

# 超高齢化社会の健康診断革新に向けた細胞外DNAの応用

愛媛大学 大学院医農融合公衆衛生学環生物統計学部門

講師 湯川 将之

(共同研究者)

愛媛大学 大学院医農融合公衆衛生学環生物統計学部門

JSPS 海外特別研究員 Razil BinTahir

## はじめに

日本は世界に類を見ない超高齢化社会を迎えており、社会全体の医療費を削減し、健康寿命を伸ばすことが重要な課題となっている。この問題を解決するためには、疾患が加齢とともに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不可欠である。

健康診断につながる技術として、血液中の細胞外DNAを利用した研究が注目されている。細胞外DNAは、体内の細胞が死ぬ際に細胞内のDNAが分解され、その断片が血液を通して体内を循環する小さなDNA分子である(図1)。疾患がある組織の細胞に由来する細胞外DNAを検出することで、疾患診断が可能とされている。細胞外DNAを用いた疾患診断では、患者の身体への負担が血液採取のみで済むため、非侵襲的かつ簡易な方法として疾患の早期発見が可能になると期待されている(図2)。また、複数の疾患組織を同時に検出できる可能性もある。しかし、血液中に浮遊する細胞外DNAは疾患組織由来のものが微量であるという問題がある。効果的な診断には、十分な量の疾患由来の細胞外DNAを収集する必要がある。そこで、血液細胞が

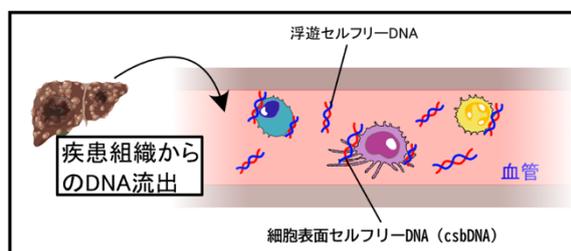


図1 血液内のセルフリーDNA。  
細胞は死んだ後、細胞DNAが短く切断され、細胞外へと流出する。そして、セルフリーDNAとして、血液には浮遊するセルフリーDNA(浮遊セルフリーDNA)、血液細胞の表面に付着するセルフリーDNA(細胞表面DNA)がある。これらは血管を通して全身を循環している。

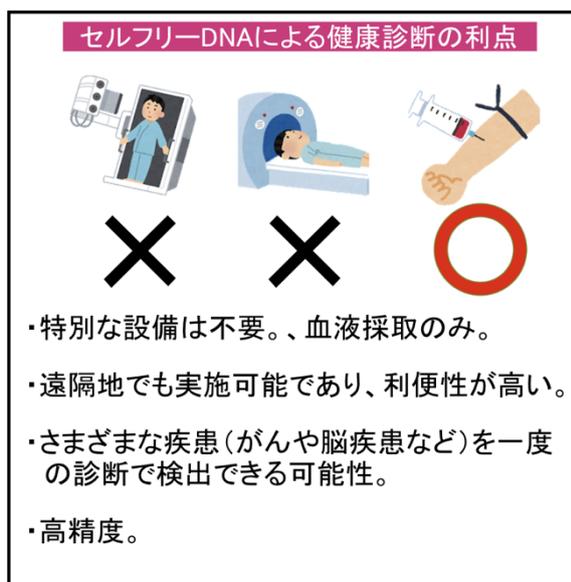


図2 セルフリーDNAを活用した健康診断の利点。

体内の血管を通じて様々な組織を循環している点に着目した。免疫細胞や赤血球などの血液細胞は、疾患組織で死んだ細胞からDNAを捕捉し、運搬する可能性を見出した。そのため、血液細胞表面に付着する細胞外DNA (csbDNA: cell-surface bound DNA) を集め、疾患細胞由来のcsbDNAを検出することで、より効果的な疾患診断につながると考えた。本研究ではcsbDNAの疾患診断への有用性を調査する。

## 結 果

### ヒト細胞表面DNAの化学的特性の解析

予備検討として、健常ドナー由来の赤血球および末梢血単核球 (PBMC) から細胞表面結合DNA (csbDNA) を回収し、数十億分子規模のcsbDNAを取得した。電気泳動によるサイズ評価では、赤血球由来は約10,000 bp、PBMC由来は約300 bpが主要画分であり、循環遊離DNA (cfDNA; 約170 bp) よりも長尺であった (図3)。このことは、csbDNAがcfDNAに比して分解の影響を受けにくく、疾患由来の外来DNAを比較的安定に担持する可能性を示唆する。とりわけ赤血球とPBMC間で顕著な長さの差が認められた点は興味深く、今後は多様な血液細胞画分からcsbDNAを個別に単離し、疾患別診断への応用可能性を広げたい。

シーケンス解析はこれから着手予定だが、十分量のcsbDNAを確保できているため、Illumina次世代シーケンサーを用いて、ゲノム由来領域や長さ分布などの特徴量を体系的に明らかにする計画である。

### データ解析基盤の整備

NGSデータ処理のための計算解析プラットフォームを新規構築し、csbDNAおよびセルフリーRNA (cfRNA) の解析体制を整えた。初期検証として、公共データベースに蓄積の多い肝がん (HCC) 由来cfRNA-seqを対象にした。肝臓はcfRNAの主要発生源の一つであり、複数コホートが公開されていることから、パイプラインの立ち上げ対象として妥当と判断した。

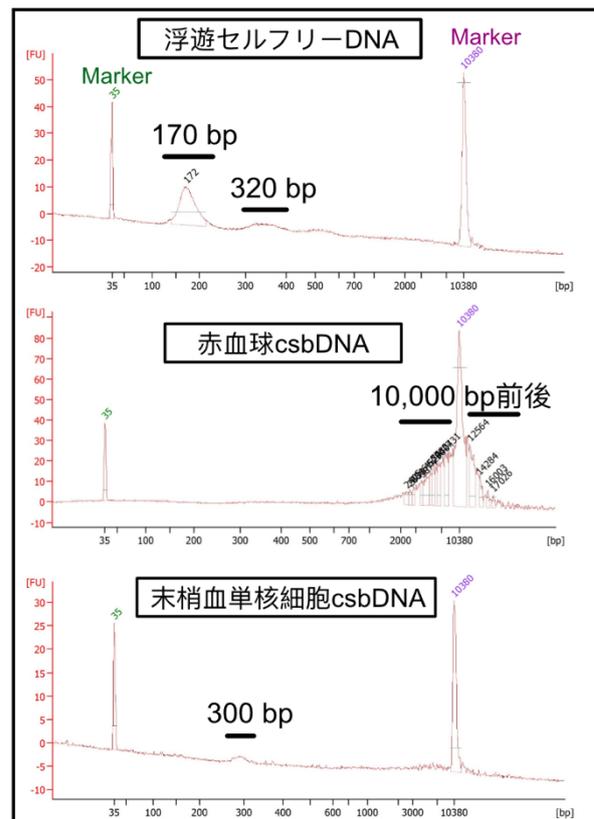


図3 csbDNAの長さ解析。

csbDNAの電気泳動解析。横の黒太線は検出DNAのピークを示している。csbDNA (約10,000および約300 bp) は、浮遊セルフリーDNA (約170 bp) より長い。

具体的には、Chen et al., 2022 および Roskams-Hieter et al., 2022 のデータを用い、HCC と健常者を識別する候補分子群の抽出を実施した(図4)。令和7年度の成果として、循環RNA中に反映される疾患関連の転写シグナルを捉え、これを特徴量として利用できることを確認した。解析手順として、cfRNA-seq から転写プロファイルを作成し、LASSO 回帰で有効特徴量を選択。これを用いて LDA および Random Forest (RF) の分類器を構築・評価したところ、ROC-AUC  $\geq 0.91$  を得て、HCC と健常者を高精度に弁別できた。既存腫瘍マーカーの報告 AUC (概ね 0.8–0.9) と比較しても、予備段階として有望な結果である。

今後は、独立検証コホートの追加、アルゴリズム多様化 (例：勾配ブースティング、正則化パラメータの最適化)、および交差検証・外部検証の厳密化により、再現性と汎化性能の一層の向上を図る。

## 考 察

### ヒト細胞表面 DNA (csbDNA) の化学的特性に関する考察

健常ドナー由来サンプルで、赤血球 (RBC) 起源の csbDNA がおよそ 10 kb、PBMC 起源が約 300 bp と、いずれも cfDNA (~170 bp) より長尺であった点は、csbDNA が分解から相対的に保護されうる運搬形態であることを示唆する。特に RBC は無核・無ミトコンドリアである一方、循環中で最も豊富な細胞集団であり、膜表面に外来核酸が吸着・結合しやすい環境にあると考えられる。10 kb 級の長尺画分は、断片化が進んだ cfDNA とは異なる由来・経路 (例：細胞外小胞やタンパク質複合体を介した表面結合、あるいは補体・凝固関連分子を介した架橋) を推測させ、疾患起因の核酸をより「原型」に近い形で担持しうる可能性がある。

一方で、この長尺性には前処理アーティファクト (軽微な白血球破碎、粘着性タンパクによる凝集、サイズ選択の偏り) が混入しうるため、(i) 表面ヌクレアーゼ処理／膜透過化前後の回収比較、(ii) プロテアーゼ・ヘパリン等による結合様式の切り分け、(iii) 免疫磁気分離やフローソーティングでの細胞画分純化、(iv) 電子／蛍光顕微鏡観察などで「表面由来」であることの実証が重要である。さらに、同一ドナーで cfDNA と csbDNA をペアで取得し、断片長分布、末端モチーフ、ヌクレオソームフットプリント、メチル化プロファイルを横断比較することで、情報冗長性と補完性を定量化できる。

今後のシーケンス計画においては、Illumina に加えて超長尺の特徴を活かせるロングリ

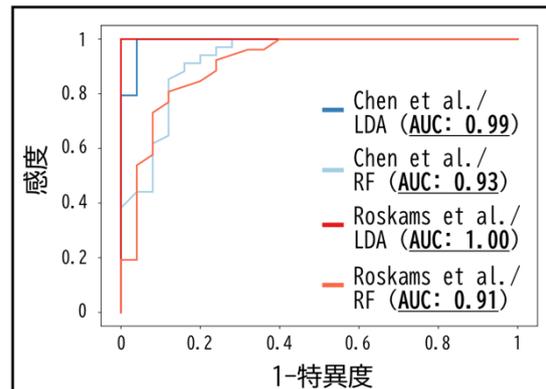


図4 計算プラットフォームの構築。公共データを用いて複数の機械学習手法 (LDA, RF) で予備解析を行いました。血液内循環RNAパターンの解析により肝臓がんを高い精度で発見できる可能性が示されました (既存の肝がん指標のAUC値は0.8前後)。

ード (ONT/PacBio) の併用や、サイズ別ライブラリ化による層別解析が、RBC由来10 kb画分の起源・機能解釈を大きく前進させると考えられる。

### データ解析基盤と cfRNA (HCC 公共データ) 初期検証に関する考察

新規に構築したNGS解析基盤は、HCCの公共cfRNA-seqコホート(例: Chen 2022、Roskams-Hieter 2022)を用いた初期検証で、HCCと健常者を高精度(ROC-AUC  $\geq$  0.91)に弁別し得た。これは、循環RNA中に腫瘍関連の転写活性や組織損傷シグナルが反映されるという仮説と整合的であり、解析パイプラインの妥当性を裏づける。

一方で、循環RNAは反復配列や低複雑性領域などマッピングが難しい要素を多く含むため、再現性確保には(i)マルチマッピングへの厳密な取り扱い、(ii)特徴量選択と分類器学習を完全に分離したネスト化交差検証、(iii)AUCだけでなくPR-AUC・キャリブレーション(Brier)・決定曲線解析による臨床的有用性の評価、(iv)施設差・試薬差・保存条件差を考慮したバッチ補正と潜在因子推定、が重要となる。さらに、良性だが炎症性の対照群(肝硬変、慢性肝炎、NAFLD/NASHなど)を含む独立検証コホートの整備が、特異度の外的妥当性を高めるうえで不可欠である。

### csbDNAとcfRNAの統合、および次段階への展望

本結果は、「長尺で物理的に安定な表面結合DNA」というキャリア情報と、「循環RNAに反映される病態依存シグナル」という機能情報が相補的であることを示唆する。今後は、(i)同一被検者でのcsbDNAメチル化・断片学指標とcfRNA特徴量の多層統合、(ii)転移臓器・病期・治療介入に応じたシグナルの分解能向上、(iii)縦断サンプリングによる治療反応・再発予測モデルの構築、を進めることで、単回採血から進行・転移・治療奏効を包括的に推定する道筋が開ける。実装面では、前処理・品質管理(抗凝固剤、処理時間、温度、遠心条件)の標準化と、外部精度管理の枠組みを研究段階から並走させることが肝要である。これらを満たすことで、スクリーニングからモニタリングまでを視野に入れた、再現性・汎用性の高い診断系へのブリッジが現実味を帯びる。

## 要 約

本研究は、超高齢化社会における非侵襲で高頻度実施可能な健診の実装を目指し、血液細胞表面結合DNA(csbDNA)を新たな診断キャリアとして活用する枠組みを提示する。健常ドナー由来の赤血球およびPBMCから数十億分子規模のcsbDNAを回収し、主要断片長が赤血球で約10 kb、PBMCで約300 bpと、循環遊離DNA(cfDNA, 約170 bp)より長尺であることを確認、分解耐性と疾患由来情報の安定担持の可能性を示した。解析面ではNGS計算基盤を新規構築し、公共cfRNAデータ(肝がん)で特徴量選択と機械学習(LDA/RF)によりROC-AUC $\geq$ 0.91の高精度識別を達成、パイプラインの妥当性を検証した。今後

はIlluminaによる本解析（必要に応じロングリードやサイズ層別）を進めつつ、独立コホート追加、アルゴリズム多様化、ネスト化交差検証と外部検証、前処理・品質管理の標準化を並走させる。最終的には、csbDNAの断片長・メチル化などの物理・エピゲノム指標と、循環RNAに反映される疾患関連シグナルを統合し、単回採血で多疾患のスクリーニングから治療モニタリングまでを一貫して支援する健診プラットフォームの実装を目指す。

## 文 献

1. Yancik R. Cancer burden in the aged: an epidemiologic and demographic overview. *Cancer*. 1997;80(7):1273–83.
2. 小幡 篤. 地方都市の地域医療の課題と実践. 日本内科学会. 106 巻 7 号. 日本内科学会雑誌. 2017;106(7):1427~1432.
3. 石井 儀光. 人口減少期における病院立地の現状と課題. 日本オペレーションズ・リサーチ学会. 日本オペレーションズ・リサーチ学会論文誌. 2012;57(3):119~123.
4. Mader S, Pantel K. Liquid Biopsy: Current Status and Future Perspectives. *Oncology Research and Treatment*. 2017;40: 404–408.
5. Nikanjam M, Couvillion A, Lewis M. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol*. 2022;15(1):132.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Moss J, Magenheim 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.
10. Chen S, Jin Y, Wang S, Xing S, Wu Y, Tao Y, et al. Cancer type classification using plasma cell-free RNAs derived from human and microbes. *eLife*. 2022;11:e75181. eLife
11. Roskams-Hieter B, Kim HJ, Anur P, Wagner JT, Callahan R, Spiliotopoulos E, et al. Plasma cell-free RNA profiling distinguishes cancers from pre-malignant conditions in solid and hematologic malignancies. *npj Precis Oncol*. 2022;6:28.