

Application Report

Qube 384およびQPatchを使用したヒトiPSC由来運動ニューロンの電気生理学的特性評価

細胞培養期間、生物物理学的特性および神経疾患表現型の研究

要旨

ヒト由来多能性幹細胞 (hi PSC) は10年前に開発され、特に心臓疾患および神経疾患における疾患モデリング、創薬、個別化医療に役立つものと大きな期待を寄せられている¹. イオンチャネルの機能不全はこれら疾患の主要な病因の1つであるため、iPS細胞技術の発展に伴い、iPS細胞の電気生理学的特性を高スループットで解析することのできる機器の必要性が高まっている. このレポートでは自動パッチクランプ装置(APC) Qube 384およびQPatchの有用性を、患者および健常者由来のhi PSC運動ニューロンを用いた3つの特性研究によって示す、内容は以下の通りである.

- APCを用いてhiPSC由来運動ニューロンより高い成功率 (Qube 60%, QPatch 30%)で記録を実施することが可能 となった。
- 健常者由来hiPSCにおける電位依存性チャネル(Na +(Na_V) およびK +(K_V))の生物物理学的特性評価
- 健常者由来hiPSCにおけるリガンド依存性チャネル(GABAA 受容体)の測定
- 脊髄性筋萎縮症(SMA)および筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者に由来するhiPSC運動ニューロンのスクリーニング
- 2人の異なる健常者に由来するhiPSC運動ニューロンの比較

序論

hiPSCは2007年に発見され、患者の体細胞を胚に似た多能性分化能を有する状態に再プログラミングできる可能性が初めて

示された $^{2.3}$. いったん細胞がhiPSCへ再プログラムされると、心筋細胞やニューロン 4 などといった細胞へ分化することができる.このことは疾患モデリング、創薬、個別化医療におけるhiPSC利用の大きな可能性を示すものである $^{5.6}$. しかし、hiPSC由来セルラインの標準化と同様に、hiPSCの再プログラミングと分化操作における品質管理はまだ開発途上段階にある 8 . そのため、これらhiPSC由来セルラインの特性評価およびスクリーニングに利用することのできる高スループット試験系の確立が強く求められている.

イオンチャネルは神経系および心血管系疾患における主要な治療標的であるため 7 、hiPSC由来セルラインを用いた電気生理学的研究は創薬領域において興味深いものとなる。このレポートではAPCプラットフォームであるQube 384およびQPatchを用いた、hiPSC由来運動ニューロンの3つの電気生理学的特性研究を紹介する。

- 1. はじめの研究では、健常者由来hiPSC運動ニューロンに発現するイオンチャネルの特性を評価した。この研究は、内因性イオンチャネル (Na_V および K_V) の薬理学的分析、リガンド依存性受容体 ($GABA_A$) の同定、細胞培養期間に対する電流の振幅および実験成功率の測定が含まれる.
- 2. 2番目の研究ではシステムの高スループット性を利用し、 SMAまたはALS患者由来のhiPSCニューロンと健常者由来の 対照群細胞、さらに同質遺伝子対照群細胞を用い、これら の細胞で同時に並行してスクリーニング試験を行った.
- 3. 3番目の研究では、2人の異なる健常者に由来す3hiPSC運動ニューロン間におけ3Na4チャネルの生物物理学的特性の変動性を評価した。

AR PUBLIC28033-5 Sophion

結果

自動パッチクランプ装置を用いたhiPSC由来運動ニューロンの スクリーニング

APCプラットフォームを使用して神経細胞研究を実施する際の主な課題は、細胞の生育性と膜の完全性を維持しながら、ニューロンネットワークから細胞をいかに分離するかということにある⁹、細胞の剥離回収およびホールセルプロトコルを最適化することでこの課題を克服し、384ウェルAPCシステムQubeを使用して最大60%の成功率得ることができた(Fig. 1).

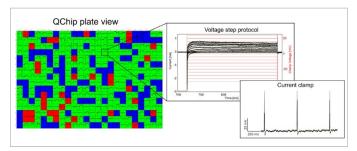


Fig. 1: Qubeを用いたhiPSC由来運動ニューロンの高スループット測定。384ウェルQChipの測定概要図は最大60%の成功率 (細胞膜抵抗値> $200M\Omega$) を実現する Qubeの高スループット性を示している。色分けは、実験の合格 (緑) または不合格 (赤・青) を表す。Qubeでは、同一実験内で電位固定実験および電流固定実験を実行できる。

中程度のスループットシステムであるQPatchを用いた実験の成功率は、最大30%であった。2つのシステム (Qube/QPatch)間で非常に類似した Na_V -および K_V -チャネル電流-電位 (IV) 相関が得られた (Fig. 2).

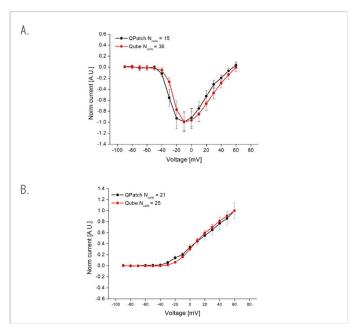


Fig. 2: hi PSC由来運動ニューロンからQPatchおよびQubeを用いて測定を行った結果、 Na_v および K_v チャネルそれぞれにおいて類似した電流-電位 (IV) 相関が得られた。 Na_v および K_v チャネルのIV相関は-90 mVから+60 mV (Δ V=+10 mV) までのステップ電位に対する電流応答によって定量化した。QPatch (黒) およびQube (赤) A: ステップ電位に対する平均 Na_v 電流(-10 mVで記録された電流によって正規化)。B: 平均 K_v 電流(+60 mVで記録された電流によって正規化)。x エラーバーはすべて標準誤差 (SEM) で表示。

研究1:hiPSC由来運動ニューロンの電気生理学的特性評価

hiPSC由来運動ニューロンの特性評価として、 Na_V および K_V -チャネルにおけるIV相関の取得(Fig. 2)、チャネル阻害薬の適用(Fig. 3)、そして γ -アミノ酪酸(GABA)で誘導される電流の記録を行った。(Fig. 4).

すべての実験において、ホールセル抵抗 (R_{men}) が200M Ω 未満の 細胞はデータ分析から除外された. 試験を実施したニューロン (N=645) の98%±2%は K_V チャネルを発現し、85%±3%は N_{aV} チャネルを発現していた $(K_V$ および N_{aV} の電流振幅が150 pA以上の細胞を解析対象とした). K_V 電流は2つの亜種に分類され、1 つはAタイプ K_V チャネル、もう1つは遅延整流 K_V チャネルとして知られる特性を示す (Fig.3A).

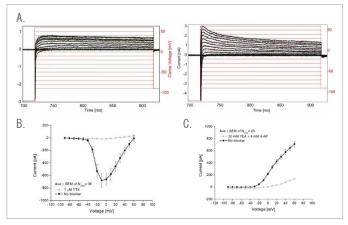


Fig. 3: hiPSC由来運動ニューロンのNa_vおよびK_vチャネルのIV相関. A: -90 mVから+ 60 mV(Δ V= +10 mV)までの電位ステッププロトコル(赤)に対する代表的な電流応答(黒). 細胞はNa_vチャネルと遅延整流性およびA- タイプK_vチャネルを発現していたことが示された. $B: Na_v$ ピーク電流の平均電流電位相関. 電流はI μ M TTX添加で完全にブロックされる. $C: 平均K_v$ 電流一電位相関. 30 mM TEAおよび4 mM 4-APの添加により、+60 mVでのK_v電流は約85%ブロックされる. エラーバーは標準誤差(SEM).

薬液を30秒後にウォッシュアウトする標準リガンド適用プロトコル (Fig. 4A) と0.8秒後に急速ウォッシュアウトする積層型リガンド適用プロトコル (Fig. 4B) を使用して、保持電位-90~mVにおいて細胞へ $100~\mu$ M GABAを添加した。その結果、最大45%の細胞においてGABA誘導電流が検出された。

BrainXell社提供の凍結保存hiPSC神経前駆細胞のバイアルを解凍する際、培養容器内で1週間の成熟が必要になる。この間に細胞は機能性を持った有糸分裂後運動ニューロンへと分化し、樹状突起ネットワークを形成する(Fig. 5A)。 Nav-、Kv-およびGABAチャネル電流を $in\ vitro$ での培養日数(DIV)の関数として定量化すると、これらのチャネルの電流振幅は時間とともに増加することが明らかになった(Fig. 5B)。しかし、樹状突起ネットワークを同時発達させながら細胞を剥離回収する手技が難しいため、実験の全体的な成功率はDIVの増加に伴って低下した(Fig. 5C)。以上の結果より、特定のイオンチャネルターゲットに対するhiPSC実験条件を最適化する際には、最良の結果を得るために、チャネル発現と実験成功率の間で最適な着地点を見つける必要がある。

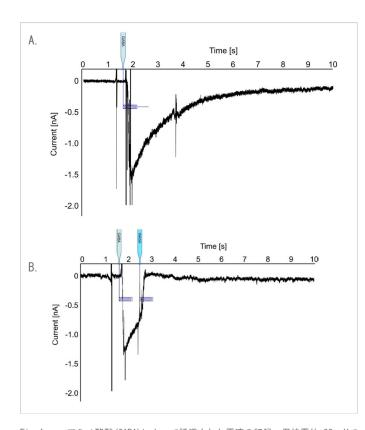


Fig. 4: アーアミノ酪酸(GABA)によって誘導された電流の記録. 保持電位-90 mVで記録された100 μM GABAの添加時の電流応答. A: 薬液適用30秒後にウォッシュアウトを行う標準リガンド適用プロトコル. B: リガンドとウォッシュアウト液が同じピペットに積み重ねて充填され, 薬液適用0.8秒後に迅速に洗浄される積層型リガンド適用プロトコル. この方法は, リガンド刺激を繰り返す実験において,電流の脱感作を緩和するのに役立つ.

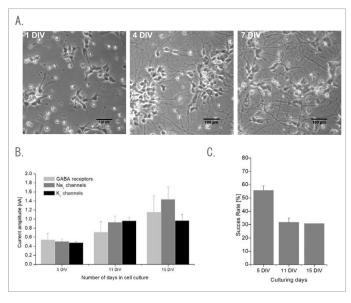


Fig. 5: in vitroでの培養日数 (DIV) の増加に伴い、電流振幅は増加し、実験の成功率は低下する。A:機能性を持った有糸分裂後運動ニューロンへと分化していくhiPSC前駆ニューロンの光学顕微鏡写真。1 DIV、4 DIV、および7 DIVで撮影。スケールバーは100 μ m。B:5 DIV、11 DIVおよび15 DIVで記録されたGABA受容体チャネル(明るい灰色、V=-90 μ mV)、Na μ Fャネル(灰色、V=0 μ mV)、 μ V/Fャネル(黒、V=40 μ MV)の電流振幅。C:5 DIV、11 DIVおよび15 DIVにおける実験成功率(μ Mm)。200 μ MQ)。エラーバーは標準誤差(SEM)。

研究2: SMAおよびALS患者由来hiPSC運動ニューロンを用いたスクリーニング試験

Qube 384を用いた中枢神経疾患の細胞特性評価および薬物スクリーニング試験の実施可能性を検証するため、 SMA^{10} または ALS^{11} 患者由来のhiPSCを使用し、その電気生理学的特性を健常者由来hiPSC(対照群)と比較した(Fig. 6-8).

SMA hiPSCについて、 Na_V および K_V チャネルそれぞれの生物物理学的特性を健常者由来のhiPSCと比較した。さらに、SMA hiPSCの一部を1 DIVおよび4 DIVにおいて化合物SMN- $C3^{12,13}1_{\mu}$ Mで処理した。SMN-C3は現在、SMA治療薬としてフェーズ I 臨床試験中である。対照群、SMA、そしてSMA + SMN-C3ニューロン同時並行測定試験の細胞配置図をFig.6に示す。複数の細胞クローンを並行してテストするために、4つの細胞懸濁液貯留槽を持つセルクローン細胞移動プレート(ccCTP)を使用した。実験プレート(QChip)上における最終細胞レイアウトは以下の通りである(Fig.6)。

- 対照群ニューロン(行1~8)
- SMAニューロン(行9~12)
- 1 μM SMN-C3存在下で培養されたSMAニューロン(行13-16)

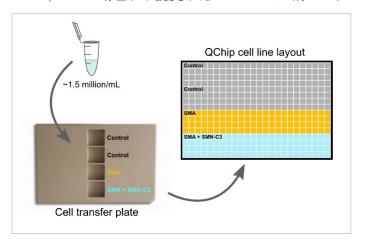


Fig. 6: SMA iPSCに対する化合物作用試験の実験レイアウト. 細胞密度150万個/mLの細胞懸濁液680 μ Lを細胞移動プレート(CTP)の4つのコンパートメントへそれぞれ添加した。QChip上における最終細胞レイアウト:対照群ニューロン(行1~8)、SMAニューロン(行9~12)、および1 μ M SMN-C3存在下で培養したSMAニューロン(行13~16).

 K_V チャネルにおけるIV相関は、これら3種のセルライン間で同様の応答を示した(データ非掲載).一方でNa_V チャネルにおけるIV相関は、先行研究と同様¹⁰に、SMAニューロンNa_Vピーク電流が対照群と比較して有意に増加した(Fig. 7AおよびBのオレンジ).1 μ MのSMN-C3存在下でSMA細胞を培養すると、このSMAニューロンNa_Vピーク電流の増加が完全に抑制された(Fig. 7AおよびBの青).セルライン間において50%活性化電位(V_{s_0})に有意な差は見られず(Fig. 7CおよびD),細胞膜容量にも変化はなかった(データ非掲載).

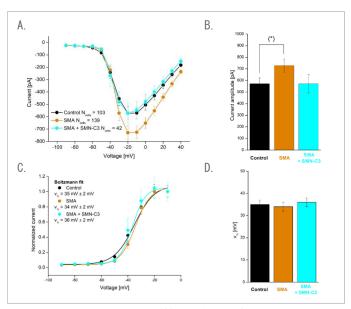


Fig. 7: SMAニューロンNa_vチャネル特性に対する化合物作用の評価. 対照群ニューロン(黒), SMAニューロン(オレンジ) および培養中にSMN-C3で処理した SMAニューロン(青). A: 平均Na_v電流電位相関. B: V = -20 mVにおける電流振幅の定量. 電流振幅は対照群と比較してSMA細胞群において有意に増加した(t検定, p <0.05(*), 95%信頼区間) C: V = -20 mVにおける電流値で正規化した平均Na_v電流. ボルツマン関数によるフィッティング(実線)より,50%活性化電位 (V_s) を算出. D:50%活性化電位 (V_s) 値. エラーバーはSEM.

ALSニューロンは、SOD1遺伝子 (ALS D90A) に疾患を引き起こす単一の点突然変異を含むことが示されている 11 . そこで、対照群、ALSニューロン (ALS D90A) および同質遺伝子対照群 (ALS D90D) を用いて試験を実施した (Fig. 8). その結果対照群と比較してALS D90AニューロンNa_Vピーク電流は有意に増加し、これはSOD1遺伝子の単一点変異である同質遺伝子セルラインALS D90Dにおいて打ち消された (Fig. 8AおよびB). セルライン間において50%活性化電位 (V_{3}) に有意な差は見られなかった (Fig. 8C およびD)

ヒトiPS細胞技術はまだ標準化されたiPS細胞としての状態が定まっておらず、再プログラミングおよび分化プロトコル中の品質管理によって遺伝的な多様性を生じる可能性があり、これらは未だ開発中の領域であることを付記しておく⁸. したがって、何らかの確固たる結論を出す前に、遺伝的な完全性が確認されたhiPSCを用いて、複数の個人から得られた対照および疾患細胞群を比較することを推奨する.

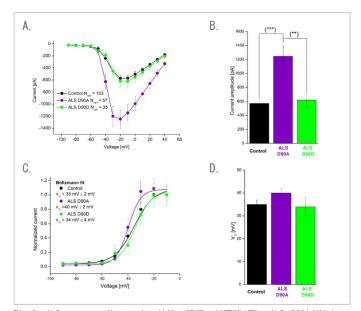


Fig. 8: ALSニューロン Na_V チャネル特性の評価. 対照群(黒), ALS D90A(紫) および同質遺伝子レスキューALS D90D(緑). A: 平均 Na_V 電流電位相関. B: V=-20 mVにおける電流振幅の定量. 電流振幅はALS D90A細胞において対照群(t検定, p <0.001(***), 95%信頼区間)または<math>ALS D90D細胞(t検定, p <0.01(**), 95%信頼区間)よりも有意に大きかった. <math>C: V=-20 mVにおける電流値で正規化した平均 Na_V 電流. ボルツマン関数によるフィッティング(実線)より,50%活性化電位(V_V)を算出. D: 50%活性化電位(V_V)値. V=-V0~10%に

研究3:2人の異なる健常者に由来するhiPSC運動ニューロン間におけるNa_vチャネル特性の変動性評価

異なるhiPSCクローン間における電気生理学的表現型の再現性評価の初期指標として、細胞供給元1および2それぞれに由来する2人の異なる健常者由来hiPSC運動ニューロン Na_V チャネルの特性評価を行った。

 K_v チャネルによる影響を回避するため、細胞内液および細胞外溶液にはK *を添加せずに実験を行った。また Ca_v 電流を除去するため、 $0.2\,\mathrm{mM}\,CdCl_2$ を細胞外溶液に添加した、 Na_v 電流は、ここまで用いてきた Na_v IV相関取得実験と同様の電位プロトコルを用いて誘導した $(Fig.\ 9A)$. その結果、これら2つの細胞供給元間で電流振幅と50%活性化電位 (V_v) の両方に有意差があることが明らかとなった $(Fig.\ 9BおよびCe$ 参照).

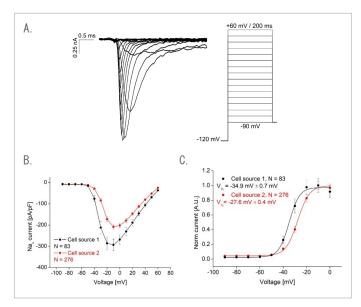


Fig. 9:2人の異なる健常者由来のhiPSC運動ニューロンにおけるNa、電流活性化. A:代表的なNa、電流応答(左)は-90 mVから+60 mVまで+10 mV刻みの脱分極ステップ(右)によって誘導された。B:細胞供給元1(黒)および細胞供給元2(赤)の電位変化に対する平均Na、電流を細胞膜容量で正規化しプロットした。C:V=-15 mVにおける電流値で正規化された細胞供給元1(黒)および細胞供給元2(赤)のNa、電流・ボルツマン関数によるフィッティング(実線)により50%活性化電位($V_{\rm s}$)を算出した。細胞供給元1-34.9 mV±0.7 mV 細胞供給元2-27.6 mV±0.4 mV. 各データポイント数は83細胞(供給元1)もしくは276細胞(供給元2)の平均±SEM.

Navチャネルの不活性化電流は、異なるコンディショニング電位 (+10 mV刻みで-90 mVから0 mV) から+10 mVへの脱分極ステップパルス刺激によって誘導された (Fig. 10A). 正規化された不活性化電流をコンディショニング電位に対してプロット (Fig. 10B) することで、細胞供給元2の不活性化電流が細胞供給元1に対して有意に右へシフトしていることが明らかとなった。Nav電流回復は、10回連続した+ 10 mVまでの脱分極刺激を用いて定量化した (Fig. 10C)。各電位プロトコルの実行ごとに刺激間隔を1 msから開始し、増分 (Δ t) 50%ずつで延長させていった。2番目のピーク電流振幅を1番目のピーク電流振幅を用いて正規化し、 Δ tの関数としてプロットした (Fig. 10D)。プロットデータを一次指数関数でフィッティングすることにより、2つの細胞供給元間におけるNavチャネル回復時間に有意な差があることが明らかになった。

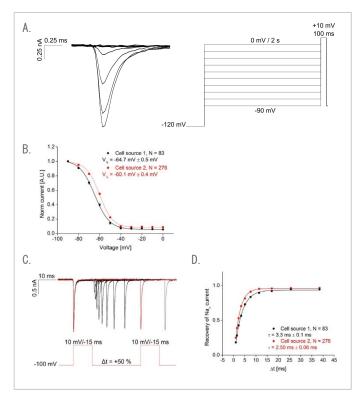


Fig. 10: 2人の異なる健常者由来のhiPSC運動ニューロンにおけるNav電流の不活性化と回復. A: 異なるコンディショニング電位から+10 mVへの脱分極ステップパルス刺激(10 mV刻みで-90 mVから0 mV)(右)によって誘導される代表的な電流応答(左). B: 脱分極ステップパルス刺激(+10 mV)によるNav電流は、-90 mVコンディショニング電位で誘導された電流を用いて正規化し、コンディショニング電位の関数としてブロットした. ボルツマン関数によるフィッティング(実線)により、細胞供給元1(黒)で-64.7 mV±0.5 mVおよび細胞供給元2(赤)で-60.1 mV±0.4 mVの50%不活性化電位(V_{u})が得られた。C: 刺激間隔を1 msから開始し、電位プロトコルの実行ごとに刺激間隔を増分(Δ t)50%ずつ延長させる10回連続脱分極刺激時の代表的なNav電流トレース(上). D: 2番目のピーク電流振幅を1周いて正規化し、正規化された電流を Δ tの関数としてプロットすることによりNav電流回復を定量化した。一次指数関数でデータフィッティング(実線)することで、細胞供給元1(黒)では3.3 ms±0.1 ms 細胞供給元2(赤)では2.50 ms±0.06 msの時定数(τ)が得られた。各データポイント数は、83細胞(黒)または276細胞(赤)の平均±SEM.

2人の異なる健常者由来のhiPSC運動ニューロン間で、Na_Vチャネルの電気生理学的性質には僅かながらも有意な変動があることをデータは示している。これらは、1)遺伝的背景の違い、2)hiPSC分化時におけるクローン間のばらつき、または3)hiPSC成熟時における系統間のばらつきによって引き起こされている可能性が考えられる。病態生理学的な真の表現型を特定するためにhiPSC由来の疾患モデルを研究する際には、これらのばらつきを考慮する必要がある。

結論

これらの結果は、自動パッチクランプシステムであるQube 384 およびQPatchを用いてhiPSC由来運動ニューロンの電気生理学的性質を評価する試験を実施できる可能性を示し、神経疾患におけるイオンチャネルを標的とした高スループット薬物スクリーニング、診断、および精密医療への道を拓いた。

方法

細胞: 脊髄運動ニューロンは以下のヒトhiPSC系統より作製した: 健常コントロール (WC30), 無症候性 SMA キャリア (GM03815), SMAタイプ I (GM00232), D90A SOD1変異を持つALS, D90D SOD1同質遺伝子コントロール (ND29149). D90D hiPSC系統は, TALEN技術***を使用してD90A SOD1変異を修正することにより確立された. 指示された分化は, 記述通りに実施した***100 μM SMN-C3を用いた実験では, 最終濃度が1 μMとなるよう培地と事前に混合し, *in vitro*での培養開始後1日目および4日目に添加した. BrainXell社プロトコルに従い5~15日間培養した後, 培地を除去してから細胞をPBSで2回洗浄し, T25細胞フラスコあたり2 mLのAccumax™を添加し37°Cで7分間インキュベートしたのち細胞を回収した. その後6 mLの培地を加えて細胞を遠心沈殿させ(4分, 150 x g), 目的の細胞密度まで細胞外溶液を用いて再懸濁した.

実験溶液:細胞内液および細胞外液の組成については、ソフィオンバイオサイエンスにお問い合わせ下さい.

 K_V および Na_V チャネルのI-V相関: π 位プロトコル:プロトコルは、-120 mVで700 msの事前ステップ電位と、それに続く-90 mVから+60 mVまで(Δ V= +10 mV)200 msの電位ステップで構成された. 化合物:電位プロトコル2回目の実行前に、1 μ M TTX (Na_V 阻害薬)または30 mM TEAと4 mM 4-AP (K_V 阻害薬)の組み合わせを細胞に適用した. 解析:膜抵抗 (R_{men})200M Ω 以下および電流振幅(I)150 pA以下の細胞は解析から除外した. Na_V ピーク電流は脱分極刺激開始後2.5 ms以内から抽出した. Na_V 活性化曲線は、V=-15 mVのピーク電流振幅を用いて正規化し作成した. 平均 K_V 電流は脱分極刺激開始後890 msから920 msの範囲で抽出した.

GABA誘導電流:作動薬の添加:100 μM GABAをV = −90 mVで追加した.

Nay チャネルの生物物理学的特性評価: 電位プロトコル:活性化:上記参照. 不活性化: -120 mVで700 msの事前ステップ電位に続き-90 mVから0 mV(Δ V= +10 mV)まで2秒間の電位ステップ、引き続き+10 mV 100 msのステップ脱分極より電位プロトコルは構成された. 回復:このプロトコルは, -100 mVから-15 mVまで10 msの10連続した脱分極刺激で構成され、刺激間隔は1 msから始まり脱分極刺激実行ごとに増分(Δ t)50%ずつ延長された. 解析: 膜抵抗 R_{mem} <1000 M Ω および電流振幅 I <200 pAの細胞は解析から除外された. 活性化:上記解析参照. 不活性化:プロトコルの最終脱分極ステップにおけるNay ピーク電流は脱分極刺激入力後2.5 ms以内から抽出された. Nay 不活性 化曲線は、ピーク電流を固定電位-90 mVで記録された電流振幅で正規化することにより作成された. 回復:2回目の脱分極Nay

Sophion Bioscience A/S

sophion.co.jp - E-mail: info@sophion.co.jp

ピーク電流は脱分極刺激入力後2.5 m以内より抽出し, 1回目の 脱分極刺激時に対する電流振幅を用いて正規化した.

謝辞

すべてのセルラインはBrainXell Inc.から提供されたものである. Mike Hendrickson(プロジェクトマネージャー, BrainXell Inc.)およびPaul Guyett(博士研究員, BrainXell Inc.)の継続的な科学的な見地からのサポートに著者一同感謝申し上げる.

References:

- Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C. & Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. Nature Reviews Drug Discovery 16, 115-130 (2017).
- Yu, J. et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. Science 318, 1917-1920 (2007).
- Takahashi, K. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell 131, 861-872 (2007).
- Bellin, M., Marchetto, M. C., Gage, F. H. & Mummery, C. L. Induced pluripotent stem cells: the new patient? Nature Reviews Molecular Cell Biology 13, 713-726 (2012).
- Ko, H. C. & Gelb, B. D. Concise Review: Drug Discovery in the Age of the Induced Pluripotent Stem Cell. STEM CELLS Translational Medicine 3, 500-509 (2014).
- Grskovic, M., Javaherian, A., Strulovici, B. & Daley, G. Q. Induced pluripotent stem cells - opportunities for disease modelling and drug discovery. Nature Reviews Drug Discovery 10, 915-929 (2011).
- Dunlop, J., Bowlby, M., Peri, R., Vasilyev, D. & Arias, R. Highthroughput electrophysiology: an emerging paradigm for ion-channel screening and physiology. Nature Reviews Drug Discovery 7, 358-368 (2008)
- 8 Popp, B. et al. Need for high-resolution Genetic Analysis in iPSC: Results and Lessons from the ForIPS Consortium. Scientific Reports 8, (2018).
- Raman, I. M. & Bean, B. P. Resurgent Sodium Current and Action Potential Formation in Dissociated Cerebellar Purkinje Neurons. The Journal of Neuroscience 17, 4517-4526 (1997).
- Liu, H. et al. Spinal muscular atrophy patient-derived motor neurons exhibit hyperexcitability. Scientific Reports 5, (2015).
- Chen, H. et al. Modeling ALS with iPSCs Reveals that Mutant SOD1 Misregulates Neurofilament Balance in Motor Neurons. Cell Stem Cell 14, 796-809 (2014).
- Naryshkin, N. A. et al. SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy. Science 345, 688-693 (2014).
- Cully, M. Beefing up the right splice variant to treat spinal muscular atrophy: Neuromuscular disorders. Nature Reviews Drug Discovery 13, 725-725 (2014).
- Du, Z.-W. et al. Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells. Nature Communications 6, (2015).

Author:

Kadla R Rosholm, Application scientis