt in medium, waaraan groeifactoren worden toegevoegd (welke precies hangt af van het weefsel dat wordt gegroeid). Deze gel en groeifactoren zijn duur, waardoor het groeien van organoïden veel kostbaarder is dan van 'klassieke' 2D-cellijnen. Het is belangrijk om te beseffen dat de kweekcondities van de organoïden invloed kunnen hebben op het gedrag van de cellen. Zo worden organoïden veelal gegroeid in de aanwezigheid van een hoge concentratie EGF. Wanneer EGF-remmers worden getest, heeft de EGF-concentratie directe invloed op de gemeten

IC50. Overigens bevat serum, een standaardcomponent van het medium waarin 2D-cellijnen worden gegroeid, dergelijke groeifactoren ook in hoge concentraties.

Afhankelijk van het weefsel waaruit ze zijn ontstaan, groeien organoïden langzamer dan 2D-cellijnen, waardoor experimenten langer kunnen duren. Deze groeisnelheid is met het oog op 'personalized medicine' zeker relevant. Indien organoïden in de toekomst worden gebruikt om de juiste therapie voor een patiënt te selecteren, is de benodigde tijd om genoeg materiaal op te kweken essentieel, aangezien men zo snel mogelijk wil starten met de behandeling.

Ondanks dat organoïden kunnen worden gegroeid uit vele verschillende tumor- en weefseltypen, is de efficiëntie van het opzetten van een lijn verschillend per tumortype en varieert tussen 30 en 90%. Ondanks dat deze efficiëntie hoger is dan bij cellijnen, waar deze eerder in de orde is van 0,1 tot 1%, is dit een belangrijke kanttekening, zeker als men denkt aan een toepassing van organoïden in 'personalized medicine'. Deze efficiëntie of 'take-rate' is onder andere afhankelijk van de hoeveelheid weefsel, het type weefsel, behandeling van de patiënt en vermenging met gezond of necrotisch weefsel.

Organoïden gegroeid uit bipten of resectiemateriaal ontstaan uit (kanker)stamcellen die aanwezig zijn in dit weefsel. Het is bijvoorbeeld in de studie van Seino et al. aangetoond dat niet elke tumorcel onder gestandaardiseerde condities zal uitgroeien.⁴⁷ Hierdoor is het mogelijk dat een dergelijke heterogeniteit die bij het in kweek brengen van tumorweefsel wel aanwezig is, verloren gaat doordat bepaalde tumorcelklonen snel uitgroeien onder de gebruikte kweekcondities. Daarnaast is het mogelijk dat het weefselbiopt niet representatief is voor de gehele tumor. Dit betekent dat de organoïd-lijn dit dan ook niet zal zijn. Wel zijn er kwaliteitschecks te bedenken, zoals bijvoorbeeld het valideren van veelvoorkomende mutaties voorafgaand aan verdere analyse, die dit kunnen inkaderen. Voest en collega's hebben overigens laten zien dat gekweekte colorectaal tumororganoïden de oorspronkelijke tumorheterogeniteit goed blijven representeren.⁴⁴

Een andere belangrijke en al reeds genoemde kanttekening is dat ASC-organoïden enkel bestaan uit epitheelcellen. Dit betekent in het geval van carcinomen dat automatisch wordt verrijkt voor tumorcellen, terwijl immuuncellen, endotheelcellen en fibroblasten verdwijnen. Dit is een voordeel voor het in kaart brengen van het kankergenoom, waarbij kankerdrijvende mutaties in 100% van de cellen kunnen worden gedetecteerd, doordat 'verontreiniging' met fibroblasten, immuuncellen en eventuele andere tumor-infiltrerende cellen verdwijnt. Indien de onderzoeksvraag gaat over de interactie van de tumorcellen met niet-epitheliale cellen, zijn organoïden niet het juiste model. Mogelijk kunnen 'co-cultures,' waarbij de organoïden in vitro worden gecombineerd met

AANWIJZINGEN VOOR DE PRAKTIJK

- 1** Organoïden zijn 3D-structuren die sterk lijken op het orgaan of de tumor van oorsprong. Ze worden gekweekt vanuit stamcellen en maken laboratoriumstudies mogelijk.
- 2** Organoïden kunnen gegroeid worden uit patiëntenweefsel (zowel gezond als tumor) en behouden genetische, morfologische en functionele eigenschappen van het weefsel van oorsprong. Dit biedt de mogelijkheid de cellen van individuele patiënten te onderzoeken in het laboratorium.
- 3** Organoïden houden de belofte in van 'personalized medicine': het kiezen van de juiste therapie voor de individuele patiënt.

andere celtypen (bijvoorbeeld immuuncellen of endotheelcellen), hier een uitkomst bieden. Dergelijke 'co-cultures' zijn reeds beschreven.⁵⁴⁻⁵⁶

CONCLUSIE

Organoïden zijn zelf-organiserende structuren gegroeid vanuit stamcellen die kunnen worden gebruikt om organen te modelleren in het laboratorium. Het groeien van zulke 'mini-orgaan-tjes' geeft onderzoekers de mogelijkheid om biologische vragen over de pathofysiologie en therapie van kanker te beantwoorden. Bovendien laten steeds meer studies zien dat de respons van organoïden gegroeid uit patiëntenmateriaal voorspellend is voor de respons van de patiënt. Daarom kan deze methode in de toekomst op bredere schaal voor 'personalized medicine' worden ingezet. Voor sommige toepassingen zal een aantal beperkingen van deze techniek, zoals hierboven genoemd, eerst moeten worden overwonnen. In de afgelopen jaren zijn de eerste studies van start gegaan om dit voorspellend vermogen van organoïden aan te tonen in de kliniek.

DANKWOORD

Wij willen Yorick Post, Fjodor Yousef Yengej en Frans Schutgens bedanken voor het kritisch doorlezen van dit manuscript. We willen Joep Beumer bedanken voor *Figuur 1*. We willen Jeanine Roodhart bedanken voor haar input omtrent klinische studies met organoïden.

REFERENTIES

1. Thomson JA. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282(5391):1145-7.
2. Takahashi K, et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126(4):663-76.
3. Kretschmar K, et al. Organoids: modeling development and the stem cell niche in a dish. *Dev Cell* 2016;38(6):590-600.
4. Eiraku M, et al. Mouse embryonic stem cell culture for generation of three-dimensional retinal and cortical tissues. *Nat Protoc* 2012;7(1):69-79.
5. Lancaster M, et al. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 2014;345:1247125.
6. Eiraku M, et al. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell* 2008;3(5):519-32.
7. Sato T, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009;459(7244):262-5.
8. Dye BR, et al. In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *Elife* 2015;4:e05098.
9. Lancaster MA, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 2013;501(1):373-9.
10. Longmire TA, et al. Efficient derivation of purified lung and thyroid progenitors from embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2012;10(4):398-411.
11. McCracken KW, et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature* 2014;516(7531):400-4.
12. Spence JR, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* 2011;470(7332):105-9.
13. Takasato M, et al. Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney. *Nat Cell Biol* 2014;16(1):118-26.
14. Takebe T, et al. Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nat Protoc* 2014;9(2):396-409.
15. Barker N, et al. Lgr5+ve stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell* 2010;6(1):25-36.
16. DeWard AD, et al. Cellular heterogeneity in the mouse esophagus implicates the presence of a nonquiescent epithelial stem cell population. *Cell Rep* 2014;9(2):701-11.
17. Huch M, et al. Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. *EMBO J* 2013;32(20):2708-21.
18. Huch M, et al. In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 2013;494(7436):247-50.
19. Karthaus WR, et al. Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures. *Cell* 2014;159(1):163-75.
20. Kessler M, et al. The Notch and Wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids. *Nat Commun* 2015;6.
21. Linnemann JR, et al. Quantification of regenerative potential in primary human mammary epithelial cells. *Development* 2015;142:1-13.
22. Nanduri LSY, et al. Purification and ex vivo expansion of fully functional salivary gland organoids. *Nat Protoc* 2014;9(2):396-409.

- vary gland stem cells. *Stem Cell Reports* 2014;3(6):957-64.
23. Ren W, et al. Single Lgr5- or Lgr6-expressing taste stem/progenitor cells generate taste bud cells ex vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(46):16401-6.
24. Rock JR, et al. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(31):12771-5.
25. Tadokoro T, et al. IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;1-9.
26. Lee SH, et al. Tumor evolution and drug response in patient-derived organoid models of bladder cancer. *Cell* 2018;173(2):515-528.e17.
27. Crespo M, et al. Colonic organoids derived from human induced pluripotent stem cells for modeling colorectal cancer and drug testing. *Nat Med* 2017;23(7):878-84.
28. Gasiunas G, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109(39):2579-86.
29. Jinek M, et al. A Programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity 2012;337:816-22.
30. Schwank G, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* 2013;13(6):653-8.
31. Drost J, et al. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature* 2015;521(7550):43-7.
32. Matano M, et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat Med* 2015;21(3):256-62.
33. Fearon ER, et al. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
34. Fessler E, et al. TGF β signaling directs serrated adenomas to the mesenchymal colorectal cancer subtype. *EMBO Mol Med* 2016;8(7):e201606184.
35. Chan TL, et al. BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas. *Cancer Res* 2003;63(16):4878-81.
36. Snover DC. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2011;42(1):1-10.
37. Roerink SF, et al. Intra-tumour diversification in colorectal cancer at the single-cell level. *Nature* 2018;556(7702):457-62.
38. Sato T, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 2011;141(5):1762-72.
39. Seidlitz T, et al. Human gastric cancer modelling using organoids. *Gut* 2018 Apr 27 [Epub ahead of print].
40. Bartfeld S, et al. In vitro expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection. *Gastroenterology* 2015;148(1):126-136.e6.
41. Broutier L, et al. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat Med* 2017;23(12):1424-35.
42. Van de Wetering M, et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell* 2015;161(4):933-45.
43. Fujii M, et al. A colorectal tumor organoid library demonstrates progressive loss of niche factor requirements during tumorigenesis. *Cell Stem Cell* 2016;18(6):827-38.
44. Weeber F, et al. Preserved genetic diversity in organoids cultured from biopsies of human colorectal cancer metastases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112(43):13308-11.
45. Sachs N, et al. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity. *Cell* 2018;172(1-2):373-86.e10.
46. Turco MY, et al. Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium. *Nat Cell Biol* 2017;19(5):568-77.
47. Seino T, et al. Human pancreatic tumor organoids reveal loss of stem cell niche factor dependence during disease progression. *Cell Stem Cell* 2018;22(3):454-67.e6.
48. Boj SF, et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell* 2015;160(1-2):324-38.
49. Gao D, et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell* 2014;159(1):176-87.
50. Drost J, et al. Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. *Nat Protoc* 2016;11(2):347-58.
51. Dekkers JF, et al. A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *J Cyst Fibros* 2012;11(7):S32.
52. Vlachogiannis G, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science* (80-) 2018;926:920-6.
53. Weeber F, et al. Tumor organoids as a pre-clinical cancer model for drug discovery. *Cell Chem Biol* 2017;24:1092-100.
54. Nozaki K, et al. Co-culture with intestinal epithelial organoids allows efficient expansion and motility analysis of intraepithelial lymphocytes. *J Gastroenterol* 2016;51(3):206-13.
55. Lindemans CA, et al. Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature* 2015;528(7583):560-4.
56. Ibiza S, et al. Glial-cell-derived neuroregulators control type 3 innate lymphoid cells and gut defence. *Nature* 2016;535(7612):440-3.
57. Driehuis E, et al. CRISPR/Cas 9 genome editing and its applications in organoids. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 2017;312(3):G257-65.

ONTVANGEN 21 JUNI 2018, GEACCEPTEERD 1 AUGUSTUS 2018.