

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	末梢における免疫細胞の生存制御機構の解明に向けたB細胞の非線形的刺激応答の解析
Title(English)	
著者(和文)	安田翔也
Author(English)	Shoya Yasuda
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11032号, 授与年月日:2019年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:山村 雅幸,秋山 泰,小長谷 明彦,青西 亨,瀧ノ上 正浩
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11032号, Conferred date:2019/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

末梢における免疫細胞の生存制御機構の解明に向けた
B細胞の非線形的刺激応答の解析

2019年2月7日

総合理工学研究科 知能システム科学専攻

安田 翔也

Summary

B cells express an enormously diversified antigen receptors (BCR) capable of recognizing various foreign antigens (Ag). Such diversified BCR may also react with self Ag. Immunological tolerance functions to prevent the appearance or activation of potentially self-reactive B cells. Breakdown of immune tolerance can lead to severe immune disorders such as rheumatoid arthritis and type I diabetes. It is now clear that the B cell central tolerance is achieved by self Ag-mediated apoptosis of self-reactive immature B cells in the bone marrow. However, it remains elusive how self-reactive mature B cells in the spleen or lymph node are inactivated.

As a clue to elucidate peripheral immune tolerance, we focused on the following two unexplained phenomena. One is that B cells exhibit a nonlinear survival response against antigenic stimulation. In general, B cells are more activated depending on Ag doses. However, it is also known that B cells will not respond until Ag stimulation reaches certain strength. Besides, the current study has revealed that B cells tend to die at very low doses of Ag stimulation. Therefore, even with the same Ag stimulation, as the Ag dose increases, B cells change their responses from death to non-responsiveness and then to increased survival. Such distinct responses to different doses of Ag stimulation are likely related to B cell peripheral tolerance but the mechanism remains unknown.

The other phenomenon is that BCR change from $\text{IgM}^{\text{high}}\text{IgD}^{\text{low}}$ to $\text{IgM}^{\text{low}}\text{IgD}^{\text{high}}$ during B cell maturation. Some functional differences between IgM and IgD have been noted. However, the function of one of them can be compensated for by the other so it is unclear why both are needed for B cells. Studies thus far indicate that IgD responds poorly to Ag stimulation suggesting that B cells become less sensitive as they mature and express higher levels of IgD. The increased IgD expression is also likely related to peripheral B cell tolerance but again the mechanism is unclear.

There are several reasons that prevent detailed investigation of these phenomena. The tonic signal, which has been shown by genetic studies to support B cell survival in the periphery, is very weak and difficult to be detected by conventional experiments. B cell lines, which are derived from B lymphomas and can survive indefinitely, are obviously not suitable for the current study and therefore purified primary B cells are used. To overcome these difficulties and to obtain key suggestions for future experiments, we decided to take a mathematical/computational approach.

In this study, we first constructed a mathematical model taking into consideration of B cell signaling pathway and binding reaction between BCR and the Ag (in this case F(ab')_2 -anti-IgM antibodies as pseudo Ag). Next, we analyzed the above two phenomena through computer simulations. As a result, we confirmed the existence of a threshold for B cell survival upon Ag stimulation. Interestingly, this threshold was found to depend not on the amount, but the density, of Ag-bound BCR. In addition, by shifting to the $\text{IgM}^{\text{low}}\text{IgD}^{\text{high}}$ type B cells decrease their responsiveness to Ag stimulation as a safety guard to prevent unwanted activation while maintaining the tonic signal required for their

survival. These findings provide a new and reasonable principle for understanding the mechanism of immune tolerance that is critical for preventing autoimmune diseases.

Based on these results, we proposed several practical experiments that might lead to additional discovery in peripheral tolerance. One is to examine the relationship between B cell survival and the amount and density of antigen-bound BCR. In this experiment, the density of antigen-bound BCR may have a greater influence on survival than the amount of antigen-bound BCR. The second is an experiment to investigate the relationship between BCR expression level and differentiation. In our insight, the ability to differentiate into memory B cells or antibody-secreting plasma cells may be determined by the BCR expression level. Finally, we proposed to investigate the relationship between the ratio of IgM/IgD and B cell activation in individual cells. Cells with higher IgD level may be more difficult to be activated. These new ideas have been raised based on the results of our mathematical modeling, and have been overlooked from the perspective of experimental immunology.

We hope that our suggested experiments will lead to further understanding of the mechanism of immune tolerance and provide additional clue for treating autoimmune diseases. Moreover, we expect that our approach on B cells will also be applicable to other immune cells such as T cells.

要旨

B 細胞は多様な抗原受容体を発現し、様々な外来抗原を認識する能力を持つ反面、自己の抗原にも反応する危険性を内包している。B 細胞が自己の抗原に反応しないための仕組みを免疫寛容と呼ぶ。免疫寛容の破綻は、関節リウマチや I 型糖尿病といった自己免疫疾患をもたらす。これまでに、骨髄における中枢免疫寛容として、自己抗原に反応する未熟 B 細胞がアポトーシスによって除去されることが判明している。しかし、脾臓やリンパ節にある自己反応性 B 細胞の活性化を抑制する末梢免疫寛容機構については、未だ不明な点が多い。

末梢免疫寛容を解明する手掛かりとして、次の 2 つの解明されていない現象に注目した。一つは、B 細胞が抗原刺激に対して非線形的な刺激応答を示すことである。通常、B 細胞は抗原濃度に応じて活性化しやすくなることが知られているが、微小な抗原刺激では B 細胞がかえって死にやすいことも見出されている。同じ種類の刺激でも刺激の強さ（抗原濃度）に応じて中→低→高といったように生存率が変わることは、末梢免疫寛容との関わりがありそうだが、その機構はよく分かっていない。

もう一つは、B 細胞抗原受容体 (BCR) が成熟につれて IgM 高発現型 ($\text{IgM}^{\text{high}}\text{IgD}^{\text{low}}$) から IgD 高発現型 ($\text{IgM}^{\text{low}}\text{IgD}^{\text{high}}$) へシフトすることである。IgM と IgD は、細かな機能の違いは見出されているが、一方が欠損しても他方が補うことが知られており、その存在意義の違いまでは明確になっていない。IgD の方が抗原に対して鈍感とされるため、成熟につれて鈍感な方にシフトすると言える。これは末梢免疫寛容と関わりが深い、IgD 型へシフトする理由は不明のままである。

これらの現象の解明が進まないのには理由がある。無刺激状態における末梢 B 細胞の生存は、BCR からの微弱なシグナルによって維持されていることが遺伝的な実験から判明している。この微弱な生存シグナルは、一般にトニックシグナル (Tonic signal) と呼ばれる。しかし、トニックシグナルは非常に小さいため、実験的に測定、解析することが困難である。また、B 細胞株はがん細胞由来であり無限に生存できるため、生存シグナルの解析には適していない。したがって、実験の都度、マウスから精製した正常 B 細胞を使用する必要がある。本研究では、これらの困難を乗り越えるため、数理モデル化と計算機シミュレーションを用いるアプローチをとった。

本研究ではまず、B 細胞のシグナル伝達や、抗原と受容体の結合反応を考慮した数理モデルを構築した。次に、シミュレーションを通して、上述の 2 つの現象の解析を行った。その結果、B 細胞の活性化にはオフセットまたは閾値が存在することが確認できた。この閾値は、面白いことに、抗原を結合した BCR の数ではなく密度によって規定されることが示された。また、IgD 型へのシフトによって、B 細胞の生存シグナルを維持しつつ、活性化のための閾値を上昇させることで、活性化をトリガーしにくくなるという安全設計が存在することが示唆された。これらはいずれも、自己免疫疾患を防ぐうえで非常に理にかなった原理である。

さらに本研究では、これらの示唆を元に、新たな知見を発見する可能性がある、いくつかの具体的な実験を提案した。一つは、抗原と結合した BCR の数と密度を観察し、生存率との関係を調べることである。この実験では、抗原に結合した BCR の数よりも密度が生存に大きく影響する可能性がある。次に、BCR 発現量と分化誘導の関係を調べる実験である。私たちの考えでは、BCR 発現量に応じて、記憶 B 細胞や抗体分泌細胞へ分化する比率が変わる可能性がある。最後に、個々の細胞についての、IgM/IgD 発現比率と B 細胞の活性化の関係を調べる実験である。IgD 比率が高い細胞ほど、活性化されにくい可能性がある。これらはいずれも、これまでは見落とされてきた実験であり、数理モデル化とシミュレーションによって見出されたものといえる。

今後は、提案に基づいた実験を行うことで、B 細胞の末梢免疫寛容の解明が進み、自己免疫疾患の新規治療法の開発に繋がるのが期待される。また、T 細胞を始めとした B 細胞以外の免疫細胞への応用も十分に期待される。

目次

Summary.....	2
要旨.....	4
第 1 章 序論.....	9
1.1 背景.....	10
1.1.1 多様な抗原を認識する B 細胞と T 細胞	
1.1.2 免疫寛容とは	
1.2 課題.....	11
1.2.1 末梢免疫寛容にかかわる B 細胞の非線形的刺激応答	
1.2.2 末梢免疫寛容にかかわる B 細胞抗原受容体の抗体タイプの違い	
1.3 解明の困難さ.....	14
1.4 アプローチ.....	15
1.5 目的.....	15
1.6 用語の定義.....	15
第 2 章 IgM がもたらす非線形的刺激応答の解析.....	17
2.1 数理モデルの構築.....	18
2.1.1 トニックシグナルと結合型シグナルのシグナル伝達経路	
2.1.2 結合型シグナルの非線形性	
2.1.3 数理モデル	
2.1.4 数理モデルの考察	
2.2 実験およびパラメータ群の決定.....	26
2.2.1 抗原と IgM の結合・解離速度の決定	
2.2.2 IgM 減少速度の決定	
2.2.3 オフセット案におけるその他のパラメータ群の最適化	
2.2.4 Hill 式案におけるその他のパラメータ群の最適化	
2.2.5 実験の妥当性	
2.2.6 パラメータ群最適化の妥当性	
2.2.7 最適パラメータ群の妥当性と安定性	
2.3 モデルのロバスト性.....	34
2.3.1 図 2.6 の実験データに摂動を加えた場合	
2.3.2 図 2.7 の実験データに摂動を加えた場合	
2.3.3 図 2.8 の実験データに摂動を加えた場合	
2.3.4 図 2.9 の実験データに摂動を加えた場合	
2.3.5 モデルのロバスト性検証の結論	
2.4 非線形項の妥当性と解析.....	42
2.4.1 非線形項を適用しない場合	

2.4.2	非線形項を結合型 IgM の「数」に適用した場合	
2.4.3	非線形項を結合型 IgM の「密度」に適用した場合	
2.4.4	オフセット案と Hill 案の違い	
2.4.5	オフセットの効果	
2.4.6	Hill 式の効果	
2.4.7	Hill 係数の意味	
2.5	非線形的刺激応答に影響するもの.....	48
2.6	第 2 章のまとめ	49
第 3 章	IgM と IgD の共発現がもたらす非線形的刺激応答の解析.....	51
3.1	数理モデルの構築	52
3.1.1	数理モデルの拡張	
3.1.2	数理モデルの考察	
3.2	実験およびパラメータ群の決定.....	55
3.2.1	抗原と IgM および IgD の結合・解離速度の決定	
3.2.2	IgM および IgD 減少速度の決定	
3.2.3	オフセット案におけるその他のパラメータの最適化	
3.2.4	Hill 式案におけるその他のパラメータの最適化	
3.2.5	実験の妥当性	
3.2.6	パラメータ群最適化の妥当性	
3.2.7	最適パラメータ群の妥当性と安定性	
3.3	モデルのロバスト性	63
3.3.1	図 3.2 の実験データに摂動を加えた場合	
3.3.2	図 3.3 の実験データに摂動を加えた場合	
3.3.3	図 3.4 の実験データに摂動を加えた場合	
3.3.4	図 3.5 の実験データに摂動を加えた場合	
3.3.5	モデルのロバスト性検証の結論	
3.4	IgM のみの場合と IgM+IgD 共発現の場合の抗原に対する反応性の違い.....	72
3.5	オフセットと Hill 式の意味	72
3.6	IgM トニックシグナルと IgM 結合型シグナルの力関係.....	73
3.7	IgM トニックシグナルと IgD トニックシグナルの力関係.....	73
3.8	第 3 章のまとめ	74
第 4 章	議論	76
4.1	結果のまとめ	77
4.1.1	課題 1.2.1 (B 細胞の非線形的刺激応答) に対応する結果	
4.1.2	課題 1.2.2 (IgM と IgD の存在意義) に対応する結果	
4.2	総合討論	77
4.2.1	第 2 章と第 3 章の仮定について	
4.2.2	実験の改善点および限界	

4.2.3	反応が中庸である細胞を積極的に淘汰する意味	
4.2.4	自己と他者の識別	
4.2.5	他の B 細胞サブセットとの関係	
4.2.6	他の受容体の関与	
4.2.7	リンパ腫との関係	
4.3	新たな実験の提案	80
4.3.1	抗原濃度に応じた結合型 BCR「密度」と生存・増殖の観察	
4.3.2	BCR 発現量による分化誘導の違い	
4.3.3	IgM と IgD の発現比率による細胞寿命の違い	
第 5 章	結論と展望	82
方法		84
	外れ値の検定	84
	微分方程式の解法	84
	変数の初期値	84
	細胞集団の生存率の計算アルゴリズム	85
	パラメータ群最適化（遺伝的アルゴリズム）	86
謝辞		87
参考文献		88
研究実績		94
	学位論文に関連する業績	94
	学術雑誌等に発表した論文（査読あり）	
	ポスター発表（査読なし）	
	その他の業績	94
	学術雑誌等に発表した論文（査読あり）	
	ポスターおよび口頭発表（査読なし）	
補遺		96
	プライマリー細胞の精製および培養方法	96
	生存率や BCR 発現量の測定方法	96

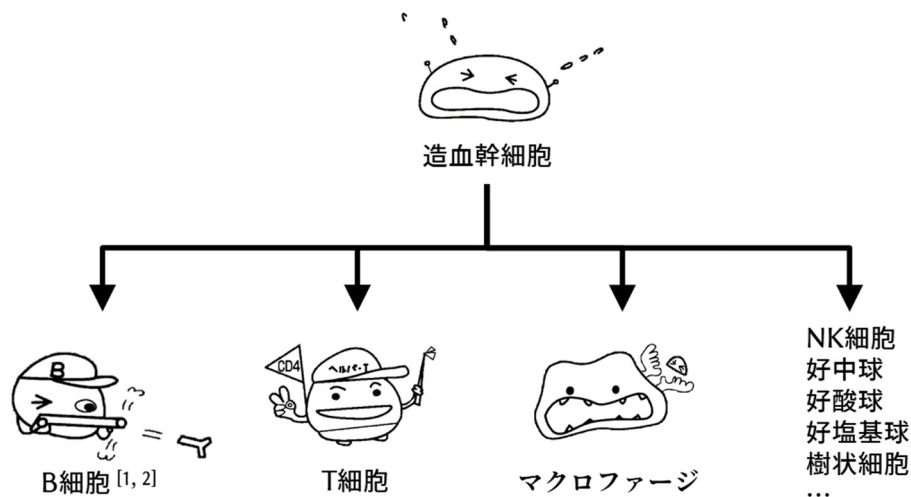
第 1 章 序論

1.1 背景

1.1.1 多様な抗原を認識する B 細胞と T 細胞

免疫細胞は、生体をバクテリアやウイルスから守るために機能する細胞群の総称である。具体的には、B 細胞[1,2]、T 細胞、マクロファージ、NK 細胞、好中球、好酸球、好塩基球、樹状細胞等から成る (図 1.1)。一般に、免疫細胞の異常は、次に挙げる重篤な疾患をもたらす。リンパ腫：免疫細胞が無制限に増殖する、いわゆる血液がんのこと[3-5]。免疫不全：免疫細胞が正常な攻撃機能を果たさず、軽微な感染症であっても重篤化しやすい状態[6-8]。自己免疫疾患：免疫細胞が、自己の正常な組織を外敵と認識し攻撃する[9-11]。

免疫細胞の中でも B 細胞と T 細胞は、造血幹細胞から分化する過程で、他の細胞やウイルスが持つ抗原 (Antigen, Ag) を認識するための受容体を細胞表面に発現する。抗原受容体の先端には、抗原を認識する部位がある。この部位をコードする遺伝子群は、分化の過程でランダムに再編成され、300 万通り以上とも言われる認識能力を示す。ただし、一つの細胞は一種類の抗原認識能力しか示さない。このように、B 細胞と T 細胞は、集団として極めて多様な抗原認識能力を持ち、様々なバクテリアやウイルスを認識・攻撃できるように準備されている。また同時に、自己の正常な組織を認識・攻撃する細胞が生まれる可能性も内包している。



<引用>イラストは萩原清文著『好きになる免疫学』(講談社)より改変
図 1.1 免疫細胞の分化の一例。

1.1.2 免疫寛容とは

自己免疫疾患は、B細胞とT細胞がもつ「免疫寛容」と呼ばれる仕組みが破綻することで生じる。免疫寛容とは、免疫細胞が自己の正常な組織に対して認識あるいは攻撃をしない仕組みである。自己の正常な組織が持っている抗原を「自己抗原」と呼び、免疫細胞は、自己抗原に反応しないように制御される。免疫寛容の破綻は、関節リウマチやI型糖尿病といった自己免疫疾患をもたらす。

免疫寛容は、「中枢免疫寛容」と「末梢免疫寛容」に細分される（図 1.2）。中枢とは骨髄および胸腺のことであり、末梢はそれ以外の免疫器官である脾臓、リンパ節、血液中を指す。中枢免疫寛容とは、免疫細胞が分化・成熟する過程において、自己抗原を認識する細胞を排除する仕組みである。例えば、B細胞は骨髄、T細胞は胸腺において、それぞれ自己抗原が提示され、自己抗原反応性の細胞にアポトーシスが誘導される[12-14]。しかし、骨髄や胸腺で発現せず、末梢でのみ発現する自己抗原に対する選別は行われない。末梢免疫寛容は、脾臓、リンパ節、血液中において、中枢で排除しきれなかった自己抗原反応性の細胞を抑える仕組みを指す。具体的には、自己抗原に対するアネルギー（不応答）、イグノランス（無視）が知られており、また、制御性T細胞によっても抑制される[15-17]。本研究では、B細胞の末梢免疫寛容に着目する。

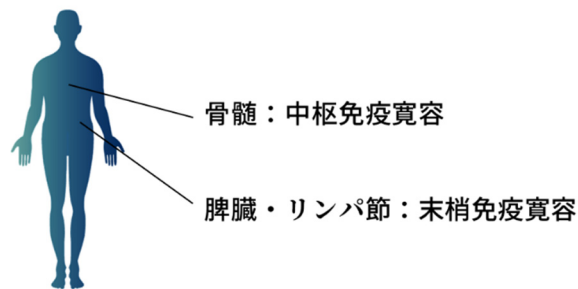


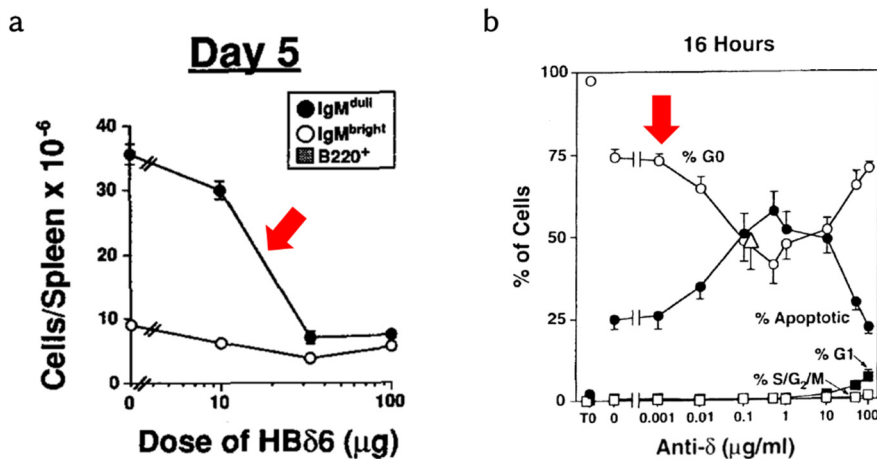
図 1.2 B細胞の免疫寛容。

1.2 課題

1.2.1 末梢免疫寛容にかかわる B細胞の非線形的刺激応答

制御性T細胞による自己免疫反応の抑制に比べると、B細胞が本来的に備えているアネルギーやイグノランスの仕組みには多くの不明点が残されている[18]。もっとも単純かつ大きな疑問の一つは、アネルギー状態の細胞の寿命が短いことである[19]。この現象は末梢免疫寛容にとって有利であることは明らかだが、その仕組みはよく分かっていない。

1995年にFred D. Finkelmanらは、解明の糸口となる興味深い実験結果を得た。通常、B細胞は、抗原刺激が大きいほど活性化し、生存率や増殖率が上昇する。ところが、微小な抗原刺激を与えた場合には、かえって生存率が下がることが明らかになった[20] (図 1.3a)。また、2001年にはDavid Peckhamらも、微小な抗原刺激を与えたときにB細胞の生存率が低下することを報告している[21] (図 1.3b)。



<引用> (a) Finkelman FD, et al., *J Exp Med.* 1995[20]より改変

<引用> (b) Peckham D, et al., *Int Immunol.* 2001[21]より改変

図 1.3 微小な抗原刺激が細胞の生存率を低下させるという 2 件の報告。赤矢印は編集により追加したもの。(a)異なる濃度の疑似抗原を注射して 5 日後のマウス脾臓から精製された B 細胞数。(b)異なる濃度の疑似抗原を添加して 16 時間培養後の B 細胞生存率。

「同じ種類の抗原刺激であっても、小さな刺激では生存率が下がり、大きな刺激では生存率が上がる」という非線形的刺激応答は、末梢免疫寛容と関係が深い。これは次の考えに基づく。一つの B 細胞は単一の抗原認識性能しか有しないため、抗原刺激の種類ではなく、「強さ」や「刺激時間」によって自身の挙動を制御する必要があると考えられる。中枢免疫寛容においては、抗原提示細胞から明確な自己抗原が提示され、これに強く反応する細胞がアポトーシスを誘導される。中枢で淘汰しきれなかった細胞は末梢に輸送されるが、末梢にいる B 細胞が、中枢と同等以上の自己抗原刺激を受けるとは考えにくい[22]。もしそうであれば、自己免疫反応を起こすからである。したがって、末梢の B 細胞は「比較的弱い自己抗原刺激」に晒され続けると考えられ、これを利用して自己抗原反応性の細胞を抑制しようとするのは理にかなっている。

微小抗原刺激における生存率低下については、次のような仮説が述べられている。末梢では T 細胞による補助がない限りは、負の生存シグナルが導入されるのではないかと[23]。抗原刺激は細胞周期を活性させるが、微小な刺激では G0 期から G1 期に入り切らずアポトーシスが誘導されるのではないかと[21]。また、末梢でのアポトーシスは、一般的なデスリガンド (Fas リガンド) を介するアポトーシスとは経路が

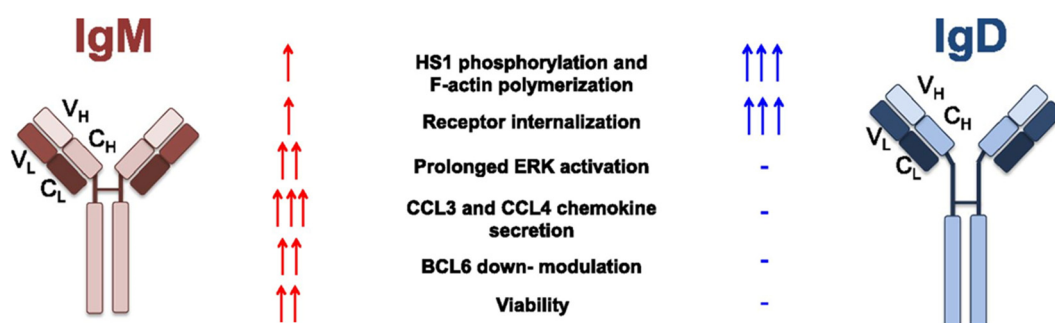
異なるらしい[24]。いずれにしろ、この非線形的刺激応答を解明することは、末梢免疫寛容の仕組みに大胆に迫る手掛かりになり得る。

1.2.2 末梢免疫寛容にかかわる B 細胞抗原受容体の抗体タイプの違い

B 細胞が抗原を認識する受容体を、B 細胞抗原受容体 (B cell receptor, BCR) と呼ぶ。BCR は、細胞膜から外に向かって抗体が突き出た構造をしている。前提として、抗体は Y 字形状のタンパク質である。哺乳類の抗体には、その重鎖 (Y 字の幹の部分) の種類によって、IgG、IgM、IgA、IgD、IgE の 5 種が確認されており、それぞれ役割が異なることが知られている。BCR の抗体部分は、先端の抗原認識部位こそ共通だが、IgM と IgD の 2 種類が発現する。つまり、BCR には IgM 型 BCR と IgD 型 BCR が存在する (以下それぞれ単に IgM、IgD と呼ぶ)。

余談だが、哺乳類がもつ 5 つの抗体の名前の由来は次の通りとされる。IgG : 電気泳動の移動度が γ グロブリン分画であったことから。IgM : 5 量体を形成する巨大分子で Macroglobulin と呼ばれたことから。IgA : 電気泳動の移動度が β 2A 分画であったことから。IgD : それまでに見つかった IgG、IgM、IgA のいずれとも性質が異なることから Distinctive に由来[25]。IgE : 皮膚のアレルギー反応である Erythema (紅班) を起こすことから。

さて、BCR としての IgM と IgD は、細かな機能の違いはあれど[26,27]、存在意義の明確な違いまでは見出されていない[28-30] (図 1.4)。一方が欠損しても、他方が 2~3 倍に発現して補うことから[31-35]、単に予備として用意されているのではないかという説が中心的である。また、IgM は一価の抗原刺激によっても細胞内に強いシグナルを生じるのに対し、IgD は多価の抗原でしかシグナルを生じない[36]。この事実も、BCR としては IgM が主役で、IgD は予備または調整役であるという説に説得力を与えている。



<引用> Ten Hacken E, et al., *J Immunol.* 2016[26]より

図 1.4 IgM 型 BCR と IgD 型 BCR の機能面の違い。両者は構造的に類似しているが、IgD への抗原刺激では、シグナル伝達の比較的上流までの活性しか認められない。

B 細胞は、中枢で分化・成熟する段階では IgM しか持ち合わせないが (IgM^{high}IgD⁻)、末梢において徐々

に IgD も発現し始め、最終的には IgM が減少して IgD 型へシフトする (IgM^{low}IgD^{high}) [27]。このシフトの理由は明らかになっていないが、より鈍感な方向にシフトするということは、バクテリアやウイルスとの戦いのためとは考えにくく、むしろ末梢免疫寛容との関係を思い起こさせる。なぜなら、一つの B 細胞は一種類の抗原認識部位しか持たないため、末梢での抗原反応性を制御するために、BCR の「発現量」や「重鎖のタイプ」を変えることは理にかなっているからである。したがって、IgD 型へのシフトがもたらす影響を明らかにすることは、末梢免疫寛容の解明に迫る重要な手掛かりの一つと考えられる。

1.3 解明の困難さ

1.2.1 と 1.2.2 で述べた課題には、分子生物学的な実験手法での解明を妨げるいくつかの障壁がある。無刺激状態における末梢 B 細胞の生存は、BCR からの微弱なシグナルによって維持されていることが遺伝的な実験から判明している。この微弱な生存シグナルは、一般にトニックシグナル (Tonic signal) と呼ばれる。しかし、トニックシグナルは非常に小さいため、実験的に測定、解析することが困難である。例えば、シグナル伝達を媒介するタンパク質の活性量をウェスタンブロッティング法で定量しようとしても、ノイズに埋もれるか、有用なピークが得られないことがある。実際に、B 細胞の生存シグナルを媒介する SYK (研究業績[1] Fig. S2) や ERK (研究業績[2] Fig. 3C) の活性量は、ほとんど検出限界レベルであった。

次に、タンパク質のノックアウトマウスの作製が一筋縄ではいかない。統計的には 6 割の遺伝子のノックアウトが胎生致死に至る[37]ことを考慮すると、生存シグナルに関わる遺伝子のノックアウトはより高い確率で失敗すると考えられる。よって、複数のタンパク質の連鎖によって成立する生存シグナル伝達の全てを同定することは期待できない。

また、実験の手間の側面から言えば、比較的扱いが容易である B 細胞株を用いたいところだが、そうは問屋が卸さない。細胞株はがん細胞 (B リンパ腫) 由来の無限に生存できる細胞であるため、生存シグナルや細胞死の制御機構に異常が生じており、生存制御の検証には適していない。したがって、マウスから取り出して精製した正常なプライマリー細胞を使わざるを得なく、マウスの管理には特別な手間を要する。

最後に、上述の障壁を乗り越えたとしても、「刺激量に応じて異なる挙動を示す」という非線形性を明らかにすることは容易ではない。これは、分子生物学的な実験手法が静的な解析を主とすることに起因する。複数のタンパク質の相互作用から成るシステムの解析のためには、動的な実験データの獲得と、数理モデル化や計算機シミュレーションを用いたアプローチが望まれる。

1.4 アプローチ

1.3 で言及した通り、B 細胞の非線形的な刺激応答を明らかにするには、数理モデル化とシミュレーションを用いたアプローチが望ましい。これまでに、末梢免疫寛容に直接迫った数理モデルはなかったため、新たに数理モデルを構築する必要がある。そこで、大きく分けて2種類の数理モデルをヒントにした。

一つ目は、細胞内シグナル伝達ネットワークの微分方程式モデルである[38-44]。細胞内シグナル伝達の数式表現に際しては、タンパク質 A と酵素 E によってタンパク質 B が生成される時、 $d[B]/dt=k[E][A]$ (k は定数) と表現できることが基本にあり、場面に応じてミカエリス・メンテン式や Hill 式が用いられる。2014 年に Hisaaki Shinohara らは、マウス B 細胞において、BCR から転写因子 NF- κ B までのシグナル伝達経路中に正のフィードバックループが存在することを見出し、抗原刺激の強さに応じて NF- κ B 活性量が切り替わる閾値応答を示した[38]。また、2016 年に Hyunryul Ryu らは、ラットの神経細胞において、正と負のフィードバックループの組み合わせにより、ERK/MAPK 経路への一過性の刺激が増殖を、持続性の刺激が分化を誘導するという時間応答を示した[42]。

二つ目は、受容体とリガンドの結合・解離モデルである[45-48]。受容体 R とリガンド L の結合および解離は、 $R+L\rightleftharpoons RL$ という基本的な化学反応式に従うことが知られており、 $d[RL]/dt=k_1[R][L]-k_2[RL]$ (k_1 , k_2 はそれぞれ定数) と表せる。2000 年に Sumanas Wanant らは、インスリン受容体において、リガンド結合量が少ないときは正の協同性が、多いときには負の協同性が現れる仕組みを説明している[45]。また、2018 年に Allen Zinkle らは、マウス線維芽細胞において、抗原による受容体の架橋 (2 量体形成) が閾値応答、さらには運命決定の引き金になると述べている[46]。

本研究では、これらの数理モデルを組み合わせて新たなモデルを構築し、シミュレーションを用いて、1.2.1 と 1.2.2 で述べた現象を解析した。

1.5 目的

本研究は、末梢免疫寛容の仕組みの解明に向けて、数理モデル化とシミュレーションによって、今後の生物実験計画に対する示唆を得ることを目的とした。

1.6 用語の定義

以降、特に断りがない場合、用語を表 1.1 の通り定義する。

表 1.1 用語の定義。

用語	定義
B 細胞	マウス脾臓から精製した成熟 B 細胞。論文によって Mature B (成熟 B)、Naive B (ナイーブ B)、Resting B (休止 B)、Follicular B (濾胞 B) と呼ばれることがあり、それぞれ厳密には異なるが、本論文ではまとめて成熟 B 細胞として扱う。
実験	B 細胞を用いた wet 実験
シミュレーション	計算機を用いた dry 実験
BCR	B 細胞抗原受容体 (B cell receptor)
非結合型 BCR	抗原が結合していない BCR
結合型 BCR	抗原が結合した BCR
トニックシグナル (Tonic signal)	非結合型 BCR から生じる微弱な生存シグナル
結合型シグナル	結合型 BCR から生じる比較的強い生存シグナル
IgM	IgM 型 BCR
IgD	IgD 型 BCR
IgM+IgD	IgM と IgD の両方
Ag	抗原 (Antigen)

第2章 IgM がもたらす非線形的刺激応答の解析

2.1 数理モデルの構築

2.1.1 トニックシグナルと結合型シグナルのシグナル伝達経路

本章では、BCR として IgM のみを仮定し、個々の細胞の生存シグナルを表現する数理モデルを作成した。手始めに、B 細胞内のシグナル伝達経路を網羅的に調べ、モデルの骨子を定めたい。抗原と結合していない IgM（非結合型 IgM）から細胞内に生じる生存シグナルをトニックシグナルと呼ぶ[49-56]。一方で、抗原と結合した IgM（結合型 IgM）からはより強い生存シグナルが生じるとされ[56, 57-72]、これを結合型シグナルと呼ぶことにする。各シグナル伝達経路を図 2.1 にまとめた。

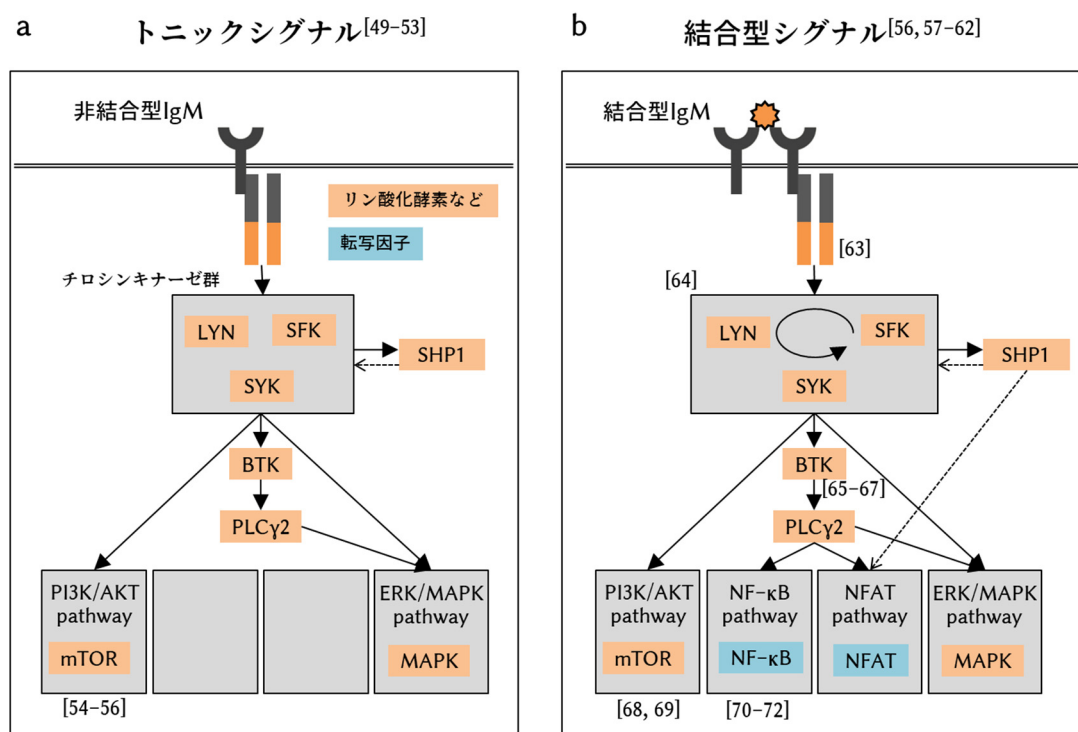


図 2.1 トニックシグナル (a) および結合型シグナル (b) の伝達経路。オレンジの四角はリン酸化酵素、ブルーの四角は転写因子を示す。矢印は活性（正の影響）、点線矢印は抑制（負の影響）を意味する。

トニックシグナルと結合型シグナルは、役者こそ類似しているが、異なる経路と捉えられている。もっとも大きな違いは、IgM 直下のチロシンキナーゼ群が活発な自己リン酸化反応を起こすかどうかである。また、転写因子へと続く比較的下流の 4 経路のうち、2 経路はトニックシグナルでは確認されていない。図 2.1 には簡略化した経路を示したが、実際には非常に複雑な相互作用によって成り立っており、全てを精密にモデル化することは現実的でない。ここでは、解明されている範囲で最小限のモデルを構築した。

モデルは図 2.2 の通りである。まず、シグナル伝達の最上流部分である「抗原と IgM の結合・解離」を単純な模式図で表し、結合定数を k_1 、解離定数を k_2 とした。次に、トニックシグナルと結合型シグナルはそれぞれ異なる経路で転写因子を活性させるとし、トニックシグナルの強さを k_3 、結合型シグナルの強さを k_4 で表現した。個々の細胞はそれぞれ異なる IgM 初期値を有し、細胞表面の IgM 量は時間とともに自然減少すると仮定した。また、トニックシグナルと結合型シグナルがない場合は、転写因子の活性量も自然減少する。個々の細胞は、転写因子の活性量がある基準値を下回ったときに死ぬと定義し、この基準値を *Deadline* とした。

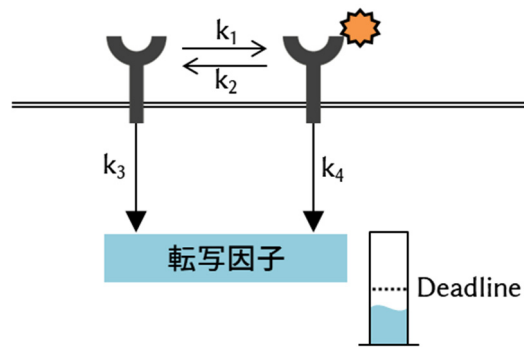
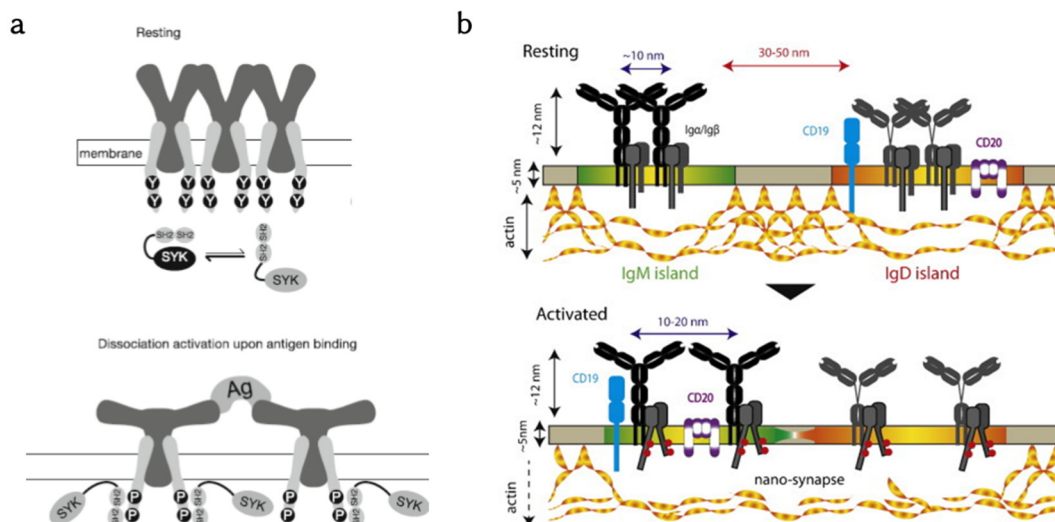


図 2.2 トニックシグナルと結合型シグナルを考慮した最小限の模式図。細い矢印は「変化」、太い矢印は「活性化」を示す。

2.1.2 結合型シグナルの非線形性

IgM に結合する抗原が多価であれば、一つの抗原が複数の IgM を架橋し、IgM の凝集をもたらす[73, 74]。複数の IgM が接近すると、細胞膜直下に網目状に張ったアクチン構造が押しつけられ、微小ではあるが空間が生じる[75-78] (図 2.3)。この空間が、細胞膜直下でのチロシンキナーゼ群の活発な自己リン酸化を誘発することにより、強い結合型シグナルが生じるとされる。



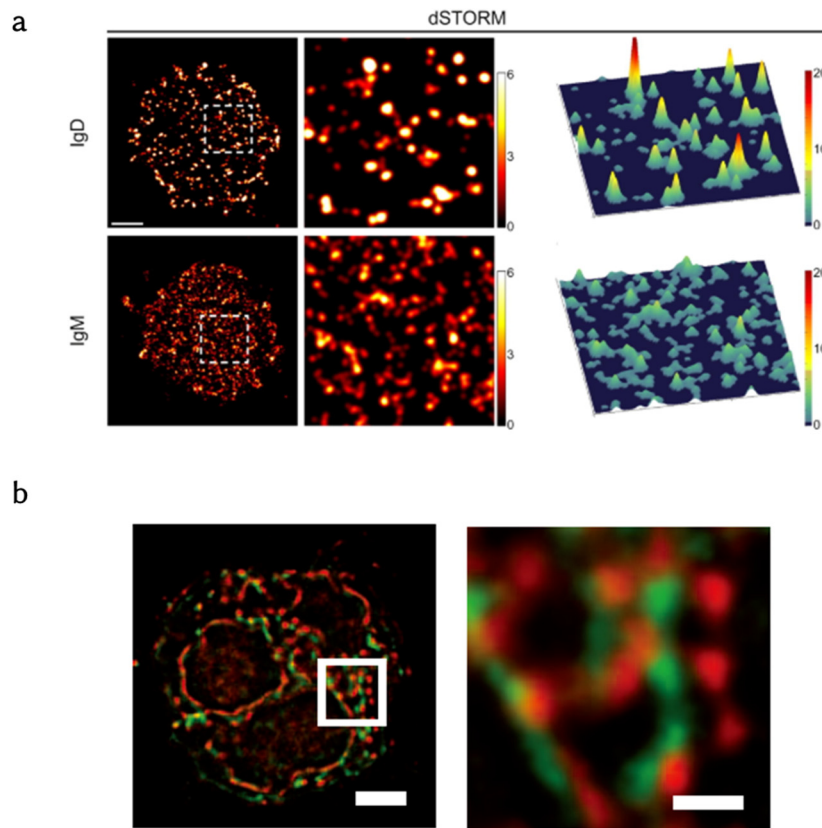
<引用> (a) Ouchida R, et al., *J Immunol.* 2010[73]より改変

<引用> (b) Maity PC, et al., *Biochim Biophys Acta.* 2015[75]より

図 2.3 非結合型 IgM と結合型 IgM の細胞膜直下の様子。(a)抗原が結合すると IgM の膜内部分の構造が変わり、チロシンキナーゼ群が入り込めるようになる。(b)チロシンキナーゼ群が入り込めるようになるのは、細胞膜直下のアクチン線維構造が押しつけられて空間ができるからである。

このような理由から、「結合型 IgM 数が一定以上になってはじめて結合型シグナルが生じる」という状況が仮定できる。別の表現をするならば、「結合型 IgM はある数より少ない場合には結合型シグナルを生じない」とも言える。そこで、2.1.1 で構築したモデルの骨子のうち、結合型 IgM 数に対して非線形項を適用することを考える。一つの案は、結合型 IgM 数からある値を差し引いて有効値とする(ただし非負)、オフセットの考え方である。もう一つの案は、結合型 IgM 数に対して、協同性を表す Hill 式を適用して有効値とする方法である。これ以降は、オフセット案と Hill 式案の 2 つを並行して検討する。

次に、非線形項の適用場所について検討する。ごく最近になり、2013 年に Pieta K. Mattila らが[76]、2015 年には Palash Chandra Maity らが[79]、IgM と IgD が細胞膜ラフト上に局在することを蛍光観察で示した(他に[80, 81]) (図 2.4)。ラフトとは、細胞膜を構成する種々の脂質分子の流動性の差によって生じる、細胞膜上の領域である。



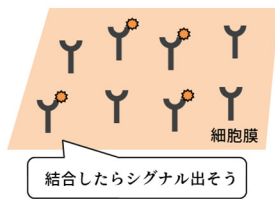
<引用> (a) Mattila PK, et al., *Immunity*. 2013[76]より改変

<引用> (b) Maity PC, et al., *Sci Signal*. 2015[79]より

図 2.4 IgM と IgD は細胞膜ラフトに局在する。(a)IgM と IgD がそれぞれクラスターを形成している。(b)緑は IgM、赤は IgD を表す。

もし IgM が細胞膜上に一様に分散し、個別に結合型シグナルを生じるのであれば、オフセットや Hill 式で表される非線形項が介入する余地はない (図 2.5a)。しかし、実際には IgM はラフト上に偏在し、結合型 IgM がいくつか凝集することで結合型シグナルが生じる。このような場合には、結合型シグナルが発生する度合いは、局所的に何割が結合型 IgM になったか、という結合密度に応じて決まると考えることができる (図 2.5b)。このような理由から、非線形項は結合型 IgM 「密度」に対して適用される。

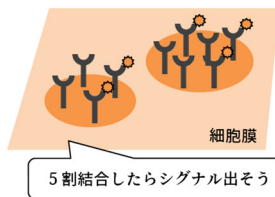
- a IgMが細胞膜上に分散し、個々のIgMから結合型シグナルが生じる場合



結合型シグナルの強さは、結合型IgMの「数」に比例

$$\text{結合型シグナル} \propto \text{結合型IgM数}$$

- b IgMがラフト上に局在し、IgMの集合体から結合型シグナルが生じる場合



結合型シグナルが出るか否かは、結合型IgMの「密度」に応じる

結合型シグナルの強さは、「全IgM数×結合型IgM密度」に比例

$$\text{結合型シグナル} \propto \text{全IgM数} \times f(\text{結合型IgM密度})$$

図 2.5 IgM が細胞膜上に分散している場合 (a) とラフト上に局在している場合 (b) における結合型シグナルの発生様式の違い。 f は非線形項。

2.1.3 数理モデル

2.1.1 で作成したモデルの骨子に、2.1.2 の非線形項を適用した模式図が図 2.6 である。トニックシグナルは k_3 、結合型シグナルは k_4 で表される。ただし、結合型シグナルは、 $\text{IgM}_{\text{antigen}}$ そのものから発生するのではなく、 $\text{IgM}_{\text{antigen}}$ に非線形項を適用した「 $\text{IgM}_{\text{antigen}}$ 有効値」から発生することに注意したい。また、 $\text{Trans}_{\text{off}}$ と Trans_{on} はそれぞれ転写因子の不活性型と活性型である。

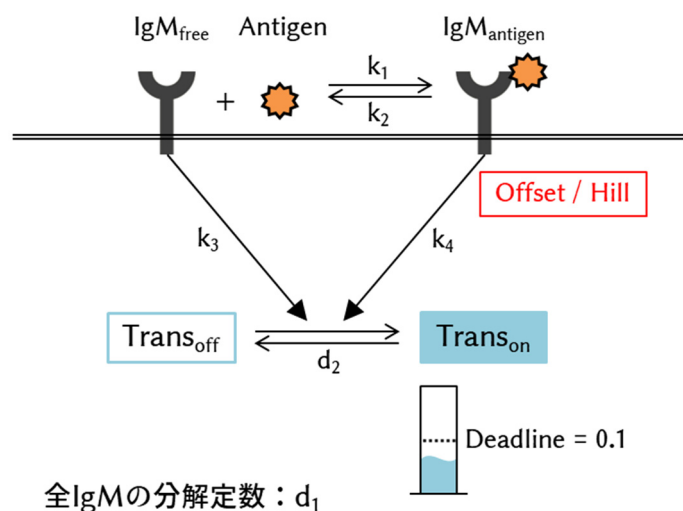


図 2.6 完成した模式図。細い矢印は「変化」、太い矢印は「活性化」を示す。

モデルの数式表現は次の通りである。

$$\frac{d IgM}{dt} = -d_1 \cdot IgM \quad (1)$$

$$\frac{d IgM_{antigen}}{dt} = k_1 \cdot Antigen \cdot IgM_{free} - k_2 \cdot IgM_{antigen}$$

$$IgM = IgM_{free} + IgM_{antigen} \quad (2)$$

$$\frac{d Trans_{on}}{dt} = k_3 \cdot Trans_{off} \cdot IgM_{free} + k_4 \cdot Trans_{off} \cdot F - d_2 \cdot Trans_{on}$$

$$1 = Trans_{off} + Trans_{on} \quad (3)$$

$$F = IgM \cdot f\left(\frac{IgM_{antigen}}{IgM}\right) = IgM \cdot \left(\frac{IgM_{antigen}}{IgM} - Offset\right) > 0 \quad \text{オフセット案}$$

$$F = IgM \cdot f\left(\frac{IgM_{antigen}}{IgM}\right) = IgM \cdot \frac{\left(\frac{IgM_{antigen}}{IgM}\right)^n}{K^n + \left(\frac{IgM_{antigen}}{IgM}\right)^n} \quad \text{Hill 式案}$$

式(1)は、B細胞が持つIgM発現量 (IgM) が定数 d_1 に従って単調減少することを表す。式(2)は、結合型IgM数 ($IgM_{antigen}$) の変化を表し、右辺の第一項が抗原 ($Antigen$) との結合速度、第二項が解離速度を表す。式(3)は、転写因子の活性化数 ($Trans_{on}$) の増減を表し、右辺の第一項が非結合型IgMによるトニックシグナル、第二項が結合型IgMによる結合型シグナル、第三項が自然減少を意味する。式(3)の中で、

結合型 IgM の有効値が F で表されている。非線形項がなければ、ここには結合型 IgM 数 ($IgM_{antigen}$) が当てはまり、別の表現では $IgM \cdot (IgM_{antigen}/IgM)$ と表せる。非線形項としてオフセット案では、結合型 IgM 密度である ($IgM_{antigen}/IgM$) から一定の値 $Offset$ を減じたものを有効値とした。また、Hill 式案では、結合型 IgM 密度に Hill 式を適用し、協同性の指標を n 、半飽和時の結合密度を K とした。

変数とパラメータの一覧を、初期値や取りうる範囲とともに表 2.1 および表 2.2 にまとめた。

表 2.1 変数とその意味、初期値、取り得る範囲。

変数	意味	初期値	取り得る範囲
IgM	IgM 発現数	0 – 1 (実験値を規格化)	0 – 1
$IgM_{antigen}$	結合型 IgM 数	0	0 – 1
$Trans_{on}$	活性型転写因子数	0 – 1 (=IgM 初期値)	0 – 1

表 2.2 パラメータとその意味、概ね取り得る範囲、単位。

パラメータ	意味	概ね取り得る範囲	単位
k_1	抗原結合速度	0 – 10	mL/ μ g/h
k_2	抗原解離速度	0 – 10	/h
k_3	トニックシグナル の強さ	0 – 0.2	/h
k_4	結合型シグナル の強さ	0 – 0.2	/h
d_1	IgM 減少速度	0 – 0.2	/h
d_2	活性型転写因子 の減少速度	0 – 0.2	/h
$Offset$	IgM 結合密度に 対するオフセット	0 – 1	–
n	IgM 結合密度の 協同性の指標	0 – 10	–
K	半飽和時の IgM 結合密度	0 – 1	–

2.1.4 数理モデルの考察

まず、本モデルは個々の B 細胞についてのモデルであることに注意したい。パラメータは共通だが、細胞ごとに変数の初期値は異なる。

式(1)について考える。ここでは、IgM は時間に対して減少関数である。IgM の分解様式は、「B 細胞が最低限の栄養下で培養される」という環境に依存した仮定であり、栄養条件が良い *in vivo* での挙動とは必ずしも一致しない。とは言っても、*in vivo* における B 細胞の生存率や生存シグナルを観測することはできないため、培養環境を想定せざるを得なかった。

式(3)について考える。活性型転写因子の減少様式は、タンパク質が確率的に活性状態から不活性状態へ移行することを想定している。そもそも、細胞がどのような条件でアポトーシスを起こすかについては、次の3つの考え方が挙げられる。①細胞外から因子（デスリガンド）を受け取ったとき。②細胞内のプログラムに基づいた細胞死。③必須タンパク質群のうち一つでも規定値を下回ったとき。ここでは、末梢の免疫細胞にもっとも良く当てはまるのは③だと考えた。本モデルで、活性型転写因子数が既定値を下回った時点を細胞死と定義したことは、このような理由に基づいている。

非線形要素としてオフセット案と Hill 式案の2種を定義したが、前者は結合型 IgM の有効値を解析するのに適しており、後者は結合型 IgM の協同性を解析するのに適しているため、両者を用意しておくことには価値がある。

また、非線形項の適用場所について考える。複雑なシグナル伝達経路のどこに非線形要素が存在するかについては、多くの研究者が探しているところであり、明確に指摘することは難しい。Hisaaki Shinohara らは、転写因子に近い比較的下流に正のフィードバックループがあり、これが閾値応答をもたらしていることを提唱した[38]。また、4つの主要なシグナル伝達経路の内、いくつかはクロストークしているという報告もある。例えば、PI3K は AKT 経路のみならず、PLC γ 2 経路や ERK/MAPK 経路も惹起する[82]。これによって非線形性が生じる可能性もある。しかし、シグナルは細胞内を拡散しながら伝播するため、より着目すべきは上流と考え、本研究では IgM の架橋・凝集に焦点を当てたモデルを構築した。ただし、この他に非線形要素が存在することを否定するものではない。

最後に、パラメータ群について考える。パラメータ群のうち、 k_1 , k_2 , d_1 は実験によって直接定めることができるが、これ以外は、複数のタンパク質の相互作用を抽象化した独自のものであり、実験によって定めることが難しい。したがって、これらのパラメータ群は機械的な手法により最適化し、妥当性を検討する必要がある。また、各パラメータが取り得る範囲については、 k_1 , k_2 は[分]単位の速い反応のため、最大を 10 とした。この最大値は、結合型 IgM が 10 分間で 8 割以上解離するような速さであり、実際はこれより遅いだろうという判断に基づく。 k_3 , k_4 , d_1 , d_2 はタンパク質の反応にかかる係数のため、[時間]単位の反応であることを考慮し、最大を 0.2 と見積もった。この最大値は、ある変数が 3.5 時間で半減するような速さであり、これが最大値だろうと考えた。

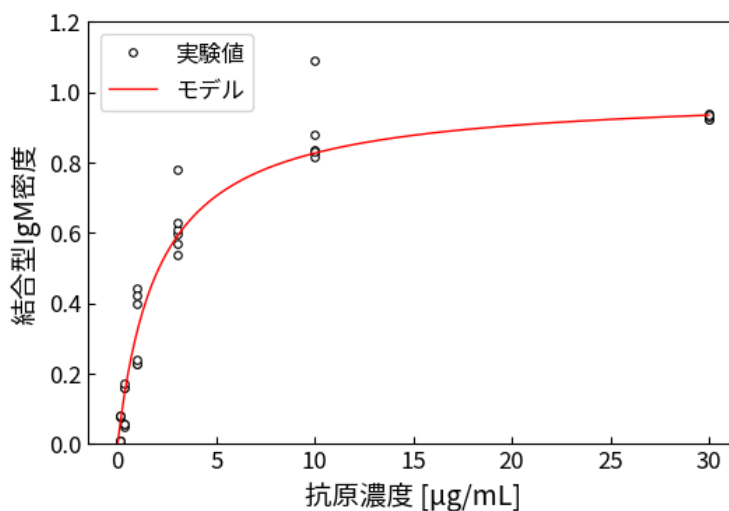
2.2 実験およびパラメータ群の決定

2.2.1 抗原と IgM の結合・解離速度の決定

k_1 , k_2 はそれぞれ抗原と IgM の結合・解離速度である。式(2)より、抗原濃度[$\mu\text{g/mL}$]に対する結合型 IgM 密度は、

$$\frac{IgM_{antigen}}{IgM} = \frac{antigen}{antigen + \frac{k_2}{k_1}} \quad (4)$$

である。マウス実験にて、異なる抗原濃度 (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 [$\mu\text{g/mL}$]) における結合型 IgM 密度を調べたところ、図 2.6 (実験値) の通りであった (研究業績[2] Fig. 6A)。よって、式(4)と実験結果から、 $\frac{k_2}{k_1} = 2.1$ を得た (図 2.6 モデル)。

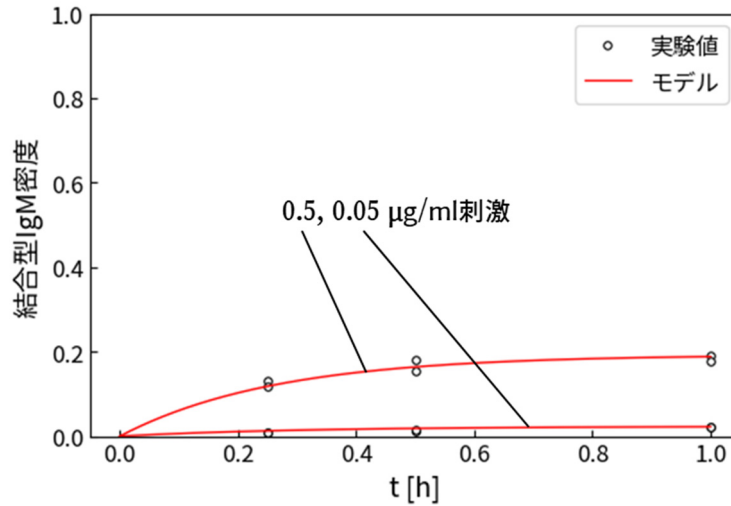


<引用>実験値は研究実績[2] Shoya Yasuda, et al., *Sci Rep* 2017 より
図 2.6 抗原濃度[$\mu\text{g/mL}$]に対する結合型 IgM 密度。実験値は
2 マウス 6 ウェルで、外れ値はフィッティングに使用して
いない。

次に、 k_1 , k_2 の絶対値を定めたい。式(1)と式(2)より、時間 t [h] に対する結合型 IgM 密度は、

$$\frac{IgM_{antigen}}{IgM} = \frac{k_1 \cdot antigen(1 - e^{-(k_1 \cdot antigen + k_2)t})}{k_1 \cdot antigen + k_2} \quad (5)$$

である。マウス実験で、抗原濃度 0.5 および 0.05 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]における、15, 30, 60 [min]時点の結合型 IgM 密度を調べたところ、図 2.7 (実験値) の通りであった (研究業績[2] Fig. 6B)。よって、式(5)、実験結果および $\frac{k_2}{k_1} = 2.1$ から、 $k_1 = 1.5$, $k_2 = 3.1$ を得た (図 2.7 モデル)。



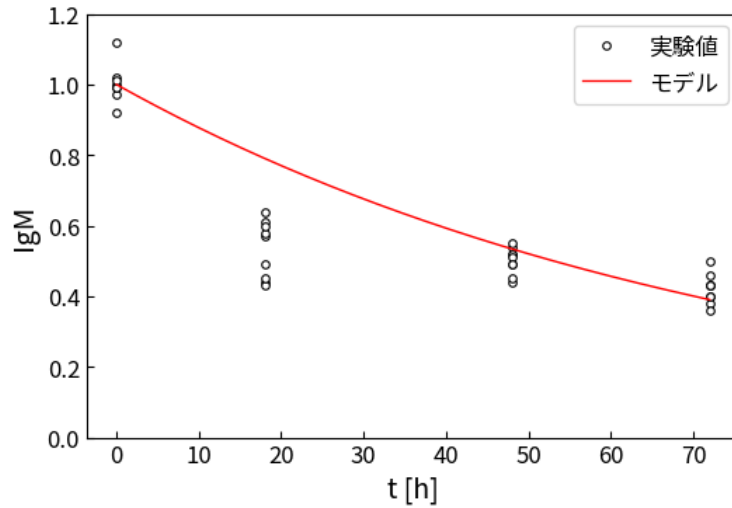
<引用>実験値は研究実績[2] Shoya Yasuda, et al., *Sci Rep* 2017 より
 図 2.7 時間 t [h]に対する結合型 IgM 密度。実験値は 1 マウス 2 ウェル。

2.2.2 IgM 減少速度の決定

d_1 は IgM の減少速度である。式(1)より、時間 t [h]に対する IgM 数は、

$$IgM = e^{-d_1 \cdot t} \quad (6)$$

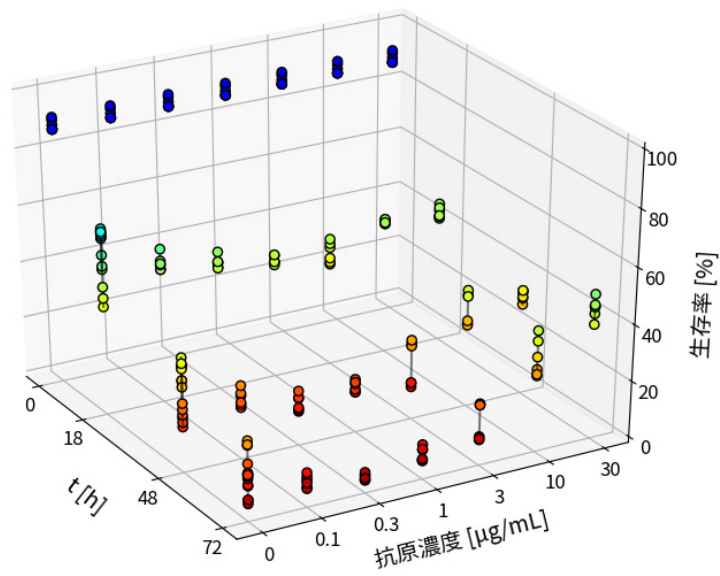
である。しかし、実験では個々の細胞の IgM 数を追跡することができない。そこで、細胞集団の IgM 平均値の推移を調べ、それが個々の細胞にも当てはまると仮定した。細胞を精製した時間を基準に、0, 18, 48, 72 [h]時点の IgM 発現数を測定したものが図 2.8 (実験値) である (研究業績[2] Fig. 7A)。式(6)と実験結果より、 $d_1 = 0.013$ を得た (図 2.8 モデル)。



<引用>実験値は研究実績[2] Shoya Yasuda, et al., *Sci Rep* 2017 より
 図 2.8 時間 t [h] に対する IgM 発現数。実験値は 3 マウス 9 ウェルで、18 [h] データはフィッティングに使用していない (2.3.3 参照)。

2.2.3 オフセット案におけるその他のパラメータ群の最適化

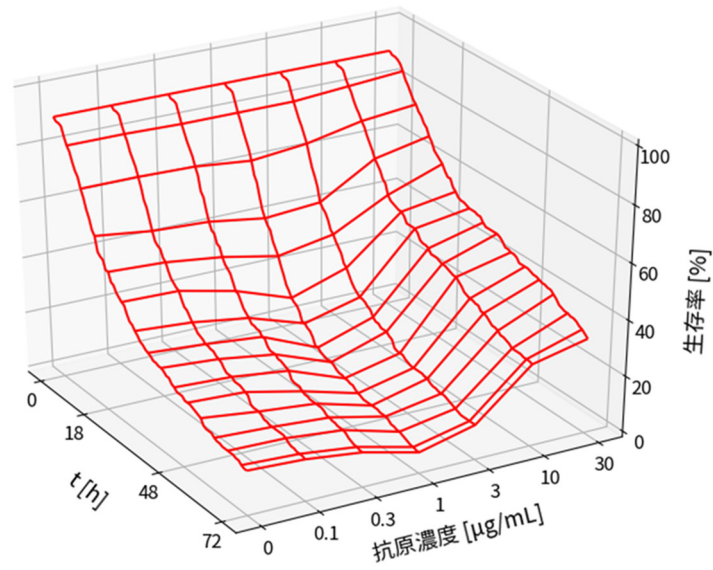
パラメータのうち、 k_3 , k_4 , d_2 , *Offset* は実験で直接定めることが難しいことは 2.1.4 に述べた通りである。したがって、観測可能な実験結果からこれらを推定する必要がある。マウス実験によって得られた、異なる抗原濃度における B 細胞生存率の推移が図 2.9 である (研究業績[2] Fig. 5)。



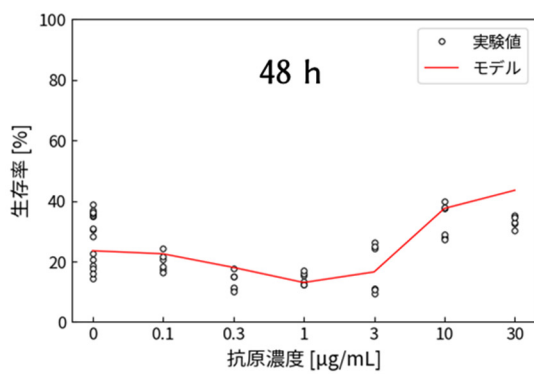
<引用>研究実績[2] Shoya Yasuda, et al., *Sci Rep* 2017 より
 図 2.9 抗原濃度[$\mu\text{g/mL}$]に対する B 細胞生存率[%]の推移。実験は
 2 マウス 6 ウェル (ただし 0 [$\mu\text{g/mL}$]は 5 マウス 12 ウェル)。

一方で、シミュレーションは 200 細胞で行い、0.01 時間ごとの生存率を算出できる。実験値とシミュレーションの誤差二乗合計を評価値として、評価値ができるだけ小さくなるように、遺伝的アルゴリズムを用いてパラメータ群を最適化した。その結果、 $k_3 = 0.018$, $k_4 = 0.070$, $d_2 = 0.15$, $Offset = 0.48$ が得られた。図 2.9 に対応する生存率推移を図 2.10 に、全パラメータを表 2.3 にまとめた。

a



b



c

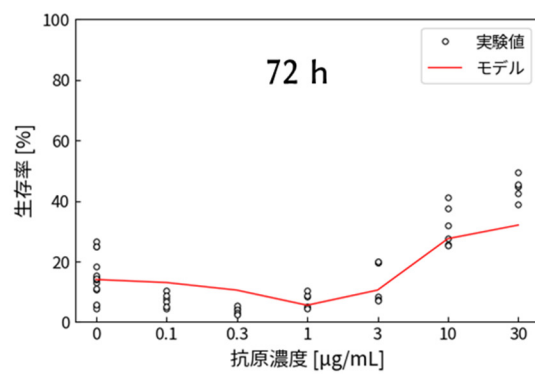


図 2.10 オフセット案でのパラメータ最適化の結果。(a)抗原濃度[$\mu\text{g/mL}$]に対する B 細胞生存率 [%]の推移。(b)48 [h]時点での実験値とモデル。(c)72 [h]時点での実験値とモデル。

表 2.3 オフセット案において最適化されたパラメータの一覧。

パラメータ	最適値	単位
k_1	1.5	$\text{mL}/\mu\text{g}/\text{h}$
k_2	3.1	/h
k_3	0.018	/h
k_4	0.070	/h
d_1	0.013	/h
d_2	0.15	/h
Offset	0.48	—

2.2.4 Hill 式案におけるその他のパラメータ群の最適化

Hill 式案においても、2.2.3 と同様の手順でパラメータ k_3 , k_4 , d_2 , n , K を最適化した。その結果、 $k_3 = 0.018$, $k_4 = 0.050$, $d_2 = 0.15$, $n = 4.8$, $K = 0.83$ が得られた。図 2.9 に対応する生存率推移を図 2.11 に、全パラメータを表 2.4 にまとめた。

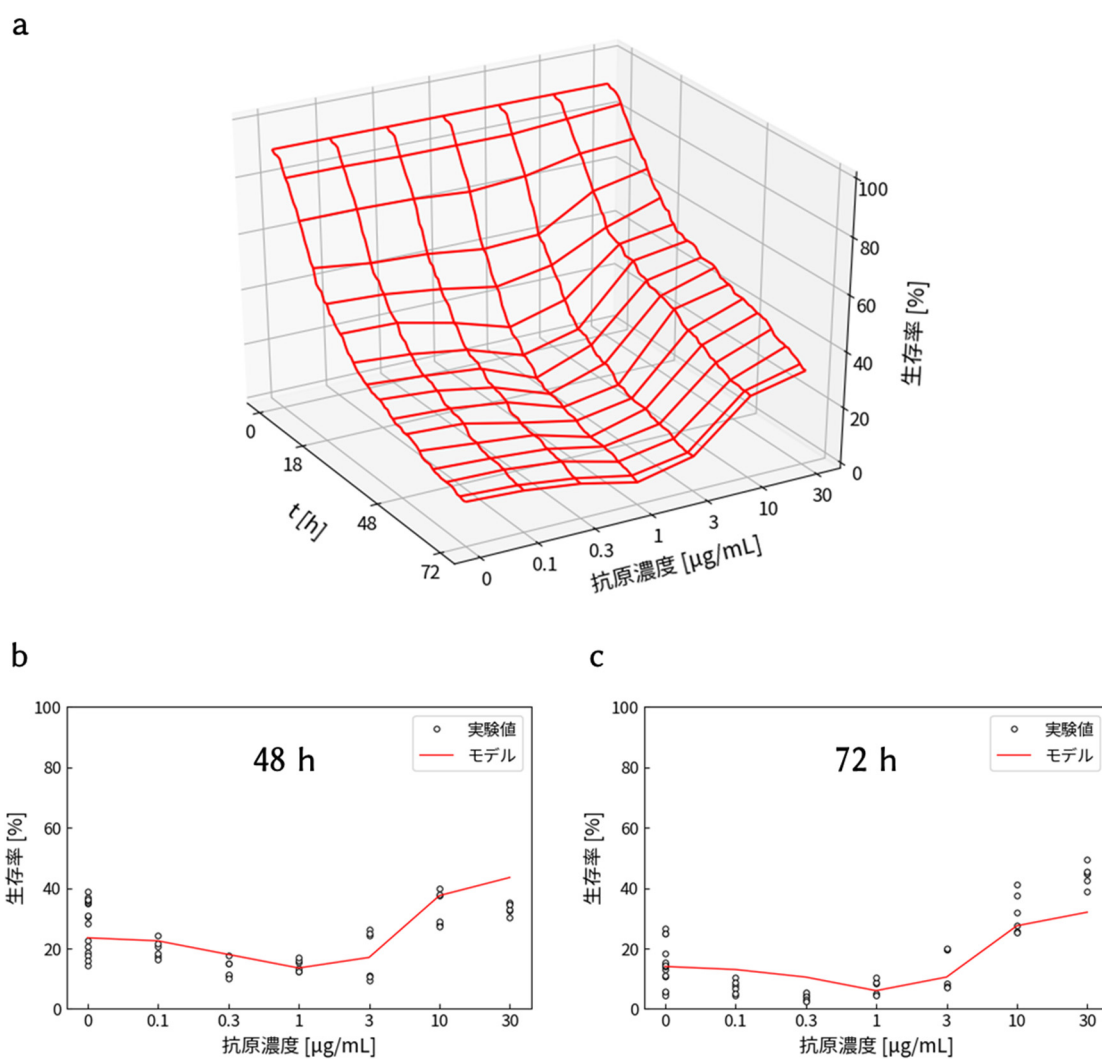


図 2.11 Hill 式案でのパラメータ最適化の結果。(a)抗原濃度[$\mu\text{g/mL}$]に対する B 細胞生存率[%]の推移。(b)48 [h]時点での実験値とモデル。(c)72 [h]時点での実験値とモデル。

表 2.4 Hill 式案において最適化されたパラメータの一覧。

パラメータ	最適値	単位
k_1	1.5	mL/ μ g/h
k_2	3.1	/h
k_3	0.018	/h
k_4	0.050	/h
d_1	0.013	/h
d_2	0.15	/h
n	4.8	–
K	0.83	–

2.2.5 実験の妥当性

マウス実験の妥当性について考える。実験は、統計的な処理ができるほどの回数を試行しなかったため、平均値や標準偏差は表示していない。これは、30 [μ g/mL]の抗原刺激が非常に高価であることが主な原因である。また、時折外れ値として処理される値も見られた。これについては、マウスの調子に依存する部分と、実験者の手腕に依存する部分を切り分けることが難しい。このように実験結果の妥当性については追及の余地が残るが、雑誌論文（研究業績[1,2]）を発表済みであることを考慮していただきたい。他の論文では、あくまで主観的ではあるが、概ね3マウス以上の実験結果が掲載される場合が多い。

使用した疑似抗原の濃度について考える。疑似抗原の濃度を個数に変換した場合、もっとも低い濃度である0.1 [μ g/mL]の場合では1細胞あたり約 10^6 個である（F(ab')₂抗IgM抗体が約110 [kDa]、細胞密度が 5×10^5 [個/mL]、培地が200 [μ L]より）。細胞1個あたりのBCR数は1万~10万個と言われるため、少なく見積もってもBCR数の10倍数の疑似抗原が与えられた。

マウス実験の結果について考える。異なる抗原濃度における生存率推移（図2.9）では、微小刺激濃度において生存率が低下する現象が見られ、1.2.1で言及した先行研究[20,21]の結果を支持する結果となった。また、30 [μ g/mL]のとき、48 [h]よりも72 [h]の生存率が高いのは、強い結合型シグナルにより細胞が活性化し、増殖を始めたからだと考えられる。増殖の可能性は他の刺激濃度でも懸念されるが、どの細胞がどの時点で増殖したかを追跡することはできない。本研究では、増殖の影響は小さいと考え考慮しないこととした。

2.2.6 パラメータ群最適化の妥当性

本モデルの未知パラメータ群の最適化は、最適化問題として見た場合、多峰性の問題と考えられる。そこで、最適化手法としてグリッドサーチ（Grid search, GS）も行き、遺伝的アルゴリズム（Genetic algorithm,

GA) の結果と比較した。

グリッドサーチは、各パラメータを細かな幅で刻み、それらの全ての組み合わせを探索する方法である。その後、最良のパラメータセットから山登り法に従い、さらなる最適化を行った。ただし、理論上は、各パラメータを無限に細かく刻むことで、確実に大域解を得ることができる。ここでは、GA とほとんど同じ計算時間（概ね 3 日位内）で解が得られる程度の刻み幅を設定した。具体的には、オフセット案は 4 パラメータの最適化のため、各パラメータとも 10 段階刻みとし $10^4=10000$ 通りを探索した。Hill 式案では 5 パラメータのため、 $6^5=7776$ 通りを探索した（表 2.5）。

表 2.5 グリッドサーチおよび GA の結果。

パラメータ	オフセット案		Hill 式案		単位
	グリッドサーチ	GA	グリッドサーチ	GA	
k_1	1.5	1.5	1.5	1.5	mL/ μ g/h
k_2	3.1	3.1	3.1	3.1	/h
k_3	0.019	0.018	0.029	0.018	/h
k_4	0.076	0.070	0.068	0.050	/h
d_1	0.013	0.013	0.013	0.013	/h
d_2	0.15	0.15	0.20	0.15	/h
<i>Offset</i>	0.50	0.48	-	-	-
n	-	-	5.7	4.8	-
K	-	-	0.83	0.83	-
評価値	7186	7032	8749	7011	-

これによれば、オフセット案と Hill 式案のいずれにおいても、GA はグリッドサーチより優れていた。詳しく見ると、一つの大きな局所解の中において、やや GA が勝る結果であった。よって、本モデルのパラメータ群最適化が多峰性の問題であることが確認され、遺伝的アルゴリズムを用いたことの妥当性が示された。とは言っても、遺伝的アルゴリズムの結果が大域解であることを証明することができるわけではない。そのため、遺伝的アルゴリズムでは 5 種の乱数シードを用いてそれぞれ最適化を行い、各パラメータの最適値が概ね誤差 5%未満に収まることを確認し、妥当であると結論づけた。表 2.3、2.4 および 2.5 には、5 種の実行結果のうち最良のものを示している。

2.2.7 最適パラメータ群の妥当性と安定性

いずれのパラメータも、表 2.2 で示した「概ね取り得る範囲」に収まっており、妥当な範囲の値といえることを確認しておきたい。各パラメータを上下に 10%動かした際の、評価値（実験値との誤差二乗合計）の変化を調べた（図 2.12）。図 2.12 には、グリッドサーチと GA による最適化の結果も表示している。

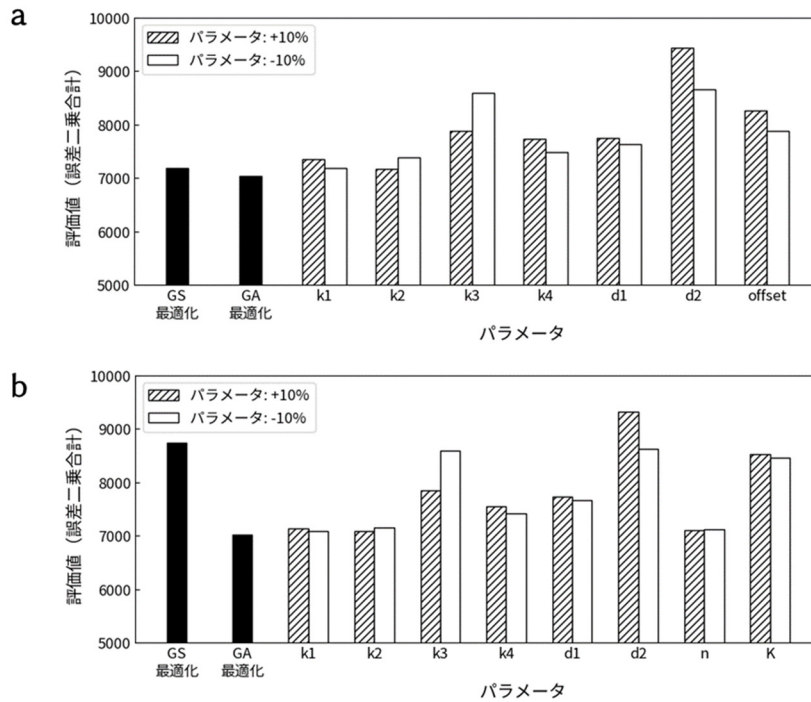


図 2.12 パラメータの安定性解析。(a)オフセット案。(b)Hill 式案。

これによれば、 k_1 と k_2 は[分]単位の反応係数のため、10%程度上下してもさほど影響はない。 d_2 は $Trans_{on}$ の減少速度のため、生存率に直接的に影響する。また、*Offset*は生存率が落ち込む濃度点を左右するため、同じく生存率に大きく影響する。Hill 式案の n を 10%程度上下させることは、生存率に対してほとんど影響を与えない。これは、 n が結合型シグナルにかかる閾値の「キレの良さ」を示す指標に過ぎず、閾値の大きさは K に支配されているためである。 K は*Offset*と似た意味を持ち、感度は高かった。

2.3 モデルのロバスト性

マウスの調子や実験者の手腕が変化した、あるいは実験回数が不足しており母集団が持つ真の値から離れたデータが得られた、といったように実験データが十分に信頼できない状況においても、本モデルが適用できるかを検証した。検証では、図 2.6~2.9 で示したマウス実験結果がある程度上または下にずれた（対応するパラメータが 0.5 倍や 2 倍になった）と仮定した摂動を加え、それぞれパラメータ群の最適化を行った。

2.3.1 図 2.6 の実験データに摂動を加えた場合

k_2/k_1 が 2 倍または 1/2 倍相当に変化したと仮定し、他のパラメータ群の最適化を行った（図 2.13、表

2.6)。その結果、 k_2/k_1 に対する摂動は、他のパラメータ群に特筆すべき影響を与えなかった。

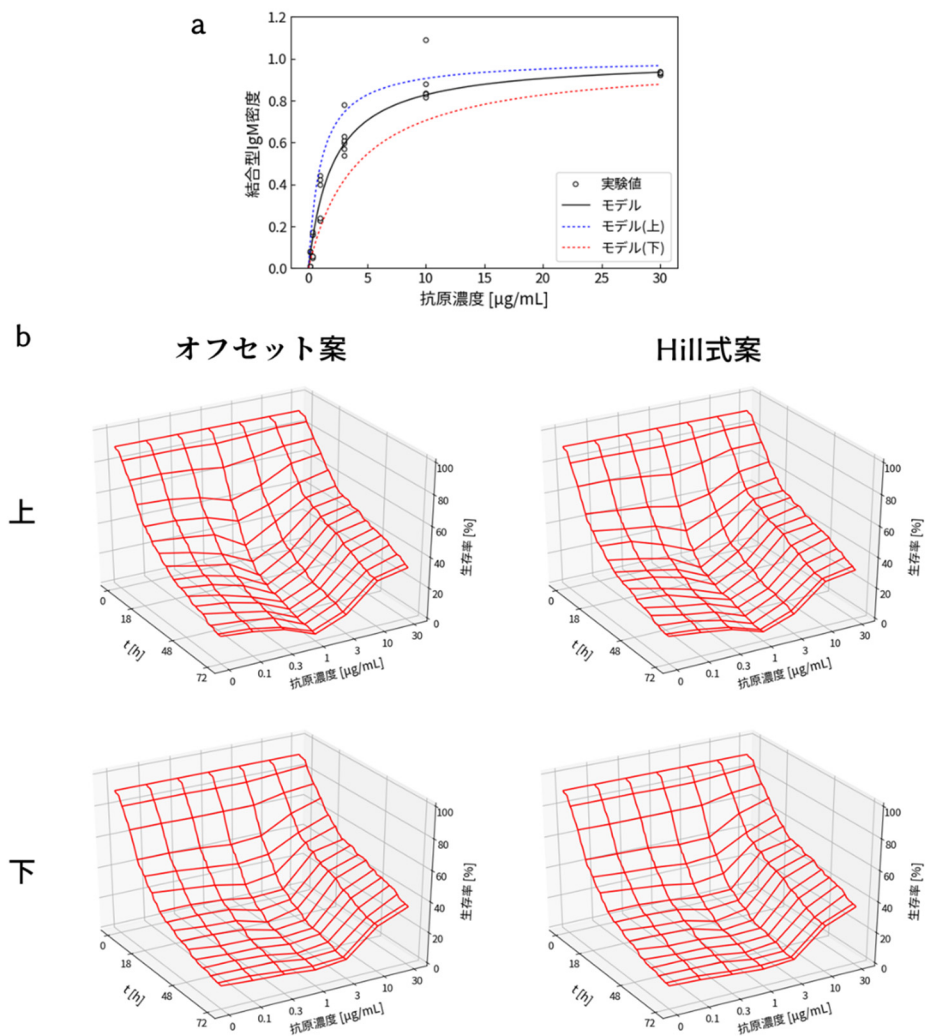


図 2.13 図 2.6 の実験データに上下の摂動を加えた場合の、オフセット案と Hill 式案でのパラメータ最適化の結果。(a)実験データに上下の摂動を加えた場合の、 k_2/k_1 のフィッティング。(b)パラメータ最適化の結果。

表 2.6 図 2.6 の実験データに上下の摂動を加えた場合の、オフセット案と Hill 式案でのパラメータ最適化の結果。（青字）摂動を与えたパラメータ。（赤字）その他のパラメータ群の最適化結果。

パラメータ	オフセット案			Hill 式案			単位
	最適値	最適値 (上)	最適値 (下)	最適値	最適値 (上)	最適値 (下)	
k_1	1.5	2.5	0.81	1.5	2.5	0.81	mL/ μ g/h
k_2	3.1	2.6	3.4	3.1	2.6	3.4	/h
k_3	0.018	0.018	0.017	0.018	0.020	0.017	/h
k_4	0.070	0.086	0.060	0.050	0.048	0.051	/h
d_1	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	/h
d_2	0.15	0.13	0.14	0.15	0.15	0.15	/h
<i>Offset</i>	0.48	0.63	0.33	-	-	-	-
n	-	-	-	4.8	6.9	3.8	-
K	-	-	-	0.83	0.88	0.75	-
評価値	7032	7035	7103	7011	6915	7159	-

2.3.2 図 2.7 の実験データに摂動を加えた場合

k_1 が2倍または1/2倍相当に変化したと仮定し、他のパラメータの最適化を行った（図 2.14、表 2.7）。その結果、 k_1 に対する摂動は、他のパラメータ群に特筆すべき影響を与えなかった。

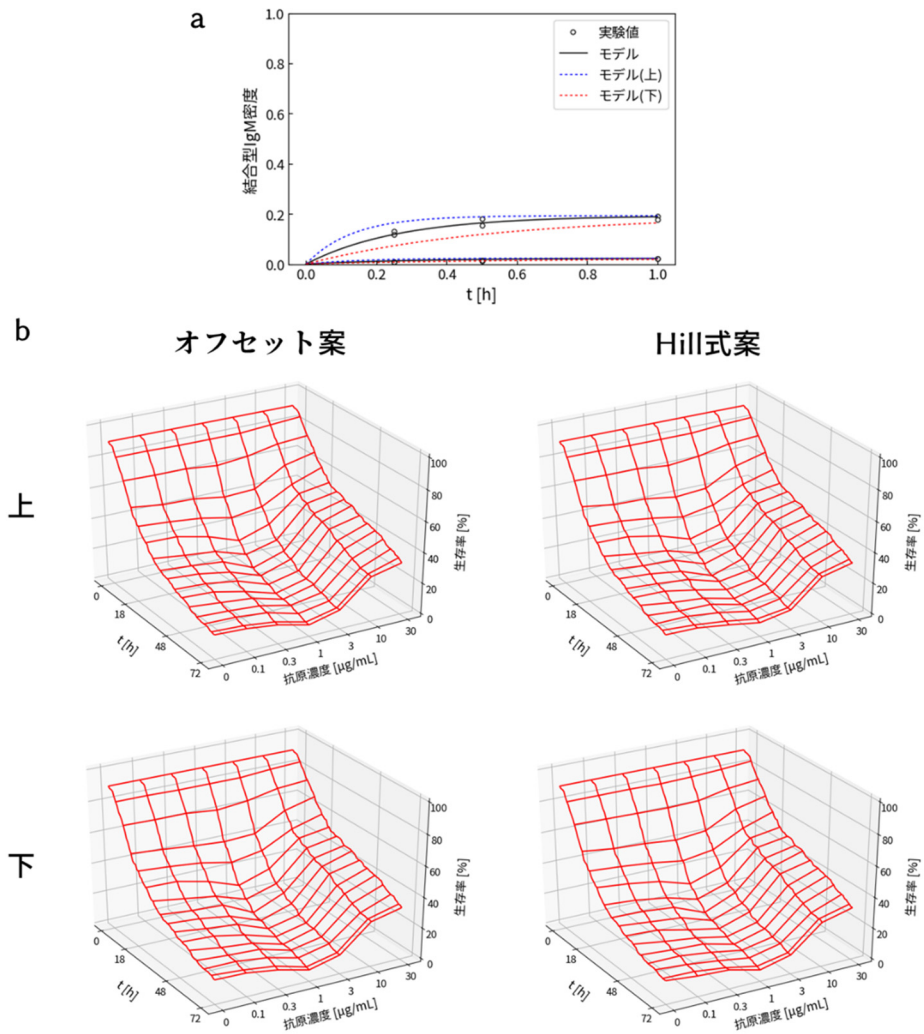


図 2.14 図 2.7 の実験データに上下の摂動を加えた場合の、オフセット案と Hill 式案でのパラメータ最適化の結果。(a)実験データに上下の摂動を場合の、 k_1 および k_2 のフィッティング。(b)パラメータ最適化の結果。

表 2.7 図 2.7 の実験データに上下の摂動を加えた場合の、オフセット案と Hill 式案でのパラメータ最適化の結果。(青字) 摂動を与えたパラメータ。(赤字) その他のパラメータ群の最適化結果。

パラメータ	オフセット案			Hill 式案			単位
	最適値	最適値 (上)	最適値 (下)	最適値	最適値 (上)	最適値 (下)	
k_1	1.5	2.9	0.73	1.5	2.9	0.73	mL/ μ g/h
k_2	3.1	6.1	1.5	3.1	6.1	1.5	/h
k_3	0.018	0.018	0.019	0.018	0.018	0.017	/h
k_4	0.070	0.070	0.070	0.050	0.050	0.052	/h
d_1	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	/h
d_2	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.14	/h
Offset	0.48	0.48	0.47	-	-	-	-
n	-	-	-	4.8	4.8	4.4	-
K	-	-	-	0.83	0.83	0.86	-
評価値	7032	7043	7058	7011	7035	6997	-

2.3.3 図 2.8 の実験データに摂動を加えた場合

d_1 が 2 倍または 1/2 倍相当に変化した場合と、加えて、IgM の減少様式を単調減少ではなく、別式(1)_2 で置き換えた場合における検証を行った。

$$\frac{d \text{IgM}}{dt} = -d_1(\text{IgM} - \text{IgM}_0 \cdot l) \quad (1)_2$$

IgM_0 は IgM 初期値、 l は底上げ割合を意味する。別式(1)_2 の解析解は次の通りである。

$$\text{IgM} = \text{IgM}_0 \cdot l + \text{IgM}_0(1 - l)e^{-d_1 t} \quad (6)_2$$

パラメータの最適化の結果を図 2.15、表 2.8 に示した。

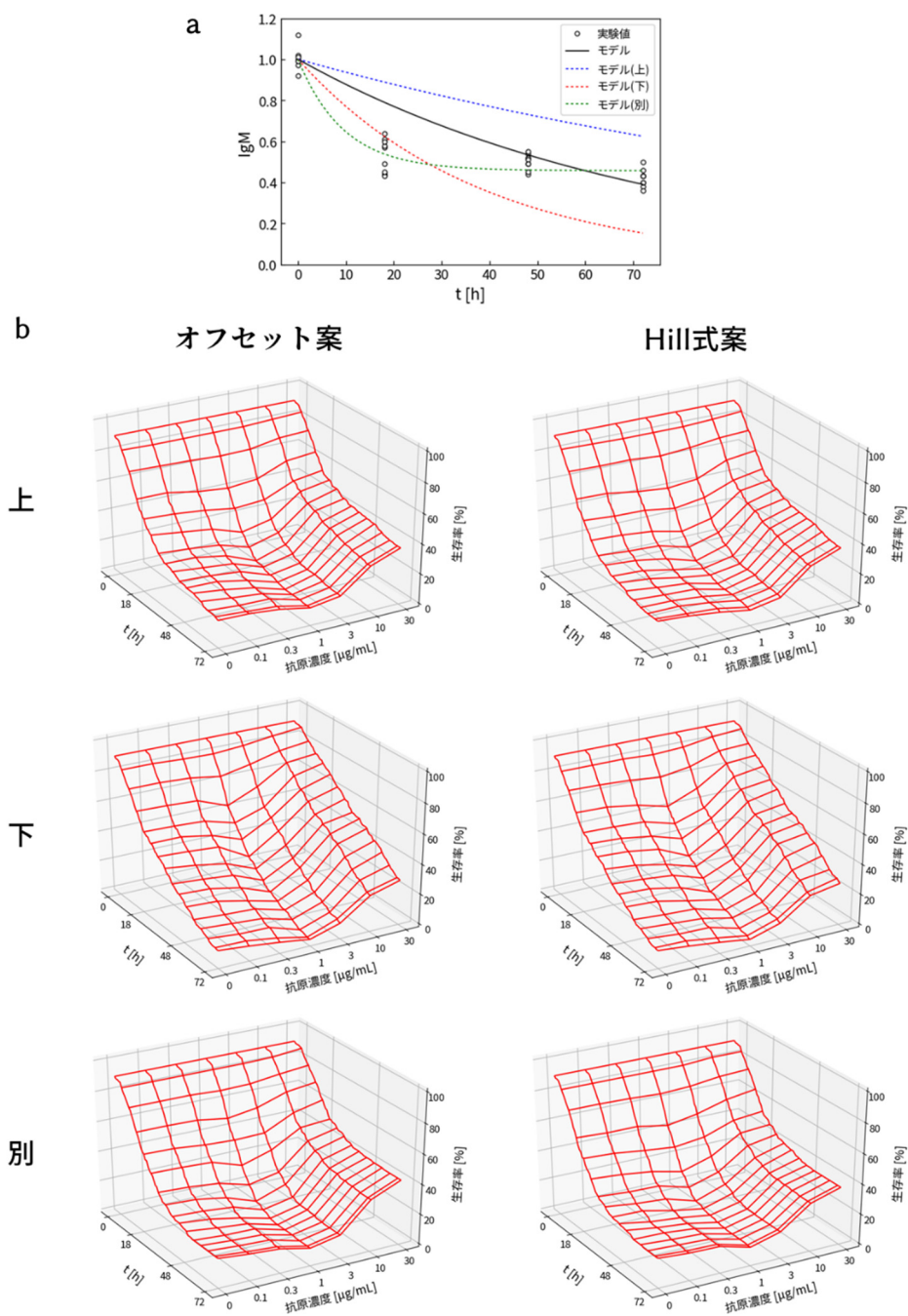


図 2.15 図 2.8 の実験データに上下の摂動を加えた場合の、オフセット案と Hill 式案でのパラメータ最適化の結果。(a)実験データに上下の摂動を加えた場合の、 d_1 のフィッティング。緑破線は別式(1)_2 に従うフィッティング。(b)パラメータ最適化の結果。

表 2.8 図 2.8 の実験データに上下の摂動を加えた場合の、オフセット案と Hill 式案でのパラメータ最適化の結果。(青字) 摂動を与えたパラメータ。(赤字) その他のパラメータ群の最適化結果。

パラメータ	オフセット案				Hill 式案				単位
	最適値	最適値 (上)	最適値 (下)	最適値 (別)	最適値	最適値 (上)	最適値 (下)	最適値 (別)	
k_1	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	mL/ μ g/h
k_2	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	/h
k_3	0.018	0.012	0.036	0.016	0.018	0.011	0.039	0.019	/h
k_4	0.070	0.043	0.14	0.065	0.050	0.035	0.091	0.047	/h
d_1	0.013	0.0065	0.026	0.11	0.013	0.0065	0.026	0.11	/h
l	-	-	-	0.46	-	-	-	0.46	-
d_2	0.15	0.13	0.16	0.12	0.15	0.13	0.17	0.13	/h
Offset	0.48	0.47	0.45	0.48	-	-	-	-	-
n	-	-	-	-	4.8	4.4	5.2	4.1	-
K	-	-	-	-	0.83	0.88	0.74	0.83	-
評価値	7032	7059	9412	7210	7011	6923	9328	7317	-

実験データに対して下方向の摂動 (d_1 が 2 倍になるような摂動) を与えた場合に、最適化時の評価値が約 7000 から 9000 にまで上昇した。これは次の理由による。生存率推移は、IgM の減少と $Trans_{on}$ の減少に応じて低下する一方で、トニックシグナルと結合型シグナルによって支えられる。IgM が異常な減少をたどった場合、トニックシグナルと結合型シグナルを増やすだけでは対応しきれず、やや無理のあるフィッティングになった。

2.3.4 図 2.9 の実験データに摂動を加えた場合

生存率推移のうち 18, 48, 72h のデータが 1.5 倍または 1/2 倍相当に変化したと仮定し、他のパラメータの最適化を行った (図 2.16、表 2.9)。

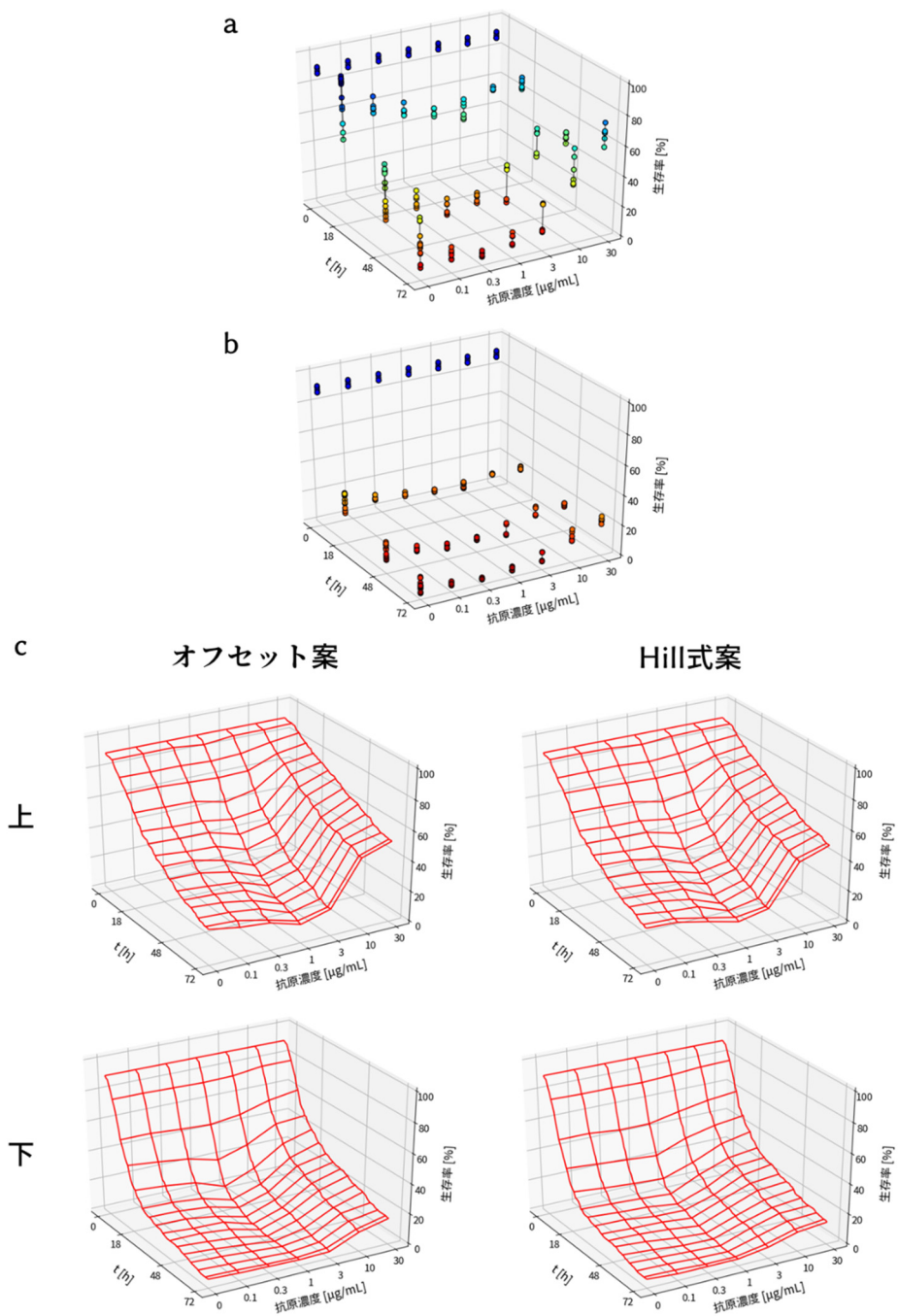


図 2.16 図 2.9 の実験データに上下の摂動を加えた場合の、オフセット案と Hill 式案でのパラメータ最適化の結果。(a)実験データに上下の摂動を加えたもの。(b)パラメータ最適化の結果。

表 2.9 図 2.9 の実験データに上下の摂動を加えた場合の、オフセット案と Hill 式案でのパラメータ最適化の結果。(赤字)パラメータ群の最適化結果。

パラメータ	オフセット案			Hill 式案			単位
	最適値	最適値 (上)	最適値 (下)	最適値	最適値 (上)	最適値 (下)	
k_1	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	mL/ μ g/h
k_2	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	/h
k_3	0.018	0.015	0.015	0.018	0.016	0.015	/h
k_4	0.070	0.087	0.049	0.050	0.049	0.033	/h
d_1	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	/h
d_2	0.15	0.098	0.20	0.15	0.10	0.20	/h
<i>Offset</i>	0.48	0.52	0.43	-	-	-	-
n	-	-	-	4.8	5.7	3.3	-
K	-	-	-	0.83	0.82	0.73	-
評価値	7032	17260	2540	7011	17601	2371	-

実験データに対して上方向の摂動 (1.5 倍になる摂動) を与えた場合に、最適化時の評価値が約 7000 から 17000 にまで上昇した。これは、値の規模が大きくなったことで、誤差二乗合計も拡大したためである。実験データに対して下方向の摂動 (0.5 倍になる摂動) を与えた場合には、最適化時の評価値が約 2000 にまで低下した。これも同様に、値の規模に応じた誤差の縮退である。

2.3.5 モデルのロバスト性検証の結論

マウスの調子や実験者の手腕が変化した、あるいは実験回数が不足しており母集団が持つ真の値から離れたデータが得られた、というような、実験データが十分に信頼できない状況においても、本モデルが、個々のパラメータの意味を損なうことなく適用できることが確認された。これは、本モデルがロバストであることを証明するのみならず、T 細胞をはじめとする他の免疫細胞にも適用できる可能性があることも示唆している。なお、別式(1)_2 を用いても問題なくモデルは成立するが、本研究では、より単純である単調減少モデルを採用した。

2.4 非線形項の妥当性と解析

2.4.1 非線形項を適用しない場合

2.1.2 で言及したように、細胞膜上に分散した結合型 IgM から個別に結合型シグナルが生じる場合、オフセットや Hill 式が介在する余地はない。オフセットや Hill 式を適用しない場合、式(3)は次の通りである。

$$\frac{dTrans_{on}}{dt} = k_3 \cdot Trans_{off} \cdot IgM_{free} + k_4 \cdot Trans_{off} \cdot IgM_{antigen} - d_2 \cdot Trans_{on} \quad (3)_2$$

$$1 = Trans_{off} + Trans_{on}$$

異なる IgM 初期値を持つ 5 つの細胞を用いて、抗原濃度に対する式(3)_2 をプロットしたのが図 2.17 である。

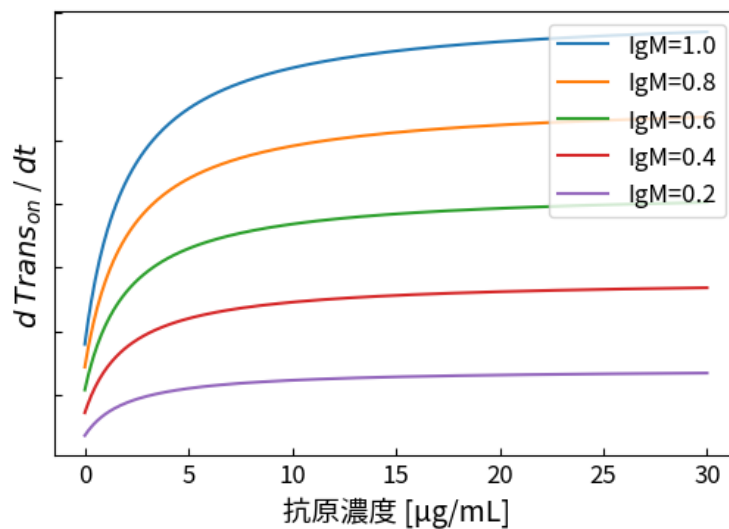


図 2.17 異なる IgM 初期値を持つ 5 つの細胞を用いた、抗原濃度に対する式(3)_2 のプロット。

これより、いずれの細胞においても、「微小抗原刺激における生存率の低下」が起き得ないことが分かった。よって、オフセットや Hill 式で表現された非線形項は本モデルに必須である。

2.4.2 非線形項を結合型 IgM の「数」に適用した場合

では、オフセットや Hill 式を、結合型 IgM の「数」に対して適用した場合はどうなるだろうか。式(3)を次のように書き換えた。

$$\frac{dTrans_{on}}{dt} = k_3 \cdot Trans_{off} \cdot IgM_{free} + k_4 \cdot Trans_{off} \cdot F - d_2 \cdot Trans_{on} \quad (3)_3$$

$$1 = Trans_{off} + Trans_{on}$$

$$F = IgM \cdot \frac{f(IgM_{antigen})}{IgM} = IgM \cdot \frac{(IgM_{antigen} - offset)}{IgM} > 0$$

オフセット案

$$F = IgM \cdot \frac{f(IgM_{antigen})}{IgM} = IgM \cdot \frac{(IgM_{antigen}^n)}{K^n + IgM_{antigen}^n}$$

Hill 式案

異なる IgM 初期値を持つ 5 つの細胞を用いて、抗原濃度に対する式(3)_3 をプロットしたのが図 2.18 である。

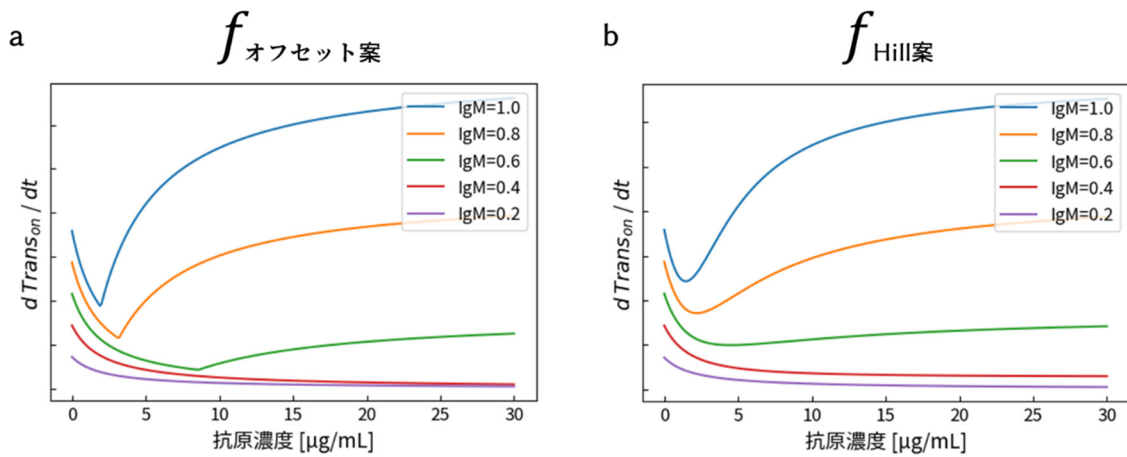


図 2.18 異なる IgM 初期値を持つ 5 つの細胞を用いて、抗原濃度に対する式(3)_3 のプロット。
(a)オフセット案の場合。(b)Hill 式案の場合。

これによれば、一部の細胞では「微小抗原刺激における生存率の低下」が起こるが、他の細胞では落ち込む濃度点が変わることが分かった。IgM 発現数は細胞によって最大で 1000 倍程度の差がある (図 m.1 参照)。したがって、この適用法では、個々の細胞がバラバラの挙動を取り、集団として図 2.9 のような挙動を成さない。よって、オフセットや Hill 式を、結合型 IgM の「数」に対して適用することが適切でないことが、モデルの解析の側面から確認された。

2.4.3 非線形項を結合型 IgM の「密度」に適用した場合

では、本モデルで採用したように、オフセットや Hill 式を、結合型 IgM の「密度」に対して適用した場合も確認しておきたい。2.4.2 と同様に、式(3)は図 2.19 のようにプロットされた。

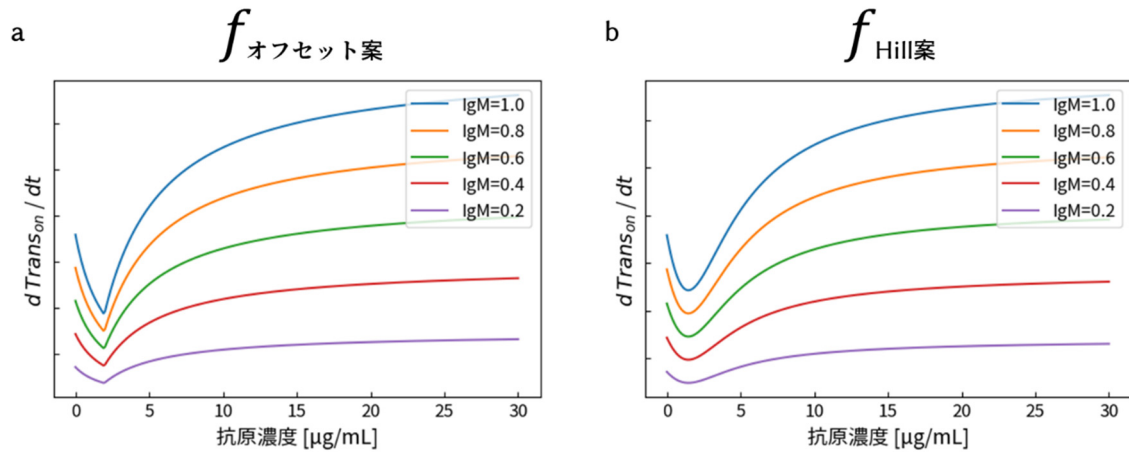


図 2.19 異なる IgM 初期値を持つ 5 つの細胞を用いて、抗原濃度に対する式(3)のプロット。(a)オフセット案の場合。(b)Hill 式案の場合。

これによれば、全ての細胞が一つの濃度点で生存率を減じることが分かる。すなわち、細胞が持つ IgM 数にかかわらず、全ての細胞が統一した挙動を成し、本研究で扱う現象を表現し得ることが分かる。

2.4.4 オフセット案と Hill 案の違い

オフセット案と Hill 式案の違いを検証した。最適化されたパラメータを元に、抗原濃度に対する「結合型 IgM 密度」と「結合型 IgM 密度の有効値」をプロットした (図 2.20)。

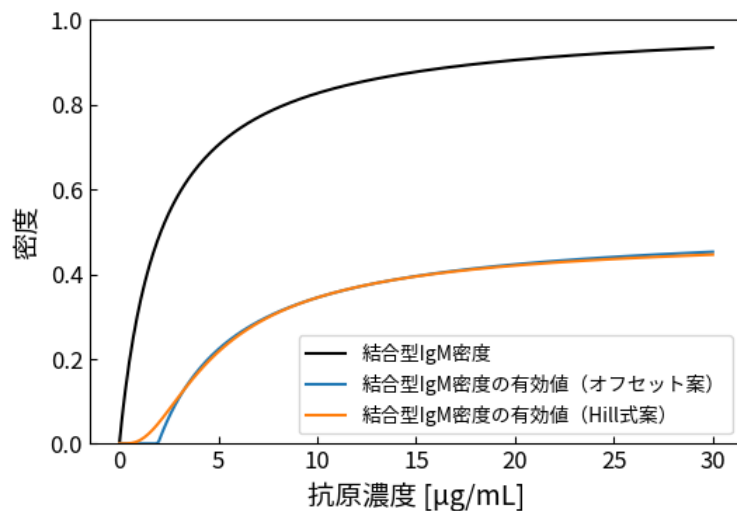


図 2.20 抗原濃度に対する「結合型 IgM 密度」と「結合型 IgM 密度の有効値」のプロット。

これより、オフセット案 ($Offset = 0.48$) と Hill 式案 ($n = 4.8, K = 0.83$) はほとんど同じ効果を発揮

していることが分かった。また、これらは他のパラメータ群とは独立して機能することも分かった。

2.4.5 オフセットの効果

2.1.4 で言及したように、オフセット案は、結合型 IgM の有効値を解析するのに適している。オフセットを変えながら、抗原濃度に対する式(3)をプロットしたのが図 2.21 である。

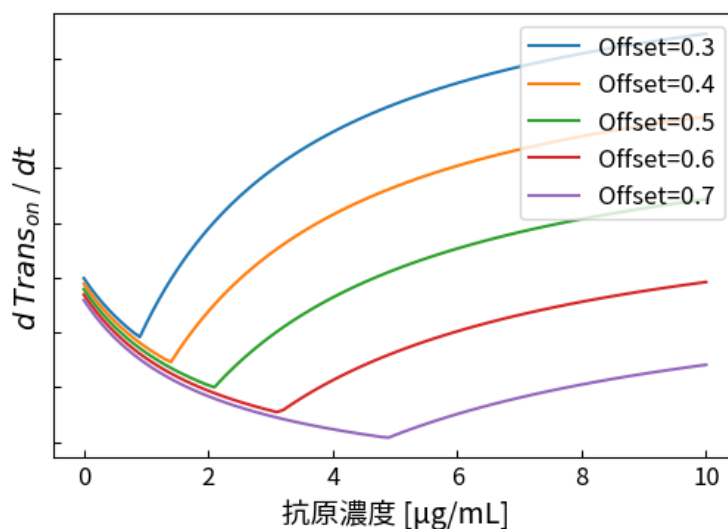


図 2.21 オフセット案における、抗原濃度に対する式(3)のプロット。各線が重ならないように縦軸方向にわずかにずらしてある。

これによれば、オフセットは「生存率が落ち込む抗原濃度点」を制御するパラメータであり、オフセットが大きいくほど V 字形状が高濃度方向へシフトすることが分かる。この V 字形状はほとんどそのまま生存率のグラフにも反映される。最適化されたオフセットは 0.48 であるため、すべての細胞は抗原濃度 2 [μg/mL] 付近でもっとも生存率が落ち込むことが予想される。

2.4.6 Hill 式の効果

一方で、Hill 式案は結合型 IgM (の密度) の協同性を解析するのに適している。そこで、式(3)の Hill 式部分を用いて、いくつかの細胞における「結合型 IgM 密度」に対する「結合型 IgM 密度の有効値」をプロットした (図 2.22)。

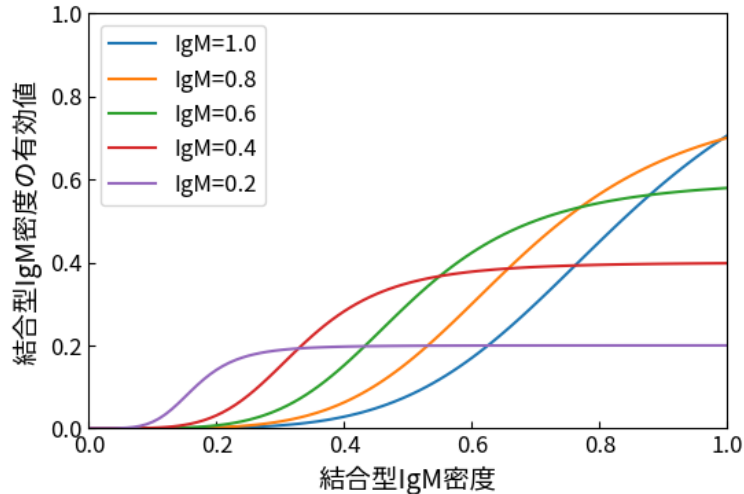


図 2.22 Hill 式案における、「結合型 IgM 密度」に対する「結合型 IgM 密度の有効値」のプロット。

半飽和時に着目すると、IgM が 0.2 の細胞は、全 IgM の 15%程度が抗原に結合すると (0.4 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]刺激相当) 有効値が立ち上がるが、IgM が 0.8 の細胞は、全 IgM の 70%程度が抗原に結合しなければ (5 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]刺激相当) 有効値が立ち上がらないことが分かった。すなわち、IgM が少ない細胞ほど低濃度の抗原刺激で結合型シグナルを発揮し、IgM が多い細胞ほど結合型シグナルを生じるのに大きな抗原刺激を要する。これは、図 2.23 を用いて、次のように解釈することができる。IgM 数が少ない細胞は、IgM が細胞膜上 (あるいはラフト上) を比較的自由に動くことができるため、少数の抗原結合であっても結合型 IgM が凝集し、結合型シグナルを発生することができる (左)。一方で、IgM 数が多い細胞は、隣り合う IgM が物理的に邪魔をし、IgM は身動きが取りづらい。この場合、抗原数が多ければ結合型シグナルを発生できるが (右)、抗原数が少ない場合は、結合型 IgM が凝集できず、結合型シグナルを発生できない (中央)。

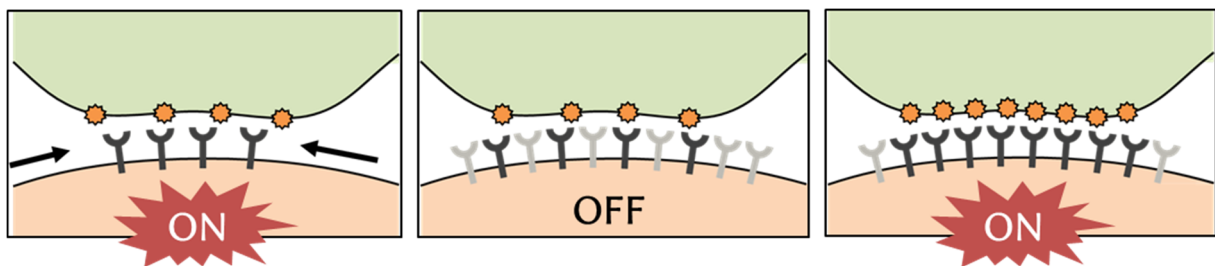


図 2.23 IgM 数が少ない細胞ほど低濃度の抗原刺激で結合型シグナルを発揮し、IgM 数が多い細胞ほど結合型シグナルを生じるのに大きな抗原刺激を要する仕組み。(左) IgM 数が少なく抗原も少ない場合。(中央) IgM 数が多く抗原が少ない場合。(右) IgM 数が多く抗原も多い場合。

2.4.7 Hill 係数の意味

次に、結合型 IgM 密度の協同性を示す数値 $n = 4.8$ について考える。本モデルの $n = 4.8$ は、IgM が周囲

に約 5 個の結合型 IgM を配した場合に結合型シグナルが生じる可能性を示唆している。そもそも、IgM が細胞膜上（あるいはラフト上）にどのように並ぶかは不明である。2006 年に Dagmar Iber らは、実験データから推測できる範囲で、IgM クラスターを構成する IgM の個数を約 5 個と推定し、これがアレルギー（不応答）と関わりがあることをほのめかした[83]。本モデルの結果は、驚くべきことに Dagmar Iber らの推測と概ね一致している。なお、平面上の最密充填は、周囲に 6 個を配したハニカム構造であるため、結合型シグナルが生じる際は、ほとんど最密充填に近い構造を成している可能性がある。ただし、これは抗原結合によって架橋された場合の話のため、非結合型 IgM がそのように並んでいるかまでは言及できない。

2.5 非線形的刺激応答に影響するもの

本モデルを用いて、B 細胞の非線形的刺激応答を解析した。モデル化により、個々の細胞を追跡し、どの細胞がどの時刻に死ぬかを解析できるようになった。そこで、様々な条件を検討した上で、次の 3 細胞に着目した。

- (1) IgM 初期値 0.4、抗原刺激 0.1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] \rightarrow 72 [h] 生
- (2) IgM 初期値 0.4、抗原刺激 1.8 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] \rightarrow 72 [h] 死
- (3) IgM 初期値 0.2、抗原刺激 30 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] \rightarrow 72 [h] 生

これらの細胞は、72 [h]時点において全 IgM 数と結合型 IgM 数を図 2.24 の通り持つ。

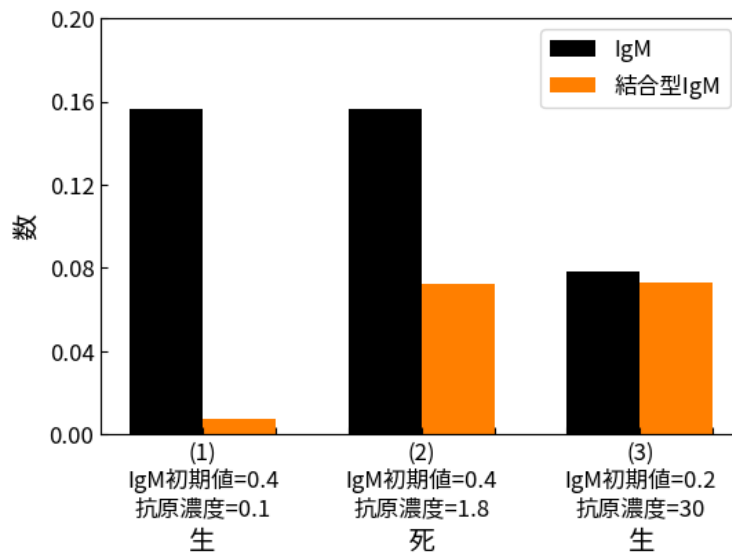


図 2.24 (1) (2) (3) の細胞が 72 [h]時点で持つ全 IgM 数と結合型 IgM 数。

前提として、通常、IgM 数や結合型 IgM 数が多いほど生存しやすいと考えられている。その上で、次のような比較を行った。

<比較1>

(1) と (2) の細胞は同数の IgM を持っており、(2) の方が多くの結合型 IgM を有している。一見すると (2) の方が生存に有利だが、実際には、(1) が生存、(2) が細胞死に至っている。

<比較2>

(2) と (3) の細胞は同数の結合型 IgM を持っており、(2) の方が全 IgM 数は多い。一見すると (2) の方が生存に有利だが、実際には、(3) が生存、(2) が細胞死に至っている。

以上の比較から、IgM の絶対数よりも結合型 IgM 密度の方が、細胞の生存への影響が大きいことが分かった。これは、モデル中のオフセットと Hill 式に起因し、次のような説明ができる。抗原が少ない環境 (1) では、ほとんどの IgM が非結合型 IgM として存在し、トニックシグナルにより生存が幫助される。一方で、抗原が十分に多い環境 (3) では、ほとんどの IgM が結合型 IgM として存在し、結合型シグナルにより生存が支えられる。しかし、抗原濃度が中くらい (2) であると、結合型 IgM と非結合型 IgM がおよそ半々といった中途半端な状態になり、トニックシグナルは (1) に比べて少なく、かつ、結合型シグナルはオフセットや Hill 式によって発生できる閾値に達していない。したがって、(2) は (1) と (3) に比べて生存率が低下する。

2.6 第2章のまとめ

本章では、IgM がもたらす B 細胞の非線形的刺激応答の仕組みに迫った。中枢 (B 細胞の場合は骨髄) では、IgM が少ない細胞や、自己抗原に強く反応する細胞が淘汰され、IgM 発現数が中くらいの細胞が末梢へ送られる。このように中枢で選別済みとはいえ、IgM 発現数は末梢において 1000 倍程度のばらつきがある (図 m.1 参照)。非線形項の適用法の検証を通じて、結合型 IgM の「数」の違いは吸収され、「抗原と結合した IgM の密度」が生死に強く影響する仕組みがあることが示唆された。また、Hill 式案の解析を通じて、この仕組みは、結合型 IgM のみによってではなく、非結合型 IgM も巻き込んだ物理的な位置関係によって成立する可能性が示唆された。この考えは、結合型 IgM の凝集と細胞膜直下のアクチン線維構造との関わりを述べた報告[75-78]と相性が良い。すなわち、結合型 IgM と非結合型 IgM はそれぞれ異なるアクチン線維構造を誘導し、それによってチロシンキナーゼ群の自己リン酸化の規模が制御されると考えることができる。

この他に、末梢の B 細胞が、なぜ 1000 倍もばらついた IgM 数を持っているかを検討することで、もう一つの示唆が得られる。IgM が多い細胞を生存させるメリットは、外来抗原への攻撃能力の面で明白である。一方で、IgM が少ない細胞であっても十分な抗原刺激があれば生存できることには、どのような理

由があるのか。一つには、彼らは攻撃では活躍しないが、記憶 B 細胞に分化し、二度目の抗原侵入に対する迅速な応答に寄与している可能性がある。一般には、「B 細胞の中で高い抗原親和性を示すものが記憶 B 細胞に分化誘導される」と考えられている。新たな示唆はこれを覆すものであるが、2016 年に Ryo Shinnakasu らが報告した、「抗原への親和性が十分に高まらない細胞が記憶 B 細胞へ分化誘導される」という新説には矛盾しない[84]。この説については、さらなる検証が求められる。本研究で示唆されたことは、「IgM 発現数が少ない細胞」が「強い抗原刺激」に触れたときに記憶 B 細胞になることであり、上述の 2 説の対立を解消する可能性も感じさせる。

第3章 IgM と IgD の共発現がもたらす非線形的刺激応答の解析

3.1 数理モデルの構築

3.1.1 数理モデルの拡張

本章では、BCRとしてIgMとIgDの両方（以下、IgM+IgDと表記する）を仮定したときの、細胞集団の非線形的刺激応答、および、IgMとIgDの役割の違いを解析した。2.1.3で作成したモデルに、IgDを加えて拡張したものが図3.1および次の数式である。

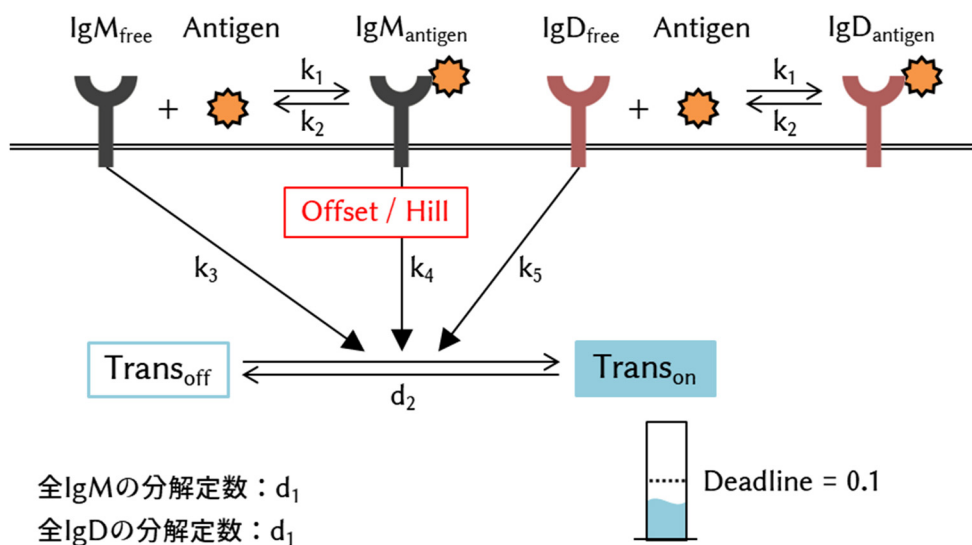


図3.1 IgDを加えて拡張したモデルの模式図。細い矢印は「変化」、太い矢印は「活性化」を示す。

$$\frac{d IgM}{dt} = -d_1 \cdot IgM \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \frac{d IgM_{antigen}}{dt} &= k_1 \cdot Antigen \cdot IgM_{free} - k_2 \cdot IgM_{antigen} \\ IgM &= IgM_{free} + IgM_{antigen} \end{aligned} \quad (2)$$

$$\frac{d IgD}{dt} = -d_1 \cdot IgD \quad (7)$$

$$\begin{aligned} \frac{d IgD_{antigen}}{dt} &= k_1 \cdot Antigen \cdot IgD_{free} - k_2 \cdot IgD_{antigen} \\ IgD &= IgD_{free} + IgD_{antigen} \end{aligned} \quad (8)$$

$$\begin{aligned} \frac{d Trans_{on}}{dt} &= k_3 \cdot Trans_{off} \cdot IgM_{free} \\ &+ k_4 \cdot Trans_{off} \cdot F \\ &+ k_5 \cdot Trans_{off} \cdot IgD_{free} \\ &- d_2 \cdot Trans_{on} \end{aligned} \quad (9)$$

$$1 = Trans_{off} + Trans_{on}$$

$$F = IgM \cdot f \left(\frac{IgM_{antigen}}{IgM} \right) = IgM \cdot \left(\frac{IgM_{antigen}}{IgM} - Offset \right) > 0$$

$$F = IgM \cdot f \left(\frac{IgM_{antigen}}{IgM} \right) = IgM \cdot \frac{\left(\frac{IgM_{antigen}}{IgM} \right)^n}{K^n + \left(\frac{IgM_{antigen}}{IgM} \right)^n}$$

オフセット案

Hill 式案

式(1)と式(2)は第2章と同様で、それぞれ IgM と結合型 IgM の増減を表す。これに加え、IgD についても同様に、IgD と結合型 IgD の増減を式(7)および式(8)に定義した。式(9)は式(3)を改変したもので、活性化転写因子の数 ($Trans_{on}$) の増減を表す。ただし、非結合型 IgD から発生するトニックシグナルが赤字の通り追加されている。その他の条件は第2章と同じである。また、式中のパラメータは本章で改めて決定する。

変数とパラメータの一覧を、初期値や取り得る範囲とともに表 3.1 および表 3.2 にまとめた。

表 3.1 変数とその意味、初期値、取り得る範囲。

変数	意味	初期値	取り得る範囲
IgM	IgM 発現数	0 – 1 (実験値を規格化)	0 – 1
$IgM_{antigen}$	結合型 IgM 数	0	0 – 1
IgD	IgD 発現数	0 – 1 (実験値を規格化)	0 – 1
$IgD_{antigen}$	結合型 IgD 数	0	0 – 1
$Trans_{on}$	活性型転写因子数	0 – 1 (IgM 初期値 + IgD 初期値を規格化)	0 – 1

表 3.2 変数とその意味、概ね取り得る範囲、単位。

パラメータ	意味	概ね取り得る範囲	単位
k_1	抗原結合速度	0 – 10	mL/ μ g/h
k_2	抗原解離速度	0 – 10	/h
k_3	IgM トニックシグナルの強さ	0 – 0.2	/h
k_4	IgM 結合型シグナルの強さ	0 – 0.2	/h
k_5	IgD トニックシグナルの強さ	0 – 0.2	/h
d_1	IgM・IgD 減少速度	0 – 0.2	/h
d_2	活性型転写因子減少速度	0 – 0.2	/h
$Offset$	IgM 結合密度に対するオフセット	0 – 1	-
n	IgM 結合密度の協同性の指標	0 – 10	-
K	半飽和時の IgM 結合密度	0 – 1	-

3.1.2 数理モデルの考察

IgM トニックシグナルと IgD トニックシグナルがクロストークしているのではないかという懸念はあるが、ここではそれぞれ k_3 および k_5 として別々に定義した。これは、図 2.4b で示したように、IgM と IgD が混ざることなく別々の領域に偏在していることに基づいている。もし、IgM と IgD が混在していた場

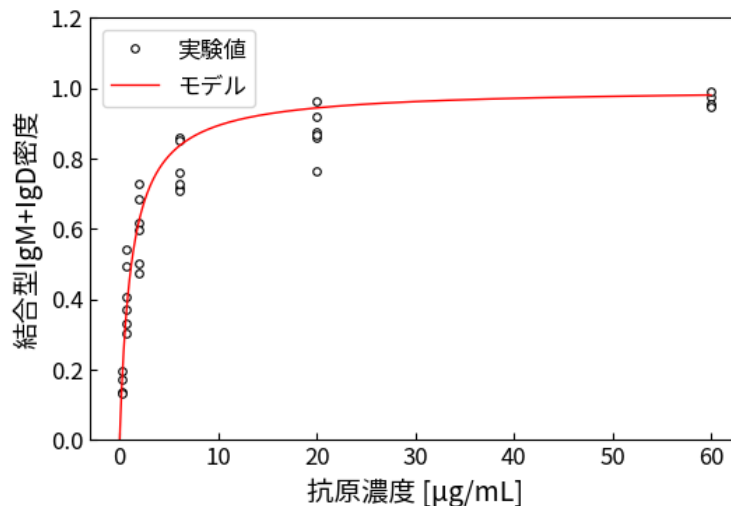
合、下流の生存シグナルが互いに干渉する可能性が高く、IgM と IgD の機能的な分担が難しくなる。

IgM と IgD の結合・解離様式の違いについて考える。生体内では、個々の細胞が持つ IgM と IgD の抗原認識部位は共通であるため、IgM と IgD にかかる結合・解離定数セット (k_1, k_2) はほとんど同じであると推測される。モデルではこの考えを踏襲し、IgM と IgD に同じ (k_1, k_2) のセットを適用した。実験では、IgM と IgD が共通して持つ重鎖の部分 (κ 鎖) に結合する疑似抗原を用いた。これは、300 万通りとも言われる多様な抗原認識部位に対して普遍的に結合できる「マスター抗原」が存在しないための措置である。よって、IgM と IgD が共通の (k_1, k_2) を持つという仮定は適切ではあるが、現実の抗原刺激とは異なる値セットだと考えられる。これについては、実験値が変わった場合の検証 (3.3.1 および 3.3.2) の結果から、モデルの信頼性に影響しないと判断した。

3.2 実験およびパラメータ群の決定

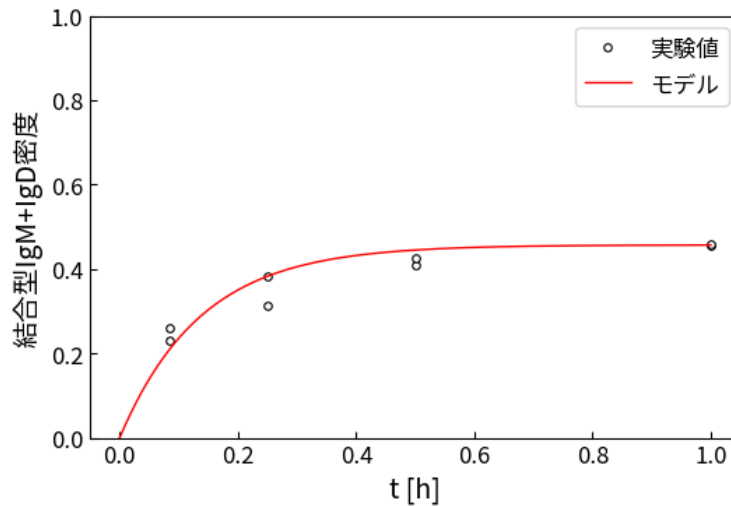
3.2.1 抗原と IgM および IgD の結合・解離速度の決定

k_1, k_2 は、抗原と IgM、あるいは抗原と IgD の結合・解離速度である。抗原濃度に対する IgM および IgD の結合型密度は式(4)に従う。マウス実験で、異なる抗原濃度 (0.2, 0.6, 1.8, 6, 18, 60, 180 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]) における結合型 IgM+IgD 密度を調べたところ、図 3.2 (実験値) の通りであった (研究業績[1] Fig. 3b)。よって、式(4)とマウス実験結果から、 $\frac{k_2}{k_1} = 1.2$ を得た (図 3.2 モデル)。



<引用>実験値は研究実績[1] Shoya Yasuda, et al., *Genes Cells* 2018 より
図 3.2 抗原濃度 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] に対する結合型 IgM+IgD 密度。実験値は 3 マウス 6 ウェルで、外れ値はフィッティングに使用していない。

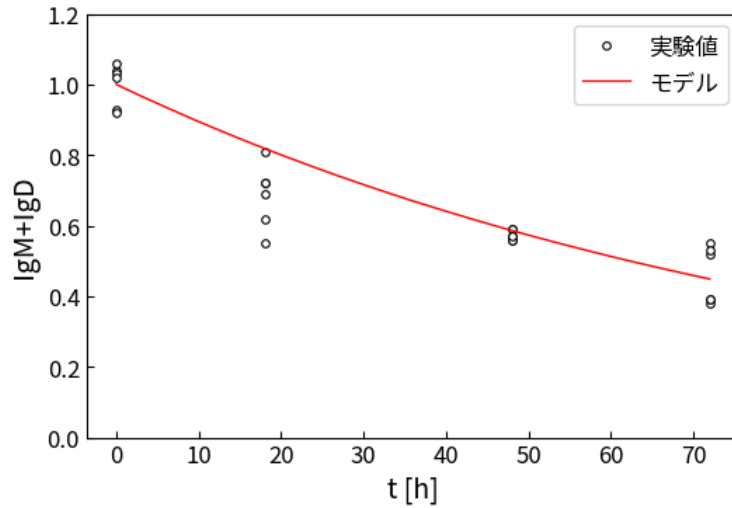
次に、 k_1 , k_2 の絶対値を定めたい。時間 t [h]に対する結合型 IgM+IgD の密度は式(5)の通りである。マウス実験で、抗原濃度 1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]における、15, 30, 60 [min]時点の結合型 IgM+IgD 密度を調べたところ、図 3.3 (実験値) の通りであった (研究業績[1] Fig. 6a)。よって、式(5)、マウス実験の結果、 $\frac{k_2}{k_1} = 1.2$ から、 $k_1 = 3.3$, $k_2 = 3.9$ を得た (図 3.3 モデル)。



<引用>実験値は研究業績[1] Shoya Yasuda, et al., *Genes Cells* 2018 より
 図 3.3 抗原濃度[$\mu\text{g}/\text{mL}$]に対する結合型 IgM+IgD 密度。実験値は 1 マウス 2 ウェル。

3.2.2 IgM および IgD 減少速度の決定

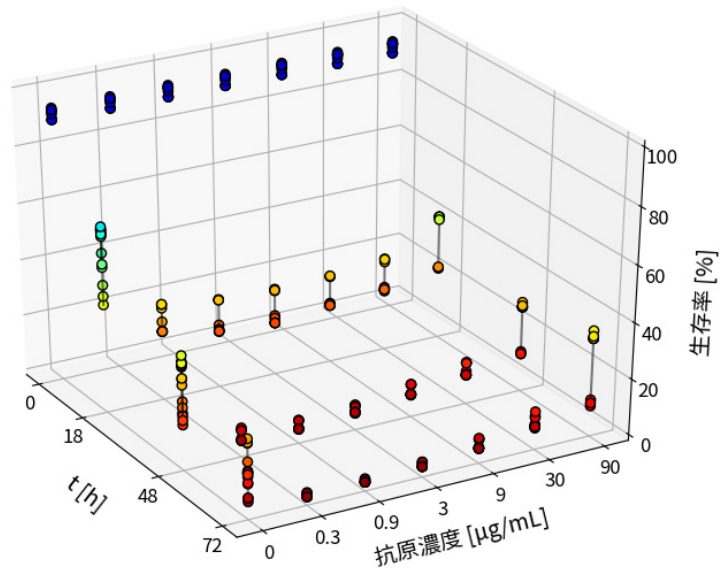
d_1 は IgM と IgD に共通の減少速度である。時間 t [h]に対する IgM+IgD 数は式(6)に従う。ここでも第 2 章と同様に、細胞集団の IgM+IgD 平均値の推移を調べ、それが個々の細胞の IgM と IgD にも当てはまると仮定した。細胞を精製した時間を基準に、0, 18, 48, 72 [h]時点の IgM+IgD 発現数を測定したものが図 3.4 である (研究業績[1] Fig. 6b)。式(6)と実験結果より、 $d_1 = 0.011$ を得た。



<引用>実験値は研究実績[1] Shoya Yasuda, et al., *Genes Cells* 2018 より
 図 3.4 時間 t [h] に対する IgM+IgD 発現数。実験値は 2 マウス 6 ウェルで、18 [h] のデータはフィッティングに使用していない (3.3.3 参照)。

3.2.3 オフセット案におけるその他のパラメータの最適化

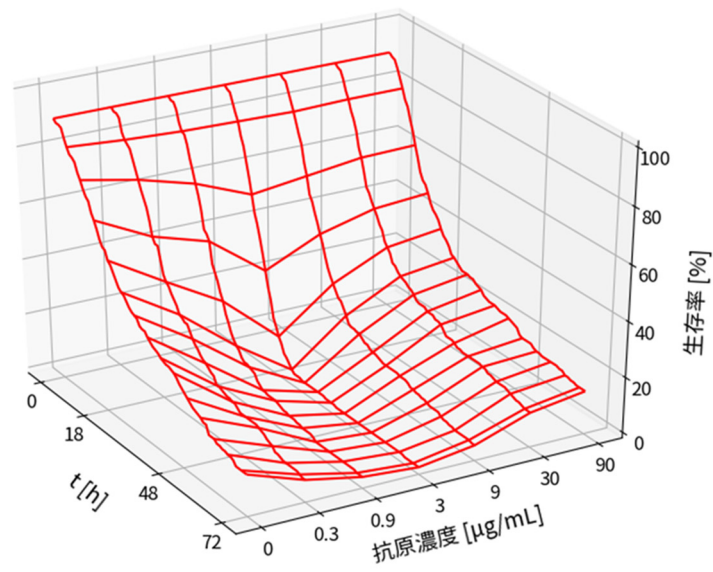
パラメータのうち、 k_3 , k_4 , k_5 , d_2 , *Offset* は実験で直接定めることが難しい。そこで本章でも、観測可能な実験結果からこれらを推定した。マウス実験によって得られた、異なる抗原濃度における B 細胞生存率の推移が図 3.5 である (研究業績[1] Fig. 3a)。



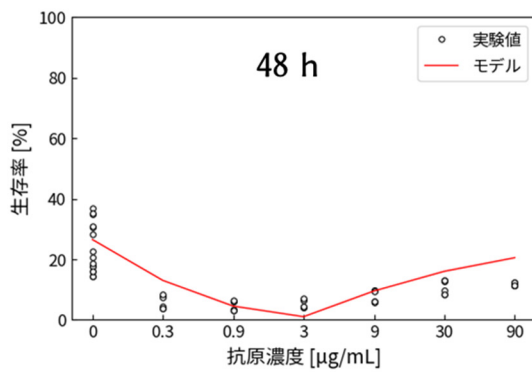
<引用>研究実績[1] Shoya Yasuda, et al., *Genes Cells* 2018 より
 図 3.5 抗原濃度[$\mu\text{g/mL}$]に対する B 細胞生存率[%]の推移。実験は
 2 マウス 6 ウェル (ただし 0 [$\mu\text{g/mL}$]は 5 マウス 12 ウェル)。

遺伝的アルゴリズムを用いて、実験値とモデル (シミュレーション) の誤差二乗合計ができるだけ小さくなるようにパラメータ群を最適化した。その結果、 $k_3 = 0.016$, $k_4 = 0.087$, $k_5 = 0.0075$, $d_2 = 0.18$, $Offset = 0.77$ が得られた。図 3.5 に対応する生存率推移を図 3.6 に、全パラメータを表 3.3 にまとめた。

a



b



c

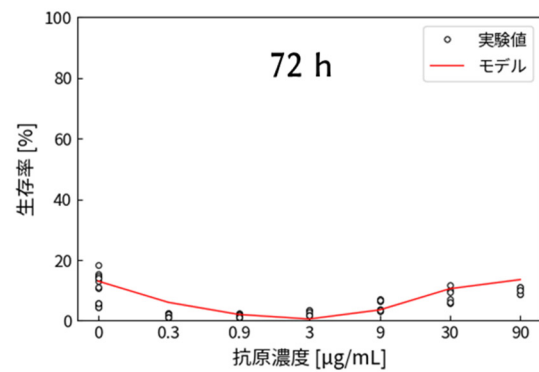


図 3.6 オフセット案でのパラメータ最適化の結果。(a)抗原濃度[μg/mL]に対する B 細胞生存率[%]の推移。(b)48 [h]時点での実験値とモデル。(c)72 [h]時点での実験値とモデル。

表 3.3 オフセット案において最適化されたパラメータの一覧。

パラメータ	最適値	単位
k_1	3.3	mL/μg/h
k_2	3.9	/h
k_3	0.016	/h
k_4	0.087	/h
k_5	0.0075	/h
d_1	0.011	/h
d_2	0.18	/h
Offset	0.77	-

3.2.4 Hill 式案におけるその他のパラメータの最適化

Hill 式案においても、3.2.3 と同様の方法でパラメータ k_3 , k_4 , k_5 , d_2 , n , K を最適化した。その結果、 $k_3 = 0.015$, $k_4 = 0.024$, $k_5 = 0.0076$, $d_2 = 0.18$, $n = 8.3$, $K = 0.90$ が得られた。図 3.5 に対応する生存率推移を図 3.7 に、全パラメータを表 3.4 にまとめた。

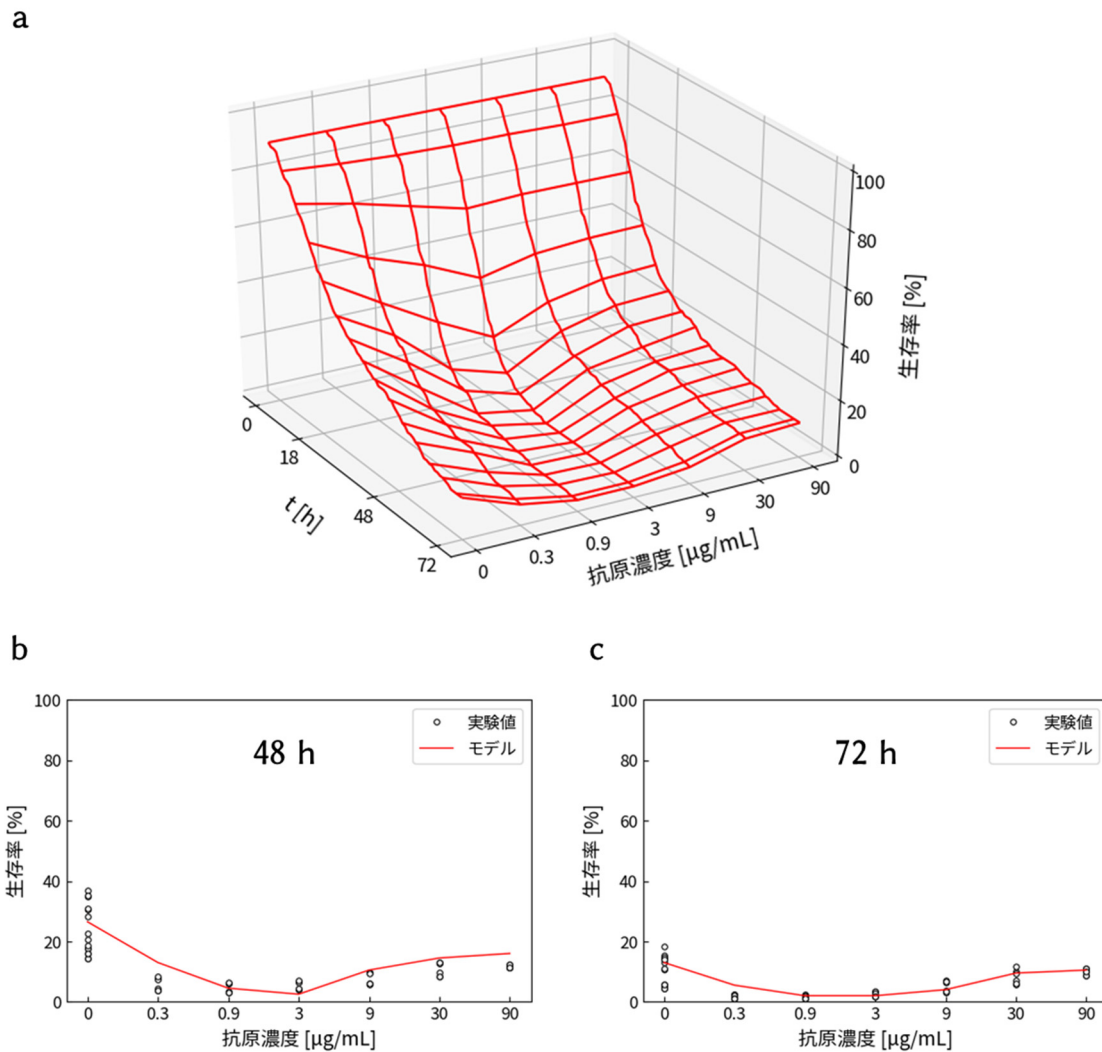


図 3.7 Hill 式案でのパラメータ最適化の結果。(a)抗原濃度[$\mu\text{g/mL}$]に対する B 細胞生存率[%]の推移。(b)48 [h]時点での実験値とモデル。(c)72 [h]時点での実験値とモデル。

表 3.4 Hill 式案において最適化されたパラメータの一覧。

パラメータ	最適値	単位
k_1	3.3	mL/ μ g/h
k_2	3.9	/h
k_3	0.015	/h
k_4	0.024	/h
k_5	0.0076	/h
d_1	0.011	/h
d_2	0.18	/h
n	8.3	-
K	0.90	-

3.2.5 実験の妥当性

マウス実験の結果について考える。抗原濃度に対する生存率推移は、前章と同様に、微小刺激濃度において低下する現象が見られた。ただし、抗原刺激を与えた場合の 18, 48, 72 [h] 生存率は、前章よりも総じて低かった。これは、IgD を刺激すると生存率が低下するという報告[20, 21]を支持し、また、IgD が IgM よりも刺激に鈍感であるという報告[26, 32, 36]との相性も良い。72 [h] だけに着目すると、どの刺激濃度においても生存率が低く、「微小刺激濃度における生存率の落ち込み」が確かかどうか検定できるわけではない。これについては、48 [h] からの推移であることと、フローサイトメーターで 5000 個以上の細胞の生死を判定したものであることを考慮し、再現性があると判断した。

3.2.6 パラメータ群最適化の妥当性

本章でも、未知パラメータ群の最適化手法としてグリッドサーチと遺伝的アルゴリズムを比較した。グリッドサーチでは、オフセット案は $6^5=7776$ 通り、Hill 式案は $5^6=15625$ 通りを探索した (表 3.5)。

表 3.5 グリッドサーチおよび GA の結果。

パラメータ	オフセット案		Hill 式案		単位
	グリッドサーチ	GA	グリッドサーチ	GA	
k_1	3.3	3.3	3.3	3.3	mL/ μ g/h
k_2	3.9	3.9	3.9	3.9	/h
k_3	0.020	0.016	0.022	0.015	/h
k_4	0.24	0.087	0.059	0.023	/h
k_5	0.021	0.0075	0.022	0.0076	/h
d_1	0.011	0.011	0.011	0.011	/h
d_2	0.31	0.18	0.34	0.18	/h
<i>Offset</i>	0.83	0.77	-	-	-
n	-	-	12	8.3	-
K	-	-	0.95	0.90	-
評価値	6238	5911	6562	6203	-

これによれば、オフセット案と Hill 式案のいずれにおいても、GA はグリッドサーチより優れていた。詳しく見ると、グリッドサーチと GA では異なる 2 つの大きな局所解を得た。グリッドサーチが得た局所解は、トニックシグナルと結合型シグナルが大きく、かつ、活性型転写因子の減少速度も大きいものである。この解は、いくつかのパラメータが表 3.2 に示した「各パラメータが概ね取り得る範囲」を逸脱しており、適切ではないと判断できる。よって、本章においても遺伝的アルゴリズムを用いたことの妥当性が確認された。

3.2.7 最適パラメータ群の妥当性と安定性

いずれのパラメータも、表 3.2 で示した「概ね取り得る範囲」に収まっており、妥当な値だといえる。各パラメータを上下に 10%動かした際の、評価値（実験値との誤差二乗合計）の変化を調べた（図 3.8）。図 3.8 には、グリッドサーチと GA による最適化の結果も表示している。

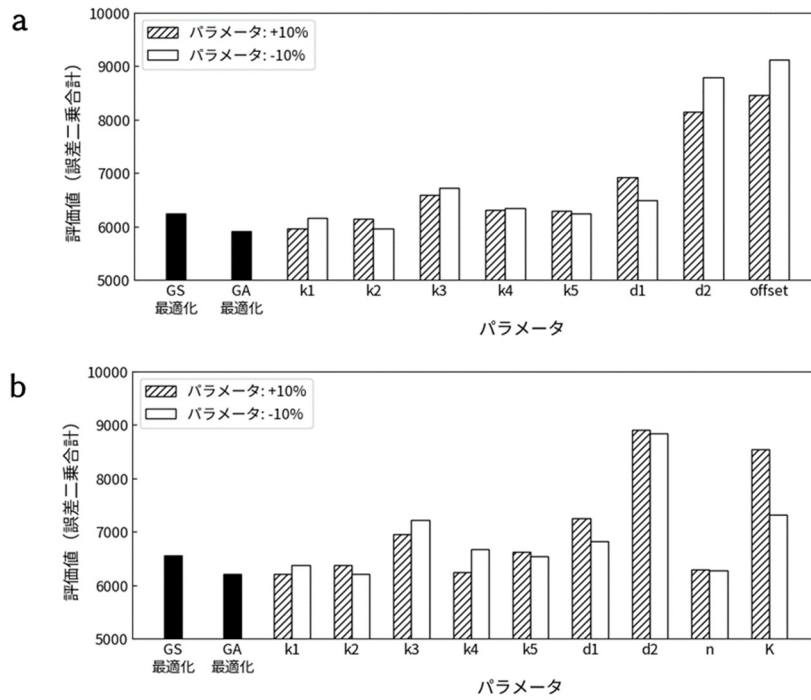


図 3.8 パラメータの安定性解析。(a)オフセット案。(b)Hill 式案。

各パラメータの安定性は、前章と概ね同様であった。Hill 式案の n は、最適化の乱数シードによっては 7.1~9.0 までを取り得るようだが、これは他のパラメータと比較して感度が低いためである。Offset と K は生存率が落ち込む濃度点を左右するため感度が高い。

3.3 モデルのロバスト性

3.3.1 図 3.2 の実験データに摂動を加えた場合

k_2/k_1 が 2 倍または 1/2 倍相当に変化したと仮定し、他のパラメータの最適化を行った (図 3.9、表 3.6)。特筆すべき影響はなかった。

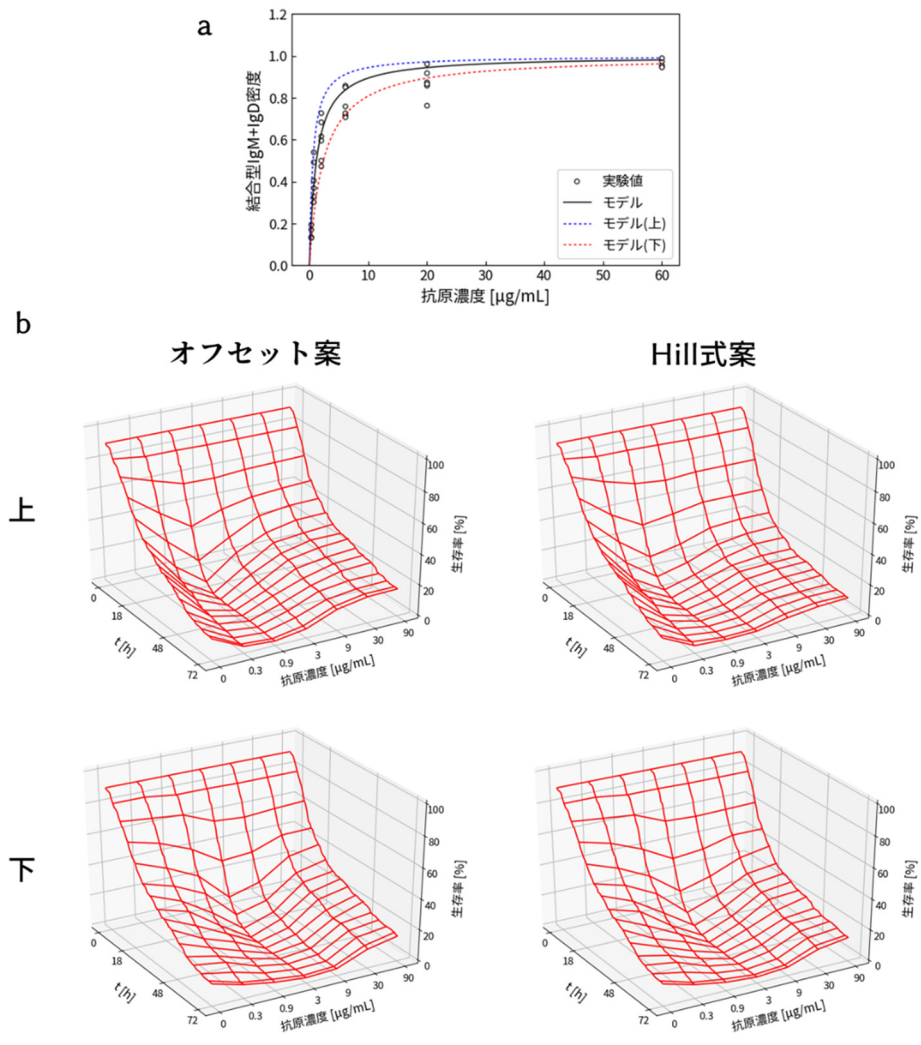


図 3.9 図 3.2 の実験データに上下の摂動を加えた場合の、オフセット案と Hill 式案でのパラメータ最適化の結果。(a)実験データに上下の摂動を加えた場合の、 k_2/k_1 のフィッティング。(b)パラメータ最適化の結果。

表 3.6 図 3.2 の実験データに上下の摂動を加えた場合の、オフセット案と Hill 式案でのパラメータ最適化の結果。(青字) 摂動を与えたパラメータ。(赤字) その他のパラメータ群の最適化結果。

パラメータ	オフセット案			Hill 式案			単位
	最適値	最適値 (上)	最適値 (下)	最適値	最適値 (上)	最適値 (下)	
k_1	3.3	4.6	2.2	3.3	4.6	2.2	mL/ μ g/h
k_2	3.9	2.7	5.1	3.9	2.7	5.1	/h
k_3	0.016	0.016	0.015	0.015	0.016	0.015	/h
k_4	0.087	0.069	0.071	0.024	0.022	0.026	/h
k_5	0.0075	0.0066	0.0078	0.0076	0.0072	0.0079	/h
d_1	0.011	0.011	0.011	0.011	0.013	0.013	/h
d_2	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	/h
<i>Offset</i>	0.77	0.76	0.70	-	-	-	-
n	-	-	-	8.3	9.4	8.2	-
K	-	-	-	0.90	0.90	0.87	-
評価値	5911	5854	6444	6203	5964	6440	-

3.3.2 図 3.3 の実験データに摂動を加えた場合

k_1 が2倍または1/2倍相当に変化したと仮定し、他のパラメータの最適化を行った(図 3.10、表 3.7)。特筆すべき影響はなかった。

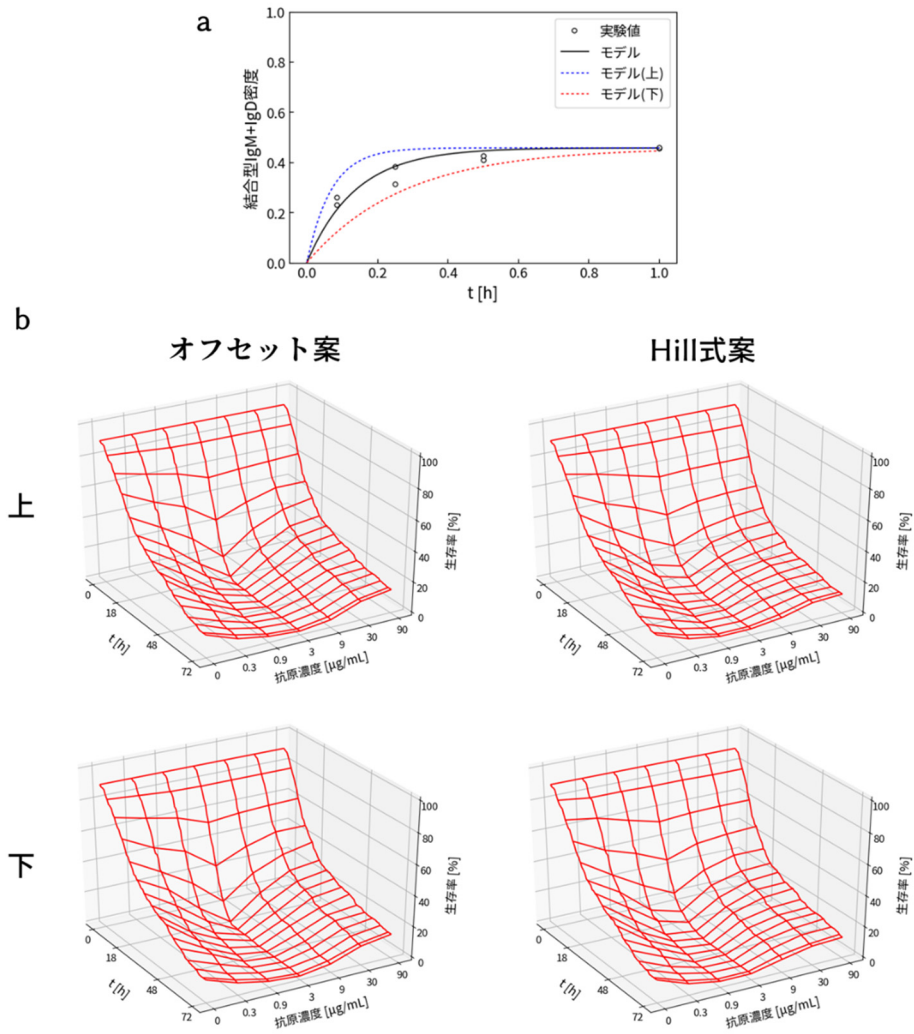


図 3.10 図 3.3 の実験データに上下の摂動を加えた場合の、オフセット案と Hill 式案でのパラメータ最適化の結果。(a)実験データに上下の摂動を場合の、 k_1 および k_2 のフィッティング。(b)パラメータ最適化の結果。

表 3.7 図 3.3 の実験データに上下の摂動を加えた場合の、オフセット案と Hill 式案でのパラメータ最適化の結果。(青字) 摂動を与えたパラメータ。(赤字) その他のパラメータ群の最適化結果。

パラメータ	オフセット案			Hill 式案			単位
	最適値	最適値 (上)	最適値 (下)	最適値	最適値 (上)	最適値 (下)	
k_1	3.3	6.6	1.7	3.3	6.6	1.7	mL/ μ g/h
k_2	3.9	7.9	2.0	3.9	7.9	2.0	/h
k_3	0.016	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	/h
k_4	0.087	0.086	0.085	0.024	0.023	0.025	/h
k_5	0.0075	0.0071	0.0072	0.0076	0.0076	0.0078	/h
d_1	0.011	0.011	0.011	0.011	0.013	0.013	/h
d_2	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	/h
Offset	0.77	0.78	0.77	-	-	-	-
n	-	-	-	8.3	8.1	8.9	-
K	-	-	-	0.90	0.89	0.88	-
評価値	5911	5937	5920	6203	6198	6189	-

3.3.3 図 3.4 の実験データに摂動を加えた場合

d_1 が 2 倍または 1/2 倍相当に変化した場合と、加えて、IgM および IgD の減少様式を単調減少ではなく、別式(1)_2 で置き換えた場合における検証を行った。パラメータの最適化の結果を図 3.11、表 3.8 に示した。

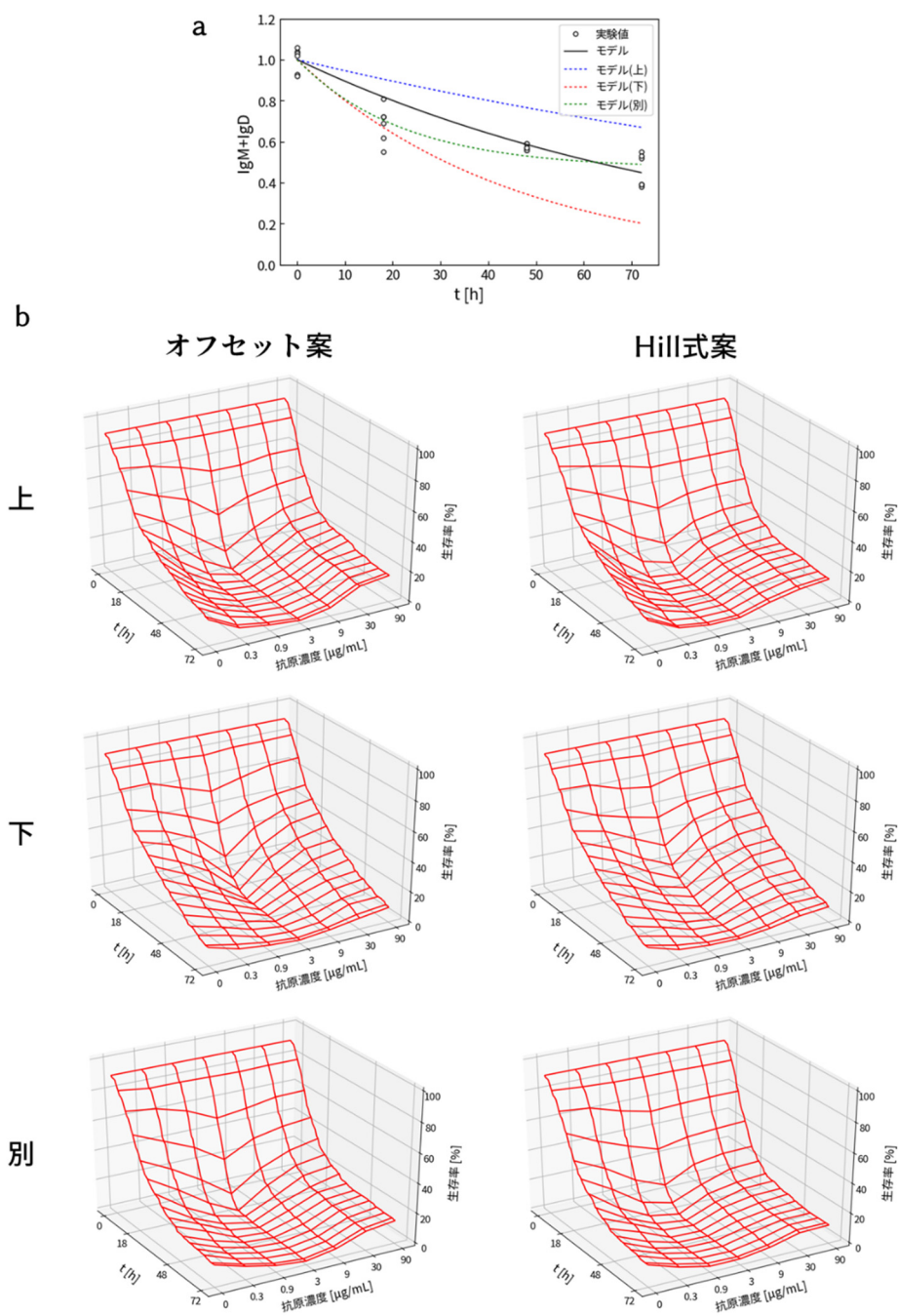


図 3.11 図 3.4 の実験データに上下の摂動を加えた場合の、オフセット案と Hill 式案でのパラメータ最適化の結果。(a)実験データに上下の摂動を加えた場合の、 d_1 のフィッティング。緑破線は別式(1)_2 に従うフィッティング。(b)パラメータ最適化の結果。

表 3.8 図 3.4 の実験データに上下の摂動を加えた場合の、オフセット案と Hill 式案でのパラメータ最適化の結果。(青字) 摂動を与えたパラメータ。(赤字) その他のパラメータ群の最適化結果。

パラメータ	オフセット案				Hill 式案				単位
	最適値	最適値 (上)	最適値 (下)	最適値 (別)	最適値	最適値 (上)	最適値 (下)	最適値 (別)	
k_1	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	mL/ μ g/h
k_2	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	/h
k_3	0.016	0.0095	0.032	0.0094	0.015	0.0089	0.032	0.015	/h
k_4	0.087	0.074	0.13	0.069	0.024	0.017	0.042	0.025	/h
k_5	0.0075	0.0078	0.0028	0.0078	0.0076	0.0082	0.0027	0.0095	/h
d_1	0.011	0.0056	0.022	0.045	0.011	0.0056	0.022	0.045	/h
l	-	-	-	0.47	-	-	-	0.47	-
d_2	0.18	0.18	0.17	0.17	0.18	0.18	0.18	0.18	/h
Offset	0.77	0.79	0.76	0.78	-	-	-	-	-
n	-	-	-	-	8.3	9.4	9.2	8.8	-
K	-	-	-	-	0.90	0.88	0.89	0.88	-
評価値	5911	5522	7480	5506	6203	5719	7530	6092	-

3.3.4 図 3.5 の実験データに摂動を加えた場合

生存率推移のうち 18, 48, 72h のデータが 1.5 倍または 1/2 倍相当に変化したと仮定し、他のパラメータの最適化を行った (図 3.12、表 3.9)。

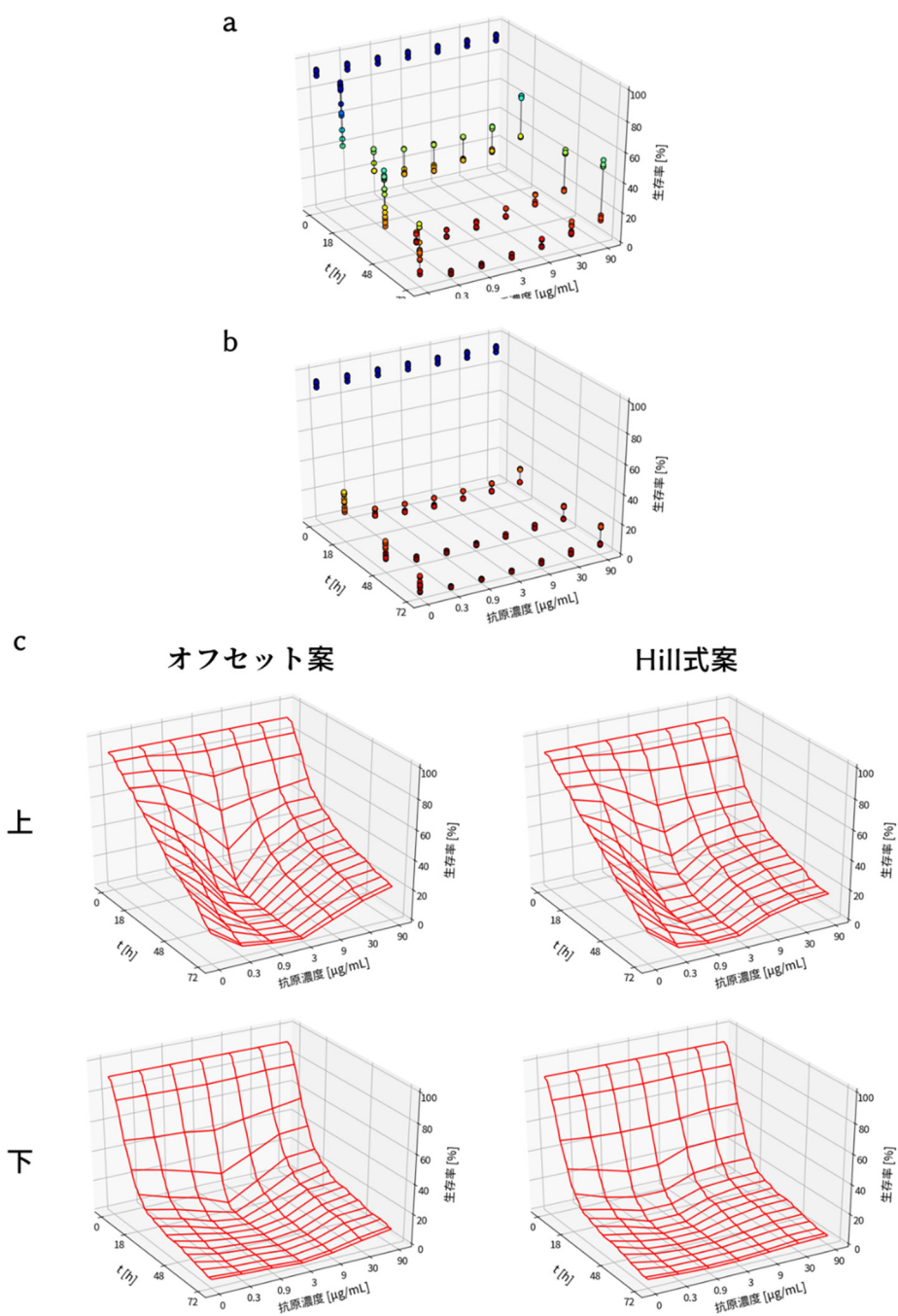


図 3.12 図 3.5 の実験データに上下の摂動を加えた場合の、オフセット案と Hill 式案でのパラメータ最適化の結果。(a)実験データに上下の摂動を加えたもの。(b)パラメータ最適化の結果。

表 3.9 図 3.5 の実験データに上下の摂動を加えた場合の、オフセット案と Hill 式案でのパラメータ最適化の結果。(赤字)パラメータ群の最適化結果。

パラメータ	オフセット案			Hill 式案			単位
	最適値	最適値 (上)	最適値 (下)	最適値	最適値 (上)	最適値 (下)	
k_1	3.3	1.5	1.5	3.3	1.5	1.5	mL/ μ g/h
k_2	3.9	3.1	3.1	3.9	3.1	3.1	/h
k_3	0.016	0.010	0.014	0.015	0.0091	0.013	/h
k_4	0.087	0.094	0.079	0.024	0.028	0.018	/h
k_5	0.0075	0.012	0.000030	0.0076	0.014	0.000063	/h
d_1	0.011	0.013	0.013	0.011	0.013	0.013	/h
d_2	0.18	0.15	0.20	0.18	0.16	0.20	/h
Offset	0.77	0.76	0.78	-	-	-	-
n	-	-	-	8.3	6.6	6.9	-
K	-	-	-	0.90	0.90	0.85	-
評価値	5911	14487	1959	6203	15317	2025	-

実験データに対して上方向の摂動 (1.5 倍になる摂動) を与えた場合に、最適化時の評価値が約 6000 から 14000 にまで上昇した。これは、値の規模が大きくなったことで、誤差二乗合計も大きくなったためである。実験データに対して下方向の摂動 (0.5 倍になる摂動) を与えた場合には、最適化時の評価値が約 2000 にまで低下した。これも同様に、値の規模に応じた誤差の縮退のためである。

下方向の摂動においては、IgD トニックシグナルの強さを示す k_5 は非常に小さくなり、ほとんど誤差に埋もれてしまった。これは、シミュレーションを 200 細胞で行ったため、生存率が 0.5% 刻みでしか算出できないことに起因する。72 [h] の実験データはいくつかの点が 1% 未満であり、これに対して 0.5% 刻みでしかシミュレーション結果が変動できないため、定量的な結果が得られなかった。

3.3.5 モデルのロバスト性検証の結論

実験データが十分に信頼できない状況においても、本モデルが適用できることが確認された。なお、別式(1)_2 を用いても問題なくモデルは成立するが、本研究では、より単純である単調減少モデルを採用している。

3.4 IgM のみの場合と IgM+IgD 共発現の場合の抗原に対する反応性の違い

IgM のみが発現する場合と、IgM+IgD が共発現する場合では、刺激に対する刺激応答にどのような差があるのか。前章 (図 2.9) と本章 (図 3.5) ではマウス実験者が異なるため、用いた抗原濃度も少し異なった。そこで、抗原濃度を統一し、0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]における 72 [h]生存率をプロットした (図 3.13)。

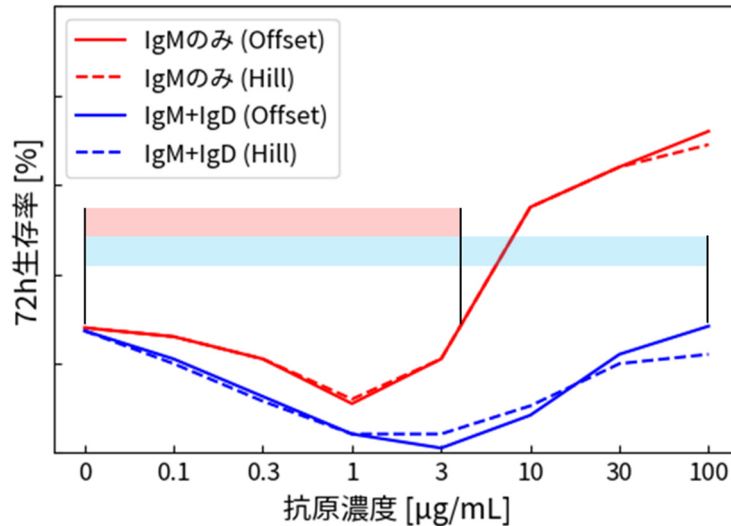


図 3.13 抗原濃度に対する 72 [h]生存率。(赤) IgM のみ発現時。(青) IgM+IgD 発現時。グラフの左端 (無刺激時) が揃うように青線は 1.05 倍に補正してある。赤帯と青帯は、無刺激時よりも生存率が下がる範囲を示す。

IgM のみ発現時と IgM+IgD 共発現時を比較すると、全体的に生存率が低下していることは前述の通りである。IgM のみでは、0.1~3 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]の刺激において無刺激の場合よりも生存率が低下するが、IgM+IgD では 0.1~100 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]の刺激で生存率が減じる。すなわち、B 細胞の成熟、あるいは末梢での時間経過に伴い、無刺激時よりも生存率が低下する濃度幅が約 30 倍に増大した。これは言い換えれば、細胞が活性化するための抗原濃度 (閾値) が 30 倍も上昇したことを意味する。

3.5 オフセットと Hill 式の意味

細胞が活性化するための抗原濃度 (閾値) について考える。オフセット案における $Offset = 0.77$ は、IgM のうち 77%以上が結合型 IgM になれば、強い結合型シグナルが発生しないことを意味する。また、Hill 式案の $K = 0.90$ は、IgM のうち 90%が結合型 IgM になった時点で、結合型シグナルが半分の力を発揮することを意味する。これらをあわせて考えると、IgM が抗原と結合する際、結合型 IgM が 77%

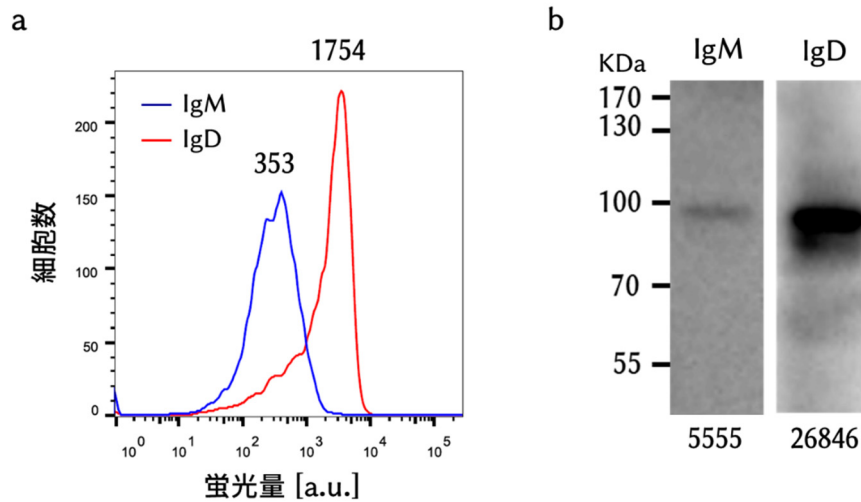
程度のときに結合型シグナルが発生し始め、90%程度において結合型シグナルが半分の力を発揮すると解釈できる。すなわち、少しの抗原には反応しないが、強い抗原刺激に対してはしっかりと反応する。このように非線形性が備わっていることは、末梢での自己免疫反応を防止するためだと考えられる。

3.6 IgM トニックシグナルと IgM 結合型シグナルの力関係

ここでは、パラメータの定量性が本モデル中でしか意味をなさないことを前提に議論を行う。オフセット案の k_3 , k_4 を比較すると、単一細胞における IgM トニックシグナルと IgM 結合型シグナルの力関係はおおよそ 1:6 であることが示唆された。これは、単一 BCR としての力関係として考えることもできる。これらの比率は実験的に測定することができず、本研究で初めて見積もったものである。

3.7 IgM トニックシグナルと IgD トニックシグナルの力関係

IgM と IgD の絶対的な発現数を知るため、二種類の実験を参照した (研究業績[1] Fig. 4b および c)。一つは IgM または IgD に特異的に結合する蛍光標識抗体を用いて、フローサイトメーターで蛍光量を測定する方法である (図 3.14a)。ただし、この方法は、用いた二種類の蛍光標識抗体の親和性が異なるため、ほとんど飽和値まで添加しているとはいえ、参考値にしかならない。次に、IgM または IgD に特異的に結合する抗体を用いて、ウェスタンブロッティング法による定量を行った (図 3.14b)。この方法も、二種の抗体の親和性が異なることと、電気泳動時の定量誤差によって信頼性は低下し、やはり参考値としかならない点に注意したい。



<引用>研究実績[1] Shoya Yasuda, et al., *Genes Cells* 2018 より
 図 3.14 細胞集団の IgM と IgD の発現数。(a)フローサイトメーターによる蛍光量の比較。(b)ウェスタンブロッティング法による蛍光バンドの強度の比較。

いずれの結果も、IgD が IgM の約 5 倍の発現数があることを示唆しており、参考値ながらも一定の信頼性があると判断した。ちなみに、フローサイトメーターを用いたより厳密な方法として、2015 年に A. E. Moskalensky らは、蛍光値の動的な測定と数理モデルに基づいた慎重な補正によって、T 細胞が持つ受容体数を推定している[85]。

ここで、 k_3 , k_5 の比較によれば、単一細胞における IgM トニックシグナルと IgD トニックシグナルの力関係はおよそ 2:1 である。また、IgD は IgM に比べて 5 倍数発現することを考慮すれば、単一 BCR としての IgM と IgD が発するトニックシグナルの比率はおよそ 9:1 と算出される。これは、IgD トニックシグナルが IgM トニックシグナルよりも弱いという経験則が、細胞膜上の全 BCR としてだけでなく、単一 BCR の規模においても成立することを示唆している。ただし、IgM トニックと IgD トニックの力関係は、実験的に測定する手段がなく、初めての見積りである。

3.8 第 3 章のまとめ

B 細胞は IgM のみ ($\text{IgM}^{\text{high}}\text{IgD}^-$) から IgM+IgD 共発現 ($\text{IgM}^{\text{low}}\text{IgD}^{\text{high}}$) 型へシフトすることによって、抗原に対する反応性や自身の生存時間を調節していると考えて良いだろう。これは、次の 2 つの側面において合理的である。

一つは細胞の寿命である。末梢での免疫細胞の寿命は数週間（半減期 5~6 週間）と言われ[86]、他の体細胞の寿命と比べれば短い。B 細胞は、IgD 型へのシフトによって生存シグナルの規模を弱め（図 2.9

と図 3.5 の比較による)、老化による細胞死とは異なる機構で、積極的に「現役引退」を勧告しているのではないかと考えられる。体内の B 細胞は一定の数になるように維持されている[87]。一方で、骨髄からは毎日 100 万個ともいわれる数の B 細胞が産生され、脾臓やリンパ節に輸送される。B 細胞数を一定に保つために末梢の B 細胞を増殖させることは、B 細胞クローンの増加、すなわち多様性の減少をもたらすため好ましくない[88]。このため、積極的な現役引退と骨髄からの供給によって、多様性を維持していると考えられる。

もう一つは、自己免疫反応を起こさないための安全率である。末梢に長く留まった細胞は、誤動作のリスクが高まっていると考えられる。IgM+IgD 共発現型へのシフトによって、細胞の活性化に必要な抗原濃度（閾値）が上昇し、より強い抗原にしか反応できなくなる（図 3.13）。これによって B 細胞の誤動作を防ぎ、自己免疫反応を抑えようとしているのではないか。

いずれにしろ、IgD は外来抗原に対する攻撃よりも、B 細胞自身のメンテナンスに寄与する側面が強いことが再確認された。また、IgD は IgM の 5 倍数も発現していながら非常に弱い力で機能している点に、影の調整役としての IgD の興味深さがある。

第 4 章 議論

4.1 結果のまとめ

4.1.1 課題 1.2.1 (B 細胞の非線形的刺激応答) に対応する結果

末梢における BCR 発現数の 1000 倍以上のばらつきを吸収し、BCR の数ではなく「結合型 BCR の密度」が生死に強く影響する仕組みがあることが示唆された。また、この仕組みは、結合型 BCR のみによって起きるのではなく、非結合型 BCR との物理的な位置関係において成立する可能性がある。さらには、個々の細胞の BCR 発現数のばらつきを利用し、発現数が多い細胞は攻撃用に、発現量が少ない細胞は記憶 B 細胞用 (免疫記憶用) にと、分化誘導している可能性も示唆された。

4.1.2 課題 1.2.2 (IgM と IgD の存在意義) に対応する結果

IgM 型から IgD 型へのシフトによって、抗原に対する反応性や細胞の生存時間の制御を行っている可能性が高い。具体的には、IgM と IgD が発するトニックシグナルの強度の差を利用して、細胞の新陳代謝を促す、あるいは、抗原に対する閾値を上昇させて (安全率を広げて) 自己免疫反応を防ぐ、といった制御をしている可能性が示唆された。

4.2 総合討論

4.2.1 第 2 章と第 3 章の仮定について

第 2 章で仮定した「BCR として IgM のみが発現する状況」は、中枢で発生した未熟 B 細胞、あるいは末梢に移動直後の成熟 B 細胞に良く当てはまる。また、第 3 章で仮定した「IgM と IgD が共発現する状況」は、末梢に移動して時間が経過した B 細胞 (辺縁帯 B 細胞や濾胞 B 細胞等) に該当する。本研究では、この 2 つの状況を比較することで、B 細胞が中枢から末梢へ向かう時間変化を含めて検討できた。これは、B 細胞の一生の内、図 4.1 の赤字の部分に該当する。

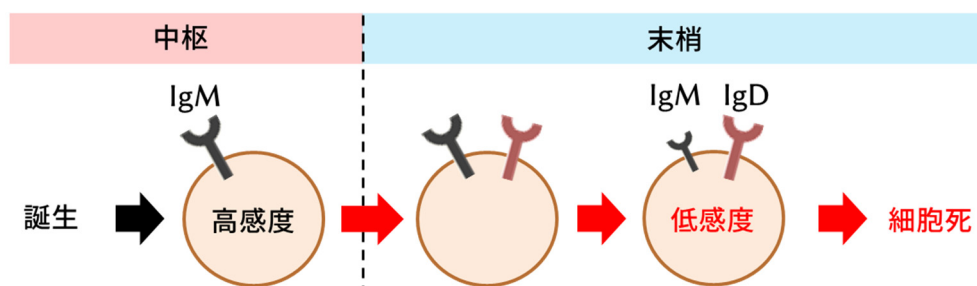


図 4.1 B 細胞が誕生してから死ぬまでの BCR の変化。

4.2.2 実験の改善点および限界

実験において、マウスの脾臓の成熟 B 細胞を精製して用いたことの妥当性について考える。そもそも末梢とは、骨髄と胸腺以外の免疫器官である脾臓、リンパ節、血液中のことを指す。脾臓は比較的多くの B 細胞が得られる上、脾臓が無菌状態のため、B 細胞が刺激を受けていない Naive な状態にある[89]。一方で、リンパ節は B 細胞の数が少ない上、より重要な問題点として、外来抗原によって刺激済みである可能性がある。例えば、腸管リンパ節では絶えず腸内細菌の刺激を受けているため、B 細胞は Naive な状態ではなく、本研究には使用できない。血液中も同様に Naive B が少ないため、やはり適していない。本研究では、実験の都合から脾臓 B 細胞を使用した。リンパ節や血液中でも同一の末梢免疫寛容の仕組みを持つと考えている。

実験に用いた疑似抗原には他の選択肢がある。第 2 章では IgM に特異的に結合する抗 IgM 抗体、第 3 章では IgM+IgD に特異的に結合する抗 Igk 抗体を用いたが、第 3 章では抗 IgM 抗体+抗 IgD 抗体を用いたほうがより詳細な解析ができるという考えはある。しかし、抗 IgM 抗体と抗 IgD 抗体の親和性が異なる点は新たな問題点となるため、必ずしも良いとは言えない。とはいえ、抗 Igk 抗体を用いた場合と、抗 IgM 抗体+抗 IgD 抗体を用いた場合の結果を比較してみることに価値がある。

4.2.3 反応が中庸である細胞を積極的に淘汰する意味

中途半端な抗原刺激を受けた細胞（中庸な反応を示す細胞）が増殖することは考えにくい。増殖しないのであれば、ことさら積極的に殺さなくても自己免疫疾患には繋がらないという指摘はある。しかし、そのような細胞も、運が悪ければ T 細胞の補助によって活性化され、増殖ないしは抗体産生細胞へ分化する可能性があるため[23]、積極的にアポトーシスさせる意味がある。

4.2.4 自己と他者の識別

本モデルが、免疫細胞の自己と他者の識別を説明できるかを考える。2010 年に Susana Minguet らは、多価の抗原のみが BCR を活性化することを示した上で、「(依然として原理はわからないが) B 細胞は自己と他者を区別している」と述べている[22]。なぜなら、「抗原の価数」と「自己か他者かどうか」の関係は見出されていないからである。本研究では、自己と他者の識別方法までは明らかにできなかったが、抗原刺激の強さによって生存応答が切り替わる仕組みに迫った。仮に、自己抗原は主として一価であり、他者（バクテリアやウイルス）の抗原は多価であるとするならば、本研究は自己と他者の識別に大きな示唆を与える結果を得たことになる。

4.2.5 他の B 細胞サブセットとの関係

B 細胞にはいくつかのサブセットが存在するため、本モデルが、それらの異なる特性を説明し得るかどうかを考える。B-1 細胞は、バクテリアやウイルスを普遍的に認識する低親和性の BCR を産生し[90, 91]、これが自己抗原とも交差反応することが知られている[92]。この B-1 細胞は、IgM のみを発現し、主として末梢での自己増殖によって維持される。これらの事実は、IgM のみ発現の細胞が IgM+IgD 共発現の細胞に比べて、「生存しやすい」「自己抗原に反応しやすい」という結果と合致している。

また、辺縁帯 B 細胞は、通常の B 細胞よりも高レベルの IgM および低レベルの IgD を発現し、自己抗原によって活性化することが知られている[93, 94]。この事実も本研究で得られた知見と矛盾しない。辺縁帯 B 細胞は、自己反応性の抗体を産生し得る形質細胞（抗体産生細胞の大半を占める）に分化することができるが、このことも、IgM/IgD 比率と関わりがあるかもしれない。

4.2.6 他の受容体の関与

トニックシグナルには、本研究では扱わなかったが、B 細胞が持つ BAFF 受容体も関与することが示されている[56]。ただし、BAFF 受容体は BAFF (B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family) を受け取るものであり、抗原には反応しない。よって、本モデル中の k_3 または k_5 で表されるトニックシグナルが、BAFF 受容体から発生するトニックシグナルも内包していると考えべきである。また、B 細胞には、他にも CD40 受容体や種々のサイトカイン受容体が発現しており、それぞれのリガンドを他の細胞から受け取ることによって活性化できる。これらの反応は本モデルとは独立の事象と考え、考慮に入れていない。

4.2.7 リンパ腫との関係

トニックシグナルは、正常な B 細胞だけでなく B リンパ腫の腫瘍形成にも必要であることが分かっている[95, 96]。この事実は、B リンパ腫が、増殖機構に異常をきたしているものの、その生存は依然としてトニックシグナル依存であることを示唆している。したがって、トニックシグナルを遮断するアプローチは B リンパ腫の治療に役に立つ可能性が高い。実際に、トニックシグナルを媒介する BTK の阻害剤（イブルチニブ）は、抗がん剤として使用されている。本研究の数理的な知見は、リンパ腫の新規治療法開発の大きな手掛かりになり得る。

4.3 新たな実験の提案

4.3.1 抗原濃度に応じた結合型 BCR「密度」と生存・増殖の観察

抗原結合に伴う受容体の凝集と密度を観察し、閾値応答との関係を調べることで、生存シグナル最上流での閾値制御機構が明らかになる可能性がある。2013年に Gina J. Fiala らは、金粒子で標識した疑似抗原を B 細胞に添加し、抗原と BCR の結合様式を電子顕微鏡で観察した[97]。この結果から、非結合型 IgD の 40%が 2 量体を、60%がそれより大きいオリゴマーのクラスターを形成しているの見積もった。通常、このような非結合型 BCR のクラスター形成の推定に比べれば、結合型 BCR のクラスター推定は容易である。よって、提案の実験は十分に実行可能性がある。

4.3.2 BCR 発現量による分化誘導の違い

BCR 発現数による分化誘導の違いを調べることで、B 細胞の新たな分化誘導機構が明らかになる可能性がある。具体的には、プライマリー細胞を培養する前に、BCR に特異的に結合する蛍光標識抗体を添加し、セルソーターを用いて BCR 発現数に応じて複数のグループに分ける。この実験は、蛍光標識抗体によって結合型 BCR シグナルが生じてしまうことと、セルソーターによって細胞にダメージが与えられてしまうことから、定性的な検証に留まる。2016年に Ryo Shinnakasu らは、「抗原への親和性が十分に高まらない細胞が記憶 B 細胞へ分化誘導される」と述べている[84]。もしこれを支持する結果になれば、これまで有力であった「B 細胞の中で高い抗原親和性を示すものが記憶 B 細胞に分化誘導される」という考えを覆すことになる。一方で、2016年に Akram Méndez らは、B 細胞内のシグナル伝達ネットワークを考慮したモデルを用いて、末梢 B 細胞の選択的な分化制御を示した[98]。このモデルでは、分化には B 細胞がもつ他の受容体 (CD40 受容体、IL21 受容体) への刺激入力が必要である。もし、BCR 発現数のみによる分化制御が示されれば、そのインパクトは大きい。

リンパ節や血液中には抗体産生細胞や記憶 B 細胞に分化しているものも含まれる。一方で、脾臓 B 細胞は刺激を受けていない Naive な状態であるため、活性化や分化誘導の実験に適している。

4.3.3 IgM と IgD の発現比率による細胞寿命の違い

IgM と IgD の発現比率による細胞寿命の違いを調べることで、IgD 型へのシフトに伴う「引退勧告」の存在を確かめることができる。そもそも、BCR 発現数が少ない細胞ほど寿命が短いことは明らかになっており[49, 50]、これは BCR トニックシグナルが存在することの証明にもなっているが、こうした実験は IgM と IgD の違いを考慮していない。提案する実験では、IgM と IgD にそれぞれ特異的に結合する 2 種の蛍光標識抗体を用いて、セルソーターで (IgM^{high}, IgD^{low}) (IgM^{high}, IgD^{high}) (IgM^{low}, IgD^{high}) の 3 グルー

プに分離し、それぞれを培養しながら生存率推移を観察する。これによって統計的な違いが認められれば、次に、一細胞観察によって個々の細胞の IgM/IgD 比率と寿命の関係を調べる。2010 年に Savaş Tay らは、マウス線維芽細胞の一細胞観察を行い、GFP 標識した NF- κ B 量の時空間的な変化を測定した[99]。同様の一細胞観察手法は珍しくなくなっている。しかし、これらの方法をそのまま BCR 発現数の測定に用いることは難しい。なぜなら、BCR 数を測定するために蛍光標識疑似抗原を結合させると、結合型シグナルが生じて細胞の寿命に影響を与えるからである。単価の抗原を用いることで、IgM は活性化し得るものの[36]、生存シグナルへの影響を最小限に留めることができるかもしれない。

第 5 章 結論と展望

本研究では、末梢免疫寛容の仕組みの解明に向けて、数理モデル化とシミュレーションによって、今後の生物実験計画に対するいくつかの示唆を得た。また、これらの示唆を元に、いくつかの新たな実験を提案した。今後は、提案に基づいた実験を行うことで、B細胞の末梢免疫寛容の解明が進み、自己免疫疾患の新規治療法の開発に繋がることが期待される。また、T細胞を始めとしたB細胞以外の免疫細胞への応用も十分に期待される。

免疫学の分野において、実験と数理モデルを統合したアプローチは、2010年頃からの進展が目立ち、今後ますます加速することが見込まれる。実験と数理モデルを一人で担当できることは理想的だが、技術の専門性は日進月歩で深まり、全てを一人で担うことは困難になってくる。近年はインターネットを通じた遠隔会議システムも十分に普及した。今後は、実験を得意とする人と数理モデルを得意とする人の共同研究が、国や地域を問わず活発に行われることが予想される。

方法

外れ値の検定

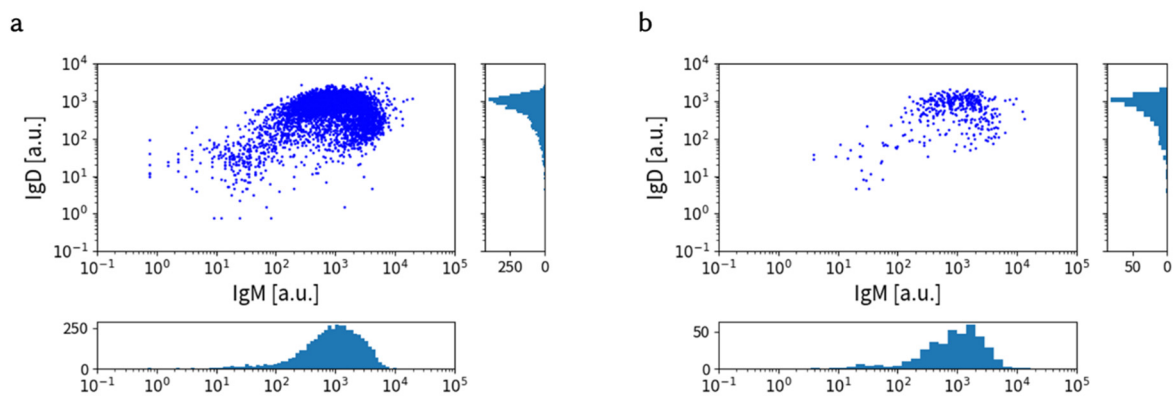
実験値に対しては、第三四分位点と第一四分位点の差を IQR とした上で、(第三四分位点+1.5×IQR) よりも大きい点と、(第一四分位点-1.5×IQR) よりも小さい点を外れ値と判定した。

微分方程式の解法

式(1),(2),(7),(8)は解析解を求め、式(3)および式(9)は数値解法を用いた。数値解法には Python のソルバーである `scipy.integrate.odeint` を用いた。

変数の初期値

変数 IgM, IgD, $Trans_{on}$ の初期値には、IgM と IgD の相対的な発現数が用いられている。細胞集団の IgM および IgD の相対的な発現数は図 m.1a の通りである (研究業績[1] Fig. 4a)。シミュレーションでは、図 m.1a からランダムに抽出した 200 細胞の値 (図 m.1b) を規格化し、IgM と IgD の初期値に用いた。



<引用>研究実績[1] Shoya Yasuda, et al., *Sci Rep* 2017 より

図 m.1 細胞集団の IgM および IgD 発現数。(a)5112 細胞。(b)ランダムに抽出した 200 細胞。

細胞集団の生存率の計算アルゴリズム

計算は 200 細胞で行い、ある時点における細胞集団の生存率は、 $(\text{生細胞数} / 200) \times 100 [\%]$ で算出した。アルゴリズムは図 m.2 の通りである。

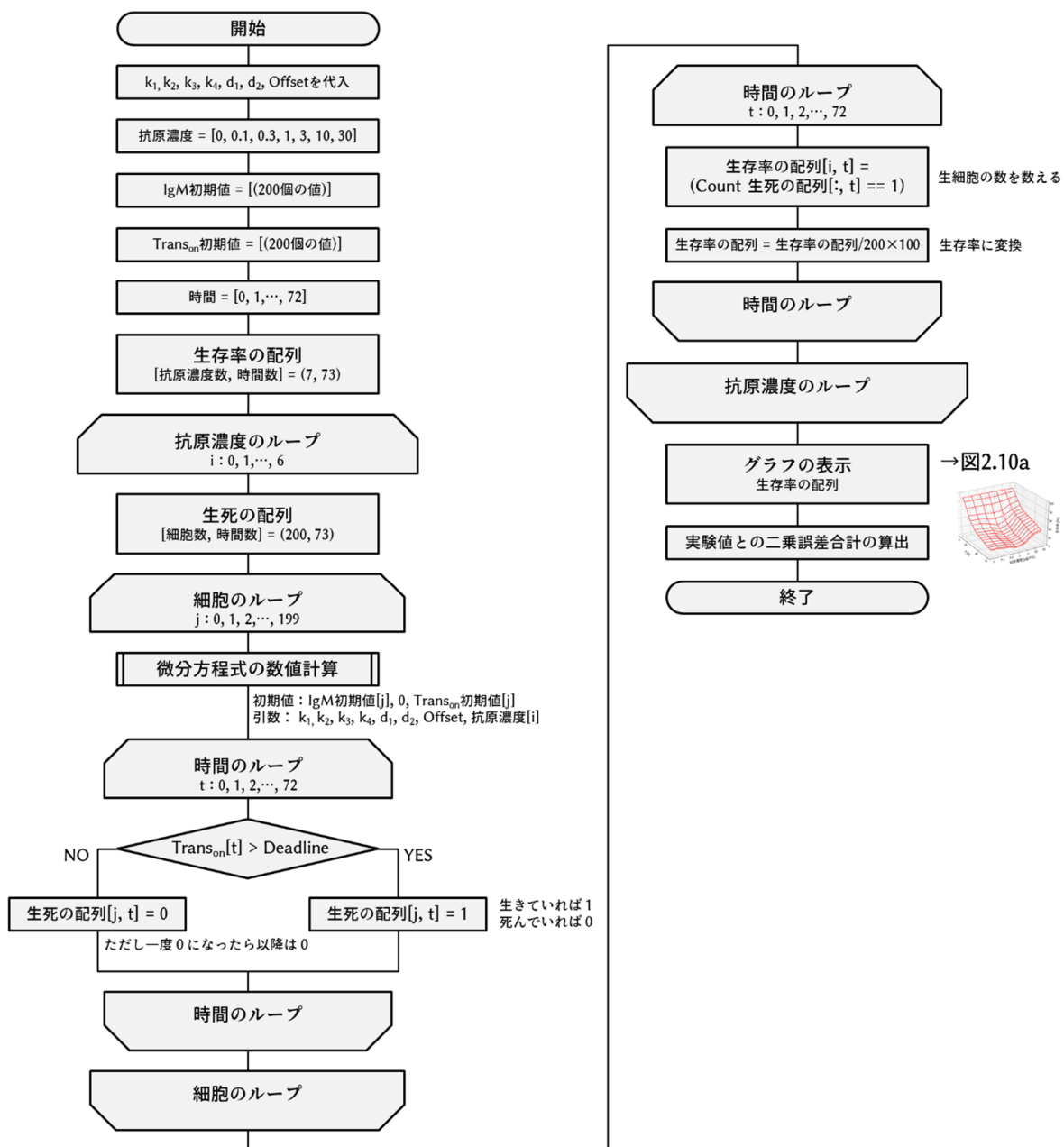


図 m.2 第 2 章オフセット案における 200 細胞の生存率の計算アルゴリズム

パラメータ群最適化（遺伝的アルゴリズム）

実験によって直接決定できないパラメータ群は、遺伝的アルゴリズム（Genetic algorithm, GA）による最適化を行った。GA は、交叉法に REX（Real-Coded Ensemble Crossover）[100]を、世代交代法に JGG（Just Generation Gap）を用いた[101, 102]。また、最適化するパラメータ数が n のとき、集団サイズは $50n$ 、親数は $2n$ 、子の数は $10n$ に設定した。この方法では、第 1 世代の集団として $50n$ 個体のパラメータ群が初期化範囲から乱数で生成される。第 $N+1$ 世代は、集団から $2n$ 個体をランダム抽出し、REX に従って子を $10n$ 個体生成し、JGG に従って $2n$ 個体を集団に戻すことで得られる。集団の評価値（実験値との誤差二乗合計）に変化がなくなるまで十分に世代を経た後、もっとも評価値が小さかったパラメータ群を得た（図 m.3）。GA は 5 つの異なる乱数シードで行われ、解が概ね誤差 5%以内に収まることを確認し、最良値を採用した。また、乱数生成には高性能な乱数生成器である Mersenne Twister を用いた[103]。

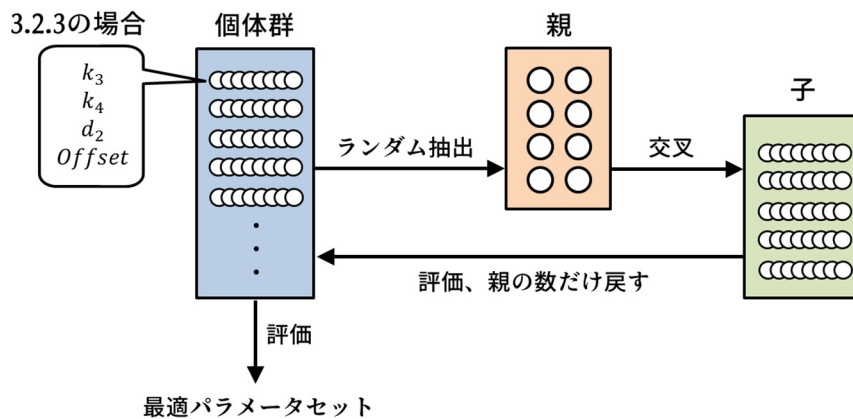


図 m.3 GA のアルゴリズムの概要。

謝辞

指導教員である山村雅幸教授には、日々の研究はもちろんのこと、中高生向けの科学教室開催のような寄り道に至るまで、様々なご指導を賜りました。博士課程からの新しいテーマで、かつ、プログラミングもできない状態からのスタートでしたが、研究室の皆様に支えていただきながら、何とか論文執筆まで至りました。補佐員の西さんは、私たちが研究に専念できるように常に支えてくださいました。藤堂さんは、私が研究に行き詰まったときに「賞味期限切れたからあげるよ」といって渡すものを「食べられるものを持ってきてください」と言いながらいつも食べてくださいました。張さんは、私が研究に行き詰まったことを検出すると、「お悩み相談付き肩揉み 10 分コース」で 9 割の問題を解決してくださいました。

復旦大学の Wang Ji-Yang 教授は、数理モデル化という未知のアプローチを受け入れてくださり、粘り強く共同研究を推し進めてくださいました。博士学生の Zhou Yang は、「とにかく濃度を振って調べてほしい」という意味不明な要求も受け入れ、ほとんどのマウス実験を行ってくださったうえ、3 ヶ月間の上海渡航中も、丁寧に実験を教えてくださいました。

Einstein College の Jan Vijn 教授は 3 ヶ月間の米国渡航を受け入れてくださり、研究員の Xiao Dong は熱心にゲノム解析を教えてくださいました。同じ建物内の日本人研究員 Masako さん、Hiroko さんには、実験のみならず生活面でもお世話になりました。

また、情報生命博士教育院の秋山泰教授は、多くの学会発表や海外渡航を支援してくださり、長きに渡って研究を見守ってくださいました。事務室長の岡田さんは、私の「ルールの境界を攻める」という理解不能な挑戦にも常に応えてくださいました。

この場をお借りして、皆様に厚く御礼申し上げます。

なお、本研究は、日本学術振興会特別研究員 DC 奨励費（201610309）および若手研究者海外挑戦プログラム奨励費（201780043）の助成を受けたものです。

参考文献

- [1] Melchers F., Checkpoints that control B cell development., *J Clin Invest* **125**(6), 2203-10, 2015
- [2] Hardy RR, Hayakawa K., B cell development pathways., *Annu Rev Immunol* **19**, 595-621, 2001
- [3] Hardy RR, B-1 B cells: development, selection, natural autoantibody and leukemia., *Curr Opin Immunol* **18**(5), 547-55, 2006
- [4] Dühren-von Minden M, Übelhart R, Schneider D, Wossning T, Bach MP, Buchner M, Hofmann D, Surova E, Follo M, Köhler F, Wardemann H, Zirikli K, Veelken H, Juma H., Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling., *Nature* **489**(7415), 309-12, 2012
- [5] Young RM, Wu T, Schmitz R, Dawood M, Xiao W, Phelan JD, Xu W, Menard L, Meffre E, Chan WC, Jaffe ES, Gascoyne RD, Campo E, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Rimsza LM, Staudt LM., Survival of human lymphoma cells requires B-cell receptor engagement by self-antigens., *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(44), 13447-54, 2015
- [6] Khan WN, Alt FW, Gerstein RM, Malynn BA, Larsson I, Rathbun G, Davidson L, Müller S, Kantor AB, Herzenberg LA, et al., Defective B cell development and function in Btk-deficient mice., *Immunity* **3**(3), 283-99, 1995
- [7] Smith T, Cunningham-Rundles C., Primary B-Cell Immunodeficiencies., *Hum Immunol*, doi: 10.1016/j.humimm.2018.10.015., In Press
- [8] Pieper K, Grimbacher B, Eibel H., B-cell biology and development., *J Allergy Clin Immunol* **131**(4), 959-71, 2013
- [9] Young RM, Wu T, Schmitz R, Dawood M, Xiao W, Phelan JD, Xu W, Menard L, Meffre E, Chan WC, Jaffe ES, Gascoyne RD, Campo E, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Rimsza LM, Staudt LM., Survival of human lymphoma cells requires B-cell receptor engagement by self-antigens., *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(44), 13447-54, 2015
- [10] Pao LI, Lam KP, Henderson JM, Kutok JL, Alimzhanov M, Nitschke L, Thomas ML, Neel BG, Rajewsky K., B cell-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase Shp1 promotes B-1a cell development and causes systemic autoimmunity., *Immunity* **27**(1), 35-48, 2007
- [11] Tsubata T., B-cell tolerance and autoimmunity., *Fl000Res* **6**, 391, 2017
- [12] Pelanda R, Torres RM., Central B-cell tolerance: where selection begins., *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(4), a007146, 2012
- [13] Nemazee D., Mechanisms of central tolerance for B cells., *Nat Rev Immunol* **17**(5), 281-294, 2017
- [14] Pelanda R, Torres RM., Central B-cell tolerance: where selection begins., *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(4), a007146, 2012
- [15] Mandik-Nayak L, Racz J, Sleckman BP, Allen PM., Autoreactive marginal zone B cells are spontaneously activated but lymph node B cells require T cell help., *J Exp Med* **203**(8), 1985-98, 2006
- [16] Brink R, Goodnow CC, Crosbie J, Adams E, Eris J, Mason DY, Hartley SB, Basten A., Immunoglobulin M and D antigen receptors are both capable of mediating B lymphocyte activation, deletion, or anergy after interaction with specific antigen., *J Exp Med* **176**(4), 991-1005, 1992
- [17] Theofilopoulos AN, Kono DH, Baccala R., The multiple pathways to autoimmunity., *Nat Immunol* **18**(7), 716-724, 2017

- [18] Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT, Vilen BJ., B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells?, *Nat Rev Immunol* **7**(8), 633-43, 2007
- [19] Russell L, John S, Cullen J, Luo W, Shlomchik MJ, Garrett-Sinha LA., Requirement for Transcription Factor Ets1 in B Cell Tolerance to Self-Antigens., *J Immunol* **195**(8), 3574-83, 2015
- [20] Finkelman FD, Holmes JM, Dukhanina OI, Morris SC., Cross-linking of membrane immunoglobulin D, in the absence of T cell help, kills mature B cells in vivo., *J Exp Med* **181**(2), 515-25, 1995
- [21] Peckham D, Andersen-Nissen E, Finkelman FD, Stunz LL, Ashman RF., Difference in apoptosis induction between surface IgD and IgM., *Int Immunol* **13**(3), 285-95, 2001
- [22] Minguet S, Dopfer EP, Schamel WW., Low-valency, but not monovalent, antigens trigger the B-cell antigen receptor (BCR)., *Int Immunol* **22**(3), 205-12, 2010
- [23] Carsetti R, Köhler G, Lamers MC., A role for immunoglobulin D: interference with tolerance induction., *Eur J Immunol* **23**(1), 168-78, 1993
- [24] Kozono Y, Kotzin BL, Holers VM., Resting B cells from New Zealand Black mice demonstrate a defect in apoptosis induction following surface IgM ligation., *J Immunol* **156**(11), 4498-503, 1996
- [25] ROWE DS, FAHEY JL., A NEW CLASS OF HUMAN IMMUNOGLOBULINS. II. NORMAL SERUM IGD., *J Exp Med* **121**, 185-99, 1965
- [26] Ten Hacken E, Sivina M, Kim E, O'Brien S, Wierda WG, Ferrajoli A, Estrov Z, Keating MJ, Oellerich T, Scielzo C, Ghia P, Caligaris-Cappio F, Burger JA., Functional Differences between IgM and IgD Signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia., *J Immunol* **197**(6), 2522-31, 2016
- [27] Surova E, Jumaa H., The role of BCR isotype in B-cell development and activation., *Adv Immunol* **123**, 101-39, 2014
- [28] Guo L, Zhang X, Zheng B, Han S., IgM-mediated signaling is required for the development of a normal B cell memory response., *Mol Immunol* **45**(4), 1071-7, 2008
- [29] Alés-Martínez JE, Warner GL, Scott DW., Immunoglobulins D and M mediate signals that are qualitatively different in B cells with an immature phenotype., *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(18), 6919-23, 1988
- [30] Sabouri Z, Perotti S, Spierings E, Humburg P, Yabas M, Bergmann H, Horikawa K, Roots C, Lambe S, Young C, Andrews TD, Field M, Enders A, Reed JH, Goodnow CC., IgD attenuates the IgM-induced anergy response in transitional and mature B cells., *Nat Commun* **7**, 13381, 2016
- [31] Roes J, Rajewsky K., Immunoglobulin D (IgD)-deficient mice reveal an auxiliary receptor function for IgD in antigen-mediated recruitment of B cells., *J Exp Med* **177**(1), 45-55, 1993
- [32] Nitschke L, Kosco MH, Köhler G, Lamers MC., Immunoglobulin D-deficient mice can mount normal immune responses to thymus-independent and -dependent antigens., *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(5), 1887-91, 1993
- [33] Geisberger R, Lamers M, Achatz G., The riddle of the dual expression of IgM and IgD., *Immunology* **118**(4), 429-37, 2006
- [34] Han S, Zhang X, Xu R, Finkelman FD, Brombacher F, Zheng B., IgD+IgM- B cells mount immune responses that exhibit altered antibody repertoire., *Eur J Immunol* **34**(3), 661-668, 2004
- [35] Lutz C, Ledermann B, Kosco-Vilbois MH, Ochsenbein AF, Zinkernagel RM, Köhler G, Brombacher F., IgD can largely substitute for loss of IgM function in B cells., *Nature* **393**(6687), 797-801, 1998

- [36] Übelhart R, Hug E, Bach MP, Wossning T, Dühren-von Minden M, Horn AH, Tsiantoulas D, Kometani K, Kurosaki T, Binder CJ, Sticht H, Nitschke L, Reth M, Jumaa H., Responsiveness of B cells is regulated by the hinge region of IgD., *Nat Immunol* **16**(5), 534-43, 2015
- [37] Horii T, Morita S, Kimura M, Terawaki N, Shibutani M, Hatada I., Efficient generation of conditional knockout mice via sequential introduction of lox sites., *Sci Rep* **7**(1), 7891, 2017
- [38] Shinohara H, Behar M, Inoue K, Hiroshima M, Yasuda T, Nagashima T, Kimura S, Sanjo H, Maeda S, Yumoto N, Ki S, Akira S, Sako Y, Hoffmann A, Kurosaki T, Okada-Hatakeyama M., Positive feedback within a kinase signaling complex functions as a switch mechanism for NF- κ B activation., *Science* **344**(6185), 760-4, 2014
- [39] Brandman O, Meyer T., Feedback loops shape cellular signals in space and time., *Science* **322**(5900), 390-5, 2008
- [40] Brandman O, Ferrell JE Jr, Li R, Meyer T., Interlinked fast and slow positive feedback loops drive reliable cell decisions., *Science* **310**(5747), 496-8, 2005
- [41] Nakakuki T, Birtwistle MR, Saeki Y, Yumoto N, Ide K, Nagashima T, Brusch L, Ogunnaike BA, Okada-Hatakeyama M, Kholodenko BN., Ligand-specific c-Fos expression emerges from the spatiotemporal control of ErbB network dynamics., *Cell* **141**(5), 884-96, 2010
- [42] Ryu H, Chung M, Dobrzyński M, Fey D, Blum Y, Sik Lee S, Peter M, Kholodenko BN, Li Jeon N, Pertz O., Frequency modulation of ERK activation dynamics rewires cell fate., *Mol Syst Biol* **12**(4), 866, 2016
- [43] Kim KM, Reth M., Signaling difference between class IgM and IgD antigen receptors., *Ann N Y Acad Sci* **766**, 81-8, 1995
- [44] Junkin M, Kaestli AJ, Cheng Z, Jordi C, Albayrak C, Hoffmann A, Tay S., High-Content Quantification of Single-Cell Immune Dynamics., *Cell Rep* **15**(2), 411-22, 2016
- [45] Wanant S, Quon MJ., Insulin receptor binding kinetics: modeling and simulation studies., *J Theor Biol* **205**(3), 355-64, 2000
- [46] Zinkle A, Mohammadi M., A threshold model for receptor tyrosine kinase signaling specificity and cell fate determination., *F1000Res* **7**, pii:F1000 Faculty Rev-872, 2018
- [47] Shankaran H, Wiley HS, Resat H., Receptor downregulation and desensitization enhance the information processing ability of signalling receptors., *BMC Syst Biol* **1**, 48, 2007
- [48] Artyomov MN, Lis M, Devadas S, Davis MM, Chakraborty AK., CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery., *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(39), 16916-21, 2010
- [49] Lam KP, Kühn R, Rajewsky K., In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death., *Cell* **90**(6), 1073-83, 1997
- [50] Kraus M, Alimzhanov MB, Rajewsky N, Rajewsky K., Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer., *Cell* **117**(6), 787-800, 2004
- [51] Monroe JG., ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes., *Nat Rev Immunol* **6**(4), 283-94, 2006
- [52] Monroe JG., Ligand-independent tonic signaling in B-cell receptor function., *Curr Opin Immunol* **16**(3), 288-95, 2004

- [53] Szydłowski M, Kiliszek P, Sewastianik T, Jabłonska E, Białopiotrowicz E, Gorniak P, Polak A, Markowicz S, Nowak E, Grygorowicz MA, Prochorec-Sobieszek M, Szumera-Cieckiewicz A, Malenda A, Lech-Maranda E, Warzocha K, Juszczynski P., FOXO1 activation is an effector of SYK and AKT inhibition in tonic BCR signal-dependent diffuse large B-cell lymphomas., *Blood* **127**(6), 739-48, 2016
- [54] Havranek O, Xu J, Köhrer S, Wang Z, Becker L, Comer JM, Henderson J, Ma W, Man Chun Ma J, Westin JR, Ghosh D, Shinnars N, Sun L, Yi AF, Karri AR, Burger JA, Zal T, Davis RE., Tonic B-cell receptor signaling in diffuse large B-cell lymphoma., *Blood* **130**(8), 995-1006, 2017
- [55] Burger JA, Wiestner A., Targeting B cell receptor signalling in cancer: preclinical and clinical advances., *Nat Rev Cancer* **18**(3), 148-167, 2018
- [56] Mackay F, Figgett WA, Saulep D, Lepage M, Hibbs ML., B-cell stage and context-dependent requirements for survival signals from BAFF and the B-cell receptor., *Immunol Rev* **237**(1), 205-25, 2010
- [57] Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC., The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL., *Blood* **120**(6), 1175-84, 2012
- [58] Kurosaki T., Regulation of BCR signaling., *Mol Immunol* **48**(11), 1287-91, 2011
- [59] Kurosaki T, Shinohara H, Baba Y., B cell signaling and fate decision., *Annu Rev Immunol* **28**, 21-55, 2010
- [60] Xu Y, Xu L, Zhao M, Xu C, Fan Y, Pierce SK, Liu W., No receptor stands alone: IgG B-cell receptor intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to antibody memory., *Cell Res* **24**(6), 651-64, 2014
- [61] Niiron H, Clark EA., Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals., *Nat Rev Immunol* **2**(12), 945-56, 2002
- [62] DeFranco AL., The complexity of signaling pathways activated by the BCR., *Curr Opin Immunol* **9**(3), 296-308, 1997
- [63] Rothstein TL, Herzenberg LA, Holodick NE, Ghosn E., B-1 Cell Development and Function., *Ann N Y Acad Sci* **1362**(1), 110–116, 2015
- [64] Wang J, Koizumi T, Watanabe T., Altered antigen receptor signaling and impaired Fas-mediated apoptosis of B cells in Lyn-deficient mice., *J Exp Med* **184**(3), 831-8, 1996
- [65] Khan WN, Alt FW, Gerstein RM, Malynn BA, Larsson I, Rathbun G, Davidson L, Müller S, Kantor AB, Herzenberg LA, et al., Defective B cell development and function in Btk-deficient mice., *Immunity* **3**(3), 283-99, 1995
- [66] Kerner JD, Appleby MW, Mohr RN, Chien S, Rawlings DJ, Maliszewski CR, Witte ON, Perlmutter RM., Impaired expansion of mouse B cell progenitors lacking Btk., *Immunity* **3**(3), 301-12, 1995
- [67] Kil LP, de Bruijn MJ, van Nimwegen M, Corneth OB, van Hamburg JP, Dingjan GM, Thaiss F, Rimmelzwaan GF, Elewaut D, Delsing D, van Loo PF, Hendriks RW., Btk levels set the threshold for B-cell activation and negative selection of autoreactive B cells in mice., *Blood* **119**(16), 3744-56, 2012
- [68] Majchrzak A, Witkowska M, Smolewski P., Inhibition of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in diffuse large B-cell lymphoma: current knowledge and clinical significance., *Molecules* **19**(9), 14304-15, 2014
- [69] Srinivasan L, Sasaki Y, Calado DP, Zhang B, Paik JH, DePinho RA, Kutok JL, Kearney JF, Otipoby KL, Rajewsky K., PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival., *Cell* **139**(3), 573-86, 2009
- [70] Pillai S, Cariappa A., The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision., *Nat Rev Immunol* **9**(11), 767-77, 2009

- [71] Ouchida R, Lu Q, Liu J, Li Y, Chu Y, Tsubata T, Wang JY., FcμR interacts and cooperates with the B cell receptor To promote B cell survival., *J Immunol* **194**(7), 3096-101, 2015
- [72] Perkins ND., Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function., *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(1), 49-62, 2007
- [73] Ouchida R, Kurosaki T, Wang JY., A role for lysosomal-associated protein transmembrane 5 in the negative regulation of surface B cell receptor levels and B cell activation., *J Immunol* **185**(1), 294-301, 2010
- [74] Kurosaki T, Hikida M., Tyrosine kinases and their substrates in B lymphocytes., *Immunol Rev* **228**(1), 132-48, 2009
- [75] Maity PC, Yang J, Klaesener K, Reth M., The nanoscale organization of the B lymphocyte membrane., *Biochim Biophys Acta* **1853**(4), 830-40, 2015
- [76] Mattila PK, Feest C, Depoil D, Treanor B, Montaner B, Otipoby KL, Carter R, Justement LB, Bruckbauer A, Batista FD., The actin and tetraspanin networks organize receptor nanoclusters to regulate B cell receptor-mediated signaling., *Immunity* **38**(3), 461-74, 2013
- [77] Song W, Liu C, Upadhyaya A., The pivotal position of the actin cytoskeleton in the initiation and regulation of B cell receptor activation., *Biochim Biophys Acta* **1838**(2), 569-78, 2014
- [78] Huang L, Zhang Y, Xu C, Gu X, Niu L, Wang J, Sun X, Bai X, Xuan X, Li Q, Shi C, Yu B, Miller H, Yang G, Westerberg LS, Liu W, Song W, Zhao X, Liu C., Rictor positively regulates B cell receptor signaling by modulating actin reorganization via ezrin., *PLoS Biol* **15**(8), e2001750, 2017
- [79] Maity PC, Blount A, Jumaa H, Ronneberger O, Lillemeier BF, Reth M., B cell antigen receptors of the IgM and IgD classes are clustered in different protein islands that are altered during B cell activation., *Sci Signal* **8**(394), ra93, 2015
- [80] Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, Kohlhammer H, Lamy L, Zhao H, Yang Y, Xu W, Shaffer AL, Wright G, Xiao W, Powell J, Jiang JK, Thomas CJ, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Johnson NA, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Wilson WH, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Braziel RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Pierce SK, Staudt LM., Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma., *Nature* **463**(7277), 88-92, 2010
- [81] Pore D, Gupta N., The ezrin-radixin-moesin family of proteins in the regulation of B-cell immune response., *Crit Rev Immunol* **35**(1), 15-31, 2015
- [82] Jacob A, Cooney D, Pradhan M, Coggeshall KM, Convergence of signaling pathways on the activation of ERK in B cells, *J Biol Chem* **277**(26), 23420-6, 2002
- [83] Iber D, Gruhn T., Organisation of B-cell receptors on the cell membrane., *Syst Biol (Stevenage)* **153**(5), 401-4, 2006
- [84] Shinnakasu R, Inoue T, Kometani K, Moriyama S, Adachi Y, Nakayama M, Takahashi Y, Fukuyama H, Okada T, Kurosaki T., Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment., *Nat Immunol* **17**(7), 861-9, 2016
- [85] Moskalensky AE, Chernyshev AV, Yurkin MA, Nekrasov VM, Polshchitsin AA, Parks DR, Moore WA, Filatenkov A, Maltsev VP, Orlova DY., Dynamic quantification of antigen molecules with flow cytometry., *J Immunol Methods* **418**, 66-74, 2015

- [86] Fulcher DA, Basten A, B cell life span: a review., *Immunol Cell Biol* **75**(5), 446-55, 1997
- [87] Cabatingan MS, Schmidt MR, Sen R, Woodland RT, Naive B lymphocytes undergo homeostatic proliferation in response to B cell deficit, *J Immunol.* **169**(12), 6795-805, 2002
- [88] Kogut I, Scholz JL, Cancro MP, Cambier JC, B cell maintenance and function in aging, *Semin Immunol.* **24**(5), 342-9, 2012
- [89] Shapiro-Shelef M, Calame K., Regulation of plasma-cell development, *Nat Rev Immunol.* **5**(3), 230-42, 2005
- [90] Hardy RR., B-1 B cells: development, selection, natural autoantibody and leukemia., *Curr Opin Immunol* **18**(5), 547-55, 2006
- [91] Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL., Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70-., *J Exp Med* **208**(1), 67-80, 2011
- [92] Hayakawa K, Hardy RR., Development and function of B-1 cells., *Curr Opin Immunol* **12**(3), 346-53, 2000
- [93] Mandik-Nayak L, Racz J, Sleckman BP, Allen PM., Autoreactive marginal zone B cells are spontaneously activated but lymph node B cells require T cell help., *J Exp Med* **203**(8), 1985-98, 2006
- [94] Magri G, Miyajima M, Bascones S, Mortha A, Puga I, Cassis L, Barra CM, Comerma L, Chudnovskiy A, Gentile M, Llige D, Cols M, Serrano S, Aróstegui JI, Juan M, Yagüe J, Merad M, Fagarasan S, Cerutti A., Innate lymphoid cells integrate stromal and immunological signals to enhance antibody production by splenic marginal zone B cells., *Nat Immunol* **15**(4), 354-364, 2014
- [95] Dühren-von Minden M, Übelhart R, Schneider D, Wossning T, Bach MP, Buchner M, Hofmann D, Surova E, Follo M, Köhler F, Wardemann H, Zirlík K, Veelken H, Jumaa H., Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling., *Nature* **489**(7415), 309-12, 2012
- [96] Young RM, Wu T, Schmitz R, Dawood M, Xiao W, Phelan JD, Xu W, Menard L, Meffre E, Chan WC, Jaffe ES, Gascoyne RD, Campo E, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Rimsza LM, Staudt LM., Survival of human lymphoma cells requires B-cell receptor engagement by self-antigens., *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(44), 13447-54, 2015
- [97] Fiala GJ, Kaschek D, Blumenthal B, Reth M, Timmer J, Schamel WW., Pre-clustering of the B cell antigen receptor demonstrated by mathematically extended electron microscopy., *Front Immunol* **4**, 427, 2013
- [98] Méndez A, Mendoza L., A Network Model to Describe the Terminal Differentiation of B Cells., *PLoS Comput Biol* **12**(1), e1004696, 2016
- [99] Tay S, Hughey JJ, Lee TK, Lipniacki T, Quake SR, Covert MW., Single-cell NF-kappaB dynamics reveal digital activation and analogue information processing., *Nature* **466**(7303), 267-71, 2010
- [100] Kobayashi S, The Frontiers of Real-coded Genetic Algorithms., *Trans. Jpn. Soc. Artif. Intell.* **24**(1), 147-162, 2009
- [101] Kita H, Yamamura M, A functional specialization hypothesis for designing genetic algorithms., *Proc. '99 IEEE Intl. Conference On SMC* **3**, 579-584, 1999
- [102] Akimoto Y, Hasada R, Sakuma J, Ono I, Kobayashi S, Generation alternation model for real-coded GA using multi-parent: Proposal and evaluation of just generation gap (JGG), *Proc. 19th SICE Symposium on Decentralized Autonomous Systems*, 341-346, 2007
- [103] Matsumoto M, Nishimura T, Mersenne twister: a 623-dimensionally equidistributed uniform pseudo-random number generator., *ACM Trans. Model. Comput. Simul.* **8**(1), 3-30, 1998

研究実績

学位論文に関連する業績

学術雑誌等に発表した論文（査読あり）

- [1] **Yasuda S**, Sun J, Zhou Y, Wang Y, Lu Q, Yamamura M, Wang JY., Opposing roles of IgM and IgD in BCR-induced B-cell survival., *Genes Cells* **23**(10), 868-879, 2018
- [2] **Yasuda S**, Zhou Y, Wang Y, Yamamura M, Wang JY., A model integrating tonic and antigen-triggered BCR signals to predict the survival of primary B cells, *Sci Rep* **7**(1), 14888, 2017

ポスター発表（査読なし）

- [3] **Yasuda S**, Zhou Y, Wang JY, Yamamura M, “B 細胞の生存を制御する BAFF 受容体シグナルの数理解析の試み”, *ConBio2017(生命科学系学会合同年次大会)*, 2P-1326, 2017
- [4] **Yasuda S**, Zhou Y, Yamamura M, Wang JY, “Mathematical modeling of BAFFR-mediated B cell survival signal”, *The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology*, 3-E-W34-1-P, 2017
- [5] **Yasuda S**, Zhou Y, Wang JY, Yamamura M, “B 細胞の生存を制御する内因性および外因性シグナルの数理解析の試み”, 第 89 回日本生化学会大会, 2P-404, 2016
- [6] **Yasuda S**, Zhou Y, Wang Y, Yamamura M, Wang JY, “Mathematical modeling of intrinsic and extrinsic signals that regulate B cell survival”, *The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology*, 2016A-0640, 2016
- [7] **Yasuda S**, Zhou Y, Wang JY, Yamamura M, Mathematical analysis of intrinsic and extrinsic factors that regulate B-cell survival, *BMB2015 (日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会)*, 1P0795, 2015
- [8] Zhou Y, **Yasuda S**, Yamamura M, Wang JY, “Analysis of intrinsic and extrinsic factors that regulate B cell survival”, *10th CSI (Chinese Society for Immunology, 第 10 回中国免疫学会学術集会)*, 紀要 pp72-73, 2015

その他の業績

学術雑誌等に発表した論文（査読あり）

- [9] Lai N, Min Q, Xiong E, Liu J, Zhang L, **Yasuda S**, Wang JY., A tetrameric form of CD40 ligand with potent biological activities in both mouse and human primary B cells., *Mol Immunol.* **105**, 173-180, 2018

- [10] Li S, Liu J, Min Q, Ikawa T, **Yasuda S**, Yang Y, Wang YQ, Tsubata T, Zhao Y, Wang JY., Kelch-like protein 14 promotes B-1a but suppresses B-1b cell development., *Int Immunol.* **30**(7), 311-318, 2018
- [11] Dong X, Shi M, Lee M, Toro R, Gravina S, Han W, **Yasuda S**, Wang T, Zhang Z, Vijg J, Suh Y, Spivack SD., Global, integrated analysis of methylomes and transcriptomes from laser capture microdissected bronchial and alveolar cells in human lung., *Epigenetics* **13**(3), 264-274, 2018
- [12] Liu J, Xiong E, Zhu H, Mori H, **Yasuda S**, Kinoshita K, Tsubata T, Wang JY., Efficient Induction of Ig Gene Hypermutation in Ex Vivo-Activated Primary B Cells., *J Immunol.* **199**(9), 3023-3030, 2017
- [13] **Yasuda S**, Hayakawa M, Onoe H, Takinoue M., Twisting microfluidics in a planetary centrifuge., *Soft Matter.* **13**(11), 2141-2147, 2017
- [14] **Yasuda S**, Hayakawa M, Onoe H, Takinoue M, Generation of Multi-helical Microfibers and Marble Microbeads using Orbital-rotation and Axial-spin Centrifuge, *19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2015)*, pp1163-1165, 2015

ポスターおよび口頭発表（査読なし）

- [15] Laosunthara A, Todo K, **Yasuda S**, Proposal of new evaluation method of educational policy using mathematical model, *Research Report of JSET Conferences* 18(5), 69-74, 2018.
- [16] **Yasuda S**, Hayakawa M, Takinoue M, Centrifuge-based synthesis of hydrogel microfiber with helical structure, *Journal of the Society for Chemistry and Micro-Nano Systems (CHEMINAS)* **13**(2), 冊子 pp40-41, 2014
- [17] **Yasuda S**, Hayakawa M, Takinoue M, Control synthesis of anisotropic hydrogel microfiber with helical structure, *The 52nd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (BSJ2014)*, 3P316, 2014

補遺

プライマリー細胞の精製および培養方法

実験は復旦大学 (Fudan Univ.) の Wang Ji-Yang 研究室に依頼したものであり、詳細は研究業績[1, 2]に記載されている。マウス (C57BL/6) は Shanghai Slac Laboratory Animal Corporation から購入し無菌環境で飼育した。B 細胞は、マウスの脾臓からマウス B リンパ球濃縮セット (Cat # 557792, BD Biosciences) の手順に従って精製した。この手法では、脾臓の細胞懸濁液に対して、T 細胞、未熟 B 細胞、B-1 細胞等と特異的に結合する磁性粒子標識抗体を加え、これらを磁石によって取り除くネガティブセレクションを行う。残された培養液中に含まれる細胞は、フローサイトメーター (FACSVerse, BD Biosciences) で B220 発現量を測定することで、95%以上が成熟 B 細胞であることを確認した。精製された B 細胞は、96 ウェル平底プレート (5×10^5 cells/mL, 200 μ L/ウェル) を用いて、RPMI 1640 培地中 (10%FBS、 5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール、100U ペニシリンおよびストレプトマイシンを含む) で培養した。実験に応じて、疑似抗原として、IgM に特異的に結合する F(ab')₂ 抗 IgM 抗体 (Cat # 16-5092, eBioscience) や、IgM+IgD に特異的に結合する F(ab')₂ 抗 Igk 抗体 (Cat# 1052-14, SouthernBiotech)を加えて培養した。(詳細は研究業績[1] Shoya Yasuda, et al., *Genes Cells* 2018 および研究実績[2] Shoya Yasuda, et al., *Sci Rep* 2017 参照)

生存率や BCR 発現量の測定方法

細胞集団の生存率は、7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) で染色し、生細胞 (7-AAD^{low}FSC^{high}) および死細胞 (7-AAD^{high}FSC^{low}) の割合をフローサイトメーターで測定することで算出した。細胞集団の BCR 発現量は、BCR の重鎖に特異的に結合する蛍光標識抗体を用いて、その蛍光強度をフローサイトメーターで測定した。この手法では、B 細胞を氷上において蛍光標識抗体を加え、細胞を 200 μ L FACS 緩衝液 (2% FCS、0.02%アジ化ナトリウムを含む PBS) で 2 回洗浄し、フローサイトメーターで蛍光値を測定した。慣習に従い、蛍光値の Geometric mean (幾何平均値) を BCR 発現量の指標として用いた。実験に応じて、蛍光標識抗体として、IgM に特異的に結合する PE 標識抗 IgM 抗体 (Cat # 553521, BD Biosciences)、IgD に特異的に結合する FITC 標識抗 IgD 抗体 (Cat# 405703, Biolegend) および IgM+IgD に特異的に結合する PE 標識抗 Igk 抗体 (Cat # 562021, BD Biosciences) を使用した。(詳細は研究実績[1] Shoya Yasuda, et al., *Genes Cells* 2018 および研究実績[2] Shoya Yasuda, et al., *Sci Rep* 2017 参照)