

# 新規健康診断のための細胞表面 DNA を用いた非侵襲的な医工計測法の開発

愛媛大学 大学院医農融合公衆衛生学環 生物統計学部門  
湯川将之

## 1. はじめに

日本は世界に類を見ない超高齢化社会を迎え、医療システム全体が新たな課題に直面している。寿命が延びるにつれて、がんや糖尿病、心血管疾患などの加齢性疾患に罹患する確率が著しく増加しており（参考文献 1）、医療費の増大が国民経済に大きな負担を与えている。特に、先進医療の多くは高額な治療費を要するため、全国民が平等に利用できるわけではなく、健康寿命を延ばすための障壁となっている。この高額な治療費は、国民全体の健康寿命を延ばす上での大きな障壁となっている。この問題を解決するためには、疾患が重篤化する前に予測・捕捉する健康診断を充実させることが重要である。早期発見により治療コストを削減し、身体への負担を軽減するために、血液中に存在する DNA を用いて非侵襲的かつ簡易的に病気を診断する方法の開発を目指す。

リキッドバイオプシー（血液などの体液試料）研究は、体液中に含まれるマーカー分子（タンパク質、核酸、代謝物など）を利用して病態や予後を診断することを目的としている（参考文献 2）。特に、細胞外 DNA を利用した診断は、高い検出感度からの早期診断、そして複数の病態を同時に検出できる可能性がある（図 1）（参考文献 3 と 4）。本研究では、細胞外 DNA の中でも、細胞表面に付着する細胞外 DNA（細胞表面 DNA）に焦点を当てている（図 2）。細胞表面 DNA は細胞膜に付着する形で存在し、免疫細胞や赤血球が疾患由来の DNA を捕捉して運搬する可能性がある。従来の細胞外 DNA の研究では主に体液に浮遊している細胞外 DNA が対象になっていたが、細胞表面 DNA を用いる方法の方が効果的な疾患診断が期待される。

本研究では、主に次世代型 DNA シーケンサーを用いて細胞表面 DNA の特徴を明らかにし、バイオマーカーを同定する。また、細胞表面 DNA のメチル化パターンを公共データベースと比較して由来臓器を特定

**細胞外DNAによる健康診断の利点**



- ・特別な設備は不要。血液採取のみ。
- ・遠隔地でも実施可能であり、利便性が高い。
- ・さまざまな疾患（がんや脳疾患など）を一度の診断で検出できる可能性。
- ・高精度。

図1 細胞外DNAを活用した健康診断の利点。

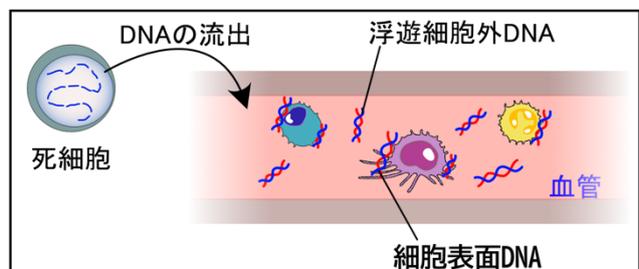


図2 血液内の細胞外DNA。

細胞は死んだ後、ゲノムDNAが短く切断され、細胞外へと流出する。そして、細胞外DNAとして、血液には浮遊する細胞外DNA、血液細胞の表面に付着する細胞表面DNAがある。これらは血管を通して全身を循環している。

し、逆畳み込み解析により細胞表面 DNA 混合物の由来臓器の割合を推定する。この方法により、細胞表面 DNA のプロファイリングを行い、健康な人と疾患のある人の特徴を比較することで、疾患の早期発見と診断を可能にすることを目標としている。さらに、高度なデータ解析手法を用いて診断感度と正確性の向上を目指す。

## 2. 実験手法

### 血液から血漿および血液細胞分画の単離

健康な人から抗凝固剤(EDTA チューブ)を用いて採取した血液サンプルを遠心分離し、血漿および血液細胞を単離した(図3)(参考文献5)。遠心分離は、Ficoll-Paque 密度勾配法を用い、赤血球、末梢血単核細胞、および血漿を精密に分画した。このステップでは、層間の混入を防ぐため、慎重な操作が求められる。これらの分画は以降のステップで使用します。

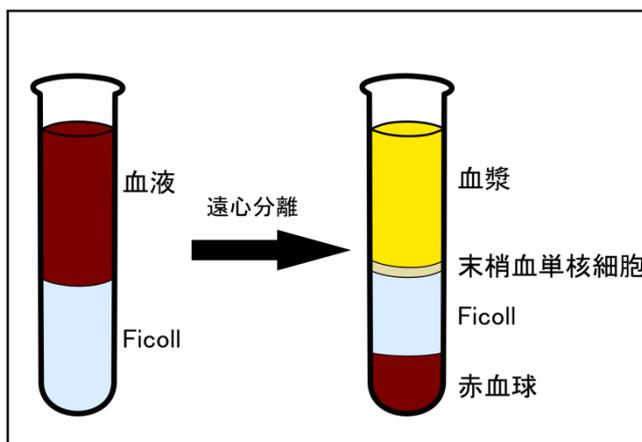


図3 血液成分の分離

採取された末梢血をFicoll密度勾配法により分画し、それぞれの分画からDNAを単離する。

### 血漿からの細胞外 DNA の単離

遠心分離後の血漿を 2000g, 10min, 4C と 15000g, 10min, 4C の遠心分離を続けて行い、上清を移すことによって細胞や細胞の破片などを取り除く。この血漿を細胞外 DNA の抽出キット(QIAamp MinElute ccfDNA Mini Kit)を使用した。このプロセスにより、高純度の ccfDNA を得ることができ、次世代 DNA シーケンサーでの解析に適した状態となる。

### 血液細胞からの細胞表面 DNA の単離

単離した血液細胞(末梢血単核細胞および赤血球分画)から細胞表面 DNA を抽出した。このプロセスでは、細胞表面を洗浄した後、界面活性剤や酵素を使用して細胞表面 DNA を効率的に分画した。その後、DNA 精製キットを用いて、細胞表面 DNA を精製し、混入物を除去した。

### DNA 電気泳動

単離した細胞表面 DNA および細胞外 DNA のサイズや純度を確認するために、Agilent Bioanalyzer を用いて、電気泳動を実施した。電気泳動後、泳動結果はデジタルデータとして出力され、バンドの位置と強度から DNA のサイズと濃度を確認した。

### マウスモデルの活用

腫瘍移植モデルとして、マウスの上皮に EL4 細胞を移植し、腫瘍形成を誘導した。心臓から採取した血液をヒトの血液と同様に処理し、細胞表面 DNA を単離した。このモデルを用いることで、細胞表面 DNA を用いた腫瘍検出法の検証を行った。

### 3. 結果と考察

#### ヒト細胞表面 DNA

予備実験では、健康な人から採取した赤血球および末梢血単核細胞（PBMC）の細胞表面 DNA を単離し、数十億個レベルの細胞表面 DNA 分子を得た。電気泳動法により細胞表面 DNA の長さを調べたところ、それぞれ約 10,000 bp 長と約 300 bp 長であり、浮遊細胞外 DNA（約 170 bp 長）よりも長いことが明らかとなった（図 4）。この結果から、細胞表面 DNA は浮遊細胞外 DNA よりも分解が進んでおらず、より安定的に疾患由来の細胞外 DNA を運搬していると示唆している。さらに、赤血球と PBMC の細胞表面 DNA の長さに大きな差異がある点は非常に興味深い発見であった。この結果を踏まえ、さまざまな細胞画分から細胞表面 DNA を単離することで、異なる疾患に対応した診断アプリケーションの可能性が広がると考えられる。今後の研究では、これらのアプリケーションの実現に向け、さらなる解析を進める必要がある。

現在、シーケンシングデータの取得はこれからの段階であるが、十分量の細胞表面 DNA を確保できていることから、イルミナ社製次世代 DNA シーケンサーを使用して解析を行う予定である。この解析により、細胞表面 DNA がどのゲノム領域に由来するのか、さらにその長さなどの特徴を詳細に明らかにしていく計画である。

#### マウスモデルでの細胞表面 DNA

腫瘍を移植したマウスを用いた実験では、ヒトの血液サンプルと同様の方法で細胞表面 DNA を単離することが可能であった。今後は、単離した細胞表面 DNA の DNA メチル化プロファイルを解析し、さらに細胞デコンボリューション解析を実施する予定である。これにより、細胞表面 DNA を用いた腫瘍検出のための動物腫瘍モデルの確立を目指す。このモデルの構築は、疾患診断技術の新たな可能性を広げる重要なステップとなると考えられる。

### 4. まとめと展望

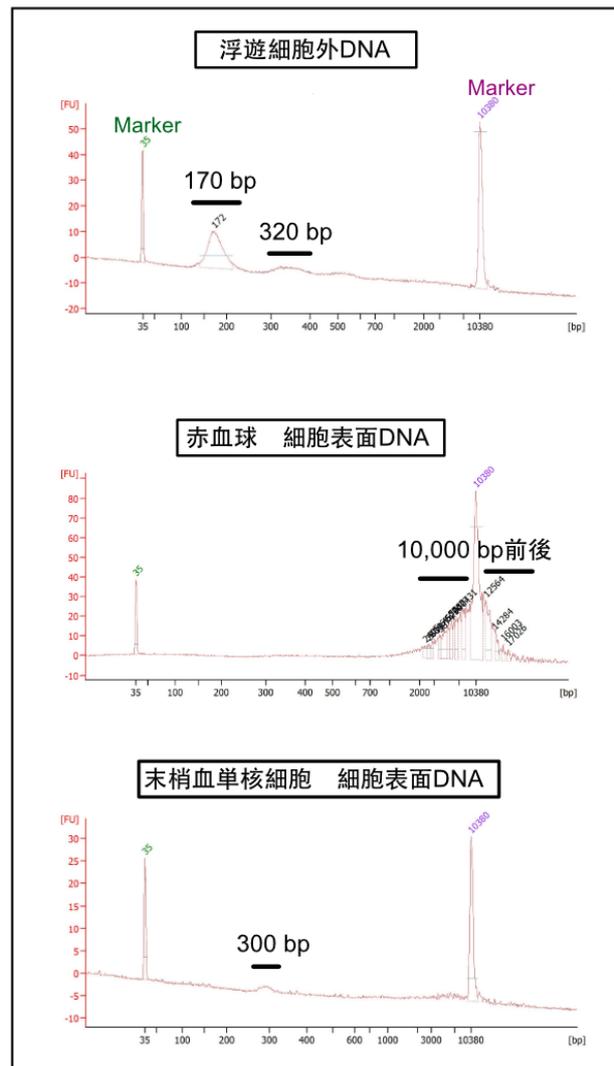


図4 細胞表面DNAの長さ解析。

細胞表面DNAおよび浮遊細胞外DNAの電気泳動結果。横の黒太線は検出されたDNAのピークを示している。細胞表面DNA（約10,000 bpおよび約300 bp）は、浮遊細胞外DNA（約170 bp）とは異なる長さを持ち、分解が進んでおらず、より安定して疾患関連DNAを運搬する可能性があることを示唆している。

細胞表面DNAおよび浮遊細胞外DNAの電気泳動結果。横の黒太線は検出されたDNAのピークを示している。細胞表面DNA（約10,000 bpおよび約300 bp）は、浮遊細胞外DNA（約170 bp）とは異なる長さを持ち、分解が進んでおらず、より安定して疾患関連DNAを運搬する可能性があることを示唆している。

本研究において、細胞表面 DNA の単離方法を確立するとともに、細胞表面 DNA を利用した非侵襲的健康診断法の可能性を示すことができた。また、コンピュートースクリプトとして、DNA メチル化を用いた細胞デコンボリューション手法 (参考文献 6) を導入することができ、今後の研究の進展に寄与すると考えられる。

今後の課題としては、次世代 DNA シークエンシングを用いた 1 分子レベルでのプロファイル取得を進め、細胞表面 DNA の詳細な特性を明らかにする必要がある。また、細胞外 RNA など他のリキッドバイオプシー分野の解析も並行して進めることで、多階層的なデータ解析を行うことが可能になる。このようなアプローチにより、より包括的な疾患診断技術の開発が期待される。

本研究で得られた技術は、健康診断の精度を向上させるだけでなく、患者の負担を軽減する革新的な医療ツールとして大きな可能性を秘めている。今後のさらなる研究と応用展開により、医療分野における実用化が期待される。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、公益財団法人 天野工業技術研究所から多大なるご支援を賜り、心より深く感謝申し上げます。天野工業技術研究所からの助成金は、細胞表面 DNA を用いた非侵襲的医工計測法の開発において、重要な推進力となりました。これにより、技術的な進展を遂げ、実現に向けた大きな一歩を踏み出すことができました。

特に、設立間もない私たちの研究室にとって、本研究の初期段階を支えていただいたことは、非常に意義深いものです。今回のご支援により、革新的な健康診断技術の実現が現実味を帯び、患者負担の軽減につながる診断法の発展に寄与するだけでなく、未来の医療分野への貢献にもつながると確信しております。

改めて、公益財団法人 天野工業技術研究所の皆様には深く感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) Yancik R. Cancer burden in the aged: an epidemiologic and demographic overview. *Cancer*. 1997;80(7):1273–83.
- 2) Mader S, Pantel K. Liquid Biopsy: Current Status and Future Perspectives. *Oncology Research and Treatment*. 2017;40: 404–408.
- 3) Lo YMD, Han DSC, Jiang P, and Rossa W K Chiu. Epigenetics, fragmentomics, and topology of cell-free DNA in liquid biopsies. *Science*. 2021;372(6538):eaaw3616.
- 4) Bai J, Jiang P, Ji L, Lam WKJ, Zhou Q, Ma M-JL, Ding SC, Ramakrishnan S, Wan CW, Yang TC, Yukawa M, Chan RWY, Qiao R, Yu SCY, Choy LYL, Shi Y, Wang Z, Tam THC, Law MF, Wong RSM, Wong J, Chan SL, Wong GLH, Wong VWS, Chan KCA, Lo YMD. Histone modifications of circulating nucleosomes are associated with changes in cell-free DNA fragmentation patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2024;121(42):e2404058121.

- 5) Yukawa M, Jagannathan S, Vallabh S, Kartashov AV, Chen X, Weirauch MT, et al. AP-1 activity induced by co-stimulation is required for chromatin opening during T cell activation. *J Exp Med.* (2019) 217:e20182009.
- 6) Moss J, Magenheimer J, Neiman D, Zemmour H, Loyfer N, Korach A, et al. Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nat Commun.* 2018;9:5068.