

腸管上皮幹細胞

佐藤 俊 朗

腸管上皮は3~4日ごとに再生を繰り返すダイナミックな組織である。その原動力となっている細胞が腸管上皮幹細胞であり、永続的な自己複製能と全ての腸管上皮細胞への分化能を有する。近年、Lgr5が腸管上皮幹細胞に発現していることがわかり、その自己複製メカニズムが解明されてきた。Lgr5幹細胞はWntシグナル、Notchシグナル、BMPシグナルにより制御されており、この制御機構の理解が腸管上皮幹細胞培養技術につながった。つまり、幹細胞維持因子を全て同定することにより、体外で腸管上皮幹細胞を維持することが可能になった。さらに、こうした幹細胞維持因子の発現から、幹細胞が維持される場“ニッチ”について新しい知見が出てきた。また、腸管上皮幹細胞はがん化とともに自律的な増殖能を獲得していくが、腫瘍化した上皮幹細胞はどの程度“ニッチ”を必要としているのだろうか？ 本稿では、腸管上皮幹細胞の同定、制御機構、培養法確立を基に最新の知見を概説する。

1. はじめに

腸管上皮は人体において、外界との接触面積が最も広い組織である。これは栄養素や水分の吸収機能を最大限に発揮するためであると思われる。同時に、消化管上皮は細菌やウイルスに対する最前線となっており、粘液分泌や抗菌物質の産生を介して外敵の侵入を阻止している。また、口側の内容物を効率良く消化し、肛側に運搬するために、神経・内分泌機構による腸管の消化液分泌、腸管運動調節が行われている。これら全ての腸管機能は主に4種類の分化細胞[吸収上皮細胞(消化吸収機能)、杯細胞(粘液産生)、内分泌細胞(内分泌)、パネート細胞(抗菌作用)]により担われている。腸管上皮は絨毛と呼ばれる腸管内腔に突出した分化細胞からなる組織構造と、主に未分化細胞からなる陰窩の二つのコンパートメントに分けられる。分化細胞のうち、パネート細胞のみが陰窩底部に局在し、その他の分化細胞は分化とともに陰窩から絨毛に移動していく。多

彩な機能を持つ腸管上皮細胞であるが、これら全ての腸管上皮細胞は腸管上皮幹細胞から生み出されている。腸管上皮幹細胞は一生を通じて自己複製し続けるとともに、全ての腸管上皮細胞への分化能を持つ細胞と定義されており、陰窩底部に存在すると考えられている。

2. 20世紀の腸管上皮幹細胞研究

消化管上皮幹細胞研究は1948年にLeblondらのオートラジオグラフィーを利用したパルスチェイス法による一連の研究に端を発する。Leblondはさらに詳細な研究から1974年に腸管上皮幹細胞の存在を予測し、一元説を提唱した¹⁾。放射性物質は未分化増殖細胞のみを標識するが、数日後には4種類の腸管上皮細胞、吸収上皮細胞、杯細胞、パネート細胞、内分泌細胞の全ての種類が標識されることから、全ての腸管上皮細胞は幹細胞から由来するという説である。当時、4種類の腸管上皮細胞の由来は諸説あったため、Leblondの報告により初めて腸管上皮幹細胞の存在が唱えられたことになる。また、彼は幹細胞の場所をパネート細胞間にあるCrypt Columnar Cell (CBC細胞)であることを提唱し、この説はLeblondの弟子であるChengとBjerknesにより支持されてきた(図1)。

一方、Pottenはパネート細胞の直上で、陰窩底部から4番目の細胞(+4細胞)にDNA標識が長期間にわたり留

慶應義塾大学医学部消化器内科 (〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35)

Intestinal stem cells

Toshiro Sato (Department of Gastroenterology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku, Tokyo 160-8582, Japan)

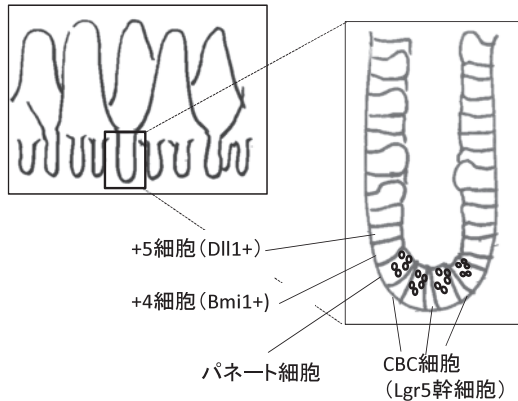


図1 腸管上皮と腸管上皮幹細胞

まることから (LRC: label retaining cells), +4 細胞が幹細胞であると唱えた (図1)。他の組織幹細胞においても, 真の幹細胞は細胞周期が非常に遅い, あるいは静止期にあると考えられており, 細胞分裂により DNA 標識が薄まらない LRCこそが真の幹細胞であるという考え方が主流であった。幹細胞の分裂回数を制限することにより, 幹細胞の DNA 複製に伴う変異の蓄積, また, テロメア短縮による細胞老化を効率的に防ぐという考え方は合理的であり, その後, LRC は造血幹細胞, 神経幹細胞, 皮膚上皮幹細胞においても幹細胞マーカーと考えられるようになった。LRC の幹細胞機能を調べる方法がなかったため +4 細胞は 1980 年代から “推定的な” 幹細胞でありながら, ほとんどの研究者はこの細胞を腸管上皮幹細胞であると考えようになった。

幹細胞の機能解析は最近になるまで不可能であった。DNA メチル化パターンや PAS の染色性によって検出される *O*-アセチルトランスフェラーゼの変異は非常に低い頻度で腸管上皮細胞を遺伝学的に標識しているため細胞の追跡標識マーカーとして使うことができる。これらの標識は陰窩一絨毛軸全ての細胞を置き換えるため, 機能的な幹細胞の存在が示唆された。Bjerknes は変異原である *N*-nitroso-*N*-ethylurea (NEU) を用い, ランダムに *Dlb-1* 遺伝子座に変異を与えた。このまれな変異をもった細胞は特定のレクチンによる染色性を獲得する。この技術により, 腸管において初めて細胞系譜追跡 (lineage tracing) が行われた²⁾。しかしながら, 変異は *Dlb-1* のみならず, 多数の他の遺伝子にも変異が入っていると考えられ, また, 変異の導入効率が極めて低いため, 陰窩一絨毛軸全ての細胞が染色されるようなクローンは得られなかった。いずれの方法も幹細胞の存在を示唆することはできたが, 具体的にどの細胞がクローンを産み出しているか (つまり, どの腸管上皮細胞が幹細胞であるか) をはっきりと示すことはできなかった。

3. 腸管上皮幹細胞の新世代研究

2007 年に, Barker らはマウスの消化管において, CBC 細胞に *Lgr5* という Wnt 標的遺伝子が特異的に発現していることを見いだした³⁾。さらに, *Lgr5*-EGFP-ires-CreER ノックインマウスを作製し, *Rosa*-Cre レポーターマウスと交配させることにより, *Lgr5* 陽性細胞の娘細胞の細胞系譜追跡を行った。その結果, *Lgr5* 陽性細胞が 1 年以上にわたって, 娘細胞を産生し, 4 種類の細胞に分化していることがわかり, CBC 細胞が腸管上皮幹細胞であることを証明した。腸管上皮幹細胞の同定は, 消化管上皮幹細胞研究のブレークスルーとなった。Sangiorgi らは同様の実験手法を用い, +4 細胞に主に発現する *Bmi1* の遺伝学的細胞系譜解析を行った。その結果, +4 細胞にも長期自己複製能と多分化能を持つことを報告した⁴⁾ (図1)。

CBC 細胞と +4 細胞の双方が幹細胞なのか, また, どちらが上流の幹細胞であるか, 活発に議論されている。*Lgr5* と *Bmi1* は双方ともに発現量が低いため, 免疫組織化学的または *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現局在の解析が困難であった。*Lgr5* は EGFP のノックインレポーターにより, その局在がわかっていたが, *Bmi1* については不明であった。最近, 1 分子の mRNA をも検出する高感度 *in situ* ハイブリダイゼーション技術が開発され, これらの腸管上皮幹細胞マーカー遺伝子の局在が明らかにされた⁵⁾。その結果, *Lgr5* はノックインレポーターの発現と一致し, CBC 細胞に局在していた。一方, *Bmi1* は陰窩底部に幅広く発現しており, +4 に局在しているとする従来の *in situ* ハイブリダイゼーションの結果とは異なった。さらに Munoz らは, Sangiorgi らの *Bmi1*-CreER マウスを用いて細胞系譜追跡実験を再試したところ, 全系統分化する一部のクローンを認めるものの, 大部分の娘細胞は, 短期間で消失する分化細胞であることがわかった。*Bmi1* は *Lgr5*+ 細胞にも発現していることを考え併せると, *Bmi1* の遺伝学的細胞系譜解析の結果は *Lgr5*+*Bmi1*+ 細胞による可能性が考えられる。Tian らは *Lgr5* 発現細胞特異的にジフテリア毒素受容体 (DTR) を発現させた *Lgr5*-DTR ノックインマウスを作製し, ジフテリア毒素により *Lgr5*+ 幹細胞を除去した後に *Bmi1* の細胞系譜追跡を行った。その結果, *Lgr5* 幹細胞を除去しても *Bmi1* 陽性細胞が幹細胞として働くことが報告され, *Bmi1*+ 細胞は *Lgr5*+ 細胞のバックアップとして, *Lgr5*+ 陽性細胞が傷害された時に幹細胞機能が高まることが報告された⁶⁾。ただし, ジフテリア毒素がどの程度効率的に *Lgr5*+ 幹細胞を除去することができるかさらなる検証が必要であり, *Bmi1*+ 幹細胞と *Lgr5*+ 幹細胞の関係が今後より一層明らかになっていくであろう (図2)。

さらに最近, 陰窩底部から数えて 5 番目の +5 細胞に発

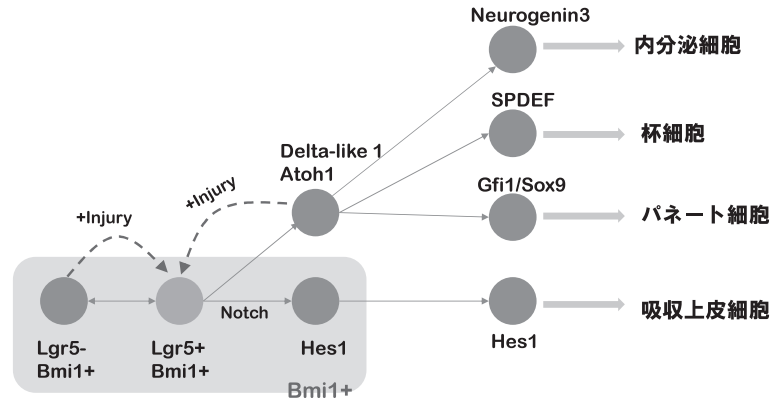


図2 腸管上皮細胞の細胞系譜

現する Dll1 (Notch シグナルの受容体, 後述) に着目し, Dll1-EGFP-ires-CreER マウスが作製された⁷⁾. このマウスを Cre レポーターマウスと交配し, +5 細胞の細胞系譜解析が行われた. Dll1+ 細胞は一過性に増殖し, 分泌系細胞への分化が観察されたが, Lgr5-EGFP-ires-CreER マウスで観察されたような幹細胞クローンは認められなかった. このことから, Dll1+ 細胞は長期間自己複製能, 全系統への分化能のいずれも有しておらず, 幹細胞でないことが示された. しかしながら, 本マウスに対して放射線照射を行い, 細胞系譜解析を行ったところ, 幹細胞クローンが観察されるようになり, 放射線により Lgr5+ 細胞が除去された場合, 非幹細胞である Dll1+ 細胞が幹細胞に脱分化することが見いだされた. 本研究から, 幹細胞ヒエラルキーはある程度の可塑性を許容し, 幹細胞が除去された場合, 前駆細胞が脱分化することにより幹細胞を補うことがわかった (図2).

4. 腸管上皮幹細胞の自己複製メカニズム

腸管上皮幹細胞自己複製の分子メカニズムは, 遺伝子変異マウスの解析から浮き彫りにされてきた. 家族性大腸腺腫症の原因遺伝子となっている APC は Wnt シグナルに対する抑制因子であることがわかっている. マウスにおける APC 遺伝子の腸管上皮選択的な機能欠失ではヒトと同様に腺腫形成が観察され, 逆に Wnt の阻害タンパク質である Dkk1 を腸管上皮に過剰発現した場合は腸管上皮の著しい増殖抑制がみられるため⁸⁾, Wnt シグナルが腸管上皮細胞の増殖制御に深く結びついていることがわかっている. また, R-spondin1 を腹腔内投与されたマウスでは腸管上皮の過剰な増殖と Wnt シグナルの著明な活性化を認めることから, R-spondin が腸管上皮における Wnt 活性化に重要な役割を担っていることが示唆されてきた⁹⁾. 最近, R-spondin が幹細胞マーカーである Lgr5 のリガンドであることが示され, Wnt とその受容体である Frizzled/Lrp の結合とともに, R-spondin/Lgr の結合が腸管上皮における Wnt

活性化, さらには幹細胞維持に必須であることがわかった¹⁰⁾. さらに, E3 ユビキチンリガーゼである RNF43 は幹細胞特異的に発現し, Frizzled 受容体の分解を制御していることがわかった. RNF43 は Wnt 標的遺伝子であるが, Wnt の過剰な活性化を防ぐための負のフィードバック機構として機能している. RNF43 とそのホモログである ZNRF3 を腸管上皮細胞特異的にノックアウトしたマウスでは, Wnt シグナルの過剰な活性化のため, 腺腫を形成することが報告された¹¹⁾. このように, Wnt シグナルは腸管上皮幹細胞の自己複製において最も重要な増殖因子であり, その不活性化は幹細胞の消失に, 過剰な活性化は幹細胞の異常増殖 (腺腫形成) につながるようになってきた (図3).

Wnt 以外にも幹細胞の自己複製に重要な働きを示す分子があり, Notch シグナルの活性化は恐らく, Wnt に次いで重要な因子であろう. Notch シグナルはそのリガンドである Notch リガンドにより活性化され, Notch の細胞質内ドメイン (NICD) が切断され, 核内移行する. NICD は RBP-jk とともに Hes1 などの標的遺伝子を活性化させる. Hes1 は分泌系細胞分化因子である Atoh1 を抑制し, 分泌系細胞への分化を抑制している. このことは Atoh1 ノックアウトマウスで分泌系細胞が消失すること¹²⁾, 反対に RBP-jk ノックアウトマウスや Notch の NICD 切断を抑制する γ セクレターゼ阻害薬の投与により吸収上皮細胞への分化が消失することから裏付けられる¹³⁾.

BMP シグナルも腸管上皮幹細胞制御において重要な役割を担っている. BMP 阻害タンパク質である Noggin を腸管上皮に遺伝子導入したマウスや *Bmpr1a* をノックアウトしたマウスでは腸管上皮幹細胞の増殖や異所性の陰窩形成などが観察された^{14,15)}. また, *Bmpr1a* やその下流シグナルである *Smad4* は若年性ポリポーシスの責任遺伝子ともなっており, BMP シグナルの分化誘導作用と幹細胞機能抑制作用が病態とも関連していることがわかってきた.

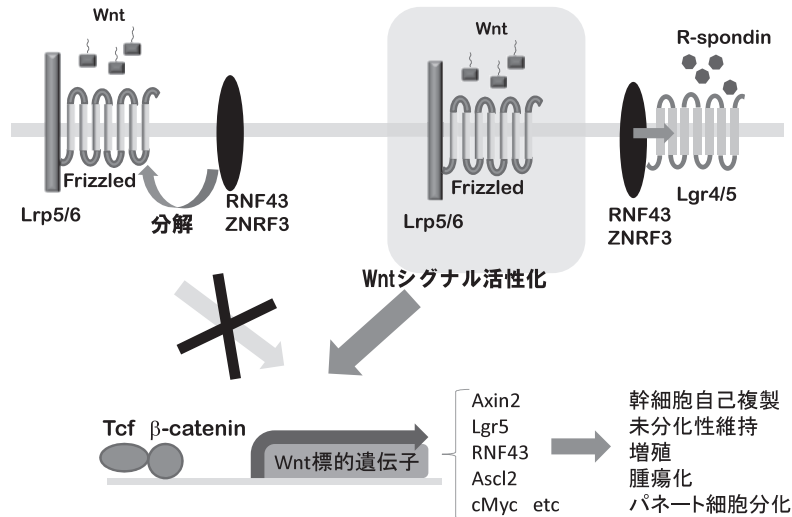


図3 腸管上皮における Wnt 活性化機構

5. 腸管上皮幹細胞の体外での培養

腸管上皮幹細胞の自己複製を明確に実証するためには、腸管上皮幹細胞を培養する技術が必要となる。筆者らは遺伝子改変動物の *in vivo* データを基に、増殖因子をスクリーニングし、新しい腸管上皮幹細胞培養を確立した。本培養法では Wnt シグナル活性化に必要な R-spondin, 腸管上皮細胞の増殖因子である上皮増殖因子 (EGF), 幹細胞分化抑制に重要な骨形成タンパク質 (BMP) 阻害タンパク質である Noggin の 3 因子が長期間の腸管上皮幹細胞の維持、増殖に必須であった。また、生体内の陰窩と同様に腸管上皮細胞は基底膜と接触している必要があり、腸管上皮細胞は基底膜成分を模倣した細胞外基質、マトリジェル内で効率的に培養できた。培養された腸管上皮細胞は生体内と同様に、幹細胞の自己複製と全ての分化細胞を産生し、絨毛-陰窩構造を擬似化した 3 次元組織構造体 (オルガノイド) を形成する¹⁶⁾。本法は単一の腸管上皮幹細胞から培養することや、凍結保存、ウイルスベクターによる遺伝子操作などが可能であり、その生体内細胞との相同性の高さから、細胞株に変わる新しい研究ツールとなっている (図 3)。

最近、オルガノイド培養技術はマウス小腸のみならず、マウス胃、大腸、ヒトの小腸、大腸にも応用され、種を問わず、様々な臓器由来組織を培養できることがわかってきた。殊に、ヒトの消化器幹細胞培養はマウスに比して、培養抵抗性があり困難であった。我々は、様々な因子のスクリーニングの結果、ALK (activin like kinase) 4/5/7 の阻害薬である A83-01, ストレス応答性 MAP キナーゼ, p38 の阻害薬である SB203580, ビタミン B3 誘導体であるニコチンアミドを追加投与することにより、永続的なヒト腸管上皮幹細胞培養法を確立した¹⁷⁾。さらに、Wnt 標的遺伝子

の一つである EphB2 を用い、単一の EphB2+ 腸管上皮細胞からオルガノイドを形成させ、長期間の培養と全ての分化細胞への分化を証明した¹⁸⁾。このことにより、初めてヒト腸管上皮幹細胞の存在を実証した。また、オルガノイド技術は大腸腺腫や大腸がんなどの腫瘍組織上皮細胞にも応用ができ、疾患由来細胞の培養が可能となってきた。さらに、食道の化生変化であり、食道腺がんの前がん病変であるバレット上皮も同様に培養に成功した。いずれの疾患組織も永続的に培養が可能であり、分化能も保たれていることから、疾患組織幹細胞の維持がなされていると考えられる¹⁷⁾。

6. 腸管上皮幹細胞のニッチ

ショウジョウバエの生殖器官幹細胞の研究から、幹細胞の維持にはニッチと呼ばれる微小環境が必要であることが示唆されてきた。ショウジョウバエの研究では幹細胞と隣接する細胞がニッチ細胞として機能し、未分化性維持や増殖制御において必須の役割をしていることが示された。腸管上皮幹細胞は陰窩底部の線維芽細胞によってその幹細胞機能が維持されると考えられてきた。しかしながら、オルガノイド培養では線維芽細胞が含まれておらず、線維芽細胞との細胞間相互作用は幹細胞維持には必須ではないことがわかった。我々は腸管上皮細胞にニッチとなる細胞が存在すると考え、常に Lgr5 幹細胞の隣に位置するパネート細胞に注目した。パネート細胞では CD24 の発現が亢進しており、フローサイトメトリーにて純化することができた。パネート細胞と Lgr5 幹細胞の遺伝子発現プロファイルを解析すると、パネート細胞は EGF, トランスフォーミング増殖因子 α (TGF- α), Dll4, Wnt-3 など、幹細胞維持に必須の因子を発現していることがわかった。相補的に、Lgr5 幹細胞はこれらの受容体遺伝子が発現しており、パ

ネート細胞から産生された増殖シグナルが隣の幹細胞に伝わることを示唆された。

我々は *in vitro* においてパネート細胞が Wnt 依存性に幹細胞維持に働くことを見いだした。また、Gfi1 ノックアウトマウスやパネート細胞特異的にジフテリア毒素を発現させ、パネート細胞を減少させたマウスでは幹細胞の数も減ることがわかった。これらのことから、パネート細胞が腸管上皮幹細胞のニッチとして機能していることが示された¹⁹⁾。前述した、+5 細胞の幹細胞脱分化においても、放射線照射による Lgr5 幹細胞の除去により、+5 細胞がパネート細胞と接着するようになり、Wnt 刺激や Notch 刺激を受容できるようになることが、その脱分化に重要であると考えられる⁷⁾。

最近、パネート細胞を含めた分泌系細胞への分化を制御する転写因子 Atoh1 のノックアウトマウス、また、Wnt-3 ノックアウトマウスではパネート細胞がなくても幹細胞機能が保たれていることが報告された^{20,21)}。さらに、腸管の線維芽細胞には Wnt2b を分泌する細胞が存在し Wnt2b も腸管上皮幹細胞の Wnt を活性化させることが報告された²¹⁾。このことから、Wnt はパネート細胞だけではなく、隣接する線維芽細胞からも産生され、幹細胞制御に関わることが示唆された。Notch シグナルのような細胞間相互作用は基底膜を隔てている線維芽細胞からは受容することが困難であり、パネート細胞がなくなった状態でも他の細胞が Notch 活性化のためにニッチ細胞となっていることが考えられる。大腸陰窩にはパネート細胞が存在しないが、幹細胞は常に非幹細胞と接触しており、同様のメカニズムで幹細胞を支持していることが示唆される。実際、大腸では CD24⁺c-kit⁺ の上皮細胞が常に Lgr5 幹細胞をエスコートしていることが示された²²⁾。造血幹細胞においても骨芽細胞や血管内皮細胞、神経細胞など複数のニッチ細胞が同定されている。腸管では、複数の細胞が Wnt や BMP シグナルなどの微小環境形成に関与している。Notch に代表される細胞間接着シグナルや細胞外基質との接着も幹細胞の未分化性維持に重要である。腸管上皮幹細胞培養に必須となっている R-spondin の局在はいまだ不明であり、腸管上皮幹細胞のニッチはパネート細胞や線維芽細胞由来タンパク質、その他の細胞との相互作用で形成されていると考えられる。

7. 腸管上皮幹細胞と大腸がん

大腸がんは本邦でも近年増加傾向にある悪性腫瘍である。遺伝性の発症原因を除いて、その発がんメカニズムはわかっていない。しかしながら、Vogelstein らの研究により、大腸腺腫 (APC) から段階的に発がんしていく Adenoma-Carcinoma Sequence が提唱され、APC 遺伝子の変異による大腸腺腫発症から、長時間をかけて KRAS,

SMAD4, TP53 遺伝子などの変異が蓄積することで大腸がんとなることが支持されている。Barker らは、腺腫の起源となる細胞について研究した。腸管上皮管腔側の分化細胞で APC 変異を誘導しても、微小な腺腫 (microadenoma) しか形成されなかった、一方、Lgr5 幹細胞に対して APC 変異を誘導した場合、非常に効率よく腺腫を形成した。さらに、腺腫内でも Lgr5 幹細胞と Lgr5 陰性の腺腫細胞が存在することが示され、腺腫細胞の中にも幹細胞ヒエラルキーがあることが示唆された。最近、腺腫内の Lgr5 幹細胞に対して、細胞系譜解析が行われ、腺腫内において Lgr5 幹細胞が腫瘍始原細胞 (tumor initiating cells) となっていることがわかった²³⁾。また、腺腫 Lgr5 幹細胞は APC 変異パネート細胞と常に接しており、腺腫 Lgr5 幹細胞は依然としてパネート細胞をニッチとして必要としていることが示唆された²⁴⁾。

大腸がんにおけるがん幹細胞の存在は 2007 年に二つのグループによって初めて示された^{25,26)}。この際、CD133 ががん幹細胞マーカーとして使われたが、後の研究から、CD133 は幹細胞を含むものの、幹細胞特異的ではないことが報告された²⁷⁾。現時点では明確に証明された大腸がん幹細胞マーカーはないが、正常大腸上皮幹細胞マーカーである Lgr5 が推定的な大腸がん幹細胞マーカーとなっている。Lgr5 の発現は CD133 に比し、大腸がん内でより限定的な発現パターンを示し、大腸がん患者の予後と相関している²⁸⁾。大腸がん幹細胞のニッチに関しては大腸がん幹細胞の同定ができていないため、不明な点が多いが、大腸がんの周囲に存在する線維芽細胞に大腸がん幹細胞維持作用があることが示され、肝細胞増殖因子 (HGF) などの液性因子を介していることが示された²⁹⁾。

8. おわりに

腸管上皮幹細胞について概説した。近年の研究により、腸管上皮幹細胞の理解は急速に深まった。今後、炎症・再生などの病態における腸管上皮幹細胞の動態、幹細胞ニッチによる幹細胞ヒエラルキーの維持機構に研究の焦点が当てられていくであろう。また、正常腸管上皮幹細胞に関する知見が大腸発がんや大腸がん幹細胞の研究に活かされてきており、腸管上皮幹細胞研究の重要性が一層高まると思われる。

文 献

- 1) Cheng, H. & Leblond, C.P. (1974) *Am. J. Anat.*, 141, 537-561.
- 2) Bjerknes, M. & Cheng, H. (1999) *Gastroenterology*, 116, 7-14.
- 3) Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H.,

- Peters, P.J., & Clevers, H. (2007) *Nature*, 449, 1003–1007.
- 4) Sangiorgi, E. & Capecchi, M.R. (2008) *Nat. Genet.*, 40, 915–920.
 - 5) Itzkovitz, S., Lyubimova, A., Blat, I.C., Maynard, M., van Es, J., Lees, J., Jacks, T., Clevers, H., & van Oudenaarden, A. (2012) *Nat. Cell Biol.*, 14, 106–114.
 - 6) Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K.G., Rangell, L., Klein, O.D., & de Sauvage, F.J. (2011) *Nature*, 478, 255–259.
 - 7) van Es, J.H., Sato, T., van de Wetering, M., Lyubimova, A., Yee Nee, A.N., Gregorieff, A., Sasaki, N., Zeinstra, L., van den Born, M., Korving, J., Martens, A.C., Barker, N., van Oudenaarden, A., & Clevers, H. (2012) *Nat. Cell Biol.*, 14, 1099–1104.
 - 8) Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., & Clevers, H. (2003) *Genes Dev.*, 17, 1709–1713.
 - 9) Kim, K.A., Kakitani, M., Zhao, J., Oshima, T., Tang, T., Binnerts, M., Liu, Y., Boyle, B., Park, E., Emtage, P., Funk, W.D., & Tomizuka, K. (2005) *Science*, 309, 1256–1259.
 - 10) de Lau, W., Barker, N., Low, T.Y., Koo, B.K., Li, V.S., Teunissen, H., Kujala, P., Haegebarth, A., Peters, P.J., van de Wetering, M., Stange, D.E., van Es, J.E., Guardavaccaro, D., Schasfoort, R.B., Mohri, Y., Nishimori, K., Mohammed, S., Heck, A.J., & Clevers, H. (2011) *Nature*, 476, 293–297.
 - 11) Koo, B.K., Spit, M., Jordens, I., Low, T.Y., Stange, D.E., van de Wetering, M., van Es, J.H., Mohammed, S., Heck, A.J., Maurice, M.M., & Clevers, H. (2012) *Nature*, 488, 665–669.
 - 12) Yang, Q., Bermingham, N.A., Finegold, M.J., & Zoghbi, H.Y. (2001) *Science*, 294, 2155–2158.
 - 13) van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D. J., Radtke, F., & Clevers, H. (2005) *Nature*, 435, 959–963.
 - 14) Haramis, A.P., Begthel, H., van den Born, M., van Es, J., Jonkheer, S., Offerhaus, G.J., & Clevers, H. (2004) *Science*, 303, 1684–1686.
 - 15) He, X.C., Zhang, J., Tong, W.G., Tawfik, O., Ross, J., Scoville, D.H., Tian, Q., Zeng, X., He, X., Wiedemann, L.M., Mishina, Y., & Li, L. (2004) *Nat. Genet.*, 36, 1117–1121.
 - 16) Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., & Clevers, H. (2009) *Nature*, 459, 262–265.
 - 17) Sato, T., Stange, D.E., Ferrante, M., Vries, R.G., Van Es, J.H., Van den Brink, S., Van Houdt, W.J., Pronk, A., Van Gorp, J., Siersema, P.D., & Clevers, H. (2011) *Gastroenterology*, 141, 1762–1772.
 - 18) Jung, P., Sato, T., Merlos-Suarez, A., Barriga, F.M., Iglesias, M., Rossell, D., Auer, H., Gallardo, M., Blasco, M.A., Sancho, E., Clevers, H., & Battle, E. (2011) *Nat. Med.*, 17, 1225–1227.
 - 19) Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., & Clevers, H. (2011) *Nature*, 469, 415–418.
 - 20) Kim, T.H., Escudero, S., & Shivdasani, R.A. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 3932–3937.
 - 21) Farin, H.F., Van Es, J.H., & Clevers, H. (2012) *Gastroenterology*, 143, 1518–1529.
 - 22) Rothenberg, M.E., Nusse, Y., Kalisky, T., Lee, J.J., Dalerba, P., Scheeren, F., Lobo, N., Kulkarni, S., Sim, S., Qian, D., Beachy, P.A., Pasricha, P.J., Quake, S.R., & Clarke, M.F. (2012) *Gastroenterology*, 142, 1195–1205.
 - 23) Barker, N., Ridgway, R.A., van Es, J.H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A.R., Sansom, O.J., & Clevers, H. (2009) *Nature*, 457, 608–611.
 - 24) Schepers, A.G., Snippert, H.J., Stange, D.E., van den Born, M., van Es, J.H., van de Wetering, M., & Clevers, H. (2012) *Science*, 337, 730–735.
 - 25) O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., & Dick, J.E. (2007) *Nature*, 445, 106–110.
 - 26) Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., & De Maria, R. (2007) *Nature*, 445, 111–115.
 - 27) Shmelkov, S.V., Butler, J.M., Hooper, A.T., Hormigo, A., Kushner, J., Milde, T., St Clair, R., Baljevic, M., White, I., Jin, D.K., Chadburn, A., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Gale, N. W., Thurston, G., Yancopoulos, G.D., D'Angelica, M., Kemeny, N., Lyden, D., & Rafii, S. (2008) *J. Clin. Invest.*, 118, 2111–2120.
 - 28) Merlos-Suárez, A., Barriga, F.M., Jung, P., Iglesias, M., Céspedes, M.V., Rossell, D., Sevillano, M., Hernando-Momblona, X., da Silva-Diz, V., Muñoz, P., Clevers, H., Sancho, E., Mangués, R., & Battle, E. (2011) *Cell Stem Cell*, 8, 511–524.
 - 29) Medema, J.P. & Vermeulen, L. (2011) *Nature*, 474, 318–326.
-