

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37

論文表題 Title

脳オルガノイドを用いた自閉スペクトラム症の病態メカニズム解明:環境要因の影響評価と課題  
Elucidating the Pathogenic Mechanisms of Autism Spectrum Disorder Using Brain Organoids: Assessment of Environmental Factors and Challenges

短縮表題 Abbreviated Title

脳オルガノイドによる自閉症研究:環境要因と課題  
Autism Research Using Brain Organoids: Environmental Factors and Challenges

著者名 Authors

中村 賢佑<sup>1,2</sup>、左中 彩恵<sup>1,2</sup>、樋口 浩輝<sup>1,2</sup>、久保 明澄<sup>1,3</sup>、神谷 沙羅<sup>1,4</sup>、佐々木 哲也<sup>1,4,5\*</sup>  
Kenyu Nakamura<sup>1,2</sup>, Sae Sanaka<sup>1,2</sup>, Koki Higuchi<sup>1,2</sup>, Asumi Kubo<sup>1,3</sup>, Sara Kamiya<sup>1,4</sup>, Tetsuya Sasaki<sup>1,4,5\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratory of Anatomy and Neuroscience, Department of Biomedical Sciences, Institute of Medicine, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577, Japan  
<sup>2</sup> College of Medicine, School of Medicine and Health Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577, Japan  
<sup>3</sup> College of Biology, School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577, Japan  
<sup>4</sup> Master's Program of Frontier Medical Sciences, Degree Program of Comprehensive Human Sciences, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577, Japan  
<sup>5</sup> PhD Program of Neurosciences, Degree Program of Comprehensive Human Sciences, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577, Japan

**\* Corresponding author**

Tetsuya Sasaki  
Laboratory of Anatomy and Neuroscience, Department of Biomedical Sciences, Institute of Medicine, University of Tsukuba.  
D401, General Research Building, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577, Japan  
Tel.: +81 29 853 8333  
Fax: +81 29 853 8333  
E-mail: [tsasaki@md.tsukuba.ac.jp](mailto:tsasaki@md.tsukuba.ac.jp)

1 日本語要約

2 自閉スペクトラム症(ASD)は複雑な神経発達障害であり、その病態メカニズム解明が急務となっている。近年、ヒト  
3 幹細胞から作製される脳オルガノイド技術が、ASD 研究に革新をもたらしている。この三次元培養モデルは、ASD  
4 の環境要因研究に特に有用である。薬剤曝露や感染などの環境因子がヒトの神経発達に与える影響を直接観  
5 察でき、長期的な影響評価も可能である。また、患者由来の iPS 細胞を用いることで、個々の遺伝的背景を考慮  
6 した研究が実現する。これらの利点により、ASD の複雑な病因解明に新たな洞察をもたらしている。一方で、成熟  
7 度の限界や再現性の課題も存在する。倫理的配慮を重視しつつ、技術改良や他分野との融合により、これらの  
8 欠点克服が進められている。今後、この技術は ASD の病態解明と新規治療法開発の加速に大きく貢献すると期  
9 待される。

10

11 **Abstract**

12 Autism Spectrum Disorder (ASD) is a complex neurodevelopmental disorder, and elucidating its pathogenic  
13 mechanisms is an urgent task. Recently, brain organoid technology derived from human stem cells has brought  
14 innovation to ASD research. This three-dimensional culture model is particularly useful for studying environmental  
15 factors in ASD. It allows direct observation of how environmental factors such as drug exposure and infections affect  
16 human neurodevelopment, and enables long-term impact assessment. Furthermore, using iPSCs derived from patients  
17 makes it possible to conduct research considering individual genetic backgrounds. These advantages provide new  
18 insights into the complex etiology of ASD. However, challenges such as limitations in maturity and reproducibility  
19 exist. While emphasizing ethical considerations, efforts are being made to overcome these drawbacks through  
20 technological improvements and integration with other fields. In the future, this technology is expected to  
21 significantly contribute to accelerating the elucidation of ASD pathology and the development of new therapeutic  
22 approaches.

23

24 **Keywords:** Autism Spectrum Disorder, Brain Organoids, Environmental Factors, *in vitro* Models,  
25 Neurodevelopment,

26

27

## 1. はじめに

自閉スペクトラム症(ASD)は、社会的コミュニケーションの障害と限局的・反復的な行動を特徴とする複雑な神経発達障害である(1)。ASDの発症には遺伝的要因と環境要因が複雑に関与していることが知られているが、その詳細なメカニズムは依然として不明な点が多い(2)。近年、脳オルガノイド技術の発展により、ヒト特異的な神経発達過程を *in vitro* で再現することが実現し、ASDの病態メカニズム解明と新規治療法開発に向けた研究に新たな展開をもたらしている(3,4)。本総説では、ASDの環境要因研究における脳オルガノイドの応用に焦点を当て、最新の研究動向と今後の展望について概説する。

## 2. 脳オルガノイドとは何か？

脳オルガノイドは、ヒト幹細胞から派生した三次元的な *in vitro* 培養モデルであり、初期の脳発達過程を模倣する能力を持つ革新的な研究ツールである(5)。脳オルガノイドの主要な特徴として、実際の脳組織に類似した三次元構造を形成し、神経幹細胞、神経前駆細胞、様々なタイプの神経細胞、そしてグリア細胞を含む細胞多様性を持つことが挙げられる(6,7)。さらに、成熟に伴いシナプス形成や自発的な電気活動が観察され、ヒト特有の神経発達過程を再現できる点が重要である(8,9)。

脳オルガノイドの一般的な作製手順は、ヒト iPS 細胞または胚性幹細胞の培養から始まり、神経誘導因子を用いた神経外胚葉への分化誘導、三次元培養による神経ロゼットの形成、そして成長因子を含む特殊な培地での長期培養を経て行われる。これらの過程を経て、数ヶ月から1年以上かけて成熟した脳オルガノイドが形成される(10)。

ASD研究において、脳オルガノイドはヒト特異的な神経発達過程の観察を実現し、患者由来の iPS 細胞を用いることで個々の遺伝的要因を考慮した研究が可能となる。また、薬剤曝露や感染などの環境要因が神経発達に与える影響を直接観察でき、ASDの症状が顕在化する時期に相当する神経発達段階まで長期的な発達過程を追跡できる点で重要な役割を果たしている(11-14)。

## 3. ASDの環境要因

ASDの発症に関与する環境要因として、胎児期や早期発達段階における様々な因子が指摘されている(15-17)。主な環境要因には、抗てんかん薬(バルプロ酸など)(18)、抗うつ薬、抗精神病薬などの薬剤曝露、母体の細菌・ウイルス感染(母体免疫活性化)(19,20)、葉酸不足やビタミンD欠乏などの栄養状態(21)、大気汚染物質や内分泌攪乱物質などの環境化学物質(22)、高齢出産(23)、母体のストレスや低出生体重などの周産期ストレス(24)が挙げられる。これらの環境要因が神経発達にどのように影響を与え、ASDの発症リスクを高めるのかを理解することは、予防法や治療法の開発において極めて重要である。

## 4. 脳オルガノイドを用いたASD研究の最新知見

### 4.1 神経発生の異常

1 ASD 患者由来の iPS 細胞から作製した脳オルガノイドでは、神経幹細胞と前駆細胞の動態に顕著な変化が  
2 観察されている。ASD 関連遺伝子 CHD8 の変異を持つ脳オルガノイドにおいて、神経幹細胞の早期枯渇と中間  
3 前駆細胞の増加が報告されており、この変化は大脳皮質の層構造形成に影響を与え、ASD の病態に関与すると  
4 考えられる (25)。また、複数の ASD 患者由来の脳オルガノイドを用いた大規模な研究では、神経幹細胞の細胞  
5 周期の延長と分裂面の異常が観察されており、これらの変化は神経細胞の産生タイミングと配置に影響を与え、  
6 ASD に特徴的な大脳皮質の構造異常につながると示唆されている (12)。

7 神経細胞の分化と移動のプロセスにも、ASD 関連の異常が報告されている。ASD 患者由来の脳オルガノイド  
8 において、特定の転写因子 (*TBR1*, *SATB2*) の発現異常を介したニューロンサブタイプの産生バランスの崩れが  
9 示されており、この研究は ASD における大脳皮質の層特異的な変化を説明する重要な知見となっている (26)。  
10 さらに、ASD 関連遺伝子 *CNTNAP2* の変異が、神経細胞の放射状移動 (radial migration) を遅延させることが脳  
11 オルガノイドモデルで明らかにされ、ASD の大脳皮質微細構造異常の一因を示唆している (27)。

12

#### 13 4.2 神経回路形成の異常

14 シナプスの形成と機能の異常は、ASD の中核的な病態メカニズムの一つと考えられている (28)。ASD 患者由  
15 来の脳オルガノイドを用いた研究では、興奮性シナプスの過剰形成と抑制性シナプスの形成不全が報告されて  
16 おり、シナプス後部タンパク質の異常な集積とスパイン形態の変化が観察されている。これらの知見は、ASD にお  
17 ける興奮/抑制バランスの破綻を裏付ける重要な証拠となる (29)。また、ASD 関連遺伝子 SHANK ファミリーの変  
18 異を持つ脳オルガノイドにおいて、シナプス可塑性の異常と長期増強 (LTP) の障害が示されており、この研究  
19 は ASD における学習と記憶の問題に関する神経生物学的基盤を提供している (30)。

20 脳オルガノイド技術の進歩により、より成熟した神経回路の機能解析が実現している。長期培養 (最長 900 日)  
21 した脳オルガノイドにおいて、複雑な神経回路活動パターンが観察され、ASD 関連遺伝子変異がこの活動パ  
22 ーンを変化させることが報告されている。この研究は、ASD における大規模な神経回路の機能異常を示唆する重  
23 要な知見である (8)。オプトジェネティクス技術を脳オルガノイドに適用した研究では、ASD 患者由来のオルガノ  
24 イドにおいて特定の神経回路の反応性が低下していることが示されており、情報処理の異常を回路レベルで理  
25 解する上で重要な手法となると期待される (31)。

26

#### 27 4.3 分子メカニズムの解明

28 最新の単一細胞解析技術を用いた研究により、ASD の分子レベルの異常がより詳細に明らかになりつつある。  
29 ASD 患者由来の脳オルガノイドを用いた単一細胞トランスクリプトーム解析により、神経発達に関わる重要な遺伝  
30 子ネットワークの攪乱が同定されており、特に細胞接着分子や軸索ガイダンス因子の発現異常が、ASD の神経回  
31 路形成異常に寄与すると考えられる (32)。さらに、プロテオミクス解析とリン酸化解析を組み合わせた統合的アプ  
32 ローチにより、ASD 関連タンパク質の翻訳後修飾の異常が脳オルガノイドで同定されており、この研究は ASD の  
33 病態メカニズムにおけるシグナル伝達経路の重要性を強調している (33)。

34

## 1 5. ASD の遺伝的要因と環境要因に関するオルガノイド研究の注意点

2 ASD の複雑な病因を理解するためには、遺伝的要因と環境要因の両方を考慮したオルガノイド研究が不可  
3 欠である。しかし、それぞれの要因に焦点を当てた実験を行う際には、特有の注意点がある。

4 遺伝的要因に着目した研究では、ASD は遺伝的に非常に多様であることを考慮し、単一遺伝子変異モデル  
5 だけでなく、複数の遺伝的背景を持つオルガノイドを用いた比較研究が必要となる (34)。このアプローチにより、  
6 ASD の遺伝的 heterogeneity をより適切に反映できる。また、CRISPR-Cas9 などの遺伝子編集技術を用いて特定  
7 の遺伝子変異を導入する際は、オフターゲット効果に注意を払う必要がある (35)。予期せぬゲノム編集が実験結  
8 果に影響を与える可能性があるため、複数の独立したクローンを用いた検証が重要となる。さらに、ASD 関連遺  
9 伝子の影響は発達段階によって異なるため、オルガノイドの異なる成熟段階で継時的に観察を行うことが求めら  
10 れる (25)。

11 多くの ASD 関連遺伝子は相互作用すると考えられるため、複数の遺伝子の組み合わせ効果も検討する必要  
12 がある (36)。また、遺伝子変異がエピジェネティックな変化を引き起こす可能性があるため、DNA メチル化やヒス  
13 トン修飾などのエピジェネティックマーカーの解析も考慮すべきである (37)。

14 一方、環境要因に焦点を当てた ASD のオルガノイド研究では、曝露のタイミングと期間が重要な考慮点となる。  
15 環境要因の影響は発達段階によって大きく異なると考えられるため、異なる成熟段階での曝露実験が必要であり、  
16 急性曝露と慢性曝露の両方を考慮する必要がある (22)。また、用量の設定においては、*in vivo* での曝露量を適  
17 切に反映することが重要だが、オルガノイドシステムでは薬物動態が異なると予想されるため、複数の濃度条件  
18 での実験が求められる (38)。

19 実際の環境では複数の要因が同時に作用すると考えられるため、単一の環境要因だけでなく、複数の要因の  
20 組み合わせ効果も検討する必要があるかもしれない (39)。さらに、環境要因の影響は遺伝的背景によって異な  
21 ると予想されるため、異なる遺伝的背景を持つオルガノイドでの比較実験が重要となる (40)。環境要因の影響は  
22 即時的でない場合もあるため、曝露後の長期的な変化を観察することも必要である (8)。オルガノイドシステムで  
23 は脳-血液関門を欠き、代謝機能が不完全であるため、環境化学物質の代謝産物の影響を適切に評価できない  
24 可能性がある。この限界を認識し、肝臓オルガノイドとの共培養などの方法を検討する必要がある (41)。

25 これらの注意点を考慮することで、ASD の遺伝的要因と環境要因に関するオルガノイド研究の信頼性と臨床的  
26 妥当性を高めることができる。同時に、オルガノイドモデルの限界を認識し、*in vivo* 研究や臨床データとの統合的  
27 な解析を行うことが、ASD の複雑な病因の全体像を理解する上で重要である。

28

## 29 6. 今後の展望と課題

30 脳オルガノイドを用いた ASD 研究は急速に進展しているものの、この分野にはまだ克服すべき重要な課題が  
31 存在する。これらの課題に対処することは、ASD の病態メカニズム解明と新規治療法開発に向けた研究の進展に  
32 不可欠である。

33

### 34 6.1. 再現性と標準化の確立

1 最も緊急性の高い課題の一つは、オルガノイドモデルの再現性と標準化の問題である。個々の研究間で結果  
2 の一貫性を確保することは、信頼性の高い科学的知見を積み重ねる上で極めて重要である。この課題に対して  
3 は、国際的な協力体制のもと、オルガノイド作製プロトコルの厳密な標準化が求められる。これにより、異なる研究  
4 室間でのデータの比較や統合が容易になり、ASD 研究全体の進展が加速されると考えられる。

## 5 6.2. 成熟した神経回路の再現

6 現状の技術では、生後の脳発達過程を完全に模倣することは困難であり、ASD の症状が顕在化する時期の  
7 神経機能を十分に評価できていない。この限界を克服することは、ASD の病態を真に理解する上で不可欠であ  
8 る。長期培養技術の改良や、ヒト胎児脳組織由来の細胞を利用したハイブリッドオルガノイドの開発など、革新的  
9 なアプローチが試みられている。これらの技術革新は、より生理的に妥当な ASD モデルの創出につながると期待  
10 される。

## 11 6.3. 環境要因と遺伝要因の統合的評価

12 ASDの複雑な病因を解明するためには、環境要因と遺伝要因の相互作用を統合的に評価するモデルの開発  
13 が不可欠である。この課題に対しては、多臓器オルガノイドシステムの構築や、マイクロ流体デバイスとの統合な  
14 ど、より複雑な *in vitro* モデルの開発が進められている (42)。これらの高度なモデルは、ASD の多因子的な病  
15 態をより忠実に再現し、新たな治療標的の同定につながると予想される。

## 16 6.4. トランスレーショナル研究の推進

17 オルガノイド研究の知見を臨床応用へと橋渡しするトランスレーショナル研究の推進 (43) は、ASD 研究の最  
18 終目標である。オルガノイドで同定された異常が実際の ASD 患者の脳でも観察されるか、また、それらの異常を  
19 標的とした治療アプローチが有効であるかを検証することは、新規治療法開発の鍵となる。この課題に対しては、  
20 臨床と基礎研究者の緊密な連携が不可欠であり、包括的なアプローチが求められる。

21  
22 脳オルガノイドを用いた ASD 研究は飛躍的な発展を遂げ、この複雑な障害の理解と治療法開発に革命をもた  
23 らすことが期待される。同時に、倫理的配慮や社会的影響を十分に考慮しながら、この研究分野を進展させてい  
24 くことが重要である (44)。ASD 研究者コミュニティの協力と革新的な技術開発により、ASD 患者とその家族に希望  
25 をもたらす画期的な発見が生まれることが期待される。

## 27 7. 結論

28 脳オルガノイドを用いた ASD 研究は、ヒト特異的な神経発達過程の理解と環境要因の影響評価に大きく貢献  
29 し、ASD の複雑な病態メカニズムの解明に向けた新たな道が開かれつつある。オルガノイドモデルの限界を克服  
30 するための継続的な技術革新が不可欠である。今後、脳オルガノイド技術のさらなる発展と、遺伝学、エピジェネ  
31 ティクス、環境科学などの関連分野との融合により、ASD の予防法や個別化治療法の開発が加速されると予想さ  
32 れる。研究者同士の努力と協力により、ASD の謎が解き明かされ、より効果的な支援や治療法が開発されることを  
33 期待したい。

## 35 8. 謝辞

1 当研究室の研究の一部は、科学研究費補助金(19K08065, 22K07611, 19H05201)、先進医薬研究振興財団、  
2 内藤記念科学振興財団、武田科学振興財団、川野小児医科学奨学財団、大樹生命厚生財団、ライフサイエンス  
3 振興財団、中富健康科学振興財団、薬学研究奨励財団、三島海雲記念財団、基礎生物学研究所・共同利用研  
4 究、筑波大学オープンファシリティ推進室のサポートの下で行われた。本総説の執筆にあたり、解剖学・神経科学  
5 研究室のメンバーから、有意義なコメントをいただいた。この場をお借りして感謝する。

6

## 7 **9. 利益相反声明**

8 著者らは、競合する利害関係がないことを宣言する

9

## 参考文献

1. Gangopadhyay M. DSM-5-TR® self-exam questions. Muskin PR, Dickerman AL, Drysdale A, Holderness CC, editors. Arlington, TX: American Psychiatric Association Publishing; 2023. 488 p.
2. Bai D, Yip BHK, Windham GC, Sourander A, Francis R, Yoffe R, et al. Association of genetic and environmental factors with autism in a 5-country cohort. *JAMA Psychiatry*. 2019 Oct 1;76(10):1035–43.
3. Marton RM, Paşca SP. Organoid and assembloid technologies for investigating cellular crosstalk in human brain development and disease. *Trends Cell Biol*. 2020 Feb;30(2):133–43.
4. Amin ND, Paşca SP. Building models of brain disorders with three-dimensional organoids. *Neuron*. 2018 Oct 24;100(2):389–405.
5. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science*. 2014 Jul 18;345(6194):1247125.
6. Qian X, Song H, Ming G-L. Brain organoids: advances, applications and challenges. *Development*. 2019 Apr 16;146(8):dev166074.
7. Quadrato G, Brown J, Arlotta P. The promises and challenges of human brain organoids as models of neuropsychiatric disease. *Nat Med*. 2016 Nov;22(11):1220–8.
8. Trujillo CA, Gao R, Negraes PD, Gu J, Buchanan J, Preissl S, et al. Complex oscillatory waves emerging from cortical organoids model early human brain network development. *Cell Stem Cell*. 2019 Oct 3;25(4):558-569.e7.
9. Pollen AA, Bhaduri A, Andrews MG, Nowakowski TJ, Meyerson OS, Mostajo-Radji MA, et al. Establishing cerebral organoids as models of human-specific brain evolution. *Cell*. 2019 Feb 7;176(4):743-756.e17.
10. Velasco S, Kedaigle AJ, Simmons SK, Nash A, Rocha M, Quadrato G, et al. Individual brain organoids reproducibly form cell diversity of the human cerebral cortex. *Nature*. 2019 Jun;570(7762):523–7.
11. Mariani J, Coppola G, Zhang P, Abyzov A, Provini L, Tomasini L, et al. FOXP1-dependent dysregulation of GABA/glutamate neuron differentiation in autism spectrum disorders. *Cell*. 2015 Jul 16;162(2):375–90.
12. Adhya D, Swarup V, Nagy R, Dutan L, Shum C, Valencia-Alarcón EP, et al. Atypical neurogenesis in induced pluripotent stem cells from autistic individuals. *Biol Psychiatry*. 2021 Mar 1;89(5):486–96.
13. Janssens S, Schotsaert M, Karnik R, Balasubramaniam V, Dejoze M, Meissner A, et al. Zika virus alters DNA methylation of neural genes in an organoid model of the developing human brain. *mSystems* [Internet]. 2018 Jan;3(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/mSystems.00219-17>
14. Amiri A, Coppola G, Scuderi S, Wu F, Roychowdhury T, Liu F, et al. Transcriptome and epigenome landscape of human cortical development modeled in organoids. *Science*. 2018 Dec 14;362(6420):eaat6720.
15. Sasaki T. The role of immune system molecules in cortical formation and their abnormalities in psychiatric disorders. *DOHaD Research*. 2023;11(2):126–34.
16. Kubo A, Kamiya S, Higuchi K, Nakamura K, Kishi K, Sasaki T. Influence of maternal immune activity on fetal survival and brain development: critical role of IL-17A and microglia. *jxiv.jst.go.jp* [Internet]. Available from: <https://jxiv.jst.go.jp/index.php/jxiv/preprint/view/861>
17. Sasaki T. Prenatal Programming and Autism Spectrum Disorders. *DOHaD Research*. 2023;11(1):15–6.
18. Christensen J, Grønberg TK, Sørensen MJ, Schendel D, Parner ET, Pedersen LH, et al. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA*. 2013 Apr 24;309(16):1696–703.
19. Al-Haddad BJS, Jacobsson B, Chabra S, Modzelewska D, Olson EM, Bernier R, et al. Long-term risk of neuropsychiatric disease after exposure to infection in utero. *JAMA Psychiatry*. 2019 Jun 1;76(6):594–602.
20. Kubo A, Sasaki T. IL-17 signaling and neuroimmunology: Psoriasis to Autism Spectrum Disorder [Internet]. *Jxiv*; 2024. Available from: <http://dx.doi.org/10.51094/jxiv.869>

- 1 21. Egorova O, Myte R, Schneede J, Hägglöf B, Bölte S, Domellöf E, et al. Maternal blood folate status during  
2 early pregnancy and occurrence of autism spectrum disorder in offspring: a study of 62 serum biomarkers. *Mol*  
3 *Autism*. 2020 Jan 16;11(1):7.
- 4 22. Modabbernia A, Velthorst E, Reichenberg A. Environmental risk factors for autism: an evidence-based review  
5 of systematic reviews and meta-analyses. *Mol Autism*. 2017 Mar 17;8(1):13.
- 6 23. Wu S, Wu F, Ding Y, Hou J, Bi J, Zhang Z. Advanced parental age and autism risk in children: a systematic  
7 review and meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand*. 2017 Jan;135(1):29–41.
- 8 24. Scheinost D, Sinha R, Cross SN, Kwon SH, Sze G, Constable RT, et al. Does prenatal stress alter the developing  
9 connectome? *Pediatr Res*. 2017 Jan;81(1–2):214–26.
- 10 25. Schafer ST, Paquola ACM, Stern S, Gosselin D, Ku M, Pena M, et al. Pathological priming causes  
11 developmental gene network heterochronicity in autistic subject-derived neurons. *Nat Neurosci*. 2019  
12 Feb;22(2):243–55.
- 13 26. Sen D, Voulgaropoulos A, Drobna Z, Keung AJ. Human cerebral organoids reveal early spatiotemporal  
14 dynamics and pharmacological responses of UBE3A. *Stem Cell Reports*. 2020 Oct 13;15(4):845–54.
- 15 27. Lu X, Yang J, Xiang Y. Modeling human neurodevelopmental diseases with brain organoids. *Cell Regen (Lond)*.  
16 2022 Jan 4;11(1):1.
- 17 28. Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen J-E, Woolfrey KM. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric  
18 disorders. *Nat Neurosci*. 2011 Mar;14(3):285–93.
- 19 29. Watanabe M, Buth JE, Vishlaghi N, de la Torre-Ubieta L, Taxidis J, Khakh BS, et al. Self-organized cerebral  
20 organoids with human-specific features predict effective drugs to combat Zika virus infection. *Cell Rep*. 2017  
21 Oct;21(2):517–32.
- 22 30. Tian Y, Voineagu I, Paşca SP, Won H, Chandran V, Horvath S, et al. Alteration in basal and depolarization  
23 induced transcriptional network in iPSC derived neurons from Timothy syndrome. *Genome Med*. 2014 Oct  
24 10;6(10):75.
- 25 31. Bhattacharya A, Choi WWY, Muffat J, Li Y. Modeling developmental brain diseases using human pluripotent  
26 stem cells-derived brain organoids - progress and perspective. *J Mol Biol*. 2022 Feb 15;434(3):167386.
- 27 32. Eichmüller OL, Knoblich JA. Human cerebral organoids - a new tool for clinical neurology research. *Nat Rev*  
28 *Neurol*. 2022 Nov;18(11):661–80.
- 29 33. Paulsen B, Velasco S, Kedaigle AJ, Pigoni M, Quadrato G, Deo AJ, et al. Autism genes converge on  
30 asynchronous development of shared neuron classes. *Nature*. 2022 Feb;602(7896):268–73.
- 31 34. Zaslavsky K, Zhang W-B, McCready FP, Rodrigues DC, Deneault E, Loo C, et al. SHANK2 mutations  
32 associated with autism spectrum disorder cause hyperconnectivity of human neurons. *Nat Neurosci*. 2019  
33 Apr;22(4):556–64.
- 34 35. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with  
35 improved specificity. *Science*. 2016 Jan 1;351(6268):84–8.
- 36 36. Satterstrom FK, Kosmicki JA, Wang J, Breen MS, De Rubeis S, An J-Y, et al. Large-scale exome sequencing  
37 study implicates both developmental and functional changes in the neurobiology of autism. *Cell*. 2020 Feb  
38 6;180(3):568-584.e23.
- 39 37. Sun W, Poschmann J, Cruz-Herrera del Rosario R, Parikshak NN, Hajan HS, Kumar V, et al. Histone acetylome-  
40 wide association study of autism spectrum disorder. *Cell*. 2016 Nov;167(5):1385-1397.e11.
- 41 38. Zhong S, Zhang S, Fan X, Wu Q, Yan L, Dong J, et al. A single-cell RNA-seq survey of the developmental  
42 landscape of the human prefrontal cortex. *Nature*. 2018 Mar 22;555(7697):524–8.
- 43 39. Pelch KE, Bolden AL, Kwiatkowski CF. Environmental chemicals and autism: A scoping review of the human

- 1 and animal research. *Environ Health Perspect.* 2019 Apr;127(4):46001.
- 2 40. Brito A, Russo FB, Muotri AR, Beltrão-Braga PCB. Autism spectrum disorders and disease modeling using  
3 stem cells. *Cell Tissue Res.* 2018 Jan;371(1):153–60.
- 4 41. Ramme AP, Koenig L, Hasenberg T, Schwenk C, Magauer C, Faust D, et al. Autologous induced pluripotent  
5 stem cell-derived four-organ-chip. *Future Sci OA.* 2019 Sep 10;5(8):FSO413.
- 6 42. Shaji M, Tamada A, Fujimoto K, Muguruma K, Karsten SL, Yokokawa R. Deciphering potential vascularization  
7 factors of on-chip co-cultured hiPSC-derived cerebral organoids. *Lab Chip.* 2024 Feb 13;24(4):680–96.
- 8 43. Sawai T, Hayashi Y, Niikawa T, Shepherd J, Thomas E, Lee T-L, et al. Mapping the ethical issues of brain  
9 organoid research and application. *AJOB Neurosci.* 2022 Apr;13(2):81–94.
- 10 44. Niikawa T, Hayashi Y, Shepherd J, Sawai T. Human brain organoids and consciousness. *Neuroethics* [Internet].  
11 2022 Apr;15(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12152-022-09483-1>