

## 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早期肝細胞癌の診断：AFP, PIVKA-IIとの併用検査としてのメチル化SEPT9とメチル化HOXA1の性能比較

松井康貴, 山崎綾乃, 末廣 寛<sup>1)</sup>, 星田朋美<sup>1)</sup>, 佐伯一成<sup>2)</sup>,  
山内由里佳<sup>2)</sup>, 松本俊彦<sup>2)</sup>, 檜垣真吾<sup>3)</sup>, 藤井郁英<sup>4)</sup>,  
鈴木千衣子<sup>4)</sup>, 高見太郎<sup>2)</sup>, 坂井田功<sup>2, 3)</sup>, 山崎隆弘<sup>1)</sup>

山口大学医学部医学科 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<sup>1)</sup> 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<sup>2)</sup> 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)  
セントヒル病院<sup>3)</sup> 宇部市今村北3-7-18 (〒755-0155)  
阿知須共立病院<sup>4)</sup> 山口市阿知須4841-1 (〒754-1277)

**Key words** : 肝細胞癌, AFP, PIVKA-II, 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である  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) と protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II) の併用検査は肝硬変や慢性肝炎など肝癌ハイリスク因子を有する患者に対して保険適応となっているが, 早期癌の検出には限界がある. この問題解決のためには新たな検査の開発が必要であり, その一つとしてリキッドバイオプシーが挙げられる. 今回我々はこれらの腫瘍マーカーにリキッドバイオプシーを加えた場合の早期肝細胞癌の検出性能を評価するため, 本研究を行った.

【方法・材料】健常者25人, 慢性肝疾患30人, 肝細胞癌78人 (うち早期肝細胞癌44人) を対象とした. 被験者の血清からAFP, PIVKA-IIを測定した. また, リキッドバイオプシーとしてメチル化SEPT9及びメチル化HOXA1のコピー数を測定した.

【結果】AFPとPIVKA-IIの併用検査では早期肝細胞癌の検査感度56.8%, 特異度94.5%であった. 一方,

これらの検査に加えてメチル化SEPT9を併用したところ, 感度77.3%, 特異度89.1%であり, メチル化HOXA1の併用では, 感度63.6%, 特異度90.9%であった.

【結論】早期肝細胞癌の検査感度の点では, AFP, PIVKA-IIとの併用マーカーとしては, メチル化HOXA1よりもメチル化SEPT9の方が優れていた. AFPやPIVKA-IIにメチル化SEPT9を組み合わせることでより多くの早期肝細胞癌患者の拾い上げが可能になることが示唆された.

## I. はじめに

肝癌は世界で90万人が罹患し, 6番目の癌罹患数であり, 世界で年に83万人が死亡し, 癌死亡数の3番目にあたる<sup>1)</sup>. なかでも肝細胞癌は原発性肝癌の90.1%を占め<sup>2)</sup>, 相対5年生存率は, TNM Stage分類のStage Iでは62.9%, Stage IIでは45.4%, Stage IIIでは15.9%, Stage IVでは4.5%と病気が進行するほど予後は不良であり, 未だ予後不良な癌種のひとつである<sup>3)</sup>. そのため, 一番の予後改善策としては, 肝細胞癌の早期発見が望ましい.

肝細胞癌の腫瘍マーカーとして  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) と protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II) が挙げられる。胎児の肝臓および卵黄嚢で産生される胎児期特有の血清蛋白であるAFPは肝細胞癌でも上昇するため、肝細胞癌診断に使われている。しかし、AFPは肝細胞癌以外の癌、慢性肝炎、肝硬変、神経変性疾患や非セミノーマ性精巣癌などでも上昇することからAFP単独での使用は望ましくないとされている<sup>4)</sup>。また、PIVKA-IIは、ビタミンKが不足したときに産生される凝固活性をもたない異常プロトロンビンである。単独の場合、PIVKA-IIは肝細胞癌診断においてAFPより高い感度、特異度を持つ。しかし、PIVKA-IIはワルファリン投与時、セフェム系抗生物質使用時、閉塞性黄疸時、極度の栄養状態不良時、アルコール性肝障害の際は上昇し、偽陽性を呈する。一方で、ビタミンK製剤投与時にはPIVKA-IIは肝癌が存在しても正常化することから注意が必要である<sup>5)</sup>。このAFPとPIVKA-IIの同時併用検査は肝硬変や慢性肝炎など肝癌ハイリスク因子を有する患者に対して本邦では保険適応となっており、肝癌診療ガイドラインにおいても小肝細胞癌の診断において2種以上の腫瘍マーカーを測定することが推奨されている<sup>6)</sup>。他研究グループの報告では、早期肝細胞癌についてAFP単独では感度53%、特異度90%、PIVKA-II単独では感度61%、特異度61%、両者併用では感度78%と向上するものの、特異度は62%と低く、AFPおよびPIVKA-IIのみでは早期肝細胞癌のスクリーニングには限界があるとされる<sup>7)</sup>。したがって、早期肝細胞癌を診断するための新たな検査法の開発が必要である。

早期肝臓癌を診断する方法として、現在期待されているのがリキッドバイオプシーである。リキッドバイオプシーとは、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り、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で簡便な検査法である。

SEPT9は細胞分裂に重要な役割を果たすだけでなく、SEPT9のCpGアイランドの過剰メチル化が発がんに関連することから、癌抑制遺伝子の可能性が指摘されている<sup>8, 9)</sup>。肝細胞癌ではSEPT9プロモーター領域CpGの異常な過剰メチル化によりSEPT9の発現がしばしば抑制されており、肝癌の

発癌における重要なエピドライバー遺伝子であることが報告されている<sup>10)</sup>。また、臨床応用例として、血清AFPの肝細胞癌の検査感度57.7%、特異度98.3%に対し、メチル化SEPT9 (以下m-SEPT9) リキッドバイオプシーでは検査感度82.7%、特異度96.0%であり、さらには、両者併用により検査感度は91.3%にまで向上することが報告されている<sup>11)</sup>。我々は、血清中のメチル化遺伝子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m-SEPT9遺伝子をターゲットとしたリキッドバイオプシーの有用性を報告している。第一報においては、m-SEPT9の全ステージ肝細胞癌に対する検査感度63.2%、特異度90.0%であり、早期肝細胞癌 (Barcelona Clinic Liver Cancer [BCLC] stage 0/A)<sup>12)</sup> に限定した場合の検査感度は、血清AFP単独では18%、m-SEPT9単独では54.8%、両者併用では63%と、血清AFP単独に比べて検査感度が45%向上することを報告している<sup>13)</sup>。第二報ではAFP単独での全ステージ肝細胞癌の検査感度36.8%、特異度97.5%に対して、血清mSEPT9単独での検査感度63.2%、特異度82.5%、両者併用では検査感度71.1%まで向上することを報告している<sup>14)</sup>。

一方、m-SEPT9以外の有用なバイオマーカー候補遺伝子として、Homeobox A1 (以下HOXA1) が挙げられる。HOX遺伝子は頭部・体幹などの前後軸と四肢の近位・遠位軸に沿って発現しており胚の発生に重要な役割をもっている<sup>15)</sup>。また、HOX遺伝子のCpGアイランドでDNAのメチル化が起こるとHOXタンパクが産生できなくなるため、腫瘍抑制物質が産生されず、腫瘍形成が促進されることが報告されており、実際に、様々な種類の癌でHOX遺伝子のメチル化が確認されている<sup>15)</sup>。肝細胞癌については、メチル化HOXA1 (以下m-HOXA1) と3つのメチル化遺伝子 (EMX1, TSPYL5, B3GALT6)、および、2つの腫瘍マーカー (AFP, AFP-L3) からなるマルチパネル検査が早期肝細胞癌の診断に有用という報告がある<sup>16)</sup>。また、m-HOXA1を含む6つのメチル化マーカーによるリキッドバイオプシーが肝細胞癌の診断に有用という報告もある<sup>17)</sup>。ただし、m-HOXA1単独での肝細胞癌診断性能の報告例はない。

これまで我々は血清AFPとメチル化遺伝子の組み合わせでの肝癌診断性能の評価を行っていた。し

かし、実際の臨床現場では、肝細胞癌の高リスク群である肝硬変や慢性肝炎の患者に対しては腫瘍マーカーAFPとPIVKA-IIの同時検査が保険診療として認められていることから、実臨床への応用を想定した場合、AFP、および、PIVKA-IIの両者を含んだ形でのリキッドバイオプシーの肝細胞癌の診断性能を明らかにする必要があると考えた。そこで、今回我々は、既存の腫瘍マーカーであるAFP、PIVKA-IIとの組み合わせのバイオマーカーとしてm-SEPT9とm-HOXA1のどちらが早期肝細胞癌のスクリーニングに有用であるかを検証するため、本研究を行った。

## II. 研究方法

本研究では、ヘルシンキ宣言の倫理原則に従って行われた。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の承認を得て実施した（承認番号H28-124）。

### 1. 材料

2016年11月から2020年11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133人を対象とした。被験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。被験者の内訳は健常者25人、肝細胞癌を合併していない慢性肝疾患患者30人、肝細胞癌患者78人（早期肝細胞癌44人）であった（表1）。大腸内視鏡検査で異常のないことが確認された被験者を健常者として登録した。肝細胞癌の進行度は、BCLC staging systemの基準を用い、Stage 0/Aを早期肝細胞癌とした<sup>11)</sup>。

## 2. 方法

### 1) 血液検体の採取

健常者群については人間ドックで大腸内視鏡検査を受検し、大腸腫瘍を認めなかった被験者を健常者群として登録した。なお、大腸内視鏡検査実施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、採取後6ヵ月以内に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1200g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。

### 2) AFP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」(AFP) (東ソー, 東京)、測定機器はAIA-2000 (東ソー, 東京)を用いた。

### 3) PIVKA-II測定

PIVKA-IIの血清濃度はEIA法で測定した。検査試薬はEテスト「TOSOH」II (PIVKA-II) (積水メディカル, 東京)、測定機器はAIA-2000 (東ソー, 東京)を用いた。

### 4) DNA抽出

冷凍保存してい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の血清検体からDNAを抽出した。そして、50 $\mu$ Lの溶出バッファーに溶出し、-20°Cで冷凍保存した。

### 5) メチル化解析

m-SEPT9及びm-HOXA1のコピー数の測定は、本

表1 臨床病理学的背景

	健常者	慢性肝疾患	肝細胞癌	
	n = 25	n = 30	全ステージ n = 78	早期のみ n = 44
性別(人)				
男性	13	14	51	32
女性	12	16	27	12
平均年齢	48.1	65.2	71.9	73
(範囲)	(36-59)	(40-85)	(39-84)	(61-84)

講座で開発した高感度メチル化解析法を用いて行った。本技術は、DNAの酵素処理と、Droplet digital PCR法の2つの手順からなり、以下に詳細を述べる。

#### 6) 酵素処理

酵素処理は二つのステップからなる。最初のステップでは、血清DNA 10 $\mu$ Lを解凍し、AmpliTaq Gold buffer II (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 1  $\mu$ Lと25mM MgCl<sub>2</sub> 1  $\mu$ L, 3種類の酵素 (Hha I, Hpa II, Exo I) (すべて Thermo Fisher Scientific) 各 1  $\mu$ Lからなる酵素反応液 5  $\mu$ Lをこの血清DNAに加えた。そして、混合液を37°Cで16時間の酵素反応をさせた。次のステップでは、BstU I (New England Biolabs, Hitchin, United Kingdom) 1  $\mu$ Lを入れ、混合液を60°Cで16時間の酵素反応をさせ、酵素反応後に98°Cで10分間の加熱を行った。

Hha I, Hpa II, BstU I 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', 5'-CGCG-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ため、後のPCRで増幅が可能となる。

Exo I はエキソヌクレアーゼであり、DNA溶液中に存在する一本鎖DNAを消化する。もし酵素反応液中に一本鎖DNAがわずかでも存在すると、上記制限酵素の切断を免れてしまい、メチル化の有無にかかわらずPCRで増幅されてしまうことから、メチル化を来している二本鎖DNAのみPCR増幅できるよう本酵素を使用した。

#### 7) Droplet digital PCR

酵素反応終了後、酵素反応処理済DNA溶液 8  $\mu$ LとPCR反応液14 $\mu$ Lを混合した。このPCR反応液は、内部コントロールのhTERT (human telomerase reverse transcriptase) とターゲット遺伝子SEPT9, または、HOXA1の20 $\mu$ Mプライマーミックスと5  $\mu$ Mプローブ各 1  $\mu$ L (計 4  $\mu$ L) と、2  $\times$  ddPCRマスターミックス (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 10 $\mu$ Lからなる。

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'-CCTGGGAGCTCTGGGAATT-3'

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

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'-GTCCGAAATGATCCCATC-3'

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

HOXA1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'-CCCATGGAGGAAGTGAGAA-3'

Reverse primer : 5'-GGGGTATTCCAGGAAGGAGT-3'

Probe : 5'-FAM-GCACAGTCACGCCGG-3'

このPCR反応液からAutomated droplet generator (Bio-Rad) を用いて、Droplet (液滴) を作り、サーマルサイクラーを用いて、95°Cで10分間予熱したのち、94°C 30秒の熱変性および56°C 60秒のアニーリングを40回繰り返してDNAを増幅させ、最後に98°Cで10分間加熱した。DNAの増幅後、QX200 droplet reader (Bio-Rad) およびQuantaSoft software (Bio-Rad) 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SEPT9またはHOXA1は3種類の制限酵素のいずれかに認識され、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。

内部コントロールとして用いた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、ヒトDNAが試料中に存在すればPCRによって必ず増幅されるため、DNA試料の品質管理目的で用いた。

#### 8) 統計解析

測定した4種類の検査マーカー (m-SEPT9, m-HOXA1, AFP, PIVKA-II) 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. 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, US) を使用し、多重比較にはKruskal-Wallis test, および, Dunn's testを行った。各検査マーカーの肝細胞癌診断性能を比較するためにReceiver Operating Characteristic (ROC) 解析を行った。p < 0.05で有意差ありと判定した。

### Ⅲ. 結 果

#### 1. 単独マーカーでの肝細胞癌スクリーニング性能比較

AFPの中央値は、健常者群3.3ng/mL、慢性肝疾患群2.6ng/mL、肝細胞癌群10.1ng/mLであった。健常者群と肝細胞癌群の間、慢性肝疾患群と肝細胞癌群の間に有意差が見られた（それぞれ、 $p = 0.0096$ ,  $p = 0.0003$ ）（図1A）。

PIVKA-IIの中央値は、健常者群21.4mAU/mL、慢性肝疾患群16.6mAU/mL、肝細胞癌群81.4mAU/mLであった。健常者群と肝細胞癌群の間、慢性肝疾患群と肝細胞癌群の間に有意差が見られた（それぞれ、 $p = 0.0065$ ,  $p < 0.0001$ ）（図1B）。

m-SEPT9の中央値は、健常者群1.8コピー、慢性肝疾患群2.4コピー、肝細胞癌群5.2コピーであった。健常者群と肝細胞癌群の間、慢性肝疾患群と肝細胞癌群の間に有意差が見られた（それぞれ、 $p = 0.0011$ ,  $p = 0.0075$ ）（図1C）。

m-HOXA1の中央値は、健常者群12.0コピー、慢性肝疾患群9.6コピー、肝細胞癌群16.6コピーであった。慢性肝疾患群に比べて肝細胞癌群ではm-HOXA1コピー数の増加傾向が認められた（ $p = 0.1039$ , 図1D）。

慢性肝疾患群と全ステージの肝細胞癌群のROC解析を行い、慢性肝疾患群と肝細胞癌群の中で特異度が96.4%となるようにm-SEPT9とm-HOXA1のカットオフ値を定めた。すると、m-SEPT9のカットオフ値は7.3コピー、m-HOXA1のカットオフ値は44.0コピーであった。慢性肝疾患群と肝細胞癌群のROC解析について、Area Under the Curve（以下AUC）は、AFPは0.76、PIVKA-IIは0.81、m-SEPT9は0.69、m-HOXA1は0.63であった（図2A）。また、慢性肝疾患群と早期肝細胞癌群（Stage 0/A）のROC解析によるAUCは、AFPは0.71、PIVKA IIは0.74、m-SEPT9は0.69、m-HOXA1は0.62となった（図2B）。

AFPのカットオフ値について、American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) のpractice guidanceに基づいてカットオフ値を20ng/mLと設定した<sup>18)</sup>。またPIVKA-IIのカットオフ値については、Parkらの研究で用いられたカットオフ値を参考にし、40mAU/mLと設定し

た<sup>8)</sup>。これらのカットオフ値を用いて単独バイオマーカーによる肝細胞癌スクリーニングの性能比較を行った（表2）。早期肝細胞癌群の場合、PIVKA-IIが単独検査では感度50.0%と最も良好であった。

#### 2. 複数マーカーの組み合わせでの肝細胞癌スクリーニング性能比較

併用する検査のうち少なくとも一つが陽性であった場合を検査陽性とし、全て陰性であった場合を検査陰性とした。二種類のマーカーを用いた併用検査での検査性能を表3に示す。全ステージの肝細胞癌群の場合、二種類のマーカーで最も感度が高くなった組み合わせは、PIVKA-IIとm-SEPT9の組み合わせであり、感度は73.1%、特異度89.1%であった。また、早期肝細胞癌群の場合も、最も感度が高かった組み合わせは同じ組み合わせで、感度70.5%、特異度89.1%であった。

三種類のマーカーを用いた併用検査の検査性能を表4に示す。全ステージの肝細胞癌群の場合、最も感度が高くなったのはAFP、PIVKA-II、m-SEPT9の組み合わせであり、感度は78.2%、特異度89.1%であった。また、早期肝細胞癌群の場合でも、最も感度が高かったのは同じ組み合わせであり、感度77.3%、特異度89.1%であった。

### Ⅳ. 考 察

Septinは細胞質分裂、アポトーシス、小胞輸送、細胞極性の維持の役割を含む様々な機能を持つGTPaseファミリーである。SEPT9はseptinファミリーの一つであるSeptin-9をコードする遺伝子であり、発癌においてがん抑制遺伝子として働き、プロモーターの異常なメチル化によって発現レベルが低下する<sup>19)</sup>。我々のこれまでの報告例も含めて、m-SEPT9をターゲットとしたリキッドバイオプシーは肝細胞癌診断に有効であることが報告されている<sup>11, 13, 14)</sup>。なお、m-SEPT9は大腸癌でも増加することが報告されていることから<sup>20)</sup>、本検討において、特に健常者群について大腸内視鏡検査で大腸癌がないことを必ず確認した。

HOX遺伝子は、発生、受容体シグナル伝達、分化、運動能、血管新生だけでなく、アポトーシスにも重要な役割を担っている<sup>21)</sup>。HOX遺伝子は発現量の低下と増加の両面で、癌の発生や進展に関連が

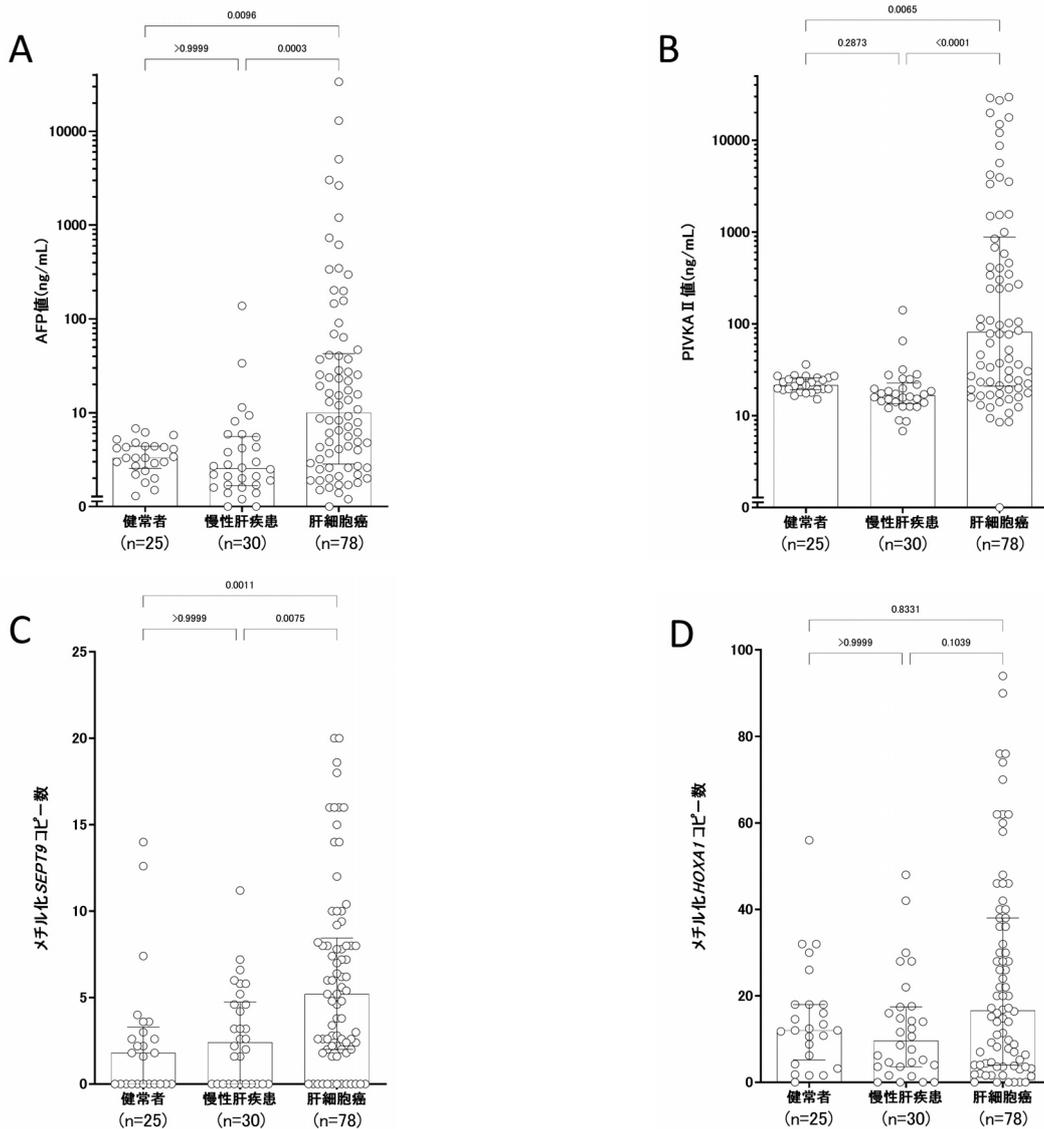


図 1

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PIVKA-II値 (B)，血清メチル化SEPT9コピー数 (C)，血清メチル化HOXA1コピー数 (D) の中央値および四分範囲を示す。

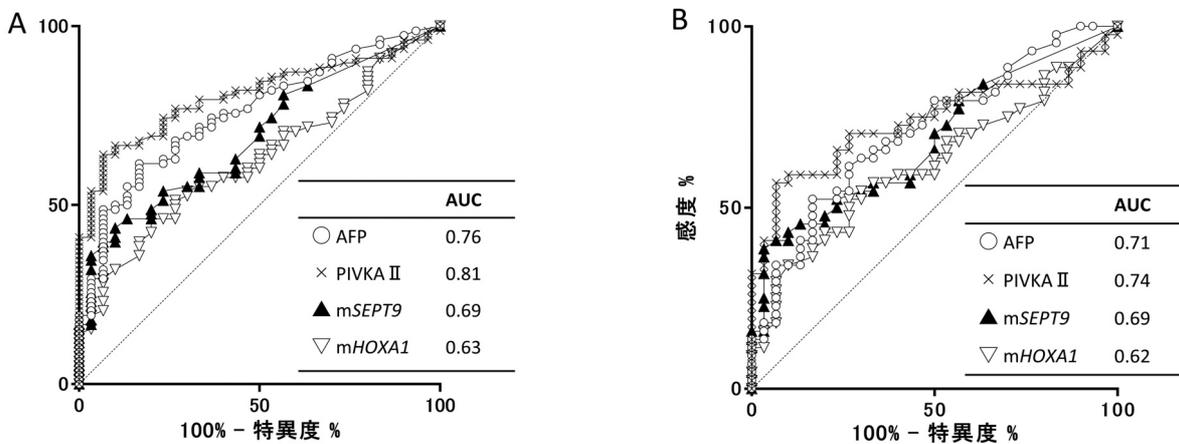


図 2

慢性肝疾患群と肝細胞癌群 (全ステージ) のROC曲線 (A)，慢性肝疾患群と肝細胞癌群 (stage0~A) のROC曲線 (B)

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	PIVKA II	<i>mSEPT9</i>	<i>mHOXA1</i>
全ステージ肝細胞癌				
感度	38.5%	59.0%	35.9%	19.2%
	(30/78)	(46/78)	(28/78)	(15/78)
特異度	96.4%	96.4%	92.7%	96.4%
	(53/55)	(53/55)	(51/55)	(53/55)
陽性的中率	93.8%	95.8%	87.5%	88.2%
	(30/32)	(46/48)	(28/32)	(15/17)
陰性的中率	52.5%	62.4%	50.5%	45.7%
	(53/101)	(53/85)	(51/101)	(53/116)
早期肝細胞癌				
感度	22.7%	50.0%	38.6%	15.9%
	(10/44)	(22/44)	(17/44)	(7/44)
特異度	96.4%	96.4%	92.7%	96.4%
	(53/55)	(53/55)	(51/55)	(53/55)
陽性的中率	83.3%	91.7%	81.0%	77.8%
	(10/12)	(22/24)	(17/21)	(7/9)
陰性的中率	60.9%	70.7%	65.4%	58.9%
	(53/87)	(53/75)	(51/78)	(53/90)

表3 二種類のバイオマーカーの併用検査による肝細胞癌診断性能比較

	AFP + <i>mSEPT9</i>	AFP + <i>mHOXA1</i>	PIVKA II + <i>mSEPT9</i>	PIVKA II + <i>mHOXA1</i>	AFP + PIVKA II	<i>mSEPT9</i> + <i>mHOXA1</i>
全ステージ						
肝細胞癌						
感度	59.0%	48.7%	73.1%	64.1%	65.4%	43.6%
	(46/78)	(38/78)	(57/78)	(50/78)	(51/78)	(34/78)
特異度	91.0%	92.7%	89.1%	92.7%	94.5%	91.0%
	(50/55)	(51/55)	(49/55)	(51/55)	(52/55)	(50/55)
陽性的中率	90.2%	90.5%	90.5%	92.6%	94.4%	87.2%
	(46/51)	(38/42)	(57/63)	(50/54)	(51/54)	(34/39)
陰性的中率	61.0%	56.0%	70.0%	64.6%	65.8%	53.2%
	(50/82)	(51/91)	(49/70)	(51/79)	(52/79)	(50/94)
早期						
肝細胞癌						
感度	54.5%	34.1%	70.5%	56.8%	56.8%	43.2%
	(24/44)	(15/44)	(31/44)	(25/44)	(25/44)	(19/44)
特異度	91.0%	92.7%	89.1%	92.7%	94.5%	91.0%
	(50/55)	(51/55)	(49/55)	(51/55)	(52/55)	(50/55)
陽性的中率	82.8%	78.9%	83.8%	86.2%	89.3%	79.2%
	(24/29)	(15/19)	(31/37)	(25/29)	(25/28)	(19/24)
陰性的中率	71.4%	63.8%	79.0%	72.9%	73.2%	66.7%
	(50/70)	(51/80)	(49/62)	(51/70)	(52/71)	(50/75)

表4 三種類のバイオマーカーの併用検査による肝細胞癌スクリーニング性能比較

	AFP +PIVKA II + <i>mSEPT9</i>	AFP +PIVKA II + <i>mHOXA1</i>
全ステージ		
肝細胞癌		
感度	78.2% (61/78)	70.5% (55/78)
特異度	89.1% (49/55)	90.9% (50/55)
陽性的中率	91.0% (61/67)	91.7% (55/60)
陰性的中率	74.2% (49/66)	68.5% (50/73)
早期		
肝細胞癌		
感度	77.3% (34/44)	63.6% (28/44)
特異度	89.1% (49/55)	90.9% (50/55)
陽性的中率	85.0% (34/40)	84.8% (28/33)
陰性的中率	83.1% (49/59)	75.8% (50/66)

あると考えられている。*HOXA1*はHOX遺伝子の一つであり、*HOXA1*のDNAメチル化修飾による*HOXA1*タンパク発現低下により、*HOXA1*のターゲットとなる様々な腫瘍抑制遺伝子やアポトーシス関連遺伝子の転写や発現が抑制される結果、腫瘍形成が促進されること、また、*m-HOXA1*は胆管癌、乳癌、肺癌、胃癌、甲状腺癌におけるバイオマーカーであることが報告されている<sup>15)</sup>。肝細胞癌については、*m-HOXA1*と3つのメチル化遺伝子 (*EMX1*, *TSPYL5*, *B3GALT6*)、および、2つの腫瘍マーカー (AFP, AFP-L3) からなるマルチパネル検査による全ステージ肝細胞癌の検査感度80%、早期肝細胞癌の検査感度71%、特異度90%と報告されている<sup>16)</sup>。Kisielらは*HOXA1*を含む6つのメチル化マーカーによるリキッドバイオプシーでの検査感度は全ステージ肝細胞癌95%、ステージ0 75% (3/4)、ステージA 93% (39/42)、ステージB 93% (13/14)、ステージC 100% (28/28)、ステージD 100% (7/7) で

あり、特異度は92% (137/149) と報告している<sup>17)</sup>。以上のように*HOXA1*のDNAメチル化修飾による*HOXA1*タンパク発現低下が癌の発生に関係するという報告がある一方で、*HOXA1*発現量増加が肝細胞癌患者生命予後不良と関連することが報告されている<sup>22)</sup>。さらには、*HOXA1*の発現を抑制することで、*in vitro*においては細胞増殖能、細胞移動能、浸潤能が抑制され、*in vivo*では腫瘍サイズが縮小することが報告されている<sup>22)</sup>。以上の知見から、*HOX*遺伝子は発現量の低下と増加の両面で、癌の発生や進展に関連する可能性があるといえる。今回の我々の検討では肝細胞癌組織の*HOXA1*メチル化レベルと*HOXA1*発現量や腫瘍悪性度との関係について検討しなかったため、今後この点についても検討を行う必要性が考えられた。

本研究において、慢性肝疾患群と肝細胞癌群のROC曲線のAUCはPIVKA-II, AFP, *m-SEPT9*, *m-HOXA1*それぞれ0.76, 0.81, 0.69, 0.63, 慢性肝

疾患群と早期肝細胞癌群のROC曲線のAUCはそれぞれ0.71, 0.74, 0.69, 0.62であった。m-SEPT9, m-HOXA1のどちらも、肝細胞癌全ステージのAUCと早期肝細胞癌群のAUCに大きな差はなかった。このことから、SEPT9のメチル化、HOXA1のメチル化が発癌の初期変化である可能性が考えられた。

本研究におけるm-SEPT9, m-HOXA1のカットオフ値の設定について、慢性肝疾患群と肝細胞癌群のROC解析に基づきそれぞれ特異度96.4%となる値をカットオフ値と定めた。この理由として複数マーカー併用検査した場合の偽陽性を少なくするためである。この特異度におけるm-SEPT9, m-HOXA1の感度はそれぞれ38.5%, 19.2%であり、m-SEPT9の方が優れていた。次に、複数のマーカーを併用した際の検査性能について検討した。PIVKA-IIとm-SEPT9について着目すると、全ステージ肝細胞癌、および、早期肝細胞癌に対する検査感度は、PIVKA-II単独ではそれぞれ59.0%, 50.0%, m-SEPT9単独ではそれぞれ35.9%, 38.6%に過ぎなかった。しかし、両者を組み合わせることで検査感度がそれぞれ73.1%, 70.5%にまで向上し、PIVKA-IIのみでは拾い上げることができない肝細胞癌をm-SEPT9により拾い上げ可能であった。さらには、PIVKA-IIとm-SEPT9の組み合わせによる全ステージ肝細胞癌の検査感度73.1%, 早期肝細胞癌の検査感度70.5%は、保険適応となっているPIVKA-IIとAFPの組み合わせによる肝細胞癌の検査感度（全ステージ肝細胞癌65.4%, 早期肝細胞癌56.8%）よりも高いことから、PIVKA-IIを相補するマーカーとしてはAFPよりもm-SEPT9の方が肝細胞癌の検査感度が優れている可能性が示唆された。臨床現場においては肝硬変や慢性肝炎など肝癌への進行リスクが疑われる患者に対してはAFPとPIVKA-IIの同時検査が保険診療として認められていることから、これらの腫瘍マーカーとm-SEPT9あるいはm-HOXA1の組み合わせによる検査性能を比較したところ、AFP, PIVKA-II, m-SEPT9の組み合わせが最も臨床性能が優れていた。すなわち、早期肝細胞癌群について、AFPとPIVKA-II併用検査では感度56.8%, 特異度94.5%であるが、これらにm-SEPT9を組み合わせると感度77.3%, 特異度89.1%となり、特異度が若干低下するものの、20.5%もの検査感度向上が見られた。そのため、従来のAFPとPIVKA-

IIでは陽性とならなかった肝細胞癌症例でも、m-SEPT9を加えることで拾い上げが可能になるものと思われた。

類似の検査として前述のChalasaniraは、HOXA1, EMX1, TSPYL5の3つのメチル化遺伝子と2つの腫瘍マーカー（AFP, AFPL3）からなるパネル検査で早期肝細胞癌を感度71%, 特異度90%で検出可能と報告している<sup>16)</sup>。これは我々の今回のm-SEPT9, AFP, PIVKA-II併用検査成績とほぼ同等の成績であるが、AFPとAFPL3の併用は本邦では保険適応外であることから、Chalasaniraの方法では我が国での臨床検査としての実施は不可能である。さらには、我々の開発した検査法では解析対象のメチル化遺伝子についてはSEPT9の1種類のみであり、3つのメチル化遺伝子を調べるChalasaniraの方法<sup>16)</sup>よりも低コストで解析できる点で優位性がある。

## V. 結 論

早期肝細胞癌スクリーニング性能はm-HOXA1よりもm-SEPT9の方が優れていた。また、二種類のマーカーによる併用検査の組み合わせでは、PIVKA-IIとm-SEPT9の組み合わせが、三種類のマーカーによる併用検査の組み合わせでは、AFPとPIVKA-IIとm-SEPT9の組み合わせが最も優れた検査感度を示した。今回の結果は早期肝細胞癌スクリーニングにおけるAFP, PIVKA-II, m-SEPT9併用検査の有用性を示すものであった。今後さらに症例を重ねて臨床的有用性を検証する必要がある。

## 引用文献

- 1) Ferlay J, Ervik M, Lam F, et al. Global Cancer Observatory : Cancer Today. Lyon. <https://gco.iarc.fr/today>. (参照2022-02-17)
- 2) 日本肝癌研究会 肝癌追跡調査委員会 (編). 第23回全国原発性肝癌追跡調査報告 (2014-2015). 2021年7月.
- 3) がん診療連携拠点病院等 院内がん登録 2012-2013年5年生存率集計 報告書 [https://ganjoho.jp/public/qa\\_links/report/hosp\\_c/hosp\\_c\\_reg\\_surv/pdf/hosp\\_c\\_reg\\_surv\\_all\\_2012-](https://ganjoho.jp/public/qa_links/report/hosp_c/hosp_c_reg_surv/pdf/hosp_c_reg_surv_all_2012-)

- 2013.pdf. (参照2022-02-17)
- 4) Adeniji N, Dhanasekaran R. Current and Emerging Tools for Hepatocellular Carcinoma Surveillance. *Hepatol Commun* 2021 ; 5 : 1972-1986.
  - 5) 日本臨床検査医学会. 肝臓癌. 日本臨床検査医学会ガイドライン作成委員会編, 臨床検査のガイドラインJSLM2015, 宇宙堂八木書店, 東京, 2015 ; 319-323.
  - 6) 日本肝臓学会 (編). 肝臓診療ガイドライン第5版 2021年版. 金原出版. 2021
  - 7) Marrero J, Feng Z, Wang Y, et al. Alpha-fetoprotein, des-gamma carboxyprothrombin, and lectin-bound alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2009 ; 137 : 110-118.
  - 8) Robertson C, Church S, Nagar H, et al. Properties of SEPT9 isoforms and the requirement for GTP binding. *The Journal of Pathology* 2004 ; 203 : 519-527.
  - 9) Burrows J, Chanduloy S, McIlhatton M, et al. Altered expression of the septin gene, SEPT9, in ovarian neoplasia. *The Journal of Pathology* 2003 ; 201 : 581-588.
  - 10) Villanueva A, Portela A, Sayols S, et al. DNA methylation-based prognosis and epidrivers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2015 ; 61 : 1945-1956.
  - 11) Li B, Huang H, Huang R, et al. SEPT9 Gene methylation as a noninvasive marker for hepatocellular carcinoma. *Dis Markers* 2020 ; 29 : 6289063.
  - 12) Reig M, Forner A, Rimola J, et al. BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation : The 2022 update. *J Hepatol* 2022 ; 76 : 681-693.
  - 13) Kotoh Y, Suehiro Y, Saeki I, et al. Novel Liquid Biopsy Test Based on a Sensitive Methylated SEPT9 Assay for Diagnosing Hepatocellular Carcinoma. *Hepatol Commun* 2020 ; 4 : 461-470.
  - 14) 山崎綾乃, 末廣 寛, 星田朋美, 他. 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. *山口医学* 2021 ; 3 : 89-98.
  - 15) Paço A, de Bessa Garcia SA, Freitas R. Methylation in HOX Clusters and Its Applications in Cancer Therapy. *Cells* : 2020 ; 9 : 1613.
  - 16) Chalasani N, Ramasubramanian T, Bhattacharya A, et al. A Novel Blood-Based Panel of Methylated DNA and Protein Markers for Detection of Early-Stage Hepatocellular Carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2021 ; 12 : 2597-2605.
  - 17) Kisiel J, Dukek B, Kanipakam R, et al. Hepatocellular Carcinoma Detection by Plasma Methylated DNA : Discovery, Phase I Pilot, and Phase II Clinical Validation. *Hepatology* 2019 ; 69 : 1180-1192.
  - 18) 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 : 2 : 723-750.
  - 19) Li B, Huang H, Huang R, et al. SEPT9 Gene Methylation as a Noninvasive Marker for Hepatocellular Carcinoma. *Dis Markers* 2020 ; 6289063.
  - 20) 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.
  - 21) Pilato B, Pinto R, Summa S, et al. HOX gene methylation status analysis in patients with hereditary breast cancer. *J Hum Genet* 2013 ; 58 : 51-53.
  - 22) Zha T, Hu B, Yu F, et al. Overexpression of HOXA1 correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Tumor Biology* 2012 ; 33 : 2125-2134.

**Liquid Biopsy Test Based on a Sensitive DNA Methylation Assay for Diagnosing Early-Stage Hepatocellular Carcinoma: Which Is Better as a Combination Marker of AFP and PIVKA-II, Methylated *SEPT9* or *HOXA1*?**

Koki MATSUI, Ayano YAMASAKI,  
Yutaka SUEHIRO<sup>1)</sup>, Tomomi HOSHIDA<sup>1)</sup>,  
Issei SAEKI<sup>2)</sup>, Yurika YAMAUCHI<sup>2)</sup>,  
Toshihiko MATSUMOTO<sup>2)</sup>, Shingo HIGAKI<sup>3)</sup>,  
Ikuei FUJII<sup>4)</sup>, Chieko SUZUKI<sup>4)</sup>,  
Taro TAKAMI<sup>2)</sup>, Isao SAKAIDA<sup>2, 3)</sup> and  
Takahiro YAMASAKI<sup>1)</sup>

Department of Medicine, Yamaguchi University School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan 1) Department of Oncology & Laboratory Medicine, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan 2) Department of Gastroenterology and Hepatology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan 3) Department of Gastroenterology, St. Hill Hospital, 3-7-18 Imamura-Kita, Ube, Yamaguchi 755-0155, Japan 4) Ajisu Kyoritsu Hospital, 4841-1 Ajisu, Yamaguchi, Yamaguchi 754-1277, Japan

**SUMMARY**

Although a combination test of alpha-fetoprotein (AFP) and protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II) is covered by public insurance in Japan for the screening of hepatocellular carcinoma (HCC) in patients with chronic hepatitis and/or cirrhosis, its diagnostic performance for early-stage HCC is limited. To resolve this, we investigated whether a liquid biopsy of methylated *SEPT9* and methylated *HOXA1* may complement the diagnostic performance of AFP and PIVKA-II for early-stage HCC. We measured AFP, PIVKA-II, and copy numbers of methylated *SEPT9* and *HOXA1* in serum from 25 healthy controls, 30 patients with chronic liver disease, and 78 patients with HCC (including 44 patients with early-stage HCC). Sensitivity and specificity for early-stage HCC were, respectively, 56.8% and 94.5% for the combination of AFP and PIVKA-II; 77.3% and 89.1% for the combination of AFP, PIVKA-II, and methylated *SEPT9*; and 63.6% and 90.9% for the combination of AFP, PIVKA-II, and methylated *HOXA1*. Having the highest sensitivity and considerable specificity, the combination of AFP, PIVKA-II, and methylated *SEPT9* appeared to be the best companion test for detecting early-stage HCC.