

Title	天疱瘡患者由来の自己反応性B細胞の単一細胞トランスクリプトーム解析
Sub Title	Single-cell transcriptome analysis of autoreactive B cells from pemphigus patients
Author	山上, 淳(Yamagami, Jun)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2021
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2020.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>天疱瘡は、表皮細胞間の接着分子であるデスマogleイン (Dsg) に対する自己抗体によって生じる自己免疫性皮膚疾患である。自己抗体が発症に関連しており、抗CD20抗体が臨床的に著効することから、自己反応性B細胞が病態に重要と考えられてきた。自己免疫性B細胞の特徴については、これまでそのレパトア解析が様々な論文で報告されてきたが、その遺伝子発現については報告されていない。今回我々は、蛍光抗体で標識した組み換えDsg蛋白を用いることで、天疱瘡患者の末梢血からDsg特異的B細胞を単離することに成功し、シングルセルRNAシーケンスの技術を用いて、その遺伝子発現解析を行った。</p> <p>具体的には、慶應義塾大学病院に通院する天疱瘡患者の末梢血から単核球 (PBMC) を分離し、フローサイトメトリーで記憶B細胞の分画からDsg特異的B細胞を単離した。また、コントロールとして非特異的B細胞も同一患者から単離した。1例では治療前と治療後のDsg特異的B細胞を単離することができた。それぞれ単離したB細胞から、SMART-Seq HT kit (Takara)でcDNA増幅し、Nextera XT DNA Library prep kit (illumina)でライブラリー作成し、Novaseq6000 (illumina)でシーケンス解析を行った。3例の天疱瘡患者から、92のDsg特異的B細胞と115の非特異的B細胞のRNAシーケンスデータを得た。検出された10518遺伝子のうち、253が発現変動遺伝子(DEGs)であり、リンパ球の遊走や代謝に関わる経路と関係していた。また治療前後の比較では、B細胞の分化や抗体産生に関わる経路が抑制されており、臨床経過を反映していた。</p> <p>天疱瘡は、自己抗体と病態が明瞭に結びついている疾患の一つであり、自己免疫性B細胞の解析に有用なモデルである。今回のアプローチは、自己免疫性B細胞特異的な遺伝子発現を検出しただけでなく、治療によって変動する遺伝子の検出も可能とした。今後この手法を用いることで新たな治療標的の発見や他疾患への応用が期待される。</p> <p>Pemphigus is an autoimmune skin disease caused by autoantibodies against desmoglein (Dsg), an adhesion molecule between epidermal keratinocytes. Since anti-CD20 monoclonal antibody therapy is used effectively in the treatment of pemphigus, autoreactive B cells have been considered important in the pathogenesis. The characteristics of autoimmune B cells have been reported in various publications, but their gene expression has not been reported. In this study, we succeeded in isolating Dsg-specific B cells from the peripheral blood of patients with pemphigus and analyzed their gene expression using single-cell RNA sequencing technology.</p> <p>Mononuclear cells were isolated from the peripheral blood (PBMCs) of pemphigus patients, and Dsg-specific B cells were isolated from the fraction of memory B cells by flow cytometry. In one case, we were able to isolate Dsg-specific B cell before and after treatment. cDNA amplification from each isolated B cell, library preparation, and sequencing analysis were performed with SMART-Seq HT kit (Takara), Nextera XT DNA Library prep kit (illumina), and Novaseq6000 (illumina). From 3 pemphigus patients, we obtained RNA sequencing data for 92 Dsg-specific B cells and 115 non-specific B cells. Of the 10518 genes detected, 253 were differently expressed genes (DEGs), which were associated with changes in pathways related to lymphocyte migration and metabolism. In addition, pre- and post-treatment comparisons showed that pathways involved in B cell differentiation and antibody production were suppressed, reflecting the clinical course of the disease.</p> <p>Pemphigus is one of the diseases in which autoantibodies and pathology are most clearly linked, making it a useful model for the analysis of autoimmune B cells. Our approach not only detected autoimmune B cell-specific gene expression, but also made it possible to detect genes that vary with treatment course. This method is expected to be used to discover new therapeutic targets and to be applied to other diseases in the future.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2020000008-20200007

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.

研究代表者	所属	医学部臨床教室	職名	専任講師	補助額	500（特B）千円
	氏名	山上 淳	氏名（英語）	Jun Yamagami		
研究課題（日本語）						
天疱瘡患者由来の自己反応性 B 細胞の単一細胞トランスクリプトーム解析						
研究課題（英訳）						
Single-cell transcriptome analysis of autoreactive B cells from pemphigus patients						
1. 研究成果実績の概要						
<p>天疱瘡は、表皮細胞間の接着分子であるデスモグレイン(Dsg)に対する自己抗体によって生じる自己免疫性皮膚疾患である。自己抗体が発症に関連しており、抗 CD20 抗体が臨床的に著効することから、自己反応性 B 細胞が病態に重要と考えられてきた。自己免疫性 B 細胞の特徴については、これまでそのレパトア解析が様々な論文で報告されてきたが、その遺伝子発現については報告されていない。今回我々は、蛍光抗体で標識した組み換え Dsg 蛋白を用いることで、天疱瘡患者の末梢血から Dsg 特異的 B 細胞を単離することに成功し、シングルセル RNA シーケンスの技術を用いて、その遺伝子発現解析を行った。</p> <p>具体的には、慶應義塾大学病院に通院する天疱瘡患者の末梢血から単核球(PBMC)を分離し、フローサイトメトリーで記憶 B 細胞の分画から Dsg 特異的 B 細胞を単離した。また、コントロールとして非特異的 B 細胞も同一患者から単離した。1例では治療前と治療後の Dsg 特異的 B 細胞を単離することができた。それぞれ単離した B 細胞から、SMART-Seq HT kit (Takara)で cDNA 増幅し、Nextera XT DNA Library prep kit (illumina)でライブラリー作成し、Novaseq6000 (illumina)でシーケンス解析を行った。3例の天疱瘡患者から、92の Dsg 特異的 B 細胞と 115 の非特異的 B 細胞の RNA シーケンスデータを得た。検出された 10518 遺伝子のうち、253 が発現変動遺伝子(DEGs)であり、リンパ球の遊走や代謝に関わる経路と関係していた。また治療前後の比較では、B 細胞の分化や抗体産生に関わる経路が抑制されており、臨床経過を反映していた。</p> <p>天疱瘡は、自己抗体と病態が明瞭に結びついている疾患の一つであり、自己免疫性 B 細胞の解析に有用なモデルである。今回のアプローチは、自己免疫性 B 細胞特異的な遺伝子発現を検出しただけでなく、治療によって変動する遺伝子の検出も可能とした。今後この手法を用いることで新たな治療標的の発見や他疾患への応用が期待される。</p>						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
<p>Pemphigus is an autoimmune skin disease caused by autoantibodies against desmoglein (Dsg), an adhesion molecule between epidermal keratinocytes. Since anti-CD20 monoclonal antibody therapy is used effectively in the treatment of pemphigus, autoreactive B cells have been considered important in the pathogenesis. The characteristics of autoimmune B cells have been reported in various publications, but their gene expression has not been reported. In this study, we succeeded in isolating Dsg-specific B cells from the peripheral blood of patients with pemphigus and analyzed their gene expression using single-cell RNA sequencing technology.</p> <p>Mononuclear cells were isolated from the peripheral blood (PBMCs) of pemphigus patients, and Dsg-specific B cells were isolated from the fraction of memory B cells by flow cytometry. In one case, we were able to isolate Dsg-specific B cell before and after treatment. cDNA amplification from each isolated B cell, library preparation, and sequencing analysis were performed with SMART-Seq HT kit (Takara), Nextera XT DNA Library prep kit (illumina), and Novaseq6000 (illumina). From 3 pemphigus patients, we obtained RNA sequencing data for 92 Dsg-specific B cells and 115 non-specific B cells. Of the 10518 genes detected, 253 were differently expressed genes (DEGs), which were associated with changes in pathways related to lymphocyte migration and metabolism. In addition, pre- and post-treatment comparisons showed that pathways involved in B cell differentiation and antibody production were suppressed, reflecting the clinical course of the disease.</p> <p>Pemphigus is one of the diseases in which autoantibodies and pathology are most clearly linked, making it a useful model for the analysis of autoimmune B cells. Our approach not only detected autoimmune B cell-specific gene expression, but also made it possible to detect genes that vary with treatment course. This method is expected to be used to discover new therapeutic targets and to be applied to other diseases 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)			