

第6号：リキッドバイオプシ特集②

はじめに

～ctDNA解析について～

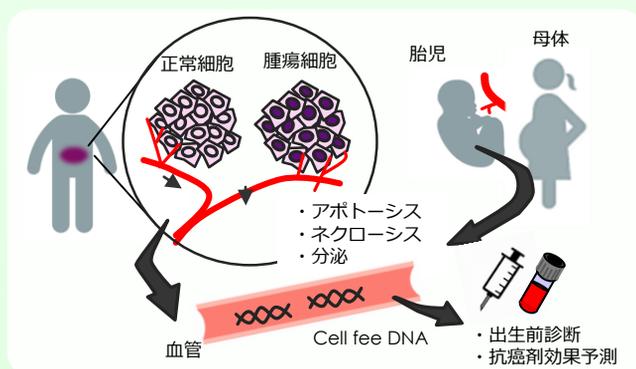
2018年8月にKPSL newsを創刊して早くも1年が経ち、vol.6を発行することができました。これもひとえに普段から研究を盛り上げていただいている皆様のおかげとっております。これからも皆様に興味を持っていただけるような情報をご提供できるよう続けてまいります。

さて今回の第6号は、前号『微小膜画分(エクソソームなど)の解析について』に引き続き、リキッドバイオプシ特集として『ctDNA (circulating tumor DNA) 解析』をご紹介します。

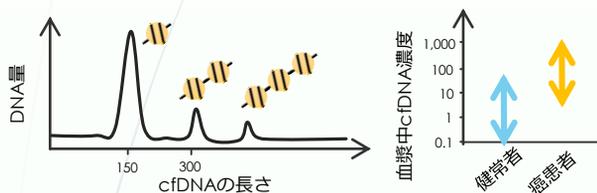
cfDNAとctDNA

ネクローシスやアポトーシスにより細胞から血液に放出されたDNA断片は、cell free DNA (cfDNA)として体内を循環しています。そのcfDNAは断片化した状態で存在し、そのサイズは主に約170bpとなっております。これはクロマチン1つを構成するDNAサイズと一致します。

がん患者の血液には正常細胞由来だけでなく腫瘍細胞由来のcell free DNAが微量に存在しており、これをcirculating tumor DNA(ctDNA)と呼びます。

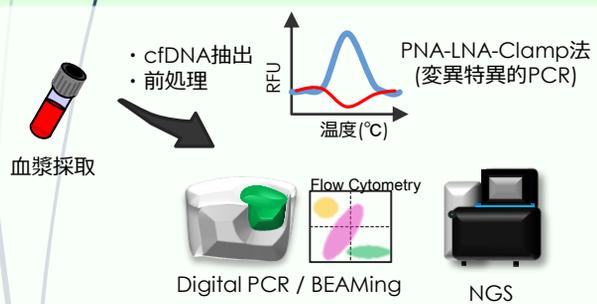


検査への応用が期待されるcell free DNA



Cell free DNAのフラグメントサイズと濃度

近年、がんなどの診断や治療法選択において、生体検査(バイオプシ)の代替として、血液・体液などを用いたリキッドバイオプシによる低侵襲な検査のニーズが高まっております。ctDNAの変異の解析は分子標的治療薬の効果予測や薬剤耐性のモニタリングなどに有用な指標とされており、臨床有用性の早期確立と臨床検査としての実用化に期待が寄せられています。



ctDNA解析の主な手法

ctDNAの解析手法

血中cfDNA量はごく微量であること、さらに正常細胞由来のDNAもある中から腫瘍由来の変異を検出しなければいけないことから、ctDNAの解析は高感度に精度よく測定する技術が求められます。これまではPNA-LNA-Clamp法といった変異特異的PCRやデジタルPCRといった手法が使われてきました。特にデジタルPCRをベースとしてフローサイト検出するBEAMing法は、ctDNAを高感度に測定できる一つの手法です。

最近では次世代シーケンサー(NGS)の精度向上と分子バーコード技術開発により、NGSによるctDNA解析が主流となりつつあり、多くの企業がctDNA解析のための試薬や測定サービスを展開しています。また日本では現在、産学連携全国がんゲノムスクリーニング事業「SCRUM-Japan GI-SCREEN」において、Guadant Health社のGuadant360アッセイを用いた消化器癌患者のctDNA中の遺伝子変異を検出する臨床研究がまさに進行中です。

試薬名/テスト名	企業名
Guadant360	Guadant Health
FoundationOne Liquid	Foundation Medicine
AVENIO ctDNA series	Roche Diagnostics
Oncomine Lung cfDNA Assay	Thermo Fisher Scientific
Reveal ctDNA 28 kit	ArcherDX
Signatera™	Natera
OptiSeq™ Pan-Cancer Panel	DiaCarta
PlasmaSELECT™ 64	PGDx

Roche社が開発したctDNA解析システム

弊社ではRoche社が開発した「AVENIO ctDNA Analysis システム」を使用しております。分子バーコードとin silicoでのエラー抑制技術を組み合わせた統合デジタルエラー抑制 (iDES) 戦略による優れた分析性能が特徴です。後期の固形腫瘍（肺がん、大腸がんなど）の患者を主なターゲットとし、血漿検体（リキッドバイオプシー）から4種類の遺伝子変異（SNV, Indel, CNV, Fusion）を調べることができます。



AVENIO ctDNA Targeted kitにおける対象遺伝子とデータ

● NCCNガイドラインで規定されている17遺伝子が含まれ、幅広いがん種の研究用途に

Gene	Seq Target	SNV	Indel*	Fusion**	CNV**	Gene	Seq Target	SNV	Indel*	Fusion**	CNV**
ALK	Selected Regions	•	•	•		KRAS	All Coding Regions	•			
APC	Selected Regions	•	•			MET	All Coding Regions	•	•		•
BRAF	Selected Regions	•	•			NRAS	Selected Regions	•			
BRCA1	All Coding Regions	•				PDGFRA	Selected Regions	•			
BRCA2	All Coding Regions	•				RET	Selected Regions	•		•	
DPYD	Selected Regions	•				ROS1	Selected Regions	•		•	
EGFR	All Coding Regions	•	•		•	TP53	All Coding Regions	•			
ERBB2	All Coding Regions	•	•		•	UGT1A1***	Selected Regions	•			
KIT	Selected Regions	•	•								

● 変異タイプ別の感度及び陽性的中率

Mutation Class	SNVs		Indels		Fusions		CNVs	
Mutant Allele Frequency/ Copy Number	0.5%*		1.0%*		1.0%		At LOD**	
Sensitivity and PPV	Sensitivity	PPV	Sensitivity	PPV	Sensitivity	PPV	Sensitivity	PPV
	>99%	>99%	>99%	>99%	>99%	>99%	>99%	>99%

SNVはアレール頻度0.5%のホットスポット、IndelおよびFusionはそれぞれアレール頻度1.0%の遺伝子の検出感度と陽性的中率を算出しました。CNVのパフォーマンスは、5コピーに増幅したMETをもつ腫瘍ゲノムが10%存在している条件(2.3コピーの増幅)で評価しています。全てのパネルで塩基あたり99.99%以上の特異性を達成していました。これらの検証には細胞株DNAを混合したcgDNA10ng~50mgを使用しており、シーケンシングデータはillumina NextSeq 500によるものです。Targeted Kitは1検体あたり40Mリード、Expanded KitとSurveillance Kitは1検体あたり60Mリードを解析しました。



ctDNA解析のためのサンプル採取

cell free DNA解析用の採血を行う場合、通常の抗凝固剤入り採血管ですと採血後の時間の経過に伴い有核血液細胞由来のDNAが増加し、腫瘍など解析対象となるctDNAの存在率が相対的に低下してしまいます。正確な結果を得るためには、適切な採血および試料の保存が非常に重要です。複数のメーカーがctDNA解析専用の採血管を開発していますので、参考にしてください。

KPSLの次世代シーケンス解析一覧 まずはご相談ください

RNA-seq	メッセンジャーRNAを網羅的に測定することで生体内の遺伝子発現変動を網羅的に解析します
ChIP-seq	クロマチン免疫沈降 (ChIP) により精製されたDNAの配列を解析し、転写修飾因子の結合領域の推定やヒストン修飾を受けている領域の探索などの研究に用いられます
exome-seq	エクソン配列のみを網羅的に解析します。エクソンは全ゲノムの2%未満ですが遺伝性疾患の多くがエクソン領域の変異によるものと推定されており、効率的に疾患関連遺伝子を解析します
ctDNA解析	血漿中cell free DNAを抽出し、腫瘍由来のDNAの変異を解析します

KPSL News バックナンバー

- Vol.1 プロテオミクス特集
~次世代定量プロテオミクス『iMPAQT』分析始めました~
- Vol.2 メタボロミクス特集
~網羅分析からターゲット分析へ~
- Vol.3 高感度マルチイムノアッセイ特集
- Vol.4 遺伝子解析特集
~次世代シーケンサーの基本原則と新たな技術の紹介~
- Vol.5 リキッドバイオプシ特集
~細胞外小胞 (Extracellular Vesicles) の新たな展開~

【お問い合わせ先】

九州プロサーチ有限責任事業組合
〒819-0388 福岡県福岡市西区九大新町4-1
TEL:092-805-3239 FAX:092-805-3239
MAIL: info@kpsl.jp

←URL: <https://kpsl.jp/>



KPSL
九州プロサーチLLP