





- TruSight RNA Pan-Cancer：1,385 に及ぶがん関連遺伝子の発現、バリエーションおよび融合を包括的に評価
- TruSeq Custom Amplicon Low Input Dual Strand：最大 1,536 アンプリコンまでユーザーによるデザインが可能な腫瘍プロファイリング用カスタムパネル

## ライブラリー調製

イルミナのライブラリー調製は、キャプチャー方式のターゲット濃縮とアンプリコン生成を行います (図 3)。ターゲット濃縮では、選択された特定の領域をビオチン標識したプローブとハイブリダイゼーションによりキャプチャーした後、磁気ビーズを使用して抽出します。この高度にマルチプレックスされた手法により、体細胞変異の検出やバリデーション、またはスクリーニングが幅広く行えます。TruSight RNA Pan-Cancer パネルでは、この手法を用いてライブラリー調製を行います。

アンプリコンの生成は、使用する製品に応じて 2 つの異なる方法で行います (図 3)。TruSeq Custom Amplicon Low Input と TruSight Myeloid は、ハイブリダイゼーション – 伸長ライゲーションのアプローチにより、PCR 増幅を行う前の 2 本鎖 DNA の集団から 1 本鎖の鋳型を作製します。TruSight Tumor 15 は、マルチプレックスされた PCR 法を活用して、ゲノム DNA から抽出した既定のターゲット領域を増幅します。各手法により生成したアンプリコンのシーケンスは、生殖細胞系 DNA が混合した不均一な腫瘍など複雑なサンプルで希少な体細胞変異を検出するのに有用です<sup>19</sup>。

TruSeq Custom Amplicon Low Input Dual Strand は、体細胞腫瘍のプロファイリングに有用な機能として新たに加わりました。この手法では、対になる 2 本のアンプリコンをライブラリー調製で作製します。これにより、FFPE の脱アミノ反応、保管による酸化、その他の取り扱い、調製およびリシーケンスの過程で生じるアーチファクトに起因するノイズが軽減されます。その結果生じる DNA を調べることで、プロファイリング解析での正確な全体像を得ることができます。

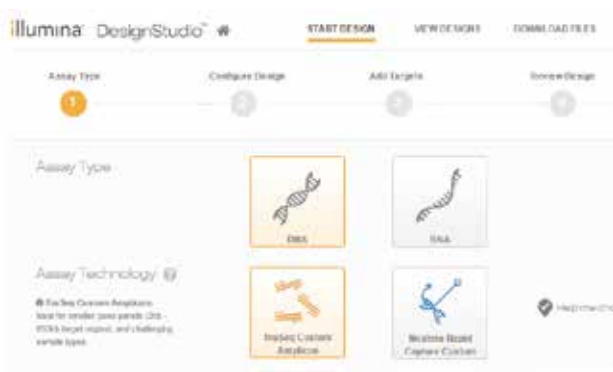


図 4：カスタムプローブのデザイン DesignStudio を使えば、ターゲットとするゲノム領域と搭載するアンプリコンを可視化して、カバレッジとスコアを評価することができます。

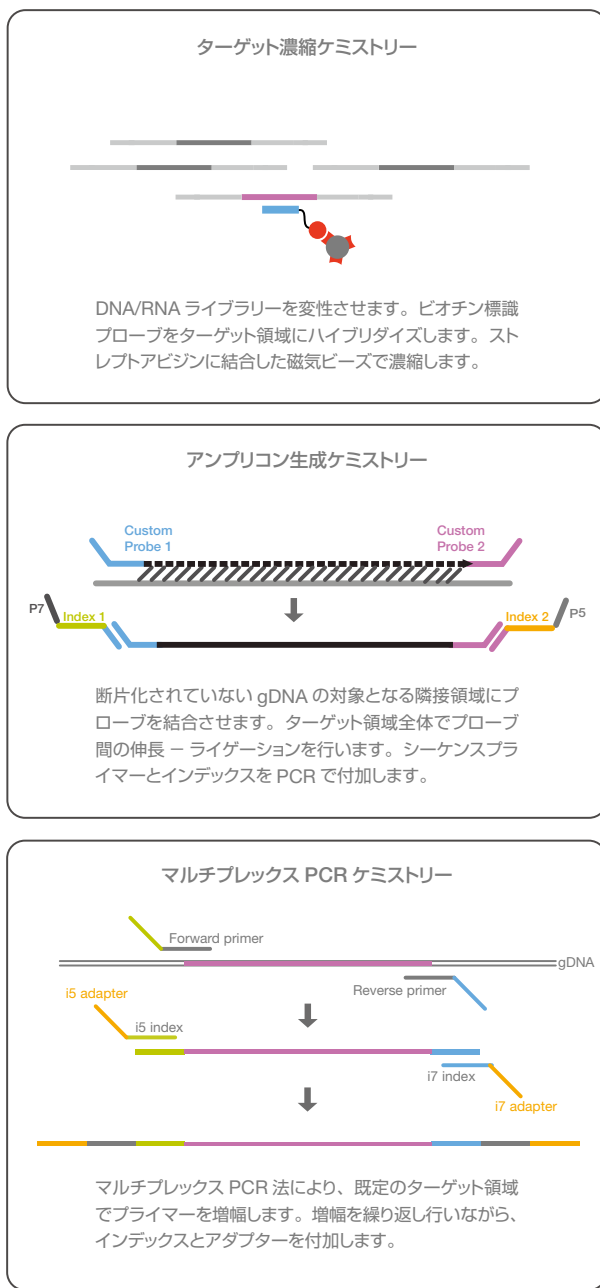


図 3：ライブラリー調製法 イルミナのシーケンス用ライブラリーの調製法には、ターゲット濃縮、アンプリコン生成およびマルチプレックス PCR 法が含まれます。

### カスタムパネルデザイン

TruSeq Custom Amplicon Low Input アッセイでは、イルミナの使いやすい無料のオンラインツールである DesignStudio™ を利用すれば、カバレッジが最適化され、対象の遺伝子および領域をターゲットとしたカスタムパネルのデザインがスムーズに行えます (図 4)。DesignStudio により、選択した遺伝子全体を *in silico* で平均 94% 以上カバーした TruSeq Custom Amplicon Low Input のプローブデザインが可能です。イルミナのコンシェルジュサービスは、プローブデザインの最適化、カスタムパネルの機能性評価と最適化、およびターゲットカバレッジの向上の支援を行います。†

### MiniSeq システムで行うシーケンス

ライブラリー調製で、ターゲット濃縮またはアンプリコン作成のどちらを行う場合でも、調製が完了したサンプルライブラリーは、MiniSeq システムで簡単にシーケンスが行うことができます (図 5)。DNA 増幅とシーケンスを完全に自動化し 1 台の装置で行うため、高額な専用機器を購入して操作する必要がありません。



図 5: MiniSeq システム MiniSeq システムは、最新の SBS ケミストリーおよびサンプルに統合されたワークフローを活用しています。

ロードしてすぐにランが開始できる操作性を備えた MiniSeq システムでは、シーケンスランの始めから終わりまでの各ステップを、ユーザーインターフェースにわかりやすく表示される案内に従って段階的に進めます。MiniSeq システムでのライブラリーのロードおよびランのセットアップに必要な時間は 10 分未満です。シーケンスランは 24 時間以内に完了することができます。MiniSeq 試薬キットは、研究デザインに最適なリード長、サンプル数および出力要件に合わせて中出力および高出力の 2 種類から選択できます。

### 簡素化されたデータ解析およびバイオインフォマティクス

MiniSeq システムで行うデータ解析では、インフォマティクスの専門知識もコマンドラインの習得も必要ありません。MiniSeq システムは、ランを設定し、稼働状況をモニターし、ランが完了すると自動的にシーケンスデータを解析する Local Run Manager ソフトウェアを装置に搭載しています。Local Run Manager はモジュラー方式を採用しているため、必要に応じて自身の解析モジュールだけをインストールしアップデートすることができます。

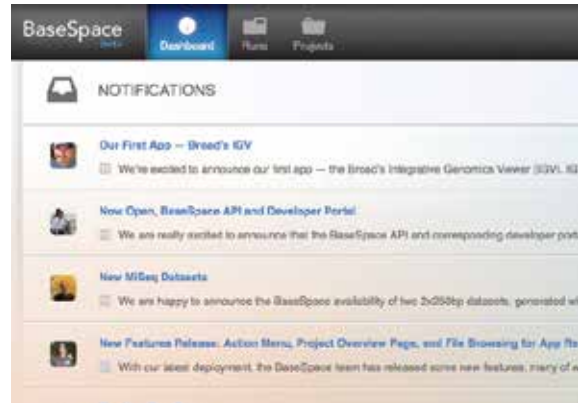


図 6: BaseSpace ダッシュボード BaseSpace 環境のクリック操作による直感的なユーザーインターフェースが、お客様ご自身で行うインフォマティクスを強力に支援します。

† イルミナコンシェルジュサービスに関する詳細につきましては、弊社担当営業までお問い合わせください。

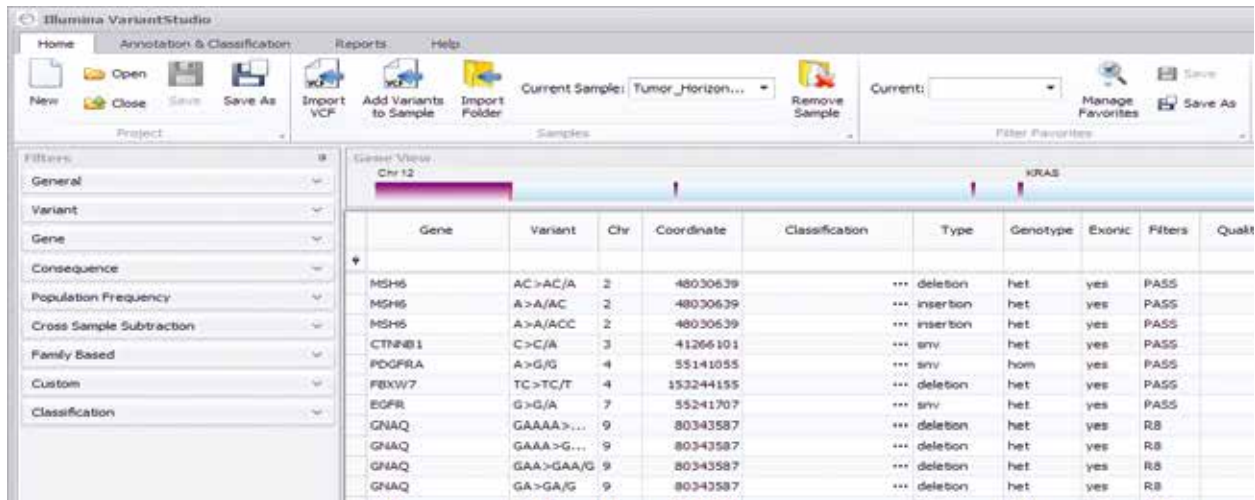


図 7: VariantStudio 直感的なユーザーインターフェースが特長の VariantStudio ソフトウェアを使えば、インフォマティクスの専門知識がなくても、データの解析および探索が容易に行えます。幅広いソースから得られた情報を 1 つのデータベースに集約して、ゲノムデータのアノテーションを包括的にを行います。レポートをフレキシブルに作成して、結果の要約およびアノテーションを行います。

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。

さらに、MiniSeq システムで作成したシーケンスデータを Base Space コンピューティング環境（クラウドまたはオンサイト）に瞬時に転送して、保管や解析を行うこともできます。BaseSpace アプリは、インフォマティクス初心者でも 1 クリックだけでスタートできるようデザインされた直感的なユーザーインターフェイスに、専門家が汎用するデータ解析ツールをまとめて表示します（図 6）。これらのアプリは、アライメントやバリエーションコールなど、シーケンスデータ解析の一般的なニーズを幅広くサポートしています。

これにより BaseSpace が体系的に利用でき、これまでに取り揃えられた市販およびオープンソースの解析ツール数は最大規模を誇ります。VariantStudio により、フレキシブルかつ構造化されたレポート形式で疾患に関連するバリエーション情報のフィルタリング、同定、およびアノテーションが迅速に行えます（図 7）。

## 実証済みのワークフロー： TruSight Tumor 15

### ライブラリー調製

TruSight Tumor 15 のライブラリー調製法では、マルチプレックス PCR 法を採用して、カバレッジのより高い均一性と、プライマーダイマーや FFPE に起因するアーチファクトの低減を実現しています。これにより、体細胞変異の高精度かつ高感度な解析を行うことができます。<sup>20</sup>

『TruSight Tumor 15 Protocol Guide』は、DNA 抽出、定量化、工程中の品質評価手順を含む DNA シーケンスライブラリーの調製を行うためのわかりやすいプロトコルです。プロトコルは、必要な試薬を一覧表示し、安全な停止ポイントを指示しながら、ライブラリー調製の始めから終わりまでを段階的に進めます。

このプロトコルに従って、20ng の total DNA をインプットしサンプルライブラリーを調製しました。既知のバリエーション組成物である 3 つのコントロール DNA と、MiSeq<sup>®</sup> システムを用いてあらかじめ特性付けした肺がん、大腸がん、黒色腫および乳がん由来の FFPE サンプル 10 検体のシーケンスを行い、データを産出しました。

表 1: TruSight Tumor 15 のカバレッジ

サンプル ID	データ品質	500x 以上でカバーした塩基の割合 (%)	アンプリコンの平均カバレッジ
FFPE_Colon1	Medium	99.7%	24,219x
FFPE_Colon2	Low	99.9%	20,763x
FFPE_Colon3	Low	99.2%	35,270x
FFPE_Colon4	High	100.0%	18,357x
FFPE_Colon5	High	100.0%	15,769x
FFPE_Melanoma1	Medium	99.7%	32,707x
FFPE_Melanoma2	Low	99.1%	41,640x
FFPE_Melanoma3	High	100.0%	17,285x
FFPE_Melanoma4	Low	95.7%	10,177x
FFPE_Breast1	High	99.1%	15,501x

本製品の使用目的は研究に限られます。診断での使用はできません。

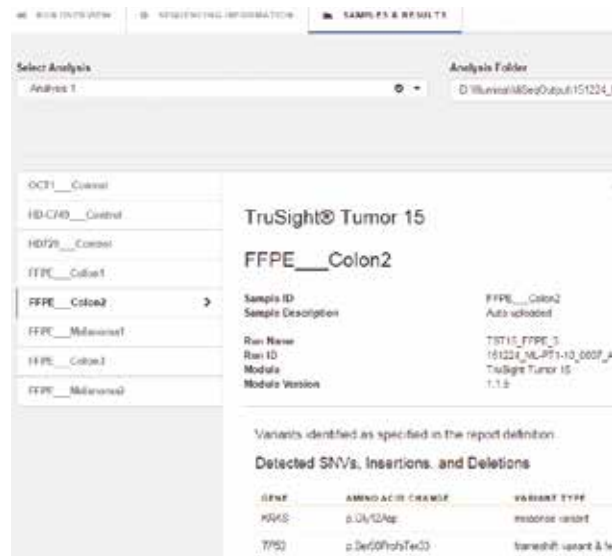


図 8: Local Run Manager Local Run Manager ソフトウェアにより、ユーザーによるランの設定、稼働状況のモニタリング、結果の表示が行えます。ランが完了すると、自動的にシーケンスデータを解析します。

### MiniSeq システムで行うシーケンス

TruSight Tumor 15 の高出力モードで、1 回のランあたり 8 サンプルのライブラリーをプールしました（コントロール DNA と FFPE 抽出腫瘍サンプルが混合した全 16 種）。ライブラリー、試薬カートリッジ、およびフローセルを MiniSeq システムにロードしました。300 リードのサイクルでクラスター形成とペアエンドシーケンスを Local Run Manager で設定し、ユーザーによる途中操作なしに自動で行った場合、所用時間は 24 時間で 97% の塩基を 500x でカバーしました。

### データ解析

MiniSeq システムを使って一次解析（画像解析、ベースコール）を行いました。その他の解析（デマルチプレックス、アライメント、バリエーションコール）は、TruSight Tumor 15 Local Run Manager Module（図 8）と VariantStudio を用いて実施しました。





参考文献

1. Sie D, Snijders PJ, Meijer GA, et al. Performance of amplicon-based next generation DNA sequencing for diagnostic gene mutation profiling in oncopathology. Cell Oncol. 2014;37(5):353-361.
2. Luthra R, Patel KP, Reddy NG, et al. Next generation sequencing based multigene mutational screen for acute myeloid leukemia using Miseq: applicability for diagnostics and disease monitoring. Haematologica. 2014;99(3):465-473.
3. Thomas M, Sukhai M, Zhang T, et al. Clinical testing and implementation of the TruSight Myeloid Next Generation Sequencing (NGS) panel for identification of clinically relevant variants in hematological malignancies. Cancer Res. 2015;75(15):4260.
4. Thiede C, Bullinger L, Hernandez-Rivas JM, et al. Results of the "Evaluation of NGS in AML-Diagnostics (ELAN)" Study-an Inter-Laboratory Comparison Performed in 10 European Laboratories. Blood. 2014;124(21): 2374.
5. Shendrue J, and Hanlee J. Next-generation DNA sequencing. Nat Biotech. 2008;26:1135-1145.
6. Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology. Nat Methods. 2008;5(1):16-18.
7. Tuononen K, Maki-Nevala S, Sarhadi VK, et al. Comparison of targeted next-generation sequencing (NGS) and real-time PCR in the detection of EGFR, KRAS, and BRAF mutations on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor material of non-small cell lung carcinoma-superiority of NGS. Genes, Chromosomes and Cancer. 2013;52(5):503-511.
8. Ross MG, Russ C, Costello M, et al. Characterizing and measuring bias in sequence data. Genome Biol. 2013;14:R51.
9. Liu L, Li Y, Li S, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. J Biomed Biotechnol. 2012;2012:251364.
10. Cross D, Burmester JK. The promise of molecular profiling for cancer identification and treatment. Clin Med Res. 2004;2(3):147-150.
11. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. J Thorac Oncol. 2013;8:823-859.
12. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology
13. WHO/IARC Cancer Pathology and Genetics. www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/
14. Staudt LM. Molecular diagnosis of the hematological cancers. N Eng J Med. 2003;348:1777-1785.
15. Gardner JA, de Abreu F, Peterson J, et al. Identification of somatic mutations in acute myeloid leukemia patients using the TruSight Myeloid Sequencing Panel. A J Clin Path. 2015;144(2):A238.
16. Mertens F, Johansson B, Fioretos T, et al. The emerging complexity of gene fusions in cancer. Nat Rev Cancer. 2015;15:371-381.
17. Parker BC, Zhang W. Fusion genes in solid tumors: an emerging target for cancer diagnosis and treatment. Chin J of Cancer. 2013;32(11):594-603.

イルミナの保守サービス、トレーニング、およびコンサルティングを活用して、性能と生産性を最大化

ラン実行中にその場で支援が必要となった場合も、ワークフローの性能を高めるために詳細なコンサルティングを必要としている場合も、イルミナはお客様をサポートいたします。イルミナのサービスチームおよびサポートチームは、導入トレーニングから、装置のサポート、さらに進行中のNGSプロジェクトのコンサルティングまで、お客様のニーズに合わせた適切なフルサポートの数々を提供しています

プロフェッショナルサービス

プロダクトケアサービス

- 段階的な装置サービス+アドオンサービス
• 装置コンプライアンスサービス
• 装置オンデマンドサービス

イルミナiSchool

- ご希望の施設でのインストラクターによるトレーニング
• イルミナトレーニングラボでのインストラクターによるトレーニング
• オンラインコース
• ウェビナー

コンサルティング

- 装置およびライブラリー調製の検査を行う Proof-of-Concept サービス
• デザイン支援と製品の最適化を行う コンシエルジュサービス
• 時間単位でコンサルティングを行う IT および バイオインフォマティクスの個別支援サービス

イルミナが提供するサポートについての詳細は：jp.illumina.com/services/instrument-services-training.html をご覧ください。

18. Mardis ER. The translation of cancer genomics: time for a revolution in clinical cancer care. Genome Med. 2014;6(3):22.
19. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nat. 2008;456:53-59.
20. Illumina. TruSight Tumor 15 Data Sheet. www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-tumor-15-data-sheet-1170-2015-003.pdf

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, GalX, 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. 770-2015-J043 10MAR2016

