

肝細胞癌に対する高感度DNAメチル化解析による 簡便かつ低コストスクリーニング検査の研究開発

末廣 寛

山口大学大学院医学系研究科

臨床検査・腫瘍学講座

産学連携の経歴

2007年	シーズ発掘試験 (JST)
2008年	A-STEPシーズ顕在化 (JST)
2009年	地域イノベーション創出開発事業 (経産省)
2009年	ものづくり中小企業製品開発等支援 (経産省)
2011-2012年	A-STEPシーズ顕在化 (JST)
2013-2014年	がん超早期発見・治療機器の総合研究開発 (NEDO)
2020-2022年	革新的がん医療実用化研究事業 (AMED)

現在実施中の AMED事業 (2020.9-2022.3)

健常者：500例

肝癌：1,000例

血清メチル化SEPT9コピー数測定

肝癌診断性能評価

共同研究企業募集中
共同研究内容
• 試薬キット化
• 自動測定化

研究背景

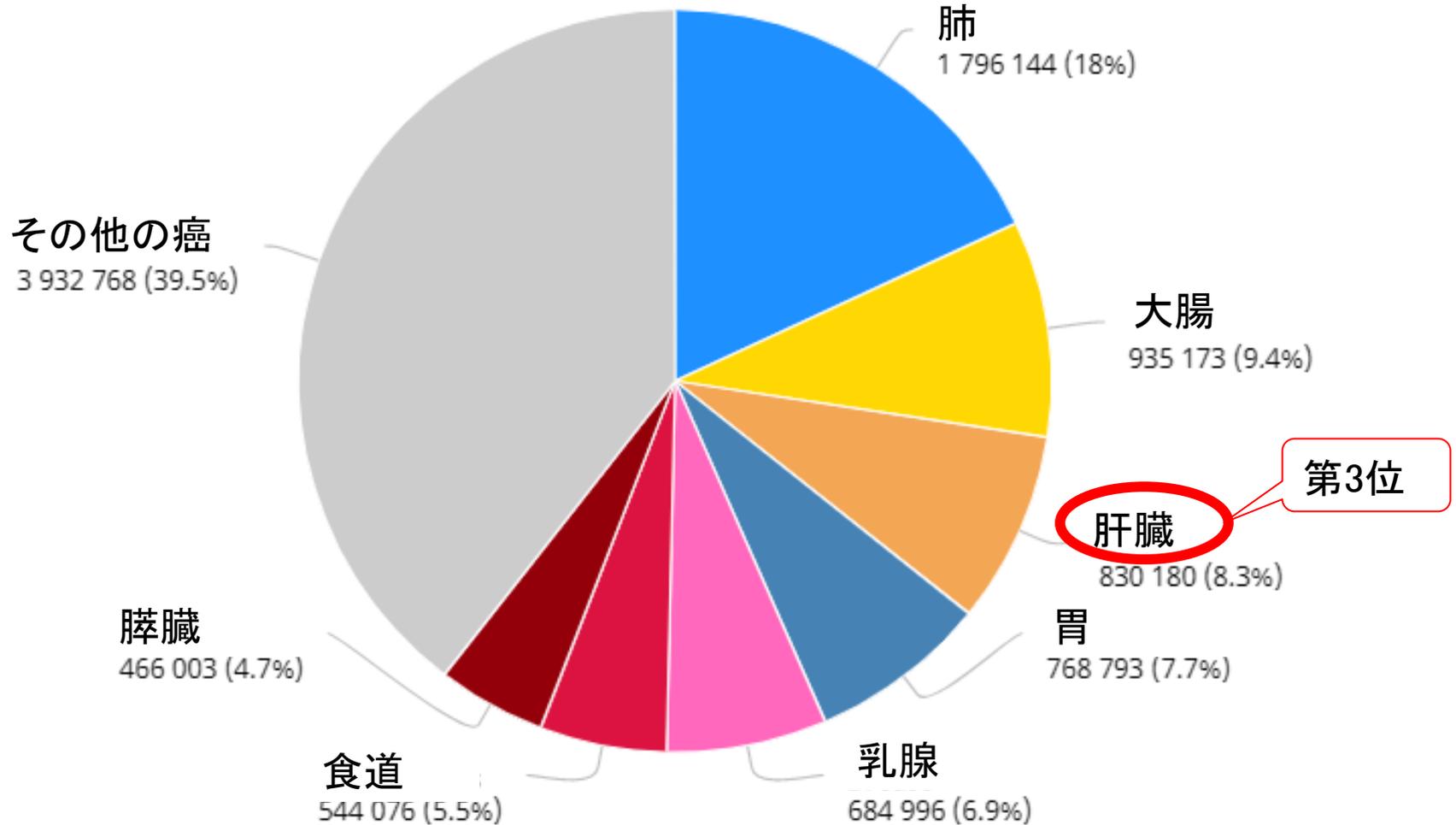
研究内容

新規メチル化解析技術開発

肝癌診断への応用

実用化への課題

世界の癌関連死の原因



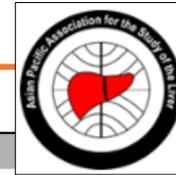
各国際ガイドラインで肝癌リスク群を 嚴重にフォローするように提唱されている



PRACTICE GUIDANCE | HEPATOLOGY, VOL. 68, NO. 2, 2018

Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases

Jorge A. Marrero,¹ Laura M. Kulik,² Claude B. Sirlin,³ Andrew X. Zhu,⁴ Richard S. Finn,⁵ Michael M. Abecassis,² Lewis R. Roberts,⁶ and Julie K. Heimbach⁶



Hepatol Int (2017) 11:317–370
DOI 10.1007/s12072-017-9799-9

GUIDELINES

Asia–Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatocellular carcinoma: a 2017 update

Masao Omata^{1,2} · Ann-Lii Cheng³ · Norihiro Kokudo⁴ · Masatoshi Kudo⁵ · Jeong Min Lee⁶ · Jidong Jia⁷ · Ryosuke Tateishi⁸ · Kwang-Hyub Han⁹ · Yoghesh K. Chawla¹⁰ · Shuichiro Shiina¹¹ · Wasim Jafri¹² · Diana Alcantara Payawal¹³ · Takamasa Ohki¹⁴ · Sadahisa Ogasawara¹⁵ · Pei-Jer Chen¹⁶ · Cosmas Rinaldi A. Lesmana^{17,18} · Laurentius A. Lesmana¹⁷ · Rino A. Gani¹⁸ · Shuntaro Obi¹⁹ · A. Kadir Dokmeci²⁰ · Shiv Kumar Sarin²¹



Clinical Practice Guidelines

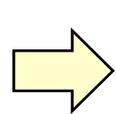
JOURNAL
OF HEPATOLOGY

EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma[☆]

European Association for the Study of the Liver^{*}



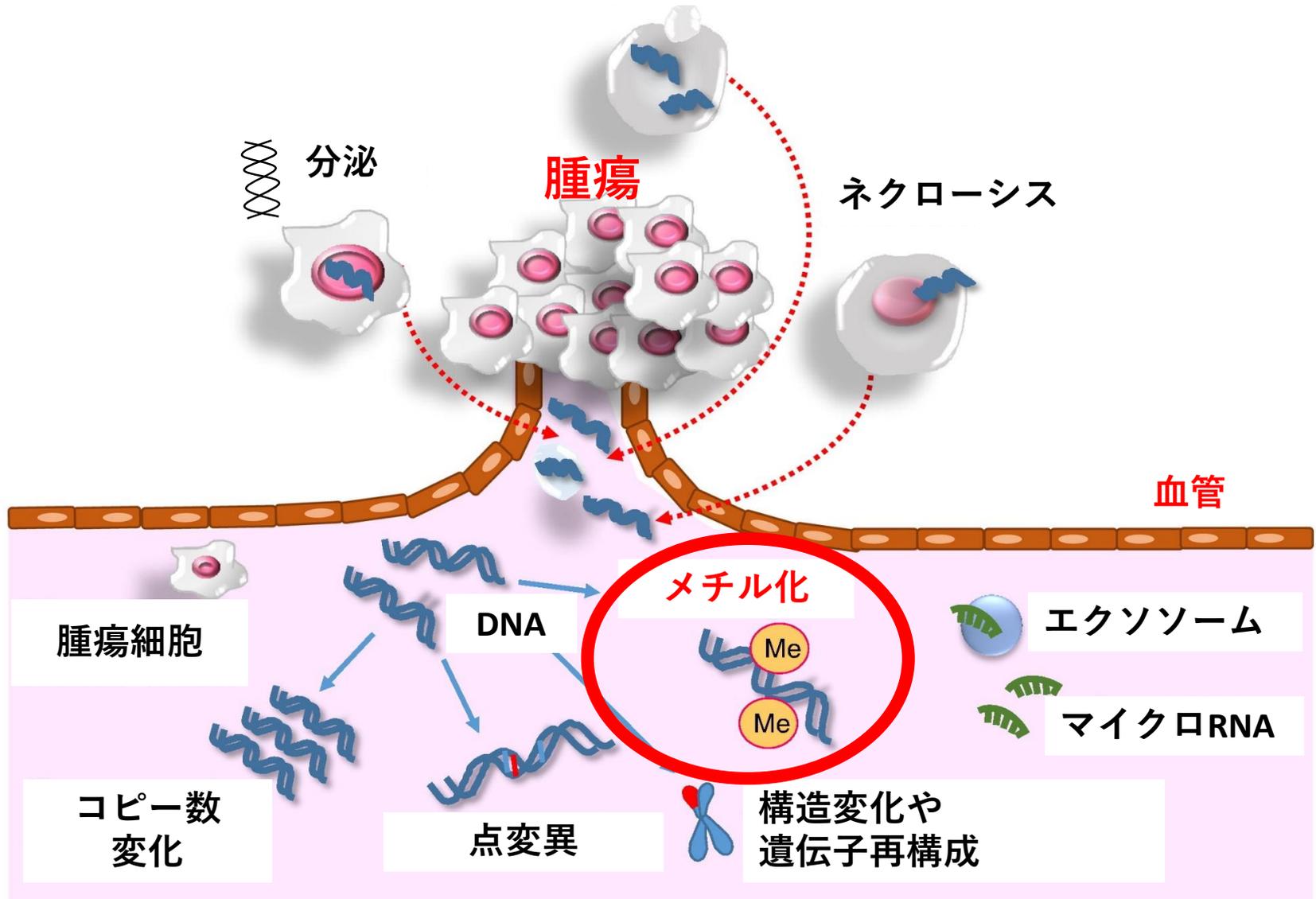
Management of Hepatocellular Carcinoma in Japan: JSH Consensus Statements and Recommendations 2021 Update



早期発見可能なバイオマーカーは未だ存在せず、
新規のスクリーニング方法が必要

簡便・低侵襲・高精度なスクリーニング検査 →リキッドバイオプシー

アポトーシス



現在臨床応用されているリキッドバイオプシー →Epi proColon®

Epi proColon®

- 2016年にFDA承認
- 大腸癌の検査として使用
- 血漿中のメチル化SEPT9をターゲットとする定性検査

SEPT9とは？

- 細胞分裂や腫瘍抑制因子を制御する鍵となる遺伝子
- SEPT9の高度メチル化が肝発癌に関与しているという報告がある

肝癌診断におけるEpi proColon®の有用性

EBioMedicine 30 (2018) 138–147

Contents lists available at ScienceDirect

EBioMedicine

journal homepage: www.ebiomedicine.com



ELSEVIER



Research Paper

Plasma mSEPT9: A Novel Circulating Cell-free DNA-Based Epigenetic Biomarker to Diagnose Hepatocellular Carcinoma

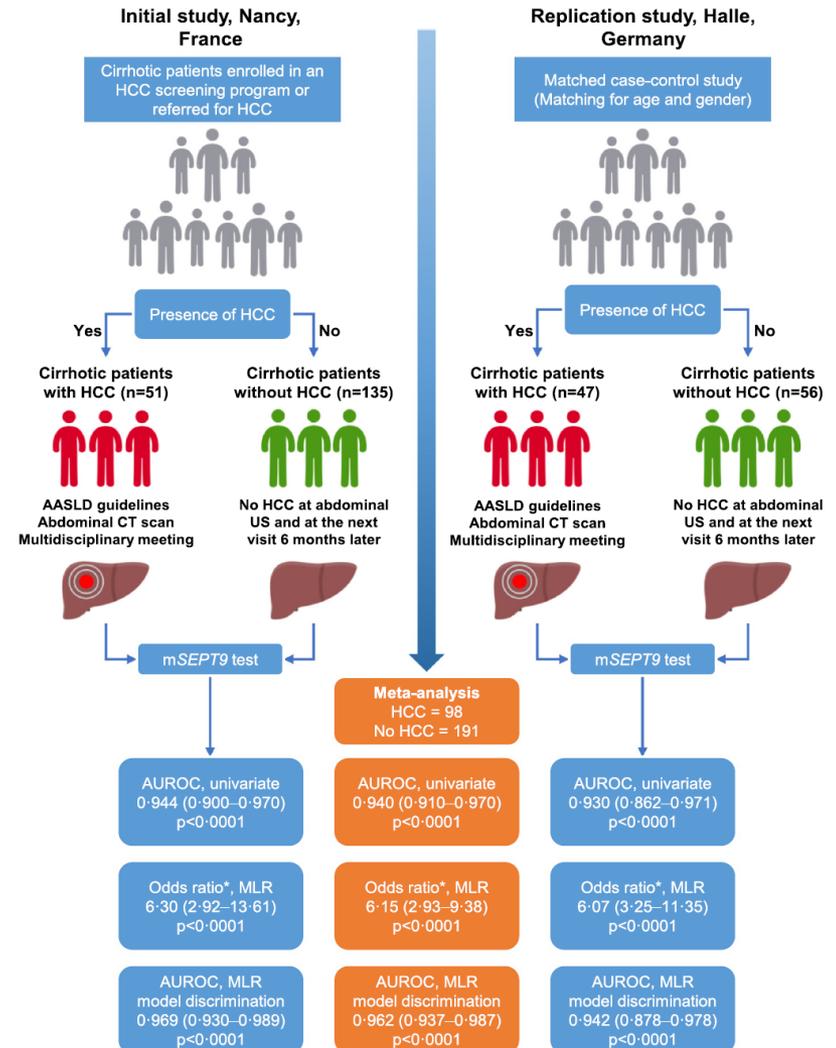
Abderrahim Oussalah^{a,b,*}, Susann Rischer^{c,1}, Mouni Bensenane^d, Guillaume Conroy^d, Pierre Filhine-Tresarrieu^{a,b}, Renée Debard^a, Denise Forest-Tramoy^a, Thomas Josse^a, Dana Reinicke^c, Matthieu Garcia^a, Amandine Luc^c, Cédric Baumann^c, Ahmet Ayav^f, Valérie Laurent^g, Marcus Hollenbach^h, Cristina Ripoll^c, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez^{a,b}, Fares Namour^{a,b}, Alexander Zipprich^{c,2}, Michael Fleischhacker^{c,2}, Jean-Pierre Bronowicki^{b,d,2}, Jean-Louis Guéant^{a,b,d,*}



➤ SEPT9メチル化を検出することが肝癌診断に有用であるとの報告はあるが、肝癌診断のリキッドバイオプシーは実用化されていない。

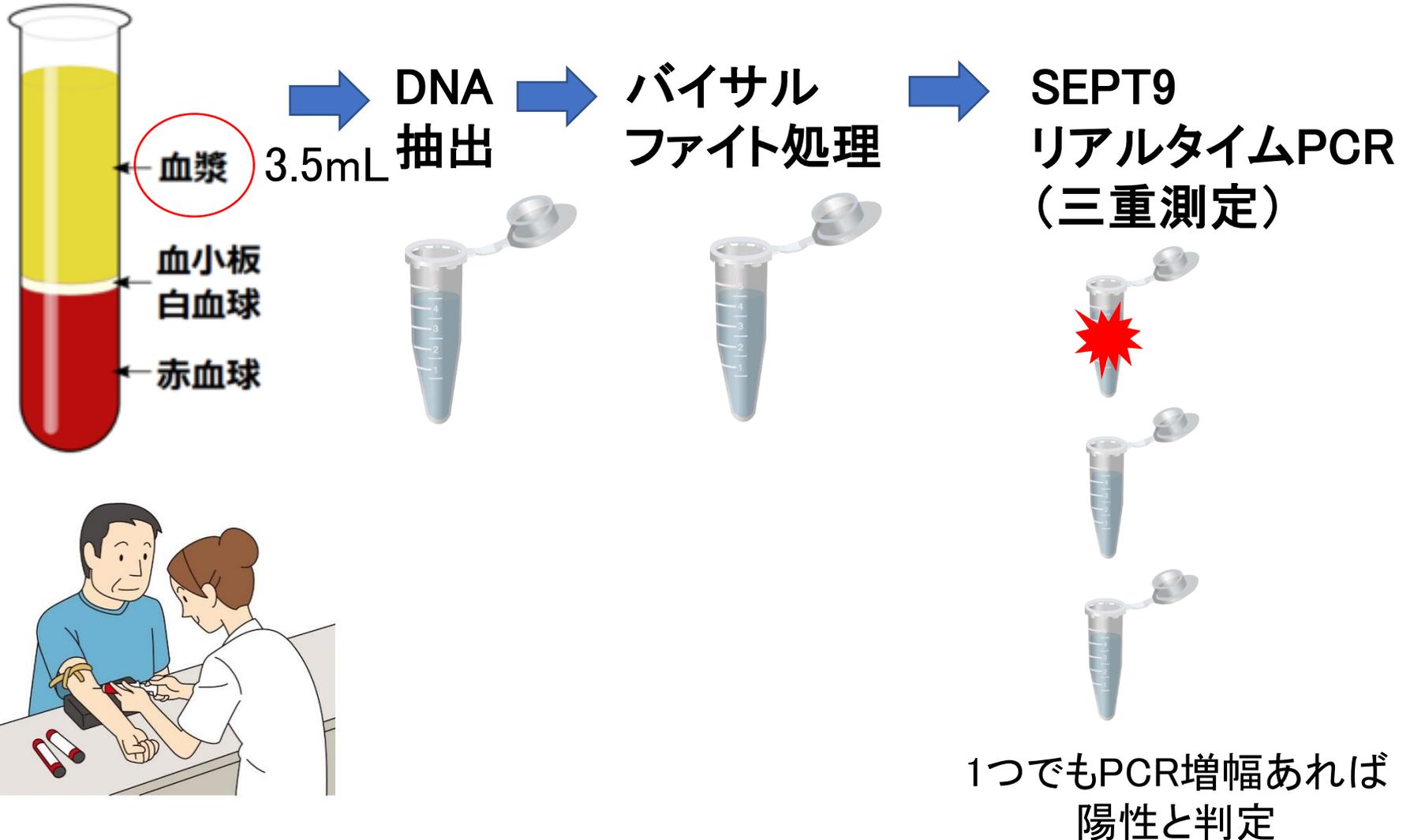
➤ Epi proColon®の問題点

- ・コストが高い(約300ドル, 約3万円)
- ・検体に使用できるのは血漿のみ
- ・多量の血漿(3.5mL)の検体が必要
- ・バイサルファイト処理で工程が煩雑
- ・定量性がない

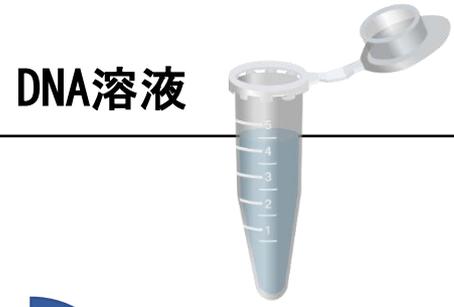


* For each mSEPT9 positive triplicate for HCC diagnosis

Epi proColon[®]検査手順



バイサルファイトベースのメチル化解析 (従来技術)



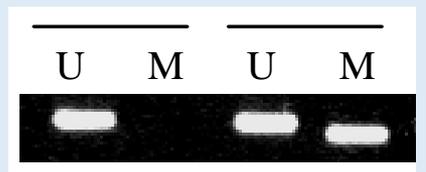
メチル化なし
CCCTCGGCCGCCG
UUUTUGGUUGUUG

バイサル
ファイト処理

メチル化あり
CCCT^{CH₃}CGG^{CH₃}CCG^{CH₃}CCG
UUUT^{CH₃}CGG^{CH₃}UCG^{CH₃}UCG

各種メチル化解析

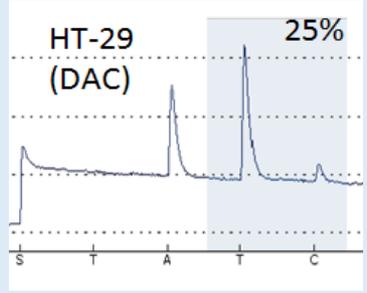
Methylation specific PCR



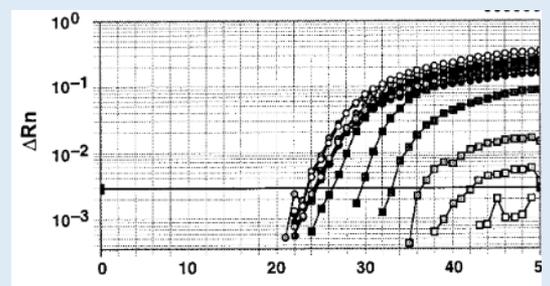
COBRA



Pyrosequencing

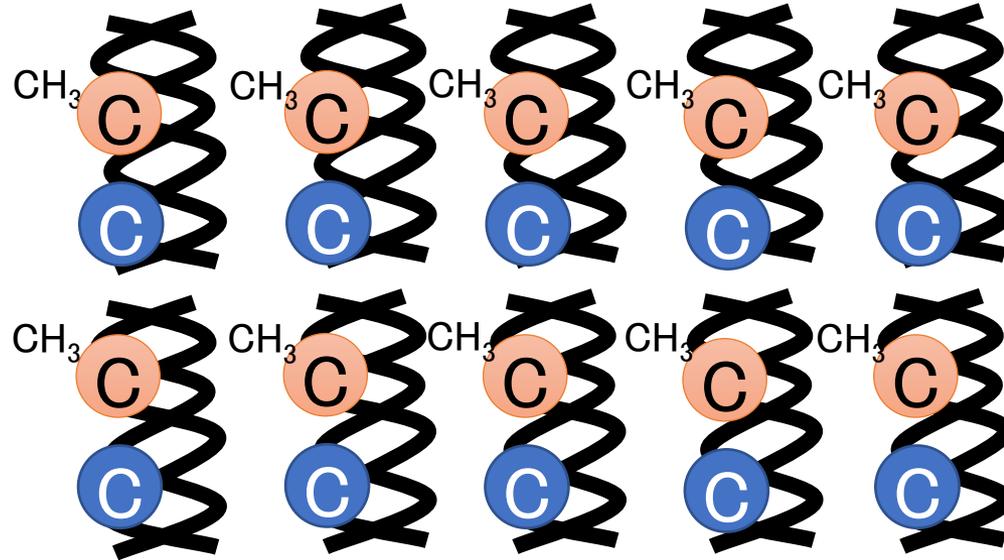


リアルタイムPCR

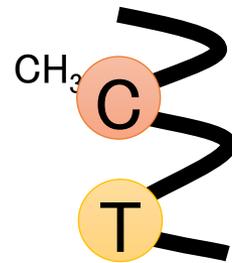


従来技術の問題点

PCR反応液中に
100コピー以上の
ターゲットDNAが
必要



バイサルファイト
処理



9割のDNAが変性喪失
一本鎖DNA(分解しやすい)

定量測定

定量PCRでの**検出限界は約10コピー**

研究背景

研究内容

新規メチル化解析技術開発

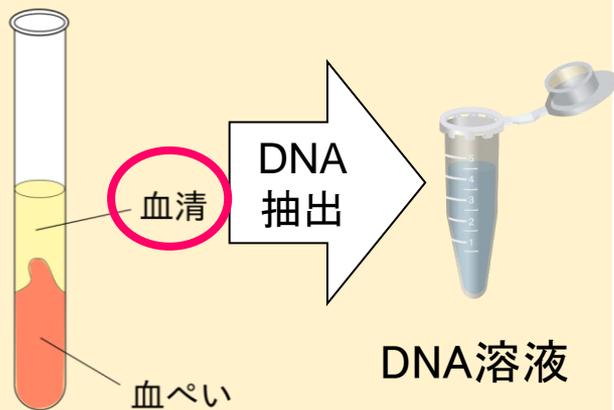
肝癌診断への応用

実用化への課題

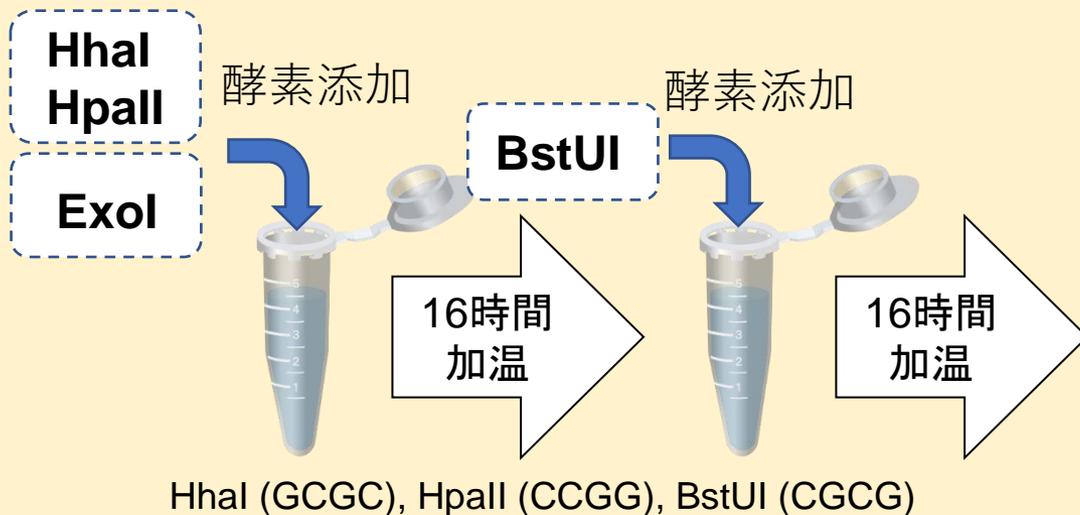
新規メチル化解析法

(特許第6897970号)

①血清や血漿からDNA抽出

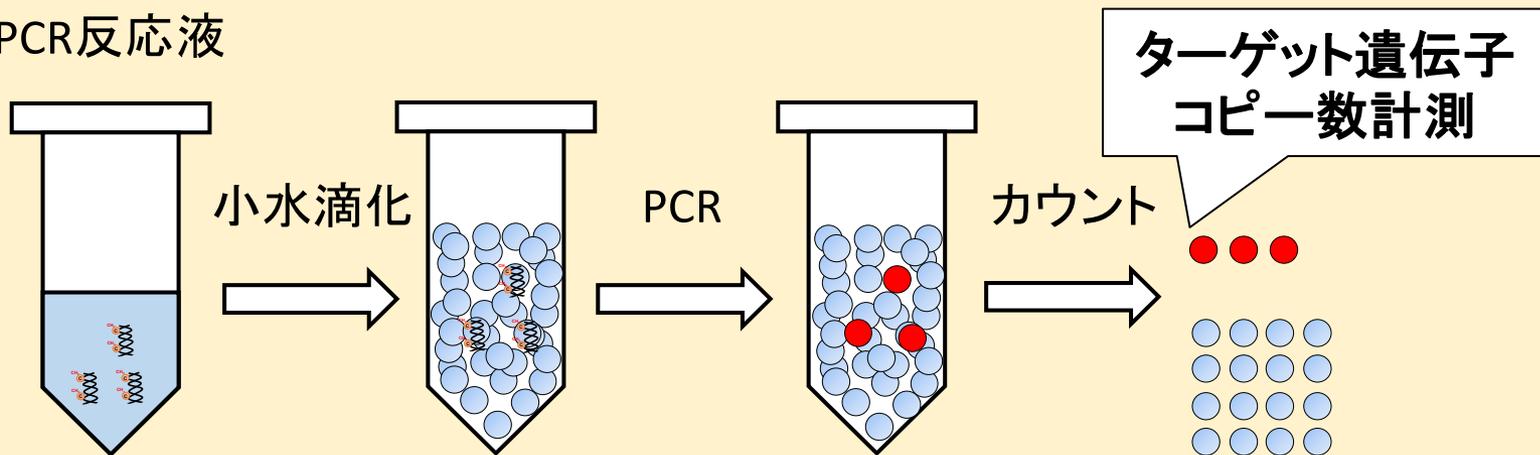


②DNA前処理(二段階酵素処理)



③デジタルPCR

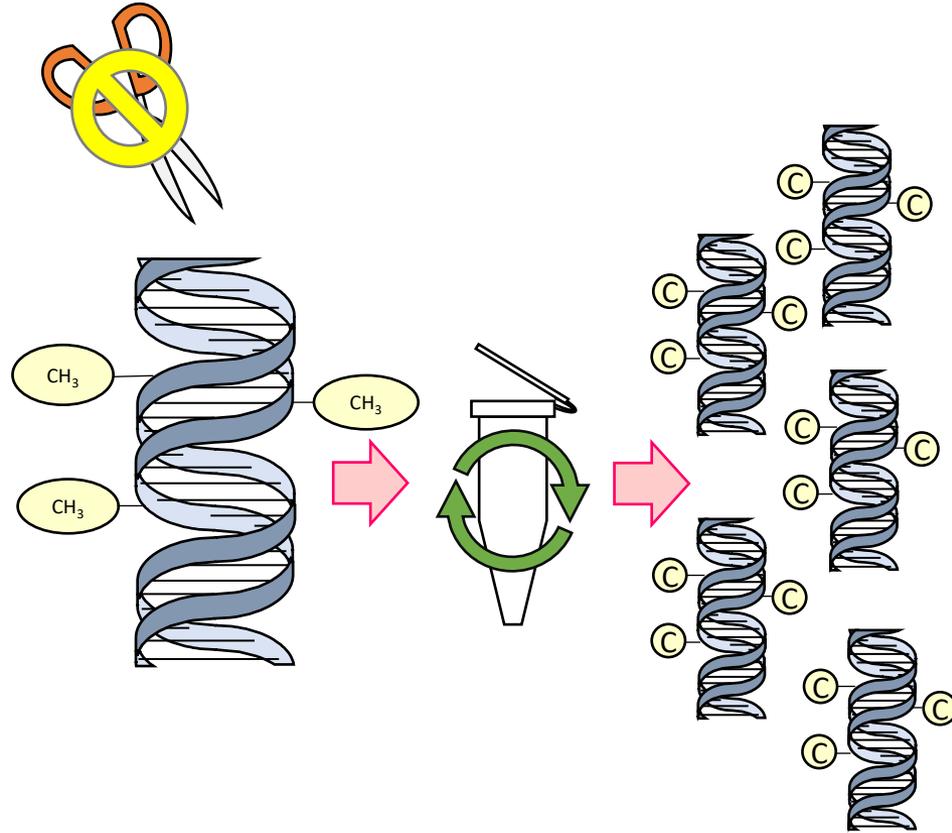
PCR反応液



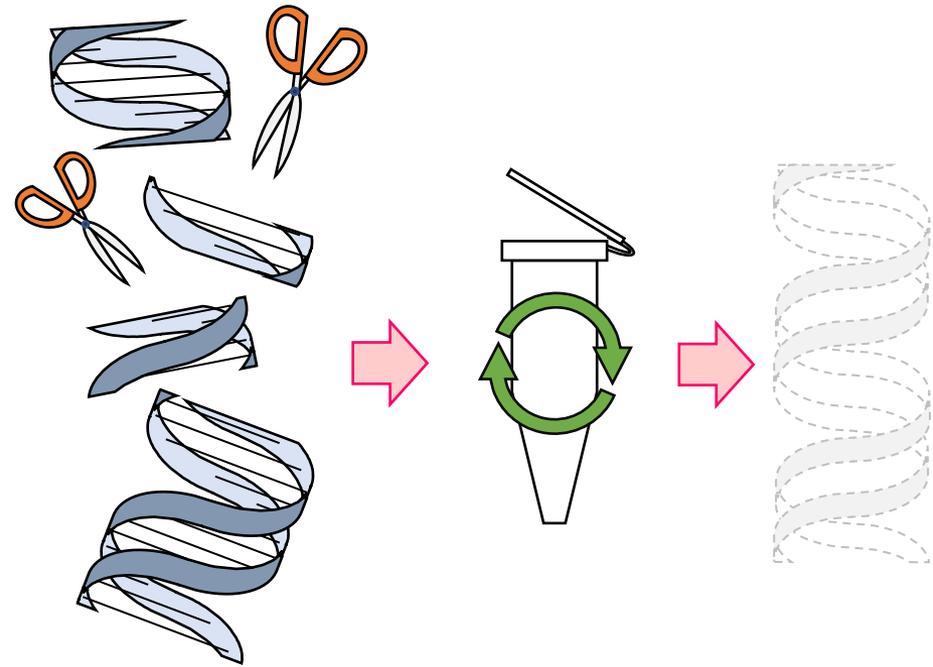
メチル化感受性制限酵素でのDNA処理

SEPT9がメチル化されていると...

SEPT9がメチル化されていないと...



メチル化感受性制限酵素で処理されず
PCRで増幅することができる



メチル化感受性制限酵素で切断され
PCRで増幅されない

- 少量のDNAでもPCRで増幅可能
- バイサルファイト処理法と比較し、**感度100倍**

Epi proColon®と新規メチル化解析法の比較

	Epi proColon®	新規メチル化解析法
検体	血漿	血清または血漿
測定検体量	3.5mL	0.04mL
DNA処理方法	煩雑 (DNA濃縮とバイサルファイト法) →90%のDNAが喪失するため、 多量の検体が必要	単純 (メチル化感受性制限酵素)
PCR	リアルタイムPCR	デジタルPCR
解析	定性(陽性/陰性)	定量(コピー数の絶対数)
値段	高コスト(300ドル、約3万円)	低コスト(原価2,500円)

研究背景

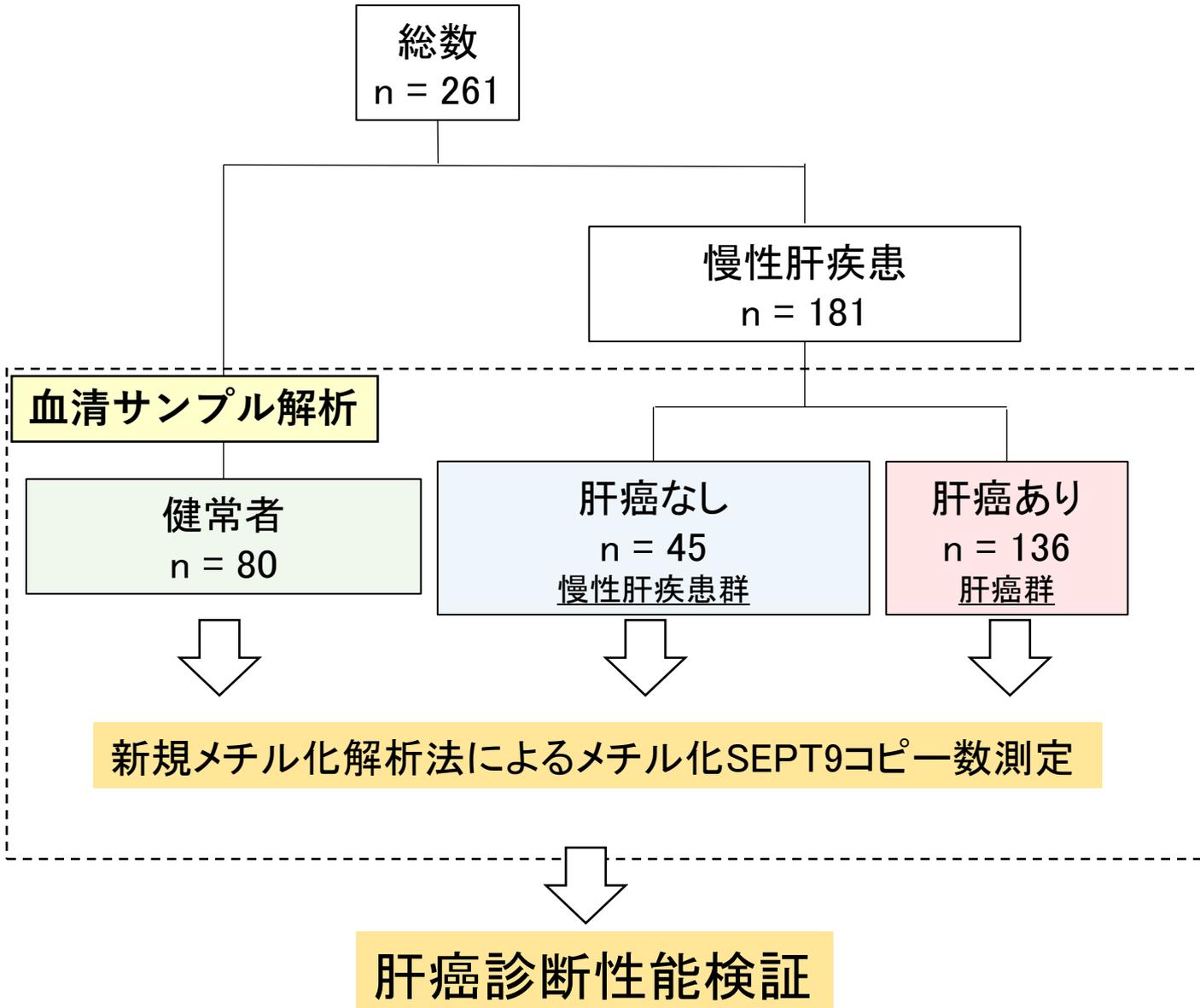
研究内容

高感度メチル化解析技術開発

肝癌診断への応用

実用化への課題

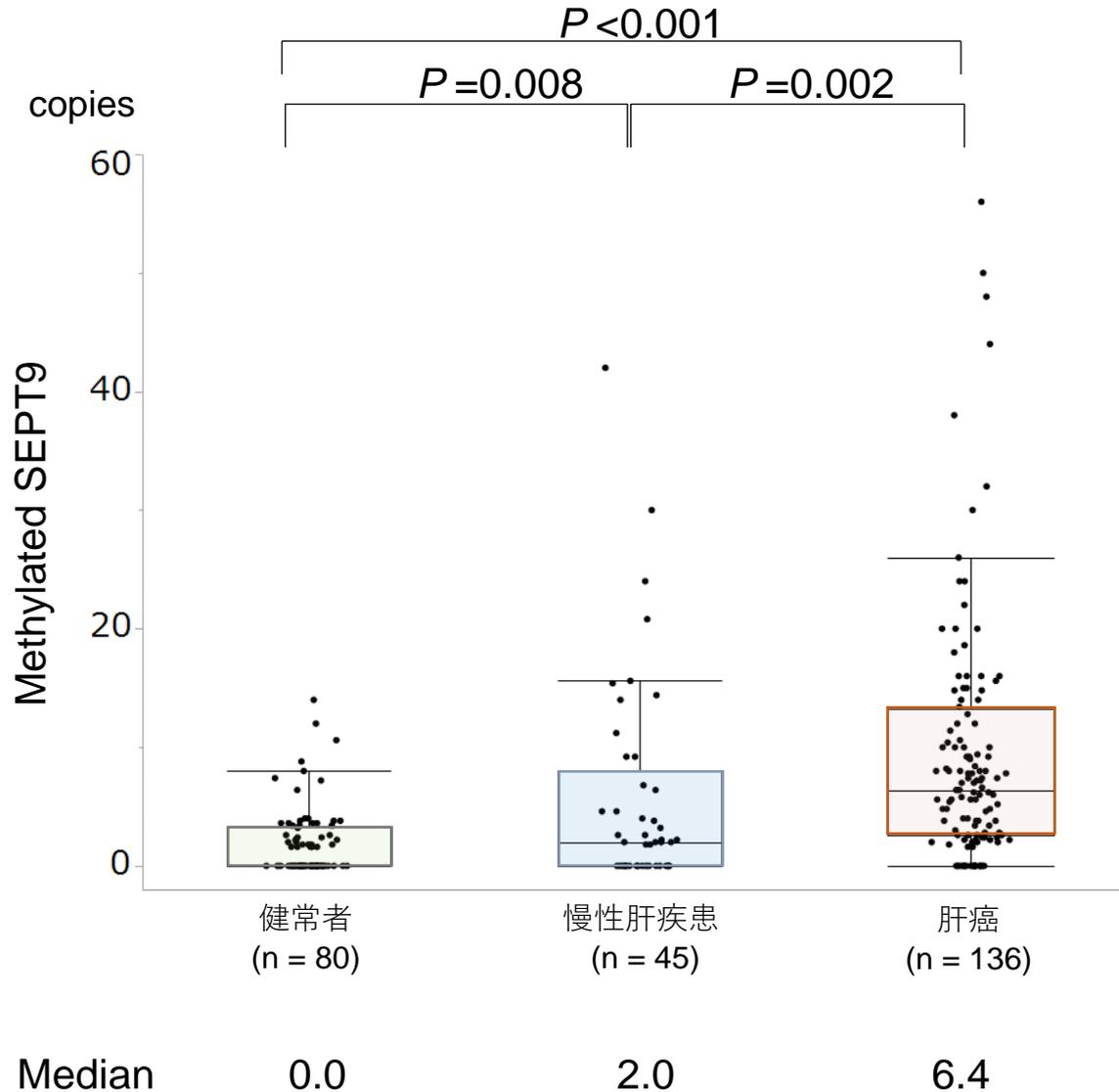
研究の流れ



患者背景

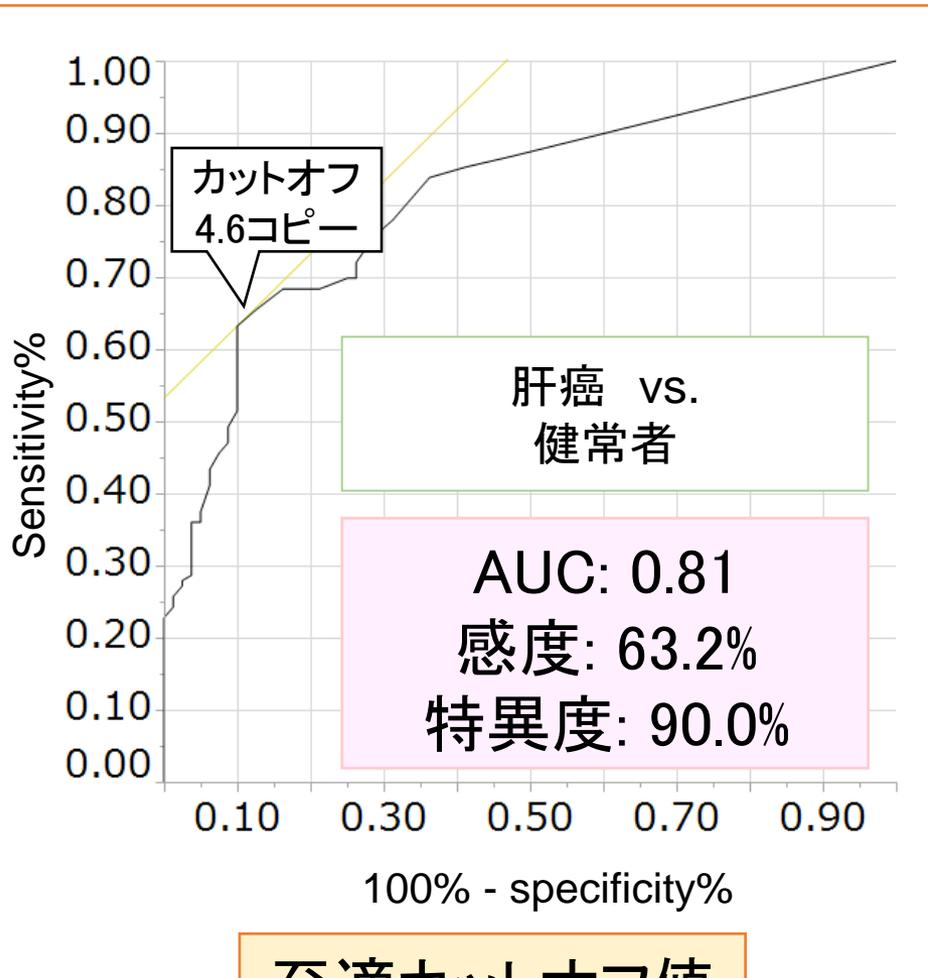
	健常者 (n =80)	慢性肝疾患 (n =45)	肝癌 (n = 136)
年齢	50.1(±8.5)	69.0 ± 10.4	72.4 ± 8.5
性別、男性/女性	38/42	22/23	98/38
B型/C型肝炎ウイルス /非ウイルス	-	12/18/15	18/58/60
慢性肝性/肝硬変 (Child-Pugh score A/B/C)	-	12/33 (20/9/4)	68/68 (51/17/0)
がんの進行期 0/A/B/C/D	-	-	12/50/31/41/2
腫瘍サイズ (cm)	-	-	3.2 (2.0-5.75)
腫瘍の数	-	-	1 (1-3)
脈管浸潤 +/-	-	-	33/103
肝外進展 +/-	-	-	14/122

血清検体中のメチル化SEPT9コピー数

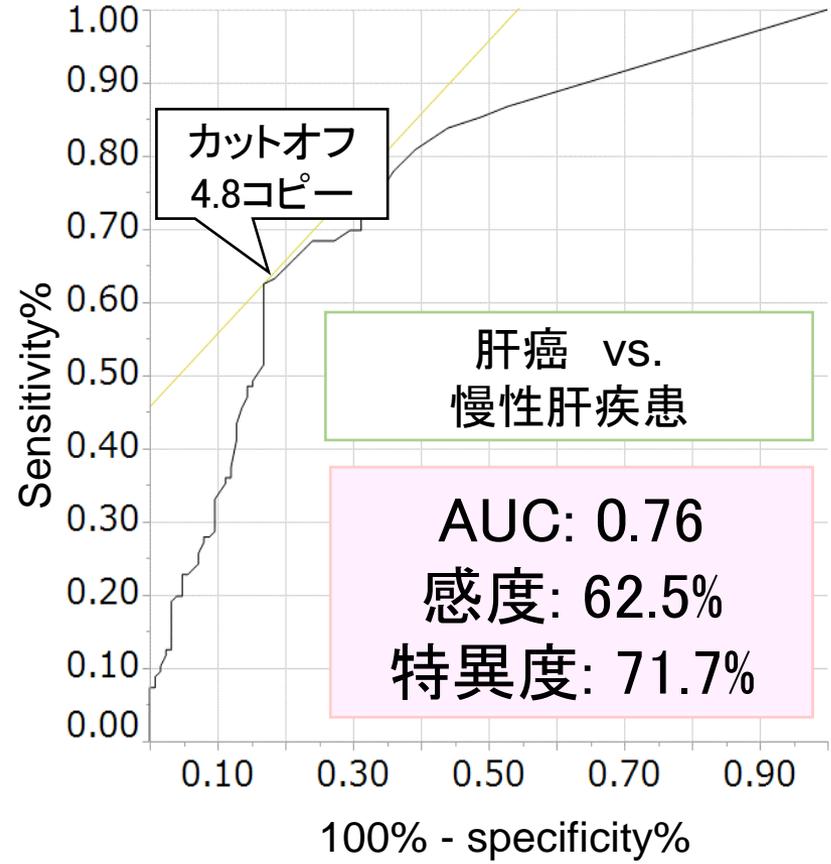


肝癌患者は健常者や慢性肝疾患患者よりも有意にメチル化SEPT9コピー数が増加していた。

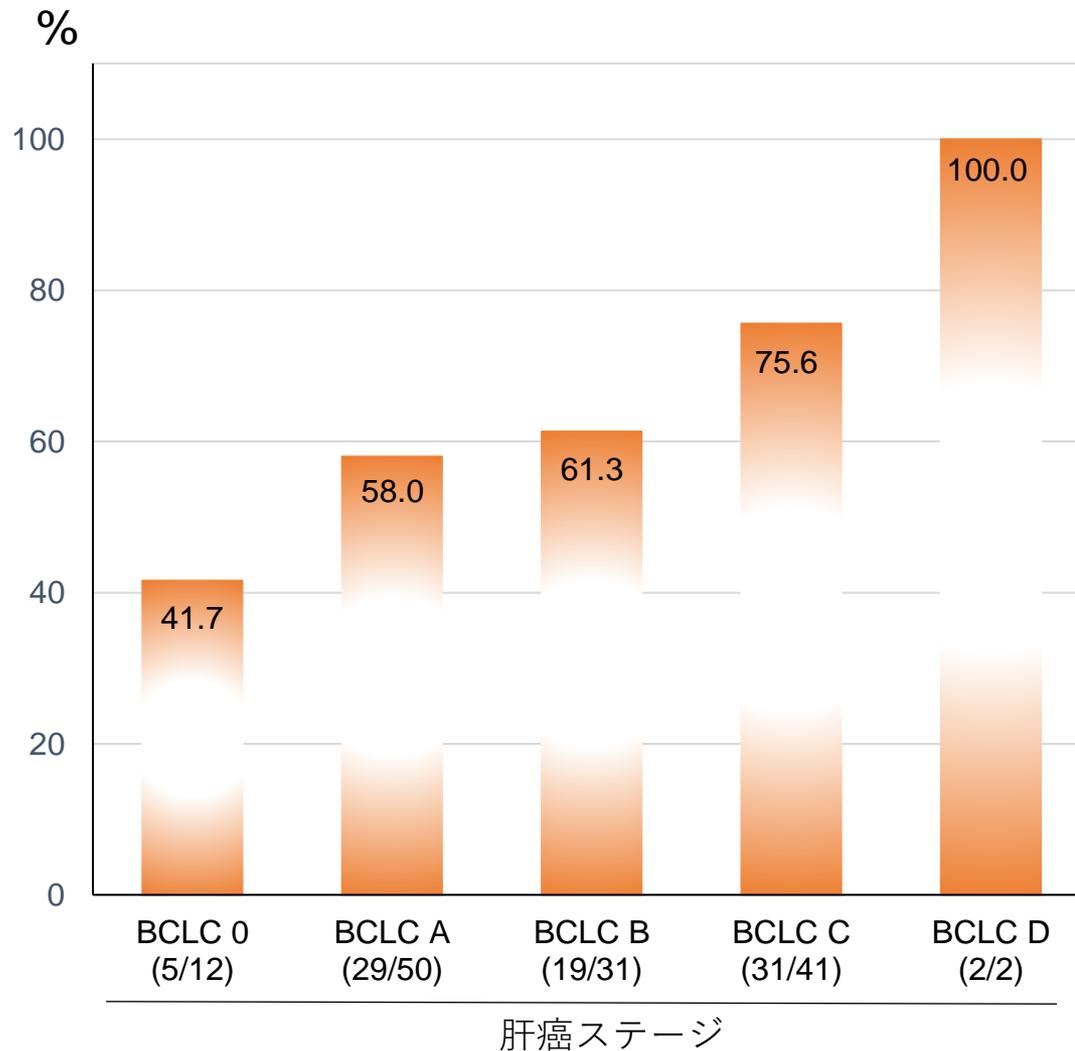
メチル化SEPT9コピー数のROC曲線



至適カットオフ値



メチル化SEPT9コピー数 ≥ 4.6 コピーの割合

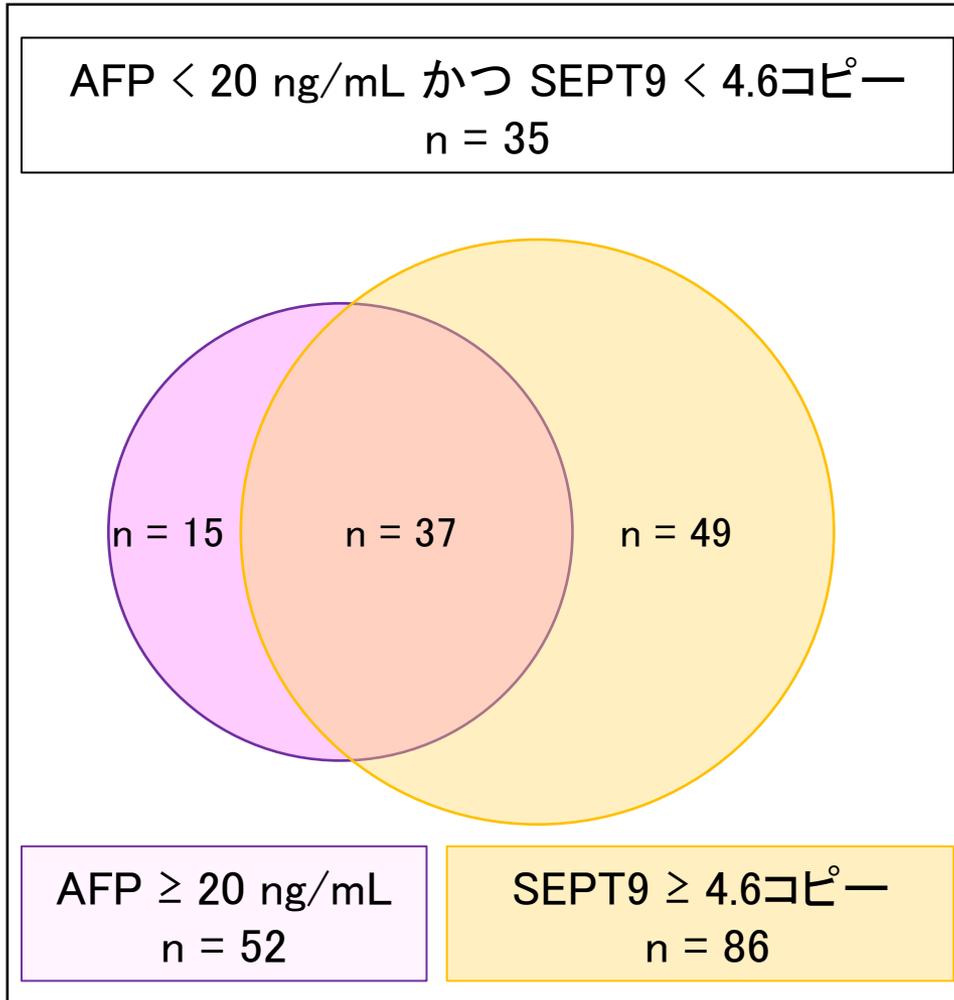


がんのステージ進展に伴い陽性率は増加する

まとめ①

- 血清中のメチル化SEPT9コピー数は健常者<慢性肝障害患者<肝癌患者の順で有意に増加していた。
- 肝癌のステージの進行に伴い、メチル化SEPT9コピー数は高値となった。
- ROC曲線で設定したカットオフ値4.6コピー以上である割合も、ステージの進行に伴い増加した。

腫瘍マーカーと血清メチル化SEPT9併用の意義



カットオフ値
AFP 20 ng/dL
SEPT9 4.6コピー

- AFPのみ陽性: 11.0% (15/136)
- SEPT9のみ陽性: 36.0% (49/136)
- 共に陽性: 27.7% (37/136)



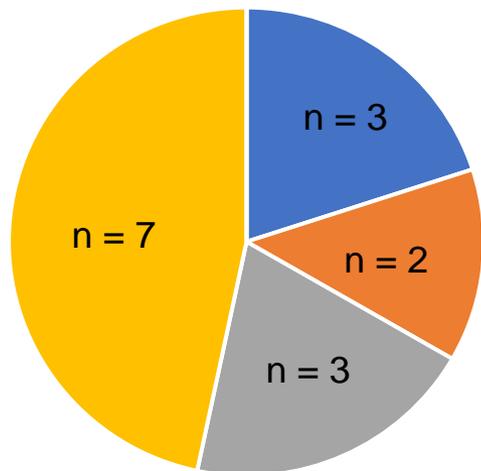
AFPとメチル化SEPT9両者併用で
検出感度は74.3% (101/136)

腫瘍マーカーおよびメチル化SEPT9陽性患者の 肝細胞癌の進行度

新技術説明会
New Technology Presentation Meetings!

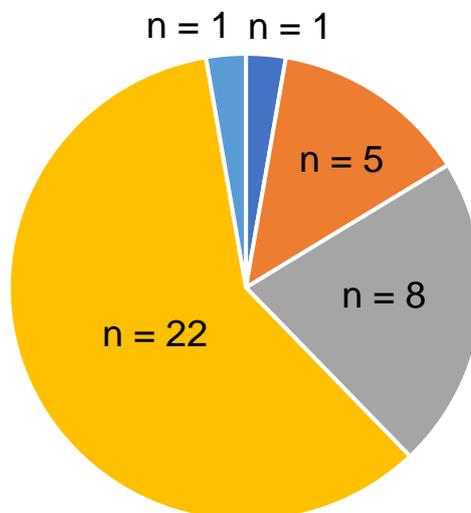
AFPのみ陽性

n = 15



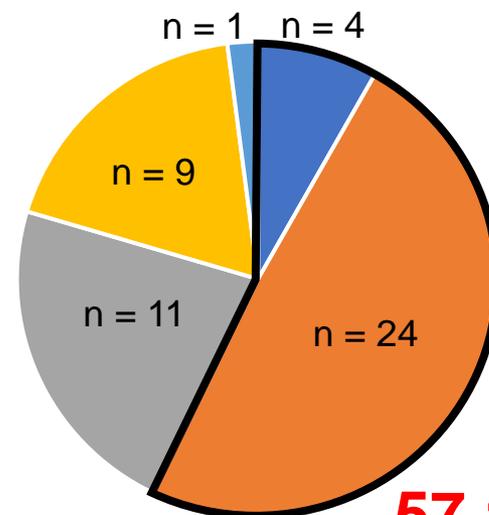
共に陽性

n = 37



SEPT9のみ陽性

n = 49



57.1%

肝癌ステージ(※BCLC0は超早期癌、BCLC Aは早期癌)

■ BCLC 0 ■ BCLC A ■ BCLC B ■ BCLC C ■ BCLC D

超早期および早期肝癌
検出も可能！

まとめ②

- 既存の腫瘍マーカーであるAFPとメチル化SEPT9を併用すると、検出感度は74.3%であった。
- メチル化SEPT9はステージ0(超早期)およびステージ A(早期)の肝細胞癌も57.1%検出可能であった。

結論

- 新規メチル化解析は少量の血清サンプルで定量的に評価できるという点でEpi proColon[®]より優れている。
- メチル化SEPT9を標的とした新規メチル化解析によるリキッドバイオプシーは超早期および早期肝癌の検出が可能である。

研究背景

研究内容

新規メチル化解析技術開発

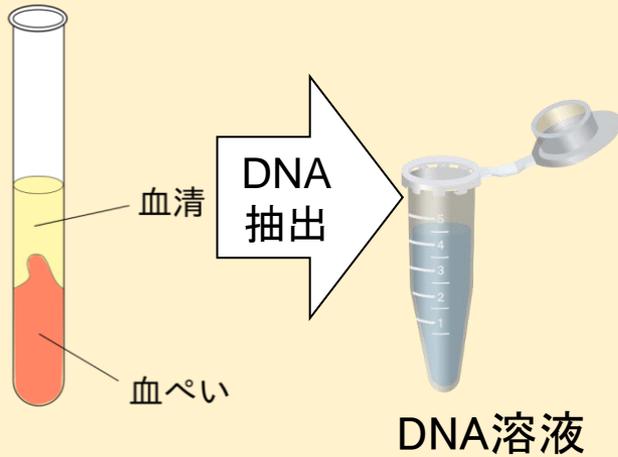
肝癌診断への応用

実用化への課題

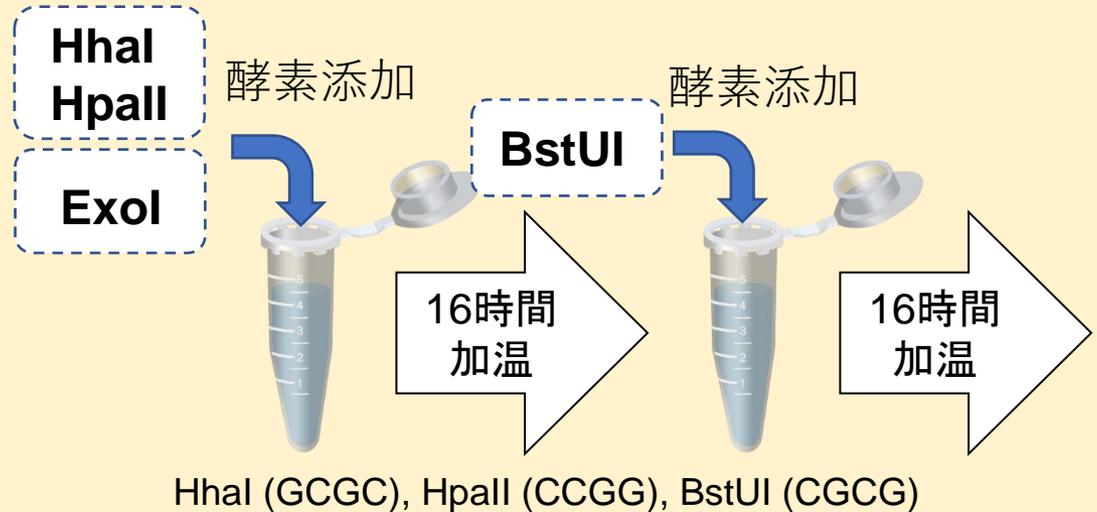
新規メチル化解析法

(特許第6897970号)

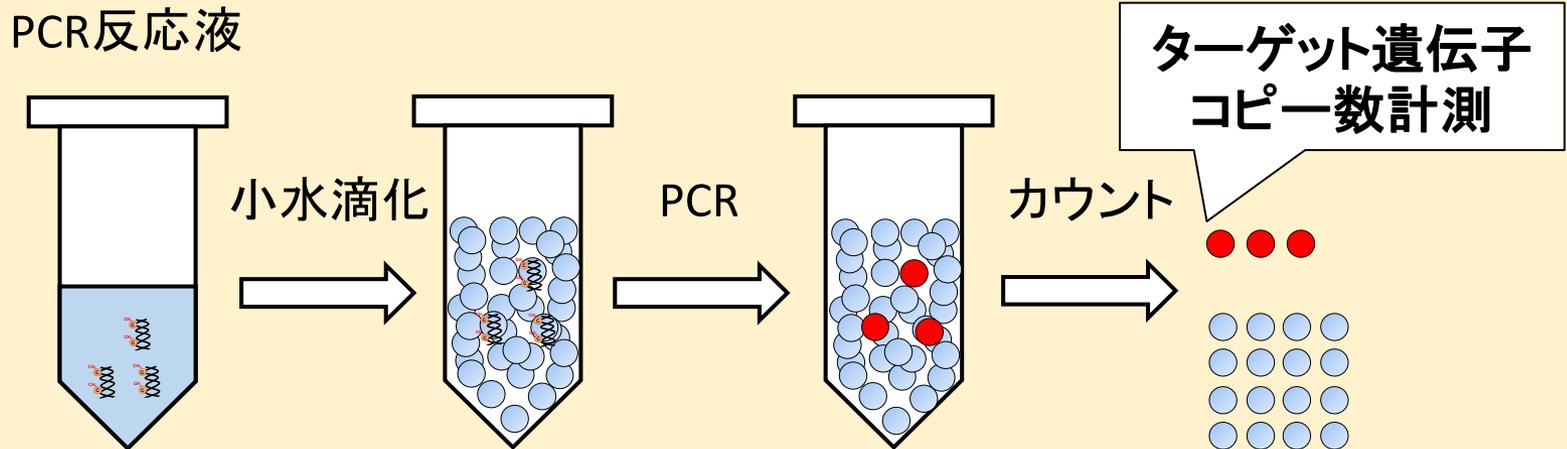
① 血清からDNA抽出



② DNA前処理(二段階酵素処理)

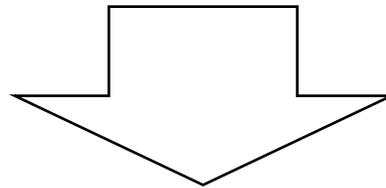


③ デジタルPCR



課題

現状では原価2500円で解析可能だが、商用化した場合にはデジタルPCRのpatent代が高額となる可能性大



デジタルPCR以外の測定試薬開発
前処理・測定のオートメーション化

企業様への期待

独自の遺伝子検査技術を有し、それに
適合したSEPT9遺伝子数測定試薬の
開発が可能な企業様との共同研究を
希望します。

本技術に関する知的財産権

発明の名称	大腸腫瘍の有無を検査する方法
発明者	末廣 寛
出願人	山口大学
出願番号	特願2017-539177, PCT/JP2016/076218
公開番号	WO2017/043497
登録番号	特許第6897970号

発明の名称	がんの診断用バイオマーカー
発明者	末廣 寛、山崎 隆弘、星田 朋美
出願人	山口大学
出願番号	特願2018-139564
公開番号	特開2020-14415
登録番号	

お問い合わせ先

◆ 知財部門

山口大学 大学研究推進機構 知的財産センター

吉松 勇

TEL: 0836(85)9964

FAX: 0836(85)9967

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

◆ 産学連携部門

山口大学 大学研究推進機構 産学公連携・研究推進センター 上島一夫

TEL: 0836(85)3067

FAX: 0836(22)2116

E-mail: life-s@yamaguchi-u.ac.jp