

出國報告（出國類別：進修）

2019-2022 年美國紐約大學醫學中心 皮膚研究進修報告

服務機關：高雄榮民總醫院/皮膚科

姓名職稱：游偉雯/主治醫師

派赴國家：美國

出國期間：2019/9/1-2020/8/31 公假

2020/9/1-2022/2/28 留停

報告日期：2022/3/28

摘要

Hidradenitis suppurativa 化膿性大汗腺炎 (HS) 是一種慢性炎性皮膚病，主要影響人類有大汗腺分泌的皮膚部位，包括腋窩，會陰，腹股溝和乳房下部位。由於極度的疼痛，惡臭的分泌物和嚴重的疤痕形成，這種疾病伴隨相當程度的社會心理負擔。由於對其發病機理的不了解，目前治療非常困難。紐約大學醫學中心的皮膚細胞生物研究，以皮膚附屬器(如汗腺及毛髮)的研究聞名，透過先進的單細胞 RNA 定序 Single-Cell RNA Sequencing 技術能夠在組成多樣且複雜的細胞群集，有效率深入解析單細胞內數千個基因表現量，揭露細胞次分群資訊，在單顆細胞解析度下，開闊皮膚細胞生理及病理免疫學的全新視野。此行主要透過學習使用單細胞 RNA 定序 Single Cell RNA Sequencing 技術，分析化膿性大汗腺炎的皮膚組織，從龐大的細胞基因資訊中，找尋到病程各階段可能的致病機轉以及分子治療的潛在目標。

關鍵字

Hidradenitis suppurativa 化膿性大汗腺炎

Single cell RNA sequencing transcriptomic analyses 單細胞 RNA 定序

Epidermal stem cell fate 表皮幹細胞命運

Sinus tracts 竇道

Androgen 雄性激素

目次

一、目的.....	4
二、過程.....	4
三、心得及建議.....	30
附錄.....	33

一、目的

Hidradenitis suppurativa 化膿性大汗腺炎 (HS) 是一種慢性炎性皮膚病，主要影響人類有大汗腺分泌的皮膚部位，包括腋窩，會陰，腹股溝和乳房下部位。由於極度的疼痛，惡臭的分泌物和嚴重的疤痕形成，這種疾病伴隨的社會心理負擔特別具有破壞性。HS 的總體患病率在 0.05-4.1% 之間，女性和非裔美國人發病率更高，並且與吸煙和肥胖症密切相關。由於對其發病機理的不完全了解，HS 的管理非常困難。建議根據疾病的嚴重程度進行內科和外科手術聯合治療；但是，對於晚期或復發性病變，通常需要進行大量的外科手術。

紐約大學醫學中心的格羅斯曼醫學院的 Lu 實驗室以皮膚附屬器(如汗腺及毛髮)的研究聞名，以汗腺為模型，研究表皮幹細胞在正常發育和傷口修復過程中利用的分子機制，了解幹細胞如何利用或改變正常發育和修復過程的基本原則，以實現再生和應對環境刺激，目標是利用動物模型獲得知識，並將其轉化為人類皮膚再生和疾病治療方法，以使有需要的病人受益。實驗室主持人 Catherine Pei-ju Lu 教授曾有多篇論文發表於 Cell, Science [1]等世界級科學期刊。該實驗室近期與紐約大學傷口癒合中心和 Hansjörg Wyss 整形外科的臨床醫生合作，積極招募 HS 患者進行臨床和基礎研究。採用單細胞 RNA 測序技術和計算分析，研究 HS 病變皮膚中不同細胞類型之間的相互作用，以及這些相互作用如何參與疾病的進展。目標是確定新的治療目標，為 HS 患者制定更具體的治療策略，並希望能直接改善他們的疾病管理和生活質量。使用先進並在近期蓬勃發展的單細胞 RNA 定序 Single Cell RNA Sequencing 技術能夠在組成多樣且複雜的細胞群集，有效率深入解析單細胞內數千個基因表現量，揭露以往多細胞下所隱藏的細胞次分群資訊，在單顆細胞解析度下，開闊皮膚細胞生理及病理免疫學的全新視野。期盼藉由先進的單細胞 RNA 定序 Single Cell RNA Sequencing 技術，分析化膿性大汗腺炎的組織檢體，從龐大的細胞資訊中，找尋到病程各階段可能的致病機轉以及分子治療的潛在目標。

此次進修的計畫大致可區分為三個階段：

- **第一階段**：了解竇道和皮膚附件在化膿性汗腺炎 HS 中的作用，定義 HS 病變和病變皮膚不同譜系中的轉錄變化，研究幹細胞的命運。
- **第二階段**：化膿性汗腺炎 HS 的竇道中雄激素受體 androgen receptor 免疫反應性分析
- **第三階段**：在單細胞分辨率下定義化膿性汗腺炎 HS 的適應性和非適應性免疫細胞概況。



實驗室成員合影（疫情爆發前）

二、過程

第一階段行程紀要：

- 2019年9月，正式加入團隊，認識環境，熟悉成員。固定會議時間：每週一與實驗室主持人進行單獨會談，討論實驗進度與規劃；每週三為實驗室群組會議，分別分享實驗近況以及相互討論，最後會有 journal club 時間一起評讀較新的文獻及實驗設計，作為參考。
- 2019年10月，判讀病理切片與免疫染色切，分別用 CD3，CD19 和 CD68 等進行多重免疫熒光成像，分別標記了 T 細胞，B 細胞和巨噬細胞。
- 2019年11月，學習 image J，並用以計算單位面積下的細胞計數，對代表性的病灶周圍和病灶皮膚處的免疫細胞數量進行量化。
- 2019年12月，學習 multiplexing image 圖片擷取及專用軟體 InForm 使用，計算重疊免疫染色下的細胞計數，訓練並運人工智慧幫助計算。
- 2020年1-2月，學習使用 R 語言及 R studio 程式軟體系統處理 single-cell RNA sequencing 的資料系統，運用 Seurat 以及 iCellR 等不同套件進行分析。使用 Seurat v3.0 工作流程將 5,848 個角質形成細胞重新分組。
- 2020年3月，分析個細胞族群的相異基因表現(Differentially-expressed genes)與已知的基因標記，做出細胞聚類分析(clustering)，分群註釋(annotation)。此時紐約市因 COVID-19 疫情嚴重爆發，實驗室傳出人員與親友確診，學校與實驗室相繼關閉或是暫停工作，隨後紐約市也宣佈封城，禁止所有群聚活動，實驗大多暫停或是並限制人員出入，所有相關學術活動皆改為遠距或線上辦理。不過因為我的研究工作大多是以電腦操作數據分析及影像分析為主，所以改為遠距工作並無太大的影響。
- 2020年4-5月，分析各種上皮組織細胞的相異基因表現(Differentially-expressed genes)，並作路徑分析(pathway analysis)。
- 2020年6月，各類基因分析的視覺化呈現(visualization)，製作圖表：例如均勻流形近似和投影(UMAP)圖，點陣圖，火山圖和小提琴圖。
- 2020年7月，文獻收集選讀，文章撰寫。
- 2020年8月，最終版本編排，校閱並投稿。

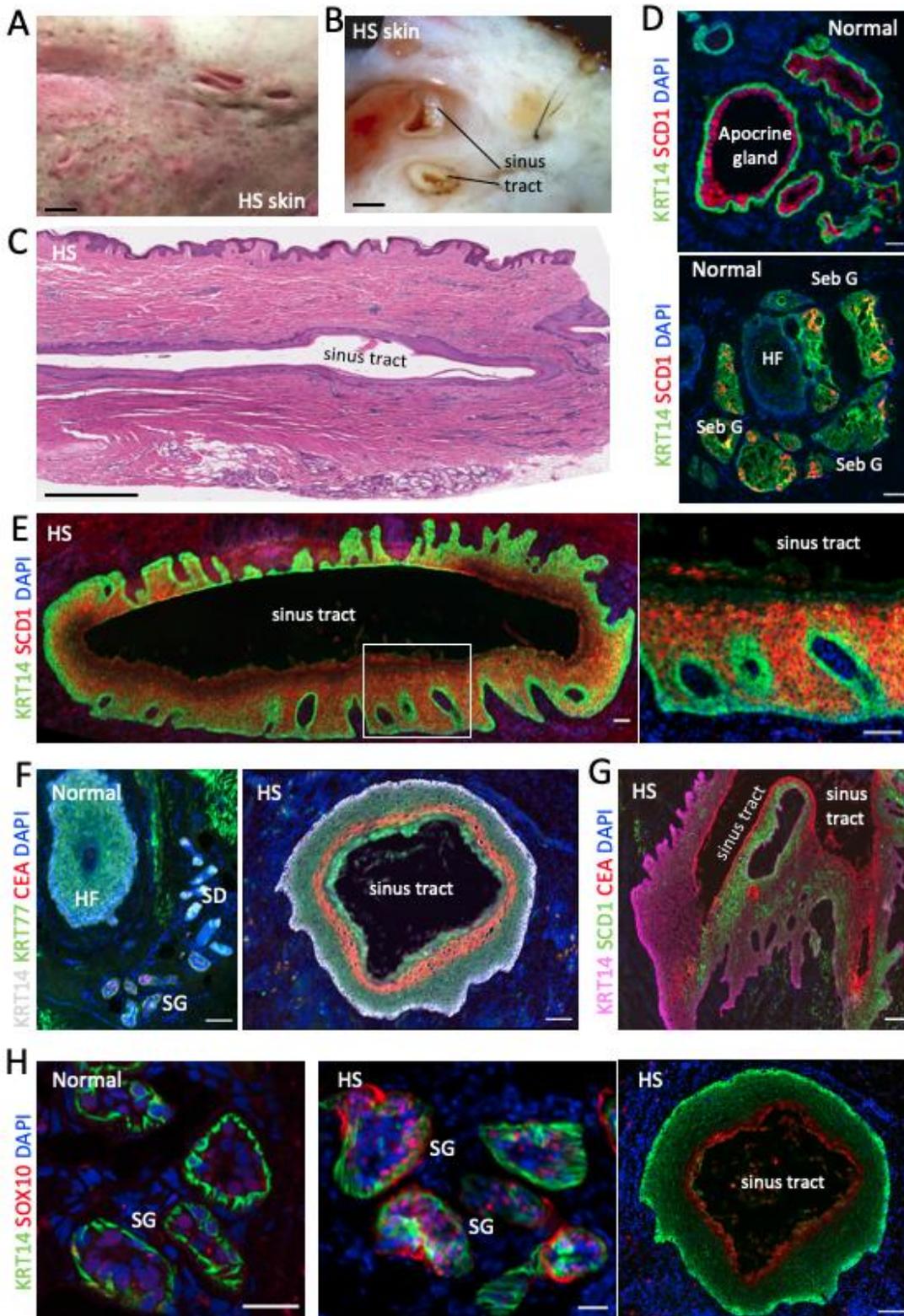
第一階段成果摘要：

- 表皮異常發生在免疫細胞募集之前

HS 病變發展的特定皮膚區域暗示了皮脂腺-毛囊單位在 HS 發病機理中的獨特作用。我們收集了 HS 患者的病灶和病灶皮膚樣品，並分別用 CD3，CD19 和 CD68 進行了多重免疫熒光成像，分別標記了 T 細胞，B 細胞和巨噬細胞。我們顯示，儘管病灶周圍的表皮已經表現出明顯的牛皮癬樣增生，但免疫細胞浸潤卻很少。我們對代表性的病灶周圍和病灶皮膚處的免疫細胞數量進行了量化，結果顯示在毛囊周圍區域的巨噬細胞數量增加，病灶表皮中所有 T 細胞，B 細胞和巨噬細胞數量增加，並且免疫細胞浸潤的水平又以 HS 竇道最高。這些結果

表明表皮異常發生在 HS 的免疫細胞募集之前，而異常的表皮細胞，不僅是 IFE (interfollicular epidermis)，還包括竇道和皮膚附屬器，都在 HS 皮膚中積極募集免疫細胞。

Figure 1. Keratinocytes lining HS sinus tracts express high level of sebaceous and sweat gland-specific markers



- 單細胞 RNAseq 揭示了 HS 發病機理中表皮和皮膚附件的變化

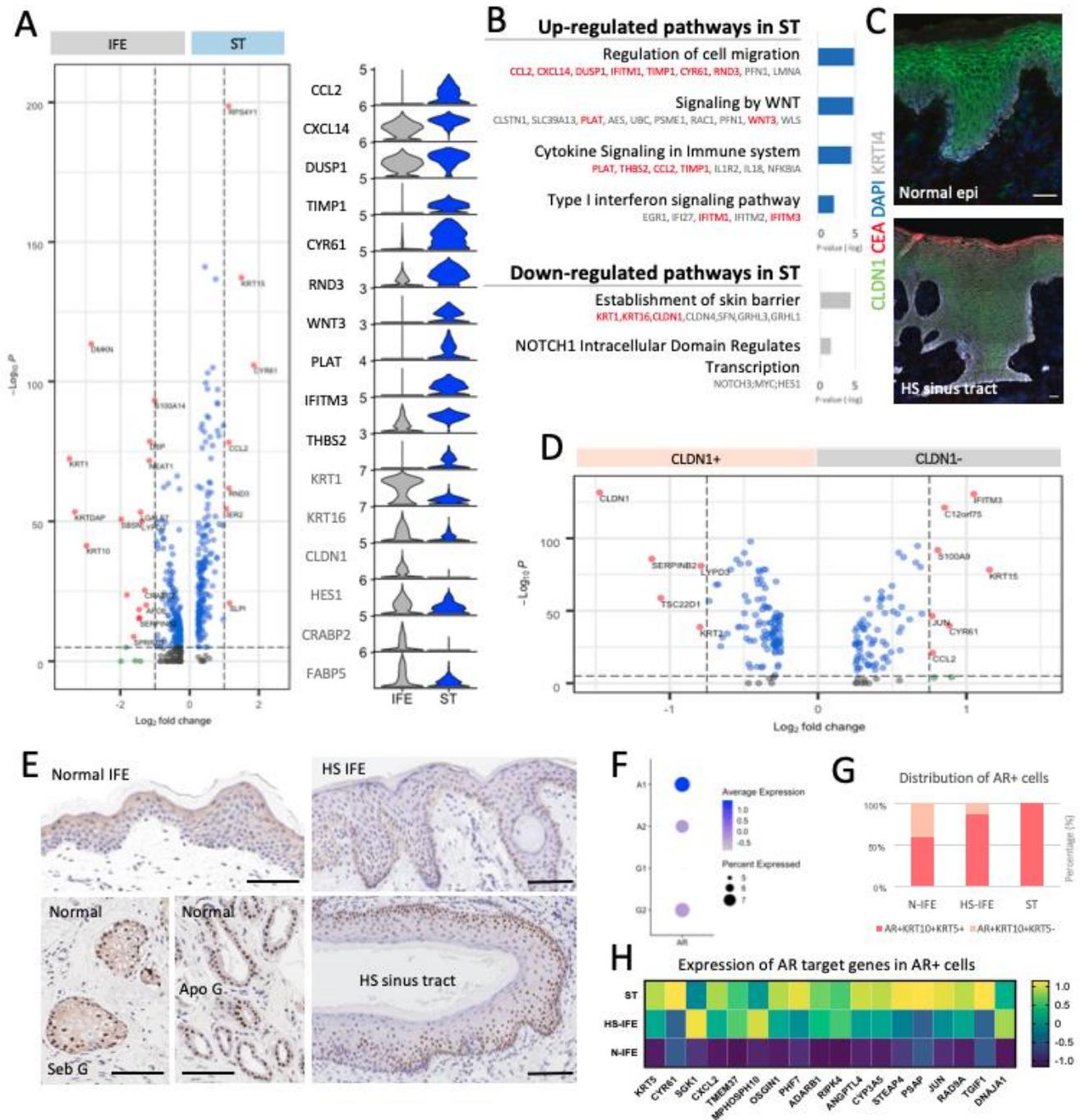
為了了解各種表皮譜系在 HS 發病機理中的獨特作用，我們使用 scRNAseq 從腋窩和腹股溝的正常、病變和病變皮膚中獲取 35,365 個細胞的數據（圖 2A）。使用 Seurat v3.0 工作流程 32,33 將 5,848 個角質形成細胞重新分為 17 組，如圖 2B 中的均勻流形近似和投影（UMAP）圖所示。使用每種角質形成細胞類型的已知信號基因，我們能夠確定其身份，包括 interfollicular epidermis 小孔間表皮（IFE），HF，漏斗部（INF）和 sweat duct 汗管（SD），sweat gland 汗腺（SG）肌上皮細胞和管腔細胞，皮脂腺，如圖 2B 和 C 以及圖 3 所示。首先，我們分析了正常和 HS 皮膚中 IFE 的差異表達基因 differentially-expressed genes（DEG），如圖 2D 所示。病灶周圍皮膚最明顯的變化已經發生，包括脂質代謝（APOE），屏障功能（SCEL，DSP），類維生素 A 酸信號傳遞（CRABP2，FABP5），應激反應（S100A8，S100A9，KRT6A），干擾素反應（IFI27）（圖 2E）。為了了解這些 DEG 中的生物學意義，進行了途徑分析（圖 2F）。與正常個體相比，HS 中細胞對細胞壓力，白介素-1（IL-1）和先天性免疫反應的細胞對應途徑被上調，而與屏障功能有關的基因（例如 cornified envelope 角質化包膜形成）被下調。有趣的是，對於調節類維生素 A 酸信號傳遞重要的 CRABP2 和 FABP5 在 HS IFE 中被上調，但受體基因（RARG，RXRA）被下調，表明 HS 皮膚中 RA(retinoid acid)信號的接收減少（圖 2G）。此外，我們注意到，不僅它們的表達水平在不同患者之間不盡相同，而且調節劑和受體的表達也可能呈負相關（圖 2G）。為了檢查 HS 皮膚中類維生素 A 的代謝水平，我們分析了正常、周圍和病變皮膚中 RA 目標基因的表達，發現正常情況下響應 RA 信號上調的基因在正常皮膚中上調，而基因正常情況下，響應 RA 信號而被抑制的細胞在病灶皮膚中升高，表明 HS 中 RA 信號的失調。此外，在其他疾病模型中，APOE 表達可以被 RA 信號增強，我們也在 HS 皮膚中觀察到了相似的模式（圖 2G 和 H）。總之，這些結果揭示了 HS 表皮中除了已知的屏障功能和免疫調節缺陷外，類維生素 A 酸和脂質代謝異常。接下來，我們檢查了正常和 HS 皮膚的 HF 和 SG 肌上皮細胞內基因表達的變化。在前 100 個基因中，我們檢測到 32 個在 HF 和 SG 中均下調的基因，包括抗菌肽（DCD），AP1 家族成員（JUN，JUNB 和 FOSB），應激反應（ATF3）和細胞因子調節（SOCS3）（圖 2I）。在上調的前 100 個基因中，HF 和 SG 之間共有 15 個基因，包括 S100A7，S100A8，S100A9 和 S100A11（圖 2J）。我們還檢測到在 HF 和 SG 中與 IFN 反應有關的基因上調，包括 JAK1，IFNGR1，IFITM1 和 IFI16，表明 IFN 反應是在 HS 病變的皮膚附件中所共有的反應。

- HS 竇道內的表皮細胞表現出嚴重的屏障缺陷和雄激素信號上調

我們通過在竇道和 IFE 之間進行差異表達分析來進一步鑑定竇道細胞簇的特徵，以識別其在形態上非常相似的分子變化。火山圖和小提琴圖（圖 3A）中顯示的最高 DEGs 包括趨化性基因（CCL2，CXCL14），TGFB 反應（CYR61，RND3），干擾素反應（IFITM3）。竇道中上調的途徑包括調節細胞遷移，WNT 信號傳導，細胞因子信號傳導和 I 型乾擾素信號傳導。與 IFE 相比，皮膚屏障（CLDN1）和 NOTCH 通路的建立被下調（圖 3B）。與 HS IFE 相比，我們進行了免疫熒光染色，並顯示了在竇道中 CLDN1 的表達減少和變化。有趣的是，在表達 CEA（汗腺標記）的區域，CLDN1 表達明顯下調（圖 3C）。我們對 HS 表皮中的 CLDN1+ 和 CLDN1- 細胞進行了差異表達分析，發現當 CLDN1 不存在時，CCL2，CYR61 和 S100A9 以及其他應激反應基因被上調（圖 3D）。這些結果再次強調了 HS 皮膚的屏障缺陷，其在竇道中尤其嚴重。最有趣的是，我們在 HS 竇道中檢測到了雄激素受體（AR）的強表達，它對正常皮膚的皮脂腺和頂泌腔細胞具有特異性（圖 3E）。由於先前已

證明 **KRT5** 是重要的 **AR** 靶基因，並且正常皮膚中的 **AR** + 細胞大部分位於基底上層 (**KRT10** +)，因此我們試圖分析在正常、病變 **IFE** 和竇道中 **AR** + **K10** + 細胞為 **KRT5** + 的百分比，作為主動 **AR** 信號轉導的潛在指標。我們發現 **HS** 皮膚中 **AR** + **KRT5** + 細胞顯著增加，並且竇道中的 **AR** + 細胞 100% 也是 **KRT5** + (圖 3F)，表明 **AR** 信號可能在 **HS** 皮膚中發生。我們進一步檢查了 **AR** 目標基因陣列的表達，我們發現大多數這些目標基因在竇道中的表達水平要高於 **IFE** (圖 3G)。這些結果突出了性激素在 **HS** 發病機理中的重要參與，以及竇道和皮膚附屬器之間的潛在譜系關係。

Figure 3. Epidermal cells lining HS sinus tracts exhibit severe barrier defect and upregulation of androgen signaling



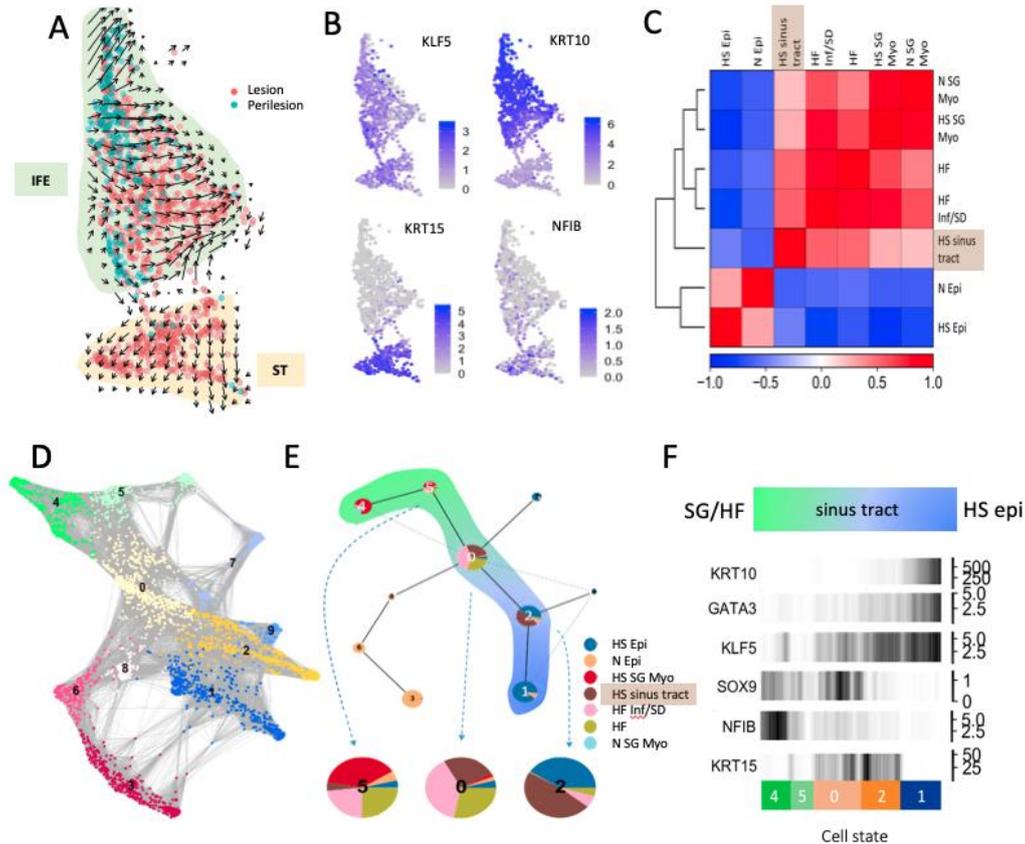
- **HS 竇道與毛囊皮脂腺的漏斗(infundibulum)部位有最緊密的係譜(lineage)關係**

由於 HS 竇道中的角質形成細胞表現出與 IFE 相似的形態和分化程序，而且具有如我們此處所示的獨特腺體特徵，因此我們試圖通過進行 RNA 速度(RNA velocity)來研究竇道的譜系軌跡和細胞動力學。使用我們的 scRNAseq 數據中未剪接和剪接的 mRNA 的比率，我們分析了患者 G1 的皮損和病變 HS 皮膚中轉錄組變化的速率和方向，如圖 4A 所示。在 IFE 簇內，來自病變周圍的角質細胞具有指向病變的強烈軌跡，這支持了我們的假設，即病變周圍的細胞代表疾病的早期階段，並隨後發展為病變。重要的是，儘管代表竇道的簇在 UMAP 中接近 IFE，但幾乎沒有細胞可能衍生自或發展為 IFE，這表明竇道中的細胞具有其自身的身份。此外，當我們檢查 IFE 細胞命運標記 (KLF5 和 KRT10) 和附屬器命運標記 (KRT15 和 NFIB) 在這些簇中的表達時，我們發現竇道簇表達的 KRT15 和 NFIB 水平明顯較高，同時還表達 KLF5 和 KRT10，表明竇道中的細胞同時具有兩種細胞命運 (圖 4B)，這與它們的形態學特徵是一致的。

接下來，為了了解 HS 病變表皮，竇道和附肢簇之間的血統關係，我們進行了相關矩陣分析。如圖 4C 所示，我們發現竇道簇與皮膚附件和遠離 IFE 簇的所有簇歸為一組。此外，使用 Monocle v3.038 進行的偽時間分析(pseudotime analysis)，我們顯示正常的表皮細胞分佈在一個中間莖上，並在右側分支為病變表皮，在左側為附屬器簇，而來自 HS 竇道的細胞分裂為兩種細胞狀態與表皮或附肢的分支對齊 (見圖 5A)。使用 iCellR 互動工具，我們分析了包含 HS 竇道細胞的不同細胞狀態 (I 和 II) 的細胞組成。如圖 5B 所示，狀態 I 主要包含總竇道細胞的 85%，它們與漏斗/汗管和 HF 處於同一狀態。狀態 II 包含 15% 的竇道細胞，主要與 HS 病變 IFE 細胞共享同一狀態。

為了更深入地研究這些不同簇的狀態，我們使用基於分區的圖抽象 (PAGA) 40 進行譜系分析，並展示了單個細胞的 Fruchterman-Reingold 佈局 (FR1) 的鄰域圖 (圖 4D)，並將其進一步劃分為 PAGA 圖的分辨率更高 (圖 4E)。十個分區 (稱為細胞狀態) 在狀態 0 連接到一個公共相交處，並形成三個主要譜系路徑，正常表皮 (3-6-8-)，病變表皮 (1-2-) 和附肢 (4-5-)。我們進一步分析了每種狀態下的細胞組成，發現大多數竇道細胞以 0 和 2 分佈，與 HF 和 HF INF / SD 以及病灶 IFE 共享譜系相似性，這與 Monocle 分析的結果一致。此外，我們檢查了路徑中的不同細胞命運標記，其細胞狀態為 4-5-0-2-1 (在圖 4E 中突出顯示)。在單細胞分辨率下，我們發現狀態 1 最高的表皮標記 (KRT10, GATA3, KLF5) 和狀態 4 最高的皮膚附屬器標記 (SOX9 和 NFIB) 的梯度表達都朝著另一端的狀態逐漸降低。如圖 4F 所示，表明附件命運可能轉變為表皮命運，反之亦然。有趣的是，狀態為 0 的細胞同時具有 KLF5 和 SOX9 的高表達，這表明在共享相同狀態 0 的這些細胞中存在幹細胞命運的雙重性。

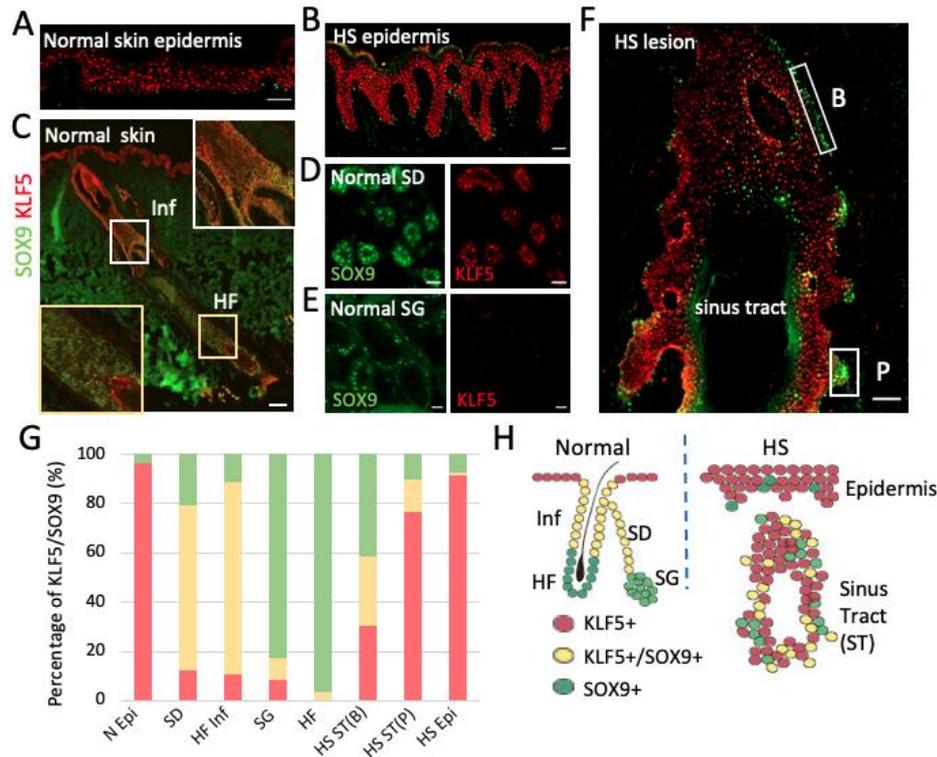
Figure 4. Pseudotime analyses indicate the lineage similarity of HS sinus tracts closest to the infundibulum of apocrine-pilosebaceous unit.



● HS 竇道中發生表皮幹細胞命運雙重性

HS 中皮膚附屬器丟失的一種可能解釋可能是這些細胞失去了控制附屬器命運的關鍵轉錄因子，從而導致 IFE 分化（即 KRT10 表達）上調並可能轉化為病理性竇道。為了研究正常和 HS 條件下人皮膚附件中細胞命運的同一性，我們對 KLF5（IFE 命運）和 SOX9（附屬器命運）進行了 IF 染色，並量化了不同附件和竇中 SOX9⁺，KLF5⁺和 SOX9⁺ KLF5⁺細胞的數量大片。與僅表達 Sox9（且很少表達 Klf5 或 Krt10 的表達）的小鼠皮膚附件相比，人的附屬器結構（HF INF 和 SD）具有 SOX9 和 KLF5 的廣泛共表達（80%），以及高水平的 KRT10 共表達（圖 5 和圖 6）。這些發現表明，在正常體內平衡過程中，該區域的細胞已經表現出明顯的幹細胞命運雙重性。此外，我們發現，雖然小鼠 IFE 僅表達 Klf5 19，但大多數人表皮角質形成細胞表達 KLF5，而在基底層中表達 SOX9 的細胞很少（4%）（圖 5A）。有趣的是，在 HS 中，IFE 中更多的細胞表達 SOX9（8%），尤其是那些位於增生性網紋底部的細胞（圖 5E）。然而，正常和 HS 皮膚的 IFE 中的細胞都顯示出不同的命運，幾乎沒有 KLF5 和 SOX9 的共表達。重要的是，在 HS 竇道中檢測到很大百分比的 SOX9⁺細胞以及 SOX9⁺ KLF5⁺細胞（圖 5F 和圖 7）。圖 5G 中的定量顯示 70% 的基底細胞是 SOX9⁺，其中 40% 的也是 KLF5⁺。在竇道突出前部，大約 23.5% 的細胞是 SOX9⁺，其中 55% 的細胞也是 KLF5⁺。圖 5H 示出了在正常和 HS 皮膚中表現出不同或雙重細胞命運的表皮細胞的分佈。在這裡，我們證明了幹細胞命運的雙重性在高頻竇道內襯的細胞中以高頻率發生，介於 HF INF / SD 區域和 IFE 之間。結合 scRNAseq PAGA 譜系分析，這些結果支持以下觀點：在正常穩態下，頂泌皮脂腺單位 INF 的祖細胞表現出 SOX9⁺ KLF5⁺細胞命運的對偶性，HS 竇道可能源自這些祖細胞並上調 IFE 分化，從而失去了 SOX9⁺的表達而成為 KLF5⁺。

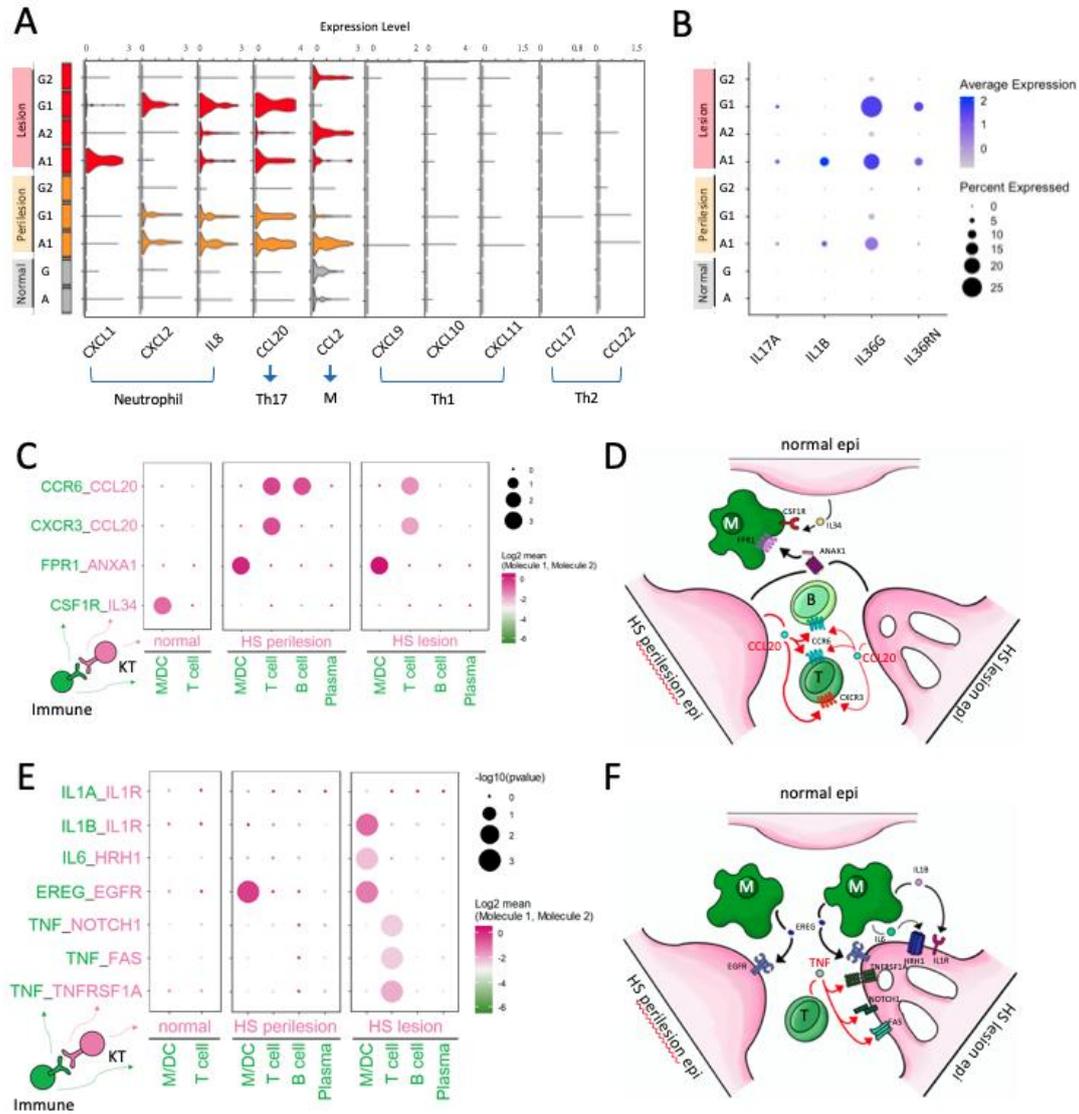
Figure 5. Epidermal stem cell fate duality occurs in the HS sinus tracts



● HS 病灶周圍角質形成細胞產生引起 Th17 反應的細胞因子

利用我們的 scRNAseq 數據，我們進一步分析了正常、病灶和病灶 IFE 中重要細胞因子的表達。在圖 6A 中，我們顯示了與 HS 皮膚中嗜中性粒細胞 (CXCL1, CXCL2, IL8)，Th17 細胞 (CCL20) 和巨噬細胞 (CCL2) 募集有關的細胞因子上調，其中一些已經在病灶周圍皮膚中高表達，提示早期表皮異常可能與這些可能引發炎症反應的細胞因子的表達有關。我們還檢查了 Th1 (CXCL9, CXCL10, CXCL11) 和 Th2 (CCL17 和 CCL22) 響應的趨化因子的表達，發現它們並不存在。關於 IL17 反應相關的細胞因子，我們在患者 A1 中檢測到低水平的 IL1B, IL36G, IL36RN 和令人驚訝的 IL17A (圖 6B)，在 IFE 中其 CCL20 水平也特別高。接下來，我們使用 CellPhoneDB v2.041 來調查表皮細胞表達的細胞因子的受體是否表達以及哪些免疫細胞表達該受體，並通過排列進行統計學置信度分析來分析角質形成細胞與免疫細胞之間的潛在相互作用。我們以患者 A1 (其表皮表達最高水平的 CCL20) 為例，並分析了與該患者中存在的免疫細胞的潛在相互作用。如圖 6C-D 所示，我們檢測到了病灶周圍皮膚中 T 細胞表達的 CCL20 與 CCR6 和 CXCR3 的潛在顯著相互作用。這種相互作用在病變皮膚中不太明顯，這可能是由於病變表皮中 CCL20 的表達較低。此外，IL34 在正常表皮中表達，但在病灶皮膚中不表達，這表明它在穩態過程中可能與單核細胞/巨噬細胞相互作用，並且這種相互作用在 HS 中消失。此外，我們分析了表皮細胞表達的受體與免疫細胞表達的細胞因子之間的相互作用，以了解表皮細胞如何響應免疫刺激。我們在圖 6E 中顯示表皮細胞表達的受體可能與巨噬細胞/樹突狀細胞 (DC) 表達的細胞因子相互作用，包括 IL1B, IL6 和 EREG。此外，表皮細胞表達一些潛在的受體 (NOTCH1, FAS 和 TNFRSF1A) 來接受 T 細胞產生的 TNF，這更可能發生在病變皮膚而不是病變周圍的皮膚中，這表明 TNF 反應可能主要發生在 HS 進展後期 (圖 6E-F)。

Figure 6. HS perilesional epidermis produce cytokines eliciting Th17 response

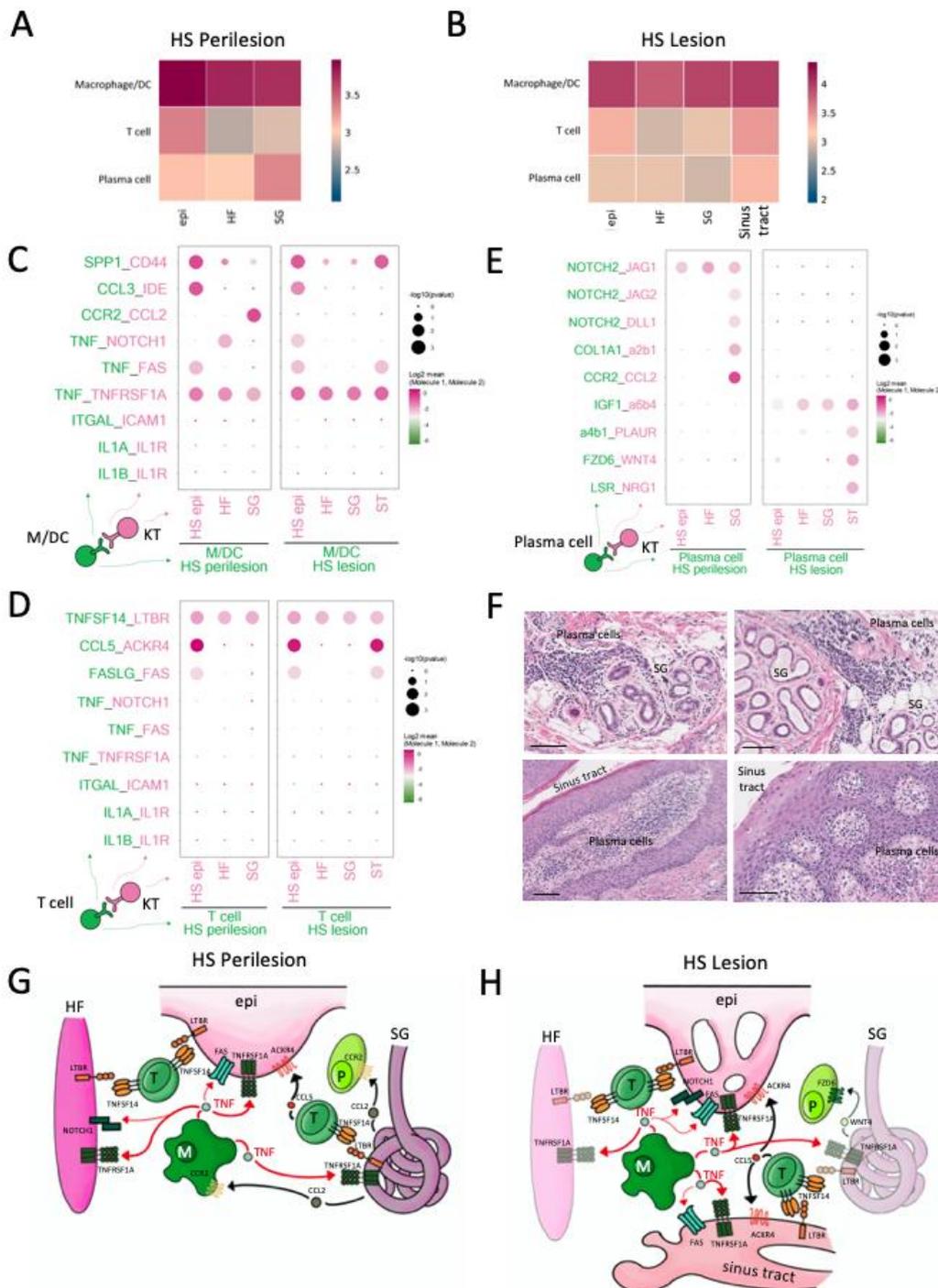


● HS 發病機理中皮膚附屬器和竇道的免疫原性

為了描述不同的皮膚附屬器和竇道在 HS 發病機理中的作用，我們進一步分析了 G2 患者正常、病灶和病灶皮膚中潛在的免疫上皮通訊網絡，聚焦在小泡間表皮（IFE），毛囊（HF）的比較。），汗腺（SG）和竇道（ST）的比較，如圖 7A-B 中的強度熱圖所示。我們發現巨噬細胞/ DC 與表皮簇的相互作用最強，並且與巨噬細胞/ DC，T 細胞和漿細胞的顯著相互作用的配體-受體對分別如圖 7C，D，E 所示。我們的數據表明 CCL3_IDE 和 CCR2_CCL2 相互作用可能分別發生在具有 IFE 和 SG 的巨噬細胞/ DC 之間，這兩者在建立趨化梯度中都很重要。有趣的是，患者 G2 中的巨噬細胞和表皮之間發生 TNF_TNFRSF1A 相互作用(圖 7C)，而與患者 A1 中的 T 細胞和表皮之間的相互作用更顯著(圖 6E)，這表明不同的 HS 患者可能發生不同的免疫反應。關於 T 細胞，表皮與皮膚的相互作用水平高於皮膚病灶周圍皮膚的附屬器結構（HF 和 SG），甚至與病灶皮膚竇道的相互作用更高(圖 7A，B 和 D)。這與我們對 HS 病變皮膚各個區域中免疫細胞的定量分析一致。在潛在的相互作用中，TNFSF14_LTBR 可能是 HS 中發生的一般相互作用，而 CCL5_ACKR4 和 FASLG_FAS 對 IFE 和竇道更具特異性。

此外，我們調查了 HS 皮膚中漿細胞的存在及其與不同類型的角質形成細胞的潛在相互作用。我們注意到病灶周圍皮膚漿細胞與汗腺之間的相互作用水平很高，以及病灶皮膚漿細胞與竇道之間的相互作用水平很高（圖 7E）。我們發現汗腺細胞表達 JAG1，JAG2，DLL1，這可能與病灶周圍皮膚漿細胞表達的 NOTCH2 相互作用。此外，SG 細胞表達高水平的 CCL2，可作為表達 CCR2 的漿細胞的強化學吸引劑。至於病變皮膚，竇道中的角質形成細胞表達更高水平的 WNT4 和 NRG1，它們可能分別與漿細胞表達的 FZD6 和 LSR 相互作用。在圖 7F 中，我們顯示漿細胞被募集到汗腺和竇道附近，支持了這些結構在 HS 皮膚漿細胞募集中可能具有獨特作用的觀點。重要交互作用的摘要顯示在圖 7G 和 H 中。

Figure 7. Immunogeneity of skin appendages and sinus tracts in HS pathogenesis



第二階段行程紀要：

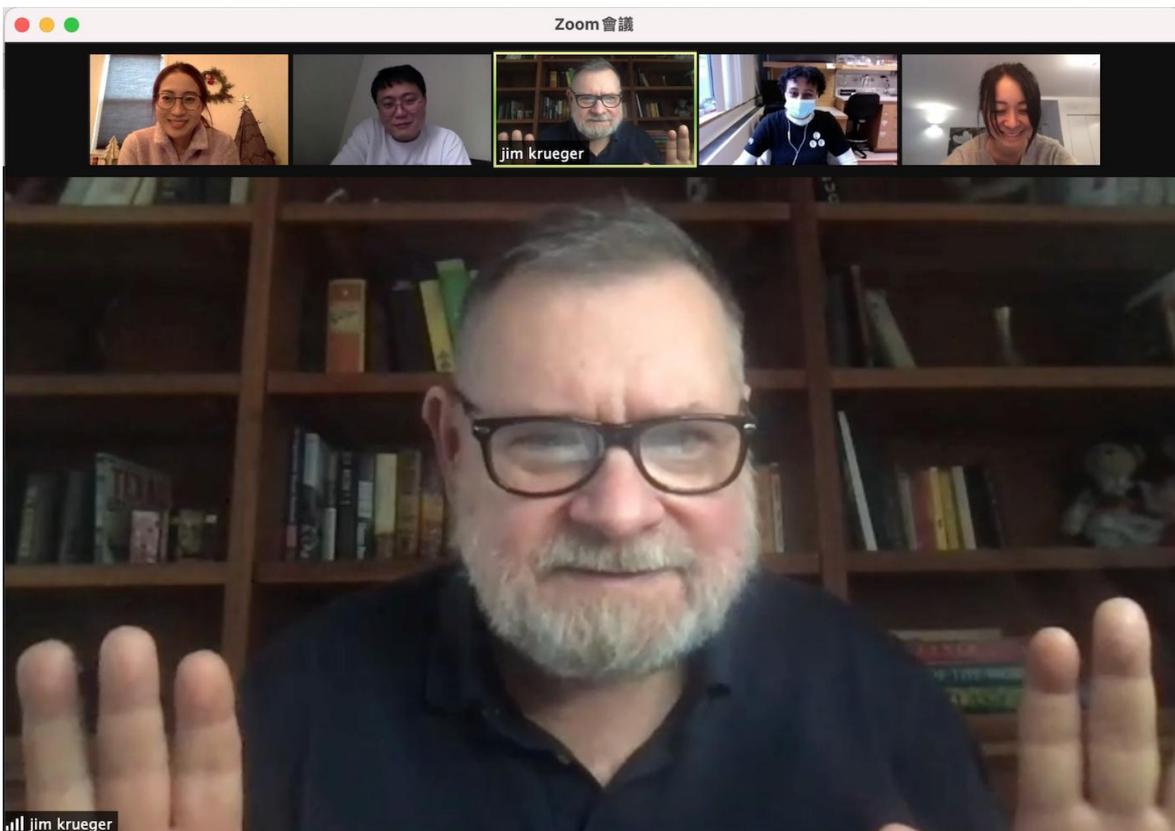
- 2020 年 9-10 月，選定檢體並進行 androgen receptor (AR) 免疫染色，判讀病理切片與免疫染色切片結果。患者的樣本是在 Hansjorg Wyss 整形外科部門通過手術從腋下或腹股溝區域切除的。手術後，我們對組織樣本進行解剖，分離出感興趣的區域，如竇道和發炎的表皮。
- 2019 年 11 月，使用 image J，並用以計算單位面積下的細胞計數。所有的組織切片及免疫染色或是螢光染色皆由我進行查看、評估和量化整個切片圖像。玻片進行掃描之後，圖像是以x100 的放大率拍攝的，用於量化。分別在表皮和竇道中計算 10 個不同的同等大小的區域 (200um*400um)。
- 2019 年 12 月，使用 Prism 進行統計分析並製作圖表。所選區域沿表皮和竇道內襯上皮隨機分佈，不考慮熱區。所有被染色的細胞核都被算作陽性，無論染色強度如何。對該區域表皮和上皮內的所有陽性和陰性細胞進行計數。AR 陽性細胞的百分比是通過總細胞數除以陽性細胞數來計算的。採用單因素方差分析 (ANOVA) 來確定不同患者樣本之間的統計學差異。
- 2021 年 1-2 月，相關文獻蒐集選讀。
- 2021 年 3 月，資料彙整並進行撰稿。
- 2021 年 4-5 月，投稿並進行第一與第二階段審稿，最終獲得 British Journal of Dermatology 期刊刊登 (2021 impact factor: 9.3) (請見附件雜誌原文，文末也特別致謝也嚴慶齡醫學基金會 YEN TJING LING MEDICAL FOUNDATION 補助)
- 2021 年 5 月，國際研究皮膚科會議口頭報告 Society for Investigative Dermatology (SID) (線上會議截圖請見文末附件一)
- 2021 年 5 月，受邀國際會議演講：9th Annual AARS (American Acne and Rosacea Society) Scientific Virtual Symposium (會議議程請見文末附件二)



實驗室成員合影 (疫情爆發前)



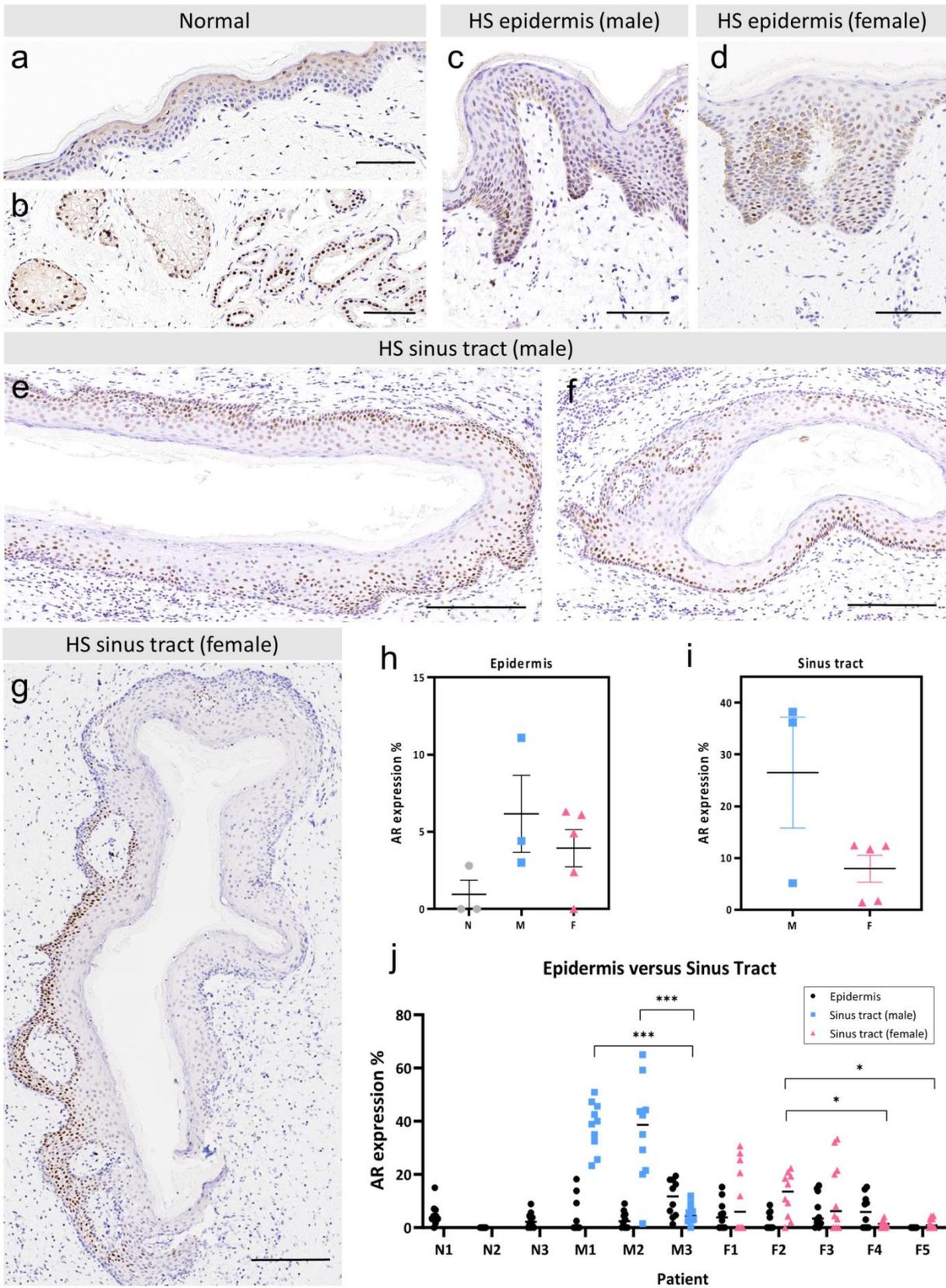
實驗室環境



後疫情時代大多以線上會議為主：與當代乾癬大師 James Krueger 進行討論

第二階段成果摘要：

我們進行了 AR 免疫染色，並量化了正常對照組和 HS 患者皮膚樣本的代表性區域中 AR+角質細胞的百分比。在正常的腋窩皮膚中，表皮的染色並不明顯，而在分泌腺和皮脂腺中檢測到強烈的核染色（圖 1a-b）。在表皮中，HS 的平均 AR+百分比（4.8%）高於正常皮膚（2.6%）（圖 1c-d, 1h）。在 HS 竇道中，男性（圖 1e-f）和女性（圖 1g）患者的襯裡上皮中 AR+細胞的水平明顯較高，與女性（平均 7.6%）相比，男性（平均 26.5%）表現出更高的表達量（圖 1i）。值得注意的是，男性在竇道中表現出廣泛、連續的模式，而女性則表現出節段性、斑塊狀的表達模式（圖 1e-g）。總的來說，竇道中的表達比同一病人的表皮中的表達要高（圖 1j）。重要的是，在兩性中都表現出個體差異性，從極高（M2）到完全陰性（F5）（圖 1j）。



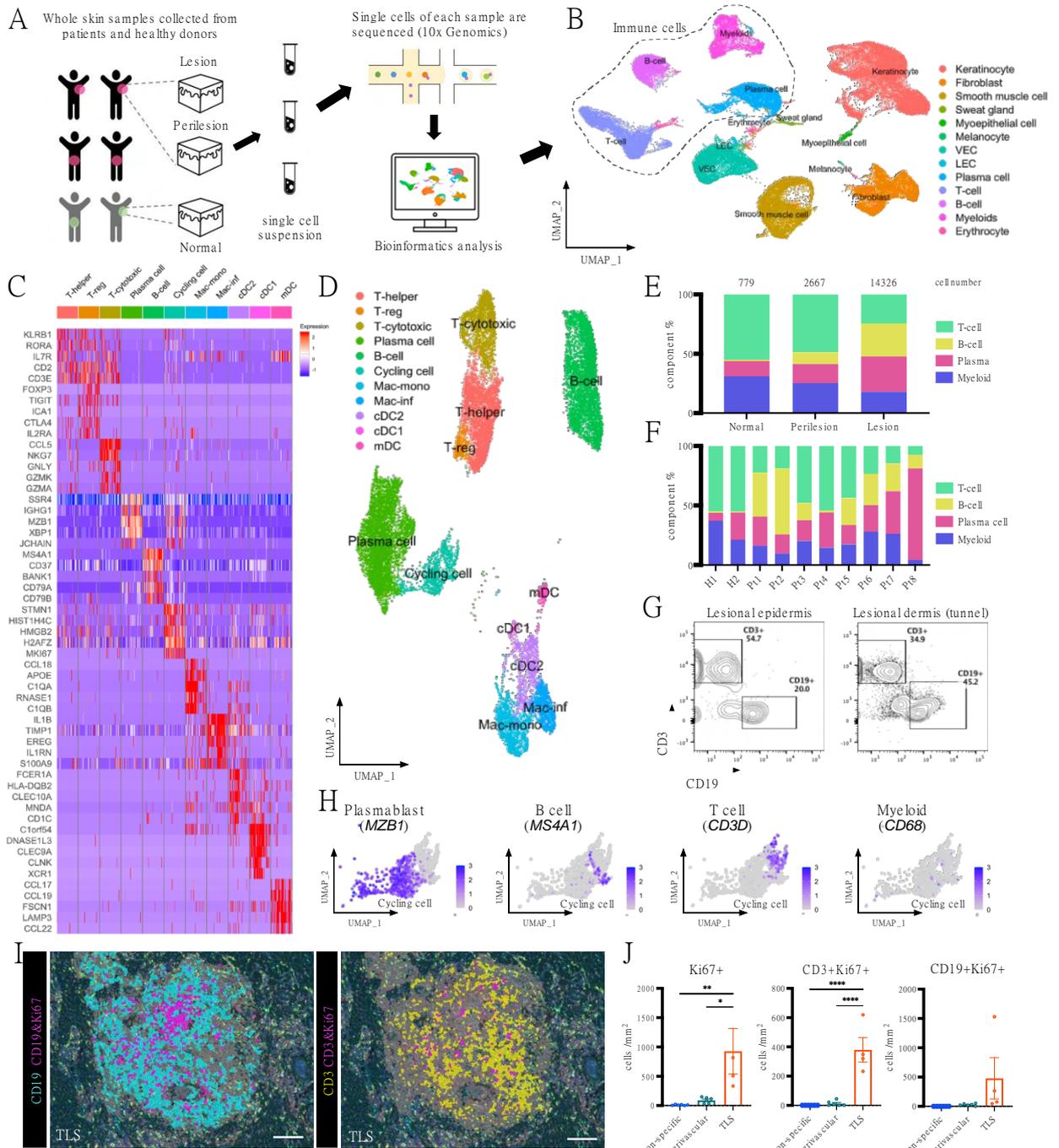
第三階段行程紀要：

- 2021 年 6-8 月，進行化膿性大汗腺炎之「免疫細胞」單細胞 RNA 定序 Single Cell RNA Sequencing 的分析研究中。使用 Seurat R 軟件進行下游生物信息學分析；並根據它們的頂級差異表達基因（DEGs）和已知的標記基因，進一步將它們重新聚類
- 2021 年 9-10 月，為了研究 HS 病變皮膚中增殖免疫細胞的密度和分佈，我們用 Opal® 熒光團進行了多重免疫染色，並使用 InForm® 軟件進一步分析獲得的圖像。學習使用 InForm 軟體進行人工智慧病理判讀與免疫染色切片判讀，學習如何教育人工智慧系統達成繁複的影像計算。
- 2021 年 11 月，進一步產生多組 multiplexed immunostaining 免疫染色切片，並使用 Inform 軟體以計算單位面積下的細胞計數。鑑於 B 細胞和漿細胞在 HS 病變的免疫細胞中的比例明顯升高，我們試圖利用多重免疫熒光（IF）成像和匹配的 scRNA-seq 和單細胞 BCR-seq 分析來了解這些細胞在 HS 病變皮膚中的分佈、特性和克隆性（clonality）。
- 2021 年 12 月，使用 Prism 進行統計分析並製作圖表。為了更好地描述逐步分化的特徵，我們使用 Monocle3 偽時間分析程序建立一個連續的軌跡，觀察從 cDC2s 開始到 mDCs 結束的 DEG 動態。
- 2021 年 1-2 月，文獻蒐集選讀，資料彙整並進行撰稿。學習使用 Bio Render 線上軟體進行醫學卡通示意圖繪製。

第三階段成果摘要：

- 在 HS 中，免疫細胞增殖主要發生在三級淋巴結構（TLS）--類似聚集的地方
為了勾勒出 HS 發病機制中複雜的免疫細胞組成和信號網絡，我們對來自受影響個體腋下或腹股溝區域的 8 個病變皮膚和 6 個周圍皮膚樣本，以及來自相同區域的 2 個正常皮膚活檢樣本進行了單細胞 RNA 測序（scRNA-seq）（圖 1A）。經過質量控制過濾，我們從整個皮膚樣本中共獲得了 68,010 個測序細胞。我們使用 Seurat R 軟件包（4.0.3 版）進行下游生物信息學分析；所有細胞被聚類，然後根據已知的轉錄特徵分配到 13 個主要細胞系，如統一流形近似和投影（UMAPs）所示（圖 1B）。我們分離出四個免疫細胞系（17,772 個細胞），並根據它們的頂級差異表達基因（DEGs）和已知的標記基因，進一步將它們重新聚類為 11 種細胞類型（圖 1C-1D）。正常、周圍和病變皮膚樣本中的免疫細胞組成（圖 1E）顯示，在受 HS 影響的皮膚中，B 細胞和漿細胞有明顯的擴張，這在不同患者中程度不同（圖 1F）。使用 FACS 分析，我們證實在 HS 病變皮膚內，B 細胞在隧道附近比在表皮內更豐富（圖 1G）。值得注意的是，我們發現了一簇循環細胞（MKI67+），主要由漿細胞（MZB1+）組成，其次是 B 細胞（MS4A1+）、T 細胞（CD3D+）和骨髓細胞（CD68+）（圖 1H）。為了研究 HS 病變皮膚中增殖免疫細胞的密度和分佈，我們用 Opal® 熒光團進行了多重免疫染色，並使用 InForm®（2.4.7 版）軟件進一步分析獲得的圖像。我們發現，與血管周圍浸潤和非特異性區域相比，免疫細胞聚集中的增殖細胞（Ki67+）明顯富集，特別是在隧道附近（圖 S1D-S1F）。此外，一些聚集區表現出明顯的 B 細胞（CD19+）和 T 細胞（CD3+）區，呈現出人類疾病中 TLSs 最有序的建築特徵之一（圖 1I-1J）。

Figure 1. Immune cell proliferation occurs predominantly in tertiary lymphoid structure (TLS)-like aggregates in HS



- 具有組織駐留記憶 (T_{rm}) 特徵的 IL17A⁺和 IFNG⁺T 細胞的原位克隆性擴增主要發生在 TLSs 中。

為了了解發生在 HS 皮損中的 T 細胞增殖的結果，我們對 HS 衍生的樣本進行了匹配的 scRNA-seq 和單細胞 TCR 測序 (scTCR-seq)，以檢查 T 細胞的克隆性和獨特的細胞因子特徵。此外，我們對同一患者不同身體區域的外周血和病變皮膚進行採樣，以進一步研究 HS 病變中不斷擴大的 T 細胞克隆（主要在隧道附近的 TLSs）是否有可能通過循環遷移到不同的病變部位。從 5218 個 T 細胞中出現了三個無監督集群，我們根據它們的功能特徵對其進

行了註釋:具有高水平 FOXP3 表達的調節性 T 細胞(T-regs);具有高水平 CTLA4 和 CD40LG 表達的 T 輔助細胞,其中較小的子集也表達 IL17A 和 IL17F;以及具有高水平 NKG7、GZMB、GNLY 和 IFNG 表達特徵的細胞毒性 T 細胞(圖 2A 和 2B)。

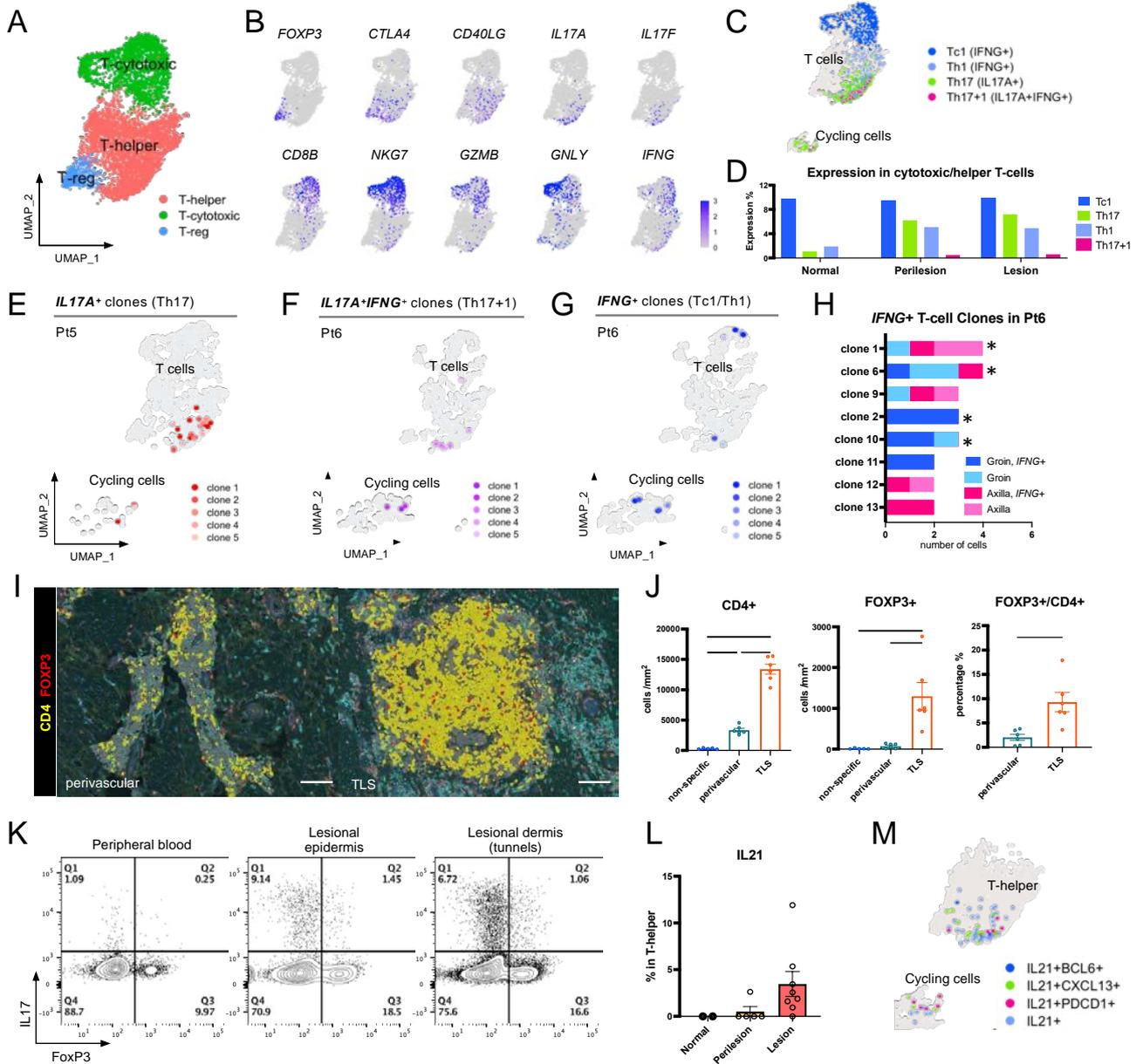
值得注意的是,我們在 HS 樣本中檢測到較高的 Th1 和 Th17 相關基因的表達,與最近的報導一致。我們表明,在 HS 病變皮膚中,9.9%的 T 細胞毒性細胞為 IFNG+;在輔助 T 細胞中,7.2%為 IL17A+ (Th17),4.9%為 IFNG+ (Th1),這兩個百分比都明顯高於正常樣本(圖 2C 和 2D;圖 S2B)。此外,一小部分(0.6%) T 細胞同時表達 IFNG 和 IL17A,並表現出 Th1 和 Th17 細胞狀態的重疊特徵,表明在受 HS 影響的皮膚中存在 Th17.1 反應(或類似 Th1 的 Th17 細胞),儘管是 T 細胞的相對小部分(圖 2C 和 2D)。這一發現進一步強調了 HS 中免疫狀況的複雜性,因為 Th17 細胞轉化為 Th1 樣 Th17 細胞的可塑性最近被認為是在自身免疫和炎症性疾病的發病過程中經常發揮作用的一個特徵。

由於 IL17A+和 IFNG+ T 細胞在 HS 中都被上調,並在 MKI67+循環細胞群中被檢測到(圖 2C),我們試圖通過匹配 scTCR-seq 和 scRNA-seq 結果來研究這些細胞的克隆性程度。我們發現許多頂級克隆,每個克隆都由其相同的互補決定區 3(CDR3)序列定義,都表達 IFNG、IL17A 或兩者,我們進一步表明,在不同的患者中,這些 T 細胞克隆中有許多細胞正在積極增殖(圖 2E-2G),表明 T 細胞向 1 型和 17 型分化的極化在受 HS 影響的皮膚中經歷了克隆性放大。值得注意的是,這些頂級克隆中的大多數具有組織常駐記憶(T_{rm})特徵,表達高水平的 CD69、ITGAE 和 IL32(Pt5 克隆 1-4)。利用我們一次對不同解剖部位的病變皮膚取樣的優勢,我們進一步確定了幾個 T 細胞克隆,它們分佈在同一患者的不同解剖區域(腹股溝和腋窩)(圖 2H)。總之,這些發現表明,在 HS 中,IL17A+和 IFNG+細胞不僅在病變的皮膚組織中增殖,而且還在全身循環。

此外,我們證明,與正常皮膚(3.7%)相比,HS 皮損皮膚中的 T-regs 部分(7.6%)有所增加,並顯示 FoxP3+T 細胞在 TLS 中高度富集(圖 2I 和 2J)。值得注意的是,5.0%的病變 FOXP3+T 細胞共同表達 IL17A。我們通過 FACS 分析進一步驗證了 HS 中 IL17A+ T-反應物的存在,我們在病變真皮中發現 6.0%的 FOXP3+細胞共表達 IL17A,在同一患者的血樣中發現 2.4%(圖 2K)。以前的報告表明,T-regs 中 IL17 的表達與促炎症活動和抑制功能的喪失相對應;因此,HS 皮損皮膚中 T-regs 中 IL17A 和 FOXP3 的異常共表達表明它們的功能可能受到病理損害,為 HS 微環境中的免疫景觀增加了進一步的複雜性。

此外,由於濾泡輔助 T 細胞(T_{fh})在 TLS 的形成中起著關鍵作用,我們調查了 T_{fh} 的標誌性細胞因子基因 IL21 的表達,發現它在病變皮膚的 T 細胞中升高(圖 2L)。許多 IL21+細胞共同表達 BCL6、CXCL13 或 PDCD1,這些都是 T_{fh} 分化的已知標記,其中一些細胞也存在於循環細胞群中,表明 T_{fh} 樣細胞群可能在 HS 病變皮膚中積極擴展,從而支持促進 B 細胞分化和抗體產生的 TLS 的發展(圖 2M)。

Figure 2. *In situ* clonal expansion of IL17A⁺ and IFNG⁺ T cells occurs predominantly in TLSs



- 具有優先使用 **VHJH** 基因的 **B 細胞**和**漿細胞**的原位克隆性擴增主要發生在 **TLSs** 中
鑑於 **B 細胞**和**漿細胞**在 **HS** 病變的免疫細胞中的比例明顯升高 (圖 1E 和 1F)，我們試圖利用多重免疫熒光 (IF) 成像和匹配的 **scRNA-seq** 和單細胞 **BCR-seq** (5-8 號患者) 分析來了解這些細胞在 **HS** 病變皮膚中的分佈、特性和克隆性。我們發現，**B 細胞** (**CD19+**) 主要位於 **TLSs** 的中心，而**漿細胞** (**CD38+**) 則分佈在外圍 (圖 3A)。另一方面，**B 細胞**在血管周圍幾乎沒有，而**漿細胞**則高度集中在那裡 (圖 3A 和 3B)。我們進一步量化了**漿細胞** (**CD38+Ki67+**雙陽性細胞) 的比例，發現這些細胞只存在於 **TLSs** (圖 3B)。此外，比較病變表皮、基底層和隧道區域，我們發現在表皮下聚集的 **B 細胞**和**漿細胞**非常少；相反，它們在隧道附近高度富集，包括**漿細胞** (圖 3C 和 3D)。漿細胞在隧道附近的密集浸潤被 **FACS** 分析進一步證實 (圖 3E)，支持這樣的觀點，即受 **HS** 影響的皮膚中的隧道是高度免疫原性結構，可能引發淋巴細胞聚集。

scBCR-seq 分析發現 **HS** 患者的 **B 細胞**和**漿細胞**有明顯的克隆性擴張。平均而言，我們在每

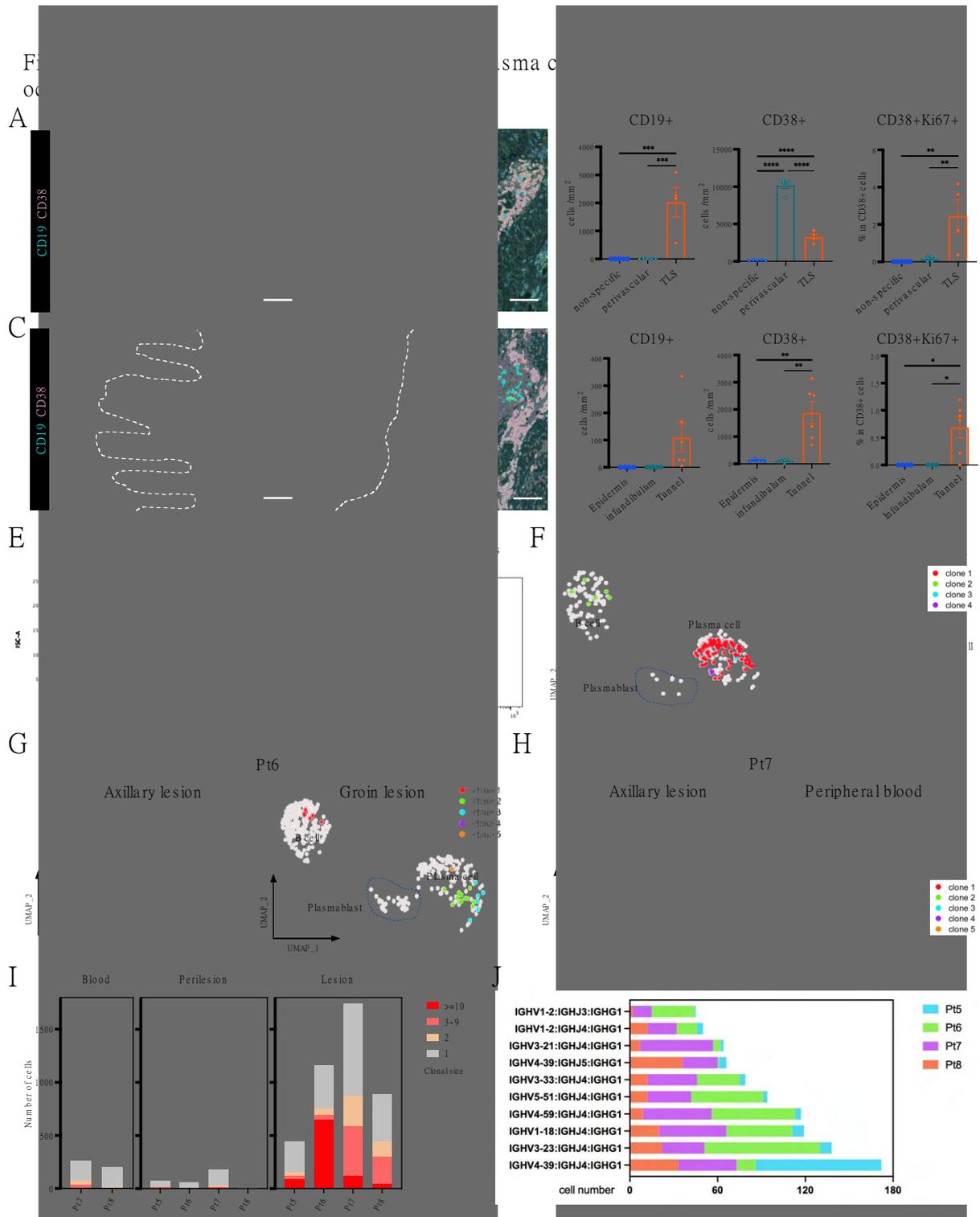
個病人身上檢測到約 740 個獨特的克隆（每個克隆都由相同的 CDR3 序列定義）；其中，在一位病人 Pt5 身上檢測到的最大克隆佔 BCR 重組的 16%，並且完全位於一個結節性病變中（圖 3F）。在 Pt6 中，我們收集了腋下和腹股溝的病變，兩個部位都有相同的 B 細胞和漿細胞克隆（圖 3G）。在 Pt7 中，我們收集了其外周血和腋下皮損皮膚樣本，我們也在兩個部位檢測到相同的克隆（圖 3H）。在 Pt8 中，大部分的優勢克隆是在具有廣泛隧道結構的病變組織中發現的，在其他病變皮膚區域檢測到的細胞很少。值得注意的是，我們在所有被檢查的病人中都發現了含有活躍的循環細胞（漿細胞）的克隆細胞，這表明在受 HS 影響的皮膚中發生了漿細胞的局部活化。綜上所述，這些結果證明了 B 細胞和漿細胞在 HS 病變皮膚內的原位克隆性擴張，同時也提供了證據，證明與疾病相關的 B 細胞和漿細胞通過循環在病變部位之間流動。

此外，我們發現，與周圍和血液樣本相比，較大的克隆在病變樣本中特別豐富（圖 3I），在病變皮膚中，40.1% 的所有測序細胞屬於有三個或更多細胞的克隆，21.0% 屬於有 >9 個細胞的克隆，表明 HS 病變皮膚中克隆型的數量和多樣性更大。我們進一步分析了 BCR IgH V(D)J 段在免疫球蛋白複合物中的使用頻率，並確定了幾種使用頻率較高的組合，並且是所有 4 名（圖 3J）或 4 名患者中的 3 名所共有。在多名 HS 患者中鑑定出某些共同優先使用的 VHJH 基因，表明在長期慢性炎症期間，類似的 B 細胞抗原可能存在於病變的皮膚中，從而引發持續的克隆性擴張。

- HS 皮損皮膚中朗格漢斯細胞減少，CCR7+CCL19+ 遷移性樹突細胞增加

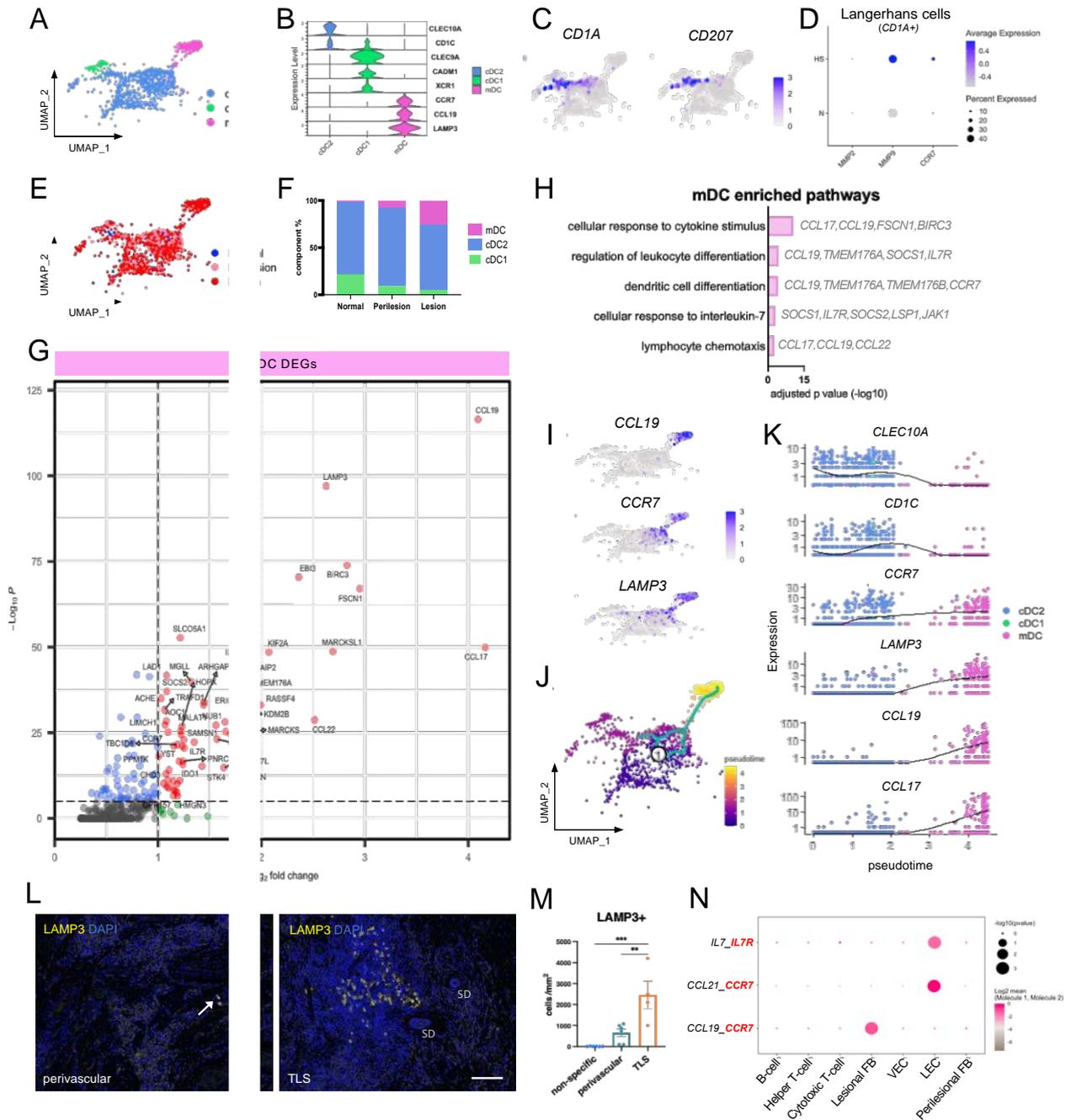
鑑於激活的樹突狀細胞（DCs）在其他皮膚炎症性疾病的極化炎症反應中起著關鍵作用，我們試圖了解 HS 病變皮膚中不同類型的 DCs 如何有助於 HS 的發病機制和 TLSs 的組織。根據已知的標記，總共有 1308 個細胞被聚類並被註釋為三個不同的 DC 群體：遷移性 DCs（mDCs）、常規 DC1s（cDC1s）和常規 DC2s（cDC2s），其中還包括 CD1A+ 和 CD207+ 朗格漢斯細胞的子集（圖 4A-4C）。由於朗格漢斯細胞在皮膚中具有重要的調節作用（Rajesh 等人，2019 年），我們發現耐人尋味的是，與正常皮膚（20.51% CD207+）相比，這些專門的抗原呈遞細胞在 HS 病變皮膚的 DC 群體中的比例明顯減少（5.78% CD207+），與最近的一項研究一致。我們還檢測到 HS 朗格漢斯細胞中 MMP9 和 CCR7 的上調，這可能有助於它們的遷移特性和離開病變皮膚（圖 4D）。

分析三個 DC 集群的各自比例，我們發現 HS 病變皮膚中的 mDCs 明顯增加（圖 4E 和 4F）。為了研究 mDCs 的獨特分子特徵，我們比較了 mDC 和 cDC 集群的 DEGs（圖 4G）。進一步對 mDCs 中的 DEGs 進行路徑分析，發現它們的分化和激活狀態，以及它們在調節淋巴細胞分化、趨化和 IL-7 信號傳導方面的潛在作用（圖 4H）。在 mDCs 排名靠前的 DEGs 中，我們確定了 CCL19 和 CCR7，這對配體/受體對適應性免疫反應中的遷移信號很重要（圖 4G-4I），表明 mDCs 之間以及 mDCs 與其他細胞類型之間可能發生自分泌和旁分泌信號。此外，我們發現成熟樹突狀細胞的標誌 LAMP3 在 HS 病變皮膚的 mDC 中獨特地高度表達（圖 4G 和 4I）。在 UMAP 上觀察到的從 cDC2c 到 mDCs 的連續性表明了細胞狀態之間的連續分化。為了更好地描述逐步分化的特徵，我們使用 Monocle3 偽時間分析程序建立一個連續的軌跡，其中觀察到的細胞從 cDC2s 開始到 mDCs 結束（圖 4J）。圖 4K 進一步顯示了 cDC2s 和 mDCs 中的 DEG 動態，沿著偽時間路徑，CCR7 在 LAMP3 和 CCL19 之前激活。這些結果表明，病變的 mDCs 可能來自組織駐留的 cDC2，代表了 HS 皮膚的激活細胞狀態。



由於 CCL19 對 TLS 的形成至關重要，並在 mDCs 中高度表達，我們試圖了解 mDCs 在 HS 病變皮膚中的分佈。使用 LAMP3 作為 mDCs 的標記，我們檢測到 mDCs 在 HS 皮膚的 TLS 中比血管周圍和非特異性區域明顯富集（圖 4L 和 4M）。此外，我們發現兩個重要的受體基因 CCR7 和 IL7R 也在 mDCs 中高表達，接下來我們使用 CellPhoneDB v.2.0 數據庫工具來研究與 mDCs 的潛在相互作用夥伴（圖 4N）。我們發現，mDCs 上的 IL7R 被確定為與淋巴內皮細胞（LECs）的 IL7 相互作用的伙伴，mDCs 上的 CCR7 分別與病變成纖維細胞的 CCL19 和 LECs 的 CCL21 相互作用。總的來說，這些結果表明 mDCs 在協調 TLSs 內免疫細胞和間質細胞之間的細胞間信號網絡方面發揮著積極作用。

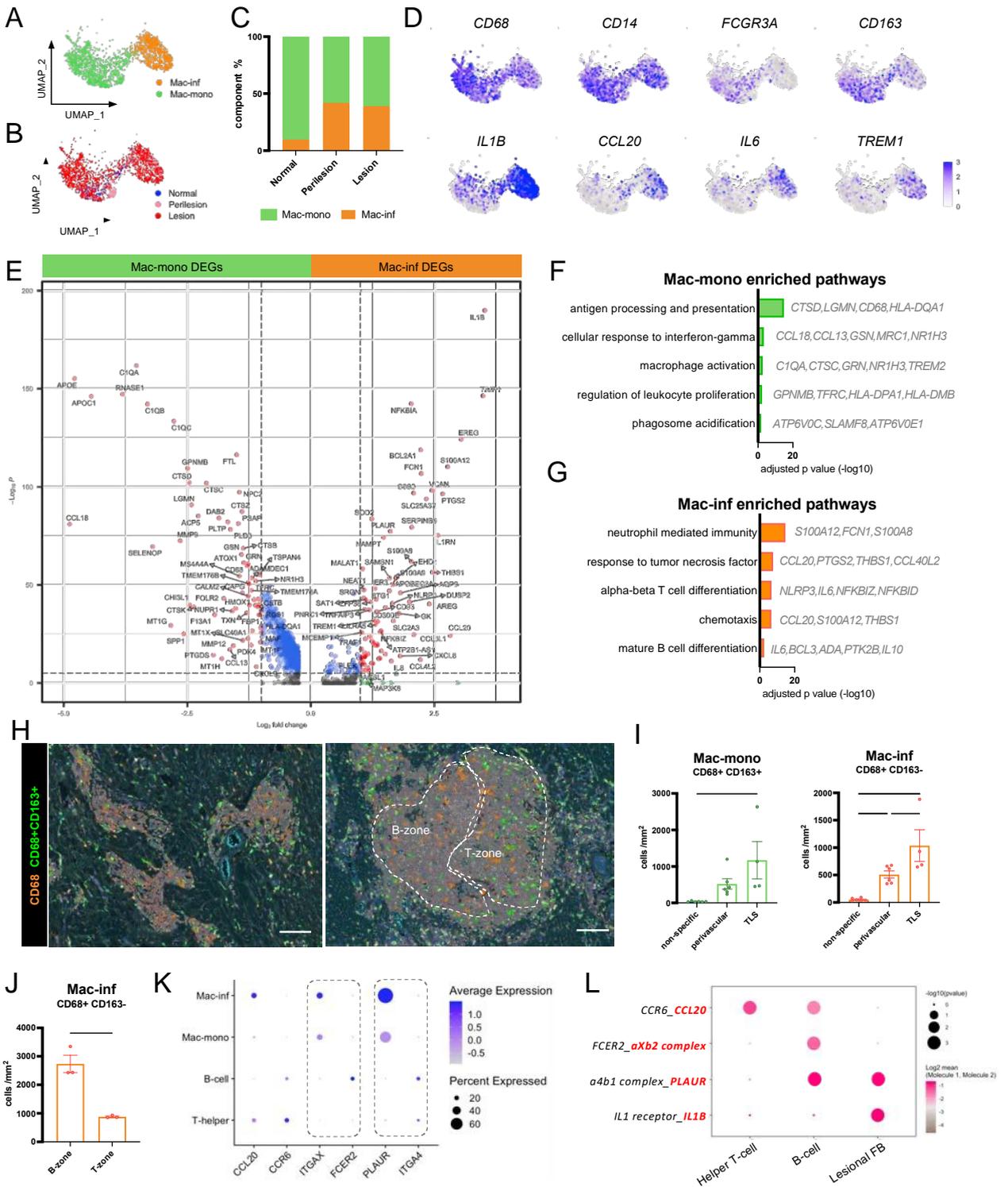
Figure 4. Langerhans cells are reduced and CCR7⁺CCL19⁺ migratory dendritic cells are increased in HS lesional skin



● 兩種功能不同的巨噬細胞在 TLSs 中富集

從我們的 scRNA-seq 數據來看，2,185 個細胞被聚類為兩個巨噬細胞（CD68⁺）亞群，即單核細胞衍生的巨噬細胞（Mac-mono）和炎症巨噬細胞（Mac-inf），後者在受 HS 影響的皮膚中明顯增加（圖 5A-5C）。值得注意的是，組織常駐巨噬細胞（LYVE1⁺）的百分比從正常皮膚的 61.5% 明顯減少到 HS 影響皮膚的 1.6%，表明 HS 病變皮膚在維持組織平衡方面存在潛在缺陷，並與組織纖維化有關。單核細胞衍生的巨噬細胞顯示出更高的經典標誌物 CD68、CD14、FCGR3A 和 CD163 的表達，而炎症巨噬細胞表達炎症細胞因子 IL1B、CCL20、IL6 和 TREM1（觸發受體在骨髓細胞 1 上表達）（圖 4D）。獨特的是，TREM1 在 IBD 和鱗狀細胞癌中也被巨噬細胞表達，並被提議作為其他慢性炎症和腫瘤的潛在治療目標。

Figure 5. Two functionally distinct types of macrophages are enriched in TLSs



通過分析兩個集群的 DEGs 和生物過程，我們發現 Mac-mono 在抗原處理和表達方面具有功能優勢，而 Mac-inf 在細胞因子的產生、趨化以及 T 和 B 細胞分化方面具有重要作用（圖 5E-5G）。根據 scRNA-seq 數據中兩種巨噬細胞群的表達模式，我們用 CD163 表達水平來區分這兩種細胞類型，並通過多路免疫熒光組織染色分析它們在 HS 病變皮膚中的區域分佈。我們發現，單核細胞衍生的巨噬細胞（CD68+CD163+）和炎症性巨噬細胞（CD68+CD163-）都在 TLSs 中明顯富集（圖 5H 和 5I）。更具體地說，在一些組織較好的 TLSs 中，與 T 細胞區相比，炎症性巨噬細胞（CD68+CD163-）優先位於 B 細胞區（圖 5H 和 5J），表明炎症性

巨噬細胞和 B 細胞之間的相互作用水平在 TLSs 內有所提高。

這一耐人尋味的觀察促使我們去尋找潛在的互動夥伴。我們首先確定了所有有助於巨噬細胞和 B 細胞之間相互作用的潛在配體/受體對，並具體分析了它們在 Mac-inf 和 Mac-mono 中的基因表達水平（圖 S4E）。我們發現，Mac-inf 表達的編碼 ITGAX（aXb2 複合物）和 PLAUR 的基因水平更高，它們可能分別通過 FCER2 和 ITGA4（a4b1 複合物）與 B 細胞相互作用（圖 5K 和 5L）。Mac-inf 的 CCL20 可能通過 CCR6 誘導 T 細胞和 B 細胞的趨化性（圖 5K 和 5L）。重要的是，鑑於 IL1B 的表達是 HS 中 Mac-INF 最突出的特徵，我們發現在所有的細胞類型中，病變的成纖維細胞被確定為 Mac-INF 表達的 IL1B 的首要交互夥伴，因為它們表達的 IL1R 水平最高（圖 5L），顯示了免疫細胞和間質細胞之間的顯著串擾。

- HS 中的 CXCL13hi 和 CCL19hi 病變成纖維細胞表現出與 SLO 的基質細胞相似的特徵。

為了研究成纖維細胞對 TLS 形成的貢獻，我們對 7,849 個成纖維細胞進行了聚類，並根據標誌性轉錄物確定了四個亞群：乳頭狀（APCDD1+）、網狀（MFAP5+）、CCL19hi 和 CXCL13hi 成纖維細胞（圖 6A）。我們檢查了這些群體在正常、周圍和病變樣本中的百分比，令人驚訝的是，病變皮膚中超過一半的成纖維細胞（55.2%）是由 CXCL13hi 群的細胞組成的（圖 6B）。我們通過定量 PCR（qPCR）證實了 HS 病變皮膚中 CXCL13 的這種上調。

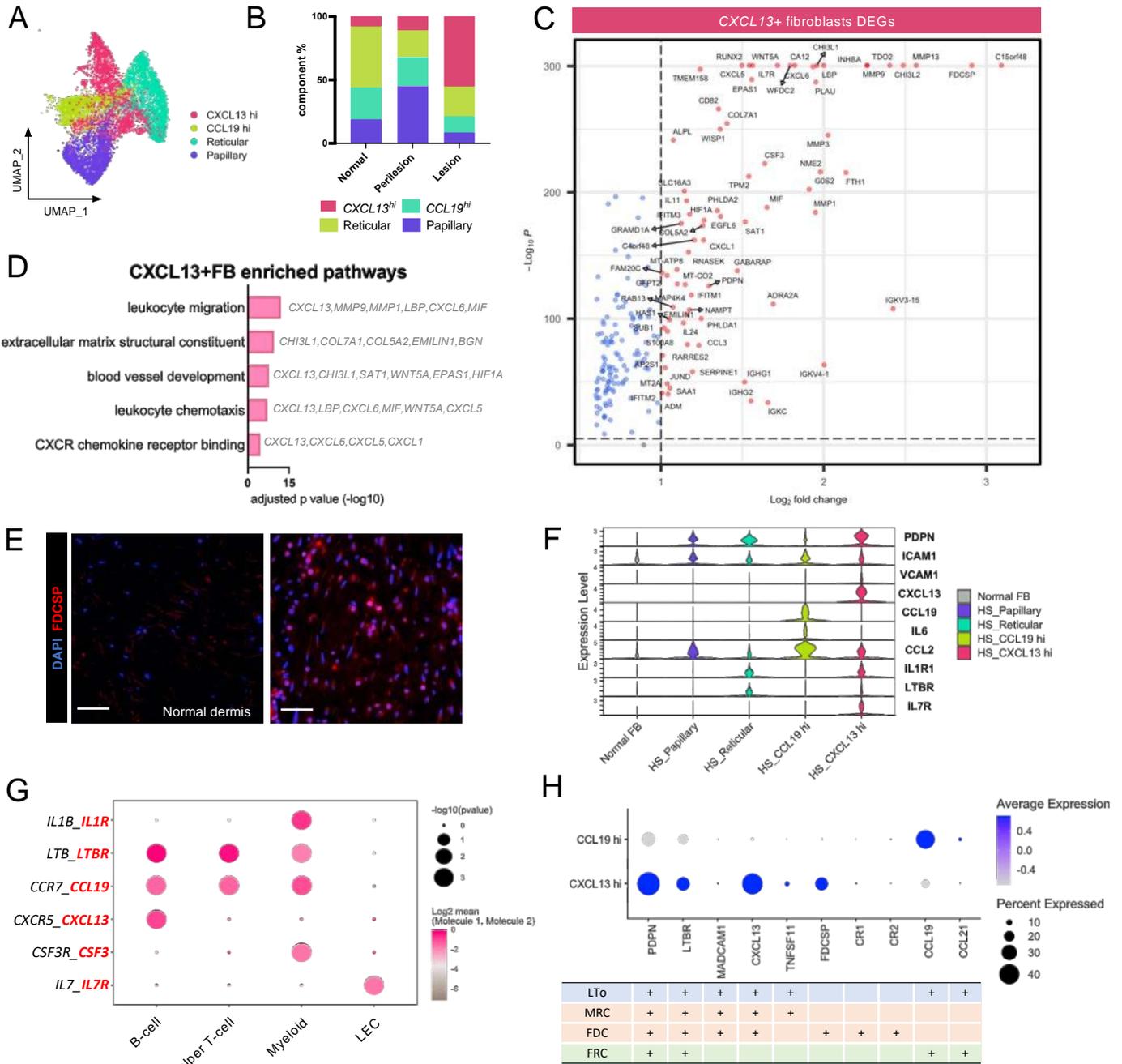
鑑於 CXCL13 在 B 細胞招募和淋巴器官形成中的重要作用，我們首先試圖了解 HS 皮膚的這種 CXCL13hi 成纖維細胞群是否表現出類似於二級和三級淋巴器官基質細胞的其他特徵。通過 DEGs 和通路分析，我們發現這些 CXCL13hi 成纖維細胞可能參與細胞外基質重塑、血管發育和白細胞趨化，表明 HS 病變皮膚中間質細胞和免疫細胞之間存在密集的信號串擾（圖 6C 和 6D）。最耐人尋味的是，我們發現 FDCSP（濾泡樹突狀細胞分泌蛋白）在 CXCL13+ 人群中高度表達，該蛋白編碼由濾泡 DC（FDCs）分泌，專門與激活的 B 細胞結合。FDCSP 在病變的成纖維細胞中的表達通過 IF 染色得到證實（圖 6E）。

在這些成纖維細胞群中表達的頂級基因中，我們發現在 HS 病變中，形成 TLS 的關鍵成分被明顯上調（圖 6F）。首先，PDPN（podoplanin）的表達在淋巴結構的發展中至關重要，在 HS 病變的成纖維細胞中被上調，並且在所調查的細胞類型中 CXCL13hi 細胞的表達最高。我們還發現粘附分子的表達增加：例如，支持免疫細胞保留的 ICAM1（細胞內粘附分子 1）在所有成纖維細胞群中都上調，而 VCAM1（血管細胞粘附分子 1）在 CXCL13hi 成纖維細胞中輕微上調。值得注意的是，CXCL13 和 CCL19 這兩種對淋巴器官形成至關重要的趨化因子在兩個不同的集群中高度表達；此外，CCL2、IL6 和 CCL21 也在 CCL19hi 集群中表達，突出了其促炎狀態。此外，對淋巴組織內信號傳導很重要的受體，包括 IL1R1、LTBR 和 IL7R，在 CXCL13hi 和網狀成纖維細胞中高度表達，表明這些可能是接受這些炎症刺激的主要細胞類型，並進一步建立信號傳導的正反饋。利用所有細胞類型內特定的細胞因子-受體配對，我們證明這些成纖維細胞與淋巴細胞、髓細胞和 LECs 表現出強烈的相互作用，並可能在協調免疫-間質細胞交叉對話以促進 HS 中 TLSs 的形成中發揮核心作用（圖 6G）。

鑑於 CXCL13 和 CCL19 是由次級淋巴器官（SLOs）中的邊緣網狀細胞（MRCs）和濾泡網狀細胞（FRCs）產生的標誌性細胞因子（Barone 等，2016；Gago da Graça 等，2021；Katakai，2012），我們接下來研究 CXCL13hi 和 CCL19hi HS 成纖維細胞是否表達與 SLOs 中基質細胞相似的一組標誌性基因。如圖 6H 所示，CXCL13hi 成纖維細胞表達的基因是由 MRC 和 FDC 專門表達的，如 TNFSF11（RANKL）和 FDCSP，而 CCL19hi 成纖維細胞表現出與 FRC 更相似的獨特表達（CCL19 和 CCL21），顯示了兩種類型的成纖維細胞的明確極化，共同支持

HS 病變皮膚的淋巴結構形成。

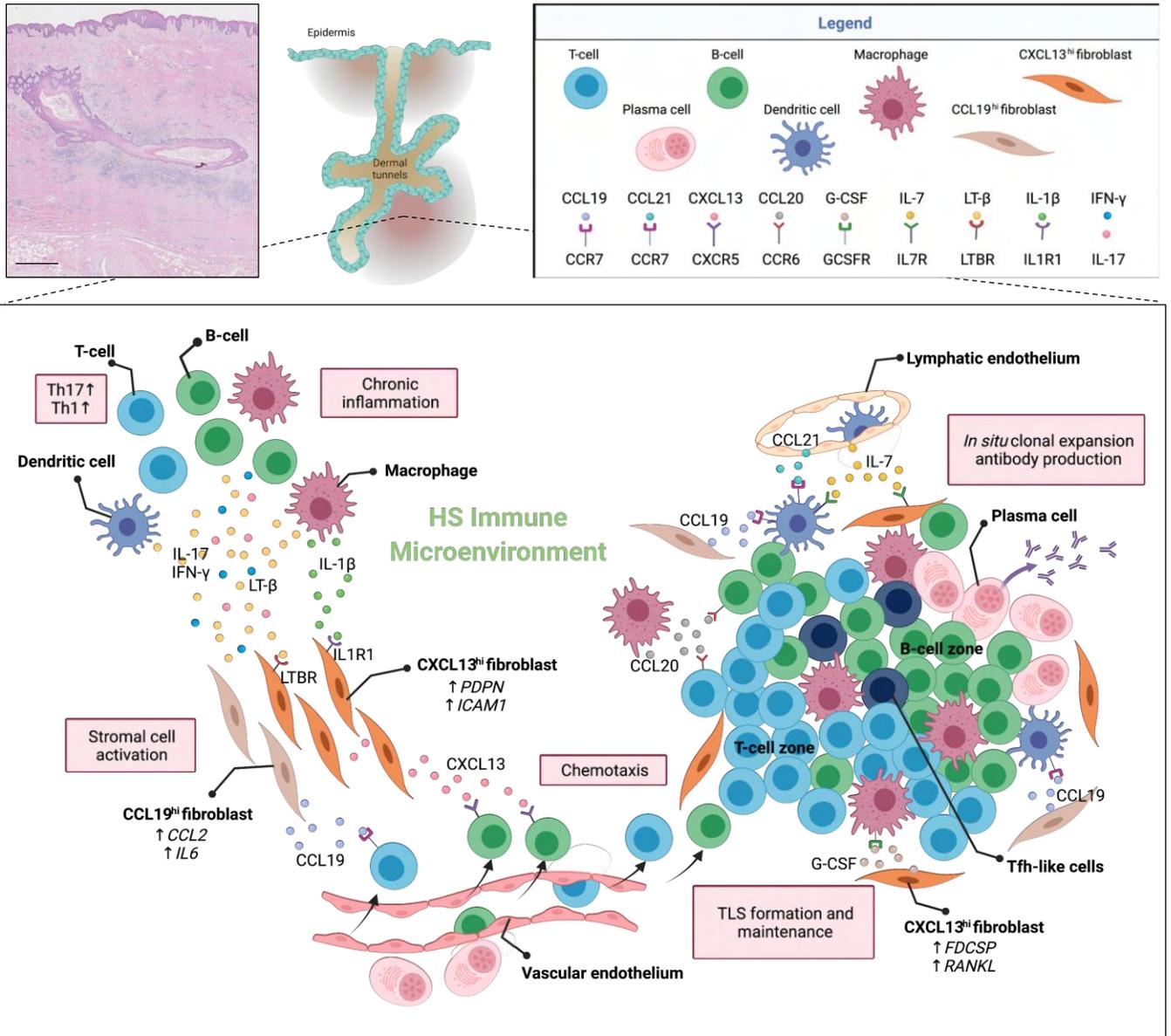
Figure 6. *CXCL13^{hi}* and *CCL19^{hi}* lesional fibroblasts in HS exhibits similar features to stromal cells of SLOs



目前對 HS 的免疫反應和治療目標的理解主要集中在 T 細胞和骨髓細胞上，因為這些細胞類型長期以來被認為是炎症性皮膚病的主要參與者。然而，並非所有患者在接受針對這些免疫細胞的治療後都有令人滿意的結果，導致臨床醫生和研究人員猜測，涉及其他免疫細胞類型以及非免疫細胞的機制在疾病進展和慢性化中也很重要。在這項工作中，我們剖析了 HS 病變皮膚中的免疫和非免疫細胞的景觀、動態和功能特徵，並以單細胞分辨率分析了它們的細胞間相互作用。我們證明，HS 皮損皮膚包含 TLS，由有組織的 B 細胞和 T 細胞區、抗原呈遞的骨髓細胞以及富含成纖維細胞和內皮細胞的支持性基質細胞網絡組成。這些都為維持慢性炎症和可能的局部抗體產生提供了一個最佳的生態位（圖 7），因為 B 細胞的聚集可能反映了對皮膚相關抗

原的反應。

Figure. 7. Graphic summary and hypothetical model of TLS formation in HS lesional skin



三、心得及建議

研習心得

- **非常感謝院方的支持**：讓我能有此榮幸，參與紐約大學整形外科關於化膿性大汗腺炎 HS 的研究，除了能加入世界頂尖的生物醫學實驗室拓展視野，還可以著手處理高端又先進的科技產物與基因資訊：單細胞 RNA 定序 Single Cell RNA Sequencing。
- **隔行如隔山**：面對著這個數據排山倒海而來的時代，醫學背景出身的臨床醫師其實很難在未經訓練的狀況下立即處理大量的數據資訊。在這次的進修研究中，我進入了未知的領域，一腳跨入 data science 的世界。我本身的專業是皮膚與病理，在出國以前，不論是臨床工作或醫學研究，傳統上以形態學(morphology)為主流並輔以生物標靶(biomarker)的依據，一直是過去我所熟悉的臨床病理診斷模式。近年來隨著分子轉錄生物學技術的不斷突破，Single cell 單細胞分離及基因定序技術的成熟，在縮小到單一細胞的極高解析度技術下，也相對伴隨而來大量的定序資料，而這些巨量數據更提高了後續分析的門檻，特別是對於沒有資訊工程相關背景的臨床醫師們。隔行如隔山，為了要能夠進行這些大數據的分析並取得有意義的生物資訊，我需要重頭學習的技能非常多：包括學習操作 R 語言，使用 R studio 來運算大量的生物基因資訊，進行各種視覺化的套件，大數據細胞品質管控(Cell quality control)、正規化(Normalization)、群集分析(Cluster analysis)、差異性表現基因分析(Differentially expressed genes analysis)、生物標靶基因分析(Marker identification)、GO 分析(Gene ontology analysis)，搭配 scRNA-seq 和 BCR-seq/TCR-seq 來分析 clonality，甚至是使用 Monocle 偽時間分析程序建立一個連續的 DEG 動態軌跡...等等的流程，對我來說已經不只是嶄新的知識領域，甚至是過去完全沒聽過也無法理解的語言與專有名詞。雖然起初學習處理數據與做這些運算對我來說非常陌生，但在艱困的入門之後也因為不斷使用漸漸能夠上手並產生興趣，即便不需要完全理解每種運算背後的身後理論，也逐漸能夠從數據海中成功擷取有意義的資訊，也越做越覺得有趣並有成就感。
- **人生沒有什麼路是白走的**：慶幸自己獨特的雙專科背景（解剖病理專科與皮膚專科）能夠有所發揮。除了要學會處理與運用龐大的數據之外，真正的考驗其實是要能從在這些繁複龐雜的大量訊息中擷取出有價值的生物意義，此時過去的皮膚科臨床經驗與病理科的訓練基礎突然成為了我在分析資料上最有力的資產。將近十年的住院醫師生涯與困難的雙專科醫師訓練雖然辛苦，很高興自己還是努力一步一腳印的走了過來。對各類細胞標記的熟悉讓我能相對容易的辨識細胞群集，對組織病理及各種免疫染色的檢閱能力也在活體標本的驗證上順利進行，對皮膚科各種治療標的的知識也幫助了後續的臨床應用與資訊分析。非常榮幸有機會在 Lu 實驗室從事化膿性皮炎 HS 項目，在皮膚病理學方面的專業知識和臨床實踐經驗能夠成為團隊的重要補充，為基礎研究和轉化醫學搭建橋樑。
- **有臨床價值的發現更值得深入探究**：針對化膿性大汗腺炎的檢體，我們發現在一些病人的皮膚竇道中有表現 AR 免疫反應性，這不僅支持了 HS 的雄性激素基礎提供了額外的證據，而且還闡明了抗雄性激素治療的可能機制。雖然需要進一步的實驗和全面的臨床病理研究來證實雄性激素在 HS 中的作用，但這個發現對臨床治療相當具有突破性。在研究中心主持人 Lu Pei-ju 教授的指導與強大的實驗室夥伴們支持下，整理資料並經過統計分析，一篇篇化膿性大汗腺炎的論文逐漸形成，從門外漢到文章產出並投稿，甚至獲得頂尖期刊

(British Journal of Dermatology, IF: 9.3) 的發表，都是我在出國前沒有預期的成果。目前雖然手上還有兩個文章待完成，也已經進入收尾的階段了。這兩年來實在學到很多新技能，跨足到生物信息學(bioinformatic)的領域也是行前未能預期的，覺得很榮幸也非常充實。期待未來回國還能繼續與目前的實驗室進行跨國合作，延續進修時候的研究能量。

- COVID-19 的衝擊與反思：疫情之下看到不同民族，不同政體，不同文化的人們有著非常不同的反應與作為。整個世界一片兵荒馬亂的時候，台灣卓越的抗疫成績也讓在海外的我感受到榮光。這波疫情也凸顯了台灣醫療在某種程度上的成功，雖然疫情尚未結束，未來還有很長的路要走，身為曾在海外的台灣人我十分心存感激，感謝醫界的前輩與同事們配合政府防疫，上下一心堅守崗位，非常不容易的一路守護台灣人民的健康至今。

計畫成果

- 論文標題「化膿性汗腺炎的竇道中雄激素受體免疫反應性的新證據：性別和個體變異性的評估」 “Novel Evidence of Androgen Receptor Immunoreactivity in Sinus Tracts of Hidradenitis Suppurativa: Assessment of Gender and Individual Variability” “已刊登於皮膚科頂尖期刊 British Journal of Dermatology (2021 Impact Factor 9.3)。(請見附件雜誌原文，文末也特別致謝也嚴慶齡醫學基金會 YEN TJING LING MEDICAL FOUNDATION 補助)
- 論文標題「在單細胞 RNA 定序解析度下分析化膿性大汗腺炎竇道與皮膚附屬器之細胞命運二元性和免疫原性」 “Cell Fate Duality and Immunogenicity within Sinus Tracts and Skin Appendages in Hidradenitis Suppurativa at the Single-Cell Resolution” “已進入投稿階段，期能儘早獲得知名期刊刊登。
- 論文標題「化膿性大汗腺炎中三級淋巴細胞結構中廣泛的淋巴細胞克隆擴」 “Extensive Lymphocyte Clonal Expansion in the Tertiary Lymphoid Structures in Hidradenitis Suppurativa” “已進入投稿階段，期能儘早獲得知名期刊刊登。
- 國際會議口頭報告：2021 年 Society for Investigative Dermatology (SID) (線上會議截圖請見文末附件一)
- 受邀國際會議演講：9th Annual AARS (American Acne and Rosacea Society) Scientific Virtual Symposium (會議議程請見文末附件二)
- 目前仍有在進行化膿性大汗腺炎之「免疫細胞」單細胞 RNA 定序 Single Cell RNA Sequencing 的分析研究中，期待能有更多突破性的發現，除了提升對此疾病更多微觀免疫學的知識，也有機會找到未來治療標靶。^{[1][2]}

研習成果之學術或應用價值

- 在目前的 HS 臨床指南中使用抗雄激素治療，證據級別較低。提出有力建議的主要限制是缺乏隨機對照試驗，因為大多數現有的研究都是病例係列或病例對照的設計，其結果衡量標準不一。在我們的研究中，在女性患者中觀察到的竇道的節段性染色模式導致了這樣的假設：AR 免疫反應性可能與治療反應性有關。如果表達 AR 的細胞負責 HS 中內臟器官的雄激素敏感性，那麼不表達或低表達可以解釋一些患者報告的抗雄激素治療的無反應性或部分反應性，甚至可以作為未來抗雄激素療法的潛在預測因素。需要進一步的實驗和全面的臨床病理研究來證實雄性激素在 HS 中的作用。我們的研究結果不僅為支持 HS 的雄

性激素基礎提供了額外的證據，而且還闡明了抗雄性激素治療的可能機制。當前正在進行的 HS 臨床試驗的生物製劑包含阻斷 IL17A- (Secukinumab, Bimikizumab, Ixekizumab), TNF- (Adalimumab, Etanercept, Infliximab), IL1- (Anakinra 和 Bermekimab) 和 LFA1- (Efalizumab) 等。由於 HS 發病機理尚未得到充分了解，因此我們的研究對這些療法的療效提供了重要的啟示。

- 我們發先，在受 HS 影響的皮膚中，有淋巴細胞和骨髓細胞創造了富含 IL-17、IFN γ 、IL-1 β 和 LT β 的炎症環境，與表達 CXCL13 或 CCL19 的間質細胞相結合，共同組織淋巴結構，使疾病惡化，維持慢性炎症。我們發現間質基質細胞，如成纖維細胞和內皮細胞，不僅表達編碼相應受體和細胞因子的基因與免疫細胞相互作用，而且在 SLOs 中表現出作為結構和功能組織者的基質細胞的特徵，這表明正常發育過程中淋巴組織的基本原則在慢性疾病環境中被再現。我們的研究結果提供了對一些 HS 患者對針對免疫細胞的經典生物療法難治的機制的見解，並指出未來需要潛在的聯合療法來最有效地干預慢性炎症性疾病中 TLS 相關的微環境。

應用及推廣

- 預期未來幾年，乘載大量數據的轉錄醫學，圖像數位化乃至於人工智慧的醫療研究發展在臺灣都會越來越普及，能夠有機會提前到國外接觸並學習處理先進的數位資訊是可貴的經驗，期盼在將來面對更多新進的數位資訊可以更快上手也能提供相關的經驗分享。
- 積極發展皮膚病理的業務與成立皮膚病理數位中心，配合院方政策，近期在病理全面數位化之後可以嘗試設計一些人工智慧輔助影像辨識的疾病模式與研究方向，期望也能繼續申請院內研究計畫補助，甚至國科會研究計畫補助以利後續研究進行。
- 繼續與紐約大學 Lu 實驗室進行長期的跨國學術交流與合作關係，除了開發更多相關研究項目，也可以成為本科後進將來出國進修的管道之一。
- 在全球疫情趨於穩定之後，積極參與國際間皮膚科各項領域會議，與其他國家的專家學者面對面討論與溝通，藉此提升本院國際知名度與能見度，締結更多國際合作機會。

附錄

附件一

國際會議演講：2021 SID (Society for Investigative Dermatology) Virtual Meeting

會議期間：2021年5月3日至2021年5月8日

姓名：游偉雯 Wei-Wen Yu

報告內容：在單細胞分辨率下定義化膿性汗腺炎的適應性和先天性免疫細胞特徵

Defining Adaptive and Innate Immune Cell Profile in Hidradenitis Suppurativa at the Single Cell Resolution

The screenshot shows a virtual meeting interface. At the top is a green navigation bar with the SID logo and menu items: HOME, THEATER, CONCURRENTS, POSTER HALL, EXHIBITS, NETWORKING, RESOURCES, ENGAGEMENT, HELP, and a search icon. Below the navigation bar, on the left, is a poster for the presentation '030 Hidradenitis Suppurativa: Immune Cell Profiles in scRNAseq' by Wei-Wen Yu. The poster text describes the study: 'Hidradenitis suppurativa (HS) is a severe chronic inflammatory skin disease lacking effective therapeutic options due to little understanding of the complex immune response within the lesional skin. Using single-cell transcriptomic analysis, we examined the signature changes in each immune cell types during HS progression, as well as in silico ligand-receptor predictions between different immune cell types to construct the interaction network that contributes to HS pathogenesis.' Below the poster is a 'Staff' and 'Guests' section showing 'Currently there are no users online.' On the right, a large slide displays the presentation title 'Defining Adaptive and Innate Immune Cell Profiles in Hidradenitis Suppurativa at the Single Cell Resolution' by Wei-Wen Yu, M.D., from the Laboratory of Catherine Lu, Department of Plastic Surgery, NYU Langone Health, New York, New York, and the Department of Dermatology, Kaohsiung Veterans General Hospital, Taiwan. Below the slide is a chat room with messages from ROSA LOPEZ, Erin Theisen, MD, PhD, and Wei-Wen Yu, MD. The chat messages discuss the role of neutrophils in HS and the challenges of capturing them in scRNAseq data.

附件二

受邀國際會議演講：9th Annual AARS (American Acne and Rosacea Society) Scientific Virtual Symposium

會議日期：2021年5月6日

姓名：游偉雯 Wei-Wen Yu

報告內容：在單細胞分辨率下定義化膿性汗腺炎的適應性和先天性免疫

細胞特徵 Defining Adaptive and Innate Immune Cell Profile in Hidradenitis Suppurativa at the Single Cell Resolution



Calling All Dermatology Healthcare Professionals and Scientists!
Join Us for a **FREE** Educational Live Program

9TH ANNUAL AARS
SCIENTIFIC VIRTUAL SYMPOSIUM
THURSDAY, MAY 6, 2021 • 6:00 PM – 8:30 PM EDT

Complimentary Virtual Live Symposium

RECORDING WILL BE MADE AVAILABLE TO AARS MEMBERS ONLY

CO-CHAIRS

- J. MARK JACKSON, MD**
AARS President
Louisville, KY
- DIANE THIBOUTOT, MD**
AARS Past President
Hershey, PA
- AMANDA NELSON, PHD**
AARS Grant Awardee and Member
Hershey, PA

AGENDA

- 5:45 PM Virtual Doors Open
- 6:00 PM **Welcome**, J. Mark Jackson, MD, AARS President
- 6:10 PM **Differences in Acne Therapy Prescribing Patterns Between Pediatricians and Dermatologists**, Madison Jones, University of Southern California Keck School of Medicine, Los Angeles, CA, USA
- 6:20 PM **Racial and Language Disparities in Teledermatology Visits for Acne During the COVID-19 Pandemic**, Michelle S. Lee, Harvard Medical School, Boston, MA, USA
- 6:30 PM **Reactive Adipogenesis in the Perifollicular Stroma Is a Component of the Host Immune Response in Acne**, Marc C. Liggins, PhD, Dermatology, University of California San Diego, La Jolla, CA, USA
- 6:40 PM **Shifts in the Skin Bacteria and Fungi in Healthy Children Transitioning through Puberty**, Jin Park, MD, PhD, Dermatology Branch, NIAMS, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
- 6:50 PM **Q&A and Panel Discussion**, Moderated by J. Mark Jackson
- 7:00 PM **Isotretinoin Disrupts Skin Microbiome Composition and Metabolic Function After 20 Weeks of Therapy**, Zachary Thomas Nolan, B.S., Dermatology, Penn State College of Medicine, Hershey, PA, USA
- 7:10 PM **Activity of Sarecycline in Murine Models of Infection and Inflammation**, Ayman Grada, MD, MS, Boston University School of Medicine, Boston, MA, USA
- 7:20 PM **Acne, Androgenetic Alopecia, and Atopic Dermatitis in Transgender Patients on Hormone Therapy: A Retrospective Comparative Cohort Study**, Julia Li Gao, Fenway Health, Boston, MA, USA
- 7:30 PM **Evaluation of a First in Class Proteasome Inhibitor in Patients with Moderate to Severe Rosacea**, Jack Arbisser, MD, PhD, Dermatology, Emory University Woodruff Health Sciences Center, Atlanta, GA, USA
- 7:40 PM **Q&A and Panel Discussion**, Moderated by Amanda Nelson, PhD, AARS Grant Awardee and Member
- 7:50 PM **Hidradenitis Suppurativa Genome-Wide Association Study**, Lynn Petukhova, PhD, Department of Dermatology, Columbia University, New York, NY, USA
- 8:00 PM **Intramuscular Triamcinolone for Acute Hidradenitis Suppurativa Flares**, Gabrielle Benesh, BS, Division of Dermatology, Montefiore Medical Center, Bronx, NY, USA
- 8:10 PM **Defining Adaptive and Innate Immune Cell Profiles in Hidradenitis Suppurativa at the Single Cell Resolution**, Wei-Wen Yu, MD, Plastic Surgery, NYU Langone Health, New York, NY, USA
- 8:20 PM **Q&A and Panel Discussion**, Moderated by Diane Thiboutot, MD, AARS Past President
- 8:30 PM Symposium Concludes

*Agenda subject to change.

Register Today for Free! Limited Spots Available!
<https://acneandrosacea.org/medical-professionals/member-networking>