

Press Release



〒753-8511 山口市吉田1677-1
TEL : 083-933-5007
FAX : 083-933-5013
E-mail : sh011@yamaguchi-u.ac.jp

【2024年5月13日】

送付枚数 本票含めA4 5枚

肝細胞がんに対するリキッドバイオプシー検査と腫瘍マーカー を組み合わせた新規診断インデックスの開発

【発表のポイント】

- ✓ 改良型 DNA メチル化アッセイ法の開発により工程の簡素化と診断性能の向上を実現した。
 - ・解析に要する日数が3日から1日に短縮
 - ・簡便かつ超高感度に定量測定が可能
- ✓ 肝がん診断のための新規インデックス(ASDAm-H1 index)を開発した。
 - ・メチル化 *HOXA1* と腫瘍マーカーの組み合わせ検査
 - ・ウイルス性・非ウイルス性、いずれの早期肝がんに対しても高い診断性能
 - ・非ウイルス性肝がんに対する新たなサーベイランスシステムの可能性

【概要】

山口大学大学院医学系研究科臨床検査・腫瘍学講座の山崎隆弘教授、末廣 寛准教授、國宗勇希（大学院生）、消化器・腫瘍外科学講座の永野浩昭教授および消化器内科学講座の高見太郎教授らの研究グループは、肝細胞がん（以下肝がん）に対するリキッドバイオプシー検査（血漿や血清中に浮遊しているがん細胞や腫瘍特異的な遺伝子変化を非侵襲的に検出する方法）と腫瘍マーカーを組み合わせた新規診断インデックスを開発しました。

同研究者らは新しい DNA メチル化レベル解析法である Combined Restriction Digital PCR (CORD) アッセイを開発し、リキッドバイオプシーに応用することで、様々な消化器がんの診断に有用であることを報告してきました（注1）。今回、この CORD アッセイをさらに改良し、リキッドバイオプシーに用いたところ、このリキッドバイオプシーと従来の腫瘍マーカーとの組み合わせが肝がん診断に非常に有用であることを発見しました。肝がん診断の検査感度（注2）は86.2%、特異度（注3）は93.9%であり、早期がんでも76.3%と高い検査感度を示しています。なお、この新規診断インデックスを ASDAm-H1 index と命名しています。

本研究成果は、肝臓領域のトップジャーナルである *Liver Cancer* 誌 (IF 13.8) に 2024 年 2 月 14 日に公開されました。

【研究背景】

「がん」は日本人の2人に1人は罹患する身近な疾患であり、年間約2.5万人が肝がんで亡くなっています。以前のわが国の肝がんの原因はウイルス肝炎、とくにC型肝炎ウイルスが主でしたが、治療の進歩により同ウイルスの排除が可能となり、C型肝炎ウイルスによる肝がんは年々減ってきています。その一方で、主にアルコール摂取、続いて糖尿病、脂質異常症や高血圧などの生活習慣に起因したウイルスに関係しない慢性肝障害を原因とする「非ウイルス性肝がん」が増加しています。

しかし、この非ウイルス性肝がんについては、早期がん発見のための有効なスクリーニング検査で確立されたものはありません。そのため、「非ウイルス性肝がん」が発見されたときにはすでに進行した状態で見つかるという問題点があります。そこで、新たなスクリーニング検査の開発が望まれてきました。

その候補としてリキッドバイオプシー検査がありますが、肝がん診断のリキッドバイオプシー検査については本邦では実用化されたものはありません。なお、がんは遺伝子の異常により起こる病気であり、その遺伝子異常の一つとしてDNA（遺伝子）メチル化があります。我々はDNAを3種類のメチル化制限酵素（HhaI, HpaII, BstUI）で処理してメチル化されているDNAのみをデジタルPCRで測定するCORDアッセイを開発し、簡便かつ低コストで高感度な定量化に成功しています。そしてこのCORDアッセイをリキッドバイオプシーに使用したところ、胃、大腸、膵臓など種々の消化器がんの早期診断に有用性であることを発見し、多数の論文に報告してきました（注1）。さらに、同技術を用いてSEPT9という遺伝子のメチル化レベルを調べたところ、肝がん診断に非常に有用であることや、分子標的薬の効き目と関係あることを発見し、これらについても論文に報告しています（注1）。

今回、工程の簡素化、およびリキッドバイオプシー検査の診断性能向上を目指し改良型CORDアッセイの開発を行いました。さらに新たなバイオマーカー候補であるメチル化HOXA1 (m-HOXA1) の肝がん診断性能を評価するとともに、これまで使用されてきた肝がんの腫瘍マーカーとの組み合わせによる新規診断インデックスの開発を目指しました。

【研究成果】

健常者154名、肝がんのない慢性肝障害患者93名、肝癌患者269名の計516名の血清試料による改良型CORD法によるm-HOXA1のコピー数測定を行いました。同時に、肝がんの腫瘍マーカーであるAFP、DCP (PIVKA-IIとも言います)も測定しました。

- 1) 改良型CORDアッセイ：DNA処理において従来法はメチル化制限酵素を2段階で処理していましたが、改良型では1段階で処理することにより、DNA処理時間を32時間から17時間に短縮できました。それにより、トータルの検査工程を約3日から約1日

にすることに成功しました (図 1)。

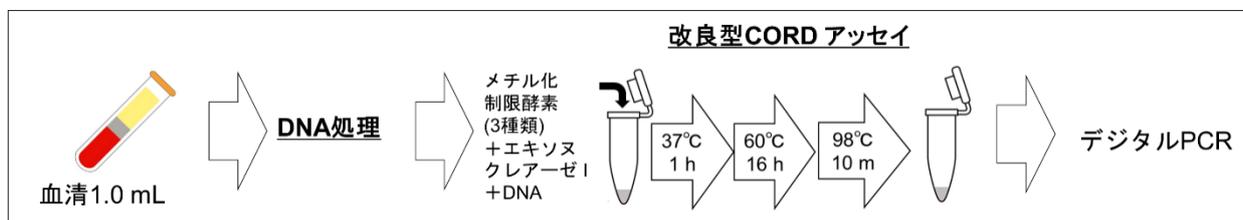


図 1 改良型 CORD アッセイ

- 2) *m-HOXA1* の肝がん診断性能：非がん群と肝がん群を識別する能力を示す曲線下面積 (AUC 注 4) は 0.82 でした。また、カットオフ値を 310 コピー/mL としたときの感度 69.1%、特異度 78.5% でした。これは、従来の腫瘍マーカー AFP よりも優れています (AUC 0.77, 感度 37.5%, 特異度 98.4%)。一方、DCP とほぼ同等の検査性能でした (AUC 0.82, 感度 66.5%, 特異度 96.8%)。さらに、これらの検査を組み合わせ、肝がん診断性能を調べてみました。それが次の説明になります。
- 3) 新規診断インデックス (ASDAm-H1 index) による肝がん診断性能：年齢、性、腫瘍マーカー (AFP、DCP) および *m-HOXA1* による肝がんの新規診断インデックスを開発し、ASDAm-H1 index と命名しました。その診断精度は AUC 0.96、感度 86.2%、特異度 93.9% (カットオフ値, 0.62) でした (図 2)。ウイルス性および非ウイルス性肝がんの感度は同等 (85.0%, 87.5%) であり、早期肝がんでも 76.3% と高い検査感度でした (図 3)。

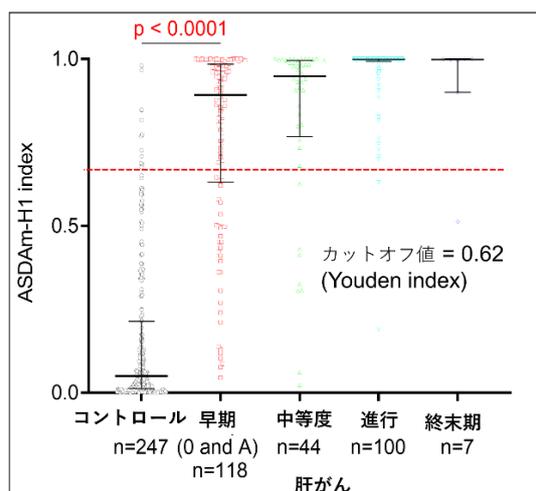


図 2 新規診断インデックス (ASDAm-H1 index)

ASDAm-H1 インデックスの中央値は、コントロール群では 0.05 ですが、早期がん患者ではその値が 0.89 とはるかに高くなります。このインデックスの値によって、肝がんか、がんでない

かを判別可能となります。

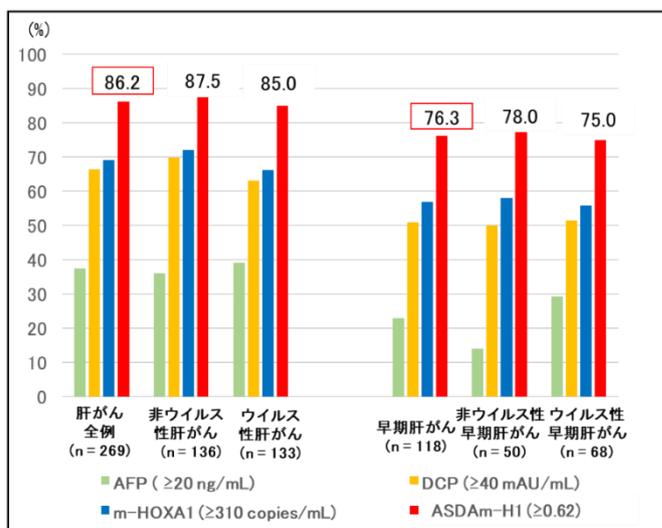


図3 各マーカーの検査感度

ASDAm-H1 は、AFP、DCP、m-*HOXA1* 単独検査と比べて、肝がんの診断性能が高いことを示しています。

【結論】

検査工程を約 1 日で終了できるより簡便な改良型 CORD アッセイの開発に成功しました。さらにその方法を用いて測定するリキッドバイオプシー検査である血清メチル化 *HOXA1* と腫瘍マーカーとの組み合わせによる新規肝がん診断インデックスを作成しました。近年、増加傾向にあるにもかかわらずサーベイランスシステムが未整備である「非ウイルス性肝がん」に対して、このインデックスが、がんの発見に特に有用であると思われます。

【今後の展望】

リキッドバイオプシー検査と腫瘍マーカーの組み合わせによるがん診断インデックスは、他のがん種にも応用可能です。実際に、本研究者らは胃がんや膵がんでもその有用性を確認しています。様々な臓器の早期がん診断に有効な方法として、今後も開発していきます。

注1) 肝がん以外に胃がん、大腸がん、膵がんについて論文報告しています。

肝がん：

- ・ Kotoh Y, Suehiro Y, Takami T, Nagano H, Yamasaki T, et al. Hepatol Commun. 2020; 4:461-70.
- ・ Saeki I, Suehiro Y, Nagano H, Takami T, Yamasaki T, et al. Hepatol Int. 2023 Oct;17(5):1289-1299.

胃がん：

・ Hideura E, Suehiro Y, Takami T, Yamasaki T, et al. *Cancers (Basel)*. 2020; 12:789.

大腸がん：

・ Suehiro Y, Takami T, Yamasaki T, et al. *Oncotarget*. 2018; 9:16974-87.

膵がん：

・ Fujimoto Y, Suehiro Y, Takami T, Nagano H, Yamasaki T, et al. *Oncology*. 2021; 99:234-9.

・ Suehiro Y, Takami T, Nagano H, Yamasaki T, et al. *Oncology*. 2022;100(12):674-684.

注2) 感度とは、病気の人を検出する力です。つまり今回であれば、その検査が肝がんと判断できる比率です。100%に近いほど感度が高い診断法と言えます。

注3) 特異度とは、病気でない人を検出する力を示します。その検査が肝がんでないと判断できる比率で、感度と同じように100%に近いほど特異度の高い診断法と言えます

注4) AUC とは、統計解析において感度と特異度をもとに描かれる ROC 曲線を作成した時、グラフ曲線より下の部分の面積をいいます。値が1 (感度100%、特異度100%) に近いほど診断精度が高いということになります。

【問合せ先】

<研究に関すること>

山口大学大学院 医学系研究科臨床検査・腫瘍学講座 教授 山崎 隆弘

E-mail: t.yama@yamaguchi-u.ac.jp

<報道に関すること>

山口大学総務企画部総務課広報室

電話：083-933-5007

FAX：083-933-5013

E-mail:sh011@yamaguchi-u.ac.jp