

Title	シェーグレン症候群を端緒とした病変局所のシングルセル解析
Sub Title	Single cell analysis of lesion sites in Sjögren's syndrome
Author	竹下, 勝(Takeshita, Masaru)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2022
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2021. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>初年度である今年にはシェーグレン症候群を中心とする唾液腺の検体収集を行い、一部の解析を実施した。検体採取としては、具体的には、血清抗SSA抗体陽性シェーグレン症候群患者、血清抗セントロメア抗体陽性シェーグレン症候群患者、両抗体陽性患者、両抗体陰性非シェーグレン症候群患者の4群の唾液腺組織を数サンプルずつ収集し、遺伝子発現解析を行った。唾液腺上皮細胞のデータから、文献情報を基に各細胞種のマーカー遺伝子/タンパク質となりそうな特異的に発現するタンパク質をリストアップし、免疫染色で確認中である。今後はリンパ球の解析を進める。各細胞のTCR、BCRの解析を行い、major cloneの抗体をリコンビナントタンパク質として発現し、反応性の解析を行ない、それぞれの細胞が自己抗体産生細胞かどうかを検討する。自己反応性細胞と非自己産生細胞の間で発現解析を行う事で、病態の中心にあると思われる自己反応性リンパ球の特定と、治療標的の探索を行う。</p> <p>検体収集にあたり、これまでシェーグレン症候群としてはあまり報告の無い種類の血清自己抗体を持つ患者由来の唾液腺検体を、偶然、複数入手できた。これまでの経験から、唾液腺組織内でそれらの自己抗体の産生が行われている事が想定された。その為、唾液腺に浸潤したB細胞をシングルセルソートしcDNAとし、そこから各細胞の持つ免疫グロブリン配列をPCRで増幅ののちシーケンシングした。得られた配列を発現ベクターに挿入し、組織由来の抗体ライブラリを作製した。現在までに作製した100種類以上の抗体の反応性、特異性の解析を行なったところ、多くの自己抗体が含まれることを確認でき、現在は対応抗原の詳細な解析を実施している。同定した自己抗原について、当科で保存している多数の自己免疫疾患の血清をスクリーニングし、どのような病態と関連するのかを意味付けする。</p> <p>This year, the first year of the project, salivary gland samples, mainly for Sjögren's syndrome, were collected and partially analyzed. To be specific, several samples of salivary gland tissue were collected from four groups of patients: serum anti-SSA antibody-positive Sjögren's syndrome patients, serum anti-centromere antibody-positive Sjögren's syndrome patients, both antibody-positive patients, and both antibody-negative non-Sjögren's syndrome patients, and gene expression analysis was performed. The data from salivary gland epithelial cells are being immunostained to identify specifically expressed proteins that may serve as markers for each cell type. We will now proceed with the analysis of lymphocytes. We will analyze the TCR and BCR of each cell, express major clone antibodies as recombinant proteins, analyze the reactivity, and examine whether each cell is an autoantibody-producing cell. By analyzing the expression between autoreactive and non-autoreactive cells, we will identify autoreactive lymphocytes that may be at the center of the disease and search for therapeutic targets.</p> <p>In collecting the samples, we fortuitously obtained several salivary gland samples derived from patients with serum autoantibodies that are not commonly reported in Sjögren's syndrome. Based on our experience, we assumed that these autoantibodies might be produced in the salivary gland tissue. Therefore, B cells infiltrating in the salivary glands were single-cell sorted to obtain cDNA, from which the immunoglobulin sequences of each cell were amplified by PCR and sequenced. The obtained sequences were inserted into an expression vector to create a tissue-derived antibody library. The reactivity and specificity of more than 100 antibodies produced to date have been analyzed, and it was confirmed that many of them react with anti-nuclear antibody (ANA) test, indicating that these were autoantibodies. Further detailed analysis of the corresponding antigens is currently in progress. The identified autoantigens will be screened against sera of a number of autoimmune diseases stored in the department to make sense of what pathologies they are associated with.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2021000003-20210249">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2021000003-20210249</a>

publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	医学部臨床教室	職名	助教(有期・医学部)	補助額	300 (A) 千円
	氏名	竹下 勝	氏名 (英語)	Masaru Takeshita		
研究課題 (日本語)						
シェーグレン症候群を端緒とした病変局所のシングルセル解析						
研究課題 (英訳)						
Single cell analysis of lesion sites in Sjögren's syndrome						
1. 研究成果実績の概要						
<p>初年度である今年にはシェーグレン症候群を中心とする唾液腺の検体収集を行い、一部の解析を実施した。検体収取としては、具体的には、血清抗 SSA 抗体陽性シェーグレン症候群患者、血清抗セントロメア抗体陽性シェーグレン症候群患者、両抗体陽性患者、両抗体陰性非シェーグレン症候群患者の 4 群の唾液腺組織を数サンプルずつ収集し、遺伝子発現解析を行った。唾液腺上皮細胞のデータから、文献情報を基に各細胞種のマーカー遺伝子/タンパク質となりそうな特異的に発現するタンパク質をリストアップし、免疫染色で確認中である。今後はリンパ球の解析を進める。各細胞の TCR、BCR の解析を行い、major clone の抗体をリコンビナントタンパク質として発現し、反応性の解析を行ない、それぞれの細胞が自己抗体産生細胞かどうかを検討する。自己反応性細胞と非自己産生細胞の間で発現解析を行う事で、病態の中心にあると思われる自己反応性リンパ球の特定と、治療標的の探索を行う。</p> <p>検体収集にあたり、これまでシェーグレン症候群としてはあまり報告の無い種類の血清自己抗体を持つ患者由来の唾液腺検体を、偶然、複数入手できた。これまでの経験から、唾液腺組織内でそれらの自己抗体の産生が行われている事が想定された。その為、唾液腺に浸潤した B 細胞をシングルセルソートし cDNA とし、そこから各細胞の持つ免疫グロブリン配列を PCR で増幅ののちシーケンスした。得られた配列を発現ベクターに挿入し、組織由来の抗体ライブラリを作製した。現在までに作製した 100 種類以上の抗体の反応性、特異性の解析を行なったところ、多くの自己抗体が含まれることを確認でき、現在は対応抗原の詳細な解析を実施している。同定した自己抗原について、当科で保存している多数の自己免疫疾患の血清をスクリーニングし、どのような病態と関連するのかを意味付けする。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>This year, the first year of the project, salivary gland samples, mainly for Sjögren's syndrome, were collected and partially analyzed. To be specific, several samples of salivary gland tissue were collected from four groups of patients: serum anti-SSA antibody-positive Sjögren's syndrome patients, serum anti-centromere antibody-positive Sjögren's syndrome patients, both antibody-positive patients, and both antibody-negative non-Sjögren's syndrome patients, and gene expression analysis was performed. The data from salivary gland epithelial cells are being immunostained to identify specifically expressed proteins that may serve as markers for each cell type. We will now proceed with the analysis of lymphocytes. We will analyze the TCR and BCR of each cell, express major clone antibodies as recombinant proteins, analyze the reactivity, and examine whether each cell is an autoantibody-producing cell. By analyzing the expression between autoreactive and non-autoreactive cells, we will identify autoreactive lymphocytes that may be at the center of the disease and search for therapeutic targets.</p> <p>In collecting the samples, we fortuitously obtained several salivary gland samples derived from patients with serum autoantibodies that are not commonly reported in Sjögren's syndrome. Based on our experience, we assumed that these autoantibodies might be produced in the salivary gland tissue. Therefore, B cells infiltrating in the salivary glands were single-cell sorted to obtain cDNA, from which the immunoglobulin sequences of each cell were amplified by PCR and sequenced. The obtained sequences were inserted into an expression vector to create a tissue-derived antibody library. The reactivity and specificity of more than 100 antibodies produced to date have been analyzed, and it was confirmed that many of them react with anti-nuclear antibody (ANA) test, indicating that these were autoantibodies. Further detailed analysis of the corresponding antigens is currently in progress. The identified autoantigens will be screened against sera of a number of autoimmune diseases stored in the department to make sense of what pathologies they are associated with.</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)			