

TruSight™ Oncology 500 ctDNA

リキッドバイオプシーサンプルからの包括的なゲノムプロファイリングを国内施設で実現

特長

- 血液検体からの包括的ゲノムプロファイリング**
 523 遺伝子を対象に、DNA のバリエーションや bTMB、bMSI を評価*
- 国内でのリキッドバイオプシーの実現**
 限られた組織サンプルの代替または補完として、非侵襲的に取得可能な血漿サンプルを活用
- 信頼性の高い結果**
 血中の頻度の低い変異検出に 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、NovaSeq™ 6000 システムを利用した高密度シーケンス、先進的なバイオフィオマティクスを採用
- 統合されたワークフローの活用**
 cfDNA から 解釈 レポート 作成に DRAGEN™ Bio-IT Platform を使用することで、バリエーションコールを 5 日間完了

* bTMBおよびbMSIは血漿ベースの(血液)マーカー

表 1 : TruSight Oncology 500 ctDNAの概要

パラメーター	詳細
装置	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 (遺伝子融合) 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エーションレポートまで 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	150 × 2 bp
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	Small variants 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 ≥ 2%
分析感度	≥ 95% (検出下限ですべてのバリエーションタイプに対して)
分析特異度	≥ 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

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包括的ゲノムプロファイリングを実現しました。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より高い感度と特異度で検出できる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感度を実現し、cfDNA 内の血中循環腫瘍 DNA (ctDNA) の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。

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ることに加え、使用期限は 6 ヶ月に延長され、Q30 スコアも改善されます。



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。

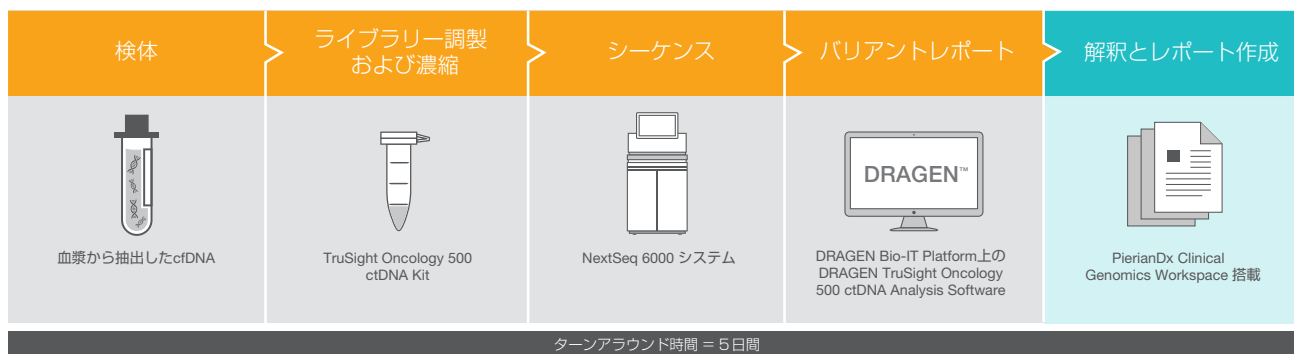


図 2 : TruSight Oncology 500 ctDNA アッセイのワークフロー : TruSight Oncology 500 ctDNA アッセイはラボの既存のワークフローに統合し、5 日間 で cfDNA からバリエントレポートを取得します。

包括的なコンテンツの設計

がんコミュニティの著名な研究者の協力により、TruSight Oncology 500 ctDNA のコンテンツは、複数の腫瘍タイプをカバー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、現在使用されているバイオマーカーと新しいバイオマーカーの双方が含まれるように設計されています。パネルのプロローブは既知の遺伝子融合と新しい遺伝子融合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)、コピー数多型 (CNV)、遺伝子融合、免疫腫瘍学に重要なマイクロサテライト不安定性 (MSI) と腫瘍変異負荷 (TMB) などのバイオマーカ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。

表 2 : TruSight Oncology 500 ctDNA で検出されるバリエントの例

バリエントタイプ	関連例
SNV および Indel	EGFR, POLE, TMPRSS2, BRAF
遺伝子融合	ALK, ROS1, NTRK, RET
CNV	HER2
MSI	MSI スコア
TMB	TMB スコア

低頻度変異バイオマーカーを検出する実績のある技術

TruSight Oncology 500 ctDNA は、Sequencing by Synthesis (SBS) ケミストリーによる実証済みの Illumina シーケンスを使用してわずか 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、ピオチン標識プロ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ローブを使用するだけでなく、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を維持します。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チファクトの両方の脱落を低減します。

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ントの識別を可能にする分子バーコード (UMI) を追加します。³ 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、Small Variants に対して 0.5% のバリエントアリル頻度 (VAF) における変異を、分析感度 95%、分析特異度 >99.995% で検出できます (表 3)。

表 3 : 低頻度バリエントの高精度検出

バリエントタイプ	分析感度 ^a	分析特異度 ^b
Small Variants (≥ 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%
遺伝子融合 (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ント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パイオインフォマティクスアルゴリズムを使用して cfDNA の課題を克服し、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修正を行ったうえで、生データに基づいてバリエントコールを行います。頻度の低いバリエント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、高感度なバリエントコールの結果を取得します。

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。バリエントコールおよびエラー修正の後で生殖細胞系列バリエント、信頼度の低いバリエント、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ントがフィルタリングされ、TMB 測定精度はさらに高められます。

DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software は、Illumina DRAGEN Server v3 (ローカルサーバー) 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 (表 4)。

PierianDx Clinical Genomics Workspace が三次解析を完了するので、ユーザーは、バリエーションレポートファイルを直接 Clinical Genomics Workspace クラウドにアップロードするだけです。Clinical Genomics Workspace はバリエーションアノテーション、スムーズな解釈のためのフィルタリング、およびレポートの作成を実行します。Clinical Genomics Workspace は、遺伝子に含まれる何千ものバリエーションから最終的に自動出力されるカスタマイズ可能なゲノムレポートにおいて、生物学的に関連のあるバリエーションをフィルタリングして優先順位を付けます。cfDNA から統合されたバリエーションレポートが取得されるまで、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 で達成される結果の質の高さを実証するため、イルミナは SNV、CNV、遺伝子融合、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 3 および図 4、表 5 および表 6)。

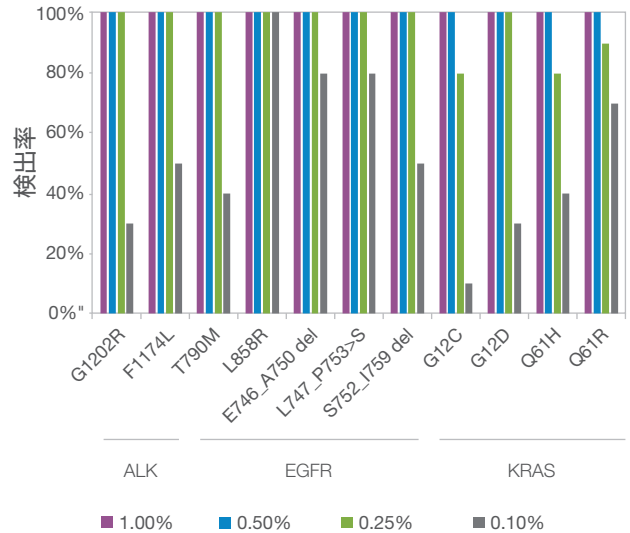


図 3: 低 VAF での Small Variant 検出: 各バリエーションのアリル頻度 (VAF) が既知であるサンプルを希釈し、0.10 ~ 1.00% VAF の範囲にしました。30 ng の市販リアルタイムコントロール DNA を使用し、各サンプルの 5 レプリケートを TruSight Oncology 500 ctDNA で解析しました。

表 4: ローカルサーバー DRAGEN Server v3 を使用するとデータ解析に要する時間が減少する

データ解析手順	DRAGEN ソリューションを使用しない場合 ^a	TruSight Oncology 500 ctDNA DRAGEN Analysis Software
BCL 変換	6 時間	1 時間
アライメント + リード分解 + 再アライメント	170 時間	11 時間
遺伝子融合コール	10 時間	2 時間
バリエーションコール	24 時間	8 時間
合計時間	~ 9 日間	~ 20 時間 (~ 85% の短縮)

a. S4 フローセル使用、24 サンプルに対するシングルノード (128 GB メモリー、24 コア CPU)、非並列パイプライン

* クラウドベースの DRAGEN™ TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software ソリューションは間もなく発売予定です。

まとめ

TruSight Oncology 500 ctDNA は NGS ベースのマルチプレックスアッセイで、血漿サンプルからがん関連バイオマーカー数百種を同時に解析することができます。アッセイ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おり、複数のサンプルを使って繰り返し試験を行わなくても、さまざまな腫瘍タイプに関与する 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) の評価も行います。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。

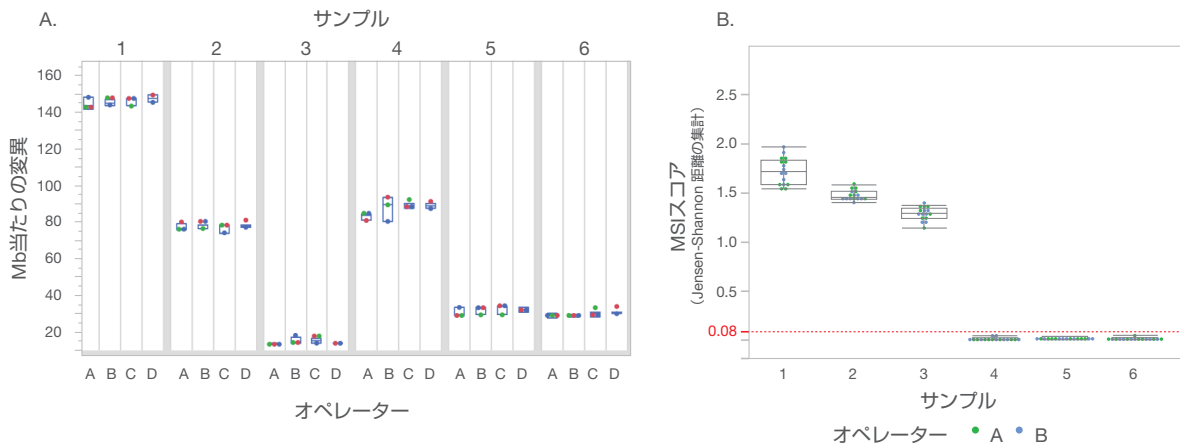


図 4: 再現性のある TMB および MSI 測定: (A) TMB は、6 つの異なる血漿サンプルのレプリケートを使って、4 人のオペレーターによって評価しました。(B) MSI は、MSI 高不安定性であることが既知のヌクレオソーム調製細胞株 3 つ (1 ~ 3) と変異頻度の低い MSI 高不安定性腫瘍の cfDNA サンプル 3 つ (4 ~ 6) を使って、2 人の異なるオペレーター (緑、青) によって評価しました。

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				
AKT2	1.4	1.4	0.02	100%
BRAF	1.5	1.5	0.01	100%
BRCA2	1.8	1.5	0.01	100%
CCND3	1.5	1.4	0.01	100%
CDK6	1.5	1.5	0.01	100%
FGF14	1.3	1.5	0.01	100%
FGF3	2.1	1.6	0.01	100%
FGF4	1.4	1.2	0.01	100%
FGFR2	1.3	1.5	0.01	100%
MET	1.4	1.5	0.02	100%
MYC	1.7	1.8	0.02	100%
欠失				
BRCA1	0.8	0.8	0.01	100%
BRCA2	0.8	0.8	0.01	100%
AR	0.7	0.8	0.01	100%

30 ng の ctDNA 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で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 での遺伝子融合検出

遺伝子融合	予想される VAF	観察された VAF	標準偏差	検出率
FGFR2-COL14A1	4.1%	4.2%	0.5%	100%
NPM1-ALK	3.4%	0.7%	0.2%	100%
FGFR3-BAIAP2L1	3.4%	0.7%	0.2%	100%
NPM1-ALK	2.4%	0.4%	0.1%	100%
EML4-ALK	1.7%	0.5%	0.1%	100%
CCDC6-RET	1.0%	0.7%	0.1%	100%
FGFR2-COL14A1	0.9%	0.4%	0.1%	100%
EML4-ALK	0.7%	0.2%	0.1%	100%
NCOA4-RET	0.5%	0.1%	0.0%	100%
EML4-ALK	0.5%	0.8%	0.2%	100%
NPM1-ALK	0.5%	0.1%	0.0%	100%
CCDC6-RET	0.2%	0.2%	0.1%	100%

遺伝子融合アレル頻度が 0.5 ~ 4% のサンプルを評価しました。30 ng の ctDNA 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。遺伝子融合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、『TruSight Oncology 500 ctDNA Local App User Guide』を参照してください。

詳細はこちらから

TruSight Oncology 500 ctDNA についての詳細は、jp.illumina.com/tso500-ctDNA をご覧ください。

DRAGEN Bio-IT Platform についての詳細は、jp.illumina.com/DRAGEN をご覧ください。

参考文献

1. 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.
2. Leigh 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.
3. Illumina (2017) TruSight Oncology UMI Reagents. <http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-oncology-umi-reagents-datasheet-100000050425.pdf> Accessed May 4, 2020.

製品情報

製品	数量	カタログ番号
TruSight Oncology 500 ctDNA Kit	48 サンプル / 16 インデックス	20039252
TruSight Oncology 500 ctDNA Kit plus PierianDx Interpretation Report	48 サンプル / 16 インデックス	20043410
NovaSeq Reagent Kit		
NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit v1.5	300 サイクル	20028314
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5	300 サイクル	20028312
NovaSeq Xp 4-Lane Kit v1.5	1 キット	20043131
オンプレミスのバリエーションレポート		
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software、レベル 1	年間ライセンス (約 48 サンプル分)	20042100
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software、レベル 2	年間ライセンス (約 96 サンプル分)	20042101
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software、レベル 3	年間ライセンス (約 288 サンプル分)	20042102
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software、レベル 4	年間ライセンス (約 480 サンプル分)	20042103
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software、レベル 5	年間ライセンス (約 960 サンプル分)	20042104
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software、レベル 6	年間ライセンス (約 2,400 サンプル分)	20042105
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software、レベル 7	年間ライセンス (約 4,800 サンプル分)	20042106
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software、レベル 8	年間ライセンス (約 9,600 サンプル分)	20042107
Illumina DRAGEN Server v3	1 台	20040619
Illumina DRAGEN Server Advance Exchange Plan		20032797
Illumina DRAGEN Server Installation		20031995

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. 1170-2019-006-D JPN QB9370 11DEC2020

