

NextSeq™ 1000 およびNextSeq 2000システム での全長V(D)J 免疫レパトア シーケンス (IR-Seq)

- 高品質のリードを用いたより多くのデータにより、より多くのクローンタイプを発見
- ランあたりのサンプル数を増やし、研究予算に合わせた柔軟な実験デザインを実現



免疫レパートリー生物学

Bリンパ球とTリンパ球で構成される適応免疫系は、非常に多様な抗原受容体のレパートリーを生み出す進化的に洗練された過程を通じて、病原体に対する非常に特異的な防御を可能にします。¹ 抗原受容体が病原体を認識すると、その受容体を増幅し、感染を排除するために追加の免疫細胞を動員する一連の現象が起こります。受容体の多様性を生成するこの過程は、V(D)J組換えとして知られています。V(D)J組換えでは、可変(V)、多様(D)、および連結(J)セグメントが機能的なB細胞受容体(BCR)とT細胞受容体(TCR)に確率的に組み換えられます。BCRとTCRの遺伝子は、V、D、J可変セグメントの配列と、受容体構造の残りの部分を構成する定常領域としてゲノム内のさまざまな部位に存在します(図1および図2)。少数の遺伝子のV、D、JセグメントをランダムにmRNA転写産物に組み換えることにより、 10^{18} の固有のBCR配列^{2,3}と 10^{12} の固有のTCR配列^{4,5}を生成することが可能であると推定されています。

BCR配列とTCR配列の定量化可能な免疫レパートリーは、感染症、自己免疫疾患(例:狼瘡、関節リウマチ、多発性硬化症)、およびがんにも動的に反応します。免疫応答の間、循環する抗原受容体のレパートリーは、多様なプールから、1つまたは少数の拡張したクローンが多数を占める受容体に移行します(図3)。したがって、レパートリーの構成を理解することは、疾患の過程で何が起きているかを知るために非常に有益です。免疫レパートリーの信じられないほどの多様性は、解析に高いシーケンス深度が必要であることを意味します。さらに、

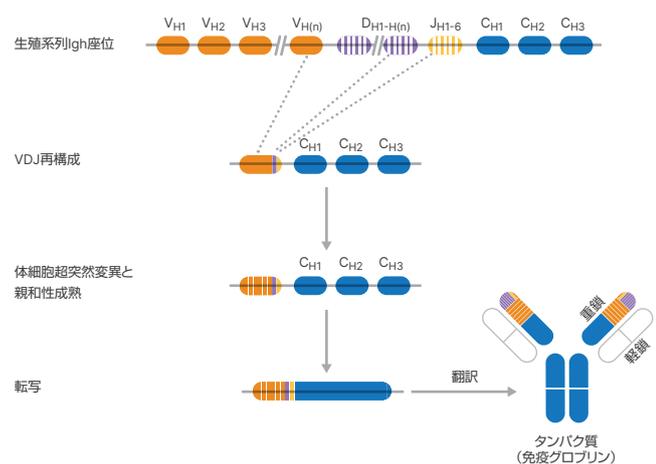


図1: V(D)J組換えプロセスによるBCR生成: BCR受容体の遺伝子はゲノム内の複数の部位で発生します。遺伝子には、多数のVドメインと少数のDドメインとJドメイン、および定常Cドメインが含まれています。いくつかのV(D)Jドメインの確率的組換えにより、非常に多様な免疫グロブリン受容体集団が生じます。

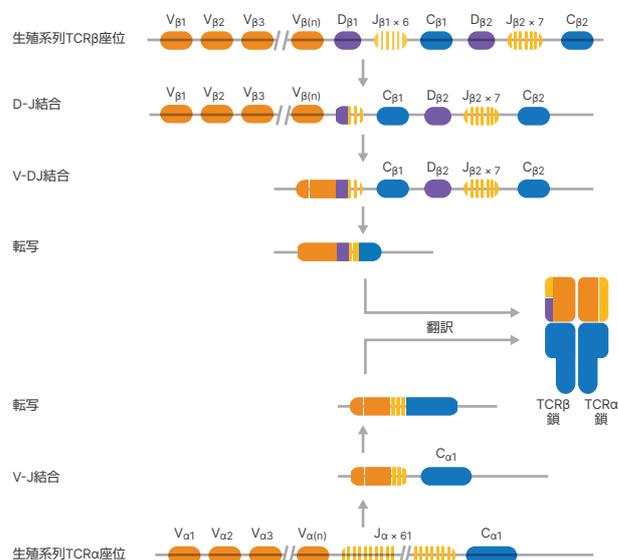


図2: V(D)J組換えプロセスによるTCRの生成: TCRは、2つの異なるゲノム座位から転写されるヘテロ二量体です。TCRβ遺伝子にはいくつかのV、D、J、および定常ドメインが含まれており、TCRαにはV、J、および定常ドメインが含まれています。V(D)Jドメインの確率的組換えにより、非常に多様なTCR集団が生じます。

全長の組換えV(D)J遺伝子と、アインタイプ決定情報を含む部分的な定常領域は、400 bp~600 bp⁶の範囲に及びます。これを正確にアセンブルするには、300 bp × 2ペアエンドリードが可能なプラットフォームが必要であり、この能力により可変領域配列再構成のための単一のギャップのないコンティグを形成することができます。

NextSeq 1000およびNextSeq 2000システムは、600サイクルキットが利用できるため、IR-Seqおよびその他のNGSアプリケーションに対応する強力なベンチトップシーケンサーを探しているラボにとって優れた選択肢となります。NextSeq 1000/2000 P1 Reagents (600 Cycles) (イルミナ、カタログ番号: 20075294) は1億リードで最大60 Gbの高品質データを生成し、NextSeq 1000/2000 P2 300M Reagents (600 Cycles) (イルミナ、カタログ番号: 20075295) は3億リードで最大180 Gbの高品質データを生成します。これと比べて、MiSeq™ Reagent Kit v3 (600 Cycles) (イルミナ、カタログ番号: MS-102-3003) は2,250万リードで最大15 Gbの高品質データを生成します。

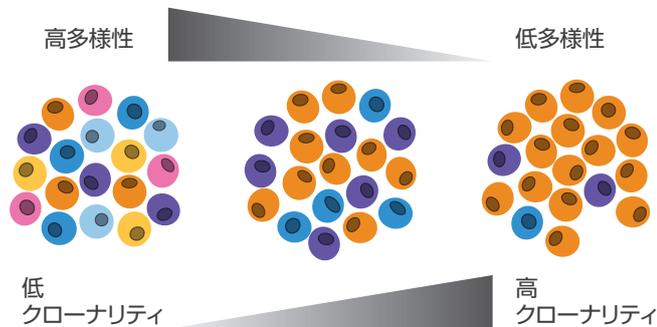


図3：適応免疫応答：適応免疫系は、固有のBCRおよびTCRを発現する非常に多様な細胞集団に依存しています。抗原応答がない場合、これら受容体のレパートリーはその種類の多様性が高く、低いクローナリティを示します。認識した抗原の存在下では、活性化された受容体を持つ細胞が増殖することで、レパートリーの多様性が低くなり、活性細胞のクローナリティが高くなります。

IR-Seqライブラリー調製

免疫レパートリーライブラリー溶液の選択は、インプット（DNA、バルクRNA、またはシングルセルRNA）、方法（cDNA末端の迅速増幅法またはマルチプレックスPCR法）、シーケンス領域（相補性決定領域（CDR3）または全長）および鎖の種類（TCRまたはBCR）などのさまざまな要因に応じて異なります。⁷ 免疫レパートリー研究のための複数のライブラリー調製ソリューションとプロトコールが利用可能であり、いくつかはNextSeq 2000システムで検証されています（表1）。これらのオプションの多くは、300 bp × 2のペアエンドシーケンスを必要とする、もしくはこの方が有効となります。NextSeq 1000/2000 Reagents (600 Cycles)は、実験の規模を拡大したいと考えている研究者にとって、MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles)の進化した代替品となります。

表1：IR-Seqアプリケーション用の検証済みサードパーティー製ライブラリー準備キット^a

解像度	方法	プロバイダー	キット名 (カタログ番号)	ターゲット受容体	推奨されるシーケンスリード長	バイオインフォマティクス二次解析
バルクRNA-Seq	CDR3/全長	New England Biolabs	NEBNext Immune Sequencing Kit (Human) (E6320S, E6320L)	BCR, TCR, BCR + TCR	300 bp × 2	Open Source pRESTO Tools
バルクRNA-Seq	CDR3/全長	New England Biolabs	NEBNext Immune Sequencing Kit (Mouse) (E6330S, E6330L)	BCR, TCR, BCR + TCR	300 bp × 2	Open Source pRESTO Tools
バルクRNA-Seq	CDR3/全長	QIAGEN	QIAseq Immune Repertoire RNA Library Kit (333705)	TCR	300 bp × 2	QIAGEN GeneGlobeパイプライン
バルクRNA-Seq	CDR3/全長	Takara	SMART-Seq Human TCR (with UMIs) (634780, 634781, 634779)	TCR	300 bp × 2	Cogent NGS Immune Profiler Software
バルクRNA-Seq	CDR3/全長	Takara	SMART-Seq Human BCR (with UMIs) (634777, 634778, 634776)	BCR	300 bp × 2	Cogent NGS Immune Profiler Software
シングルセル	CDR3/全長	BD Bio	BD Rhapsody TCR/BCR Multiomic Assay Kit (665828, 665829)	BCR, TCR, BCR + TCR	215 bp × 85 ^b または300 bp × 2	BD Rhapsody Analysis Pipeline

a. 代表されるライブラリーは固有分子識別子 (UMI) テクノロジーを使用し、エラー補正、重複除去、パイプラインからの信頼度の高いリードを提供します。

b. シングルセルのラン構成は、より小規模な300サイクルキットカートリッジと互換性があります。

IR-Seq性能

IR-Seqライブラリーは通常、断片サイズ (600~800 bp) が大きく、リード深度要件によりマルチプレックス可能なサンプル数が制限されます。NextSeq 1000/2000 P1 Reagents (600 Cycles) は、MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles) を使用したMiSeqシステムよりも約4倍以上のデータである1億リードを生成できます。NextSeq 1000/2000 P2 300M Reagents (600 Cycles)は、MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles)を使用したMiSeqシステムと比較して、3億ものリード、つまり12倍以上のデータを生成します。NextSeq 1000およびNextSeq 2000システムのこの大規模なデータ容量により、MiSeqシステムよりもリード深度が増加し、IR-Seqライブラリーのマルチプレックスに対する柔軟性が加わりま (表2)。

また、NextSeq 2000システムに使用したNextSeq 1000/2000 P1 Reagents (600 Cycles)とNextSeq 1000/2000 P2 300M Reagents (600 Cycles)は、MiSeqシステムに使用したMiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles)と比較した場合、Q30以上のクオリティスコアのある塩基をより高い割合で生成します。リード長全体にわたってQ30スコアが向上することにより、より優れた二次解析結果とより優れたクロノタイプの同定が可能になります (表2)。

最後に、NextSeq 1000/2000 P1 Reagents (600 Cycles)で実施したシーケンスは、MiSeqシステムよりもはるかに高速です。ラボは時間の節約により、MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles)を使用した週2回ランと比べて、NextSeq 1000/2000 P1 Reagents (600 Cycles)を使用した週3回のシーケンスランを完了でき、ランあたりより多くのデータを得ることができます (表2)。

NextSeq 1000およびNextSeq 2000システムで生成されたシーケンスデータは、商用およびオープンソースのバイオインフォマティクス解析ツールの広範なエコシステムと互換性のある標準化されたファイル形式で出力できます。ライブラリー調製の各プロバイダーは独自のカスタム解析を提供しています。また、免疫レパートリー解析にはサードパーティー製の専用ツールも利用できます。

まとめ

適応免疫系の状態は個人の健康に直接関係しています。そのため、免疫レパートリーの配列構成を理解することで、研究者は、感染症への応答の仕方、免疫系の健康状態、さらには特定のがんの進行状況など、ヒトの健康に関する豊富な情報を得ることができます。

NextSeq 1000およびNextSeq 2000システムは、イルミナおよびサードパーティーサプライヤーから提供されている幅広いライブラリー調製キットと解析ソフトウェアと互換性があります。600サイクルキットを利用可能なこれらのシステムは、複雑なIR-Seqアプリケーションに最適であり、免疫レパートリーの詳細な像を得るために必要なリードとサンプルマルチプレックス性能を提供します。さまざまなフローセル構成により、研究者は実験のニーズに合わせてリード深度とサンプル数を調整できます。NextSeq 1000およびNextSeq 2000システムは、アプリケーション間の広範な柔軟性を提供し、研究者がシーケンスプロジェクト間を簡単に移行できるようにします。

表2: NextSeq 1000システム、NextSeq 2000システムおよびMiSeqシステムの600サイクルキットの性能

	MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles)	NextSeq 1000/2000 P1 Reagents (600 Cycles)	NextSeq 1000/2000 P2 300M Reagents (600 Cycles)
クオリティスコア (Q30以上の塩基の割合)	≥ 70%	≥ 80%	≥ 80%
ランあたりの最大合計リードペア数	2,500万	1億	3億
ランあたりの最大サンプルリードペア数 ^a	2,250万	9,000万	2.7億
500万リードを達成するためのサンプルマルチプレックス ^a	4	18	54
2,500万リードを達成するためのサンプルマルチプレックス ^a	-	3	10
ランタイム	55時間	34時間	44時間

a. 配列多様性のために10% (v/v) PhiXライブラリーを追加した場合の最大サンプルリード数。

詳細はこちら

[NextSeq 1000およびNextSeq 2000システム](#)

[免疫関連の遺伝子バリエーション](#)

[QIAGENのQIAseq Immune Repertoire RNA Library KitデータはNextSeq 2000 600サイクルキットで利用できます](#)

[New England BiolabsのNEBNext Immune Sequencing Kitデータが新しいNextSeq 2000 600サイクルキットで利用可能になりました](#)

[TakaraのSMARTer Human BCRデータがNextSeq 2000システムの新しい600サイクルキットで利用可能になりました](#)

参考文献

1. InformedHealth.org. Cologne, Germany:Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG); 2006-. The innate and adaptive immune systems. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279396/>. Updated July 30, 2020. Accessed May 15, 2023.
2. Elhanati Y, Sethna Z, Marcou Q, Callan CG Jr, Mora T, Walczak AM. [Inferring processes underlying B-cell repertoire diversity.](#) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370(1676):20140243. doi:10.1098/rstb.2014.0243
3. Hoehn KB, Fowler A, Lunter G, Pybus OG. [The Diversity and Molecular Evolution of B-Cell Receptors during Infection.](#) *Mol Biol Evol.* 2016;33(5):1147-1157. doi:10.1093/molbev/msw015
4. Elhanati Y, Murugan A, Callan CG Jr, Mora T, Walczak AM. [Quantifying selection in immune receptor repertoires.](#) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(27):9875-9880. doi:10.1073/pnas.1409572111
5. Laydon DJ, Bangham CR, Asquith B. [Estimating T-cell repertoire diversity: limitations of classical estimators and a new approach.](#) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370(1675):20140291. doi:10.1098/rstb.2014.0291
6. Kim D, Park D. [Deep sequencing of B cell receptor repertoire.](#) *BMB Rep.* 2019;52(9):540-547. doi:10.5483/BMBRep.2019.52.9.192
7. Frank ML, Lu K, Erdogan C, et al. [T-Cell Receptor Repertoire Sequencing in the Era of Cancer Immunotherapy.](#) *Clin Cancer Res.* 2023;29(6):994-1008. doi:10.1158/1078-0432.CCR-22-2469

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

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

© 2023 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 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。

