illumina®

MiniSeq™ システムでがんの素因となる生殖細胞変異を調べる

イルミナがお届けする最も手の届きやすいシーケンスプラットフォームを使った、がんの素因となるゲノム変異の同定

特長

- **サンプルからデータまで効率化された生殖細胞検出のソリューション**
  ハンズオン時間を最小限に短縮したシンプルなワークフロー
- **専門家により選定されたコンテンツの固定パネルおよびカスタムパネルでバリアントを包括的に検出**
  包括的なアッセイにより、幅広いがん種において素因となる遺伝子、バリアント、およびホットスポットを検出
- **シンプルなデータ解析**
  ローカルまたはクラウドで行う、途中の操作の要らない直感的なデータ解析
- **一貫したイルミナサポート**
  専門知識を有するイルミナのスペシャリストが、装置の設置やトレーニングをサポート

はじめに

今日のがん研究は、次世代シーケンス（NGS）技術によってゲノム変異とがん素因の関連性が解明されるなど、革新的な発展を遂げました。[1-4] キャピラリー電気泳動（CE）/ サンガーシーケンス法や PCR ベースのジェノタイピングなどの従来の手法に比べ、複数の遺伝子やサンプルを同時並列にシーケンスすることが可能な高スループットの NGS には、特徴的な利点が数多くあります。

サンガーシーケンス法は、迅速でシンプルなワークフローを特長とする手法として、現在最も幅広く利用されていますが、サンプルの必要インプット量が多く、検出力や解析精度が低いため、拡張性に制限があります [5, 6]。PCR ベースのジェノタイピングでも、迅速でシンプルなワークフローにより精度の高い解析が行えますが、一部の変異しか調べることができず、検出力は低く、複数のサンプル処理能力や低量インプットへの対応力に欠けています [7]。

図 1：ターゲットシーケンスで実現するバリアント検出 ターゲットシーケンスにより、さまざまながん種の素因となるバリアントを検出することができます。

NGS は、高い解析精度（1% のアリル頻度まで検出）、何百もの遺伝子を同時にプロファイルできる高い検出力、さらに、高い解像度を実現しています [8, 9]。サンガー /CE シーケンス法や PCR ベースのジェノタイピングに比べ、より少ないコストとより迅速なターンアラウンド、そしてより少ないサンプル量で、がんの素因となるさまざまな変化を調べることができる NGS のメリットを、世界中の研究室が活用しています。

ターゲットシーケンスの手法を用いることで、がん研究者は、がんの素因であることが既知のまたは素因となることが推定される遺伝子、遺伝子領域、またはホットスポットを選択し、焦点を絞った研究を行うことができます（図 1）。がんのターゲットシーケンスに対応したターゲットパネルは、専門家により選定されたコンテンツでシーケンスプロジェクトの範囲を大幅に絞り込むことを可能にし、コストとデータ解析の負担を低減しています。限定された遺伝子を評価するため、がんのターゲットシーケンスは、選択した領域のよりディープなカバレッジを実現します。

MiniSeq システムでは、がんのターゲットシーケンスに対応した、使いやすく、コスト効率の良い包括的なツールを数多く利用することができます。本システムは、世界中で利用される NGS の 90% 以上を占める最新のイルミナ NGS テクノロジーを活用し、その査読論文数は 26,000 部を超えます。*

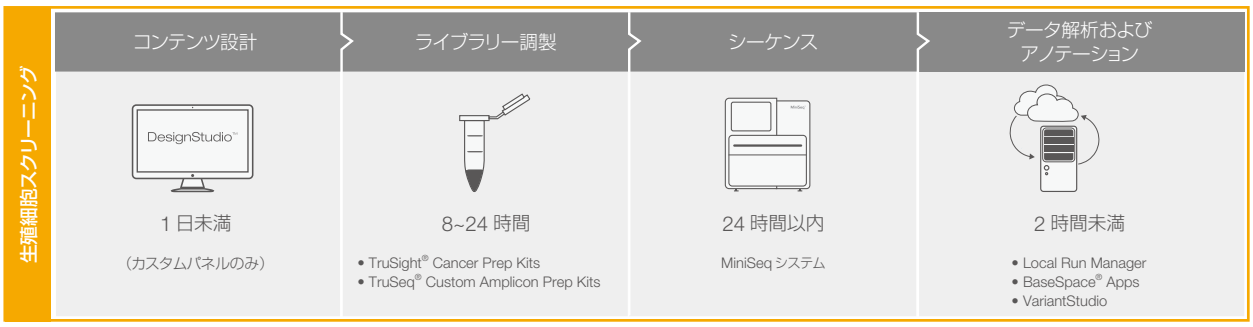

図 2：MiniSeq システムの生殖細胞変異検出のワークフロー 効率化されたライブラリー調製、シーケンス、そしてデータ解析までが行える統合ワークフローにより、さまざまなサンプルの研究がコスト効率よく行えます。

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。

MiniSeq システムのイルミナライブラリー調製ソリューションとサンプルからデータまでのシンプルかつ効率的なワークフローを利用できます（図 2）。このワークフローおよびソリューションの数々は、イルミナのサイエンティストが業界ガイドラインや専門家の推奨に従って開発し、MiniSeq システムでの使用に合わせて最適化しました。BaseSpace 環境では、シーケンスデータの安全な解析や保管だけでなく共有も行え、また、専門家が選定したツールを直感的なユーザーインターフェースに表示することにより、インフォマティクス解析が容易に行えます。イルミナのサービスチームおよびサポートチームが、ライブラリー調製からデータ解析までのワークフロー全体をサポートしてトレーニングや支援を提供すると共に、お客様からのご質問にお答えしています。

MiniSeq システムは、これまでで最も手の届きやすく、少ないサンプル量でもランが行えるコスト効率の良いシーケンスシステムとして、品質と信頼のイルミナ NGS を、あらゆるラボで利用可能にしています。MiniSeq システムにより、がん研究においてかつてないほどスムーズにターゲットシーケンスへと移行することができます。

シンプルかつ効率的なワークフロー

生殖細胞変異の検出がシンプルに行える MiniSeq システムのワークフローにより、生産性を最大限に高めることができます（図 2）。TruSight Cancer Sequencing Panel は、がん素因との関連が知られる 94 の遺伝子および 284 の一塩基多型（SNP）を搭載した固定パネルです。さらに、最大 1,536 のアンプリコンをカスタムデザインできる TruSeq Custom Amplicon Low Input ライブラリー調製キットを使って、生殖細胞プロファイリングを行うこともできます。

ライブラリー調製

イルミナのライブラリー調製法では、キャプチャー方式のターゲット濃縮とアンプリコン生成を行います（図 3）。ターゲット濃縮では、選択された特定の領域をビオチン標識したプローブとハイブリダイゼーションすることによりキャプチャーした後、磁気ビーズを使用して抽出します。この高度にマルチプレックスされた手法により、TruSight Cancer Panel などを使った、遺伝的変異の検出やバリデーション、またはプロファイリングが幅広く行えます。

TruSeq Custom Amplicon Low Input は、ハイブリダイゼーション - 伸長 - ライゲーションのアプローチによりアンプリコンを生成します。ここでは、PCR増幅を行う前の 2 本鎖 DNA の集団から、1 本鎖の鋳型を作製します。

TruSight Cancer ライブラリー調製

TruSight Cancer Sequencing Panel を TruSight Rapid Capture Kit と併用することにより、ライブラリー調製と濃縮が 1 つの統合ワークフローで行えます。わずか 50ng の DNA インプット量で行える迅速なライブラリー調製は 1.5 日で完了し、機械的断片化を行う必要はありません。

TruSight Rapid Capture Sample Prep Guide のプロトコールでは、DNA シーケンス用のライブラリー調製が簡単に行えます。

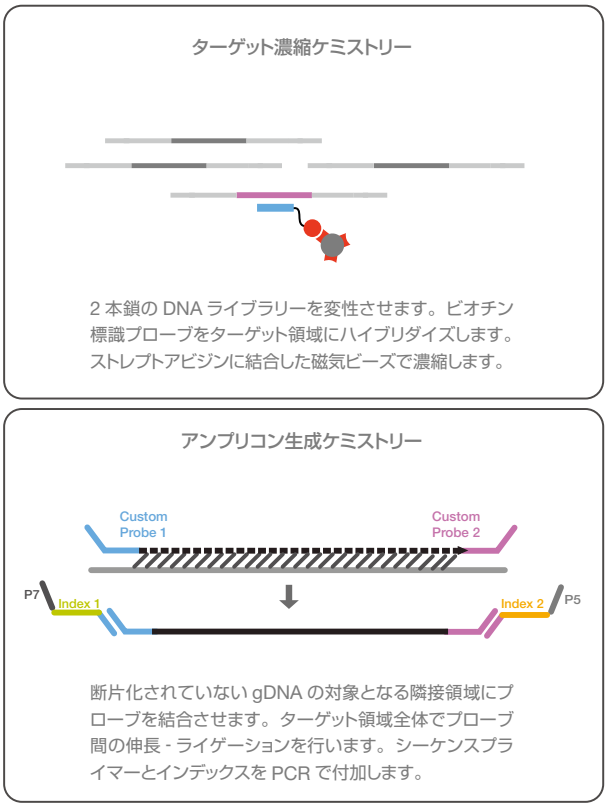

図 3：ライブラリー調製法 イルミナのシーケンス用ライブラリーの調製法には、ターゲット濃縮とアンプリコン生成が含まれます。

プロトコールは、必要な試薬を一覧表示し、安全な停止ポイントを示しながら、ライブラリー調製を段階的に始めから終わりまで進めます。

TruSeq Custom Amplicon Low Input ライブラリー調製

TruSeq Custom Amplicon Low Input アッセイでイルミナの使いやすい無料のオンラインツールである DesignStudio™ を利用すれば、カバレッジが最適化され、対象の遺伝子および領域をターゲットとしたカスタムアンプリコンパネルのデザインがスムーズに行えます（図 4）。DesignStudio により、選択した遺伝子全体を *in silico* で平均 94% 以上カバーした TruSeq Custom Amplicon Low Input のデザインが可能です。イルミナのコンシェルジュサービスは、プローブのデザイン、カスタムパネルの機能性評価、およびターゲットカバレッジの向上の支援を行います †。

TruSeq Custom Amplicon Low Input のアッセイは、自動化しやすく、シンプルで効率的なライブラリー調製を特長としています。わずか 3.5 時間のハンズオン時間で、ライブラリー調製を 6.5 時間で完了することができます。TruSeq Custom Amplicon Low Input ライブラリー調製参照ガイドでは、プロトコールの概要、成功のポイントやテクニック、各ステップの詳細、キット製品の構成、お客様に準備いただく消耗品の一覧など、初めてのご利用に必要な情報すべてを確認いただけます。

* 社内資料。Illumina, Inc. 2015.

† イルミナコンシェルジュサービスに関する詳細につきましては、弊社担当営業までお問い合わせください。

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。

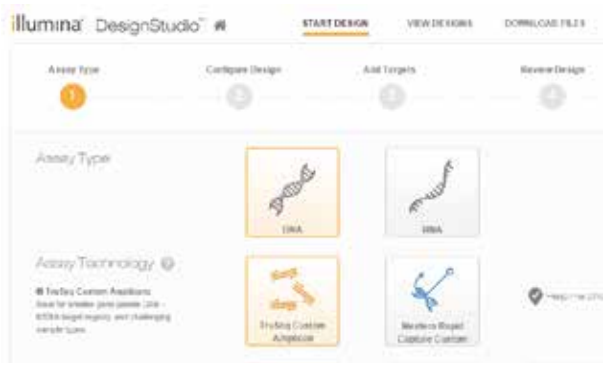

図 4：カスタムプローブのデザイン DesignStudio を使えば、ターゲットとするゲノム領域と搭載するアンプリコンを可視化して、カバレッジとスコアを評価することができます。

MiniSeq システムで行うシーケンス

ライブラリー調製で、ターゲット濃縮またはアンプリコン生成のどちらを行う場合でも、調製が完了したサンプルライブラリーは、MiniSeq システムで簡単にシーケンスが行うことができます（図 5）。DNA 増幅とシーケンスを完全に自動化し 1 台の装置で行うため、高額な専用機器を購入して操作する必要がありません。

ロードしてすぐにランが開始できる操作性を備えた MiniSeq システムでは、シーケンスランの始めから終わりまでの各ステップを、ユーザーインターフェースにわかりやすく表示される案内に従って段階的に進めます。MiniSeq システムでの（ライブラリーの）ロードおよび（ランの）セットアップに必要な時間は 10 分未満です。（シーケンス）ランは 24 時間以内に完了することができます。MiniSeq 試薬キットは、研究デザインに最適なリード長、サンプル数および出力要件に合わせて中出力および高出力の 2 種類から選択できます。

図 5：MiniSeq システム MiniSeq システムは、最新の SBS ケミストリーおよびシンプルに統合されたワークフローを活用しています。

簡素化されたデータ解析およびバイオインフォマティクス

MiniSeq システムで行うデータ解析では、インフォマティクスの専門知識もコマンドラインの習得も必要ありません。MiniSeq システムは、ランを設定し、稼働状況をモニターし、ランが完了すると自動的にシーケンスデータを解析する Local Run Manager ソフトウェアを装置に搭載しています。Local Run Manager はモジュラー方式を採用しているため、必要に応じて自身の解析モジュールだけをインストールしアップデートすることができます。

さらに、MiniSeq システムで作成したシーケンスデータを BaseSpace コンピューティング環境（クラウドまたはオンサイト）に瞬時に転送して、保管や解析を行うこともできます。BaseSpace アプリケーション（App- アプリ）は、インフォマティクス初心者でもクリックだけでスタートできるようデザインされた直感的なユーザーインターフェースに、専門家が汎用するデータ解析ツールをまとめて表示します。これらのアプリは、アライメントやバリアントコールなど、シーケンスデータ解析の一般的なニーズを幅広くサポートしています。これにより BaseSpace が体系的に利用でき、これまでに取り揃えられた市販およびオープンソースの解析ツール数は最大規模を誇ります。

VariantStudio により、シーケンスデータから得られた疾患に関連するバリアント情報のフィルタリング、同定、およびアノテーションが迅速に行えます（図 7）。VariantStudio の使いやすいアプリケーションで、疾患に関連するバリアント情報を構造化されたフォーマットにまとめてアノテーションしたレポートがフレキシブルに作成できます。

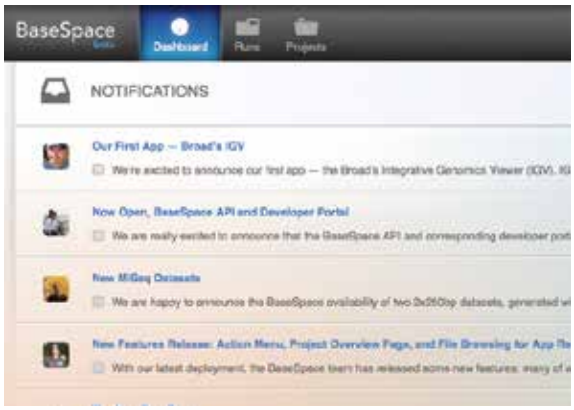

図 6：BaseSpace ダッシュボード BaseSpace 環境のクリック操作による直感的なユーザーインターフェースが、お客様ご自身で行うインフォマティクスを強力に支援します。

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。

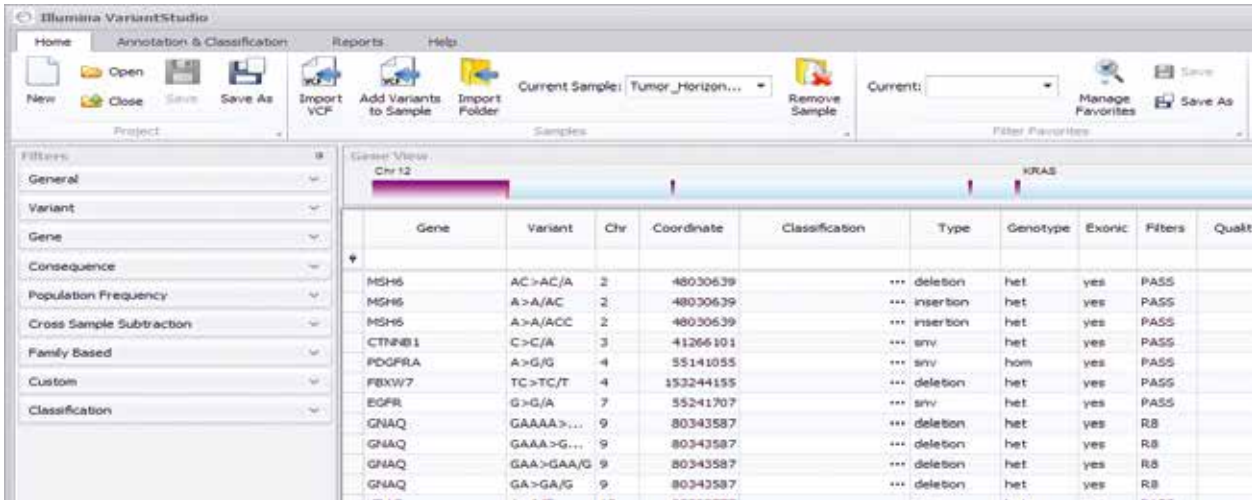

図 7 : VariantStudio 直感的なユーザーインターフェースが特長の VariantStudio ソフトウェアを使えば、インフォマティクスの専門知識がなくても、データの解析および探索が容易に行えます。幅広いソースから得られた情報を 1 つのデータベースに集約して、ゲノムデータのアノテーションを包括的に行います。レポートをフレキシブルに作成して、結果の要約およびアノテーションを行います。

実証されたワークフロー – TruSight Cancer

ライブラリー調製

TruSight Cancer Oligo Box および TruSight Rapid Capture Library Prep Kit 使ってライブラリーを調製しました。血液から DNA サンプルを抽出し、各サンプルにつき 50ng の DNA をインプットしてアッセイを行いました。TruSight Cancer のライブラリーを『TruSight Rapid Capture Sample Prep Guide』に明記されているプロトコールに従って調製しました。ライブラリーの定量およびノーマライズを行って、MiniSeq システムでシーケンスを行いました。

MiniSeq システムで行うシーケンス

サンプルライブラリー、試薬カートリッジ、およびフローセルを MiniSeq システムにロードしました。100bp × 2 リードのサイクルで DNA 増幅とペアエンドシーケンスを、ユーザーによる途中操作なしに自動で行った場合の所要時間は 16 時間でした。

データ解析 – アライメントおよびバリアントコール

BaseSpace 上で BWA Enrichment App を使ってシーケンスデータの解析を行いました（図 8）。デマルチプレックスおよび FASTQ ファイル生成後、ソフトウェアは Burrows-Wheeler Aligner（BWA）を使い、ヒトの参照ゲノム hg19 にリードをアラインして BAM ファイルを作成します。その後、Genome Analysis Toolkit（GATK）を使って、マニフェストファイルに指定されたターゲット領域のバリアント解析を行いました。GATK は、SNP、インデル、および他の構造多型を含むテキストファイルとして VCF ファイルを出力します。濃縮、バリアントコール、カバレッジ、フラグメントのインサート長、および重複に関するレポートとして、サマリー一覧が作成されました。

図 8 : BaseSpace で行う TruSight Cancer のデータ解析 BWA Enrichment アプリを使って BaseSpace で作成したサマリー一覧。ラン指標（アライメントできたリード数、アライメントできた塩基数、および濃縮率）を表示しています。

結果および考察

TruSight Cancer Sequencing Panel は 99% 以上の塩基を 20x でカバーするため、信頼性の高いバリアントコールデータが得られます（表 1）。また、99% 以上のリードをアライメントし、リードの 77% 以上を濃縮して、特異的かつ精確なシーケンスが行えます（表 1）。

一塩基多型のデータベース（dbSNP）は、シンプルな遺伝子多型を幅広く集めたパブリックドメインアーカイブです [10]。dbSNP にはほぼすべての SNV（一塩基変異）およびインデル（挿入および欠失）が含まれるため、TruSight Cancer によるシーケンスで得られる研究データは関連性が高く、素因となる新たな遺伝的変異を同定するための検出力が向上します（図 9）。

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。

表1：TruSight Cancer Sequencing Kitのカバレッジの概要

サンプル	ターゲット領域の平均カバレッジ	20x カバレッジ以上のターゲット領域（%）	ターゲットカバレッジ（1x）	ターゲットカバレッジ（10x）	ターゲットカバレッジ（20x）	ターゲットカバレッジ（50x）
1	1068x	94.5%	99.9%	99.4%	99.1%	98.6%
2	1465x	95.2%	100.0%	99.6%	99.5%	99.1%
3	1355x	91.7%	99.7%	99.2%	99.0%	98.5%
4	1248x	97.4%	100.0%	99.8%	99.7%	99.4%
5	1129x	97.4%	100.0%	99.9%	99.6%	99.4%
6	1262x	91.5%	99.8%	99.3%	99.0%	98.4%

TruSight Cancer Sequencing キットを使えば、MiniSeq システムでシーケンスを行った 6 サンプルの代表的なラン情報を集約したサマリーを作成できます（BWA Enrichment）。

Variant Summary

SNVs

Sample	SNVs	SNV Het/Hom Ratio	SNV Ts/Tv Ratio	SNVs (Percent Found in dbSNP)
1	347	6.2	2.8	95.1%
2	291	1.6	2.6	100.0%
3	357	8.2	2.6	95.0%
4	291	1.6	2.6	100.0%
5	355	7.7	2.6	94.9%
6	346	7	2.7	94.5%

Show 10 entries　Showing 1 to 6 of 6 entries　1

Indels

Sample	Indels	Indel Het/Hom Ratio	Indels (Percent Found in dbSNP)
1	6	5	66.7%
2	2	1	50.0%
3	2	1	100.0%
4	1	0	100.0%
5	3	2	100.0%
6	3	2	100.0%

Show 10 entries　Showing 1 to 6 of 6 entries　1

図 9：TruSight Cancer のバリアントサマリー TruSight Cancer Sequencing Panel を使えば、精確で特異性の高いシーケンスや信頼性の高いバリアントコールが行え、検出力が向上します。

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。

まとめ

MiniSeq システムでは、がんの素因となるゲノム変異を調べるための生殖細胞検査に対応した、使いやすく、コスト効率の良い包括的なツールの数々を利用することができます。専門家により選定されたコンテンツを搭載し業界ガイドラインに従って開発されたイルミナの実績あるアッセイを利用することも、または、イルミナのサイエンティストのサポートで、自分だけのカスタムパネルを開発することもできます。MiniSeq システムにより、ラボの規模を問わず、CE/Sanger シーケンス法や PCR ベースのジェノタイピング法に比べ、よりコストを抑えながら、さらに迅速なターンアラウンドで、より少量の組織サンプルでも、がんの素因となるさまざまな変化を調べることができます。

詳細情報

がんのターゲットシーケンスに関する詳細につきましては：
jp.www.illumina.com/applications/cancer/research/cancer-dna-sequencing/targeted-cancer-seq.html をご覧ください。

製品情報

製品名	カタログ番号
MiniSeq System	SY-420-1001
MiniSeq High Output Kit（75 Cycles）	FC-420-1001
MiniSeq High Output Kit（150 Cycles）	FC-420-1002
MiniSeq High Output Kit（300 Cycles）	FC-420-1003
MiniSeq Mid Output Kit（300 Cycles）	FC-420-1004
TruSight 疾患パネル	**カタログ番号**
TruSight Cancer Sequencing Panel	FC-121-0202
TruSight Rapid Capture（1 index, 8 samples）	FC-140-1101
TruSight Rapid Capture（2 indexes, 8 samples）	FC-140-1102
TruSight Rapid Capture（4 indexes, 16 samples）	FC-140-1103
TruSight Rapid Capture（24 indexes, 48 samples）	FC-140-1104
TruSight Rapid Capture（24 indexes, 96 samples）	FC-140-1105
TruSight Rapid Capture（96 indexes, 288 samples）	FC-140-1106
Amplicon DNA カスタムパネル	**カタログ番号**
TruSeq Custom Amplicon Low Input Kit（96 samples）	FC-134-2001
TruSeq Custom Amplicon Low Input Kit（16 samples）	FC-134-2002
TruSeq Custom Amplicon Index Kit	FC-130-1003

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。

参考文献

1. Rahman N. Integrating germline cancer predisposition gene testing into routine clinical practice - The Mainstreaming Cancer Genetics programme [AACR abstract 4705]. *Cancer Res*. 2014;74(19sup-pl):4705.
2. Münz M, Ruark E, Renwick A, et al. CSN and CAVA: variant annotation tools for rapid, robust next-generation sequencing analysis in the clinical setting. *Genome Med*. 2015;7(76):1-8.
3. Wimberger P, Benet-Pages A, Schubert S, et al. Identification of ERCC2 as novel susceptibility gene for hereditary breast and ovarian cancer [ASCO abstract 1512]. *J Clin Oncol*. 2015;33(suppl):1512.
4. Sykorova V, Dvorakova S, Vcelak J, et al. Search for new genetic biomarkers in poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas using next generation sequencing. *Anticancer Res*. 2015;35(4):2029-2036.
5. Shendrue J, and Hanlee J. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotech*. 2008;26:1135-1145.
6. Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods*. 2008;5(1):16-18.
7. Tuononen K, Maki-Nevala S, Sarhadi VK, et al. Comparison of targeted next-generation sequencing (NGS) and real-time PCR in the detection of EGFR, KRAS, and BRAF mutations on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor material of non-small cell lung carcinoma-superiority of NGS. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2013;52(5):503-511.
8. Liu L, Li Y, Li S, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. J Biomed Biotechnol. 2012;2012:251364.
9. Ross MG, Russ C, Costello M, et al. Characterizing and measuring bias in sequence data. *Genome Biol*. 2013;14:R51.
10. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(1):308-311.

イルミナの保守サービス、トレーニングおよびコンサルティングを活用して、性能と生産性を最大化

ラン実行中にその場で支援が必要となった場合も、ワークフローの性能を高めるために詳細なコンサルティングを必要としている場合も、イルミナはお客様をサポートいたします。イルミナのサービスチームおよびサポートチームは、導入トレーニングから、装置のサポート、さらに進行中の NGS プロジェクトのコンサルティングまで、お客様のニーズに合わせた適切なフルサポートの数々を提供しています

プロフェッショナルサービス

プロダクトケアサービス

- 段階的な装置サービス+アドオンサービス
- 装置コンプライアンスサービス
- 装置オンデマンドサービス

イルミナiSchool

- ご希望の施設でのインストラクターによるトレーニング
- イルミナトレーニングラボでのインストラクターによるトレーニング
- オンラインコース
- ウェビナー

コンサルティング

- 装置およびライブラリー調製の検査を行う Proof-of-Concept サービス
- デザイン支援と製品の最適化を行うコンシェルジュサービス
- 時間単位でコンサルティングを行う IT およびバイオインフォマティクスの個別支援サービス

イルミナが提供するサポートについての詳細は：jp.illumina.com/services/instrument-services-training.html をご覧ください。

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。

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

代理店

本製品の使用目的は研究に限定されます。 販売条件：jp.illumina.com/tc

© 2016 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPro, DASL, Design Studio, GAIIx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, NextSeq, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode, the pumpkin orange color, the Genetic Energy streaming bases design は、Illumina, Inc. の商標または登録商標です。
その他の会社名や商品名は、各社の商標または登録商標です。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。

Pub. No. 770-2015-J044 09MAR2016

illumina®