

令和 6年 3月 4日

報道機関 各位

動的ネットワークバイオマーカー理論とエネルギー地形解析により
意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症が
多発性骨髄腫の進行過程における未病状態であることを数理的に確立

■ ポイント

- ・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で、初めてヒト臨床検体による未病検出が行われた。
- ・動的ネットワークバイオマーカー (DNB) 理論^{*1}により、多発性骨髄腫^{*2}の前がん段階として知られる「意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症 (MGUS)」が未病段階であることを数理的に明らかにした。
- ・エネルギー地形解析^{*3}により、正常および多発性骨髄腫の段階が MGUS 段階と比べて相対的に安定な傾向を持ち、DNB 解析結果を支持することを明らかにした。

■ 概要

多発性骨髄腫の未病状態を同定するため、富山大学未病研究センターの実験と数理チームが多発性骨髄腫の進行過程におけるヒト臨床検体より得られたラマン散乱スペクトルに対して DNB 解析とエネルギー地形解析を適用した。対象データは骨髄細胞のラマン散乱スペクトル^{*4}で、時系列順に正常、MGUS、多発性骨髄腫の3つの段階に分類される。DNB 解析の結果、多発性骨髄腫の前がん段階、すなわち悪性化した形質細胞が異常増殖する前の MGUS 段階において、状態遷移の予兆が見られることを数理的に明らかにした。また、エネルギー地形解析の結果、正常段階と多発性骨髄腫が相対的に安定な傾向があることが示された。これは MGUS 段階が状態遷移直前であるという DNB 解析の結果を支持した。ラマン顕微鏡と DNB 理論を融合させた未病検出系のヒト臨床検体への応用は、今後、未病治療の社会実装の1つになる可能性を秘めている。

■ 研究の背景

多発性骨髄腫 (Multiple Myeloma; MM) は血液がんの一種で、骨髄中の抗体産生に関わる形質細胞が悪性化し、モノクローナルな異常ガンマグロブリンである M タンパクを生み出しながら異常増殖する病気である。進行過程は3つの段階に分けられ、正常 (Normal; NL)、意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症 (Monoclonal gammopathy of undetermined significance; MGUS)、MM の順に進行すると考えられている。

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「動的ネットワークバイオマーカー (DNB) 理論」が考案された。この理論は、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。

一般に、健康な状態から疾病の状態に至る過程において、症状が急激に悪化し、重症化することがある。DNB 理論では、そのような急激な変化を多数の細胞や遺伝子から成る複雑ネットワークのダイナミクスの変化と解釈し、その遷移直前の状態（未病状態）を数理的に捉えることを目的とする。状態遷移直前の信号を検出するために、相互作用ネットワークを構成する遺伝子やタンパク質等の発現のゆらぎに着目する点が特徴である。これまでに様々な疾病において DNB 理論を用いた未病状態の同定が報告されてきた。しかし、これまで多くの未病研究では動物の犠牲を伴う破壊検査による計測が用いられており、社会実装が容易でないことが課題となっていた。

そこで、破壊検査を伴わない未病検出系を実現するため、我々は過去に非破壊・低侵襲検査が可能なラマン顕微鏡と DNB 理論を組み合わせた手法を提案し、マウス T 細胞の活性化過程におけるラマン散乱スペクトルデータの中から遷移直前の状態を同定することに成功した。本研究では、さらなる未病治療の実現へ向けて、多発性骨髄腫の進行過程におけるヒト臨床検体をラマン顕微鏡で測定し、その計測データに対して DNB 理論を適用した。

一方で、臨床検体は制御された実験系で得られたデータとは異なり、年齢や性別などの背景情報が様々であるため、疾病以外に由来するゆらぎが DNB 理論によって検出される可能性が考えられる。そこで本研究では、DNB 解析の結果を支持するため、エネルギー地形解析をラマン散乱スペクトルへ適用し、データの安定性を評価した。エネルギー地形解析とは、数個から十数個の変数の活性、非活性の出現頻度をもとにデータの安定性などを調べる手法である。

■ 研究の内容・成果

使用データは、正常 (NL) 段階の 25 人、MGUS 段階の 21 人、多発性骨髄腫 (MM) 段階の 24 人の計 70 人の骨髄細胞をラマン顕微鏡により計測した 2515 のラマン散乱スペクトルである。DNB 解析の対象は 600 から 1800 cm^{-1} までの 1 cm^{-1} 刻みの 1201 変数である。

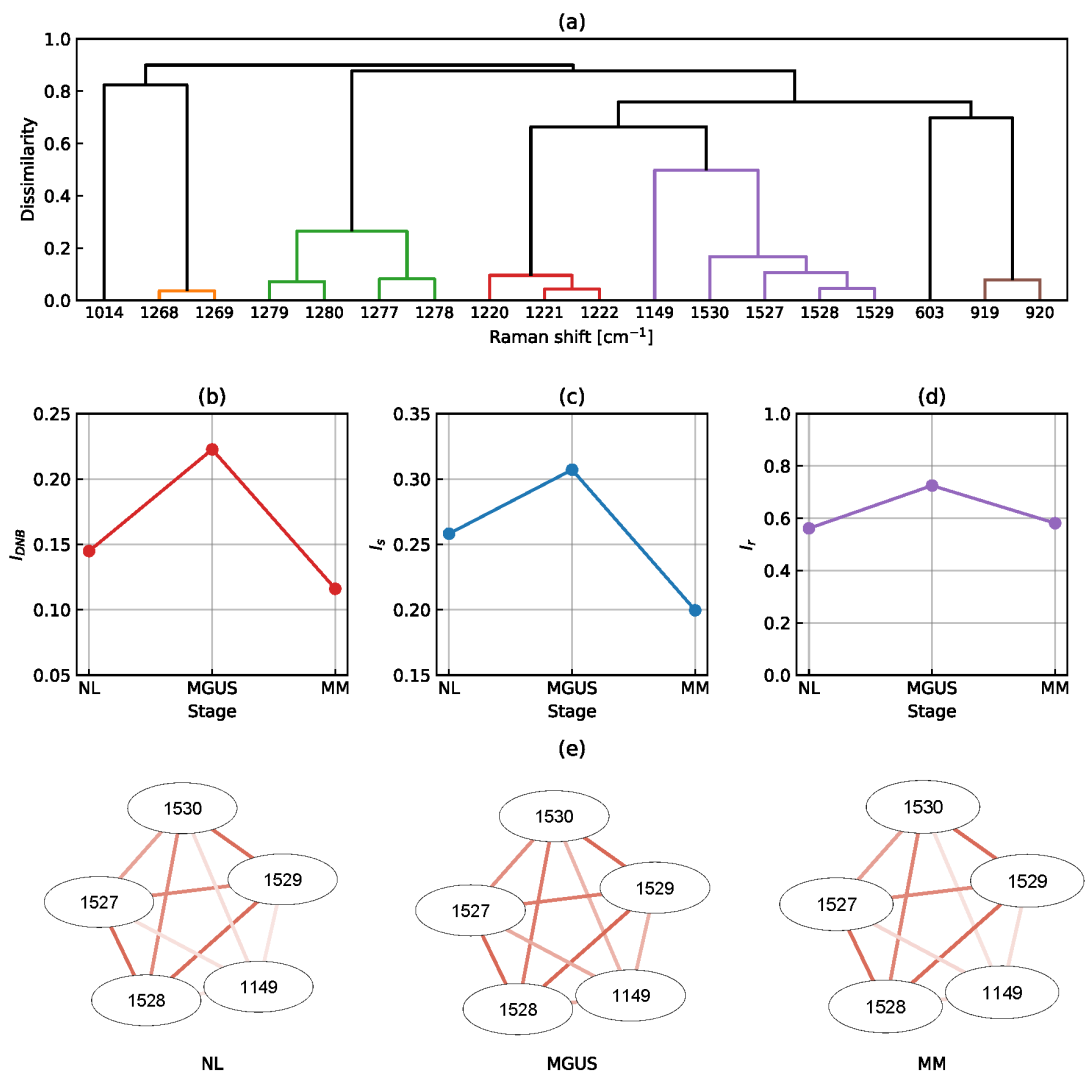


図 1： ラマンシフトを用いた DNB 解析の結果。

(a) MGUS 段階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、(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

[Yonezawa *et al.* Int. J. Mol. Sci. **25**, 1570 (2024) の Fig. 2 より引用]

図 1 はラマンシフトを用いた DNB 解析の結果である。等分散検定や多重検定補正、階層型クラスタリングを用いて、MGUS 段階で同期的に揺らぐ DNB ラマンシフト群 (1149、1527、1528、1529、1530 cm^{-1}) を抽出した (図 1 (a) の紫色部分)。状態遷移の予兆を表す DNB スコアを計算したところ、MGUS 段階でピークを示した (図 1 (b))。図 1 (e) の揺らぐラマンシフト間の相関の経時的変化から、特に 1149 cm^{-1} とその他のラマンシフト群との相関強度の変化が DNB スコアに寄与することが分かった。以上より、MGUS 段階が多発性骨髄腫における未病状態であること、および状態遷移に関わる DNB ラマンシフト群が明らかになった。

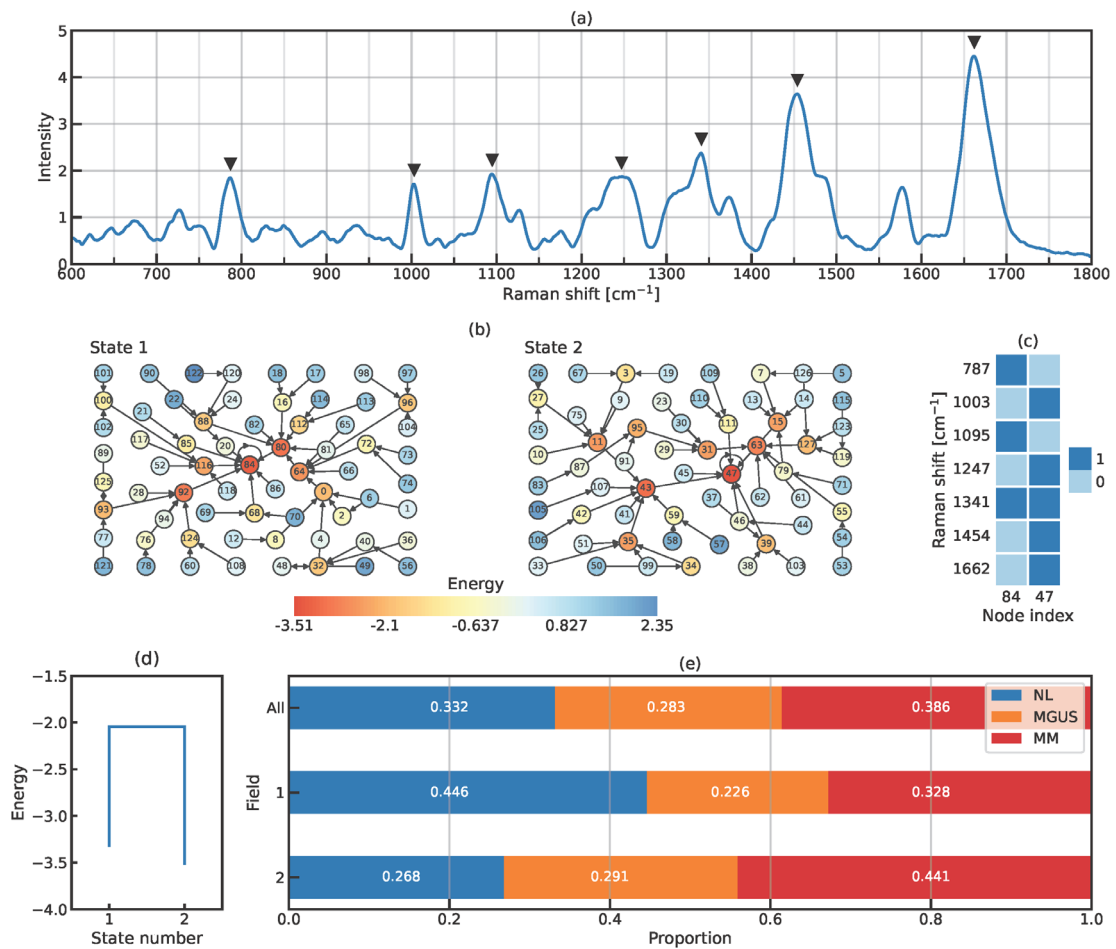


図2： ラマンシフトを用いたエネルギー地形解析の結果。

- (a) 全段階におけるラマンシフトの平均強度。
逆三角は解析に用いるラマン散乱スペクトルのピーク。
- (b) ベイスングラフ、(c) 局所最小の活性パターン、(d) 非連結性グラフ
- (e) 各Fieldにおける正常、MGUS、多発性骨髄腫のデータの比率。

[Yonezawa *et al.* Int. J. Mol. Sci. **25**, 1570 (2024) の Fig. 4 より引用]

図2はラマンシフトを用いたエネルギー地形解析の結果である。ラマン散乱スペクトルから選択された強度の高い7つのピークに対して、各ピークの平均値を基準とする大小を活性、非活性に対応させてエネルギー地形解析を適用した。図2 (b) のベイスングラフより2つの安定状態 (State 1, State 2) が得られた。各安定状態で局所最小となる活性パターンは1010100と0101111である (図1 (c))。これは、1が活性、0が非活性に対応しており、787、1095、1341 cm^{-1} が平均より高い強度を持つ活性パターンが多く出現していたことを示す。図2 (d) の非連結性グラフは、異なる状態へ遷移するために必要な最小のエネルギー障壁を示す。我々は、このエネルギー障壁より小さな値を持つ活性パターンの集合を

Fieldと独自に定義し、安定状態と多発性骨髄腫の進行過程における各段階の関係を詳しく解析した。図2(e)は各Fieldにおける正常段階、MGUS、多発性骨髄腫のデータの比率を示す。すべての活性パターンについて出現頻度を集計するとほとんど偏りが無いが、Field 1は正常段階に、Field 2は多発性骨髄腫に偏って出現した。このことから正常段階と多発性骨髄腫は異なる2つの安定状態である傾向が見られた。

■ 今後の展開

非破壊検査とヒト臨床検体を用いた未病の同定は、未病医療のために不可欠な要素である。本研究では、ラマン顕微鏡により得られたヒト臨床検体のデータとDNB理論から多発性骨髄腫の未病状態の同定を行った。この成果は、未病医療の社会実装の1つのプロトタイプであり、今後の未病研究の新たな潮流になりうる。また、多発性骨髄腫の悪性化前の超早期の段階で状態遷移の予兆を捉えたことも重要である。今後、得られたDNBラマンシフト群と悪性化の関係を生物学的に調査することで、多発性骨髄腫の治療のための新たな知見が生み出されることが期待される。

【用語解説】

※1 動的ネットワークバイオマーカー理論 (DNB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。

※2 多発性骨髄腫 (Multiple myeloma, MM)

血液がんの一種で、骨髄中の抗体産生に関わる形質細胞が悪性化し、モノクローナルな異常ガンマグロブリンであるMタンパクを生み出しながら異常増殖する病気。進行過程は骨髄中の形質細胞の比率などの指標から3つの段階に分けられ、時系列順に正常(Normal; NL)、意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症(Monoclonal gammopathy of undetermined significance; MGUS)、MMの順に進行すると考えられている。MGUSは無症状のため治療対象ではないが、MGUS患者のうち毎年約1%が多発性骨髄腫へ移行する。

※3 エネルギー地形解析

数個から十数個の変数の活性、非活性をもとにデータの安定性を定量的に調べることが出来る手法。ある活性、非活性の組(活性パターン)から安定状態への経路や異

なる安定状態に移行するために必要なエネルギーを示すことができる。

※4 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：

Establishing Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance as an Independent Pre-Disease State of Multiple Myeloma Using Raman Spectroscopy, Dynamical Network Biomarker Theory, and Energy Landscape Analysis

著者：

Shota Yonezawa, Takayuki Haruki, Keiichi Koizumi, Akinori Taketani, Yusuke Oshima, Makito Oku, Akinori Wada, Tsutomu Sato, Naoki Masuda, Jun Tahara, Noritaka Fujisawa, Shota Koshiyama, Makoto Kadowaki, Isao Kitajima and Shigeru Saito

掲載誌：

International Journal of Molecular Sciences

DOI：

<https://doi.org/10.3390/ijms25031570>

【本発表資料のお問い合わせ先】

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

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