

Novel liquid biopsy test based on a sensitive
methylated SEPT9 assay for diagnosing
hepatocellular carcinoma

(肝細胞癌診断における高感度メチル化解析法による
新規リキッドバイオプシーの開発)

氏名 厚東 由里佳

所属 山口大学大学院医学系研究科 医学専攻
消化器内科学講座

令和2年6月

目次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	2
3. 方法	3
(1) 対象	3
(2) 方法	3
(3) 解析	5
4. 結果	5
5. 考察	10
6. 結語	12
7. 謝辞	12
8. 参考文献	12

1. 要旨

リキッドバイオプシーが様々な悪性腫瘍の診断に有望視されているが、肝細胞癌の診断に実用化されているものは存在しない。米国で承認されている Epi proColon®は血漿中のメチル化 SEPT9 をターゲットとした大腸癌のスクリーニング検査として初承認されたリキッドバイオプシーである。しかし、多量の血漿が必要であり、定量性がないことが問題点である。我々は少量の DNA から数コピーでもメチル化 DNA を定量的に検出できる高感度メチル解析法を新規開発した。本研究ではこの解析法を用いてメチル化 SEPT9 による肝細胞癌の診断能を評価した。対象は健常者(healthy control)80 人、肝細胞癌のない慢性肝疾患患者(CLD) 45 人、肝細胞癌患者(HCC)136 人(BCLC stage 0, 12; A, 50; B, 31; C, 41, and D, 2)である。方法は、メチル化感受性制限酵素を用いて DNA を 2 段階処理し、ドロップレットデジタル PCR(ddPCR)を行った。メチル化 SEPT9 のコピー数の中央値は、healthy control 群 0.0 コピー、CLD 群 2.0 コピー、HCC 群 6.4 コピーであり、各群で有意差を認めた (HCC vs. healthy control, $P < 0.001$; HCC vs. CLD, $P = 0.002$; CLD vs. healthy control, $P = 0.008$)。healthy control 群から HCC 群を検出するための cut off を 4.6 コピーと設定すると感度 63.2%、特異度 90.0%となった。さらに、肝細胞癌のステージが進行するにつれて、メチル化 SEPT9 4.6 コピー以上の陽性率が増加した(BCLC stage 0, 41.7%; A, 58.0%; B, 61.3%; C, 75.6%, and D, 100%)。高感度メチル化 SEPT9 解析法は肝細胞癌診断のリキッドバイオプシーとなり得る可能性が示唆された。

2. 研究の背景

肝細胞癌(HCC)は世界の癌関連死の原因第4位であり¹, HCCが75-85%を占める原発性肝癌の絶対数は, 2030年までに主要な世界30ヶ国で増加するとされている². HCCを早期発見するためにHCCリスク群を厳重にフォローすることが米国, ヨーロッパ, アジア, 日本などの国際ガイドラインで提唱されているが³⁻⁶, 早期発見可能なバイオマーカーは未だ存在しない^{4, 6}. HCCは早期に発見することで良好な予後が得られることが報告されており^{7, 8}, 新規のスクリーニング方法が必要である.

リキッドバイオプシーは新規の診断ツールであり, 血中循環腫瘍細胞や血中循環遊離腫瘍DNA(cfDNA)がリキッドバイオプシーのターゲットとして知られている. その中で, メチル化cfDNAは最も注目されているリキッドバイオプシーのターゲットである. cfDNAのメチル化は発癌の初期に発生するため, HCC患者におけるCDKN2A, RASSF1A, GSTP1といったメチル化遺伝子の診断性能は多数の研究で評価されている⁹⁻¹¹. しかしながら, 実臨床で使用されているものはない.

Epi proColon® (Epigenomics AG, Berlin, Germany)は2016年に米国のFDAに承認された, メチル化SEPT9を検出する大腸癌のスクリーニング検査であり¹², 同検査がHCCの診断に有用であるという報告が1報ある¹³. しかし, Epi proColon®にはいくつかの問題点が指摘されている. まず, 血液中の癌特異的なDNAはごく少量であり, また, バイサルファイト法でDNAを処理するため, DNAの変性および欠失がおこることから, 多量の血漿が必要となる点である^{14, 15}. 次に, 定性検査で陽性または陰性の判定しきれない点である. これらの問題点を解決すべく, 我々はバイサルファイト処理とメチル化DNAの免疫沈降反応を必要としない, 新たな手法を開発した(CORD assay). この方法はバイサルファイト処理法と比較し感度が100倍であるため, 少量のDNA検体から1コピーのメチル化遺伝子でさえ定量的に検出可能である¹⁶. 本方法の特徴は3つのメチル化感受性制限酵素を用いて処理し, ddPCRを行う点である. 我々は以前癌を含む大腸の新生物について血清のメチル化SEPT9とCORD assayとの関連について報告した¹⁷. 今回, 我々はHCC患者におけるメチル化SEPT9をターゲットとした本アッセイの精度評価を行った.

3. 方法

本研究はヘルシンキ宣言に基づいて倫理的に認容された研究であり，山口大学，セントヒル病院，阿知須共立病院の IRB を通過した研究プロトコールである(H28-124, H17-83).

・血清および組織サンプル

2015年3月から2018年8月の間に山口大学，セントヒル病院，阿知須共立病院で前向き及び後ろ向きに集積した261人を対象とした(Fig.1). 慢性肝疾患がなく大腸内視鏡検査(CS)で異常のなかった健常者(healthy control)80人，HCCを合併していない慢性肝疾患患者(CLD)45人，肝細胞癌患者(HCC)136人を対象とした．健常者の血液検体はCS前に採取したものである．CLD患者は直近3ヶ月以内に画像診断でHCCのない血液サンプルを用い，エントリー後6ヶ月発癌がないことを確認している．HCC群は治療前の血液サンプルを用いた．HCCの診断は日本のガイドラインを用いて行った⁵. HCCの腫瘍進展度はBarcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) staging systemを用いた¹⁸. そのうち，35症例は手術で肝切除が施行されており，35症例の腫瘍部の凍結組織と34症例の非腫瘍部の凍結組織を用いた．

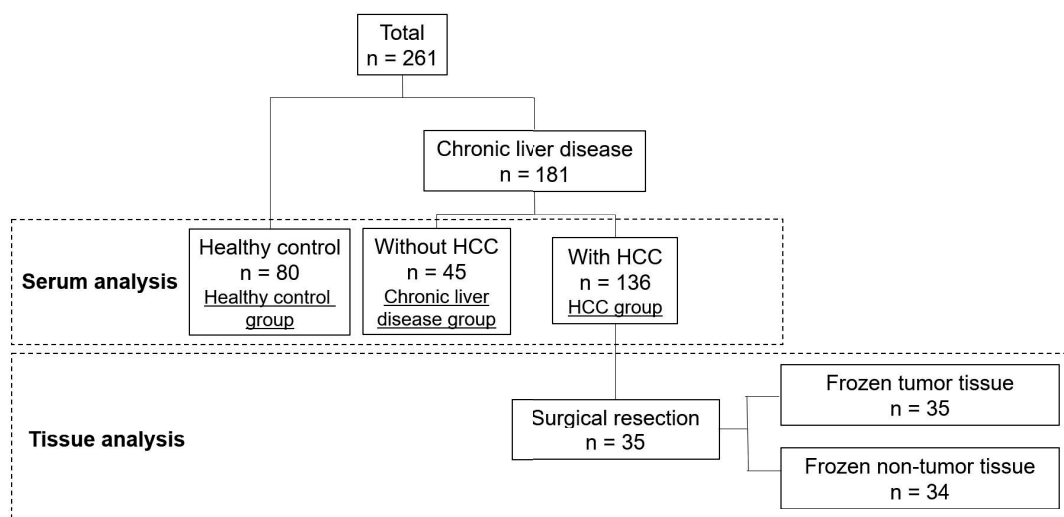


Figure 1. Study chart

・DNA抽出

DNA抽出まで-80℃で検体を保存した．血清の検体を解凍し，MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche, Tokyo, Japan)を用いて0.4mlずつDNAを抽出し，50 μLの溶出液に溶出した．組織検体はQIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いてDNAを抽出した．抽出したDNAはQubit 2.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Yokohama)を用いて二本鎖DNAを定量した．

・ SEPT9 の CORD assay

DNA サンプルは CORD assay として 3 種類のメチル化感受性制限酵素を用いて 2 段階処理を行い、マルチプレックスデジタル PCR を行った¹⁶。はじめの酵素処理段階として、溶出した 10 μ L の血中循環 cfDNA(血清 80 μ L に相当する DNA 量)または 10ng/ μ L の組織 DNA 10 μ L を 1 μ L の GeneAmp 10 \times PCR Buffer II, 1 μ L の 25 mmol/L MgCl₂, 10 U の Hha I と Hpa II, 20Unit (U)の exonuclease I (Exo I) (すべて, Thermo Fisher Scientific)を加えて, 37 $^{\circ}$ C で 16 時間酵素処理を行った。Exo I は, 制限酵素による切断から逃れた一本鎖 DNA を除去し, 未切断の DNA を PCR 増幅しないために使用している¹⁹。次に 10 U の BstUI (New England Biolabs, Hitchin, UK)を用いて, 60 $^{\circ}$ C で 16 時間追加処理を行い, さらに 98 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱を加える。SEPT9 はメチル化感受性酵素 Hpa I および BstUI の認識部位を 3 カ所所有している。その 3 カ所全てがメチル化されると上記処理でも DNA の切断は起こらず PCR で増幅することができる。ヒトテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子(The human telomerase reverse transcriptase gene; *hTERT*)はこれらの酵素の認識部位を持っていないため, *hTERT* は PCR で増幅する事ができる。

ddPCR で *hTERT* やメチル化 SEPT9 の絶対コピー数を定量することが出来る。PCR 反応液は, 酵素処理された DNA 8 μ L(血清 40 μ L に相当する DNA 量), 1 \times ddPCR Supermix for Probes(BioRad, Tokyo), 各プライマー 0.25 μ mol/L, SEPT9 または *hTERT* のプローブ 0.125 μ mol/L の合計 20 μ L を組み合わせて調製した。大腸癌で特異的にメチル化され, Epi proColon[®] のターゲットである SEPT9 転写バリエーション 2 の転写開始部位を含む SEPT9 の CpG アイランド 3 領域内に SEPT9 プライマーとプローブを設計した。

SEPT9 のプライマーおよびプローブの塩基配列は以下の通りである。

Forward primer : 5'-GCCACCCAGCCATCATGT-3'

Reverse primer : 5'-GTCCGAAATGATCCCATCCA-3'

probe : 5'-FAM-CCGCGGTCAACGC-MGB-3'

PCR によるアンプリコン長は, 第 17 染色体(ヒトアセンブリ GRCh37/hg19)の 75,369,566–75,369,627 からの 62bp である。

hTERT のプライマーおよびプローブの塩基配列は以下の通りである。

Forward primer : 5'-GGGTCCTCGCCTGTGTACAG-3'

Reverse primer : 5'-CCTGGGAGCTCTGGGAATTT-3'

probe : 5'-VIC-CACACCTTTGGTCACTC-MGB-3'¹⁶

PCR によるアンプリコン長は, 第 5 染色体の 1,253,375–1,253,434 からの 60bp である。

自動液滴生成装置(Bio-Rad)で液滴生成を完了した後, 95 $^{\circ}$ C で 10 分間の予熱, 94 $^{\circ}$ C で 30 秒間の変性を 40 サイクル, 56 $^{\circ}$ C で 60 秒間のアニーリング, 98 $^{\circ}$ C で 10 分間の加熱というサイクルで PCR を行った。増幅後, PCR プレートを入れた QX100 droplet reader (Bio-Rad)に入れ, 蛍光増幅データを QuantaSoft ソフトウェア(Bio-Rad)で解析した。

・ α -フェトプロテイン(AFP)

AFP の血中濃度は LiBASys 自動免疫学的解析(Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan)で算出した。

・統計解析

連続変数は平均値(±標準偏差)もしくは中央値(四分位範囲)で記し, 対応のない t 検定で比較検討した。名義変数は χ^2 検定や Fisher の正確検定を用いて検討した。p<0.05 である場合に統計学的有意差があるとした。ROC 解析での cut off 値は Youden index を用いて算出した。全ての統計解析は JMP software package v13.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA)を用いた。

4. 結果

・患者背景

Table 1 で患者背景を提示する。HCC 群は男性 98 人(72%)であり, 年齢平均値は 72.4 歳であった。背景肝は HBV 18 例(13%), HCV 58 例(43%), nonB nonC(NBNC) 60 例(44%)であった。HCC の進行度は Stage 0 12 例(8.8%), A 50 例(36.8%), B 31 例(22.8%), C 41 例(30.1%), D 2 例(1.5%)である。最大腫瘍径および腫瘍個数の中央値はそれぞれ 3.2cm, 1 個であった。33 例(24%)で脈管浸潤を認め, 14 例(10%)で肝外転移を認めた。CLD 群は男性 22 人(49%)であり, 年齢平均値は 69.0 歳であった。その成因は HBV 12 例(27%), HCV 18 例(40%), NBNC 15 例(33%)であった。

Table 1. Clinical patient characteristics in serum samples

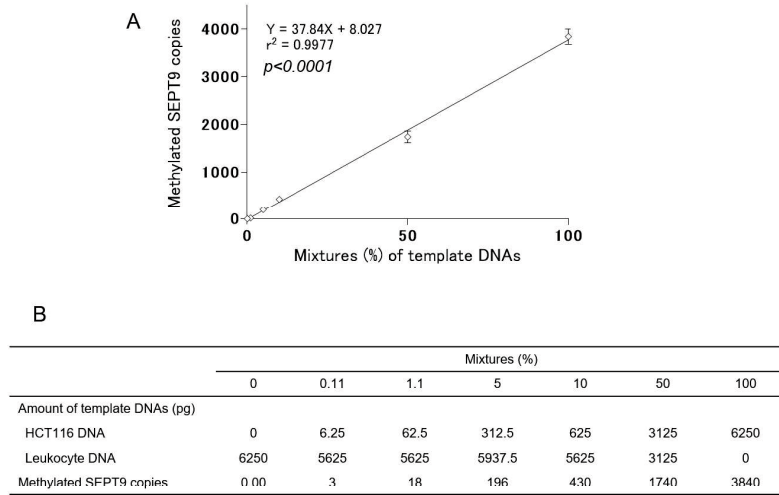
	Chronic liver disease group (n =45)	HCC group (n = 136)	Healthy control group (n =80)
Age	69.0 ± 10.4	72.4 ± 8.5	50.1 ± 8.5
Gender, male/female	22/23	98/38	38/42
Etiology, HBV/HCV/NBNC	12/18/15	18/58/60	-
CH/LC (Child-Pugh grade A/B/C)	12/33 (20/9/4)	68/68 (51/17/0)	-
BCLC stage 0/A/B/C/D	-	12/50/31/41/2	-
Tumor size, cm	-	3.2 (2.0-5.75)	-
Tumor number	-	1 (1-3)	-
Macrovascular invasion +/-	-	33/103	-
Extrahepatic spread +/-	-	14/122	-

HCC, hepatocellular carcinoma; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; NBNC, nonB nonC; CH, chronic hepatitis; LC, liver cirrhosis; BCLC, Barcelona Clinic Liver Cancer; IQR, Interquartile Range

・CORD assay の基本性能評価

血液由来の DNA が背景にある中メチル化された癌由来の DNA を検出する CORD assay の基本性能評価を行うために, 白血球から抽出した DNA(SEPT9 の脱メチル化対照 DNA)に 100%, 50%, 10%, 5%, 1.1%, 0.11%, 0%の濃度別に SEPT9 がメチル化された EpiScope methylated HCT116

gDNA (Takara Bio Inc., Japan)を添加し、それぞれのサンプルからメチル化 SEPT9 のコピー数を測定した。CORD assay では 5,625pg の非メチル化 DNA 中から、6.25pg のメチル化 SPET9 を定量する事が可能であった(Supplementary Fig. 1).



Supplementary Figure 1. Basic performance test the CORD assay

・血清検体中のメチル化 SEPT9

各群におけるメチル化 SEPT9 の中央値は healthy control 群 0.0 (0.0–3.4)コピー， CLD 群 2.0 (0.0–8.0)コピー， HCC 群 6.4 (2.6–13.3)コピーであり，各群で有意差を認めた (HCC vs. healthy control, $P < 0.001$; HCC vs. CLD, $P = 0.002$; CLD vs. healthy control, $P = 0.008$) (Fig. 2A).
メチル化 SEPT9 の cut off 値(healthy control 群 vs. HCC 群)を ROC analysis 解析にて 4.6 コピーと設定したところ，感度 63.2%，特異度 90.0%，AUC(area under the curve) 0.81 であった(Fig. 2B). 一方，CLD 群と HCC 群間での cut off 値を 4.8 コピーと設定すると，感度 62.5%，特異度 71.7%となった。そのため，メチル化 SEPT9 の 4.6 コピーを HCC 診断における至適 cut off 値として以下の検討を行った。

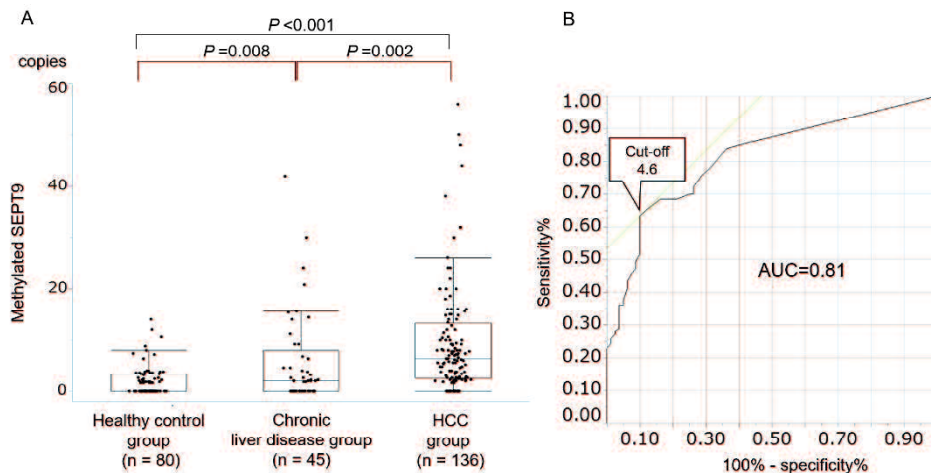


Figure 2. Methylated SEPT9 assay in serum samples

・ HCC の進行度と血清メチル化 SEPT9 コピー数との関連

BCLC staging system¹⁸で評価した HCC の進行度とメチル化 SEPT9 コピー数との関連を Fig. 3 に示した. HCC のステージが進行するにつれてメチル化 SEPT9 コピー数の中央値は増加した. 各ステージ(Stage 0,A,B,C,D)のメチル化 SEPT9 コピー数の中央値は 2.1, 5.6, 6.6, 9.2, 53.7であった(HCC 群 stage A, B, and C vs. healthy control 群ではそれぞれ $P < 0.001$, $P < 0.001$, and $P < 0.001$ であり, HCC 群 stage C vs. CLD 群, HCC 群 stage 0, A, and B はそれぞれ $P = 0.002$, $P = 0.002$, $P = 0.003$, and $P = 0.008$) (Fig. 3A). メチル化 SEPT9 陽性(≥ 4.6 コピー)患者の割合は HCC のステージが進行するにつれて増加した(BCLC stage 0, 41.7%; A, 58.0%; B, 61.3%; C, 75.6%, and D, 100%) (Fig. 3B). メチル化 SEPT9 < 4.6 コピー群と ≥ 4.6 コピー群では背景肝, 最大腫瘍径, 腫瘍個数, 脈管浸潤において有意差を認めた. 加えて, 発癌成因によるメチル化 SPET9 陽性率は NBNC 66.7% (40/60), HBV 55.6% (10/18), HCV 62.1% (36/58)であり, 群間で差はなかった($p = 0.67$) (Supplementary Table 1).

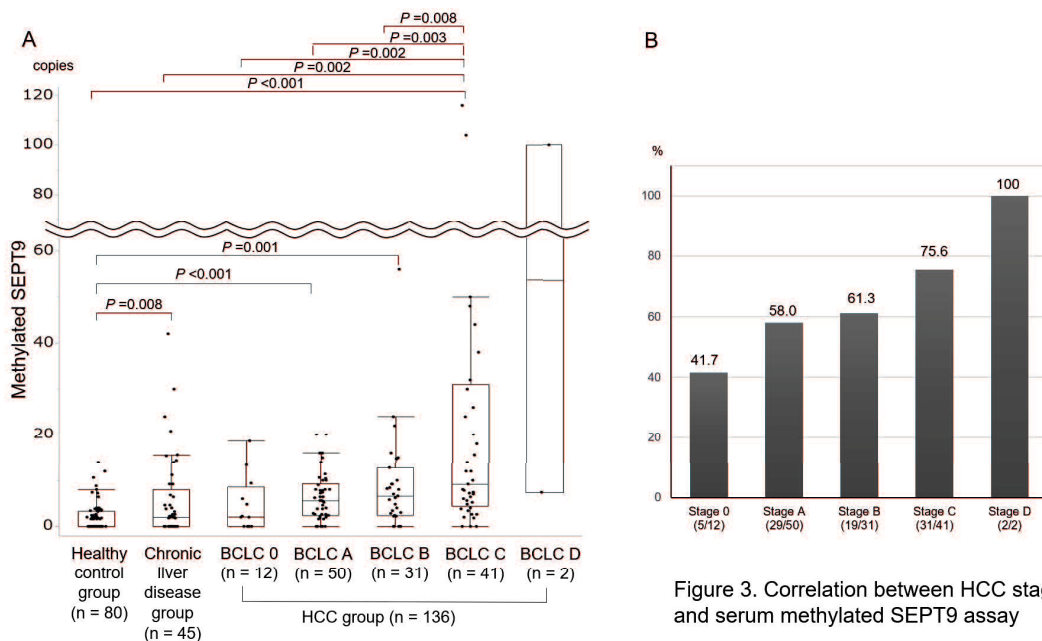


Figure 3. Correlation between HCC stages and serum methylated SEPT9 assay

Supplementary table 1. The association of methylated SEPT9 levels with clinical characteristics in patients with HCC

	methylated SEPT9 < 4.6 (n = 50)	methylated SEPT9 ≥ 4.6 (n = 86)	P value
Age	72.5 \pm 8.8	72.3 \pm 8.3	0.91
Gender, male/female	36/14	62/24	1.00
Etiology, HBV/HCV/NBNC	8/22/20	10/36/40	0.67
CH/LC	31/19	37/49	0.03
BCLC stage 0/A/B/C/D	7/21/12/10/0	5/29/19/31/2	0.14
Tumor size, cm	2.7 (1.93-4.5)	3.5 (2.2-6.25)	0.04
Tumor number	1 (1-2)	2 (1-4)	< 0.01
Macrovascular invasion +/-	6/44	27/59	0.01
Extrahepatic spread +/-	3/47	11/75	0.21

HCC, hepatocellular carcinoma; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; NBNC, nonB nonC; CH, chronic hepatitis; LC, liver cirrhosis; BCLC, Barcelona Clinic Liver Cancer; IQR, Interquartile Range

・腫瘍マーカーと血清メチル化 SEPT9 の CORD assay の併用の意義

AFP とメチル化 SEPT9 の cut off をそれぞれ 20ng/mL と 4.6 コピーと設定した. Fig. 4A に示すように, 共に陽性, AFP のみ陽性, メチル化 SEPT9 のみ陽性となる割合はそれぞれ 27.2% (37/136), 11.0% (15/136), 36.0% (49/136)であった. AFP とメチル化 SEPT9 の両者を併用することで検出感度は 74.3% (101/136)となった. HCC 患者でメチル化 SEPT9 のみ陽性であった症例は 49 例で, いわゆる超早期および早期肝癌である BCLC stage 0 または A の割合は 57.1% (28/49)であり, 一方 BCLC stage B, C, D はそれぞれ 11 例, 9 例, 1 例であった(Fig. 4B). すなわち, メチル SEPT9 の CORD assay を追加することで, 超早期および早期肝癌を含む HCC 患者の拾い上げが可能であった.

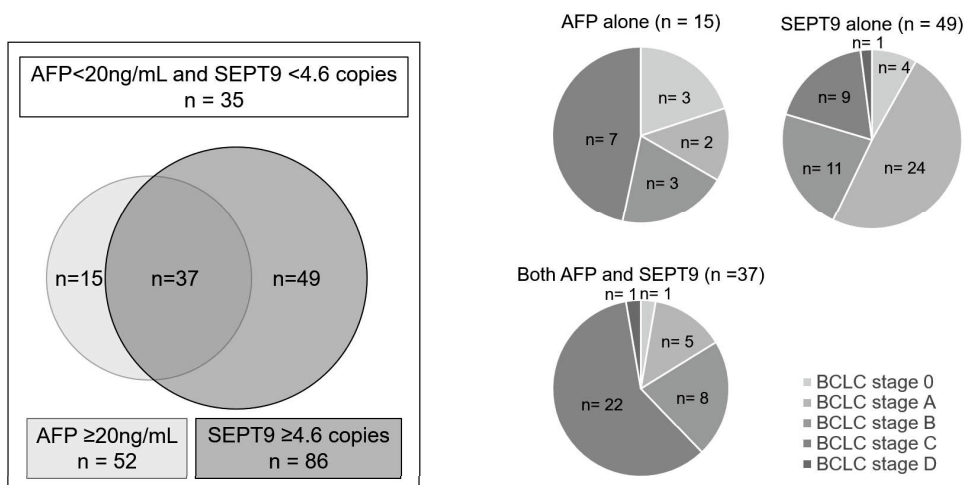


Figure 4. Combination of alpha-fetoprotein (AFP) and serum methylated SEPT9 assay

・組織検体中のメチル化 SEPT9 の解析

肝切除を施行した 35 例の患者背景を Supplementary Table 2 にまとめた. HCC の成因は HBV 3 例(8.6%), HCV 16 例(45.7%), NBNC 16 例(45.7%)であった. HCC の進行度は stage 0 2 例(5.7%), A 18 例(51.4%), B 7 例(20.0%), C 8 例(22.9%)であった. 分化度は高分化 6 例(17.1%), 中分化 23 例(65.7%), 低分化 3 例(8.6%), 分類不能 1 例(2.9%), 混合型 2 例(5.7%)であった. メチル化 SEPT9 コピー数の中央値は非腫瘍部である背景肝(n=34)で 34 コピー(10.85-51.5), 腫瘍部(n=35)で 2,360 コピー(130-5,860)であった(Fig. 5A, B). 血清(n=35)のメチル化 SEPT9 コピー数は 6.2 コピー(2.6-10.0)であり, 明らかに腫瘍組織より低値であった(P<0.001) (Fig. 5C). 34 症例で非腫瘍・腫瘍組織でのメチル化 SEPT9 コピー数を比較した. ほぼ全ての腫瘍組織で非腫瘍部より高かった(P<0.001) (Supplementary Fig.2).

Supplementary table 2. Clinical patient characteristics in 35 patients surgically resected HCC

Age	70.7 ± 6.0
Gender, male/female	25/10
Etiology, HBV/HCV/NBNC	3/16/16
CH/LC (Child-Pugh grade A/B)	24/11 (11/0)
BCLC stage 0/A/B/C	2/18/7/8
Tumor size, cm	3.3 (2.1-5.3)
Tumor number	1 (1-2)
Microvascular invasion +/-	11/24
Extrahepatic spread +/-	1/34
Degree of tumor differentiation, Well/Moderately/Poor/Undifferentiated/Combined	6/23/3/1/2

HCC, hepatocellular carcinoma; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; NBNC, nonB nonC; BCLC, Barcelona Clinic Liver Cancer; IQR, Interquartile Range

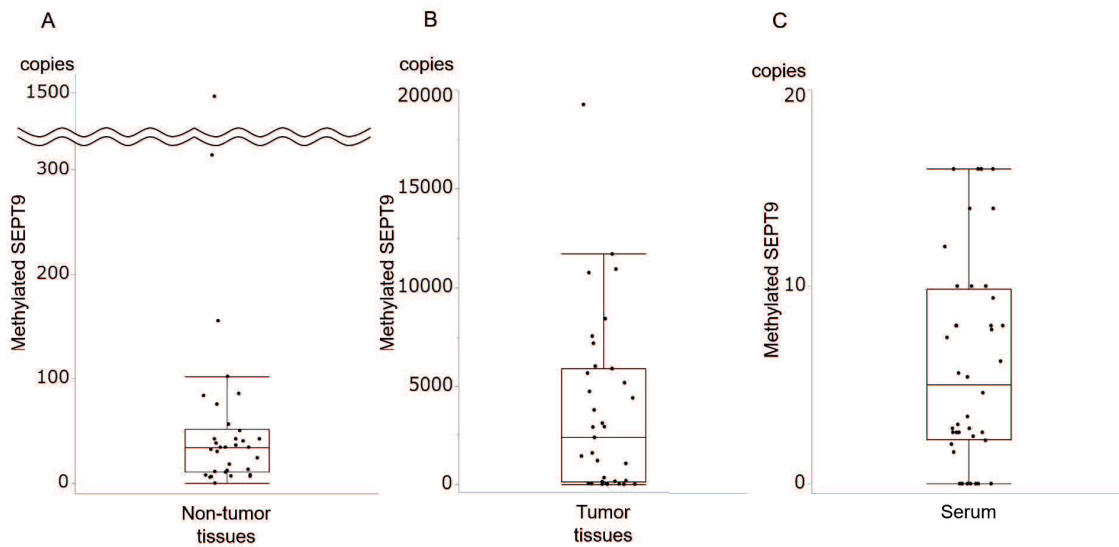
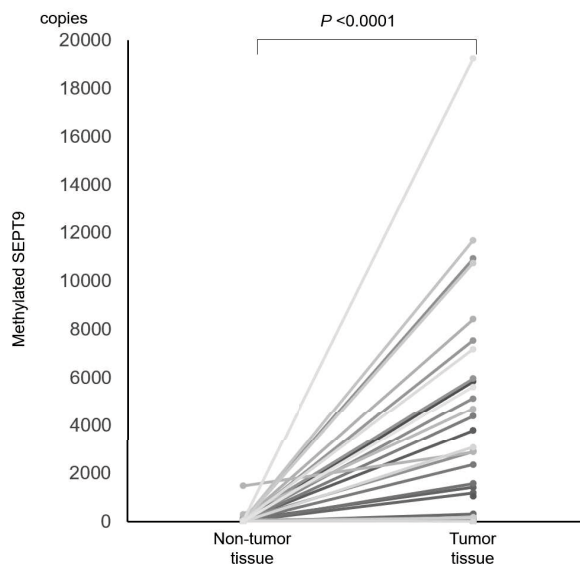


Figure 5. Methylated SEPT9 assay in non-tumor tissues, tumor tissues, and serum



Supplementary figure 2. Methylated SEPT9 assay between non-tumor tissues and tumor tissues

5. 考察

本研究で、我々はメチル化 SEPT9 をターゲットとした新規リキッドバイオプシーが HCC の診断に有用であることを示した。cfDNA はリキッドバイオプシーのターゲットのうちの 1 つであり、ジェネティックまたはエピジェネティックな腫瘍特異的な情報である。DNA のメチル化はエピジェネティックな変化の 1 つであり、様々な遺伝子のメチル化が研究されている⁹⁻¹¹。今回注目した SEPT9 は癌遺伝子もしくは腫瘍抑制遺伝子として働く²⁰。SEPT9 が高発現するとヒトでは肝腫瘍が発現し²¹、ラットでは肝発癌が起こるため²²、SEPT9 のメチル化は肝臓²³や大腸²⁴での発癌に関与しているとされている。メチル化 SEPT9 をターゲットとした Epi proColon®は大腸癌のスクリーニング検査として米国 FDA に承認された初のリキッドバイオプシーであり¹²、HCC の診断にも有用であることが報告されている¹³。Epi proColon®と比較して CORD assay はバイサルファイト処理を行わないため 0.4mL という少量の血清で検査可能である。さらに、簡便かつ定量的にメチル化を評価できるという点で優れている (Supplementary Table 3)。

Supplementary table 3. The differences between Epi proColon test and CORD assay

	Epi proColon	CORD assay
Sample	plasma	serum
Amount	3.5mL	0.04mL
Method of DNA processing	bisulfite	methylation-sensitive restriction enzyme
PCR	real-time PCR	droplet digital PCR
Analysis	qualitative (positive/negative)	quantitative
Cost	high	low

CORD assay はメチル化感受性制限酵素と ddPCR を使用する。メチル化感受性制限酵素を使用した報告²⁵⁻²⁷やメチル化解析に ddPCR を使用した報告^{28, 29}は少数であり、HCC のリキッドバイオプシーとして両方法を使用した報告は初である。さらに、メチル化感受性制限酵素を 1 種類のみ使用した場合には非メチル化 DNA の不完全処理となり、PCR 増幅が不成功となる場合があるが、我々は 3 種類のメチル化感受性制限酵素を用いることで、非メチル化 DNA を完全に処理することが可能となった。

CORD assay で測定した血清のメチル化 SEPT9 は healthy control 群や CLD 群と比較し、HCC 群で有意に高値であり、HCC 診断の感度 63.9%、特異度 90.0%であった。Epi proColon 2.0 CE®は cut off ≥ 2 として 3 回陽性であれば HCC と診断され、感度 88.7%、特異度 89.8%だと報告されている¹³。本検討での HCC 患者における BCLC stage 0, A の割合は 45.6% (62/136)であり、Epi proColon®の 32.3% (31/96)より高率であるが、直接比較ではない。さらに Epi proColon 2.0 CE®は

本邦では現在認可されていないため、両方法での臨床成績を比較するには今後の検討が必要であるう。

さらに、組織検体でのメチル化 SEPT9 についても検討を行ったところ、メチル化 SPET9 の中央値はそれぞれ腫瘍組織で 2,360 コピー、同一標本内の非腫瘍組織で 34 コピーであった。この結果は既報と一致しており²³、同一標本内の腫瘍部と非腫瘍部で明らかにメチル化 SEPT9 コピー数が異なることから、血清中で検出されるメチル化 SEPT9 は腫瘍部由来のものであると推察された。しかし、非腫瘍部からも低値ではあるがメチル化 SEPT9 が検出されることから、慢性的な肝障害により非腫瘍の肝細胞由来のメチル化 SEPT9 も血清中に一部含まれている可能性があると考えられる。

AFP は最も一般的な HCC の診断に用いられるマーカーであり、American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)では、AFP 測定及び/ないしは半年毎の腹部超音波検査での HCC の有無の評価を推奨している³。我々は AFP とメチル化 SEPT9 を組み合わせた HCC 診断能についても検討した。なお AFP の cut off 値は HCC スクリーニングとして AASLD が推奨している 20ng/mL と設定した³。AFP は肝細胞癌患者の 39.0%(52/136)で陽性となり、BCLC stage 0, A の患者は 8.1% (11/136)で陽性であった。それに対し、メチル化 SEPT9 は 63.2% (86/136)で陽性となり、BCLC stage 0, A の患者は 25.0% (34/136)で陽性であった。特に、メチル化 SEPT9 のみ陽性であった患者は 36.0%(49/136)であり、そのメチル化 SEPT9 のみ陽性であった患者 49 人のうち 28 人 (57.1%)は BCLC stage 0 ないしは A であった。すなわち、AFP とメチル化 SEPT9 を組み合わせることで早期 HCC の検出率を向上できると考えられた。さらにメチル化 SEPT9 の陽性率は NBNC 発癌とウイルス関連発癌において差がないため(P=0.67, Supplementary Table 1), NAFLD を含む NBNC 発癌の患者でも同様の検出能が期待できる。³⁻⁶。しかしながら、本検討では検体数が少ないため、大規模な集団での更なる検討が必要である。

近年早期 HCC の診断にメチル化 DNA マーカーパネルが効率的なリキッドバイオプシーであると報告されている^{29,30}。Xuら²⁹が開発したパネルは感度 83.3-85.7%、特異度 90.5-94.3%であり、Kisielら³⁰が開発したパネルは感度 95%、特異度 92%である。両パネルとも我々の方法より感度・特異度共に高い。しかし、これらのパネルは多数のマーカーを使用するため高額で、1mL 以上の血漿が必要となるため、HCC スクリーニングとして一般的に用いることは困難であると考えられる。

本研究はいくつかの制限がある。1 つ目は少ない施設から選択した患者であり、コホートサイズに限界がある。そのため、今後より大規模な患者群での検討が必要である。2 つ目は SEPT9 が HCC に特異的なマーカーではなく²³、大腸癌や頭頸部扁平上皮癌、乳癌といった種々の癌に関連する事である^{20,21}。以前我々は巨大大腸腺腫と大腸癌患者で血清メチル化 SEPT9 が有意に上昇している事を報告した¹⁷。本検討では healthy control 群は全例下部消化管内視鏡検査(CS)を施行しているが、腹部症状のない CLD や HCC 患者に CS を施行するのは困難であるため、CLD や HCC 患者の全例には CS 施行していない。メチル化 SPET9 が上昇している CLD 患者には大腸腫瘍の除外目的に下部

消化管内視鏡検査を施行することを推奨する。

6. 結語

高感度メチル化 SEPT9 は HCC 診断のリキッドバイオプシーとしての可能性を秘めている。

7. 謝辞

本研究において、山口大学検査部の方々によるデータ解析の支援に感謝いたします。また検体提供いただきました消化器・腫瘍外科の永野昭浩教授ならびに、ご指導いただきました臨床検査・腫瘍学の末廣 寛准教授、山崎隆弘教授および消化器内科学の坂井田 功教授に御礼申し上げます。

8. 参考文献

1. GLOBOCAN. New Global Cancer Data: GLOBOCAN 2018 | UICC
<https://www.uicc.org/new-global-cancer-data-globocan-2018>.
2. Valery PC, Laversanne M, Clark PJ, Petrick JL, McGlynn KA, Bray F. Projections of primary liver cancer to 2030 in 30 countries worldwide. *Hepatology* 2018;67:200-611.
3. Marrero JA, Kulik LM, Sirlin CB, Zhu AX, Finn RS, Abecassis MM, et al. Diagnosis, staging, and management of hepatocellular carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2018;68:723-750.
4. European Association of the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2018;69:182-236.
5. The Japan Society of Hepatology. Clinical Practice Guidelines for Hepatocellular Carcinoma 2013.
6. Omata M, Cheng AL, Kokudo N, Kudo M, Lee JM, Jia J, Tateishi R, et al. Asia-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatocellular carcinoma: a 2017 update. *Hepatol Int* 2017;11:317-370.
7. Kudo M. Surveillance, diagnosis, treatment, and outcome of liver cancer in Japan. *Liver Cancer* 2015;4:39-50.
8. van Meer S, de Man RA, Coenraad MJ, Sprengers D, van Nieuwkerk KM, Klumpen HJ, et al. Surveillance for hepatocellular carcinoma is associated with increased survival: results from a large cohort in the Netherlands. *J Hepatol* 2015;63:1156-1163.

9. Okajima W, Komatsu S, Ichikawa D, Miyamae M, Ohashi T, Imamura T, et al. Liquid biopsy in patients with hepatocellular carcinoma: Circulating tumor cells and cell-free nucleic acids. *World J Gastroenterol* 2017;23:5650-5668.
10. Su YH, Kim AK, Jain S. Liquid biopsies for hepatocellular carcinoma. *Transl Res* 2018;201:84-97.
11. Ye Q, Ling S, Zheng S, Xu X. Liquid biopsy in hepatocellular carcinoma: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Mol Cancer* 2019;18:114.
12. Potter NT, Hurban P, White MN, Whitlock KD, Lofton-Day CE, Tetzner R, et al. Validation of a real-time PCR-based qualitative assay for the detection of methylated SEPT9 DNA in human plasma. *Clin Chem* 2014;60:1183-1191.
13. Oussalah A, Rischer S, Bensenane M, Conroy G, Filhine-Tresarrieu P, Debard R, et al. Plasma mSEPT9: a novel circulating cell-free DNA-based epigenetic biomarker to diagnose hepatocellular carcinoma. *EBioMedicine* 2018;30:138-147.
14. Raizis AM, Schmitt F, Jost JP. A bisulfite method of 5-methylcytosine mapping that minimizes template degradation. *Anal Biochem* 1995;226:161-166.
15. Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res* 2001;29:E65-65.
16. Suehiro Y, Zhang Y, Hashimoto S, Takami T, Higaki S, Shindo Y, et al. Highly sensitive faecal DNA testing of TWIST1 methylation in combination with faecal immunochemical test for haemoglobin is a promising marker for detection of colorectal neoplasia. *Ann Clin Biochem* 2018;55:59-68.
17. Suehiro Y, Hashimoto S, Higaki S, Fujii I, Suzuki C, Hoshida T, et al. Blood free-circulating DNA testing by highly sensitive methylation assay to diagnose colorectal neoplasias. *Oncotarget* 2018;9:16974-16987.
18. Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2012;379:1245-1255.
19. Nygren AO, Dean J, Jensen TJ, Kruse S, Kwong W, van den Boom D, et al. Quantification of fetal DNA by use of methylation-based DNA discrimination. *Clin Chem* 2010;56:1627-1635.
20. Lofton-Day C, Model F, Devos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem* 2008;54:414-423.
21. Wasserkort R, Kalmar A, Valcz G, Spisak S, Krispin M, Toth K, et al. Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. *BMC Cancer* 2013;13:398.
22. Connolly D, Abdesselam I, Verdier-Pinard P, Montagna C. Septin roles in tumorigenesis. *Biol Chem* 2011;392:725-738.
23. Scott M, Hyland PL, McGregor G, Hillan KJ, Russell SE, Hall PA. Multimodality expression profiling shows SEPT9 to be overexpressed in a wide range of human tumours.

Oncogene 2005;24:4688-4700.

24. Kakehashi A, Ishii N, Shibata T, Wei M, Okazaki E, Tachibana T, et al. Mitochondrial prohibitins and septin 9 are implicated in the onset of rat hepatocarcinogenesis. *Toxicol Sci* 2011;119:61-72.
25. Villanueva A, Portela A, Sayols S, Battiston C, Hoshida Y, Méndez-González J, et al. DNA methylation-based prognosis and epidrivers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2015;61:1945-1956.
26. Song L, Li Y. The role of stem cell DNA methylation in colorectal carcinogenesis. *Stem Cell Rev* 2016;12:573-583.
27. Mohamed NA, Swify EM, Amin NF, Soliman MM, Tag-Eldin LM, Elsherbiny NM. Is serum level of methylated RASSF1A valuable in diagnosing hepatocellular carcinoma in patients with chronic viral hepatitis C? *Arab J Gastroenterol* 2012;13:111-115.
28. Hua D, Hu Y, Wu YY, Cheng ZH, Yu J, Du X, et al. Quantitative methylation analysis of multiple genes using methylation-sensitive restriction enzyme-based quantitative PCR for the detection of hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2011;91:455-460.
29. Huang ZH, Hu Y, Hua D, Wu YY, Song MX, Cheng ZH. Quantitative analysis of multiple methylated genes in plasma for the diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2011;91:702-707.
30. Huang A, Zhang X, Zhou SL, Cao Y, Huang XW, Fan J, et al. Detecting circulating tumor DNA in hepatocellular carcinoma patients using droplet digital PCR is feasible and reflects intratumoral heterogeneity. *J Cancer* 2016;7:1907-1914.
31. Xu RH, Wei W, Krawczyk M, Wang W, Luo H, Flagg K, et al. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Nat Mater* 2017;16:1155-1161.
32. Kisiel JB, Dukek BA, V S R Kanipakam R, Ghos HM, Yab TC, Berger CK, et al. Hepatocellular carcinoma detection by plasma methylated DNA: discovery, phase I pilot, and Phase II clinical validation. *Hepatology* 2019;69:1180-1192.
33. Matsui S, Kagara N, Mishima C, Naoi Y, Shimoda M, Shimomura A, et al. Methylation of the SEPT9_v2 promoter as a novel marker for the detection of circulating tumor DNA in breast cancer patients. *Oncol Rep* 2016;36:2225-2235.