

【総説】

データ駆動型アプローチによる未病の解明

春木 孝之^{1,2}、小泉 桂一^{1,3}、米澤 翔汰¹、奥 牧人^{1,3}、大嶋 佑介^{1,4}、林 周作^{1,3}、
渡邊 朋信^{5,6}、門脇 真¹、齋藤 滋^{1,7}

¹富山大学 未病研究センター

²富山大学 学術研究部 都市デザイン学系

³富山大学 学術研究部 薬学・和漢系

⁴富山大学 学術研究部 工学系

⁵理化学研究所 生命機能科学研究センター

⁶広島大学 原爆放射線医科学研究所

⁷富山大学 学術研究部 医学系

要約

動的ネットワークバイオマーカー理論は、健康から疾病状態へ変化する間にある未病、すなわち遷移状態で生じる早期警戒信号を検出することができる。この分岐理論を基礎にしたデータ駆動型アプローチにより、様々な疾患で多くの成果を上げている。遺伝子発現量に着目した自然発症メタボリックシンドロームマウスの実験では、この理論により肥満になる直前で未病状態が発見され、さらに和漢薬である防風通聖散が未病の状態を抑えることも報告された。また、非染色かつ非・低侵襲で取得可能なラマンスペクトルから、マウス T 細胞活性化過程の遷移状態も細胞レベルで明らかにされた。未病の解明には理論、実験、データ駆動型研究の融合は必要不可欠であり、本稿ではその研究成果の一端を紹介する。

キーワード：dynamical network biomarkers(DNB) theory, metabolic syndrome, pre-disease state, Raman spectra, T cell activation

1. はじめに

病気になる直前を表す「未病」という言葉が登場する中国最古の医学書「黄帝内経(こうていだいけい)」には、「聖人不治已病治未病」という記述がある。これは「名医は既にかかった病気を治すのではなく、未病を治す」という意味である。この時代には科学が十分に発展していなかったため、医者が自身の経験から未病を捉えていたと考えられる。一方、日本でも平成25(2013)年以降、閣議決定された「健康・医療戦略」に未病が登場し、「健康か病気かという二分論ではなく健康と病気を連続的に捉える『未病』の考え方などが重要になると予想される」と記載されている^[1]。また、国内の高齢化、要介護者の増

加により、いかに人が健康的に長生きできるかという「健康寿命」の延伸が重要になってきている社会背景もある。

さて、この未病は人の健康状態が病気(疾病状態)へと変化する間にあるが、「未病のタイミングはいつなのか?」、「未病を引き起こす要因は何か?」、「未病の要因に介入することで、病気の発症や重症化を防ぐことができるのか?」等、未病に対する興味、関心、疑問は様々である。古来、経験知であった未病を最新の理論、データ駆動型研究により科学知に変換し、未病を解明することが重要である。

2. バイオマーカー

バイオマーカーの例として、よく知られている「血圧」を考えてみる。血圧には最高血圧および最低血圧の二種類があるが、ここでは話を簡単にするため最高血圧のみに限る。診察室における測定において、最高血圧が140 mmHg 以上の状態が繰り返し測定されれば、高血圧と診断される。閾値である140mmHg という値を境に高血

連絡先：春木 孝之

〒 930-8555 富山県富山市五福 3190

電話：03-5454-4327

E-mail：haruki@sus.u-toyama.ac.jp

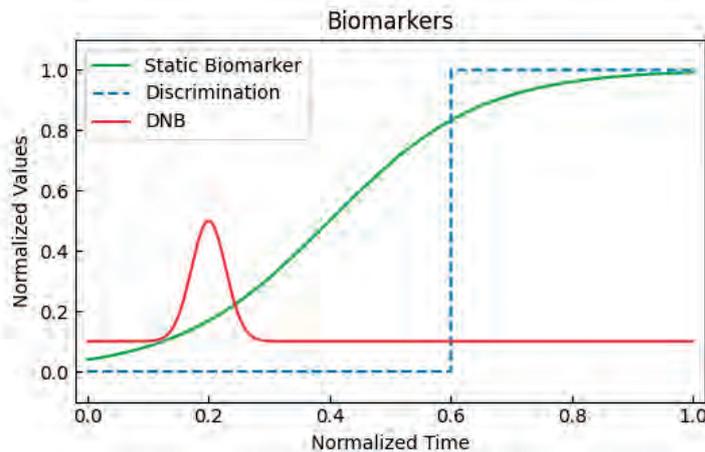


図1 バイオマーカーの概要

圧が診断されるため、血圧そのものが高血圧のバイオマーカーとなっている。また、多くの学術論文で対照群と実験群の比較がされる場合、平均値の差が有意であれば薬等の介入の効果があるとされる。先の閾値に加えて、平均値の差に着目することが一般的である。

図1はバイオマーカーの概要である。緑色実線は通常の静的なバイオマーカー、青色破線は静的なバイオマーカーによる判別結果、赤色実線は動的ネットワークワークバイオマーカー^[2-3](詳細については後述)を示す。横軸は時間(対象とする過程を全体時間で規格化)、縦軸も同様に規格化された対象とする物理量である。先の高血圧の例で示されたように、血圧は静的なバイオマーカー(緑色実線)、医者による診断結果は青色破線に対応する。診断はまさにゼロまたはイチを表すステップ関数であり、その背景には徐々に上昇する静的なバイオマーカーがあるイメージである。これを一般的な病気に置き換えれば、時間0.0において健康であった状態が、時間が経つにつれて悪化して時間1.0で完全に病気となる(縦軸の値が0.0を健康、1.0を病気と仮定)。時間0.6において、医者が病気と診断すれば、青色破線のようになる。

一方、動的ネットワークバイオマーカー(赤色実線)は、健康から病気へ遷移する間の遷移状態で生じる早期警戒信号を検出することによりピークを示す(図1中の0.2付近)。このバイオマーカーは平均値ではなく、揺らぎやネットワークに着目する点が大きな特徴である。未病のタイミングやその要因が明らかになれば、生活習慣の改善、医療介入ができ、発症や重症化の前に対策を講じることが可能となる。様々な疾患に対して、まずはこの動的ネットワークバイオマーカーが何かを探索することから始める。

3. 動的ネットワークバイオマーカー理論

2012年にAiharaらにより考案された動的ネットワークバイオマーカー(Dynamical Network Biomarkers; DNB)理論は、複雑ネットワークを構成する要素(変数)の揺らぎの大きさ、および要素間の相関の強さから特徴的な集団を抽出することにより、生体内・生物学におけ

る未病状態、すなわち状態遷移の直前(遷移状態)で生じる予兆(早期警戒信号)を検出することができる^[2-3]。本稿では、このDNB理論を生体データに適用して解析することを単にDNB解析と呼ぶ。

このDNB理論が考案される前から、生態系において状態が別の状態に遷移する際、早期警戒信号が検出されることが既に知られていた^[4-5]。Schefferらによる2001年のレビュー論文^[4]によると、湖、サンゴ礁、森林、砂漠、海洋等、対象は多岐にわたる。また、2009年の同様の論文^[5]に紹介されているバイオマス(生物資源)の例が分かりやすい。これは横軸に時間と共に増加する収穫割合、縦軸に残留バイオマスを物理量とする時系列データである。時間が経つにつれ、この物理量は徐々に減っていくが、最後に劇的に減少して状態遷移が起こる。状態が別の状態に遷移したことを意味する。さらに重要なことは、この状態遷移が起こる前のある時点から、この物理量の標準偏差、および自己相関が徐々に増加していることである。これには数学的分岐理論が大きく関係している。時系列データの場合、自己回帰モデル近似に基づく簡単な導出により、状態遷移付近で自己相関が1に近づき、分散(標準偏差の二乗)が無限大になることが知られている。すなわち、標準偏差と自己相関の値をモニタリングしていれば、状態遷移の予兆を検出できるという原理である。

このアイデアを生体の複雑システムに応用したのがDNB理論と言える。多次元に拡張された状態空間の各変数がノードとして複雑ネットワークを構成していると仮定する。図2は系の状態遷移の様子を示し、ボールを状態と考える。安定状態1の場合、外部から力が加えられても、ポテンシャルの勾配があるため、ボールは底付近で安定を維持する(図2(a))。その後、図2(b)のように、条件が変わってポテンシャルの底が平らに近づいてくると、ボールは左右に動きやすくなり(灰色矢印)、より低いポテンシャルに転がろうとして別の状態(図2(c)参照)に落ち着くことになる。この灰色矢印がDNB理論における「揺らぎ」に相当する。図2は簡略化された1次元グラフであるが、実際には多次元のため非常に複雑である。なお、日本語の文献^[6-7]も大変参考になる。

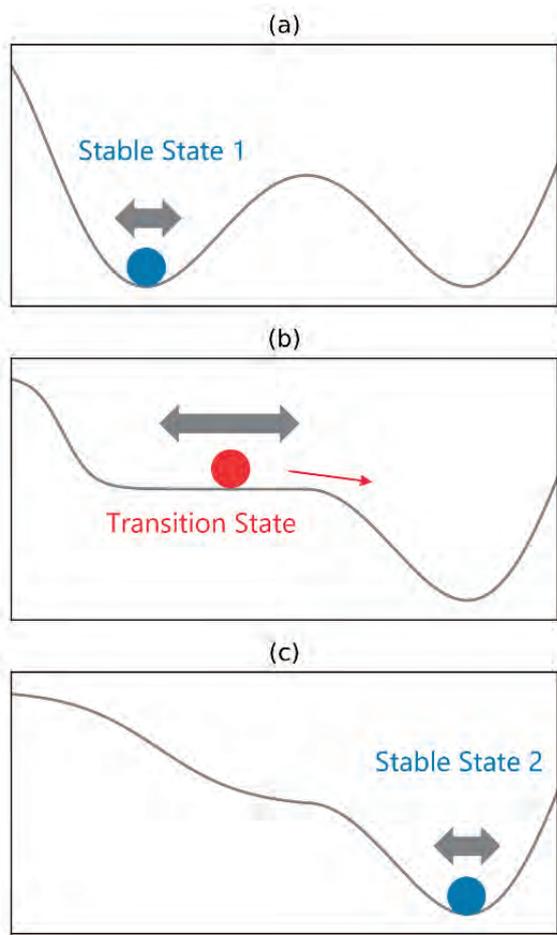


図2 様々な条件下におけるエネルギーポテンシャル
(a) 安定状態1、(b) 遷移状態、(c) 安定状態2

具体的に DNB 解析の手順の例を次に示す。

1. 前処理
2. 揺らぎの評価のための等分散検定 (F-test)
3. 揺らぐ変数同士の関係の評価するための相関係数の計算
4. DNB 候補を抽出するための階層型クラスタリング
5. 遷移状態および DNB 要素群を同定するための DNB スコアの計算

各時点のデータを $X = \{x_{ik}\}$ と表す。添え字 i は変数で $1, 2, \dots, N$ (N は変数の全体数)、添え字 k はサンプルで $1, 2, \dots, K$ (K はサンプルの全体数) を示す。遺伝子の場合、変数の全体数 N は数万、また、ラマンシフトの場合、数千のオーダーである (詳細は後述)。組織、細胞の数や機器による測定回数により、サンプル全体数 K も決定される。

変数の各インデックスの平均 (mean) $m_i(X)$ 、および標準偏差 (standard deviation) $s_i(X)$ は

$$m_i(X) = \frac{\sum_{k=1}^K x_{ik}}{K}$$

$$s_i(X) = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^K (x_{ik} - m_i(X))^2}{K-1}}$$

として定義される。大きく揺らぐ変数を選択するために、片側の等分散検定 (one-tailed F-test) が用いられる。「2 群間の分散が等しい」という帰無仮説を立て、検定を行う。統計検定量 F 値から対応する p 値を求め、仮説が棄却される水準 (有意水準) を慣例的に 0.05 とし、対立仮説を支持する領域であれば「2 群間の分散が等しくない」、つまり揺らぎが大きいと判断する。一般的に、データは離散的に指定された各時点で得られるため、例えば、初期データを対照群、初期以外の時間が経過した時点のデータを実験群とする。変数が多いと多重検定になるため、Benjamini-Hochberg 法により、 p 値を q 値に変換する多重検定補正を行っておく。

続いて、大きく揺らぐ変数を対象に変数同士の関係性を評価するため、これらの相関係数 (correlation coefficient) を計算する。相関係数 r は広く知られている次の式である。

$$r_{ij}(X) = \frac{\sum_{k=1}^K (x_{ik} - m_i(X))(x_{jk} - m_j(X))}{(K-1)s_i(X)s_j(X)}$$

ただし、添え字 j は i とは異なる変数のインデックスである。相関係数の範囲は $-1 \leq r \leq +1$ であるため、単に相関強度に着目する場合には絶対値をとる。変数同士の関係が相関強度で定義できるので、非類似度 (dissimilarity) を $d = 1 - |r|$ とすれば階層型クラスタリングが可能となる。カットオフを決めることで、個々の揺らぎが大きく、かつ互いの相関強度の高い要素 (変数) 群 (= 同調的な揺らぎ) からなるクラスターを抽出することができ、この集団が DNB 候補となる。経験的に、最も要素数の多い 1 番大きなクラスターに着目するが、このクラスターの要素数の半分以上より多い場合、2 番目以降であっても DNB 候補とする。

最後に、DNB 候補の要素群の元データに戻り、各時点における DNB スコアを求める。DNB スコアは、DNB 候補の要素群から求められる平均標準偏差と平均相関強度の積として定義される。状態遷移が近づく平均標準偏差と平均相関強度が急激に上昇するため、DNB スコアのピークを探せば良い。DNB 候補を抽出した時点で DNB スコアがピークになれば遷移状態 (未病) であり、その要素群が DNB 要素として同定される。

4. 遺伝子発現量と DNB 解析

DNB 理論はこれまで遺伝子発現量に着目し、肺損傷^[2, 8-10]、肝臓がん^[2, 10]、乳がん^[9, 10]、インフルエンザ感染症^[9]、糖尿病^[11, 12]、メタボリックシンドローム^[13, 14]、肝細胞がん^[8, 15]に適用された実績がある。この中から、自然発症メタボリックシンドロームマウス (TSOD マウス) を用いた実証研究を紹介する。TSOD マウスは 3 から 7 ヶ月齢にかけて高脂血症や糖尿病、さらに脂肪性肝炎の病態を順次発症するヒトのメタボリックシンドロームの進展と類似している病態モデルマウスである。上記病態を呈していない超早期の状態 (3 から 7 週齢) の各週齢において TSOD マウスの脂肪組織が摘出され、マイクロアレイ法により網羅的に遺伝子発現量データが取得された。

その後、DNB解析により、同調して揺らぐ遺伝子のDNBスコアがピークとなる週齢を探索した。その結果、4から5週齢目にかけて、このDNBスコアが急激に増加し、6週齢目で急激に減少していることが明らかとなった。よって、TSODマウスの5週齢目の時点がDNB理論で定義される未病であることが実証された^[13]。さらに、肥満に効果があるとされる防風通聖散を用いた実証実験も行われた^[14]。防風通聖散を服用したTSODマウスのDNBスコアのピークが見事に抑えられたことが報告された。これは未病の解明に向けた大きな成果である。

同様に、炎症性腸疾患発症モデルマウスにおいても現在、検討が行われている。マウスはデキストラン硫酸ナトリウム (Dextran Sulfate Sodium Salt; DSS) を7日間にわたり自由飲水することで、出血を伴った下痢を発症する^[25]。DSS飲水開始後0、1、3、5および7日目においてマウスから腸管を摘出し、マイクロアレイ法により取得された全遺伝子の発現量に対してDNB解析が行われた。その結果、発症より早期のDSS飲水開始後3日目に未病が検出された (論文投稿準備中)。このように、DNB理論における未病の定義が、実際の疾病動物モデル (自然発症メタボリックシンドロームおよび大腸炎) にも適用できることが明らかとなった。しかしながら、現状では臓器を摘出する必要があり、実際の臨床への応用は困難である。

5. ラマンスペクトルと DNB 解析

ラマン分光法は、赤外分光法と同様に振動分光法のカテゴリーに属し、光と分子の相互作用を利用した化学分析手法である。計測技術の進歩により、近年では生体計測への応用が進んでおり、例えば、細胞死^[16]、細胞分化^[17, 18]、免疫細胞の活性化^[19, 20]、動物やヒト組織における疾患状態^[21-23]等の検出で成果が上げられている。この最大の特徴は、非染色かつ非・低侵襲的に試料中の分子構造や組成を解析できる点である。この非染色かつ非・低侵襲という点は今後の臨床応用を見越せるという意味で大変重要である。物質に照射された光 (入射光) が、物質内の分子と衝突する際、入射光とは異なる波長をもつ非常に弱い強度の散乱光が観測され、試料中の分子構造や組成を知る手掛かりとなる。この原理は、発見したインドの研究者チャンドラセカール・ラマン (Chandrasekhara Venkata Raman) から「ラマン効果」と名付けられている。入射光とは異なる (ずれた) 波長

はその波長差からラマンシフトと呼ばれ、ラマンシフトに対応した散乱光の強度のプロットがラマンスペクトルである。先に述べた遺伝子発現量データの取得には生体組織の採取を伴うため、臨床への応用に向けては大きな障害となる。そこで、非染色かつ非・低侵襲測定が可能なラマン分光法はこの課題を解決し、疾患の超早期診断や予後予測を実現する方法のひとつとなりうる^[24]。

最近、マウス T 細胞がナイーブ状態から活性化状態に遷移する過程のラマンスペクトルが取得され、多変量解析等を用いてナイーブ状態と活性化状態を分類できることが報告された^[19]。データは、活性化刺激開始後0、2、6、12、24、48時間におけるラマンシフト (500 から 1799 cm^{-1} までの範囲) に対するラマンスペクトル強度であり、各時点の測定回数は数十から数百である。ラマンスペクトルに対して DNB 理論が適用可能かどうかを検証するため、このマウス T 細胞活性化過程をモデルデータとして、DNB 解析が試みられた^[26]。このマウス T 細胞活性化過程の DNB 解析を詳しく説明する。

DNB 解析に限らず、一般的な解析であっても前処理が必要となり、生データのラマンスペクトルをベースライン補正しなければならない。いくつか提案されている手法のうち、楕円型ボールがラマンスペクトルの下側を転がるように強度を補正するローリングボール法が用いられた。この手法には任意に指定できる二種類のパラメーターである長径、楕円率があり、18 パターンの条件で前処理 (DNB 解析の手順1) を行った。ここでは長径 1000、楕円率 0.05 の条件の結果を紹介する。DNB 解析を実施する前に、本ラマンスペクトルを単純に可視化することにより、その特徴を確認する。

図3はマウス T 細胞活性化過程の平均ラマンスペクトルである。各時点のスペクトルが異なった色で表されており、ローリングボール法で前処理されたデータである。横軸はラマンシフト、縦軸はスペクトル強度である。ラマンシフトは 500 から 1799 cm^{-1} までの 1 cm^{-1} 刻みの範囲で約 1300 次元となるため、一般的には多変量解析が用いられる。また、多くのラマンシフトは既知の分子振動モードに帰属する。例えば、1004 cm^{-1} にあるピークはフェニルアラニンの呼吸振動に相当することが知られている。

まず、ラマンシフトを固定して (図3中の逆三角マーク)、その強度の時間変化を追跡した。フェニルアラニンに加えて、チトクロムCの751 cm^{-1} および 1126 cm^{-1} 、

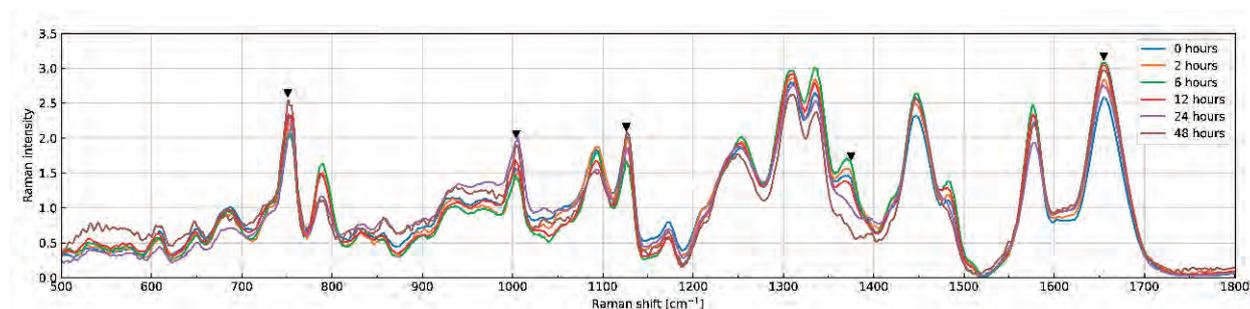


図3 マウス T 細胞活性化過程の平均ラマンスペクトル (文献^[26]の Fig. 2(b)を引用)

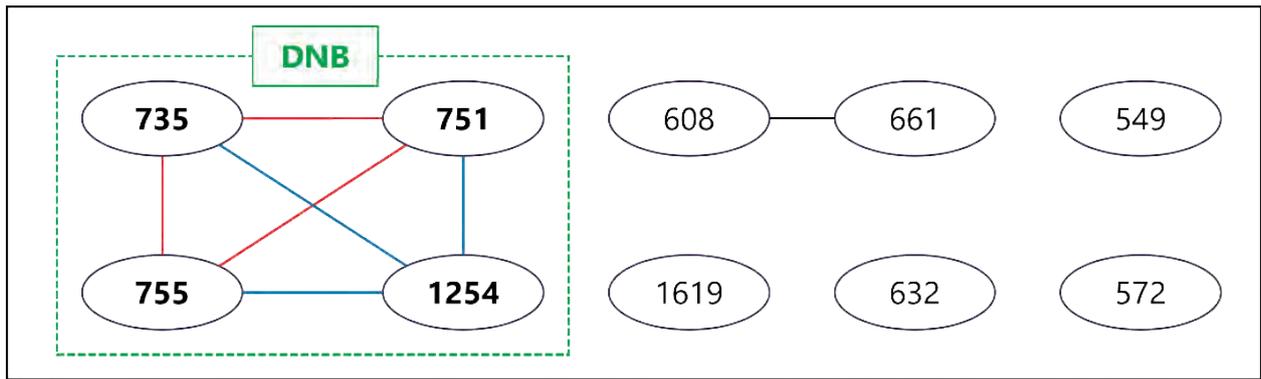


図4 揺らぐラマンシフトのネットワーク (文献^[26]の Fig. 5(a)元に作成)。

DNA に関する 1374cm^{-1} 、または糖、タンパク質に関する 1655cm^{-1} の時間変化を確認した。特に共通する変化は見られず、未病に至ってはその兆候すら見られなかった。

図3で明らかのように、ラマンスペクトルの特性からピークは1種類のラマンシフトに対応するのではなく、その周辺のシフトに幅をもって分布している。これはピークの情報が周辺のシフトに畳み込まれていることを意味し、変数をそのまま独立として取り扱うことは難しい。そこで、この課題を回避するため、ピークのみを自動検出することで81種類の代表的なラマンシフトを選択し(ピークフィルタリング)、DNB解析の対象とした。

これら81種類の代表的なラマンシフトに対してDNB解析を行い、等分散検定から活性化刺激開始後6時間において10種類の揺らぐラマンシフトが得られた(手順2)。続いて、揺らぐラマンシフト同士の相関係数(手順3)を求めて非類似度を計算し、階層型クラスタリングを行った(手順4)。カットオフを0.3としてクラスターを抽出した。

図4はピークフィルタリングの場合の揺らぐラマンシフトのネットワークである(Harukiらの論文^[26]の Fig. 5(a)の樹形図を参考に作成した)。揺らぐラマンシフト10種類のノード、相関強度の高いもの同士はエッジで結ばれている。この場合、1番大きなクラスターは緑色破線で囲まれた4種類のラマンシフトであり、その内訳は $735, 751, 755, 1254\text{cm}^{-1}$ であった。2番目に大きなクラスター(ラマンシフトが608と661)も存在するが、経験的に着目するのは1番大きなクラスターの要素数の半分より多い場合に限るため、本解析では対象外とされた。1番大きなクラスター内の相関について赤色は正、青色は負の相関を意味する。この時点で1番大きなクラスターはDNB候補に過ぎず、次に示すDNBスコアを評価しなければならない(手順5)。

図5は線形判別分析の判定スコアとDNBスコアの時間変化を示す^[26]。Ichimuraらによる先行研究^[19]において、ナイーブ状態と活性化状態を分類する線形判別分析の判定スコア(LD1)が活性化のバイオマーカーCD69の発現と良い相関を示すことが示された。つまり、この判定スコアも活性化のバイオマーカーと言える。Haruki

らの研究^[26]においても同様に、線形判別分析が行われ、判定スコアが(CD69の発現ではなく)細胞面積の時間変化と良い相関を示したことから、細胞面積も活性化のバイオマーカーであることが分かった。この活性化のバイオマーカー(線形判別分析の判定スコア:LD1)が初期の-3.0(ナイーブ状態)から、24時間を超えて2.0(活性化状態)に近づいていくのに対し、DNBスコアは活性化刺激開始後6時間でピークを示す。よって、T細胞が完全に活性化する活性化刺激開始後48時間に対して、活性化刺激開始後6時間が遷移状態であることが明らかとなった。

マウスT細胞活性化過程のラマンスペクトルのDNB解析結果について、前処理に大きく依存していることに注意が必要である。他のローリングボール法による前処理のパターンでも活性化の遷移状態が活性化刺激開始後6時間でほぼ共通しているが、DNBラマンシフトの内訳が前処理によって異なっている。よって、ラマンシフトが帰属する物質を議論したいところであるが、現時点では時期尚早であり、今後、検討が必要である。

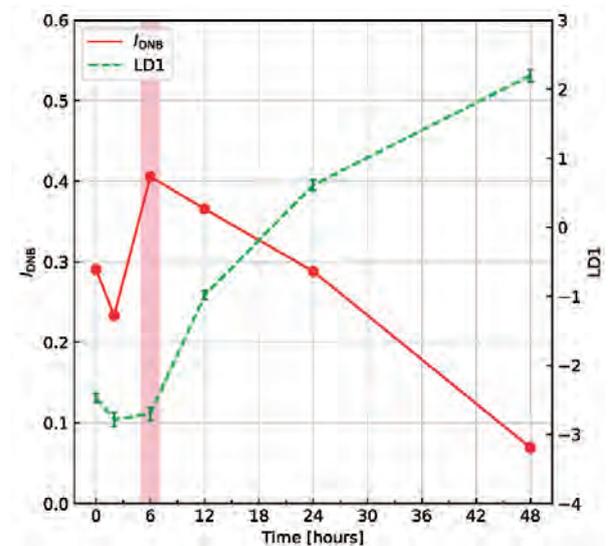


図5 線形判別分析の判定スコアとDNBスコアの時間変化(文献^[26]の図5(b)を引用)。

6. おわりに

これまで経験知として知られていた未病を科学的に解明し、科学知にすることは非常に重要である。DNB理論の登場は、興味対象とする物理量の平均の差が有意であるかどうかの従来の視点に一石を投じ、同調的に揺らぐネットワークという新たな可能性を見出した。自然発症メタボリックシンドロームマウスの遺伝子発現量データに対して行われた DNB 理論の適用は大きな成果であり、防風通聖散の効果も明らかにされた点は特筆すべきことである。また、ラマンスペクトルに対しても DNB 理論の適用が試され、未病に限らず、細胞レベルでマウス T 細胞活性化の遷移状態を検出できたことも非常に重要である。これまで遺伝子と DNB 理論の組み合わせの研究が多くの実績を積み重ねてきたが、現在は DNB 理論とラマン分光法の融合という新たなフェーズを迎えている。現在のところ、まだ課題が残されているが、臨床に向け少しずつ未病検出系の確立へと向かっている。

超高齢化社会を迎える日本において、老化に関する未病の検出は特に重要である。非・低侵襲的に糖尿病の未病検出が可能となれば、糖尿病発症を予防し、または延期させることが期待される。フレイルについても未病が明らかになれば、運動療法等により健康寿命を延伸できる可能性がある。今後も理論、実験、データ駆動型研究の積極的な連携は欠かせず、様々で異なるバックグラウンドをもつ研究者が集まることで未病の解明が進むことが期待される。

引用文献

1. 健康・医療戦略推進本部「健康・医療戦略」(平成 26 年 7 月 22 日 閣議決定、平成 29 年 2 月 17 日 一部変更)
<https://www.kantei.go.jp/jp/singi/kenkouiryousuisin/ketteisiryousu/kakugi/170217senryaku.pdf>
2. Chen L, Liu R, Liu ZP, *et al.* Detecting early-warning signals for sudden deterioration of complex diseases by dynamical network biomarkers. *Sci. Rep.* 2:342, 2012.
3. Aihara K, Liu R, Koizumi K, *et al.* Dynamical network biomarkers: Theory and applications. *Gene* 808:145997, 2022.
4. Scheffer M, Carpenter S, Foley JA, *et al.* Catastrophic shifts in ecosystems. *Nature* 413:591-596, 2001.
5. Scheffer M, Bascompte J, Brock WA, *et al.* Early-warning signals for critical transitions. *Nature* 461:53-59, 2009.
6. 合原 一幸、平田 祥人、奥 牧人 複雑生命系とビッグデータ解析. *実験医学* 34(5):84-88, 2016.
7. 奥 牧人, 山下 洋史, 岡本 有司ら DNB 理論とその応用. *生体の科学* 74(2):96-101, 2023.
8. Liu R, Li M, Liu ZP, *et al.* Identifying critical transitions and their leading biomolecular networks in complex diseases. *Sci. Rep.* 2:813, 2012.
9. Liu R, Yu X, Liu X, *et al.* Identifying critical transitions of complex diseases based on a single sample. *Bioinformatics* 30:1579-1586, 2014.
10. Chen P, Liu R, Li Y, *et al.* Detecting critical state before phase transition of complex biological systems by hidden Markov model. *Bioinformatics* 32:2143-2150, 2016.
11. Liu X, Liu R, Zhao XM, *et al.* Detecting early-warning signals of type 1 diabetes and its leading biomolecular networks by dynamical network biomarkers. *BMC Medical Genom.* 6:S8, 2013.
12. Li M, Zeng T, Liu R, *et al.* Detecting tissue-specific early warning signals for complex diseases based on dynamical network biomarkers: Study of type 2 diabetes by cross-tissue analysis. *Brief. Bioinformatics* 15:229-243, 2014.
13. Koizumi K, Oku M, Hayashi S, *et al.* Identifying pre-disease signals before metabolic syndrome in mice by dynamical network biomarkers. *Sci. Rep.* 9:8767, 2019.
14. Koizumi K, Oku M, Hayashi S, *et al.* Suppression of Dynamical Network Biomarker Signals at the Predisease State (Mibyuu) before Metabolic Syndrome in Mice by a Traditional Japanese Medicine (Kampo Formula) Bofutsushosan. *Evid. Based Complement Altern. Med.* 2020:9129134, 2020.
15. Yang B, Li M, Tang W, *et al.* Dynamic network biomarker indicates pulmonary metastasis at the tipping point of hepatocellular carcinoma. *Nat. Commun.* 9:678, 2018.
16. Okada M, Smith NI, Palonpon AF, *et al.* Label-free Raman observation of cytochrome c dynamics during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109:28-32, 2012.
17. Ichimura T, Chiu LD, Fujita K, *et al.* Visualizing Cell State Transition Using Raman Spectroscopy. *PLoS ONE* 9:e84478, 2014.
18. Ichimura T, Chiu LD, Fujita K, *et al.* Visualizing the appearance and disappearance of the attractor of differentiation using Raman spectral imaging. *Sci. Rep.* 5:11358, 2015.
19. Ichimura T, Chiu LD, Fujita K, *et al.* Non-label immune cell state prediction using Raman spectroscopy. *Sci. Rep.* 6:37562, 2016.
20. Chaudhary N, Nguyen TNQ, Cullen D, *et al.* Discrimination of immune cell activation using Raman micro-spectroscopy in an in-vitro & ex-vivo model. *Spectrochim. Acta Part A* 248:119118, 2021.
21. Taketani A, Andriana BB, Matsuyoshi H, *et al.* Raman endoscopy for monitoring the anticancer drug treatment of colorectal tumors in live mice.

- Analyst 142:3680–3688, 2017.
22. Ishimaru Y, Oshima Y, Imai Y, *et al.* Raman spectroscopic analysis to detect reduced bone quality after sciatic neurectomy in mice. *Molecules* 23:3081, 2018.
 23. Ogawa K, Oshima Y, Etoh T, *et al.* Label-free detection of human enteric nerve system using Raman spectroscopy: A pilot study for diagnosis of Hirschsprung disease. *J. Pediatr. Surg.* 56:1150–1156, 2021.
 24. Asaoka R, Kiyomatsu H, Miura H, *et al.* Prognostic potential and pathological validation of a diagnostic application using Raman spectroscopy in the characterization of degenerative changes in the cartilage of the humeral head. *J. Biomed. Opt.* 27: 115002, 2022.
 25. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, *et al.* A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98:694–702, 1990.
 26. Haruki T, Yonezawa S, Koizumi K, *et al.* Application of the Dynamical Network Biomarker Theory to Raman Spectra. *Biomolecules* 12:1730, 2022.

A data-driven approach to reveal pre-disease science

Takayuki Haruki^{1,2} / Keiichi Koizumi^{1,3} / Shota Yonezawa¹ / Makito Oku^{1,3} /
 Yusuke Oshima^{1,4} / Shusaku Hayashi^{1,3} / Tomonobu M. Watanabe^{5,6} /
 Makoto Kadowaki¹ / Shigeru Saito^{1,7}

¹ Research Center for Pre-Disease Science, University of Toyama

² Faculty of Sustainable Design, University of Toyama

³ Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama

⁴ Faculty of Engineering, University of Toyama

⁵ RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research

⁶ Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University

⁷ Faculty of Medicine, University of Toyama

Abstract

Dynamical network biomarkers theory detects the early warning signals of the pre-disease state, or transition state, from a healthy to a disease state. A data-driven approach based on bifurcation theory has achieved many results in various diseases. In an experiment on spontaneous metabolic syndrome mice focusing on gene expression levels, this theory detected a pre-disease state just before obesity, and a traditional Japanese medicine Bofutsushosan suppressed the pre-disease state. Also, the transition state in the mouse T-cell activation process was clarified at the cellular level using Raman spectra obtained in a non-labeling and non-invasive manner. Combining theory, experiment, and data-driven research is essential to reveal the pre-disease science. In this paper, we will introduce some of the research results.

Keywords : dynamical network biomarkers(DNB) theory, metabolic syndrome, pre-disease state, Raman spectra, T cell activation