

リキッドバイオプシーと NGS：トランスレーショナル臨床研究の次なるステップへ

セルフリー DNA は腫瘍の不均一性を解明する可能性を秘めている

はじめに

血液中を循環するセルフリー DNA (cfDNA) は、体内に存在するさまざまな組織、腫瘍、またはその他の微生物から生じる可能性があります。リキッドバイオプシーによる血液内の cfDNA の解析は、がんを含む特定の疾患の評価とモニタリングに特に役立ちます。

腫瘍は大量の DNA を血中に放出することが知られてきました。血中循環腫瘍 DNA (ctDNA) と呼ばれる、死んだ腫瘍細胞から放出される DNA は、血液中の全 cfDNA のごく一部です。そのため、低頻度の体細胞変異を検出できる堅牢なアッセイが必要となります。

次世代シーケンス (NGS) という解析手法では、既知の変異を高感度かつ特異的に検出できます。最近では、既知のバリエーションを持たない新しい腫瘍の候補遺伝子とバリエーションタイプをより幅広く分析できる、包括的なアッセイが開発されています。こうした解析手法の進化により、スクリーニング、治療法の選択、モニタリング、治療抵抗性の特定など、さまざまなアプリケーションで利用される ctDNA 解析が、疾患状態のモニタリング手法として注目を集めています。

組織生検に対するリキッドバイオプシーの利点

リキッドバイオプシーは、対象組織にアクセスできない場合、比較的侵襲的な方法でサンプル取得できます。病変組織にアクセスできる場合でも、モニタリングのためにリバイオプシーが望まれる多くの疾患に、cfDNA 解析はいくつかの利点をもたらします。

リキッドバイオプシーのサンプル取得は一般的な血液採取で行え、この方法について適切な訓練を受けている専門家は多数存在します。一方、組織生検は、多くの場合、有資格の技術者や外科医が持つ専門的なスキルが必要になります。この重要な手順において、リキッドバイオプシーの方が費用対効果が高く、所要時間が短くなるうえに、関連する有害事象の可能性が低く抑えられます。サンプルを取得した後は、cfDNA 解析用に最適

化された DNA 抽出方法により、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルを処理する場合に比べて時間が短縮され、費用も安く抑えられます。特定の組織へのアクセスでは、初期評価やバイオプシーの反復のための組織生検が厳しく制限される可能性があります。米国がんネットワークの診療ガイドラインは、特定の腫瘍タイプに対してリキッドバイオプシーを推奨するように改訂されています。特に、非小細胞性肺がんなど、組織生検を選択できない場合にリキッドバイオプシーが推奨されています。¹

特定の組織源から生じる ctDNA は cfDNA 全体のわずかな部分にすぎませんが、cfDNA 解析は腫瘍の不均一性を評価し、組織のサンプリングバイアスを克服できるツールになるように改良されています。ctDNA 解析を使用することで、疾患の進行と治療への反応をモニターできます。リキッドバイオプシーは、新しい変異を特定できるシーケンス手法を使用しているため、新しい変化から生じる獲得耐性のモニタリングに特に役立ちます。感度が向上し、多数の遺伝子を同時に評価するアッセイが開発されているため、cfDNA は包括的な腫瘍プロファイリングに使用できます (図 1)。その結果として、リキッドバイオプシーは、疾患の進行中の新しい変異と、原発腫瘍巣以外の新しい組織で発生する変異を特定できます。

ctDNA の解析に使用される技術

cfDNA の解析に使用される最も一般的な分子法は、定量 PCR (qPCR)、Droplet Digital PCR (ddPCR) と NGS です。どちらの PCR 方法でも、特定の DNA プローブを使用して特定の遺伝子をターゲットにし、サンプル内のターゲット数の定量的測定値を出力します。NGS もプローブを使用して特定の DNA 断片をキャプチャーしますが、出力されるデータはキャプチャーした DNA のシーケンスです。

qPCR : qPCR は、少数のバリエーションを解析する場合に効率的です。ただし、qPCR アッセイは比較的少数のターゲットを指定している場合に限定され、指定したバリエーションタイプのみを評価するため、発見力はほとんどありません。

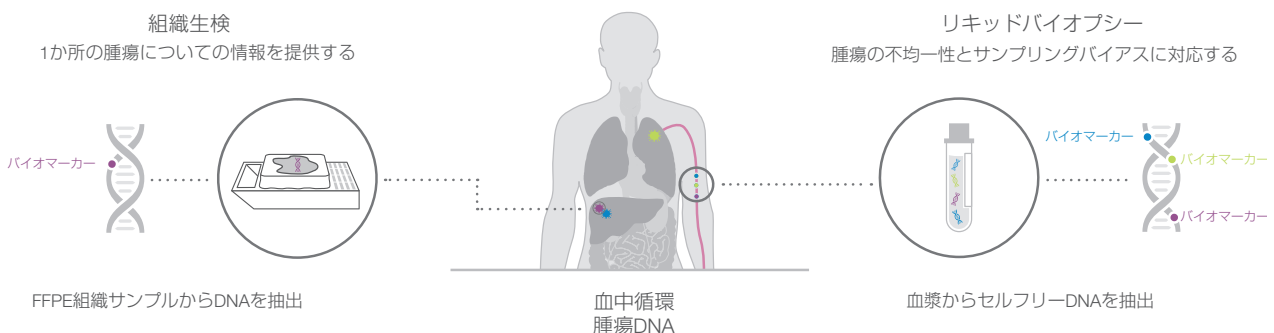


図 1 :新しい分子法では、血漿サンプルから多数の組織とバイオマーカーを評価できる：cfDNA を使用した包括的なゲノムプロファイリングは、数百のマーカーを 1 回のアッセイに統合できます。

表 1：PCR とターゲット NGS の比較

方法	利点	課題
PCR	高感度 慣れ親しんだワークフロー 必要設備はほとんどのラボで利用可能	調査できるのは低解像度の限られたバリエーションのみ 事実上、発見力はない サンプル入力要件の増加により拡張性が低下
ターゲット NGS	シーケンス深度が高く、感度が高い (0.5% まで検出可能) 発見力が高く、腫瘍の不均一性への対応に最適 バリエーション解像度が高い サンプルのマルチプレックスで高いサンプルスループットを実現	少量のターゲット (20 未満) のシーケンスでは費用対効果が低い 少量のターゲット (20 未満) のシーケンスでは時間効率が良くない

ddPCR：ddPCR は qPCR より精度が優れているものの、追加のコストがかかり、関連する技術的な専門知識も必要になります。ddPCR はまた、ターゲットの数とバリエーションタイプが特定のアッセイのデザインに限定されるため、発見力も欠けています。

NGS：NGS には DNA 配列の 1 塩基解像度が含まれるため、アッセイデザインの予備知識がなくても、新しいバリエーションを発見することができます。これにより、複数のバリエーションタイプの評価と、遺伝子の新しい場所での変異の発見が可能になります。NGS は、少数のバリエーションやサンプルを解析する場合、コストが高くなり、時間がかかります。ただし、アッセイがより多くの分子ターゲットを対象とするように設計されている場合は、NGS の包括的な性質により、効率が向上し、コストが削減されます (表 1)。

NGS がリキッドバイオプシーにもたらす利点

NGS は数百万の DNA 断片を並行でシーケンス処理し、その後、計算によってゲノムへのリードのアライメントを実行します。アッセイのデザインによっては、NGS は非常に包括的になり、多数の遺伝子ターゲットとバリエーションタイプが対象になります。がん治療における実用的なバイオマーカーの数が増え続けているため、多数のバイオマーカーを 1 つの試験に統合する機能は、意味のある答えを見つけるために必要な試験数を減らすことで、研究と臨床の両方の環境でより価値が高まるでしょう。NGS では試験の繰り返しを避けられるため、サンプル、時間、コストを節約できる可能性があります。

ハイブリッドキャプチャーケミストリーなどのシーケンスライブラリー調製オプションにより、cfDNA サンプルからターゲット遺伝子の大きな断片を取り出すことができます。ハイブリダイゼーションプロトコルは、ハイブリダイズされた領域に変異が存在する場合でもターゲットをキャプチャーできる大きさに設計できます。キャプチャーしたターゲットをシーケンスすることで新しい変異を発見できるため、アッセイデザイン時には予備知識が不要です。NGS アッセイのデザインは、シーケンス深度を低くして多数の遺伝子をターゲットにする (包括性を高くして、感度を低くする) ことも、シーケンス深度をより高くしてより少数の遺伝子をターゲットにする (包括性を低くして、感度を高くする) こともできます。リキッドバイオプシーの場合、cfDNA サンプルに含まれる ctDNA 部分がわずかである可能性があるため、少量のバリエーションを正確に検出するために必要な感度を実現するには、高いシーケンス深度が必要です。そのため、NGS 遺伝子パネルには包括的なコンテンツが存在するものの、リキッドバイオプシーへの適用は、感度の問題により最近まで限定されていました。

NGS が包括的ゲノムプロファイリングを可能にする

改良が進んだ最新のシーケンス装置では、単一サンプルのゲノムの大部分を非常に高い深度のカバレッジでシーケンスできるようになっています。NGS は、高い感度と特異度を組み合わせた

包括的な価値を提供することで、cfDNA 解析に必要なシーケンス深度で数百の遺伝子の解析を可能にします。これらの機能により、多数の既知の変異を評価でき、がん研究における新しいドライバー変異を発見できます。精度を上げるためには、新しい分子ツールとバイオインフォマティクス法を利用できます。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 DNA ライブラリーの調製に組み込むと、増幅のステップの前に個々の DNA 分子にタグを付け、シーケンス後のデータ解析で PCR に起因するエラーを識別することができます。洗練されたアルゴリズムでアーチファクトが特定され、エラーを誘発するバックグラウンドノイズが低減するため、高い特異性を持つ真のバリエーションの特定が容易になります。

リキッドバイオプシーと包括的な分子アッセイを組み合わせると体細胞系列バリエーションを評価することで、腫瘍進化、薬剤耐性、および転移から生じる新しい変異を検出できます。がんは予測できない疾患であり、ドライバー遺伝子が常にわかっているわけでも、組織タイプによって正確に推定されるわけでもありません。多数の遺伝子と多数の組織を同時に評価できるため、リキッドバイオプシーと NGS 対応の包括的ゲノムプロファイリングの相乗効果には高い価値があります。リキッドバイオプシーと対応する組織生検を対にして行った最近の研究によれば、包括的なアッセイを使用した場合、cfDNA 解析では、ガイドラインが推奨するバイオマーカーや、同等の組織生検では検出できない耐性変化が多数検出されたことがわかりました。^{2,3}

まとめ

精密医療時代ではバイオマーカーの数が増加しているため、1 回の試験に多数のバイオマーカーを統合できる分子法への関心が高まっています。その一方で、複数の研究によれば、全身腫瘍の進化を広い視野で確認できるリキッドバイオプシーは、局所組織生検では見逃される可能性のある特定の腫瘍タイプについて貴重な情報を提供できることがわかっています。最近の NGS テクノロジーの進歩で、この両方の目標が達成されたため、包括的ゲノムプロファイリングを、リキッドバイオプシーアプリケーションに必要な感度と特異度に組み合わせることができるようになりました。

参考文献

1. NCCN Guidelines. www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx. Accessed December 13, 2018.
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.
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.

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

© 2020 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。

Pub. No. 1170-2020-002-A-JPN QB9356 08JUN2020

illumina[®]