



Title	ヒト毛包組織における細胞間相互作用の解析手法に関する研究
Author(s)	森, 綾香
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/101772">https://doi.org/10.18910/101772</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

# ヒト毛包組織における細胞間相互作用の 解析手法に関する研究

提出先 大阪大学大学院情報科学研究科

提出年月 2025年1月

森 綾香

# 学位取得に関する発表論文

## 学術論文

Ayaka Mori-Ichioka, Yosuke Sunada, Takashi Koikeda, Hideo Matsuda, and Shinji Matsuo. Effect of applying *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* N793 to the scalps of men and women with thinning hair: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study, *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, Volume 43, Number 3, pp.192-203, February, 2024 (博士論文第 2 章).

Ayaka Mori-Ichioka, Hironori Shigeta, Shigeto Seno, Hideo Matsuda. Exploration of Key Signals in Alopecia Areata by Cell-cell Interaction Analysis, *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences* (採録決定) (博士論文第 3 章).

## 国際会議

Ayaka Mori-Ichioka, Yosuke Sunada, Shinji Matsuo, Hideo Matsuda. Intercellular communication analysis of single-cell transcriptome in human hair follicles and comparative analysis of bulk transcriptome co-cultured with lactic acid bacterium, *the 32nd International Conference on Genome Informatics* (GIW 2023), November, 2023 [oral presentation] (博士論文第 2 章).

Ayaka Mori-Ichioka, Hironori Shigeta, Shigeto Seno, Hideo Matsuda. Communication Analysis between Human Hair-Follicles and Immune Cells with Single-cell RNA-seq, *the 11th International Conference on Biomedical and Bioinformatics Engineering* (ICBBE 2024), November, 2024 [oral presentation] (博士論文第 4 章).

## 内容梗概

毛は哺乳類において身体の保護、感覚機能、体温調節など多様な役割を果たしている。特にヒトにおいては、毛の有無や質が外見や自己イメージの形成に影響を与え、社会的な意義を持つ重要な要素となっている。そのため、毛の直径の減少や脱落の進行は外見に大きな変化をもたらし、それに伴い心理的および社会的な苦痛を引き起こすことが知られている。薄毛や脱毛症は単なる美容上の問題にとどまらず、患者の生活の質（Quality of Life, QOL）に深刻な影響を及ぼし、その改善は社会全体にとっても重要な課題である。脱毛症の原因としては、遺伝、加齢、ストレス、食生活、免疫系の異常などが挙げられる。現在、薄毛や脱毛症に対する治療法としては、生活習慣の改善、薬剤療法、植毛手術などが行われている。しかし、生活習慣の改善だけでは十分な効果が得られず、薬剤療法や植毛手術には副作用が伴うため、脱毛症の根本的な原因に働きかける治療法の開発が求められている。そのため、脱毛症のメカニズムを分子レベルで解明し、それに基づく予防法や治療法の基盤となる知見を得ることが不可欠である。

毛は毛包から生え、毛包はヘアサイクルを経て毛を成長させる。成長期には毛包の根元で毛の元となる毛母細胞が活発に細胞分裂を行い、退行期には毛包が収縮して休止期へと移行する。このヘアサイクルに異常が生じると、薄毛や脱毛症が引き起こされる。毛包は毛の成長をつかさどる毛乳頭細胞と、毛包内の他の細胞との相互作用によって、その機能やヘアサイクルを制御している。また、毛包は外部環境や微生物、毛包組織外の細胞との相互作用の影響も受ける。以上のことから、細胞間相互作用の解明は、毛の成長および脱毛症における毛の脱落メカニズムを理解するために不可欠であり、毛乳頭細胞を中心としたシグナルの重要性を明らかにすることを目指している。

本学位論文は、第1章から第5章で構成される。第1章では、研究の背景、関連研究とその課題、それらの課題を解決するために本論文で提案するアプローチ、および本論文で取り扱う課題について述べる。第2章では、乳酸菌と共に培養した毛乳頭細胞の遺伝子発現解析を行い、乳酸菌が毛の成長に与える影響を評価するとともに、ヒトにおける乳酸菌の影響を明らかにすることを目指した。関連研究では、マウスの乳酸菌の摂取が毛の成長に関連すると報告されているが、遺伝子発現の時系列的変動やヒトでの影響については十分に評価されていなかった。本研究では、ヒト毛乳頭細胞と乳酸菌との共培養を複数の時点で行い、RNA-seqにより遺伝子発現を網羅的に解析した上で、主成分分析や階層型クラスタリング解析によって時系列的な変動を評価した。また、発現変動遺伝子解析および機

能性解析により遺伝子群の特徴を評価した。これにより、乳酸菌の影響を総合的に解析することを目指した。

第3章では、脱毛症患者の毛包シングルセル RNA-seq データを用いて、複数の条件間での細胞間相互作用の差異を検出し、脱毛症に関連する細胞種および相互作用を特定するための解析手法を提案した。関連研究では、既知のデータベースを用いて信頼性の高いリガンド-レセプターペアを推定した。しかし、複数条件間でのリガンド-レセプターペアの発現差を統計的に比較することが難しく、また膨大なペアが検出されるため、重要なペアを特定できなかった。そのため、本研究では、疑似バルクデータを用いて発現変動遺伝子解析を行い、条件特異的なリガンド-レセプターペアを同定した上で、最も頻出した細胞種をターゲットとするペアに絞り込む手法を提案した。

第4章では、脱毛症患者の皮膚シングルセル RNA-seq データを用いて、脱毛症患者特異的な T 細胞サブタイプに発現する遺伝子を特定した。関連研究では、細胞系譜解析により脱毛症患者の皮膚内の T 細胞の多様性を評価した。本研究ではそれに加えて、どの T 細胞がどの遺伝子を介して脱毛症と強く関連するのかを特定するため、細胞系譜解析に加えて細胞間相互作用解析を組み合わせることで、脱毛症特異的な T 細胞サブタイプで発現する遺伝子の検出を行った。シングルセル RNA-seq データを用いて細胞系譜解析を実施することで T 細胞サブタイプの系譜を明らかにし、差異解析により系譜の始点と終点で発現差が有意に認められる遺伝子を同定した。さらに、それらの遺伝子が第3章で行った細胞間相互作用解析により得たリガンドと一致するかを評価した。

第5章では、第2章から第4章で得た知見を総括し、毛の成長および脱落における本研究の寄与について考察した。最後に、今後の薄毛および脱毛症のメカニズム解明に向けた展望について述べた。

# 目次

<b>第1章 序論</b>	2
1.1 研究の背景	2
1.2 毛包組織の構造と機能	2
1.2.1 毛包組織の構造	2
1.2.2 毛包の機能とヘアサイクル	3
1.2.3 毛包組織内の細胞間相互作用	4
1.2.4 微生物等の外部環境からの影響	5
1.2.5 脱毛症の原因と発症メカニズム	5
1.3 毛包組織における細胞間相互作用解析の意義	6
1.3.1 微生物と毛包細胞との相互作用解析	6
1.3.2 円形脱毛症患者の毛包組織における細胞間相互作用解析	7
1.3.3 円形脱毛症患者の皮膚組織における炎症過程の解析	8
1.4 本論文の構成と目的	9
<b>第2章 乳酸菌と共に培養した毛乳頭細胞における発毛関連遺伝子の探索</b>	11
2.1 緒言	11
2.2 本研究で使用する乳酸菌	11
2.3 関連研究	12
2.4 本研究の目的	15
2.5 本研究の実験手法	15
2.5.1 生物学的実験	16
2.5.2 データ解析手順	18
2.6 本研究の実験結果	21
2.6.1 次元削減およびクラスタリング解析の結果	21
2.6.2 発現変動遺伝子解析の結果	22
2.6.3 発現変動遺伝子の機能解析の結果	23
2.7 本研究の考察	29
2.8 結言	30

<b>第3章 脱毛症患者の毛包組織での毛乳頭細胞との細胞間相互作用の解析</b>	32
3.1 緒言	32
3.2 関連研究	32
3.3 本研究の目的	35
3.4 使用したデータセット	35
3.5 本研究の解析手法	36
3.6 本研究の解析結果	39
3.7 本研究の考察	43
3.8 結言	45
<b>第4章 皮膚組織内のT細胞の脱毛症での遺伝子発現変化の解析</b>	47
4.1 緒言	47
4.2 関連研究	48
4.3 本研究の目的	49
4.4 使用したデータセット	50
4.5 本研究の解析手法	50
4.6 本研究の解析結果	52
4.7 本研究の考察	55
4.8 結言	57
<b>第5章 結論</b>	58
5.1 毛の成長および脱落における本研究の寄与	58
5.2 今後の展望	60
<b>謝辞</b>	62
<b>参考文献</b>	63

## 図目次

1.1	毛包組織の構造	3
1.2	ヘアサイクル	4
1.3	細胞間相互作用	8
2.1	主成分分析による次元削減の結果	22
2.2	階層型クラスタリングの結果	23
2.3	Gene Ontology 解析の結果	25
3.1	毛包におけるすべての細胞の UMAP 図	40
3.2	毛包における細胞種の UMAP 図	40
3.3	毛包における線維芽細胞のマーカー遺伝子の発現	41
3.4	毛包における T 細胞のマーカー遺伝子の発現	41
3.5	毛包における線維芽細胞サブクラスタの UMAP 図	41
3.6	毛包における線維芽細胞サブクラスタにおけるマーカー遺伝子の発現ヒートマップ	42
3.7	毛包における T 細胞サブクラスタの UMAP 図	42
3.8	毛包における T 細胞サブクラスタにおけるマーカー遺伝子の発現ヒートマップ	42
3.9	毛包におけるすべての細胞種の UMAP 図	43
4.1	皮膚におけるすべての細胞の UMAP 図	52
4.2	皮膚における線維芽細胞サブクラスタの UMAP 図	53
4.3	皮膚における T 細胞サブクラスタの UMAP 図	53
4.4	皮膚における T 細胞サブクラスタにおけるマーカー遺伝子の発現ヒートマップ	54
4.5	皮膚におけるすべての細胞種の UMAP 図	54
4.6	脱毛症患者の T 細胞サブクラスタの細胞系譜解析結果	55
4.7	健常者の T 細胞サブクラスタの細胞系譜解析結果	55
4.8	脱毛症患者の <i>CCL5</i> の発現量	56

## 表目次

2.1	RNA-seq に供したサンプル	17
2.2	毛の成長に関連する上位 20 遺伝子	24
2.3	Gene Ontology 解析で検出した GO タームに含まれる発現変動遺伝子	26
3.1	脱毛症患者における細胞間相互作用解析で検出した毛乳頭細胞をターゲット細胞とする相互作用	44
4.1	脱毛症患者の系譜 1 (TEM) において、始点と比較して終点で発現差が認められた遺伝子のうち、Wald 統計量が特に大きい上位 5 遺伝子	56

# 第1章 序論

## 1.1 研究の背景

毛は哺乳類において身体の保護、感覚機能、体温調節など、多様な役割を果たしている [1]。特にヒトにおいては、外見や自己イメージにも深く関わっており、重要な特徴である。薄毛とは、毛の脱落や毛の直径の減少が進行し、その結果、毛の密度やボリュームが低下し頭皮が露出する状態を指す。脱毛症は、特定の原因による薄毛の一形態であり、遺伝、加齢、ストレス、食生活、免疫系の異常などが原因として挙げられる [2]。薄毛や脱毛症は外見に大きな影響を与えるだけでなく、患者に心理的および社会的な苦痛をもたらし、その結果、生活の質 (Quality of Life, QOL) を深刻に損なう。

脱毛症には、男性型脱毛症、女性型脱毛症、円形脱毛症などさまざまな種類があり、それぞれ発症原因や進行メカニズムが異なることが知られている (1.2.5 節で詳述)。しかし、これらの疾患のメカニズムには未解明な点が多く、発症原因としては遺伝的要因のほか、免疫系の過剰反応や環境要因も関与する可能性が指摘されている。現在、薄毛や脱毛症に対する治療法としては生活習慣の改善、薬剤療法、植毛手術などがあり、症状や進行度に応じた対処が行われている。しかし、これらの方法には限界や副作用があるため、脱毛症の根本的な原因に働きかける治療法の開発が望まれている。そのため、薄毛および脱毛症の発症メカニズムを分子や細胞レベルで解明し、それに基づく予防法や治療法に必要な知見を得ることが重要である。

薄毛および脱毛症は、単なる美容上の問題にとどまらず、患者の QOL や心の健康に深刻な影響を及ぼす。これらの疾患の発症メカニズムを分子レベルで解明することは、治療法の進展において重要な役割を果たし、患者の QOL 向上にも寄与すると考えられる。したがって、本研究では、脱毛症に関連する分子メカニズムを明らかにし、予防法や治療法の基盤となる知見の提供を目指している。

## 1.2 毛包組織の構造と機能

### 1.2.1 毛包組織の構造

毛は、毛包という毛を取り囲む組織層から生える [3]。毛包組織の構造を図 1.1 に示す。毛包から露出した部分は毛幹、毛包内部にある部分は毛根と呼ばれる。毛包の一部はやや隆起して毛隆起を形成し、その中には毛包幹細胞が含まれる。毛根の最下部は球状に膨れ

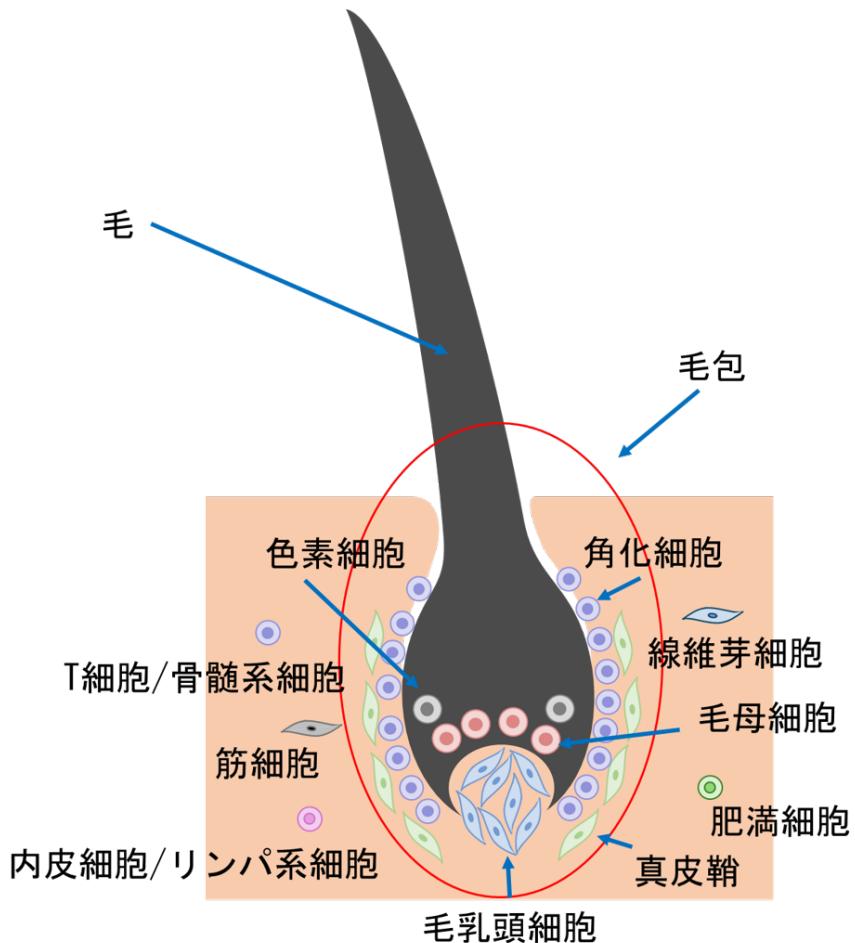


図 1.1 毛包組織の構造

て毛球となり、その中に毛乳頭が存在する。毛包は上から半球状に毛乳頭を取り囲む形をしており、毛乳頭を囲む細胞が毛母細胞である。毛母細胞から毛が発生し、共に上方に発育していく。また、毛にメラニンを供給する色素細胞も毛母に混在している。角化細胞は毛包の最外層を形成する。このように、毛包にはさまざまな組織や細胞が含まれている。また、毛包の外には、免疫細胞である T 細胞、骨髓系細胞、リンパ系細胞をはじめ、真皮を構成する線維芽細胞、血管を構成する内皮細胞、さらに筋細胞、肥満細胞が存在する。

### 1.2.2 毛包の機能とヘアサイクル

健常な状態の毛および毛包は、ヘアサイクルと呼ばれる一定の周期をもって成長する [4]。ヘアサイクルは、毛の成長と脱落に伴い、成長期、退行期、休止期を繰り返す。この周期により、毛包の形状と機能が大きく変化する。図 1.2 はヘアサイクルの各段階を模式的に示しており、毛包の形状や機能の変化を視覚化している。成長期において、毛包の最

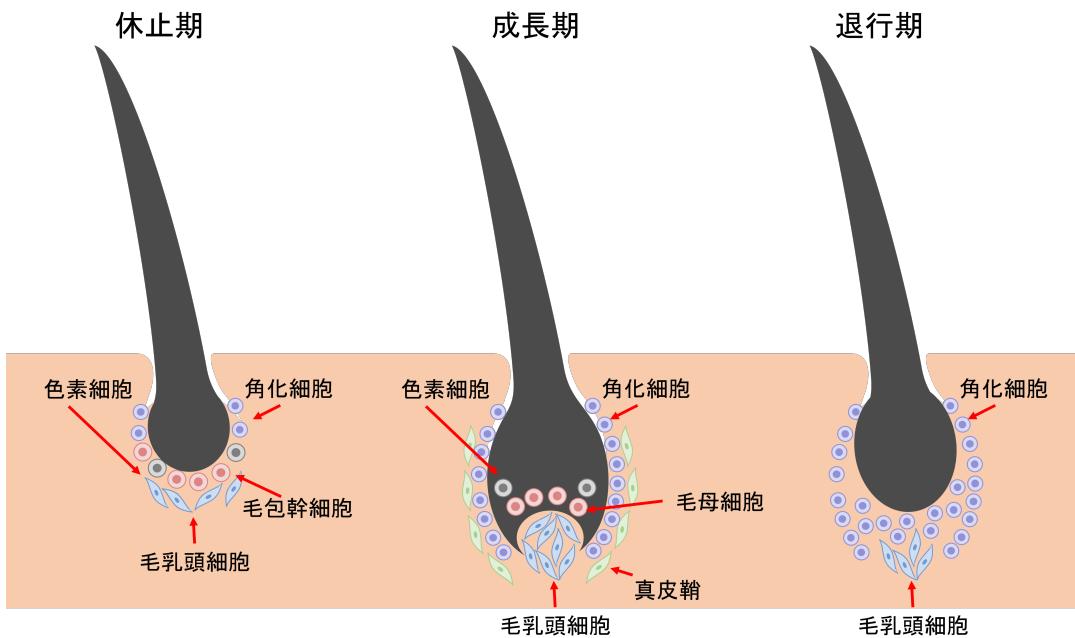


図 1.2 ヘアサイクル

下部には毛乳頭が存在し、毛乳頭細胞からのシグナルを受けた毛母細胞が盛んに細胞分裂を行うことで、毛の成長が促進される。この時期は一般的に数年続き、毛包が毛の成長を促進する重要な段階である。成長期を経た毛包は、次に退行期へと移行する。この時期は数週間続き、毛乳頭細胞の活性が低下するため、毛の成長が止まる。その後、毛包は数か月間の休止期に入る。休止期には、毛包は毛隆起部にまで退縮し、毛は脱落する。正常なヘアサイクルの進行は、毛の健康にとって極めて重要であり、これが乱れると毛の脱落や直径の減少が進行し、薄毛や脱毛症の原因となる。例えば、成長期が何らかの原因で短縮されると、毛が十分に成長しないまま休止期に移行し、細くて抜けやすい毛になる。また、退行期から成長期への移行が滞る場合、新しい毛が発育せず、毛のない状態が長く続くことになる。このように、毛包はヘアサイクルを通じてダイナミックに形態を変化させながら毛の成長を維持しており、そのためには毛包を構成する多様な組織や細胞が緻密な協調のもとで制御されることが不可欠である。

### 1.2.3 毛包組織内の細胞間相互作用

毛包を構成する細胞間の相互作用は、毛の成長やヘアサイクルの調節にとって極めて重要である [4]。例えば、ヘアサイクルの休止期には、毛包の下部に存在する毛乳頭細胞と毛包幹細胞が Wnt シグナルを介して相互に作用し、成長期の開始を促す。また、成長期に

は、毛乳頭細胞から分泌される成長因子が毛母細胞を刺激し、毛母細胞が角化細胞へと分化することで毛が成長する。さらに、成長期から退行期への移行時には、TGF- $\beta$  シグナルの伝達を通じて、毛乳頭細胞の活性が低下する。このようにして、毛包内の細胞間相互作用は、ヘアサイクルの各段階を円滑に進行させるために不可欠な役割を果たしている。特に毛乳頭細胞は、成長期の開始および維持を担う重要な細胞であり、この細胞と他の細胞との相互作用が鍵となる。したがって、毛の成長や脱落のメカニズムを解明するには、毛乳頭細胞を中心とした細胞間の相互作用を詳細に解析する必要がある。

#### 1.2.4 微生物等の外部環境からの影響

毛包の機能は、微生物やウイルスなどの外部環境からの影響を受けることが示されている [5]。例えば、毛包に常在する微生物叢は、ヘアサイクルの調節に影響を与えることが明らかになっている [6]。また、真菌の一種であるマラセチア属は、ヘアサイクルの成長期の毛包に感染し、炎症を引き起こすことが知られている [7]。したがって、毛の成長や脱落メカニズムを包括的に解明するには、毛包外の細胞および外部環境との相互作用解析が不可欠である。特に、微生物の中でも乳酸菌が、皮膚や毛包と相互作用することで、毛の発育に寄与することが示唆されている。Yin らによる微生物と毛の健康の研究に関するシステムティックレビューによると、39 種類の微生物を対象にした 23 報の研究のうち、20 報において 33 種類の乳酸菌が含まれていた [8]。このうち、乳酸菌の塗布により毛包の大きさが増加したこと [9] や、毛乳頭細胞と乳酸菌の共培養で成長因子の産生量が増加したこと [10] など、乳酸菌と毛包および毛乳頭細胞の相互作用に関する報告がいくつかある。このことから、乳酸菌と毛乳頭細胞の相互作用の解明は、毛の成長メカニズムに対する理解を深めるための重要な知見を提供するものと期待される。そこで、本研究でも乳酸菌と共に培養した毛乳頭細胞を解析対象とした。

本研究では、毛乳頭細胞と相互作用させる乳酸菌として *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* N793 株（以下、N793 株）を選定した。N793 株はとうもろこしから単離した、日清食品ホールディングスの乳酸菌ライブラリに属する乳酸菌である（2.2 節で詳述）。

#### 1.2.5 脱毛症の原因と発症メカニズム

1.1 で述べたとおり、脱毛症には様々な種類があり、それぞれに特徴的な症状や原因、発症メカニズムが存在する。例えば、円形脱毛症は、丸い斑状の脱毛を特徴とする非瘢痕

性脱毛症であり、重症化すると、頭髪全体や全身の体毛の脱落が見られることがある [11]。主な原因は遺伝的要因や環境的要因であり、ストレスが誘因となることもある [12]。発症メカニズムとして、自己免疫反応によって毛包が標的となることが挙げられる。具体的には、ヘアサイクルにおいて、成長期の毛包が毛包外から浸潤した免疫細胞である T 細胞によって攻撃され、その結果、毛包の機能が抑制され、毛の成長が停止する [12]。

アンドロゲン性脱毛症（男性型および女性型脱毛症）は、男女で異なる特徴を示す。男性では、主に前頭部や頭頂部に脱毛が進行し、生え際が後退する [13]。一方、女性では髪全体の密度が減少し、特に頭頂部の薄毛が顕著になる [14]。アンドロゲン性脱毛症の主な原因は、男性ホルモンであるアンドロゲンに対する感受性の高さであり、加齢やホルモンバランスの変化も発症要因として挙げられる [13, 14]。発症メカニズムとして、アンドロゲンが毛包に結合することにより、ヘアサイクルの成長期が短縮され、次第に毛包が萎縮し、軟毛化が進むことが報告されている [15]。

これらの脱毛症に共通する特徴として、毛包の機能不全とそれに伴うヘアサイクルの乱れが見られる。1.2.2 節および 1.2.3 節で述べたように、毛包の機能やヘアサイクルの調節には、毛包組織内における細胞間相互作用が重要な役割を果たしている。そのため、脱毛症のメカニズムを解明するには、脱毛症患者の毛包における細胞間相互作用を詳細に解析することが不可欠であると考えられる。

### 1.3 毛包組織における細胞間相互作用解析の意義

#### 1.3.1 微生物と毛包細胞との相互作用解析

1.2.4 節で述べたように、乳酸菌は毛の成長に関与する可能性が示されている。本研究では、毛の成長メカニズムの知見を得るために、乳酸菌 N793 株と共に培養した毛乳頭細胞の遺伝子発現について解析する。1.2.3 節で述べたように、毛乳頭細胞は毛包の発達に重要な役割を果たしており、1.2.4 節で紹介した薄毛を改善する効果を持つ N793 株との相互作用により、毛の成長状態を再現できると考えた。以上の遺伝子発現を解析するために RNA-seq のデータセットを取得する。このデータセットを使用することで、N793 株が毛乳頭細胞に与える影響を遺伝子発現の変化として明らかにし、毛の成長に関連する新たな知見を得ることができると考える。RNA-seq は、細胞集団における遺伝子発現を網羅的に解析できる手法として広く利用されており、特に薄毛や脱毛症の研究において毛乳頭細胞を対象とした RNA-seq データセットは発毛関連遺伝子を探索するために有効である [8]。そのため、本研究でも、RNA-seq を用いて、乳酸菌 N793 株との共培養が毛乳頭細

胞の遺伝子発現に与える影響を高精度で解析し、毛の成長メカニズムの理解を深めるための重要な情報を得ることができると考えた。

これまでの研究の多くは、特定の時点での対照群との比較に基づく発現差のある遺伝子の同定にとどまっており、遺伝子発現の経時的な変動に関する探究は十分に行われていない。したがって、本研究では、毛乳頭細胞と乳酸菌との相互作用を理解するために、時間的な遷移を考慮した解析を行う。

### 1.3.2 円形脱毛症患者の毛包組織における細胞間相互作用解析

本研究では、毛の脱落メカニズムの知見を得るため、円形脱毛症患者および健常者の毛包組織における細胞間相互作用を解析する。1.2.5 節で述べたように、脱毛症患者における毛包は機能不全に陥っており、そのメカニズムを解明するためには、毛包組織内の細胞間相互作用を詳細に解析する必要がある。そのため、本研究では円形脱毛症患者および健常者の毛包（局所的なパンチ生検）由来シングルセル RNA-seq データを用いる。

そもそも、細胞間相互作用には分泌型や接触型などさまざまな様式が存在する。分泌型では、細胞表面に存在するリガンドとレセプターを介して相互作用が行われ、リガンドは細胞から放出され、他の細胞表面のレセプターと結合して信号を伝達し、細胞の応答を引き起こす。図 1.3 に示すように、この相互作用において、リガンドを発現する細胞は「ソース」、レセプターを発現する細胞は「ターゲット」と呼ばれ、相互作用における重要な概念である。これまで、リガンドとレセプターの研究は主にタンパク質レベルで行われてきた。具体的には、リガンドとレセプターが結合する接触部位を蛍光標識を用いて観察し、接触部位の親和性や結合動態を定量的に測定する実験が行われてきた [16]。しかし、これらの実験手法は通常、特定のリガンドとレセプター、または限られた細胞種を対象とするため、細胞間相互作用の全体像を把握するには限界があった。一方、遺伝子レベルでの解析、特にトランскriプトーム解析は細胞間相互作用の網羅的な解析に有用な手法として注目されている。特にシングルセル RNA-seq 技術は、細胞種ごとのリガンドやレセプターの発現パターンを網羅的に解析することが可能であり [16]、相互作用の全体像を明らかにする点で優れた利点を持っている。例えば、CellChat を用いたシングルセル RNA-seq データに基づくリガンド-レセプターペアの発現パターン解析が開発され、異なる細胞集団間のシグナル伝達ネットワークを推定し、細胞間相互作用を網羅的に解析する方法が確立されている [17]。本研究では、この技術を活用し、脱毛症患者と健常者の毛包における遺伝子発現の比較を行い、毛の脱落に関連する新たな知見を得ることを目指し

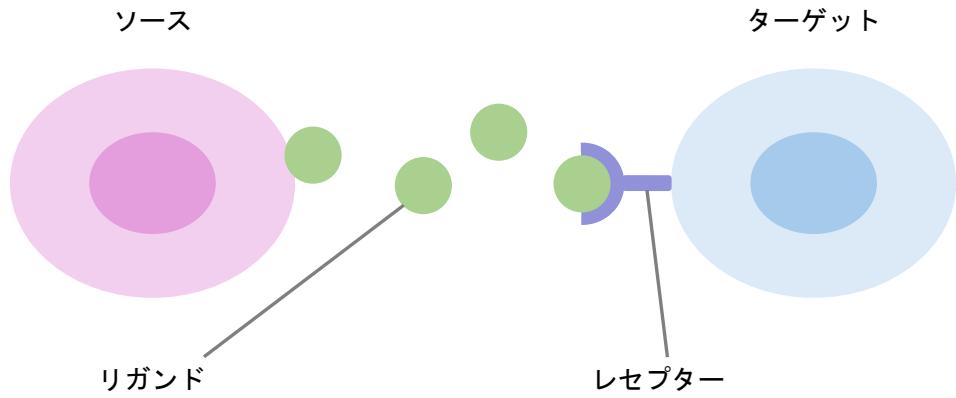


図 1.3 細胞間相互作用

ている。

従来の研究では、複数の条件（脱毛症患者と健常者）における細胞間相互作用の発現差に関して統計的な検定が行われていなかったため、発現差を正確に捉えることに限界があった。また、全細胞種の相互作用を考慮する際に、特にどの細胞種が重要であるかを明確にすることが困難であった。これらの課題を克服するための解析手法を提案し、脱毛症に特に関連する細胞種の細胞間相互作用を明らかにすることが本研究の中心となる。

### 1.3.3 円形脱毛症患者の皮膚組織における炎症過程の解析

本研究では、毛の脱落における炎症メカニズムの知見を得るために、円形脱毛症患者および健常者の皮膚組織における T 細胞の分化および特異的な遺伝子を解析する。1.2.5 節で述べたように、円形脱毛症は免疫細胞である T 細胞の攻撃によって毛包内で炎症が引き起こされる疾患であり、この炎症過程の解明が重要である。近年の研究では、円形脱毛症患者の頭皮で、CD4+T 細胞や CD8+T 細胞の毛包への浸潤や、Treg (制御性 T 細胞) の機能不全が報告されているが、T 細胞サブタイプごとの役割に関する詳細な議論は未だ不十分である [18]。そのため、本研究では円形脱毛症患者および健常者の皮膚由来シングルセル RNA-seq データを用いる。

細胞系譜は、生体内での細胞の起源や分化過程を解明する上で重要な概念であり、その詳細な解析は脱毛症を含む多様な疾患のメカニズム解明に寄与する。特に、脱毛症患者に

おけるナイーブ T 細胞やエフェクターメモリー T 細胞 (TEM) などの T 細胞サブタイプの分化系譜を解析することで、毛の脱落メカニズムに迫る重要な手がかりが得られる。細胞系譜解析は、特定の条件下において細胞がどのように分化していくかを解明手法である。近年、トラッキング手法を活用したアプローチが開発され、マーカー遺伝子や発現パターンの変化をもとに分化経路の詳細を特定できるようになった。これにより、細胞系譜の始点と終点で発現する遺伝子の違いを解析し、それらの遺伝子が組織の機能や疾患形成に与える影響を明らかにできる。本研究では、シングルセル RNA-seq データを用いて、脱毛症患者の T 細胞サブタイプを同定し、ナイーブ T 細胞から各サブタイプへの細胞系譜を解析する。また、細胞系譜の始点と終点における遺伝子発現の違いを比較することで、毛の脱落に関与する遺伝子を特定することを目指す。このアプローチは、脱毛症特異的な炎症過程に関与する T 細胞サブタイプや遺伝子に関する新たな知見を提供することが期待される。

#### 1.4 本論文の構成と目的

前述の通り、毛の成長メカニズムに対する知見を得るには、毛乳頭細胞と乳酸菌との相互作用の解析が必要である。一方、毛の脱落メカニズムに対する知見を得るには、脱毛症患者における毛乳頭細胞と毛包組織の他の細胞との細胞間相互作用を明らかにする必要がある。本学位論文は、第 1 章から第 5 章で構成される。第 1 章では、研究の背景、先行研究とその課題、それらの課題を解決するために本論文で提案するアプローチ、本論文で取り扱う課題に関して述べた。第 2 章では、薄毛を改善する乳酸菌と共に培養した毛乳頭細胞の遺伝子発現解析を行い、毛の成長に関連する遺伝子を探索した。乳酸菌と共に培養した毛乳頭細胞（共培養群）と通常の培養を行った毛乳頭細胞（対照群）を複数の時点で回収し、RNA-seq を行った。そのデータを用いて遺伝子発現を定量化し、次元削減手法およびクラスタリング解析を行うことで、適切なデータを選定し、発現変動遺伝子解析を実施した。さらに、得た発現変動遺伝子に対して機能解析を行い、毛の成長に関連する遺伝子を絞り込んだ。第 3 章では、健常者と脱毛症患者における状態の異なる細胞種において毛包内の細胞間相互作用を解析し、脱毛症の発症に強く関連する細胞種を特定し、その相互作用の差分を検出する手法を提案した。具体的には、円形脱毛症患者と健常者の毛包シングルセル RNA-seq データを使用して、毛包内の細胞間相互作用解析を行った。第 4 章では、脱毛症におけるナイーブ T 細胞から分化の進んだ T 細胞のサブタイプへの移行過程を細胞系譜として解析し、その状態変化を検出した。具体的には、円形脱毛症患者と健

常者の皮膚シングルセル RNA-seq データを使用して、T 細胞の分化過程における細胞系譜解析を行った。その後、脱毛症患者で検出した系譜の始点と終点における差異解析を行い、特徴的な遺伝子を検出した。第 5 章では、第 2 章から第 4 章で得た知見を評価し、本解析の従来の方法との違いについて考察を行った。最後に、薄毛および脱毛症のメカニズムの解明に向けた今後の展望を述べた。

## 第2章 乳酸菌と共培養した毛乳頭細胞における発毛関連遺伝子の探索

### 2.1 緒言

乳酸菌とは、グラム陽性で、芽胞を形成せず、嫌気的に炭水化物を発酵させて乳酸を主要な最終産物として生成する球菌または桿菌である [19]。乳酸菌は、ヒトや他の動物に対して有益な効果をもたらすことが広く認識されており、腸内環境の改善や免疫系の調整、さらには炎症の抑制といった多様な生理機能を有している [19, 20, 21]。これらの古くから知られている効果に加え、皮膚の健康や毛髪の成長に関連することが示されている [22]。近年の研究では、頭皮の細菌叢に乳酸菌が存在していることが報告され、乳酸菌の摂取のみならず塗布も頭皮の状態や毛髪の成長に影響を与えることも明らかにされている [22, 23, 24, 25]。このような背景から、乳酸菌が毛包の発達や毛の成長を促進し、薄毛の改善に寄与する可能性が注目されている。特に、毛包の発達において重要な役割を果たす毛乳頭細胞との相互作用に着目することで、乳酸菌が毛の成長に及ぼす影響を分子レベルで解明することができる。

本章では、乳酸菌と毛乳頭細胞を共培養した RNA-seq データを解析し、乳酸菌が引き起こす遺伝子発現の変動を明らかにする。RNA-seq は、細胞内で発現している RNA を高精度に解析できる技術であり、乳酸菌が毛乳頭細胞に与える影響を網羅的に把握するのに有効であると考えられる。これまでの研究では、特定の条件下での発現変動の大きい遺伝子に焦点を当てることが主流であったが、遺伝子発現の経時的な変動パターンに関する知見は限られている。そこで、本研究では RNA-seq を活用し、毛乳頭細胞の遺伝子発現プロファイルの時間的变化に着目する。次元削減やクラスタリング解析（2.5 節で詳細に述べる）を用いて、遺伝子発現の時系列的な変動パターンを明らかにする。この解析により、乳酸菌と毛乳頭細胞の相互作用の影響を深く理解し、毛の成長のメカニズムに関する新たな手がかりを得ることが期待される。

### 2.2 本研究で使用する乳酸菌

本研究で選定した N793 株は、過去の研究において、毛乳頭細胞に対して顕著な活性化作用を示し、毛の成長に関連する成長因子の産生促進を確認している [26]。さらに、N793 株を含むヘアローションの頭皮への塗布が、薄毛を自覚するヒトにおいて毛髪の密度改善

に寄与したという報告がある [27]。これらの結果を踏まえ、N793 株を本研究で使用する乳酸菌として選定した。

### 2.3 関連研究

Levkovich らの研究 [22] は、*in vivo* における乳酸菌の毛髪成長促進効果を検討しており、本研究と同様に炎症抑制シグナルに注目した点で関連が深いため、目的、実験手法、得られた結果に関して述べる。この関連研究では、老齢マウスを用いて、*Lactobacillus reuteri*（現在の名称は *Limosilactobacillus reuteri*、以下 *L. reuteri*）を摂取した群と対照群の皮膚組織を観察し、毛包の発達やヘアサイクルに違いがあるかどうか、さらに *L. reuteri* 摂取が抗炎症サイトカインを誘導し、それが毛包の発達やヘアサイクルの制御に寄与するかを調べた。

以下では、Levkovich らの実験手法について説明する。プロバイオティクスとは、宿主に有益な作用をもたらす生きた微生物を指す。Levkovich らの関連研究では、プロバイオティクスである *L. reuteri* を含む食品（以下、プロバイオティクス食品）を摂取した老齢マウスの皮膚組織および毛の評価を行い、その評価とヒトの健康との関係を調査した。その後、プロバイオティクス食品の効果が乳酸菌そのものに起因するのか、またその効果が抗炎症作用によるものかを評価した。このため、実験手法は主に以下の 3 つのステップに分けて行われた。

ステップ 1 プロバイオティクス食品を摂取した老齢マウスの皮膚組織および毛の評価

ステップ 2 *L. reuteri* を摂取した老齢マウスの皮膚組織および毛の評価

ステップ 3 インターロイキン 10 欠損およびインターロイキン 17 抑制マウスの皮膚組織  
および毛の評価

以下では、それぞれのステップにおける詳細な実験手法を説明する。

(ステップ 1) プロバイオティクス食品を摂取した老齢マウスの皮膚組織および毛の評価

プロバイオティクス食品の摂取と皮膚や毛髪との関連を調べるため、プロバイオティクス食品を摂取した老齢マウスの皮膚および毛の評価を行う。まず、20~24 週齢の C57BL/6 マウスに対して、市販のバニラ風味プロバイオティクスヨーグルト (0.8 ml/マウス、週 3 回) を与える。対照群には、プロバイオティクスを含まない標準食を与える。各群には 5~10 匹のマウスを割り当て、40~48 週齢に達するまで飼育する。以下の項目について評価を実施する。

(1) 毛の光沢: 光沢の評価には、機械的および感覚的手法を用いる。光沢の機械的評価には、Gossen Starlight II 光度計を使用し、1 度および 5 度の視野で反射光を測定する。

また、複数の評価者がブラインド方式で感覚的に毛の光沢を評価し、1（最も光沢がある）から 5（最も鈍い）までのスケールで点数をつける。

(2) 皮膚組織の厚み: マウスの剖検後、皮膚サンプルを採取し、組織学的手法により皮膚の厚さを測定する。

(3) 毛包の数とヘアサイクル: 皮膚サンプルの組織切片を顕微鏡で観察し、毛包の数とその毛包におけるヘアサイクルの段階を評価する。

(4) 皮脂腺細胞の数: 皮膚の組織切片において、皮脂腺細胞の数を数え、皮脂の分泌量を定量する。

(5) pH 値: 酸性の pH が毛の光沢に影響を与えることが分かっているため、各群のマウスにおける皮膚、口腔、膣粘膜、および直腸の pH を測定する。

(ステップ 2) *L. reuteri* を摂取した老齢マウスの皮膚組織および毛の評価

プロバイオティクス食品の摂取による皮膚や毛髪への効果が、基質（ヨーグルトなどの食品自体）でなく、プロバイオティクス自体に起因するものであるかを調べるため、プロバイオティクスを摂取した老齢マウスの皮膚および毛の評価を行う。まず、20~24 週齢の C57BL/6 マウスに対して、抗炎症作用を持つ *Lactobacillus reuteri* ATCC 6475 を飲料水に混合し、1 日あたり  $3.5 \times 10^5$  生菌/マウスを投与する。対照群には、プロバイオティクスを含まない飲料水を与える。各群の割り当て数、飼育期間、および評価項目は、「プロバイオティクス食品を摂取した老齢マウスの皮膚組織および毛の評価」の項目に準じて設定する。

(ステップ 3) インターロイキン 10 欠損およびインターロイキン 17 抑制マウスの皮膚組織および毛の評価

Levkovich らは、プロバイオティクスが皮膚や毛の健康に与える効果が、抗炎症メカニズムによるものである可能性があると仮説を立てた。プロバイオティクスの効果に抗炎症性サイトカインであるインターロイキン-10（以下、IL-10）が必要かどうかを調べるため、IL-10 を完全に欠損した C57BL/6 系統の変異マウスに *L. reuteri* を与える。対照群にはプロバイオティクスを含まない飲料水を与え、各群の割り当て数、飼育期間、および評価項目は「プロバイオティクス食品を摂取した老齢マウスの皮膚組織および毛の評価」に準じて行う。

さらに、IL-10 が腸や皮膚でインターロイキン-17（以下、IL-17）を抑制する役割を果

たしていることは広く認識されている [28]。そこで、全身の IL-17 レベルの低下がプロバイオティクス摂取の効果と同様の結果をもたらすかどうかを検証するため、IL-17A を抑制した老齢 C57BL/6 野生型マウスにおいて、毛の光沢や皮膚の厚みを評価する。IL-17A は、抗 IL-17A 抗体を 500  $\mu$ g ずつ、週 3 回、3~4 週間にわたって腹腔内注射で投与することで抑制する。

関連研究の実験結果について述べる。プロバイオティクス食品の摂取による老齢マウスの皮膚および毛の評価の結果、プロバイオティクス食品を摂取した老齢マウスでは、毛の光沢、皮膚の厚さ、毛包数の増加、成長期毛包の割合増加、皮脂腺細胞数の増加、酸性 pH の維持など、顕著な改善を示した。これらの結果は、プロバイオティクス食品が皮膚の健康維持と毛の光沢向上に寄与していることを示唆している。*L. reuteri* を摂取した老齢マウスの評価の結果、*L. reuteri* 摂取により、毛の光沢、皮膚の厚さ、成長期毛包の割合、皮脂腺細胞数が増加し、これらの効果はプロバイオティクス食品摂取群と同様であり、両群の間に有意差はなかった。さらに、IL-10 欠損および IL-17 抑制マウスにおける評価の結果、IL-10 欠損マウスでは *L. reuteri* 摂取の効果が減少し、IL-10 活性に依存する可能性があることが明らかになった。また、IL-17 抑制によって、プロバイオティクス摂取と同様に皮膚および毛の状態が改善し、IL-17 抑制がプロバイオティクス摂取と類似の効果を再現できることが確認できた。

Levkovich らの関連研究では、乳酸菌の一種である *L. reuteri* の摂取が老齢マウスにおいて毛包数の増加およびヘアサイクルの成長期の促進をもたらす効果を示した。さらに、この効果が抗炎症サイトカインである IL-10 の発現増加と、炎症性サイトカイン IL-17 の発現抑制と関連していることを明らかにした。この結果は、乳酸菌が炎症抑制を介して毛包発達やヘアサイクルに影響を与えるメカニズムを示唆しており、重要な知見を提供している。

この成果に基づき、今後は他の抗炎症効果に関与する他の分子やレセプターの研究が進むことが期待される。例えば、IL-1RA や TGF- $\beta$  などの抗炎症性サイトカイン [29] など、抗炎症メカニズムにおいて重要な役割を果たす分子が他にも存在する。これらの分子を対象にした研究によって、乳酸菌の抗炎症メカニズムをより包括的に理解することが可能となり、さらなる知見が得られることが期待される。

また、Levkovich らの研究は、主に抗炎症効果に焦点を当てているが、毛包の発達やヘアサイクルの成長期維持に関与する遺伝子の発現解析も今後の研究において重要である。毛包形成や成長期には Wnt /  $\beta$  カテニンシグナルや TGF- $\beta$  シグナルの関与が示唆されて

いる [8]。また、FGF（線維芽細胞成長因子）やBMP（骨形態形成因子）といった因子も毛包発達やヘアサイクルの各段階で重要な役割を果たすことが知られている [30]。これらの遺伝子の発現を分析することで、乳酸菌が毛包発達やヘアサイクルに及ぼす影響をさらに深く理解できると考える。

さらに、Levkovich らの成果をヒトへ応用するためには、マウスとヒトの皮膚構造や生理的な違いも考慮する必要がある。マウスとヒトには特に毛包のサイズやヘアサイクルのダイナミクスにおいて異なる点がある [31]。このような種間差を踏まえた研究が進むことで、乳酸菌のヒト皮膚への応用可能性についての理解がさらに進むことが期待される。

## 2.4 本研究の目的

本研究の目的は、関連研究の結果を踏まえた上で、以下の 2 つの主要な点を解明し、毛の成長メカニズムに関する新たな知見を提供することである。第一に、毛乳頭細胞の遺伝子発現の時系列的変動を評価する。具体的には、乳酸菌と毛乳頭細胞を共培養し、毛乳頭細胞を毛の成長状態に誘導した上で、複数の時点における遺伝子発現の比較解析を通じて、毛の成長に関連する遺伝子の発現変動を明らかにする。Levkovich らの研究では、乳酸菌 *L. reuteri* の摂取がマウスにおける毛包数および成長期の割合の増加と抗炎症作用に関連していることを示したが、時系列的な遺伝子発現の変動については評価していない。この点に関して、本研究では毛乳頭細胞の時系列的な遺伝子発現の変動を詳細に評価することで、毛の成長メカニズムにおける新たな知見を得ることを目指す。第二に、ヒトにおける乳酸菌の影響を評価し、その適用性についての知見を得る。Levkovich らの研究はマウスを対象としており、ヒトにおける乳酸菌の影響に関する情報は限られている。そこで、本研究ではヒト毛乳頭細胞と乳酸菌を共培養し、毛包発達やヘアサイクル、抗炎症分子の関与を網羅的に解析することにより、ヒトにおける乳酸菌の効果を明らかにすることを目指す。これにより、ヒトの毛の成長メカニズムについて理解を深めることが期待される。

## 2.5 本研究の実験手法

本研究では、毛乳頭細胞の遺伝子発現の時系列的な変動を評価し、ヒトにおける乳酸菌の影響を明らかにするため、以下の方針で実験を行うこととした。

- 乳酸菌末懸濁液を調製し、ヒト毛乳頭細胞を対象に乳酸菌と共に培養する群（共培養群）と乳酸菌を加えない群（対照群）を設ける。

- 両群ともに 2 時間、6 時間、24 時間の各時点で培養を行い、各時点で細胞を回収後、RNA を抽出して次世代シーケンシングを用いて遺伝子発現データを取得する。
- 取得したデータは、まず次元削減およびクラスタリング解析を通じて遺伝子発現パターンを可視化し、共培養群と対照群の間で明確な差が見られる時点を特定する。
- 特定した時点において両群の遺伝子発現を比較し、有意な発現変動を示す遺伝子を検出する。
- これらの遺伝子の機能を解析することで、乳酸菌が毛乳頭細胞に与える影響を解明するための候補遺伝子を抽出する。

これらの手法により、乳酸菌と共に培養した毛乳頭細胞の時系列的な遺伝子発現変動を評価するとともに、ヒトにおける乳酸菌の影響に関する新たな知見を得ることを目指す。

### 2.5.1 生物学的実験

生物学的な実験は以下の 3 つのステップからなる。

ステップ 1 乳酸菌末懸濁液の調製

ステップ 2 毛乳頭細胞の培養

ステップ 3 RNA 抽出、ライブラリ調製およびシーケンシング

それぞれのステップの詳細について説明する。

#### ステップ 1 乳酸菌末懸濁液の調製

N793 株の L-乾燥品を Lactobacillus MRS broth (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) に加え、37 °C で 24 時間、5 % CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。その後、遠心分離により培養上清を除去して N793 株の菌体を回収した。菌体を蒸留水で洗浄し、湯せんと加熱殺菌を行った。加熱殺菌後、菌体を再度蒸留水に懸濁し、-80 °C で凍結した上で、凍結乾燥機で乾燥して菌体粉末を得た。この粉末をリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffered Saline、以下 PBS) に加え、最終濃度が 1mg/mL となるよう懸濁し、乳酸菌末懸濁液を調製した。

#### ステップ 2 毛乳頭細胞の培養

N793 株と共に培養した毛乳頭細胞の遺伝子発現変化を明らかにするため、乳酸菌末懸濁液を添加した培地で毛乳頭細胞を培養した。本研究で使用した毛乳頭細胞は PromoCell

表 2.1 RNA-seq に供したサンプル

サンプル名	培地	培養時間
0h	DMEM	0 時間
CTRL_2h	DMEM + PBS	2 時間
CTRL_6h	DMEM + PBS	6 時間
CTRL_24h	DMEM + PBS	24 時間
N793_2h	DMEM + 乳酸菌末懸濁液	2 時間
N793_6h	DMEM + 乳酸菌末懸濁液	6 時間
N793_24h	DMEM + 乳酸菌末懸濁液	24 時間

社 (Heidelberg, Germany) の Human Follicle Dermal Papilla Cells (以降 HFDPCs) であった。細胞培養には Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, high glucose, Sigma-Aldrich, USA) を使用した。培地には 10 % FBS (Fetal Bovine Serum) および 1 %ペニシリン/ストレプトマイシンを添加し、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> の条件下で培養を行った。HFDPCs を  $1.0 \times 10^5$  cells/mL の濃度で 12 ウェルプレートに播種した。播種後、HFDPC を 24 時間培養し、培養上清を除去した後、PBS で洗浄した。洗浄した HFDPCs に対して PBS または乳酸菌末懸濁液を 10 %含む培地を添加した。毛乳頭細胞の時間経過に伴う遺伝子発現の変動を明らかにするため、HFDPCs の培養時間を 2 時間、6 時間、および 24 時間に設定した。HFDPCs の培地および培養時間の条件に基づいて、サンプル名を付与した。各サンプルの詳細を表 2.1 に示す。各サンプルは生物学的反復数が 5 で実験を行った。以下、CTRL\_2h、CTRL\_6h、CTRL\_24h を対照群、N793\_2h、N793\_6h、N793\_24h を共培養群とする。

### ステップ 3 RNA 抽出、ライブラリ調製およびシーケンシング

解析に使用する mRNA やその他の RNA 分子を得るために、毛乳頭細胞から全 RNA を抽出した。具体的には、HFDPCs を培養終了後に PBS で洗浄し、培養上清を除去した。HFDPCs をマイクロチューブに回収し、- 80 °Cで凍結保存した。全てのサンプルを回収・凍結した後、QIAGEN 社 (Hilden, Germany) の RNeasy Universal Mini Kit を使用して全 RNA を抽出した。全 RNA の品質確認のため、Quantus Fluorometer および QuantiFluor RNA system (Promega 社、Madison, USA) を用いて全 RNA の濃

度を測定した。その後、5200 Fragment Analyzer System および Agilent HS RNA Kit (Agilent Technologies 社、Santa Clara, USA) を用いて、全 RNA の品質を確認した。

次に、全 RNA をシーケンサーが読み取れる形式に変換するため、ライブラリ調製を行った。ライブラリの作製には、MGIEasy RNA Directional Library Prep Set (MGI Tech Co., Ltd., Shenzhen, China) を使用し、マニュアルに従って実施した。作製したライブラリの濃度は、Qubit 3.0 Fluorometer および dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific 社、Waltham, USA) を用いて測定した。加えて、Fragment Analyzer および dsDNA 915 Reagent Kit (Advanced Analytical Technologies 社、Ankeny, USA) を用いてライブラリの品質を確認した。

作製した二本鎖 DNA ライブラリを基に、MGIEasy Circularization Kit (MGI Tech Co., Ltd., Shenzhen, China) を使用して一本鎖環状化 DNA を作製した。この環状化 DNA をテンプレートとして、シーケンシング精度を向上させるために DNA ナノボール (以下 DNB) を形成した。DNB は環状化 DNA から得られ、これによりシーケンサーでの読み取り効率と精度が向上する。環状化 DNA は二本鎖の断片がリング状に閉じているため、エラーが少なくなる特徴を持つ。最終的に、DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Kit (MGI Tech Co., Ltd., Shenzhen, China) を用いて DNB を作製し、その後、作製した DNB を DNBSEQ-G400 を用いて 2x100 bp の条件でシーケンシングを行った。シーケンシングの結果、リードと呼ばれる DNA 断片の配列情報を含む短い塩基配列を FASTQ 形式で得た。

### 2.5.2 データ解析手順

データ解析手順は以下の 4 つのステップからなる。

ステップ 4 遺伝子発現の定量化

ステップ 5 次元削減およびクラスタリング解析

ステップ 6 発現変動遺伝子解析

ステップ 7 発現変動遺伝子の機能解析

それぞれのステップの詳細について説明する。

#### ステップ 4 遺伝子発現の定量化

発現変動遺伝子解析に用いる各サンプルのカウントデータを得るために、シーケンシングで得たリードを基に、各サンプルの遺伝子発現を定量化した。具体的には、リードをリファレンスゲノムにマッピングした結果であるアライメントファイルを基に、カウントデータを生成した。まず、リードのアライメントを効率的に行うために、リファレンスゲノムのインデックスを作成した。リファレンスゲノムには、Ensembl から入手した gtf 形式の GRCh38 を使用した。次に、リードをリファレンスゲノムにマッピングし、BAM 形式のアライメントファイルを生成した。その後、アライメントした BAM ファイルからカウントデータを生成した。得られたカウントデータは、Ensembl gene id および各サンプルの発現量データから成る。

#### ステップ 5 次元削減およびクラスタリング解析

得られたカウントデータの全体的な傾向を把握するために、主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) を用いた次元削減を行った。PCA は、高次元の遺伝子の発現量データを少数の主成分に圧縮し、サンプル間の遺伝子発現パターンの差異を視覚的に示すために実施した。

また、サンプルの類似度を可視化するために、階層型クラスタリングを行った。階層型クラスタリングは、サンプル間の遺伝子発現パターンに基づいて、類似するグループであるクラスタを作成する手法である。この解析にはユークリッド距離を距離関数として使用し、ウォード法を系統樹作成法として採用した。これにより、同一条件下のサンプルが適切にクラスタリングされているかを確認できる。

#### ステップ 6 発現変動遺伝子解析

異なる条件において、遺伝子の発現量の違いを定量的に比較し、統計的に有意な発現変動がある遺伝子を特定するために、発現変動遺伝子解析を行った。解析の条件は以下の通りである。

CTRL\_2h vs N793\_2h, CTRL\_6h vs N793\_6h, CTRL\_24hr vs N793\_24hr

つまり、対照群と共培養群の同じ時間（2 時間、6 時間、24 時間）における遺伝子発現の違いを比較した。乳酸菌末懸濁液の共培養による遺伝子発現の変化を各時点で評価し、乳酸菌末懸濁液の効果を時間ごとに検証する解析である。

具体的な発現変動遺伝子解析の手順について説明する。まず、解析結果の解釈を容易にするため、カウントデータの Ensembl gene id を gene symbol へと変換した。次に、各サンプル間での遺伝子発現量を比較するため、カウントデータの正規化を行った。その後、正規化したデータを用いて各遺伝子の発現量の変動を条件間で比較した。具体的には、対照群と共培養群を比較するために、疑似尤度を利用した F 検定を実施した。この手法により、各遺伝子の発現量の差が統計的に有意であるかどうかを判定した。各遺伝子の発現量を fold change (発現量の変動率) として表し、さらに FDR (False Discovery Rate) を用いて統計的に有意な遺伝子を特定した。logFC (log Fold Change) は、対照群と共培養群間の発現量の差を対数スケールで示した値であり、正の値は共培養群で発現が増加、負の値は発現が減少していることを示す。

発現変動遺伝子の絞り込みには、p 値 (p-value) および FDR (False Discovery Rate) を用いた。p 値は、帰無仮説が真であると仮定した場合に、観察した事象より極端な結果が得られる確率を示す指標である。通常、p 値が 0.05 未満であれば帰無仮説を棄却し、観察した差異が統計的に有意であると判断する。しかし、複数の仮説検定を行う際には、偶然による偽陽性が増加するリスクがあるため、p 値のみでは適切な判断が難しい場合がある。これに対し、FDR は多重比較による偽陽性の割合を制御するための指標であり、帰無仮説を棄却した場合、実際には真でない仮説 (偽陽性) の割合を示す。例えば、FDR が 0.05 であれば、棄却した仮説のうち 5 % が偽陽性であることを意味する。FDR は特に大量のデータを扱う際に有用であり、信頼性の高い統計的結論を導くために活用される。本研究では、まず p 値を算出し、その後 FDR を用いて多重比較補正を行った。最終的に、 $FDR < 0.05$  の条件を満たす遺伝子を、発現変動遺伝子とした。

## ステップ 7 発現変動遺伝子の機能解析

発現変動遺伝子の機能解析を行うために、遺伝子機能や経路に関する解析を実施した。具体的には、発現変動遺伝子の機能分類を行うため、Gene Ontology (GO) 解析を実施した。GO 解析とは、遺伝子を生物学的過程 (Biological Process, BP)、細胞構成要素 (Cellular Component, CC)、および分子機能 (Molecular Function, MF) という 3 つの主要カテゴリに分類し、それぞれのカテゴリ内で発現変動遺伝子群に関連する GO タームを統計的に評価し、有意に関連するタームを抽出する手法である [32, 33]。本研究では調整済  $p < 0.05$  の条件を満たす BP に属する GO タームを、統計的に有意性の高い遺伝子の機能とした。具体的な評価指標として、遺伝子比率 (gene ratio) を採用した。遺伝子

比率とは特定の GO タームに関連付けられた遺伝子の数を、解析対象となる全遺伝子の数で割った値を指す。この指標は、特定の GO タームがどれだけの割合の遺伝子に関連しているかを示すために用いた。

## 使用したソフトウェア

遺伝子発現の定量化において、リファレンスゲノムのインデックス作成およびリードのマッピングには STAR[34]、カウントデータの生成には RSEM[35] を使用した。次元削減およびクラスタリング解析において、PCA および階層型クラスタリングには TCC を使用した [36]。発現変動遺伝子解析において、Ensembl gene id から gene symbol への変換は biomaRt[37, 38]、データの正規化および発現変動遺伝子の検出には edgeR を使用した [39, 40]。発現変動遺伝子の機能解析において、GO 解析には clusterProfiler を使用した [41, 42]。

## 2.6 本研究の実験結果

### 2.6.1 次元削減およびクラスタリング解析の結果

主成分分析 (PCA) による次元削減を行い、各サンプルの遺伝子発現データの全体的な傾向を可視化した。PCA による次元削減の結果を図 2.1 に示す。PC1 および PC2 は、データの分散のそれぞれ 15.9 % および 6.4 % を占めており、これらの 2 つの主成分で全体の 22.3 % の分散を占めていた。PCA プロットにおいて、対照群と共培養群はそれぞれ異なるクラスタを形成し、特に 24 時間後のサンプルにおいて顕著な分離を確認した。また、2 時間、6 時間、24 時間のサンプルは、処理時間に応じて連続的に分布しており、経時的な遺伝子発現の変化を示した。PC1 は、主に処理条件の違いを反映しており、PC2 は時間経過に伴う遺伝子発現の変化を反映していると解釈した。これにより、乳酸菌末懸濁液との共培養および時間経過が遺伝子発現に与える影響を、主成分分析によって可視化した。

次に、サンプルの類似度を可視化するために、階層型クラスタリングを行った。階層型クラスタリングの結果を図 2.2 に示す。クラスタリングは、サンプル間の距離を計算し、その類似度に基づいて樹状図を作成することで、サンプルをグループ化した。本解析では、ユークリッド距離を用いてクラスタリングを行った。クラスタリングで作成した樹形図をもとに、時系列に沿ったサンプルのグループ化を示した。しかし、対照群と共培養群が明確に分かれたのは 24 時間のみだった。これは、24 時間経過後に共培養の影響が顕著

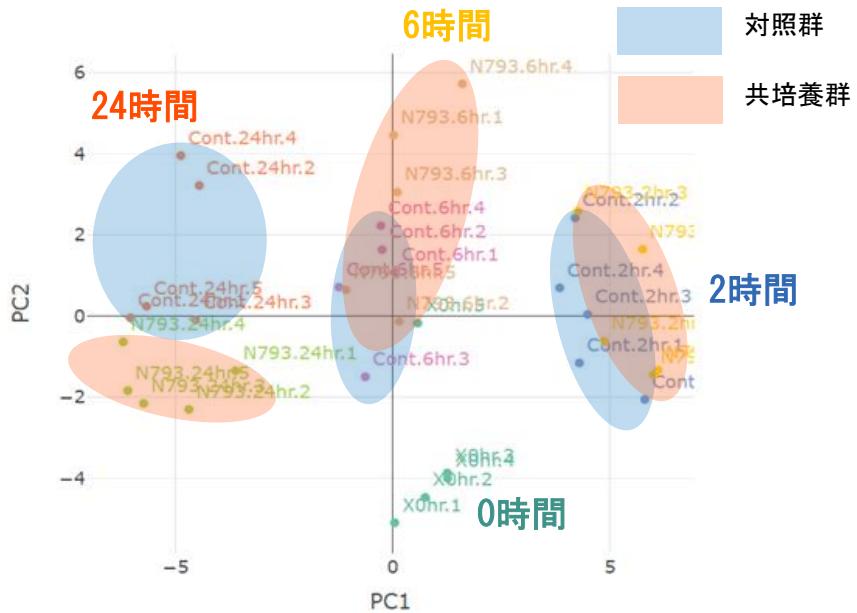


図 2.1 主成分分析による次元削減の結果

になった可能性を示している。クラスタリングによって得たグループは、PCA による次元削減の結果とも整合しており、サンプル間の遺伝子発現パターンに基づく全体的な分布傾向や類似度を明確に示した。

### 2.6.2 発現変動遺伝子解析の結果

乳酸菌未懸濁液の共培養による遺伝子発現の変化を各時点で評価し、乳酸菌未懸濁液の効果を時間ごとに検証するため、対照群と共培養群の同じ時間（2時間、6時間、24時間）における遺伝子発現の違いを比較した。その結果、対照群と比較して共培養群において、発現変動遺伝子の基準（FDR < 0.05）を満たす遺伝子を検出した。具体的には、2時間後の共培養群において、対照群と比較して 134 個の遺伝子が有意に上昇し、32 個の遺伝子が有意に減少した。また、6時間後の共培養群では、対照群と比較して 484 個の遺伝子が有意に上昇し、135 個の遺伝子が有意に減少した。さらに、24時間後の共培養群において、対照群と比較して 1166 個の遺伝子が有意に上昇し、1009 個の遺伝子が有意に減少した。上記の結果から、乳酸菌未懸濁液との共培養は、24時間後に最も大きな遺伝子発現

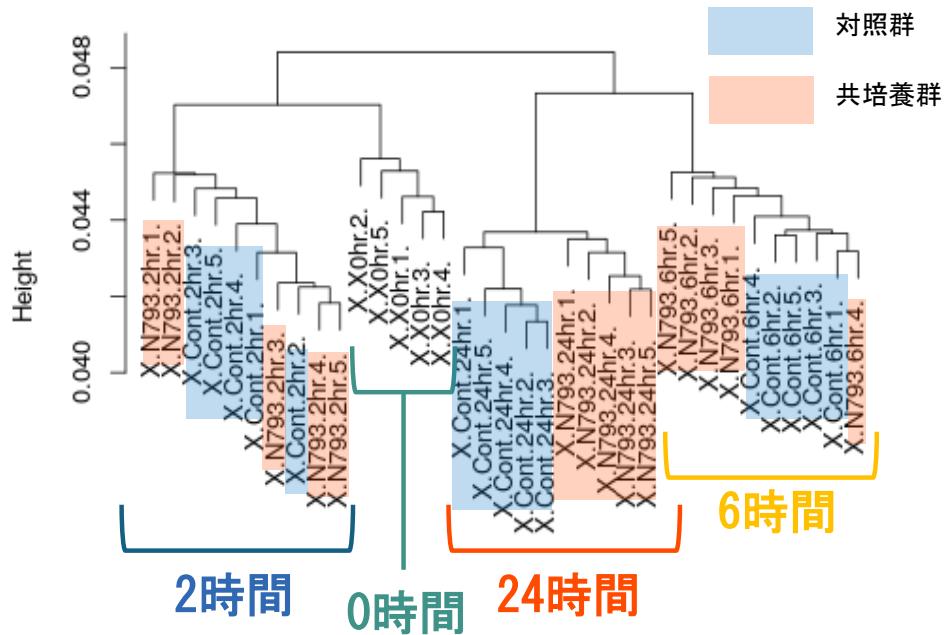


図 2.2 階層型クラスタリングの結果

の変化を引き起こすことが明らかとなった。これにより、乳酸菌未懸濁液が遺伝子発現に及ぼす影響が時間依存的であることが分かった。以降の解析では、最も変化が大きかった 24 時間後の発現変動遺伝子のうち、発現が増加した遺伝子を毛の成長に関連する遺伝子として選定することとした。毛の成長に関連する遺伝子の代表例として、上位 20 遺伝子を表 2.2 に示す。

### 2.6.3 発現変動遺伝子の機能解析の結果

発現変動遺伝子の機能解析は、共培養条件下での遺伝子発現の変化を理解するために実施した。本解析では、対照群と共培養群で有意に発現が変動した遺伝子の機能的意義を明らかにすることを目指した。最も遺伝子発現の変動が大きい培養後 24 時間の発現変動遺伝子のうち、発現が増加した遺伝子である毛の成長に関連する遺伝子を解析に使用した。GO 解析の結果を図 2.3 に示す。表に記載した GO タームに含まれる遺伝子を表 2.3 に示す。

表 2.2 毛の成長に関する上位 20 遺伝子

遺伝子名	logFC	p 値	FDR
<i>CEMIP</i>	1.19	5.43E-19	7.42E-15
<i>THBS1</i>	0.32	3.90E-15	2.67E-11
<i>TNFRSF11B</i>	0.71	4.59E-14	1.74E-10
<i>CALD1</i>	0.49	5.47E-14	1.74E-10
<i>FGF7</i>	0.80	6.37E-14	1.74E-10
<i>CCN1</i>	0.63	1.98E-13	4.51E-10
<i>ATP8B1</i>	0.62	6.58E-13	1.06E-09
<i>CXCL8</i>	2.16	6.72E-13	1.06E-09
<i>STC1</i>	0.58	6.98E-13	1.06E-09
<i>GPR176</i>	0.56	1.01E-12	1.38E-09
<i>HSPB7</i>	0.82	1.46E-12	1.81E-09
<i>ACTG1</i>	0.28	3.40E-12	3.88E-09
<i>TMEM47</i>	0.59	1.18E-11	1.15E-08
<i>TGM2</i>	0.60	2.11E-11	1.83E-08
<i>SOD2</i>	0.87	2.14E-11	1.83E-08
<i>LOXL4</i>	0.45	2.35E-11	1.89E-08
<i>TFRC</i>	0.59	2.84E-11	2.16E-08
<i>PALLD</i>	0.43	3.35E-11	2.41E-08
<i>RGMB</i>	0.36	4.01E-11	2.74E-08
<i>PLOD2</i>	0.42	7.15E-11	4.66E-08

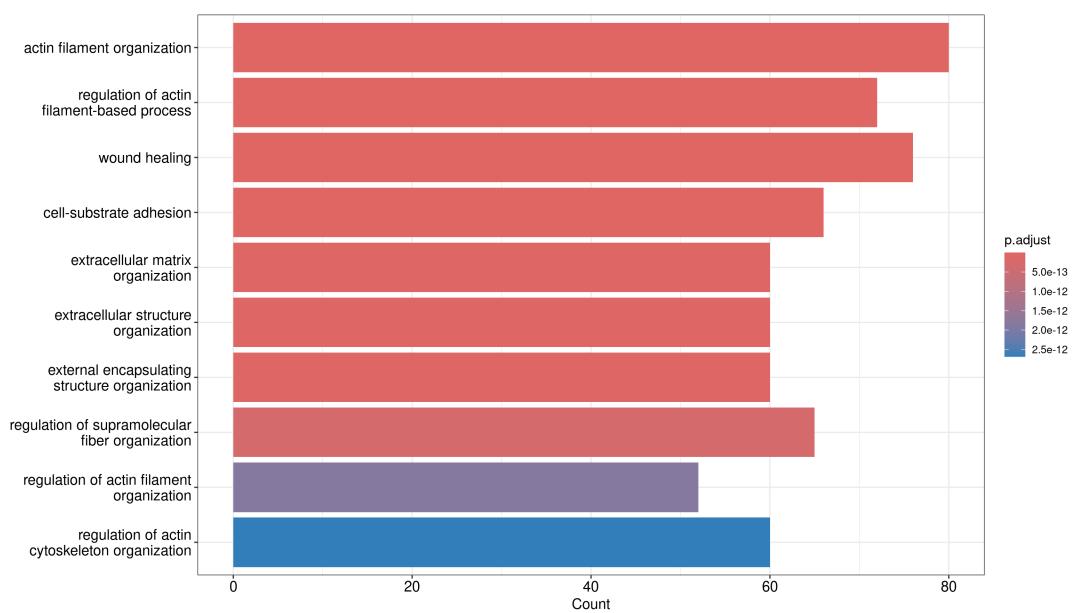


図 2.3 Gene Ontology 解析の結果

表 2.3: Gene Ontology 解析で検出した GO タームに含まれる発現変動遺伝子

GO ターム	GO タームに含まれる発現変動遺伝子
actin filament organization	CALD1, ACTG1, CCN2, LIMA1, MYADM, NEDD9, LMOD1, TPM1, EMP2, RGS4, MYO1C, ELN, ACTR3, TMSB4X, MICAL2, FLNA, DSTN, RHOC, SWAP70, FCHSD2, PLS3, ARPC4, CORO1C, WDR1, MYO1D, SHROOM3, TPM2, FERMT2, ROCK2, DAAM2, GSN, RASA1, SYNPO2, SLIT2, MYO6, CFL2, SEMA5A, MTSS1, SDC4, SNX9, MYO1B, COTL1, RAC1, ALDOA, ACTN1, BRK1, SRF, ARPC5, ARHGAP18, MSRBI, DPYSL3, SMAD3, BAIAP2L1, ARPC2, TMSB10, TPM4, ARPC3, CORO6, SSH1, FAT1, FMN2, DIAPH2, SFRP1, SRC, ROCK1, FCHSD1, SPTAN1, FHOD3, TACSTD2, TMOD2, ACTR2, ARHGEF18, PIK3CA, GMFB, CFL1, RHOA, ELM01, CSF3, ARHGAP28, CAPZA2
regulation of actin filament-based process	STC1, ACTG1, CCN2, LIMA1, MYADM, NEDD9, FRMD6, KCNJ2, LMOD1, CNN2, ATP2A2, TPM1, RGS4, PAM, MYH9, ELN, TMSB4X, FLNA, CAV1, DSTN, RHOC, SWAP70, FCHSD2, WDR1, FERMT2, ROCK2, DAAM2, GSN, RASA1, SYNPO2, SLIT2, ACTA2, CFL2, DSP, SEMA5A, MTSS1, SDC4, SNX9, GPM6B, COTL1, RAC1, BRK1, ARPC5, ARHGAP18, SMAD3, BAIAP2L1, ARPC2, TMSB10, RHOQ, IQGAP1, AKAP13, ARPC3, SSH1, SFRP1, IQGAP3, AKAP9, ROCK1, FCHSD1, SPTAN1, FHOD3, TACSTD2, PDE4B, TMOD2, SUMO1, ARHGEF18, PIK3CA, GMFB, BST2, RHOA, CSF3, ARHGAP28, CAPZA2
wound healing	THBS1, CCN1, ACTG1, MYOF, VCL, MYL12A, CNN2, WFDC1, TIMP1, MYLK, CSRP1, MYH9, MYL9, WNT5A, IL6, C1QTNF1, FLNA, CAV1, RHOC, CHMP1B, PLPP3, FGF2, FERMT2, ACTB, ACTA2, DSP, LOX, ANXA6, PRCP, SERPINE1, CHMP5, DDR2, CFLAR, SDC4, ITGB1, FGFL1, ANXA2, AK3, TFP12, SRF, MSX2, CCN4, SMAD3, GNA12, ILK, CASP3, CD9, PPIA, PLAT, ANXA5, EXT1, COL5A1, TLN1, B4GALT1, SERPINE2, PLCG2, CASK, SRC, DGKH, TNFAIP3, MCAM, PRKG1, CD59, CDKN1A, RAF1, PIK3CA, GNAQ, FZD6, FZD7, RHOA, MAP3K5, NRG1, FERMT3, TLR4, LMAN1

GO  $\Delta$  –  $\Delta$ 

## GO タームに含まれる発現変動遺伝子

cell-substrate adhesion	THBS1, CCN1, ACTG1, CCN2, MYADM, NEDD9, FN1, VCL, DAB2, GBP1, ANGPT1, EMP2, ITGA8, ANTXR1, COL8A1, FLNA, CORO1C, CCDC80, FERM1, ROCK2, SGCE, CDH11, ITGAV, RASA1, RIN2, HAS2, THY1, ITGA1, SERPINE1, NTN4, SDC4, RSU1, ITGB1, GPM6B, CSF1, PEAK1, ITGA7, RRAS, RAC1, ACTN1, SRF, LIMS2, UTRN, BCL6, SMAD3, ILK, EDIL3, ARPC2, EFEMP2, BVES, TLN1, CD63, ITGB8, SFRP1, CASK, SRC, ROCK1, PARVA, TACSTD2, AKIP1, HSD17B12, FZD7, ST6GAL1, ADAMTS12, RHOA, FERMT3
extracellular matrix organization	TNFRSF11B, CCN1, LOXL4, CCN2, COL11A1, RECK, PTX3, ITGA8, ADAMTSL4, ANTXR1, ELN, IL6, PYDN, COL8A1, CAV1, NFKB2, COL5A2, CCDC80, LUM, SULF1, COL12A1, LOXL2, HAS2, DNAJB6, LOX, RXFP1, NTN4, DDR2, CFLAR, ITGB1, GPM6B, COL1A2, P4HA1, ANXA2, SPINT2, PRICKLE1, THSD4, SMAD3, CAV2, ERCC2, COL4A1, EFEMP2, EXT1, COL5A1, B4GALT1, ADAMTS1, ADAMTS3, ADAMTS4, COL4A2, LAMB2, HSD17B12, QSOX1, LOXL3, FMOD, PHLDB1, COL10A1, ADAMTS12, FOXC1, LAMA1, COL8A2
extracellular structure organization	TNFRSF11B, CCN1, LOXL4, CCN2, COL11A1, RECK, PTX3, ITGA8, ADAMTSL4, ANTXR1, ELN, IL6, PYDN, COL8A1, CAV1, NFKB2, COL5A2, CCDC80, LUM, SULF1, COL12A1, LOXL2, HAS2, DNAJB6, LOX, RXFP1, NTN4, DDR2, CFLAR, ITGB1, GPM6B, COL1A2, P4HA1, ANXA2, SPINT2, PRICKLE1, THSD4, SMAD3, CAV2, ERCC2, COL4A1, EFEMP2, EXT1, COL5A1, B4GALT1, ADAMTS1, ADAMTS3, ADAMTS4, COL4A2, LAMB2, HSD17B12, QSOX1, LOXL3, FMOD, PHLDB1, COL10A1, ADAMTS12, FOXC1, LAMA1, COL8A2
external encapsulating structure organization	TNFRSF11B, CCN1, LOXL4, CCN2, COL11A1, RECK, PTX3, ITGA8, ADAMTSL4, ANTXR1, ELN, IL6, PYDN, COL8A1, CAV1, NFKB2, COL5A2, CCDC80, LUM, SULF1, COL12A1, LOXL2, HAS2, DNAJB6, LOX, RXFP1, NTN4, DDR2, CFLAR, ITGB1, GPM6B, COL1A2, P4HA1, ANXA2, SPINT2, PRICKLE1, THSD4, SMAD3, CAV2, ERCC2, COL4A1, EFEMP2, EXT1, COL5A1, B4GALT1, ADAMTS1, ADAMTS3, ADAMTS4, COL4A2, LAMB2, HSD17B12, QSOX1, LOXL3, FMOD, PHLDB1, COL10A1, ADAMTS12, FOXC1, LAMA1, COL8A2

GO  $\Delta$  –  $\Delta$ 

## GO タームに含まれる発現変動遺伝子

regulation of supramolecular fiber organization	ACTG1, CCN2, LIMA1, MYADM, LMOD1, STMN2, TPM1, RGS4, ELN, TMSB4X, LDLR, CRYAB, FLNA, DSTN, RHOC, SWAP70, FCHSD2, WDR1, FERMT2, ROCK2, DAAM2, GSN, RASA1, SYNPO2, EML2, SLIT2, CFL2, SEMA5A, MTSS1, PDE4DIP, SDC4, SNX9, CLIP3, COTL1, WDR47, RAC1, BRK1, ARPC5, ARHGAP18, SMAD3, BAIAP2L1, ARPC2, TMSB10, AKAP13, EFEMP2, ARPC3, SSSH1, SFRP1, DYRK1A, AKAP9, ROCK1, FCHSD1, SPTAN1, FHOD3, MAP1B, TACSTD2, TMOD2, ARHGEF18, PIK3CA, GMFB, RHOA, CSF3, ARHGAP28, CAPZA2, VBP1
regulation of actin filament organization	ACTG1, CCN2, LIMA1, MYADM, LMOD1, TPM1, RGS4, ELN, TMSB4X, FLNA, DSTN, RHOC, SWAP70, FCHSD2, WDR1, FERMT2, ROCK2, DAAM2, GSN, RASA1, SYNPO2, SLIT2, CFL2, SEMA5A, MTSS1, RAC1, BRK1, ARPC5, ARHGAP18, SMAD3, BAIAP2L1, ARPC2, TMSB10, ARPC3, SSSH1, SFRP1, ROCK1, FCHSD1, SPTAN1, FHOD3, TACSTD2, TMOD2, ARHGEF18, PIK3CA, GMFB, RHOA, CSF3, ARHGAP28, CAPZA2
regulation of actin cytoskeleton organization	ACTG1, CCN2, LIMA1, MYADM, NEDD9, LMOD1, TPM1, RGS4, PAM, ELN, TMSB4X, FLNA, DSTN, RHOC, SWAP70, FCHSD2, WDR1, FERMT2, ROCK2, DAAM2, GSN, RASA1, SYNPO2, SLIT2, CFL2, SEMA5A, MTSS1, SDC4, SNX9, GPM6B, COTL1, RAC1, BRK1, ARPC5, ARHGAP18, SMAD3, BAIAP2L1, ARPC2, TMSB10, RHOQ, IQGAP1, AKAP13, ARPC3, SSSH1, SFRP1, IQGAP3, ROCK1, FCHSD1, SPTAN1, FHOD3, TACSTD2, TMOD2, ARHGEF18, PIK3CA, GMFB, BST2, RHOA, CSF3, ARHGAP28, CAPZA2

## 2.7 本研究の考察

本研究は、Levkovich らの関連研究で明らかになった乳酸菌の抗炎症効果を介した毛の成長のメカニズムに新たな知見を提供することを目的として、薄毛改善効果を示す乳酸菌との共培養が毛の成長に及ぼす影響を時系列で解析し、発現変動遺伝子の同定を目指した。

主成分分析および階層型クラスタリングの結果、乳酸菌末懸濁液との共培養が遺伝子発現に与える影響が時間経過とともに顕著であることを示した。特に 24 時間後には、対照群と共培養群が主成分空間上で明瞭に分離し、階層型クラスタリングにおいても両群が異なるクラスタに属することを示した。このことは、乳酸菌が毛乳頭細胞の遺伝子発現に対して時間依存的かつ明確な影響を与えることを強く示唆している。さらに、24 時間という特定の時点での分離の明瞭さは、乳酸菌由来の因子が毛乳頭細胞の遺伝子発現における変化を誘導するプロセスにおいて、この時点が特に重要である可能性を示唆している。これは、乳酸菌による細胞内シグナル伝達や遺伝子発現調節が、短時間では観察できないが、一定の時間経過を経て初めて顕著になることを意味する。

発現変動遺伝子解析の結果、対照群と比較して共培養群では毛の成長に関連する既知の遺伝子を検出した（表 2.2）。例えば、線維芽細胞増殖因子 7 (FGF7) はヘアサイクルの成長期を誘導および維持する上で重要な役割を果たすことが知られており [43]、乳酸菌との共培養によりその発現が増加することを示した。このことは、乳酸菌が毛の成長を促進する可能性を強く示している。さらに、Gene Ontology 解析において検出した GO ターム「wound healing」には、マウスの休止期毛包を成長期に移行させる乳酸菌と共に培養した毛乳頭細胞 [44] で発現していた WNT5A や線維芽細胞増殖因子 2 (FGF2) が含まれていた（図 2.3 および表 2.3）。これらの一致した結果は、乳酸菌による毛の成長促進効果が、これまで報告されているヘアサイクルの成長期誘導および維持のメカニズムと類似の経路を介して発揮されている可能性を示している。これらの知見は、乳酸菌が毛乳頭細胞に与える作用の再現性を支持し、毛の成長メカニズムに関する理解を深める一助となるものである。

さらに、発現変動遺伝子解析および Gene Ontology 解析により、抗炎症作用を有する因子をコードする遺伝子を検出した。例えば、TNF レセプタースーパーファミリーメンバー 11 $\beta$  (TNFRSF11B) は炎症を誘導するシグナルである TNF シグナルを阻害するデコイレセプターである。TNFRSF11B は GO ターム「extracellular matrix

organization」、「extracellular structure organization」および「external encapsulating structure organization」に含まれていた（図 2.3 および表 2.3）。さらに、*TNFRSF11B* を介する抗炎症経路が、Levkovich らの研究にて明らかにされた抗炎症経路とは異なるものである点は特筆すべきである。この結果は、乳酸菌が複数の抗炎症経路を通じて作用する可能性を示しており、従来報告されていない新規のメカニズムを明らかにするものである。これらの知見は、乳酸菌による炎症抑制作用や毛髪成長促進効果の解明に寄与するものである。

一方、毛乳頭細胞単独の RNA-seq データによる解析には限界があることが明らかとなった。この制約の一因は、GO タームが異なる細胞種や組織で得られた遺伝子発現情報を統合しているため、単一の細胞種のみではその全体像を捉えきれない点にある。例えば、毛乳頭細胞が関与する生物学的過程の一部は、毛包内の他の細胞種との相互作用によって調節される可能性が高い。これらの細胞間相互作用によって、毛乳頭細胞における遺伝子発現の変動が生じるため、毛乳頭細胞単独の RNA-seq データでは完全な理解を得ることが難しい。したがって、毛乳頭細胞だけでなく、毛包全体の遺伝子発現データを考慮することが、毛の成長に関連する遺伝子の機能をより詳細に解析するために重要であることが示唆される。今後の研究では、毛乳頭細胞を含む毛包組織全体の遺伝子発現プロファイルを基に、毛の成長に関与する遺伝子群をさらに精密に解析することが必要である。また、乳酸菌との相互作用が毛包やヘアサイクルに与える影響についても、他の細胞種との相互作用を含めた包括的なアプローチが必要であり、さらなるメカニズムの解明が期待される。

## 2.8 結言

本研究では、毛乳頭細胞の RNA-seq データを用いて、毛の成長に関連する遺伝子の探索を行った。具体的には、薄毛の改善が期待される乳酸菌 N793 株と共に培養した毛乳頭細胞と、対照群の毛乳頭細胞との間で発現変動遺伝子を検出した。その結果、*FGF7*、*WNT5A*、*FGF2* といった、ヘアサイクルの成長期を誘導する因子をコードする遺伝子を検出し、乳酸菌 N793 株が毛の成長に寄与する可能性が明らかになった。さらに、*TNFRSF11B* の検出に成功し、乳酸菌による抗炎症作用が毛の成長に与える影響について、関連研究とは異なる経路で作用する可能性を示した。これらの知見から、乳酸菌 N793 株が毛乳頭細胞に対して毛の成長を促進するメカニズムに関して、既存の研究結果と整合性がとれているとともに、乳酸菌による毛の成長促進効果は複数の経路を介して作

用することを示した。本研究の成果は、毛の成長に関するさらなる知見を提供するものである。

## 第3章 脱毛症患者の毛包組織での毛乳頭細胞との細胞間相互作用の解析

### 3.1 緒言

第2章では、乳酸菌と毛乳頭細胞の相互作用を通じて、毛の成長メカニズムに関する知見を得た。これに対し、本章では、毛の脱落メカニズムの解明に焦点を当て、毛包組織における細胞間相互作用の詳細な解析を試みる。

脱毛症は、毛包の機能不全とそれに伴うヘアサイクルの乱れを特徴とする疾患である。毛包組織においては、細胞間相互作用が毛包の機能維持やヘアサイクルの調節において重要な役割を果たしている。そのため、脱毛症のメカニズムを解明するには、これらの相互作用を詳細に解析する必要がある。細胞間相互作用では、細胞が分泌するシグナル分子であるリガンドと、それを受け取る受容体であるレセプターが重要な役割を果たしている。これらの分子は特定のペアを形成し、細胞間の情報伝達を担うことから、リガンド–レセプターペアの解析は、相互作用の解明において不可欠である。また、シングルセルRNA-seq技術は、細胞単位での遺伝子発現解析を可能にし、細胞間相互作用を詳細に解析するための有用なツールである。

本章では、円形脱毛症患者および健常者の毛包組織由来のシングルセルRNA-seqデータセットを用いて解析を行い、円形脱毛症に特有の細胞間相互作用を明らかにする。従来の解析手法では、複数条件間の発現差を正確に捉えることや、脱毛症において重要な細胞種を特定することが困難であった。本研究では、複数条件間でリガンド–レセプターペアの発現差を統計的に検出するとともに、最も頻繁に出現するターゲット（レセプターを発現する細胞種）に焦点を当てた解析を行うことで、この課題に対応する。本研究では、脱毛症に特有のリガンド–レセプターペアを解明することで、毛の脱落メカニズムに新たな知見をもたらすことが期待される。

### 3.2 関連研究

Anらの研究[45]では、円形脱毛症のモデルマウスの皮膚組織における細胞間相互作用解析を通じてリガンド–レセプターペアを推定し、新たな知見を得られる可能性を示した。本研究と同様のアプローチを採用した点で関連が深いため、この研究について述べる。Anらの関連研究について、目的、使用されたシングルセルRNA-seqデータ、解析

手法、得られた結果について述べる。この関連研究は、シングルセル RNA-seq のデータセットを用いて、既知のリガンドとレセプターのデータベースを使用した細胞間相互作用解析を実施し、細胞集団間のリガンド–レセプターペアを明らかにしたことを示した研究である。

An らの関連研究では、ケモカインの一種である CXCL12 がレセプターである CXCR4 の機能を抑制するとともに、CXCL12 の抗体がその抑制作用を阻害することで炎症に関連する様々な疾患の発症を遅らせるという知見 [46] に着目している。このため、円形脱毛症のモデルマウスに加えて、それに CXCL12 の抗体を投与したマウスを使用している。

An らの関連研究では、円形脱毛症のモデルマウス、健常状態のマウス、CXCL12 の抗体を投与したマウスのそれぞれの細胞からシングルセルのトランск립トームを取得した。シングルセル RNA-seq には、10x Genomics Chromium システムが用いられた。シーケンシングは Illumina シーケンシングシステムで実施され、Cell Ranger (v7.2.0) を使用してデータが処理された。以上の手法より得られた計 28,351 の皮膚細胞の単一細胞ごとの RNA-seq データが解析に使用された。

解析手法は主に以下の 4 つのステップからなる。

ステップ 1 データセットの前処理

ステップ 2 データセットのクラスタリング

ステップ 3 クラスタの細胞種の同定

ステップ 4 細胞間相互作用解析によるリガンド–レセプターペアの推定

以下でそれぞれのステップについて詳細な解析手法を説明する。

(ステップ 1) データセットの前処理

シングルセル RNA-seq データの解析に際しては、まず前処理として正規化を行い、細胞ごとの発現量の差を補正する。各細胞の総発現量に基づき、各遺伝子の発現量をスケーリングし、その後対数変換を行う。正規化したデータを用いて、各細胞の遺伝子発現パターンの差異を解析する。

(ステップ 2) データセットのクラスタリング

graph-based clustering approach [47] による細胞のクラスタリングを実施する。

その後、Louvain アルゴリズム [48] を用いて細胞のクラスタを特定する。このアルゴリズムは、モジュラリティの最適化を局所的に実施し、密に結合したノードの集合をコミュニティとして集約することに特徴がある。

(ステップ 3) クラスタの細胞種の同定

各クラスタの細胞種は、これらのクラスタ特異的に発現している古典的な皮膚系統マーカーとして知られている遺伝子を指標として決定する。細胞種の発現パターンを、UMAP(Uniform Manifold Approximation and Projection) アルゴリズムにより可視化した。UMAP アルゴリズムは、複数の特徴量を持つ発現データのような高次元のデータを低次元に変換して可視化する次元削減アルゴリズムの一つである。

#### (ステップ 4) 細胞間相互作用解析によるリガンド-レセプターペアの推定

細胞間相互作用解析を通じて、クラスタ間の細胞間コミュニケーションネットワークを推定する。具体的には、リガンドを発現する細胞群とレセプターを発現する別の細胞群の平均発現値、およびそれらの補因子に基づき、質量作用の法則を用いてネットワークを定量的に測定する。この解析には、既知のリガンド-レセプターペア情報を集積したCellChatDB を利用しており、これによりデータベースに基づく信頼性の高い相互作用の推定が可能となっている [17]。重要な相互作用は、統計的検定を用いて細胞群のラベルをランダムに入れ替えた後、細胞間相互作用の確率を再計算することにより特定する。さらに、推定した細胞間相互作用に基づいて発現差遺伝子をマッピングし、顕著に変化したリガンド-レセプターペアを抽出する。

以下に、An らの関連研究の解析結果について述べる。データセットのクラスタリングの結果、Louvain アルゴリズムによって、21 個のクラスタを同定した。次に、クラスタごとの遺伝子発現を計算し、細胞マーカーに基づいて細胞種を決定した。さらに、細胞間のシグナル伝達のメカニズムを解明するために細胞間相互作用解析を行い、CXCL に関するシグナル伝達パスウェイを推定した。

その結果、CXCL12 が健常なマウスと比べて、円形脱毛症のモデルマウスの線維芽細胞のクラスタで強く発現しており、CXCL のシグナル伝達パスウェイも働いていることを推定した。一方、円形脱毛症のモデルマウスでは炎症に関連する遺伝子の発現が見られたが、CXCL12 の抗体の投与によりそれらの発現が抑制されることを確認した。

以下に、An らの関連研究における課題を述べる。An らの研究では、細胞間相互作用の解析において、クラスタリングと既知のマーカー遺伝子を基に細胞種を特定し、リガンド-レセプターペアを推定する手法が採用されている。この手法では、既知のリガンド-レセプターデータベースを活用することで細胞間相互作用の推定が可能となり、炎症作用についての結果を得ている。しかし、この手法にはいくつか課題が残っている。具体的には、異なる条件間でのリガンド-レセプターペアの発現差を統計検定により比較することが難しく、疾患特有の相互作用を明確に抽出することが困難である。また、疾患において

て特に重要なリガンド-レセプターペアを統計的な有意性により特定する方法も必要である。

### 3.3 本研究の目的

本研究の目的は、従来の細胞間相互作用解析手法の課題を克服し、脱毛症に関連する新たな知見を提供することである。具体的には、まず複数の条件（脱毛症患者と健常者）間でのリガンド-レセプターペアの発現差を統計的に比較する手法を導入する。An らの関連研究では、発現差の視覚的な比較が主に行われており、条件間での統計的有意性を判別する難しさが課題として残っていた。この課題に対しては、いくつかのアプローチが考えられる。例えば、ネットワーク解析を用いて疾患特有の相互作用を抽出する方法が挙げられるが、これは広範なデータパターンの識別に優れている一方で、統計的な有意性の評価においては課題が残ることがある。本研究では、Wald 検定を用いてリガンド-レセプターペアの発現差を統計的に評価し、微細な差異も明確に検出できる手法を採用することで、この課題を解決する。

また、検出したリガンド-レセプターペアの中で、特に疾患にとって重要なペアを特定することが難しいという課題に対しては、脱毛症患者で頻繁に相互作用するターゲット細胞に注目し、そのリガンド-レセプターペアの発現差を解析することで、脱毛症の病因における重要な細胞間相互作用を明らかにすることを目指す。これにより、個々のリガンド-レセプターペアの評価にとどまらず、病理の核心に迫る新たな視点を得ることが期待される。本研究では、脱毛症患者および健常者のヒト毛包組織由来のシングルセル RNA-seq データを活用して、脱毛症特異的なリガンド-レセプターペアを検出することを目指す。

### 3.4 使用したデータセット

脱毛症患者および健常者の毛包における細胞間相互作用を明らかにするため、シングルセル RNA-seq 解析を行った。脱毛症の解析には、Ober-Reynolds らが取得したシングルセル RNA-seq データセット (GSE212450) を用いた [49]。このデータセットには、ヒト頭皮組織サンプル (4mm パンチにより局所的に区画された領域から得られた生検) から得られたシングルセル RNA-seq の結果が含まれており、脱毛症患者 (AA, n = 5)、健常な対照ボランティア (C\_PB, n = 3)、および手術による頭皮組織 (C\_SD, n = 7) のサンプルが含まれている。本研究では、健康な状態と疾患状態の両方の毛包のシングルセ

ル RNA-seq データが必要であったため、C\_PB と AA のサンプルを採用した。

### 3.5 本研究の解析手法

本研究では、ヒト毛包組織における脱毛症特異的な相互作用を明らかにするため、以下の方針で解析を行うこととした。

- ヒト毛包組織由来のシングルセル RNA-seq データに対して、品質管理、正規化およびバッチ効果処理を行い、解析の精度を向上させる。
- データに対してクラスタリング解析を実施し、得たクラスタを基に既知のマーカー遺伝子を用いて細胞種を推定する。
- 脱毛症との関連が指摘されている細胞種に対しては、サブクラスタリングを行い、亜集団を捉えることに努め、偽陰性の可能性を減らす。
- 脱毛症特異的な相互作用を検出するため、細胞種ごとに遺伝子発現を平均化し、その結果に基づいて健常者と比較した発現変動遺伝子を同定する。さらに、同定した遺伝子とリガンド - レセプターペアを組み合わせることで、相互作用を推定する。
- 推定した相互作用において、レセプターを発現する細胞種をターゲットとして、推定したペアの分布を計算する。
- 脱毛症との関連が高い相互作用を検出するため、最も頻繁に関与する細胞種をターゲットとするペアに絞り込む。

本研究の解析手法は主に 6 つのステップからなる。

ステップ 1 データセットの前処理および品質管理

ステップ 2 クラスタリング解析と細胞種の同定

ステップ 3 繊維芽細胞および T 細胞のサブタイプの同定

ステップ 4 細胞間相互作用解析によるリガンド - レセプターペアの検出

ステップ 5 細胞間相互作用解析により検出したリガンド - レセプターペアのターゲットの同定

ステップ 6 細胞種間の最も重要な相互作用の検出

以下にそれぞれのステップの詳細について説明する。

## データセットの前処理および品質管理

C\_PB および AA のデータセットを、各細胞に元のサンプル情報をメタデータとして保持した状態で統合した。データの品質管理指標として、ミトコンドリア遺伝子の発現割合を算出し、フィルタリング基準に基づいて低品質な細胞を除去した。具体的には、遺伝子数が 200 以上 4000 未満であり、かつミトコンドリア遺伝子の割合が 10 %未満の細胞のみを残すようフィルタリングを実施した。この処理により、異常な発現量や高いミトコンドリア由来遺伝子の割合を持つ細胞が除外され、解析の精度が向上した。次に、細胞ごとの発現量の差を補正した。具体的には、各細胞の発現量をその細胞の総発現量で割り、スケーリングファクターを掛けた後に対数値に変換した。各遺伝子の発現量の対数値から全細胞における平均値を引き、その値を標準偏差で割ることで Z スコアに変換した。この Z スコアにより、異なる遺伝子間の発現値を比較しやすくし、解析の精度をさらに向上させた。主成分分析 (PCA) を用いてデータの次元を削減し、最適な次元数を決定するためにエルボープロットを作成した。続いて、UMAP を使用して低次元空間でのデータの可視化を行い、サンプルや病態による群間の違いを観察した。さらに、異なるサンプル間でのバッチ効果を統計的に補正し、サンプル間の異なる表現がより明確になった。

## クラスタリング解析と細胞種の同定

前処理を行ったデータに対して、Louvain アルゴリズムを用いて細胞のクラスタを特定した。得られたクラスタは、先行研究 [49] にあるマーカー遺伝子の発現レベルに基づいて細胞種を同定した。具体的には、線維芽細胞のマーカーとして *COL1A1*、*COL1A2*、*THY1* を、T 細胞のマーカーとして *CD3D*、内皮細胞のマーカーとして *SELE*、*VWF*、*PECAM1*、*CD200*、角化細胞のマーカーとして *KRT10*、*KRT14*、リンパ系細胞のマーカーとして *VWF*、*PECAM1*、肥満細胞のマーカーとして *TPSB2*、色素細胞のマーカーとして *MLANA*、筋細胞のマーカーとして *MYL9*、*TPM1*、*TAGLN*、骨髄系細胞のマーカーとして *CLEC9A*、*CD79A*、*CD14* を使用した。

## 線維芽細胞および T 細胞のサブタイプの同定

線維芽細胞および T 細胞からサブタイプを同定するために、再度クラスタリング解析を行った。線維芽細胞は、毛乳頭細胞の上位分類にあたる。また、T 細胞は自己免疫疾患である円形脱毛症において重要な役割を果たす細胞である。線維芽細胞クラスタのサブク

ラスタリングを行い、毛乳頭細胞および真皮鞘（毛乳頭細胞の前駆細胞）をサブタイプとして同定した。さらに、T 細胞クラスタのサブクラスタリングを行い、次の 5 つのサブクラスタを特定した：ナイーブ T 細胞、中心記憶 T 細胞 (TCM)、エフェクターメモリー T 細胞 (TEM)、末梢性エフェクターメモリー T 細胞 (TEMRA)、および制御性 T 細胞 (Treg)。サブクラスタの注釈は、既知のマーカー遺伝子を用いて行った [49, 50]。具体的には、毛乳頭細胞細胞に対しては *WNT5A*、*PTCH1*、*HHIP*、毛乳頭細胞の前駆細胞である真皮鞘に対しては *SOX2*、*EDNRA*、*NCAM1*、ナイーブ T 細胞に対しては *PTPRC*、TCM に対しては *CCR7*、TEM に対しては *GZMA*、TEMRA に対しては *CST7*、Treg に対しては *FOXP3* がマーカー遺伝子として使用した。

#### 細胞間相互作用解析によるリガンド – レセプターペアの検出

脱毛症に関連する細胞種やシグナルを特定するため、クラスタリング解析によって得られた細胞群間の細胞間相互作用解析を実施した。具体的には、まず個々の細胞から得られた発現データを細胞種ごとに集計し、平均値を算出して疑似バルクを作成した。その後、疑似バルクに対して AA と C\_PB の間で発現変動遺伝子解析を実施し、条件間での遺伝子発現の差異を統計量として検出した。各細胞種に対する遺伝子の統計量とリガンド – レセプターペアのデータベースを組み合わせることにより、AA 特異的なリガンド – レセプターペアを同定した。その後、調整された *p* 値が 0.05 未満のリガンド – レセプターペアを、AA に関連する統計的に有意な相互作用として定義した。本手法は、疑似バルクレベルでの発現変動遺伝子解析により、条件特異的な細胞間相互作用の検出を可能としている点が、An らの関連研究で使用された従来手法と比べて優れている。

#### 細胞間相互作用解析により検出したリガンド – レセプターペアのターゲットの同定

このステップでは、脱毛症患者で頻繁に相互作用するターゲット細胞に注目することで、脱毛症の病因において重要な役割を果たす細胞種を同定した。具体的には、3.5 節の「細胞間相互作用解析によるリガンド – レセプターペアの検出」にて検出したリガンド – レセプターペアに対して、リガンドを発現する細胞種をソース、レセプターを発現する細胞種をターゲットとして、推定したペアの分布を計算した。

## 細胞種間の最も重要な相互作用の検出

このステップの目的は、脱毛症において重要な役割を果たす可能性が高い細胞間相互作用を明確にすることである。

具体的には、3.5 節の「細胞間相互作用解析により検出したリガンド - レセプターペアのターゲットの同定」において重要なターゲット細胞として特定した細胞に特異的に関与するリガンド - レセプターペアを抽出し、それらを Wald 統計量に基づいて順位付けした。

## 使用したソフトウェア

シングルセル RNA-seq データの前処理とクラスタリング解析には Seurat 4.3 を使用した [51]。サンプル間でのバッチ効果の除去には Harmony 1.0 を用いた [52]。細胞間相互作用の解析には、LIANA+ 法を採用し、複数のリソースを統合したデータベースである ConsensusDB を使用した [53]。

### 3.6 本研究の解析結果

#### クラスタリング解析と細胞種の同定の結果

クラスタリングの結果、24 の異なるクラスタを同定した（図 3.1）。マーカー遺伝子の発現量に基づいて細胞種を同定した結果、9 つの細胞種をクラスタに割り当てた（図 3.2）。具体的には、線維芽細胞（Fibroblasts）、T 細胞（T cells）、角化細胞（Keratinocytes）、筋細胞（Muscle）、肥満細胞（Mastcells）、骨髓系細胞（Myeloid）、リンパ系細胞（Lymphatic）、内皮細胞（Endothelial）、色素細胞（Melanocytes）をそれぞれ割り当てた。

#### 繊維芽細胞および T 細胞のサブタイプの同定の結果

クラスタ 1、3、および 15 では、線維芽細胞のマーカー遺伝子が高発現を示した（図 3.3）。その後のサブクラスタリングにより、毛乳頭細胞および真皮鞘を含む 10 の異なるサブクラスタを特定した。（図 3.5）。サブクラスタ 4 および 6 では、それぞれ真皮鞘および毛乳頭細胞のマーカー遺伝子が高発現を示した（図 3.6）。クラスタ 0、2、および 9 では、T 細胞のマーカー遺伝子が高発現を示した（fig:featureplot:tcell）。その後のサブクラスタリングにより、T 細胞サブタイプを含む 13 の異なるサブクラスタを特定した。（図 3.7）。T 細胞クラスタのサブクラスタリングにより、ナイーブ T 細胞、TCM、TEM、

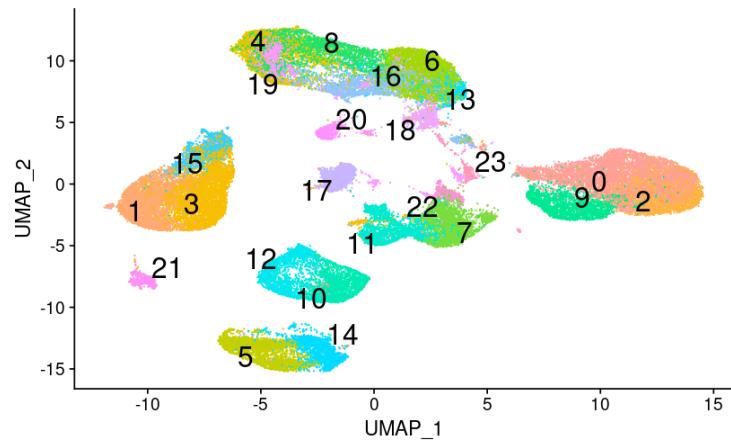


図 3.1 毛包におけるすべての細胞の UMAP 図

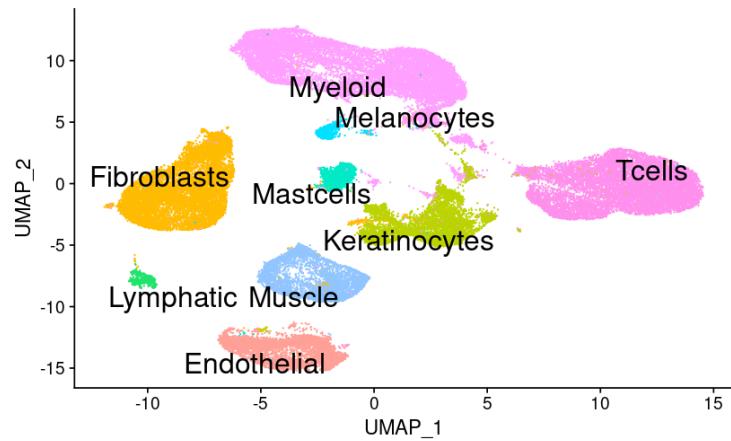


図 3.2 毛包における細胞種の UMAP 図

TEMRA、Treg などのサブタイプを含むサブクラスタを特定した。(図 3.8)。図 3.9 に最終的な全細胞種の UMAP 図を示す。

### 細胞間相互作用解析の結果

C\_PB と比較して、AA に関する 46 種類のリガンド - レセプターペアを検出した。これらのペアのうち、毛乳頭細胞をターゲットとするペアのソースとして 14、リンパ系細胞が 9、ナイーブ T 細胞が 8、内皮細胞が 6、骨髄細胞が 4、角化細胞が 2、筋細胞、他の線維芽細胞、そして TEM をそれぞれ 1 ずつ検出した。毛乳頭細胞をターゲットとするリガンド - レセプターペアが最も多かったため、それらを Wald 統計量に基づいて順位付けした。毛乳頭細胞をターゲットとしたリガンド - レセプターペアを表 3.1 に示す。ソース

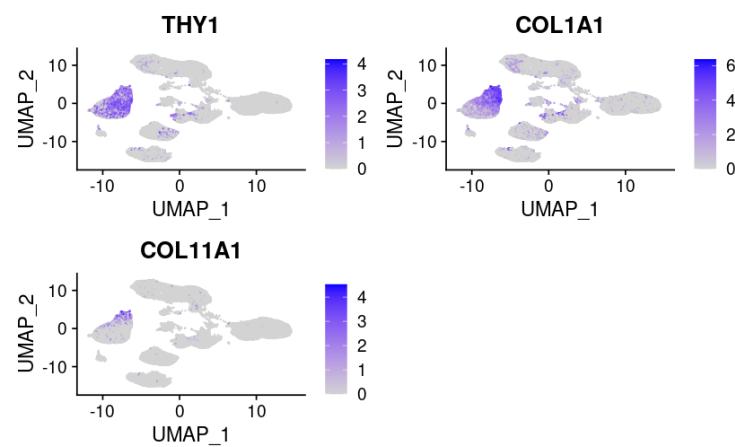


図 3.3 毛包における線維芽細胞のマーカー遺伝子の発現

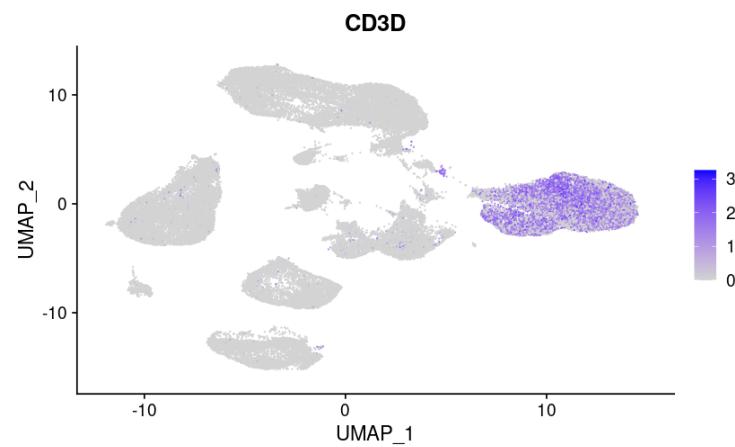


図 3.4 毛包における T 細胞のマーカー遺伝子の発現

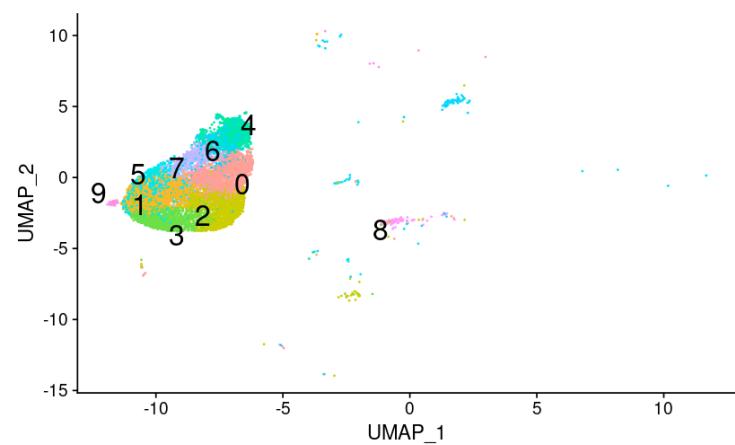


図 3.5 毛包における線維芽細胞サブクラスタの UMAP 図

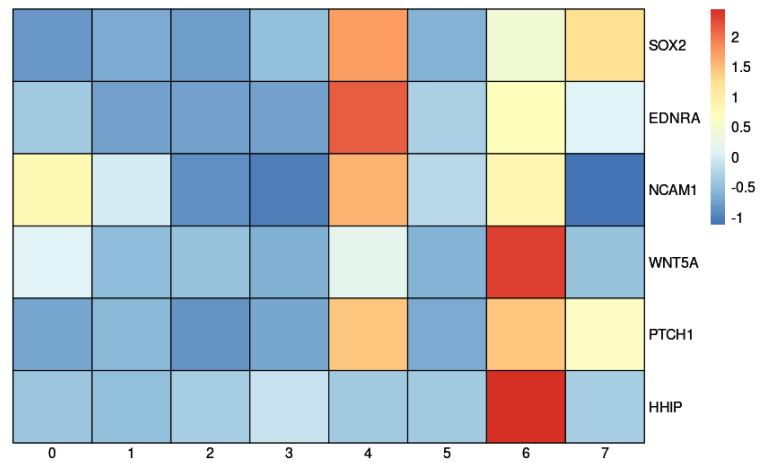


図 3.6 毛包における線維芽細胞サブクラスタにおけるマーカー遺伝子の発現ヒートマップ

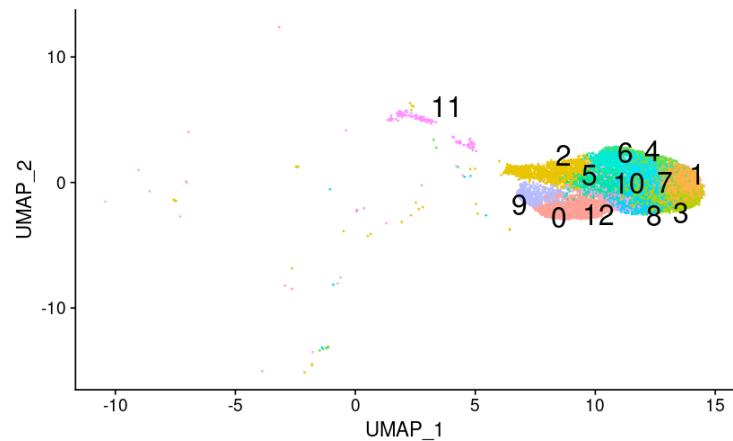


図 3.7 毛包における T 細胞サブクラスタの UMAP 図

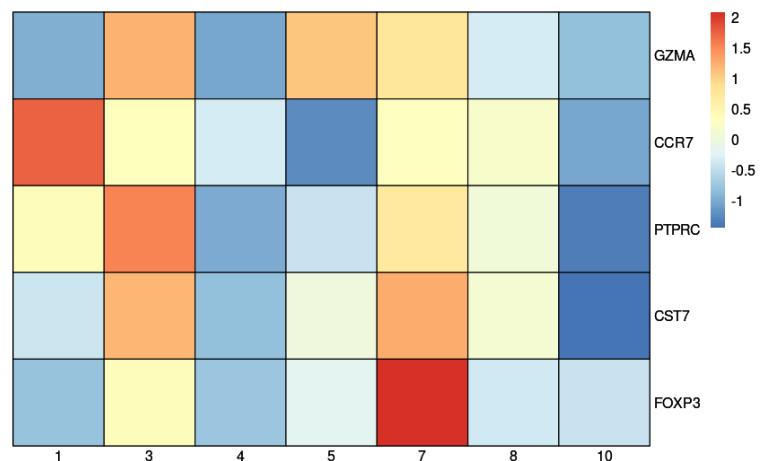


図 3.8 毛包における T 細胞サブクラスタにおけるマーカー遺伝子の発現ヒートマップ

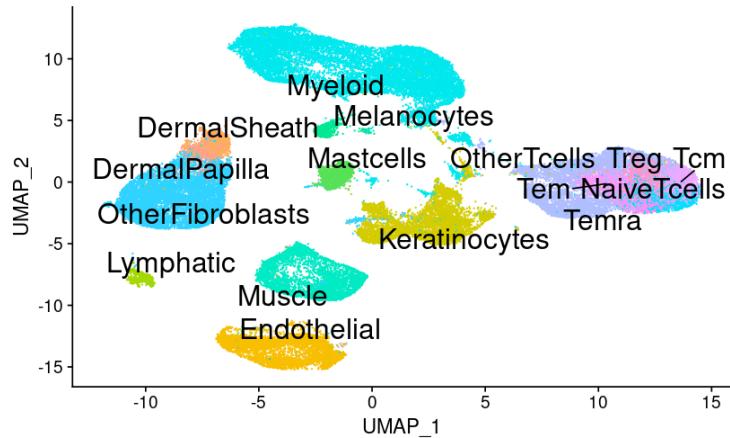


図 3.9 毛包におけるすべての細胞種の UMAP 図

が異なるがリガンドおよびレセプターが同一であるペアを除外すると、重複を除いたペアは 11 種類だった。

一方、An らの関連研究 [45] にて使用された従来法を用いて解析したところ、AA でのみ検出できた毛乳頭細胞をターゲットとするペアは、229 種類だった。また、ソースが異なるがリガンドおよびレセプターが同一であるペアを除外すると、重複を除いたペアは 64 種類だった。

### 3.7 本研究の考察

本研究では、ヒト毛包における細胞間相互作用を解析し、脱毛症患者において最も頻繁に相互作用する細胞種と、それに関連する特異的なリガンド - レセプターペアを明らかにすることを目的とした。具体的には、リガンド - レセプターペアの発現差を検出し、統計的に比較するために、Wald 検定に基づく統計量を用いた順位付け法を導入した [53]。また、検出したペアの中から、最も頻繁に相互作用する細胞種をターゲットに絞り込むことで、脱毛症にとって重要な細胞種との相互作用を特定することを目指した。

本研究の解析結果から、円形脱毛症における細胞間相互作用のターゲットとして、最も頻繁に関与している細胞種は毛乳頭細胞であることが明らかになった。円形脱毛症は、毛包および毛乳頭の萎縮や縮小、リンパ球の浸潤を特徴とする自己免疫疾患であり [54]、免疫細胞の攻撃によって毛包内で炎症が生じる。その結果、ヘアサイクルの成長期が短縮し、毛包が退行期へ移行することが知られている [55]。このことから、毛乳頭細胞が免疫細胞による攻撃の標的となる可能性を示した。

表 3.1 脱毛症患者における細胞間相互作用解析で検出した毛乳頭細胞をターゲット細胞とする相互作用

リガンド	レセプター	ソース	統計量	調整済み p 値
<i>CXCL12</i>	<i>AVPR1A</i>	毛乳頭細胞	5.24	5.42E-15
<i>CXCL12</i>	<i>AVPR1A</i>	真皮鞘	3.99	7.49E-07
<i>CXCL12</i>	<i>SDC4</i>	毛乳頭細胞	3.84	5.42E-15
<i>TGFB3</i>	<i>ENG</i>	内皮細胞	3.31	4.56E-05
<i>TNFSF13B</i>	<i>CD40</i>	角化細胞	2.75	4.27E-03
<i>CXCL12</i>	<i>SDC4</i>	真皮鞘	2.60	7.49E-07
<i>DLL1</i>	<i>NOTCH3</i>	内皮細胞	2.49	2.62E-03
<i>ADM</i>	<i>CALCRL</i>	リンパ系細胞	2.46	3.98E-02
<i>CCL5</i>	<i>SDC4</i>	TEM	2.00	2.20E-04
<i>ADM</i>	<i>RAMP2</i>	リンパ系細胞	1.99	3.98E-02
<i>BGN</i>	<i>LY96</i>	骨髄系細胞	1.96	7.48E-03
<i>FSTL1</i>	<i>DIP2A</i>	内皮細胞	1.62	3.59E-02
<i>ADAM12</i>	<i>SDC4</i>	真皮鞘	1.52	6.21E-03
<i>CCL5</i>	<i>SDC4</i>	TEMRA	1.37	1.11E-02

本研究において、円形脱毛症に関連する 14 のリガンド - レセプターペアを検出した。このうち、3 つのペアのソース細胞は真皮鞘または内皮細胞、2 つは毛乳頭細胞またはリンパ系細胞であった。また、残りはそれぞれ角化細胞、骨髄系細胞、TEM、TEMRA をソースとしていた。一方で、T 細胞サブタイプのうち、Treg、ナイーブ T 細胞、または TCM 由来のリガンド - レセプターペアは検出できなかった。Treg 細胞は免疫応答の調整および自己免疫反応の抑制に重要な役割を果たしている [56]。円形脱毛症患者では Treg の機能が低下または欠如していることが報告されており、これにより過剰な自己免疫反応が誘発され、毛包への攻撃が生じる可能性があると考えられている。Nour らの研究によると、脱毛症モデルマウスの皮膚内で Treg が増加すると、毛髪の再生が促進され、炎症経路が抑制されることが確認されている [57]。さらに、円形脱毛症患者においては、他の T 細胞サブタイプに比べて Treg 細胞の割合が低く、血清中の炎症性サイトカインである IL-17 が増加する一方、Treg が産生する抗炎症性サイトカインである IL-12 や IL-35 が減少することも報告されている [58]。本研究で Treg 由来のリガンド - レセプターペアが検

出できなかったのは、円形脱毛症における他の T 細胞からの炎症シグナルの増加によつて、Treg 由来のシグナルが相対的に減少した可能性が考えられる。

円形脱毛症に関連する相互作用のうち、リガンドとして CXCL12 を持つペアを 4 つ検出した。C-X-C モチーフケモカインリガンド 12 (CXCL12) は免疫誘引因子として知られるケモカインである。CXCL12 は 3.2 節で述べた関連研究で円形脱毛症を引き起こす因子として着目されており、この結果は関連研究の結果と整合している。

本研究で同定した CCL5 と SDC4 のリガンド - レセプターペアについて、円形脱毛症に関する既報は見当たらない。しかし、CCL5 は IFN- $\gamma$  誘導性ケモカインの一つであり、IFN- $\gamma$  誘導性ケモカインは、T 細胞や NK 細胞を炎症部位に誘引する働きがある [59]。そのため CCL5 が毛乳頭細胞に作用することで、他の T 細胞を誘引し、過剰な自己免疫反応を引き起こす可能性がある。また、SDC4 は細胞外マトリックスと関連する分子で、免疫細胞の誘引や細胞間のシグナル伝達に関与していることが知られている [60, 61]。したがって、CCL5 と SDC4 の相互作用を介して、免疫細胞の集積や炎症反応の調節が円形脱毛症の発症や進行に影響を与えると考えられる。

本研究は、ヒト毛包における細胞間相互作用を解析し、円形脱毛症患者特有の相互作用と関与するリガンド - レセプターペアを特定した。本研究の成果は、円形脱毛症の病態における新たな分子メカニズムを解明する上で重要な意義を持つ。具体的には、毛乳頭細胞が免疫細胞の攻撃の影響を受けて炎症反応の中心となる可能性を示し、CCL5 と SDC4 の相互作用というこれまで円形脱毛症において十分に明らかにされてこなかったリガンド - レセプターペアが病態に関与していることを示した。これにより、円形脱毛症における免疫細胞の誘引や炎症反応のメカニズムに新たな視点が加わり、疾患の進行に対する理解が深まった。さらに、Treg 細胞由来のシグナルが健常者と比較して相対的に減少している可能性を示したことは、円形脱毛症の免疫応答における異常を解明する上で重要な知見であり、免疫応答の調節が乱れることで過剰な自己免疫反応が引き起こされる一因であることが明らかになった。

### 3.8 結言

本研究では、シングルセル RNA-seq を活用した細胞間相互作用解析において、頻繁に相互作用するターゲット細胞を考慮し、複数の条件間でのリガンド - レセプターペアの発現差を統計的に比較する手法を提案した。これにより、従来の研究とは異なり、脱毛症特異的な相互作用を網羅的に検出し、特に重要な細胞種をターゲットとする相互作用を推定

することができた。具体的には、ヒト毛包シングルセル RNA-seq を用いて脱毛症患者において最も頻繁に相互作用する細胞種を特定し、その後、脱毛症患者特異的なリガンド – レセプターペアを推定した。本解析手法によって、脱毛症特異的な相互作用に関与する細胞種が毛乳頭細胞であることを特定し、その毛乳頭細胞をターゲットとするリガンド – レセプターペアを複数推定することができた。毛の脱落は複数の細胞種間での相互作用によって制御されているため、脱毛症特異的な相互作用を網羅的に検出できたことは重要な成果である。本研究によって得られた知見は、脱毛症の病態に関する細胞間相互作用の全体像を明確にし、今後の研究において疾患の分子メカニズムを深く理解するための基盤を提供する。特に、免疫細胞と毛乳頭細胞との相互作用や新たに同定したリガンド – レセプターペアが、炎症反応や免疫応答の調節に重要な役割を果たすことが明らかとなり、これらの相互作用が脱毛症の発症や進行に深く関与している可能性を示した。これにより、CXCL12、CCL5、SDC4 などの分子が新たな治療標的として注目を集め、免疫細胞の誘引や炎症反応の調節を通じて治療戦略の実現が進むと考えられる。また、Treg 細胞の機能低下に関連する免疫応答の調整異常が、円形脱毛症の治療法に新たな視点を提供する可能性がある。複数の細胞種間の相互作用を包括的に把握することで、新たな治療標的や治療戦略の発見に貢献する可能性があり、毛の脱落メカニズムの解明に向けた重要な一步となると考えられる。

## 第4章 皮膚組織内のT細胞の脱毛症での遺伝子発現変化の解析

### 4.1 緒言

第3章では、毛乳頭細胞と毛包内外の他の細胞との相互作用を通じて、毛の脱落メカニズムに関する知見を得ることを目指した。本章では、前章で得たリガンド-レセプターペアのソース細胞であるT細胞の分化に着目する。

円形脱毛症は、免疫細胞であるT細胞が毛包内で炎症を誘発する疾患であり、その炎症過程を解明することは、疾患メカニズムを理解する上で極めて重要である。特に、T細胞の細胞系譜と各サブタイプの役割についての詳細な議論は十分に進んでおらず、さらなる研究が必要である。

T細胞の細胞系譜を解明することは、毛の脱落メカニズムを理解するための重要な知見を提供するとともに、円形脱毛症における炎症反応や細胞間相互作用の背後にある生物学的プロセスを明らかにする可能性がある。このような知見は、疾患メカニズムの解明だけでなく、将来的な治療法の開発にも貢献することが期待される。

本章では、円形脱毛症患者および健常者の皮膚組織由来のシングルセルRNA-seqデータを使用して解析を行う。第3章では、毛乳頭細胞と毛包内外の他の細胞との相互作用を評価するため、毛包組織のデータセットを用いた。一方、本章では、毛乳頭細胞と相互作用を確認したT細胞の分化を評価するため、T細胞が基本的に毛包外の皮膚組織内に存在することを踏まえ、皮膚組織のデータセットを使用する。これらの解析では、従来の細胞系譜解析に加えて、細胞間相互作用解析を組み合わせることで、脱毛症のメカニズムをより深く理解することを目指す。細胞系譜解析では、細胞を疑似時間軸に沿って並べ、分化過程を推定する。ここで言う疑似時間軸とは、細胞の分化状態に基づいて、細胞がどの段階にあるかを推定するための仮想的な時間軸を指す。これは、実際の時間を基にしたものではなく、細胞間の遺伝子発現パターンの変化を元にした、分化過程を追跡するための順序付けを意味する[62]。疑似時間軸に沿った細胞の順序付けにより、各細胞がどの段階に位置するかを推定し、分化経路を追跡することが可能となる。さらに、細胞系譜の分化過程における遺伝子発現の動態を調べ、脱毛症特異的なT細胞サブタイプの遺伝子発現の変化を明らかにする。

## 4.2 関連研究

Lee らの研究 [63] は、脱毛症患者の皮膚における T 細胞の細胞系譜解析を行っており、本研究と同様に T 細胞の細胞系譜に着目した点で関連が深いため、この研究について述べる。目的、解析手法、得られた結果、課題について説明する。

Lee らの研究では、円形脱毛症 (AA) の免疫病理学的メカニズムを解明することを目指している。AA は自己免疫疾患で、免疫細胞が毛包を攻撃することによって、瘢痕を伴わない脱毛が引き起こされるが、疾患のメカニズムは十分に解明されていない。この研究では、ヒトの AA 頭皮生検を用いて、AA における免疫細胞の異質性をシングルセル RNA-seq 通じて解析し、特に T 細胞の役割に焦点を当てている。目的は、AA における T 細胞の異質性を理解し、疾患の進行におけるその機能的役割を明確にすることである。

以下では、Lee らの解析手法について説明する。解析手法は主に以下の 4 つのステップからなる。

- (ステップ 1) データセットの前処理および品質管理
- (ステップ 2) クラスタリング解析と細胞種の同定
- (ステップ 3) T 細胞のサブタイプの同定
- (ステップ 4) 細胞系譜解析による T 細胞の分化の推定

以下でそれぞれのステップについて詳細な実験手法を説明する。

(ステップ 1) データセットの前処理および品質管理  
脱毛症患者および健常者の毛包における T 細胞の分化および特異的に発現する遺伝子を明らかにするため、シングルセル RNA-seq 解析を実施した。ヒト皮膚組織サンプルを採取し、シングルセル RNA-seq を行ったことで、データセットを得ることができた。データセットには、脱毛症患者 (AA, n = 5) と健康な対照ボランティア (CTRL, n = 2) のサンプルが含まれている。データセットの品質管理では、ミトコンドリア遺伝子の含量が 10 %以上、または UMI カウントが 200 未満または 4000 を超える細胞を低品質とみなし、これらの細胞を除去した。品質管理後、サンプル間のデータを統合し、正規化を行った。

(ステップ 2) クラスタリング解析と細胞種の同定  
前処理を行ったデータに対して、Louvain アルゴリズムを用いて細胞のクラスタを特定した。各クラスタの細胞種は、T 細胞などの代表的なマーカー遺伝子の発現や、他のクラスタと比較して発現が上位の遺伝子および細胞種の遺伝子発現プロファイルデータベースを参照して推定した。

- (ステップ 3) T 細胞のサブセットの同定  
T 細胞サブセットの同定は、文献で確立され

た代表的なマーカーを基に行った。ヒトの T 細胞およびそのサブセットは、マウス遺伝子のヒトホモログを用いて同定した。

(ステップ 4) 細胞系譜解析による T 細胞の分化の推定シングルセル RNA-seq から得た遺伝子発現データを準備し、細胞ごとの遺伝子発現マトリックスを作成する。次に、細胞間で発現変動が大きい遺伝子を選定し、その遺伝子群に基づいて次元削減を行う。次元削減により、細胞の関係性を可視化し、細胞を疑似時間軸に沿って並べ、分化過程を推定する。

以下では、Lee らの解析結果について説明する。クラスタリングおよび細胞種の同定の結果、16 の異なる細胞種を同定した。また、各細胞種のマーカー遺伝子および細胞種特異的な遺伝子の発現を明らかにした。また、T 細胞サブセットを推定し、免疫細胞全体に占めるサブセットの頻度を評価した結果、CTRL と比べて AA では CD8+T 細胞、CD4+Treg、NK T 細胞、および  $\gamma\delta$ T 細胞の頻度が有意に増加した。T 細胞サブセットのうち、CD8+T 細胞を系譜解析した結果、明確なサブセットではなく、エフェクター性を持つ転写的な連続体を形成する、相互に関連した細胞状態で構成されていることが示唆された。この成果は、脱毛症患者の T 細胞の多様性を示しており、重要な知見を提供している。

こうした成果を踏まえ、細胞系譜解析に加えて細胞間相互作用解析を組み合わせることで、脱毛症のメカニズムをより詳細に明らかにすることが期待される。Lee らの研究が T 細胞の多様性に焦点を当てたのに対し、Lee らの研究の課題として、どの T 細胞がどの遺伝子を介して脱毛症と強く関連するのかを特定することが重要である。

本研究では、ヒト皮膚由来のシングルセル RNA シーケンスデータを用いてクラスタリングと細胞系譜解析を実施し、幹細胞性を持つナイーブ T 細胞から他の T 細胞への分化系譜を推定し、系譜に沿って発現変動する遺伝子を検出することで、脱毛症と強く関連する遺伝子を特定することを目指す。

### 4.3 本研究の目的

本研究の目的は、細胞系譜解析を通じて T 細胞の分化状態および特異的に発現する遺伝子を明らかにし、脱毛症に関連する新たな知見を提供することにある。具体的には、クラスタリングにより T 細胞サブタイプを同定した後、T 細胞サブタイプに対して細胞系譜解析を実施し、脱毛症患者および健常者における T 細胞の分化過程を解明する。さらに、それぞれの系譜に対し差異解析を行い、脱毛症患者で特異的に発現する遺伝子を検出する。最終的に、第 3 章で得た細胞間相互作用解析の結果から、T 細胞をリガンド、毛乳

頭細胞をターゲットとするリガンド–レセプターペアのリガンドが、系譜に対する差異解析で得られた発現差遺伝子と一致するかどうかを評価する。このような複合的な解析により、脱毛症における T 細胞の分化に関する理解が進み、病態に関わる遺伝子およびシグナルの同定に貢献することが期待される。

#### 4.4 使用したデータセット

脱毛症患者および健常者の毛包における T 細胞の分化および特異的に発現する遺伝子を明らかにするため、シングルセル RNA-seq 解析を行った。脱毛症の解析には、Lee らが取得したシングルセル RNA-seq データセット (GSE233906) を用いた [63]。このデータセットには、ヒト皮膚組織サンプルから得られたシングルセル RNA-seq の結果が含まれており、脱毛症患者 (AA, n = 5)、健康な対照ボランティア (CTRL, n = 2) のサンプルが含まれている。

#### 4.5 本研究の解析手法

本研究の解析手法は主に 4 つのステップからなる。

ステップ 1 データセットの前処理および品質管理

ステップ 2 クラスタリング解析と細胞種の同定

ステップ 3 T 細胞のサブタイプの同定

ステップ 4 細胞系譜解析による T 細胞の分化の推定および差異解析による発現差遺伝子の検出

以下にそれぞれのステップの詳細について説明する。

##### データセットの前処理および品質管理

CTRL および AA のデータセットについて、3.5 節の「データセットの前処理および品質管理」と同様にデータを統合し、品質管理、発現量の補正、次元削減および可視化、バッチ効果の補正を行った。具体的な手法や基準については第 3 章を参照されたい。

##### クラスタリング解析と細胞種の同定

前処理を行ったデータに対して、Louvain アルゴリズムを用いて細胞のクラスタを特定した。各クラスタの細胞種を、細胞種の遺伝子発現プロファイルデータベースを参照して

推定した。

### 線維芽細胞および T 細胞サブタイプの同定

線維芽細胞および T 細胞からサブタイプを同定するために、再度クラスタリング解析を行った。線維芽細胞クラスタのサブクラスタリングを行い、毛乳頭細胞の同定を行った。また、T 細胞クラスタのサブクラスタリングを行い、次の 5 つのサブクラスタを特定した：ナイーブ T 細胞、中心記憶 T 細胞 (TCM)、エフェクターメモリー T 細胞 (TEM)、末梢性エフェクターメモリー T 細胞 (TEMRA)、および制御性 T 細胞 (Treg)。サブクラスタの注釈は、既知のマーカー遺伝子を用いて行った [49, 50]。具体的には、毛乳頭細胞に対しては *PTCH1*、ナイーブ T 細胞に対しては *TSHZ2*、TCM に対しては *PASK*、TEM に対しては *IL7R*、TEMRA に対しては *CST7*、Treg に対しては *IL2RA* をマーカー遺伝子として使用した。

### 細胞系譜解析による T 細胞の分化の推定および差異解析による発現差遺伝子の検出

原始的なナイーブ T 細胞から各 T 細胞 (TCM、TEM、TEMRA、および Treg) への分化を推定した。細胞系譜解析では、細胞種のクラスタを用いてデータの全体的な構造を明らかにし、この構造を疑似時間と呼ばれる一次元の変数で表現される滑らかな系譜に変換した。具体的には、4.5 節の「線維芽細胞および T 細胞サブタイプの同定」で得た T 細胞サブタイプのラベルを入力し、指定した始点と終点のクラスタを基に、分化軌跡に基づく最小全域木を作成した。最小全域木は、クラスタ間の類似度を基にすべてのクラスタを連結し、細胞分化の分岐構造を明確化するために用いられる。次に、最小全域木に基づいて推定した分化軌跡に沿って、主曲線をフィッティングし、系譜を平滑化した。主曲線は、データ内の連続的な変化を滑らかに捉えるためのフィッティング手法であり、系譜上の細胞位置を定量化するための基盤となる。これにより、細胞ごとの疑似時間を定義した。その後、AA と CTRL それぞれの系譜において、始点と終点の間で遺伝子発現の差を Wald 検定を用いて統計的に評価した。具体的には、系譜の始点（ナイーブ T 細胞に対応する疑似時間 0 の細胞群）と終点（分化した細胞群に対応する疑似時間最大の細胞群）の間で遺伝子発現の平均値が等しいという仮説を検証し、分化に伴う遺伝子発現の変化が統計的に有意かどうかを判断した。各系譜 (TEM、TEMRA、Treg) について、始点と終点の間で Wald 検定を実施し、統計的有意性を評価した。さらに、発現差遺伝子について、第 3 章で得られた T 細胞をリガンド、毛乳頭細胞をレセプターとするリガンド - レ

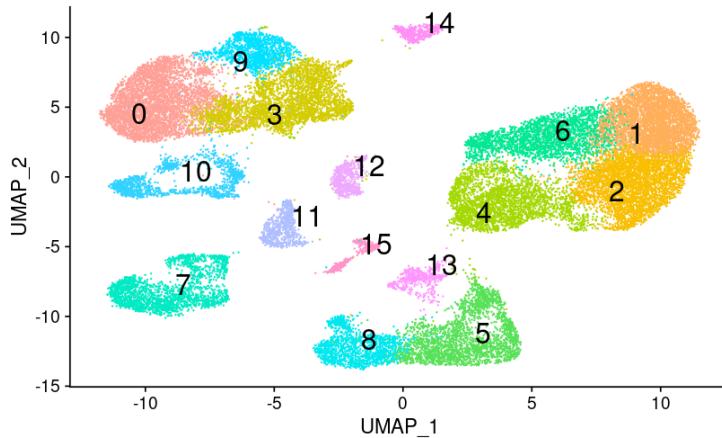


図 4.1 皮膚におけるすべての細胞の UMAP 図

セプターペアのリガンドと一致する遺伝子があるかどうかを評価した。最後に、一致した遺伝子の発現変化を疑似時間に沿ってプロットすることで、細胞分化の過程における遺伝子発現の変動を視覚化した。

### 使用したソフトウェア

シングルセル RNA-seq データの前処理とクラスタリング解析には Seurat 4.3 を使用した [51]。サンプル間でのバッチ効果の除去には Harmony 1.0 を用いた [52]。細胞種の推定には SingleR[64] および Human Primary Cell Atlas[65] を用いた。細胞系譜解析には、Slingshot2.8.0[66] および tradeSeq1.14.0[62] を用いた。系譜の差異解析には、tradeSeq1.14.0[62] を用いた。

## 4.6 本研究の解析結果

### クラスタリング解析と細胞種の同定の結果

クラスタリングの結果、16 の異なるクラスタを同定した（図 4.1）。細胞種の遺伝子発現プロファイルデータベースに基づく細胞種の同定の結果、8 つの細胞種をクラスタに割り当てた。

### 線維芽細胞および T 細胞サブタイプの同定の結果

クラスタ 2、3、および 10 では、線維芽細胞のマーカー遺伝子が高発現を示した。その後のサブクラスタリングにより、毛乳頭細胞を含む 16 の異なるサブクラスタを特定し

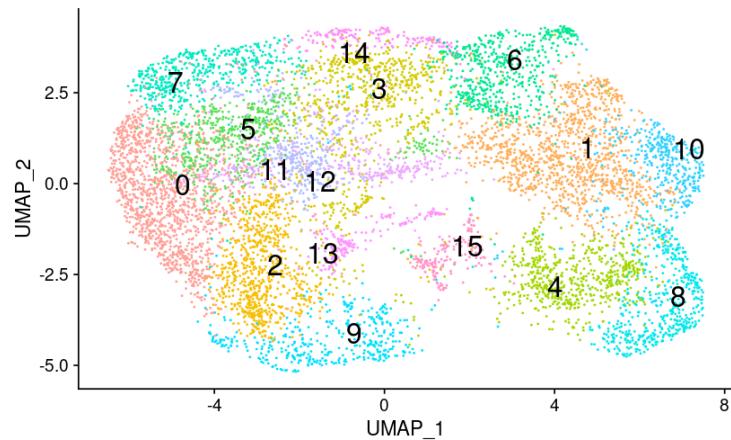


図 4.2 皮膚における線維芽細胞サブクラスタの UMAP 図

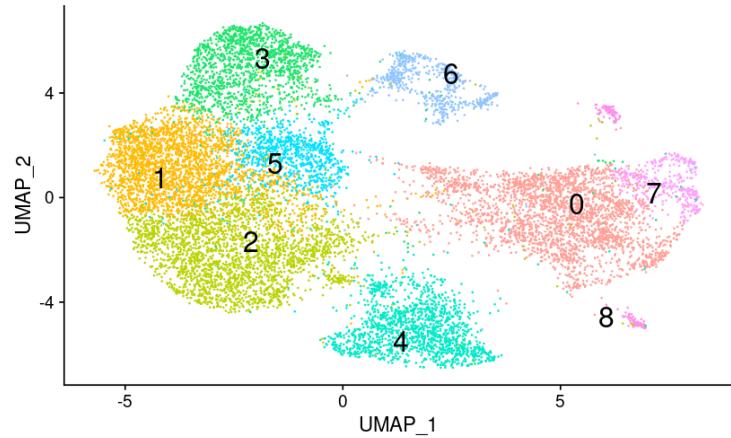


図 4.3 皮膚における T 細胞サブクラスタの UMAP 図

た（図 4.2）。サブクラスタ 8 では、毛乳頭細胞のマーカー遺伝子の高発現を示した。クラスタ 1、2、4、および 6 では、T 細胞のマーカー遺伝子が高発現を示した。その後のサブクラスタリングにより、T 細胞サブタイプを含む 9 の異なるサブクラスタを特定した（図 4.3）。T 細胞クラスタのサブクラスタリングにより、ナイーブ T 細胞、TCM、TEM、TEMRA、Treg などのサブタイプを含むサブクラスタを特定した（図 4.4）。図 4.5 に最終的な全細胞種の UMAP 図を示す。

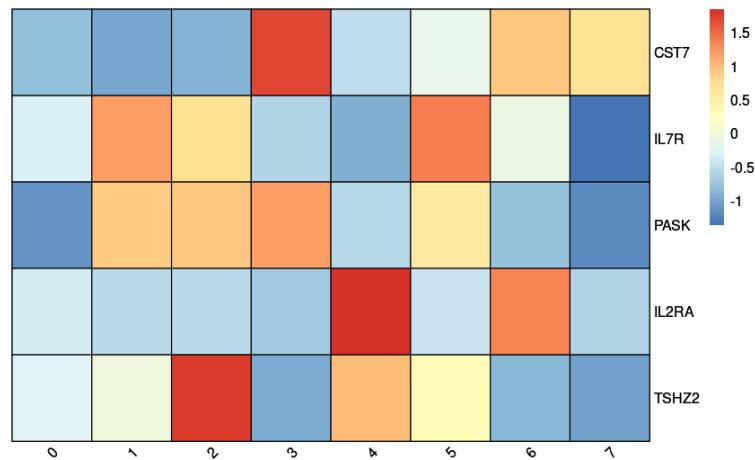


図 4.4 皮膚における T 細胞サブクラスタにおけるマーカー遺伝子の発現ヒートマップ

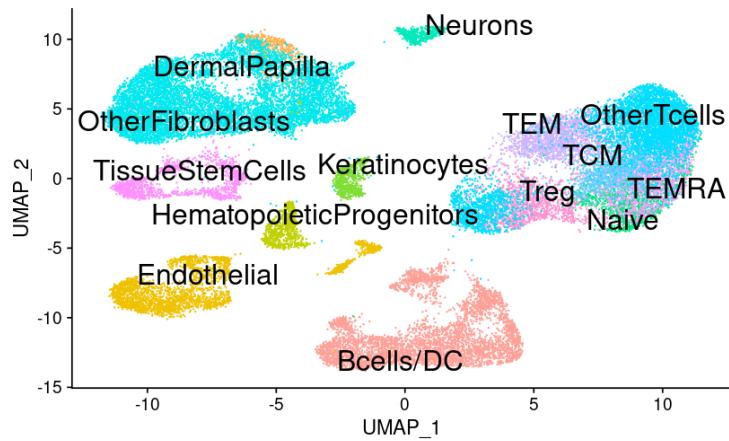


図 4.5 皮膚におけるすべての細胞種の UMAP 図

### 細胞系譜解析による T 細胞の分化の推定および差異解析による発現差遺伝子の検出の結果

T 細胞分化に関連するリガンド遺伝子を特定するために細胞系譜解析および差異解析を実施した。細胞系譜解析の結果、CTRL と AA それぞれでナイーブ T 細胞から各 T 細胞サブタイプ (TCM、TEM、TEMRA、および Treg) への分化経路を推定した。それぞれの条件で、系譜 1 (ナイーブ T 細胞から TEM)、系譜 2 (ナイーブ T 細胞から TEMRA)、および系譜 3 (ナイーブ T 細胞から Treg) を得た (図 4.6、図 4.7)。次に、差異解析により CTRL および AA それぞれの各系譜の分化過程に沿った遺伝子発現の変化を評価した結果、始点と終点とで発現差のある遺伝子を検出できた。検出した発現差遺伝子のうち、

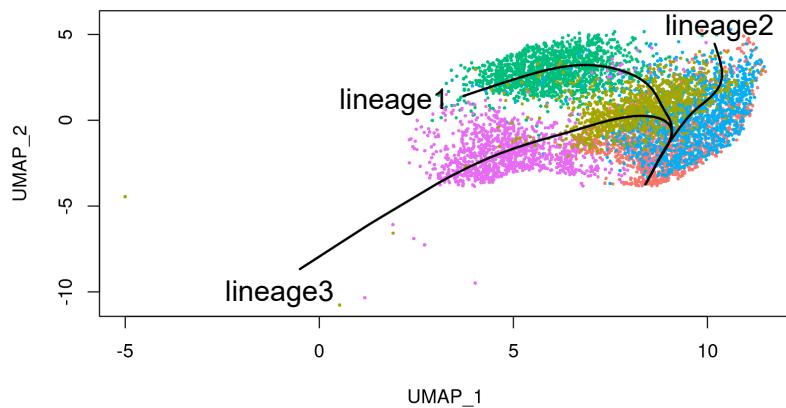


図 4.6 脱毛症患者の T 細胞サブクラスタの細胞系譜解析結果

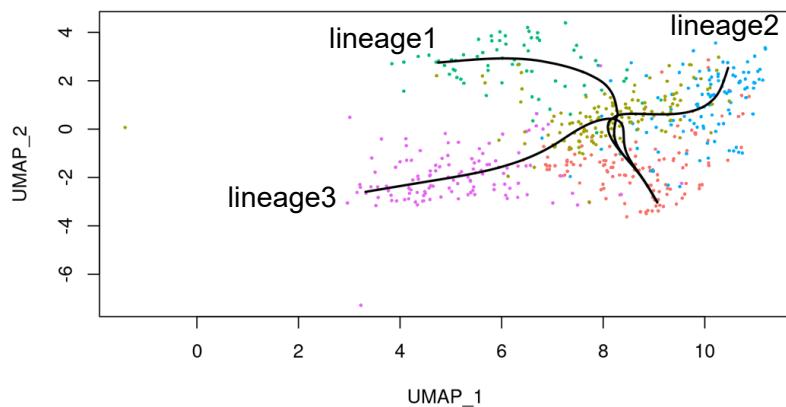


図 4.7 健常者の T 細胞サブクラスタの細胞系譜解析結果

AA の系譜 1 (ナイーブ T 細胞から TEM) において、第 3 章で推定したリガンド遺伝子に一致する遺伝子である *CCL5* を検出した (表 4.1)。AA における *CCL5* の発現変化を疑似時間に沿ってプロットした結果を 4.8 に示す。系譜 1 では疑似時間に沿って遺伝子発現が増加した一方、系譜 2 および 3 では顕著な発現変動を示さなかった。

#### 4.7 本研究の考察

本研究では、細胞系譜解析や差異解析を通じて T 細胞の分化状態および特異的に発現する遺伝子を明らかにし、脱毛症に関連する新たな知見を提供することを目的とした。具

表 4.1 脱毛症患者の系譜 1 (TEM) において、始点と比較して終点で発現差が認められた遺伝子のうち、Wald 統計量が特に大きい上位 5 遺伝子

遺伝子名	統計量	p 値
<i>NKG7</i>	405.0245	0
<i>CCL5</i>	381.4671	0
<i>CMC1</i>	254.7702	0
<i>GZMH</i>	167.8414	0
<i>GZMK</i>	155.6081	0

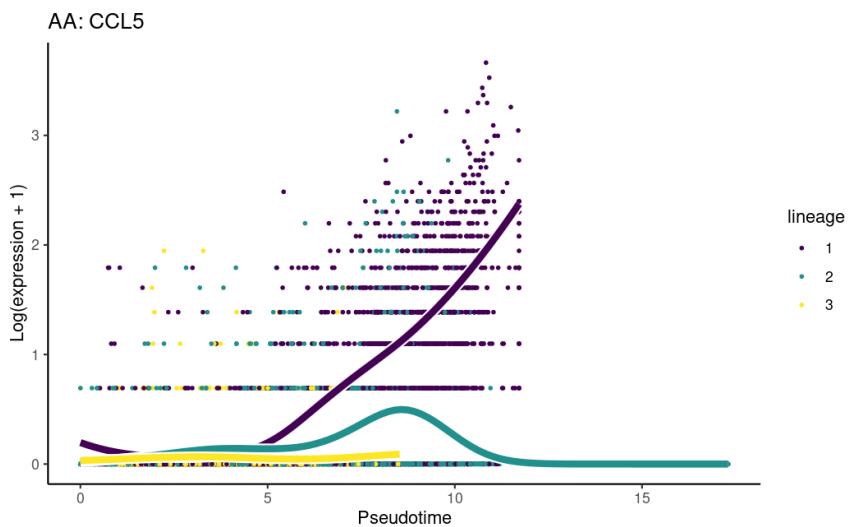


図 4.8 脱毛症患者の *CCL5* の発現量

体的には、クラスタリング解析および細胞種の同定を行い、T 細胞サブタイプを特定した後、T 細胞サブタイプに対して細胞系譜解析を実施し、脱毛症患者および健常者の T 細胞の分化過程を明らかにした。さらに、各系譜に対して差異解析を行い、脱毛症患者で特異的に発現する遺伝子を検出した。最終的に、第 3 章の細胞間相互作用解析の結果を用いて、T 細胞をリガンド、毛乳頭細胞をターゲットとするリガンド-レセプターペアのリガンドが、系譜に対する差異解析で得た発現差遺伝子と一致するかどうかを評価した。

本研究において、系譜 1 (TEM) の差異解析により、脱毛症患者において *CCL5* を有意に発現差のある遺伝子として検出した。さらに、*CCL5* は第 3 章で推定した毛乳頭細胞をターゲットとしたリガンド-レセプターペアの一部として、TEM および TEMRA のリガンドとして機能することが明らかになった。特筆すべきは、*CCL5* が脱毛症特異的な

遺伝子であるという結果が、別のデータセットを使用した第3章においても一致している点である。本解析の結果、第3章の解析結果を再現したことにより、今後の研究や臨床応用における信頼性が高まると考えられる。

本研究で検出した *CCL5* は、*CCR5* のリガンドとして知られている [67]。*CCR5* を発現した T 細胞が円形脱毛症患者の毛包周囲に浸潤することが知られているため、*CCR5* は円形脱毛症の病態に強く関与するレセプターであると考えられる [68]。さらに、*CCR5* を発現する T 細胞と *CCL5* との関係は、円形脱毛症と同様に自己免疫疾患である関節リウマチにおいても報告されている。一般的に、*CCL5* は *CCR5* を介して T 細胞を毛包に引き寄せ、その結果、局所的な炎症反応を引き起こすことが知られている [59]。そのため、*CCL5* は毛包に免疫細胞を誘引することで、毛包における炎症反応を促進し、毛包の機能の低下やヘアサイクルの乱れを引き起こす可能性がある。これまで、*CCL5* が円形脱毛症と直接関連する報告はないが、上記の考察から病態に関与する可能性が高いと考える。

以上のことから、*CCL5* は脱毛症患者の毛包における免疫応答において重要な役割を果たし、脱毛症のメカニズムに関与する可能性を示した。

#### 4.8 結言

本研究では、シングルセル RNA-seq を活用した細胞系譜解析および差異解析において、系譜の始点と終点で有意な発現差が見られる遺伝子を検出し、それが第3章で行った細胞間相互作用解析で明らかにしたリガンドと一致するかを評価した。具体的には、ヒト皮膚由来のシングルセル RNA-seq データを用いて、脱毛症患者における T 細胞サブタイプの分化系譜を特定した。その後、細胞間相互作用が認められた系譜の差分解析を行い、得られた遺伝子が T 細胞をソースとする細胞間相互作用のリガンドと一致するかを検証した。

この解析を通じて、細胞系譜解析と細胞間相互作用解析の結果が一致する遺伝子として、*CCL5* を同定することができた。この成果は、従来の細胞系譜解析ではその重要性が明らかではなかったものである。この発見は今後さらなる検証を要するが、円形脱毛症における T 細胞の分化過程およびその発現遺伝子の理解を深める重要な知見となることが期待される。

## 第5章 結論

### 5.1 毛の成長および脱落における本研究の寄与

毛は、身体の保護や感覚機能など多様な役割を果たすだけでなく、ヒトにおいては外見や心理的健康にも深く関与する重要な要素である。そのため、薄毛や脱毛症は毛の密度やボリュームの低下を引き起こし、外見に大きな変化をもたらすことで、患者の QOL や心理的健康に大きな影響を与える問題である。脱毛症は、免疫異常や遺伝的要因、環境要因が関与し、毛包機能の低下やヘアサイクルの乱れによって引き起こされる。しかし、発症メカニズムはまだ解明されていない部分が多く、予防法や診断法、治療法の開発が求められている。毛包の機能やヘアサイクルは、毛包内外の細胞間相互作用によって制御されており、特に毛乳頭細胞と他の毛包を構成する細胞との相互作用は、ヘアサイクルの各段階が円滑に進行するために重要な役割を果たしている。また、近年のシングルセル RNA シーケンシング技術の発展により、これらの細胞間相互作用を分子レベルで解析することが可能となり、新たな知見が明らかになりつつある。しかし、既存の相互作用解析手法には、複数の条件間でのリガンド-レセプターペアの発現差を検出することが難しく、さらに、検出されたペアの中から疾患にとって特に重要なものを特定することが困難であるという課題があり、今後は精度向上が一層求められる。本研究では、これらの課題を解決するために、毛包を含む微小環境における細胞間相互作用を複数の手法を統合して解析し、薄毛や脱毛症に関連する分子メカニズムの解明を目指した。特に毛乳頭細胞に着目し、これまで十分に議論されてこなかった新たな相互作用を明らかにすることで、薄毛や脱毛症の治療戦略の基盤となる知見を提供することを目的とした。

本研究の第2章では、乳酸菌とヒト毛乳頭細胞を共培養した RNA-seq データの解析を通じて、乳酸菌が毛の成長に与える影響を評価するとともに、ヒトにおける乳酸菌の影響を明らかにすることを目指した。Levkovich らの研究 [22] では、マウスの乳酸菌の摂取が毛包数や毛髪成長に関連すると報告されているが、遺伝子発現の時系列的変動やヒトでの影響については十分に評価されていなかった。本研究では、この点に着目し、ヒト毛乳頭細胞と乳酸菌との共培養を複数の時点で行い、時系列的な遺伝子発現の変動を解析した。解析手法の選定にあたり、時系列データの特徴を捉えるため、主成分分析や階層型クラスタリング解析を採用し、遺伝子発現の変動を調べた。また、発現変動遺伝子解析および Gene Ontology 解析を通じて遺伝子群の機能的特徴を評価するアプローチを取っ

た。これにより、乳酸菌の影響を総合的に解析することを目指した。解析の結果、乳酸菌との共培養により、時間経過とともに遺伝子発現に顕著な変化が見られることが明らかになった。また、マウスで毛髪成長に関与するとされる既知の遺伝子を複数検出し、これらはヒト毛乳頭細胞においても類似の挙動を示した。一方で、マウスでは報告のないヒト特有の発現変動も観察した。さらに、新たに検出した抗炎症因子の遺伝子は、乳酸菌の毛の成長作用が単一の経路に限定されないことを示唆しており、予想外の発見であった。この結果は、乳酸菌が複数の経路を通じて毛髪の成長に寄与する可能性を示しており、新規のメカニズムを明らかにした点で価値がある。これらの知見は、乳酸菌の効果をより深く理解するための基盤を提供するとともに、今後のヒトモデルを用いた検証の重要性を示している。

本研究の第3章では、脱毛症患者および健常者の毛包における細胞間相互作用を解析し、脱毛症のメカニズムに新たな知見を提供することを目的とした。Anらの関連研究[45]では、クラスタリングと既知のマーカー遺伝子発現を基に細胞種を特定し、既知のデータベースを用いて信頼性の高いリガンド-レセプターペアを推定した。しかし、この手法では、複数条件間でのリガンド-レセプターペアの発現差を統計的に比較することが難しく、また膨大なペアを検出するため、重要なペアを特定するのが困難であった。本研究では、疑似バルクデータを用いて発現変動遺伝子解析を行った結果に基づき、条件特異的なりガンド-レセプターペアを同定した。その後、最も頻出した細胞種をターゲットとするペアに絞り込む手法を提案した。結果として、円形脱毛症患者において毛乳頭細胞が最も頻繁に相互作用するターゲット細胞であることが明らかとなり、毛乳頭細胞に焦点を当てたアプローチの妥当性を確認した。これまで毛乳頭細胞は毛の成長やアンドロゲン型脱毛症において重要な役割を果たすことが知られていたが[4, 15]、円形脱毛症においても同様に中心的な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、同定したリガンド-レセプターペアの約半数が炎症シグナルに関連しており、毛乳頭細胞が炎症反応の中心となる可能性を示した。炎症シグナルを多く検出したことは、円形脱毛症が自己免疫疾患であることから予想通りの結果であったが、CCL5-SDC4というリガンド-レセプターペアの関与が明らかになることで、免疫応答のメカニズムに新たな視点が加わった。特に、CXCL12やCCL5といったケモカインによって免疫細胞が毛乳頭細胞に誘引され、毛乳頭細胞が免疫細胞の攻撃を受けて炎症反応を引き起こす可能性を示したことは、円形脱毛症の病態解明における重要な基礎情報を提供し、メカニズムの理解に貢献するものと考える。

本研究の第4章では、脱毛症患者および健常者の皮膚におけるT細胞の分化およびサブタイプに特異的に発現する遺伝子を明らかにし、脱毛症のメカニズムに新たな知見を提供することを目的とした。Leeらの関連研究[63]では、細胞系譜解析により円形脱毛症患者の皮膚内のT細胞の多様性を評価した。Leeらの成果に加え、どのT細胞がどの遺伝子を介して脱毛症と強く関連するのかを特定することが重要である。本研究では、細胞系譜解析に加えて細胞間相互作用解析を組み合わせることで、脱毛症特異的なT細胞サブタイプで発現する遺伝子の検出を行った。シングルセルRNA-seqデータを用いて細胞系譜解析を実施することでT細胞サブタイプの系譜を明らかにし、差異解析により系譜の始点と終点で発現差が有意に認められる遺伝子を特定した。さらに、それらの遺伝子が第3章で行った細胞間相互作用解析で明らかにしたリガンドと一致するかを評価した。この解析の結果、細胞系譜解析と細胞相互作用解析の結果が一致する遺伝子を同定し、Leeらの関連研究[63]で示された細胞系譜解析の有用性を改めて確認するとともに、両者を組み合わせて得た情報が、脱毛症研究における解析の信頼性をさらに高めることを示した。また、差異解析の結果、検出した遺伝子は、炎症部位に免疫細胞を引き寄せ、炎症反応を促進するケモカインCCL5をコードする遺伝子であった。CCL5は、円形脱毛症患者のT細胞で強く発現するCCR5のリガンドとして知られており、CCL5は毛包に免疫細胞を誘引することで、毛包における炎症反応を促進し、毛包の機能の低下やヘアサイクルの乱れを引き起こす可能性がある。上記の考察から、CCL5は脱毛症患者の毛包における免疫応答において重要な役割を果たし、脱毛症の病態の一端を担う可能性を示した。

第2章から第4章において、多角的なアプローチにより、脱毛症のメカニズムにおける毛乳頭細胞を中心とした炎症反応の重要性が示唆された。これらの結果は、毛包および皮膚という異なる組織から得られたシングルセルRNA-seqデータの解析でも一貫しており、本研究の結論の信頼性を一層高めている。

## 5.2 今後の展望

本研究が提供した毛の成長および脱毛に関するメカニズムの解明における重要な知見について、今後の展望を述べる。本研究で見つけたリガンド-レセプターペアが、脱毛症の進行においてどの時期に関与しているかについて考察する。円形脱毛症との関与が明らかになったCCL5-SDC4を始めとしたリガンド-レセプターペアは、脱毛症の初期に関係する相互作用であると考えられる。これらの相互作用は毛乳頭細胞をターゲットとしているが、毛乳頭細胞が毛の基部で最も発達し多くの細胞と相互作用を行うのは、ヘアサイク

ルの成長期にあたる。一方、円形脱毛症の症状が進行した毛包には毛がなく、ヘアサイクルの休止期の状態だと想定される。ヘアサイクルの休止期では、毛乳頭細胞は退化し毛を構成する他の主要な細胞と接していない。このことから、今回明らかになった相互作用は、脱毛症の初期段階における成長期の毛包内の毛乳頭細胞をターゲットにしたものであり、脱毛症の症状の進行を予防するための研究につながる知見であると考える。

今回明らかになった相互作用が、脱毛症のメカニズムにおいてどの程度重要であるかを解明するためには、さらなる解析が必要である。具体的には、脱毛症の進行過程における相互作用の変化を明らかにすることが重要である。例えば、アンドロゲン型脱毛症では症状が進行すると毛包が委縮し、治療効果が得にくくなる。同様に円形脱毛症でも、初期の斑状脱毛から進行すると全頭や全身の脱毛に至り、治療が難しくなる [11]。また、毛包だけでなく周囲の組織にまで炎症が広がることも知られている [54]。この進行過程における毛の脱落部位や毛包の形態変化は、細胞間相互作用が段階的に変化する証拠であり、それぞれの段階における相互作用の変化を解明することで、より詳細な脱毛症のメカニズムを明らかにできる可能性がある。例えば、症状ごとに採取した毛包由来のシングルセル RNA-seq を用いて、進行する各段階での細胞種ごとの遺伝子発現の変化を明確にすることで、毛包内の相互作用の進行に伴う変化をより詳細に理解できると考える。

脱毛症の表現型に関しては、複数の細胞種が関与する複数の相互作用が影響しているため、まずは網羅的な遺伝子発現の評価が必要であり、本研究を通してトランскriプトーム解析を手法として選択した。しかし、遺伝子発現の変化だけではそのメカニズムを完全に解明することは難しく、細胞間での相互作用やシグナル伝達経路がどのように絡み合い、最終的に脱毛症を引き起こすのかを明確にするためには、遺伝子発現データに加えて、実験的なアプローチによる検証も必要だと考える。1.3.2 節で述べたとおり、タンパク質レベルでの実験は、多くても 2 種類の細胞種と特定のリガンドとレセプターを対象とするため、本研究で絞り込んだ相互作用の評価は可能である。

本研究の成果が、脱毛症のメカニズム解明と予防法および治療法開発に向けた基盤として寄与することを期待する。

## 謝辞

本研究ならびに本論文の執筆にあたり、大阪大学大学院情報科学研究科の松田秀雄教授には、丁寧なご指導と多大なご支援を賜り、深く感謝申し上げます。また、本論文の審査にあたり、貴重なご指導とご助言をいただきました松田史生教授、瀬尾茂人准教授にも心より御礼申し上げます。さらに、繁田浩功助教には、研究室の会合を通じて建設的なご意見と温かい励ましをいただきましたことに、深く感謝いたします。また、様々なご支援を賜りました小林加代子様に感謝いたします。本研究の遂行にあたり、大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻ゲノム情報工学講座の学生の皆様には、多方面にわたりご支援とご協力をいただきました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

最後に、これまで私を応援してくれた両親、支えてくれた夫と息子に心から感謝します。

## 参考文献

- [1] M. R. Schneider, R. Schmidt-Ullrich, and R. Paus. The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Current Biology*, Vol. 19, No. 3, pp. R132–R142, 2009.
- [2] K. J. McElwee, A. Gilhar, D. J. Tobin, Y. Ramot, J. P. Sundberg, M. Nakamura, M. Bertolini, S. Inui, Y. Tokura, L. E. J. King, B. Duque-Estrada, A. Tosti, A. Keren, S. Itami, Y. Shoenfeld, A. Zlotogorski, and R. Paus. What causes alopecia areata? *Experimental Dermatology*, Vol. 22, No. 9, pp. 609–626, 2013.
- [3] S. Hiroshi. *Textbook of Modern Dermatology*. Nakayama Shoten, 2018.
- [4] J. H. Lee and S. Choi. Deciphering the molecular mechanisms of stem cell dynamics in hair follicle regeneration. *Experimental & Molecular Medicine*, Vol. 56, No. 1, pp. 110–117, 2024.
- [5] Y. Chen, R. Knight, and R. L. Gallo. Evolving approaches to profiling the microbiome in skin disease. *Frontiers in Immunology*, Vol. 14, p. 1151527, 2023.
- [6] K. Polak-Witka, L. Rudnicka, U. Blume-Peytavi, and A. Vogt. The role of the microbiome in scalp hair follicle biology and disease. *Experimental Dermatology*, Vol. 29, No. 3, pp. 286–294, 2020.
- [7] H.-S. Yang, W.-T. Liu, C.-C. Yang, G. Plewig, R. Danarti, and W. Chen. Vellus hair follicle diseases. *Dermatologica Sinica*, Vol. 42, No. 2, pp. 89–97, 2024.
- [8] C.-S. Yin, T. T. M. Nguyen, E.-J. Yi, S. Zheng, A. D. Bellere, Q. Zheng, X. Jin, M. Kim, S. Park, S. Oh, et al. Efficacy of probiotics in hair growth and dandruff control: A systematic review and meta-analysis. *Helixyon*, 2024.
- [9] J. H. Song, J. S. Lee, and H. J. Choi. Hair growth promoting effect of essence manufactured with products fermented by *Lactobacillus rhamnosus* and *Back-ryeoncho* (*Opuntia ficus-indica* var. sarboten) fruits in mice. *Food Science and Biotechnology*, Vol. 21, pp. 1101–1104, 2012.
- [10] W. Nam, H. Kim, C. Bae, J. Kim, B. Nam, J. Kim, S. Park, J. Lee, and J. Sim. *Lactobacillus paracasei* HY7015 promotes hair growth in a telogenetic mouse model. *Journal of Medicinal Food*, Vol. 24, No. 7, pp. 741–748, 2021.
- [11] H. H. Lee, E. Gwillim, K. R. Patel, T. Hua, S. Rastogi, E. Ibler, and J. I. Silverberg. Epidemiology of alopecia areata, ophiasis, totalis, and universalis:

- A systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, Vol. 82, No. 3, pp. 675–682, 2020.
- [12] R. M. Trüeb and M. F. R. G. Dias. Alopecia areata: a comprehensive review of pathogenesis and management. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, Vol. 54, pp. 68–87, 2018.
- [13] A. Adil and M. Godwin. The effectiveness of treatments for androgenetic alopecia: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, Vol. 77, No. 1, pp. 136–141, 2017.
- [14] G. Fabbrocini, M. Cantelli, A. Masarà, M. Annunziata, C. Marasca, and S. Cacciapuoti. Female pattern hair loss: A clinical, pathophysiologic, and therapeutic review. *International Journal of Women's Dermatology*, Vol. 4, No. 4, pp. 203–211, 2018.
- [15] A. Kidangazhiathmana and P. Santhosh. Pathogenesis of androgenetic alopecia. *Clinical Dermatology Review*, Vol. 6, No. 2, pp. 69–74, 2022.
- [16] J. Su, Y. Song, Z. Zhu, X. Huang, J. Fan, J. Qiao, and F. Mao. Cell–cell communication: new insights and clinical implications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, Vol. 9, No. 1, p. 196, 2024.
- [17] S. Jin, C. F. Guerrero-Juarez, L. Zhang, I. Chang, R. Ramos, C.-H. Kuan, P. Myung, M. V. Plikus, and Q. Nie. Inference and analysis of cell-cell communication using CellChat. *Nature Communications*, Vol. 12, No. 1, p. 1088, 2021.
- [18] T. Passeron, B. King, J. Seneschal, M. Steinhoff, A. Jabbari, M. Ohyama, D. J. Tobin, S. Randhawa, A. Winkler, J.-B. Telliez, et al. Inhibition of T-cell activity in alopecia areata: Recent developments and new directions. *Frontiers in Immunology*, Vol. 14, p. 1243556, 2023.
- [19] L. Axelsson, et al. Lactic acid bacteria: classification and physiology. *Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker-*, Vol. 139, pp. 1–66, 2004.
- [20] G. Perdigón, R. Fuller, and R. Raya. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, Vol. 2, No. 1, pp. 27–42, 2001.
- [21] B. Foligne, S. Nutten, C. Grangette, V. Dennin, D. Goudercourt, S. Poiret,

- J. Dewulf, D. Brassart, A. Mercenier, and B. Pot. Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World Journal of Gastroenterology*, Vol. 13, No. 2, p. 236, 2007.
- [22] T. Levkovich, T. Poutahidis, C. Smillie, B. J. Varian, Y. M. Ibrahim, J. R. Lakritz, E. J. Alm, and S. E. Erdman. Probiotic bacteria induce a ‘glow of health’ . *PLOS ONE*, Vol. 8, No. 1, p. e53867, 2013.
- [23] L. Wang, T. Yu, Y. Zhu, Y. Luo, F. Dong, X. Lin, W. Zhao, Z. He, S. Hu, and Z. Dong. Amplicon-based sequencing and co-occurrence network analysis reveals notable differences of microbial community structure in healthy and dandruff scalps. *BMC Genomics*, Vol. 23, No. 1, p. 312, 2022.
- [24] W.-H. Tsai, Y.-T. Fang, T.-Y. Huang, Y.-J. Chiang, C.-G. Lin, and W.-W. Chang. Heat-killed *Lacticaseibacillus paracasei* GMNL-653 ameliorates human scalp health by regulating scalp microbiome. *BMC Microbiology*, Vol. 23, No. 1, p. 121, 2023.
- [25] W.-Y. Bae, W.-H. Jung, S. L. Shin, T.-R. Kim, M. Sohn, J. Suk, I. Jung, Y. I. Lee, and J. H. Lee. Heat-treated *Limosilactobacillus fermentum* LM1020 with menthol, salicylic acid, and panthenol promotes hair growth and regulates hair scalp microbiome balance in androgenetic alopecia: A double-blind, randomized and placebo-controlled clinical trial. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2024.
- [26] A. Mori, Y. Sunada, Y. Tanii, K. Uehara, and A. Igi. Lactic acid bacteria with hair growth and hair restoration effects. Japan Patent P2022-68040A, 2022. Assignee: Nissin Foods Holdings Co., Ltd.
- [27] A. Mori-Ichioka, Y. Sunada, T. Koikeda, H. Matsuda, and S. Matsuo. Effect of applying *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* N793 to the scalps of men and women with thinning hair: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, Vol. 43, pp. 1–39, 2024.
- [28] C. L. Maynard, C. O. Elson, R. D. Hatton, and C. T. Weaver. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, Vol. 489, No. 7415, pp. 231–241, 2012.
- [29] S. M. Opal and V. A. DePalo. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, Vol. 117,

No. 4, pp. 1162–1172, 2000.

- [30] X. Li, R. Xie, Y. Luo, R. Shi, Y. Ling, X. Zhao, X. Xu, W. Chu, and X. Wang. Cooperation of TGF- $\beta$  and FGF signalling pathways in skin development. *Cell Proliferation*, Vol. 56, No. 11, p. e13489, 2023.
- [31] R. S. Zoe, D. G. James, B.-S. Cameron, B.-J. S. Barbara, and J. H. Denis. Characterisation of human hair follicle development. *bioRxiv*, 2024.
- [32] M. Ashburner, C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, Vol. 25, No. 1, pp. 25–29, 2000.
- [33] S. A. Aleksander, J. Balhoff, S. Carbon, J. M. Cherry, H. J. Drabkin, D. Ebert, M. Feuermann, P. Gaudet, N. L. Harris, et al. The gene ontology knowledgebase in 2023. *Genetics*, Vol. 224, No. 1, p. iyad031, 2023.
- [34] A. Dobin, C. A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, and T. R. Gingeras. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, Vol. 29, No. 1, pp. 15–21, 2013.
- [35] B. Li and C. N. Dewey. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, Vol. 12, pp. 1–16, 2011.
- [36] J. Sun, T. Nishiyama, K. Shimizu, and K. Kadota. TCC: an R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC Bioinformatics*, Vol. 14, pp. 1–14, 2013.
- [37] S. Durinck, Y. Moreau, A. Kasprzyk, S. Davis, B. De Moor, A. Brazma, and W. Huber. BiomaRt and Bioconductor: a powerful link between biological databases and microarray data analysis. *Bioinformatics*, Vol. 21, No. 16, pp. 3439–3440, 2005.
- [38] S. Durinck, P. T. Spellman, E. Birney, and W. Huber. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nature Protocols*, Vol. 4, No. 8, pp. 1184–1191, 2009.
- [39] M. D. Robinson, D. J. McCarthy, and G. K. Smyth. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, Vol. 26, No. 1, pp. 139–140, 2010.

- [40] Y. Chen, L. Chen, A. T. Lun, P. L. Baldoni, and G. K. Smyth. edgeR 4.0: powerful differential analysis of sequencing data with expanded functionality and improved support for small counts and larger datasets. *bioRxiv*, pp. 2024–01, 2024.
- [41] G. Yu, L.-G. Wang, Y. Han, and Q.-Y. He. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics: A Journal of Integrative Biology*, Vol. 16, No. 5, pp. 284–287, 2012.
- [42] G. Yu. Thirteen years of clusterProfiler. *The Innovation*, Vol. 5, No. 6, p. 100722, 2024.
- [43] W. Niu, W.-d. Zhang, Z.-y. Zhong, X.-b. Zhou, X.-r. Shi, and W. Xin. FGF7 secreted from dermal papillae cell regulates the proliferation and differentiation of hair follicle stem cell. *Journal of Integrative Agriculture*, 2023.
- [44] Y.-H. Baek, J.-H. Lee, S.-J. Chang, Y. Chae, M.-H. Lee, S.-H. Kim, K.-I. Han, and T.-J. Kim. Heat-killed *Enterococcus faecalis* EF-2001 induces human dermal papilla cell proliferation and hair regrowth in C57BL/6 mice. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 23, No. 10, p. 5413, 2022.
- [45] S. An, M. Zheng, I. G. Park, S. G. Park, M. Noh, and J.-H. Sung. Humanized CXCL12 antibody delays onset and modulates immune response in alopecia areata mice: insights from single-cell RNA sequencing. *Frontiers in Immunology*, Vol. 15, p. 1444777, 2024.
- [46] E. M. García-Cuesta, C. A. Santiago, J. Vallejo-Díaz, Y. Juarranz, J. M. Rodríguez-Frade, and M. Mellado. The role of the CXCL12/CXCR4/ACKR3 axis in autoimmune diseases. *Frontiers in Endocrinology*, Vol. 10, p. 585, 2019.
- [47] C. Xu and Z. Su. Identification of cell types from single-cell transcriptomes using a novel clustering method. *Bioinformatics*, Vol. 31, No. 12, pp. 1974–1980, 2015.
- [48] X. Que, F. Checconi, F. Petrini, and J. A. Gunnels. Scalable community detection with the Louvain algorithm. In *2015 IEEE International Parallel and Distributed Processing Symposium*, pp. 28–37. IEEE, 2015.
- [49] B. Ober-Reynolds, C. Wang, J. M. Ko, E. J. Rios, S. Z. Aasi, M. M. Davis, A. E. Oro, and W. J. Greenleaf. Integrated single-cell chromatin and transcriptomic analyses of human scalp identify gene-regulatory programs and critical cell types

- for hair and skin diseases. *Nature Genetics*, Vol. 55, No. 8, pp. 1288–1300, 2023.
- [50] E. Cano-Gamez, B. Soskic, T. I. Roumeliotis, E. So, D. J. Smyth, M. Baldridge, D. Willé, N. Nakic, J. Esparza-Gordillo, C. G. Larminie, et al. Single-cell transcriptomics identifies an effectorness gradient shaping the response of CD4+ T cells to cytokines. *Nature Communications*, Vol. 11, No. 1, p. 1801, 2020.
- [51] Y. Hao, S. Hao, E. Andersen-Nissen, W. M. Mauck, S. Zheng, A. Butler, M. J. Lee, A. J. Wilk, C. Darby, M. Zager, et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell*, Vol. 184, No. 13, pp. 3573–3587, 2021.
- [52] I. Korsunsky, N. Millard, J. Fan, K. Slowikowski, F. Zhang, K. Wei, Y. Baglaenko, M. Brenner, P. Loh, and S. Raychaudhuri. Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony. *Nature Methods*, Vol. 16, No. 12, pp. 1289–1296, 2019.
- [53] D. Dimitrov, P. S. L. Schäfer, E. Farr, P. Rodriguez-Mier, S. Lobentanzer, P. Badia-i-Mompel, A. Dugourd, J. Tanevski, R. O. Ramirez Flores, and J. Saez-Rodriguez. LIANA+ provides an all-in-one framework for cell–cell communication inference. *Nature Cell Biology*, pp. 1–10, 2024.
- [54] M. Wu, C. Xu, J. Jiang, S. Xu, J. Xiong, X. Fan, K. Ji, Y. Zhao, H. Ni, Y. Wang, et al. JAM-A facilitates hair follicle regeneration in alopecia areata through functioning as ceRNA to protect VCAN expression in dermal papilla cells. *Precision Clinical Medicine*, Vol. 5, No. 3, p. pbac020, 2022.
- [55] C. Zhou, X. Li, C. Wang, and J. Zhang. Alopecia areata: an update on etiopathogenesis, diagnosis, and management. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, Vol. 61, No. 3, pp. 403–423, 2021.
- [56] J. D. Fontenot, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology*, Vol. 4, No. 4, pp. 330–336, 2003.
- [57] N. Younis, N. Puigmal, A. E. Kurdi, A. Badaoui, D. Zhang, C. Morales-Garay, A. Saad, D. Cruz, N. A. Rahy, A. Daccache, et al. Microneedle-mediated delivery of immunomodulators restores immune privilege in hair follicles and reverses immune-mediated alopecia. *Advanced Materials*, p. 2312088, 2024.
- [58] X. Yang, W. Zhang, X. Zhao, W. Hou, Y. Wu, D. Feng, Z. Meng, and X. Zhou.

- Changes and significance of Th1/Th2 and Treg/Th17 cells and their cytokines in patients with alopecia areata. *Experimental Cell Research*, Vol. 442, No. 2, p. 114259, 2024.
- [59] D. Aldinucci and A. Colombatti. The inflammatory chemokine ccl5 and cancer progression. *Mediators of inflammation*, Vol. 2014, No. 1, p. 292376, 2014.
  - [60] T. Polte, S. Petzold, J. Bertrand, N. Schütze, D. Hinz, J. C. Simon, I. Lehmann, F. Echtermeyer, T. Pap, and M. Averbeck. Critical role for syndecan-4 in dendritic cell migration during development of allergic airway inflammation. *Nature Communications*, Vol. 6, No. 1, p. 7554, 2015.
  - [61] J. O. S. Onyeisi, C. C. Lopes, and M. Götte. Syndecan-4 as a pathogenesis factor and therapeutic target in cancer. *Biomolecules*, Vol. 11, No. 4, p. 503, 2021.
  - [62] K. V. d. Berge, H. R. d. Bézieux, K. Street, W. Saelens, R. Cannoodt, Y. Saeys, S. Dudoit, and L. Clement. Trajectory-based differential expression analysis for single-cell sequencing data. *Nature Communications*, Vol. 11, No. 1, p. 1201, 2020.
  - [63] E. Y. Lee, Z. Dai, A. Jaiswal, E. H. C. Wang, N. Anandasabapathy, and A. M. Christiano. Functional interrogation of lymphocyte subsets in alopecia areata using single-cell RNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 120, No. 29, p. e2305764120, 2023.
  - [64] D. Aran, A. P. Looney, L. Liu, E. Wu, V. Fong, A. Hsu, S. Chak, R. P. Naikawadi, P. J. Wolters, A. R. Abate, et al. Reference-based analysis of lung single-cell sequencing reveals a transitional profibrotic macrophage. *Nature Immunology*, Vol. 20, No. 2, pp. 163–172, 2019.
  - [65] N. A. Mabbott, J. K. Baillie, H. Brown, T. C. Freeman, and D. A. Hume. An expression atlas of human primary cells: inference of gene function from coexpression networks. *BMC Genomics*, Vol. 14, pp. 1–13, 2013.
  - [66] K. Street, D. Risso, R. B. Fletcher, D. Das, J. Ngai, N. Yosef, E. Purdom, and S. Dudoit. Slingshot: cell lineage and pseudotime inference for single-cell transcriptomics. *BMC Genomics*, Vol. 19, pp. 1–16, 2018.
  - [67] J. M. Richmond, J. P. Strassner, K. I. Essien, and J. E. Harris. T-cell positioning by chemokines in autoimmune skin diseases. *Immunological Reviews*, Vol. 289,

No. 1, pp. 186–204, 2019.

- [68] T. Ito, T. Suzuki, A. Funakoshi, T. Fujiyama, and Y. Tokura. CCR5 is a novel target for the treatment of experimental alopecia areata. *Journal of Cutaneous Immunology and Allergy*, Vol. 3, No. 2, pp. 24–32, 2020.