

Title	単一細胞解析による天疱瘡の自己反応性B細胞レパトアの解明
Sub Title	Elucidation of the repertoire of autoreactive B cells in pemphigus using single cell analysis
Author	山上, 淳(Yamagami, Jun)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2018
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>以前, 申請者らは尋常性天疱瘡患者の末梢血リンパ球を組み換えDsg3(rDsg3-Etag)と反応させ, フローサイトメトリーを用いてIgG産生性Dsg3特異的B細胞を単離し, そのVH遺伝子と塩基配列の解析を行った。その予備結果を応用して, 本年度はこれまでよりも精度と効率を高めたDsg特異的B細胞の単離方法として, 天疱瘡患者の末梢血リンパ球で7-AAD陰性およびCD19陽性となるB細胞の中から, E-tagおよびHis-tag陽性細胞をDsg特異的B細胞として検出できるシステムを確立できた。この方法を検証するため, Dsg3に対するモノクローナル抗体のノックインマウスの末梢血リンパ球を用いてDsg3特異的B細胞の単離を試みた。単離された細胞からmRNAを抽出し, RT-PCR法でIgGの重鎖および軽鎖の増幅が確認された。得られた重鎖および軽鎖の塩基配列を検討したところ, ノックインされたDsg3に反応するモノクローナル抗体と一致していたことから, この方法を用いて末梢血中からDsg3特異的B細胞を単離できる実現性が十分に高いことが示された。</p> <p>実際に落葉状天疱瘡患者の末梢血とDsg1組み換え蛋白を反応させた実験では, この方法で分離された単一細胞から, RT-PCR法でIgGの重鎖(IgH)および軽鎖(Igkまたはλ)にあたるcDNAの増幅が確認できた。得られたIgG領域の塩基配列を導入したHEK細胞は, フローサイトメトリーでDsg1との反応性が確認できた。さらに, このHEK細胞から作成された分泌型のモノクローナル抗体は, ELISAでDsg1特異的な反応性を示し, 正常ヒト皮膚を基質とした蛍光抗体間接法で, 患者血清と同様に細胞表面へのIgGの沈着を示した。</p> <p>単一細胞の分離・解析法が確立して複数症例に拡大できれば, 疾患単位でのDsg特異的B細胞レパトアを樹立することが可能となり, 将来的には自己抗体の病原性や病勢(活動期と寛解期との比較など)と関連づけた研究も計画していきたいと考えている。</p> <p>As a research progress of this year, we were able to establish a system that can detect Dsg-specific B cells as E-tag and His-tag positive cells from the peripheral blood of pemphigus patients. In order to verify this method, we tried to isolate Dsg3-specific B cells from the peripheral blood lymphocytes of knock-in mouse of monoclonal antibody against Dsg3. Messenger RNA was extracted from the isolated cells as a single cell, and the amplification of IgG heavy chain and light chain was confirmed by RT-PCR method. The nucleotide sequences of the obtained heavy and light chains were examined and found to be consistent with the sequences of knocked-in monoclonal antibody reacting with Dsg3. Therefore the feasibility of this method to isolate Dsg3-specific B cells from the peripheral blood was demonstrated.</p> <p>In an experiment in which the peripheral blood of a patient with pemphigus foliaceus was reacted with recombinant Dsg1 protein, the IgG heavy chain (IgH) and light chain (Igk or λ) amplification of cDNA was confirmed from isolated cells as a single cell. The HEK cells, into which the nucleotide sequence of the obtained IgG region had been introduced, were able to bind to Dsg1 in flow cytometric analysis. Furthermore, the secreted monoclonal antibody produced by these HEK cells exhibits Dsg1-specific reactivity by ELISA, and IgG deposition on the cell surface of epidermal cells by indirect immunofluorescence using normal human skin as a substrate just like the serum from pemphigus patients.</p> <p>If single cell isolation and analysis methods can be established, it becomes possible to establish Dsg-specific B cell repertoire and elucidate pathophysiology of autoantibodies in pemphigus in the future.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=201700001-20170009

研究代表者	所属	医学部臨床教室	職名	専任講師	補助額	300 (A) 千円
	氏名	山上 淳	氏名 (英語)	Jun Yamagami		
研究課題 (日本語)						
単一細胞解析による天疱瘡の自己反応性 B 細胞レパトアの解明						
研究課題 (英訳)						
Elucidation of the repertoire of autoreactive B cells in pemphigus using single cell analysis						
1. 研究成果実績の概要						
<p>以前、申請者らは尋常性天疱瘡患者の末梢血リンパ球を組み換え Dsg3(rDsg3-Etag)と反応させ、フローサイトメトリーを用いて IgG 産生性 Dsg3 特異的 B 細胞を単離し、その VH 遺伝子と塩基配列の解析を行った。その予備結果を応用して、本年度はこれまでよりも精度と効率を高めた Dsg 特異的 B 細胞の単離方法として、天疱瘡患者の末梢血リンパ球で 7-AAD 陰性および CD19 陽性となる B 細胞の中から、E-tag および His-tag 陽性細胞を Dsg 特異的 B 細胞として検出できるシステムを確立できた。この方法を検証するため、Dsg3 に対するモノクローナル抗体のノックインマウスの末梢血リンパ球を用いて Dsg3 特異的 B 細胞の単離を試みた。単離された細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR 法で IgG の重鎖および軽鎖の増幅が確認された。得られた重鎖および軽鎖の塩基配列を検討したところ、ノックインされた Dsg3 に反応するモノクローナル抗体と一致していたことから、この方法を用いて末梢血中から Dsg3 特異的 B 細胞を単離できる実現性が十分に高いことが示された。</p> <p>実際に落葉状天疱瘡患者の末梢血と Dsg1 組み換え蛋白を反応させた実験では、この方法で分離された単一細胞から、RT-PCR 法で IgG の重鎖 (IgH) および軽鎖 (Igκ または λ) にあたる cDNA の増幅が確認できた。得られた IgG 領域の塩基配列を導入した HEK 細胞は、フローサイトメトリーで Dsg1 との反応性が確認できた。さらに、この HEK 細胞から作成された分泌型のモノクローナル抗体は、ELISA で Dsg1 特異的な反応性を示し、正常ヒト皮膚を基質とした蛍光抗体間接法で、患者血清と同様に細胞表面への IgG の沈着を示した。</p> <p>単一細胞の分離・解析法が確立して複数症例に拡大できれば、疾患単位での Dsg 特異的 B 細胞レパトアを樹立することが可能となり、将来的には自己抗体の病原性や病勢 (活動期と寛解期との比較など) と関連づけた研究も計画していきたいと考えている。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>As a research progress of this year, we were able to establish a system that can detect Dsg-specific B cells as E-tag and His-tag positive cells from the peripheral blood of pemphigus patients. In order to verify this method, we tried to isolate Dsg3-specific B cells from the peripheral blood lymphocytes of knock-in mouse of monoclonal antibody against Dsg3. Messenger RNA was extracted from the isolated cells as a single cell, and the amplification of IgG heavy chain and light chain was confirmed by RT-PCR method. The nucleotide sequences of the obtained heavy and light chains were examined and found to be consistent with the sequences of knocked-in monoclonal antibody reacting with Dsg3. Therefore the feasibility of this method to isolate Dsg3-specific B cells from the peripheral blood was demonstrated.</p> <p>In an experiment in which the peripheral blood of a patient with pemphigus foliaceus was reacted with recombinant Dsg1 protein, the IgG heavy chain (IgH) and light chain (Igκ or λ) amplification of cDNA was confirmed from isolated cells as a single cell. The HEK cells, into which the nucleotide sequence of the obtained IgG region had been introduced, were able to bind to Dsg1 in flow cytometric analysis. Furthermore, the secreted monoclonal antibody produced by these HEK cells exhibits Dsg1-specific reactivity by ELISA, and IgG deposition on the cell surface of epidermal cells by indirect immunofluorescence using normal human skin as a substrate just like the serum from pemphigus patients.</p> <p>If single cell isolation and analysis methods can be established, it becomes possible to establish Dsg-specific B cell repertoire and elucidate pathophysiology of autoantibodies in pemphigus in the future.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
Kakuta R, Yamagami J, Funakoshi T, Takahashi H, Ohama M, Amagai M	Azathioprine mono therapy in autoimmune blistering diseases: A feasible option for mild to moderate cases.	Journal of Dermatology	2018年3月			