慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	自己免疫疾患の根治を目標とする抗原特異性と遺伝子発現のシングルセル統合解析
Sub Title	Single cell integrated analysis of antigen specificity and gene expression for the cure of autoimmune diseases
Author	竹下, 勝(Takeshita, Masaru)
Publisher	
Publication year	2022
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2021.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究は自己免疫疾患の病変部位のB細胞に着目した研究である。BCRを抗体の形で精製する事でin vitroで病変部位で起きている免疫反応の抗原特異性を調べた。シェーグレン症候群の唾液腺や関節リウマチ、混合性結合組織病、シェーグレン症候群の肺組織では血清と一致した自己抗体を産生するB細胞が高率に存在し、自己免疫反応が起こっている事が推察された。ポリクローナルに抗体が存在する血清と異なり、病変組織由来のBCRを基にしたモノクローナル抗相として解析する事で、抗体の親和性成熟やepitope spreadingに関わる抗体などの同定が可能であった。 In this study, we focused on B cells at the site of the lesion and examined the antigen specificity of the immune response occurring at the lesion site in vitro by purifying the BCRs as recombinant monoclonal antibodies. The B cells in salivary glands of Sjogren's syndrome, and lungs of rheumatoid arthritis, mixed connective tissue disease, and Sjogren's syndrome produced autoantibodies that matched the serum at a high rate, suggesting that an autoimmune reaction was ongoing at the lesion site. Disease lesion-derived monoclonal antibodies enabled the detail immunological analysis, such as the effect of affinity maturation in each antibody and spreading epitopes.
Notes	研究種目：若手研究 研究期間：2020～2021 課題番号：20K17430 研究分野：リウマチ・膠原病
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20K17430seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　 ５ 月 ３１ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2021
課題番号：２０Ｋ１７４３０

研究課題名（和文）自己免疫疾患の根治を目標とする抗原特異性と遺伝子発現のシングルセル統合解析

研究課題名（英文）Single cell integrated analysis of antigen specificity and gene expression for the cure of autoimmune diseases

研究代表者

竹下　勝（Masaru, Takeshita）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：１０５７１１３５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は自己免疫疾患の病変部位のB細胞に着目した研究である。BCRを抗体の形で精製する事でin vitroで病変部位で起きている免疫反応の抗原特異性を調べた。シェーグレン症候群の唾液腺や関節リウマチ、混合性結合組織病、シェーグレン症候群の肺組織では血清と一致した自己抗体を産生するB細胞が高率に存在し、自己免疫反応が起こっている事が推察された。ポリクローナルに抗体が存在する血清と異なり、病変組織由来のBCRを基にしたモノクローナル抗相として解析する事で、抗体の親和性成熟やepitope spreadingに関わる抗体などの同定が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
これまでの病変局所の解析により、病変部位で血清に対応した自己抗体が産生されている事、抗体の変異情報から抗体が抗原によりセレクションを受けている事、モノクローナル抗体とすることで血清ではわからなかった詳細な免疫実験が可能になる事、病変局所のシングルセル解析でクラスタリングによるセルサブセットの分類後に疾患と非疾患を比較することで疾患特異的な遺伝子変化、パスウェイ変化を検出できる事、このような手法が未知の自己抗体の同定に役立つ事など、多くの発見があった。本手法はこれまで解析した疾患以外にも広く応用ができ、病変局所の抗原特異性の解析手法として確立できたと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on B cells at the site of the lesion and examined the antigen specificity of the immune response occurring at the lesion site in vitro by purifying the BCRs as recombinant monoclonal antibodies. The B cells in salivary glands of Sjogren's syndrome, and lungs of rheumatoid arthritis, mixed connective tissue disease, and Sjogren's syndrome produced autoantibodies that matched the serum at a high rate, suggesting that an autoimmune reaction was ongoing at the lesion site. Disease lesion-derived monoclonal antibodies enabled the detail immunological analysis, such as the effect of affinity maturation in each antibody and spreading epitopes.

研究分野：リウマチ・膠原病

キーワード：シェーグレン症候群　関節リウマチ　混合性結合組織病　抗原特異性　自己抗体

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

全身性自己免疫疾患の代表例である関節リウマチの治療は、生物学的製剤の登場により著しい進歩を遂げたものの、シェーグレン症候群、炎症性筋疾患、血管炎などの疾患では明確な分子標的が定まっていないものも多く、治療はステロイドやシクロフォスファミド投与が主体となり、長期使用による副作用が問題となっている。これらの疾患の治療標的として、病変部位で高発現している分子や細胞群を探索する事は短期的には非常に重要である。しかしながらその様な治療は分子標的対症療法に留まり、抗体製剤などの高価な薬剤の継続的な投与が必要となる可能性が高い。従って、長期的には疾患の根治を目指す治療法の開発が重要となってくる。

このような短長期的な課題がある自己免疫疾患の治療法の開発においては、現時点では解明されていない二つの課題がある。一つは、自己免疫反応を起こしている T 細胞・B 細胞などのリンパ球と、それ以外の感染免疫・腫瘍免疫などで働く正常な免疫細胞に、機能として差があるのか？という点である。リンパ球には様々なサブセットがあり、それぞれ機能も異なる。正常では、自己特異的リンパ球は抑制状態にあるとされるが、多くの自己免疫疾患において病変局所に浸潤しているリンパ球は、実際には逆の pro-inflammatory な状態である。自己反応性のリンパ球の機能やそれに必要な遺伝子発現・タンパク質発現に関して、正常の免疫反応と異なる部分が存在すれば、それを標的とした治療を行う事で副作用なく自己免疫のみを治療することが可能となる。これまで多数の研究がなされているものの、後述するように自己反応性のリンパ球とそうでないものを見分ける事が技術的に非常に困難であり、いまだ明らかになっていない。

もう一つの課題は自己免疫反応の真の標的は何か？という点である。B 細胞の対応抗原は比較的抗原を同定しやすく、患者血清を用いた研究で多くの自己抗体が同定されてきた。しかし関節リウマチでは従来のリウマチ因子や抗シトルリン化ペプチド抗体に加えて、ここ 1-2 年でもカルバミル化やアセチル化等の翻訳後修飾を受けたタンパクに対する抗体が同定されており、総称して Anti-modified protein antibody: AMPA と呼ばれている。申請者も 2019 年にシェーグレン症候群の唾液腺において新規自己抗原を見出しており、未同定の自己抗原がまだ多数存在する事は明らかである。T 細胞の抗原特異性の同定は技術的に困難であるとされ、ELISPOT やテトラマーを用いた抗原特異性の研究は複数報告されているものの、100 万細胞に数個程度の特定の抗原特異性を持つ細胞の同定はシグナル/ノイズ比や再現性に問題があり、特に TCR の親和性が弱いとされる自己免疫に関して普遍的と言える結果は得られておらず、T 細胞についてはほぼ全て未解明というのが現状である。これら 2 つの大きな問題に答えを出すことが、自己免疫機構の完全解明と疾患の根治療法の確立に必須であると考えている。

２．研究の目的

本研究の目的は自己免疫機構の完全な解明であるが、その為には自己免疫反応を起こしている細胞の性質・挙動・特徴を正確に捕捉することが重要である。その過程で抗原特異性を正確に評価し、通常の免疫と自己免疫を明確に区別することが必須であるが、上記の通り、それは技術的に非常に困難であった。しかしながら近年の特にシングルセル解析技術の進歩に伴い、抗原特異性を決定している B 細胞受容体（BCR）、T 細胞受容体（TCR）の核酸配列の解析が可能になり、抗原特異性を in vitro で再現して実験する事が可能になった。しかしそれには微量な検体からのシングルセル解析技術に加え、遺伝子、タンパク、細胞を扱う多岐にわたる免疫学分子生物学的な技術の蓄積を要する。申請者は一貫してヒトにおける病態の解明のための研究を積み上げてきており、関節リウマチ、シェーグレン症候群、IgG4 関連疾患等で病態と関連する細胞・分子メカニズムの一端を解明すると共に各状況で免疫の解析技術を確立してきた。個々の解析であれば他の研究組織でも同様に実施できると思われるが、本研究はこれまでの経験と技術と最新の解析手法を統合して解析する事で、新たな知見を見出すとともに、広く多くの疾患に応用できるよう、自己免疫疾患の病態研究のスタンダードとなる解析手法の確立を目指す。

３．研究の方法

各種自己免疫疾患患者の末梢血および生検時の余剰組織サンプルを収集した。病変組織ははさみとコラゲナーゼによりシングルセル化し、FACS Aria により 96well にソート、Smart-seq2 法でシングルセル cDNA ライブラリを作り、B 細胞ではそこから H 鎖、L 鎖の可変領域を PCR で増幅してシークエンスを、唾液腺上皮細胞では Nextera XT キットにより NGS ライブラリ化しシークエンスを行った。H 鎖、L 鎖の可変領域の配列は IgG の定常領域を含むベクターに挿入し、Expi293T 細胞で抗体の産生を行った。抗体は Ab-Capcher Mag2 で精製し、定量後、各種実験に使用した。自己抗原は SBP タグおよび GFP とリンカーでつないだ形でクローニングし、293T 細胞に発現させ、Lysate として保存した。反応性確認は、各抗原の lysate を streptavidin 結合 Dynabeads で on beads 精製を行ったものを抗体と反応させ、次に蛍光標識抗ヒト IgG 抗体を反応させ、FACS Verse を用いて定量した。

４．研究成果

免疫細胞を自己反応性と非自己反応性に分類するため、BCR を抗体の形で精製する事で in vitro で抗原特異性の判断が可能な病変部位の B 細胞を中心に研究を進めた。一部、病変組織に

もともと存在する細胞(唾液腺上皮細胞)についても解析を開始した。

(1) シェーグレン症候群を中心とした、抗セントロメア抗体(ACA)の対応抗原の同定

本研究の開始前に、自己免疫機構の解明にあたり、シェーグレン症候群の病変局所（唾液腺）に浸潤し臓器障害を引き起こしていると考えられるリンパ球の抗原特異性の同定を試みた所、血清抗 SSA/SSB 抗体陽性患者の唾液腺では抗 SSA/SSB 抗体が、血清抗セントロメア抗体(ACA)陽性患者の唾液腺では ACA が産生されており、その比率は形質細胞の約 30%と高率であることが明らかになった。さらに作製した抗体の中に ACA の新規対応抗原である MIS12 複合体に反応する抗体が存在する事を見出し(Ann Rheum Dis,79(1):150-158,2020)、さらにその周囲に未同定の対応抗原が存在することが想定された。本研究ではまずこれを明らかにするため、近年のクライオ電顕を含む構造解析手法の進化に伴い明らかになった、セントロメア構造を構築するタンパク質を網羅的にリストアップし、リコンビナントタンパク質として作製した。以前の研究で自己抗体は高度に立体構造を認識する事が分かっていたため、構造上複合体を組むタンパク質毎にまとめて哺乳類細胞で発現させ、立体構造を保ったタンパク質ライブラリを完成させた。それに対し、200 以上の血清検体を用いてどのタンパク質が対応抗原になっているのかを調べた。

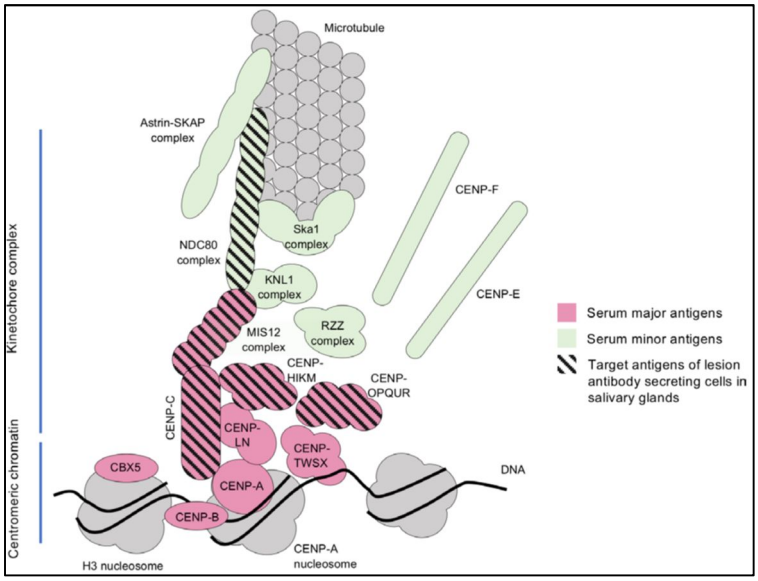

図 1. 抗セントロメア抗体対応抗原

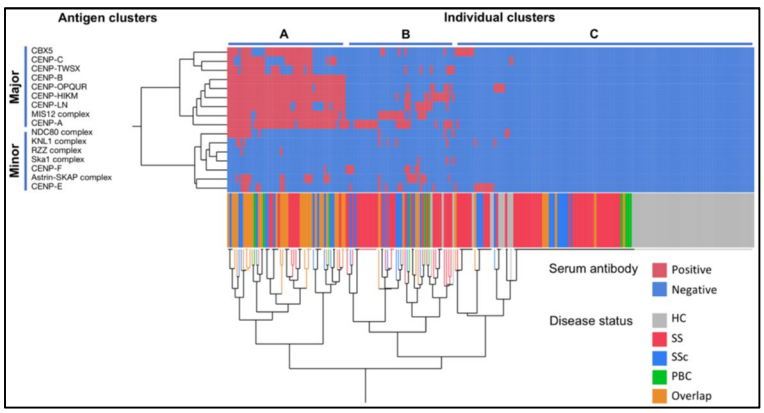

図 2. 各疾患患者における各自己抗体の出現

横 1 行が 1 抗原、縦 1 列が 1 患者を指し、抗体ありが赤で示す

結果の要約は図 1 に示す通りで、これまで同定されていた CENP-A、B、C、CBX5、当科で同定した MIS12 complex に加え、CENP-HIKM、CEMP-OPQUR、CENP-LN、CENP-TWSX が対応抗原となっており、一部の唾液腺からは NDC complex に対する抗体も同定され、これらすべてが新規自己抗原であった。これら新たな自己抗原を含めて、ACA の出現する全身性強皮症(SSc)、シェーグレン症候群(SS)、原発性胆汁性胆管炎(PBC)もしくはそのオーバーラップの血清をクラスタリングした(図 2)。この A の部分の患者は既存の測定法である抗 CENP-B 抗体検出の ELISA で陽性になる群、B の部分が既存の測定法では陽性にならないが多くの抗原を測定すると 2 抗原以上で陽性と判定される群、C が抗体陰性群と判定でき、B の部分の今まで自己抗体情報の無かった患者を新たに抗セントロメア抗体陽性と判定でき、診断、表現型予測、治療反応性の予測等ができるようになると考えられる。

(2) 自己免疫疾患に合併する間質性肺炎における自己反応性の検討

シェーグレン症候群の唾液腺と同様に、いくつかの自己免疫性疾患で合併する間質性肺炎の肺組織に対し、自己反応性の対応抗原の検討を行った。関節リウマチ、混合性結合組織病(MCTD)、シェーグレン症候群の 3 疾患の肺胞洗浄液(BALF)の余剰分を臨床検体として収集し、その中の形質細胞から抗体を作製した。肺においても唾液腺同様、血清と病変局所の自己反応性はリンクしており、血清リウマチ因子(RF)および抗シトルリン化タンパク質抗体(ACPA)陽性の患者 BALF 中の形質細胞では RF および ACPA が産生され、血清抗 RNP 抗体陽性の MCTD-BALF では抗 RNP 抗体が、抗 Ro60 抗体陽性シェーグレン症候群 BALF では抗 Ro60 抗体が産生されており、その割合は 6-23%であった。複数の疾患、複数の臓器で「自己免疫疾患患者の自己抗体は病変局所の浸潤

したB細胞が産生する」という現象が認められたため、これは多くの自己免疫疾患に共通した病態と考えられた。

それに加えて、本研究では2つの現象が確認された。1つは関節リウマチ由来の抗体に関してである。近年関節リウマチではシトルリン化修飾を受けたタンパク質を認識するACPAだけでなく、AMPA と呼ばれるカルバミル化、アセチル化などの翻訳後修飾に対する抗体も出現する事が知られている。そのため、関節リウマチのBALFから作製した抗体にこれらが含まれていないか、(ビメンチン、エノラーゼ、フィブリノゲンα/βの4主要タンパク質)×(翻訳後修飾前、シトルリン化、カルバミル化、アセチル化の4修飾状態)の16ペプチドを合成し、抗体が結合するか検討した。結果は図3左の通りで、既存のACPA検出用のELISAでは検出できないAMPAが含まれていた。抗体のsomatic hypermutationをgerm line配列に戻すことで、抗体が最初どの様なものに反応し、変異を蓄積しつつどう変わったかを調べることが出来るが、それらの抗体はsomatic hypermutationの蓄積に伴うタンパク質の種類や修飾の変化が見られ、肺内で修飾蛋白質に対してセレクションを受けていると考えられた。

APCA-positive by ELISA

N47-23	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	103	892	521	99
Eno	117	4775	136	97
Fibα	94	192	92	99
Fibβ	134	2348	4085	99

N47-36	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	104	17277	104	100
Eno	92	127	94	95
Fibα	101	98	98	100
Fibβ	106	109	104	117

N88-6	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	106	1730	1973	8976
Eno	96	94	100	97
Fibα	113	96	94	98
Fibβ	136	148	500	876

N88-17	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	105	34413	13573	125
Eno	102	6267	100	94
Fibα	96	97	94	97
Fibβ	116	576	455	120

N88-19	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	103	20468	8707	105
Eno	100	95	427	92
Fibα	98	97	106	96
Fibβ	111	93	219	96

N88-22	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	105	302	3521	506
Eno	91	38570	97	94
Fibα	98	97	106	95
Fibβ	104	1597	155	101

ACPA-negative by ELISA

N88-4	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	102	185	892	98
Eno	108	105	102	99
Fibα	96	117	95	101
Fibβ	127	96	105	93

N88-23	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	115	99	140	98
Eno	92	262	94	94
Fibα	97	100	121	99
Fibβ	98	94	96	117

N88-24	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	105	134	1623	96
Eno	108	43908	2839	98
Fibα	107	96	162	95
Fibβ	94	94	100	116

N85-25	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	100	100	105	98
Eno	98	13763	102	95
Fibα	97	99	103	97
Fibβ	97	94	93	103

N88-26	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	104	98	100	100
Eno	93	197	93	96
Fibα	97	102	99	96
Fibβ	112	93	98	95

L-chain reverted

N47-23	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	124	2709	140	102
Eno	114	9381	96	92
Fibα	96	97	95	98
Fibβ	140	223	266	111

N47-36	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	106	370	101	99
Eno	113	2034	95	95
Fibα	96	98	107	93
Fibβ	107	125	104	102

N88-6	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	104	331	7146	24564
Eno	95	8169	15647	26798
Fibα	113	98	105	98
Fibβ	183	142	2060	7638

N88-17	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	153	111	112	161
Eno	131	95	95	99
Fibα	100	94	93	98
Fibβ	116	106	95	98

N88-19	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	106	101	99	100
Eno	92	93	94	96
Fibα	97	95	109	95
Fibβ	97	97	94	108

N88-22	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	103	113	146	117
Eno	100	5655	106	94
Fibα	97	98	97	96
Fibβ	117	773	131	108

H-chain reverted

N47-23	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	100	98	97	97
Eno	95	104	92	96
Fibα	97	96	96	99
Fibβ	118	99	92	94

N47-36	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	102	103	96	99
Eno	94	101	94	94
Fibα	96	161	94	97
Fibβ	115	112	97	95

N88-6	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	104	175	155	296
Eno	93	106	95	98
Fibα	99	99	101	98
Fibβ	101	101	94	91

N88-17	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	111	99	100	110
Eno	95	107	93	95
Fibα	96	93	92	95
Fibβ	103	101	104	137

N88-19	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	128	100	98	98
Eno	105	98	108	96
Fibα	97	96	97	97
Fibβ	117	123	98	94

N88-22	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	103	100	100	100
Eno	94	95	93	103
Fibα	100	96	103	92
Fibβ	102	95	96	100

H+L chain reverted

N47-23	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	119	102	101	105
Eno	98	99	94	94
Fibα	97	96	104	99
Fibβ	115	95	107	102

N47-36	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	104	122	99	98
Eno	127	158	121	91
Fibα	96	98	92	95
Fibβ	108	120	95	108

N88-6	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	116	125	579	3796
Eno	102	230	12899	18485
Fibα	104	100	95	96
Fibβ	118	107	111	125

N88-17	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	106	103	225	646
Eno	97	107	95	110
Fibα	100	97	92	99
Fibβ	121	96	98	105

N88-19	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	106	100	100	103
Eno	120	98	93	94
Fibα	97	97	94	97
Fibβ	100	98	94	94

N88-22	Naïve	Cit	Car	Ac
Vim	104	104	98	99
Eno	95	96	100	97
Fibα	96	105	110	94
Fibβ	101	105	99	112

図3. 関節リウマチのBALF由来のAMPAの反応性

各表が各抗体、数値が反応量で、陽性を赤で示す。左2列が既存のELISAで検出可/不可の抗体の反応性を示す。右3列がL鎖、H鎖、両鎖のsomatic hypermutationを戻した抗体の反応性を示す。

2つ目はMCTDのBALF由来の抗体の反応性についてである。対応抗原であるRNPを構成する11タンパク質をそれぞれ別に産生し、ウェスタンブロットにより確認した。臨床サンプルから取得される自己抗体は高度に立体構造を見ることが分かっているが、図4に示す通り、いくつかの抗体(N83-12やN83-31)はlinear epitopeを認識すると考えられ、ウェスタンブロットでも検出でき、いくつかの抗体(N83-33やN83-47)ではできなかったが、N83-28という抗体はRNP構成タンパク質のうち、SNRPA,B,B′,Cと同時に反応した。過去の研究ではRNP抗体は最初にSNRNP70

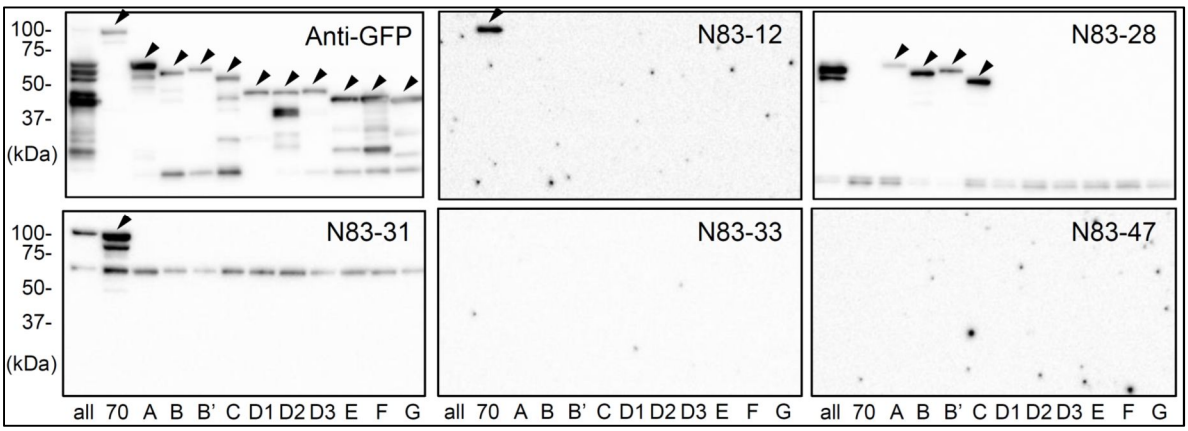

図4. MCTDのBALF由来の抗体の反応性

RNPの各構成タンパク(SNRNP70, SNRPA,B,B,C,D1-3,E,F,G)のGFP癒合タンパクを発現し、タンパク質タグで精製した。各精製タンパク質を電気泳動後膜に転写し抗体でブロットした。左上がポジコン(anti-GFP抗体)、他5つが5種のモノクローナル抗体でブロットしたもの。矢頭は目的タンパク質の大きさのバンドを示す。

と SNRPB/B′に対して反応が始まり、次に SNRPA と C に反応するように epitope spreading すると考えられていたが、本抗体はまさに epitope spreading を起こしている抗体を捉えたものと考えらえた。

(3) シェーグレン症候群の唾液腺におけるシングルセル解析

シェーグレン症候群・およびコントロール疾患患者の唾液腺より、Smart-seq2 法を用いて腺上皮細胞を 200 細胞以上シングルセルソートし、NGS での解析を実施した。それぞれの細胞で高発現している遺伝子を文献的にアノテーションし、腺房細胞、導管細胞、幹細胞が含まれている事を確認した(図 5)。さらに、それぞれの細胞のマーカーについて免疫染色で確認した。各細胞の、疾患と非疾患で発現遺伝子の差の解析を行った所、複数のパスウェイで差がある事を認めた(図 6)。上記とは別に、同様の解析を多数の細胞を処理可能なクロミウムコントローラーを使用して開始した。こちらでは腺上皮細胞だけではなく、浸潤したリンパ球等の免疫担当細胞も同時に処理を行いデータを取得している。これまでの症例でサンプル処理条件を確定し、一部の検体についてはデータが無事取得できている事を確認した。今後更にサンプル収集を進め、疾患・非疾患での解析を行う予定としている。その他の疾患のサンプルは時折得られるため、解析処理を行いつつ、まとまったサンプル数が得られたら解析を開始する予定としている。

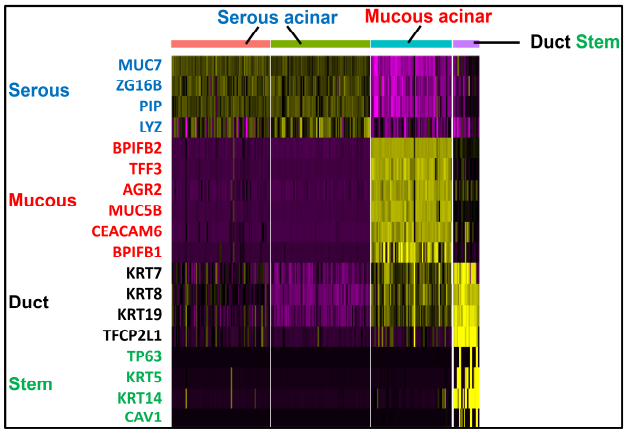

図 5. マーカー遺伝子によるクラスタリング

Duct Stem

Pathways	FDR
Translocation of ZAP-70 to Immunological synapse	2.0E-04
Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) transport and uptake by Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs)	2.6E-04
Interferon gamma signaling	5.3E-04
Iron uptake and transport	1.5E-03
Cell Cycle	2.9E-09
Cyclin A/B1/B2 associated events during G2/M transition	7.0E-04
SUMOylation of DNA replication proteins	1.2E-02
Condensation of Prometaphase Chromosomes	1.3E-02
TP53 Regulates Transcription of Cell Cycle Genes	1.7E-02

図 6. Duct/stem cell の enrichment pathways

赤：発現亢進、青：発現低下

(4) 今後の展望

これまでの病変局所の解析により、病変部位で血清に対応した自己抗体が産生されている事、抗体の変異情報から抗体が抗原によりセレクションを受けている事、モノクローナル抗体とすることで血清ではわからなかった詳細な免疫実験が可能になる事、病変局所のシングルセル解析でクラスタリングによるセルサブセットの分類後に疾患と非疾患を比較することで疾患特異的な遺伝子変化、パスウェイ変化を検出できる事、このような手法が未知の自己抗体の同定に役立つ事など、多くの発見があり、これはシェーグレン症候群など現在手掛けている疾患以外にも応用ができ、さらに発展させられると考えられた。今後は病変部位でクローナルに増殖している T 細胞の特徴や、現在進行中の病変部位の組織由来の細胞(上皮細胞、間質細胞など)が疾患によりどう変化しているのかを解析する事で、総合的な自己免疫反応の理解と治療ターゲットの同定を目指す。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計4件（うち査読付論文　3件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　3件）

１．著者名 Kajio Nobuhiko、Takeshita Masaru、Suzuki Katsuya、Kaneda Yukari、Yamane Humitsugu、Ikeura Kazuhiro、Sato Hidekazu、Kato Shin、Shimizu Hiroyuki、Tsunoda Kazuyuki、Takeuchi Tsutomu	４．巻 80
２．論文標題 Anti-centromere antibodies target centromere kinetochore macrocomplex: a comprehensive autoantigen profiling	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	６．最初と最後の頁 651～659
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/annrheumdis-2020-218881	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 竹下勝、鈴木勝也、竹内勤	４．巻 64
２．論文標題 シェーグレン症候群における適応免疫と治療への展望	５．発行年 2020年
３．雑誌名 リウマチ科	６．最初と最後の頁 552-558
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Nakazawa Maho、Suzuki Katsuya、Takeshita Masaru、Inamo Jun、Kamata Hirofumi、Ishii Makoto、Oyamada Yoshitaka、Oshima Hisaji、Takeuchi Tsutomu	４．巻 73
２．論文標題 Distinct Expression of Coinhibitory Molecules on Alveolar T Cells in Patients With Rheumatoid Arthritis Associated and Idiopathic Inflammatory Myopathy Associated Interstitial Lung Disease	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Arthritis & Rheumatology	６．最初と最後の頁 576～586
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/art.41554	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Takeshita Masaru、Suzuki Katsuya、Nakazawa Maho、Kamata Hirofumi、Ishii Makoto、Oyamada Yoshitaka、Oshima Hisaji、Takeuchi Tsutomu	４．巻 121
２．論文標題 Antigen-driven autoantibody production in lungs of interstitial lung disease with autoimmune disease	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Journal of Autoimmunity	６．最初と最後の頁 102661～102661
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaut.2021.102661	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計6件（うち招待講演　0件／うち国際学会　2件）

１．発表者名
Masaru Takeshita, Katsuya Suzuki, Maho Nakazawa, Tsutomu Takeuchi.

２．発表標題
Antigen-driven autoantibody production in lung lesion of systemic autoimmune diseases.

３．学会等名
第64回日本リウマチ学会総会・学術集会

４．発表年
2020年

１．発表者名
Masaru Takeshita, Katsuya Suzuki, Tsutomu Takeuchi

２．発表標題
Single-cell analysis of salivary gland epithelial cells revealed enhanced interferon signature and dysfunction of multipotent stem cells in Sjogren's syndrome.

３．学会等名
第65回日本リウマチ学会総会・学術集会

４．発表年
2021年

１．発表者名
Nobuhiko Kajio, Masaru Takeshita, Katsuya Suzuki, Tsutomu Takeuchi.

２．発表標題
Comprehensive analysis of anti-centromere autoantibodies with the centromere protein library in Sjogren's syndrome, systemic sclerosis, and primary biliary cholangitis.

３．学会等名
第64回日本リウマチ学会総会・学術集会

４．発表年
2020年

１．発表者名
Nobuhiko Kajio, Masaru Takeshita, Katsuya Suzuki, Tsutomu Takeuchi

２．発表標題
Anti-centromere antibodies target centromere-kinetochore macrocomplex.

３．学会等名
第65回日本リウマチ学会総会・学術集会

４．発表年
2021年

１．発表者名 Maho Nakazawa, Suzuki K, Masaru Takeshita, Inamo J, Kamata H, Ishii M, Oyamada Y, Oshima H, Takeuchi T.
２．発表標題 Distinct expression of coinhibitory molecules on alveolar T cell in patients with rheumatoid arthritis- and idiopathic inflammatory myopathies-associated interstitial lung disease.
３．学会等名 EULAR 2020 Annual European Congress of Rheumatology.（国際学会）
４．発表年 2020年

１．発表者名 Kajio N, Takeshita M, Suzuki K, Takeuchi T.
２．発表標題 Identification of novel centromere autoantigens in Sjogren’s syndrome, systemic sclerosis and primary biliary cholangitis.
３．学会等名 EULAR 2020 Annual European Congress of Rheumatology.（国際学会）
４．発表年 2020年

〔図書〕　計0件

〔出願〕　計1件

産業財産権の名称 抗セントロメア抗体の標的抗原	発明者 梶尾暢彦、竹下勝、鈴木勝也、竹内勤	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-187199	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕　計0件

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関