

# 不可能を可能にするシーケンシング

## ターゲットエンリッチメントを達成するためのホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）サンプル処理

### はじめに

ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）サンプルを使用した次世代シーケンス（NGS）用ライブラリー構築においては、サンプル品質のばらつきが大きいため、高品質のシーケンスデータを収集する上で特有の難しさがあります。ホルマリン固定方法、保管条件、経過時間によっては核酸の架橋や分解につながったり抽出収量に違いが生じたりすることになります。それゆえ、FFPE抽出とライブラリー構築の方法においては、ターゲットを濃縮する（エンリッチメント）アプリケーションについて慎重に考慮しなければなりません。CovarisとTwist Bioscienceは協力して、様々な品質のFFPE組織から直接、すぐにシーケンス可能なマルチプレックス化ライブラリーを生成する、完全なライブラリー調整・ターゲットエンリッチメントソリューションをご提供します。

### テクノロジー

このワークフローにおいては、CovarisのtruXTRAC FFPE total Nucleic Acid PlusキットとAFA-TUBE TPX shearingを、Twist Bioscienceのライブラリー調整・ターゲットエンリッチメントソリューションの世界有数の性能と組み合わせで活用します。

### CovarisのFFPE用プレ分析製品

truXTRAC FFPE total Nucleic Acidキット・ファミリーには、特許取得済みの「Adaptive Focused Acoustics (AFA)」テクノロジーが脱パラフィン化・核酸抽出のワークフローに組み込まれています。微調整されたAFAエネルギーの設定によって、同一サンプルからの並行したRNAとDNAの単離が可能であり（切断も起こりません）、それゆえ収量は増加し、別々のサンプルを入力することによる不均一性は減少します。溶媒を使用しない脱パラフィン化・アクティブ抽出プロセスにより、下流のNGS分析に十分な量の高品質な核酸が得られます。Covaris truXTRAC FFPE total Nucleic Acid Plusキットは、AFAを使用してFFPE組織サンプルから全核酸（RNAおよびDNA）を効率良く、逐次抽出するために設計されています。

### Twist Bioscienceのターゲットエンリッチメントソリューション

物理的断片化用のTwistライブラリー調整キットを使用して、下流におけるターゲットの濃縮とその後のシーケンシングにすぐ利用できるアダプター結合ライブラリーの構築が可能です。Twist CDIとUDI、両方のアダプターに対応した当キットは、幅広い品質やタイプのDNAに用いることができます。これをTwist

ターゲットエンリッチメントソリューションと組み合わせると、ターゲット分子の飽和と濃縮が達成されます。この濃縮効率によって、特に劣化したサンプルを用いた場合に、変異の決定において最高レベルの信頼性があります。ターゲット領域全体の均一なキャプチャにより余分なシーケンシングを最小化し、それによってシーケンシングコストが低下、サンプル処理量が増加し、妥協のない品質でターゲット領域全体のより深いカバレッジが達成されます。

### 方法

FFPEを用いた本アプリケーションにおいては、CovarisのFFPE抽出・断片化とTwistのライブラリー調整・ターゲットエンリッチメントを組み合わせた多段階のワークフローを、それぞれの推奨条件のもと実施しました。様々なタイプのFFPE組織（N = 6）において1回抽出を行い、その定量的品質スコアをKAPA hgDNA Quantification and QCキット（QQCキット）を使用したqPCRによって決定しました。そして抽出サンプルを200 bp~250 bpのターゲット範囲にまでそれぞれ複数回断片化しました（N ≥ 3）。次に、断片化されたゲノムDNAを100 ng、ライブラリー調整用にインプットしました。ライブラリーはキャプチャごとにマルチプレックス（N = 8）サンプルにプールしました。Twist Universal BlockersとTwist Human Core Exome Probesをターゲットエンリッチメント用ハイブリダイゼーション反応に加えしました。濃縮されたライブラリーについて、NextSeq 500/550 High Output v2キット（Illumina）を用いてシーケンスを行って2×76のペアエンドリードを生成し、150xのターゲット塩基にダウンサンプリングしました。シーケンス解析には、Picard HS\_metricsツールをマッピング品質20で使用しました。

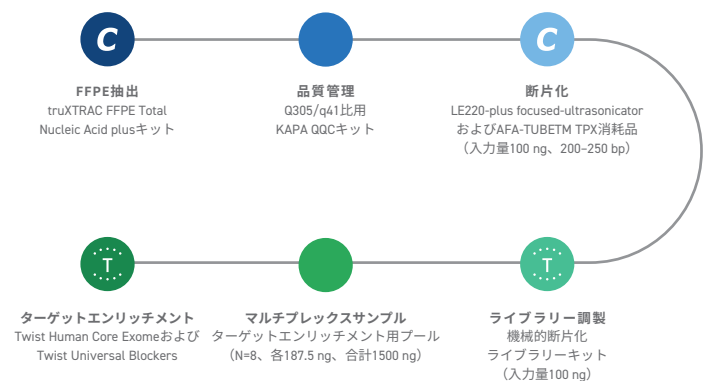
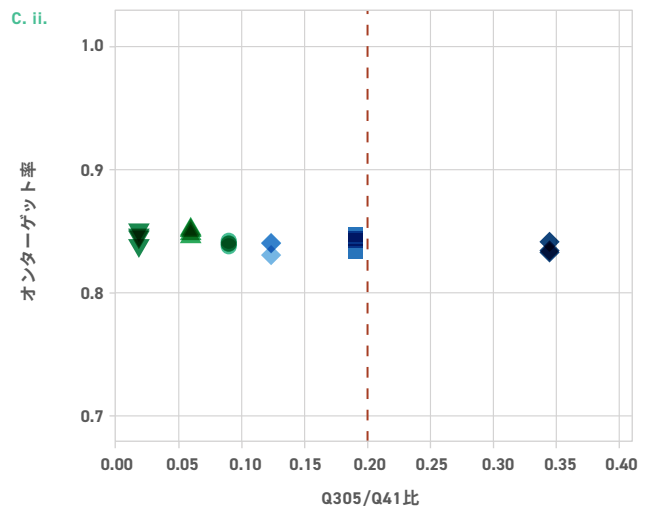
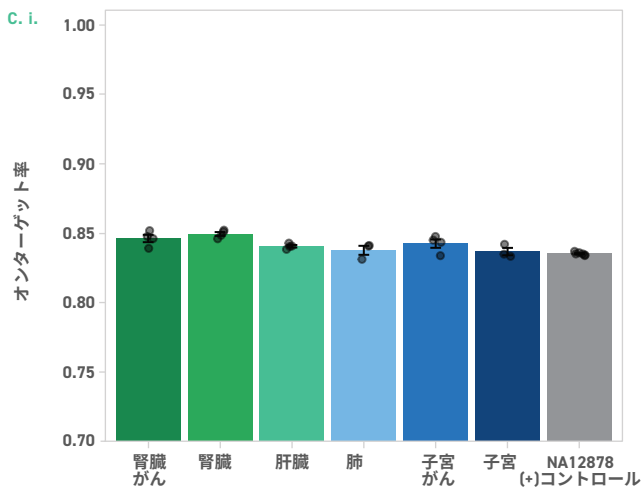
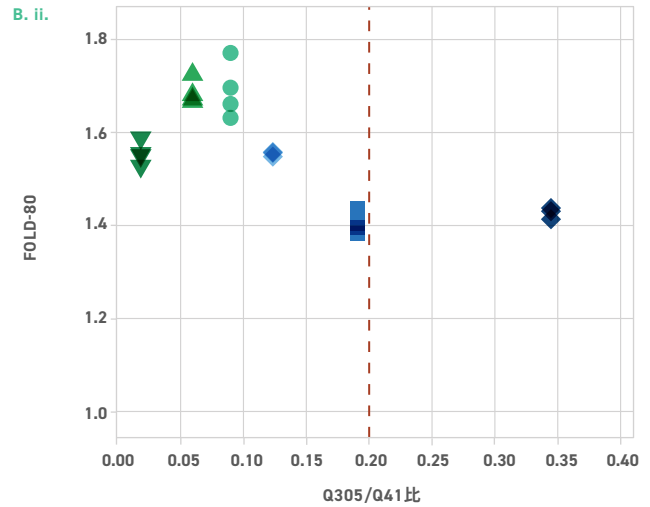
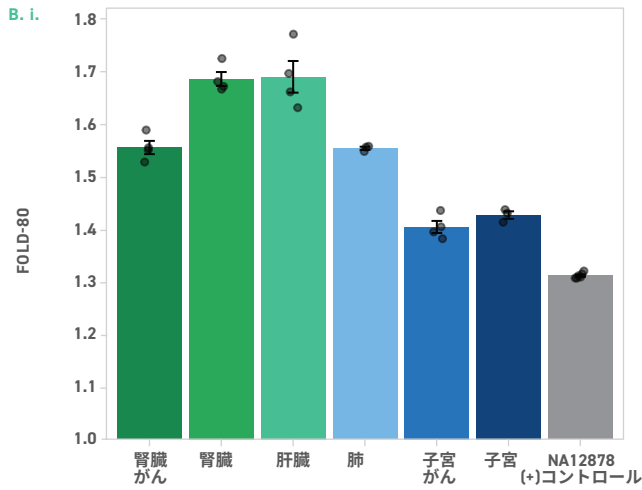
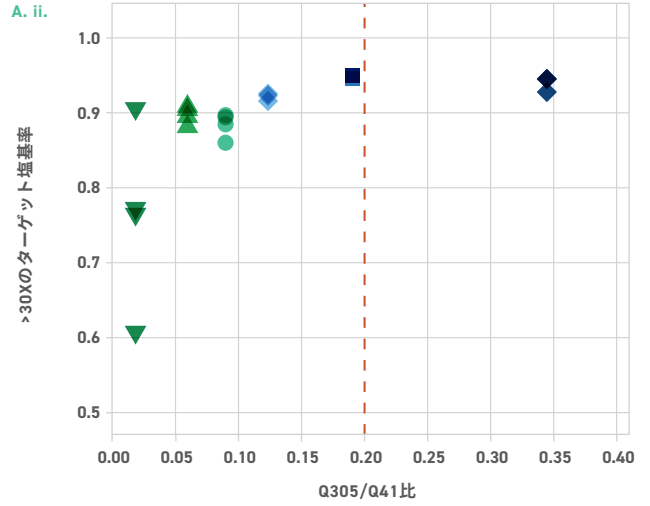
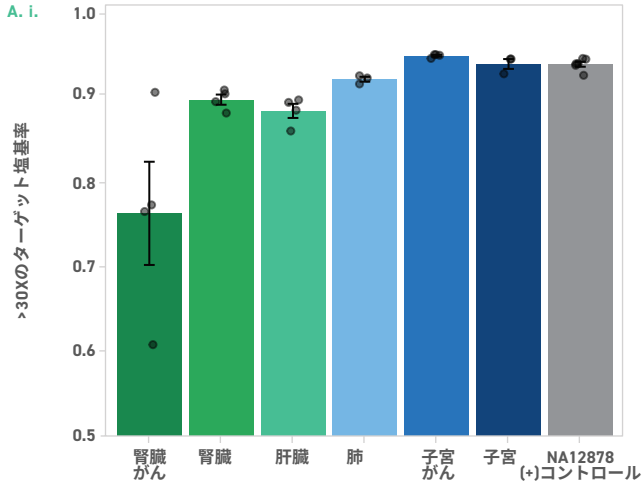


図1：実験のワークフロー

結果



結果

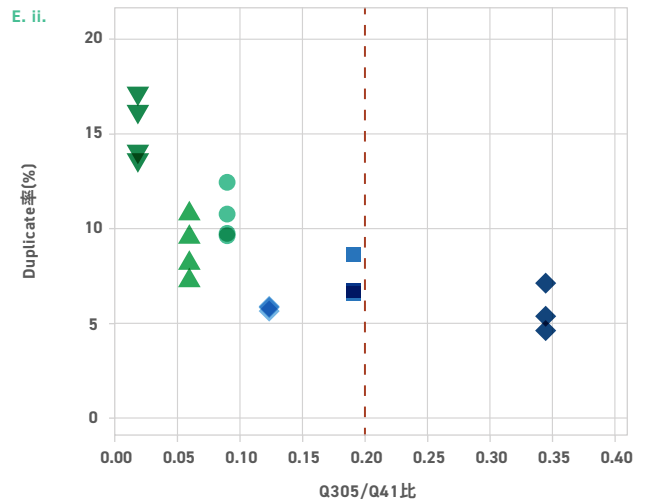
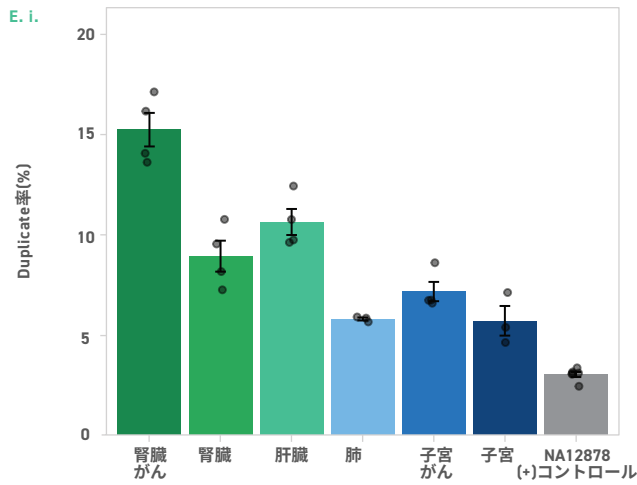
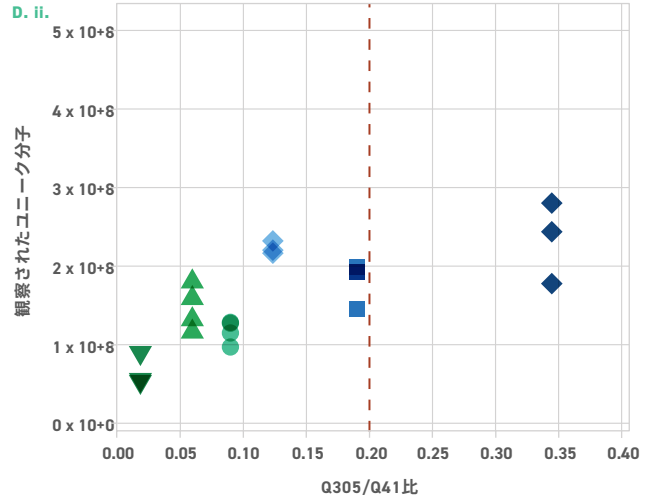
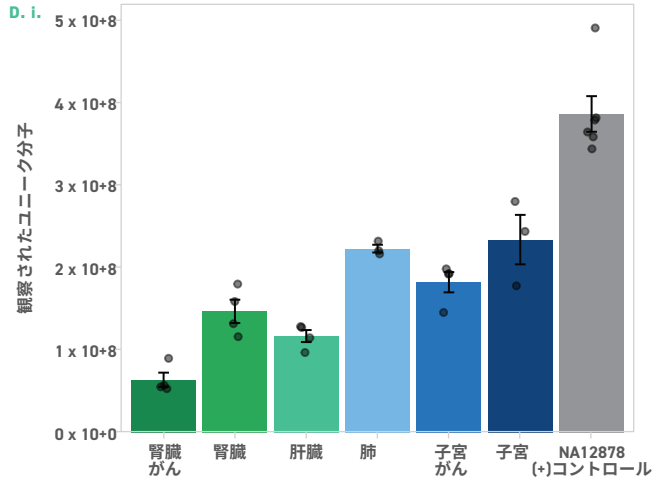


図2. FFPE抽出サンプルのシーケンスパフォーマンス (A~E) 抽出・断片化用Covaris AFAテクノロジーとTwistターゲットエンリッチメントソリューション (図1を参照) を用いて調製したゲノムDNAライブラリから得られた、シーケンスの各測定基準の概要。実験におけるワークフローについては、各ステップ (図1を参照) ごとにメーカー推奨のプロトコルに従って実施。組織タイプごとのシーケンスの各測定基準の棒グラフ (i) およびライブラリーの完全性に関する定量スコア (Q305/Q41比、KAPA hgDNA Qualification and QCキット) を横軸として、シーケンスの各測定基準を縦軸にプロットした散布図。ポジティブコントロールには、AFAによるせん断を受けたもののFFPE抽出やQ305/Q41比決定は行わなかったものを使用。全ての観察でN ≥ 3、エラーバーは標準偏差を示す。

## 結果

上述のワークフローを使用して、KAPA Q305/Q41 qPCR比が0.34~0.02の品質を持つ多数のFFPE組織タイプの処理を行いました。Q305/Q41比が0.05以上を示すサンプルでは、8プレックスライブラリーのシーケンス結果は、類似する公表された成果と比較して、均一性 (Fold<sub>80</sub>: 1.8以下)、シーケンス深度 (30xカバレッジ: 88%以上、150xダウンサンプリング)、およびDuplicate率 (11%以下) の点で大幅なターゲットエンリッチメント効率 (Picard metrics) の改善を示しました。

これらの結果は、自動化ワークフローに組み込むことが可能な、FFPEサンプルのライブラリー調製とターゲットエクソームシーケンスのための有効なソリューションを示しています。CovarisのtruXTRACキットとAFAテクノロジーは、FFPEサンプルからサイズ特異的なDNAライブラリーを生成します。これをTwistのターゲットエンリッチメントソリューション (Human Core ExomeとUniversal Blockers) と組み合わせることで、高性能なターゲットシーケンス用マルチプレックス化ライブラリーを提供します。

## 考察

大部分のFFPEサンプルには、高品質なシーケンスデータを得るための課題が絶えず伴います。サンプル保存方法、経過時間、サンプル保管条件、組織タイプ、その他の要因によって、サンプル品質の大きくなばつきがもたらされます。サンプル品質の定量化を行う場合、KAPA QQCキットなどのキットから得られるqPCRスコアは、十分なシーケンス深度をもたらす可能性の低い、低品質サンプルの同定に役立ちます。KAPA QQC Q305/Q41比が0.2未満のサンプルは、通常は「低品質」でシーケンスには適さないとされます<sup>1</sup>。

CovarisのtruXTRAC製品・AFAテクノロジーをTwistのNGSライブラリー製品・ターゲットエンリッチメントパネルと組み合わせたFFPE抽出のワークフローを紹介しました。このワークフローによって、KAPA QQC Q305/Q41比が0.05以上のサンプルであれば全エクソームマルチプレックス化ターゲットエンリッチメントおよびシーケンスを検討できるようになったことが示されました。結果として、CovarisとTwistのテクノロジーを適用すると、他のワークフローでは通常「シーケンスに適さない」とされるFFPEサンプルであっても、自信を持って「シーケンスに適する」と分類し直すことができます。

AFAとTwistターゲットエンリッチメントテクノロジーを組み合わせることで、研究者はこれまでの分子プロファイリング法には適していなかった興味深いFFPEサンプルから、よりしっかりとデータを解き明かすことができます。そのような、しばしば希少で難易度の高いサンプルのシーケンスを行えるようになったことで、様々な各腫瘍における分子ドライバーに対するより深い洞察が得られ、オーダーメイド医療や精密医療の発展に向けてさらに前進することが期待されます。

<sup>1</sup> de Abreu, F, et al. (AGBT 2015) *The KAPA Human Genomic DNA Quantification and QC Kit Enables Prediction of Sequencing Performance Through User-Defined Metrics*, Marco Island, FL

Adaptive Focused Acoustics®、AFA®、AFA-TUBE™、Covaris®、Illumina®、Kapa®、NextSeq®、truXTRAC®、Twist Bioscience®のそれぞれの商標の表示は正確であると考えられますが、それを保証するものではありません。

本文書で使用されている登録済みまたは登録申請中の名称や商標などは、特に商標マークが付されていない場合でも、法律で保護されていないとは見なされません。