

# 最新技術のがん遺伝子パネル TruSight™ Oncology 500について

オンコロジースペシャリスト  
北野 敦史



2019年9月

# TruSight™ Oncology 500

1. TSO 500 仕様
2. 主要ガイドラインに対応した項目
3. FFPE への対応
4. エクソーム解析に近い TMB の算出
5. RNAから融合遺伝子を検出

# TruSight™ Oncology 500

1. TSO 500 仕様
2. 主要ガイドラインに対応した項目
3. FFPE への対応
4. エクソーム解析に近い TMB の算出
5. RNAから融合遺伝子を検出

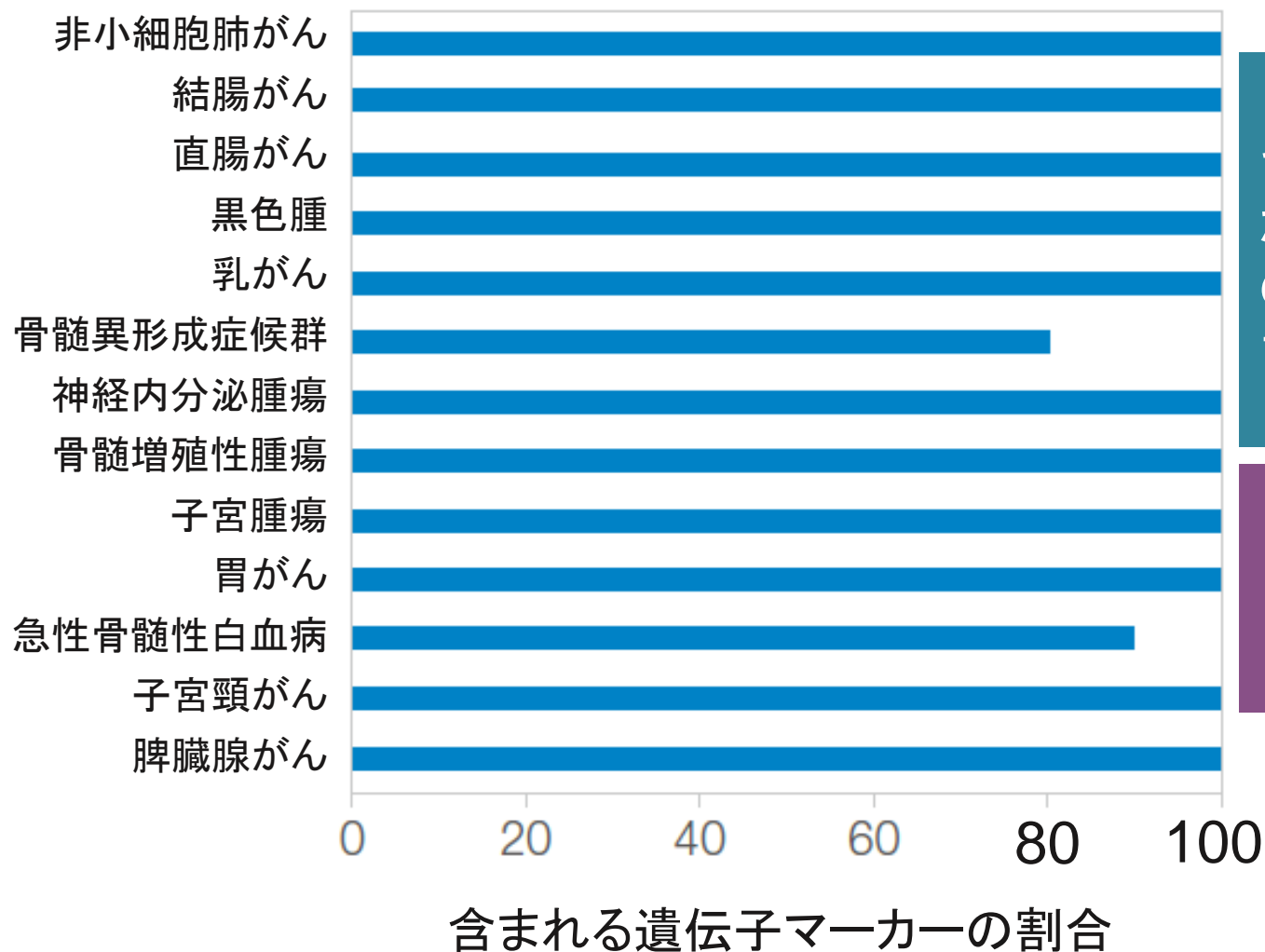
# TruSight™ Oncology 500 (TSO 500) : スペック

コンテンツ	DNA 1.95 Mb / 523 遺伝子 RNA 358 Kb / 55 遺伝子
アッセイ	キャプチャー法 (TruSight Oncology) 分子バーコード(UMIs)
パフォーマンス	5% LOD : DNA 変異 解析感度 >96% (5% VAF でのすべてのバリエントタイプに対して)
インプット量	40 ng DNA, 40 ng RNA (厚さ10 µm、FFPE 切片5枚), Tumor のみ
変異	DNA : SNVs, indels, CNV (対応予定), TMB, MSI RNA : 融合遺伝子 と スプライスバリエント
インフォマティクス	BaseSpace® Sequence Hub Local App (Linux)
スループット	8 症例 (8 DNA & 8 RNA ライブラリー) / NextSeq™ ラン (24Hrs)
合計アッセイ時間	核酸からバリエントレポートまで、3-4 日間
システム	NextSeq , NextSeq 550Dx, NovaSeq (対応予定)

# TruSight™ 500

1. TSO 500 仕様
2. 主要ガイドラインに対応した項目
3. FFPE への対応
4. エクソーム解析に近い TMB の算出
5. RNAから融合遺伝子を検出

# TruSight™ Oncology 500 : 主要ガイドラインのバイオマーカーに対応する、523遺伝子に及ぶラーズパネル



それぞれのがん種について、最新の米国がんネットワーク (NCCN) ガイドラインの遺伝子マーカーが、TS0500 パネルに含まれている割合

米国 1,233 臨床試験をカバーする項目

含まれる遺伝子マーカーの割合

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

illumina®

# TruSight™ Oncology 500 : 項目

## DNA 523 遺伝子

## RNA 55 遺伝子

### Small Variants

• ABL1	• CDKN1A	• ERRF1	• ETV1	• HGF	• KAT6A	• NFE2L2	• PPP6C	• SHQ1	• TOP2A
• ABL2	• CDKN1B	• ETS1	• ETV4	• HIST1H1C	• KDM5A	• NFKBIA	• PRDM1	• SLIT2	• TP63
• ACVR1	• CDKN2B	• ETV1	• ETV5	• HIST1H2BD	• KDM5C	• NKX2-1	• PREX2	• SMAD2	• TRAF2
• ACVR1B	• CDKN2C	• ETV4	• ETV6	• HIST1H3A	• KDM6A	• NKX3-1	• PRKAR1A	• SMAD3	• TRAF7
• ALOX12B	• CENPA	• ETV5	• EWSR1	• HIST1H3B	• KEAP1	• NOTCH4	• PRKCI	• SMARCA4	• TSHR
• ANKRD11	• CHD2	• ETV6	• FAM123B	• HIST1H3C	• KEL	• NSD1	• PRKDC	• SMARCD1	• U2AF1
• ANKRD26	• CHD4	• EWSR1	• FAM46C	• HIST1H3D	• KIF5B	• NTRK1	• PRSS8	• SMC1A	• VEGFA
• ARAF	• CIC	• FAM123B	• FANCA	• HIST1H3E	• KLF4	• NTRK2	• PTPRD	• SMC3	• VTCN1
• ARFRP1	• CRKL	• FAM46C	• FANCC	• HIST1H3F	• KLHL6	• NTRK3	• PTPRS	• SNCAIP	• WISP3
• ARID1B	• CRLF2	• FANCA	• FANCD2	• HIST1H3G	• KMT2B	• NUP93	• PTPRT	• SOCS1	• WT1
• ARID2	• CSF3R	• FANCC	• FANCE	• HIST1H3H	• KMT2C	• NUTM1	• QKI	• SOX10	• XIAP
• ARID5B	• CSNK1A1	• FANCD2	• FANCF	• HIST1H3I	• KMT2D	• PAK1	• RAB35	• SOX17	• XPO1
• ASXL1	• CTCF	• FANCE	• FANCG	• HIST1H3J	• LAMP1	• PAK3	• RAC1	• SOX2	• YAP1
• ASXL2	• CTLA4	• FANCF	• FAS	• HIST2H3A	• LATS1	• PAK7	• RAD21	• SOX9	• YES1
• ATRX	• CTNNA1	• FANCG	• FAT1	• HIST2H3C	• LATS2	• PARK2	• RAD50	• SPEN	• ZBTB2
• AURKA	• CUL3	• FAS	• FGF19	• HIST2H3D	• LMO1	• PARP1	• RAD52	• SPOP	• ZBTB7A
• AURKB	• CUX1	• FAT1	• FH	• HIST3H3	• LRP1B	• PAX3	• RAF1	• SPTA1	• ZFHX3
• AXIN1	• CXCR4	• FGF19	• FLCN	• HLA-A	• LYN	• PAX5	• RANBP2	• SRSF2	• ZNF217
• AXIN2	• CYLD	• FH	• FLI1	• HLA-B	• LZTR1	• PAX7	• RARA	• STAG1	• ZNF703
• AXL	• DAXX	• FLCN	• FLT4	• HLA-C	• MAGI2	• PAX8	• RASA1	• STAG2	• ZRSR2
• B2M	• DCUN1D1	• FLI1	• FOXA1	• HNRNPK	• MALT1	• PBRM1	• RAS1	• STAG3	
• BBC3	• DDX41	• FLT4	• FOXO1	• HOXB13	• MAP2K4	• PDCD1	• RBM10	• STAT4	
• BCL10	• DHX15	• FOXA1	• FOXO1	• HSD3B1	• MAP3K1	• PDCD1LG2	• RECQL4	• STAT5A	
• BCL2L1	• DICER1	• FOXO1	• FOXO1	• HSP90AA1	• MAP3K13	• PDK1	• REL	• STAT5B	
• BCL2L11	• DIS3	• FOXP1	• FOXO1	• ICOSLG	• MAP3K14	• PDPK1	• RHEB	• STK40	
• BCL2L2	• DNAJB1	• FRS2	• FRS2	• ID3	• MAP3K4	• PGR	• RHOA	• SUFU	
• BCOR	• DNMT1	• FUBP1	• FUBP1	• IFNGR1	• MAPK1	• PHF6	• RIT1	• SUZ12	
• BCORL1	• DNMT3B	• FYN	• FYN	• IGF1	• MAPK3	• PHOX2B	• RNF43	• SYK	
• BCR	• DOT1L	• GABRA6	• GATA1	• IGF1R	• MAX	• RPS6KA4	• RPS6KA4	• TAF1	
• BIRC3	• E2F3	• GATA1	• GATA2	• IGF2	• MDC1	• RPS6KB2	• RPTOR	• TBX3	
• BLM	• EED	• GATA2	• GATA3	• IKBKE	• MED12	• RPS6KB2	• RUNX1	• TCEB1	
• BMPR1A	• EGFL7	• GATA3	• GATA4	• IKZF1	• MEF2B	• RPS6KB2	• RUNX1T1	• TCF3	
• BRD4	• EIF1AX	• GATA4	• GATA6	• IL10	• MEN1	• PIK3R2	• RYBP	• TCF7L2	
• BTG1	• EIF4A2	• GATA4	• GATA6	• IL7R	• MGA	• PIK3R3	• SDHA	• TERC	
• C11orf30	• EIF4E	• GID4	• GID4	• INHA	• MITF	• PIM1	• SDHAF2	• TET1	
• CALR	• EML4	• GLI1	• GNA13	• INHBA	• MST1	• PLCG2	• SDHB	• TFE3	
• CASP8	• EPCAM	• GNA13	• GPR124	• INPP4A	• MST1R	• PMAIP1	• SDHC	• TFRC	
• CBFB	• EPHA3	• EPHA7	• GPS2	• INSR	• MYB	• PMS1	• SDHD	• TGFB1	
• CBL	• EPHA5	• EPHB1	• GRM3	• IRF2	• MYOD1	• PNRC1	• SETBP1	• TMEM127	
• CD274	• EPHA7	• ERCC3	• GRM3	• IRF4	• NAB2	• POLD1	• SETD2	• TMEM127	
• CD276	• EPHB1	• ERCC4	• GSK3B	• IRS1	• NCOA3	• POLE	• SF3B1	• TMPRSS2	
• CD74	• ERCC3	• ERCC5	• H3F3A	• IRS2	• NCOR1	• PPARG	• SH2B3	• TNFAIP3	
• CDC73	• ERCC4	• ERRF1	• H3F3B	• JAK1	• NEGR1	• PPM1D	• SH2B3	• TNFRSF14	
• CDK8	• ERCC5	• ETS1	• H3F3C	• JUN	• NF2	• PPP2R1A	• SH2D1A	• TOP1	

### Fusions + Splice Variants

• ABL1	• NOTCH3
• AKT3	• NRG1
• ALK	• NTRK1
• AR	• NTRK2
• AXL	• NTRK3
• BCL2	• PAX3
• BRAF	• PAX7
• BRCA1	• PDGFRA
• BRCA2	• PDGFRB
• CDK4	• PIK3CA
• CSF1R	• PPARG
• EGFR	• RAF1
• EML4	• RET
• ERBB2	• ROS1
• ERG	• RPS6KB1
• ESR1	• TMPRSS2
• ETS1	
• ETV1	
• ETV4	
• ETV5	
• EWSR1	
• FGFR1	
• FGFR2	
• FGFR3	
• FGFR4	
• FLI1	
• FLT1	
• FLT3	
• JAK2	
• KDR	
• KIF5B	
• KIT	
• KMT2A (MLL)	
• MET	
• MLLT3	
• MSH2	
• MYC	
• NOTCH1	
• NOTCH2	

製品の使用目的は研究に限定されます。

# TruSight™ Oncology 500

1. TSO 500 仕様
2. 主要ガイドラインに対応した項目
3. **FFPE への対応**
4. エクソーム解析に近い TMB の算出
5. RNAから融合遺伝子を検出



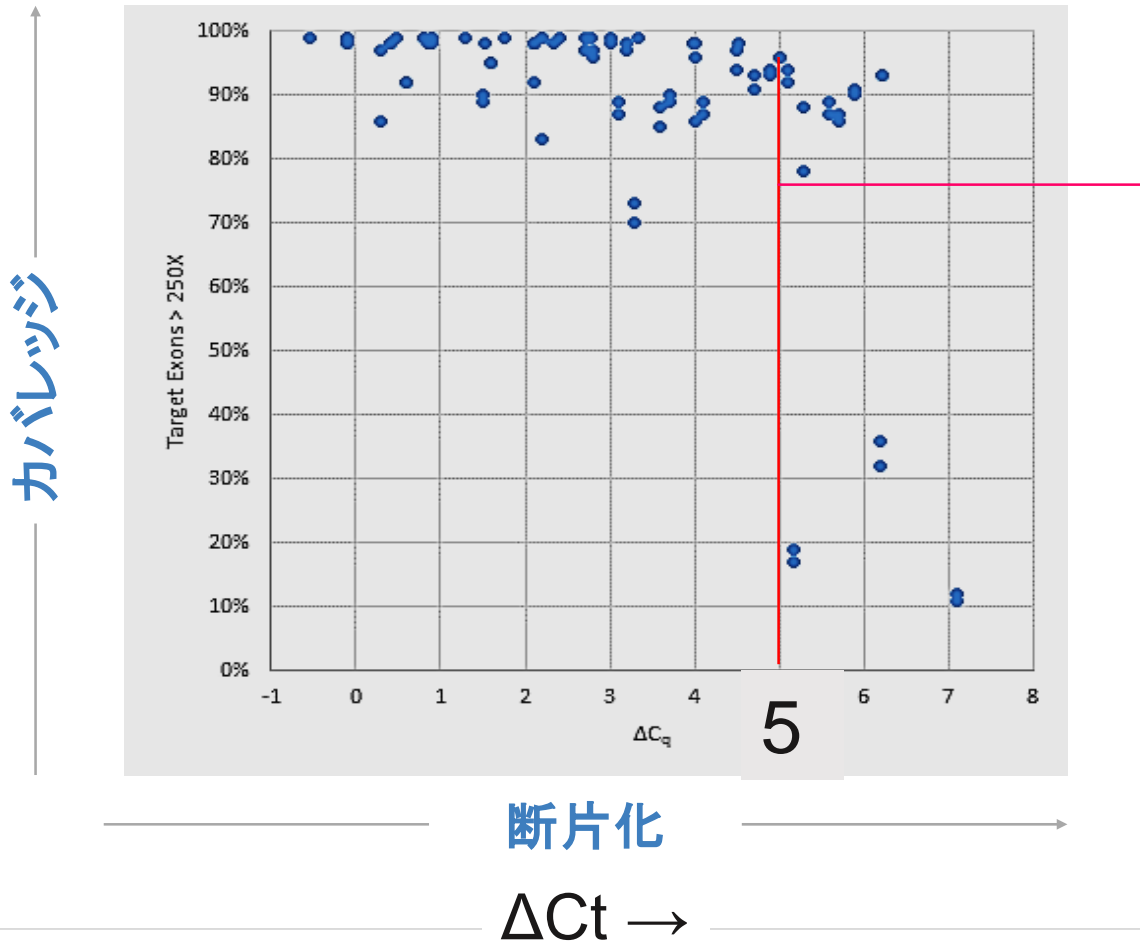
# FFPE (ホルマリン固定パラフィン包埋) サンプルの困難

## I. 核酸の断片化

## II. FFPE による偽陽性変異

# TruSight™ Oncology 500 : DNA断片化を許容するケミストリー

## Example Data



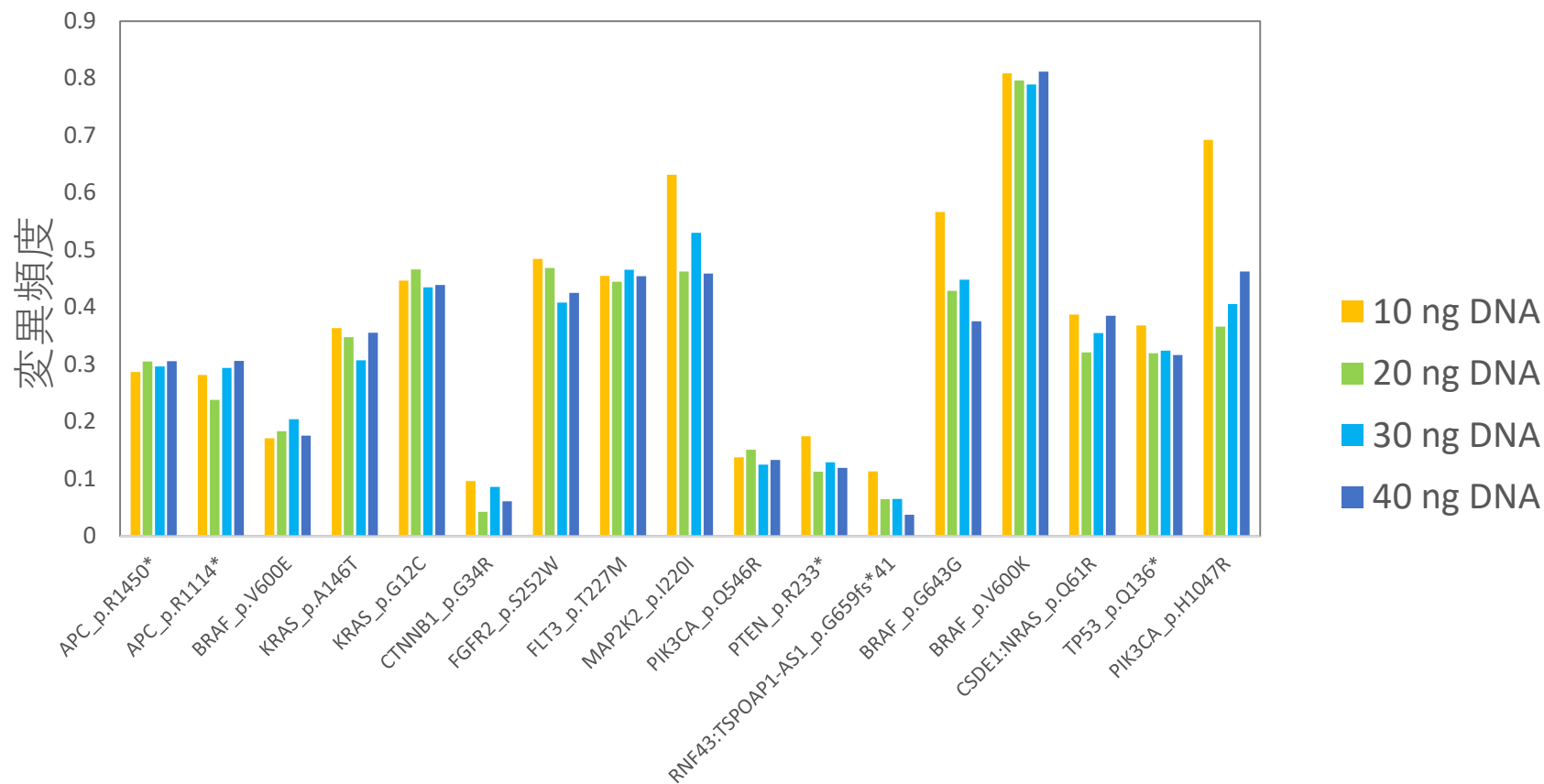
キャプチャー法とデザインアルゴリズムにより、断片化が進んだDNA でもカバレッジの減少が少ない (ΔCt 5まで、フラグメント <100bp)

Illumina data on file, 2018

# TruSight™ Oncology 500 : FFPEからの微量DNAに対応

推奨インプット量  
以下のFFPE DNAで  
のバリエーションコール  
40~10 ng インプット  
DNAでの腫瘍サンプ  
ルからのバリエーション  
コール頻度

推奨 40ng はマー  
ジンを取った推奨量

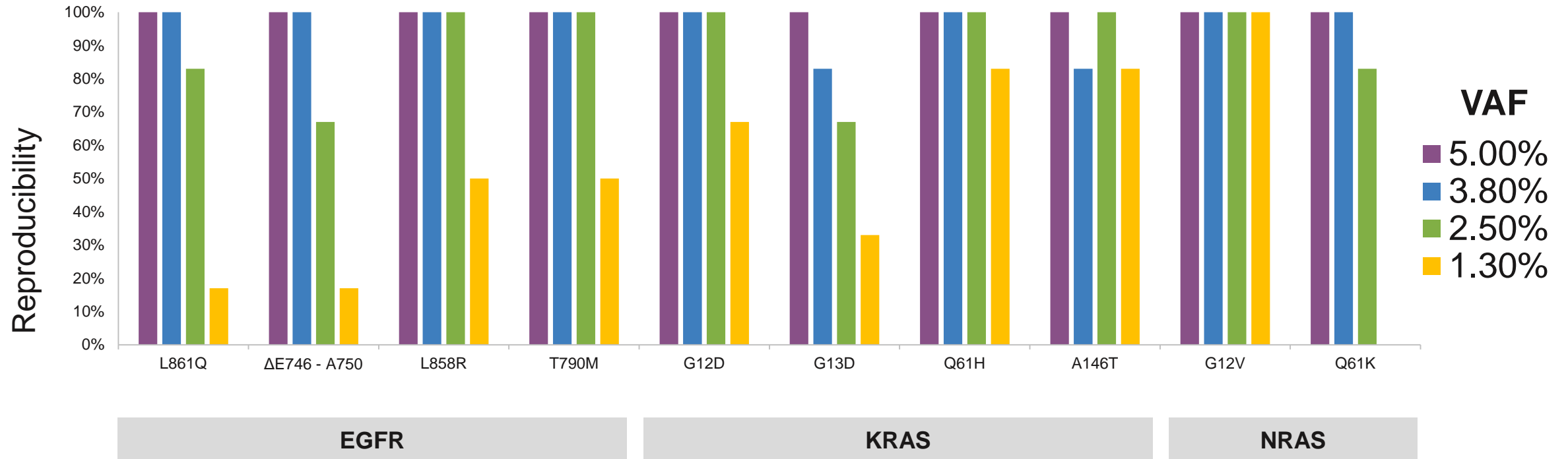


\* denotes stop codons

インプット量の異なるFFPE腫瘍サンプル

Illumina data on file, 2019

# TruSight™ Oncology 500 : 低変異頻度の検出



既知の変異頻度を有するFFPE細胞株サンプルを、1.30 – 5.00% 変異頻度に希釈した。  
 各サンプルの6 リプリケートを、40ngのDNA 量を用いてTSO500 にて分析した  
 → 頻度 5% 以下でも、高いポジティブコールレート

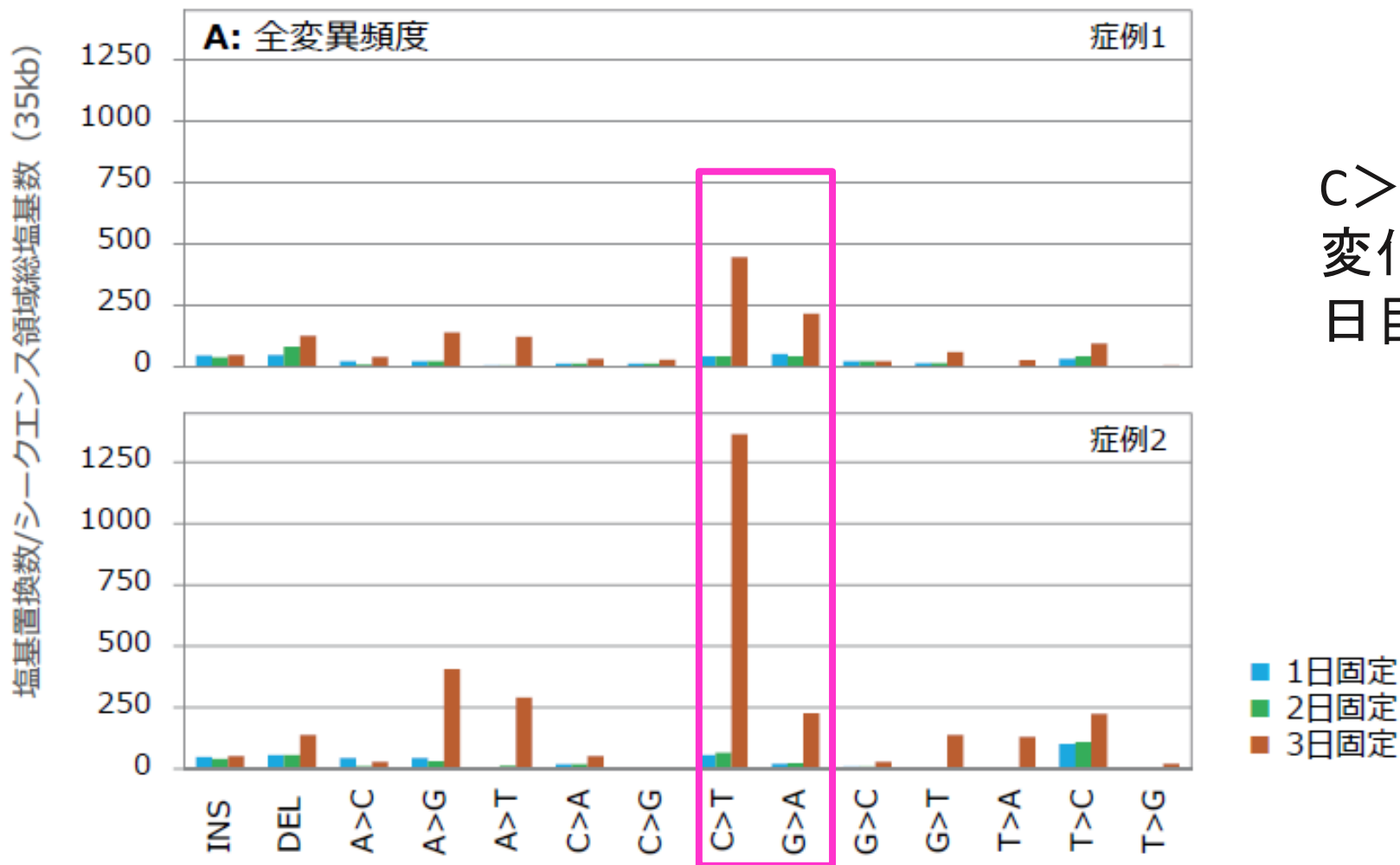
# FFPE (ホルマリン固定パラフィン包埋) サンプルの困難

## I. 核酸の断片化

## II. FFPE による偽陽性変異

# FFPE による偽陽性変異

ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程 実証データ⑤ より



C>T 置換, G>A置換, などの塩基変化数の増加が, ホルマリン固定3日目から急速に顕著になった

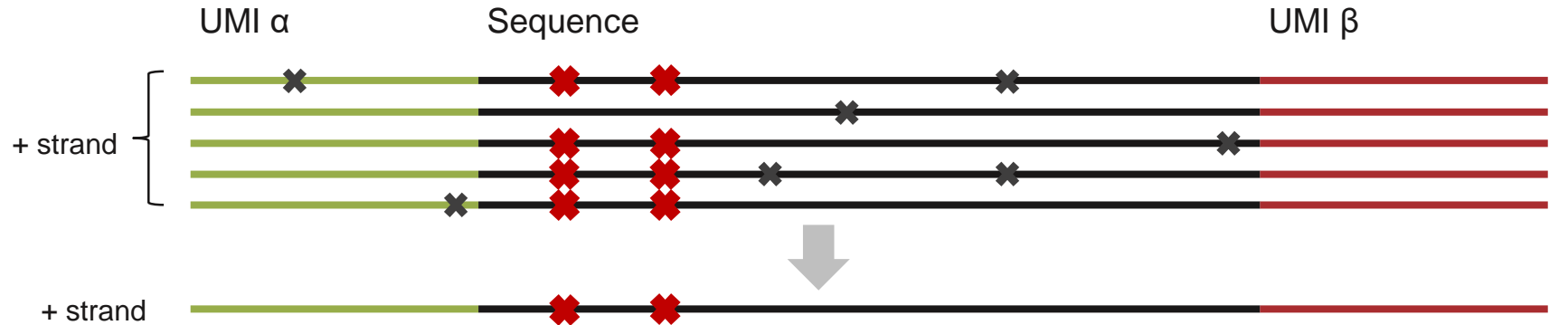
# TruSight™ Oncology 500 : Dual UMI

(Unique Molecular Identifiers, 分子バーコード)



## ファミリー単位のエラー除去:

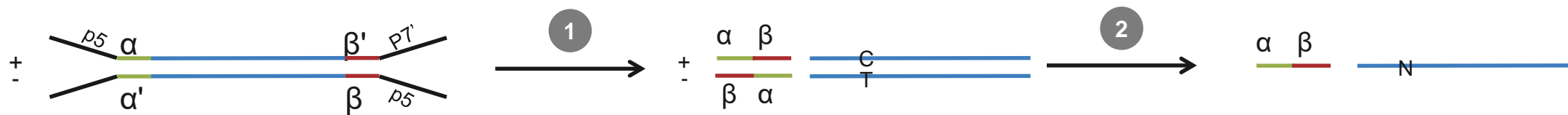
同じ位置にマップされ同じUMIを持つリードは、同じファミリーとしてまとめられる。不一致はPCRエラーであり、除去される



1

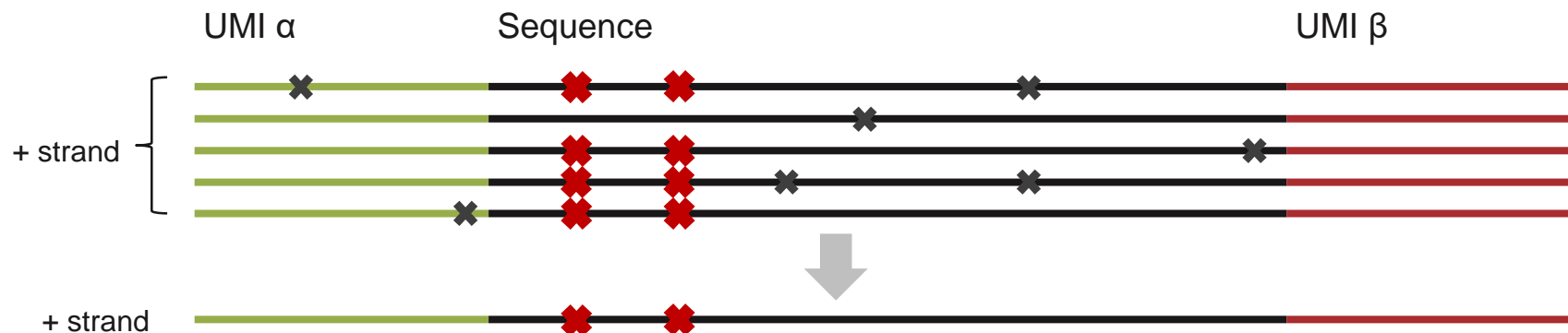
# TruSight™ Oncology 500 : Dual UMI

(Unique Molecular Identifiers, 分子バーコード)



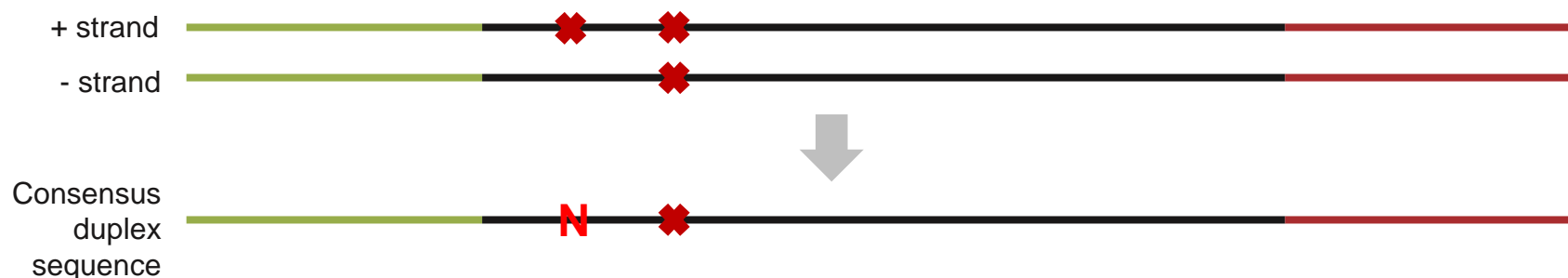
## ファミリー単位のエラー除去:

同じ位置にマップされ同じUMIを持つリードは、同じファミリーとしてまとめられる。不一致はPCRエラーであり、除去される



## ストランド間のエラー除去

同じファミリーをまとめた後、プラスとマイナスストランド間で不一致があれば、除去される。ホルマリン固定による脱アミノ化や酸化によるエラーも、除去される



製品の使用目的は研究に限定されます。





# TruSight™ Oncology 500 : 専用アルゴリズム—Variant Filtering

## 脱アミノ化や酸化によるエラーを減少

バリエーションタイプ	Baseline Only	Baseline+ Dynamic cutoff
C->A	26	0
G->T	37	0
C->G	17	0
G->C	18	0
C->T	<b>419</b>	0
G->A	<b>364</b>	<b>2</b>
T->A	19	0
A->T	21	0
T->C	86	0
A->G	63	0
T->G	19	0
A->C	27	0
Indel	4	0
MNV	56	0

### バリエーションタイプごとの擬陽性の減少

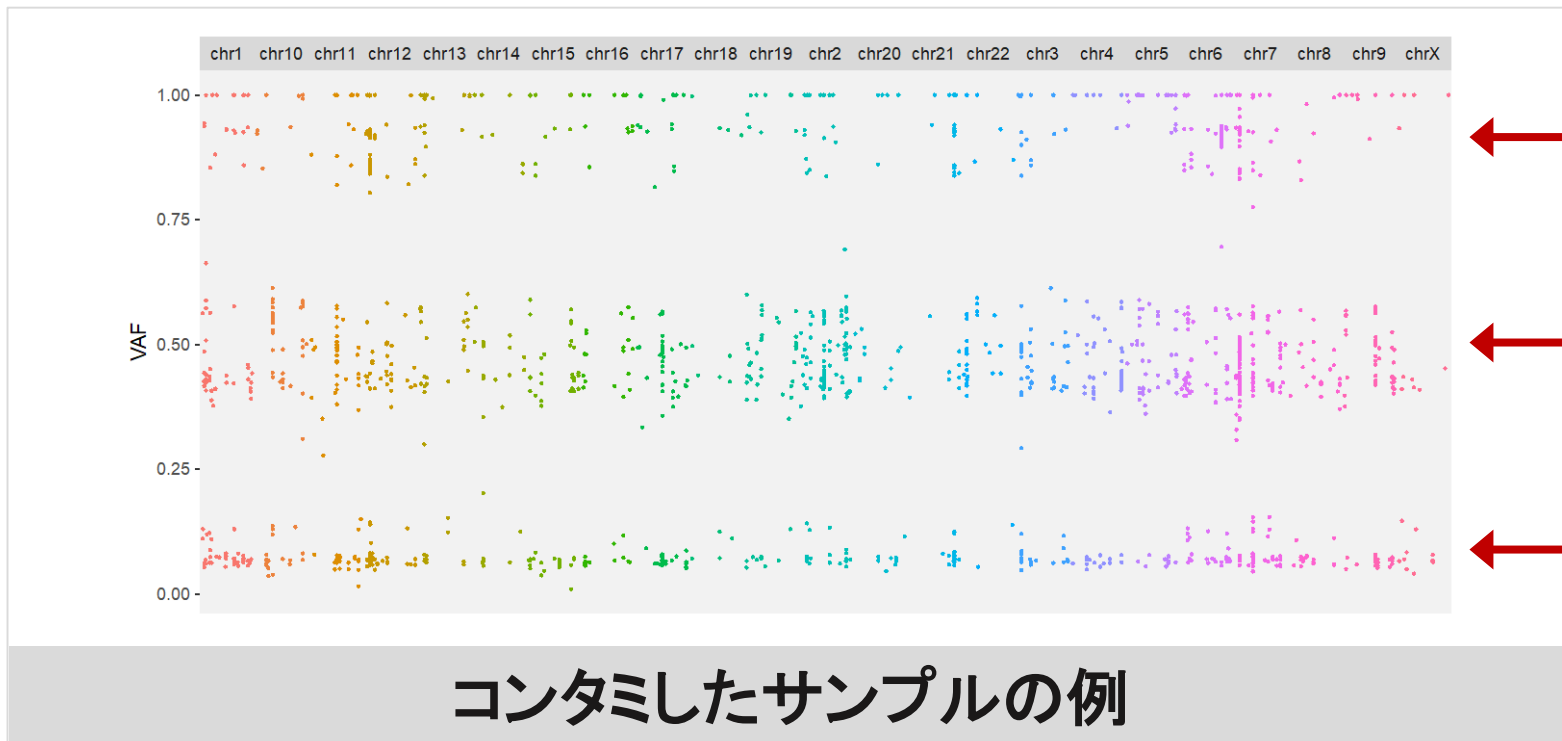
UMI と専用アルゴリズムにより、  
FFPE の擬陽性を減少

# TruSight™ Oncology 500 : DNA コンタミ検出 アルゴリズムによるクロスコンタミの検出

2000 以上のコモンSNPs  
をモニター

1 – 2% までのコンタミ  
を検出

クロスコンタミの検出精度  
98%



全体的に、モニターし  
ているSNPの頻度が、  
0%, 50%, 100% から  
外れている

# TruSight™ Oncology 500

1. TSO 500 仕様
2. 主要ガイドラインに対応した項目
3. FFPE への対応
4. エクソーム解析に近い TMB の算出
5. RNAから融合遺伝子を検出

# 精度の高いTMB結果を得るには？

TMB：ターゲット領域全体の塩基の長さで検出された変異 (SNV, InDel) の数を100万塩基あたり (/ Mb) で表記した値

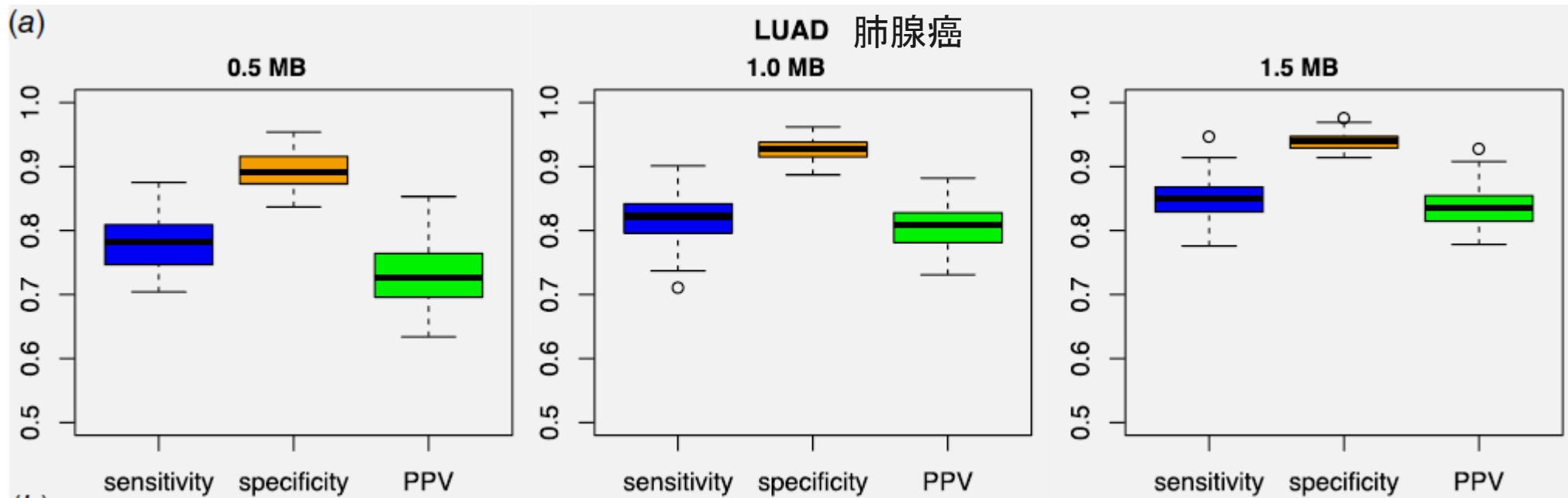
ワイドな測定領域

➡ ラージパネル、WES がゴールドスタンダード

精度の高い変異コール

➡ エラーの除去、Dual UMIs

# 精度の高いTMB スコア



← パネルサイズ

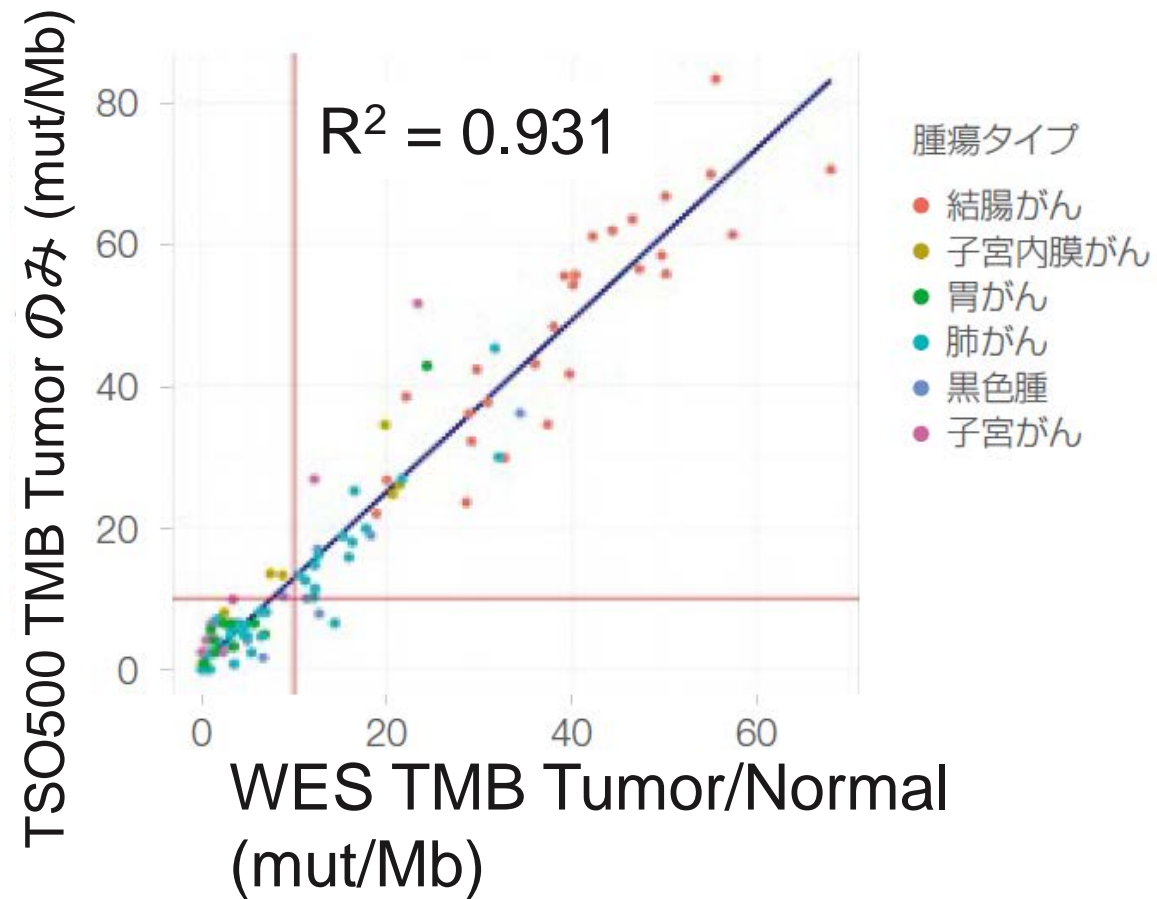
文献2

最近の報告で、1.5 Mb以上のコーディング領域を標的とすることによりTMBを正確に計算できることが示されている<sup>2</sup>  
パネルが大きいくほど感度、特異度、陽性的中率が高くなり、WESとの相関が高くなることが示されている。<sup>1,2</sup>  
(TS0500 は、1.95 Mb)

1. Chalmers et al, *Genome Medicine* 2017 9:34;

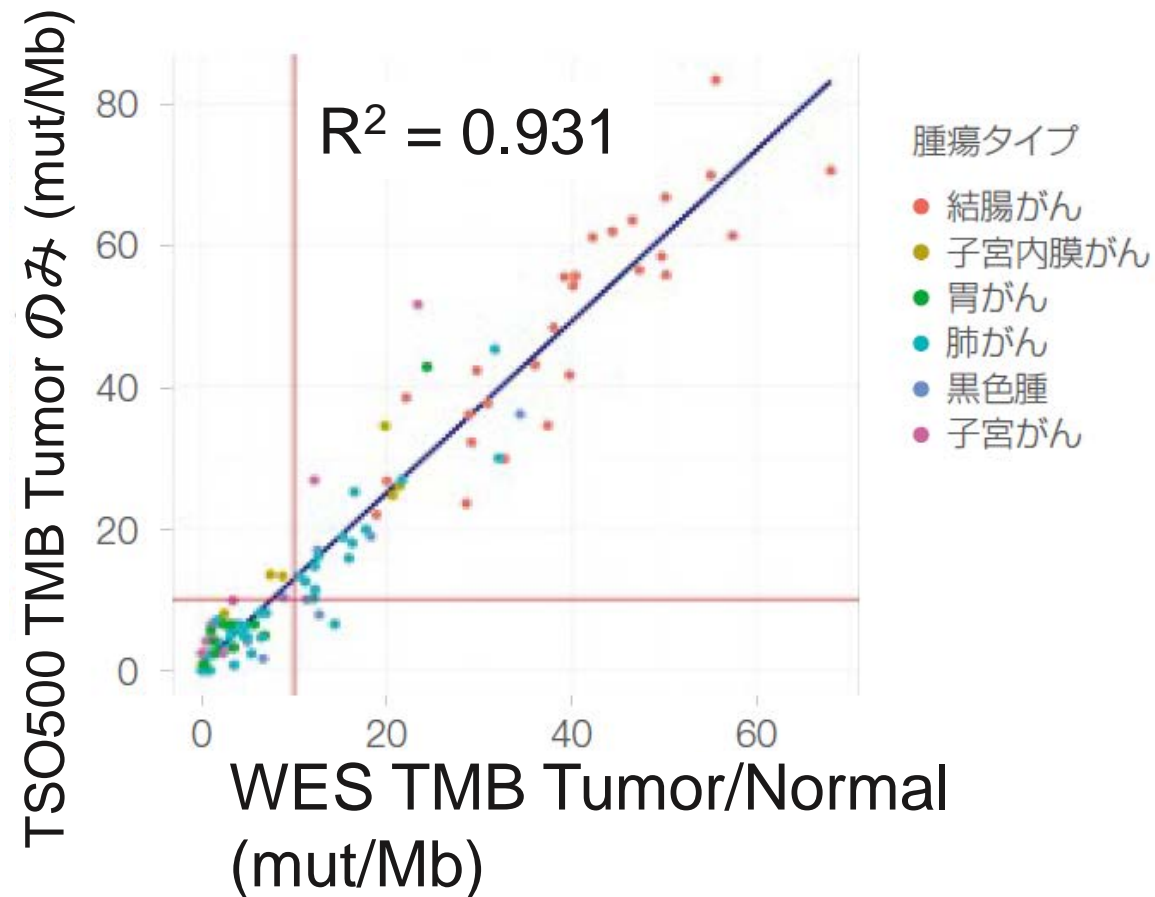
2. Buchhalter et al., *Int J Cancer*. 2018 Sep 21. doi: 10.1002/ijc.31878.

# TruSight™ Oncology 500 : 高精度のTMB スコア



TMB の結果は、2つのアッセイ間で高い相関関係を示した。

# TruSight™ Oncology 500 : 高精度のTMB スコア



TMBの結果は、2つのアッセイ間で高い相関関係を示した。

## WES とTSO500 のTMB 分類との一致指標値

	10 mutation/Mb cutoff
陽性一致率	94.7%
陰性一致率	96.1%
全体一致率	95.4%

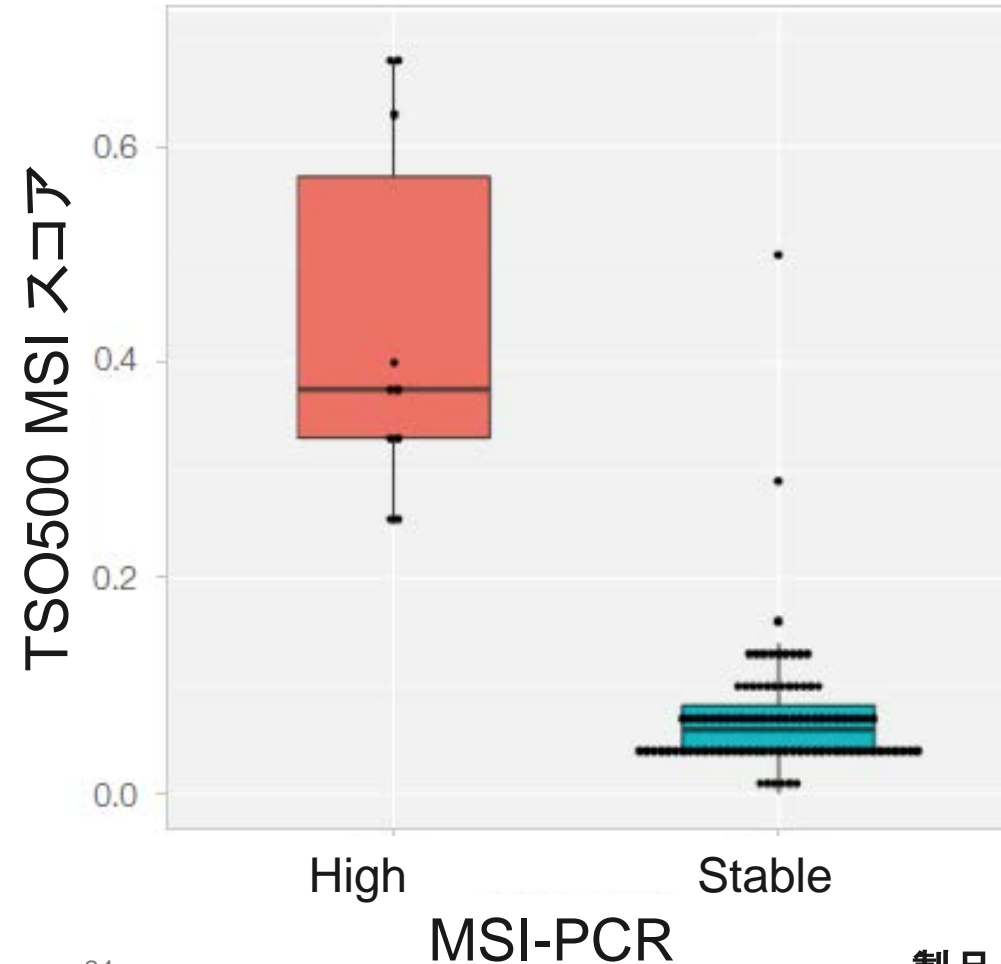
	WES T/N TMB High	WES T/N TMB Low
TSO500 TMB High	54	3
TSO500 TMB Low	2	49

Illumina data on file, 2018

illumina®

# TruSight™ Oncology 500 : MSI (Microsatellite Instability) 検出

## Tumor のみによる MSI 検出



- 100+ FFPE をテスト：結腸、胃、肺、黒色腫、子宮
- MSI PCR アッセイと比較した
- Illumina アルゴリズムは、イントロン領域の **130 homopolymers** を使用して検出している
- 98% 精度

Illumina data on file, 2018



# TruSight™ Oncology 500

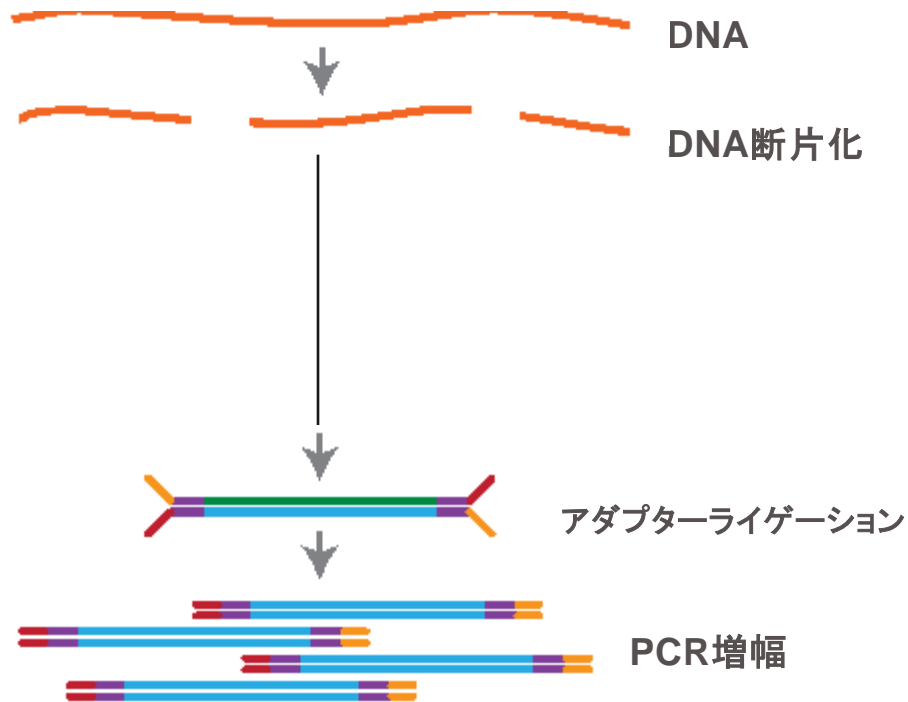
1. TSO 500 仕様
2. 主要ガイドラインに対応した項目
3. FFPE への対応
4. エクソーム解析に近い TMB の算出
5. RNAから融合遺伝子を検出

# TruSight™ Oncology 500 : ライブラリー調製ワークフロー

DNA と RNAを並行して調製

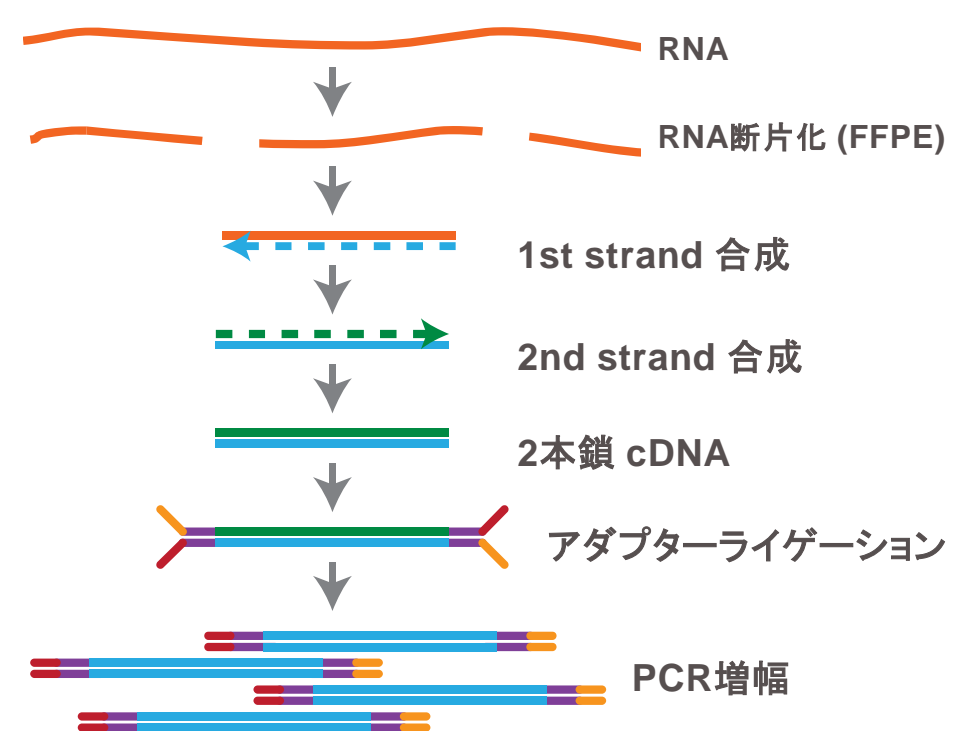
## DNAライブラリー調製

40 ng FFPE DNA



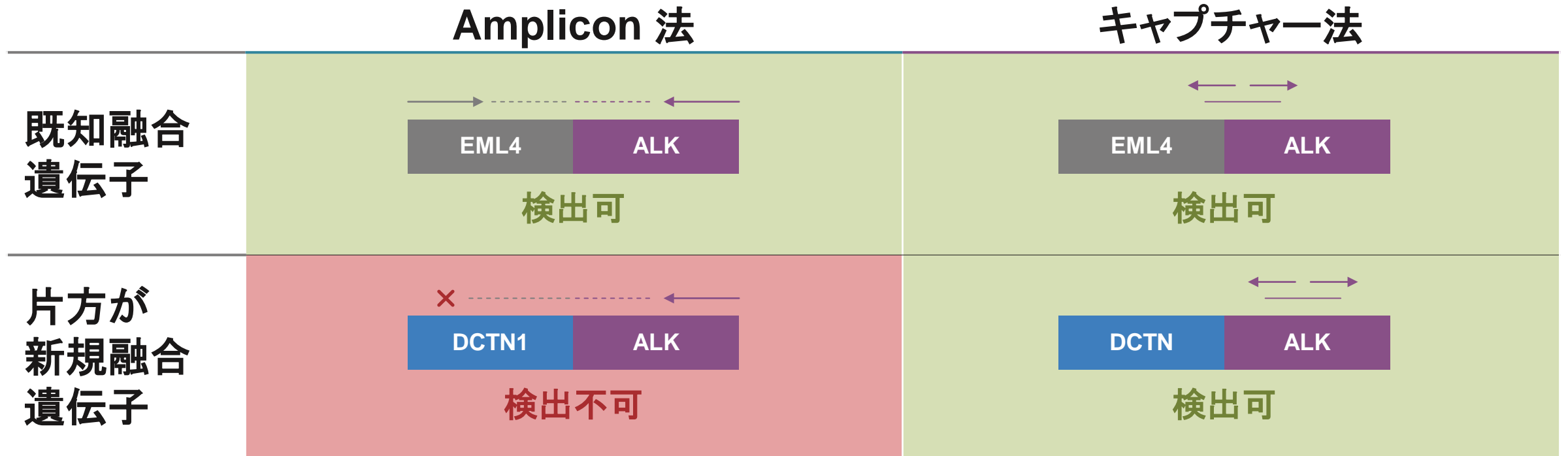
## RNAライブラリー調製

40 ng FFPE RNA



# TruSight™ Oncology 500 : 新規融合遺伝子の検出\*

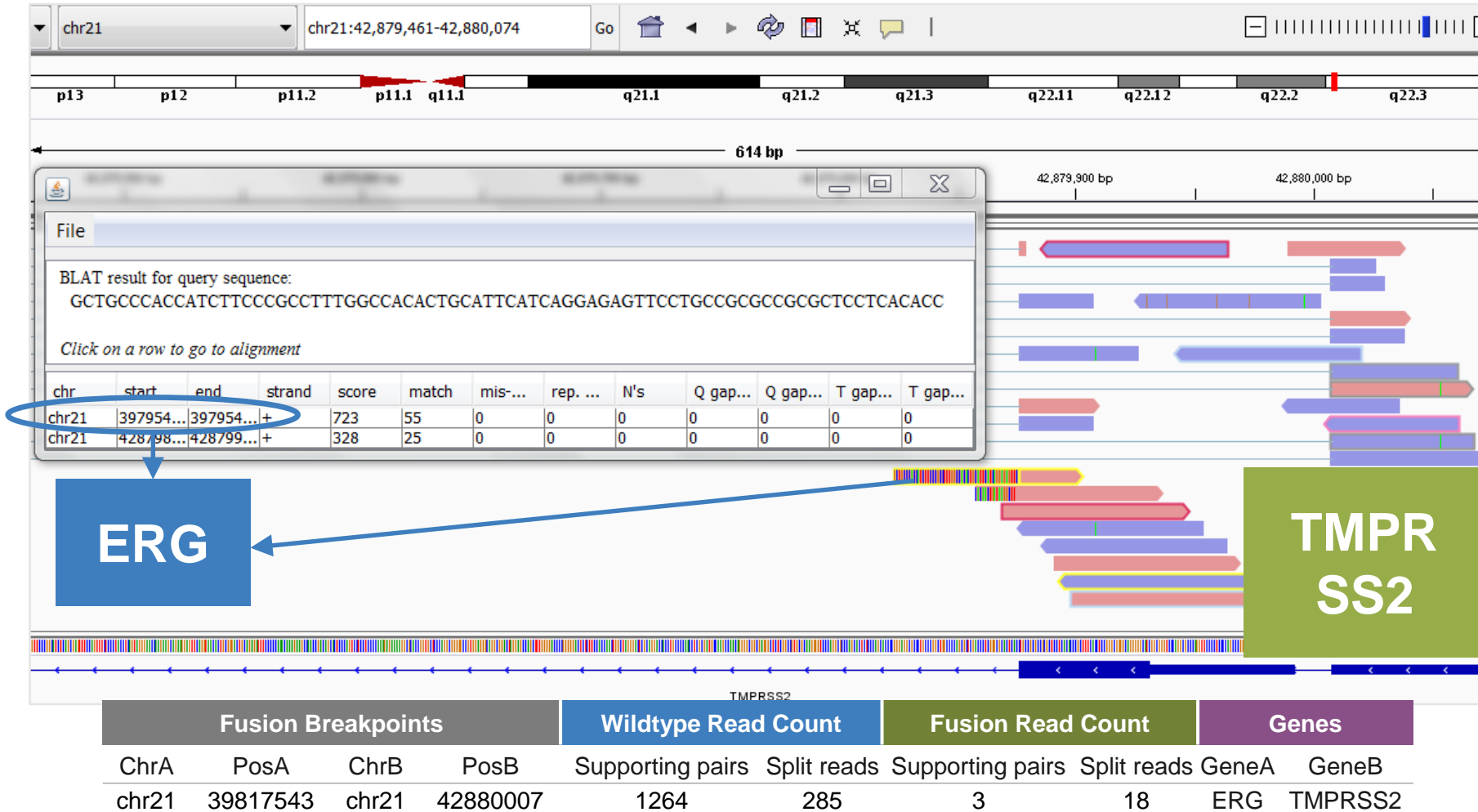
## キャプチャー法とプローブデザインアルゴリズム



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5624911/>

\* The products to evaluate DNA + RNA variants are the TSO500 DNA+ TST170 RNA bundle (PN: 20028215 / 20028216) – commercially available in Q1 -2019

# TruSight™ Oncology 500 : 新規融合ペアも検出 キャプチャーテクノロジーが実現



← パネル  
に含まれて  
いない

\* Internal development study. Data on file. Illumina, Inc. August 2016.

# TruSight™ Oncology 500 : Companion Diagnostic 開発

## CDx (開発中)

Loxo to expand oncology menu  
for NextSeq™ 550Dx



illumina と Loxo Oncology、次世代シーケンサーベースのPan-Cancer型コンパニオン診断薬を共同開発へ

2018年4月10日 – (BUSINESS WIRE) – カルフォルニア州サンディエゴillumina, Inc. (NASDAQ : ILMN) とコネチカット州スタンフォードLoxo Oncology (NASDAQ : LOXO) は、網羅的に腫瘍を調べるNGSベースのコンパニオン診断薬がもたらす広範な腫瘍プロファイリングを行うマルチ遺伝子パネルの開発およびキットによる製品化するためのグローバル戦略契約を締結したことを本日発表しました。この共同開発契約は、癌種をまたいで、Loxo Oncology社のNTRK融合遺伝子を標的としたlarotrectinib およびRET遺伝子変異を標的としたLOXO-292におけるコンパニオン診断薬 (CDx) としてTruSight Tumor 170 の薬事承認を取得することを目的としています。

(ラトロレクチニブ)

# TruSight™ Oncology 500 : まとめ

1. TSO500 のDual UMI と専用アルゴリズムは、FFPE に由来するノイズなどを削減し、正確なTMB スコアを算出する
2. ドライバー変異の検出にRNAseq による融合遺伝子やスプライシングバリエーションの検出は重要であり、TSO500 はDNA とRNA を同時にシーケンスするプロトコルが用意されている

ご清聴ありがとうございました