

令和 4 年 12 月 27 日

報道機関 各位

動的ネットワークバイオマーカー理論により マウス T 細胞活性化過程において状態遷移の予兆を検出

■ ポイント

- ・ T 細胞は細胞性免疫をつかさどり、活性化されることで種々の機能を有する T 細胞に分化していく。
- ・ 未病（病気になる直前の状態）を数理的に定義するために、合原一幸東京大学特別教授らにより考案された「動的ネットワークバイオマーカー（DNB）理論」は、マウスやヒト等生物の健康状態が疾病状態に変わる状態遷移の予兆を検出することができる。
- ・ 実用的な未病検出法を新規開発するため、マウス T 細胞の活性化をモデルとして、生体への応用が進むラマン顕微鏡により得られたラマン散乱スペクトルに DNB 理論を適用した。
- ・ マウス T 細胞が刺激後、完全に活性化する 48 時間よりも前の 6 時間において、予兆を表す DNB スコアがピークとなり、状態遷移の直前の段階であることを明らかにした。
- ・ 生きたまま細胞や組織を測定できるラマン顕微鏡を用いた未病検出系を確立した。

■ 概要

富山大学未病研究センターは、学長直轄のセンターとして 2020 年 4 月に設置された部局横断的なセンターであり、国の大型プロジェクトであるムーンショット型研究開発事業目標 2 の実施母体となっている。数理学者である合原一幸東京大学特別教授の研究プロジェクトにおいて、数理的な未病の理論を生物学的な基礎研究で実証し、最終的には近未来の未病医療として臨床応用することを目指している。

この未病研究センターを兼任する春木准教授と小泉教授らが、生きたままの細胞や組織を観察可能な非破壊・低侵襲検査により得られるラマン散乱スペクトルに対して DNB 解析を試みた。モデルデータは、マウス T 細胞活性化過程においてラマン顕微鏡により測定されたラマン散乱スペクトルである。DNB 解析の結果、T 細胞が完全に活性化する 48 時間よりも前の 6 時間において、状態遷移の予兆が見られることを明らかにした。ラマン顕微鏡と DNB 理論の融合により、今後、非破壊・低侵襲かつ経時的に取得した臨床検体の血液細胞から未病を検出できる可能性を秘めている。

■ 研究の背景

生態系の変化や株の変動等、状態が遷移する際の予兆を数理的に捉えることは重要である。この予兆が分かれば、対策を講じることが可能である。病気の場合、重症化する前に生活習慣の改善、または医療介入が可能となり、健康寿命を延ばすことができる。

これまでに本センターを含め、遺伝子発現量に対する DNB 解析の研究が行われ、様々な疾

患において予兆（超早期信号）が検出されたと報告されている。しかし、この遺伝子発現量データはマウス等動物の犠牲を伴う破壊検査により得られるため、ヒトへの応用を考えた場合に大きな問題となる。そこで、非破壊・低侵襲検査が可能なデータに着目し、その中でも細胞や組織を生きのまま計測できるラマン散乱スペクトルに対して DNB 理論の適用を試みた。

■ 研究の内容・成果

使用データは、マウス T 細胞が初期のナイーブ状態から活性化するまでの過程を経時的に計測したラマン散乱スペクトルである (Ichimura *et al.* *Sci. Rep.* **6**, 37562, 2016)。D011.10 TCR トランスジェニックマウスの脾臓（ひぞう）からナイーブ CD4+ T 細胞を抽出し、CD3 および CD28 に対する抗体による刺激後、ラマン顕微鏡により初期（0 時間）、刺激開始後 2、6、12、24、48 時間に取得されたデータである。

まず、DNB 解析を行う前に、従来法によりマウス T 細胞活性化の様子を確認した。

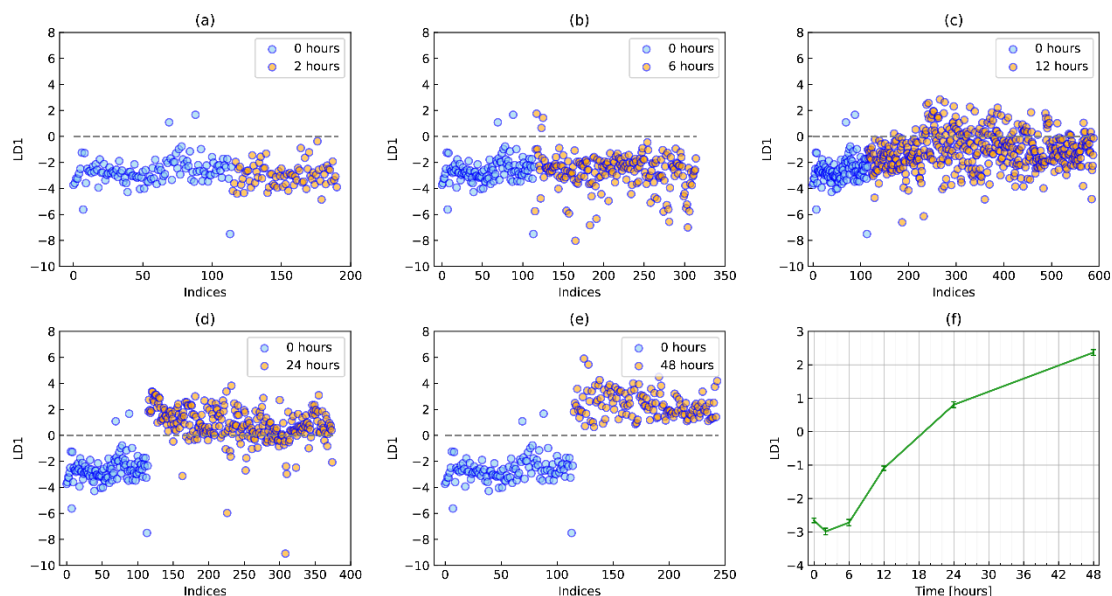


図 1: 主成分分析—線形判別分析 (PCA-LDA) によるナイーブと活性化状態の分類。
(a-e) 初期と各時間の判別スコアの散布図、(f) 平均判別スコアの時間経過 (エラーバーは標準偏差)。

[Haruki *et al.* *Biomolecules* **12**, 1730 (2022) より引用]

図 1 はマウス T 細胞の活性化過程の様子を示す。時間が経つにつれ、ナイーブ状態（青色）と活性化状態（赤色）が縦方向に徐々に分かれ、最終的にほぼ完全に分類できることが確認できた。この分類の度合いを数値化した平均判別スコアも初期から徐々に増加し、T 細胞活性化のバイオマーカーとなっていることが分かる。しかし、刺激開始後 6 時間や 12 時間において状態遷移を示すような兆候は現れていない。

次に、全範囲ラマンシフトに対して DNB 解析を試みた。対象はラマンシフト 500 から 1799 cm^{-1} まで 1 cm^{-1} 刻みの 1300 種類である。

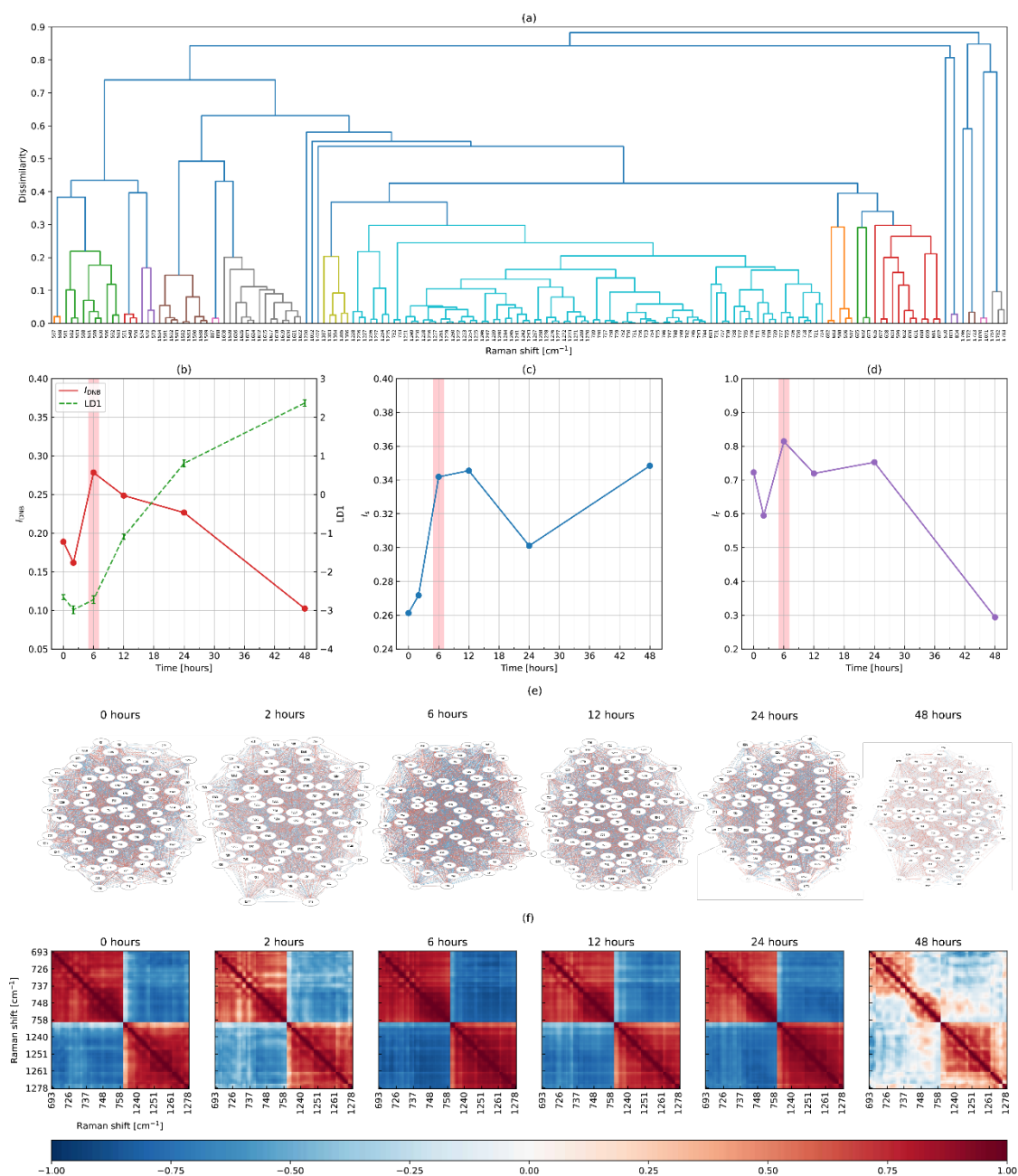


図 2: 全範囲ラマンシフトを用いた DNB 解析の結果。(a) 刺激開始後 6 時間で同期的に揺らぐラマンシフトの階層型クラスタリングにより得られた樹形図。(b) DNB スコア (平均判別スコア (緑色破線) は図 1(f) を再プロット)、(c) 平均標準偏差、(d) 平均相関強度、(e) 相関ネットワーク構造、(f) 相関係数のカラー図。

[Haruki *et al.* Biomolecules 12, 1730 (2022) より引用]

図 2 は全範囲ラマンシフトを用いた DNB 解析の結果である。統計学における等分散検定 (F 検定) や多重検定補正、階層型クラスタリングを用いて、刺激開始後 6 時間において、同期的に揺らぐラマンシフト群を抽出した(図 2(a)の水色部分)。状態遷移の予兆を表す DNB スコアを計算したところ、刺激開始後 6 時間でピークを示した (図 2(b)の赤色実線)。先の T 細胞活性化のバイオマーカー (緑色破線) と比較したところ、DNB スコアの時間的な変化はこのバイオマーカーとは明らかに異なっていた。図 2(e)の相関ネットワーク構造、および図 2(f)の相関係数の時間経過のグラフからも、相関の強さ (赤色または青色の濃さ) は刺激開始後 6 時間が一番強く、完全に活性化した 48 時間では極端に弱い (色が薄い) ことが分かる。よって、刺激開始後 6 時間が T 細胞活性化の状態遷移の直前の状態であることが明らかになった。

さらに、DNB 理論をより厳密に取り扱ったピークフィルタリングラマンシフトを用いた DNB 解析も行った。その結果、735、751、755、1254 cm^{-1} が DNB ラマンシフトして同定された (この 4 種類は先の全範囲ラマンシフトの解析結果にも含まれている)。生物学的な考察を行うために物質の構造・組成への帰属を調べた結果、ラマンシフト 735 cm^{-1} はタンパク質由来の C-S 結合、751 cm^{-1} と 755 cm^{-1} はトリプトファン、1254 cm^{-1} は脂質や Amide III に起因することが分かった。

以上より、ラマン散乱スペクトルに対する DNB 理論の新たな適用例を示すことができた。生きた細胞や組織における状態遷移の予兆を非破壊・低侵襲で検出可能なことを初めて明らかにした。

■ 今後の展開

本研究は、従来の遺伝子解析技術への応用展開、そして新たな計測技術基盤の創生につながる。また、表現型が現れる前の超早期の段階で T 細胞の状態遷移の予兆を捉えたことは、生物学的にも重要であると考えられる。今後は、この状態遷移の意義を解明することで、免疫学的な新たな知見が創出されることが期待される。さらに我々は、このラマン顕微鏡と DNB 理論の融合技術を用いて、臨床検体のラマン散乱スペクトルから未病状態の検出を目指す予定である。

【用語解説】

・ T 細胞 :

細胞性免疫をつかさどる細胞。骨髄に存在する造血幹細胞に由来し、胸腺内 (一部は胸腺外) で分化・成熟するリンパ球の一種である。活性化されることで種々の機能を有する T 細胞に分化していく。

・ 動的ネットワークバイオマーカー理論 :

状態が遷移する直前の状態を数理的に定義するため、対象とする現象を多くの要素 (変数) から成る複雑系ネットワークと仮定し、要素の揺らぎ、変数間の強い相関からサブグループ

を抽出する技術である。指標となる DNB スコアがピークを示した場合、その時間が状態遷移の直前の状態、サブグループ内の要素群が DNB として同定される。合原一幸東京大学特別教授らにより考案された。

・ラマン散乱スペクトル：

物質に光を照射し、光と物質が相互作用すると、入射光とは異なる波長をもつラマン散乱光が得られる。この波長差(ラマンシフト)が物質内の分子振動エネルギーに対応するため、帰属を通して物質内の様々な情報が分かる。ラマンシフトに対して、そのラマン散乱光の強度をプロットしたものがラマン散乱スペクトルである。非破壊・低侵襲検査の特徴から、生命科学への応用が進んでいる。

【論文詳細】

論文名：

Application of the Dynamical Network Biomarker Theory to Raman Spectra

著者：

Takayuki Haruki, Shota Yonezawa, Keiichi Koizumi, Yasuhiko Yoshida, Tomonobu M. Watanabe, Hideaki Fujita, Yusuke Oshima, Makito Oku, Akinori Taketani, Moe Yamazaki, Taro Ichimura, Makoto Kadowaki, Isao Kitajima, and Shigeru Saito

掲載誌：

Biomolecules

<https://doi.org/10.3390/biom12121730>

【本発表資料のお問い合わせ先】

富山大学 学術研究部 都市デザイン学系 准教授 春木 孝之

TEL : 076-445-6794(直通) Email : haruki@sus.u-toyama.ac.jp

富山大学 学術研究部 薬学・和漢系 教授 小泉 桂一

TEL : 076-434-7633(直通) Email : kkoizumi@inm.u-toyama.ac.jp