

# 类脑器官在神经退行性疾病中的研究进展

韩晓旭<sup>1</sup>, 张庆硕<sup>2</sup>, 宋丹丹<sup>3</sup>, 周世越<sup>2</sup>, 张金璐<sup>4</sup>, 王晓红<sup>1</sup>, 许顺良<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>山东大学第二医院全科医学科, 山东 济南

<sup>2</sup>山东大学第二医院神经内科, 山东 济南

<sup>3</sup>山东省省立三院神经内科, 山东 济南

<sup>4</sup>山东省第二人民医院神经内科, 山东 济南

收稿日期: 2024年1月23日; 录用日期: 2024年2月16日; 发布日期: 2024年2月26日

## 摘要

神经退行性疾病(Neurological Degeneration Diseases, NDDs)是一种隐袭起病、慢性进展的中枢神经系统疾病, 其主要病理特征是特定神经元的丢失和特异性病理的形成。传统实验方法对NDDs发病机制、治疗方案的探索难以模拟人体环境和潜在的病理改变。由于上述局限性, 基于人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSC)构建的类脑组织及器官(human brain organoids)已用于NDDs的基础研究。本文重点介绍了类脑器官这一新型实验研究方法在NDDs中的应用、优势及局限性, 并对其应用前景进行展望。

## 关键词

神经退行性疾病, 类脑器官, 发病机制, 药物筛选

# Advances in the Study of Human Brain Organoids in Neurodegenerative Diseases

Xiaoxu Han<sup>1</sup>, Qingshuo Zhang<sup>2</sup>, Dandan Song<sup>3</sup>, Shiyue Zhou<sup>2</sup>, Jinlu Zhang<sup>4</sup>, Xiaohong Wang<sup>1</sup>, Shunliang Xu<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of General Medicine, The Second Hospital of Shandong University, Jinan Shandong

<sup>2</sup>Department of Neurology, The Second Hospital of Shandong University, Jinan Shandong

<sup>3</sup>Department of Neurology, Shandong Provincial Third Hospital, Jinan Shandong

<sup>4</sup>Department of Neurology, Shandong Second Provincial General Hospital, Jinan Shandong

Received: Jan. 23<sup>rd</sup>, 2024; accepted: Feb. 16<sup>th</sup>, 2024; published: Feb. 26<sup>th</sup>, 2024

\*通讯作者。

文章引用: 韩晓旭, 张庆硕, 宋丹丹, 周世越, 张金璐, 王晓红, 许顺良. 类脑器官在神经退行性疾病中的研究进展[J]. 临床医学进展, 2024, 14(2): 3483-3491. DOI: 10.12677/acm.2024.142488

## Abstract

Neurological Degeneration Diseases (NDDs) are a kind of central nervous system diseases with insidious onset and chronic progression. The main pathological features are the loss of specific neurons and the formation of specific pathologies. Traditional experimental methods to explore the pathogenesis and treatment of NDDs are difficult to simulate the human environment and potential pathological changes. Due to the above limitations, brain-like tissues and organs based on human induced pluripotent stem cells (hiPSC) have been used in basic research of NDDs. This article focuses on the application, advantages and limitations of organoids as a new experimental research method in NDDs, and prospects for its application.

## Keywords

Neurodegenerative Diseases, Human Brain Organoids, Pathogenesis, Drug Screening

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

神经退行性疾病(Neurological Degeneration Diseases, NDDs)是一种隐袭起病、慢性进展的中枢神经系统疾病。其早期阶段的临床特征可能不典型,目前尚缺乏有效的早期诊断方法。且由于其病理改变的不可逆性和慢性进行性特点,疾病的整体预后不良。基于传统的细胞模型和动物模型的试验虽然阐述了部分与 NDDs 相关的病理生理改变,但由于动物和人类在遗传、解剖学和生理学基础上的差异,相关研究成果在临床转化率较低,这限制了 NDDs 的早期诊断及疾病修饰治疗相关药物筛选的研究。由于上述研究的局限性,人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSC)和由此构建的类器官在相关研究领域的应用逐渐获得关注,为相关疾病研究提供了新的手段。类脑器官(human brain organoids)可以模仿人类胎儿大脑发育的神经结构,重现胎儿大脑的表观遗传和转录特征[1] [2],甚至与出生后早期的大脑成熟度相似,为模拟人脑发育和疾病提供了独特的平台[3],尤其小胶质细胞在大脑发育和体内平衡中发挥关键作用,利用人类细胞模型阐明小胶质细胞的功能机制将促进病理学研究和药物开发[4]。类脑器官现已应用于多种 NDDs 的相关研究,并已发现上述疾病的部分重要神经病理学特征。本文回顾了类脑器官的建立、在 NDDs 具体疾病及相关药物筛选中的应用举例及优势与局限性,以期介绍这一新型研究方法,为后续基础实验研究提供新思路。

## 2. 类脑器官的构建历史

类脑器官培养技术是由类胚体技术衍生而来的。类胚体是使胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)或多能干细胞(pluripotent stem cells, PSC)脱离自我更新环境来诱导其分化,由此形成一种细胞多聚体。类胚体具有胚胎神经管的特征,如具有基底极性的假复层上皮、具有神经上皮细胞和放射状神经胶质细胞的特征等[5]。悬浮生长的 ESC 能够在没有血清及神经分化抑制剂的情况下,具有聚集成球并自发产生神经前体细胞的倾向,这证明了 PSC 自发获得神经同一性的显著能力,也说明了细胞聚集对于有效的神经分化不是必需[6]。2011年, Eiraku 等人使用 ESC 的 3D 神经培养系统生成显示视网膜结构特征的自组织

视杯状结构。后来,该团队使用 Matrigel (一种由 Engelbreth-Holm-Swarm 小鼠肉瘤细胞系分泌的富含胶状层粘连蛋白的细胞外基质)进一步将 ESC 分化为大脑各功能区的神经细胞,并在此研究中发现,在 Matrigel 中稳定的 ESC 会分化为类似视神经囊泡的视网膜原始组织的“芽”[7]。2013 年, Lancaster 和 Knoblich 的研究发现, Matrigel 中没有促进分化的生长因子类胚体,生长出更大的神经上皮芽,自发地发展相邻的大脑区域,形成真正的大脑类器官,定义为表现出多个大脑区域的神经结构,这些 3D 结构包含类似于各种大脑区域,因此被称为类脑器官[8]。此后,这种方法已成为应用于衍生不同大脑区域,包括背侧皮质[9]、腹侧前脑[10]、脉络丛、海马[11]、下丘脑[12]和脊髓[13]。神经干细胞(NSCs)周围的血管是调节神经发生和神经祖细胞分化的重要组成部分。血液循环的缺乏会在类器官培养过程中引起细胞缺氧,并可能加速坏死,从而阻碍神经元的正常发育和分化。为了克服这些局限性,一些研究试图通过将 hESC 或 hiPSC 衍生的类脑器官与来自同一患者 iPSCs 分化的内皮细胞(ECs)共培养来生成血管化类器官[14]。Shi 等人通过共培养人多能细胞和人脐静脉内皮细胞(HUVECs)创建了一种新的模型,可产生具有血管化的类脑器官[15]。他们的研究首先表明,血管化的脑器官中的血管系统可以连接到宿主的天然血管,从而构建出新的功能性血管形成系统,这表明了其在治疗神经创伤中的潜在应用。此外,在 Kook MG 及同事的研究[16]中发现, Wnt/ $\beta$ -catenin 信号的激活可促进血管类器官的神经祖细胞的增殖和神经分化。这项技术正在迅速发展,人们可以预见在不久的将来会有重大进步,这将会出现更一致、更成熟、更复杂的大脑类器官。目前,类脑器官模型已经用于研究小头畸形[8][17],孤独症谱系障碍[18],精神分裂症[19][20]、寨卡病毒感染性脑疾病[21][22]、神经系统肿瘤及神经退行性疾病[23]等。

### 3. 类脑器官的优势及局限性

#### 3.1. 类脑器官的优势

类器官的特点是体外生成的器官的小型版本,可以概括人体器官发育的关键特征[24]。由于活体人脑的可及性有限,以及对死后或手术切除的人脑样本的处理不一致,因此很难将其应用于临床研究。此外,人脑在大小、表面积和细胞结构的复杂性方面与模型动物(如小鼠)显著不同[25],通过使用类脑器官可以克服传统生物模型在解剖生理、遗传等方面与人类的差异,较准确地模仿人类大脑的发育、功能以及对疾病的易感性,进而显著提高从生物医学研究到临床试验的转化效率[26]。类脑器官在评估药物在体内代谢及毒理学机制方面至关重要,目前,类脑器官已应用于药物筛选,并取得了有效成果。

#### 3.2. 类脑器官的局限性

类脑器官的产生及建模尚在起步阶段,还需克服存在的局限性:(1) 当前大多数类脑的建立缺乏血管结构,这也进一步影响了神经的发育、增殖、分化,为后期的研究带来了不便;目前 Bilal Cakir 等人[27]利用人类胚胎干细胞建立了具有功能性血管状的类脑器官,为研究人类大脑发育与疾病提供了重要工具;(2) 类脑器官的成熟度有限,为大脑的早期发育,而神经退行疾病通常发生在细胞衰老过程中,这种差异使模拟晚发性神经疾病受到限制;(3) 类脑器官缺乏小胶质细胞等重要细胞类型,限制了神经回路的形成,目前,越来越多的研究致力于类脑器官中小胶质细胞的生成;(4) 由于培养条件、分子组合、批次的差异,类脑器官仍存在较高的异质性;这意味着类脑器官的研究及培养技术在未来还有待突破。

### 4. 类脑器官作为疾病模型的应用

#### 4.1. 阿尔茨海默病(AD)的建模

阿尔茨海默病早期往往表现为近期记忆减退,中晚期 AD 患者生活能力及生活质量大幅下降,其病理特征表现为  $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )积累,磷酸化 tau (p-Tau)形成,神经胶质细胞过度活化和神经元丢失。

相对于细胞和动物模型,类脑器官可以有效地模拟人类大脑的关键特征。因此,许多体外类器官模型已被开发用于AD建模[28]-[33]。Choi等人2014年首次成功地在3D人类神经细胞模型中阐述了A $\beta$ 和p-Tau的病理,提出该模型可以用作研究AD致病机制和药物筛选的平台[34]。大多数用于AD建模的类脑器官具有家族性患者特异性的基因改变,包括突变、缺失和插入。近两年来AD类器官模型的进展如下。

#### 4.1.1. PSEN2N 突变

有研究通过基因编辑,从具有PSEN2N基因突变的家族性AD女性患者中提取多能干细胞,对照组选用具有相同遗传背景的健康女性,分别培育类脑器官,此研究概括了PSEN2突变通过显著增加A $\beta$ 42的产生和聚集来参与AD的发病机制,还研究了PSEN2突变对类器官的产生、形态和功能的影响,为研究AD病理机制和开发药物提供了新的平台[35]。

#### 4.1.2. 模拟血脑屏障破坏

有研究将hiPSC衍生的散发性AD(sAD)类脑器官暴露在血清中,模拟老年大脑中血脑屏障破坏,该模型概括了血清暴露分别通过诱导 $\beta$ -分泌酶1(BACE)和糖原合酶激酶-3 $\alpha/\beta$ (GSK3 $\alpha/\beta$ )水平增加A $\beta$ 和p-Tau水平[36],此外,对类脑器官的单细胞转录组分析显示,血清暴露降低了神经元和星形胶质细胞的突触功能,并诱导了星形胶质细胞中的免疫反应,将有助于揭示AD未探索的发病机制。

#### 4.1.3. BIN1 基因突变

BIN1 KO类脑器官表现为早期内体缩窄,BIN1iso1的表达可以挽救,神经元中BIN1iso1的过表达可能通过增加内体的大小并诱导神经变性,进一步导致AD发病。因此BIN1,尤其是BIN1iso1可能为AD病理的早期病理生理标志[37]。目前临床上用于AD治疗药物并不能有效延缓AD病情的进展,因此,疾病修饰治疗药物成为目前研究热点。

#### 4.1.4. APOE4 基因型

Zhao等人使用iPSC衍生的类脑器官系统,证实了多种依赖于APOE4和AD疾病状态的致病途径,与健康受试者来源的类脑器官相比,ApoE4相关表型的类脑器官检测到A $\beta$ 和磷酸化tau水平升高。且由于APOE4向APOE3的等基因转化会逆转AD类脑器官的许多相关表型[38]。因此,APOE4可能是AD的有希望的治疗靶标,探索APOE4和AD相关途径之间相互作用的分子机制具有重要临床意义。

#### 4.1.5. tau 蛋白表达

tau蛋白在AD发病机制中具有重要作用,使用诱导多能干细胞(iPSC)衍生的皮质类器官通过RNA测序(scRNA seq)、RNA原位杂交(RNA scope)和免疫组织化学(IHC)技术组合,在细胞水平上绘制发育中的人脑中的tau mRNA和蛋白质表达。结果表明,在发育中的胎儿大脑和iPSC衍生的类脑器官中,tau随着神经元的成熟而增加,并为未来研究触发tau基因转录和翻译的调控机制奠定了基础[39]。

### 4.2. 帕金森病(PD)的建模

帕金森病是一种常见的神经退行性疾病,其患病率随年龄逐渐增长,其主要病理特征为脑内黑质多巴胺(DA)能神经元变性死亡及胞质内包涵体——路易小体(Lewy body)形成,近年,中脑类器官的研究在PD模型中具有重要意义,PD的相关模型能够抓住PD的关键病理生理特征,提示其在病理研究和药物筛选中具有潜在的潜力,以确定用于临床治疗的药物。

#### 4.2.1. 多巴胺能分化动力

Jonas Walter等人的研究中[40],他们使用了基于人类iPSC的神经元培养物,分析神经元从神经上皮干细胞(neuroepithelial stem cells, NESCs)向中脑多巴胺能神经元(mDAs)分化的早期过渡阶段的动力学,观

察到 PD 相关 LRRK2-G2019S 突变通过 NR2F1 改变 mDAs 发育。与对照组相比, 转录因子 NR2F1 在 LRRK2-G2019S NESC、神经元和中脑类器官中的表达降低。这意味着 NR2F1 在多巴胺能分化动力学中起重要作用。

#### 4.2.2. DNAJC6 突变

有研究使用人中脑类器官(human midbrain-like organoids, hMLOs)概括 DNAJC6 突变引起关键的 PD 病理特征, 早期发育中 DNAJC6 功能的丧失损害了腹侧中脑(VM, ventral midbrain), 进而导致在成年时 mDAs 的中脑特异性标记表达缺陷, 神经元易发生变性以及表达多种 PD 表型。DNAJC6 的缺失可以通过两种方式导致 PD 的发病过程: 一种是通过 mDAs 特异性基因的 LMX1A-dependent 转录, 另一种是通过 DNAJC6 调节囊泡运输的分子伴侣功能。所以, DNAJC6 的缺失与 mDA 神经元 PD 表型相关[41]。

#### 4.2.3. LRRK2-p.Gly2019Ser 相关基因

中脑类器官在模拟帕金森病早期发育变化方面具有一定潜力。Alise Zagare 的研究[42]提出 LRRK2 p.Gly2019Ser 突变会改变神经发育, 导致细胞不及时、不完全分化。并提出了四个候选基因, APP, DNAJC6, GATA3 和 PTN, 这可能与早期神经发育过程中的 LRRK2p.Gly2019Ser 相关转录组变化相关。

#### 4.2.4. PARK7 突变

在 PARK7 相关的 PD 中脑类器官中证明, U1 剪接位点突变导致 DJ-1 蛋白急剧减少并影响线粒体功能, 进而导致早发型 PD [43]。

### 4.3. 肌萎缩性侧索硬化症/额颞叶痴呆(ALS/FTD)的建模

肌萎缩性侧索硬化症/额颞叶痴呆(ALS/FTD)是一种致命且目前无法治愈的疾病, 其特征是认知能力迅速下降和瘫痪。明确发病机制是精准治疗的核心, 人类诱导多能干细胞(ipsc)的皮质类器官切片模型概括了 C9ORF72ALS/FTD 的早期分子病理学: 星形胶质细胞中自噬信号蛋白 P62 的水平升高, 深层神经元二肽重复蛋白 poly(GA)积聚, DNA 损伤, 进而导致疾病的发生[44]。

### 4.4. 脆性 X 综合征(FXS)的建模

脆性 X 综合征是一种由 X 染色体上的 FMR1 基因(脆性 X 信使核糖核蛋白 1)突变引起的, 最常见的是 FMR1 的 5'非转录区 CGG (三核苷酸)重复增加导致, 是致病的主要已知遗传原因。

#### 4.4.1. FMR1 突变

目前通过使用皮层类脑器官模型, Brighi 等人[45]发现, FMRP-KO 类器官体积更大, 胶质细胞数量增加, 这表明 FMRP 在调节神经胶质发生以及神经和神经胶质发育的平衡中起重要作用。

#### 4.4.2. PI3K 抑制剂缺陷挽救

在建模中观察到 FMRP 的缺失导致神经发生失调, 神经元成熟和神经元兴奋性异常。与动物模型不同, 他们发现, mGluR5 拮抗剂不能挽救 FXS 前脑类器官中的突变表型, 但 PI3K 抑制剂挽救了神经祖细胞(NPC)的增殖缺陷和突触形成缺陷[46]。此研究提示了 PI3K 抑制剂对脆性 X 类脑器官的影响进行全面评估是十分重要的, 可能为研究 FXS 的疾病机制和确定人类特异性治疗靶点提供一种特异性临床前模型。

#### 4.4.3. AMPAR(谷氨酸类似物受体)功能改变

研究显示, 在人 FXS 神经祖细胞中, 通过 AMPAR(谷氨酸类似物受体)的钙信号传导受到影响, 并且 FXS 祖细胞比对照组产生更多表达  $Ca^{2+}$  渗透性 AMPA 受体( $Ca^{2+}$ -permeable AMPA receptors, CP-AMPA)的细胞。这表明 AMPAR 的功能改变会影响神经元的分化, 并导致 FXS 中神经回路形成和

功能的异常[47]。这些研究共同为 FXS 的人类特异性分子机制提供了新的见解。

## 5. 药物筛选

类脑器官作为工具的使用不仅有助于揭示神经系统疾病的病因，而且还有助于治疗领域的进展。通常使用小鼠模型测试进行药物筛选，但是动物模型至临床应用的转化率较低，因此，类脑器官的应用为药物筛选提供了新途径。

### 5.1. AD 的药物筛选

Jong-Chan Park 等人将数学建模、AD 的病理特征与人类 iPSC 衍生的类脑器官(iCOs) (包括 CRISPR-Cas9-edited 等基因系)相结合，开发了一种有效的药物筛选平台，构建高含量筛选(HCS)系统，测试经 FDA 批准的血脑屏障渗透药物[48]。这项研究通过数学建模和使用 iCOs 的微型病理脑模型的融合，为精准治疗提供了一种策略。

### 5.2. PD 的药物筛选

在帕金森病领域，基于类脑器官的药物测试例如苯丁酸以及基因工程的 U1-snRNA 可有效逆转突变中脑类器官中的错接、线粒体功能障碍和多巴胺能神经元丢失。这为分子靶向治疗 PD 提供了有效策略[43]。

### 5.3. ALS/FTD 的药物筛选

在 ALS/FTD 皮质类器官中，气液界面皮质类器官是短期药物治疗的最佳选择，研究表明可以通过 gsk2606414 挽救对早期蛋白质稳态和 DNA 损伤相关发病机理的部分，C9 ALI-COs 切片为个性化诊断和药物发现提供了策略[44]。

### 5.4. FXS 的药物筛选

Hunt 等人使用基于 FXS 患者干细胞的平台对 FMR1 的小分子激活因子进行完整的非靶向药物筛选，这是迄今为止发表的 FMR1 化学再激活物的最大的非靶向筛选[49]。

类脑器官通过建立疾病模型代替常规实验模型进行药物筛选，减轻了药物试验的负担，有望成为药物筛选重要模型[50]。

## 6. 总结与展望

类脑器官相较动物模型更接近于大脑的功能特性，在过去的十年里，其在研究脑发育和神经元疾病的机制方面是一种非常有价值的工具，为研究神经退行性疾病提供了新的途径。类脑器官技术在精准化医疗领域有巨大的发展前景，与传统的动物模型及细胞 2D 培养互补，为探索神经系统发育、疾病模拟、药物筛选开辟了新道路。目前，已使用类脑器官进行了许多有益而有意义的研究。例如，类脑器官已成功用作检测神经发育特征并研究神经系统疾病的模型。

目前，类脑器官的研究尚处于起步阶段，克服血管化、成熟度、异质性问题一直是重中之重。为了有效地模仿人脑，还需在结构、细胞和分子水平上贴近人类胎儿、出生后、成年和老化的大脑。从长远来讲，类器官系统对于未来应对其他未知疾病、药物研发和精准治疗也有着很大的价值，将会推动更多神经系统疾病的研究，加速生物医药领域的转化，类脑器官系统的研究与应用也将会是一个长期的过程。

## 作者贡献

韩晓旭负责文献检索、论文的构思与设计、文献及资料的整理，并撰写论文初稿；张庆硕、宋丹丹、

周世越、张金璐、王晓红负责文章初稿修订；许顺良负责指导撰写思路、最终版本修订，对论文负责。

## 声明

本文无利益冲突。

## 参考文献

- [1] Luo, C., Lancaster, M.A., Castanon, R., *et al.* (2016) Cerebral Organoids Recapitulate Epigenomic Signatures of the Human Fetal Brain. *Cell Reports*, **17**, 3369-3384. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.001>
- [2] Camp, J.G., Badsha, F., Florio, M., *et al.* (2016) Human Cerebral Organoids Recapitulate Gene Expression Programs of Fetal Neocortex Development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**, 15672-15677. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520760112>
- [3] Gordon, A., Yoon, S.J., Tran, S.S., *et al.* (2021) Long-Term Maturation of Human Cortical Organoids Matches Key Early Postnatal Transitions. *Nature Neuroscience*, **24**, 331-342. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00802-y>
- [4] Zhang, W., Jiang, J., Xu, Z., *et al.* (2022) Microglia-Containing Human Brain Organoids for the Study of Brain Development and Pathology. *Molecular Psychiatry*, **28**, 96-107. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01892-1>
- [5] Edri, R., Yaffe, Y., Ziller, M.J., *et al.* (2015) Analysing Human Neural Stem Cell Ontogeny by Consecutive Isolation of Notch Active Neural Progenitors. *Nature Communications*, **6**, Article No. 6500. <https://doi.org/10.1038/ncomms7500>
- [6] Eiraku, M., Watanabe, K., Matsuo-Takasaki, M., *et al.* (2008) Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic Signals. *Cell Stem Cell*, **3**, 519-532. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.09.002>
- [7] Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., *et al.* (2011) Self-Organizing Optic-Cup Morphogenesis in Three-Dimensional Culture. *Nature*, **472**, 51-56. <https://doi.org/10.1038/nature09941>
- [8] Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C.A., *et al.* (2013) Cerebral Organoids Model Human Brain Development and Microcephaly. *Nature*, **501**, 373-379. <https://doi.org/10.1038/nature12517>
- [9] Kreffit, O., Jabali, A., Iefremova, V., *et al.* (2018) Generation of Standardized and Reproducible Forebrain-Type Cerebral Organoids from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Journal of Visualized Experiments*, No. 131, 56768. <https://doi.org/10.3791/56768>
- [10] Xiang, Y., Tanaka, Y., Patterson, B., *et al.* (2017) Fusion of Regionally Specified HPSC-Derived Organoids Models Human Brain Development and Interneuron Migration. *Cell Stem Cell*, **21**, 383-398.E7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.07.007>
- [11] Sakaguchi, H., Kadoshima, T., Soen, M., *et al.* (2015) Generation of Functional Hippocampal Neurons from Self-Organizing Human Embryonic Stem Cell-Derived Dorsomedial Telencephalic Tissue. *Nature Communications*, **6**, Article No. 8896. <https://doi.org/10.1038/ncomms9896>
- [12] Qian, X., Nguyen, H.N., Song, M.M., *et al.* (2016) Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-Bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell*, **165**, 1238-1254. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.032>
- [13] Kawada, J., Kaneda, S., Kirihara, T., *et al.* (2017) Generation of a Motor Nerve Organoid with Human Stem Cell-Derived Neurons. *Stem Cell Reports*, **9**, 1441-1449. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.09.021>
- [14] Pham, M.T., Pollock, K.M., Rose, M.D., *et al.* (2018) Generation of Human Vascularized Brain Organoids. *NeuroReport*, **29**, 588-593. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001014>
- [15] Shi, Y., Sun, L., Wang, M., *et al.* (2020) Vascularized Human Cortical Organoids (VOrganoids) Model Cortical Development *in Vivo*. *PLOS Biology*, **18**, e3000705. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000705>
- [16] Kook, M.G., Lee, S.E., Shin, N., *et al.* (2022) Generation of Cortical Brain Organoid with Vascularization by Assembling with Vascular Spheroid. *International Journal of Stem Cells*, **15**, 85-94. <https://doi.org/10.15283/ijsc21157>
- [17] Li, R., Sun, L., Fang, A., *et al.* (2017) Recapitulating Cortical Development with Organoid Culture *in Vitro* and Modeling Abnormal Spindle-Like (ASPM Related Primary) Microcephaly Disease. *Protein & Cell*, **8**, 823-833. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0479-2>
- [18] Mellios, N., Feldman, D.A., Sheridan, S.D., *et al.* (2017) MeCP2-Regulated miRNAs Control Early Human Neurogenesis through Differential Effects on ERK and AKT Signaling. *Molecular Psychiatry*, **23**, 1051-1065. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.86>
- [19] Stachowiak, E.K., Benson, C.A., Narla, S.T., *et al.* (2017) Cerebral Organoids Reveal Early Cortical Maldevelopment in Schizophrenia—Computational Anatomy and Genomics, Role of FGFR1. *Translational Psychiatry*, **7**, Article No. 6.

- <https://doi.org/10.1038/s41398-017-0054-x>
- [20] Johnstone, M., Vasistha, N.A., Barbu, M.C., *et al.* (2018) Reversal of Proliferation Deficits Caused by Chromosome 16p13.11 Microduplication through Targeting NF $\kappa$ B Signaling: An Integrated Study of Patient-Derived Neuronal Precursor Cells, Cerebral Organoids and *in Vivo* Brain Imaging. *Molecular Psychiatry*, **24**, 294-311. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0292-1>
- [21] Li, Y., Muffat, J., Omer, A., *et al.* (2017) Induction of Expansion and Folding in Human Cerebral Organoids. *Cell Stem Cell*, **20**, 385-396.E3. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.11.017>
- [22] Qian, X., Nguyen, H.N., Jacob, F., *et al.* (2017) Using Brain Organoids to Understand Zika Virus-Induced Microcephaly. *Development*, **144**, 952-957. <https://doi.org/10.1242/dev.140707>
- [23] Ma, C., Seong, H., Li, X., *et al.* (2022) Human Brain Organoid: A Versatile Tool for Modeling Neurodegeneration Diseases and for Drug Screening. *Stem Cells International*, **2022**, Article ID: 2150680. <https://doi.org/10.1155/2022/2150680>
- [24] Li, Y., Zeng, P.M., Wu, J., *et al.* (2023) Advances and Applications of Brain Organoids. *Neuroscience Bulletin*, **39**, 1703-1716. <https://doi.org/10.1007/s12264-023-01065-2>
- [25] Benito-Kwiecinski, S. and Lancaster, M.A. (2020) Brain Organoids: Human Neurodevelopment in a Dish. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **12**, a035709. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035709>
- [26] Grenier, K., Kao, J. and Diamandis, P. (2019) Three-Dimensional Modeling of Human Neurodegeneration: Brain Organoids Coming of Age. *Molecular Psychiatry*, **25**, 254-274. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0500-7>
- [27] Cakir, B., Xiang, Y., Tanaka, Y., *et al.* (2019) Engineering of Human Brain Organoids with a Functional Vascular-Like System. *Nature Methods*, **16**, 1169-1175. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0586-5>
- [28] Kim, J.Y., Mo, H., Kim, J., *et al.* (2022) Mitigating Effect of Estrogen in Alzheimer's Disease-Mimicking Cerebral Organoid. *Frontiers in Neuroscience*, **16**, Article ID: 816174. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.816174>
- [29] Gonzalez, C., Armijo, E., Bravo-Alegria, J., *et al.* (2018) Modeling Amyloid Beta and Tau Pathology in Human Cerebral Organoids. *Molecular Psychiatry*, **23**, 2363-2374. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0229-8>
- [30] Pavoni, S., Jarray, R., Nassor, F., *et al.* (2018) Small-Molecule Induction of A $\beta$ -42 Peptide Production in Human Cerebral Organoids to Model Alzheimer's Disease Associated Phenotypes. *PLOS ONE*, **13**, e0209150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209150>
- [31] Park, J., Lee, B.K., Jeong, G.S., *et al.* (2015) Three-Dimensional Brain-on-a-Chip with an Interstitial Level of Flow and Its Application as an *in Vitro* Model of Alzheimer's Disease. *Lab on a Chip*, **15**, 141-150. <https://doi.org/10.1039/C4LC00962B>
- [32] Penney, J., Seo, J., Kritskiy, O., *et al.* (2017) Loss of Protein Arginine Methyltransferase 8 Alters Synapse Composition and Function, Resulting in Behavioral Defects. *The Journal of Neuroscience*, **37**, 8655-8666. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0591-17.2017>
- [33] Raja, W.K., Mungenast, A.E., Lin, Y.T., *et al.* (2016) Self-Organizing 3D Human Neural Tissue Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate Alzheimer's Disease Phenotypes. *PLOS ONE*, **11**, e0161969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161969>
- [34] Choi, S.H., Kim, Y.H., Hebisch, M., *et al.* (2014) A Three-Dimensional Human Neural Cell Culture Model of Alzheimer's Disease. *Nature*, **515**, 274-278. <https://doi.org/10.1038/nature13800>
- [35] Yin, J. and Van Dongen, A.M. (2021) Enhanced Neuronal Activity and Asynchronous Calcium Transients Revealed in a 3D Organoid Model of Alzheimer's Disease. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **7**, 254-264. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c01583>
- [36] Chen, X., Sun, G., Tian, E., *et al.* (2021) Modeling Sporadic Alzheimer's Disease in Human Brain Organoids under Serum Exposure. *Advanced Science*, **8**, Article ID: 2101462. <https://doi.org/10.1002/advs.202101462>
- [37] Lambert, E., Saha, O., Soares, Landeira, B., *et al.* (2022) The Alzheimer Susceptibility Gene BIN1 Induces Isoform-Dependent Neurotoxicity through Early Endosome Defects. *Acta Neuropathologica Communications*, **10**, Article No. 4. <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01285-5>
- [38] Zhao, J., Fu, Y., Yamazaki, Y., *et al.* (2020) APOE4 Exacerbates Synapse Loss and Neurodegeneration in Alzheimer's Disease Patient iPSC-Derived Cerebral Organoids. *Nature Communications*, **11**, Article No. 5540.
- [39] Fiock, K.L., Smalley, M.E., Cray, J.F., *et al.* (2020) Increased Tau Expression Correlates with Neuronal Maturation in the Developing Human Cerebral Cortex. *ENEURO*, **7**, No. 3. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0058-20.2020>
- [40] Walter, J., Bolognin, S., Poovathingal, S.K., *et al.* (2021) The Parkinson's-Disease-Associated Mutation LRRK2-G2019S Alters Dopaminergic Differentiation Dynamics via NR2F1. *Cell Reports*, **37**, Article ID: 109864. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109864>



- 
- [41] Wulansari, N., Darsono, W.H.W., Woo, H.J., *et al.* (2021) Neurodevelopmental Defects and Neurodegenerative Phenotypes in Human Brain Organoids Carrying Parkinson's Disease-Linked DNAJC6 Mutations. *Science Advances*, **7**, Eabb1540. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb1540>
- [42] Zagare, A., Barmpa, K., Smajic, S., *et al.* (2022) Midbrain Organoids Mimic Early Embryonic Neurodevelopment and Recapitulate LRRK2-P.Gly2019Ser-Associated Gene Expression. *The American Journal of Human Genetics*, **109**, 311-327. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.12.009>
- [43] Boussaad, I., Obermaier, C.D., Hanss, Z., *et al.* (2020) A Patient-Based Model of RNA Mis-Splicing Uncovers Treatment Targets in Parkinson's Disease. *Science Translational Medicine*, **12**, Eaa3960. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau3960>
- [44] Szebényi, K., Wenger, L.M.D., Sun, Y., *et al.* (2021) Human ALS/FTD Brain Organoid Slice Cultures Display Distinct Early Astrocyte and Targetable Neuronal Pathology. *Nature Neuroscience*, **24**, 1542-1554. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00923-4>
- [45] Brighi, C., Salaris, F., Soloperto, A., *et al.* (2021) Novel Fragile X Syndrome 2D and 3D Brain Models Based on Human Isogenic FMRP-KO iPSCs. *Cell Death & Disease*, **12**, Article No. 498. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03776-8>
- [46] Kang, Y., Zhou, Y., Li, Y., *et al.* (2021) A Human Forebrain Organoid Model of Fragile X Syndrome Exhibits Altered Neurogenesis and Highlights New Treatment Strategies. *Nature Neuroscience*, **24**, 1377-1391. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00913-6>
- [47] Achuta, V.S., Möykkynen, T., Peteri, U.K., *et al.* (2018) Functional Changes of AMPA Responses in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Progenitors in Fragile X Syndrome. *Science Signaling*, **11**, Ean8784. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aan8784>
- [48] Park, J.C., Jang, S.Y., Lee, D., *et al.* (2021) A Logical Network-Based Drug-Screening Platform for Alzheimer's Disease Representing Pathological Features of Human Brain Organoids. *Nature Communications*, **12**, Article No. 280. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20440-5>
- [49] Hunt, J.F.V., Li, M., Risgaard, R., *et al.* (2021) High Throughput Small Molecule Screen for Reactivation of FMR1 in Fragile X Syndrome Human Neural Cells. *Cells*, **11**, Article No. 69. <https://doi.org/10.3390/cells11010069>
- [50] Shou, Y., Liang, F., Xu, S., *et al.* (2020) The Application of Brain Organoids: From Neuronal Development to Neurological Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **8**, Article ID: 579659. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.579659>