

# TruSight™ Tumor 170

同一 FFPE 腫瘍サンプルから DNA と RNA バリエントを包括的に検出する  
次世代シーケンスアッセイ

## 特長

- がん関連バリエントを包括的にカバー**  
 Small Variant、増幅、スプライスバリエント、融合の評価のための DNA と RNA からの 1 回で効率的なアッセイ
- 効率的な統合シーケンスワークフロー**  
 DNA の断片化や cDNA 合成後、統合されたワークフローにより DNA と RNA のライブラリーを並行調製
- 低品質サンプルからでも精確な結果**  
 40ng の DNA または RNA インプットで、FFPE サンプルからでもわずか 5% のアリル頻度のバリエントを検出

この難問を解決すべく、イルミナは TruSight Tumor 170 を開発しました。次世代シーケンサー（NGS）で実施するアッセイであり、固形腫瘍に関連する 170 遺伝子を対象として設計されています。TruSight Tumor 170 は濃縮ベースのターゲットパネルで、DNA と RNA を同時に解析し、さまざまな種類の遺伝子やバリエントを対象とします。パネルは、NextSeq™ 500、NextSeq 550、または HiSeq™ 2500 シーケンサーシステムと組み合わせてご使用いただけます（図 1）。

## 包括的ながん関連コンテンツ設計

TruSight Tumor 170 では、現在の RefSeq データベース<sup>2</sup> に準じ、170 遺伝子のすべてのコーディングエクソンをターゲットとしています（表 1）。遺伝子および各遺伝子のバリエント解析の種類は、European Society for Medical Oncology (ESMO)<sup>3</sup> などの専門組織が注目するコンテンツを漏らさぬよう慎重に選択されています。また、独立団体が公表する論文や後期薬剤臨床試験のデータも TruSight Tumor 170 の設計に勘案されています。これらの遺伝子および遺伝子領域には、55 の融合候補遺伝子およびスプライスバリエント候補遺伝子、148 の SNV と Indel、59 の増幅が含まれます。腫瘍学コミュニティ第一人者の見解を採用し、TruSight Tumor 170 は腫瘍形成に役割を果たす可能性が最も高いバリエントを包括的にカバーしています。

## はじめに

がんは世界的に死因の上位を占め、どの組織からも発生します。<sup>1</sup> がんの進行を理解し新しい治療法を開発するには、その腫瘍の遺伝学的根拠を解析することが重要です。しかし、多数の遺伝子が腫瘍の原因や進行の影響因子になる可能性があり、多くの異種腫瘍では複数のバリエーションが生じます。また、1 塩基変異 (SNV)、複数塩基変異 (MNV)、小さな挿入や欠失 (Indel)、増幅、スプライスバリエーション、遺伝子融合など多種のバリエーションにより、すべての遺伝子作用が変化する可能性があります。そのため、使用可能な手法がこれらのバリエーションの一部しかカバーしない場合、腫瘍を効率的に解析することは困難であり、貴重な組織、時間、および資源が余分に費やされることとなります。

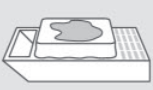





Illumina					PierianDx
FFPE 検体	サンプル	ライブラリー調製と濃縮	シーケンス	バリエントコール	解釈とレポート作成
					
FFPE 組織に対応	FFPE DNA/RNA 抽出と定量	ハイブリッドキャプチャー	NextSeq/HiSeq 2500 システム	TruSight Tumor 170 アプリ	PierianDx Clinical Genomics Workspace 搭載

図 1: TruSight Tumor 170 のワークフロー ラボの現行ワークフローにシームレスに統合できるよう最適化されており、核酸の抽出からバリエントコールまで 4 日以内に完了します。アッセイは、NextSeq シリーズまたは HiSeq 2500 システムでランが可能です。

表 1: TruSight Tumor 170 アッセイの遺伝子コンテンツ

SNV および Indel (DNA から)									
AKT1	BRIP1	CREBBP	FANCI	FGFR2	JAK3	MSH3	PALB2	RAD51D	TSC1
AKT2	BTK	CSF1R	FANCL	FGFR3	KDR	MSH6	PDGFRA	RAD54L	TSC2
AKT3	CARD11	CTNNB1	FBXW7	FGFR4	KIT	MTOR	PDGFRB	RB1	VHL
ALK	CCND1	DDR2	FGF1	FLT1	KMT2A (MLL)	MUTYH	PIK3CA	RET	XRCC2
APC	CCND2	DNMT3A	FGF2	FLT3	KRAS	MYC	PIK3CB	RICTOR	
AR	CCNE1	EGFR	FGF3	FOXL2	MAP2K1	MYCL1	PIK3CD	ROS1	
ARID1A	CD79A	EP300	FGF4	GEN1	MAP2K2	MYCN	PIK3CG	RPS6KB1	
ATM	CD79B	ERBB2	FGF5	GNA11	MCL1	MYD88	PIK3R1	SLX4	
ATR	CDH1	ERBB3	FGF6	GNAQ	MDM2	NBN	PMS2	SMAD4	
BAP1	CDK12	ERBB4	FGF7	GNAS	MDM4	NF1	PPP2R2A	SMARCB1	
BARD1	CDK4	ERCC1	FGF8	HNF1A	MET	NOTCH1	PTCH1	SMO	
BCL2	CDK6	ERCC2	FGF9	HRAS	MLH1	NOTCH2	PTEN	SRC	
BCL6	CDKN2A	ERG	FGF10	IDH1	MLL2	NOTCH3	PTPN11	STK11	
BRAF	CEBPA	ESR1	FGF14	IDH2	MPL	NPM1	RAD51	TERT	
BRCA1	CHEK1	EZH2	FGF23	INPP4B	MRE11A	NRAS	RAD51B	TET2	
BRCA2	CHEK2	FAM175A	FGFR1	JAK2	MSH2	NRG1	RAD51C	TP53	
増幅 (DNA から)									
AKT2	BRCA2	CHEK1	ERCC2	FGF5	FGF14	FGFR4	MDM4	NRG1	RAF1
ALK	CCND1	CHEK2	ESR1	FGF6	FGF19	JAK2	MET	PDGFRA	RET
AR	CCND3	EGFR	FGF1	FGF7	FGF23	KIT	MYC	PDGFRB	RICTOR
ATM	CCNE1	ERBB2	FGF2	FGF8	FGFR1	KRAS	MYCL1	PIK3CA	RPS6KB1
BRAF	CDK4	ERBB3	FGF3	FGF9	FGFR2	LAMP1	MYCN	PIK3CB	TFRC
BRCA1	CDK6	ERCC1	FGF4	FGF10	FGFR3	MDM2	NRAS	PTEN	
融合およびスプライスバリエント (RNA から)									
ABL1	BRAF	EML4	ETV4	FGFR4	KIF5B	MYC	NTRK2	PIK3CA	TMPRSS2
AKT3	BRCA1	ERBB2	ETV5	FLI1	KIT	NOTCH1	NTRK3	PPARG	
ALK	BRCA2	ERG	EWSR1	FLT1	KMT2A (MLL)	NOTCH2	PAX3	RAF1	
AR	CDK4	ESR1	FGFR1	FLT3	MET	NOTCH3	PAX7	RET	
AXL	CSF1R	ETS1	FGFR2	JAK2	MLL2	NRG1	PDGFRA	ROS1	
BCL2	EGFR	ETV1	FGFR3	KDR	MSH2	NTRK1	PDGFRB	RPS6KB1	
AXL	CSF1R	ETS1	FGFR2	JAK2	MLL2	NRG1	PDGFRA	ROS1	
BCL2	EGFR	ETV1	FGFR3	KDR	MSH2	NTRK1	PDGFRB	RPS6KB1	

## DNA と RNA で共通のワークフロー

TruSight Tumor 170 のライブラリー調製では、同一サンプルから抽出した DNA と RNA に同時に適用可能な濃縮手法が用いられます。最初の手順で、ゲノム DNA は断片化され RNA は cDNA に変換されます。その後、ライブラリー調製は共通のワークフローとなります (図 2)。

- 断片化された DNA、cDNA はシーケンス可能なライブラリーに変換されます。
- 対象領域がビオチン標識プローブにハイブリダイズされ、ストレプトアビジンビーズで磁気的にプルダウンされ、ライブラリープールを濃縮するため溶出されます。
- ライブラリーは、簡単なビーズベースプロトコルでノーマライズし、プール後、シーケンスします。

## TruSight Tumor 170 のデータ解析

イルミナのシーケンスシステムには、シーケンスデータの解析および管理を目的としたイルミナのゲノミクスコンピューティング環境である BaseSpace™ Sequence Hub というオプションが用意されています。シーケンスデータの保存、解析、アーカイブ、データ共有を安全に行うことができます。読みやすいフォーマットで

解析フロー下流のレポート作成が可能で、このレポートを使用してバリエーションコールができるように設計されています。信頼性の高い RNA バリエーションや高頻度の融合結果について、ユーザフレンドリーで内容を絞った内容を出力する他に、Small Variant、増幅、融合、スプライスバリエーションについても生データを出力することができます。

TruSight Tumor 170 アプリは BaseSpace Sequence Hub で使用可能です。ローカルベースの二次解析をご希望の場合は、Docker ベースイメージを提供いたします。詳細は担当営業までお問い合わせください。

## 高感度で信頼性の高いバリエーション検出

NGS でのディープシーケンスにより、高精度に腫瘍亜集団での体細胞バリエーションを明らかにすることができます。高品質のシーケンスを誇る NextSeq および HiSeq システムと組み合わせれば、TruSight Tumor 170 パネルがターゲット領域を均一にカバーしながら、250x 以上のカバレッジで、変異アレル頻度がわずか 5% の体細胞変異を同定します (表 2)。



図 2: 共通のライブラリー調製ワークフロー cDNA 合成 (RNA の場合) および断片化 (DNA の場合) の後、DNA と RNA は同じワークフローで処理されます。

表 2: 仕様

パラメーター	詳細
システム	NextSeq または HiSeq 2500 システム
パネルサイズ	533 kb DNA 358 kb RNA
最小インサートサイズ	79 bp DNA 63 bp RNA
必要な DNA インプット量	合計 40 ng
必要な RNA インプット量	合計 40 ng
ライブラリー調製時間	32 時間
シーケンスラン時間	24 時間 (NextSeq システム) または 27 時間 (HiSeq 2500 システム)
シーケンスラン	2 × 101 サイクル
キットサイズ	24 サンプル (DNA、RNA とも)
サンプルスルーブット	1 回のランで 8 サンプル (NextSeq システム) または Rapid ランで 6 サンプル (HiSeq 2500 システム)
感度	5% の変異アリル頻度 95% 以上の感度と特異性

### 低品質サンプルでも高いターゲットカバレッジを実現

FFPE 組織から抽出した核酸では、品質基準を満たさずターゲットカバレッジが不十分で、検出感度が下がる可能性があります。TruSight Tumor 170 では、DNA ではわずか 79bp、RNA では 63bp という短い断片の核酸からライブラリーを作製することでこの問題を解決しました。これにより、抽出した核酸が低品質でも、FFPE サンプルで高いカバレッジが実現可能です (図 3)。

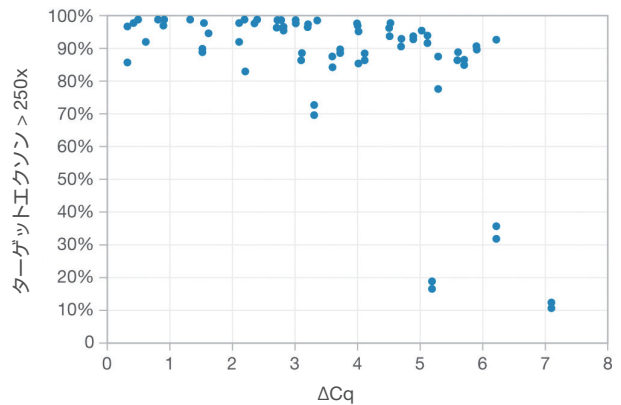


図 3: FFPE サンプルでのカバレッジ さまざまな品質の FFPE 腫瘍サンプルの DNA を抽出し、TruSight Tumor 170 アッセイを用いてライブラリーを作製し、NextSeq 500 システムでシーケンスを実施しました。各サンプルの品質の評価には qPCR を用い、DNA の増幅力を測定しました。ΔCq 値は、各 DNA サンプルの Ct 値から DNA 標準サンプルの Ct 値を引いた値です。

## 品質に関係なく Small Variant を確実に検出

TruSight Tumor 170 では、サンプルの品質に関わらず低頻度のバリエーションでも高い感度と精度で同定することができます。ターゲットカバレッジが高いので、特徴的な細胞株の低レベルのバリエーションでも確信を持ってコールすることができます (表 3)。TruSight Tumor 170 により、FFPE 腫瘍サンプルでは、わずか 5% の変異アリル頻度でもバリエーション検出が可能です (表 4)。

表 3: 特徴的な細胞株での Small Variant コール

遺伝子	変異	報告されている頻度	検出された頻度	カバレッジ
APC	R2714C	0.33	0.31	2547x
ARID1A	P1562fs	0.34	0.31	419x
BRAF	V600E	0.10	0.11	2282x
BRCA2	A1689fs	0.33	0.30	1097x
EGFR	G719S	0.24	0.22	2207x
EP300	K291fs	0.08	0.06	1359x
FBXW7	G667fs	0.34	0.30	2870x
FGFR1	P150L	0.08	0.08	1102x
FLT3	S985fs	0.10	0.10	1925x
FLT3	V197A	0.12	0.10	1908x
IDH1	S261L	0.10	0.09	2052x
KIT	D816V	0.10	0.15	1239x
KRAS	G13D	0.15	0.14	1507x
KRAS	G12D	0.06	0.07	1503x
MET	V237fs	0.06	0.06	3700x
MLH1	L323M	0.08	0.09	1725x
NF1	L626fs	0.08	0.10	1270x
NOTCH1	P668S	0.32	0.32	1637x
NRAS	Q61K	0.12	0.14	1824x
PDGFRA	G426D	0.34	0.29	2018x
PI3KCA	E545K	0.09	0.16	773x
PI3KCA	H1047R	0.18	0.15	1694x

既知のバリエーションを含むホルマリン固定細胞株 (Horizon Diagnostics 社 (製品番号 HD200)) から抽出した DNA から TruSight Tumor 170 アッセイでライブラリーを作製し、NextSeq 500 システムでシーケンスを行いました。すべての HD200 バリエーションで予想頻度と 100% 一致しました。

表 4: FFPE 腫瘍サンプルでの Small Variant 検出

サンプル	報告された変異	検出された変異	検出された頻度	カバレッジ
FFPE_Colon	TP53 R158C	TP53 R158C	0.057	1545x
FFPE_Bone	TP53 P72R	TP53 P72R	0.059	515x
FFPE_Brain1	PIK3CA E545G	PIK3CA E545G	0.078	289x
FFPE_Brain2	PIK3CA H1047R	PIK3CA H1047R	0.076	531x
FFPE_Breast	KRAS G12D	KRAS G12D	0.049	1671x
FFPE_Lung1	KRAS G12D	KRAS G12D	0.059	575x
FFPE_Lung2	TP53 C242F	TP53 C242F	0.080	691x
FFPE_Skin	TP53 R248Q	TP53 R248Q	0.050	1240x

FFPE 腫瘍サンプルから DNA を抽出して TruSight Tumor 170 アッセイでライブラリーを作製し、NextSeq 500 システムでシーケンスを行いました。8 つの FFPE サンプルすべてで、報告された変異と一致しました。

## FFPE サンプルから、増幅、融合、スプライスバリエーションの信頼性の高いコールが可能

TruSight Tumor 170 ではイルミナシーケンスシステムの感度と新しいソフトウェアプラットフォームが一体となり、増幅、融合、スプライスバリエーションを同時にコールすることができます。TruSight Tumor 170 アプリは新しいバリエーションコールアルゴリズムを採用し、さまざまな品質のサンプルの生のシーケンスデータからスプライスバリエーション、融合、遺伝子の増幅を正確にコールします (表 5、6)。

表 5: FFPE 腫瘍サンプルでの増幅コール

サンプル	報告された増幅	報告された増幅レベル	検出された増幅	検出された増幅レベル
FFPE_Bone	FGF19	1.4	FGF19	2.9
FFPE_Brain2	PDGFRA	2.3	PDGFRA	2.9
FFPE_Breast	RPS6KB1	2.4	RPS6KB1	2.4
FFPE_Colon	BRCA2	2.2	BRCA2	2.0
FFPE_Lung1	PIK3CA	2.4	PIK3CA	2.7
FFPE_Lung2	FGFR1	2.4	FGFR1	2.9
FFPE_Lung3	MYC	2.2	MYC	2.8
FFPE_Lung4	CCNE1	2.1	CCNE1	2.2
FFPE_Lung5	EGFR	2.2	EGFR	4.5
FFPE_Lung6	CCND1	2.3	CCND1	2.9
FFPE_Stomach1	CDK6	2.3	CDK6	1.7
FFPE_Stomach2	MET	1.5	MET	1.4

FFPE 腫瘍サンプルから DNA を抽出し、TruSight Tumor 170 アッセイでライブラリーを作製し、NextSeq 500 システムでシーケンスを行いました。12 個の FFPE サンプルすべてで、バリエーションが 100% 一致しました。

表 6：FFPE 組織および細胞株での融合およびスプライスバリエントコール

サンプル	DV200	報告されたバリエント	検出されたバリエント
FFPE_Brain Tissue	なし	EGFR VIII Splice Variant	EGFR VIII Splice Variant
FFPE_Breast Tissue	81	RPS6KB1-VMP1, RPS6KB1-DIAPH3, CCDC170-ESR1 fusions	RPS6KB1-VMP1, RPS6KB1-DIAPH3, CCDC170-ESR1 fusions
FFPE_Ewing's Tissue	48.9	EWSR1-FLI1 fusion	EWSR1-FLI1 fusion
FFPE_Gastric Cell Line	93	MET Exon 14 Skipping Splice Variant	MET Exon 14 Skipping Splice Variant
FFPE_Lung CellLine	93	CCDC6-RET fusion	CCDC6-RET fusion
FFPE_Lung Tissue1	73.3	EML4-ALK fusion	EML4-ALK fusion
FFPE_Lung Tissue2	95	FGFR3-TACC3 fusions	FGFR3-TACC3 fusions
FFPE_Prostate Cell Line	95.5	ARV7 Splice Variant	ARV7 Splice Variant
FFPE_Prostate Tissue	28.7	TMPRSS2-ERG, TMPRSS2-GNPT fusions	TMPRSS2-ERG, TMPRSS2-GNPT fusions

FFPE 腫瘍サンプルから RNA を抽出後 TruSight Tumor 170 アッセイでライブラリーを作製し、NextSeq 500 システムでシーケンスを行いました。9 個の FFPE サンプルすべてで、バリエントが 100% 一致しました。DV200 の値は、ヌクレオチドが 200 個以上の RNA 断片の割合 (%) を表しており、シーケンスライブラリーの調製に用いる RNA の品質評価に利用しています。

## まとめ

TruSight Tumor 170 は、固形腫瘍でよくみられる体細胞バリエントの検出に適した統合ワークフローソリューションを提供します。膨大な種類の体細胞バリエントを効率的に評価するため、DNA と RNA のライブラリーを同時に調製し、シーケンスを行い、解析を行います。主要なオピニオンリーダーの意見や後期薬剤臨床試験のデータと併せてエビデンスに基づくガイドラインに従い開発されているため、がん関連遺伝子を包括的に把握し、FFPE の DNA および RNA から低頻度のバリエントでも正確に解析することができます。1 回のアッセイで 170 遺伝子やさまざまな種類のバリエントを評価することにより、TruSight Tumor 170 では、効率的で経済的なソリューションで腫瘍サンプルの遺伝学的研究を包括的に行うことができます。

## 詳細について

TruSight Tumor 170 の詳細は、  
[jp.illumina.com/TruSightTumor170](http://jp.illumina.com/TruSightTumor170) にアクセスしてください。

## 参考文献

1. American Cancer Society. [www.cancer.org](http://www.cancer.org). Accessed October 3, 2016.
2. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, et al. [Reference sequence \(RefSeq\) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation](#). *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D733-45.
3. European Society for Medical Oncology. [www.esmo.org](http://www.esmo.org). Accessed October 3, 2016.

## 製品情報

ライブラリー調製キット	サンプル数	カタログ番号
TruSight Tumor 170 Kit	24	OP-101-1004
TruSight Tumor 170 Kit, plus PierianDx	24	20032628
TruSight Tumor 170 Kit, with NextSeq v2.5 Reagents	24	20028821
TruSight Tumor 170 Kit, with NextSeq v2.5 Reagents, plus PierianDx	24	20032629

## 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](http://jp.illumina.com)

 [www.facebook.com/illumina](https://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](http://jp.illumina.com/tc)

© 2019 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](http://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。

**illumina**<sup>®</sup>