

TruSight® HLA v2 シーケンスパネル

実績あるイルミナ NGS テクノロジーおよび TruSight HLA Assign™ 2.1 解析ソフトウェアを用いてフェーズされた明瞭な HLA タイピングが 1 回のアッセイで。

特長

- 包括的なアッセイ**
 1 回のアッセイで、11 の HLA 遺伝子座の高解像度シーケンス
- 明瞭な結果**
 ディープシーケンスにより、精確で明瞭な HLA タイピングを実現
- DNA からレポートまでのソリューション**
 包括的なワークフローで、ライブラリー調製、イルミナシーケンサーによるシーケンス、そして TruSight HLA Assign 2.1 Software を用いたデータ解析までをサポート

はじめに

ヒト白血球型抗原 (HLA) は、浸潤細胞、異物細胞、感染細胞や機能不全の細胞を認識、排除して、疾患と戦い健康状態を維持する免疫システムにおいて、非常に重要な役割を果たしています。HLA 変異は、異常な免疫応答の原因となる場合があり、自己免疫疾患やがん、移植拒絶反応や薬剤感受性との関連が認識されてきました¹⁻⁴。

HLA 領域のシーケンスを行うことにより、さまざまな免疫疾患に関する洞察が得られますが、ゲノムのこの領域は配列相同性および変動性が高く、HLA シーケンスには課題もありました。これまでこの領域を解読するには手間の掛かるアッセイを繰り返し行う必要があり、得られた結果も極めて不明瞭なものでした^{5,6}。TruSight HLA v2 シーケンスパネルは、1 回のアッセイでこれらの課題を克服しています。実績あるイルミナの次世代シーケンス (NGS) テクノロジーを活用することにより、11 の HLA 遺伝子座に対するフェーズされた明瞭な HLA 配列結果が得られます。さらに、TruSight HLA Assign 2.1 Software により、直感的で迅速な解析や HLA タイピング結果のレポート作成をサポートしています。

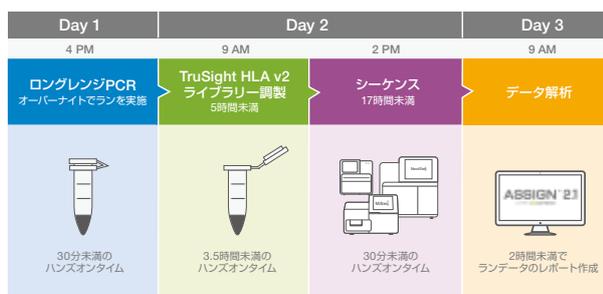


図 1: HLA タイピングに対応した DNA からレポートまでの統合ワークフロー
TruSight HLA v2 シーケンスパネルにより、サンプルからレポートまでが 4 時間のハンズオンタイムを含む 48 時間未満で完了する、精確で効率的な HLA タイピングが行えます。

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 1: TruSight HLA v2 パネルがタイピングを行う 11 の HLA 遺伝子座

遺伝子座	シーケンス領域
HLA-A	4.1kb (遺伝子全長)
HLA-B	2.8kb (エクソン 1 ~イントロン 6)
HLA-C	4.2kb (遺伝子全長)
HLA-DRB1/3/4/5	4.6 ~ 5.1kb (エクソン 2 ~イントロン 4)
HLA-DQB1	6.9kb (遺伝子全長)
HLA-DPB1	9.7kb (エクソン 2 ~ 3' UTR)
HLA-DQA1	7.3kb (遺伝子全長)
HLA-DPA1	10.3kb (遺伝子全長)

HLA 遺伝子配列を完全長でキャプチャー

TruSight HLA v2 シーケンスパネルは、一般的にタイピングが行われるすべての HLA 遺伝子座に加え、新たに関連性を示す座位もカバーしています (表 1)。既知の遺伝子座位 (クラス I のエクソン 2、3、4; クラス II のエクソン 2 および 3) 以外の遺伝子も幅広くカバーしているため、新たな情報が得られることでより高解像度のタイピングが行えます。さらに、TruSight HLA v2 パネルによって遺伝子の完全長をカバーできるため、プライマーを新規にデザインする必要なく、新たなアリルを検出することができます。

DNA からレポートまでのワークフロー

TruSight HLA v2 シーケンスパネルは、HLA 解析用に最適化された試薬およびソフトウェアを付属した、DNA からレポートまでの包括的な HLA タイピングソリューションです (図 1)。ロングレンジ PCR 法と Nextera® ライブラリー調製法を組み合わせることにより 1 回のアッセイでエクソンとイントロンの精確なフェージングが行えるペアエンドリードの長いインサート長が得られます⁷。特定の HLA アリルを検出するためにフォローアップアッセイを行う必要はありません。その簡潔なワークフローでは、ターンアラウンドタイムが 48 時間未満、ハンズオンタイムが 4 時間未満と、より一層の効率化を実現しています。緻密なアッセイデザインで、さまざまなシーケンスシステムや試薬とフレキシブルに併用できるため、ランあたり 4 ~ 384 サンプルまであらゆるサイズのマルチプレックスが行えます。

ライブラリー調製に対応した最新の NGS ケミストリー

ロングレンジ PCR と HLA 特異的な Nextera ライブラリー調製テクノロジーの利点を活かした TruSight HLA v2 シーケンスパネルを使えば、1 回のアッセイで高精度かつ明瞭な HLA タイピング結果が得られます (図 2)。さらに、独自のマルチプレックス機能とサンプルの統合的バーコード標識により、最大 384 サンプルを同時に解析するためのサンプルプーリングが行えます。

TruSight HLA v2 のワークフローは、ロングレンジ PCR 法による遺伝子座特異的なプライマーを用いた HLA 遺伝子の増幅から始まります (図 2A)。続く Nextera ライブラリー調製ステップでは、増幅した DNA を断片化しアダプターを付加したライブラリーへと素早く変換するため (図 2B)、末端の修復を行う必要もありません。ビーズを使用した独自のノーマライゼーション技術により、TruSight HLA v2 ワークフローでは、すべてのアンプリコンをまとめてノーマライズすることができます。これにより、各アンプリコンを個別に定量しノーマライズする手間が省かれ、ハンズオンに掛かる時間が大幅に短縮されます。NGS を活用した他の HLA タイピング手法では、すべてのアンプリコンではなく、数個のサンプルをノーマライズした平均値に基づいて全体のプーリングを行います。しかし、このような手法ではサンプル、座位、およびアリルがすべて均等に増幅されない場合があり、HLA タイピングでエラーを生じかねないという問題があります。ビーズを用いた独自のノーマライゼーション技術を活用し作業の加速化を実現した TruSight HLA v2 パネルは、専用の周辺機器を必要とせず、自動化が容易に行えます。ライブラリー調製のプロトコル完了までに要するハンズオンタイムは 4 時間未満です (図 3)。

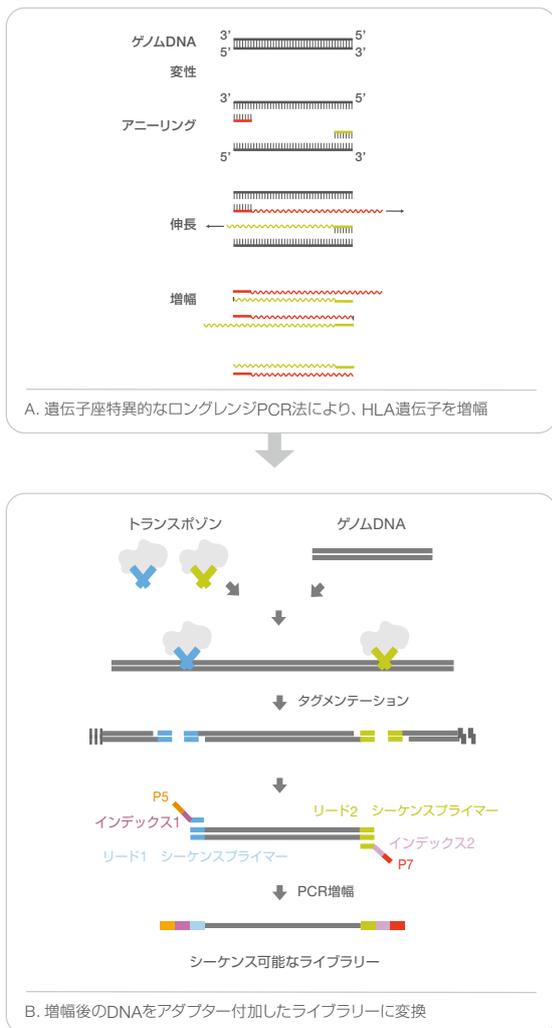


図 2: TruSight HLA v2 Assay ロングレンジ PCR 法と HLA 特異的な Nextera ライブラリー調製テクノロジーの利点を活かした TruSight HLA v2 シーケンスパネルを使えば、1 回のアッセイで高精度かつ明瞭な HLA タイピングが行えます。

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: TruSight HLA ライブラリー調製プロトコル DNA からシーケンスの完了まで、TruSight HLA v2 ライブラリー調製プロトコルの実施に要する時間は、4 時間未満のハンズオンタイムでおよそ 16 時間です。

イルミナのベンチトップ型シーケンサーで選べる さまざまなシーケンスオプション選択

調製済みのライブラリーを MiniSeq™ システム、MiSeq® システム、または NextSeq® システムに直接ロードしてシーケンスを行います (図 4)。150bp × 2 のペアエンドリード長で HLA 遺伝子座の高品質なシーケンスを行うため、高度多型性を利用したフェーズの割り当てが正確に行えます。これにより、明瞭な HLA タイピング結果がシーケンスデータから直接得られます。サンプルからレポートまでのワークフローは、48 時間未満で完了します。

TruSight HLA Assign 2.1 Software による 最適化されたデータ解析

装置搭載のソフトウェアが TruSight HLA v2 ライブラリーから得られたシーケンスデータの解析を行います。各サンプルの HLA アンプリコンをバーコード標識した単一のライブラリーにプールし、サンプルあたり 2 つの FASTQ ファイルを作成します。デマルチプレックス後 FASTQ ファイルを作成したら、ファイルを TruSight HLA Assign 2.1 Software に直接ロードしてアライメントを行います。



図 4: TruSight HLA で自在に選べるシーケンスオプション選択 TruSight HLA v2 シーケンスパネルは、イルミナのさまざまなベンチトップ型シーケンサーと互換性があります。

最初のアライメント完了時には、すべてのヘテロ接合体の位置がフェーズされています。その後、フェーズされたアライメント情報を International ImMunoGeneTics Information System (IMGT) /HLA データベース⁹と比較照合し、HLA タイピング結果の信頼性を高めます。Assign ソフトウェアは、TruSight HLA v2 シーケンスパネルとの併用を前提に最適化されています。このソフトウェアでは、複数のサンプルおよび遺伝子座の配列情報を操作が容易なインターフェースにインポートすることができます。

- データはインターフェースのサマリーパネルにまとめて表示されるため、さらに詳細な解析が必要な遺伝子座位を迅速に特定することができます。
- 結果パネルには、一致率が最も高いアレルが表示されるため、関連性のある（一般的な、公表済みの）CWD アレルを特定する必要なく、希少なアレルを素早く確認することができます。
- リード数、アライメント情報、参照データを表示するビューでは多彩なツールを利用した詳細な解析が行えるため、外付けのリソースやツールを必要最小限に抑えられます。

TruSight HLA Assign 2.1 Software では、自在なオプション選択により、お客様がお使いのバックエンドシステムとの互換性を問わず、解析結果のレポート作成が行えます。CWD アレルに焦点を絞ったサンプルレポートでは、P および G グループおよび監査証跡を含む、複数のレポート作成オプションを選択したユーザー編集も行えます。TruSight HLA Assign 2.1 Software の利点を活かした TruSight HLA v2 シーケンスパネルは、HLA タイピングに適した包括的なソリューションです。

高精度な HLA タイピング

TruSight HLA v2 シーケンスパネルで達成される質の高いタイピング結果を実証するため、72 サンプルの計 959 リファレンスアレルについて解析を行い、パネルを使って精度および不明瞭度を算出しました。得られた結果を、国際組織適合性ワーキンググループ (IHWG)⁹ のリファレンスパネルを用いた過去の実験および代替法で得られたタイピング結果と比較しました (表 2)。

サンプル

比較試験で使用したサンプルの由来は以下のとおりです。

- 第 10 回ワークショップで HLA ホモ接合性家系であることが示唆された 48 の DNA サンプルに由来する細胞株を搭載した、IHWG 血縁リファレンスパネルの 11 サンプル
- 第 13 回ワークショップ時に適用可能であった、最も一般的な配列特異的手法を用いてタイピングを行った 51 の DNA サンプル (血縁リファレンスパネルにも搭載される 4 サンプルを含む) を組み合わせた IHWG 配列多型 (SP) リファレンスパネルの 37 サンプル

- 世界各地に由来する 15 サンプルを搭載した IHWG 人類学リファレンスパネルの 13 サンプル
- SBT による高解像度の HLA タイピングで得られた、Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH) 細胞株に由来する 9 サンプル
- 第 10 回 IHWG ワークショップから新たに 1 サンプル、第 12 回 IHWG ワークショップから新たに 4 サンプル、第 13 回 IHWG ワークショップから新たに 11 サンプル、IHWG Null Sample Repository の 2 サンプル

結果

参照パネルと比較すると、TruSight HLA v2 を使ったタイピング結果は高精度であることが分かります (図 5A)。72 サンプルで同定された公表済みの 959 アレルを用いてリファレンスタイピングを行い一致率と精度を算出したところ、907 アレル (94.58%) がリファレンスタイピング結果と一致し、42 (4.38%) リファレンスがカバレッジの向上、文献の参照、または両方による修正後正確な結果を示し、5 アレル (0.52%) に新規のエクソン変異が同定され、5 アレル (0.52%) には 1~3 個の塩基位置を編集する必要がありましたが、最後の 5 アレルの精度については確認できませんでした。今回の実験でタイピングを行った 1,294 アレルすべてで、結果の不明瞭度を算出したところ、結果が不明瞭であったのはわずかに 3.17% でした (図 5B)。

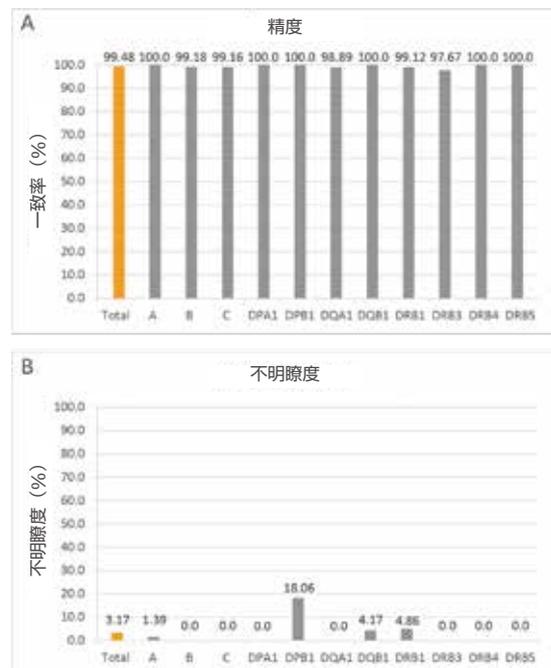


図 5: TruSight HLA v2 パネルのタイピング性能 TruSight HLA v2 によるタイピング結果は、リファレンスタイピング結果と比較した場合、精度 (A)、不明瞭性 (B) ともに優れていることが分かります。

まとめ

TruSight HLA v2 シーケンスパネルは、広範なカバレッジで超高解像度のヒト白血球型抗原 (HLA) タイピングが可能なソリューションとして、1 回のアッセイで HLA 領域の評価がシンプルかつ迅速に行えます。TruSight HLA v2 シーケンスパネルのより広範なカバレッジによりこれまでになく高い解像度が得られるため、フォローアップを行ってタイピング結果の信頼性を高める必要がありません。

詳細について

TruSight HLA v2 シーケンスパネル、TruSight HLA Assign 2.1 Software、およびイルミナシーケンスシステムについての詳細は、jp.illumina.com/hlaseq をご覧ください。

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 HLA v2 Sequencing Panel (24 samples)	24	20000215
TruSight HLA v2 Sequencing Panel (24 samples, Automated)	24	20005170
インデックスキット	サンプル数	カタログ番号
Nextera XT Index Kit (24 indexes, 96 samples)	96	FC-131-1001
Nextera XT Index Kit v2 Set A (96 indexes, 384 samples)	384	FC-131-2001
Nextera XT Index Kit v2 Set B (96 indexes, 384 samples)	384	FC-131-2002
Nextera XT Index Kit v2 Set C (96 indexes, 384 samples)	384	FC-131-2003
Nextera XT Index Kit v2 Set D (96 indexes, 384 samples)	384	FC-131-2004
シーケンス試薬キット (互換性のあるすべてのシステムに対応)	サンプル数	カタログ番号
MiSeq Reagent Kit v2 Nano (300 cycles)	6	MS-103-1001
MiSeq Reagent Kit v2 Micro (300 cycles)	24	MS-103-1002
MiSeq Reagent Kit v2 (300 cycles)	96	MS-102-2002
MinSeq High Output Kit (300 cycles)	144	FC-420-1003
MiniSeq Mid Output Kit (300 cycles)	48	FC-420-1004

参考文献

- Gough SCL, Simmonds MJ. The HLA region and autoimmune disease: associations and mechanisms of action. *Curr Genomics*. 2007;8(7) :453-465.
- Ayala García MA, González Yebra B, López Flores AL, Guaní Guerra E. The major histocompatibility complex in transplantation. *J Transplant*. 2012;2012:842141.
- Anasetti C, Amos D, Beatty PG, et al. Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *N Engl J Med*. 1989;320:197-204.
- The International HIV Controllers Study. The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA Class I peptide presentation. *Science*. 2010;330:1551-1557.
- Lange V, Bohme I, Hofmann J, et al. Cost-efficient high-throughput HLA typing by MiSeq amplicon sequencing. *BMC Genomics*. 2014;15:63.
- Wittig M, Anmarkrud JA, Kassens JC, et al. Development of a high-resolution NGS-based HLA-typing and analysis pipeline. *Nucleic Acids Res*. 2015;23;43(11) :e70.
- Tewhey R, Bansal V, Torkamani A, Topol EJ, Schork NJ. The importance of phase information for human genomics. *Nat Rev Genet*. 2011;12:215-223.
- The International ImMunoGeneTics Project (IMGT) /HLA Database. www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla. Accessed June 21, 2016.
- International Histocompatibility Working Group (IHWG) Website, Reference Panels. www.ihwg.org/reference/index.html. Accessed April 18, 2016.

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, GAllX, 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. 070-2016-J002 15SEP2016

