illumina®

TruSight® Tumor 15 ライブラリー調製キットに使用する FFPE サンプルの品質評価について

次世代シーケンサーで最適な結果を得るための、DNA 品質に関する主な指標に基づいた FFPE 由来 DNA 抽出用キットの比較

はじめに

次世代シーケンサー（NGS）が登場し、一回のアッセイで得られる情報の幅が大いに広がり、その感度と特異性が著しく向上したことにより、腫瘍学研究の様相は変化を遂げました。さらに数多くの研究機関や臨床ラボで NGS のパワーを積極的に活用いただけるよう、イルミナは、精確な解析に不可欠な質の高いデータを産出するシンプルかつ包括的なソリューションを提供しています。

ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）サンプルはこれまで、固形がんの形態学的解析に利用されてきました。最近では、このように貴重なサンプルの分子診断法が開発され、マーカーの開発や腫瘍形成を促す要因についての理解が進んでいます。しかしながら、ホルマリン固定やパラフィン包埋の過程で、断片化、クロスリンク、化学的修飾による損傷などの影響を受け、DNA の品質は低下してしまいます。一部の分子アッセイでは、インプットされる DNA の質と量の両方を満たすことが質の高いデータを得るために非常に重要となります。この課題を克服するために、イルミナでは、MiSeq® システムや MiniSeq™ システムで行う TruSight Tumor 15 ライブラリー調製キットなど、あらゆるアプリケーションで良好な結果が得られるよう、DNA とライブラリーの品質に関する主要なチェックポイントを定義しています。

TruSight Tumor 15 ライブラリー調製キット [1] は、FFPE に起因するアーチファクトを発生させることなく高感度なシーケンスが行えるよう、ライブラリー調製とデータ解析のステップが最適化されたターゲットシーケンスのためのソリューションです。『TruSight Tumor 15 Reference Guide』[2] には、使用する組織に関する要件や DNA 抽出法などのサンプルインプットに関するガイドラインが記載されています。当白書では、上記ガイドラインに沿った FFPE サンプルの使用について説明しています。まず、複数の腫瘍タイプで DNA 収量の差異を評価し、次に、3 つの市販キットを用いて抽出した DNA で、NGS のパフォーマンスを左右する品質を評価しました。DNA の抽出には、ReliaPrep FFPE gDNA Miniprep System（Promega 社）、QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit（QIAGEN 社）、および AllPrep DNA/RNA FFPE Kit（QIAGEN 社）を使用しました。その後、サイズ解析およびシーケンスに関する指標に基づいて、DNA 増幅の可能性、調製されたライブラリー量および品質についてサンプルの評価を行いました。

TruSight Tumor 15 で使用する組織の要件

TruSight Tumor 15 で使用する組織の要件を規定するガイドラインの策定には、民間のベンダー 3 社が提供する 6 つの異なる組織から採取した FFPE 腫瘍サンプルを使用しました（表 1）。ミクロトームを使って、FFPE ブロックを 5µm の薄片にし、「累積領域」により、異なる組織領域と薄片数での収量をノーマライズしました。この指標は、複数の 5µm 薄片全体にみられる組織領域の総数を示しています。DNA 抽出後、蛍光法（Accuclear Ultra High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit）により dsDNA 濃度を測定したところ、FFPE が性質上非常に可変的であることから予測できるとおり、類似した組織領域からの収量に幅広い分布がみられました。DNA 収量の中央値では、組織別に大きな違いは見られませんでした（表 1）。しかし、DNA 必要量の規定値が確実に得られていることを考慮すると、異常な統計値（表 1、最小デシル収量）は組織特異的な挙動がより明確に反映されています。組織必要量の規定値（表 1）は、90% のサンプルから最少濃度 2ng/µL の DNA が 20ng（TruSight Tumor 15 アッセイのライブラリー調製で必要なインプット量）以上得られると推測される量を示しています。これにより、メラノーマを除いて TruSight Tumor 15 アッセイに推奨される組織必要量は、140mm^2 以上の領域を含む 5µm の薄片を対象とし設定されています。メラノーマ組織はその物理的性状により、著しく大量の組織サンプルが必要となります。

TruSight Tumor 15 で使用する DNA の要件

市販される 11 の DNA 抽出用キットを予備的にスクリーニングした結果、続いて行われる TruSight Tumor 15 との互換性評価に 3 つのキットが適していると判断されました（表 2）。市販の FFPE ブロックを、ミクロトームを使って 10µm の薄片にし、メーカーの指示事項に従って DNA を抽出しました。多数の組織タイプから採取した 20 以上の異なる腫瘍サンプルを使って DNA を回収し、収量ならびに DNA 増幅の可能性について解析を行いました（表 3）。

表 1：組織タイプ別 FFPE サンプル量あたりの DNA 収量

パラメーター	膀胱がん	乳がん	結腸がん	肺がん	黒色腫	子宮がん
テストしたサンプル数	n = 27	n = 52	n = 35	n = 37	n = 37	n = 27
収量の中央値（ng/mm^2）	1.96	1.78	2.40	2.12	1.49	3.57
最小デシル収量（ng/mm^2）	0.79	0.43	0.71	0.99	0.10	1.43
組織必要量の規定値（mm^2）	76	139	85	61	618	42

5µm の薄片を用いて領域を算出しました。収量の中央値：50% のサンプルでこの収量またはこれ以上の収量が得られました。最小デシル：10% 以上のサンプルから得た収量の平均値。組織必要量の規定値は、90% 以上のサンプルから最低濃度 2ng/µL の DNA が 20ng 以上得られる組織領域値として算出しています。

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。

表 2：DNA 抽出用キット

詳細	メーカー	カタログ番号
ReliaPrep FFPE gDNA Miniprep System	Promega	A2352
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit	QIAGEN	60404
AllPrep DNA/RNA FFPE Kit	QIAGEN	80234

抽出用キットで得られた DNA 収量

抽出した DNA を組織領域 mm^2 あたりの DNA 収量によって特性付けしました。蛍光法（Qubit dsDNA HS Assay Kit）を用いて DNA 濃度を測定したところ、異なる組織タイプおよび抽出用キットの間で収量にばらつきがみられましたが、3 つのキットではいずれも、ライブラリー調製に十分な量（20ng 以上）の DNA が得られました（図 1）。

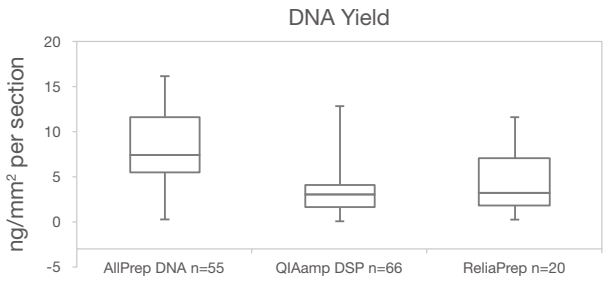

図 1：DNA 濃度と収量 各メーカーの指示事項に従って DNA 抽出用キットを使用しました。各キットで 20 以上のサンプルを処理しました。組織薄片の厚さは 10μm でした。

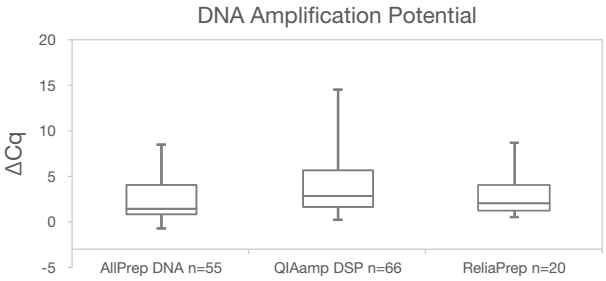

図 2：抽出用キット間で類似した DNA 品質 各 DNA 抽出用キットで 20 以上のサンプルから抽出した DNA を、qPCR 法で処理しました。ΔCq 値は、各サンプルと FFPE ではないリファレンス gDNA サンプル間の Ct 値の差を示しています。

DNA 増幅の可能性

FFPE サンプルでは分解や化学的修飾が起こるため、増幅してライブラリー産物を生成することが可能な FFPE 由来の DNA 量は、FFPE 組織から抽出した総量に対しごくわずかであることがほとんどです。TruSight Tumor 15 のマルチプレックス PCR プロセスでは、DNA ポリメラーゼがその力量を発揮して DNA テンプレート全体をリードするため、定量 PCR（qPCR）法を用いて、FFPE 組織から抽出した DNA の性能を確認しました。各サンプルの ΔCq 値は、非 FFPE サンプルのリファレンス gDNA の増幅可能性に対して FFPE 由来 DNA の増幅可能性を比較することにより算出でき、PCR ベースの手法における性能を予測するのに利用することができます。コントロール DNA より後半のサイクルで増幅したサンプルでは、ΔCq 値が 0 に近いサンプルより品質が低くなりました。平均 ΔCq 値については、テストを行ったキット間では明らかな違いは見られず、すべての抽出用キットの平均 ΔCq 値が 3 以下という優れた性能を示しました（図 2）。

表 3：解析を行った FFPE 腫瘍サンプル

サンプル ID	腫瘍タイプ	組織領域（mm^2）	腫瘍（%）	病理学上の注記
1	膀胱がん	66	95	移行上皮がん
2	膀胱がん	180	70	移行上皮がん
3	乳がん	135	90	浸潤性乳頭がん
4	乳がん	84	70	浸潤性小葉がん
5	結腸がん	198	30	腺がん
6	結腸がん	100	95	腺がん
7	結腸がん	160	90	粘液性腺がん
8	肺がん	180	15	リンパ球と背後関係のある腺がん
9	肺がん	126	95	腺がん
10	黒色腫	120	95	リンパ節への転移性メラノーマ
11	黒色腫	77	95	非色素性結節型黒色腫類上皮細胞型
12	黒色腫	200	85	色素沈着の強い結節型黒色腫類上皮細胞型

FFPE ブロックは、民間のベンダー 2 社（Proteogenex 社および Precision Medicine 社）より調達しました。10μm の薄片から各キットにより DNA を抽出しました。組織領域は 2~4 枚のスライドを累積した領域を表しています。

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。

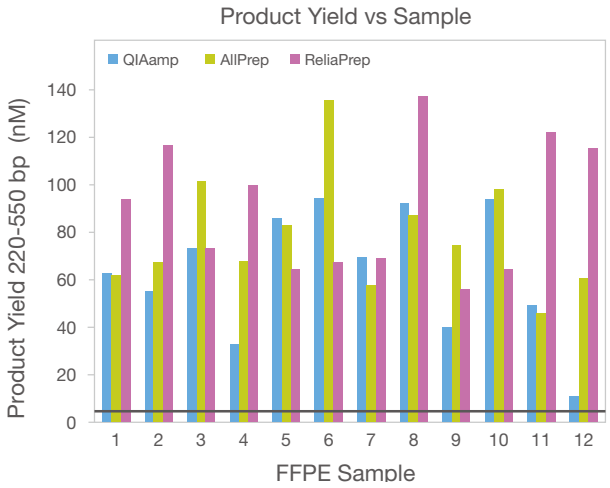

図 3:ライブラリー調製後の産物収量 PCR 精製後、220~550bp のライブラリーを Fragment Analyzer で定量しました。黒線は、収量が十分と判断されるサンプルの閾値（4nM）を示しています。

ライブラリー産物の収量

5 つの組織タイプから採取した 12 サンプルの一部を選び、TruSight Tumor 15 を使ってライブラリー調製を行いました（表 3）。最初のステップで、ターゲット領域（アンプリコン）を PCR 増幅し、PCR 産物をインデックスアダプターで標識しました。PCR 精製後、Fragment Analyzer でライブラリーサンプルを解析して、断片サイズと収量を測定しました。質の高い NGS データが得られると予測される十分な収量が得られるライブラリーサンプルの DNA 濃度は、220~550bp の範囲で 4nM となります。DNA 濃度には大きな差がみられるものの、テストしたライブラリーサンプルはすべて 4nM の閾値を上回りました（図 3、黒線）。

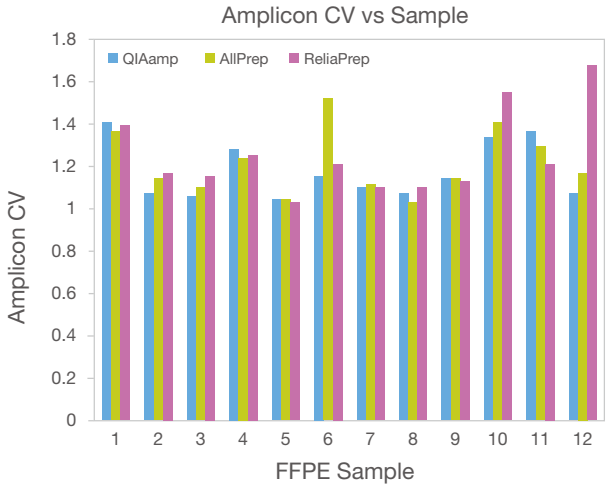

図 4：抽出用キット間で比較したアンプリコン CV 複数のアンプリコン深度間にみられる変動係数（アンプリコン CV）を、アンプリコンカバレッジの平均値を超える標準偏差として算出しています。各サンプルにみられるキット間での差は最小限に抑えられていることがわかります。

アンプリコン CV

TruSight Tumor 15 で調製したライブラリーのシーケンスを MiSeq システムで行い、アンプリコン CV シーケンスに関する指標に基づいて品質評価を行いました。アンプリコン深度間にみられる一定の変動係数値（アンプリコン CV）ですべてのターゲットアンプリコン全体のカバレッジ均一性を評価し、平均値を超える標準偏差として算出しています。各サンプルのアンプリコン CV を比較したところ、キット間の差が最小限に抑えられていることが確認され、各キットでサンプル間に一貫性が保たれていることも示唆されました（図 4）。

まとめ

TruSight Tumor 15 は、さまざまな組織タイプや品質の異なる DNA サンプルのアッセイにご利用いただけます。FFPE の供給元に重点を置いたこの研究で適用した各指標の合否基準に基づいて、現行ガイドラインの出発物質量や DNA 抽出法は規定されているため、TruSight Tumor 15 Reference Guide[2] に沿った実験を行うことにより、最適な結果が得られます。

テストを行ったさまざまな DNA 抽出用キットでは十分な DNA 量が得られた一方で、NGS データの品質に関する QC 指標の評価結果では、FFPE サンプルから抽出した DNA の品質に大きなばらつきが見られました。DNA の増幅可能性、ライブラリー産物の収量、およびアンプリコン CV の評価で、一貫して優れた性能を示した DNA を抽出したのは 3 キットのみでした。出発物質量やライブラリー調製について規定したガイドラインに沿って、上記テストの合格基準を満たす品質の DNA を使用することが、FFPE 腫瘍サンプルの精確な解析を行うのに十分な高品質の NGS データを得ることにつながります。結論として、ReliaPrep FFPE gDNA Miniprep System（Promega 社）、QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit（QIAGEN 社）、および AllPrep DNA/RNA FFPE Kit（QIAGEN 社）では、一貫してライブラリー QC の合否基準値を上回っているため、TruSight Tumor 15 アッセイでの FFPE サンプルからの DNA 抽出には、この 3 キットの使用が推奨されます。

詳細について

固形がんのターゲットシーケンスについての詳細は、jp.illumina.com/OncologyPanel をご覧ください。

参考文献

1. Illumina (2015)『TruSight Tumor 15 パネル』(http://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/datasheet_trusight_tumor_panel_15.pdf).
2. Illumina (2016)『TruSight Tumor 15 Reference Guide』(http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/trusight/trusight-tumor-15-reference-guide-1000000001245-04.pdf).

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。

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

代理店

本製品の使用目的は研究に限定されます。 販売条件：jp.illumina.com/tc

© 2016 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPro, DASL, Design Studio, GAIIx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, NextSeq, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode, the pumpkin orange color, the Genetic Energy streaming bases design は、Illumina, Inc. の商標または登録商標です。
その他の会社名や商品名は、各社の商標または登録商標です。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. 1170-2015-J010 23JUN2016

illumina®