

学位論文（博士）

ALS 患者（*TARDBP*^{N345K/+}）由来の
新規脳微小血管内皮細胞モデルの確立：
拡散バリア機能障害と免疫細胞相互作用の研究

氏名 松尾 欣哉

所属 山口大学大学院医学系研究科
医学専攻 臨床神経学講座

令和 6 年 12 月

目 次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	2
3. 目的	3
4. 方法	4
(1) 対象	4
(2) 方法	5
(3) 解析	6
5. 結果	7
6. 考察	8
7. 結語	9
8. 謝辞	10
9. 参考文献	11

1. 要旨

血液脳関門 (Blood-Brain Barrier: BBB) は、血中の有害分子や免疫細胞の侵入を制限し、中枢神経の恒常性を維持する重要な機能群であり、脳微小血管内皮細胞 (Brain Microvascular Endothelial Cells: BMEC) は主要な構成細胞である。種々の神経変性疾患において、全身の炎症や免疫細胞分画など末梢血液中の変化が神経予後に影響することから、末梢環境と中枢をつなぐ BBB の病態進展への関与が注目されている。筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS) は、根本的な治療法が存在しない代表的な神経変性疾患であり、ヒト剖検脳での BBB 破綻の報告に加えて、動物モデルでは、BBB 破綻が神経変性に先行することが示されているが、ヒト由来の機能解析可能な疾患 BBB モデルがなく BBB 破綻が結果なのか、原因なのかという検証は困難で、その病態機序は解明されていない。本研究では、家族性 ALS 患者 (TAR DNA-binding protein (*TARDBP*) ^{N345K/+} 変異) 由来のヒト人工多能性幹細胞から BMEC 様細胞を分化させ、ALS 患者由来 BMEC の機能を解析した。ALS 患者由来の BMEC 様細胞では、タイトジャンクションが破綻、小分子の透過性亢進、細胞接着因子の発現亢進、免疫細胞の接着数の増加がみられた。ALS 患者由来 BMEC 様細胞では、*vivo* と同様に *TARDBP* がコードする Transactive response DNA-binding protein 43 が細胞質内に異常局在していた。ただしこれらの異常は遺伝子編集で作成した *TARDBP* 変異 (*TARDBP*^{K263E/K263E}, *TARDBP*^{G295S/G295S}) クローン由来のモデルでは再現されず、遺伝子変異部位や背景遺伝子の差が影響している可能性がある。この結果は BMEC 様細胞単独での培養で観察されており、本患者における BMEC の異常が疾患進行の単なる 2 次的な影響ではないことを示している。また、また、Wnt/ β -カテニンシグナルが低下しており、その活性化薬により BMEC のバリア機能が回復し、VCAM-1 の発現が低下した。本モデルは家族性 ALS 患者の BMEC 異常を再現しており、ALS における BMEC を標的とした治療薬開発に有用なモデルである。

2. 研究の背景

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS) は、成人における致死的な神経変性疾患であり、主に一次および二次運動ニューロンに影響を与え、進行的な四肢の筋力低下、嚥下困難、呼吸麻痺を引き起こす (Feldman et al., 2022)。ALS のほとんどの症例は孤発性であるが、5%から 10%は家族性であり、*SOD1*, *C9ORF72*, *FUS*, および *TAR DNA-binding protein gene (TARDBP)* を含む約 30 の原因遺伝子または修飾遺伝子が同定されている (Gregory et al., 2020)。*TARDBP* は、DNA および RNA に結合し、それらの発現およびスプライシングを調節するタンパク質、TDP-43 (Transactive response DNA-binding protein 43) をコードしている。TDP-43 の凝集体は、*TARDBP* 変異のない孤発性 ALS 症例においても、ユビキチン陽性の細胞質神経細胞封入体として観察され、これは ALS の病理学的特徴として広く認識されている。

運動ニューロンの変性は中枢神経系 (Central nerve system: CNS) で起こるが、神経変性と末梢免疫系の活性化、および血液中の体液因子との関連が示唆されている。例えば、ALS 患者のコホート研究では、末梢血中の C-reactive protein (CRP) の上昇が運動機能障害の進行と短縮された寿命に関連していることが報告されている (Lunetta et al., 2017)。ALS 患者の末梢血中の特定の免疫細胞サブセットは、神経機能や予後と関連している (Murdock et al., 2017, Cui et al., 2022)。さらに、フィブリンやトロンビンなどの血液由来分子が神経炎症および神経変性を引き起こす重要な要素であることが示されている (Ryu et al., 2018, Shlobin et al., 2021, Finney et al., 2023)。実際、ALS 患者の剖検サンプルでは、脊髄、運動皮質、脳幹において、血清成

分やT細胞，マクロファージ，自然殺傷細胞などの末梢免疫細胞の存在が繰り返し報告されている(Troost et al., 1989, Troost et al., 1990, Kawamata et al., 1992, Engelhardt et al., 1993, Graves et al., 2004, Henkel et al., 2004, Garbuzova-Davis et al., 2012, Winkler et al., 2013, Jara et al., 2019, Garofalo et al., 2020, Garofalo et al., 2022). これらのデータは，血清や免疫細胞がALSにおける神経変性の重要な促進因子であることを強く示唆している.

しかしCNSは血液脳関門(Blood-Brain Barrier: BBB)によって末梢組織と隔離されている. BBBは脳微小血管が有する特徴的な機能群であり，CNSの恒常性を維持する上で重要な役割を果たしている. BBBは単一の細胞タイプで構成されるわけではなく，脳微小血管内皮細胞(Brain Microvascular Endothelial Cells: BMEC)，血管および実質基底膜に埋め込まれたペリサイト，アストロサイトの足突起，ミクログリア，ニューロンなど，さまざまな細胞および非細胞成分が関与しており，これらは神経血管ユニット(Neurovascular unit: NVU)として知られている. 他臓器の血管内皮細胞と比較して，BMECは連続的なタイトジャンクション，窓状構造の欠如，特定の極性輸送体および排出ポンプを持ち，さらに細胞接着因子の発現制御によってCNSへの免疫細胞の移動を制限している(Engelhardt and Ransohoff, 2012). 病的状態では，これらの分子，特にIntercellular Adhesion Molecule-1(ICAM-1)やVascular Cell Adhesion Molecule-1(VCAM-1)の発現が増加し，CNSへの免疫細胞侵入が増加する. ALSにおけるBMEC機能不全は新たな病態メカニズムの発見や治療標的の開発に繋がる可能性があり魅力的な研究対象である.

近年，*TARDBP*変異がALSにおける血管バリア機能障害に関連する分子経路を解明するための焦点となっている. 動物研究では，*TARDBP*変異やTDP-43の発現変化が拡散バリア機能障害および異常な免疫細胞浸潤を引き起こすことが示唆されている(Sasaki et al., 2015, Zamudio et al., 2020, Cheemala et al., 2023). 特に，ALSまたは前頭側頭葉変性症(Frontotemporal lobar degeneration: FTL)患者のBMECでは，TDP-43および核内 β -カテニンのレベルが低下しており，BBBの発達と維持に重要なWnt下流遺伝子の発現が減少していることが報告されている(Cheemala et al., 2023). さらに，TDP-43のノックダウンやTDP-43断片の過剰発現により，マウスの脳内皮細胞においてタイトジャンクションタンパク質の発現が低下することが示されている(Xu et al., 2022). これらの報告は，TDP-43がBMEC機能において調節的役割を果たしており，その生理的機能の低下がALS患者のBMEC変化に関連していることを示唆している. このようにTDP-43と血管バリア機能の関係への関心が高まっているものの，種間のTDP-43の構造および機能の違いにより(Wang et al., 2004, Ling et al., 2015)，ヒトにおけるTDP-43の直接的な関与を示すことは困難である. これらはALS患者由来のモデルを用いた血管バリア機能の詳細な解析の必要性を強調している.

私たちは，human induced pluripotent stem cells (hiPSCs)からBMEC様細胞を分化させるExtended Endothelial Cell Culture Method (EECM)を確立し，病的状態におけるBMECの役割を研究している(Nishihara et al., 2020, Nishihara et al., 2021, Matsuo et al., 2023). 先行研究では，hiPSCs由来のニューロンやアストロサイトがALSの病態生理や治療効果の一部を反映することが報告されているが(Okano et al., 2020, Okano and Morimoto, 2022, Morimoto et al., 2023, Okano et al., 2023, Leventoux et al., 2024, Thiry et al., 2024)，ALSにおける内皮細胞の機能についての研究は限られている(Katt et al., 2019). EECMで分化させたBMEC様細胞の強みは，その形態およびトランスクリプトームにおいて純粋な内皮細胞の特徴を示し

(Gastfriend et al., 2021), 強力なバリア機能と細胞接着分子の発現を有している点であり, 末梢免疫系と BBB との相互作用の研究に適したモデルであるといえる (Nishihara et al., 2020).

3. 目的

本研究では, 家族性 ALS 患者 ($TARDBP^{N345K/+}$) 由来の hiPSCs から EECM の手法をもちいて BMEC 様細胞を確立し, ALS 患者由来の新規 BMEC モデルを *in vitro* に再現した. ジャンクションの形態, 小分子透過性, 細胞接着因子の発現とそれによる免疫細胞の接着誘導といった BMEC 機能を評価し, ALS 患者由来の BMEC 様細胞の機能を検証した. さらに, 健常者由来の hiPSCs に $TARDBP^{G295S/G295S}$ および $TARDBP^{K263E/K263E}$ の遺伝子編集技術をもちいて導入し, 特定の $TARDBP$ 変異が BMEC 機能不全に寄与するかどうかを検証した.

4. 方法

材料および方法

ドナーおよびヒト人工多能性幹細胞 (hiPSCs)

hiPSCs のドナーと $TARDBP$ 変異を持つ遺伝子編集 hiPSCs の由来については, 図 1A にまとめられている. 家族性 ALS 患者 (年齢/性別: 63 歳/男性, $TARDBP$ p.N345K) から採取された T リンパ球をリプログラムして, 患者由来の hiPSC 株が作成された (Leventoux et al., 2020). $TARDBP^{K263E/K263E}$ および $TARDBP^{G295S/G295S}$ の 2 つの病原性変異を持つ同系の hiPSC 株は, 先行研究で報告されている (Imaizumi et al., 2022). これらの変異は ALS や FTLD と関連していることが報告されている (Floris et al., 2015). また, $TARDBP$ 変異の位置は図 1B に示されている. 理化学研究所バイオリソース研究センターから提供された 2 つの健常者由来 hiPSC 株 (HPS1006 および HPS4290) は, 健康コントロールとして使用された (HC1 および HC2).

hiPSCs の維持

hiPSCs は mTeSR1 培地 (STEMCELL Technologies) で維持された. 細胞が 80% のコンフルエンスに達したら, ReLeSR (STEMCELL Technologies) を使用して細胞を剥離し, 次のマトリゲルコート済み 6 ウェルプレートに播種した. 培地は毎日交換した.

EECM-BMEC 様細胞および平滑筋様細胞への hiPSCs の分化

EECM は, 以前に報告された方法 (Nishihara et al., 2021) を用いて実施され, hiPSCs から BMEC 様細胞および平滑筋様細胞 (Smooth muscle like cells: SMLCs) が生成された (図 1C). $CD31^+$ 内皮前駆細胞は Wnt/ β -カテニンシグナルを活性化する CHIR99021 で刺激して生成された. 各 hiPSC クローンの播種密度は, 細胞純度を向上させるために 24,000~53,000/cm² の範囲で最適化された (補足表 S1)

．磁気活性化細胞分離（Magnetic-Activated Cell Sorting: MACS）を用いて CD31⁺細胞を精製し、コラーゲンコート済みの 6 ウェルプレートに播種した．3～5 日, SMLCs が内皮細胞の間に混在している状態で、これらの細胞に Accutase（Sigma-Aldrich）処理を施すと、内皮細胞は SMLCs よりも早く剥がれた．この差異を利用して、剥がれた内皮細胞を選択的に収集し、2～3 回繰り返すことで純粋な内皮細胞集団を得た．この集団を EECM-BMEC 様細胞と命名し、3～6 パッセージ目の細胞を以下のアッセイに使用した．残った SMLCs は hECSR 培地に残され、馴化培地は 2～3 日に 1 回収集し、0.22 μ m フィルターでろ過して保存した．

透過性実験

EECM-BMEC 様細胞の単層の透過性は、先行研究で記述された方法に従って測定された (Nishihara et al., 2021)．EECM-BMEC 様細胞を 0.4 μ m の孔を持つ Transwell フィルターインサート（Corning, PC 膜）に 1.12×10^5 細胞/500 μ L の密度で播種し、5 日間培養した．6 日目に、単層の透過性はナトリウムフルオレセイン（NaFl, 376.3 Da, Sigma-Aldrich）を用いて評価された．10 μ M の NaFl を Transwell インサートの上部に添加し、15 分ごとに 1 時間まで下部チャンバーから拡散した蛍光トレーサーを含むサンプルを収集した．蛍光強度は、FlexStation 3 マルチウェルリーダー（Molecular Devices）で測定され、励起波長 485 nm、発光波長 530 nm に設定された．各条件は 3 回の繰り返しでテストされ、各アッセイ後にフィルターを染色して、内皮細胞の単層に穴が開いていないことを確認した．

BMEC 様細胞単層のインピーダンス測定

xCELLigence RTCA デバイス（Agilent）を用いて、リアルタイムかつラベルフリーでバリア強度測定を行った．EECM-BMEC 様細胞を IV 型コラーゲンでコーティングされた E-plate16 に 1×10^4 細胞/ウェルの密度で播種し、コンフルエンスに達するまで培養した．その後、4 μ M CHIR99021 または DMSO（コントロール）を添加し、さらに 2～3 日間インピーダンスを測定した．各条件で少なくとも 3 回のテストが行われ、データは細胞指数として出力された．細胞指数は、細胞間接触および細胞接着の強さに関連する無次元のパラメータである．

フローサイトメトリ解析による接着分子の細胞表面発現

内皮接着分子の細胞表面発現は、先行研究で記述された方法に基づき評価された (Nishihara et al., 2021)．このモデルでは、SMLC 由来の馴化培地が、BMEC 様細胞の表面における VCAM-1 の発現亢進に必要である (Nishihara et al., 2020)．EECM-BMEC 様細胞は、同じクローンの SMLC 由来の馴化培地に、1 ng/mL のヒト組換え TNF- α （R&D Systems）および 20 IU/mL のヒト組換え IFN- γ （R&D Systems）を含有する/しない条件下で、48 ウェルプレートに培養され、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ で 16 時間刺激された．接着分子の細胞表面染色は、Attune NxT フローサイトメーター（Thermo Fisher Scientific）で検出された．平均蛍光強度は FlowJo Ver10.9（BD Biosciences）を用いて計算された．

免疫蛍光染色

フィルターインサート膜、IV 型コラーゲンでコーティングされた 8 ウェルチャンバープレート、または E-plate16 上の EECM-BMEC 様細胞について、タイトジャンクショ

ンタンパク質の解析が先行研究で記述された方法に基づいて行われた (Nishihara et al., 2021). 簡単に説明すると, Claudin-5, Occludin, VE-cadherin の染色には冷メタノール (-20°C) で 20 秒間固定し, TDP-43 および VE-cadherin の二重染色には 4%パラホルムアルデヒドで 10 分間固定した. その後, 5%スキムミルクおよび 0.1% Triton X-100 の溶液でブロックおよび透過性を与え, 一次および二次抗体でインキュベートした (補足表 S3 参照). 細胞核は $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ の DAPI で染色した. DPBS で洗浄後, Mowiol (Sigma-Aldrich) で封入した. 画像は, BZ-X810 顕微鏡 (KEYENCE) を使用して撮影した. TDP-43 の異常局在をカウントする際は, バイアスがないように DAPI チャネルに基づいて 40 倍で免疫蛍光画像を取得した. 各クローンについて 10 枚の画像が撮影され, 細胞質内での異常局在数は, 異なる 3 人の評価者によって盲検下で独立してカウントされ, バイアスを排除した.

定量リアルタイム PCR

total RNA は, RNA 抽出キット (Roche, スイス) を使用して, コンフルエント状態の EECM-BMEC 様細胞から抽出された. total RNA は, AffinityScript cDNA Synthesis Kit (Agilent, 米国カリフォルニア州) を用いて逆転写され, CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad) 上で Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green Master Mixes (Agilent, 米国カリフォルニア州) を使用して増幅が行われた. プライマーの配列は, 補足表 S4 に示されている. 各 mRNA の相対的な発現量は, 比較閾値サイクル法によって計算され, β -アクチン mRNA 発現に基づいて正規化された.

EECM-BMEC 様細胞における Wnt/ β -カテニンシグナル経路の活性化

グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 (Glycogen Synthase Kinase-3, GSK-3) 阻害剤である CHIR99021 を, Wnt/ β -カテニン経路の活性化剤として使用した. 4 回目または 5 回目のパッセージの EECM-BMEC 様細胞を先行研究に基づいて解凍した (Nishihara et al., 2021). EECM-BMEC 様細胞は, $4\text{ }\mu\text{M}$ の CHIR99021 または DMSO (コントロール) で hECSR 培地中で処理された後, 使用された. EECM-BMEC 様細胞は, 透過性実験, 免疫細胞化学, または接着分子の発現解析のために, Transwell フィルター, チャンバースライド, またはプレートに播種された.

静的条件下での免疫細胞接着実験

EECM-BMEC 様細胞は, $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ の IV 型コラーゲンでコーティングされた 96 ウェルプレートに播種され, 翌日, 同じ hiPSCs クローン由来の SMLC の馴化培地で 16 時間培養された. 0.1 ng/mL の $\text{TNF-}\alpha$ と 2 IU/mL の $\text{IFN-}\gamma$ を添加し, 炎症性サイトカインの存在下および不在下で実験が行われた. 当日, 蛍光標識された末梢血単核細胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cells: PBMC) が準備され, 既報の方法 (Nishihara et al., 2021) に基づいて, 若干の修正を加えて接着実験が行われた. 簡単に説明すると, PBMCs は健康なドナーから分離され, BD Vacutainer CPT Mononuclear Cell Preparation Tube (BD, 米国) を使用して製造元のプロトコルに従い採取された. 分離された PBMCs は, 使用するまで凍結保存された. 蛍光標識された PBMCs を EECM-BMEC 様細胞の単層上に分注し, 15 分後に未接着細胞を除去し, 接着した細胞の数を自動カウントソフトウェアを用いて算出した.

統計解析

統計解析は, GraphPad Prism 7 ソフトウェア (GraphPad Software, La Jolla, 米

国)を用いて実施された。表示されているデータは、平均値 ± 標準偏差 (SD) で表されている。2 群間の比較では、統計的有意性を確認するために非対応 t 検定が使用された。各実験に適用された具体的な統計手法については、対応する図の説明文に記載されている。

研究の承認

本研究は、山口大学医学部倫理委員会（承認番号 H2021-133-3）および慶應義塾大学医学部倫理委員会（承認番号 20080016）の承認を受けて実施された。

5. 結果

EECM-BMEC 様細胞および平滑筋様細胞の樹立と評価

まず、ALS 患者由来の EECM-BMEC 様細胞および SMLCs を分化させ、BMEC および平滑筋細胞の *in vitro* モデルを確立した。*TARDBP*^{N345K/+}変異を有する ALS 患者由来の 1 つの hiPSC クローンと、2 つの健康コントロール (HC1 および HC2) が本研究に使用された。また、HC2 に異なる *TARDBP* 変異を導入し、同一遺伝背景を持つ 2 つの *TARDBP* 変異体クローン (*TARDBP*^{G295S/G295S} および *TARDBP*^{K263E/K263E}) が生成された (図 1A)。HC および ALS 由来の hiPSCs は、EECM を用いて BMEC 様細胞および SMLCs に分化させた (図 1C)。HC および ALS 由来の hiPSCs はいずれも EECM-BMEC 様細胞に分化し、紡錘状の形態で、初代ヒト BMECs に類似していた (図 1D)。VE-cadherin の連続した接着結合の染色と、Cludin-5 および Occludin などのタイトジャンクション蛋白の細胞間局在も確認された (図 1D)。各 hiPSC クローン由来の SMLCs は、 α -平滑筋アクチン (α SMA)、平滑筋タンパク質 22- α (SM22 α)、およびカルポニンの染色によって、平滑筋細胞の特性を確認した (図 1D)。各クローンの分化は少なくとも 5 回行われ、その再現性が確認された。これらのデータは、HC および ALS 由来の hiPSCs が成功裏に EECM-BMEC 様細胞および SMLCs に分化したことを示しており、拡散バリア機能および BMEC 様細胞との免疫細胞相互作用に関するさらなる研究に使用されたことを示している。

ALS 患者 (*TARDBP*^{N345K/+}) 由来の EECM-BMEC 様細胞はタイトジャンクションの破綻を示した

ALS 患者の脳や脊髄の剖検サンプルでは、タイトジャンクションタンパク質の発現低下が報告されている (Garbuzova-Davis et al., 2012)。そこで、ALS 患者由来の EECM-BMEC 様細胞がタイトジャンクションの異常を再現するかどうかを調べた。

ALS 由来の EECM-BMEC 様細胞と HC 由来の細胞を比較したところ、ALS 患者 (*TARDBP*^{N345K/+}) 由来の EECM-BMEC 様細胞は、播種密度が同じであるにもかかわらず、より大きな形態を示した (図 2)。VE-cadherin の染色には有意差がなく、ALS 患者由来の EECM-BMEC 様細胞と HC 由来の細胞の間で接着結合に違いは見られなかった。しかし、ALS 患者由来の細胞では、Cludin-5 および Occludin のタイトジャンクション蛋白の連続性が途切れており、これは HC 由来の細胞には見られなかった。次に、*TARDBP*^{G295S/G295S} および *TARDBP*^{K263E/K263E} 由来の単一 *TARDBP* 変異モデルが

、このタイトジャンクションの破綻を再現するかどうかを調べた。しかし、予想に反して、*TARDBP*^{G295S/G295S} および *TARDBP*^{K263E/K263E} 由来の EECM-BMEC 様細胞は、HC 由来の細胞と同様に連続したタイトジャンクションを示した (図 2)。これらの結果は、*TARDBP*^{N345K/+} EECM-BMEC 様細胞が ALS 患者の中枢神経系 (CNS) の剖検サンプルで観察されるタイトジャンクションの断片化を模倣していることを示しているが、*TARDBP* 遺伝子編集モデル (*TARDBP*^{G295S/G295S} および *TARDBP*^{K263E/K263E}) はこれを再現しなかったことを示している。

ALS 患者 (*TARDBP*^{N345K/+}) 由来の EECM-BMEC 様細胞は拡散バリア機能の障害を示した

ALS 患者の剖検脳および脊髄では、血管からの血清タンパク質 (IgG やフィブリンなど) の漏出が報告されている (Winkler et al., 2013)。しかし、この漏出が神経変性の最終段階によるものか、BMEC の一次的な異常を示しているかは不明であった。この質問に答えるために、ALS 患者由来の *in vitro* EECM-BMEC 様細胞が、神経変性や炎症のない状態で透過性の増加を示すかどうかを調べた。蛍光小分子の透過性を拡散バリア機能の指標として比較したところ、ALS 患者 (*TARDBP*^{N345K/+}) 由来の EECM-BMEC 様細胞は、HC に比べて NaFl 透過性が有意に増加していることが示された (図 3)。次に、*TARDBP* 変異 (*TARDBP*^{G295S/G295S} および *TARDBP*^{K263E/K263E}) が拡散バリア機能の障害に寄与するかどうかを調べた。しかし、*TARDBP*^{G295S/G295S} および *TARDBP*^{K263E/K263E} 由来の EECM-BMEC 様細胞の透過性は、アイソジェニックコントロール (HC2) 由来の細胞と比較して有意に増加しなかった (図 3)。これらのデータは、ALS 患者 (*TARDBP*^{N345K/+}) 由来の EECM-BMEC 様細胞がタイトジャンクションの断片化を示しており (図 2)、このタイトジャンクションの破綻が、小分子のより高い透過性として反映される機能的な意味を持つことを示している。さらに重要なことに、この拡散バリア機能の障害は、神経変性や神経炎症の要因が存在しない状態で示された。

ALS 患者 (*TARDBP*^{N345K/+}) 由来の EECM-BMEC 様細胞は細胞表面接着分子の発現増加を示した

ALS 患者の剖検サンプルでは、CNS に免疫細胞の浸潤が見られることが報告されている (Henkel et al., 2004, Garofalo et al., 2022)。そこで、ALS 患者由来の EECM-BMEC 様細胞が重要な内皮接着分子である ICAM-1 および VCAM-1 を持っているかどうかを調べた。これらの接着分子は、CNS への免疫細胞浸潤を制御する役割を担っている (Marchetti and Engelhardt, 2020)。フローサイトメトリー解析を行った結果、ALS 患者由来の EECM-BMEC 様細胞では、HC 由来の細胞と比較して、細胞表面の VCAM-1 発現が有意に増加していることが確認された (図 4)。興味深いことに、*TARDBP*^{G295S/G295S} および *TARDBP*^{K263E/K263E} 由来の EECM-BMEC 様細胞は、HC と同様に低い VCAM-1 発現を示した (図 4)。ICAM-1 の発現レベルは、炎症性サイトカインで刺激した *TARDBP*^{G295S/G295S} 由来 EECM-BMEC 様細胞では亢進を認めたがその他の *TARDBP* 遺伝子編集クローンの条件では有意な上昇は認めなかった。これらの

結果は、ALS 患者 (*TARDBP*^{N345K/+}) 由来の EECM-BMEC 様細胞が、VCAM-1 を介して免疫細胞の浸潤を促進する可能性があることを示唆している。

ALS 患者 (*TARDBP*^{N345K/+}) 由来の EECM-BMEC 様細胞は PBMC の接着を増加させた

次に、ALS 患者由来の EECM-BMEC 様細胞が、免疫細胞との相互作用を持つかどうかを検討した。これを確認するために、静的条件下での免疫細胞接着アッセイを実施し、各クローンから得られた EECM-BMEC 様細胞の単層上に、蛍光標識された PBMC を接着させた。その結果、ALS 患者由来の EECM-BMEC 様細胞は、炎症性サイトカイン刺激下で、HC 由来の細胞と比較して有意に多くの PBMC が接着することが確認された (図 5)。一方、*TARDBP*^{G295S/G295S} および *TARDBP*^{K263E/K263E} 由来の EECM-BMEC 様細胞では、HC2 と同様に PBMC の接着が増加しなかった。これらのデータは、ALS 患者由来の EECM-BMEC 様細胞が、VCAM-1 を介した免疫細胞接着を促進していることを示している。

ALS 患者 (*TARDBP*^{N345K/+}) 由来の EECM-BMEC 様細胞は TDP-43 の細胞質への異常局在を示し、Wnt/ β -カテニンシグナルの活性化が内皮機能障害を回復させた

ALS 患者の剖検サンプルでは、TDP-43 の細胞質内での異常な凝集が観察されている (Ferrer et al., 2021)。TDP-43 が細胞質に局在することにより、その核内機能が損なわれ、タイトジャンクションの破綻が引き起こされと考えられている。そこで、ALS 患者由来の EECM-BMEC 様細胞において、TDP-43 の局在を解析した。ALS 患者 (*TARDBP*^{N345K/+}) 由来の細胞では、TDP-43 が細胞質に異常局在しており、HC や *TARDBP* 遺伝子編集クローンでは観察されなかった (図 7A)。さらに、Wnt/ β -カテニンシグナル経路の活性化剤である CHIR99021 を用いた治療により、ALS 患者由来 EECM-BMEC 様細胞のタイトジャンクションの破綻が回復し、バリア機能が改善され、亢進した VCAM-1 の発現が軽減した (図 7B, 7C, 7D)。これにより、Wnt/ β -カテニンシグナルが内皮機能障害の回復に重要な役割を果たすことが示唆された。これらの結果は、損傷した内皮細胞が修復可能であり、治療のターゲットとなる可能性があることを示している。

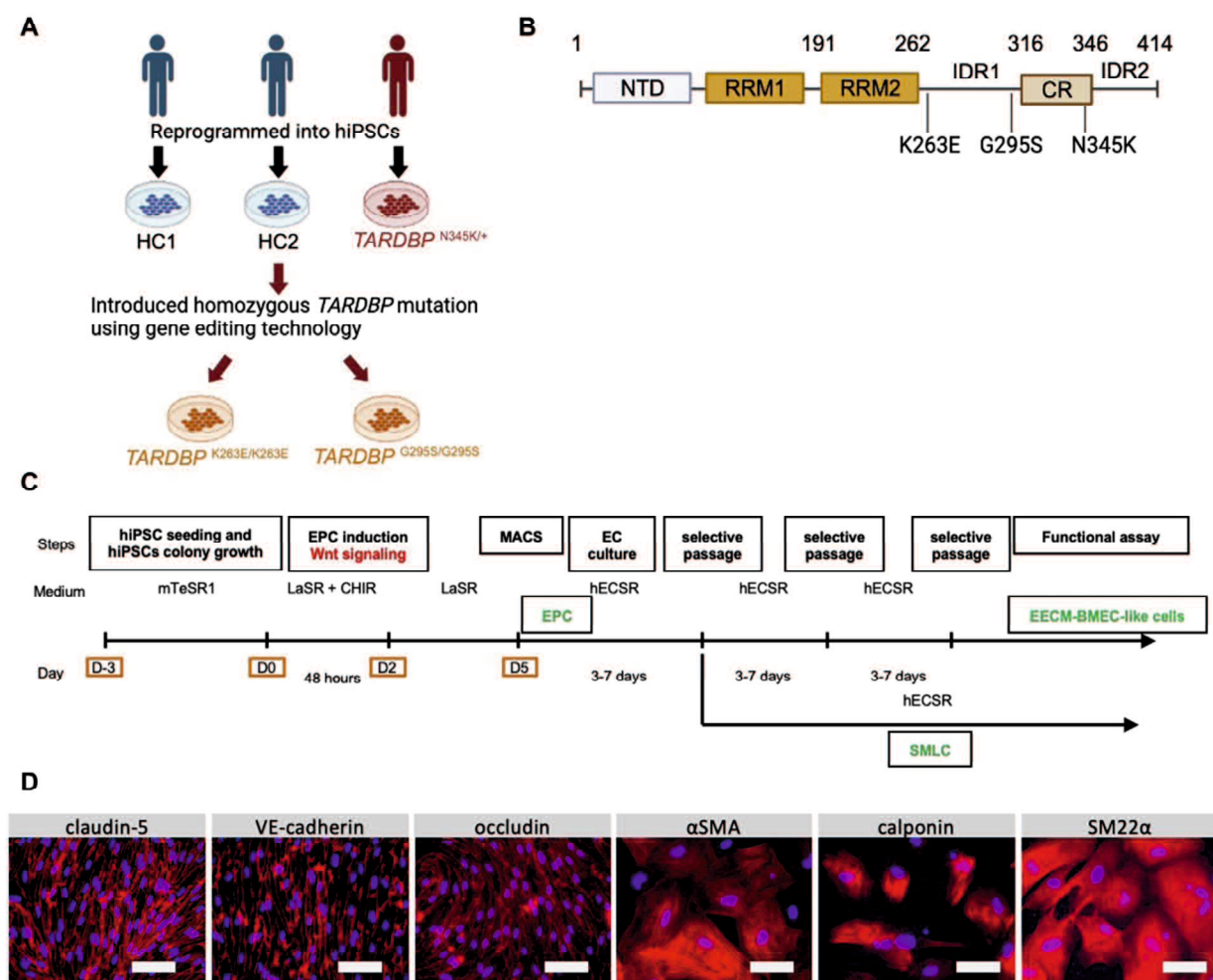


図 1: ALS 患者由来 iPSC 細胞から BMEC 様細胞および平滑筋様細胞を樹立

(A) hiPSC のドナーと *TARDBP* 遺伝子変異を持つ遺伝子編集 hiPSC クローンの由来を示す概略図. hiPSC は, 2 名の異なる健康なドナー (HC1 および HC2) およびヘテロ接合型 *TARDBP* 変異 (*TARDBP*^{N345K/+}) を有する ALS 患者から生成された. HC2 は, *TARDBP*^{K263E/K263E} および *TARDBP*^{G295S/G295S} の同一遺伝子背景をもつアイソジェニックコントロールである. hiPSC (ヒト誘導多能性幹細胞), HC (健常コントロール), ALS (筋萎縮性側索硬化症). 図は BioRender.com を用いて作成した.

(B) 各 *TARDBP* 変異の遺伝子座を示す. NTD (N 末端ドメイン), RRM (RNA 認識モチーフ), IDR (内在的無秩序領域), CR (保存領域). 図は BioRender.com を用いて作成.

(C) EECM プロトコルの概要を示す. EPC (内皮前駆細胞), MACS (磁気活性化細胞選別), EC (内皮細胞), mTeSR1/LaSR/CHIR/hECSR は培地および化合物の名称であり, 詳細は補足表 S2 に記載. EECM (拡張内皮細胞培養法), BMEC (脳微小血管内皮細胞), SMLC (平滑筋様細胞).

(D) EECM-BMEC 様細胞および SMLC の代表的な免疫染色画像を示す. HC 由来の細胞を 8 ウェルチャンパープレートで培養し, EECM-BMEC 様細胞では接合タンパク質 VE-cadherin, Claudin-5, Occludin (赤色) を染色した. SMLC では, 平滑筋細胞マーカーである α SMA, カルポニン, または SM22 α (赤色) を染色した. 核は DAPI (青色) で染色した. スケールバー=50 μ m.

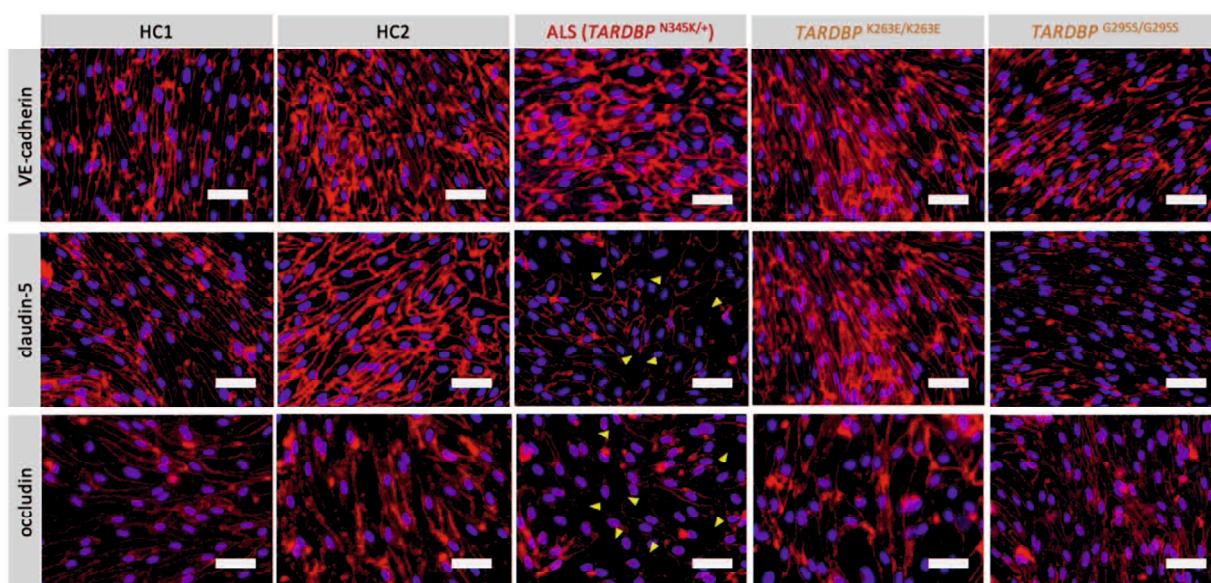


図 2: ALS 患者由来 EECM-BMEC 様細胞におけるタイトジャンクションの破綻

EECM-BMEC 様細胞を $0.4 \mu\text{m}$ の孔径を有する Transwell フィルター上で 6 日間培養した後、接合部の VE-cadherin, Claudin-5, または Occludin (赤色) を免疫染色し、核を DAPI (青色) で染色した。黄色の矢頭は、Claudin-5 および Occludin における目視可能な不連続部分を示している。各染色結果は、5 回以上の独立した実験で確認され、それぞれ別個の分化細胞で実施された。スケールバー= $50 \mu\text{m}$ 。

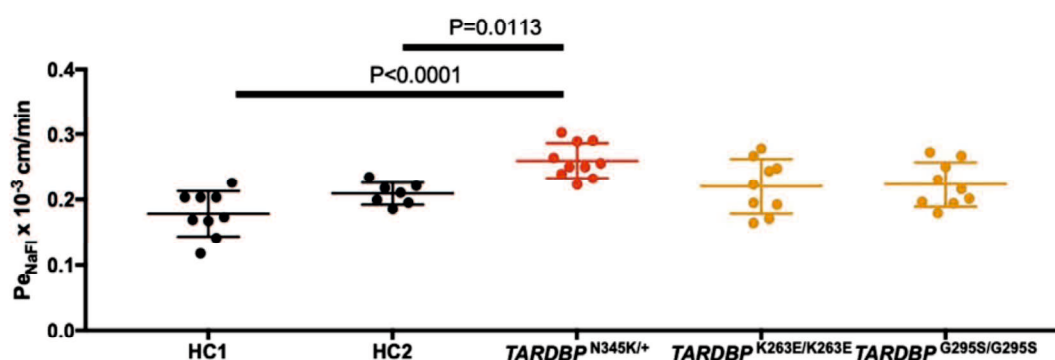


図 3: ALS 患者由来 EECM-BMEC 様細胞における拡散バリア機能の障害

健常コントロール (HC, 黒), ALS クローン (赤), および遺伝子編集クローン (オレンジ) 由来の EECM-BMEC 様細胞を, $0.4 \mu\text{m}$ の孔径を有する Transwell フィルター上で単層培養し, 6 日間でコンフルエントな単層を形成させた。その後, 6 日目に透過性を測定した。透過性は, EECM-BMEC 様細胞単層を通過する 376Da ナトリウムフルオレセイン (NaFI) の蛍光強度から計算した。各点は, 少なくとも 3 回の独立した分化で得られた独立したフィルターの透過性を示し, 各分化について少なくとも 3 回の実験を実施した。データは平均値±標準偏差 (SD) で示した。統計解析には非対応 t 検定を使用し, P 値は対応する図中に記載した。

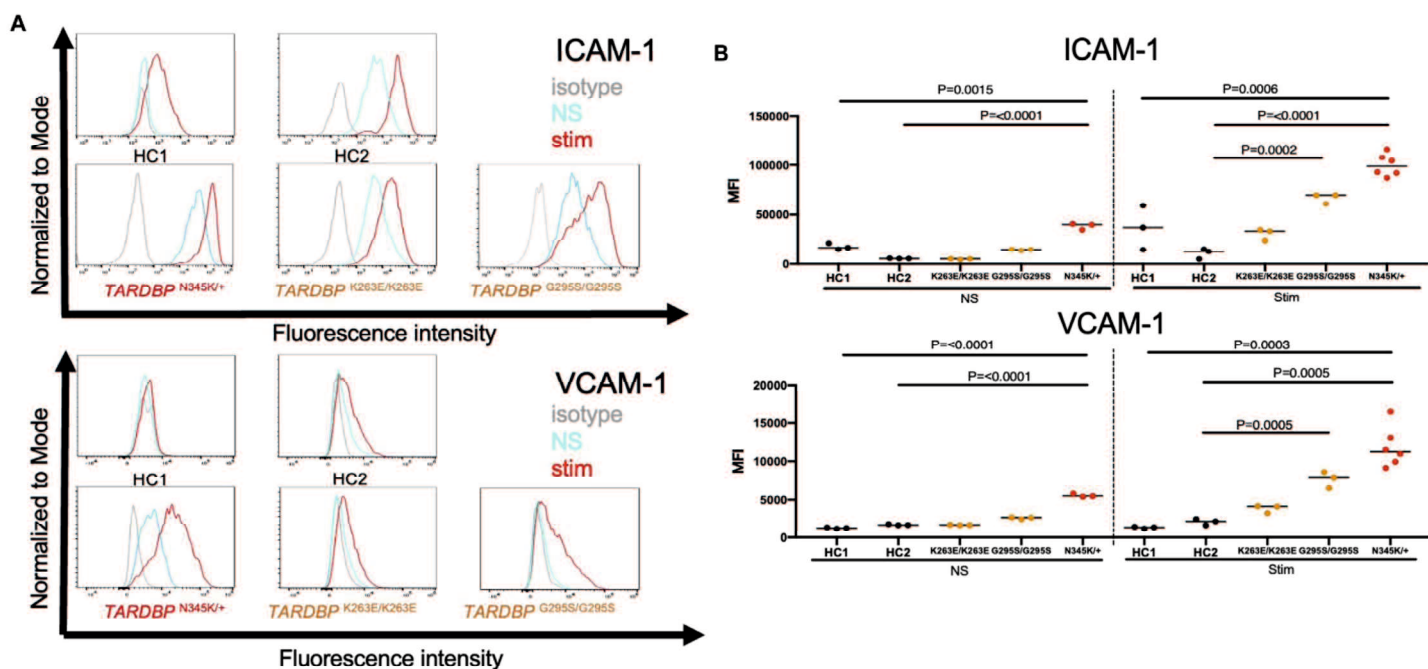


図 4: ALS 患者由来 EECM-BMEC 様細胞における細胞表面接着分子の発現増加

EECM-BMEC 様細胞を IV 型コラーゲンでコーティングしたウェルプレートに播種し、同一の hiPSC クローン由来の条件培地を用いて処理を行った。処理は、炎症性サイトカイン (1ng/mL TNF- α および 20IU/mL IFN- γ) による刺激あり・なしの条件で実施した。接着分子 ICAM-1 および VCAM-1 の細胞表面免疫染色を、フローサイトメーターを用いて検出した。灰色、青色、赤色の線は、それぞれアイソタイプコントロール、非刺激条件 (NS)、および 16 時間の炎症性サイトカイン刺激条件を示す。

(A) 各クローンにおける ICAM-1 および VCAM-1 の代表的なヒストグラムを示す。各クローンについて少なくとも 3 つの独立した試料を解析した。

(B) フローサイトメーターを用いて解析した EECM-BMEC 様細胞表面の ICAM-1 および VCAM-1 の幾何平均値の変化を示す。各記号は、独立して分化させた試料を用いた実験を表す。左側は非刺激条件 (NS)、右側は 1ng/mL TNF- α および 20IU/mL IFN- γ を用いた刺激条件 (Stim) を示す。統計解析には非対応 t 検定を用い、P 値は対応する図中に記載した。

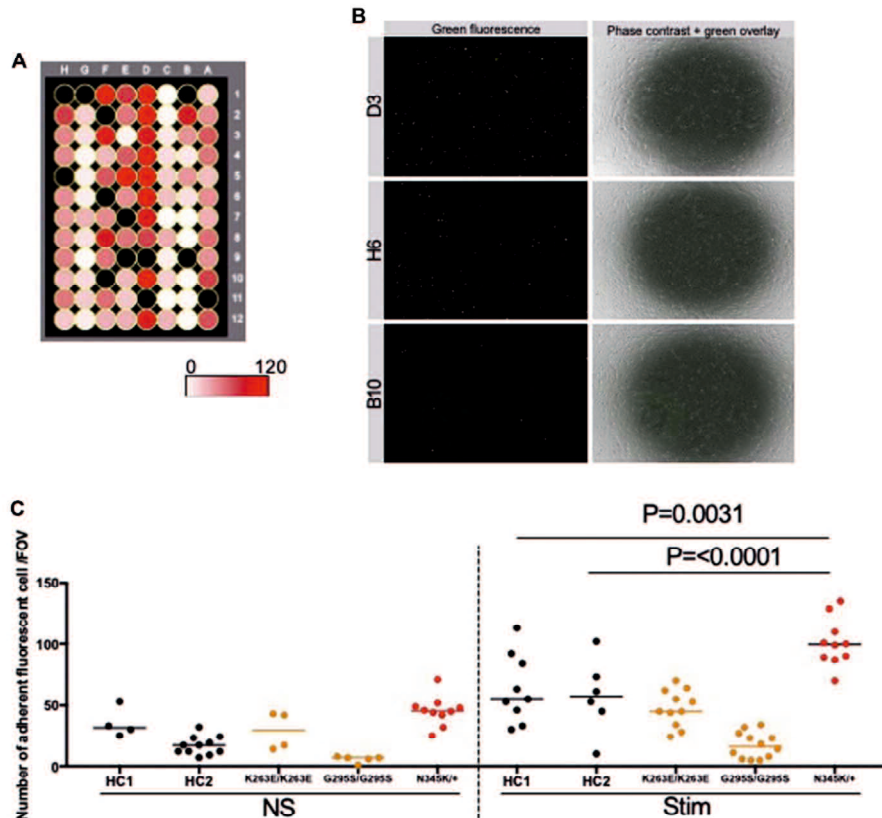


図 5: ALS 患者由来 EECM-BMEC 様細胞にみられた PBMC 接着の増加

EECM-BMEC 様細胞は、IV型コラーゲンでコーティングした 96 ウェルプレートに播種され、同じ hiPSC クローン由来の条件培養液で処理された。処理は、16 時間の炎症性サイトカイン刺激 ($0.1\text{ng/ml TNF-}\alpha + 2\text{IU/ml IFN-}\gamma$) の有無で行われた。アロジェネティックな健康ドナー由来の蛍光標識 PBMC は、EECM-BMEC 様細胞の単層と 30 分間相互作用した。洗浄後、各ウェルの中央領域の位相差および蛍光画像が自動的に撮影された。接着した PBMC の数は、ハイブリッドセルカウントソフトウェア BZ-X アナライザーを用いて自動的に計測された。

(A) ウェル内の接着 PBMC 数のヒートマップ。A1-12: 刺激なし条件の *TARDBP*^{K263E/K263E} 由来クローン B1-6: サイトカイン刺激条件の *TARDBP*^{K263E/K263E} 由来クローン。B7-12: 刺激なし条件の *TARDBP*^{G295S/G295S} 由来クローン。C1-12: サイトカイン刺激条件の *TARDBP*^{G295S/G295S} 由来クローン。D1-12: サイトカイン刺激条件の ALS 患者 (*TARDBP*^{N345K/+}) 由来クローン。E1-6: 刺激なし条件の ALS 患者 (*TARDBP*^{N345K/+}) 由来クローン。E7-12: 刺激なし条件の HC1。F1-12: サイトカイン刺激条件の HC1。G1-12: サイトカイン刺激条件の HC2, H1-12: サイトカイン刺激条件の HC2。黒く塗りつぶされたウェルは、ウェル中央部の細胞層が剥離していたため除外した。

(B) 各ウェルの代表的な画像 緑色蛍光標識された接着 PBMC と、位相差画像上の EECM-BMEC 様細胞の単層を示す。D3, H6, B10 は、それぞれ 高・中・低 程度の PBMC 接着数を代表する図 5 (A) におけるウェルの位置を示す。

(C) 各クローン由来の EECM-BMEC 様細胞に接着した PBMC 数の炎症性サイトカイン刺激の有無による比較。各ドットは、各ウェル中央の視野における接着 PBMC 数を表す。左側: 非刺激条件 (NS) 右側: $0.1\text{ng/ml TNF-}\alpha$ および $2\text{IU/ml IFN-}\gamma$ による刺激条件 (Stim)。データは平均 $\pm$ SD で示されている。統計解析には非対応 t 検定を使用し、P 値は対応する図に記載した。

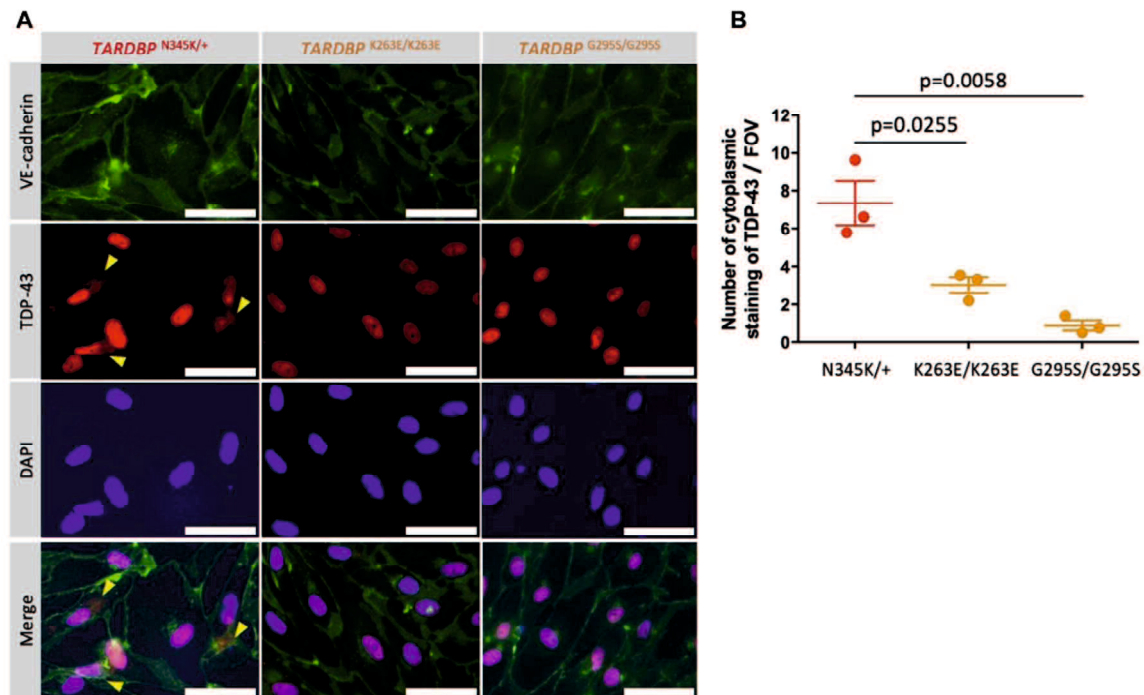


図 6. ALS 患者由来 EECM-BMEC 様細胞における TDP-43 の細胞質内異所性局在

(A) TDP-43 (赤色) VE-cadherin (緑色)，および DAPI (青色) の三重染色を行った代表的な画像を示す．核内に局在する TDP-43 は紫色に染色され，一方で細胞質内に異所性に局在した TDP-43 は赤色に観察された (黄色の矢印)．各染色結果は，少なくとも 3 回の独立した実験で確認され，それぞれ 3 つの別個の分化バッチで実施された．スケールバー = 30 μ m.

(B) 細胞質内の TDP-43 染色を，40 倍視野の画像で計数した．各点は，3 名の独立した観察者が，それぞれ 10 枚の画像を調査して得た計数値の平均を表す．統計解析には非対応 t 検定を用い，P 値は対応する図中に記載している．

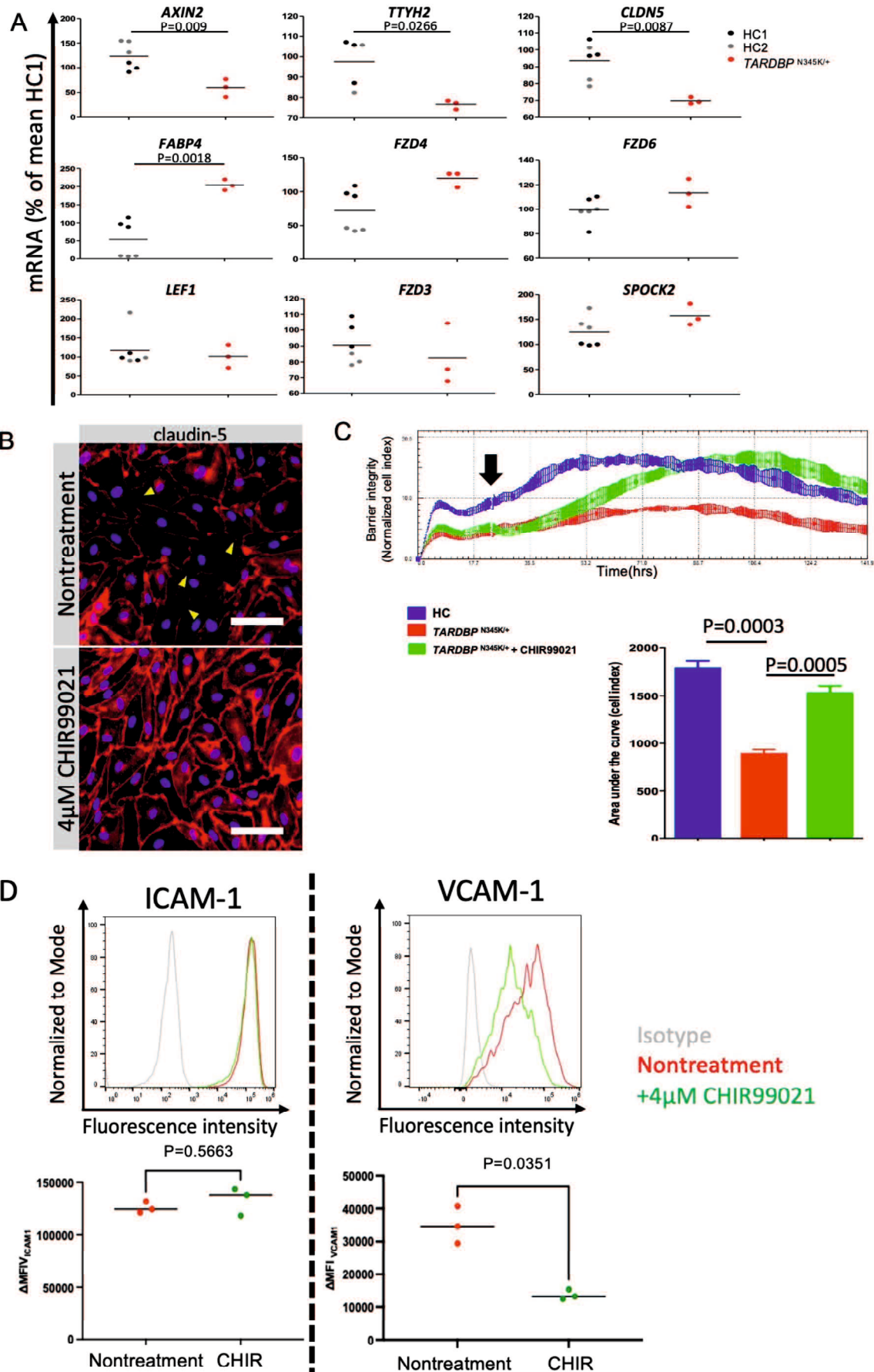


図 7: Wnt/ β -カテニンシグナルの活性化による ALS 患者由来 EECM-BMEC 様細胞のバリア機能回復

(A) AXIN2, TTYH2, CLDN5, LEF1, FZD3, FZD4, FZD6, SPOCK2, および FABP4 の mRNA 発現量の測定 HC1, HC2, および ALS 患者 (*TARDBP*^{N345K/+}) 由来の EECM-BMEC 様細胞において、定量リアルタイム PCR により mRNA 発現を測定した。HC1 由来サンプルの平均値を 100% に設定し、各値の正規化係数として使用した。各ドットは 1 サンプルを表し、各サンプルについて 少なくとも 3 回の qPCR を実施。黒バーは mRNA 発現の平均値を示す。

(B) ALS 患者 (*TARDBP*^{N345K/+}) 由来 EECM-BMEC 様細胞におけるタイトジャンクションの免疫染色。ALS 患者 (*TARDBP*^{N345K/+}) 由来 EECM-BMEC 様細胞を、コラーゲン IV でコーティングしたプレート上で 4 μ M CHIR99021 存在下で 3 日間培養した。タイトジャンクションは Claudin-5 (赤) で染色核は DAPI (青) で染色。各染色結果は、3 回以上の独立した実験 (それぞれ 3 つの異なる分化バッチを使用) で得られた代表的な画像を示す。スケールバー = 40 μ m

(C) EECM-BMEC 様細胞単層のインピーダンス測定。上図: EECM-BMEC 様細胞単層のインピーダンスを示す。HC1 由来細胞 (青), ALS 患者 (*TARDBP*^{N345K/+}) 由来細胞 (赤) を E-plate 16 上に播種。一部のウェルには 4 μ M CHIR99021 (緑) を添加。黒矢印は、CHIR99021 または DMSO コントロールを各ウェルに添加したタイミングを示す。各条件で 少なくとも 3 つの同条件サンプルを用いた。正規化されたセルインデックス値が高いほど、バリア機能の向上を示す。下図: 各条件におけるセルインデックスの曲線下面積 (AUC) を示す。

(D) ALS 患者 (*TARDBP*^{N345K/+}) 由来 EECM-BMEC 様細胞における ICAM-1 および VCAM-1 発現の解析。上段: ICAM-1 および VCAM-1 の代表的な発現ヒストグラム。ALS 患者由来 EECM-BMEC 様細胞において、CHIR99021 処理の有無による影響を示す。細胞は、同じ hiPSC クローン由来の SMLCs の条件培養液で処理され、炎症性サイトカイン刺激 (1ng/ml TNF- α + 20IU/ml IFN- γ) を受けた。ICAM-1 および VCAM-1 の発現はフローサイトメトリー解析により検出。各染色結果は、3 回の独立した実験から得られた代表的なデータを示す。下段: 細胞表面 ICAM-1 および VCAM-1 の発現変化を示す散布図。 Δ MFI (MFI staining - MFI isotype) を用いて発現レベルを定量化。各シンボルは、独立した分化サンプルを用いた 1 回の実験を表す。バーは 3 回のした。実験の平均 Δ MFI 値を示す。統計解析: 非対応 t 検定を実施し P 値は対応する図に記載した。

6. 考察

本研究では、独自に確立した hiPSC 由来の BMEC 様細胞の分化手法である Extended Endothelial Cell Culture Method (EECM) を使用して、ALS の病態における BMEC の役割を調べた。この手法を適用することで、新規の ALS 患者 (*TARDBP*^{N345K/+}) 由来の BMEC 様細胞を樹立した。これまでのところ、ALS 患者における BBB 機能不全に関する報告は剖検検体の研究に限定されており、BBB 機能不全が神経変性の原因であるのか、単なる二次的結果であるのかは明らかではなかった。しかし、いくつかの動物モデルの研究では、神経細胞の変性に先行して BBB の破綻が示されている。例えば、ALS の動物モデルとして広く使用されているヒト SOD1^{G93A} トランスジェニックマウスでは、13 週齢で運動ニューロンの数が減少し、神経症状が出現するが、以下のような早

期の BBB の変化が報告されている：1) 運動ニューロンの減少がまだ見られない 8 週齢で IgG およびプルシアンブルーの漏出が始まる (Zhong et al., 2008), 2) マトリックスメタロプロテイナーゼ-9 の発現増加とタイトジャンクションおよび基底膜成分の染色減少が 10 週齢で観察される (Miyazaki et al., 2011), 3) IgG の沈着, ICAM-1 の増加, および脊髄におけるミクログリアの活性化が 40~80 日 (6~11 週) の無症状期から見られる (Alexianu et al., 2001). これらのデータは, 神経変性に先行する BBB の破壊を示しており, ALS の病態における BBB の役割を解明する重要な手がかりを提供している. これらの研究に基づき, ALS 患者由来の in vitro モデルを用いて, BBB の変化が神経変性の進行に寄与しているかどうかを研究した. 本研究で樹立した ALS 患者 (*TARDBP*^{N345K/+}) 由来の EECM-BMEC 様細胞がタイトジャンクションの破綻を示し, 蛍光小分子の透過性が増加することを明らかにした. また, ICAM-1 および VCAM-1 の発現が増加しており, PBMC の接着試験では, ALS 患者由来 BMEC 様細胞が健康対照群 (HC) 由来の細胞に比べて, より多くの PBMC を引き付けることが示され, これらの接着分子が免疫細胞の CNS への移行を促進する可能性が示唆された. さらにこれらの結果は, ALS に関連する遺伝子変異が神経やグリア細胞だけでなく, 血管バリア機能にも影響を与える可能性を示唆している. ALS 患者 (*TARDBP*^{N345K/+}) 由来 BMEC 様細胞では, TDP-43 の細胞質内異常局在が観察され, これはタイトジャンクション異常と関連していた. 小分子を用いた Wnt/ β -カテニンシグナルの活性化は, BMEC のバリア異常を修復し, タイトジャンクションの改善, 透過性の低下, および VCAM-1 発現の抑制をもたらした. 興味深いことに, 遺伝子編集クローン (*TARDBP*^{G295S/G295S} および *TARDBP*^{K263E/K263E}) 由来 BMEC 様細胞では, バリア機能の異常や免疫細胞接着の増加は観察されなかった. この差異は, 変異部位や対立遺伝子の状態 (ヘテロ接合対ホモ接合) の違いによる可能性がある. 本研究では, 96 ウェルプレートを使用した免疫細胞接着解析法を新たに確立した. この方法は, 多数のサンプルを同一条件下で比較できるよう設計されており, 従来法 (8~16 ウェル) に比べて, 実験間の変動や偏りを最小限に抑えることが可能である. この新技術は, 免疫細胞と BMEC 様細胞の相互作用研究を大幅に加速させると期待される. 本研究にはいくつか限界がある. 第一に, 患者由来の 1 つのモデルのみを解析しており, 特定の ALS 関連変異 (*TARDBP*^{N345K/+}) が BMEC 機能障害に寄与するかどうかを結論づけることはできない. 遺伝的背景が *TARDBP* 変異とは独立して, あるいは *TARDBP* 変異と共同して BMEC 機能に影響を与える補助因子として作用している可能性を排除することはできない. 将来的には, *TARDBP*^{N345K/+} のアイソジェニックモデルや遺伝的修復モデルを用いた機能解析を行い, 特定の変異と BMEC 機能との関連を解明することが必要である. また, ALS 患者における特定の变異と NVU の異常との関連に焦点を当てた剖検例の報告は依然として限られている. BMEC の破綻が ALS 患者において, *TARDBP* 変異だけでなく *C9orf72*, *SOD1*, *FUS* など他の特定の遺伝子変異によって異なるかどうかを明らかにすることは, 今後の重要な研究課題である. 第二に, 単培養された EECM-BMEC 様細胞を用いて血管バリア特性の障害を示したが, ペリサイトやアストロサイトなど NVU を構成する他の細胞を含めたモデルはまだ作成されていない. これらの細胞も *TARDBP* を発現し, その変異の影響を受ける可能性がある. これらの変異型 NVU 構成細胞を共

培養することで血管バリア特性にどのような影響が生じるかは、現時点では解明されていない。第三に、このモデルでは拡散バリアの障害や BMEC による免疫細胞の中樞神経系への浸潤の可能性を示したが、BMEC 機能障害が神経変性に直接寄与するという証拠は示していない。今後の研究では、血流を再現し、ペリサイト、アストロサイト、ニューロン、ミクログリアを取り入れた NVU モデルを発展させ、末梢の変化が神経変性を引き起こす直接的な証拠を明らかにする必要がある。しかしながら本研究では ALS 患者 (*TARDBP*^{N345K/+}) 由来の EECM-BMEC 様細胞が ALS の剖検脳サンプルにおける BMEC の形態変化を再現することを示した。炎症や神経変性などの要因を除外した *in vitro* 環境で BMEC 機能障害が確認されたことは、BMEC の異常が進行した病理の二次的な結果ではなく、むしろ ALS の病因に直接関与していることを示唆している。

7. 結語

本研究で確立した ALS 患者由来 BMEC 様細胞は、ALS における血管バリア機能障害の解明や治療薬開発に役立つモデルである。タイトジャンクション障害、透過性の増加、接着分子の発現増加などの特徴を有し、これらが免疫細胞の CNS 侵入を促進する可能性が示された。このモデルと新しい免疫細胞接着解析技術を活用することで、ALS の病態形成における BMEC の役割に関するさらなる知見が得られることが期待される。

8. 謝辞

研究について実際的にご指導いただき、論文の責任著者となってくださった山口大学臨床神経学講座の西原秀昭先生に深謝申し上げます。共同研究で大変お世話になりました。慶應義塾大学森本悟先生、岡野秀之先生、東北大学鈴木直輝先生、青木正志先生に深謝申し上げます。大学院での研究にあたり多大なご指導をいただきました山口大学臨床神経学講座の中森雅之教授に深謝申し上げます。

9. 参考文献

- ALEXIANU, M. E., KOZOVSKA, M. & APPEL, S. H. 2001. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology*, 57, 1282-9.
- CHEEMALA, A., KIMBLE, A. L., TYBURSKI, J. D., LECLAIR, N. K., ZUBERI, A. R., MURPHY, M., JELLISON, E. R., REESE, B., HU, X., LUTZ, C. M., YAN, R. & MURPHY, P. A. 2023. Loss of Endothelial TDP-43 Leads to Blood Brain Barrier Defects in Mouse Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *bioRxiv*, 2023.12.13.571184.
- CUI, C., INGRE, C., YIN, L., LI, X., ANDERSSON, J., SEITZ, C., RUFFIN, N., PAWITAN, Y., PIEHL, F. & FANG, F. 2022. Correlation between leukocyte phenotypes and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Elife*, 11.
- ENGELHARDT, B. & RANSOHOFF, R. M. 2012. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol*, 33, 579-89.
- ENGELHARDT, J. I., TAJTI, J. & APPEL, S. H. 1993. Lymphocytic Infiltrates in the Spinal Cord in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Archives of Neurology*, 50, 30-36.

- FELDMAN, E. L., GOUTMAN, S. A., PETRI, S., MAZZINI, L., SAVELIEFF, M. G., SHAW, P. J. & SOBUE, G. 2022. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, 400, 1363-1380.
- FERRER, I., ANDRES-BENITO, P., CARMONA, M., ASSIALIOUI, A. & POVEDANO, M. 2021. TDP-43 Vasculopathy in the Spinal Cord in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis (sALS) and Frontal Cortex in sALS/FTLD-TDP. *J Neuropathol Exp Neurol*, 80, 229-239.
- FINNEY, C. A., WILKINS, H. M., SWERDLOW, R. H. & BROWN, D. A. 2023. Activators of neurotoxic microglia in neurodegeneration: is the answer in blood? *Immunol Cell Biol*, 101, 687-689.
- FLORIS, G., BORGHERO, G., CANNAS, A., DI STEFANO, F., MURRU, M. R., CORONGIU, D., CUCCU, S., TRANQUILLI, S., CHERCHI, M. V., SERRA, A., LOI, G., MARROSU, M. G., CHIO, A. & MARROSU, F. 2015. Clinical phenotypes and radiological findings in frontotemporal dementia related to TARDBP mutations. *J Neurol*, 262, 375-84.
- GARBUSOVA-DAVIS, S., HERNANDEZ-ONTIVEROS, D. G., RODRIGUES, M. C., HALLER, E., FRISINA-DEYO, A., MIRTYL, S., SALLOT, S., SAPORTA, S., BORLONGAN, C. V. & SANBERG, P. R. 2012. Impaired blood-brain/spinal cord barrier in ALS patients. *Brain Res*, 1469, 114-28.
- GAROFALO, S., COCOZZA, G., BERNARDINI, G., SAVAGE, J., RASPA, M., ARONICA, E., TREMBLAY, M. E., RANSOHOFF, R. M., SANTONI, A. & LIMATOLA, C. 2022. Blocking immune cell infiltration of the central nervous system to tame Neuroinflammation in Amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Behav Immun*, 105, 1-14.
- GAROFALO, S., COCOZZA, G., PORZIA, A., INGHILLERI, M., RASPA, M., SCAVIZZI, F., ARONICA, E., BERNARDINI, G., PENG, L., RANSOHOFF, R. M., SANTONI, A. & LIMATOLA, C. 2020. Natural killer cells modulate motor neuron-immune cell cross talk in models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Nat Commun*, 11, 1773.
- GASTFRIEND, B. D., NISHIHARA, H., CANFIELD, S. G., FOREMAN, K. L., ENGELHARDT, B., PALECEK, S. P. & SHUSTA, E. V. 2021. Wnt signaling mediates acquisition of blood-brain barrier properties in naïve endothelium derived from human pluripotent stem cells.
- GRAVES, M. C., FIALA, M., DINGLASAN, L. A., LIU, N. Q., SAYRE, J., CHIAPPELLI, F., VAN KOOTEN, C. & VINTERS, H. V. 2004. Inflammation in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord and brain is mediated by activated macrophages, mast cells and T cells. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 5, 213-9.
- GREGORY, J. M., FAGEGALTIER, D., PHATNANI, H. & HARMS, M. B. 2020. Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Current Genetic Medicine Reports*, 8,

121-131.

- HENKEL, J. S., ENGELHARDT, J. I., SIKLOS, L., SIMPSON, E. P., KIM, S. H., PAN, T., GOODMAN, J. C., SIDDIQUE, T., BEERS, D. R. & APPEL, S. H. 2004. Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol*, 55, 221-35.
- IMAIZUMI, K., IDENO, H., SATO, T., MORIMOTO, S. & OKANO, H. 2022. Pathogenic Mutation of TDP-43 Impairs RNA Processing in a Cell Type-Specific Manner: Implications for the Pathogenesis of ALS/FTLD. *eNeuro*, 9.
- JARA, J. H., GAUTAM, M., KOCAK, N., XIE, E. F., MAO, Q., BIGIO, E. H. & OZDINLER, P. H. 2019. MCP1-CCR2 and neuroinflammation in the ALS motor cortex with TDP-43 pathology. *J Neuroinflammation*, 16, 196.
- KATT, M. E., MAYO, L. N., ELLIS, S. E., MAHAIRAKI, V., ROTHSTEIN, J. D., CHENG, L. & SEARSON, P. C. 2019. The role of mutations associated with familial neurodegenerative disorders on blood-brain barrier function in an iPSC model. *Fluids Barriers CNS*, 16, 20.
- KAWAMATA, T., AKIYAMA, H., YAMADA, T. & MCGEER, P. L. 1992. Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol*, 140, 691-707.
- LEVENTOUX, N., MORIMOTO, S., HARA, K., NAKAMURA, S., OZAWA, F., MITSUZAWA, S., AKIYAMA, T., NISHIYAMA, A., SUZUKI, N., WARITA, H., AOKI, M. & OKANO, H. 2020. Generation of an ALS human iPSC line KEIOi001-A from peripheral blood of a Charcot disease-affected patient carrying TARDBP p.N345K heterozygous SNP mutation. *Stem Cell Res*, 47, 101896.
- LEVENTOUX, N., MORIMOTO, S., ISHIKAWA, M., NAKAMURA, S., OZAWA, F., KOBAYASHI, R., WATANABE, H., SUPAKUL, S., OKAMOTO, S., ZHOU, Z., KOBAYASHI, H., KATO, C., HIROKAWA, Y., AIBA, I., TAKAHASHI, S., SHIBATA, S., TAKAO, M., YOSHIDA, M., ENDO, F., YAMANAKA, K., KOKUBO, Y. & OKANO, H. 2024. Aberrant CHCHD2-associated mitochondriopathy in Kii ALS/PDC astrocytes. *Acta Neuropathol*, 147, 84.
- LING, J. P., PLETNIKOVA, O., TRONCOSO, J. C. & WONG, P. C. 2015. TDP-43 repression of nonconserved cryptic exons is compromised in ALS-FTD. *Science*, 349, 650-5.
- LUNETTA, C., LIZIO, A., MAESTRI, E., SANSONE, V. A., MORA, G., MILLER, R. G., APPEL, S. H. & CHIO, A. 2017. Serum C-Reactive Protein as a Prognostic Biomarker in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol*, 74, 660-667.
- MARCHETTI, L. & ENGELHARDT, B. 2020. Immune cell trafficking across the blood-brain barrier in the absence and presence of neuroinflammation. *Vasc Biol*, 2, H1-H18.
- MATSUO, K., ENGELHARDT, B. & NISHIHARA, H. 2023. Differentiation of Human

- Induced Pluripotent Stem Cells to Brain Microvascular Endothelial Cell-Like Cells with a Mature Immune Phenotype. *J Vis Exp*.
- MIYAZAKI, K., OHTA, Y., NAGAI, M., MORIMOTO, N., KURATA, T., TAKEHISA, Y., IKEDA, Y., MATSUURA, T. & ABE, K. 2011. Disruption of neurovascular unit prior to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res*, 89, 718–28.
- MORIMOTO, S., TAKAHASHI, S., ITO, D., DATÉ, Y., OKADA, K., KATO, C., NAKAMURA, S., OZAWA, F., CHYI, C. M., NISHIYAMA, A., SUZUKI, N., FUJIMORI, K., KONDO, T., TAKAO, M., HIRAI, M., KABE, Y., SUEMATSU, M., JINZAKI, M., AOKI, M., FUJIKI, Y., SATO, Y., SUZUKI, N., NAKAHARA, J. & OKANO, H. 2023. Phase 1/2a clinical trial in ALS with ropinirole, a drug candidate identified by iPSC drug discovery. *Cell Stem Cell*, 30, 766–780.e9.
- MURDOCK, B. J., ZHOU, T., KASHLAN, S. R., LITTLE, R. J., GOUTMAN, S. A. & FELDMAN, E. L. 2017. Correlation of Peripheral Immunity With Rapid Amyotrophic Lateral Sclerosis Progression. *JAMA Neurol*, 74, 1446–1454.
- NISHIHARA, H., GASTFRIEND, B. D., KASAP, P., PALECEK, S. P., SHUSTA, E. V. & ENGELHARDT, B. 2021. Differentiation of human pluripotent stem cells to brain microvascular endothelial cell-like cells suitable to study immune cell interactions. *STAR Protoc*, 2, 100563.
- NISHIHARA, H., GASTFRIEND, B. D., SOLDATI, S., PERRIOT, S., MATHIAS, A., SANO, Y., SHIMIZU, F., GOSSELET, F., KANDA, T., PALECEK, S. P., DU PASQUIER, R., SHUSTA, E. V. & ENGELHARDT, B. 2020. Advancing human induced pluripotent stem cell-derived blood-brain barrier models for studying immune cell interactions. *FASEB J*, 34, 16693–16715.
- OKANO, H. & MORIMOTO, S. 2022. iPSC-based disease modeling and drug discovery in cardinal neurodegenerative disorders. *Cell Stem Cell*, 29, 189–208.
- OKANO, H., MORIMOTO, S., KATO, C., NAKAHARA, J. & TAKAHASHI, S. 2023. Induced pluripotent stem cells-based disease modeling, drug screening, clinical trials, and reverse translational research for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 167, 603–614.
- OKANO, H., YASUDA, D., FUJIMORI, K., MORIMOTO, S. & TAKAHASHI, S. 2020. Ropinirole, a New ALS Drug Candidate Developed Using iPSCs. *Trends Pharmacol Sci*, 41, 99–109.
- RYU, J. K., RAFALSKI, V. A., MEYER-FRANKE, A., ADAMS, R. A., PODA, S. B., RIOS CORONADO, P. E., PEDERSEN, L. O., MENON, V., BAETEN, K. M., SIKORSKI, S. L., BEDARD, C., HANSPERS, K., BARDEHLE, S., MENDIOLA, A. S., DAVALOS, D., MACHADO, M. R., CHAN, J. P., PLASTIRA, I., PETERSEN, M. A., PFAFF, S. J., ANG, K. K., HALLENBECK, K. K., SYME, C., HAKOZAKI, H., ELLISMAN, M. H., SWANSON, R. A., ZAMVIL, S. S., ARKIN, M. R., ZORN, S. H., PICO, A. R., MUCKE, L., FREEDMAN, S. B., STAVENHAGEN, J. B.,

- NELSON, R. B. & AKASSOGLU, K. 2018. Fibrin-targeting immunotherapy protects against neuroinflammation and neurodegeneration. *Nat Immunol*, 19, 1212-1223.
- SASAKI, S., IGUCHI, Y., KATSUNO, M. & SOBUE, G. 2015. Alterations in the blood-spinal cord barrier in TDP-43 conditional knockout mice. *Neurosci Lett*, 598, 1-5.
- SHLOBIN, N. A., HAR-Even, M., ITSEKSON-HAYOSH, Z., HARNOF, S. & PICK, C. G. 2021. Role of Thrombin in Central Nervous System Injury and Disease. *Biomolecules*, 11.
- THIRY, L., SIROIS, J., DURCAN, T. M. & STIFANI, S. 2024. Generation of human iPSC-derived phrenic-like motor neurons to model respiratory motor neuron degeneration in ALS. *Commun Biol*, 7, 238.
- TROOST, D., VAN DEN OORD, J. J., DE JONG, J. M. B. V. & SWAAB, D. F. 1989. Lymphocytic infiltration in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Neuropathology*, 8, 289-294.
- TROOST, D., VAN DEN OORD, J. J. & VIANNEY DE JONG, J. M. 1990. Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 16, 401-10.
- WANG, H. Y., WANG, I. F., BOSE, J. & SHEN, C. K. 2004. Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family. *Genomics*, 83, 130-9.
- WINKLER, E. A., SENGILLO, J. D., SULLIVAN, J. S., HENKEL, J. S., APPEL, S. H. & ZLOKOVIC, B. V. 2013. Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*, 125, 111-20.
- XU, X., ZHANG, C., JIANG, J., XIN, M. & HAO, J. 2022. Effect of TDP43-CTFs35 on Brain Endothelial Cell Functions in Cerebral Ischemic Injury. *Mol Neurobiol*, 59, 4593-4611.
- ZAMUDIO, F., LOON, A. R., SMELTZER, S., BENYAMINE, K., NAVALPUR SHANMUGAM, N. K., STEWART, N. J. F., LEE, D. C., NASH, K. & SELENICA, M. B. 2020. TDP-43 mediated blood-brain barrier permeability and leukocyte infiltration promote neurodegeneration in a low-grade systemic inflammation mouse model. *J Neuroinflammation*, 17, 283.
- ZHONG, Z., DEANE, R., ALI, Z., PARISI, M., SHAPOVALOV, Y., O'BANION, M. K., STOJANOVIC, K., SAGARE, A., BOILLEE, S., CLEVELAND, D. W. & ZLOKOVIC, B. V. 2008. ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nat Neurosci*, 11, 420-2.