

TruSight™ Oncology 500 ctDNA

リキッドバイオプシーサンプルから、
研究用途の包括的なゲノム
プロファイリングが可能

- 組織バイオプシーの補完として、または組織が現実的に利用できないときの代用として非常に低侵襲的な血液サンプルを利用
- 500を超える遺伝子中のDNAバイオマーカーとTMBやMSIなどの免疫腫瘍学シグネチャーを解析
- UMIベースのハイブリッドキャプチャーライブラリー調製およびNovaSeq™ 6000システムを利用したディープシーケンスにより頻度の低い変異検出を実現
- 専用のDRAGEN™パイプラインとPierianの解析の統合により、cfDNAから解釈レポート作成が5日間で完了

illumina®

はじめに

リキッドバイオプシーにより、血漿中の循環セルフリーDNA (cfDNA) を包括的に解析し、非侵襲的なアプローチによる固形腫瘍のプロファイリングが実現します。リキッドバイオプシーの利点を活かすには、頻度の低い体細胞変異を高い感度と特異度で検出できる解析アッセイを使用することが重要です。TruSight Oncology 500 ctDNAは、実績のあるイルミナの次世代シーケンサー (NGS) の技術によって高い分析感度を実現し、cfDNA内の血中循環腫瘍DNA (ctDNA) を対象に包括的ゲノムプロファイリングを可能にします (図1、表1)。この優れた研究技術と先進的なDRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Softwareを組み合わせることにより、臨床研究者は1つのアッセイで数百個の遺伝子を解析して複数のバリエーションタイプを評価するDNA-to-reportソリューションを利用できるようになります (図2)。

TruSight Oncology 500 ctDNAでは、NovaSeq 6000 v1.5 シーケンス試薬をご利用いただけます。オペレーション効率の向上により、サンプルあたりのコストを35%以上削減できる可能性があります。これに加え、使用期限は6カ月に延長され、Q30スコアも改善されます。¹

リキッドバイオプシーの可能性

腫瘍のわずかな部分から情報を得る組織バイオプシーとは異なり、リキッドバイオプシーは全身の腫瘍内および腫瘍間の不均一性に関する情報を提供します。最近の研究によれば、cfDNA解析では、ガイドラインが推奨するバイオマーカーや同等の組織バイオプシーでは検出できない耐性変化が多数検出されました。² さらに、非小細胞性肺癌に関する研究により、cfDNA解析は組織サンプルの解析との一致度が高いことが明らかになりました。³

包括的なコンテンツの設計

TruSight Oncology 500 ctDNAのコンテンツは、腫瘍学分野の専門家の協力により設計されています。複数の腫瘍タイプに関する主要なガイドラインと臨床試験に含まれる遺伝子を包括的に網羅し、既存および新規のバイオマーカーが含まれています。パネルのプローブは既知と新規の融合遺伝子の両方をキャプチャーするように設計され、腫瘍形成に関わる可能性のある変異を検出するための523遺伝子が含まれています。バイオマーカーには、1塩基変異 (SNV)、挿入や欠失 (Indel)、コピー数バリエーション (CNV)、融合遺伝子、マイクロサテライト不安定性 (MSI) と腫瘍変異負荷 (TMB) などの複雑な免疫腫瘍学のゲノムシグネチャーが含まれています (表2)。

すべての遺伝子の一覧については、jp.illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/trusight-oncology-500-ctdna.html をご覧ください。



図1: リキッドバイオプシーにより複数のバリエーションタイプや複数のがんタイプのバイオマーカーをプロファイリング: 精巧なバリエーションコールアルゴリズムと高深度のシーケンスにより、検出下限 (LOD) 0.5%でcfDNA内の主要バイオマーカーを検出できます。

表1: TruSight Oncology 500 ctDNAの概要

パラメーター	TruSight Oncology 500 ctDNA
システム	NovaSeq 6000システム
パネルサイズ	1.94 Mb DNA
パネルのコンテンツ	523遺伝子 59遺伝子 (CNV) 23遺伝子 (融合遺伝子) MSI (> 2,400座位) TMB
DNAインプット必要量	30 ng cfDNA ^a
サンプルタイプ	血液中のcfDNAを抽出
合計アッセイ時間	ライブラリー調製から バリアントレポートまで 5日間
シーケンスランタイム	ラン36時間、解析10時間 (S2フローセル) ラン45時間、解析22時間 (S4フローセル)
シーケンスラン	151 bp x 2
サンプルスループット	1ランあたり8サンプル (S2フローセル) 1ランあたり24サンプル (S4フローセル) ライブラリー調製キットあたり48サンプル
検出限界	スモールバリアントでは0.5% VAF 遺伝子増幅では ≥ 1.4 倍の変化 遺伝子欠失では ≤ 0.6 倍の変化 MSIでは腫瘍部位に占める割合が $\geq 2\%$
分析感度	$\geq 95\%$ (検出下限ですべてのバリアントタイプに 対して)
分析特異度	$\geq 95\%$

a. Agilent TapeStationシステムまたはFragment Analyzerシステムによる
定量を推奨

表2: TruSight Oncology 500 ctDNAで検出される
バリアントの例

バリアントタイプ	関連例
SNVおよびIndel	EGFR, POLE, TMRSS2, BRAF
融合遺伝子	ALK, ROS1, NTRK, RET
CNV	HER2
MSI	MSIスコア
TMB	TMBスコア

すべての遺伝子の一覧については、jp.illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/trusight-oncology-500-ctdna.htmlをご覧ください。

低頻度変異のバイオマーカーを検出する 実績のある技術

TruSight Oncology 500 ctDNAは、Sequence by Synthesis (SBS) ケミストリーによる実証済みのイルミナシーケンスを使用し、わずか30 ngのcfDNAで包括的なゲノムプロファイリングを実現するため、組織検査が使用できない場合や組織解析の補完としての理想的な代替手段です。ライブラリー調製ではターゲット濃縮ケミストリーを活用し、ビオチン標識プローブおよびストレプトアビジンのコーティングされた磁気ビーズを用いて、DNAベースのライブラリーから選択されたターゲットを濃縮します。ハイブリダイゼーションキャプチャーによるターゲット濃縮ケミストリーは、高度に結合する特異性を与えるためにデザインされた十分に大きなプローブを使用できるだけでなく、小さな変異を含むターゲットに対するハイブリダイゼーションも維持します。このアプローチでは、自然なアリルバリエーションとアーティファクトの両方のサンプル脱落を低減します。



図2: TruSight Oncology 500 ctDNAアッセイのワークフロー: TruSight Oncology 500 ctDNAアッセイはラボの既存のワークフローに統合し、5日間でcfDNAからバリアントレポートを取得します。DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis SoftwareはDRAGENサーバー上またはIllumina Connected Analyticsを介したクラウドに実行します。

cfDNAに含まれるctDNAはわずかであるため、ノイズからシグナルを分離するには強力な手段が必要です。このため、ライブラリー調製時に低頻度バリエーションの識別を可能にする分子バーコード (UMI) を追加します。⁴ TruSight Oncology 500 ctDNAライブラリーは、NovaSeq 6000 システムで高深度 (~35,000xでサンプルあたりのリード数400 M) のシーケンスを実施し、感度を増強させます。その結果、スモールバリエーションに対して0.5%のバリエーションアリル頻度 (VAF) における変異を、95%の分析感度、99.995%以上の分析特異度で検出できます (表3)。

表3: 低頻度バリエーションの高精度検出

バリエーションタイプ	分析感度 ^a	分析特異度 ^b
スモールバリエーション (≥ 0.5% VAF)	≥ 95%	≥ 99.995%
遺伝子増幅 (≥ 1.4倍の変化)	≥ 95%	≥ 95%
遺伝子欠失 (≤ 0.6倍の変化)	≥ 95%	≥ 95%
融合遺伝子 (0.5%)	≥ 95%	≥ 95%
MSI-high検出 (腫瘍部位に占める割合が2%以上)	≥ 95%	≥ 95%

a. 分析感度は規定のバリエーションレベルにおける検出率として定義
b. 分析特異度は既知の陰性に対する検出性能として定義

高精度でより高速な解析

DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Softwareは、より高速かつ完全に統合されたバイオインフォマティクスアルゴリズムを使用して、最適なアッセイ性能を実現します。このソフトウェアはシーケンスアライメントと分子バーコードによるエラー補正を行ったうえで、生データに基づいてバリエーションコールを行います。頻度の低いバリエーションのシグナルを喪失することなく重複するリードやシーケンスエラーを除去するとともに、高感度なバリエーションコールの結果を取得します。すべてのパイプラインのコンポーネントがDRAGENプラットフォーム内にあるので、さらなる性能向上と効率化を実現します。

PCRベースのアッセイによる定性的結果とは異なり、DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Softwareは2,400を超えるホモポリマーMSIマーカー座位から定量的なMSIスコアを提供します。TMB解析の場合、DRAGENソフトウェアは非同義および同義SNVおよびIndelの両者を測定して感度を最適化します。バリエーションコールおよびエラー補正の後で生殖細胞系列バリエーション、信

頼度の低いバリエーション、可能性を判定できないクローン性造血に関連したバリエーションがフィルタリングされ、TMB測定の精度はさらに高められます。

DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Softwareは、ローカルサーバー上のIllumina DRAGEN Server v3やv4、またはIllumina Connected Analytics (ICA) を介したクラウド上で実行します。この超高速プラットフォームは、データ解析時間を最大85%、または9日間から20時間にまで短縮する、高度なハードウェアとソフトウェアを提供します (図3)。ICAはラボに安全なクラウドベースのゲノムプラットフォームを提供し、より多くのローカルインフラを導入したり維持したりする必要なく、二次解析の規模を拡張することが可能です。⁵ さらに、DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis SoftwareはDRAGEN v3.10ソフトウェアと互換性があり、固形腫瘍組織サンプルを対象とするTruSight Oncology 500アッセイで使用されるバージョンと同じです。この共有プラットフォームの使用により、ラボに対する柔軟性が高まります。

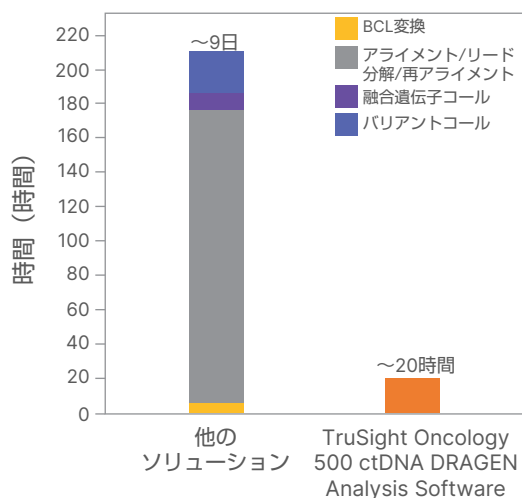


図3: ローカルサーバーDRAGEN Server v4によるデータ解析時間の減少: TruSight Oncology 500 ctDNA DRAGEN Analysis Softwareは様々なデータ解析ステップを約20時間を要する1つのプロセスに統合し、別のソリューションと比べて約85%減少します。S4フローセル使用、24サンプルに対する、DRAGEN v4サーバー上のDRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA v2.1パイプラインとシングルノード (128 GBメモリー、24コアCPU)、非並列パイプラインを使用した他のソリューションの解析時間を比較しています。

Pierian Clinical Genomics Workspaceは三次解析を提供し、ワークフローを完了します。バリエントレポートファイルをローカルまたはICAベースの二次解析環境から直接のClinical Genomics Workspaceクラウドにアップロードするだけです。Clinical Genomics Workspaceはバリエントアノテーションとフィルタリングを実行し、スムーズな解釈とレポート作成を実現します。Clinical Genomics Workspaceは、ゲノムに含まれる何千ものバリエントから、生物学的に関連のあるバリエントをフィルタリングして優先順位を付け、カスタマイズ可能で自動生成可能なゲノムレポートを提供します。cfDNAから統合されたバリエントレポート作成まで、ワークフロー全体の所要時間はわずか5日間です (図2)。

広範な検証によって得られる正確かつ再現性の高い結果

TruSight Oncology 500 ctDNAで得られる高品質の結果を実証するため、イルミナはSNV、CNV、融合遺伝子、TMB、MSIのコール機能を評価するさまざまな試験を行いました (図4および図5、表5および表6)。

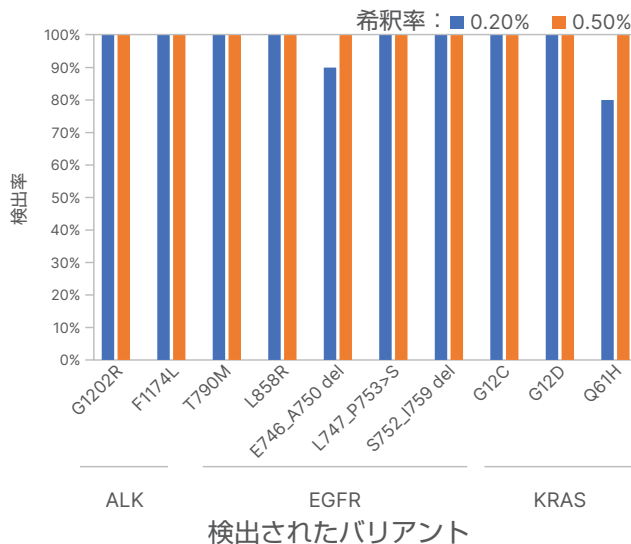


図4: 低VAFでのスモールバリエント検出: 各バリエントのアリル頻度 (VAF) が既知であるサンプルを希釈し、0.10~1.00% VAFの範囲にしました。30 ngの市販リファレンスコントロールDNAを使用し、各サンプルの5レプリケートをTruSight Oncology 500 ctDNAで解析しました。

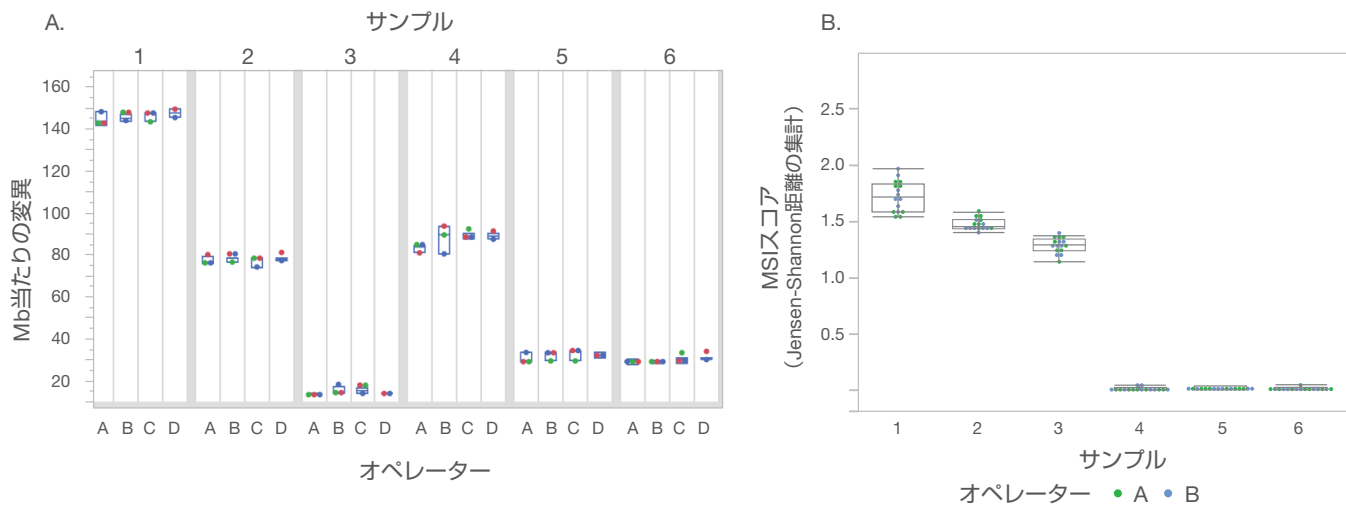


図5: 再現性のあるTMB およびMSI 測定: (A) TMBは、6つの異なる血漿サンプル (1~6) のトリプレケート (緑、青、赤の点) を使って、4人のオペレーター (A、B、C、D) によって評価しました。(B) MSIは、MSI-highステータスが既知のヌクレオソーム調製細胞株3つ (1~3) と変異頻度の低いMSI-high腫瘍のcfDNAサンプル3つ (4~6) を使って、2人の異なるオペレーター (Aは緑、Bは青) によって評価しました。

表5: CNVの感度検出

遺伝子	予想される倍率変化	観察された平均値	標準偏差	検出率
増幅				
<i>BRCA2</i>	1.8	1.4	0.01	100%
<i>CCND3</i>	1.5	1.3	0.01	100%
<i>FGF14</i>	1.3	1.5	0.01	100%
<i>FGF3</i>	1.6	1.4	0.01	100%
<i>FGF4</i>	1.7	1.4	0.01	100%
<i>FGFR2</i>	1.6	1.4	0.01	100%
<i>MET</i>	1.5	1.3	0.01	100%
<i>MYC</i>	1.9	1.7	0.02	100%
欠失				
<i>BRCA1</i>	0.7	0.7	0	100%
<i>BRCA2</i>	0.6	0.6	0.01	100%

30 ngのcfDNAインプットでTruSight Oncology 500 ctDNAを使用して、遺伝子増幅および欠失の倍率変化が既知のサンプルを評価。各サンプルの5つのレプリケートを解析しました。

表6: 低VAFでの融合遺伝子検出

融合遺伝子	予想されるVAF	観察されたVAF	標準偏差	検出率
<i>FGFR2-COL14A1</i>	4.1%	4.1%	0.5%	100%
<i>NPM1-ALK</i>	3.4%	0.6%	0.1%	100%
<i>FGFR3-BAIAP2L1</i>	3.4%	0.8%	0.2%	100%
<i>NPM1-ALK</i>	2.4%	0.6%	0.1%	100%
<i>EML4-ALK</i>	1.7%	0.5%	0.1%	100%
<i>CCDC6-RET</i>	1.0%	0.7%	0.1%	100%
<i>FGFR2-COL14A1</i>	0.9%	0.4%	0.2%	100%
<i>EML4-ALK</i>	0.7%	0.2%	0.1%	100%
<i>EML4-ALK</i>	0.5%	0.5%	0.3%	100%
<i>NPM1-ALK</i>	0.5%	0.2%	0.0%	100%
<i>NCOA4-RET</i>	0.5%	0.2%	0.0%	100%
<i>CCDC6-RET</i>	0.2%	0.1%	0.1%	100%

アリル頻度が約 0.5 ~ 4% の既知の融合遺伝子のサンプルを評価しました。30 ng の cfDNA インプットで、各サンプルの 5 レプリケートを TruSight Oncology 500 ctDNA で解析しました。融合遺伝子の方向性は既知の発現に基づいて報告しました。DNA ベースの融合の方向性の詳細については、『DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software v1.2 User Guide』を参照してください。

まとめ

TruSight Oncology 500 ctDNAは、血漿サンプルから数百種類のがん関連バイオマーカーを同時に解析するNGSベースのマルチプレックス研究用アッセイです。アッセイのコンテンツは現在のガイドラインおよび臨床試験に沿っています。複数のサンプルが必要となる一連の試験をしなくても、さまざまな腫瘍タイプに関する523遺伝子から複数のバリエーションタイプを検出できます。また、TruSight Oncology 500 ctDNAは、免疫腫瘍学のバイオマーカーや新しいバイオマーカー（TMB、MSI、NTRKおよびROS1）の評価もします。幅広いゲノムコンテンツ、業界をリードするシーケンス技術、高度なソフトウェアを活用するTruSight Oncology 500 ctDNAはラボでの複雑なオペレーションと解析を最小限にし、臨床研究プロジェクトを加速する統合されたソリューションを提供します。

詳細はこちら

TruSight Oncology 500 ctDNA : jp.illumina.com/tso500-ctDNA

NovaSeq 6000システム : jp.illumina.com/systems/sequencing-platforms/novaseq.html

DRAGEN Bio-IT Platform : jp.illumina.com/products/by-type/informatics-products/dragen-bio-it-platform.html

Illumina Connected Analytics : jp.illumina.com/products/by-type/informatics-products/connected-analytics.html

製品情報

製品名	カタログ番号
TruSight Oncology 500 ctDNA Kit (48 samples, 16 indexes)	20039252
TruSight Oncology 500 ctDNA Kit plus Pierian Interpretation Report (48 samples, 16 indexes)	20043410
シーケンス試薬キット	
NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit v1.5 (300 cycles)	20028314
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5 (300 cycles)	20028312
NovaSeq Xp 4-Lane Kit v1.5	20043131
オンプレミスのバリエーションレポート作成	
Illumina DRAGEN Server v4	20051343
Illumina DRAGEN Server Advance Exchange Plan	20032797
Illumina DRAGEN Server Installation	20031995
クラウドベースのバリエーションレポート作成	
ICA Basic Annual Subscription	20044874
ICA Professional Annual Subscription	20044876
ICA Enterprise Annual Subscription	20038994
ICA Enterprise Compliance Add-on (Basicにのみ対応)	20066830
ICA Training and Onboarding	20049422
ICA Data Storage: Illumina Analytics, 1 credit	20012038
ICA Data Storage: Illumina Analytics Starter Pack, 1000 credits	20012039
ICA Data Storage: Illumina Analytics, 5000 credits	20042040
ICA Data Storage: Illumina Analytics, 50,000 credits	20042041
ICA Data Storage: Illumina Analytics, 100,000 credits	20042042

参考文献

1. Illumina. Enhanced sequencing capabilities with the NovaSeq 6000 v1.5 Reagent Kit. jp.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/novaseq-v1-5-reagents-tech-note-770-2020-013/novaseq-v1.5-reagents-tech-note-770-2020-013.pdf. Published 2020. Accessed March 30, 2022.
2. Parikh AR, Leshchiner I, Elagina L, et al. Liquid versus tissue biopsy for detecting acquired resistance and tumor heterogeneity in gastrointestinal cancers. *Nat Med*. 2019;25(9):1415-1421. doi:10.1038/s41591-019-0561-9
3. Leighl NB, Page RD, Raymond VM, et al. Clinical Utility of Comprehensive Cell-free DNA Analysis to Identify Genomic Biomarkers in Patients with Newly Diagnosed Metastatic Non-small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2019;25(15):4691-4700. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-0624
4. Illumina. TruSight Oncology UMI Reagents. jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-oncology-umi-reagents-datasheet-1000000050425.pdf. Published 2017. Accessed March 15, 2022.
5. Illumina. Illumina Connected Analytics Security Brief. jp.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/ica-security-brief-m-gl-00683/ica-security-brief-m-gl-00683.pdf. Published 2022. Accessed March 16, 2022.

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

© 2023 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。

illumina[®]