

原 著

高感度DNAメチル化解析技術を用いた リキッドバイオプシーによる肝細胞癌スクリーニング： メチル化SSTとメチル化SEPT9の診断性能比較

山崎綾乃, 末廣 寛¹⁾, 星田朋美¹⁾, 佐伯一成²⁾, 山内(厚東)由里佳²⁾,
松本俊彦¹⁾, 高見太郎²⁾, 坂井田功²⁾, 山崎隆弘¹⁾

山口大学医学部医学科4年生 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)
山口大学大学院医学系研究科 臨床検査・腫瘍学講座(臨床検査医学)¹⁾ 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)
山口大学大学院医学系研究科 消化器内科学講座(内科学第一)²⁾ 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 肝細胞癌, AFP, メチル化DNA, 高感度メチル化解析法

和文抄録

【研究背景】肝細胞癌の腫瘍マーカー alpha-fetoprotein (AFP) は早期肝細胞癌に対する検査感度が低いため, 新たな検査の開発が必要である. この問題を解決する方法としてリキッドバイオプシーが挙げられる. 我々はメチル化Septin9 (SEPT9) をターゲットとするリキッドバイオプシーとAFP検査が早期肝細胞癌の診断に有用であることを報告している. 一方, Somatostatin (SST) の高度メチル化が肝細胞癌組織で認められており, 肝細胞癌のバイオマーカーと考えられている. 上述のSEPT9と同様, メチル化SSTをターゲットとするリキッドバイオプシーとAFPの併用検査が早期肝細胞癌の診断に有用と考えられるが, この点については未だ検証されていない. そこで, 本研究ではメチル化SSTとAFP併用検査による肝細胞癌診断性能を検証した. また, メチル化SEPT9とAFPの併用検査との肝細胞診断性能比較を行った.

【方法・材料】健康者群25人, 肝細胞癌を合併していない慢性肝疾患群15人, 肝細胞癌群38人(うち早期肝細胞癌19人)を対象とした. 被検者の血清からDNAを抽出後, 3種類のメチル化感受性制限酵素

を用いてDNAを処理し, Droplet digital PCRによりメチル化SEPT9及びメチル化SSTのコピー数を測定した.

【結果】非肝細胞癌群(健康者群+慢性肝疾患群)と肝細胞癌群の2群でReceiver operating characteristic曲線解析を行いArea under the curve (AUC) 値を比較したところ, メチル化SEPT9単独検査とAFP単独検査ではAUCはいずれも0.73であり, メチル化SST単独検査での0.59よりも高かった. 早期肝細胞癌群についても同様で, メチル化SEPT9単独とAFP単独のAUCはいずれも0.70であり, メチル化SSTでの0.61よりも高かった. メチル化SEPT9とAFPの併用検査とメチル化SSTとAFPの併用検査については, 陰性的中率は両者でほぼ同等であったが(全ステージ肝細胞癌75.0% vs. 72.2%, 早期肝細胞癌82.5% vs. 83.9%), 陽性的中率はメチル化SEPT9とAFP併用検査の方が優れていた(全ステージ肝細胞癌79.4% vs. 66.7%, 早期肝細胞癌63.2% vs. 50.0%).

【結論】肝細胞癌スクリーニングにおいて, AFPとの併用バイオマーカーとしてはメチル化SSTよりメチル化SEPT9の方が有用である可能性が高かった.

はじめに

原発性肝癌には肝細胞癌や肝内胆管癌があり、そのうち肝細胞癌が93%を占めている¹⁾。肝細胞癌を含む肝癌は罹患者の死亡率が約6割と高く²⁾、更に病期が進行するにつれて相対5年生存率は2.6%と著しく低下する³⁾。Alpha-fetoprotein (以下、AFP) は肝細胞癌の腫瘍マーカーである^{4, 5)}。全ステージの肝細胞癌と早期肝細胞癌に対するAFPの検査感度を比較した場合、Nakamuraらはそれぞれ62%、55%、Shangらは53%、46%と報告しており、早期肝細胞癌の検査感度が低い^{6, 7)}。このため、スクリーニング検査としてAFPが一般的に利用されるのは、慢性肝炎や肝硬変などの肝細胞癌発症のリスクの高い患者のみである⁴⁾。従って、早期肝細胞癌を発見するためにはAFP以外の新たな検査の開発が必要となってくる。肝細胞癌を早期発見するために様々なバイオマーカーが研究されているが、実用化には至っているものは少ない⁵⁾。現在期待されている検査にリキッドバイオプシーがある。リキッドバイオプシーを直訳すると液体生検であり、血漿や血清中に浮遊している癌細胞や腫瘍特異的な遺伝子変化を検出する方法である。組織生検による診断と比較すると患者への侵襲性が低く、安全かつ簡便で、繰り返し検査をすることができ、臨床利用できれば利点が多い。我々は、血清中のメチル化されたDNAを定量的に検出する高感度メチル化解析法を開発しており、本技術を用いて*Septin9* (以下、*SEPT9*) 遺伝子をターゲットとしたリキッドバイオプシー検査と血清AFPを併用することで早期肝細胞癌の検査感度が63%と、血清AFP単独での検査感度18%に比べて45%上昇するという結果を得ている⁸⁾。

一方、*SEPT9*以外の有用なバイオマーカー候補遺伝子として*Somatostatin* (以下、*SST*) が挙げられる⁹⁾。*SST*遺伝子は、*Somatostatin*をコードする遺伝子であり、*Somatostatin*は下垂体前葉からの成長ホルモン、消化管・膵臓からのガストリンやインスリン、グルカゴンなどのホルモン分泌を抑制する。様々な腫瘍組織において*SST*遺伝子が高度にメチル化され、遺伝子発現が抑制されていることから、*SST*遺伝子は癌抑制遺伝子として機能することが示唆されている^{9, 10)}。肝癌については、癌組織での

*SST*メチル化レベルの上昇は報告されているが⁹⁾、血清中のメチル化*SST*レベルの変化 (リキッドバイオプシー) はまだ検証されていない。今回、肝細胞癌群と非肝細胞癌群の血清メチル化*SST*レベルを調べ、血清AFPの併用マーカーとしてメチル化*SEPT9*とメチル化*SST*のどちらが肝細胞癌のスクリーニングとして有用であるかを検討した。

方法・材料

本研究は、ヘルシンキ宣言に基づいて倫理的に認可された研究であり、山口大学医学部附属病院 治験及び人を対象とする医学系研究等倫理審査委員会 (IRB) の承認を得て実施した。

材 料

2017年1月から2019年10月の間に山口大学医学部附属病院、西岐波セントヒル病院、阿知須共立病院で前向き及び後ろ向きに集積した78人を対象とした。被検者全員から文書でインフォームドコンセントを取得した。慢性肝疾患がなく大腸内視鏡検査でも異常の見られなかった25人を健常者群とした。肝細胞癌を合併していない慢性肝疾患患者15人を慢性肝疾患群、肝細胞癌を発症した38人を肝細胞癌群とした (表1)。肝細胞癌の進行度は、BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) staging systemの基準に従い、早期肝細胞癌はstage 0からstage Aまでとした¹¹⁾。

方 法

血液検体の採取

健常者群については、大腸内視鏡検査の前に血液検体を採取した。慢性肝疾患群については、直近3

表1 臨床病理学的背景

	健常者 n = 25	慢性肝疾患 n = 15	肝細胞癌	
			全ステージ n = 38	早期のみ n = 19
性別(人)				
男性	13	5	25	14
女性	12	10	13	5
平均年齢 (範囲)	48 (36-59)	70 (50-86)	72 (39-84)	74 (63-84)

ヵ月以内に画像診断で肝細胞癌のないことを確認したのち血液検体を採取し、更にエントリー後6ヵ月発癌がないことも確認した。肝細胞癌群は治療前に血液検体を採取した。採取した血液検体を1,200gで10分間遠心して血清を分離し、2 mLチューブに分注し、 -20°C で凍結保存した。

AFPの測定

AFPの血清濃度はEIA法で測定した。検査試薬はST Eテスト「TOSOH」II (AFP) (東ソー, 東京), 測定機器はAIA-2000 (東ソー, 東京)を用いた。

DNA抽出

冷凍保存した血清検体を解凍し、MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)を用いて0.4mLの血清からDNAを抽出し、50 μL の溶出液に溶出した。このDNA検体を -20°C で冷凍保存した。

メチル化解析

メチル化SEPT9及びメチル化SSTのコピー数の測定は本講座の高感度メチル化解析法を用いて行った^{12, 18)}。本技術は、血清から抽出したDNAを3種類のメチル化感受性制限酵素とエキソヌクレアーゼで処理し、Droplet digital PCR法を用いて定量的に測定する方法であり、以下に詳細を述べる。

(1) 酵素処理

まず、血清DNA 10 μL を解凍したのち、酵素反応液 5 μL と混合した。この酵素反応液はAmpliTaq Gold buffer II (Thermo Fisher Scientific, 東京) 1 μL と25mM MgCl₂ 1 μL 、3種類の酵素 (Hha I, Hpa II, Exo I) (全てThermo Fisher Scientific, 東京) 各 1 μL からなる。Hha IとHpa IIはメチル化感受性制限酵素であり、それぞれ5'-GCGC-3'と5'-CCGG-3'を認識して塩基配列を切断する。メチル化されたこの塩基配列は切断されずに残る。Exo Iはエキソヌクレアーゼであり、制限酵素による切断を受けなかった一本鎖DNAを分解し、これらがPCRによって増幅されるのを防ぐ。そして混合液を37 $^{\circ}\text{C}$ で16時間酵素反応させた。これを酵素反応処理済DNA溶液とした。次に、酵素BstUI (New England Biolabs, Hitchin, United Kingdom) 1 μL

を入れ、混合液を60 $^{\circ}\text{C}$ で16時間酵素反応させ、その後98 $^{\circ}\text{C}$ で10分加熱した。BstUIはメチル化感受性制限酵素であり、5'-CGCG-3'を認識して塩基配列を切断する。

(2) デジタルPCR

酵素反応終了後、酵素反応処理済DNA溶液 8 μL とPCR反応液14 μL を混合した。このPCR反応液はhTERT (human telomerase reverse transcriptase)とSEPT9又はSSTの20 μM プライマー-MIXと5 μM プローブ各 1 μL (計 4 μL)と、2 \times dd PCRマスターミックス (Bio-Rad, 東京) 10 μL からなる。

hTERTのプライマー及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'-CCTGGGAGCTCTGGGAATT-3'

Probe : 5'-VIC-CACACCTTTGGTCACTC-MGB-3'¹²⁾

SEPT9のプライマー及びプローブの塩基配列は以下の通りである。

Forward primer : 5'-GCCACCAGCCATCATGT-3'

Reverse primer : 5'-GTCCGAAATGATCCCATCCA-3'

Probe : 5'-FAM-CCGCGGTCAACGC-MGB-3'⁸⁾

SSTのプライマー及びプローブの塩基配列は以下の通りである。

Forward primer : 5'-AAAACAGAGGGAGACGGTTG-3'

Reverse primer : 5'-GAGTGGCTGGTCAAATCTA-3'

Probe : 5'-FAM-TGCTGCCTGCTGATCCGCGC-BHQ1-3'

このPCR反応液からAutomated droplet generator (Bio-Rad, 東京)を用いてDroplet (小水滴)を作り、サーマルサイクラーを用いて、95 $^{\circ}\text{C}$ で10分予熱したのち、94 $^{\circ}\text{C}$ で30秒熱変性・56 $^{\circ}\text{C}$ で60秒アニーリングという一連の操作を40回繰り返してDNAを増幅させたのちに98 $^{\circ}\text{C}$ で10分加熱した。QX100 droplet readerおよびQuantaSoft software

(いずれもBio-Rad, 東京)で対象遺伝子のコピー数を測定した。メチル化されていないSSTまたはSEPT9は3種類の制限酵素のいずれかに認識されて切断されるとPCRで増幅されないため検出されないが、メチル化されていると制限酵素の処理から逃れてPCRで増幅され、検出される。hTERTはヒトテロメア逆転写酵素遺伝子であり、通常ヒトが持つ遺伝子である。hTERTはこれらのメチル化感受性制限酵素に認識されず、PCRによって増幅されるので、反応が正常に行われたかどうかを判断する内部コントロールとして用いた。

(3) 統計解析

測定した3種類の検査マーカー(メチル化SEPT9, メチル化SST, AFP)と被験者の臨床病理学的背景の関係について統計学的に解析を行った。解析にはGraphPad Prism ver. 8 (GraphPad Software, CA, US)を使用し、Mann-Whitney検定とReceiver Operating Characteristic (以下, ROC)解析を行った。 $p < 0.05$ で有意差ありと判定した。

結 果

健常者群, 慢性肝疾患群, 肝細胞癌群の単独マーカーでの比較

AFP値の中央値は、健常者群3.3ng/mL, 慢性肝疾患群1.7ng/mL, 肝細胞癌群12.6ng/mLであった。慢性肝疾患群と肝細胞癌群の間、健常者群と肝細胞癌群の間には有意差が見られ(それぞれ $p = 0.0007$, $p = 0.0041$)、共に肝細胞癌群でAFP値が有意に上昇していた(図1A)。

メチル化SSTコピー数の中央値は、健常者群26.0コピー、慢性肝疾患群28.0コピー、肝細胞癌群44.0コピーであった。健常者群と慢性肝疾患群の間と慢性肝疾患群と肝細胞癌群の間、健常者群と肝細胞癌群の間いずれにも有意差が見られなかった(それぞれ $p = 0.4207$, $p = 0.1437$, $p = 0.1278$)。しかし、健常者群、慢性肝疾患群、肝細胞癌群と病態が進行するにつれてメチル化SSTのコピー数が増加する傾向が見られた(図1B)。

メチル化SEPT9コピー数の中央値は、健常者群1.8コピー、慢性肝疾患群2.0コピー、肝細胞癌群5.2コピーであった。健常者群と慢性肝疾患群の間には

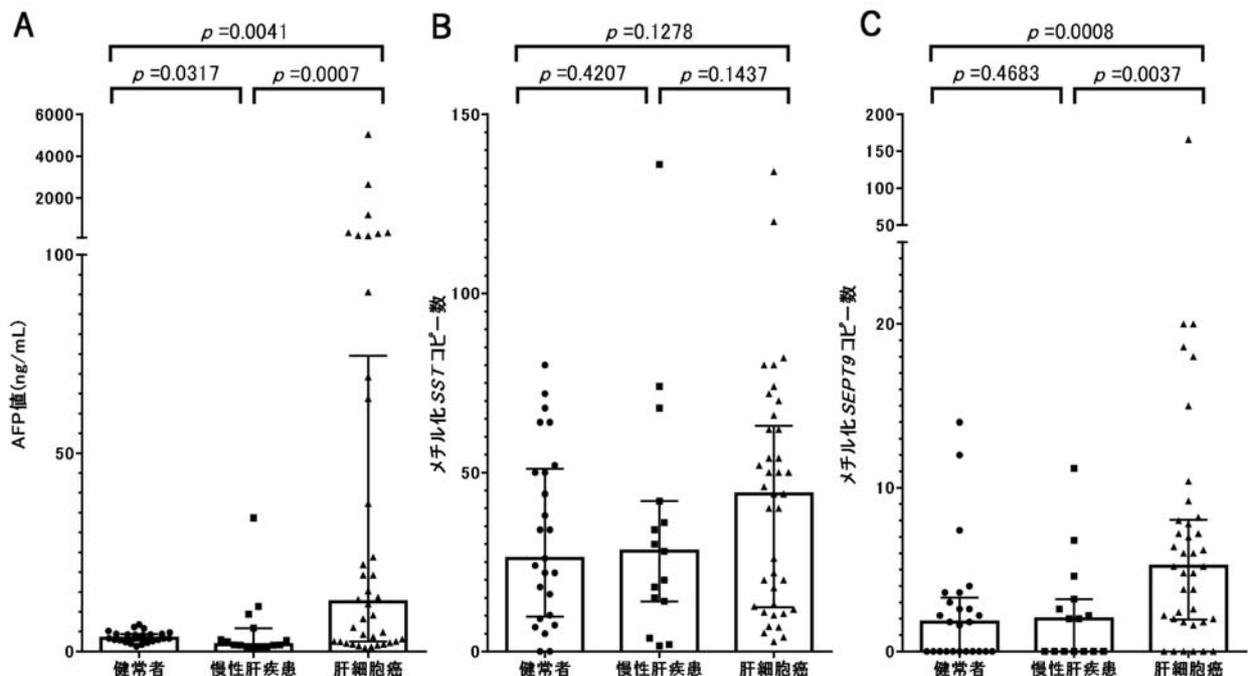


図1 健常者群と慢性肝疾患群, 肝細胞癌群における単独マーカーの分布. 血清AFP値 (A), 血清メチル化SSTコピー数 (B), 血清メチル化SEPT9コピー数 (C)

有意差が見られなかった ($p = 0.4683$)。慢性肝疾患群と肝細胞癌群の間、健常者群と肝細胞癌群の間には有意差が見られ (それぞれ $p = 0.0037$, $p = 0.0008$)、共に肝細胞癌群でメチル化SEPT9のコピー数が有意に増加していた (図1C)。

非肝細胞癌群と肝細胞癌群の単独マーカーでの比較

ROC解析では、肝細胞癌と非肝細胞癌を比較するために慢性肝疾患群と健常者群をまとめて非肝細胞癌群とした。非肝細胞癌群と全ステージの肝細胞癌群のROC解析において、Youden's indexを用いると、カットオフ値はメチル化SEPT9 3.7コピー、メチル化SST 39.0コピーであった。American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) のpractice guidanceに基づいてAFPのカットオフ値を20ng/mLと設定した¹³⁾。AFPの感度36.8% (14/38)、特異度97.5% (39/40)、メチル化SEPT9の感度63.2% (24/38)、特異度82.5% (33/40)、メチル化SSTの感度57.9% (22/38)、特異度67.5% (27/40) であった (表2)。Area Under the Curve (以下、AUC)は、AFP 0.73、メチル化SEPT9 0.73、メチル化SST 0.59であった (図2A)。

非肝細胞癌群と早期肝細胞癌群 (stage 0~A) については、AFPの感度15.8% (3/19)、特異度97.5% (39/40)、メチル化SEPT9の感度52.6% (10/19)、特異度82.5% (33/40)、メチル化SSTの感度63.2% (12/19)、特異度67.5% (27/40) であった (表2)。また、AUCは、AFP 0.70、メチル化SEPT9 0.70、メチル化SST 0.61であった (図2B)。

血清AFPとメチル化DNAの併用検査による肝細胞癌の診断性能

併用する2つの検査のどちらか一方が陽性、あるいは、両方陽性の場合を検査陽性とし、両方とも陰性の場合を検査陰性とした。非肝細胞癌群と肝細胞癌群を比較したところ、肝細胞癌の検査感度と特異度、陽性的中率、陰性的中率は、AFPとメチル化SEPT9の併用検査では71.1% (27/38)、82.5% (33/40)、79.4% (27/34)、75.0% (33/44)、AFPとメチル化SSTの併用検査では73.7% (28/38)、65.0% (26/40)、66.7% (28/42)、72.2% (26/36) であった。早期肝細胞癌群のみに対象を限定した場合は、AFPとメチル化SEPT9の併用検査ではそれ

表2 単独バイオマーカーによる肝細胞癌スクリーニング性能比較

	AFP	メチル化SEPT9	メチル化SST
全ステージ肝細胞癌			
感度	36.8% (14/38)	63.2% (24/38)	57.9% (22/38)
特異度	97.5% (39/40)	82.5% (33/40)	67.5% (27/40)
早期肝細胞癌			
感度	15.8% (3/19)	52.6% (10/19)	63.2% (12/19)
特異度	97.5% (39/40)	82.5% (33/40)	67.5% (27/40)

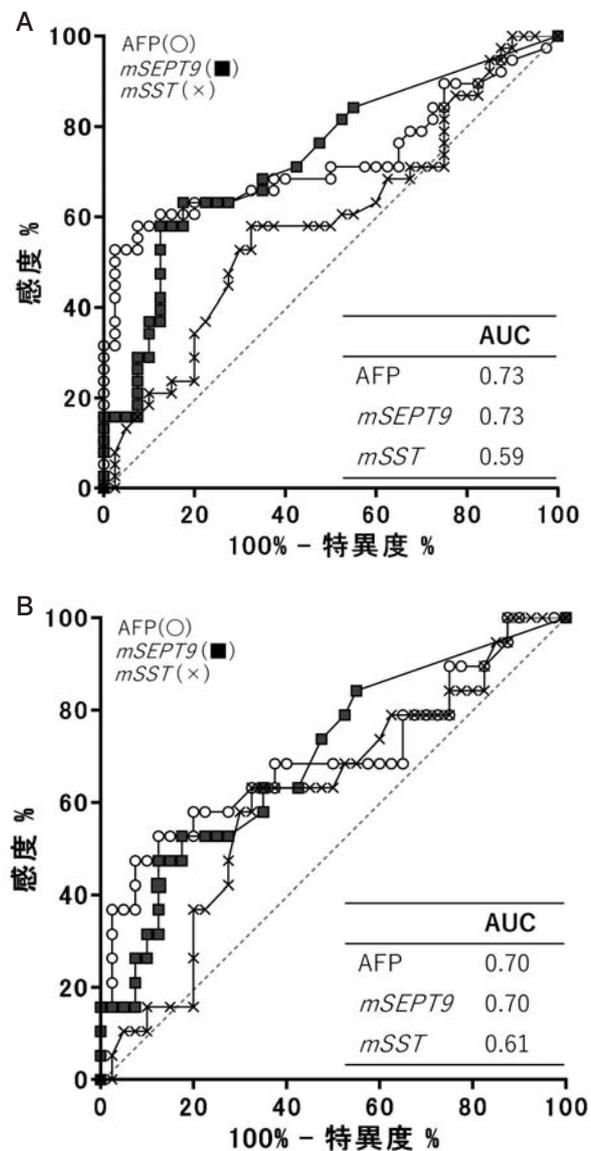


図2 非肝細胞癌群と肝細胞癌群 (全ステージ) のROC曲線 (A)、非肝細胞癌群と早期肝細胞癌群 (stage 0~A) のROC曲線 (B)

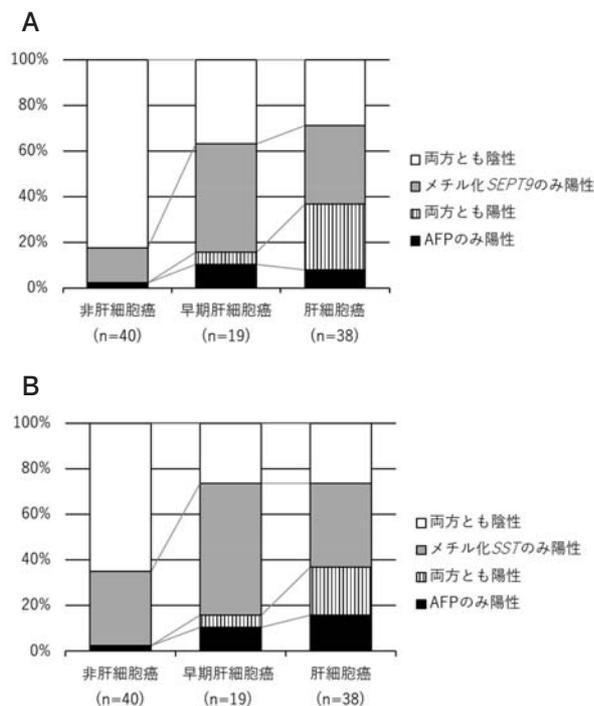


図3 AFPとバイオマーカーの併用による肝細胞癌および早期肝細胞癌の検査性能比較. AFPとメチル化SEPT9の併用 (A), AFPとメチル化SSTの併用 (B)

表3 併用検査による肝細胞癌スクリーニング性能比較

	AFP+メチル化 SEPT9	AFP+メチル化 SST
全ステージ肝細胞癌		
感度	71.1% (27/38)	73.7% (28/38)
特異度	82.5% (33/40)	65.0% (26/40)
陽性的中率	79.4% (27/34)	66.7% (28/42)
陰性的中率	75.0% (33/44)	72.2% (26/36)
早期肝細胞癌		
感度	63.2% (12/19)	73.7% (14/19)
特異度	82.5% (33/40)	65.0% (26/40)
陽性的中率	63.2% (12/19)	50.0% (14/28)
陰性的中率	82.5% (33/40)	83.9% (26/31)

それぞれ63.2% (12/19), 82.5% (33/40), 63.2% (12/19), 82.5% (33/40), AFPとメチル化SSTの併用検査では73.7% (14/19), 65.0% (26/40), 50.0% (14/28), 83.9% (26/31)であった (図3, 表3).

考 察

肝細胞癌のリキッドバイオプシー

リキッドバイオプシーは体液中 (血清, 血漿, 尿,

唾液, 便) に存在している腫瘍由来物質を非侵襲的に, あるいは, 採血など軽微な侵襲を伴って採取し, 解析する方法である. 検査のターゲット物質としては, 腫瘍由来の物質であればよく, 腫瘍細胞, 遺伝子変異, メチル化遺伝子, エクソソーム, マイクロRNA, 蛋白などがある. 血液中を循環しているDNAをCell free DNA (cfDNA) と言い, その中で, 腫瘍由来のDNAをCirculating tumor DNA (ctDNA) という. 肝細胞癌のctDNAについては, 変異遺伝子としてのTP53, CTNBL1, TERTが報告されており, メチル化遺伝子については今回取り上げたSEPT9以外にp15, p16, APC, SPINT2, SFRP1, p16INK4a, TFPI2, GSTP1, VIM, FBLN1などが報告されている⁵⁾.

血清メチル化SST

Manoochehriらは, 肝臓癌だけでなく, 膵臓癌, 食道癌, 胃癌, 大腸癌, 乳癌, 肺癌, 前立腺癌, 頭頸部癌, 膀胱癌, 腎臓癌において, 癌部のSSTのメチル化レベルが健常部と比較して有意に上昇することから, メチル化SSTが種々の癌のバイオマーカーとなりうることを報告している. ただし, 組織レベルでの検討のみであり, メチル化SSTをターゲットとしたリキッドバイオプシーの報告例は膵臓癌以外にはこれまでなかった⁹⁾. 今回の研究では, 肝細胞癌患者群において非肝細胞癌群と比較して血清中でSSTのメチル化レベルが高いことが分かった. これは肝細胞癌でのメチル化SSTをターゲットとしたリキッドバイオプシーについて世界で初めての報告である.

血清メチル化SEPT9

SEPT9は真核生物に高度に保存された重合性グアノシン三リン酸 (GTP) 結合タンパク質をコードするseptin (SEPT) ファミリーに属する. 一般にseptinは細胞質分裂や細胞骨格形成に関与していることが知られているが, 癌化やアポトーシスにも関与しているという報告もある^{14, 15)}. SEPT9は細胞分裂に関わっていて, フィラメントを形成し, アクチンやテブリンといった細胞骨格と共存する¹⁵⁾. SEPT9は大腸癌組織においてエピジェネティックな修飾を受けており, メチル化SEPT9が大腸癌のバイオマーカーであることが報告されている. 実際には, Food and Drug Administration (FDA) によ

りメチル化SEPT9をターゲットとしたリキッドバイオプシーが大腸がんのスクリーニング検査として承認されている¹⁵⁾。さらには、肝臓の診断にもメチル化SEPT9をターゲットとしたリキッドバイオプシーが有効であるという先行研究がある^{8, 16)}。そこで、今回の研究ではメチル化SEPT9をメチル化SSTの比較対象とした。

健常者群、慢性肝疾患群、肝細胞癌群の単独マーカーでの比較

肝細胞癌群の血清中のメチル化SSTコピー数について、健常者群および慢性肝疾患群と比較したところ、病期の進行とともに増加する傾向が見られたが、両者に有意差は見られなかった。一方、血清中AFP値とメチル化SEPT9コピー数については、肝細胞癌群の方が健常者群および慢性肝疾患群よりも有意に高値であった。以上から単独マーカーとしては、AFPおよびメチル化SEPT9はメチル化SSTよりも肝細胞癌診断性能に優れていた。

血清SSTメチル化レベルは健常者群に比べて慢性肝疾患群でも増加の傾向が見られたことから、血清中で検出されたメチル化SSTの増加量は腫瘍組織由来だけでなく、慢性的な肝組織の障害も原因であると考えられる。また、組織レベルでのSSTメチル化は肝細胞癌だけではなく、膵臓や胃、乳房、大腸などの癌でも報告されており⁹⁾、検出された血清中のメチル化SSTはこれら由来のものが含まれている可能性も考えられる。実際に、今回の被験者の選定にあたり、大腸内視鏡検査を行ったのは健常者群に対してのみであり、慢性肝疾患群と肝細胞癌群に対しては行っていない。そのため、慢性肝疾患群や肝細胞癌群においてメチル化SSTが高かった症例の中には大腸腫瘍や他の腫瘍を持っている患者が含まれていた可能性は否定できない。

消化管がんにおいてSST受容体の発現レベル増加^{17, 18)}やSSTメチル化によるSST発現低下^{9, 10, 19, 20)}が報告されており、Manoochehriらによりフィードバック機構の可能性が示唆されている⁹⁾。一方、肝細胞癌でもSST受容体の発現が亢進していることから²¹⁾、肝細胞癌でもこのフィードバック機構が働いている可能性が考えられる。肝臓疾患組織でのSSTメチル化レベル、SST発現量およびSST受容体発現量を同時に比較した報告例はまだないため、今後はこ

れらの点について検討する必要がある。さらには、同一患者の組織と血清でSSTメチル化レベルを比較した報告はまだないため、この点についても今後検討する必要がある。

非肝細胞癌群と肝細胞癌群の単独マーカーでの検査性能の比較

ROC解析では、肝細胞癌と非肝細胞癌を比較するために慢性肝疾患群と健常者群をまとめて非肝細胞癌群とした。ROC曲線のYouden's indexによって定めたカットオフ値に従い、メチル化SEPT9とメチル化SSTの感度・特異度を求めると、全ステージの肝細胞癌ではメチル化SEPT9の方がメチル化SSTよりも感度・特異度ともに高い値であった。ただし、メチル化SEPT9とメチル化SSTの感度・特異度のどちらかを一致させての比較ではないため、直接的な臨床性能比較はできない。そこで、ROC曲線のAUCを比較してみたところ、全ステージの肝細胞癌について、メチル化SEPT9はAFPのAUCの値と等しく、メチル化SSTのAUCよりも高かった(図2A)。早期肝細胞癌についても同様の結果であった(図2B)。一般的にAUC 0.9以上であれば診断能力の高い検査、AUC 0.7-0.9では中程度の診断能力の検査、AUC 0.5-0.7では診断能力の低い検査とされる²²⁾。メチル化SSTの全ステージ及び早期肝細胞癌のAUCはそれぞれ0.59, 0.61、メチル化SEPT9とAFPは同じ値でありそれぞれ0.73, 0.70であったことから、臨床検査としての有用性はメチル化SST単独では低く、メチル化SEPT9の方が優れていた。

AFPについてはAASLDで推奨されているカットオフ値20ng/mLを用いた¹³⁾。今回の検討では全ステージの肝細胞癌で感度36.8%、特異度97.5%、早期の肝細胞癌で感度15.8%、特異度97.5%であった。しかし、他研究者らの報告では全ステージの肝細胞癌で感度37~74%、特異度48~98%、早期の肝細胞癌で感度38~59%、特異度61~93%であり²³⁾、今回の検討で得られた感度は著しく低かった。これは今回の研究で集積した検体数が少なかったことや、先行研究と比べてウイルス性肝細胞癌と非ウイルス性肝細胞癌の割合が異なっていた可能性があることが影響したと考えられる。ウイルス性肝細胞癌は非ウイルス性肝細胞癌に比べてAFPが高いという報告もあり²⁴⁾、今後はさらに数を増やすとともに、患者

の臨床病理学的背景を十分調査したうえで、AFPの臨床検査性能を再検討する必要がある。

血清AFPとメチル化DNAの併用検査による肝細胞癌の診断性能

本研究の最終的な目標はメチル化SSTが肝細胞癌(stage 0~A)のスクリーニング検査においてAFPと併用する検査として有用であるかどうかの検証である。AFP単独での検査結果と、メチル化SST又はSEPT9を併用した検査結果を比較して、感度・特異度・陽性的中率・陰性的中率を比較した。

AFPとメチル化SEPT9を併用した場合、AFP単独と比較して感度は全ステージの肝細胞癌で71.1%と34.2%の検査感度向上を認め、早期の肝細胞癌でも63.2%と47.4%の感度向上を認めた。AFPとメチル化SSTを併用した場合、感度は全ステージの肝細胞癌、早期の肝細胞癌含めて同等の結果(感度73.7%)となり、それぞれAFP検査単独よりも36.8%、57.9%の感度向上を認めた。感度の面では、AFPとメチル化SSTを併用する検査の方が優れていた。しかし、特異度および陽性的中率、陰性的中率については、AFPとメチル化SEPT9を併用した方が、AFPとメチル化SSTを併用した場合よりも全般的に優れていた。検査特異度においては、複数の検査を併用する場合、共に陰性の場合のみを検査陰性とするので、単体の検査の場合と比較すると特異度は低下しやすい。そのため、AFP単独の検査よりもメチル化SEPT9またはメチル化SSTを併用した検査で特異度が下がったと考えられる。また、臨床での検査ではコストを考慮することは重要である。スクリーニング検査によって疾病の疑いが生じると、更により詳細な検査をすることになる。偽陽性が多く生じると、必要以上の確認検査が増加しコストも増大する。AFPとメチル化SSTを併用した場合には偽陽性が14例であったのに対してAFPとメチル化SEPT9を併用した場合には7例であった。これらより、臨床ではAFPとメチル化SEPT9を併用する検査の方がスクリーニング検査としては有用であると考えられた。

結 論

肝細胞癌スクリーニングのためのAFPとの併用

検査の組み合わせの対象は、血清メチル化SEPT9の方が血清メチル化SSTよりも有用であった。ただし、被験者数が78人と少ないこと、コントロール群、慢性肝疾患群、肝細胞癌群の男女比、年齢分布などが完全にマッチしていないなどの理由により予備的な研究結果に過ぎない。今後も症例数を増やして検証試験を行い、血清メチル化SEPT9やメチル化SSTの肝癌バイオマーカーとしての有用性を比較検討する必要がある。

引用文献

- 1) 工藤正俊, 泉 並木, 久保正二, ほか. 第20回全国原発性肝癌追跡調査報告(2008~2009). 肝臓 2019; 60: 8: 258-293.
- 2) 国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」 https://ganjoho.jp/reg_stat/index.html (参照2020-12-04)
- 3) がん診療連携拠点病院等 院内がん登録2010-2011年5年生存率集計 報告書 https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/brochure/hosp_c_reg_surv.html (参照2020-12-04)
- 4) 一般社団法人 日本肝臓学会. 第1章 診断およびサーベイランス. 肝癌診療ガイドライン2017年版. 23-64.
- 5) Mocan T, Simão AL, Castro RE, et al. Liquid Biopsies in Hepatocellular Carcinoma: Are We Winning? *J Clin Med* 2020; 9: 1541-1566.
- 6) Nakamura S, Nouse K, Sakaguchi K, et al. Sensitivity and Specificity of Des-Gamma-Carboxy Prothrombin for Diagnosis of Patients with Hepatocellular Carcinomas Varies According to Tumor Size. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2038-2043.
- 7) Shang S, Plymoth A, Ge S, et al. Identification of Osteopontin as a Novel Marker for Early Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 2012; 55: 2: 483-490.
- 8) Kotoh Y, Suehiro Y, Saeki I, et al. Novel Liquid Biopsy Test Based on a Sensitive Methylated SEPT9 Assay for Diagnosing Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology Communication* 2020; 4: 461-470.

- 9) Manoochehri M, Wu Y, Giese NA, et al. SST gene hypermethylation acts as a pan-cancer marker for pancreatic ductal adenocarcinoma and multiple other tumors : toward its use for blood-based diagnosis. *Mol Oncol* 2020 ; **14** : 1252-1267.
- 10) Mori Y, Cai K, Cheng Y, et al. A genome-wide search identifies epigenetic silencing of somatostatin, tachykinin-1, and 5 other genes in colon cancer. *Gastroenterology* 2006 ; **131** : 797-808.
- 11) Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2012 ; **379** : 1245-1255.
- 12) Suehiro Y, Zhang Y, Hashimoto S, 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.
- 13) Marrero JA, Kulik LM, Sirlin CB, et al. Diagnosis staging and management of hepatocellular carcinoma : 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Disease. *Hepatology* 2018 ; **68** : 723-750.
- 14) Kakehashi A, Ishii N, Shibata T, et al. Mitochondrial prohibitins and septin 9 are implicated in the onset of rat hepatocarcinogenesis. *Toxicol Sci* 2011 ; **119** : 61-72.
- 15) Wasserkort R, Kalmar A, Valcz G, et al. Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. *BMC Cancer* 2013 ; **13** : 398.
- 16) Oussalah A, Rischer S, Bensenane M, et al. Plasma mSEPT9 : a novel circulating cell-free DNA-based epigenetic biomarker to diagnose hepatocellular carcinoma. *EBioMedicine* 2018 ; **30** : 138-147.
- 17) Zhao WY, Zhuang C, Xu J, et al. Somatostatin receptors in gastrointestinal stromal tumors : new prognostic biomarker and potential therapeutic strategy. *Am J Transl Res* 2014 ; **6** : 831-840.
- 18) Qiu CZ, Wang C, Huang ZX, et al. Relationship between somatostatin receptor subtype expression and clinicopathology, Ki-67, Bcl-2 and p53 in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2006 ; **12** : 2011-2015.
- 19) Jackson K, Soutto M, Peng D, et al. Epigenetic silencing of somatostatin in gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2011 ; **56** : 125-130.
- 20) Leiszter K, Sipos F, Galamb O, et al. Promoter Hypermethylation-related reduced somatostatin production promotes uncontrolled cell proliferation in colorectal cancer. *PLoS ONE* ; **10** : 1-17.
- 21) Reynaert H, Rombouts K, Vandermonde A, et al. Expression of somatostatin receptors in normal and cirrhotic human liver and in hepatocellular carcinoma. *Gut* 2004 ; **53** : 1180-1189.
- 22) Akobeng AK. Understanding diagnostic test 3 : receiver operating characteristic curves. *Acta Paediatr* 2007 ; **96** : 644-647.
- 23) Li C, Zhang Z, Zhang P, et al. Diagnostic accuracy of des-gamma-carboxy prothrombin versus alpha-fetoprotein for hepatocellular carcinoma : A systematic review. *Hepatol Res* 2014 ; **44** : E11-25.
- 24) 河合弘一, 野本 実, 青柳 豊. 肝細胞癌を合併した非B非C肝硬変の臨床的特徴. 高後 裕, 青柳 豊, 橋本悦子, 西口修平, 鈴木康秋, 大竹孝明. 我が国における非B非C肝硬変の実態調査 2011. 響文社. 札幌, 2012 ; 27-31.

Liquid Biopsy Test Based on a Sensitive DNA Methylation Assay for Diagnosing Hepatocellular Carcinoma : Which Is a Better Marker, Methylated *SST* Or *SEPT9*?

Ayano YAMASAKI, Yutaka SUEHIRO¹⁾,
Tomomi HOSHIDA¹⁾, Issei SAEKI²⁾,
Yurika YAMAUCHI (KOTOH)²⁾,
Toshihiko MATSUMOTO¹⁾, Taro TAKAMI²⁾,
Isao SAKAIDA²⁾ and Takahiro YAMASAKI¹⁾

Department of Medicine, Yamaguchi University School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan 1) Department of Oncology & Laboratory Medicine (Clinical Laboratory Science), Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan 2) Department of Gastroenterology and Hepatology (Internal Medicine I.), Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

SUMMARY

We performed this study to investigate whether

serum cell-free DNA testing (liquid biopsy) of either methylated *SEPT9* or methylated *SST*, which are possible biomarkers of HCC, in combination with AFP may improve clinical performance for the detection of HCC. Study subjects included 25 healthy controls, 15 patients with chronic liver disease without HCC, and 38 patients with HCC. Methylation level of serum cell-free *SEPT9* and *SST* was measured by methylation-sensitive restriction enzymes followed by multiplex droplet digital polymerase chain reaction. According to receiver operating characteristic curve analysis to discriminate between non-HCC group (including control group and chronic liver disease without HCC group) and HCC group, area under the curve (AUC) was 0.73 by AFP and 0.73 by *mSEPT9*, whereas it was only 0.59 by *mSST*. Regarding combination tests, although negative predictive values were almost same between the AFP + *mSEPT9* test and the AFP + *mSST* test (75.0% vs 72.2%), a positive predictive value of AFP + *mSEPT9* test was higher than that of the AFP + *mSST* test (79.4% vs. 66.7%). In conclusions, methylated *SEPT9* was a better companion marker of AFP for HCC screening than methylated *SST*.