

学位論文（博士）

Combination Assay of Methylated *HOXA1* with Tumor
Markers Shows High Sensitivity for Detection of Early-
Stage Hepatocellular Carcinoma

（メチル化 *HOXA1* と腫瘍マーカーの組み合わせ検査
は早期肝細胞癌検出能に対して高い検査感度を示す）

氏名 國宗 勇希

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 臨床検査・腫瘍学講座

令和6年4月

目 次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	4
3. 方法	4
(1) 対象	4
(2) 方法	5
(3) 解析	6
4. 結果	6
5. 考察	12
6. 結語	15
7. 謝辞	15
8. 参考文献	16

1. 要旨

はじめに

肝炎ウイルス関連肝細胞癌（ウイルス性 HCC）患者は、肝炎制御の向上により減少しているが、非ウイルス関連肝細胞癌（非ウイルス性 HCC）患者は日本で増加している。非ウイルス性 HCC 患者に対する確立されたサーベイランスシステムは存在せず、進行した段階で診断されることが多い。この問題に対処するため、本研究を行った。

方法

516 人の参加者（健常者 154 人、HCC のない慢性肝疾患[CLD]患者 93 人、HCC 患者 269 人）から血清サンプルを収集した。参加者は、健常者と CLD 患者からなる対照群と HCC 群に分けた。我々は改良型 combined restriction デジタル PCR (CORD) アッセイ（1 ステップ CORD アッセイ）を用いて血清中のメチル化 *HOXA1* (m-*HOXA1*) のコピー数を評価した。HCC の腫瘍マーカーである Alpha-fetoprotein (AFP) および Des-gamma-carboxy prothrombin (DCP) と比較して m-*HOXA1* の診断性能を評価し、さらに HCC 診断予測を改善するための新規インデックスを作成した。

結果

血清 m-*HOXA1* レベルは、各 HCC ステージ群において対照群と比較し、有意に高かった。HCC 診断における感度は 69.1%、特異度は 78.5%であった。m-*HOXA1* の曲線下面積 (AUC) は AFP より優れており、DCP と同等であった。多変量ロジスティック回帰分析により、m-*HOXA1*、DCP、AFP の順に HCC 診断に対する独立した寄与が明らかになった（年齢および性別で調整）。我々は回帰モデルに基づく HCC の予測モデル式である ASDAm-H1 インデックス (Age, Sex, DCP, AFP, and m-*HOXA1*) を作成した。このインデックスの診断精度は AUC で 0.96、感度は 86.2%、特異度は 93.9%であった。感度はウイルス性および非ウイルス性 HCC に対して同等であった。早期 HCC に限定すると、ASDAm-H1 インデックスの感度は 76.3%であった。

結論

ASDAm-H1 インデックスは、ウイルス性および非ウイルス性 HCC を早期段階でも検出する優れた性能を示した。このインデックスは非ウイルス性 HCC サーベイランスシステムとしての可能性を秘めている。

2. 研究の背景

肝臓癌は罹患率の第6位、死亡率の第3位を占める。毎年約90万人が罹患し、約83万人がこの癌で死亡している¹⁾。肝細胞癌(HCC)は原発性肝癌の約90%を占める。早期HCCの5年生存率は70%であるが、進行期HCCの中央値生存期間は約1~1.5年である²⁾。進行期HCC患者の予後は厳しいため、予後を改善する最善の方法は早期発見である。

Alpha-fetoprotein (AFP) は、HCCサーベイランスに広く使用されている³⁾。日本では、AFP、Des-gamma-carboxy prothrombin (DCP)、およびAFP-L3の3つの腫瘍マーカーがHCCの補助診断マーカーとして推奨されている⁴⁾。これら3つの腫瘍マーカーと画像検査を使用したHCCサーベイランスシステムにより、日本のHCC患者は他国に比べて早期に診断される傾向がある⁵⁾。しかし、このサーベイランスシステムは主にウイルス性HCC(ウイルス性HCC)を対象としているため⁴⁾、非ウイルス性HCC(非ウイルス性HCC)患者はしばしば進行期に診断される。そのため、HCCの病因に関係のない新しいサーベイランスシステムが必要である。

これらの問題を解決するために、我々は以前、メチル化遺伝子の高感度定量化技術であるcombined restriction デジタルPCR (CORD) アッセイを開発し⁶⁾、その技術をメチル化 *SEPT9* のリキッドバイオプシーとしてHCCの検出に応用した⁷⁾。HCCのもう一つの候補バイオマーカーとして、メチル化 Homeobox A1 (m-*HOXA1*) がある⁸⁻¹⁰⁾。*HOX* 遺伝子は、アポトーシス、発生、受容体シグナル伝達、分化、運動性、血管新生などに重要な役割を果たし¹¹⁾、HCC組織で *HOXA1* の高メチル化が報告されている⁸⁾。m-*HOXA1* はHCCの有用なバイオマーカーであると思われるが、CORDアッセイを使用したm-*HOXA1* の診断性能に関する報告はない。

本研究では、従来のCORDアッセイの処理時間を短縮するために改良型CORDアッセイを開発した。この改良型CORDアッセイを使用して、HCC検出のためのm-*HOXA1* の臨床的意義を評価した。さらに、年齢、性別、腫瘍マーカー(DCP、AFP)、およびm-*HOXA1* からなる新規インデックスを作成し、HCC予測の改善を目指し、その診断性能も評価した。

3. 方法

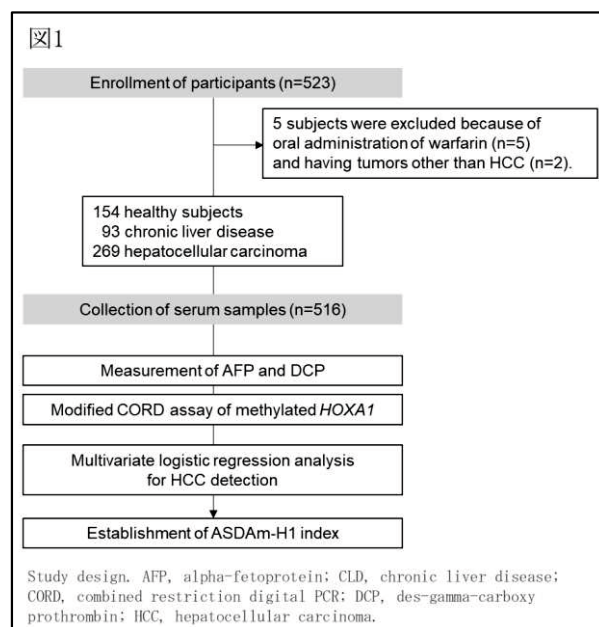
(1) 対象

前向き研究として2016年12月から2022年1月にかけて、山口大学病院、セントヒル病院、阿知須共立病院で523人の参加者を登録した。他の腫瘍を持つか、ワルファリンを服用している理由にて、7人の参加者は除外した。血液サンプルは、参加者が受けるいかなる医療処置の前に収集された。最終的に、516人の参加者から血清サンプルが収集された。対象者は、健常者154人、HCCのない慢性肝疾患(CLD)患者93人、およびHCC患者269人であった(図1)。

(2) 方法

サンプル準備とDNA抽出

血清サンプルはDNA抽出まで-80°Cで保管した。血清サンプルを解凍した後、その一部をAFPおよびDCPの測定に使用した。さ



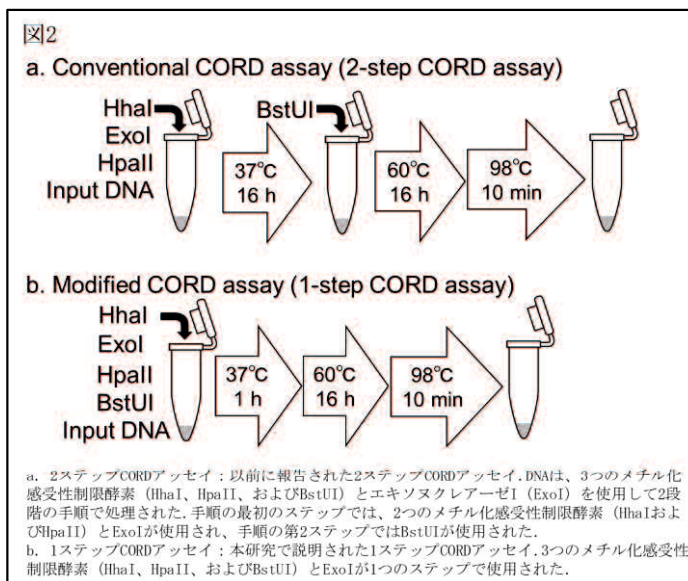
らに、各血清サンプル 1.0 mL を用いて、メーカーの指示に従い Maxwell DNA 精製キット（プロメガ、マディソン、WI, USA）で DNA を抽出した。DNA は 60 μ L の溶出バッファーに溶出した。

AFP および DCP

血清 AFP および DCP レベルは、AIA-CL2400 全自動化学発光酵素免疫測定システム（すべて東ソー、東京、日本）上の AIA-packCL AFP キットおよび AIA-packCL PIVKAI キットを使用して測定した。

m-HOXAI の 1 ステップ CORD アッセイ

従来の CORD アッセイでは、DNA をメチル化感受性制限酵素（HhaI および HpaII）およびエキソヌクレアーゼ I（ExoI）（すべて Thermo Fisher Scientific、ウォルサム、MA, USA）で 16 時間 37 $^{\circ}$ C で処理し、その後、さらに別のメチル化感受性制限酵素である BstUI（New England Biolabs、Hitchin、UK）で 16 時間 60 $^{\circ}$ C で追加処理する 2 ステップの手順を使用していた（図 2a）^{6, 7}。手順を簡略化し、制限酵素反応の時間をさらに短縮するために、すべての酵素を同時に処理する改良型 CORD



アッセイ、すなわち 1 ステップ CORD アッセイを開発した（図 2b）。反応混合液は、抽出した DNA 10 μ L、25 mmol/L MgCl₂ の 1 μ L、10 \times AmpliTaq Gold Buffer II の 1 μ L（いずれも Thermo Fisher Scientific）、HhaI（10 U/ μ L）の 1 μ L、HpaII（10 U/ μ L）の 1 μ L、ExoI（20 U/ μ L）の 1 μ L、および BstUI（10 U/ μ L）の 1 μ L から成る。反応混合液を 1 時間 37 $^{\circ}$ C で、次に 16 時間 60 $^{\circ}$ C でインキュベートし、最終的に 10 分間 98 $^{\circ}$ C で加熱した。ドロップレットデジタル PCR を実行して m-HOXAI の絶対コピー数をカウントした。m-HOXAI には HpaII の認識部位があり、その部位がメチル化されている場合、これらの酵素による消化を回避し、PCR によって増幅される。PCR 反応溶液は、酵素処理された DNA（0.1 mL 血清に相当する DNA 量）8 μ L、2 \times ddPCR super mix for probes（Bio-Rad、ヘラクレス、CA, USA）、各プライマー 0.25 μ mol/L、プローブ 0.125 μ mol/L を含む 20 μ L である。HOXA 検出用プライマー/プローブ配列はフォワードプライマー：5' -CCCATGGAGGAAGTGAGAAA-3'、リバープライマー：5' -GGGGTATTCCAGGAAGGAGT-3'、プローブ：5' -FAM-GCACAGTCACGCCGG-MGB-3' である。PCR 産物の長さは 62 bp である^{14, 15}。自動ドロップレットジェネレーター（Bio-Rad）でドロップレットを作成した後、以下の PCR 条件で T100 サーマルサイクラー（Bio-Rad）を使用して PCR を実行した：94 $^{\circ}$ C で 10 分間、94 $^{\circ}$ C で 30 秒、56 $^{\circ}$ C で 60 秒のサイクルを 40 回、98 $^{\circ}$ C で 10 分間。QX200 ドロップレットリーダー（Bio-Rad）を使用して蛍光強度を測定し、QuantaSoft Analysis Pro Software（Bio-Rad）を使用して分析した（図 1）。血清 1 mL あたりのコピー数を決定した。

(3) 解析

Mann-Whitney U 検定を使用して、2 群間の数値変数の差を比較した。Kruskal-Wallis 検定および Dunn の多重比較検定を使用して、複数群間の数値変数の差を比較した。カテゴリ変数は χ^2 検定または Fisher の確率検定を使用して解析した。最適なカットオフ値は、Receiver operating characteristic (ROC) 曲線から Youden Index により決定した。多変量ロジスティック回帰分析を実施して、HCC 診断に寄与する独立因子の探索を行った (図 1)。

統計的有意性は p 値 0.05 未満と定義した。統計解析には、GraphPad Prism ver.9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) および StatFlex ver. 7.0 (アーテック株式会社、大阪、日本) を使用した。

4. 結果

被験者の特徴

表 1 には参加者の臨床的特徴を示している。我々は患者を、B 型肝炎ウイルス (HBV) 関連の慢性肝疾患 (CLD) または肝細胞癌 (HCC)、C 型肝炎ウイルス (HCV) 関連の CLD または HCC、HBV および HCV 関連の CLD または HCC、および非ウイルス性 CLD または HCC に分類した。HBV-CLD または HCC は B 型肝炎表面抗原 (HBs Ag) 陽性と定義し、HCV-CLD または HCC は HCV 抗体 (HCV Ab) 陽性と定義した。HBV+HCV-CLD または HCC は HBs Ag および HCV Ab の両方が陽性であると定義し、非ウイルス性 CLD または HCC はその両方が陰性であると定義した。背景肝疾患の非ウイルス性病因はアルコール性肝疾患 (ALD)、自己免疫性肝炎 (AIH)、原発性胆汁性胆管炎 (PBC)、非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD)、および原因不明に分類した。ALD の診断には、1 日 60 g 以上のアルコール 5 年以上摂取を診断基準として使用した¹⁶⁾。

NAFLD は脂肪肝を有し、男性で 1 日 30 g 未満、女性で 1 日 20 g 未満のアルコール摂取と定義した¹⁷⁾。

我々は対象者を対照群と HCC 群の 2 つのグループに分けた。対照群は、健常者 154 人 (62.3%) および HCC のない CLD 患者 93 人 (37.7%) で構成されていた (男性 110 人

表 1 Clinical characteristics of the participants

Parameters	Control group		HCC group
	Healthy subjects (n = 154)	CLD (n = 93)	HCC (n = 269)
Age in years, median (range)	59 (36 - 88)	67 (36 - 86)	75 (39 - 95)
Sex			
Male	68	42	194
Female	86	51	75
Etiology			
HBV	-	33	37
HCV	-	25	94
HBV+HCV	-	0	2
Non-viral	-	35	136
Chronic liver disease			
None	-	-	10
Chronic hepatitis	-	62	103
Liver cirrhosis	-	31	156
Severity of liver cirrhosis ¹			
A	-	30	110
B	-	0	43
C	-	1	3
Tumor stage ²			
0	-	-	29
A	-	-	89
B	-	-	44
C	-	-	100
D	-	-	7
ECOG PS, (0/1/2/3/4)	-	-	233/26/6/3/1
Tumor size (mm), median (range)	-	-	29 (0 - 200)
Tumor number, median (range)	-	-	1 (0 - 10<)
Vascular invasion, present/absent	-	-	71/198
Extrahepatic spread, present/absent	-	-	29/240

CLD, chronic liver disease; ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; HBV, hepatitis B virus; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus; -, not available.

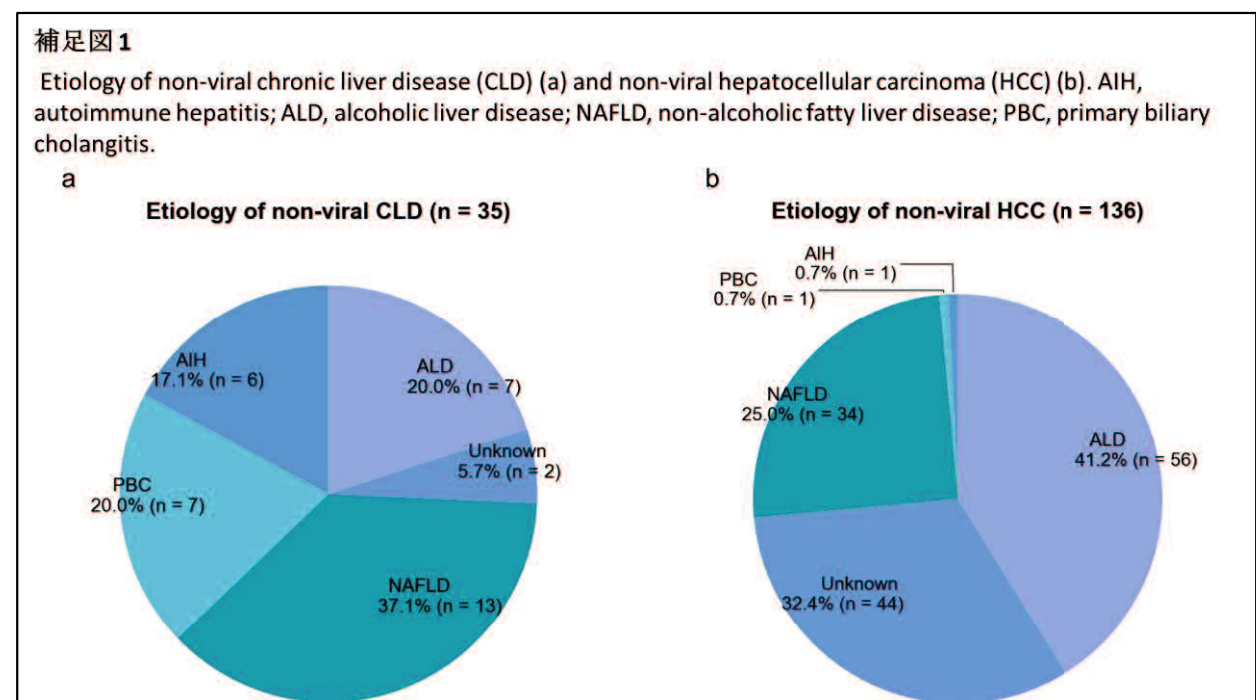
¹Severity of liver cirrhosis was determined using the Child-Pugh scoring system.

²Tumor stage is based on the Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) staging system.

[44.5%]、中央値年齢：63歳）。 対照群のCLD患者のうち、ウイルス関連CLD患者は58人（62.4%）で、HBV患者33人およびHCV患者25人を含んでいた。 非ウイルス関連CLD患者35人（37.6%）には、NAFLD患者13人（37.1%）、ALD患者7人（20.0%）、PBC患者7人（20.0%）、AIH患者6人（17.1%）、および不明患者2人（5.7%）が含まれていた（補足図1a）。

HCC群は、269人の患者（病理診断：136人 [50.6%]）で構成されており、そのうち194人（72.1%）が男性で、中央値年齢は75歳であった。 このグループでは、ウイルス性HCC患者が133人（49.4%）で、HBV患者37人、HCV患者94人、HBV+HCV患者2人が含まれていた。 一方、非ウイルス性HCC患者は136人（50.6%）で、ALD患者56人（41.2%）、NAFLD患者34人（25.0%）、PBC患者1人（0.7%）、AIH患者1人（0.7%）、および不明型患者44人（32.4%）が含まれていた（補足図1b）。

HCC患者のステージ0、A、B、C、Dの人数はそれぞれ29人（10.8%）、89人（33.1%）、44人（16.4%）、100人（37.2%）、および7人（2.6%）であった。 早期HCCはBCLCステージ0/Aとして定義し、早期HCC患者の人数は118人（43.9%）であった。 対照群とHCC群の間には、性別および年齢において有意な差があった（ $p < 0.001$ ）。



Alpha fetoprotein (AFP)

AFPの中央値は、対照群、早期HCC群、およびHCCのステージB、C、Dの各群でそれぞれ2.8、4.7、8.4、60.3、および14.9 ng/mLであった（図3a）。表2には、2つのグループ間のAFPの統計的有意差を示している。ROC解析による曲線下面積（AUC）は、全体のHCC群と対照群に対して0.77であった（図3e）。HCCスクリーニングのためにアメリカ肝臓病学会（AASLD）が推奨するカットオフ値20 ng/mLでは、全ステージHCCの感度は37.5%、特異度は98.4%であった（表3a, c）。次に、

HCC を病因に基づいて非ウイルス性 HCC 群とウイルス性 HCC 群の 2 つのグループに分けた。非ウイルス性 HCC の感度は 36.0%、ウイルス性 HCC の感度は 39.1%であった (表 3a)。さらに、早期 HCC に焦点を当てると、非ウイルス性早期 HCC の感度は 14.0%、ウイルス性早期 HCC の感度は 29.4%であり (表 3b)、特に非ウイルス性早期 HCC に対する AFP の感度が不十分であることを示唆された。

Des-gamma-carboxy prothrombin (DCP)

DCP の中央値は、対照群、早期 HCC 群、および HCC のステージ B、C、D の各群でそれぞれ 19.0、41.5、87.9、1,513.4、および 1,825.1

mAU/mL であった (図 3b)。2 つのグループ間の DCP の統計的有意差を表 2 に示し

表 2 Statistical differences of each marker between two groups

a. AFP					
Group	Control	Early	B	C	D
Control	-	<0.001	<0.001	<0.001	0.003
Early	<0.001	-	0.521	<0.001	0.334
B	<0.001	0.521	-	0.115	1.000
C	<0.001	<0.001	0.115	-	1.000
D	0.003	0.334	1.000	1.000	-
b. DCP					
Group	Control	Early	B	C	D
Control	-	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Early	<0.001	-	1.000	<0.001	0.035
B	<0.001	1.000	-	0.002	0.154
C	<0.001	<0.001	0.002	-	1.000
D	<0.001	0.035	0.154	1.000	-
c. m-HOXAI					
Group	Control	Early	B	C	D
Control	-	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Early	<0.001	-	1.000	<0.001	0.166
B	<0.001	1.000	-	0.033	0.542
C	<0.001	<0.001	0.033	-	1.000
D	<0.001	0.166	0.542	1.000	-
d. ASDAm-HI					
Group	Control	Early	B	C	D
Control	-	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Early	<0.001	-	1.000	<0.001	1.000
B	<0.001	1.000	-	0.032	1.000
C	<0.001	<0.001	0.032	-	1.000
D	<0.001	1.000	1.000	1.000	-

Early, B, C, and D indicate Barcelona Clinic Liver Cancer stages. -, not applicable. The *P* values shown represent the significant differences between two groups.

表 3 Diagnostic performance for HCC detection

a. Sensitivity for all-stage HCC detection

Biomarkers	Cutoff	Overall HCC (n = 269)	Non-viral HCC (n = 136)	Viral HCC (n = 133)	HBV HCC (n = 37)	HCV HCC (n = 94)
Sensitivity (%)						
AFP	≥20	37.5	36.0	39.1	43.2	38.3
DCP	≥40	66.5	69.9	63.2	73.0	60.6
m-HOXAI	≥310	69.1	72.1	66.2	70.3	66.0
ASDAm-HI	≥0.62	86.2	87.5	85.0	83.8	85.1

b. Sensitivity for early-stage HCC detection

Biomarkers	Cutoff	Overall HCC (n = 118)	Non-viral HCC (n = 50)	Viral HCC (n = 68)	HBV HCC (n = 17)	HCV HCC (n = 49)
Sensitivity (%)						
AFP	≥20	22.9	14.0	29.4	23.5	32.7
DCP	≥40	50.9	50.0	51.5	70.6	44.9
m-HOXAI	≥310	56.8	58.0	55.9	58.8	57.1
ASDAm-HI	≥0.62	76.3	78.0	75.0	70.6	75.5

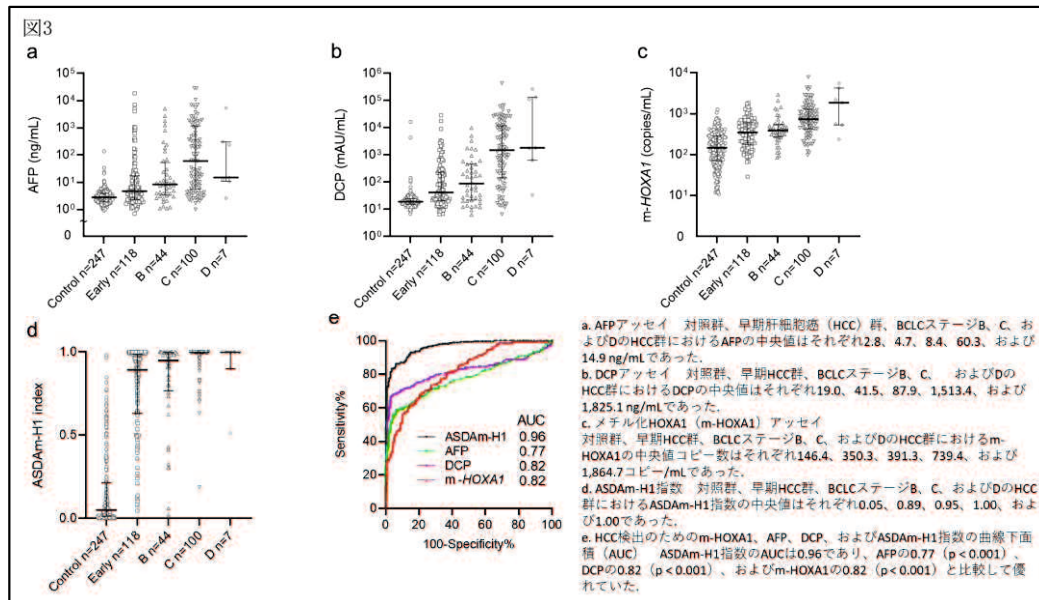
c. Specificity for all-stage HCC detection

Biomarkers	Cutoff	Control (n = 247)	Healthy subjects (n = 154)	CLD (n = 93)
Specificity (%)				
AFP	≥20	98.4	100.0	95.7
DCP	≥40	96.8	98.1	95.7
m-HOXAI	≥310	78.5	85.1	67.7
ASDAm-HI	≥0.62	93.9	96.8	89.2

Early-stage HCC is defined as Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) stage 0/A.

AFP, alpha-fetoprotein; CLD, chronic liver disease; DCP, des-gamma-carboxy prothrombin; HBV, hepatitis B virus; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus.

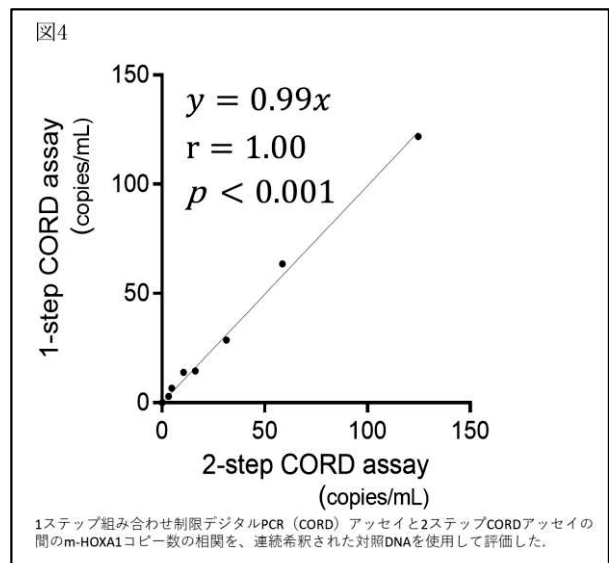
ている. ROC 解析による AUC は、全体の HCC 群と対照群に対して 0.82 であった (図 3e) . カットオフ値を 40 mAU/mL と設定した場合¹⁸⁾、全ステージ HCC の感度は 66.5%、特異度は 96.8%であった (表 3a, c) . 非ウイルス性 HCC およびウイルス性 HCC の感度はそれぞれ 69.9%および 63.2%であった (表 3a) . 早期 HCC に焦点を当てると、非ウイルス性早期 HCC の感度は 50.0%、ウイルス性早期 HCC の感度は 51.5%であった (表 3b) .



メチル化 *HOXA1* (*m-HOXA1*)

EpiScope メチル化 HCT116 gDNA (タカラバイオ、滋賀、日本) の連続希釈系列を使用して、1 ステップ CORD アッセイと従来の CORD アッセイの間での *m-HOXA1* コピー数の一致を確認した ($r = 1.00$; 図 4) . 次に、1 ステップ CORD アッセイを使用して血清 *m-HOXA1* コピー数を測定した. *m-HOXA1* の中央値コピー数は、対照群、早期 HCC 群、および HCC のステージ B、C、D の各群でそれぞれ 146.4、350.3、391.3、739.4、および 1,864.7 コピー/mL であった (図 3c) . 2 つのグループ間の *m-HOXA1* コピー数の統計的有意差を表 2 に示している.

ROC 解析によると、全体の HCC に対する AUC は 0.82 であった (図 3e) . Youden Index による最適なカットオフ値は 310 コピー/mL とすると、全体の HCC に対する感度は 69.1%、特異度は 78.5%であった (表 3a, c) . *m-HOXA1* が 310 コピー/mL 未満と 310 コピー/mL 以上である場合の腫瘍ステージ、血管侵襲、および腫瘍サイズに有意差があった (補足表 1) . *m-HOXA1* の陽性率は HCC の進行に伴って増加した. HCC の病因に注目すると、非ウイルス性 HCC の感度は 72.1%、ウイルス性 HCC の感度は 66.2%であった (表 3a) . さらに、早期 HCC において、非ウイルス性早期 HCC の感度



1ステップ組み合わせ制限デジタルPCR (CORD) アッセイと2ステップCORDアッセイの間の*m-HOXA1*コピー数の相関を、連続希釈された対照DNAを使用して評価した.

は 58.0%、ウイルス性早期 HCC の感度は 55.9%であり、早期 HCC 全体の感度は 56.8%であった (表 3b)。

補足表 1 Association of methylated *HOXA1* levels with clinical characteristics in patients with hepatocellular carcinoma

Parameters	m- <i>HOXA1</i> (copies/mL)		p-Value ¹
	<310 (n = 83)	≥310 (n = 186)	
Age in years, median (IQR)	75 (70 – 80)	74 (68 – 79)	0.441
Sex			
Female	31	44	0.021
Male	52	142	
Tumor stage ²			
0	14	15	<0.001
A	37	52	
B	13	31	
C	18	82	
D	1	6	
Etiology			
Viral	45	88	0.295
Non-viral	38	98	
Chronic liver Disease			
None	5	5	0.273
Chronic hepatitis	28	75	
Liver cirrhosis	50	106	
Severity of liver cirrhosis ³			
A	36	74	0.75
B	14	29	
C	0	3	
Child-Pugh score, median (IQR)	6 (5 – 7)	6 (5 – 7)	0.66
Vascular invasion			
Present	10	61	<0.001
Absent	73	125	
Extrahepatic spread			
Present	5	24	0.093
Absent	78	162	
Tumor size (mm), median (IQR)	20 (15 – 30)	35 (21 – 75)	<0.001
Tumor number, median (IQR)	1 (1 – 3)	2 (1 – 5)	0.125

¹When performing the tests, comparisons of two categories were performed with the chi-square test, whereas Fisher's test was used for comparisons of three or more categories.

For continuous variables, the Mann-Whitney U-test was used.

²Tumor stage was based on the Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) staging system.

³Severity of liver cirrhosis was determined using the Child-Pugh scoring system.

IQR, interquartile range, m-*HOXA1*, methylated *HOXA1*.

3つの診断マーカーを組み合わせた HCC の予測

HCC の予測精度を向上させるため、AFP、DCP、および m-*HOXA1* の 3 つの診断マーカーを組み合わせ、HCC 群と対照群の間の年齢と性別の差を調整したうえで、多変量ロジスティック回帰分析を行った。3 つのマーカーすべてが偏った分布を示したため、解析前に対数変換を行った。その結果、m-*HOXA1*、AFP、DCP は相互に独立した要因であり、その順に HCC の診断に寄与することが明らかになった (表 4)。回帰モ

デルから、HCC の予測確率を以下のように定式化できる。この定式化を ASDAm-H1 インデックス (Age, Sex, DCP, AFP, and m-HOXA1) と命名した (図 1)。

$$\text{ASDAm-H1 index} = \frac{1}{1 + e^{\{-(-21.19 - 0.95(\text{Sex}) + 0.13(\text{Age}) + 1.02(\text{Log_AFP}) + 0.82(\text{Log_DCP}) + 1.46(\text{Log_mHOXA1})\}}}$$

ASDAm-H1 インデックスの中央値は、対照群、早期 HCC 群、および HCC のステージ B、C、D の各群でそれぞれ 0.05、0.89、0.95、1.00、および 1.00 であった (図 3d)。表 2 には、2 つのグループ間の ASDAm-H1 インデックスの統計的有意差を示している。ASDAm-H1 インデックスは、全体の HCC に対する診断精度が最も高く、AUC は 0.96 であり、AFP 単独では 0.77、DCP 単独では 0.82、m-HOXAI 単独では 0.82 であった (図 3e)。Youden Index による最適なカットオフ値を 0.62 と設定した場合、ASDAm-H1 インデックスの HCC に対する感度は 86.2%、特異度は 93.9%、早期 HCC に対する感度は 76.3% であった (表 3a, c)。注目すべきことに、ASDAm-H1 指数は常者と CLD 患者を区別することもできた ($p = 0.016$ 、補足表 2、3)。さらに、ステージ 0 と A を個別に分析したところ、ASDAm-H1 インデックスの感度はステージ 0 で 62.1%、ステージ A で 80.9% に達し、AFP および DCP よりも高い感度を示した (補足表 4)。HCC 群を非ウイルス性 HCC 群とウイルス性 HCC 群に分けた場合、感度は非ウイルス性 HCC で 87.5%、ウイルス性 HCC で 85.0% であった (表 3a)。また、ウイルス性 HCC の各タイプに基づくサブグループ解析を行った結果、ASDAm-H1 インデックスは原因ウイルスにかかわらずほぼ同等の診断性能を示した (HBV-HCC、83.8%; HCV-HCC、85.1%) (表 3a)。非ウイルス性早期 HCC の感度は 78.0%、ウイルス性早期 HCC の感度は 75.0% であった (表 3b)。

補足表 2 Median value and interquartile range of each marker

Parameters	Healthy subjects (n = 154)	CLD (n = 93)	HCC (n = 269)
AFP (ng/mL)	3.0 (2.3 – 3.9)	2.2 (1.7 – 4.0)	9.2 (3.2 – 163.6)
DCP (mAU/mL)	19.1 (15.6 – 24.1)	18.5 (15.0 – 24.5)	170.2 (26.2 – 1614.2)
m-HOXAI (copies/mL)	106.2 (49.2 – 225.6)	234.0 (138.6 – 364.5)	479.3 (248.9 – 841.8)
ASDAm-H1 index	0.03 (0.01 – 0.09)	0.12 (0.03 – 0.49)	0.98 (0.82 – 1.00)

AFP, alpha-fetoprotein; ASDAm-H1 index, predicted value of Age, Sex, DCP, AFP, and m-HOXAI; CLD, chronic liver disease; DCP, des-gamma-carboxy prothrombin; HCC, hepatocellular carcinoma; m-HOXAI, methylated HOXA1.

補足表 3 Statistical differences of each marker between two groups

a. AFP	Healthy subjects	CLD	Early	B	C
Healthy subjects	-	1.000	<0.001	<0.001	<0.001
CLD	1.000	-	<0.001	<0.001	<0.001
Early	<0.001	<0.001	-	0.781	<0.001
B	<0.001	<0.001	0.781	-	0.173
C	<0.001	<0.001	<0.001	0.173	-
D	0.010	0.001	0.501	<0.001	1.000

b. DCP	Healthy subjects	CLD	Early	B	C
Healthy subjects	-	1.000	<0.001	<0.001	<0.001
CLD	1.000	-	<0.001	<0.001	<0.001
Early	<0.001	<0.001	-	1.000	<0.001
B	<0.001	<0.001	1.000	-	0.003
C	<0.001	<0.001	<0.001	0.003	-
D	<0.001	<0.001	0.053	0.231	1.000

c. m-HOXAI	Healthy subjects	CLD	Early	B	C
Healthy subjects	-	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CLD	<0.001	-	0.021	0.019	<0.001
Early	<0.001	0.021	-	1.000	<0.001
B	<0.001	0.019	1.000	-	0.049
C	<0.001	<0.001	<0.001	0.049	-
D	<0.001	0.007	0.249	0.813	1.000

d. ASDAm-HI	Healthy subjects	CLD	Early	B	C
Healthy subjects	-	0.016	<0.001	<0.001	<0.001
CLD	0.016	-	<0.001	<0.001	<0.001
Early	<0.001	<0.001	-	1.000	<0.001
B	<0.001	<0.001	1.000	-	0.048
C	<0.001	<0.001	<0.001	0.048	-
D	<0.001	<0.001	1.000	1.000	1.000

補足表 4 Diagnostic performance

a. Sensitivity for BCLC-stage 0 HCC detection

Biomarkers	Cutoff	Overall HCC	Non-viral HCC	Viral HCC
		(n = 29)	(n = 10)	(n = 19)
Sensitivity (%)				
AFP	≥ 20	27.6	10.0	36.8
DCP	≥ 40	37.9	40.0	36.8
m-HOXAI	≥ 310	51.7	50.0	52.6
ASDAm-HI	≥ 0.62	62.1	70.0	57.9

b. Sensitivity for BCLC-stage A HCC detection

Biomarkers	Cutoff	Overall HCC	Non-viral HCC	Viral HCC
		(n = 89)	(n = 40)	(n = 49)
Sensitivity (%)				
AFP	≥ 20	21.4	15.0	26.5
DCP	≥ 40	55.1	52.5	57.1
m-HOXAI	≥ 310	58.4	60.0	57.1
ASDAm-HI	≥ 0.62	80.9	80.0	81.6

5. 考察

従来の CORD アッセイでは、合計 32 時間のインキュベーション時間を要する 2 段階の手順を実施していた (図 2a)。本研究では、労力を節約し、インキュベーション時間を短縮するため、改良型 CORD アッセイ (1 ステップ CORD アッセイ) を開発した。酵素反応を 2 段階処理から、3 つのメチル化感受性制限酵素と ExoI を同時に処理する 1 段階処理に改良した。それにより、インキュベーション時間を 32 時間から 17 時間に短縮できた (図 2b)。以上より、改良型 CORD アッセイは処理時間を約 3 日から約 1 日に短縮することができた。我々は、1 ステップ CORD アッセイと従来の CORD アッセイとの間で *m-HOXAI* レベルの一致を確認した後 (図 4)、1 ステップ CORD アッセイを用いて血清 *m-HOXAI* レベルの臨床性能を評価した。

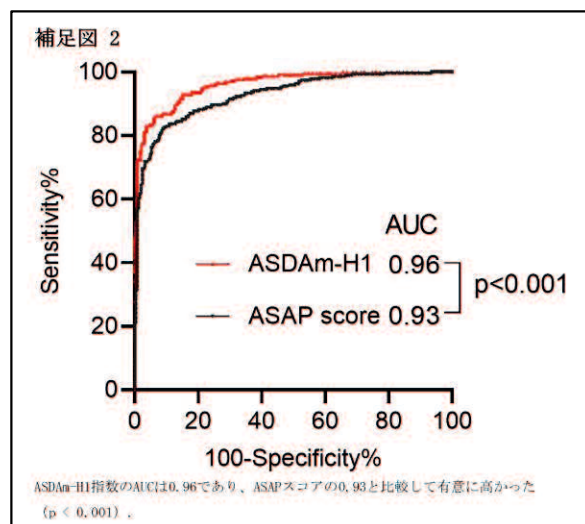
血清 *m-HOXAI* レベルは、各 HCC ステージ群において対照群と比較して有意に高く、HCC の診断に対する感度と特異度はそれぞれ 69.1% および 78.5% であった。早期 HCC に対する感度は、非ウイルス性 HCC で 58.0%、ウイルス性 HCC で 55.9% であり、HCC の病因による有意差はなかった。*m-HOXAI* の AUC は AFP より優れており、DCP と同等であった (図 3e)。しかし、*m-HOXAI* の特異度 78.5% は、AFP (98.4%) および DCP (96.8%) より低かった。DNA の高メチル化は肝線維症と関連していると報告されており¹⁹⁾、我々は以前の CORD アッセイでメチル化 *SEPT9* レベルが非腫瘍組織サンプルでも検出されることを確認している⁷⁾。これらの理由から、血清 *m-HOXAI* レベルは健常者と比較して CLD 患者で有意に増加しており (中央値: 健康な被験者 106.2 コピー/mL ; CLD234.0 コピー/mL ; $p < 0.001$; 補足表 2 および 3)、CLD 患者に対する特異度はさらに 67.7% に低下していた (表 3c)。したがって、*m-HOXAI* の単独使用では HCC の診断には不十分であると考えられた。

そのため、我々は多変量ロジスティック回帰分析を行い、年齢および性別で調整後、*m-HOXAI*、DCP、および AFP がそれぞれ独立した HCC 診断への寄与因子であることを見出した。ASDAm-H1 インデックスを作成した結果、このインデックスの AUC は各バイオマーカーよりも優れており、感度 86.2%、特異度 93.9% であった (図 3e ; 表 3a, c)。さらに、早期 HCC に焦点を当てると、感度は 76.3% と非常に高く、非ウイルス性早期 HCC では 78.0%、ウイルス性早期 HCC では 75.0% であった (表 3b)。これは、HCC の病因にかかわらず、早期 HCC の検出に ASDAm-H1 インデックスが臨床的に有用であることを示す初めての報告である。

HCC 診断には他にもスコアリングシステムが存在する^{10,20,21)}。その一つに、マルチターゲット血液検査 (mt-HBT) があり、性別およびメチル化 DNA 遺伝子 (*HOXA1*、*TSYL5*、および *B3GALT6*) の対数コピー値と対数変換された AFP を使用する¹⁰⁾。mt-HBT は、ウイルス性早期 HCC の診断に対する感度が 71–84%、特異度が 88–90%、非ウイルス性早期 HCC の診断に対する感度が 71–80%、特異度が 84–87% であった。本研究では、ASDAm-H1 インデックスのウイルス性早期 HCC に対する感度は 75.0%、非ウイルス性早期 HCC に対する感度は 78.0%、特異度は 93.9% であり (表 3b, c)、mt-HBT に比べて同等の感度でありながら、より高い特異度を示した。しかし、両研究の対照群の構成が大きく異なるため、特異度に影響を与える可能性がある。mt-HBT 研究では、対照群の大多数が肝硬変患者 (93.2%、605/649) であったのに対し、本研究で

は対照群は健康な被験者（154/247、62.3%）および慢性肝炎（62/247、25.1%）と肝硬変（31/247、12.6%）の患者で構成されていた。本研究において、対照群を CLD 患者に限定しても、特異度は依然として 89.2%と非常に高かった（表 3c）。したがって、ASDAm-H1 指数は mt-HBT と同等の診断性能を持つ可能性がある。

1 ステップ CORD アッセイの利点は、少量の血清（1.0 mL）のみを必要とする点である。一方、重亜硫酸ベースのメチル化アッセイ（mt-HBT を含む）は大量の血漿（5.0–6.0 mL）を使用する¹⁰。これは、重亜硫酸処理中に DNA の約 90%が失われるためである²²。さらに、ASDAm-H1 インデックスは 1 つのメチル化マーカーのみを使用するのに対し、mt-HBT は 3 つのメチル化マーカーを使用する。したがって、ASDAm-H1 インデックスは、労力を節約し、コストを削減できると考えられる。もう一つの類似の指標である GALAD スコアは、性別、年齢、AFP アイソフォーム L3（AFP-L3）、対数変換された AFP、および対数変換された DCP を使用する^{20, 21}。Chalasanani らは、m-HOXAI を含む mt-HBT の AUC が GALAD スコアと同等かそれ以上であることを示した¹⁰。日本では、3 つの腫瘍マーカー（AFP、DCP、AFP-L3）の同時測定が公的健康保険で認められていないため、GALAD スコアと ASDAm-H1 指数の診断性能を比較することはできていない。最近、中国の HBV-HCC 患者を対象とした多施設研究で、GALAD スコアに使用されている AFP-L3 を除外した ASAP スコアが評価され²³、そのスコアは HCV-HCC に対して GALAD スコアよりも優れた診断性能を示していた²⁴。本研究のコホートで ASDAm-H1 インデックスと ASAP スコアの診断性能を比較した。補足図 2 に示されるように、ASDAm-H1 インデックスは全体の HCC に対する AUC が 0.96



であり、ASAP スコアの 0.93 よりも有意に高かった ($p < 0.001$)。以前の報告に基づいて計算されたカットオフ値 0.63 では、ASAP スコアの感度は全体の HCC で 69.5%、早期 HCC で 55.1%であった。本研究のコホートにおけるスコアの最適なカットオフ値を Youden Index で 0.58 と設定した場合、全体の HCC と早期 HCC の感度はそれぞれ 71.4%と 57.6%であった。したがって、ASAP スコアは ASDAm-H1 よりも低い感度であった（補足表 5）。

補足表 5 Diagnostic performance of ASAP score

a. Sensitivity

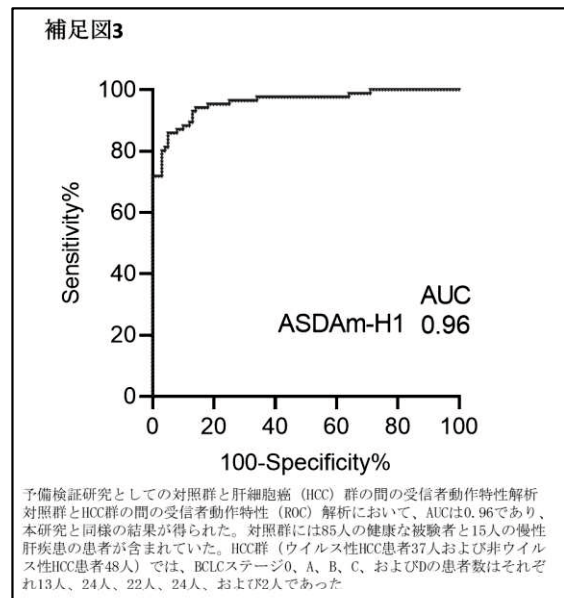
Biomarker	Cutoff	Overall HCC (n = 269)	Early-stage HCC (n = 118)
		Sensitivity (%)	
ASAP score	≥ 0.63	69.5	55.1
	≥ 0.58	71.4	57.6

b. Specificity

Biomarker	Cutoff	Overall HCC (n = 269)
		Specificity (%)
ASAP score	≥ 0.63	97.2
	≥ 0.58	96.8

ASAP score = $-7.58 + 0.05 \times \text{age} - 0.58 \times \text{gender} + 0.42 \times \text{Log [AFP (ng/mL)]} + 1.11 \times \text{Log [DCP (mAU/mL)]}$, where gender = 0 for male and 1 for female.
HCC, hepatocellular carcinoma.

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、患者は単一施設から収集され、サンプルサイズが限られている。第二に、検証研究がまだ完了していない。これらの問題に対処するために、我々はより大きなサンプルサイズを用いた前向き多施設研究を実施している。予備検証研究の結果の一部は補足図 3 に示しており、対照群と HCC 群を区別するための AUC は本研究と同じく 0.96 であった。同時に、完全寛解後の HCC 再発および CLD 患者における癌発症の予測マーカーとして ASDAm-H1 インデックスが使用できるかどうかを調査するための追跡調査も実施している。第三に、早期 HCC 検出のための最適な式およびカットオフ値はまだ確定していない。ASDAm-H1 インデックスのカットオフ値を Youden Index を用いて全体の HCC 検出のために設定したが、利益と損害のバランスを取る最適なカットオフ値を決定する必要がある²⁵⁾。したがって、最適なカットオフ値を確認するためにはさらに検討が必要である。



最後に、*m-HOXAI* は HCC に特異的ではない。実際、*HOXA1* の高メチル化は胆管癌、乳癌、肺癌、胃癌、および甲状腺癌の組織で観察されており²⁶⁾、膵臓癌では血清 *m-HOXAI* が増加している^{14, 15)}。血清および血漿サンプルを使用した研究は、*m-HOXAI* の診断性能をさまざまな種類の癌の検出において報告しているが、*m-HOXAI* のリキッドバイオプシーによる癌の種類範囲を明らかにするためにはさらなる研究が必要である。

6.結語

我々は、ASDAm-H1 インデックスがウイルス性および非ウイルス性の HCC を早期段階でも検出する優れた性能を示すことを示した。このインデックスは、非ウイルス性 HCC サーベイランスシステムとしての可能性を秘めている。

7.謝辞

本研究において、検体管理に携わっていただいた山口大学検査部の方々、データ解析の支援をいただいた保健学科の市原清教授に感謝申し上げます。また、検体提供いただいた消化器・腫瘍外科の永野昭浩教授ならびに消化器内科学の高見太郎教授に御礼を申し上げます。そして、ご指導賜りました臨床検査・腫瘍学講座の末廣 寛准教授、山崎隆弘教授に感謝の意を示します。

8.参考文献

- 1 World Health Organization [Internet]. Cancer today. 2023. [cited 2023 Nov. 9]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/home>
- 2 Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):6.
- 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(2):723–50.
- 4 Kudo M. Surveillance, Diagnosis, and Treatment Outcome of Hepatocellular Carcinoma in Japan: 2023 Update. *Liver Cancer*. 2023;12(2).
- 5 Kudo M, Lencioni R, Marrero JA, Venook AP, Bronowicki JP, Chen XP, et al. Regional differences in sorafenib-treated patients with hepatocellular carcinoma: GIDEON observational study. *Liver Int*. 2016 Aug;36(8):1196–205.
- 6 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(24):16974–87.
- 7 Kotoh Y, Suehiro Y, Saeki I, Hoshida T, Maeda M, Iwamoto T, et al. Novel Liquid Biopsy Test Based on a Sensitive Methylated *SEPT9* Assay for Diagnosing Hepatocellular Carcinoma. *Hepatol Commun*. 2020;4(3):461–70.
- 8 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(3):1180–92.
- 9 Chalasani NP, Ramasubramanian TS, Bhattacharya A, Olson MC, Edwards VD, Roberts LR, et al. A Novel Blood-Based Panel of Methylated DNA and Protein Markers for Detection of Early-Stage Hepatocellular Carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2021;19(12):2597–605.e4.
- 10 Chalasani NP, Porter K, Bhattacharya A, Book AJ, Neis BM, Xiong KM, et al. Validation of a Novel Multitarget Blood Test Shows High Sensitivity to Detect Early Stage Hepatocellular Carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2022;20(1):173–82.e7.
- 11 Pilato B, Pinto R, De Summa S, Lambo R, Paradiso A, Tommasi S. HOX gene methylation status analysis in patients with hereditary breast cancer. *J Hum Genet*. 2013;58(1):51–53.
- 12 Hasegawa K, Takemura N, Yamashita T, Watadani T, Kaibori M, Kubo S, et al. Clinical Practice Guidelines for Hepatocellular Carcinoma: The Japan Society of Hepatology 2021 version (5th JSH-HCC Guidelines). *Hepatol Res*. 2023;53(5):383–90.
- 13 Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2012;379(9822):1245–55.
- 14 Shinjo K, Hara K, Nagae G, Umeda T, Katsushima K, Suzuki M, et al. A novel sensitive detection method for DNA methylation in circulating free DNA of pancreatic cancer. *PLoS One*. 2020;15(6):e0233782.
- 15 Suehiro Y, Suenaga S, Kunimune Y, Yada S, Hamamoto K, Tsuyama T, et al. CA19-9 in Combination with Methylated *HOXA1* and SST Is Useful to Diagnose Stage I Pancreatic Cancer. *Oncology*. 2022;100(12):674–84.

- 16 Japanese Society for Biomedical Research on Alcohol [Internet]. Japanese Society for Biomedical Research on Alcohol Diagnostic criteria for Alcoholic Liver Disease 2011 Edition [cited 2023 Nov .9]. Available from: <https://www.kanen.ncgm.go.jp/cont/010/sankou.html>
- 7 Tokushige K, Ikejima K, Ono M, Eguchi Y, Kamada Y, Itoh Y, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis 2020. *J Gastroenterol.* 2021;56(11):951–63.
- 18 Omata M, Cheng AL, Kokudo N, Kudo M, Lee JM, Jia J, et al. Asia-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatocellular carcinoma: a 2017 update. *Hepatol Int.* 2017;11(4):317–70.
- 19 Yang L, Liu Y, Sun Y, Huang C, Li J, Wang Y. New advances of DNA/RNA methylation modification in liver fibrosis. *Cell Signal.* 2022;92:110224.
- 20 Johnson PJ, Pirrie SJ, Cox TF, Berhane S, Teng M, Palmer D, et al. The detection of hepatocellular carcinoma using a prospectively developed and validated model based on serological biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(1):144–53.
- 21 Berhane S, Toyoda H, Tada T, Kumada T, Kagebayashi C, Satomura S, et al. Role of the GALAD and BALAD-2 Serologic Models in Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma and Prediction of Survival in Patients. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016;14(6):875–86.e6.
- 22 Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(13):E65–5.
- 23 Yang T, Xing H, Wang G, Wang N, Liu M, Yan C, et al. A Novel Online Calculator Based on Serum Biomarkers to Detect Hepatocellular Carcinoma among Patients with Hepatitis B. *Clin Chem.* 2019;65(12):1543–53.
- 24 Liu SY, Li C, Sun LY, Guan MC, Gu LH, Yin DX, et al. ASAP Score versus GALAD Score for detection of hepatitis C-related hepatocellular carcinoma: A multicenter case-control analysis. *Front Oncol.* 2022;12:1018396.
- 25 World Health Organization [Internet]. Copenhagen: Screening programmes:a short guide. [cited 2023 Nov. 9]. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330829/9789289054782-eng.pdf>.
- 26 Paço A, de Bessa Garcia SA, Freitas R. Methylation in HOX Clusters and Its Applications in Cancer Therapy. *Cells.* 2020;9(7).