illumina®

TruSight ™ Myeloid Sequencing Panel

専門家が選定したコンテンツと次世代シーケンサーテクノロジーにより
コスト効率よく血液悪性腫瘍における体細胞変異を同定

特長

- **専門家が選定したコンテンツ**
  血液悪性腫瘍において高頻度変異が見られる 54 遺伝子を著名な専門家のコンソーシアムがデザイン
- **効率的かつ包括的な手法**
  ライブラリー調製、シーケンス、データ解析、データアノテーションを含むシングルワークフロー
- **コスト効果が高く、時間効率のよいソリューション**
  シングル遺伝子アッセイとほぼ同程度のコストで同時に複数の遺伝子を評価
- **高精度、高感度解析**
  それぞれの領域を最低 500 カバレッジ読むことで 5% の変異アリルまで検出

はじめに

アメリカでは、およそ 4 分に 1 人が血液癌と診断されています。骨髄性悪性腫瘍を評価する現在の解析手法は効果的ではありますが、複数の変異を見る際には、時間と費用がかかり、疾患の根本的な遺伝的原因を決定できないことがあります。

TruSight Myeloid Sequencing Panel は、次世代シーケンサー（NGS）テクノロジーを用いて、1 回のテストで 54 遺伝子（腫瘍抑制遺伝子、発癌に関与するホットスポット）を包括的に評価できます（表 1）。本パネルは、急性骨髄性白血病（AML）、急性異形性症候群（MDS）、骨髄増殖性腫瘍（MPN）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性骨髄単球性白血病（CMML）、若年性骨髄単球性白血病（JMML）への関与が明らかとなっている変異をターゲットとしています。1 回のアッセイで、高精度で経済的な結果が得られ、複数のサンプルについて、疾病状態や予後といった液性腫瘍の迅速なプロファイリングが行えます。

ターゲットコンテンツの設計戦略

著名な血液癌疾患の専門家で構成されたコンソーシアムによって、TruSight Myeloid Sequencing Panel のコンテンツはデザインされました。本パネルは、血液悪性腫瘍で高頻度に見られる変異として知られている 54 遺伝子をターゲットとし、白血病と骨髄増殖性疾患にフォーカスしています。ターゲット遺伝子は、臨床的関連領域を含み、疾患や経過について包括的なイメージを描くことができます。ターゲット遺伝子は、MDS-AML 連続体に関与するものも含まれます。

卓越したカバレッジ

TruSight Myeloid Sequencing Panel は、血液悪性腫瘍に関連したゲノムの変化を調査するために最適化されたオリゴプールを特徴としています。本パネルは、141kb までのゲノムコンテンツにフォーカスしており、ヒト NCBI37/hg19 ゲノムを対象としてデザインされた 250bp まで の 568 のアンプリコンで構成されています。オリゴプールは、15 種類の完全長遺伝子（エクソンのみ）とエクソンホットスポットを含む 39 種類の遺伝子をターゲットとしております（表 2）。

表 1：TruSight Myeloid Sequencing Panel で評価する遺伝子領域

遺伝子	ターゲット領域	遺伝子	ターゲット領域	遺伝子	ターゲット領域	遺伝子	ターゲット領域
ABL1	4–6	*DNMT3A*	full	*KDM6A*	full	*RAD21*	full
ASXL1	12	*ETV6/TEL*	full	*KIT*	2, 8–11, 13 + 17	*RUNX1*	full
ATRX	8–10 and 17–31	*EZH2*	full	*KRAS*	2 + 3	*SETBP1*	4 (partial)
BCOR	full	*FBXW7*	9 + 10 + 11	*MLL*	5–8	*SF3B1*	13–16
BCORL1	full	*FLT3*	14 + 15 + 20	*MPL*	10	*SMC1A*	2, 11, 16 + 17
BRAF	15	*GATA1*	2	*MYD88*	3–5	*SMC3*	10, 13, 19, 23, 25 + 28
CALR	9	*GATA2*	2–6	*NOTCH1*	26–28 + 34	*SRSF2*	1
CBL	8 + 9	*GNAS*	8 + 9	*NPM1*	12	*STAG2*	full
CBLB	9, 10	*HRAS*	2 + 3	*NRAS*	2 + 3	*TET2*	3–11
CBLC	9, 10	*IDH1*	4	*PDGFRA*	12, 14, 18	*TP53*	2–11
CKDN2A	full	*IDH2*	4	*PHF6*	full	*U2AF1*	2 + 6
CEBPA	full	*IKZF1*	full	*PTEN*	5 + 7	*WT1*	7 + 9
CSF3R	14–17	*JAK2*	12 + 14	*PTPN11*	3 + 13	*ZRSR2*	full
CUX1	full	*JAK3*	13				

この最適化されたオリゴプールは、ターゲット領域の均一的なカバレッジを提供し、平均カバレッジが 5000x の場合、95% 以上のアンプリコンで 500 以上のカバレッジが可能となります。これにより、MiSeq システムではランあたり 8 サンプルのアッセイが実施でき、稀な変異をコールするのに必要とされる感度と精度が、高い信頼性をもって得ることができます。

簡単かつ統一されたワークフロー

TruSight Myeloid Sequencing Panel は、効率的なワークフローと特異的な変異コールでの自動化データ解析を含む完全に一体化された DNA データソリューションを提供します（図 1）。血液、骨髄、細針吸引（FNA）から抽出された DNA 50ng からスタートし、ライブラリーは、マルチプレックス化オリゴヌクレオチプローブを用いて調製します。

サンプル特異的インデックスをそれぞれのライブラリーに添加することで、ハイスループットで行うシーケンス前にライブラリーをプールすることができます。プールされたライブラリーは、MiSeq システムにロードすると、自動化シーケンスとデータ解析が行えます。解析データは、VariantStudio ソフトウェアにインポートされ、高精度な変異アノテーション、分類、レポート化が可能です。すべてのプロセスは、わずか 3 日で完了します。

最適化されたアッセイケミストリー

TruSight Myeloid アッセイは、それぞれの遺伝子領域の上流 1 つと下流 1 つのオリゴペアのマルチプレックスプールとハイブリダイズすることで開始します（図 2）。それぞれのオリゴは、固有のターゲット特異的配列と増幅反応で必要となる共通のアダプター配列を含みます。独自の伸長ライゲーション反応によりターゲット領域まで伸ばし、続くライゲーションにより 2 つのプローブが結合し、共通の末端配列をもつ新しいテンプレートライブラリーが完成します。伸長ライゲーションの結果、2 つの固有のライブラリー特異的インデックスが組み込まれた PCR 増幅テンプレートが出来上がります。1 本鎖に変換され、ビーズを使ったプロトコールによりアダプターが付きノーマライズ化されたライブラリーが最終反応産物となります。シーケンス反応に使えるライブラリーは、追加のプロセスなしで、MiSeq システムで行うシーケンス用の MiSeq 試薬カートリッジへロードすることができます。

表 2: カバレッジ詳細

累積ターゲット領域サイズ	~141kb
ターゲット遺伝子数	54
アンプリコンサイズ	~250bp
アンプリコン数	568
推奨平均カバレッジ	5,000 ×
ターゲット最少カバレッジ	500 ×
エクソンカバー率	500 × 95

図 1: 簡単で統一されたワークフロー

TruSight Myeloid Sequencing Panel は、統一化されたライブラリー調製とシーケンス、そして自動化データ解析により、3 日間で DNA からデータが得られる効率的なワークフローを提供します。

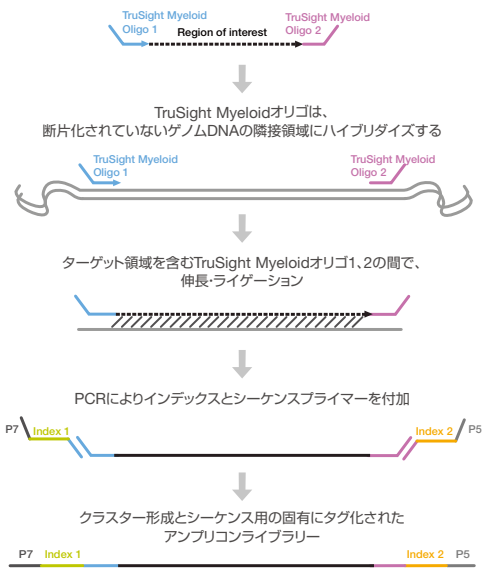
データ解析

TruSight Myeloid ライブラリーから得られたシーケンスデータは、装置に搭載された MiSeq Reporter ソフトウェアで解析します。デマルチプレックスと FASTQ ファイル作成後、ソフトウェアは BAM ファイルを作成するためにカスタムの Smith-Waterman アライナーを用いてヒト hg 19 リファレンスゲノムを対象としてリードをアラインします。Somatic Variant Caller は、特異的領域で変異解析を実施します。出力は、VCF か gVCR ファイルで、これらは SNPs や indel を含むテキストファイルです。

データ解釈

MiSeq Reporter ソフトウェアで作成された VCF や gVCR ファイルは、イルミナの VariantStudio ソフトウェアに直接インポートできます。この強力なツールにより、臨床研究者は疾患関連変異を迅速に同定および分類でき、簡潔ですぐに使用できるレポートで重要な発見を伝えることができます。直感で理解できる枠組みは、柔軟にフィルタリングできるオプションと効率的な変異分類、迅速で豊富なアノテーションおよびカスタム化可能なレポートの選択肢によって提供されます

図 2：最適化されたアッセイケミストリー



TruSight Myeloid アッセイにより、ターゲット領域を簡単かつ効率的にハイブリダイゼーションおよび増幅できます。

まとめ

TruSight Myeloid Sequencing Panel により、臨床研究施設は血液悪性腫瘍に関連のあるゲノムの調査のために、専門家が選定したコンテンツにアクセスできます。最適化されたプローブは、血液癌や骨髄増殖性疾患でよく見られる変異を包括的にカバーしています。このパネルをご利用いただくことで、1 回のアッセイで 54 遺伝子を解析でき、時間とコストや必要な資源を節約することができます。

製品情報

製品名	カタログ番号
TruSight Myeloid Sequencing Panel（96samples）	FC-130-1010

追加情報

TruSight Myeloid Sequencing Panel と
イルミナの NGS テクノロジーの詳細は、
http://www.illuminakk.co.jp/products/trusight-myeloid.ilmn
をご覧ください。

参考文献

1. Facts & Statistics. The Leukemia & Lymphoma Society.（www.lls.org/#/ diseaseinformation/getinformationsupport/factsstatistics/）

バイオマーカーの特許、またその他製品の使用に関する特許についての注意点：

塩基配列も含むいくつかのゲノム変異／多型、および特定アプリケーションにおける使用は特許により守られている場合があります。特定アプリケーションにおける製品の使用の際は、特許の所有者あるいは管理者からライセンスの取得が求められる場合がありますので、ご確認およびご注意ください。

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

© 2018 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. 1170-2013-J004 27JUN2018