



NGSターゲットシーケンスサービス

リキッドバイオプシー用
OptiSeq™がんパネル解析サービス

フィルジェン株式会社

XNA分子クランプテクノロジー ～プレジジョンメディシンと早期がん検出～

技術概要

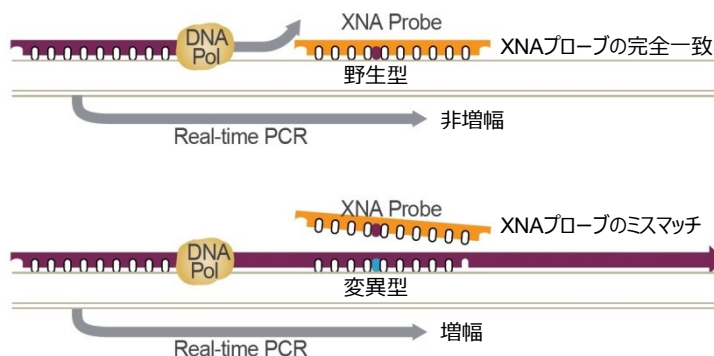
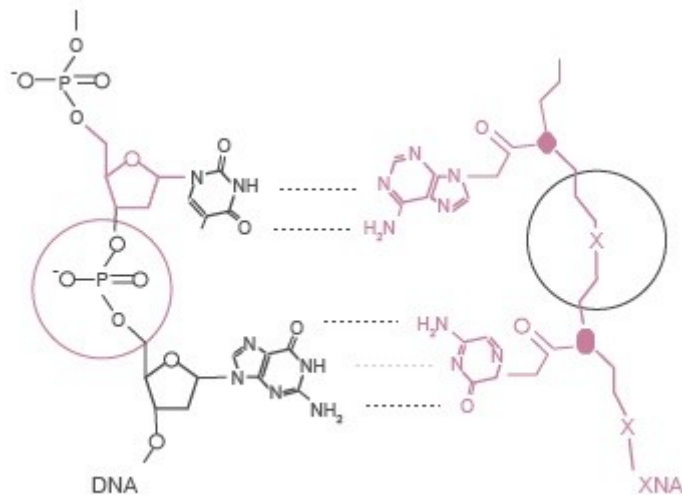
XNA（ゼノ核酸）とは、ワトソン-クリック塩基対形成によって標的DNA配列とハイブリダイズし、修飾された化学骨格を有する革新的な新しい核酸分子オリゴマーです。このXNAオリゴマーは、標的となる標準的なDNA配列へのハイブリダイズにおいて非常に有効であり、定量PCR（qPCR）における分子クランプとして、あるいは標的配列の検出のための特異的な分子プローブとして使用することが可能です。

XNAは、100%相補的な野生型配列に非常に強く結合し、DNAポリメラーゼによるDNA伸長を阻害します。一方で、XNAと変異型DNAの二本鎖は、ミスマッチによって安定的ではなくなるため、PCR反応において鋳型鎖から脱落するため、変異型標的配列のみを効率的に増幅することができます。

XNA分子クランプアッセイは、リキッドバイオプシーやFFPEサンプルに対して非常に高感度です。検出限界（LoD）は、5ngのctDNAを使用して0.1%（7または8コピーの変異DNA）に達することもあり、これは、血液2mlに相当します。

また、循環腫瘍細胞（CTC）の存在は、複数のがんにおける生存率の低さと関連していることが判明しており、CTC値を好ましくないレベル（ $\geq 5\text{CTC}/7.5\text{ml}$ の血液）から好ましいレベル（ $< 5\text{CTC}/7.5\text{ml}$ の血液）で発見することで生存率が向上するため、血中のCTC数は、がんの治療反応の予測因子として使用することができます。このことから、XNAテクノロジーは、がんの変異を発見し、がん治療のために有用な情報を集める効果的な手段になる可能性を持っています。

がんの精密医学においては、成長経路や腫瘍抑制遺伝子などのがんドライバー変異を見つけることが重要で、これらの変異が異なる種類のがんの早期発症に寄与することが知られています。これらの変異の検出は、早期のがん検出に不可欠だけでなく、付随する診断ツールとしてのがん治療のための戦略を提供するためにも不可欠です。



プレジジョンメディシンと早期がん検出

アメリカ合衆国のホワイトハウスが推進するPrecision Medicine Initiativeでは、プレジジョンメディシンを「個々の遺伝子、環境、ライフスタイルの個人差を考慮に入れた、病気の治療と予防のための新たなアプローチ」と定義しています。プレジジョンメディシンによるアプローチを採用することで、「one-size-fits-all（万能）」なソリューションを提供するのではなく、個人の遺伝的構成に基づいた治療法を提供していくことを目的としています。



早期がん検出のための挑戦 - 侵襲的方法

伝統的な手法として、腫瘍遺伝子変異は、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）腫瘍バイオプシー組織サンプルから単離されたDNAを用いて検出されてきました。しかし、組織サンプルには、いくつかの課題があります。

- ✓ 外科的な腫瘍サンプルは侵襲的で、場合によっては危険であり、常に簡単にサンプルを用意できるとは限らない
- ✓ 遠隔転移による変異は、必ずしも検出できるわけではないため、適切な治療計画を立てる機会を逃す可能性がある
- ✓ がんの進行に伴って起こる動的な変異の変化は組織サンプルでは特定できないため、進行に伴う治療戦略の変更が難しい



FFPEによる侵襲的方法



リキッドバイオプシーによる
非侵襲的方法

早期がん検出のための挑戦 - 非侵襲的方法

近年では、低侵襲手法、一般にリキッドバイオプシーと呼ばれる血液サンプルの採取や、血液中の循環する無細胞腫瘍DNA（ctDNA）の変異のモニタリングなどは、早期のがん検出において注目を集めています。しかし、これらの手法には、いくつかの制限があります。

- ✓ 検出技術の感度が結果を大きく左右してしまい、それ自体が制限の要因となりやすいため、現在のがん研究と検出のほとんどが悪性化したがんから行われている主な理由となっている
- ✓ がんが発症する前の小集団の細胞における遺伝子変異の検出が困難であるため、ゲノムワイド解析を用いた前がん研究や早期がん検出は非常に限られている

XNA分子クランプアッセイの特長と利点

ctDNAの腫瘍変異を見つけることは、循環中の健康な細胞の集団に存在するがん細胞DNAの割合が野生型DNAと比べて非常に小さいため、干し草の山の中で針を見つけるくらい大変です。そのような微量の腫瘍細胞DNA（初期ステージでは、全ctDNAのわずか0.01%~1%程度）を検出することは、腫瘍DNAの割合が高く、そして血液中の循環DNAの大部分に寄与し得る進行がんにおいて使用される技術と比較して、はるかに高感度の技術が必要とします。XNAテクノロジーは、これらの問題を解決するためのソリューションを提供します。

- ✓ 多くの一般的な検出装置でテクノロジーを採用することが可能
- ✓ 既知のヌクレアーゼに耐性のある合成オリゴマー（長さ15~25nt）
- ✓ 塩濃度に影響されることなく、標的配列に対する非常に高い結合親和性
- ✓ 一塩基（SNP）や挿入/欠失（インデル）による大きな融解温度差（ $\Delta T_m = 15 \sim 20^\circ C$ ）（ナチュラルDNAでは5~7°C）



OptiSeq™ がんパネル解析サービス

～XNAテクノロジーを採用したNGSソリューションと遺伝子パネル～

これ以上のコストと時間のかかるディープシーケンスは必要ありません！

OptiSeq™次世代シーケンシングプラットフォームは、シーケンシングの深度を最大100倍（OptiSeq™プラットフォームでの500リードは、このプラットフォームを使用しない場合の50,000リードに相当）まで縮小し、遺伝子変異の超高感度検出を可能にすることで、コストと時間の問題を解決します。このプラットフォームは、野生型のテンプレートのみをハイブリダイズする独自のXNAテクノロジーを使用しているため、変異型鋳型のみが選択的に増幅され配列決定されます。

サービスの特長



超高感度

0.1%以下の変異を検出する能力



リキッドバイオプシー サンプル

血液サンプル(cfDNA、
ctDNA)に最適



素早い結果

サンプル調製からレポート
までの所要時間を効率的
にしたワークフロー



CLIA認定

CLIA認定ラボで
実施された解析



高精度

変異遺伝子のリードを
強化することによる
エラーの減少



高い再現性

優れたXNAテクノロジーが
ばらつきを最小化



高い費用対効果

リード深度を100倍削減
することで達成

合理化されたワークフロー



ステップ1
サンプル調製&QC



ステップ2
ターゲット
エンリッチメント



ステップ3
ライブラリー調製&
QC&テンプレート



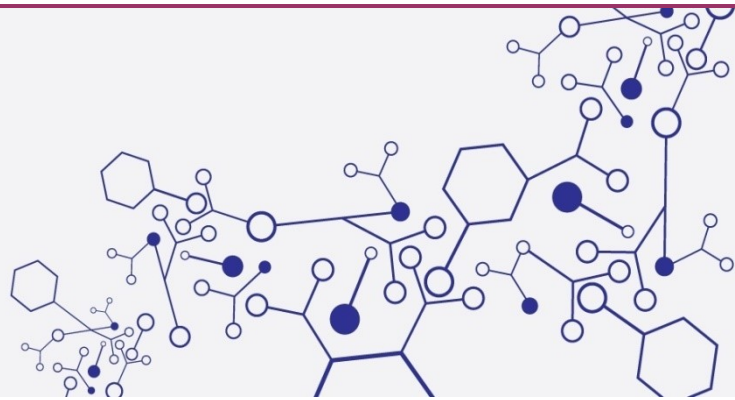
ステップ4
シーケンス反応



ステップ5
データ解析



ステップ6
レポート



OptiSeq™ 遺伝子リスト(65遺伝子)

OptiSeq™がんパネルは、65個のがん遺伝子と腫瘍抑制遺伝子から、2,900の一般的に観察される変異部位（ホットスポット）を標的とするように設計されています。

ABL1	AKT1	ALK	APC	ATM	BRAF	BRCA1
BRCA2	CDH1	CDKN2A	CSF1R	CTNNB1	DDR2	DNMT3A
EGFR	ERBB2	ERBB3	ERBB4	EZH2	FBXW7	FGFR1
FGFR2	FGFR3	FLT3	FOXL2	GNA11	GNAQ	GNAS
HNF1A	HRAS	IDH1	IDH2	JAK2	JAK3	KDR
KIT	KRAS	MAP2K1	MET	MLH1	MPL	MSH6
MTOR	NF1	NF2	NOTCH1	NPM1	NRAS	PDGFRA
PIK3CA	PIK3R1	PTCH1	PTEN	PTPN11	RB1	RET
SMAD4	SMARCB1	SMO	SRC	STK11	TERT	TP53
TSC1	VHL					

サービス仕様

サービス認定：CLIA認定ラボで実施されるサービス

サンプルタイプ：リキッドバイオプシーサンプル（血液 / cfDNA）

生物種：Human

推奨DNA量：体細胞変異（SNP）の検出に10ng、生殖細胞変異については100pg

シーケンシングプラットフォーム：illumina社シーケンサー（Miseq）

エンリッチメント法：マルチプレックスPCR

プライマーペア数：601

プライマープール数：1

対象遺伝子数：65種

ターゲット領域サイズ：55199bp

アンプリコンサイズ：平均146bp（125～175bp）

サンプルマルチプレックス（～2000xの平均カバレッジ）：2x150リード長（～25サンプル）

カバレッジの均一性（～ $\geq 0.2x$ の平均カバレッジ）：>95%

オンターゲットリード%（アライメントされたリード総数のうち、標的領域にアライメントされたリード数の割合）：>95%



納品データについて

解析終了後、CD/DVD、USB等で納品いたします。なお、研究プロジェクトに依存して変更される場合があります。納品内容は基本的に生データレポートの形式でご提供させていただきますが、ご依頼がある場合は生データのご提供も可能です。

また、研究プロジェクトにより別途クリニカルレポートが必要な場合は、追加費用にてご提供させていただきます。ただし、本サービスは研究用途に限定しているため、臨床医による署名はございません。

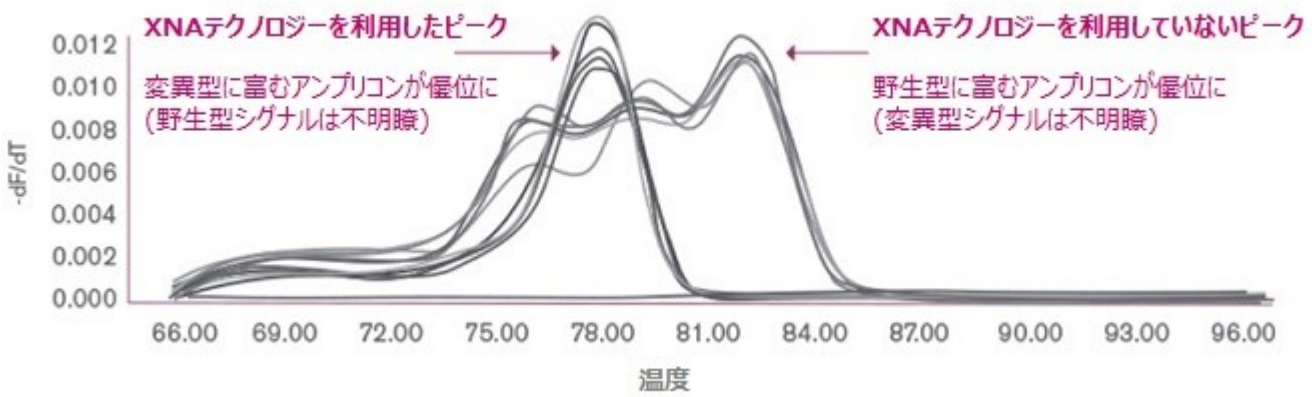


OptiSeq™ がんパネル解析サービス

～NGSターゲットシーケンスサービスのサポートデータ～

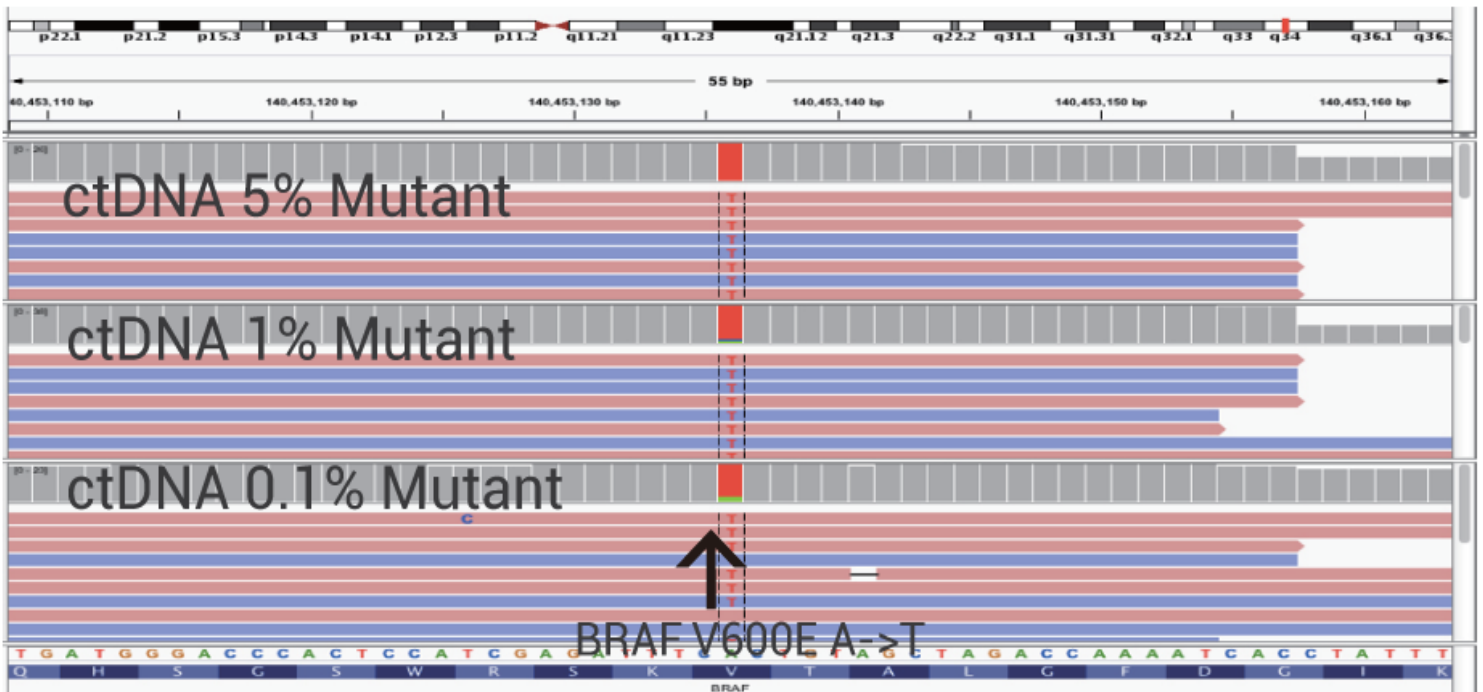
PCRアンプリコンの融解プロファイル

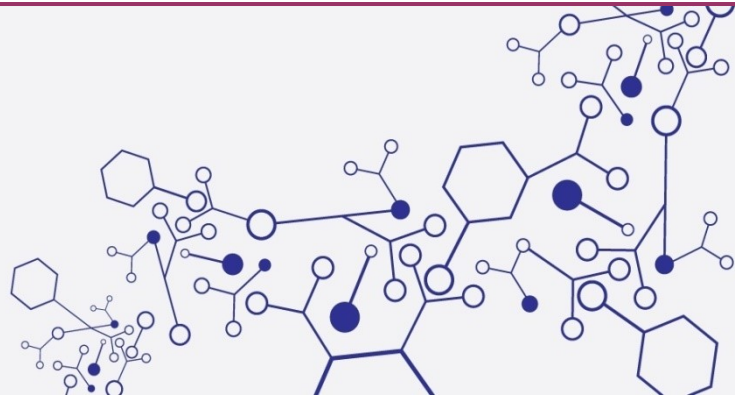
OptiSeq™は、XNAテクノロジーを採用することで、肺腫瘍サンプルからKRASコドン12変異アレルを主に濃縮し、高分解能融解プロファイルの単一ピークで示される様に純粋な変異型PCRアンプリコンをもたらします（左側）。一方で、XNAテクノロジーを使用しない従来のNGSのPCRでは、プロファイル内の変異アレルシグナルが不明瞭になります（右側）。



BRAF V600 変異の高感度検出

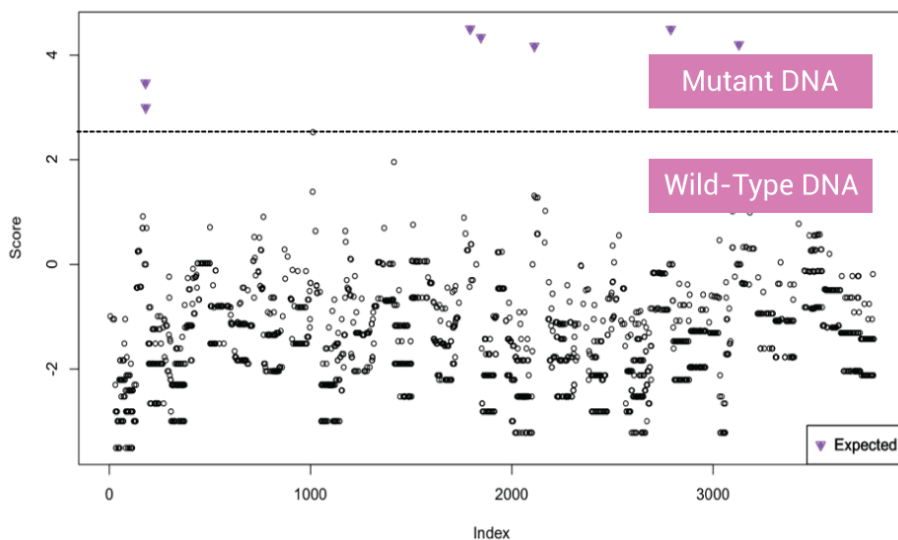
rare変異およびactionable 変異をディープシーケンスなしに検出可能です。OptiSeq™は、全血中の ctDNA から BRAF V600E 変異を迅速に、正確にそして効率よく検出します。5%、1%および0.1%の変異体DNAの検出レベルが示されています。





バックグラウンドノイズの減少

ctDNA 変異部分から来るデータは、変異DNAシグナル（点線上の逆三角形）から分離された野生型DNA（点線下の黒丸）からの高いバックグラウンドノイズを示しています。変異型DNAの場合、変異型DNA鋳型配列のみが配列決定/分析されます（OptiSeq500リード=XNAテクノロジーなしの5万リード）。野生型の場合、野生型アレルは解析されないため、時間が短縮されますが、それでも高品質のリード深度が得られます。



がん変異解析に役立つ検出キットも販売しています！

フィルジェンでは、DiaCarta社のがん変異解析に有用な検出キットもご用意しています。胃がん、肺がん、大腸がんなど、がんの3大死因となっている部位の変異を検出することが可能です。いずれのキットも、XNAテクノロジーを採用しており、リキッドバイオプシーサンプルに対応した仕様となっています。

QClamp® Gene Mutation Detection Tests

KRAS、BRAF、JAK2などの単一遺伝子のコドン変異を検出できるqPCRキットを複数ラインナップしています。



ColoScope™ Colorectal Cancer Mutation Detection Kit

リキッドバイオプシーおよびFFPEサンプルにおける結腸直腸がんに関連するバイオマーカーの定性的検出に利用できる高感度なリアルタイムPCRベースのアッセイキットです。



本サービスについて

本サービスの解析作業は、弊社の海外提携先（DiaCarta社）にて実施されます。また、提供するデータは全て研究用途に限定されています。診断および医療目的ではご利用頂けません。

本サービスは、最低3サンプルからの受注受付となります。サービス内容には、サンプル調整からデータ解析までが全て含まれています。また、解析対象となる cfDNA、ctDNAの性質上、ご用意いただいたサンプルは、速やかに業務提携先へ発送されます。そのため、サンプルの返却などは一切行っておりませんので、ご発送の際は、あらかじめご注意ください。

サービス提供元



DiaCarta, Inc.

【お問い合わせ】

2600 Hilltop Drive, Richmond, CA 94806, USA

TEL : 1-800-246-8878 E-mail : information@diacarta.com

URL : <https://diacarta.com/>

輸入販売元



フィルジェン 株式会社
受託解析部

【お問い合わせ】

〒459-8011 愛知県名古屋市緑区定納山1丁目1409番地

TEL : 052-624-4388 FAX : 052-624-4389

メール : biosupport@filgen.jp URL : <https://filgen.jp/>

代理店

(Jun.,2019)