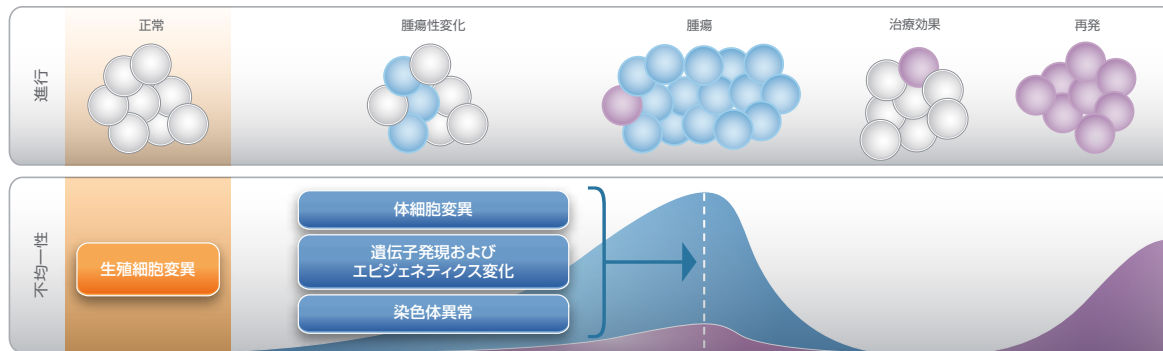


次世代シーケンサーとマイクロアレイで 癌のパズルを解明する

癌は、ゲノムにおける多くの変化により引き起こされる疾患です。これまで研究者達はイルミナの Infinium® BeadChip などのマイクロアレイを使用して、長年にわたり幅広い種類の癌の遺伝子関連性を同定してきました。最近では、腫瘍学遺伝子および環境共同研究 (COGS) においてイルミナの BeadChip が有用な役割を果たし、4つのコンソーシアム*からのコンテンツにより設計されたイルミナのカスタム iSelect® ジェノタイプングアレイを使用して、乳癌、卵巣癌および前立腺癌の3種類のホルモン関連固形癌に関連した遺伝的多型 (SNP) に関する試験が、25万人の患者を対象に行われました¹。これらのツールは非常に正確ではありますが、仮説に基づくものであり、広範囲な遺伝子の変化ではなく、単一のSNP情報を得るものです。

ここ数年において、次世代シーケンサー (NGS) はそのコストが大幅に低下し、一方でその使いやすさや操作性は向上しています。癌研究においても次世代シーケンサーが貴重なツールとして利用されており、癌ゲノムにおける体細胞変異や遺伝子発現の変化がアレイよりもはるかに高い解像度で検出できるようになりました。また、かつてない優れた精度と費用対効果を実現しています。イルミナの Sequencing by Synthesis (一塩基合成法: SBS) ケミストリーをベースとしたHiSeq® およびMiSeq® システムなどの次世代シーケンサーテクノロジーにより、研究者は全ゲノムシーケンス (WGS) あるいはターゲットシーケンスを使用してゲノムを網羅的に検索し、1回の実験で腫瘍のクローン集団の同定を行うことが可能となっています。さらに、遺伝子発現およびエピジェネティクスの変化は、RNA-Seq、ChIP-Seq、バイサルファイトシーケンスあるいは従来のメチル化アレイのいずれかを使用して解析することが可能で、腫瘍形成におけるこれらの変化の役割に関する情報を得ることができます。マイクロアレイおよび次世代シーケンサーを腫瘍研究に使用することで得られる情報は、腫瘍生物学をさらに深く理解し、より多くの情報に基づいた、より個別化した治療判断の提供につながります (図1)。

図1: 腫瘍の進行経路



癌は、正常細胞中の特定の遺伝子が発現することで始まります。その結果、無秩序な細胞の増殖が引き起こされます。癌の進行に伴い、細胞はさらに体細胞変異を蓄積していき、増殖して新たな癌クローンを形成します。その結果、最も進行した癌には複数のクローンが含まれます。各クローンの治療に対する反応性および転移のリスクはそれぞれ異なっていることから、これらすべての腫瘍クローンを完全に理解することが重要です。

* iCOGSアレイは、乳癌コンソーシアム (BCAC)、卵巣癌コンソーシアム (OCAC)、前立腺癌関連遺伝子変異研究グループ (PRACTICAL) およびBRCA1/2変異調査コンソーシアム (CIMBA) により使用されました。

イルミナ全ゲノムシーケンスソリューションシステムおよび受託サービスの選択

HiSeq 2500およびHiSeq 2000シーケンスシステムは、腫瘍または正常細胞のシーケンスを実行するには理想的で、少量のサンプルスタート量（サンプル調製キットにより、50ng~1μg）でサンプル調製からデータ解析までの効率的なワークフローを可能とします。予算に応じて、研究室でのシーケンス、またはIllumina Genome Network (IGN) の癌受託解析サービスを選択していただけます（表2）。いずれの場所でのシーケンスにおいても、HiSeqシステムは常に腫瘍研究を推進させる高品質なデータを提供します。

表2：イルミナ全ゲノムシーケンスシステム選択肢

オプション	システム導入	IGN 癌受託サービス
シーケンスシステム	HiSeq 2000 または HiSeq 2500	
キット	TruSeq DNA PCR-Free サンプル調製キット	
利点	バイアスの無いゲノムカバレッジ、PCR 増幅なし、サンプル調製は半日で完了	
DNA スタート量	1μg	3μg
解析ソフトウェア	アライメント用 iSAAC ソフトウェア* 同時変異コール用の Strelka	iSAAC アライメントおよび Strelka を使用した 最適化された体細胞の同時コール 効率的な解析のために、BAM および VCF フォーマットで提供されるデータセット

*https://github.com/sequencing/isaac_aligner

高い柔軟性を持つHiSeq 2500システムは、サンプルのローディング、クラスターの形成および自動化ペアエンドシーケンスをすべて1つのシステムに統合した自動化ソリューションを提供します。HiSeq 2500は、Rapidあるいは高出力モードで操作することが可能で、1サンプルの全ゲノムシーケンス（2 x 100bpの30xカバレッジ）が約1日で（Rapidモード）、あるいは5サンプルの全ゲノムシーケンスがわずか11日で（高出力モード）完了します。費用効率が高く、フレキシブルなHiSeq 2000システムは、シンプルなワークフローを実現し、異なるリードカバレッジを必要とするアプリケーションを同時に実行できます。HiSeq 2000システムでは、8サンプル以上の全ゲノムシーケンス（2 x 100bpの30xカバレッジ）が11.5日で完了します。

システム予算が限られている、あるいは新たにシーケンスを始められた研究者の方々には、IGNの癌解析受託サービスをお勧めします。IGNは、中規模から大規模コホートプロジェクトにおける腫瘍/正常のシーケンス解析実施に費用効率の高いソリューションをお届けします。すべてのシーケンス受託サービスの中で最も少量のサンプル必要量（3μg）により、IGNの専門家がHiSeqシステムを使用して、正常ゲノムに関しては最低でも平均40xのアライメント後カバレッジを、そして腫瘍ゲノムに関しては最低でも平均80xのアライメント後カバレッジを提供します。データ解析には、IGNの最適化された同時コール法が含まれ、不均一な腫瘍サンプルに関して最も正確な体細胞変異コールが確実に実行されます。業界で使用されている標準フォーマットでお渡しするデータセットは、市販およびオープンソースのサードパーティソフトウェアを使用して可視化および下流解析に使用可能です。さらに得られたデータは、ジェノタイプング、RNA-Seqおよびメチル化解析などに組込むことが可能で、癌のメカニズムのより明確で包括的な理解を得ることができます。

ターゲットシーケンスにより特定の変異に焦点をあてる

ターゲットシーケンスでは、予備知識に基づいて選択されたある特定の遺伝子領域またはアンプリコンに焦点をあてます。既知の腫瘍関連遺伝子領域のみを使用することにより、より効率的なデータ解析パイプラインを利用して、より費用効率の高いシーケンスを行うことが可能となります。

表3：イルミナターゲットシーケンス用サンプル調製キット

オプション	ターゲットシーケンス					
	既存製品の内容				カスタム製品の内容	
キット	Nextera Rapid エクソーム/ 拡張エクソーム 濃縮キット	TruSeq 癌パネル	TruSight 腫瘍パネル	TruSight 癌パネル	Nextera Rapid カスタム濃縮キット	TruSeq カスタム アンプリコン
特徴	コーディング領域 のエクソーム (37Mb；214,405 エクソン)、 拡張エクソーム (62Mb；エクソン、 UTR および miRNA) を 1.5 日 で調製	1 日以内でのサン プル調製、FFPE サンプルの QC、 48 腫瘍遺伝子内の 高頻度な 変異ホットスポット をターゲット、 212 のアンプリコン	肺癌、大腸癌、 メラノーマ (皮膚癌)、胃癌 および卵巣癌との 関連から 選択された、 26 の癌遺伝子 および腫瘍抑制遺 伝子をターゲット	ロンドンの癌研究所 (Institute of Cancer Research) との 共同研究により 開発；調製および エンリッチメント が 2.5 日で完了； 発癌性に関連した 94 の遺伝子および 284 の SNP を ターゲット	カスタム化； 0.5 ～ 25Mb の ターゲットシーケ ンスが 1.5 日で完了	カスタム化； 16 ～ 1536 アンブ リコンによる 4 ～ 650kb の ターゲットシー ケンスが 1 日以内 で完了
DNA 量	50ng	150 ～ 250ng (FFPE で 250ng)	30 ～ 300ng (DNA QC)	50ng	50ng	150 ～ 250ng (FFPE で 250ng)
システム	HiSeq 2500、 HiSeq 2000 および MiSeq	MiSeq	MiSeq	HiSeq 2500、 HiSeq 2000 および MiSeq	HiSeq 2500、 HiSeq 2000 および MiSeq	MiSeq
解析ソフト ウェア	HiSeq Analysis Software MiSeq Reporter	MiSeq Reporter with Somatic Variant Caller および Illumina Amplicon Viewer	MiSeq Reporter with Somatic Variant Caller および Illumina Amplicon Viewer	HiSeq Analysis Software MiSeq Reporter	HiSeq Analysis Software MiSeq Reporter	MiSeq Reporter with Somatic Variant Caller および Illumina Amplicon Viewer

遺伝子発現およびエピジェネティクス解析

イルミナの最新技術を利用して、トランスクリプトームおよびエピジェノムの変化をモニターすることが可能です。これにより、疾患の分類、予後、治療の選択と効果、および疾患の進行の理解に役立つ貴重なデータを得ることができます。腫瘍形成においては、Small RNAが介在した制御の変化、DNAとタンパク質の相互作用およびDNAメチル化により引き起こされる遺伝子発現の変化が重要な役割を果たしており、このような研究は非常に重要視されています。これらの変化を検出するためには、シーケンスおよびマイクロアレイの様々な手法が利用できます。

RNAシーケンス

腫瘍は極めて多くの変異を含むため、腫瘍形成ドライバーを同定すること、および治療標的となり得る遺伝子変化を同定することが重要です。RNAシーケンス (RNA-Seq) を使い、DNA変異の機能的効果をさらに理解することができます。RNA-Seqは遺伝子機能、新規の転写産物、および異なる癌タイプにおける遺伝子発現プロファイルを予備知識なしで検出します。RNA-Seqはダイナミックレンジが広く、発現量が低い場合にも転写物の確実な検出および定量が行えます。このような研究データを使用して、より効果的な治療を提案し、診断開発をサポートすることが可能です。

RNA-Seqでは、RNAを抽出後、cDNAに変換し、さらにcDNA末端にアダプターを結合させてシーケンスライブラリーを構築します。イルミナのサンプル調製キットは各鎖に特異的な情報を提供するため、以前から癌形成と関連付けられている遺伝子制御機構であるアンチセンス発現の検出が可能です。Poly-Aを利用したmRNA解析 (TruSeq Stranded mRNAサンプル調製キット) を行うことや、mRNAに加えコーディングおよび複数の型のノンコーディングRNA、対象とするRibo-Zero rRNA還元ケミストリーによる全トランスクリプトーム解析 (TruSeq Stranded Total RNAサンプル調製キット) を実施できます。FFPEを含む低品質のサンプルにおいても強固な結果を提供することができるのが、TruSeq Stranded Total RNAサンプル調製キットの重要なポイントです。

ターゲットRNA発現

ターゲットを絞ったRNAターゲットの解析を行うことで、より多数のサンプルを処理することができ、研究をさらに加速します。TruSeq Targeted RNA Expression キットは、高度なカスタム化が可能な遺伝子発現プロファイリングおよび検証をMiSeqシステム上で実現します。このキットは、わずか50ngのRNAをスタートとする迅速でシンプルなワークフローと、装置上での自動データ解析を提供します。専門家により構築された、p53および乳癌、肺癌、前立腺癌などのパネルをご用意していますが、さらに最適化するために、追加コンテンツを搭載するカスタム化およびフルカスタムのパネル設計も可能で、遺伝子、アイソフォーム、スプライスジャンクション、遺伝子融合およびcSNPをターゲットとする12~1,000のアッセイのパネルを構築し、384サンプルのマルチプレックスで実験を進めることができます。

Small RNAの介在による制御

Small RNAまたはmicro RNA (miRNA) は、様々な機構によって遺伝子発現を制御しており、多数の癌と関連付けられています⁵。多くのmiRNAは、癌において欠失、あるいは増幅しているゲノム領域に位置しています。miRNAは、その相対量とサイズから標準のRNA-Seqアッセイと併用して解析することが困難であるため、イルミナではポピュレーション内のすべてのmiRNAを同定するための Small RNA を対象とした専用試薬キットをご提供しています。

MiSeqシステムによるSmall RNAシーケンスは、極めて高いカバレッジおよび感度におけるmiRNAの発見およびプロファイリングを可能とします (1細胞当たり最低1コピー)。TruSeq Small RNAサンプル調製キットは、MiSeq ReporterソフトウェアのSmall RNAワークフローを使用して、MiSeqによるシステム上でのアライメントおよび解析を実行します。また、最高48サンプルまで同時にインデックスおよびプールのことが可能です。

DNA – タンパク質相互作用

転写因子結合の変化は腫瘍形成における重要な事象であり、タンパク質とDNAがどのように相互作用して遺伝子発現を制御するかは、癌を完全に理解するためには極めて重要です。クロマチン免疫沈降（ChIP）実験からは、遺伝子発現の活性化または抑制の機構に関する情報が明らかにされます。ChIP DNAのシーケンス（ChIP-Seq）により、研究者には、対象とするタンパク質に関連した、ゲノム中のDNA領域の完全な像を捉えることができます。

TruSeq ChIPサンプル調製キットは、遺伝子制御機構を明らかにするための、簡便で費用効率の高いソリューションです。TruSeq ChIPサンプル調製キットは、イルミナのすべてのシーケンスシステムに使用でき、ChIPサンプルのインデックス化（1回のシーケンスランで最高24サンプルをプールのすることが可能および微量スタートに対応しています）MiSeqシステムでは、転写因子研究など、より少量のタンパク質とDNAの相互作用に焦点をあてたChIP-Seqを効率的に行うことができます。

DNAメチル化

癌の進行速度は、エピジェネティクスの変化による影響を受ける可能性があります。DNAのメチル化状態を評価することにより、遺伝子発現変化の制御ドライバーの詳細を知ることが可能となり、癌の進行または治療効果の予想に利用できるバイオマーカー候補の発見につながります。

イルミナのInfiniumアッセイでは、メチル化部位を一塩基の解像度で定量的に解析することができます。HumanMethylation450 BeadChipは、専門家により選択された包括的なカバレッジで、RefSeq遺伝子の99%、CpGアイランドの96%、およびその他のカテゴリーを対象としています。これらのコンテンツは癌研究者を含むメチル化の専門家コンソーシアムにより選択され、充実したコンテンツ、高解像度シーケンススペースのメチル化解析により、研究者はメチル化ゲノムを直接解析することができるようになりました。これによりメチル化のパターンを同定かつ追跡することが可能で、メチル化の特性の変異を一塩基の解像度で検出することができます。数多くの異なるアプローチが確立されていますので、異なるタイプの研究デザインそれぞれに適した、特徴ある利点が提供されます。イルミナのシーケンスシステムを利用したメチル化解析の最新の文献に関しては、イルミナのウェブサイト（<http://www.illumina.com/science/publications-list.ilmn>）をご参照ください。

構造変異検出

多くのタイプの癌が、疾患の病因および予後に関する情報を与える多くの構造的変化（コピー数変異、逆位など）を示すことから、これらの変化を正確かつ効率的に同定する技術を利用することは極めて重要です。イルミナでは、全体的な染色体変化を同定するために、アレイベースおよびシーケンスベースのアプローチをお届けしています。

コピー数変異（CNV）

従来、研究者は欠失、転移および逆位などの染色体異常のプロファイルを解析するために、細胞遺伝学的解析法を使用してきました。イルミナのBeadChipは2005年以来幅広く使用されてきており、関連解析およびコピー数検出のためにゲノムの最大カバレッジを可能とするマーカーを取り入れてきました。イルミナのOmniおよびHumanCoreシリーズ、HumanCytoSNP-12 BeadChipはCNV検出に理想的で、イルミナのGenomeStudioソフトウェアを使用することにより最高120万のマーカーの可視化が容易に行えます。またカスタム化が可能なiSelect BeadChipでは、1サンプルあたり3,072~100万のマーカーのジェノタイプングパネルを設計でき、マーカーの総数に応じて数種類の複数サンプルフォーマットでご提供しています。

遺伝子の増幅および欠失は、腫瘍の進行および薬剤耐性を引き起こす可能性があるため、CNVを迅速に同定することのできる次世代シーケンサーのスピードは非常に重要です。近日リリース予定のイルミナの解析ソフトウェアは、シーケンスデータからCNV情報を迅速に可視化することを可能とします。

構造的変異

標準的なイルミナのDNAシーケンス（比較的短いDNA断片）により染色体再配列を検出することが可能ですが、大きなDNA断片のシーケンスは、構造的変異の切断点を含む確率がより高いため、より効率的です。Nextera Mate Pair サンプル調製キットは、構造的変異を検出するために特別にデザインされたキットです。DNAは比較的大きな範囲で断片化し、ビオチン化アダプターを使いタグづけします（タグメンテーション）。これらの断片は、環状化された後、再びさらに断片化され、ビオチンジャンクションが引き出されます。これらのジャンクションをシーケンスすることにより、大きなDNA断片の各末端に特有なシーケンス情報が供給され、染色体再配列の迅速な同定ができます。このキットを使うことで構造的変異および染色体切断の最も包括的な評価を行うことができます。

要約

2003年に初めてBeadChipを導入し、2007年にイルミナ初のシーケンスシステムを発売して以来、イルミナの技術は常に癌研究をサポートしてきました。今日、イルミナの技術は、多くの研究者に使われており、包括的全ゲノム研究、ターゲット遺伝子プロファイリング、遺伝子発現、およびエピジェネティック研究を目覚しい速度で進めています。イルミナのHiSeq、MiSeq、HiScanおよびiScanプラットフォームにより得られるデータを統合することにより、癌生物学に関する理解が深まり、診断法開発の加速および癌治療に革新をもたらす新たな治療アプローチへの可能性が広がります。

参考文献

1. <http://www.nature.com/icogs/>
2. <https://sites.google.com/site/strelkasomaticvariantcaller/>
3. Chapman M. A., Lawrence M. S., Keats J. J., Cibulskis K., Sougnez C., et al. (2011) Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* 471: 467-472
4. Holbrook J. D., Parker J. S., Gallagher K. T., Halsey W. S., Hughes A. M., et al. (2011) Deep sequencing of gastric carcinoma reveals somatic mutations relevant to personalized medicine. *J Transl Med* 9: 119
5. Govindan R., Ding L., Griffith M., Subramanian J., Dees N. D., et al. (2012) Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell* 150: 1121-1134.
6. Meltzer PS (2005) Cancer genomics: Small RNAs with big impacts. *Nature* 435: 745-746.

