

低インプット量での TruSight™ Oncology ctDNA v2の使用

5~30 ng ctDNAを用いた試験結果の
検証

illumina®

はじめに

包括的ゲノムプロファイリング (CGP) は、次世代シーケンサー (NGS) を利用し、少ないサンプル量で幅広いバイオマーカーを1つのアッセイで評価し、一連の関連検査を複数実施するよりも早く結果が得られます。^{1,2} CGPは多くの場合、組織生検を使用して実行されます。ただし、十分な組織検体が入手できない場合があります (最大25%の確率で発生する可能性があります³)、がん種によって腫瘍細胞を検体とすること自体が難しい、あるいは組織バイオプシーの結果取得が遅くなる可能性があります。リキッドバイオプシーとも呼ばれる血中循環腫瘍DNA (ctDNA) を用いたCGPの実施には、次のような利点があげられます。

- 侵襲性を最小限に抑えたサンプルの採取方法⁴
- サンプル内のがんの不均一性 (時間的および空間的) に関する詳細情報の提供⁴
- 複数回実施が可能 (例: 疾患の進行または潜在的な治療に対する反応をモニタリングする場合)⁴
- 組織生検と比較して、より速く、より安価なサンプル調製方法⁴

抽出されるctDNAの質は、がん種、病期、血漿量、総血液量などのいくつかの要因によって異なることがあります。⁵ リキッドバイオプシーからの高感度かつ迅速なCGPを可能にするために、イルミナは、最適なパフォーマンスが得られる推奨インプット量の20 ng ctDNAを用いるTruSight Oncology 500 ctDNA v2を提供しています。20 ng ctDNAが利用できない状況でも、信頼できる結果を得ることができます。このテクニカルノートでは、TruSight Oncology 500 ctDNA v2を使用し、5~30 ngの範囲のインプット量で、さまざまなアリル頻度とシーケンス深度で生成された結果を示します。

方法

サンプル

正確で再現性のある結果を保証するために、0.2%および0.5% VAFの既知のバリエーションを含む次世代シーケンサー (NGS) 用リファレンスサンプル2つ (表1) を、5、10、20、30 ngのインプット量で検証しました。ライブラリー調製には、VAFレベルおよびインプットレベルごとに少なくとも2つのレプリケートを含めました。サンプルには19個のスマールバリエーション、3個のCNV、および3個の遺伝子再構成が含まれていました。

表1: SeraCareから入手したNGSリファレンスサンプル^a

サンプル	カタログ番号
Seraseq ctDNA Complete Mutation Mix AF 0.5%	0710-0531
Seraseq ctDNA Complete Mutation Mix AF 0.2% (健康なドナーサンプルのプールから得たcfDNA中でターゲットのVAFに希釈)	0710-0531

a. SeraCareはLGC Clinical Diagnosticsの一部です。

ライブラリー調製とシーケンス

Serseqサンプルは抽出された核酸として提供され、TruSight Oncology 500 ctDNA v2でライブラリーを調製しました。ライブラリーは、NovaSeq™ 6000システムのS4フローセルでシーケンスしました (表2)。

表2: シーケンスパラメーターの仕様

パラメーター	仕様
システム	NovaSeq 6000システム
リード長	151 bp × 2
サイクル数	300
サンプルあたりのリード数	約4億ペアエンドリード
S4フローセルあたりのサンプル数	24

UMIによるエラー率の削減

超低頻度のバリエーション同定を可能にするために、ライブラリーの調製では、NGSに固有のエラー率を0.007%以下に低減する独自の分子バーコード (UMI) を利用します (図1)。⁶ ノイズ低減は、分子バーコードのアライメントとその後のリードCollapsingに基づいて誤ったバリエーションをフィルタリングして除去することによって実現されます。

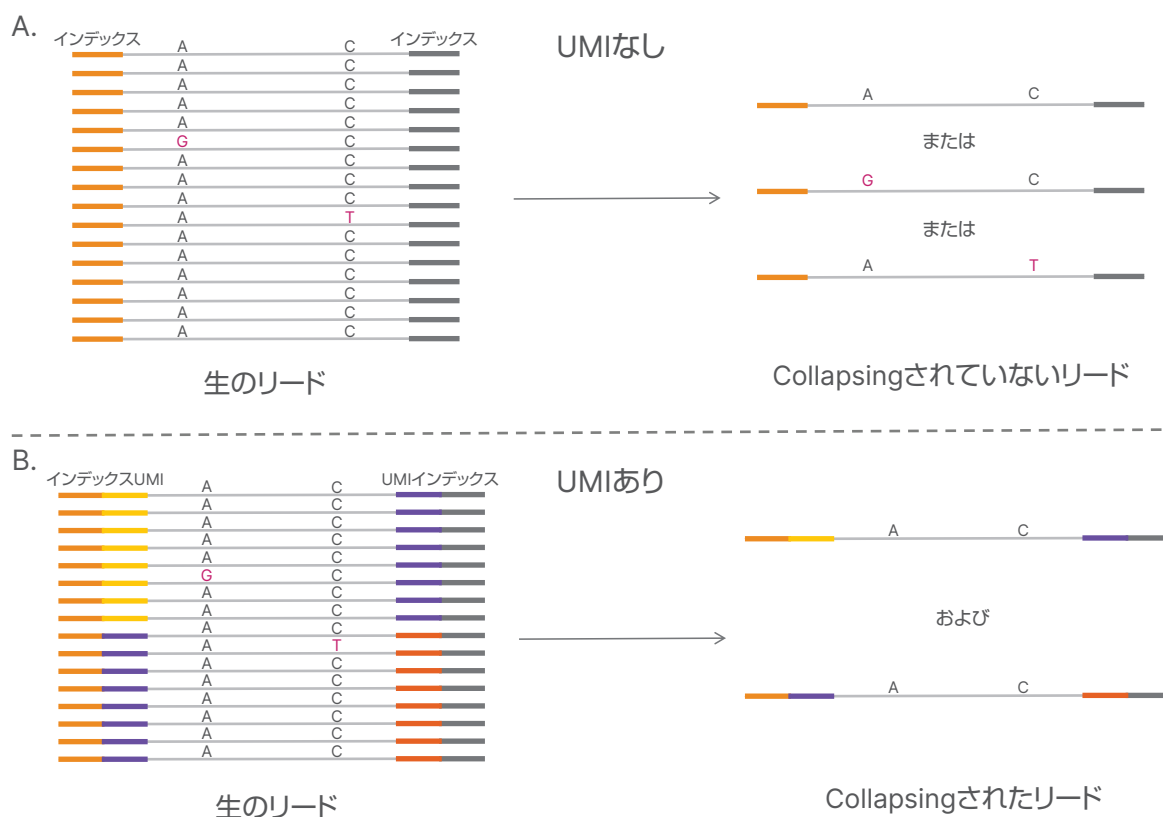


図1: UMIとDRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA v2.1解析ソフトウェアを使用したエラー補正によるバリアントの正確な検出: UMIはエラー補正ソフトウェアと統合されており、真の変異とバックグラウンドノイズを区別できます。(A) 2つのバリアントを含む16個のリードは、真にまれなバリアントまたは導入されたエラーである可能性がある。エラー補正がなければ、真のバリアントと偽陽性を区別することは不可能です。(B) UMIの統合により、同じ開始分子からの複数リードの認識が可能になり、それらが1つのリードにcollapsingされます。各リードセットには1つのエラーが含まれます。エラー補正後、正しいシーケンスの1つだけが残ります。

解析

二次解析は、DRAGEN™ TruSight Oncology 500 ctDNA v2.1解析パイプラインを使用してローカルで実施しました。バリアントコールとサンプルQCメトリクスの追加解析は、JMPとExcelを使用して実施しました。シーケンスリードは、バイオインフォマティクスのダウンサンプリング^{*}、推奨される (35,000 ×) 生のシーケンス深度および減らした (25,000 ×および15,000 ×) 生のシーケンス深度をシミュレートしました。次に、各シーケンス深度でのインプット量ごとのバリアントコール感度を評価しました。

* ダウンサンプリングにより、シーケンスランで解析されるリード数を減らします。

結果

シーケンス深度

低頻度のバリアントを探す場合、シーケンス深度を増やすことで、それらのバリアント検出の確率が最大化されます。正確なバリアントコールを保証するために、イルミナでは、最小35,000 ×の生のシーケンス深度でシーケンスを行うことを推奨しています。エクソンカバレッジ中央値 (MEC) は、エクソン領域にわたるリードファミリー数の中央値です (図2)。20 ng DNAインプットと4億リードを使用することで、生のシーケンス深度では3,500 ×、35,000 ×のシーケンス深度では2,500 ×以上のMECが得られます。これは、通常、エクソンリードの95%以上が1,000 ×以上のカバレッジを、エクソン

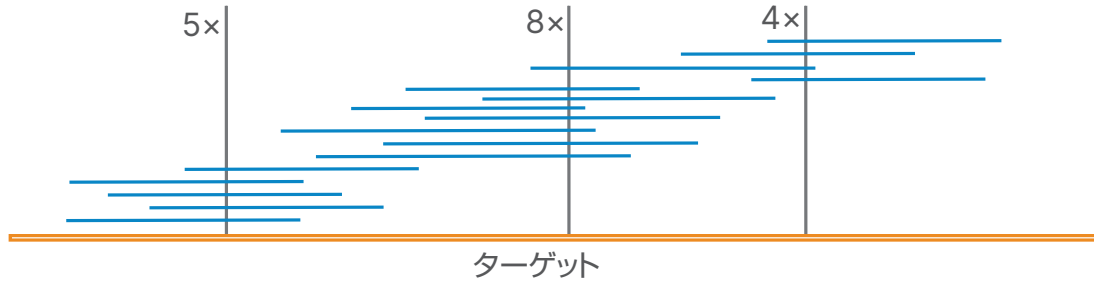


図2: エクソンカバー率中央値: 水平線は、ターゲット領域のシーケンスリードを表します。垂直線は、どのリードが3つの特定の塩基をカバーしているかを示します。示されているシーケンス深度と位置は、説明のみを目的としています。ターゲット全体のすべての塩基が考慮されます。示されている領域のMECは5 ×です。エラー補正後の0.5%検出下限 (LoD) に推奨されるMECは1,000 ×以上です。0.2% VAFと同等のサポートリード数を達成するには、2,500 ×のMECが推奨されます。

リードの90%以上が1,500 ×以上のカバーレッジを有しますが、リードCollapsing後では、パネル内のエクソン塩基に対してcollapsingされた断片カバーレッジ中央値が3,500 ×になることを意味します。1,000 ×のカバーレッジでは、VAF 0.5%のバリエーションには約5つのサポートリードが生成され、VAF 0.2%のバリエーションには約3つのサポートリードが生成されます。1,500 ×のカバーレッジでは、VAF 0.5%のバリエーションには約7つのサポートリードが生成されます。ライブラリーは、より低いシーケンス深度までシーケンスでき、低レベルのバリエーション検出を達成できますが、カバーレッジとバリエーション感度の低下が観察されます (表3および表4)。

イルミナは、TruSight Oncology 500 ctDNA v2を使用する場合、スモールバリエーションで0.2% VAFをコールするのに十分な数のサポートリードを生成するためには、35,000 ×のシーケンス深度、2,500 ×のエクソンカバー率中央値を推奨しています。

分析性能

アッセイパフォーマンスは、さまざまな検出限界にわたる分析感度と分析特異度に直接関係します。分析感度は、存在するバリエーションを正確に同定する能力 (真陽性率) として定義されます。分析特異度は、バリエーションが存在しない場合 (真陰性)、バリエーションをコールしない能力として定義されます。TruSight Oncology 500 ctDNA v2を使用した場合、20 ngのインプットctDNAを使用し、35,000 ×の生のカバーレッジ深度でシーケンスした場合のSNV (small nucleotide variant) 検出の仕様は、0.2% VAFで90%以上、0.4% VAFで95%以上です。COSMICデータベースでバリエーションの再発数が50を超えるホットスポット領域の場合、VAF 0.2%でのSNVの分析感度は95%以上に上昇します (図3)。

表3: 既知のSeraseqサンプル内のスモールバリエーションに対するエクソンカバー率中央値

インプット	シーケンス深度	N	0.2% VAF	0.5% VAF
5 ng	15,000 ×	4	886	1,234
	25,000 ×	4	1,060	1,654
	35,000 ×	4	1,132	1,854
10 ng	15,000 ×	2	1,067	1,210
	25,000 ×	2	1,570	1,550
	35,000 ×	2	1,849	1,697
20 ng	15,000 ×	4	1,122	1,357
	25,000 ×	4	1,949	2,139
	35,000 ×	4	2,517	2,599
30 ng	15,000 ×	2	1,120	1,335
	25,000 ×	2	2,124	2,410
	35,000 ×	2	2,919	3,181

35,000 ×カバーレッジでの20 ngのインプットは、TruSight Oncology 500 ctDNA v2で使用する場合の標準推奨事項です。n=各シーケンス深度でのレプリケートの数、VAF=バリエーションアレル頻度。

表4: 異なるシーケンス深度での複数のバリエントタイプのコール率

インプット	シーケンス深度	n	スモールバリエント		CNV		遺伝子再構成	
			0.2% VAF	0.5% VAF	0.2% VAF	0.5% VAF	0.2% VAF	0.5% VAF
5 ng	15,000 ×	4	68%	91%	25%	67%	50%	75%
	25,000 ×	4	76%	96%	33%	92%	67%	92%
	35,000 ×	4	75%	97%	42%	100%	75%	100%
10 ng	15,000 ×	2	58%	95%	67%	100%	67%	83%
	25,000 ×	2	79%	97%	67%	100%	67%	83%
	35,000 ×	2	84%	97%	67%	100%	83%	100%
20 ng	15,000 ×	4	66%	89%	67%	100%	67%	67%
	25,000 ×	4	87%	97%	67%	100%	58%	83%
	35,000 ×	4	92%	97%	67%	100%	75%	100%
30 ng	15,000 ×	2	66%	89%	67%	100%	33%	67%
	25,000 ×	2	84%	95%	67%	100%	83%	100%
	35,000 ×	2	89%	97%	67%	100%	83%	100%

灰色のボックスは、LoD値を示します。n=各シーケンス深度でのレプリケートの数、VAF=バリエントアレル頻度。

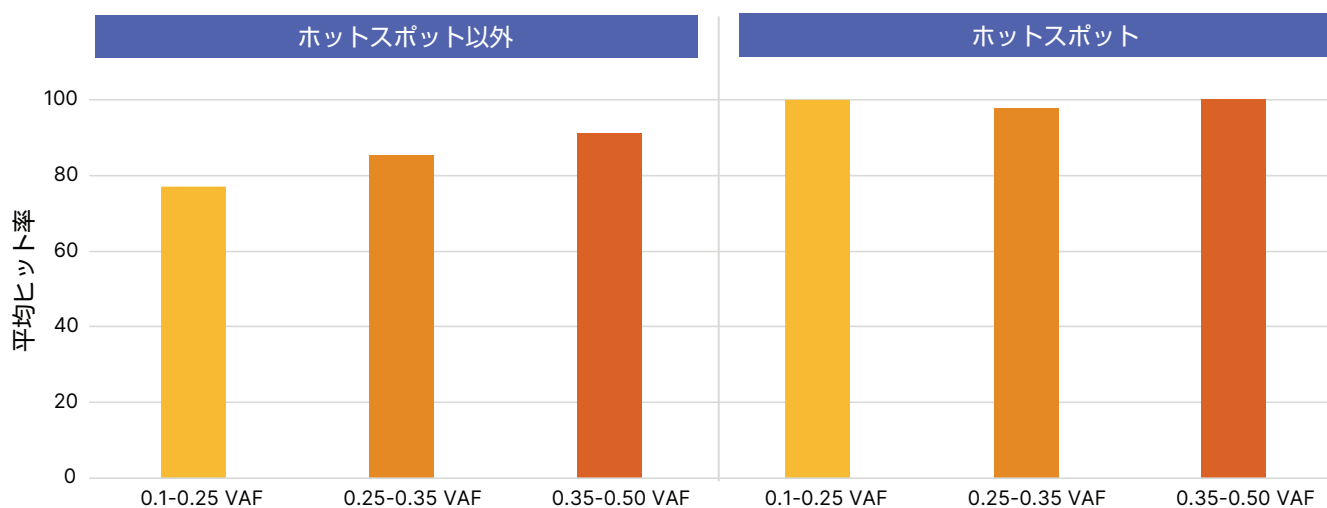


図3: 0.2% VAFでの主要なSNVホットスポットに対する高い解析パフォーマンス: 3つの細胞株と各単一ヌクレオチドの既知のVAFを含むSeraseq ctDNAコントロールサンプルの混合物のヌクレオソーム調製物を、TruSight Oncology 500 ctDNA v2を使用してライブラリーを生成し、NovaSeq 6000システムのS4フローセルでシーケンスしました。イルミナが推奨するカバレッジは、35,000 ×以上のシーケンス深度です。解析は、DRAGEN™ TruSight Oncology 500 ctDNAパイプラインを使用して実施しました。ホットスポット以外の領域とホットスポット領域の両方のヒット率が0.1~0.5% VAFで測定されました。ホットスポット領域のSNVに対して観察された全体的な感度は95%以上です。

考察

TruSight Oncology 500 ctDNA v2は、強化されたケミストリー、強力なテクノロジー、および高度なバイオインフォマティクスを採用して、リキッドバイオプシーサンプルからのCGPを可能にします。ライブラリー調製にUMIを組み込むことと、DRAGEN TruSight Oncology ctDNA ソフトウェア (v2.1以上) のエラー補正機能により、わずか5 ng ctDNAのサンプルインプットと0.2% VAFからバリエーションを確実に検出する、正確かつ高感度のワークフローが作成されます。

詳細はこちら

[TruSight Oncology ctDNA v2](#)

[分子バーコード \(UMI\)](#)

[DRAGEN TruSight Oncology ctDNA二次解析 \(v2.1以上\)](#)

参考文献

1. Lim C, Tsao MS, Le LW, et al. [Biomarker testing and time to treatment decision in patients with advanced nonsmall-cell lung cancer](#). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2015;26(7):1415-1421. doi:10.1093/annonc/mdv208
2. Yu TM, Morrison C, Gold EJ, Tradonsky A, Layton AJ. [Multiple Biomarker Testing Tissue Consumption and Completion Rates With Single-gene Tests and Investigational Use of OncoPrint Dx Target Test for Advanced Non-Small-cell Lung Cancer: A Single-center Analysis](#). *Clin Lung Cancer*. 2019;20(1):20-29.e8. doi:10.1016/j.clcc.2018.08.010
3. Hagemann IS, Devarakonda S, Lockwood CM, et al. [Clinical next-generation sequencing in patients with non-small cell lung cancer](#). *Cancer*. 2015;121(4):631-639. doi:10.1002/cncr.29089
4. Saarenheimo J, Eigeliene N, Andersen H, Tiirola M, Jekunen A. [The Value of Liquid Biopsies for Guiding Therapy Decisions in Non-small Cell Lung Cancer](#). *Front Oncol*. 2019;9:129. Published 2019 Mar 5. doi:10.3389/fonc.2019.00129
5. Guibert N, Pradines A, Favre G, Mazieres J. [Current and future applications of liquid biopsy in nonsmall cell lung cancer from early to advanced stages](#). *Eur Respir Rev*. 2020;29(155):190052. Published 2020 Feb 12. doi:10.1183/16000617.0052-2019
6. Illumina. [Trusight Oncology Umi Reagents data sheet](#). <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-oncology-umi-reagents-datasheet-1000000050425.pdf>. Accessed October 19, 2023.

イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22 階
Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810
jp.illumina.com

 www.facebook.com/illuminakk

販売店

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件 : jp.illumina.com/tc

© 2024 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc. または各所有者に帰属します。

商標および登録商標の詳細は jp.illumina.com/company/legal.html をご覧ください。

予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。

