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 Jititle 学事振興資金研究成果実績報告書 (2017.) Jalc DOI Abstract 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)と反応さってコ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おいる場合は、中央のは関係性細胞を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と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の重鎖および増幅が確認された。得られた重鎖および軽鎖の埋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、この方法で未梢血中から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。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またはハ)に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、	よびHis するた 特異的 ド軽鎖の を用い
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 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)と反応さってリ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忠とはag陽性細胞をDsg特異的B細胞として持出できるシステムを確立できた。この方法を検証し、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Dsg3B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、この方法で未梢血中から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。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A)は、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、	よびHis するた 特異的 ド軽鎖の を用い
Publisher 慶應義塾大学 2018 2018 3 2018 3 3 3 3 3 3 3 3 3	よびHis するた 特異的 ド軽鎖の を用い
Publication year 2018 Jtitle 学事振興資金研究成果実績報告書 (2017.) JaLC DOI Abstract 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)と反応さってのソけ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おし、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 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、この方法で末梢血中から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。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または入)に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、	よびHis するた 特異的 ド軽鎖の を用い
Jtitle 学事振興資金研究成果実績報告書(2017.) JaLC DOI Abstract 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)と反応さってカ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おも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Dsg3B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、この方法で未梢血中から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。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またはハ)に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、	よびHis するた 特異的 ド軽鎖の を用い
Jalc DOI Abstract 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)と反応さって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おして線陽性細胞を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Dsg3B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、この方法で末梢血中から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。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(Igxまたはハ)にDNA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、	よびHis するた 特異的 ド軽鎖の を用い
Abstract 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)と反応で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おも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Dsg3B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、この方法で末梢血中から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。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、	よびHis するた 特異的 ド軽鎖の を用い
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おも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Dsg3B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、この方法で未梢血中から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。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)にでDNA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、	よびHis するた 特異的 ド軽鎖の を用い
思者血清と同様に細胞表面へのIgGの沈着を示した。 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特異的母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 In order to verify this method, we tried to isolate Dsg3-specific B cells from the peripheral b lymphocytes of knock-in mouse of monoclonal antibody against Dsg3. Messenger RNA wa extracted from the isolated cells as a single cell, and the amplification of IgG heavy chain a chain was confirmed by RT-PCR method. The nucleotide sequences of the obtained heavy 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. In an experiment in which the peripheral blood of a patient with pemphigus foliaceus was re with recombinant Dsg1 protein, the IgG heavy chain (IgH) and light chain (Igk or λ) amplific cDNA was confirmed from isolated cells as a single cell. The HEK cells, into which the nucl sequence of the obtained IgG region had been introduced, were able to bind to Dsg1 in flox cytometric analysis. Furthermore, the secreted monoclonal antibody produced by these HE exhibits Dsg1-specific reactivity by ELISA, and IgG deposition on the cell surface of epiderr by indirect immunofluorescence using normal human skin as a substrate just like the serum pemphigus patients. If single cell isolation and analysis methods can be established, it becomes possible to esta Dsg-specific B cell repertoire and elucidate pathophysiology of autoantibodies in pemphigu future.	obside a cells a from
Notes	
Genre Research Paper	
URL https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2017000001-2017	'0009

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.

2017 年度 学事振興資金 (個人研究) 研究成果実績報告書

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	冊切板	300 (7		''']

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

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。

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 ($Ig\kappa$ 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。

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。

2. 研究成果実績の概要(英訳)

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.

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 (Ig κ 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.

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.

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)					
, , ,	Azathioprine mono therapy in autoimmune blistering diseases: A feasible option for mild to moderate cases.	Journal of Dermatology	2018年3月					