

317-327.

- [35] Shafiq N, Malhotra S, Pandhi P. Anticonvulsant action of celecoxib (alone and in combination with sub-threshold dose of phenytoin) in electroshock induced convulsion. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2003, 25(2): 87-90.
- [36] Fischborn SV, Soerensen J, Potschka H. Targeting the prostaglandin E2 EP1 receptor and cyclooxygenase-2 in the amygdala kindling model in mice. *Epilepsy Res*, 2010, 91(1): 57-65.
- [37] Polascheck N, Bankstahl M, Loscher W. The COX-2 inhibitor parecoxib is neuroprotective but not antiepileptogenic in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol*, 2010, 224(1): 219-233.
- [38] Holtman L, van Vliet EA, van Schaik R, et al. Effects of SC58236, a selective COX-2 inhibitor, on epileptogenesis and spontaneous seizures in a rat model for temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, 2009, 84(1): 56-66.
- [39] Baik EJ, Kim EJ, Lee SH, et al. Cyclooxygenase-2 selective inhibitors aggravate kainic acid induced seizure and neuronal cell death in the hippocampus. *Brain Res*, 1999, 843(1-2): 118-129.
- [40] Loscher W, Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci*, 2005, 6(8): 591-602.
- [41] Liu JY, Thom M, Catarino CB, et al. Neuropathology of the blood-brain barrier and pharmacoresistance in human epilepsies. *Brain*, 2009, 132(10): 2671-2685.
- [42] Zibell G, Unkrue B, Pekcec A, et al. Prevention of seizure-induced up-regulation of endothelial P-glycoprotein by COX-2 inhibition. *Neuropharmacology*, 2009, 56(5): 849-855.
- [43] Stack JH, Beaumont K, Larsen PD, et al. IL-converting enzyme/caspase-1 inhibitor VX-765 blocks the hypersensitive response to an inflammatory stimulus in monocytes from familial cold autoinflammatory syndrome patients. *J Immunol*, 2005, 175(4): 2630-2634.
- [44] Maroso M, Balosso S, Ravizza T, et al. Interleukin-1 beta biosynthesis inhibition reduces acute seizures and drug resistant chronic epileptic activity in mice. *Neurotherapeutics*, 2011, 8(2): 304-315.
- [45] Ravizza T, Lucas SM, Balosso S, et al. Inactivation of caspase-1 in rodent brain: a novel anticonvulsive strategy. *Epilepsia*, 2006, 47(7): 1160-1168.
- [46] Pellock JM, Hrachovy R, Shinnar S, et al. Infantile spasms: a U. S. consensus report. *Epilepsia*, 2010, 51(10): 2175-2189.
- [47] Vincent A, Irani SR, Lang B. The growing recognition of immunotherapy-responsive seizure disorders with autoantibodies to specific neuronal proteins. *Curr Opin Neurol*, 2010, 23(2): 144-150.
- [48] 余年, 狄晴. 炎性反应与癫痫. 国际神经病学神经外科学杂志, 2009, 36(4): 341-344.

## 诱导性多能干细胞研究进展及其在帕金森病中的应用

杜阳 综述 肖波, 冯莉, 唐薇婷 审校  
中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008

**摘要:** 2006 年 Takahashi 小组将 4 种转录因子导入小鼠成纤维细胞, 令其重编程为具有胚胎干细胞特性的诱导性多能干细胞(iPS 细胞), 该成果开启了干细胞研究的新篇章。近年, 研究者们就如何提高体细胞重编程效率及安全性, 进而推动 iPS 细胞在临床领域的应用, 展开了广泛研究。应用 iPS 细胞作为细胞移植供体已成为帕金森病细胞移植治疗研究的新热点, 而帕金森病患者特异性 iPS 细胞的获取更为研究帕金森病发病机制、新药筛选及疗效评估提供了新工具。

**关键词:** 诱导性多能干细胞; 帕金森病; 细胞移植; 治疗

帕金森病是一种常见的中老年神经变性疾病

病, 为中脑黑质-纹状体内的多巴胺能神经元选择

**基金项目:** 国家自然科学基金(81000553)

**收稿日期:** 2012-06-26; **修回日期:** 2012-12-05

**作者简介:** 杜阳(1987-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事癫痫发病机制的研究。

**通讯作者:** 冯莉(1982-), 女, 博士, 主治医师, 主要从事癫痫发病机制的研究。E-mail: fengli1982@yahoo.com.cn。

性丢失,导致多巴胺分泌减少,引起慢性进展性的运动功能障碍。由于变性的多巴胺能神经元位置局限,解剖位置清楚,过去人们多尝试用神经干细胞、胚胎干细胞等细胞移植方法补充丢失的多巴胺能神经元,试图达到阻止病程进展或逆转疾病的目的。但该种方法应用的细胞来源有限,且涉及社会伦理问题,从而限制了其进一步应用。在此背景下,诱导多能干细胞技术则应运而生。诱导多能干细胞技术是指通过分子水平的技术处理,使已完成分化的各类型细胞发生“逆转”,重新恢复为原来的具有多向分化潜能的多能干细胞,这种新获得的多能干细胞被称之为诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS 细胞)。它不仅为帕金森病细胞移植提供了新的、更优良的细胞来源,与此同时,由帕金森病患者体细胞重编程而来的 iPS 细胞的诞生也为研究帕金森病发病机制、药物筛选提供了新工具。本文就诱导性多能干细胞技术的进展及其在帕金森病中的应用进行综述。

## 1 诱导性多能干细胞的诞生

多能干细胞是指有能力分化为各种特殊类型细胞的细胞,在特定条件下,可诱导其定向分化为特定类型干细胞,并最终分化为目的细胞,从而用于移植替代治疗,其在再生医学领域的应用十分广泛。但为获取多能干细胞或健康的各类型干细胞,通常需要从异体甚至胚胎取材,该问题一度饱受争议,阻碍了它的进一步研究。科学家们转而致力于通过其它手段获取多能干细胞。

在胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)逐步分化为体细胞的过程中,尽管前者逐渐丧失其全能性,不再具有发育成其它类型体细胞的能力,然而,若能通过某些处理,令这些体细胞的“记忆”消除,则可使其生长和发育程序逆转,最终恢复到原来的多能状态,这个过程我们称之为体细胞重编程。过去已有的体细胞重编程方法包括:①将体细胞核移植入卵母细胞,利用卵母细胞胞质中的全能物质令核发生重编程;②体细胞与胚胎干细胞融合,利用胚胎干细胞的全能物质实现核的重编程;③将体细胞与多能干细胞抽提物共孵育以实现重编程<sup>[1]</sup>。

上述体细胞重编程方法均为通过多能干细胞的参与,开启体细胞重编程“程序”,于是 Takahashi 小组猜想多能干细胞中可能有一些特异性因子与维持 ES 细胞全能状态密切相关。2006 年至 2007

年,Takahashi 小组筛选出 24 个全能相关性候选因子进行排列组合测试,并确定其中 Oct4、Sox2、Klf、c-Myc 四种因子为诱导体细胞重编程所必须<sup>[2,3]</sup>。他们先后通过逆转录病毒将 Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4 四种因子导入小鼠和人成纤维细胞,并通过筛选最终获得一些具有胚胎干细胞特性的细胞,称为 iPS 细胞。该技术只需要特异性转录因子的导入,便可诱导完成体细胞重编程,具有简单、易操作、无需破坏胚胎等优点,这一里程碑式的研究成果将体细胞重编程的研究方向转入新的阶段,开启了体细胞重编程的新纪元。在随后几年内,众多实验室先后尝试将不同转录因子组合导入体细胞,以提高重编程效率,提升重编程安全性。皮肤成纤维细胞、造血细胞、B 淋巴细胞、神经干细胞、肝细胞甚至乳腺肿瘤细胞等相继被重编程为 iPS 细胞<sup>[4]</sup>,这说明具备重编程能力的细胞不局限于特定的组织来源及特定分化阶段,当然,不同来源或不同发育阶段的细胞重编程为 iPS 细胞的难易程度不同、所需转录因子组合不同,效率也不同。

此外,从患有某种基因相关性疾病的患者身上提取体细胞进行重编程,将产生的 iPS 细胞在体外培养、扩增,可建立稳定的疾病特异性 iPS 细胞系,其保留了患者身上特有的基因组学特征,为研究疾病的发病机制、筛选新药提供了方便。迄今,帕金森病、亨廷顿病、腺苷脱氨酶严重复合型免疫缺陷病、唐氏综合征、青少年 1 型糖尿病、肌萎缩侧索硬化症、杜氏肌营养不良症等疾病特异性 iPS 细胞已先后产生<sup>[5-7]</sup>。

## 2 iPS 细胞的特性

iPS 细胞是否完全等同于 ES 细胞呢?这个问题对于 iPS 是否能真正应用于临床至关重要。首先,iPS 细胞与 ES 细胞在染色体组型、基因表达及分化模式方面非常相似,大量实验资料显示 iPS 细胞在克隆形态、生长特性、表面标志物、基因表达模式、表观遗传学特征等方面与 ES 细胞具有较高相似度。第二,将 iPS 细胞注入免疫缺陷小鼠皮下,可形成包含所有三个胚层组分的畸胎瘤;注入二倍体囊胚后会形成嵌合体小鼠<sup>[2]</sup>,这说明与胚胎干细胞一样,iPS 细胞可分化为所有 3 个胚层(内、中、外胚层)以及三个胚层来源的所有细胞。第三,iPS 细胞也具有无限的自我更新能力,能够维持数量上的稳定,为建立 iPS 细胞系与移植提供了可能。而较之 ES 细胞,iPS 细胞更有其独特优势,

如来源丰富,且利用自体细胞重编程获得的 iPS 细胞进行细胞移植,可以避免个体、种属差异所致的免疫排斥问题。iPS 细胞上述特性为细胞移植治疗开辟了新天地。

当然微观生物学检测提示 iPS 细胞与 ES 细胞并非完全一样,这些微小差异可能一方面为体细胞重编程效率低下的原因,另一方面导致了细胞异常增殖、肿瘤形成这一结果,这将限制其临床应用研究的推进,因此了解体细胞重编程的具体机制及微观调控非常重要<sup>[8]</sup>。为了在保证重编程效率与降低风险两者中寻找平衡,科学家们作出了以下尝试。

### 3 体细胞重编程的关键问题

#### 3.1 提高 iPS 细胞诱导效率

目前,提高 iPS 细胞诱导效率的方法包括:①在诱导体系中加入化学物质,如 Ding 小组利用 Oct4 和 Klf4 诱导神经干细胞重编程时加入 BIX-01294(G9a 组蛋白甲基转移酶抑制剂)。②调控某些基因的表达,如 miR-106a-363 簇及 miR-302-367 的表达可提高小鼠体细胞重编程效率,p53 基因表达的下调可提高细胞重编程效率。③改进诱导方法,如在诱导体系中加入 SV40 大 T 抗原,可使诱导效率提高 23~70 倍。④在许多体细胞分化过程中,抗重编程、肿瘤抑制机制被激活,是重编程效率低下的原因之一,因此,通过增强对抗重编程将提高重编程的效率。

#### 3.2 改进 iPS 细胞的诱导方法

特异性转录因子的导入需要载体的帮助。常用的载体为逆转录病毒、慢病毒<sup>[9, 10]</sup>。随着特异性转录因子的导入,上述病毒也会整合入宿主细胞原基因组,成为安全隐患。因此,优化载体也是 iPS 细胞研究的热点。Stadtfeld 等<sup>[11]</sup>利用非整合性腺病毒作为载体,可以解决病毒基因整合入宿主细胞基因组的问题,但与整合性病毒载体比较,其介导的重编程效率有所降低。转座子<sup>[12]</sup>介导体系同样获得了成功,而 piggy Bac 转座子诱导体系的重编程效率与逆转录病毒诱导体系相当。

iPS 细胞诱导方法需要改进的另一方面是特异性转录因子的简化。前文已提及特异性转录因子插入宿主细胞的潜在风险。后续研究表明通过加入一些化学物质可以取代或减少外源性转录因子加入的个数,且极大的提高重编程效率,如 BIX、Bay 与 Oct4、Klf4 组合,可以代替 Sox<sup>[13]</sup>。Soldner

等<sup>[14]</sup>应用多西环素(DOX)介导的携有 loxP 剪切位点的慢病毒载体,将四种特异性转录因子导入 PD 患者的成纤维细胞,成功获取 iPS 细胞后,利用 Cre 重组酶剪切外源 DNA,获得了无转录因子整合的 iPS 细胞。

#### 4 iPS 细胞在帕金森病中的应用

帕金森病是一种以中脑黑质-纹状体内多巴胺能神经元选择性丢失为特征的中枢神经系统退行性疾病。细胞移植治疗将多巴胺能神经元植入黑质纹状体,旨在达到神经再生,即在移植部位重建神经环路,恢复多巴胺能神经元的生理功能<sup>[4]</sup>。过去对细胞移植治疗的研究已经有了一定积累:将胎儿中脑多巴胺能神经元植入帕金森病患者的双盲实验中,患者的运动障碍明显改善,尽管术后 57% 的患者仍出现了运动并发症<sup>[15, 16]</sup>;将人胚胎干细胞衍生的多巴胺能神经元植入 PD 大鼠、小鼠模型,同样获得了一定疗效。但是获取上述两种细胞均需破坏胚胎,取之有限,且有违社会伦理。人诱导性多能干细胞(human induced pluripotent stem cell, hiPS 细胞)的诞生为细胞移植提供了更优良的供源,它取材方便,可在体外建立稳定的 iPS 细胞系,若从患者自身体细胞重编程得到 iPS 细胞,更能避免个体差异造成的移植后免疫排斥反应,是进行细胞移植的良好材料<sup>[5, 17]</sup>。

当然, iPS 细胞应用于 PD 细胞移植治疗的研究尚处于起步阶段,许多问题有待解决,例如如何高效的将 iPS 细胞定向分化为多巴胺能神经元,多巴胺能神经元的纯化、培养。过去, Hwang 等<sup>[18]</sup>和 Takahashi<sup>[4]</sup>总结了多种诱导 ES 细胞定向分化为多巴胺能神经元的方法,通过优化培养条件、修饰基因、调节胞内信号转导可以进一步提高分化效率。目前,多个实验室采用与以上诱导 ES 细胞定向分化的方法在体外将 iPS 细胞也诱导为多巴胺能神经元。

iPS 细胞移植的在体研究也取得了一定进展。Wernig 等<sup>[17]</sup>将 iPS 细胞悬浮培养形成拟胚体,通过无血清培养基筛选得到了大量神经上皮样细胞,这些细胞不仅具有神经前体细胞的典型形态,还均匀表达神经干细胞的表面标志物 nestin、Sox2 和 Brn2 等,将 iPS 细胞来源的神经前体细胞亚克隆移植入处于胚胎期 13.5~14.5 d 的鼠胚侧脑室,在分娩后的 1~9 周内对其进行动态观测,可见它们广泛迁移到大脑各个区域,分化成如谷氨酸能、γ-氨基

丁酸能、酪氨酸羟化酶阳性的儿茶酚胺能等各型神经细胞,与周围的神经细胞形成广泛的突触联系,并检测到自发动作电位;若这些 iPS 衍生的神经前体细胞在添加 Shh、FGF8 的培养基中继续培养,可最终分化为  $\beta$ -III-tubulin<sup>+</sup>、TH<sup>+</sup>,且携带中脑多巴胺能神经元标志物 EN1、Pitx3、Nurr1 的神经元,将这些多巴胺能样神经元植入 PD 大鼠模型的纹状体,可明显改善大鼠的偏侧旋转运动,但可能一方面由于植入前未将部分未分化的 iPS 细胞筛选干净,另一方面由于外源性转录因子的插入,形态学随访检测到脑组织内有畸胎瘤形成。针对这一问题, Wernig 等<sup>[17]</sup>应用 FACS 流式细胞术将 SSEA1<sup>+</sup>细胞剔除后,再植入动物模型,结果 8 周后未观察到畸胎瘤形成。Chang 等<sup>[19]</sup>通过 DHA 下调 ES 细胞多能性因子 Oct4、c-Myc 的表达能够抑制移植后畸胎瘤的形成,同时,通过激活 Nurr1 基因及 Nurr1 相关通路可促进 iPS 细胞向 TH<sup>+</sup>细胞分化、提高多巴胺能神经元移植后的存活率,能够上调神经保护性基因 (Bcl-2、Bcl-xL、BDNF 及 GDNF),并能减少 MPTP 诱导的神经前体细胞凋亡。

Hargus 等<sup>[20]</sup>从帕金森病患者体细胞重编程得到了无外源性转录因子插入的 hiPS 细胞,并植入 PD 大鼠模型。植入的 hiPS 细胞 50% 衍生了 TH 阳性和 Girk2 阳性的多巴胺能样神经元,但未见黑质-A9 多巴胺能神经前体细胞标志物 FOXA2 阳性的细胞,而帕金森病患者丢失的即黑质-A9 多巴胺能神经元,研究表明其在植入纹状体后存活率最好<sup>[21, 22]</sup>。该实验进行至 16 周时,PD 大鼠的运动功能障碍明显减轻,但未见完全缓解的个体。由于这种从帕金森病患者身上获取的 iPS 细胞可能仍然携带 PD 致病基因,猜测移植后可能再次出现多巴胺能神经元变性丢失<sup>[29]</sup>。不过本实验中未检测到任何神经退行性变的组织形态学变化。

Sánchez-Danés 等<sup>[23]</sup>通过使 iPS 细胞衍生的神经前体细胞中 LMX1A 过表达,诱导其分化得到的多巴胺能神经元从细胞标志物、生理学特性以及植入术后生存率和整合到纹状体的能力来看,与黑质-A9 多巴胺能神经元几乎一样。这种经改善的诱导方法使 iPS 细胞应用于细胞移植治疗更接近现实。

另外,从 PD 患者自体细胞重编程而来的 PD 患者特异性 iPS 细胞可以完全复制某个帕金森病患者的基因模式,即携带患者个体中与该疾病相关的全部遗传信息,建立真正意义上的 PD 模型,它为

研究帕金森病内在发病机制提供了良好平台,并可用于 PD 药物的筛选及疗效评估<sup>[14]</sup>。

2011 年有 2 组实验室在这方面取得了成果: Nguyen 等<sup>[24]</sup>获取了携带 LRRK2 基因 p. G2019S 突变的 PD 患者特异性 iPS 细胞,并发现该 iPS 细胞分化而来的多巴胺能神经元的氧化应激基因及突触核蛋白基因表达增多,并且对过氧化氢、MG-132、6-OH-DA 等刺激更敏感; Devine 等<sup>[25]</sup>获取了携带  $\alpha$ -synuclein (SNCA) 三拷贝基因的 PD 患者特异性 iPS 细胞,并最终分化为多巴胺能神经元,其中  $\alpha$ -synuclein 的表达是对照组的 2 倍。

## 5 展望

iPS 细胞的问世在干细胞、再生医学领域具有里程碑式的意义,近年来,对 iPS 细胞的研究取得了很多突破性进展,获取 iPS 细胞的体细胞重编程技术日益革新,在不久的未来,必将应用于临床,发挥其价值。目前,在开展 iPS 细胞治疗帕金森病临床应用研究前,还有一系列问题亟待解决:①体细胞重编程的分子机制、微观调控机制的研究尚未深入,hiPS 细胞的安全应用存在不可预知的风险。②制备 hiPS 细胞效率偏低。③干细胞自我更新与分化机制仍处于研究阶段,目前体外诱导 iPS 细胞定向分化为多巴胺能神经元的方法需要提升其精确性及高效性。④筛选、纯化分化的多巴胺能神经元,以防止植入后的畸胎瘤形成。⑤移植后能否长期改善帕金森病患者症状,这一点可能以后还会结合基因治疗,将帕金森病患者 iPS 细胞进行基因修饰,然后将所得的健康细胞“回输”患者。⑥充分评估临床应用的安全性。我们相信,随着体细胞重编程技术的不断革新,iPS 细胞移植技术必将在神经科学领域发挥更重要的作用,为帕金森等神经退行性疾病的治疗带来新的曙光。

## 参 考 文 献

- [1] Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2007, 1 (1): 39-49.
- [2] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126 (4): 663-676.
- [3] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131 (5): 861-872.
- [4] Takahashi J. Stem cell therapy for parkinson's disease. Ex-

pert Rev Neurother, 2007, 7(6): 667-675.

- [5] Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 2008, 134(5): 877-886.

- [6] Oshimura M, Kazuki Y, Uno N. Challenge toward gene-therapy using iPS cells for Duchenne muscular dystrophy. *Rinsho Shinkeigaku*, 2012, 52(11): 1139-1142.

- [7] Inoue H. ALS patient-specific iPS cells. *Rinsho Shinkeigaku*, 2012, 52(11): 1137-1138.

- [8] Nishikawa S, Goldstein RA, Nierras CR. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(9): 725-729.

- [9] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-1920.

- [10] Kaji K, Norrby K, Paca A, et al. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, 2009, 458(7239): 771-775.

- [11] Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 2008, 322(5903): 945-949.

- [12] Wolz K, Michael IP, Mohseni P, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, 458(7239): 766-770.

- [13] Shi Y, Desponts C, Do JT, et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(5): 568-574.

- [14] Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, 2009, 136(5): 964-977.

- [15] Freed CR, Greene PE, Breeze RE, et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 2001, 344(10): 710-719.

- [16] Kim JB, Zehres H, Wu G, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 2008, 454(7204): 646-650.

- [17] Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, et al. Neurons derived from

reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with PD. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(15): 5856-5861.

- [18] Hwang DY, Kim DS, Kim DW. Human ES and iPS cells as cell sources for the treatment of Parkinson's disease: current state and problems. *J Cell Biochem*, 2010, 109(2): 292-301.

- [19] Chang YL, Chen SJ, Kao CL, et al. Docosahexaenoic acid promotes dopaminergic differentiation in induced pluripotent stem cells and inhibits teratoma formation in rats with parkinson-like pathology. *Cell Transplant*, 2011, 21(1): 313-332.

- [20] Hargus G, Cooper O, Deleidi M, et al. Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(36): 15921-15926.

- [21] Grealish S, Jönsson ME, Li M, et al. The A9 dopamine neuron component in grafts of ventral mesencephalon is an important determinant for recovery of motor function in a rat model of Parkinson's disease. *Brain*, 2011, 133(Pt 2): 482-495.

- [22] Isacson O, Björklund LM, Schumacher JM, et al. Towards full restoration of synaptic and terminal function of the dopaminergic system in Parkinson's disease from regeneration and neuronal replacement by stem cells. *Ann Neurol*, 2003, 53(Suppl 3): S135-S146.

- [23] Sánchez-Danés A, Consiglio A, Richaud Y, et al. Efficient Generation of A9 Midbrain Dopaminergic Neurons by Lentiviral Delivery of LMX1A in Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells. *Hum Gene Ther*, 2012, 23(1): 56-69.

- [24] Nguyen HN, Byers B, Cord B, et al. LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(3): 267-280.

- [25] Devinee MJ, Ryten M, Vodicka P, et al. Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the alpha-synuclein locus. *Nat Commun*, 2011, 2: 440.