

TruSight® Tumor 170によるTumor Mutational Burdenの解析

がん関連遺伝子に焦点をあてたターゲットシーケンスは、全エクソームシーケンスと同等の結果をもたらすとともに、Tumor Mutational Burdenを包括的に評価します。

はじめに

がん免疫療法は、悪性新生物を同定、攻撃し、理想的には破壊する免疫システムを利用した新しい分野です。残念ながら、この新しい治療アプローチは一部の患者のみに反応を認め、ノンレスポonderとレスポonderを識別する必要性が大いにあります。¹⁻⁴ その理由として、以下の3点があげられます。第一に、現在利用されているバイオマーカー技術では、こういった患者を分類するにはその能力に乏しいということ、¹ 第二に、治療計画が高額であること、⁵ 第三に、これらの治療法には、重度の副作用が生じる可能性があるということです。⁶

Tumor Mutational Burden (TMB)、または、がんゲノム上のコーディング領域内の変異数は、免疫療法に対する応答と相関していることが示されています。⁷⁻⁹ 歴史的にTMBは全エクソームシーケンス (WES) によって決定されてきましたが、⁷⁻⁹ 最新の2つの研究から、TMBはターゲットシーケンス用パネルを使用することによって効果的に推測できることが示され、^{10,11} 効率的で、かつ今日のがん検査の規範に適合しうる方法であると示されました。¹²

TruSight Tumor 170は、固形がんに関連があるとされる170遺伝子の全コーディング領域を標的とした包括的次世代シーケンス (NGS) 法です。¹³ ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルを使用するための堅牢な技術を使って、TruSight Tumor 170は一度のシーケンスランで、同一サンプルからのDNAとRNAから、一塩基変異、Indel、増幅、スプライスバリアントおよび融合の解析を行うことができます。

がん関連遺伝子のシーケンスによるTumor Mutational Burdenの評価

TMB推測におけるTruSight Tumor 170の性能評価には、次の3タイプの解析を行いました。

1) Cancer Genome Atlas (TCGA)¹⁴ に由来し、過去にWESデータを用いてTMB評価を行ったことのある5,336サンプルについて、TruSight Tumor 170で標的としている領域をWESデータから抽出し*in silico*で再評価しました。このシミュレートされたTruSight Tumor 170データセットから、TMBを推測し、もとの全WESデータと比較しました。

2) TruSight Tumor 170から推測されたTMBによって、レスポonderとノンレスポonderを分類する機能を*in silico*にて評価しました。ここでは、3つの臨床研究⁷⁻⁹ でチェックポイント阻害剤で治療した199例のWESデータを抽出し、TruSight Tumor 170のターゲット領域での解析を行い、全WESデータに基づいたもとの結果と比較しました。

3) 27例の腫瘍サンプルについて、WESとTruSight Tumor 170の両方でシーケンスを行い、TMBの相関性について評価しました。

3つすべての解析において、TruSight Tumor 170とWESとの間に高い相関を認めました。これは、TruSight Tumor 170に含まれるコンテンツが腫瘍サンプルからの効率的なTMBの推測に利用できることを示しています。

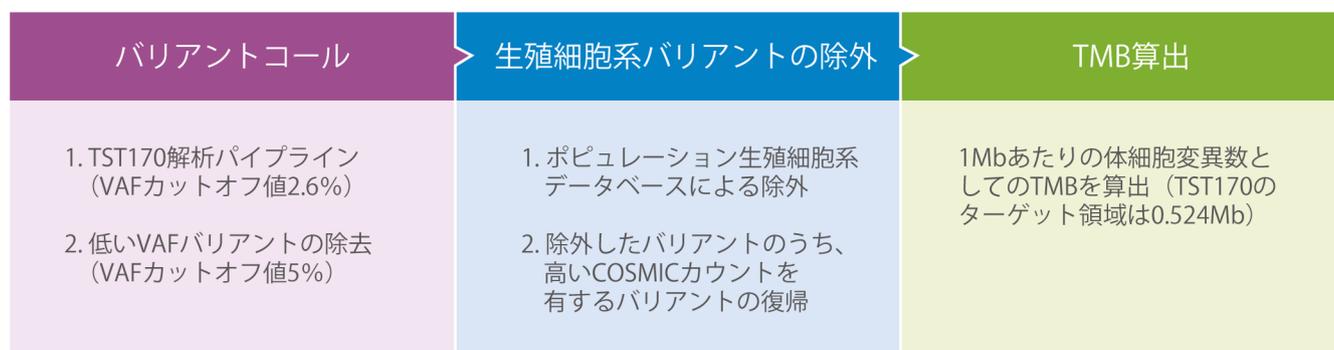


図1 : TruSight Tumor 170でのTMB解析パイプライン—検出されたバリエントは、VAFカットオフに基づいて除外し、TMB算出の前に、生殖細胞系データベースにおいてさらに除外しました。TST170 = TruSight Tumor 170 VAF = variant allele frequency (変異アリル頻度)

データ解析方法

WES研究からのデータは、TruSight Tumor 170パネルに網羅されたターゲット領域に基づき、一連のフィルタリングを実施しました(図1)。まずはじめに、変異アリル頻度(VAF) 5%以下のバリエーションを除外しました。次に、Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) での高いカウント(>4)を有するバリエーション以外で、各データベース(遺伝的変異(dbSNP)に関するNational Center for Biotechnology Informationデータベース、1000 Genomes Project、Exome Sequencing Project (ESP) およびExome Aggregation Consortium (ExAC) のデータベース¹⁵⁻²⁰)でのアノテーションに基づき、既知の生殖細胞系バリエーションを除外しました。²¹最後に、TMBをターゲット領域における1Mbあたりの変異数として算出しました。TMBは、全ての体細胞変異に基づいて算出し、非同義変異に限定するように再計算しました。45 Mbを網羅したWESと比較して、TruSight Tumor 170はゲノムコンテンツの0.524 Mbを網羅しています。²²

ライブラリー調製およびNGS

WESおよびTruSight Tumor 170のデータを比較するため、さまざまな組織のFFPE腫瘍サンプル27例からDNAを分離し、一定量を取りました。各サンプルに対して、TruSight Tumor 170 Library Prep KitおよびTruSeq[®] Exome Library Prep Kitを用いてライブラリーを調製し、NextSeq[®]、HiSeq[®] 2000または、HiSeq 2500 システムでシーケンスを行いました。

In Silico研究の結果

5,336例のTCGAサンプルから得たWESデータは、TruSight Tumor 170が網羅する領域について、*in silico*にて解析しました。TruSight Tumor 170のターゲット領域から推測したTMBは、WESから推測したTMBと高い相関を示し、全ての変異および、非同義変異に対する相関係数 R^2 は、それぞれ0.91(図2A)と0.90(図2B)を示しました。

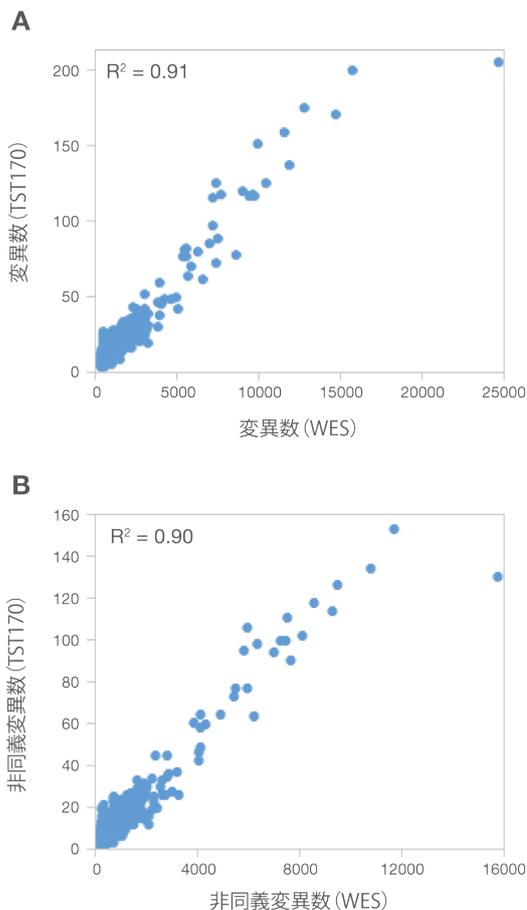


図2: TCGAのWESデータに対するTruSight Tumor 170解析によるTMB推測 - TruSight Tumor 170の性能は、WESで解析した5,336例のTCGAサンプルを用いてTMBを推測するために評価しました。それぞれの方法から得られた変異数をプロットしています。A) 全変異 $R^2=0.91$ 、B) 非同義変異 $R^2=0.90$ TST170 = TruSight Tumor 170

これまでの3つの報告では、WESパネルを用いた高いTMB被験者と低いTMB被験者を識別する予後的な重要性が示されています。*In silico*でこの試験を再評価することによって、高いTMBの被験者とチェックポイント阻害剤（CTLA-4またはPD-1）への応答との高い相関がWESおよびTruSight Tumor 170の両方を用いて得られました（図3）。

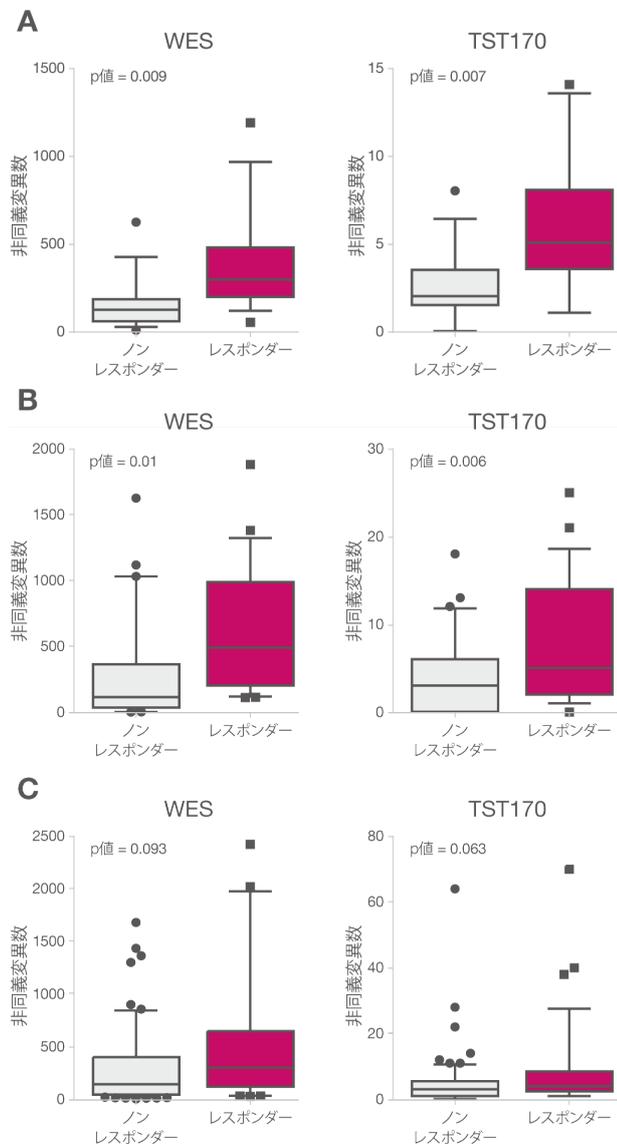


図3：報告された研究データのTruSight Tumor 170解析によるTMBの推測—TruSight Tumor 170によって網羅された領域の*In silico*解析は、チェックポイント阻害剤を投与された199例の被験者からのWESデータと比較しました。両方の方法からのデータは、3つの臨床試験でチェックポイント阻害剤に回答した被験者においてより高いTMB推測値を示しました。A) 31例の非小細胞肺癌被験者、Rizviらによる報告。⁷ B) 58例のメラノーマ検体、Snyderらによる報告。⁸ C) 110例のメラノーマ研究、Van Allenらによる報告。⁹ TST170 = TruSight Tumor 170。

FFPE腫瘍サンプルを用いたWESとTruSight Tumor 170の比較

27例のFFPE腫瘍サンプルをWESとTruSight Tumor 170の両方でプロファイルし、TMB推測値との相関を評価しました。TruSight Tumor 170からのシーケンスデータは2回の独立したラン間で高い再現性があり（図4A）、TruSight Tumor 170とWESとの間で、TMB推測値に対する高い相関（ $R^2=0.998$ ）が見られました（図4B）。

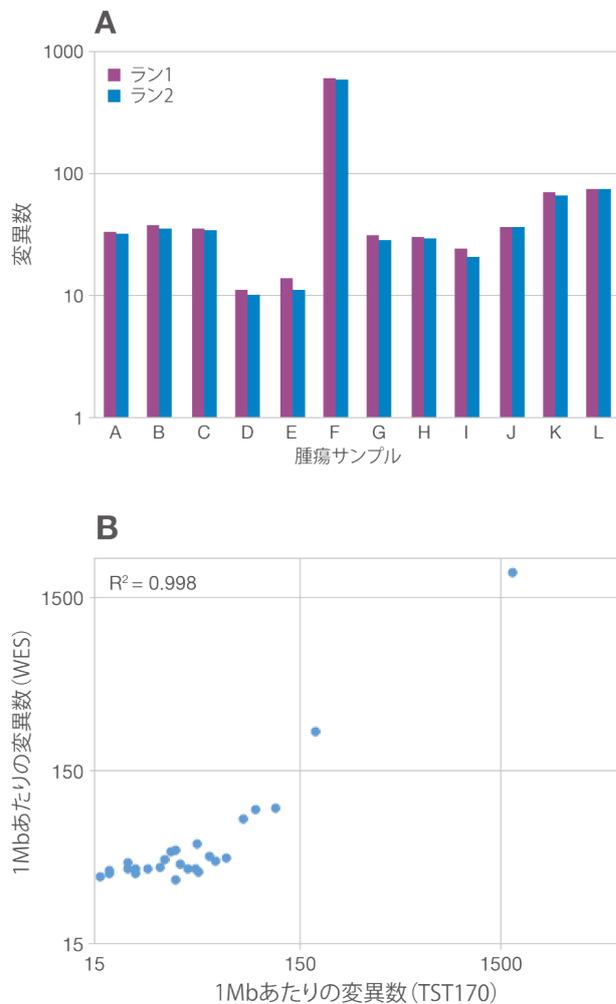


図4：WESおよびTruSight Tumor 170による27例の腫瘍サンプルのシーケンスと解析—A) 検出された変異の高い再現性は、12例のFFPE腫瘍サンプルを解析したTruSight Tumor 170による2回の独立したランで認められました。B) WESおよびTruSight Tumor 170の両方を用いてプロファイルし適合したサンプルについて、検出された変異から生殖細胞系変異とVAFを除外したところ、これらは高い相関を示しました（ $R^2=0.998$ ）。TST170 = TruSight Tumor 170

まとめ

最近の研究で、TMBはチェックポイント阻害後の応答と関連する可能性が示されており、免疫療法の候補の選択において、TMB評価の将来的な役割を示唆しています。従来TMBの評価にはWESが用いられてきましたが、低コストで実施できるターゲットパネルにより、同等の情報を得ることができるか、という議題がありました。個別化医療のアプローチ開発において、WESのコストは高額であるため、低コストのゲノム解析手法を検討する必要があります。この問題に取り組むために、TruSight Tumor 170のTMB見積における性能を評価しました。解析結果からは、がん関連遺伝子を包括的に網羅しているTruSight Tumor 170は、TMBの正確な評価について、WESと高い一致が示されました。ターゲットシーケンスパネルは、WGSまたはWESと比較して1サンプル当たり低コストで情報を得ることができ^{23,24}、このことはがんの診断と治療選択の新しい方法を開発する上で重要な判断事項になる可能性があります。

詳細はこちらから

TruSight Tumor 170の詳細については、jp.illumina.com/TruSightTumor170にアクセスしてください。

参考文献

- Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol*.2016;17(12):e542-e551. doi:10.1016/S1470-2045(16)30406-5.
- Champiat S, Ferté C, Lebel-Binay S, Eggermont A, Soria JC. Exomics and immunogenetics: Bridging mutational load and immune checkpoints efficacy. *Oncoimmunology*.2014;3(1):e27817.
- Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med*.2016;8(328):328rv4. doi:10.1126/scitranslmed.aad7118.
- Pitt J, Vétizou M, Daillère R, et al. Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors. *Immunity*.2016;44(6):1255-1269.
- Morrison C. Financial toxicity looms as cancer combinations proliferate. *Nat Biotechnol*.2015;33(8):783-784.
- Michot J, Bigenwald C, Champiat S, et al. Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *Eur J Cancer*.2016;54:139-148.
- Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*.2015;348(6230):124-128.
- Snyder A, Makarov V, Merghoub T, et al. Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med*.2014;371(23):2189-2199.
- van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science*.2015;350(6257):207-211.
- Garofalo A, Sholl L, Reardon B, et al. The impact of tumor profiling approaches and genomic data strategies for cancer precision medicine. *Genome Med*.2016;8(1):79. doi:10.1186/s13073-016-0333-9.
- Campesato L, Barroso-Sousa R, Jimenez L, et al. Comprehensive cancer-gene panels can be used to estimate mutational load and predict clinical benefit to PD-1 blockade in clinical practice. *Oncotarget*.2015;6(33):34221-34227.
- Ashord M. Cancer Gene Panels Could Help to Identify Patients for Immunotherapy, Studies Suggest. *GenomeWeb*. www.genomeweb.com/cancer/cancer-gene-panels-could-help-identify-patients-immunotherapy-studies-suggest. Updated April 29, 2016. Accessed February 2, 2017.
- TruSight Tumor 170. www.illumina.com/TruSightTumor170. Accessed January 18, 2017.
- The Cancer Genome Atlas. cancergenome.nih.gov/. Accessed January 16, 2017.
- Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*.2001;29(1):308-311.
- 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature*.2015;526(7571):68-74.
- NHLBI Exome Sequencing Project (ESP). evs.gs.washington.edu/EVS/. Accessed January 27, 2017.
- ExAC Browser. exac.broadinstitute.org/. Accessed January 27, 2017.
- Tennessen JA, Bigham AW, O'Connor TD, et al. Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. *Science*.2012;337(6069):64-69.
- Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*.2016;536(7616):285-291.
- Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res*.2015;43:D805-D811. doi:10.1093/nar/gku1075.
- Illumina (2016) TruSeq Exome Library Prep Kit (www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/truseq-exome-data-sheet-770-2015-007.pdf).
- van Nimwegen KJ, van Soest RA, Veltman JA, et al. Is the \$1000 Genome as Near as We Think? A Cost Analysis of Next-Generation Sequencing. *Clin Chem*.2016;62(11):1458-1464.
- Feliubadaló L, Tonda R, Gausachs M, et al. Benchmarking of Whole Exome Sequencing and Ad Hoc Designed Panels for Genetic Testing of Hereditary Cancer. *Sci Rep*.2017;7:37984. doi:10.1038/srep37984.

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

© 2017 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPRO, DASL, Design Studio, GAllx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Innuo, iSelect, MiSeq, Nextera, NextSeq, NovaSeq, 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. 1170-2017-001-A-19APR2017-JPN

 illumina®

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。