



イルミナiSchool

# Oncology Breakthrough: ウェビナーシリーズ5

低品質、微量FFPE  
サンプルへの対処方法:  
TruSeq RNA Access  
を用いた融合遺伝子検出

時間になりましたら開始しますので、しばらくお待ちください

2015年12月08日  
16:00-16:30  
イルミナ株式会社

今日の内容:

## Oncology Breakthrough: ウェビナーシリーズ5

「低品質、微量FFPEサンプルへの対処方法:  
TruSeq RNA Accessを用いた融合遺伝子検出」

- ▶ 発表者           イルミナ株式会社 シーケンシング・スペシャリスト  
                          鈴木 健介

(現在音声はミュートされています)

# セッション中の注意

- ▶ 音声はミュートされています
- ▶ ご質問がある場合は、WebEx の Q&A にてご入力ください
- ▶ セッションの最後に確認して、回答します

The image shows a WebEx session interface. At the top, a toolbar contains several icons: a back arrow, a microphone icon labeled '音声プロ...', a group of people icon labeled '参加者', a speech bubble icon labeled 'チャット', and a question mark icon labeled 'Q&A'. The 'Q&A' icon is highlighted with a red box. Below the toolbar, a green notification bar reads 'Mio Tonouchiのアプリケーションを表示...'. The main content area displays a slide titled 'イルミナオンラインセミナー RNAシーケンスを始めよう! セッション1 実践手法 トランスクリプトーム解析の今昔: なぜマイクロアレイ?なぜRNAシーケンス?' with the date '2011年9月8日 16:00-16:45' and the company name 'illumina®'. On the right side, a 'Q&A' window is open, showing a list of questions. The question '質問: 全てのパネリスト' is selected. Below the question list, a text input field contains the question '質問です。Nexteraの場合' and a '送信' (Send) button. This entire Q&A window area is highlighted with a red box.

# Disclaimer

- ▶ 本発表には、開発品目の紹介も含まれます。  
開発品目は仕様が変更される場合があります。
- ▶ イルミナ株式会社が本邦で提供する製品は、研究目的でのみ使用できます。診断目的に用いることはできません。

# 本日の内容

- ▶ TruSeq RNA Accessの特徴
- ▶ TruSeq RNA Access の製品詳細
- ▶ 利用例

# TruSeq RNA Access の特徴

FFPEサンプルから抽出した  
微量で分解された Total RNAから  
RNA seqを可能にし  
融合遺伝子の検出も可能にする

微量



20 ng

分解



RIN値2

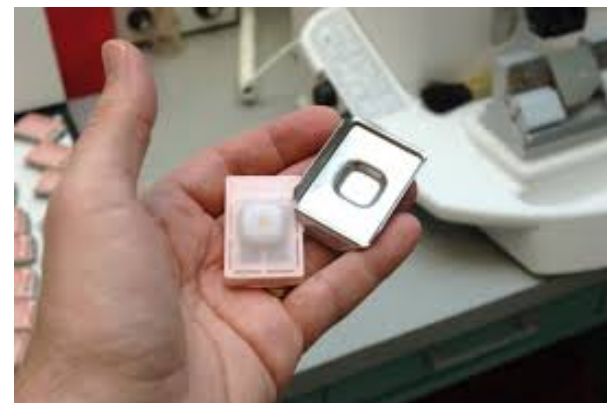
融合遺伝子



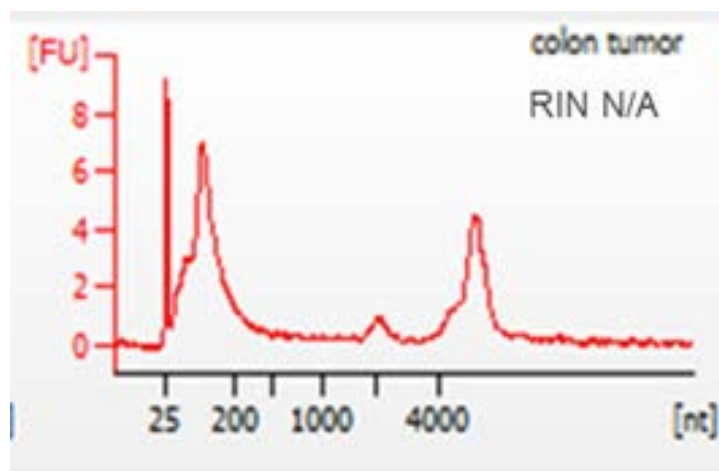
検出可能

# FFPEサンプルからのRNA-Seqにおける課題

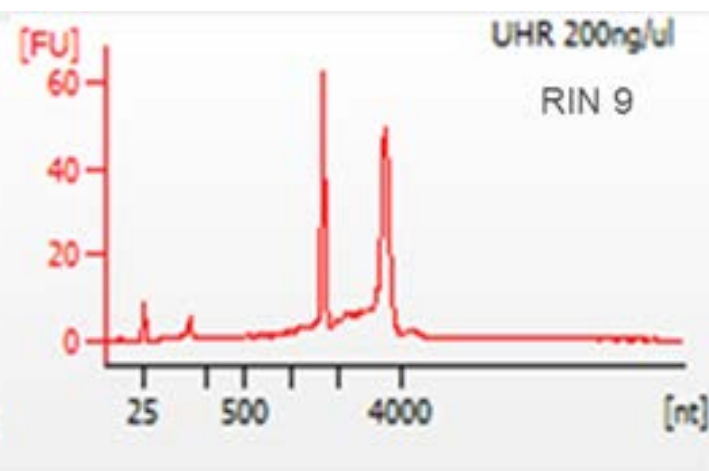
- ▶ 微量
- ▶ 分解
- ▶ 化学的に修飾



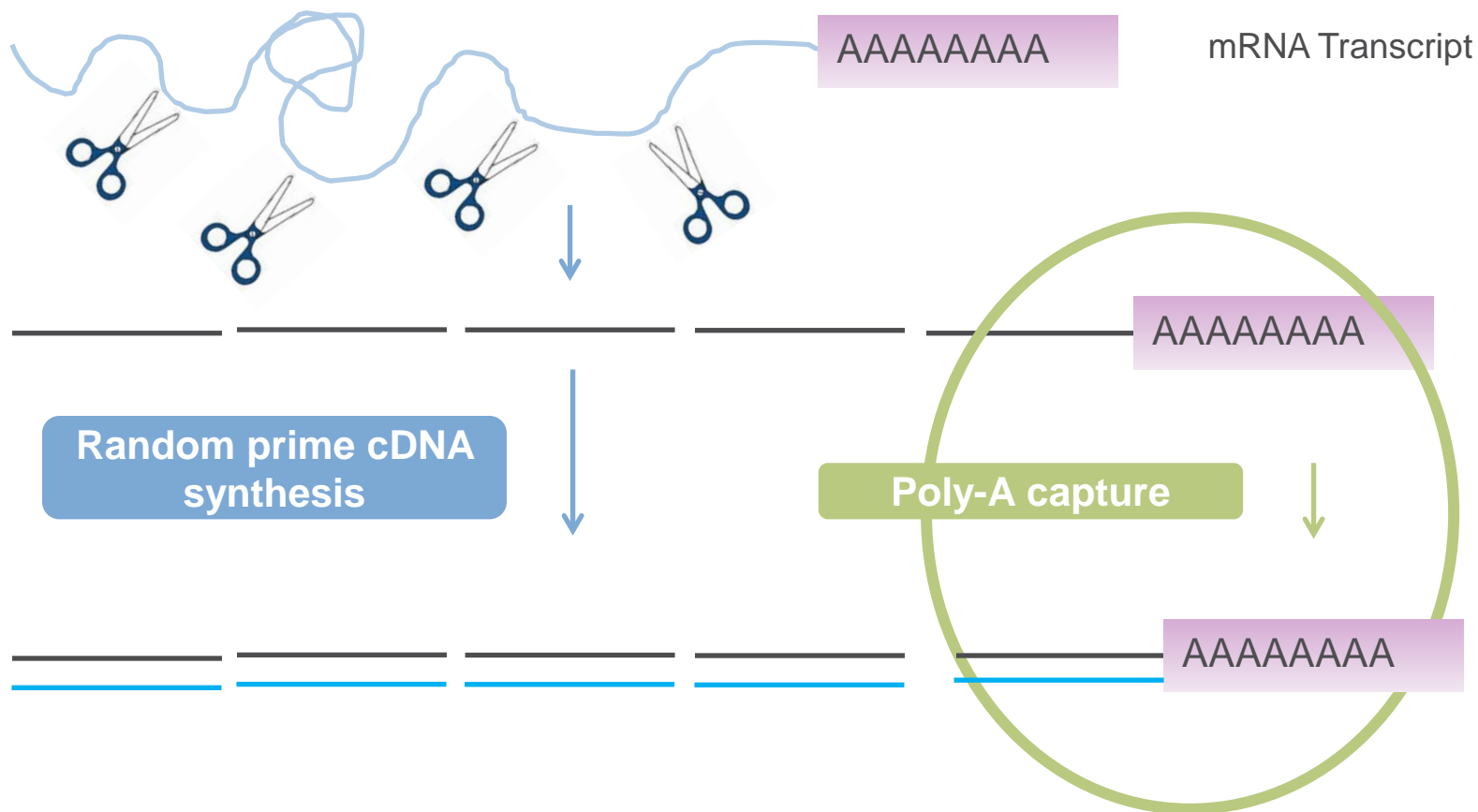
FFPE



Fresh/Frozen

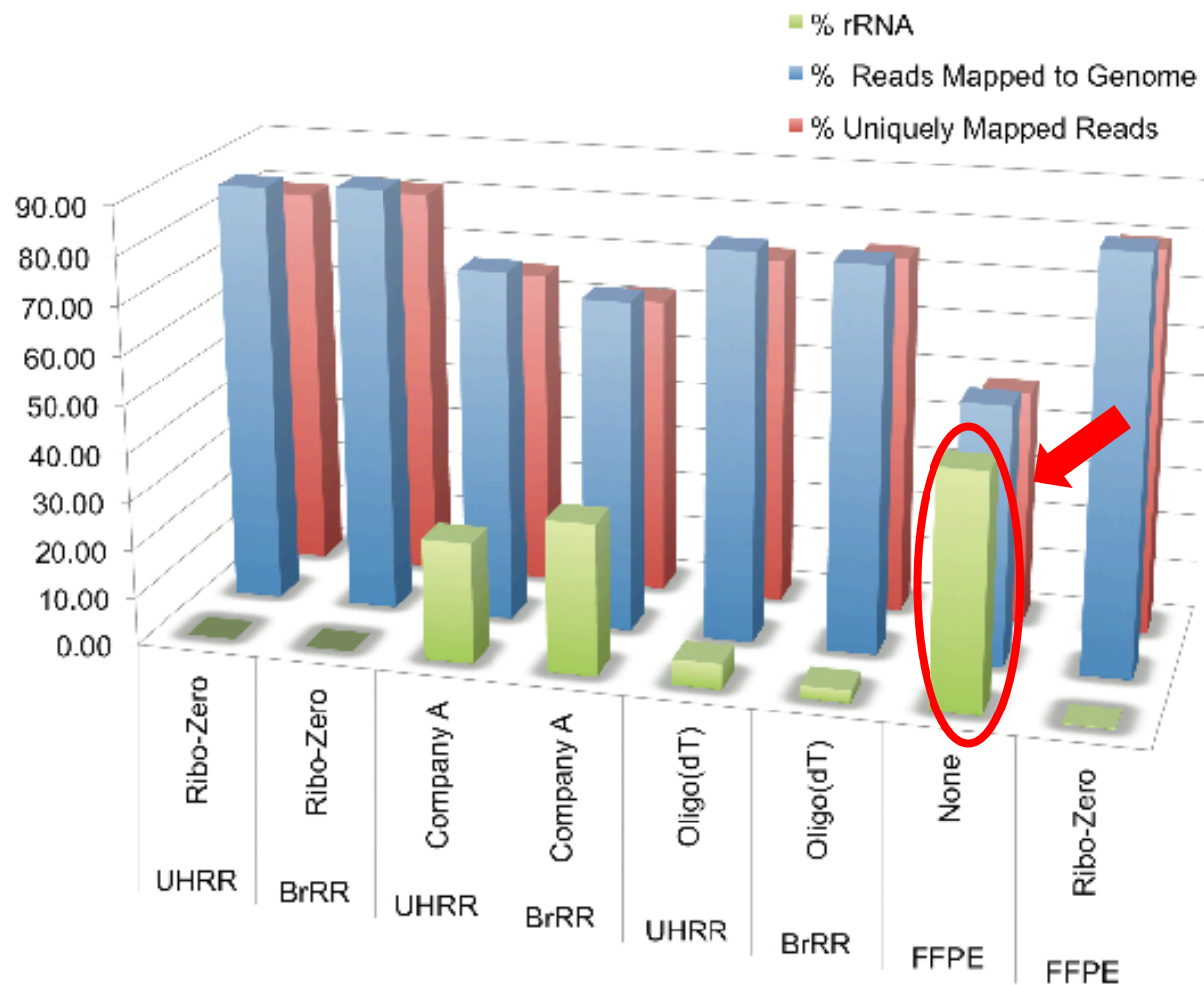


# FFPEサンプルからのRNA-Seqにおける課題

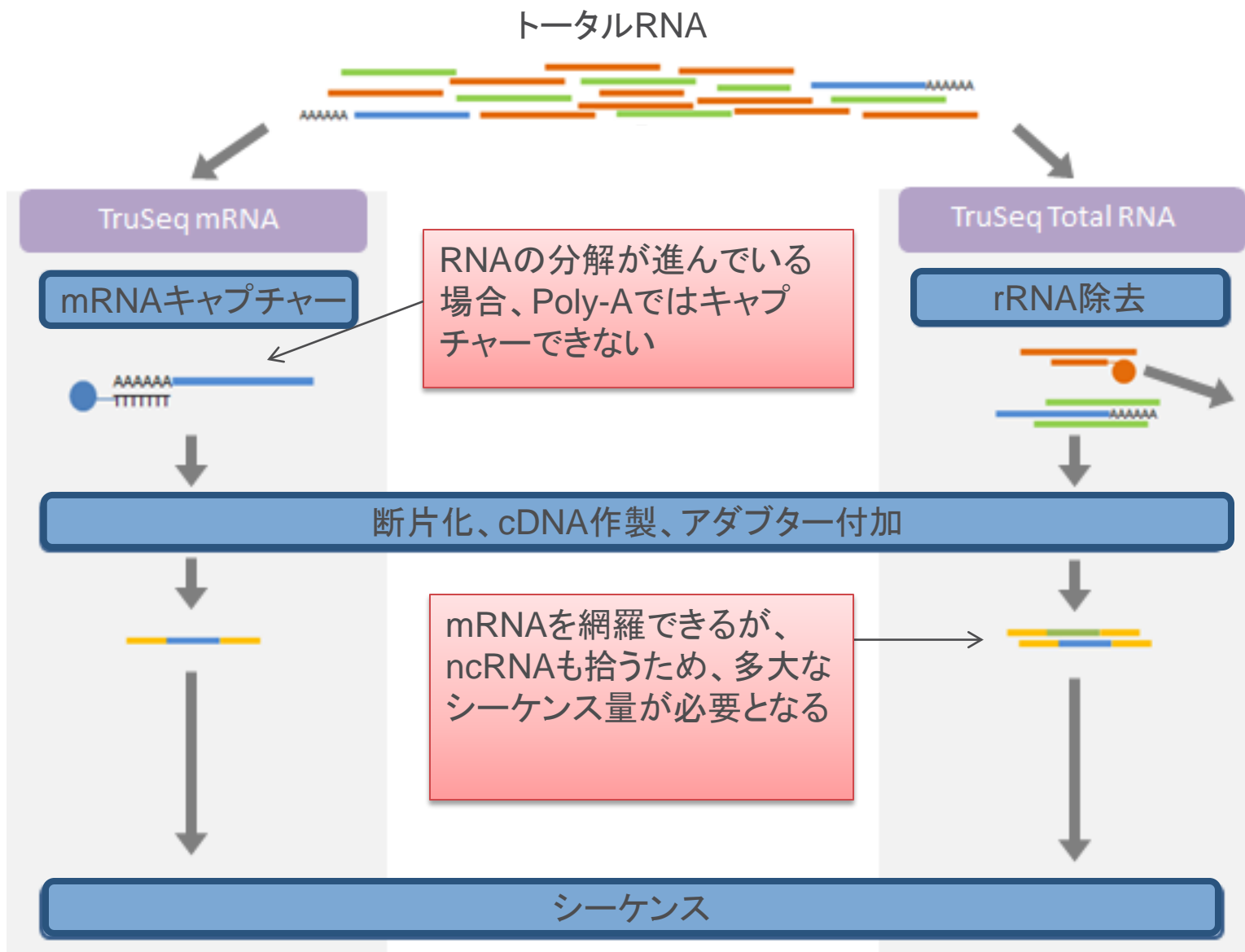




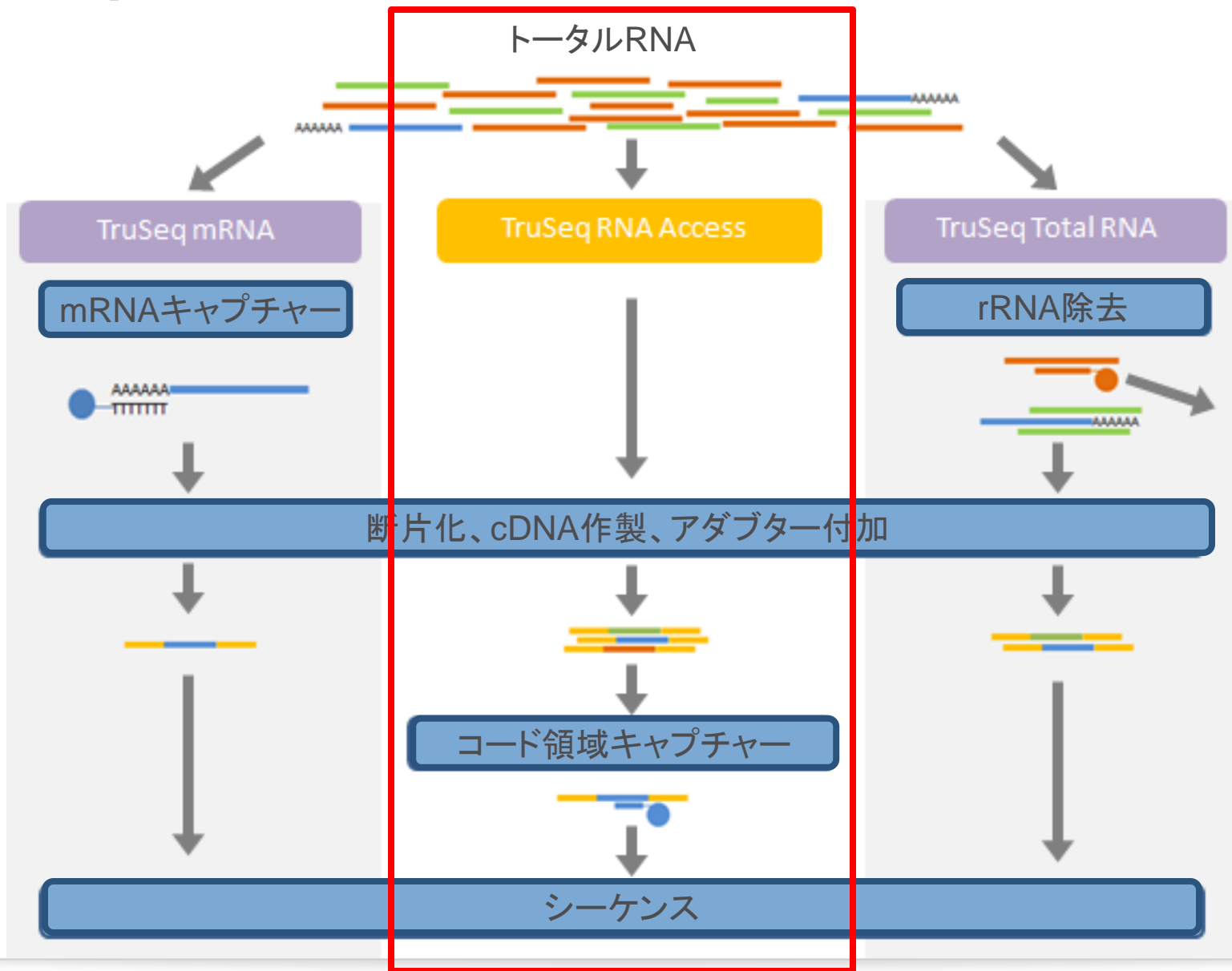
# Total RNA を用いたRNA-Seqにおける rRNAの混入



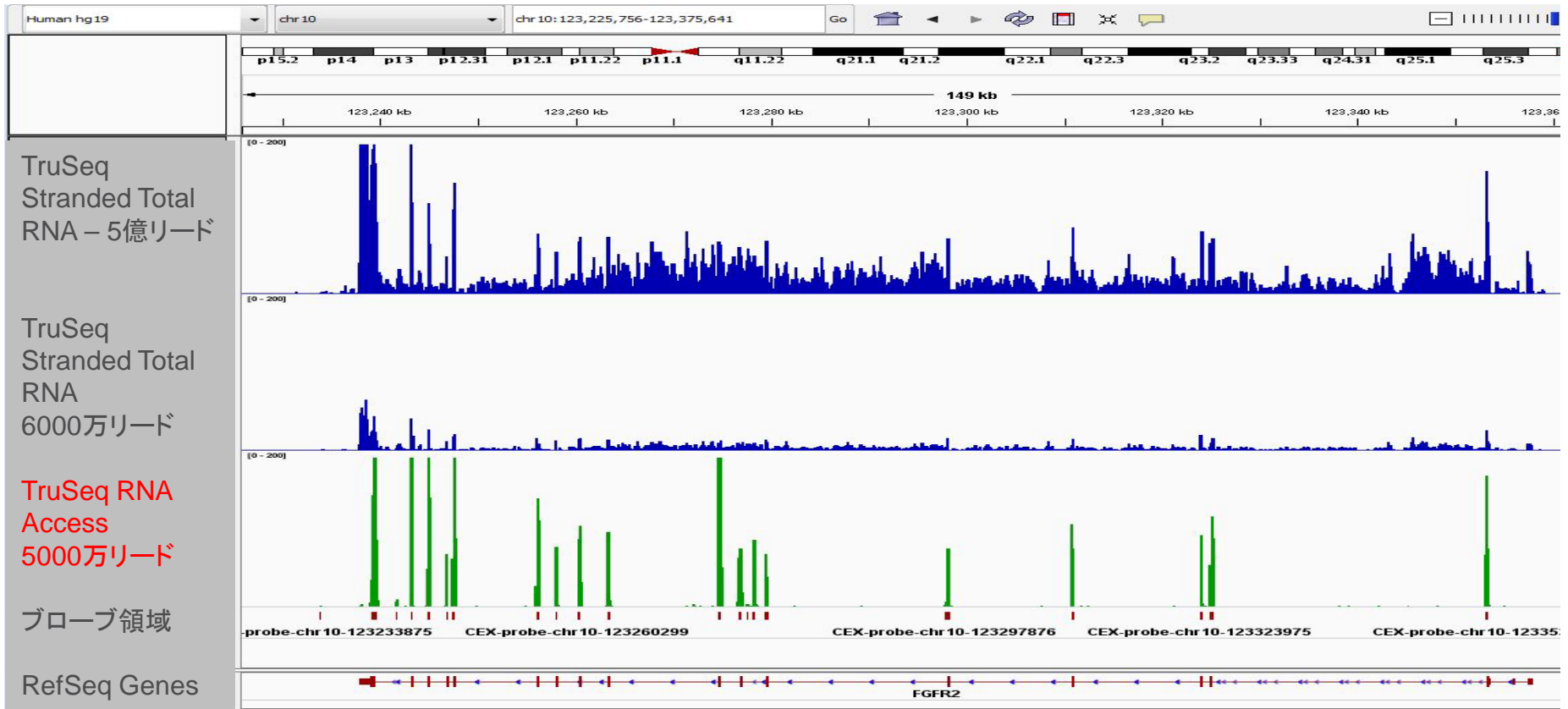
# これまでの手法とその課題



# TruSeq RNA Accessライブラリー調製キット



# コーディング領域(mRNA)だけを効率よくシーケンス



コーディング
  UTR
  インtron
  遺伝子間領域

% Bases Aligned to Region

0% 25% 50% 75% 100%

TruSeq Stranded Total RNA



TruSeq RNA Access



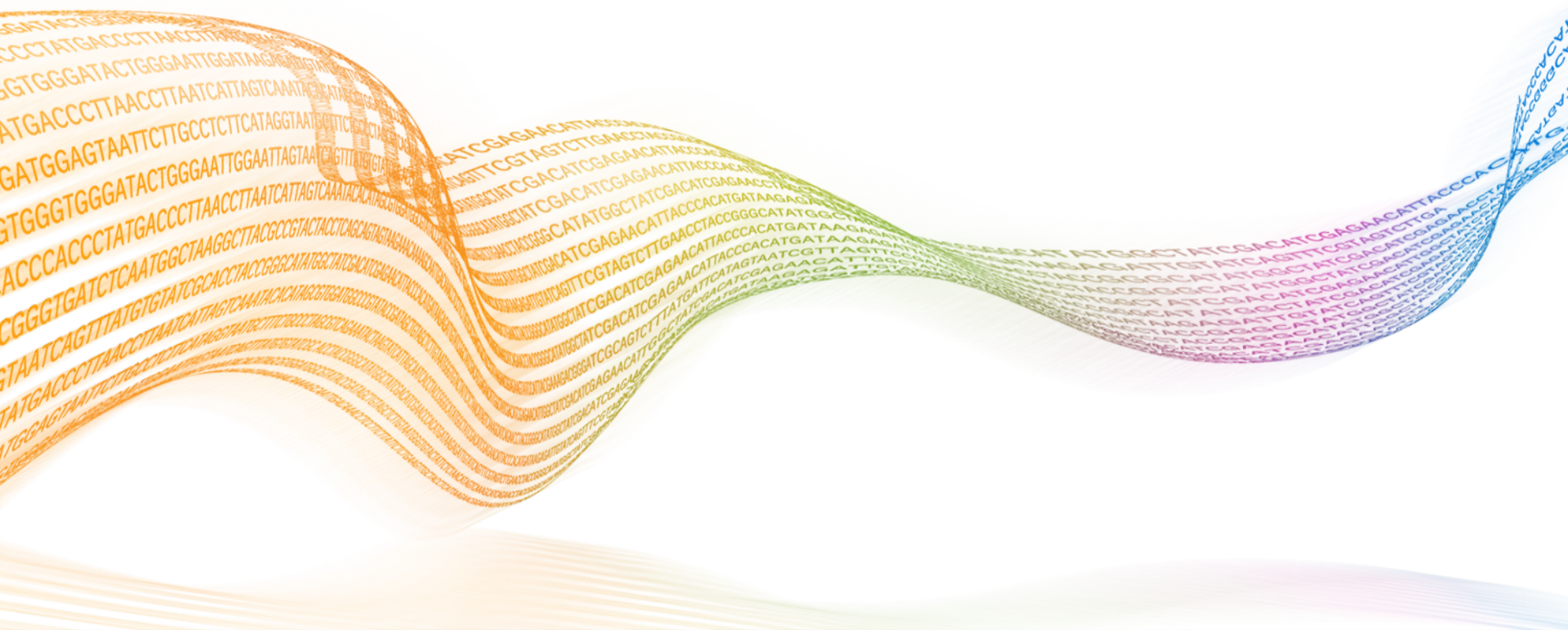
# コーディング領域(mRNA)だけを効率よくシーケンス

各プラットフォームごとのサンプル数

製品名	対象	リード数	NextSeq 500		HiSeq 2500	
			中出力	高出力	ラピッドラン	高出力
フローセルタイプ						
TruSeq Total RNA (FFPE)	mRNA & ncRNA	>2億	1	4	3	20
<b>TruSeq RNA Access (FFPE)</b>	mRNA	5,000万	4	16	12	80

- mRNAだけをキャプチャーしてシーケンスするため、効率よく解析ができる
- トランスクリプトーム解析(mRNA & ncRNA)と比べて、少ないリード量で解析でき、多くのサンプルを処理できる

# TruSeq RNA Access の製品詳細



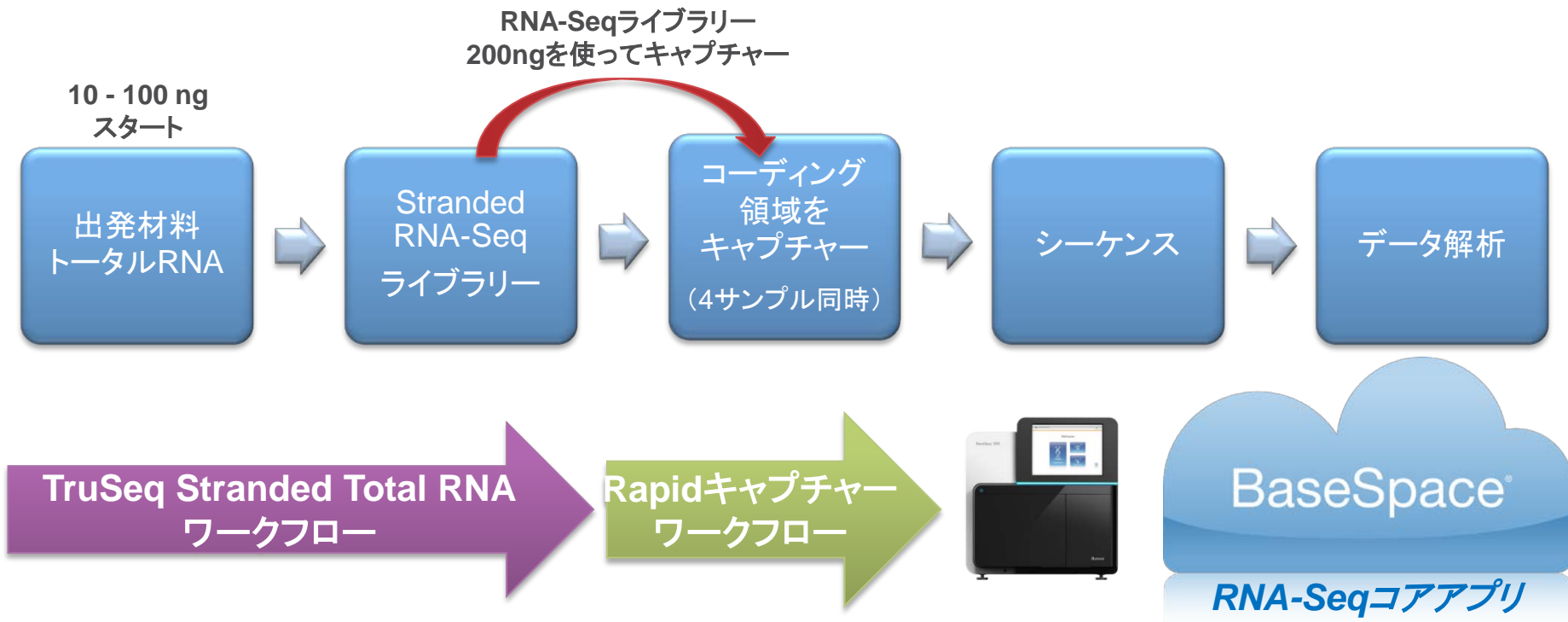
# TruSeq RNA Access コスト

カタログ番号	製品名	希望販売価格
RS-301-2001	TruSeq RNA Access Library Prep Kit - Set A (48 samples, 12 indexes)	¥1,350,000 (\ 28,125 / 検体)
RS-301-2002	- Set B	

## システム別の試薬コスト

5000万 リード/サンプル (75bp x 2)	MiSeq	NextSeq 500		HiSeq 2500	
		中出力	高出力	Rapid ラン	高出力 v4
フローセルの種類	V3				
対象シーケンス試薬	MS-102-3001	FC-404-2001	FC-404-2002	FC-404-4022	FC-401-4002
ランあたりのサンプル数	1	4	16	12	80
ラン試薬	¥153,000	¥180,000	¥464,000	¥521,100	¥2,269,000
RNA Accessコスト	¥28,125	\28,125	\28,125	\28,125	\28,125
サンプルあたりのコスト	¥181,125	¥73,125	¥57,125	¥71,550	¥56,488

# TruSeq RNA Accessワークフロー

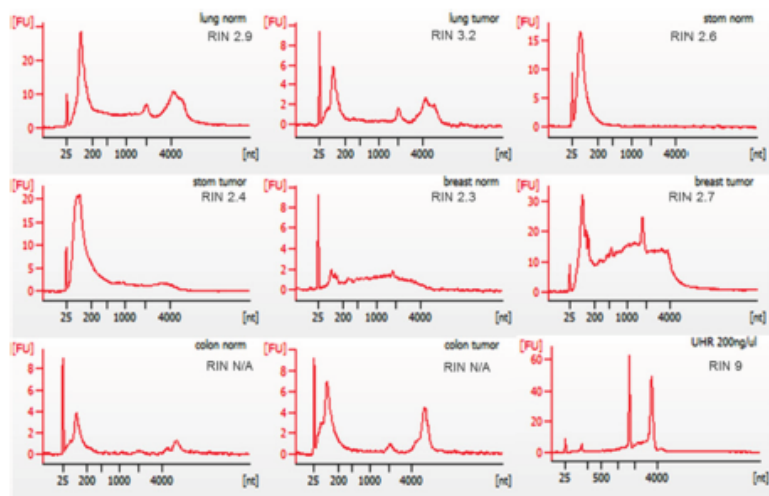




# 受け入れサンプルの確認： FFPEサンプルにおけるクオリティチェック

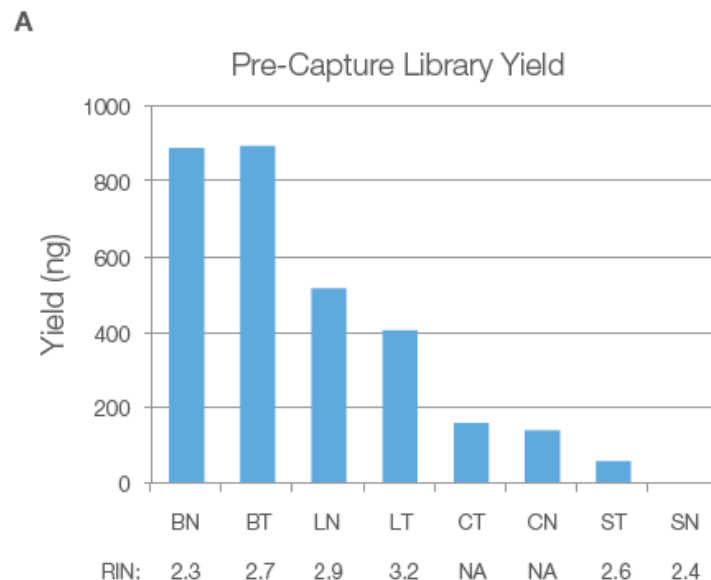
- ▶ RINはRNA品質の信頼性の高い測定基準にはならない

Figure 2: RNA Quality from FFPE Samples



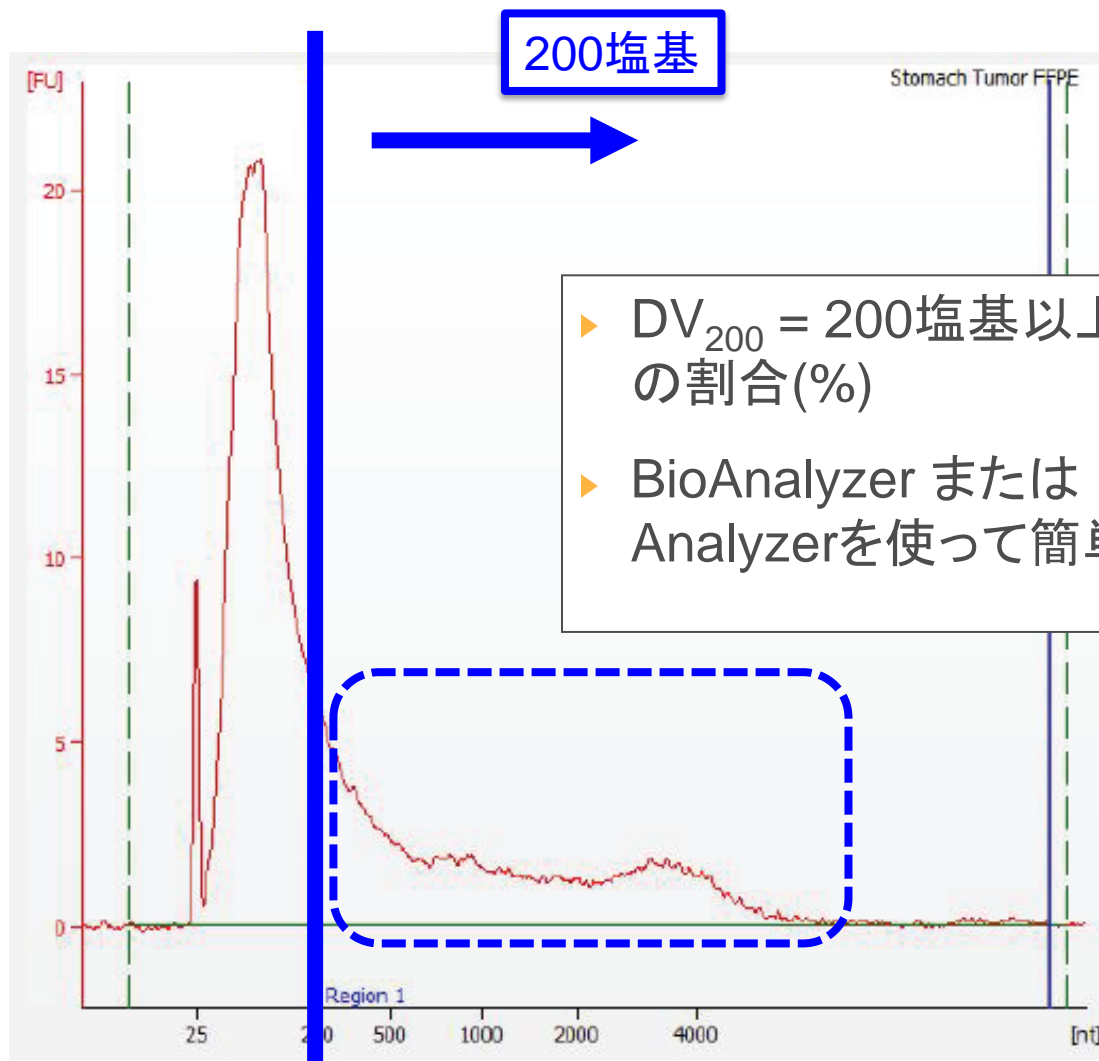
RNA isolated from FFPE samples was examined using an Agilent Bioanalyzer. RNA Integrity Numbers (RINs)<sup>®</sup> were calculated from the Bioanalyzer traces.

Figure 3: RIN versus DV<sub>200</sub> and Library Yield



RIN値とライブラリー収量(濃縮前)とは相関が認められなかった

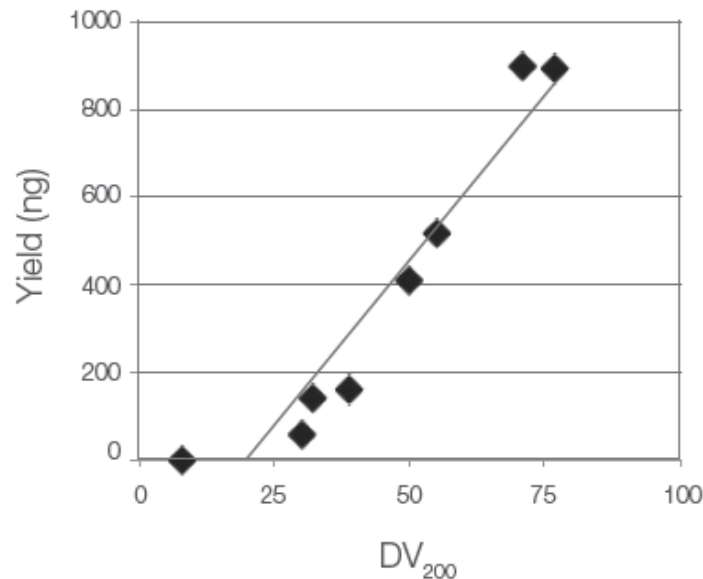
# 受け入れサンプルの確認： 信頼性の高い新QCマトリックス



# 受け入れサンプルの確認： 信頼性の高い新QCマトリックス

- ▶  $DV_{200}$  = 200塩基以上のフラグメントの割合(%)
- ▶ BioAnalyzer または Fragment Analyzerを使って簡単に算出
- ▶ TruSeq Targeted RNA発現解析キットで導入済み

B



$DV_{200}$ とライブラリー収量(濃縮前)には、高い相関が認められた( $R^2=0.91$ )

Table 1: RIN and  $DV_{200}$  Values From FFPE Samples

Sample	RIN	$DV_{200}$ *
Breast Normal	2.3	77
Breast Tumor	2.7	71
Lung Normal	2.9	55
Lung Tumor	3.2	50
Colon Normal	N/A	32
Colon Tumor	N/A	39
Stomach Tumor	2.4	30
Stomach Normal	2.6	8

\*The " $DV_{200}$ " is the percentage of RNA fragments > 200 nucleotides. Although RIN values for these samples lie within a relatively narrow range (2.3–3.2), the size distribution of the RNA varies greatly among the samples.

RIN値の値に対して、さまざまな $DV_{200}$ が認められた

# 受け入れサンプルの確認

## ライブラリー作製に必要なインプット量の計算

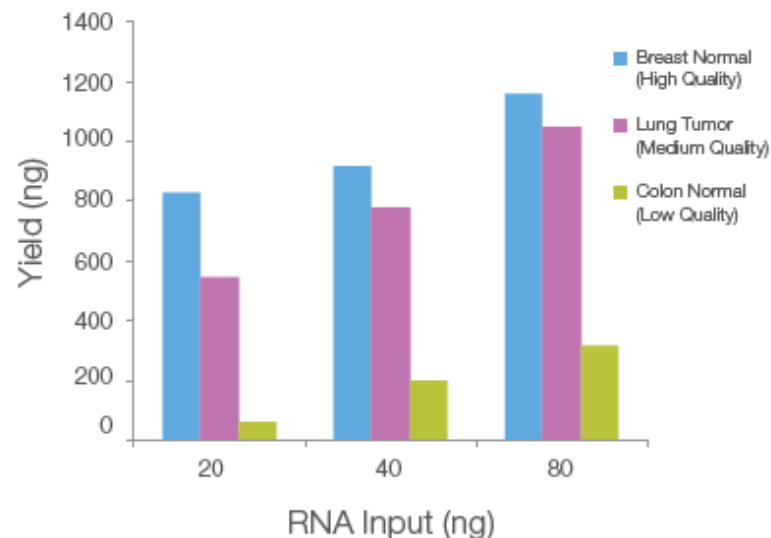
- DV200 (200 nt以上のRNA分子の割合) でQC
- DV200の値に応じてインプット量を調節
- RIN値2程度の分解度合いまで解析可能  
(Stranded Total RNAはRIN値4以上を要求)

Table 2: Recommended RNA Input Based on DV<sub>200</sub>

Quality**††	DV200	Recommended Input Quantity
High	> 70 %	20 ng
Medium	50 – 70%	20 – 40 ng
Low	30 – 50%	40 – 100 ng
Too Degraded	< 30 %	Not Recommended

DV<sub>200</sub> に基づく推奨インプット量

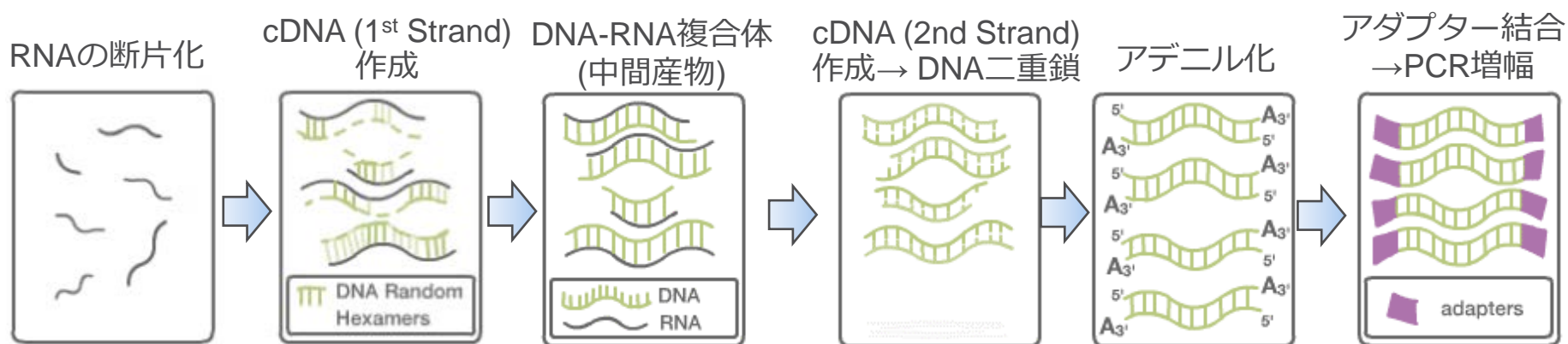
A



各種FFPEサンプルからTruSeq RNA Accessを用いてライブラリーを調製

# ショットガンライブラリー構築の流れ

- QCを終えたRNAを以下の流れで処理し、ショットガンライブラリーを構築した
- RNAのインプット量、および断片化条件はQC結果に合わせて調節を行った



## インプット量 :

DV200の数値に合わせて調節

## 断片化条件 :

Quality "Low"、"Too Degraded" については実施無し。

Quality "High"、"Medium" については94℃、8 minの断片化をプロトコル通りに実施

# ショットガンライブラリーの濃縮

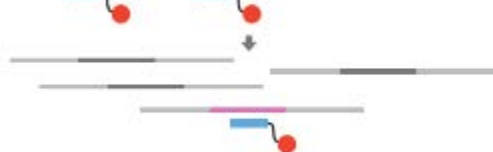
プールされたサンプルライブラリー



B.二本鎖DNAのライブラリーを混性  
(分かりやすくするために、この目ではアダプターおよびインデックスを表示していません)

-この後の濃縮反応は、混合したショットガンライブラリーを用いる  
そのため、このステップでは、200 ng ショットガンライブラリーを混合

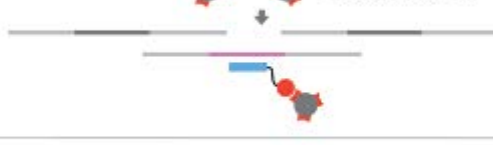
ビオチン標識プローブ



C. ビオチン標識プローブとターゲット領域をハイブリダイズ

混合したライブラリーとビオチン化プローブを混合し、Thermal Cyclerを用いて  
95°C > 58°CでHybridizationを実施

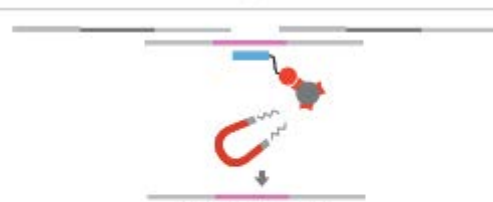
ストレプトアビジンビーズ



D. ストレプトアビジンビーズによる高速キャプチャー

ストレプトアビジンビーズを用いて、ビオチン化プローブの回収

シーケンス可能なフラグメント



E. ビーズからの溶解

回収したDNAはもう一度、Hybridization・Captureを実施する（計2回）ことにより、  
高い濃縮効率を得られる

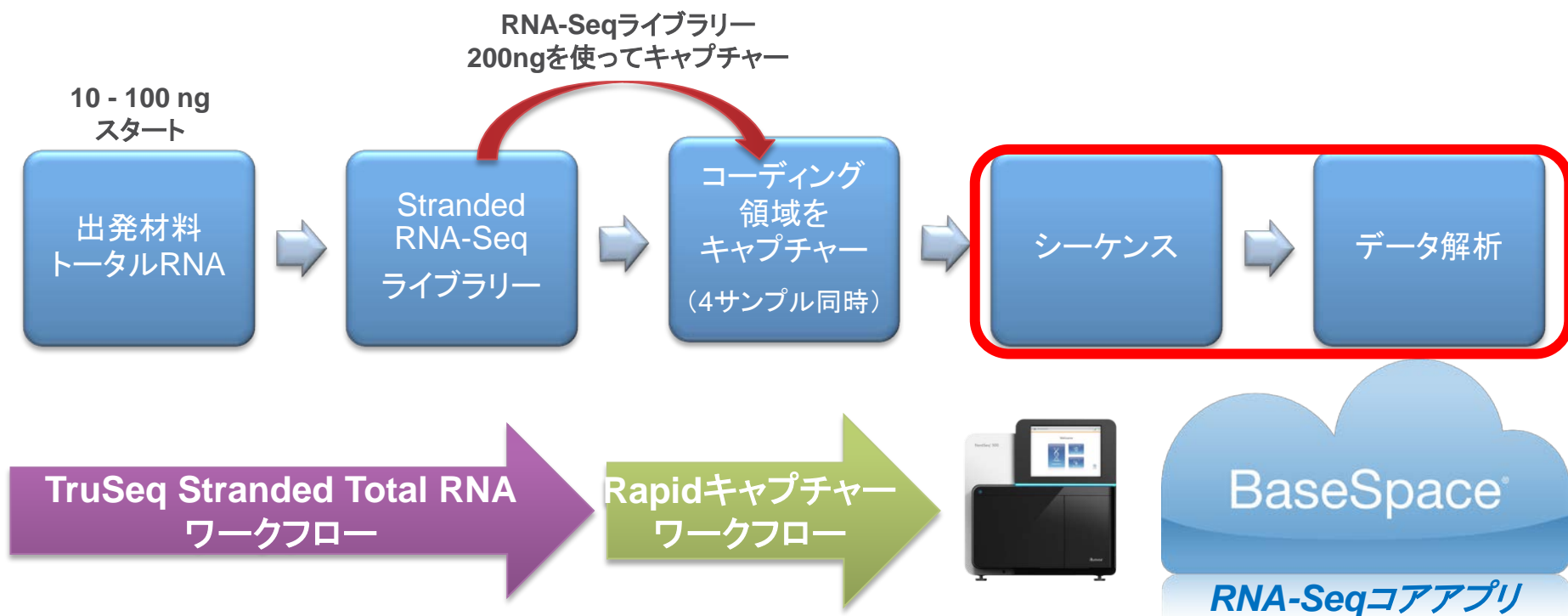


# TruSeq RNA Accessライブラリー調製キット詳細

## FFPEサンプルのRNA解析に最適

項目	詳細
キャプチャー領域	コーディングエクソン
ターゲットエクソン数	214,126
RefSeq カバレッジ	98.3%
RNAライブラリー方法	Stranded Coding RNA
キットサイズ	48 サンプル、12 濃縮反応
インデックス数	24
ライブラリー調製時間	2.5 日
ハンズオンタイム	11 時間
対応シーケンスシステム	イルミナシーケンサー(全て)

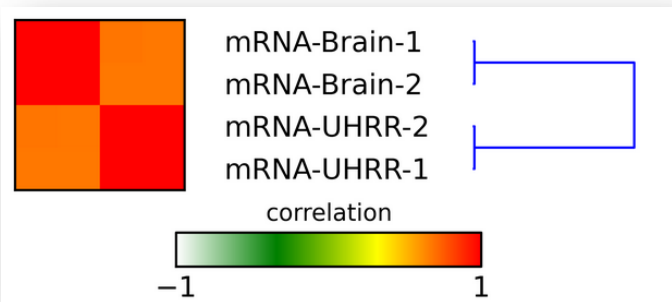
# TruSeq RNA Accessワークフロー



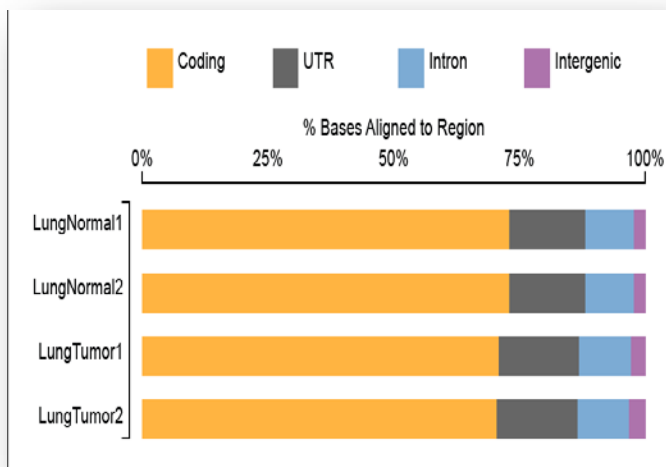


# 既存のRNA-Seq解析パイプラインを利用可能

- ▶ BaseSpace コアアプリを使えばRNA-Seqの結果が簡単に得られる



相関ヒートマップとデンドログラム



## Filters



## Significant

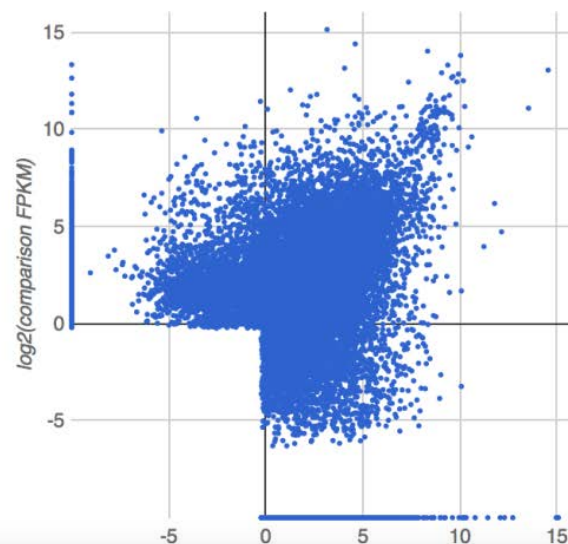
Choose a value... ②

## Status

OK

## Gene

③



Test ID	Gene	Locus	Status	$\log_2(\text{control FPKM})$	$\log_2(\text{comparison FPKM})$	$\log_2(\text{Ratio})$	q Value	Significant
XLOC_000987	-	chr1:152020810-152021644	OK	-10	2.99	-12.99	0.164383	x
XLOC_001014	S100A9	chr1:153330329-153333503	OK	4.61	14.4	-9.79	0.582102	x
XLOC_001015	-	chr1:153359119-153359585	OK	-10	2.23	-12.23	0.22233	x
XLOC_001017	S100A1	chr1:153591275-153618799	OK	7.09	-10	17.09	0.264328	x
XLOC_001018	CHTOP	chr1:153591275-153618799	OK	4.99	4.67	0.32	0.954448	x
XLOC_001019	SNAPIN	chr1:153631120-153643504	OK	4.61	4.11	0.5	0.957225	x

$\log_2$  ratioで発現レベルを絞込 (1), 有意差水準 (2), 遺伝子名 (3), 絞り込んだリストを.csv形式で出力

# イルミナiSchoolもご活用ください！

	ウェビナー	講習会	トレーニング
概要	インターネットを介した短時間(30分から1時間)のオンラインセミナーです。録画しており、いつでも閲覧いただけます。	トピックにより半日から2日をめどに開催されるセミナー形式の座学コースです。内容によっては、ハンズオンで行うデータ解析実習を含みます。	システム操作からハンズオンのライブラリー調製まで、トピックにより2-3日のコースをご用意しています。
初級	NGSIに興味がある、これから使いたいと	製品の使い方	ベーシック
			システム操作

## 講習会(中級編);ヒトを対象としたRNA-Seq解析

クラウド解析ソフトウェアBaseSpaceのTopHatとCufflinksを利用し、RNA-Seqデモデータを用いて遺伝子発現解析、融合遺伝子の検出を実践的に学びます。

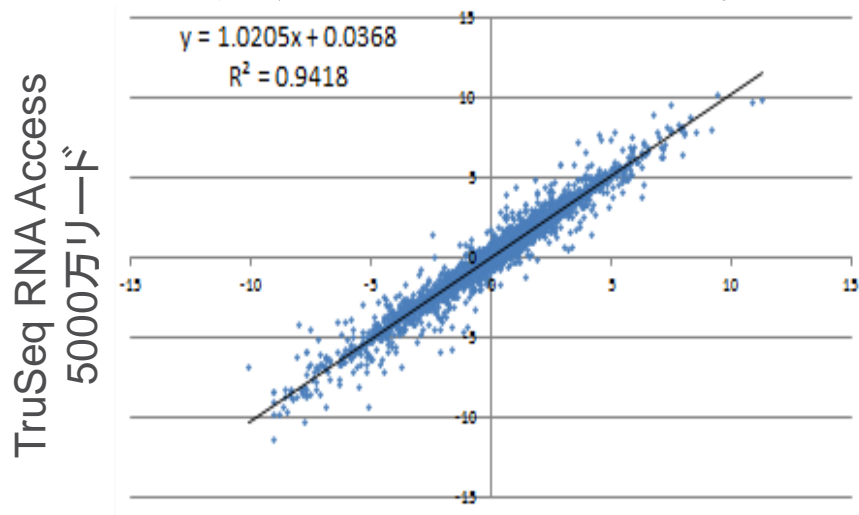
# 解析結果

広いダイナミックレンジの中で、定量的にキャプチャー

これまでの手法との比較

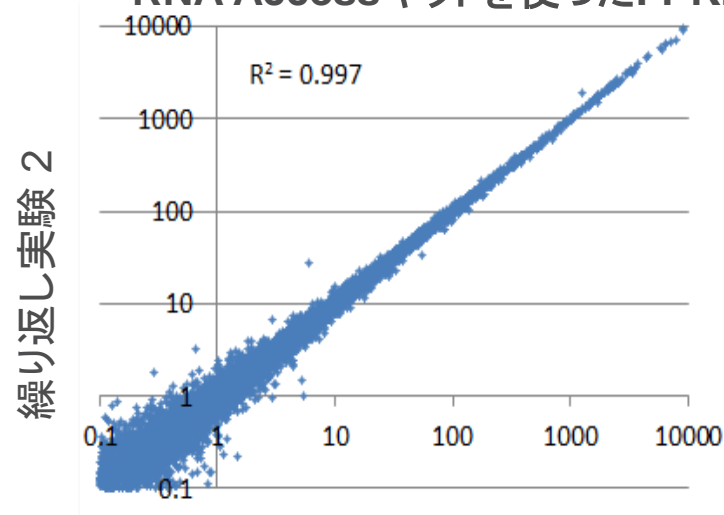
再現性

FFPEサンプル  
肺腫瘍／正常サンプルの発現変化



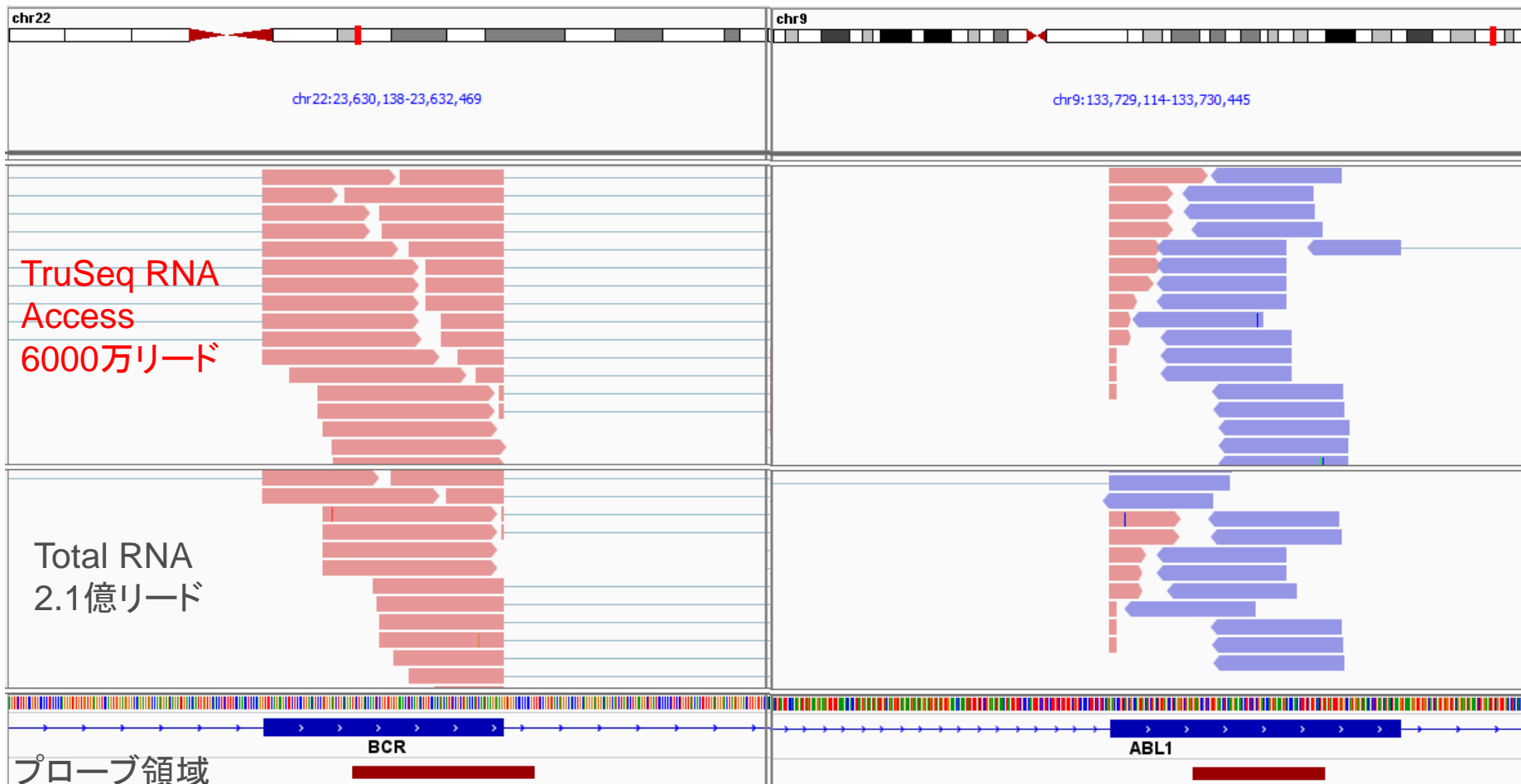
TruSeq Stranded Total RNA  
5億リード

FFPE癌サンプル  
RNA Accessキットを使ったFPKM



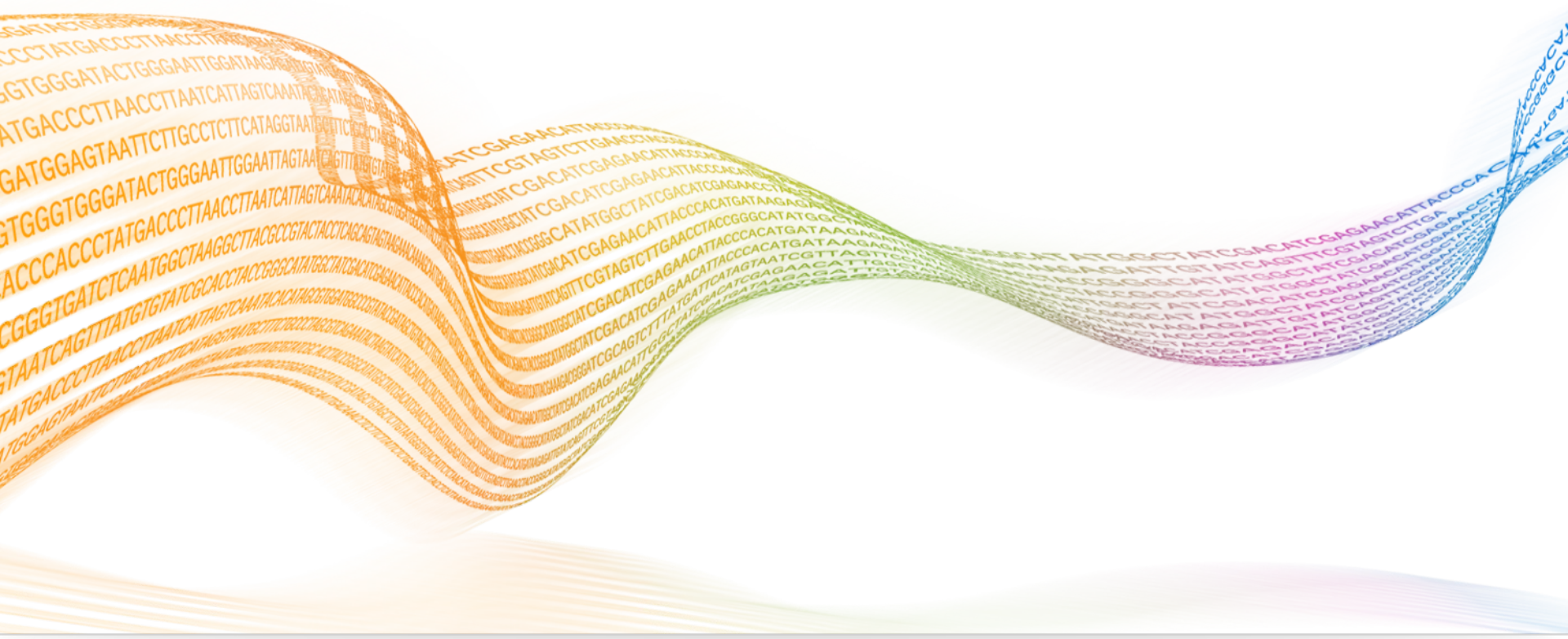
- ▶ FFPE肺癌サンプル ( $DV_{200}=50$ ) のトータルRNA 40ngからTruSeq RNA Accessライブラリー調製キットを用いてライブラリーを調製

# 解析結果：融合遺伝子の検出



- 融合遺伝子特異的なプローブをデザインする必要なし
- 新規融合遺伝子の検出も可能

# 利用例



# TruSeq RNA Access

10年前のFFPEサンプルからRNA-Seqにより新規融合遺伝子を検出

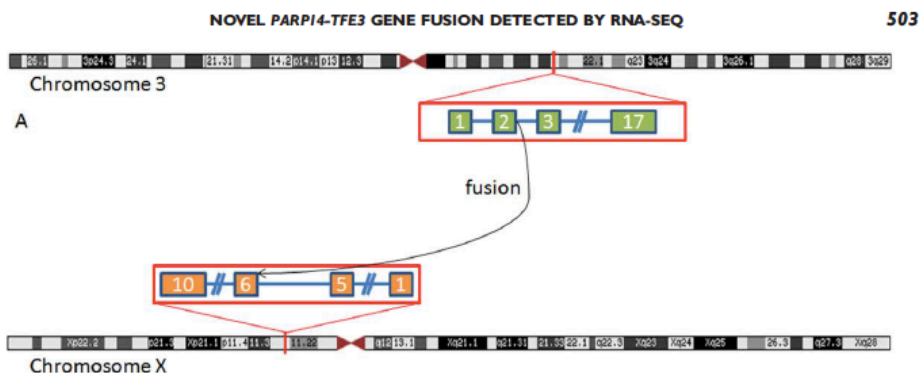
## Identification of a Novel *PARP14-TFE3* Gene Fusion from 10-Year-Old FFPE Tissue by RNA-Seq

Weihua Huang,<sup>1</sup> Michael Goldfischer,<sup>2</sup> Sabina Babyeva,<sup>1</sup> Yong Mao,<sup>3</sup> Konstantin Volyansky,<sup>3</sup> Nevenka Dimitrova,<sup>3</sup> John T. Fallon,<sup>1</sup> and Minghao Zhong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, New York Medical College, Westchester Medical Center, Valhalla, NY

<sup>2</sup>Department of Pathology, Hackensack University Medical Center, Hackensack, NJ

<sup>3</sup>Clinical Informatics Solutions and Services (CISS), Philips Research North America, Briarcliff Manor, NY



Novel *PARP14-TFE3* gene fusion in RCC suggested by RNA Seq results.

### RNA-Seq

After xylene deparaffinization, total RNA was extracted using the AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The quantity and integrity of the RNA was measured using the Agilent 2100 Bioanalyzer. One hundred nanograms of the RNA, with DV200 at 30%, was applied for sequencing library preparation using the TruSeq RNA Access Library Prep Kit (Illumina, San Diego) as per the manufacturer's protocol. Paired-end sequencing (75 × 2) was performed using the MiSeq Reagent V3 Kit (150 cycles) and the MiSeq sequencing system (Illumina). Bowtie2 was used for alignment and mapping of short sequence reads to the human genome reference hg19 or the fusion transcript *PARP14-TFE3*. Both STAR and TopHat algorithms were used for detection of any potential *TFE3* fusion. Integrative Genomics Viewer (IGV) was used for data visualization.



# 日本国内での解析例

Sample	がん	storage period	切片枚数 (≒3cm <sup>2</sup> )	切片厚み	RNA extraction Kit	RIN <sup>e</sup>	DV <sub>200</sub>	input RNA (ng)	リード数	検出した既知融合遺伝子	Junction Point をカバーするリード数
A	肺がん	7.5 years (2008.5.1-)	3	10 um	RNeasy-FFPE	2	49.2	100	33,322,985	LRIG3-ROS1	20 リード

# RNA Access まとめ

- ▶ FFPEサンプルから抽出した Total RNA 20 ng から RNA-Seq が可能
- ▶ RINが2程度の分解したTotal RNAからライブラリー作製可能
- ▶ QCの新しい基準DV200を提案
- ▶ ライブラリー作製キットの価格はサンプルあたり28,125円
- ▶ サンプルあたり5000万リードでのシーケンスを推奨



## その他 製品予告: TruSight RNA Pan-Cancer

- ▶ 重要ながんパスウェイと融合遺伝子をカバーした網羅的なパネル
- ▶ 1,385 のがん関連遺伝子をターゲットとしたRNA濃縮パネル
- ▶ 少量インプット、FFPEを含むすべてのサンプルタイプに対応
- ▶ 融合遺伝子検出- 既知・新規融合遺伝子を検出可能
- ▶ MiSeqで1ラン8サンプルのRNAシーケンス（サンプルあたり約300万リード）
- ▶ BaseSpaceアプリで簡単解析

# Oncology Breakthrough

## 次回予告

Oncology ウェビナーシリーズ 第6弾:

予定: 1月

## 「TruSight® RNA Pan-Cancer Panel」

イルミナ株式会社

製品の使用目的は研究に限定されます。  
販売条件: [www.illumina.co.jp/tc](http://www.illumina.co.jp/tc)  
©2015 Illumina, Inc. All right reserved.

製品、技術、サイエンスの知識を強化する技術教育コース

Click!!

## イルミナ iSchool

ウェビナー・ラボトレーニング・講習会 開催中!



<http://www.illumina.co.jp/>

# セッション中の注意

- ▶ 音声はミュートされています
- ▶ ご質問がある場合は、WebEx の Q&A にてご入力ください
- ▶ セッションの最後に確認して、回答します

The image shows a WebEx session interface. At the top, a toolbar contains several icons: a back arrow, a microphone icon labeled '音声プロ...', a group of people icon labeled '参加者', a speech bubble icon labeled 'チャット', and a question mark icon labeled 'Q&A'. The 'Q&A' icon is highlighted with a red box. Below the toolbar, a green notification bar reads 'Mio Tonouchiのアプリケーションを表示...'. The main content area displays a slide with the following text:

イルミナオンラインセミナー  
RNAシーケンスを始めよう！ セッション1 実験手法  
トランスクリプトーム解析の今昔：  
なぜマイクロアレイ？なぜRNAシーケンス？

2011年9月8日 16:00-16:45  
イルミナ株式会社

illumina®

At the bottom right, a 'Q&A' window is open. It has a title bar with a question mark icon and the text 'Q&A'. Below the title bar, there is a tab labeled 'すべて (0)'. The main area of the window is empty. At the bottom, there is a '質問:' label followed by a dropdown menu showing 'すべてのパネリスト'. Below this, there is a text input field containing the question '質問です。Nexteraの場合' and a '送信' button. The entire Q&A window area is highlighted with a red box.