



がん研究におけるリキッドバイオプシーのための 次世代シーケンスとマイクロアレイメソッド

イルミナの次世代シーケンサー(NGS)を使ってシンプルな採血から
腫瘍生物学への洞察を最大に深める

目次

はじめに	3
リキッドバイオブシー検体の概要	4
CTC	5
研究例	6
推奨されるワークフロー	7
cfDNAおよびctDNA	11
研究例	12
推奨されるワークフロー	13
cfDNAのメチル化パターン	15
研究例	15
推奨されるワークフロー	16
cfRNAおよびctRNA	18
研究例	18
推奨されるワークフロー	19
リキッドバイオブシーのこれから	21
詳細はこちら	21
参考文献	22

はじめに

がんは世界で死因の第1位であり、2020年だけで約2,000万件の新規症例が発生し、がんに起因する死亡は1,000万件に上ります。¹ がんゲノムアトラス(TCGA)のような近年の大規模なオミクスベースのプロジェクトにより、がん生物学の理解は大幅に向上していますが、それでも後期と診断される頻度や転移の頻度は高く、これらはがんによる死亡の90%以上を占める原因となっています。²

そのため、早期検出と介入が治療の成功、診断の改善、がん死亡率の減少に不可欠です。³

歴史的に見て、組織生検の病理組織学的解析および免疫組織化学的解析は、がんを診断し、ステージを決定するための標準的な治療法でした。⁷ イルミナのマイクロアレイおよび次世代シーケンサー(NGS)を用いた組織生検のオミクス解析メソッドを取り入れることで、腫瘍の詳細な分子特性評価が可能となり、DNA、RNAまたはタンパク質のどのような変化が腫瘍発生、増殖、転移の原因になるかが明らかにされています。

しかし、がん検出、診断、治療選択に使用する組織生検の有用性を制限する以下のようないくつかの問題があります：

- 関心のある組織へのアクセスが不可能
- 資格のある医療関係者の専門的なスキルを要する
- 経時的に生検を繰り返すため侵襲性が高い
- 腫瘍間および腫瘍内の不均一性により表現型が限られる
- 重大な手技リスク、組織の質または量が不十分などによる物理的にバイオプシーを行うための患者の不適合性

～20%

進行がんの患者のうち
バイオプシーのために
アクセスできる組織がない
患者の割合⁴⁻⁶

～15%

リキッドバイオプシーを組織解析に加えた場合、転移性非小細胞肺癌(mNSCLC)でよりアクションナブルな変異が同定される割合^{4,10,11}

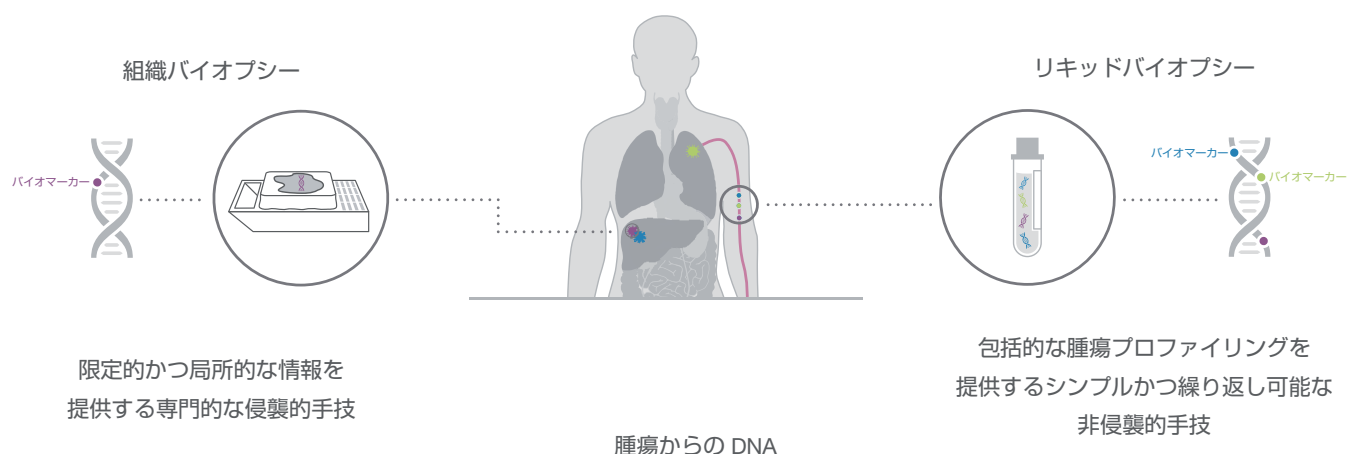


図1：リキッドバイオプシーは血漿検体からさまざまな組織やバイオマーカーを評価できます。

リキッドバイオプシー検体の概要

リキッドバイオプシーは、がん患者の血液中に存在するさまざまな腫瘍由来のバイオマーカーを検出し特性評価します。これらのバイオマーカーは健常人やがんのない患者では存在しません(図1)。

リキッドバイオプシーに共通する検体：

- 循環腫瘍細胞 (CTC)
- セルフリーDNA (cfDNA) および血中循環腫瘍DNA (ctDNA)
- セルフリーRNA (cfRNA) および循環腫瘍RNA (ctRNA)

これらのバイオマーカーは腫瘍形成や進行の全般にわたってリキッドバイオプシーアッセイで解析できます。これにより早期検出のために各検体の詳細なプロファイリングを実施し、特定のがんの特異的な分子特性に基づいて治療を調整し、治療後のがんをモニタリングする機会が得られます。ゲノムスペースの方法からはこれまでに比べてより多くの分子データへのアクセスが提供されるため、がん研究者はその使命を果たすために必要なツールが得られます。さらに、これらのテクノロジーは生体液検体を用いた仮説中立的な検証が可能であるため、実験をデザインする前には検討していなかった遺伝子やパスウェイを評価するための検出力を提供します。ゲノムテクノロジーのリーダーとして、イルミナはがん研究のためのリキッドバイオプシー検体のシーケンスに対して実証されている、統合型のワークフローと革新的なソリューションを提供しています。^{12,13}

Minetta C. Liu, MD
Mayo Clinic

長年血流中に腫瘍に関連する物質があることは知っていましたが、我々は単に、意味のあるものとしてその物質を検出するテクノロジーを持ち合わせていなかったのです。

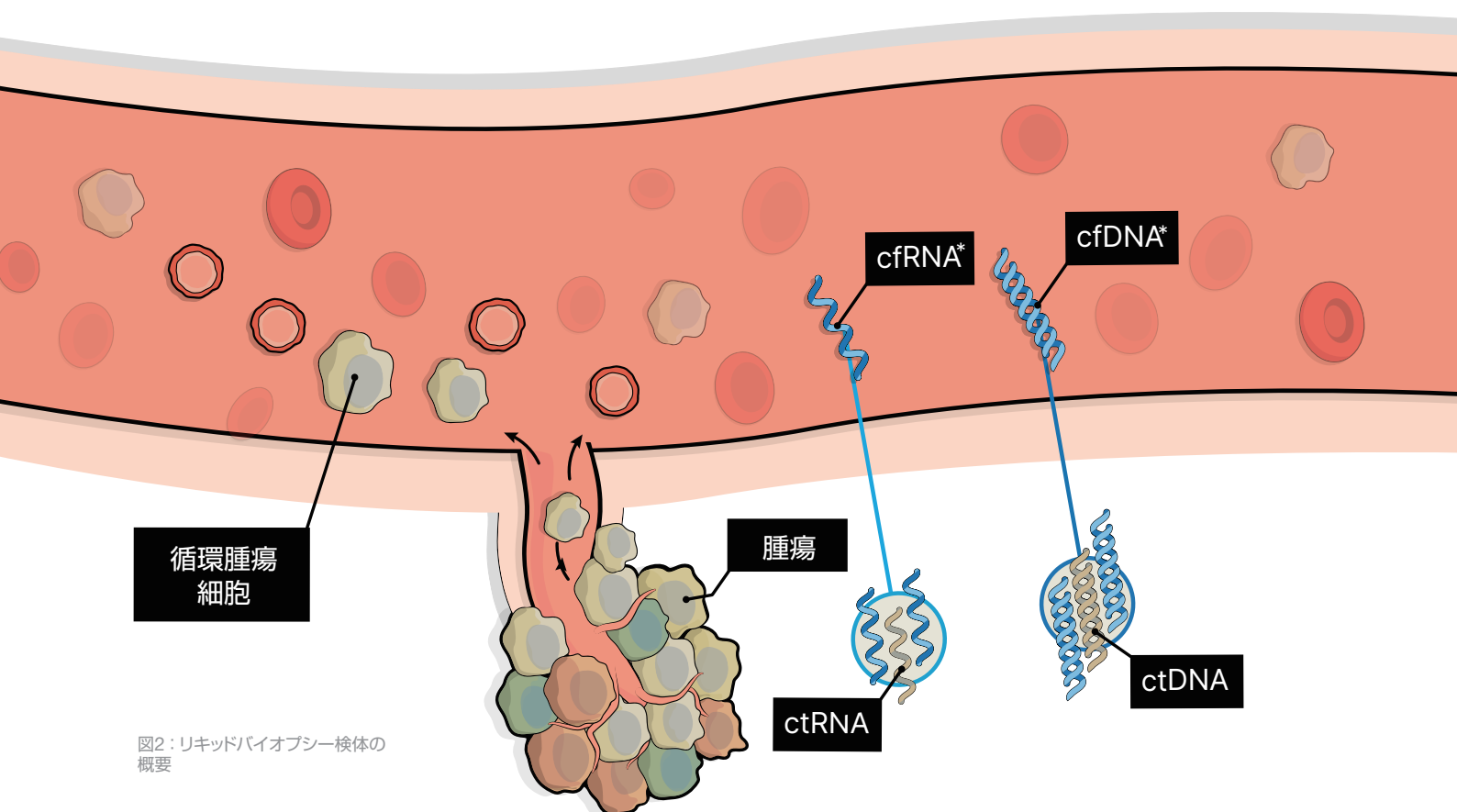


図2：リキッドバイオプシー検体の概要

CTC

CTCは腫瘍から血流に排出される細胞です。複数の研究から、CTCは転移を起こす潜在力があり、さまざまな種類のがんにおける侵襲性疾患や進行性疾患および予後不良と関連することが示されています。^{8,14} CTCはリキッドバイオプシーベースのがん特性評価のためのバイオマーカーとして役立てることができ、血流中のCTCの希少性(平均的に血液7.5 mL中にCTC1個未満～50個未満)は検出や特性評価のうえで重要な課題として残されています。¹⁵ CTC分離の一般的なメソッドは、例えば上皮細胞接着分子(EpCAM)などの抗原発現に基づくCTCの濃縮、血液細胞や免疫細胞などの非CTCの除去、白血球除去が必要となります。¹⁶⁻²⁰ 濃縮後、CTCは通常手作業によるメソッドで分離されます。

歴史的に、CTCはうまく分離することができる細胞数が少ないため、バルクで解析されてきました。しかし、CTCのバルク解析は腫瘍の不均一性に対する洞察の可能性を制限してしまいます。シングルセル分離法とシングルセルシーケンス法の技術的進歩により、ゲノミクス、トランスクリプトミクス、エピゲノミクスのレベルでシングルCTCの詳細な解析が可能になっています。リキッドバイオプシーとCTCのシングルセルシーケンスを組み合わせることで、腫瘍生物学の一因となる細胞不均一性を明らかにすることができます(図3)。²¹⁻²³



Aadel Chadhuri, MD, PhD
ワシントン大学、セントルイス

“

アッセイが向上するにつれ、リキッドバイオプシーは最終的にはがん再発を検出するための標準メソッドになるかもしれません。

”

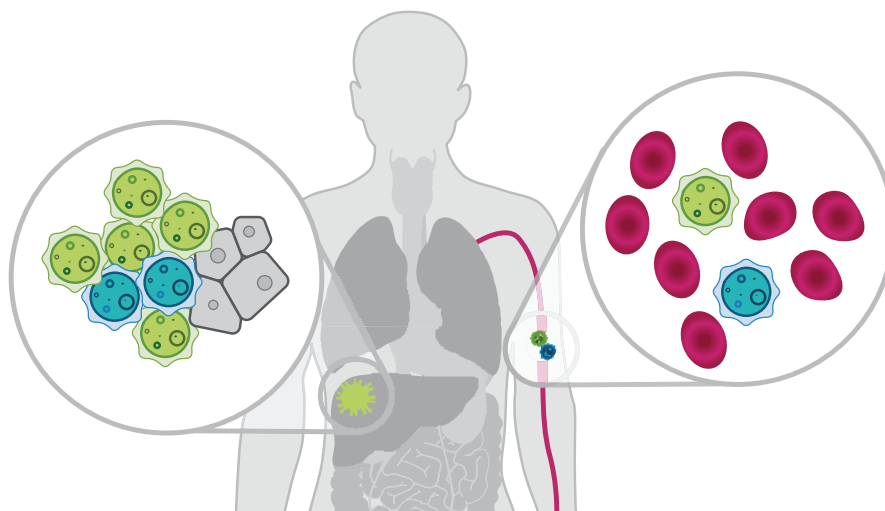


図3：CTCのリキッドバイオプシー解析は腫瘍の不均一性とがん生物学を明らかにします。

研究例

がんの遺伝学的特徴を マッピングするための クリニックにおける CTCシーケンシングの 可能性

Broad Instituteの研究者たちは、イルミナMiSeq™システムを用いて転移性前立腺がん患者からのCTCを対象に全エクソームシーケンス(WES)を実施しました。CTCは、抗EPCAM磁気ビーズを用いてアフィニティー濃縮によって分離した後、手作業で分離しました。個々のCTCを99.995%以上のエクソームカバレッジでシーケンスすることで、非常に精度の高い体細胞1塩基変異(SNV)コールが実現しました。CTCから同定されたバリエーションの70%が、シーケンスで適合させた原発腫瘍組織からのデータと一致することが示されました。これらの結果は、クリニックにおけるCTCシーケンシングの可能性を示しています。²⁴

CTCの転写産物 プロファイリングによる 治療奏効に関する 腫瘍不均一性の解明

MDアンダーソンがんセンターのサイエンティストたちは異種移植モデルにおけるCTCについて、イルミナのHiSeq™ 4000システムを用いてシングルセルRNAシーケンス(scRNA-Seq)を実施し、小細胞肺癌(SCLC)の治療後における腫瘍内不均一性(ITH)を解析しました。CTCは、異種移植マウスモデルの作成に先立ち、抗CD36を含む抗体カクテルを用いてアフィニティー濃縮で分離しました。シングルセルの転写産物プロファイリングは、治療抵抗性に続くITHの増加と、不均一な遺伝子発現パターンを示すSCLC細胞のサブポピュレーションを示しました。これらの結果より、SCLC腫瘍が複数の同時発生する抵抗性メカニズムを発展させる可能性を示し、併用する治療法を同定するために詳細な分子プロファイリングを実施する必要性を浮き彫りにしていることが示されました。²⁵

CTCのRNA-Seqによる 腫瘍全体にわたる 遺伝子発現の細胞間変動の 立証

マウントサイナイアイカーン医科大学の研究チームは、肝細胞がん(HCC)における腫瘍形成ドライバーと新規バイオマーカーを同定するためにCTCを検証しました。CTCをCD45で選択した後、CTCマーカーカクテルを使って蛍光活性化セルソーティング(FACS)を実施して濃縮しました。CTC候補について10x ChromiumプラットフォームとイルミナHiSeq 2500システムを使ってscRNA-Seqを実施しました。scRNA-Seqは遺伝子発現パターンに基づいて同定した3種類のHCC CTCの約10,000細胞について実施しました。これらのCTCのうち、複数の遺伝子がアップレギュレーションされていることが分かり、これには早期HCCの20%で過剰発現することが知られている遺伝子であるIGF2が含まれていました。この原理証明研究により、腫瘍の複雑な生物学に洞察を与えるためのCTCのscRNA-Seqの可能性が示されました。²⁶

推奨されるワークフロー:CTCのシングルセルシーケンス

イルミナのシーケンスシステムとバイオインフォマティクスツールは幅広い濃縮と細胞分離(図4、表1~2)、ライブラリー調製オプション(表3)、さまざまなシーケンスメソッド(表4)、およびデータの視覚化と解釈のためのソフトウェアパッケージが含まれ(表5)、CTC解析のためのシングルセルシーケンスワークフローをサポートします。

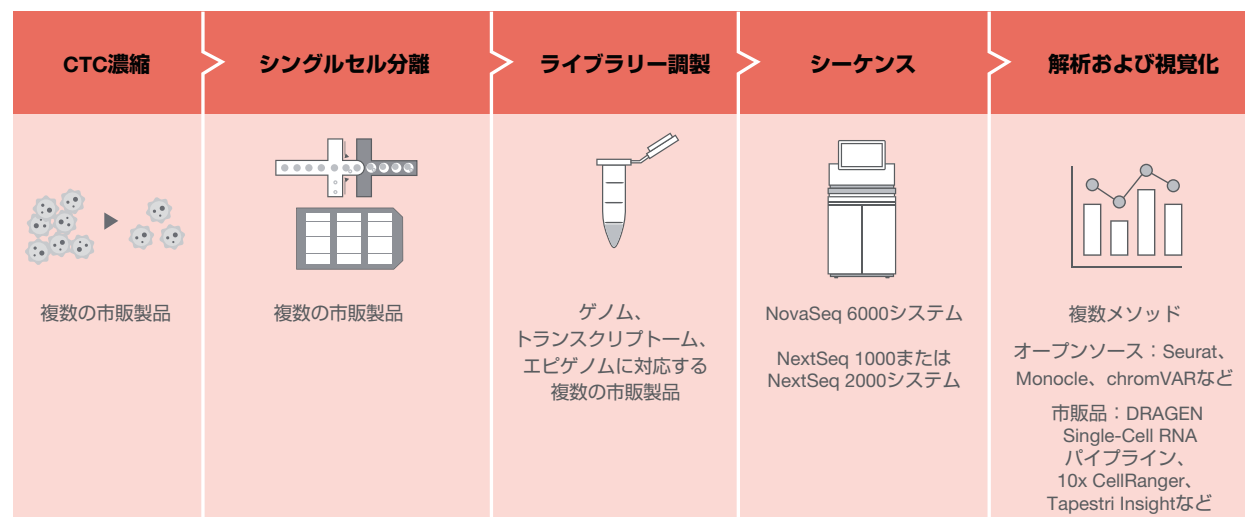


図4：CTCシングルセルシーケンスワークフロー

表1：CTC濃縮オプション

市販製品	メソッド	長所	短所
Dynabeads	免疫親和性	迅速、天然の細胞特性を維持	バックグラウンドが高い、ラベリングが不十分
EasySep	免疫親和性	使用が簡単、バッチ分離	低い回収率
RosetteSep	免疫密度	迅速、細胞を生存状態で維持	時間がかかる、手作業による処理 (再現性が低い可能性がある)
FACS	生物物理学的、免疫蛍光	高感度、複数パラメーター解析	コストが高い、CTCの希少性により実行不可能な場合がある
CellCelectorソーティングシステム ^a	免疫蛍光、マイクロフルイディクス	迅速、自動化、精確、細胞活性を維持	装置に対する高資本コスト、時間がかかる
AdnaTest	免疫磁性	迅速、使用が簡単、がん種特異的キットが利用可能	手作業によるワークフロー
Parsortix	サイズ選択、フィルタリング	迅速、自動化、抗原発現に依存しない	装置に対する高資本コスト
ScreenCell Cytoフィルター ^a	生物物理学的、細胞のサイズ	抗原発現に依存しない、高い回収率	より小さなCTCを失うことがある、手作業による処理
CellSearch	免疫蛍光、マイクロフルイディクス	CTC計測用の実証済みのFDA認可取得済み体外診断用(IVD)システムとキット	追加の実証済みのコンポーネントの購入が必要

^a 濃縮およびシングルセル分離の両方に使用

表2：シングルセル分離メソッド

市販製品	メソッド	長所	短所
DEPArrayソーティングシステム	マイクロフルイディクス	蛍光標識を用いた視覚化、一部自動化	サンプル量が少量、時間がかかる
CellCelectorソーティングシステム ^a	免疫蛍光、マイクロフルイディクス	迅速、自動化、精確、細胞活性を維持	装置に対する高資本コスト、時間がかかる
ScreenCell Cytoフィルター ^a	生物物理学的、細胞のサイズ	抗原発現に依存しない、高い回収率	より小さなCTCを失うことがある、手作業による処理
10x Chromium	マイクロフルイディクス	迅速、自動化システム、ハイスループット	非特異的細胞分離
VyCap	免疫蛍光、マイクロウェル	CellSearchシステムとの互換性あり	免疫蛍光顕微鏡が必要
^a 濃縮およびシングルセル分離の両方に使用			

表3：ライブラリー調製ソリューション

生物学的レベル	シングルセルメソッド	説明	市販製品例
ゲノム	ターゲットDNA-Seq	同一細胞から1塩基変異およびコピー数バリエーションを同時に検出	• Mission Bio Tapestry Platform
トランスクリプトーム	RNA-Seq	3'ポリアデニル化 (polyA) テールによりmRNAをキャプチャーすることで、ストランド特異的な情報によるコーディングトランスクリプトームのシーケンスが可能	• 10x Genomics Chromium Single Cell Gene Expression Solution (3' WTA)
プロテオーム	抗体シーケンス (AbSeq)	DNAタグ付き抗体でNGSによるタンパク質プロファイリングを実現	• BD [®] Ab-Seq Assay • Biolegend TotalSeq-A、B、またはC試薬
プロテオーム+トランスクリプトーム	Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes (CITE-Seq)	オリゴヌクレオチド標識抗体により、タンパク質検出をNGSによる定量的アッセイに変換	• Biolegend TotalSeq-A、B、またはC試薬 • 10x Genomics Single Cell Immune Profiling or Single Cell Gene Expression
エピゲノム	Assay for Transposase-Accessible Chromatin Sequencing (ATAC-Seq)	Tn5トランスポゼースを介したシーケンスプライマーの挿入によるゲノム中のオープンクロマチンのシーケンシング	• 10x Genomics Chromium Single Cell ATAC Solution

シーケンス

評価する細胞数は実験デザインに応じて異なり、シングルセルシーケンス実験をデザインする際は、複数の因子を検討する必要があります。例として、各サンプルに50個の細胞が含まれると仮定した場合、さまざまなシングルセルシーケンスメソッドに対するシーケンスランパラメーターを決定できます(表4)。

表4：さまざまなメソッドに対するシーケンスランパラメーター

シングルセルメソッド		細胞あたりのリードペアの推奨数
3'遺伝子発現		15,000～50,000
5'遺伝子発現		50,000
RNA-Seq		20,000
IR-Seq		5,000
scATAC-Seq		25,000
抗体シーケンス(Ab-Seq)		抗体あたり100個
ターゲットDNA-Seq		パネルサイズに依存

メソッドの例:scRNA-Seq		
システムおよびフローセル	フローセルあたりのリード数	フローセル当たりのサンプル数
NextSeq 1000/2000 P1	100M	1
NextSeq 1000/2000 P2	400M	4
NextSeq 2000 P3	1.2B	12
NovaSeq 6000 SP	800M	8
NovaSeq 6000 S1	1.6B	16
NovaSeq 6000 S2	4B	40
NovaSeq 6000 S4	10B	100

細胞あたり20,000リード、サンプルあたり50細胞と仮定

表5：解析および視覚化オプション

アプリケーション/ソフトウェア	説明	詳細はこちら
オープンソースバイオインフォマティクスツール(フリーウェア)		
Seurat	ノーマライゼーション、次元削減アプローチ、プロット、ヒートマップおよびデータ統合ツールを用いて細胞不均一性を評価するためにデザインされたRベースのscRNA-Seq解析ソフトウェア	リンク
Monocle	細胞分化の軌跡を特定するためにデザインされたRベースのscRNA-Seq解析ソフトウェア。細胞状態の開始と終わりが既知である実験に最適	リンク
chromVAR	scATAC-Seqデータ中のクロマチンアクセシビリティの変動を解析し、関連するモチーフまたはゲノムアノテーションを同定するためのRパッケージ	リンク
購入可能なバイオインフォマティクスツール		
DRAGEN Single-Cell RNA パイプライン	リードからのマルチプレックス化されたシングルセルRNA-Seqデータセットを、細胞と遺伝子ごとの分子バーコード(UMI)カウントを表す遺伝子発現マトリクスへと処理する。本パイプラインには、RNA-Seq(スプライス対応)アライメントおよび転写産物リードに対するアノテーションされた遺伝子へのマッチング、バーコードリードに対する細胞バーコードとUMIエラー補正、遺伝子発現を測定するための細胞と遺伝子ごとのUMIカウント、スパースマトリクス出力とQCメトリクス出力が含まれる。	リンク
10x Loupe Browser	10x Chromium scRNA-Seqデータおよびsc-ATAC-Seqデータを含むシングルセルシーケンスデータを視覚化し、解析することができるデスクトップ型アプリケーション。本ソフトウェアは、scRNA-Seqデータの中から、迅速かつインタラクティブに重要な遺伝子、細胞の種類、および基礎構造を見つけ出すことが可能。	リンク
Tapestri Insights	TapestriシングルセルDNAシーケンスデータの解析用で、シーケンスインポート、データ解析、および視覚化機能を備えている。本ソフトウェアは、クローナル、またはサブクローナルレベルでSNVおよびコピー数バリエーション(CNV)を含むバリエーション同定が可能。	リンク

関連するアプリケーションノートまたはその他のコンテンツへのリンク

『シングルセルシーケンスワークフロー：Critical Steps and Considerations』
<https://jp.illumina.com/destination/g/scs/single-cell-e-book-dl.html>

『NextSeq™ 2000シングルセルRNA-Seqソリューション』
<https://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/products/appnotes/nextseq-2000-single-cell-app-note-770-2020-008-jpn.pdf>

『シングルセル遺伝子発現およびクロマチンアクセシビリティの統合』

<https://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/10x-multiomics-tech-note-m-amr-00006-translations/10x-multiomics-tech-note-m-amr-00006-jpn.pdf>

関連するライブラリー調製キットまたはその他の関連製品へのリンク

DRAGEN Single Cell RNA
<https://jp.illumina.com/products/by-type/informatics-products/basespace-sequence-hub/apps/dragen-single-cell-rna.html>

cfDNAおよびctDNA

ほとんどの腫瘍は、アポトーシス、ネクローシス、ファゴサイトーシス、能動分泌などのさまざまな細胞メカニズムを介して、ctDNAを血流中に放出します。²⁷ 例えそうであっても、ctDNAは血中の総cfDNAの5~10%であり²³、それらの大半は赤血球、白血球、上皮細胞から放出されたものです。^{9,27} ctDNAの希少性および異なるステージでさまざまな種類のがんが異なる割合でctDNAを排出するという事実が、解析を複雑にします。もしそうであっても、ctDNAのゲノミクスペースのリキッドバイオブシー解析から、がんの種類、ステージ、血管新生の情報を得ることができます。²⁹ さらに、ctDNAシーケンスは、腫瘍の発生源からドライバー変異とパッセンジャー変異の両方を含むその腫瘍のバリエーションを同定し、それらが腫瘍の発生や進行に関与するかどうかを個別に同定します(図5)。²⁷ 血流中のcfDNAとctDNAの急速なターンオーバー(半減期16.3分)を考慮すると、リキッドバイオブシーを使うことで、リアルタイムでの腫瘍負荷を評価し、治療に対する反応をモニタリングすることができます。³⁰



Jasmine Zhou, PhD
カリフォルニア大学ロサンゼルス校

cfDNAはクローナル変異とサブクローナル変異の両方をキャプチャーするため、患者のがんの包括的な描写を得ることができます。

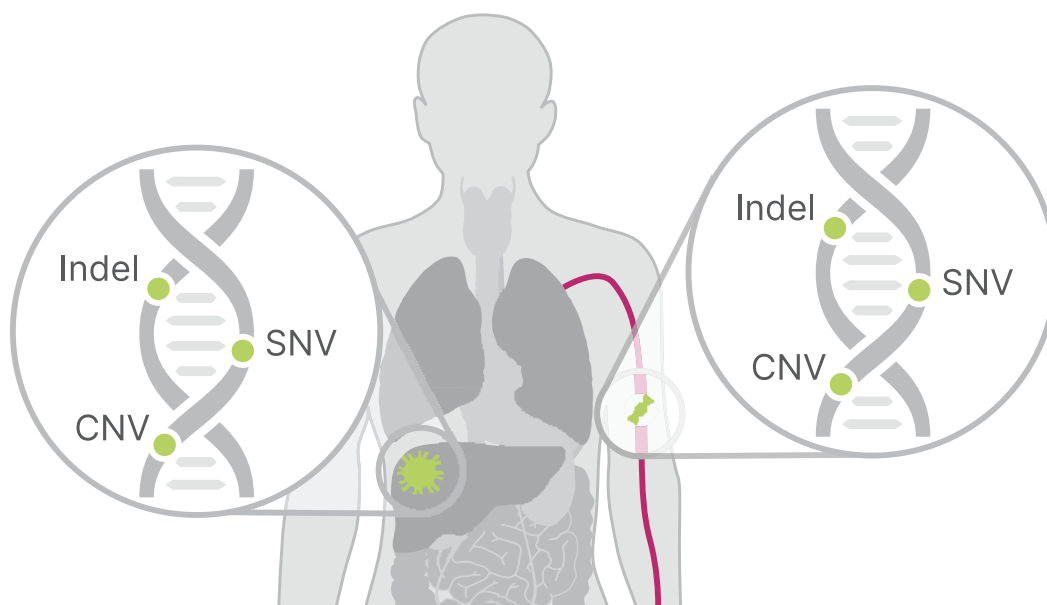


図5: ctDNAのリキッドバイオブシー解析は腫瘍内に存在するバリエーションを同定し、がんの発生と進行の詳細な特性を解析します

研究例

TruSight™ Tumor 170の
ctDNAバリエント解析への
応用の可能性

サンティアゴ大学病院のチームがNextSeq™ 500システム上でイルミナTruSight Tumor 170を用いてターゲットシーケンスを実施し、転移性結腸がん(CRC)患者から採取した血液検体からcfDNAをプロファイリングしました。KRASおよびPIK3CAにおける臨床的に意義のある既知のバリエントが本コホートの患者のそれぞれ79%と26%で同定されました。臨床的に意義のある可能性のあるバリエントは27のその他のがん遺伝子で検出され、腫瘍組織生検で見つかったバリエントと高い一致を示しました。この研究は、ctDNAターゲットアッセイとしてのTruSight Tumor 170の有用性を示しています。³¹

cfDNAシーケンスによる
cfDNAバリエントの起源の
特定

メモリアルスローンケタリングがんセンターの研究チームは、イルミナのHiSeq Xシステム上でcfDNAの高密度シーケンスを用いて、白血球(WBC)gDNAと腫瘍gDNAをcfDNA中で検出された体細胞バリエントの生理学的起源にマッピングしました。cfDNAで同定されたおよそ3,000個の体細胞バリエントのうち、約25%が腫瘍gDNAのバリエントと一致することが示されました。cfDNA体細胞バリエントのおよそ80%が白血球(WBC)中に同定されたことから、クローン性造血から生じた体細胞モザイクによるものと考えられました。この研究はcfDNAに検出されたバリエントを適切に解釈する重要性を浮き彫りにしています。³²

プレジジョンメディシンに
使用することを目的と
したctDNAシーケンスの
可能性

ワシントン大学医学部の研究者たちは、CRC治療後の患者の微小残存病変(MRD)を検出するために血漿中のctDNAを評価しました。HiSeq 4000システムで実施したハイブリッドキャプチャーパネルを用いたターゲットシーケンシングにより、高い感度と特異性を伴ってMRDを検出しました。変異解析では、患者の81%がアジュバント免疫チェックポイント阻害剤の候補と関連する腫瘍変異負荷(TMB)を有し、患者の10%がPI3K阻害またはその他の免疫療法のターゲットになる可能性のあるPIK3CA変異がありました。このレトロスペクティブ研究の結果から、個別化したがん治療法の選択に使用することを目的としたctDNA変異解析の可能性が示されています。³³

cfDNAのマルチオミクス
解析による小児がん検出の
可能性

聖アンナ小児がん研究センターの研究では、遺伝子異常の少ない小児がん患者におけるcfDNA解析の可能性を検証しました。NovaSeq™ 6000システム上でcfDNAのWGSとエピジェネティック解析を組み合わせ、cfDNA断片化パターンを特性評価することで、研究チームはcfDNA解析が小児腫瘍および遺伝子変異の少ないその他のがんの検出、分類、モニタリングに成功する可能性があることを見出しました。³⁴

ゲノムワイドなctDNA
シーケンスによる、
微小残存病変の効果的な
モニタリング

ニューヨークゲノムセンターのサイエンティストたちは、イルミナのシステム上でcfDNAのWGSを用いて、膵がんおよびCRCの患者における腫瘍負荷と術後の残存病変をモニタリングしました。存在する腫瘍断片濃度が低いことから、MRDのある患者からctDNAを検出する際に超ディープシーケンスは効果的ではないと仮定しました。彼らの解析メソッドは、10,000を超えるSNVを統合するためにゲノムワイドなcfDNAシーケンスを必要とし、これにより標準的なWGSパラメーターを用いたctDNAの検出が成功し、効果的なMRDモニタリングが可能になりました。³⁵

マルチオミクスアプローチに
よるがん進行の詳細な
全体像の提示

オレゴン健康科学大学の研究者たちは、治療中の転移性乳がんのオミクスおよび多次元空間(OMS:omic and multidimensional spatial)アトラスを作成することを目的に、3.5年の長期研究を実施しました。臨床メタデータと包括的なDNA、RNA、タンパク質プロファイリング、連続組織生検の免疫染色、ctDNAのリキッドバイオプシー解析とを組み合わせました。³⁶

推奨されるワークフロー: TruSight Oncology 500 ctDNA

TruSight Oncology 500 ctDNA(図6、表6)はNovaSeq 6000システム(表7)およびDRAGEN™ TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software(表8)とともに、リキッドバイオプシー検体から包括的なゲノムプロファイリング(CGP)を可能にします。TruSight Oncology 500 ctDNAに含まれるコンテンツでは、523遺伝子から腫瘍形成に関与すると思われるバリエーションを評価できます。これらのバリエーションには、1塩基変異(SNV)、挿入/欠失(Indel)、コピー数バリエーション(CNV)、再編成および腫瘍変異負荷(TMB)やマイクロサテライト不安定性(MSI)などの免疫腫瘍学バイオマーカーが含まれます。

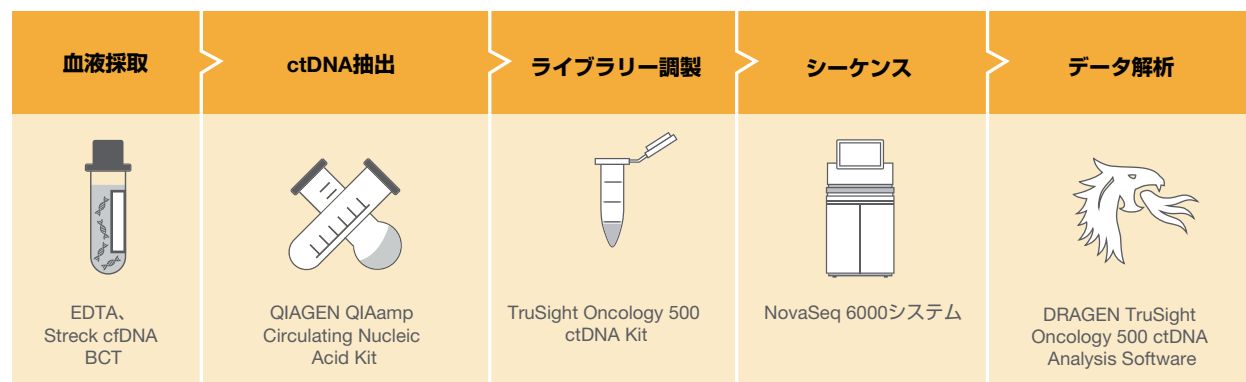


図6: TruSight Oncology 500 ctDNAワークフロー

表6: ライブラリー調製

製品名	TruSight Oncology 500 ctDNA Kit
サンプルの種類	血液由来のcfDNA
インプット量	30 ng cfDNA
ハンズオンタイム	～10.5時間

表7: シーケンス

製品名	NovaSeq 6000システム
フローセル当たりのサンプル数	S2フローセル(8億リード):8
	S4フローセル(8億リード):24
推奨リード長	151 bp × 2
シーケンスランタイム	S2フローセル:36時間
	S4フローセル:45時間

表8: データ解析

パイプライン	アプリケーション
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software	シーケンスアライメント、Collapsingによるエラー補正、 バリエーションコール、MSIスコアリング、TMB測定を実施

**関連するアプリケーションノートまたは
その他のコンテンツへのリンク**

『TruSight Oncology 500 ctDNA』

<https://jp.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/trusight-oncology-500-ctdna-data-sheet-m-gl-00843/trusight-oncology-500-ctdna-data-sheet-m-gl-00843-jpn.pdf>

『TruSight Oncology 500 ctDNA provides robust performance for detecting variants at low allele frequency』

<https://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/trusight-umi-rare-variant-technote-1000000050426.pdf>

『Accurate quantification of cfDNA for use in TruSight Oncology 500 ctDNA』

<https://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/cfdna-quantification-tech-note-1170-2020-001.pdf>

『Searching for cancer driver gene expression in clues in cell-free DNA』

<https://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/icomunity/heitzer-ulz-graz-interview-hiseq2500-cancer-1170-2016-022.pdf>

**関連するライブラリー調製キットまたは
その他の関連製品へのリンク**

TruSight Oncology 500 ctDNA

<https://jp.illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/trusight-oncology-500-ctdna.html>



cfDNAのメチル化パターン

異常なメチル化パターンは多くのがんの特徴です。³⁷ DNAメチル化の変化は腫瘍形成の初期に起こり、ゲノムの大半が低メチル化され、CpGアイランドが高メチル化状態となります。^{37,38} 全体的なメチル化パターンにおけるこの変換により、ゲノム不安定性や腫瘍抑制遺伝子のサイレンシングにつながり、腫瘍進行と転移が促進されます。^{34,35} 重要なこととして、複数の研究からctDNAのメチル化パターンは発生源の細胞/組織に存在するパターンを繰り返していることが示されています(図7)。^{40,41} このことは、ctDNAメチル化のリキッドバイオブシー解析はがんの早期検出、発生源の組織の解析、微小残存病変(MRD)のサーベイランス、治療奏効のモニタリングなどに使用できることを示しています。



Jasmine Zhou, PhD
カリフォルニア大学ロサンゼルス校

“ エピジェネティックなマーカーは、異なる環境因子への個別の曝露を反映しているため、がん発生に関するリアルタイムなリスクに対する曝露を反映しています。 ”

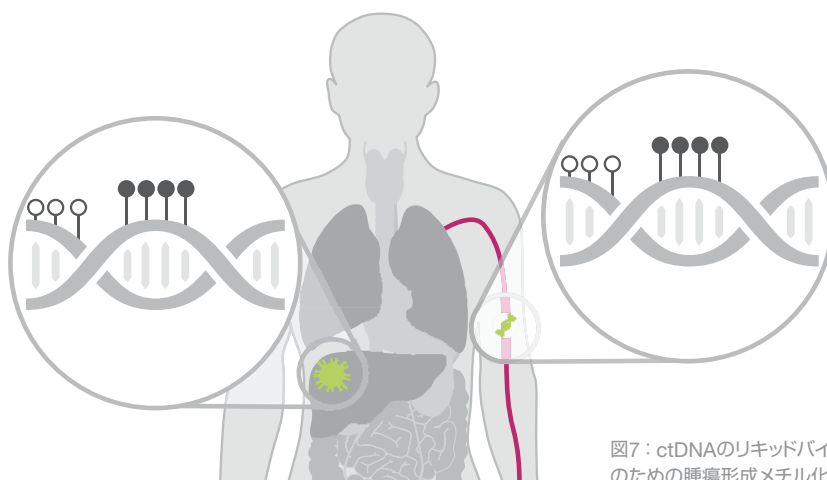


図7: ctDNAのリキッドバイオブシー解析は早期検出のための腫瘍形成メチル化パターンを同定します。

研究例

cfDNAメチル化解析が原発腫瘍のエピジェネティクスに洞察を提供

ユニバーシティカレッジダブリン、Cancer Biology and Therapeutics Laboratoryの研究者たちは、cfDNAのメチル化パターンをプロファイリングし、リキッドバイオブシーが前立腺がんメチロームをどれほどうまく捉えられているかを評価しました。イルミナのInfinium™ MethylationEPIC BeadChipを用いて、血中cfDNAのメチル化プロファイルが原発腫瘍のものと非常によく相関していることを示すことができました。このことはリキッドバイオブシーが、腫瘍に関連したエピゲノムの変化を検証するための代わりとして優れていることを示しています。⁴²

低インプット量のcfDNAに関するアレイベースのエピジェネティック解析の可能性

バーミンガム大学、Institute of Cancer and Genomic Sciencesの研究チームは、頭頸部扁平上皮細胞がん(HNSCC)患者の血液由来ctDNA検体中のDNAメチル化パターンをプロファイリングしました。Infinium MethylationEPIC BeadChipを用いて、インプット量が非常に少ないctDNA(約20 ng)を対象に評価し、固形腫瘍バイオブシーから得た結果と比較しました。結果より、インプット量を10 ngに減らしたときにctDNAのメチル化変化を確実に検出できる可能性が示され、このことはこのマイクロアレイベースのアッセイに対する新しいアプリケーションであることを示しています。⁴³

cfDNAのバイサルファイト シーケンシングによる がん検出の可能性

Mayo ClinicとUS Oncology Research社の研究者たちによる共同研究が実施され、イルミナのNovaSeq 6000システム上で全ゲノムバイサルファイトシーケンス(WGBS)により、cfDNAメチル化パターンがプロファイリングされました。この研究には合計6,500名以上の被験者が含まれました(50種類以上の異なる種類のがん患者約2,400名および約4,000名の非がん対照者)。結果より、cfDNAメチル化シーケンスは、さまざまなステージの幅広いがんの種類を高い感度と特異性を伴って検出できることが証明されました。⁴⁴

cfDNAのマルチオミクス アクセスによる新規がん バイオマーカーの同定

イラン、マシュハドのサイエンティストたちは、精確かつ非侵襲的なスクリーニングとCRCの検出のための新しいバイオマーカーを同定するために、ctDNA中のメチル化差異領域(DMR)を特定し、これらのパターンと遺伝子発現データの相互関係を示すことを試みました。候補となるバイオマーカー遺伝子には、CLDN1、INHBA、およびSLC30A10が含まれ、cfDNA解析により腫瘍組織と正常組織の間で有意な発現量の差が検出されました。⁴⁵

推奨されるワークフロー：Infinium MethylationEPIC BeadChip

Infinium MethylationEPIC BeadChip(図8、表9)はiScan™システム(表10)とGenomeStudio™ソフトウェア(表11)を統合し、ゲノム全体から85万以上のメチル化サイトを検証することが可能です。BeadChipに選択されているコンテンツは、CpGアイランド外のCpGサイト、腫瘍と正常検体で同定された異なるメチル化サイトなどが含まれます。リキッドバイオブシーとcfDNAメチル化プロファイルを組み合わせて、がんのより詳細な特性評価につなげることが可能です。



図8：Infinium MethylationEPIC BeadChipワークフロー

表9：BeadChipハイブリダイゼーション

製品名	Infinium MethylationEPIC BeadChip
インプット量	10~250 ng cfDNA ^{a,b}
マーカー数	サンプルあたり85万以上のCpGサイト
サンプルの種類	血液由来のcfDNA
アレイあたりのサンプル数	8

^a 独立した研究では少量のcfDNAインプット量で結果の成功が示されていますが^{42,43}、イルミナはcfDNAの使用に対してInfinium MethylationEPIC BeadChipを検証しておらず、最適な性能には250 ngのDNAインプット量を推奨しています。

^b 一部の研究では、Infinium MethylationEPIC BeadChipでcfDNA検体を処理する前に、Infinium FFPE DNA Restoration Kitを使用することを推奨しています。イルミナはこれらの方法を社内で検証していません。

表10：アレイスキャン

製品名	iScanシステム
説明	Infinium BeadChipsのハイスループット処理
BeadChipあたりのスキャン時間	20分
サンプルあたりのスキャン時間	～2.5分
製品名	NextSeq 550システム
説明	シーケンシングとアレイ性能を搭載した柔軟性のあるスキャナー
BeadChipあたりのスキャン時間	40分
サンプルあたりのスキャン時間	～5分

表11：データ解析

アプリケーション	説明
GenomeStudioソフトウェアMethylation Module	メチル化アレイのためのGenomeStudioはコントロールコールとQC視覚化機能のために使用できます。二次解析はユーザーベースで開発されたBioConductorパッケージで実施します。
BioConductorパッケージ	minfiやSeSAMeなどのRベースのパッケージは、高度な品質管理、データプロセス、視覚化および推測が可能です。メチル化レベルを算出し、多くのサンプルとの比較が可能です。

リソースまたは関連コンテンツ

『Infinium Methylation EPIC Kit』

<https://science-docs.illumina.com/documents/Microarray/infinium-methylation-epic-data-sheet-1070-2015-008/infinium-methylation-epic-ds-1070-2015-008.pdf>

『Automated bisulfite conversion for Infinium Methylation BeadChips』

<https://jp.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/automated-bisulfite-infinium-methylation-tech-note-m-gl-00144/automated-bisulfite-Infinium-methylation-tech-note-m-gl-00144.pdf>

メチル化アレイデータ解析のヒント

<https://jp.illumina.com/techniques/microarrays/methylation-arrays/methylation-array-data-analysis-tips.html>

関連するライブラリー調製キットまたはその他の関連製品へのリンク

Infinium MethylationEPIC BeadChip製品ページ

<https://jp.illumina.com/products/by-type/microarray-kits/infinium-methylation-epic.html>

Infinium FFPE DNA Restoration Kit製品ページ

<https://jp.illumina.com/products/by-type/molecular-biology-reagents/infinium-ffpe-qc-dna-restoration.html>

cfRNAおよびctRNA

cfRNAは血流に存在する複数種類の細胞だけでなくがん細胞からも放出されます。⁴⁶⁻⁴⁸ これらのctRNAはリキッドバイオブシーを評価することで、特異的ながんの同定、がん発生の検出、組織源の解明、疾患の分子メカニズムの解明、治療奏効のモニタリングなどが可能となるバイオマーカー候補です。⁴⁹ すべての細胞/組織で同一（遺伝的バリエーション以外）のDNAとは異なり、RNAは細胞の種類と組織間で動的かつ異なる発現を示します。これにより、ctRNAを用いることでがんを検出したり、体内におけるがんの存在する可能性のある場所を特定することが可能です（図9）。RNA発現が多様であることから、ctRNAを使用して疾患早期にがんのサブタイプを決定し分類することができる可能性があると考えられます。これは、同一臓器または組織と関連するがんであっても、進行、治療オプションおよび予後に大きな差があることから重要です。⁵⁰

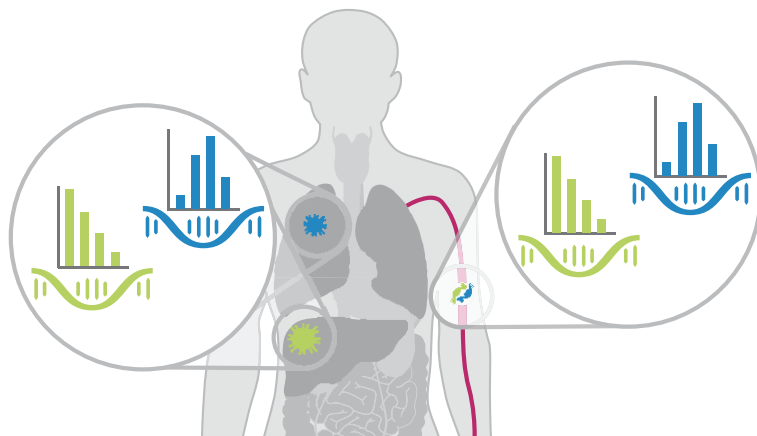


図9：ctRNAのリキッドバイオブシー解析は組織ベースの遺伝子発現パターンをプロファイルし、腫瘍の場所を特定します。

研究例

cfRNAシーケンシングによるがん検出のための新規RNAバイオマーカーの同定

GRAIL社の研究チームは、TruSeq™ RNA Exome KitとHiSeq Xシステムを使用し、乳がん患者と肺がん患者のcfRNAに関する初めてのトランスクリプトームワイドな特性評価を実施しました。およそ60,000遺伝子を検証し、結果より70%近くはがんのない人々からのcfRNAでは検出されなかったことが示されました。これらの転写産物のより詳細な特性評価により、その多くが、がんの特性評価、サブタイプの分類および発生源組織の追跡のための信頼性の高いRNAバイオマーカーとして利用できる可能性があることが分かりました。⁵⁰

cfRNAの特徴と妊娠高血圧腎症との相関関係

イルミナの研究者たちがアカデミックの研究者たちと共同で、早期に発症した重度の妊娠高血圧腎症(PE)と診断された患者からの40検体と対照の73検体についてcfRNAシーケンシングを実施しました。胎盤機能不全、胎児発達障害およびその他の既知のPE表現型に関連することが知られている30遺伝子が発現差解析で同定されました。⁵¹ これらの結果はがん研究の例ではありませんが、cfRNAの特徴が疾患状況と強く相関していることを示しており、腫瘍学におけるcfRNA解析の可能性を示しています。

cfRNAシーケンシングによる妊娠高血圧腎症の早期検出のためのRNAバイオマーカーの同定

スタンフォード大学の研究者たちはNovaSeq 6000システムを使って、およそ200名の妊娠女性からのcfRNAをシーケンシングし、PEと関連する転写産物の変化を検証しました。研究者たちは、PEを臨床症状が出る前に早期に予測するためのリキッドバイオブシーアッセイの基となる可能性のある18遺伝子を同定しました。⁵² これは疾患バイオマーカーとしてcfRNAの有用性の可能性を示す別の例です。

推奨されるワークフロー：Illumina RNA Prep with Enrichment

Illumina RNA Prep with Enrichment(図10、表12～14)はNovaSeq 6000システム、NextSeq 1000システムまたはNextSeq 2000システム(表15)およびDRAGEN RNA Pipeline(表16)とともに、リキッドバイオプシー検体からRNA-Seqを行うことが可能です。この迅速かつスケーラブルなライブラリー調製ソリューションは、柔軟性を最大にするために、事前構築された検証済みのさまざまなプローブプールやカスタム化されたプローブセットに対応します。Illumina Exome Panelを使用し、コーディングRNA配列の包括的なカバレッジを達成することができます。

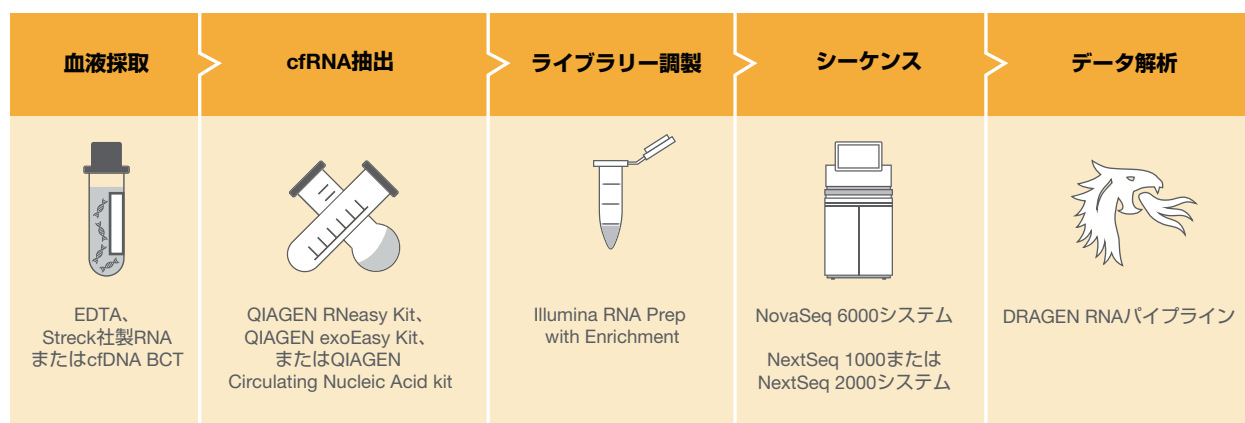


図10：Illumina RNA Prep with Enrichmentワークフロー

表12：血液採取

パラメーター	仕様
推奨される採血管(BCT)	Streck社製RNAまたはcfDNA BCT ^a
推奨される採血量	全血4 mL ^b

^a Streck社製RNA BCTはcfRNA分離に最適ですが、cfDNAチューブも使用できます。

^b 推奨採血量は10 mLであり、4 mLを下回る場合は検体失敗の確率が高くなります。

表13：cfRNA抽出

製品名	説明
QIAGEN RNeasy Kit	トータルRNAを分離
QIAGEN exoEasy Kit	エクソームおよびその他の細胞外小胞の分離
QIAGEN QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	cfDNAまたはcfRNAの分離

表14：ライブラリー調製

製品名	Illumina RNA Prep with Enrichment
サンプルの種類	血液、その他の生体液由来のctRNA
インプット量	～5 ng cfRNA(～5 mL血漿)
合計ライブラリー調製時間	～9.5時間
サンプルインデックスセット	384インデックスを利用可能

^a 濃縮ベースのプロトコールはサンプルの種類とアプリケーション中で一貫した性能を発揮しますが、リボソーム除去したトータルRNAは使用例に応じて使用することができます。

表15：シーケンス

製品名	NextSeq 1000/2000システム	NovaSeq 6000システム
最も重視する点	装置のコストとデスクトップサイズ	サンプルあたりのコストの低さ
フローセルあたりのサンプル数 ^a		SPフローセル(13~16億リード): 8~10
	P1フローセル(2億リード):1~2	S1フローセル(26~32億リード): 17~21
	P2フローセル(8億リード):5	S2フローセル(66~82億リード): 44~54
	P3フローセル ^b (24億リード):16	S4フローセル(160~200億リード): 106~133
推奨リード長 ^c	101 bp × 2	101 bp × 2

^a シーケンス深度は濃縮を使用するかどうかによって決まります。濃縮後のシーケンシングには、サンプルあたり1億~1.5億リードが推奨されます。特定の一般的ではないアプリケーションには追加のリードが必要になることがあります。

^b P3フローセルはNextSeq 2000システムのみで利用できます。

^c リード長は実験目的に応じて異なることがあります。集団全体のRNAレベルの解析には、短いリード(例、50 bp)で十分な場合があります。より詳細な解析(例、スプライシングイベント、バリエーションなど)には150 bpのリード長が推奨されます。

cfRNA-Seqはより高いバックグラウンドノイズを示し、標準的なRNA-Seqよりもわずかな変化が出ます。濃縮プロトコルを使用している場合、組織レベル解析と同等にするためには、cfRNA-Seqに対して一般的な基準の2倍のリード深度を使用する必要があります。濃縮されていないリボソーム除去検体を使用する場合、cfRNA-Seqには3倍のシーケンス深度が必要になることを見込んでおく必要があります。

表16：データ解析

パイプライン	アプリケーション
DRAGEN RNAパイプライン	迅速なアライメント、スプライスジャンクションマッピングと定量、および融合遺伝子検出

関連するアプリケーションノートまたは その他のコンテンツへのリンク

『Illumina RNA Prep with Enrichment』
<https://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/products/datasheets/illumina-rna-enrichment-data-sheet-470-2020-001-jpn.pdf>

Deciphering the role of long noncoding RNA in Cancer
<https://jp.illumina.com/science/customer-stories/icomunity-customer-interviews-case-studies/vandesompele-biogazelle-interview-nextseq-lncra.html>

『Improved detection of circulating transcripts』
<https://jp.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-rna-enrichment-crna-app-note-470-2020-009/illumina-rna-enrichment-crna-app-note-470-2020-009.pdf>

関連するライブラリー調製キットまたは その他の関連製品へのリンク

Illumina RNA Prep with Enrichment製品ページ
<https://jp.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/rna-prep-enrichment.html>

リキッドバイオブシーのこれから

リキッドバイオブシーに対するNGSのアプリケーションは、これまで以上に腫瘍増殖と進行の詳細を知る機会を作り出しています。NGSによるリキッドバイオブシーからは、腫瘍の不均一性、変異の複雑性、発生源の組織などについてより包括的な情報を得ることができます。テクノロジーが進歩し続けるにつれて、ゲノム、トランスクリプトーム、エピゲノム、プロテオームの解析を統合したマルチオミクスアプローチをリキッドバイオブシーに応用できる可能性があります。⁵³ マルチオミクスとリキッドバイオブシーを統合する能力は、がんメカニズムに対する、より深い洞察と包括的な答えを得るために類まれな検出力を提供することでしょう。

がんの分子特性評価以外に、将来的にはリキッドバイオブシーによるスクリーニングが、コレステロールや血糖などのように、年1回の身体検査の一部として標準的な予防ケアに取り込まれ、早期ステージの腫瘍を検出できるようになるかもしれません。がん患者にとっては、リキッドバイオブシーの非侵襲的な性質により、治療に対する反応や疾患再発をモニタリングし、経時的にがんを追跡するための長期研究が可能になります。最終的に、標的療法、免疫療法およびその他の新しいアプローチと組み合わせたときに、リキッドバイオブシーは多くのがん患者に対する治療法の提供に役に立つでしょう。

詳細はこちら

がん研究のメソッドガイド

<https://jp.illumina.com/areas-of-interest/cancer/research/sequencing-methods.html>

シングルセルシーケンス

<https://jp.illumina.com/techniques/sequencing/rna-sequencing/ultra-low-input-single-cell-rna-seq.html>

ctDNAシーケンス

<https://jp.illumina.com/areas-of-interest/cancer/research/sequencing-methods/non-invasive-cancer-biomarkers.html>

がんエピジェネティクス

<https://jp.illumina.com/areas-of-interest/cancer/research/cancer-epigenetics.html>

がんトランスクリプトーム解析

<https://jp.illumina.com/areas-of-interest/cancer/research/sequencing-methods/cancer-rna-seq.html>



Ellen Heitzer, PhD
グラーツ医科大学

リキッドバイオブシーにより、診断から治療奏効、がん再発まで、疾患の全体の経過を通して被験者を追跡できます。

参考文献

- ¹Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. [Cancer statistics for the year 2020: an overview](#). *Int J Cancer*. 2021; Apr 5. doi: 10.1002/ijc.
- ²Riggio AI, Varley KE, Welm AL. [The lingering mysteries of metastatic recurrence in breast cancer](#). *Br J Cancer*. 2021;124(1):13-26. doi: 10.1038/s41416-020-01161-4.
- ³World Health Organization. WHO. Cancer. 2019. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> Accessed February 2, 2022.
- ⁴Aggarwal C, Thompson JC, Black TA, et al. [Clinical Implications of Plasma-Based Genotyping With the Delivery of Personalized Therapy in Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer](#). *JAMA Oncol*. 2019;5(2):173-180. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.4305.
- ⁵Sholl LM, Do K, Shivdasani P, et al. [Institutional implementation of clinical tumor profiling on an unselected cancer population](#). *JCI Insight*. 2016;1(19):e87062. doi: 10.1172/jci.insight.87062.
- ⁶Meric-Bernstam F, Brusco L, Shaw K. [Feasibility of Large-Scale Genomic Testing to Facilitate Enrollment Onto Genomically Matched Clinical Trials](#). *J Clin Oncol*. 2015;33(25):2753-62. doi: 10.1200/JCO.2014.60.4165.
- ⁷Brown MV, McDunn JE, Gunst PR, et al. [Cancer detection and biopsy classification using concurrent histopathological and metabolomic analysis of core biopsies](#). *Genome Med*. 2012;4(4):33. doi: 10.1186/gm332.
- ⁸Plaks V, Koopman CD, Werb Z. [Circulating tumor cells](#). *Science*. 2013;341(6151):10.1126/science.1235226. doi: 10.1126/science.1235226.
- ⁹Grabuschnig S, Bronkhorst AJ, Holdenrieder S, et al. [Putative origins of cell-free DNA in humans: a review of active and passive nucleic acid release mechanisms](#). *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):8062. doi: 10.3390/ijms21218062.
- ¹⁰Leighl 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. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0624.
- ¹¹Palmero R, Taus A, Viteri S, et al. [Biomarker Discovery and Outcomes for Comprehensive Cell-Free Circulating Tumor DNA Versus Standard-of-Care Tissue Testing in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer](#). *JCO Precis Oncol*. 2021; 5:93-102. doi: 10.1200/PO.20.00241.
- ¹²Quail M, Smith M, Coupland P, et al. [A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers](#). *BMC Genomics*. 2012;13:341. doi: 10.1186/1471-2164-13-341.
- ¹³Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. [Overview of next generation sequencing technologies](#). *Curr Protoc Mol Biol*. 2018;122(1):e59. doi: 10.1002/cpmb.59.
- ¹⁴Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. [Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer](#). *N Engl J Med*. 2004;351(8):781-791. doi: 10.1056/NEJMoa040766.
- ¹⁵Nanduri LK, Hissa B, Weitz J, Scholch S, Bork U. [The prognostic role of circulating tumor cells in colorectal cancer](#). *Expert Rev Anticancer Ther*. 2019;19(12):1077-1088. doi: 10.1080/14737140.2019.1699065.
- ¹⁶Xiu J, Liao K, Wu C, Wu W, Han S. [Using single-cell sequencing technology to detect circulating tumor cells in solid tumors](#). *Mol Cancer*. 2021;20(1):104. doi: 10.1186/s12943-021-01392-w.
- ¹⁷Drucker A, The EM, Kostyleva R, Rayson D, Douglas S, Pinto DM. [Comparative performance of different methods for circulating tumor cell enrichment in metastatic breast cancer patients](#). *PLoS One*. 2020;15(8):e0237308. doi: 10.1371/journal.pone.0237308.
- ¹⁸Banko P, Lee SY, Nagygyorgy V, et al. [Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood](#). *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):48. doi: 10.1186/s13045-019-0735-4.
- ¹⁹Castro-Giner F, Aceto N. [Tracking cancer progression: from circulating tumor cells to metastasis](#). *Genome Med*. 2020;12(1):31. doi: 10.1186/s13073-020-00728-3.

- ²⁰Fischer JC, Niederacher D, Topp SA, et al. [Diagnostic leukapheresis enables reliable detection of circulating tumor cells of nonmetastatic cancer patients](#). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(41):16580-5. doi: 10.1073/pnas.1313594110.
- ²¹Rossi E, Zamarchi R. [Single-cell analysis of circulating tumor cells: how far have we come in ght -omics era?](#) *Front Genet*. 2019;10. doi: 10.3389/fgene.2019.00958.
- ²²Lim SB, Lim CT, Lim WT. [Single-cell analysis of circulating tumor cells: why heterogeneity matters](#). *Cancers (Basel)*. 2019;11(10):1595.
- ²³Xu J, Liao K, Yang X, Wu C, Wu W, Han S. [Using single-cell sequencing technology to detect circulating tumor cells in solid tumors](#). *Mol Cancer*. 2021;20(1):104. doi: 10.1186/s12943-021-01392-w.
- ²⁴Lohr JG, Adalsteinsson VA, Cibulskis K, et al. [Whole exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer](#). *Nat Biotechnol*. 2014;32(5):479–484. doi: 10.1038/nbt.2892.
- ²⁵Stewart CA, Gay AM, Xi Y, et al. [Single-cell analyses reveal increased intratumoral heterogeneity after the onset of therapy resistance in small-cell lung cancer](#). *Nat Cancer*. 2020;1:423–436. doi: 10.1038/s43018-019-0020-z.
- ²⁶D'Avola D, Villacorta-Martin C, Martins-Filho SN, et al. [High-density single cell mRNA sequencing to characterize circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma](#). *Sci Rep*. 2018;8:11570. doi: 10.1038/s41598-018-30047-y.
- ²⁷Chin R, Chen K, Usmani A, et al. [Detection of Solid Tumor Molecular Residual Disease \(MRD\) Using Circulating Tumor DNA \(ctDNA\)](#). *Mol Diag Ther*. 2019;23(3):311–331. doi: 10.1007/s40291-019-00390-5.
- ²⁸Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. [Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies](#). *Sci Transl Med*. 2014;6(224):224ra24. doi: 10.1126/scitranslmed.3007094.
- ²⁹Hillen F, Griffioen AW. [Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond](#). *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(3-4):489–502. doi: 10.1007/s10555-007-9094-7.
- ³⁰Sanz-Garcia E, Zhao E, Bratman SV, Siu LL. [Monitoring and adapting cancer treatment using circulating tumor DNA kinetics: Current research, opportunities, and challenges](#). *Sci Adv*. 2022;8(4):eabi8618. doi: 10.1126/sciadv.abi8618.
- ³¹Rodriguez-Casanova A, Bao-Caamano A, Lago-Leston RM, et al. [Evaluation of a Targeted Next-Generation Sequencing Panel for the Non-Invasive Detection of Variants in Circulating DNA of Colorectal Cancer](#). *J Clin Med*. 2021;10(19):4487. doi: 10.3390/jcm10194487.
- ³²Razavi P, Li, BT, Brown DN, et al. [High-intensity sequencing reveals the sources of plasma circulating cell-free DNA variants](#). *Nat Med*. 2019;25(12):1928–1937. doi: 10.1038/s41591-019-0652-7.
- ³³Pellini B, Pejovic N, Feng W, et al. [ctDNA MRD Detection and Personalized Oncogenomic Analysis in Oligometastatic Colorectal Cancer From Plasma and Urine](#). *JCO Precis Oncol*. 2021;5:PO.20.00276. doi: 10.1200/PO.20.00276.
- ³⁴Peneder P, Stutz AM, Surdez D, et al. [Multimodal analysis of cell-free DNA whole-genome sequencing for pediatric cancers with low mutational burden](#). *Nat Comm*. 12;3230. doi: 10.1038/s41467-021-23445-w.
- ³⁵Zviran A, Schulman RC, Shah M, et al. [Genome-wide cell-free DNA mutational integration enables ultrasensitive cancer monitoring](#). *Nat Med*. 2020;26(7):1114–1124. doi: 10.1038/s41591-020-0915-3.
- ³⁶Johnson BE, Creason AL, Stommel JM, et al. [An omic and multidimensional spatial atlas from serial biopsies of an evolving metastatic breast cancer](#). *Cell Rep Med*. 2022;3(2):100525. doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100525.
- ³⁷Lissa D, Robles A. [Methylation analyses in liquid biopsy](#). *Transl Lung Cancer Res*. 2016;5(5):492–504. doi: 10.21037/tlcr.2016.10.03.

- ³⁸Laird P. [The power and promise of DNA methylation markers](#). *Nat Rev Cancer*. 2003;3(4):253-266. doi: 10.1038/nrc1045.
- ³⁹Huang J, Wang L. [Cell-free DNA methylation profiling analysis-technologies and bioinformatics](#). *Cancers (Basel)*. 2019;11(11):1741. doi: 10.3390/cancers11111741.
- ⁴⁰Luo H, Wei W, Ye Z, Zheng J, Xu R. [Liquid biopsy of methylation biomarkers in cell-free DNA](#). *Trends Mol Med*. 2021;27(5):482-500. doi: 10.1016/j.molmed.2020.12.011.
- ⁴¹Warton K, Lin V, Navin T, et al. [Methylation-capture and Next-Generation Sequencing of free circulating DNA from human plasma](#). *BMC Genomics*. 2014;15(1):476. doi: 10.1186/1471-2164-15-476.
- ⁴²Silva R, Moran B, Russell NM, et al. [Evaluating liquid biopsies for methylomic profiling of prostate cancer](#). *Epigenetics*. 2020;15(6-7):715-727. doi: 10.1080/15592294.2020.1712876.
- ⁴³Whalley C, Payne K, Domingo E, et al. [Ultra-low DNA input into whole genome methylation assays and detection of oncogenic methylation and copy number variants in circulating tumour DNA](#). *Epigenomes*. 2021;5(1):6. doi: 10.3390/epigenomes5010006.
- ⁴⁴Liu MC, Oxnard GR, Klein EA, et al. [Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA](#). *Ann Oncol*. 2020;31(6):745-759. doi: 10.1016/j.annonc.2020.02.011.
- ⁴⁵Kerachian MA, Javadmanesh A, Azghandi M, et al. [Crosstalk between DNA methylation and gene expression in colorectal cancer, a potential plasma biomarker for tracing this tumor](#). *Sci Rep*. 2020;10:2813. doi: 10.1038/s41598-020-59690-0.
- ⁴⁶Kopreski MS, Benko FA, Gocke CD. [Circulating RNA as a tumor marker: detection of 5T4 mRNA in breast and lung cancer patient serum](#). *Ann NY Acad Sci*. 2001;945:172-178.
- ⁴⁷Perhavec A, Cerkovnik P, Novakovic S, Zgajnar J. [The hTERT mRNA in plasma samples of early breast cancer patients, non-cancer patients and healthy individuals](#). *Neoplasma*. 2008;55(6):549-554.
- ⁴⁸Castellanos-Rizaldos E, Zhang X, Tadigotla VR, et al. [Exosome-based detection of activating and resistance EGFR mutations from plasma of non-small cell lung cancer patients](#). *Oncotarget*. 2019;10(30):2911-2920. doi: 10.18632/oncotarget.26885.
- ⁴⁹Cheung KWE, Choi SYR, Lee LTC, et al. [The potential of circulating cell free RNA as a biomarker in cancer](#). *Expert Rev Mol Diagn*. 2019;19(7):579-590. doi: 10.1080/14737159.2019.1633307.
- ⁵⁰Larson MH, Pan W, Kim, HJ, et al. [A comprehensive characterization of the cell-free transcriptome reveals tissue- and subtype-specific biomarkers for cancer detection](#). *Nat Commun*. 2021;12:2357. doi: 10.1038/s41467-021-22444-1.
- ⁵¹Munchel S, Rohrbach S, Randise-Hinchliff C, et al. [Circulating transcripts in maternal blood reflect a molecular signature of early-onset preeclampsia](#). *Sci Transl Med*. 2021;12(550):eaaz0131. doi: 10.1126/scitranslmed.aaz0131.
- ⁵²Moufarrej MN, Vorperian SK, Wong RJ, et al. [Early prediction of preeclampsia in pregnancy with cell-free RNA](#). *Nature*. 2022;602:689-694. doi: 10.1038/s41586-022-04410-z.
- ⁵³Keup C, Suryaprakash V, Storbeck M, Hoffmann O, Kimmig R, Kashmir-Bauer S. [Longitudinal Multi-Parametric Liquid Biopsy Approach Identifies Unique Features of Circulating Tumor Cell, Extracellular Vesicle, and Cell-Free DNA Characterization for Disease Monitoring in Metastatic Breast Cancer Patients](#). *Cells*. 2021;10(2):212. doi: 10.3390/cells10020212.

始めるなら今です



イルミナのマルチオミクス試薬、機器およびプロトコールは、何百ものハインパクトな査読済み論文で実証されています。

(pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=illumina+sequencing)



イルミナテクノロジーは1デバイスでマルチオミクス解析が可能な広範囲のアプリケーションを揃えており、これらのアプリケーションはマルチオミクス分野における新たな課題に対応するために構築されています。



イルミナは115カ国にわたる10,000以上のラボをサポートしています。24時間年中無休のテクニカルサポート専門家があなたのあらゆるプロジェクトをサポートするために待機しています。



トピックについて特訓コースが必要ですか? イルミナにはお客様の研究をサポートするための無料のオンライントレーニングリソースの幅広いライブラリーがあります。

(jp.support.illumina.com/training.html)

イルミナの担当者へのご相談、リキッドバイオプシーを
今すぐ始めるには、以下までお問い合わせください:

イルミナカスタマーソリューションセンター

[https://jp.illumina.com/company/
contact-us.html](https://jp.illumina.com/company/contact-us.html)

がん研究メソッドに関する詳細は こちらをご覧ください



イルミナの
がん研究メソッドガイドをダウンロードする:

jp.illumina.com/destination/cr-methods-guide.html

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/illumina

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

© 2022 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. M-GL-00678-JPN 18OCT2022

illumina®

