

Fejlődésbiológia

## Humán bélszövet őssejtekből

Az Ohio állambeli Cincinnati gyermekkórházának fejlődésbiológiai laboratóriumában pluripotens őssejtek irányított differenciálódása útján növesztettek háromdimenziós felépítésében és sejtösszetételében a magzati bélhez hasonló humán szövetet *in vitro*. Az „organoidban” intesztinális őssejtek, abszorpció és szekretorikus tulajdonságok jelentek meg. A kutatási célokra ideális humán modellrendszernek terápiás alkalmazása is lehet.

*Nature, 2011. február*

Korábban is szimulálták már laboratóriumban a humán embrionális őssejtek differenciálódásának egy-egy részfolyamatát. Például pluripotens őssejtekből egyrétegű hepatocita-, illetve endokrin hasnyálmirigysejt tenyészeteket alakítottak ki, s azokat májbetegség, illetve diabetes állatmodelljében terápiás célra is használhatónak találták. A szervek bonyolult háromdimenziós szerkezetének kialakítása egyelőre túl nagy feladat a „transzlációs kutatások” számára, de a Cincinnati Gyermekkórház fejlődésbiológiai laboratóriumában sikerült természetes szervezdemény utánzó háromdimenziós „organoidot” létrehozni pluripotens őssejtekből.

A bél epitéliuma a definitív endodermának nevezett egyszerű sejtlemezből származik. Az első lépés ennek létrehozása volt a transzformáló növekedési faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) családba tartozó aktivin A segítségével. A definitív endoderma akkor őrizte meg differenciációs plaszticitását, azaz akkor volt képes mind az előbél, mind az utóbél kialakítására, ha a tenyészetet 3 napig (és nem tovább) kezelték aktivin A-val. A továbbiakban a WNT3A és FGF4 jelmolekulákkal specifikálták az utóbél irányú differenciálódást. Amikor ezek a molekulák együtt és nagy koncentrációban voltak

jelen, 48 óra múltán megjelent a CDX2 utóbélmarker. A 48 órás kezelés még nem volt elég, de a 96 órás FGF4 + WNT3A expozíció már elég volt ahhoz, hogy stabil maradjon a CDX2-expresszió és az előbél markereinek hiánya. A kezelés 2. és 5. napja között a lapos sejtlemezekből „szferoidok” képződtek. Ezek egyöntetűen polarizált epitéliumból álltak, amelyet mezenchima vett körül, előbélsejtek nem voltak bennük. A megfigyelések azt igazolják, hogy az utóbél fejlődése során az FGF4 a mezoderma expanszióját és a morfogenezist serkenti, és a két jelmolekula szinergizmusára van szükség az utóbél specifikálásához. Kétféle humán embrionális őssejtből és négyféle indukált pluripotens őssejtből sikerült ilyen szferoidokat nyerni.

A szervszerű struktúrák fejlődésének ésérésének *in vitro* reprodukálása terén még kevés a tapasztalat. A szerzők az utóbél jellegű szferoidokat egy nemrégiben kidolgozott háromdimenziós tenyésztőközegbe helyezték, ahol azok a bél magzati fejlődéséhez hasonló lépésekben intesztinális „organoidokká” fejlődtek. Az első 14 napban a szferoidok kuboid epitéliuma expandált, majd a 28. napra oszlopos elrendeződésű lett, és boholszerű képletek jelentek meg rajta, amelyek benyúltak az organoid

lumenébe. A szferoidok és organoidok tenyésztése során 72 000-szeres sejtmeg-növekedést értek el, a keletkezett organoidok szinte mind intesztinális jellegűek voltak.

A markerek elemzése azt mutatta, hogy 14 napi tenyésztés után szinte az egész epitélium exprimálta a CDX2, KLF5 és SOX9 intesztinális transzkripció faktorokat, és intenzíven proliferált. A 28. napon az SOX9 expressziója már a bélboholszerű kitüremkedések alapján levő osztódó sejtekre lokalizálódott. Az 56 napig tenyésztett organoidok LGR5- és ASCL2-expressziójából ítélve az epitéliumban proliferatív domének képződtek, bennük újonnan kialakult intesztinális őssejtekkel. A tenyésztés 18. és 28. napja között kefeszegélyes kolumnáris epitélium alakult ki, és immunfluoreszcens, illetve kvantitatív PCR módszerrel kimutatható volt a bél valamennyi fontos sejtvonala. A 28. napon a kefeszegély transzmissziós elektronmikroszkóppal megkülönböztethetetlen volt az érett bélben láthatótól. Az enterocitáknak működőképes peptidtranszport rendszerük volt: felszívták a fluoreszcens jelöléssel ellátott dipeptidet. Az epitélium 15%-ban tartalmazott MUC2<sup>+</sup> kehelysejteket (amelyek nyákot választottak el az organoid lumenébe), 18%-ban lizozimpozitív sejteket (a Paneth-sejtek jellegzetességeivel) és 1%-ban kromogranin A-t exprimáló enteroendokrin sejteket. A száznál többször passzált organoidokban az egyes sejt típusok érése is megfigyelhető volt. Az organoidok mezenchimális sejtrétege az epitéliummal együtt az embrionális fejlődésnek megfelelő lépésekben alakult ki az aktivin A hatására

megjelent 2%-nyi mezoderális sejt-ből. A 14 napos organoidok exprimáltak a mezenchima markereit (FOXF1, vimentin). Más markerekből, markerkombinációkból szubepiteliális miofibroblasztok, majd a 28. naptól simaizomsejtek és fibroblasztok jelenlétére lehetett következtetni.

A humán veleszületett fejlődési rendellenességek molekuláris alapjaira sokszor modellszervezeteken végzett funkcionális vizsgálatok világítanak rá. Pl. a neurogenin 3 génjének szerepét az intesztinális enteroendokrin sejtek veleszületett hiányának kialakulásában eddig csak egéren tudták vizsgálni. A szerzők 28 napos organoidokban adenovírus mediálta transzdukcióval fokozott *NEUROG3*-expressziót váltottak ki. Hét nap elteltével a fertő-

zött organoidokban ötször annyi kromogranin A<sup>+</sup> sejt volt, mint a kontroll organoidokban: a *NEUROG3*-expresszió elégséges feltétele volt a sejtek enteroendokrin irányú elköteleződésének. Amikor az endogén *NEUROG3* gént rövid hajtű (sh) RNS-t exprimáló lentivirus vektorral hatásaltalanították, az enteroendokrin sejtek száma 90%-kal csökkent. A *NEUROG3* részleges funkcióvesztést okozó mutációi tehát jelentős csökkenést okozhatnak a neuroendokrin sejtek számában.

A cikk elsőként demonstrálja, hogy humán pluripotens őssejtek *in vitro*, jó hatásfokkal olyan humán szövet képzésére bírhatók, amelynek háromdimenziós architektúrája és sejtösszetétele a magzati béléhez hasonlít. *In vitro* érése során az őssejtekből származó

magzati bélszövet intesztinális őssejteket képez, abszorpciós és szekretorikus tulajdonságokra tesz szert. A rendszer megkönnyítheti a veleszületett bélfejlődési rendellenességek kialakulásának vizsgálatát, és az így nyert bélszövet alkalmas lehet pl. a nekrotizáló enterocolitis, a gyulladássos bélbetegségek és a rövid bél szindrómák transzplantációs kezelésére. A humán bél mint modellrendszer bizonyára fontos eszköz lesz az intesztinális őssejtek kutatásában és az abszorpció, a biológiai hozzáférhetőség javítását célzó gyógyszerfejlesztésben.

*Írásunk az alábbi közlemény alapján készült:*

- Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*. *Nature* 2011;470(7332): 105–109