

iPS 細胞を用いた神経疾患研究への応用と課題

佐藤 裕 井上 治久

要約 人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells : iPS 細胞) は胚性幹細胞 (embryonic stem cells : ES 細胞) と同等の多分化能と増殖能を有する。これらの細胞は再生医療に限らず、患者 iPS 細胞を用いた疾患の病態解明、治療薬シーズの探索等、様々な分野での研究に利用されている。本稿では iPS 細胞を用いた神経疾患研究、その中でも老年期疾患としての認知症、あるいは老化に関する研究を中心に概説し、課題と展望についても述べる。

Key words : iPS 細胞, 疾患モデリング, 認知症, 老化

(日老医誌 2014 ; 51 : 502-509)

iPS 細胞の特性と疾患研究活用における利点

2006 年、山中伸弥博士はマウス線維芽細胞から人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells : iPS 細胞) を世界で初めて作製した¹⁾。2007 年にはヒト iPS 細胞が作製された²⁾。iPS 細胞は分化した皮膚線維芽細胞、リンパ球などの体細胞にいくつかの細胞初期化因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc など) を導入することで作製できる。すべてのヒトから iPS 細胞を作ることは可能であり、iPS 細胞はその性質 (多分化能) を維持しつつほぼ無限に増殖することができる³⁾。さらに必要に応じて目的の細胞に分化させることで病態研究や細胞移植、薬剤探索、組織発生研究等、基礎から臨床までの様々な研究リソースとして用いることが可能である⁴⁾⁵⁾。特に血液から iPS 細胞を作製する場合は、高い侵襲を伴うことなく疾患臓器の細胞を入手することができる。胚性幹細胞 (embryonic stem cells : ES 細胞) が有していた倫理的課題を iPS 細胞では回避可能である。

本稿では特に iPS 細胞技術を用いた神経疾患研究、さらにその中でも老年期疾患である認知症、あるいは老化研究における iPS 細胞の利用について論じる。

神経疾患研究

神経疾患は中枢神経、末梢神経系の異常によって生じる疾患の総称である。その研究は臨床的診断、死後剖検

組織の病理学的解析ではじまった。ポジショナルクローニングやシーケンス技術の発展に伴うゲノム情報の集積により、疾患原因・関連遺伝子が同定され⁶⁾、それに続き、該遺伝子の機能解析やモデル動物の作製・解析などがおこなわれてきた。しかし、これまでにモデル動物において同定された治療薬候補は必ずしもヒトに有効であるわけではないことから、ヒト細胞である iPS 細胞の利用が期待されている。2009 年、Ebert らは脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy : SMA) 患者由来 iPS 細胞を用いて、SMN (survival motor neuron) タンパク質をバルプロ酸処置によって増加させることが可能であることを明らかにし、患者 iPS 細胞を薬効評価に利用できることを初めて示した⁷⁾。患者 iPS 細胞を用いた疾患解析は、ヒトの細胞内情報伝達系・薬剤反応性を反映するモデルとして、疾患解析・創薬研究へ利用されつつある (図 1)。

認知症研究

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD) は、進行性の記憶障害などの臨床像を示す神経変性疾患である。病理学的には A β (β -amyloid) を主成分とする老人斑とリン酸化された微小管結合タンパク質 Tau による神経原線維変化を脳内に呈する。AD の一部は家族性であるが、家族性 AD の原因遺伝子である APP (β -amyloid precursor protein), PS1 (presenilin-1), PS2 (presenilin-2) の発見以降、株化細胞やモデルマウス等の解析により、脳内における A β の異常蓄積が神経細胞死を引き起こす (アミロイド仮説) という発症機序が支持されている。遺伝子産物 APP は一回膜貫通型のタンパク質で、

Application of iPS cells for studying neurological disorders

Yutaka Sato, Haruhisa Inoue : 京都大学 iPS 細胞研究所 増殖分化機構研究部門幹細胞医学分野

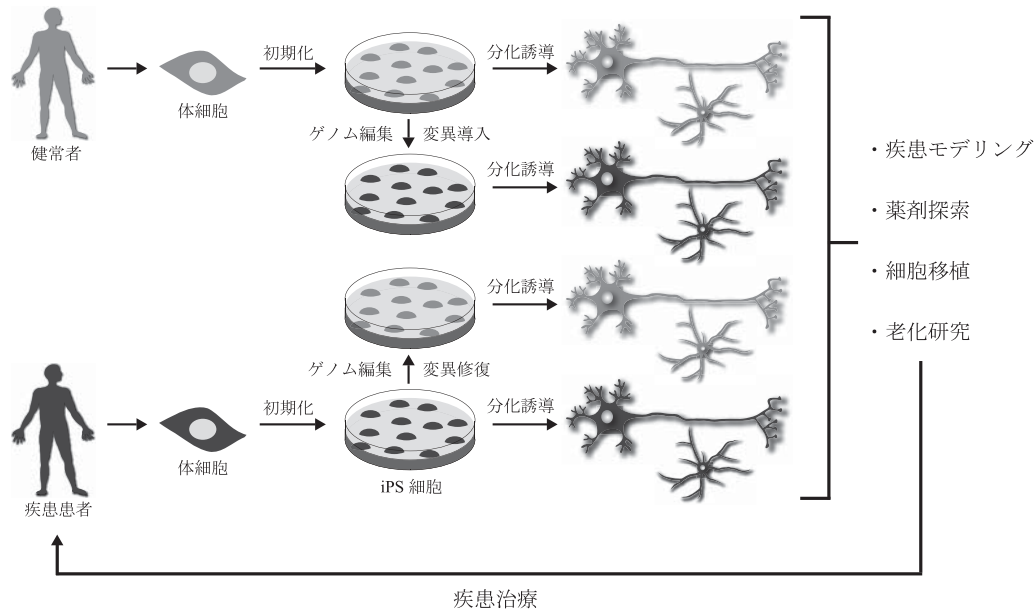


図1 神経疾患研究における iPS 細胞技術の活用

ヒト検体から皮膚細胞や血液細胞などの体細胞を採取し、細胞初期化因子を導入することで iPS 細胞を樹立する。ZFN (Zinc finger nuclease), TALEN (Transcription activator-like effector nuclease), CRISPR/Cas (Clustered regularly interspaced, short palindromic repeats/CRISPR-associated) 等の遺伝子編集技術により変異を導入または修復することで疾患細胞または isogenic control を作製し、神経細胞やグリア細胞などの標的細胞に分化させる。得られたヒト由来神経系細胞は疾患モデリング、薬剤探索、細胞移植、老化研究を含めた様々な研究分野で活用されている。

細胞質膜、エンドソーム、ゴルジ体上において β セクレターゼ (BACE1) と γ セクレターゼ (PS1 または PS2 複合体) と呼ばれる二つの酵素によって段階的な切断を受け $A\beta$ を産生する⁸⁾。これまでの解析から AD 患者 iPS 細胞由来神経細胞は $A\beta$ の蓄積を含めた AD 患者剖検脳と類似した病態を示すことが明らかにされている。我々は遺伝性 AD (APP^{V717L}) 患者 iPS 細胞由来神経細胞が細胞外 $A\beta_{42}$ の増加を示す一方、ほかの遺伝性 AD ($APP^{E693\Delta}$) と一部の孤発性 AD 患者 iPS 細胞由来神経細胞・アストロサイト内に $A\beta$ がオリゴマーとして蓄積し、小胞体ストレス・酸化ストレスを誘発していること、神経栄養因子枯渇状態において神経細胞死を生じることを報告した⁹⁾。またドコサヘキサエン酸処置でそれらストレスと神経細胞死が抑制されることを見出した。Israel らは、APP 遺伝子座の重複患者や一部の孤発性 AD 患者 iPS 細胞由来神経細胞では細胞外の $A\beta_{40}$ 量とリン酸化 Tau の亢進、Tau のリン酸化酵素である GSK3 β の活性化が見られ、 β -secretase 阻害剤がそれらを抑制することを示した¹⁰⁾。iPS 細胞を用いた研究により、アルツハイマー病において重要な役割をはたす $A\beta$ の代謝がヒトとマウスで異なることも明らかになりつつある。我々は、ヒト iPS 細胞由来神経細胞の薬剤応答性がこれまで

マウス等の実験系で想定されていた薬剤濃度と異なっていること、 γ -secretase 阻害剤では予想とは逆に $A\beta$ 量を増加させる濃度領域があることを示した¹¹⁾。Martens らも、AD モデルマウスにおいて $A\beta$ 量や記憶障害の改善が認められている様々な NSAID (Non-steroidal anti-inflammatory drugs) 型 γ -secretase 調節剤を AD 患者 iPS 由来神経細胞に添加し、高濃度 NSAID 型 γ -secretase 調節剤は確かに $A\beta_{42}$ 量を減少させる一方、薬剤のヒト生体内動態と同程度の低濃度 NSAID 型 γ -secretase 調節剤は全く効果を示さないことを明らかにした¹²⁾。低濃度 NSAID 型 γ -secretase 調節剤はマウスモデルや他の細胞モデルでは有意な $A\beta_{42}$ 量の減少を示すことから、ヒト神経細胞は他のモデル細胞と比べ代謝プロセスを含めた薬剤に対する感受性が大きく異なることを示唆している。GWAS (Genome-wide association study) による網羅的な SNPs (Single nucleotide polymorphisms, 一塩基多型) 解析により APOE の他、BIN1, CD2AP, CLU, CR1, PICALM 等の感受性遺伝子が新たに次々と報告されている。これらの遺伝子変異 iPS 細胞やさらに多数の孤発性 AD 患者 iPS 細胞由来神経細胞を比較・解析することで、今後 AD 病態に関する知見が集積される可能性がある。

前頭側頭型認知症 (Frontotemporal dementia: FTD) は前頭葉・側頭葉での脳萎縮と、多くの場合に病変部位で特徴的な封入体を呈する神経変性を伴う非アルツハイマー型認知症の疾患群である。臨床症状として初期には人格障害と行動異常、後期には記憶障害を主症状とする。現在では分子病理に従って封入体に蓄積しているタンパク質に基づき分類することができる¹³⁾。それぞれFTD-Tau (Tau陽性封入体)、FTD-TDP (TDP-43陽性封入体)、FTD-Fus (Fus陽性封入体)に大別される。FTD-TauではAD同様に過剰にリン酸化されたTauが細胞内に蓄積し、神経細胞の脱落を引き起こされる。iPS細胞由来神経細胞においても変異Tauは断片化と高リン酸化を受け、軸索の退縮を伴う神経変性を示すことが報告されている¹⁴⁾。筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) においてもFTD-TDPと同様のTDP-43 (TAR DNA-binding protein of 43 kDa) 陽性封入体が高頻度で観察され、臨床上でもFTDとALSは共通する症状を示すことから、両者は発症部位の重複した同様の遺伝子疾患と考えられる。FTD-TDPの原因遺伝子産物としてTDP-43, Progranulin, VAPB/C, C9orf72が報告されている。TDP-43はRNAの代謝制御や輸送に関わることが知られている。我々は、変異TDP-43患者iPS由来神経細胞においてTDP-43が生化学的に不溶性を示すこと、免疫組織学的に細胞質に増加していることを見いだしている¹⁵⁾。また積荷であるmRNAの輸送阻害が観察されている¹⁶⁾。異常伸長したGGGGCC反復配列を有する変異C9orf72患者iPS由来神経細胞では、核内RNA fociやユビキチン/TDP-43陽性の細胞内ジペプチド反復タンパク質封入体と、オートファジー依存的なタンパク質分解機構の減衰が観察される¹⁷⁾¹⁸⁾。またハーバード大学のグループはALS患者で同定された遺伝子変異 (SOD1, C9orf72, FUS) iPS細胞由来運動神経細胞において、膜興奮の異常亢進と神経細胞死が誘引されていることを示した。また彼らはミトコンドリア機能、酸化ストレス、小胞体ストレス、タンパク質輸送等に関わる遺伝子群の発現が変異SOD1 (A4V) と異常伸長型C9orf72患者iPS由来運動神経細胞において同様に変化していることを明らかにしている^{19)~21)}。

Lewy小体型認知症 (Dementia with Lewy bodies: DLB) は進行性の認知機能障害とドパミン神経細胞の変性を伴う認知症で、老年期の変性性認知症疾患ではADに次いで2番目に多い。パーキンソニズム (安静時振戦、筋固縮、無動) と呼ばれるパーキンソン病 (Parkinson's disease: PD) 様の運動障害を認める頻度が高く、PDと臨床、病理、分類上重複することから、現在では

DLBとPDは連続性をもった一つの疾患群と見なされることが多い²²⁾。病理学的には、大脳と脳幹の神経細胞脱落とレビー小体 (Lewy body) の出現を特徴とし、病変部位の分布に従って臨床・病的分類が微妙に異なり、それに伴い症状も多様である。Lewy小体は主要構成成分である α -synuclein陽性の線維性凝集体で、細胞核周辺部や神経突起内で観察される。DLBではSNCA (α -synuclein), Chr2p13領域, Chr2q35-36領域, GBA (Acid β -glucosidase) が原因もしくは関連遺伝子として報告されている²³⁾。変異 α -synuclein患者iPS由来神経細胞では α -synucleinの蓄積やAcid β -glucosidaseの小胞体での異常滞留、小胞体ストレスが観察される²⁴⁾。一方ゴーシェ病の原因遺伝子としても知られるGBAに変異をもつ患者由来ドパミン神経細胞においてはAcid β -glucosidaseの活性低下と α -synucleinの蓄積がみられる²⁵⁾。孤発性PD患者由来iPS細胞由来ドパミン神経細胞においては α -synucleinの蓄積は確認できないもののオートファゴソームのリソソームへの成熟が減衰している²⁶⁾。これまでの細胞・動物モデルや剖検脳での知見とともに、iPS細胞技術は孤発性と家族性DLB/PDにおけるリソソームの機能不全を含む共通の分子メカニズムを明らかにしつつある。未だに発症機序には不明な点も多いものの今後さらなる研究の発展が期待される。

他にも多くの神経疾患において、疾患特異的iPS細胞から標的細胞が作製・解析されている^{27)~66)}(表1)。さらにマウスモデルとの類似点、相違点の解明が進み、薬剤シーズ、治療法開発へと進むことが期待される。

老化研究

これまで哺乳類における老化モデルとして、本邦発のKlotho遺伝子変異マウス⁶⁷⁾やSAM (Senescence-accelerated mouse)⁶⁸⁾を含め、多数の変異マウスが報告されている。神経変性疾患の最大リスクは老化であるが、人工的に老化を促進するiPS細胞モデルが提案されている。

Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) は早老症の一つで、LMNAにおける単一遺伝子変異により生じ、平均寿命は14歳前後と非常に短い。LMNAは核膜の裏打ちタンパク質であるLamin A/Cをコードしており、HSPG患者にみられる遺伝子変異は切断型のLamin A (progerin) の過剰産生を引き起こす。その結果、核の形態やクロマチン構造の異常、DNAダメージや細胞分裂の不全が生じ、全身性のラミノパチーを呈する⁶⁹⁾。これまで患者剖検脳と同様に、ユビキチン化された異常タンパク質の蓄積した病理像を神経変性疾患患者

表 1 疾患特異的 iPS 由来神経系細胞を用いた神経疾患モデリングの例

疾患	原因遺伝子	疾患特異的 iPS 由来神経系細胞の主な表現型	参考文献
脊髄性筋萎縮症	<i>SMN1</i> (Survival of motor neuron 1)	<i>SMN1</i> 発現低下, 細胞サイズ減少, 運動神経細胞への分化効率低下, Caspase 活性化	7)27)
アルツハイマー病	<i>APP</i> (β -amyloid precursor protein), <i>PS1</i> (Presenilin-1) <i>PS2</i> (Presenilin-2)	A β 蓄積, Tau 高リン酸化, エンドソーム肥大化 小胞体ストレス, 酸化ストレス, 神経細胞の脆弱性	9)~ 13)
前頭側頭葉型変性症 (筋萎縮性側索硬化症含む)	<i>C9ORF72</i> , <i>MAPT</i> (Microtubule-associated protein tau), <i>PGRN</i> (Progranulin), <i>SOD1</i> (Superoxide dismutase 1), <i>TARDBP</i> (TAR DNA binding protein-43, TDP-43) <i>VAPB</i> (VAMP-associated protein B),	RNA foci・細胞内封入体形成 Tau 高リン酸化 不溶性 TDP-43 蓄積, 小胞体ストレス 膜興奮異常, 神経細胞の脆弱性	15)~ 21)28)
Lewy 小体型認知症 (ゴーシェ病, パーキンソン病含む)	<i>SNCA</i> (α -synuclein), <i>GBA</i> (β -glucocerebrosidase) <i>LRRK2</i> (Leucine-rich repeat kinase 2), <i>PINK1</i> (PTEN induced putative kinase 1), <i>PARK2</i> (Parkin)	α -synuclein 蓄積, オートファジー/リソソーム不全 酸化ストレス, ミトコンドリア機能異常 小胞体ストレス, 神経細胞の脆弱性	24)~ 26) 29)~ 38)
遺伝性痙性対麻痺	<i>SPAST</i> (Spastin)	Spastin 発現量低下, 軸索形成とミトコンドリア輸送の異常	39)40)
家族性自律神経失調症	<i>IKBKAP</i> (inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein)	<i>IKBKAP</i> 転写低下 末梢神経分化能低下	41)42)
球脊髄性筋萎縮症	<i>AR</i> (Androgen receptor)	dihydrotestosterone 存在下で Androgen receptor 凝集	43)
脆弱 X 症候群	<i>FMR1</i> (Fragile X mental retardation 1)	<i>FMR1</i> のエピゲノム修飾変化とタンパク量減少 神経突起長とシナプス活動の異常	44)45)
脊髄小脳変性症 II 型	<i>ATXN2</i> (Ataxin 2)	Ataxin 2 の発現量低下, 神経細胞の脆弱性	46)
脊髄小脳変性症 III 型	<i>ATXN3</i> (Ataxin 3)	グルタミン酸刺激下で Ataxin 3 の部分分解促進 と不溶性凝集体形成	47)
ダウン症候群	21 番染色体トリソミー	A β 蓄積, Tau 高リン酸化, シナプス活動低下, 神経細胞の脆弱性	48)59)
ティモシー症候群	<i>CACNA1C</i> (Calcium channel, L type, α -1)	Tyrosine hydroxylase 増加, ノルエピネフリン・ドパミン分泌量増加 活動電位依存的な樹状突起の退縮	50)51)
ドラベ症候群	<i>SCN1A</i> (Sodium channel voltage gated type 1, α subunit)	γ -aminobutyric acid 作動性神経細胞の活動低下, Na 電流の増加	52)53)
ニーマンピック病 ハンチントン病	<i>NPC1</i> (Niemann-Pick disease, type C1) <i>HTT</i> (Huntingtin)	コレステロール蓄積 Huntingtin 凝集, Caspase 活性化, オートファジー不全, 神経細胞死	54) 55)~ 60)
副腎白質ジストロフィー	<i>ABCD1</i> (ATP-binding cassette, sub-family D, member 1)	オリゴデンドロサイトにおける very long chain fatty acid の蓄積	61)
フリードライヒ失調症	<i>FXN</i> (Frataxin)	Frataxin 低発現, ミトコンドリア機能異常	62)63)
ペリツェウス・ メルツパッハー病	<i>PLP1</i> (Proteolipid protein 1)	オリゴデンドロサイトにおける 小胞体ストレス, ミエリン形成異常	64)
レット症候群	<i>MECP2</i> (Methyl CpG binding protein 2)	<i>MECP2</i> 発現低下, 成熟神経細胞への分化効率低下 vesicular glutamate transporter 1 陽性小胞減少, シナプス活動減少 細胞体・核サイズ減少	65)~ 67)

由来 iPS 細胞を用いて再現することは容易ではなかった。しかし Sloan-Kettering 研究所のグループは、PD 患者 iPS 細胞由来のドパミン神経細胞に外来性の progerin を過剰発現することで人工的に老化を促進させることを試みた⁷⁰⁾。その結果、Lewy 小体の蓄積や神経細胞死を含む様々な PD 病理像を短い培養期間で再現することに成功した。また progerin の発現により iPS 細胞から分化させた PD 変異をもたない線維芽細胞、ドパミン神経細胞において、細胞老化の特徴である細胞核の形態・機能維持、mTOR の活性、ミトコンドリア機

能の異常が亢進していた。一方で、HSPG 患者において PD など神経変性疾患を生じることは知られておらず、また HSPG 患者 iPS 由来神経細胞も PD 様の表現型は示さない。加えて通常の老化細胞で観察される全ての特徴が progerin の過剰発現によって引き起こされる訳ではない。今後、様々な老化因子と孤発性を含めた他の PD 患者や神経変性疾患 iPS 細胞を組み合わせ解析することで、老化と病態促進の具体的な関係性が何なのかについて検討が可能かもしれない。

新技術による課題への取り組み

疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究において課題となるのが対照群の設定である。得られた結果が iPS 細胞間のクローナルバリエーションや、ゲノム配列中の SNPs や突然変異など遺伝子情報の偶発的な違いによるものではなく、実際に着目している変異に起因していることを精密に証明するための技術が誕生している。すなわち、ZFN (Zinc finger nuclease)⁷¹⁾、TALEN (Transcription activator-like effector nuclease)⁷²⁾、CRISPR/Cas (Clustered regularly interspaced, short palindromic repeats/CRISPR-associated)⁷³⁾等の遺伝子編集技術により疾患特異的細胞の遺伝子変異を修復した“isogenic control”の作製が可能になり、標的の遺伝子変異以外の他の遺伝子情報は相同な理想的な対照群が得られるようになった。この手法により遺伝子変異と疾患をより直接的に関連付けることが可能になっている。

ヒト組織細胞から iPS 細胞を経ず、直接目的細胞に分化させる技術も発展しつつある。皮膚細胞から直接神経細胞へと分化させる方法 (induced Neuron: iN) も多数報告されているが、その分化効率の低さが課題となっていた⁷⁴⁾。ワシントン大学のグループは、これまでの転写因子の発現を主とした iN 作製法とは異なり、細胞老化関連因子である p16-INK4a や p19-ARF の発現を阻害することで、最大 80% の電気生理学的に機能的な iN を作製することに成功した⁷⁵⁾。この系において p53 の過剰発現は p16/p19 量依存的な神経分化をほぼ完全に抑制する。一方で telomerase の触媒サブユニットの発現もまた神経分化を誘発する。これらの結果は、細胞老化関連因子が細胞の再プログラミング化や標的細胞への分化に関わる細胞内情報伝達系の重要な制御因子として機能していることを意味する。今後さらに高効率かつ短時間で目的細胞を調整、利用できるような技術が発展すると期待される。

これまで、ES 細胞・iPS 細胞から分化誘導した神経細胞は 2 次元 (平面) で培養を行われていたが、理化学研究所の研究グループは無血清凝集浮遊培養法 (SFEBq 法, Serum-free floating culture of embryoid body-like aggregates with quick reaggregation) とその改良法を元に 3 次元 (立体) 培養を行うことにより、ヒト ES 細胞から直径数 mm の自己組織化した大脳新皮質に類似した構造を再現することに成功している。この人工大脳新皮質は各層 (大脳辺縁層, 皮質板, サブプレート, 中間層, 脳室下帯, 脳室帯) が明瞭に隔てられ、生体脳によく似た層構造を呈する⁷⁶⁾⁷⁷⁾。一方でオーストリア科学ア

カデミーの研究グループは従来の三次元的培養法に加え、ユニークな方法 (細胞塊が培養液に浸かった状態で攪拌し続ける等) で最長 10 カ月間培養可能な“Cerebral organoid”を作製した⁷⁸⁾。Cerebral organoid は大脳皮質だけではなく、脈絡叢、網膜、髄膜に似た構造を形成する。さらに彼らは CDK5RAP2 (CDK5 regulatory subunit-associated protein 2) 遺伝子変異を有する小頭症患者の iPS 細胞由来 Cerebral organoid では幹細胞や神経細胞の増殖、分化が抑制されており、構造体の形成不全を示すことを見出した。in vitro における組織形成研究の発展は将来的にはこれまでよりも生体に近い細胞環境条件での病態解明、創薬研究を実現するかもしれない。

終わりに

iPS 細胞技術は、これまでヒトの神経疾患研究の律速であった多くの課題を解決し、様々な疾患の病態解明や創薬開発へとその利用が進んでいる。さらに新しいアイデアや技術の開発により老化研究や三次元での立体培養へと発展しつつある。今後 iPS 細胞技術は神経疾患研究のみならず、発生、成熟、老化といった人のライフサイクル全般を理解するための研究リソースとしてさらに重要性を増すと考えられる。

参考文献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676.
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-872.
- 3) Yamanaka S, Blau HM: Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 2010; 465: 704-712.
- 4) Inoue H, Nagata N, Kurokawa H, Yamanaka S: iPS cells: a game changer for future medicine. *EMBO J* 2014; 33: 409-417.
- 5) Hargus G, Ehrlich M, Hallmann AL, Kuhlmann T: Human stem cell models of neurodegeneration: a novel approach to study mechanisms of disease development. *Acta Neuropathol* 2014; 127: 151-173.
- 6) Foo JN, Liu JJ, Tan EK: Whole-genome and whole-exome sequencing in neurological diseases. *Nat Rev Neurol* 2012; 8: 508-517.
- 7) Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, et al.: Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009; 457: 277-280.
- 8) Haass C, Selkoe DJ: Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 101-112.

- 9) Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, et al: Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* 2013; 12: 487–496.
- 10) Israel MA, Yuan SH, Bardy C, Reyna SM, Mu Y, Herrera C, et al: Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* 2012; 482: 216–220.
- 11) Yahata N, Asai M, Kitaoka S, Takahashi K, Asaka I, Hioki H, et al: Anti-A β drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease. *PLoS One* 2011; 6: e25788.
- 12) Mertens J, Stüber K, Wunderlich P, Ladewig J, Kesavan JC, Vandenberghe R, et al: APP Processing in Human Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons Is Resistant to NSAID-Based γ -Secretase Modulation. *Stem Cell Reports* 2013; 1: 491–498.
- 13) Ling SC, Polymenidou M, Cleveland DW: Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* 2013; 79: 416–438.
- 14) Fong H, Wang C, Knoferle J, Walker D, Balestra ME, Tong LM, et al: Genetic correction of tauopathy phenotypes in neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 2013; 1: 226–334.
- 15) Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, et al: Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med* 2012; 4: 145ra104.
- 16) Alami NH, Smith RB, Carrasco MA, Williams LA, Winborn CS, Han SS, et al: Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron* 2014; 81: 536–543.
- 17) Almeida S, Gascon E, Tran H, Chou HJ, Gendron TF, Degroot S, et al: Modeling key pathological features of frontotemporal dementia with C9ORF72 repeat expansion in iPSC-derived human neurons. *Acta Neuropathol* 2013; 126: 385–399.
- 18) Donnelly CJ, Zhang PW, Pham JT, Heusler AR, Mistry NA, Vidsensky S, et al: RNA toxicity from the ALS/FTD C9ORF72 expansion is mitigated by antisense intervention. *Neuron* 2013; 80: 415–428.
- 19) Sareen D, O'Rourke JG, Meera P, Muhammad AK, Grant S, Simpkinson M, et al: Targeting RNA foci in iPSC-derived motor neurons from ALS patients with a C9ORF72 repeat expansion. *Sci Transl Med* 2013; 5: 208 ra149.
- 20) Wainger BJ, Kiskinis E, Mellin C, Wiskow O, Han SS, Sandoe J, et al: Intrinsic membrane hyperexcitability of amyotrophic lateral sclerosis patient-derived motor neurons. *Cell Rep* 2014; 7: 1–11.
- 21) Kiskinis E, Sandoe J, Williams LA, Boulting GL, Moccia R, Wainger BJ, et al: Pathways Disrupted in Human ALS Motor Neurons Identified through Genetic Correction of Mutant SOD1. *Cell Stem Cell* 2014; 14: 1–15.
- 22) Vekrellis K, Xilouri M, Emmanouilidou E, Rideout HJ, Stefanis L: Pathological roles of α -synuclein in neurological disorders. *Lancet Neurol* 2011; 10: 1015–1025.
- 23) Meeus B, Theuns J, Van Broeckhoven C: The genetics of dementia with Lewy bodies: what are we missing? *Arch Neurol* 2012; 69: 1113–1118.
- 24) Chung CY, Khurana V, Auluck PK, Tardiff DF, Mazzulli JR, Soldner F, et al: Identification and rescue of α -synuclein toxicity in Parkinson patient-derived neurons. *Science* 2013; 342: 983–987.
- 25) Mazzulli JR, Xu YH, Sun Y, Knight AL, McLean PJ, Caldwell GA, et al: Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell* 2011; 146: 37–52.
- 26) Sánchez-Danés A, Richaud-Patin Y, Carballo-Carbajal I, Jiménez-Delgado S, Caig C, Mora S, et al: Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPSC-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Mol Med* 2012; 4: 380–395.
- 27) Chang T, Zheng W, Tsark W, Bates S, Huang H, Lin RJ, et al: Brief report: phenotypic rescue of induced pluripotent stem cell-derived motoneurons of a spinal muscular atrophy patient. *Stem Cells* 2011; 29: 2090–2093.
- 28) Byers B, Cord B, Nguyen HN, Schüle B, Fenno L, Lee PC, et al: SNCA triplication Parkinson's patient's iPSC-derived DA neurons accumulate α -synuclein and are susceptible to oxidative stress. *PLoS One* 2011; 6: e26159.
- 29) Nguyen HN, Byers B, Cord B, Shcheglovitov A, Byrne J, Gujar P, et al: LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell* 2011; 8: 267–280.
- 30) Seibler P, Graziotto J, Jeong H, Simunovic F, Klein C, Krainc D: Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *J Neurosci* 2011; 31: 5970–5976.
- 31) Soldner F, Laganière J, Cheng AW, Hockemeyer D, Gao Q, Alagappan R, et al: Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell* 2011; 146: 318–331.
- 32) Cooper O, Seo H, Andrabi S, Guardia-Laguarta C, Graziotto J, Sundberg M, et al: Pharmacological rescue of mitochondrial deficits in iPSC-derived neural cells from patients with familial Parkinson's disease. *Sci Transl Med* 2012; 4: 141ra90.
- 33) Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Koike M, Kuzumaki N, Hayakawa H, et al: Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and α -synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and post-mortem brain tissue. *Mol Brain* 2012; 5: 35.
- 34) Orenstein SJ, Kuo SH, Tasset I, Arias E, Koga H, Fernandez-Carasa I, et al: Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy. *Nat Neurosci* 2013; 16: 394–406.
- 35) Reinhardt P, Schmid B, Burbulla LF, Schöndorf DC, Wagner L, Glatza M, et al: Genetic correction of a LRRK2 mutation in human iPSCs links parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes in gene expression. *Cell Stem Cell* 2013; 12: 354–367.
- 36) Sanders LH, Laganière J, Cooper O, Mak SK, Vu BJ, Huang YA, et al: LRRK2 mutations cause mitochondrial DNA damage in iPSC-derived neural cells from Parkin-

- son's disease patients: reversal by gene correction. *Neurobiol Dis* 2014; 62: 381-386.
- 37) Panicker LM, Miller D, Park TS, Patel B, Azevedo JL, Awad O, et al: Induced pluripotent stem cell model recapitulates pathologic hallmarks of Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 18054-18059.
 - 38) Denton KR, Lei L, Grenier J, Rodionov V, Blackstone C, Li XJ: Loss of spastin function results in disease-specific axonal defects in human pluripotent stem cell-based models of hereditary spastic paraplegia. *Stem Cells* 2014; 32: 414-423.
 - 39) Havlicek S, Kohl Z, Mishra HK, Prots I, Eberhardt E, Denguir N, et al: Gene dosage-dependent rescue of HSP neurite defects in SPG4 patients' neurons. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 2527-2541.
 - 40) Lee G, Papapetrou EP, Kim H, Chambers SM, Tomishima MJ, Fasano CA, et al: Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 2009; 461: 402-406.
 - 41) Lee G, Ramirez CN, Kim H, Zeltner N, Liu B, Radu C, et al: Large-scale screening using familial dysautonomia induced pluripotent stem cells identifies compounds that rescue IKBKAP expression. *Nat Biotechnol* 2012; 30: 1244-1248.
 - 42) Nihei Y, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Yagi T, Yoshizaki T, et al: Enhanced aggregation of androgen receptor in induced pluripotent stem cell-derived neurons from spinal and bulbar muscular atrophy. *J Biol Chem* 2013; 288: 8043-8052.
 - 43) Sheridan SD, Theriault KM, Reis SA, Zhou F, Madison JM, Daheron L, et al: Epigenetic characterization of the FMR1 gene and aberrant neurodevelopment in human induced pluripotent stem cell models of fragile X syndrome. *PLoS One* 2011; 6: e26203.
 - 44) Liu J, Koscielska KA, Cao Z, Hulsizer S, Grace N, Mitchell G, et al: Signaling defects in iPSC-derived fragile X premutation neurons. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 3795-3805.
 - 45) Xia G, Santostefano K, Hamazaki T, Liu J, Subramony SH, Terada N, et al: Generation of human-induced pluripotent stem cells to model spinocerebellar ataxia type 2 in vitro. *J Mol Neurosci* 2013; 51: 237-248.
 - 46) Koch P, Breuer P, Peitz M, Jungverdorben J, Kesavan J, Poppe D, et al: Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with Machado-Joseph disease. *Nature* 2011; 480: 543-546.
 - 47) Shi Y, Kirwan P, Smith J, MacLean G, Orkin SH, Livesey FJ: A human stem cell model of early Alzheimer's disease pathology in Down syndrome. *Sci Transl Med* 2012; 4: 124ra29.
 - 48) Weick JP, Held DL, Bonadurer GF 3rd, Doers ME, Liu Y, Maguire C, et al: Deficits in human trisomy 21 iPSCs and neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 9962-9967.
 - 49) Paşca SP, Portmann T, Voineagu I, Yazawa M, Shcheglovitov A, Paşca AM, et al: Using iPSC-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy syndrome. *Nat Med* 2011; 17: 1657-1662.
 - 50) Krey JF, Paşca SP, Shcheglovitov A, Yazawa M, Schwemberger R, Rasmuson R, et al: Timothy syndrome is associated with activity-dependent dendritic retraction in rodent and human neurons. *Nat Neurosci* 2013; 16: 201-209.
 - 51) Higurashi N, Uchida T, Lossin C, Misumi Y, Okada Y, Akamatsu W, et al: A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. *Mol Brain* 2013; 6: 19.
 - 52) Liu Y, Lopez-Santiago LF, Yuan Y, Jones JM, Zhang H, O'Malley HA, et al: Dravet syndrome patient-derived neurons suggest a novel epilepsy mechanism. *Ann Neurol* 2013; 74: 128-139.
 - 53) Trilck M, Hübner R, Seibler P, Klein C, Rolfs A, Frech MJ: Niemann-Pick type C1 patient-specific induced pluripotent stem cells display disease specific hallmarks. *Orphanet J Rare Dis* 2013; 8: 144.
 - 54) Zhang N, An MC, Montoro D, Ellerby LM: Characterization of Human Huntington's Disease Cell Model from Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS Curr* 2010; 2: RRN1193.
 - 55) Camnasio S, Delli Carri A, Lombardo A, Grad I, Mariotti C, et al: The first reported generation of several induced pluripotent stem cell lines from homozygous and heterozygous Huntington's disease patients demonstrates mutation related enhanced lysosomal activity. *Neurobiol Dis* 2012; 46: 41-51.
 - 56) Jeon I, Lee N, Li JY, Park IH, Park KS, Moon J, et al: Neuronal properties, in vivo effects, and pathology of a Huntington's disease patient-derived induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2012; 30 (9): 2054-2062.
 - 57) Chae JI, Kim DW, Lee N, Jeon YJ, Jeon I, Kwon J, et al: Quantitative proteomic analysis of induced pluripotent stem cells derived from a human Huntington's disease patient. *Biochem J* 2012; 446: 359-371.
 - 58) An MC, Zhang N, Scott G, Montoro D, Wittkop T, Mooney S, et al: Genetic correction of Huntington's disease phenotypes in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2012; 11: 253-263.
 - 59) HD iPSC Consortium: Induced pluripotent stem cells from patients with Huntington's disease show CAG-repeat-expansion-associated phenotypes. *Cell Stem Cell* 2012; 11: 264-278.
 - 60) Jang J, Kang HC, Kim HS, Kim JY, Huh YJ, Kim DS, et al: Induced pluripotent stem cell models from X-linked adrenoleukodystrophy patients. *Ann Neurol* 2011; 70: 402-409.
 - 61) Liu J, Verma PJ, Evans-Galea MV, Delatycki MB, Michalska A, Leung J, et al: Generation of induced pluripotent stem cell lines from Friedreich ataxia patients. *Stem Cell Rev* 2011; 7: 703-713.
 - 62) Du J, Campau E, Soragni E, Ku S, Puckett JW, Dervan PB, et al: Role of mismatch repair enzymes in GAA · TTC triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia induced pluripotent stem cells. *J Biol Chem* 2012; 287: 29861-29872.
 - 63) Numasawa-Kuroiwa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M, et al: Involvement of ER Stress in Demyelination of Pelizaeus-Merzbacher Disease with

- PLP1 Missense Mutations Shown by iPSC-Derived Oligodendrocytes. *Stem Cell Reports* 2014; 2: 648–661.
- 64) Marchetto MC, Carron ME, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, et al: A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 2010; 143: 527–539.
- 65) Kim KY, Hysolli E, Park IH: Neuronal maturation defect in induced pluripotent stem cells from patients with Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 14169–14174.
- 66) Ananiev G, Williams EC, Li H, Chang Q: Isogenic pairs of wild type and mutant induced pluripotent stem cell (iPSC) lines from Rett syndrome patients as in vitro disease model. *PLoS One* 2011; 6: e25255.
- 67) Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al: Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; 390: 45–51.
- 68) Takeda T: Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochem Res* 2009; 34: 639–659.
- 69) Prokocimer M, Barkan R, Gruenbaum Y: Hutchinson-Gilford progeria syndrome through the lens of transcription. *Aging Cell* 2013; 12: 533–543.
- 70) Miller JD, Ganat YM, Kishinevsky S, Bowman RL, Liu B, Tu EY, et al: Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell* 2013; 13: 691–705.
- 71) Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D: Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science* 2003; 300: 764.
- 72) Mussolino C, Morbitzer R, Lütge F, Dannemann N, Lahaye T, Cathomen T: A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: 9283–9293.
- 73) Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, et al: Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 2013; 31: 227–229.
- 74) Morris SA, Daley GQ: A blueprint for engineering cell fate: current technologies to reprogram cell identity. *Cell Res* 2013; 23: 33–48.
- 75) Sun CK, Zhou D, Zhang Z, He L, Zhang F, Wang X, et al: Senescence impairs direct conversion of human somatic cells to neurons. *Nat Commun* 2014; 5: 4112.
- 76) Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, Kawada M, Yonemura S, Matsumura M, et al: Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 519–532.
- 77) Kadoshima T, Sakaguchi H, Nakano T, Soen M, Ando S, Eiraku M, et al: Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 20284–20289.
- 78) Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, et al: Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 2013; 501: 373–379.
-