

TruSight™ Oncology 500 ctDNA v2 が 提供する優れた 性能と改善された ワークフロー

TruSight Oncology 500 ctDNA v2は、TruSight Oncology 500 ctDNA v1の改良版であり、以下により高品質で正確なデータを提供します。

- 分析感度の向上: スモールバリエーションにおける0.2% VAF対0.5% VAF
- より少量のインプット要件: 20 ng対30 ng DNA
- ライブラリー調製の高速化: 約8時間対2.5日



はじめに

包括的ゲノムプロファイリング (CGP) は、次世代シーケンサー (NGS) を利用し、幅広いバイオマーカーを1つのアッセイで評価し、一連の関連検査を複数実施するより少ないサンプル量で早く結果が得られます。^{1,2} CGPの標準的なアプローチには、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルなどの固形がん組織検体の使用が含まれます。ただし、場合によっては、十分な組織検体が入手できない場合があります (この状況は最大25%の確率で発生する可能性があります³)、腫瘍にアクセスできないか、組織バイオプシーの結果を得るまでに遅くなる可能性があります。このような場合、リキッドバイオプシーと呼ばれる血液中の血中循環腫瘍DNA (ctDNA) を使用してCGPを実施することにより、多くの場合、組織生検よりも迅速かつ安価な方法で、腫瘍のゲノム状況についての洞察を得ることができます。⁴

リキッドバイオプシーを活用するには、cfDNA中に低頻度で存在する体細胞変異を検出できる、高感度で特異的な解析アッセイを使用することが重要です。オリジナルのTruSight Oncology 500 ctDNA アッセイは、実証済みのイルミナ次世代シーケンサー (NGS) テクノロジーの力を活用し、CGPを可能にするために必要となる高い分析感度を達成することで、この課題に対処しました。この成功に基づいて、TruSight Oncology 500 ctDNA v2は同一の包括的コンテンツを提供し、ケミストリーとワークフローの改善を行い、分析感度の向上、

答えを得るまでの時間短縮、より効率的なワークフローにつながりました (表1、表2、表3)。⁵

本テクニカルノートでは、TruSight Oncology ctDNA v2アッセイの性能をオリジナルアッセイの性能と比較します。データより、結果間の良好な一致が明らかとなり、v2アッセイでは一部のケースで性能の向上が観察されました。

TruSight Oncology 500 ctDNA v2は迅速なワークフローを提供します

TruSight Oncology 500 ctDNA v1およびv2アッセイはどちらも、ワークフローにおいて同じ基本手順に従います。1: セルフリーDNA (cfDNA) からのライブラリー調製、2: シーケンス、3: データ解析、4: レポート生成。TruSight Oncology 500 ctDNA v2では推奨インプット量はcfDNA 20 ng (v1アッセイでは30 ng) であり、ハイブリダイゼーションステップの必要回数は1回であることから、ライブラリー調製は2.5日から1日に短縮されます (図1)。

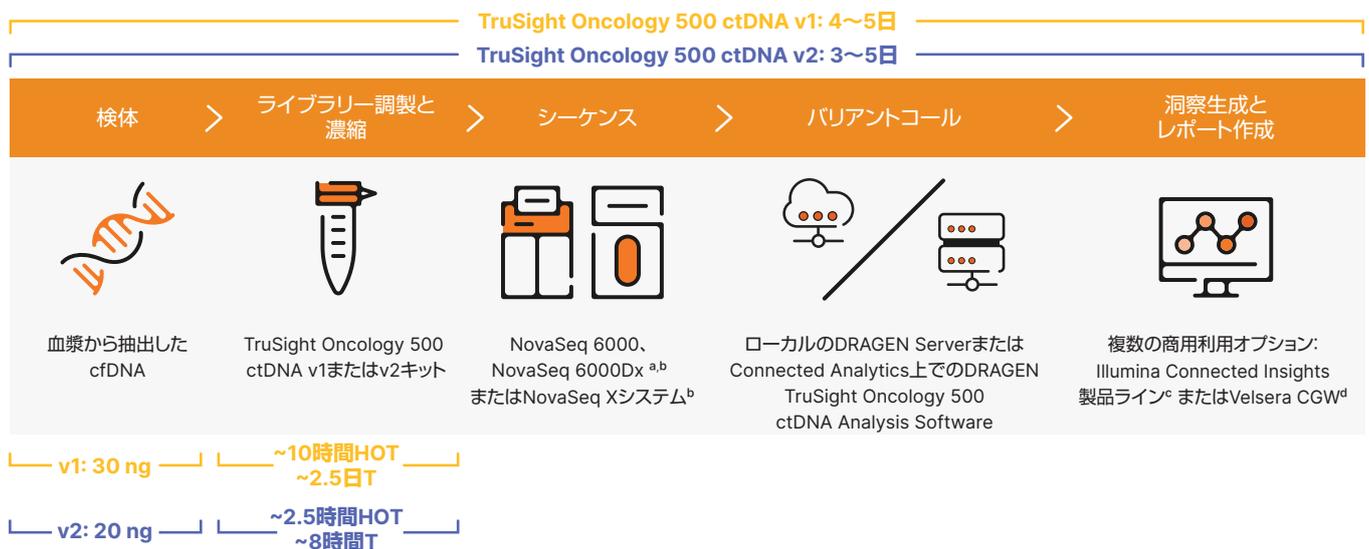


図1: TruSight Oncology ctDNA v2は、オリジナルのアッセイと比較して必要とするインプット量が少なく、より迅速なワークフローを提供します: ライブラリー調製中のハイブリダイゼーションステップは1回であるため、ユーザーは約1.5日を節約でき、ワークフロー期間の短縮が可能になります。

HOT: ハンズオンタイム。T: 合計時間。

a. RUOモードのNovaSeq 6000Dx。b. 2024年に利用可能になります。c. 一部の国で利用できます。Illumina Connected Insights製品ラインは、サードパーティーのナレッジソースへのAPIコールを通じてユーザー定義の三次解析に対応します。d. Velseraの旧称はPierianです。他の商用オプションも利用できます。

表1:TruSight Oncology 500 ctDNA v1およびv2の共通の利点

| 利点 | 特長 |
|-----------------------------|--|
| 包括的なコンテンツ | 523遺伝子をカバーする1.94 Mbパネル |
| シーケンスバッチサイズ | 8サンプル (S2フローセル) 24または48サンプル (S4フローセル) |
| NovaSeq 6000システムでの合計シーケンス時間 | S2フローセル:~36時間 S4フローセル:~44時間 |
| 二次解析の合計時間 ^a | S2フローセル:~12時間 S4フローセル:~20時間 |
| 分かりやすいレポート作成 | 複数の商用利用オプション: Illumina Connected Insights製品ライン ^b または Velsera CGW ^c などのサードパーティオプション |

- a. 表示されている解析時間は、DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA v2.1を使用したローカルDRAGENサーバー解析上のシングルフローセルの場合です。クラウドベースのIllumina Connected Analyticsを使用する場合、解析時間は大幅に異なる場合があります。
- b. 一部の国で利用できます。Illumina Connected Insights製品ラインは、サードパーティのナレッジソースへのAPIコールを通じてユーザー定義の三次解析に対応します。
- c. Velseraの旧称はPierianです。CGW: Clinical Genomic Workspace。他の商用オプションも利用できます。

改善点とデータ一致性の実証

方法

サンプル

TruSight Oncology 500 ctDNA v2がオリジナルのTruSight Oncology 500 ctDNAアッセイと同等以上の結果をもたらすことを実証するために、LGC Clinical Diagnosticsのコントロールサンプルまたは実際の臨床サンプルを使用して性能試験を実施しました* (表4)。コントロールサンプルは抽出済みの核酸として提供され、TruSight Oncology 500 ctDNAアッセイで使用するための追加の調製は必要ありませんでした。

* 研究用途のみに提供されたヒト血漿。

表2:TruSight Oncology 500 ctDNA v2によるユーザーエクスペリエンスの向上

| v2の利点 | TruSight Oncology 500 ctDNA v2 | TruSight Oncology 500 ctDNA v1 |
|-------------------------|---|--|
| 柔軟なキットサイズ | 24または48サンプル | 48サンプル |
| 少量のインプット必要量 | 推奨20 ng (最少5~10 ng) | 推奨30 ng |
| より迅速な1日でのライブラリー調製ワークフロー | ハイブリダイゼーション/キャプチャーステップは1回 • ハンズオンタイム: ~2.5時間 • 合計時間: ~8時間 | ハイブリダイゼーション/キャプチャーステップは2回 • ハンズオンタイム: 10時間 • 合計時間: ~2.5日 |
| 迅速なアッセイターンアラウンドタイム | ~3.5日 | 4~5日 |
| 効率化されたユーザー体験 | プレートベースのインデックス サーマルサイクラーベースのインキュベーションステップ | チューブベースのインデックス Hybexとサーマルサイクラーベースのインキュベーションステップ |
| 自動化対応 | 柔軟なバッチサイズを備えた自動化に適したキットとメソッド ^a | 非対応 |
| スケーラビリティの向上 | 192種類のインデックス | 16種類のインデックス |

a. 48サンプルキットは自動化を目的としています。

イルミナが検証した臨床サンプルからの核酸は、QIAamp Circulated Nucleic Acid Kit (QIAGEN、カタログ番号: 55114) を使用して抽出しました。[†] アーリーアクセスを実施した施設で検証された臨床サンプルからの核酸は、MagMAX Cell-Free DNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific、カタログ番号: A29319) またはQIASymphony DSP Circulated DNA Kit (QIAGEN、カタログ番号: 937556) のいずれかを使用して抽出しました。

[†] 提示したデータは、DNA抽出のためのQIAamp Circulated Nucleic Acid Kitの使用を反映しています。QIAampキット (QIAGEN)、Quick-cfDNA (Zymo Research)、またはApostle MiniMax High Efficiency Cell-Free DNA Isolation Kit (Beckman Coulter) を使用して同等のシーケンス性能が達成されました (データは示していません)。

表3: TruSight Oncology 500 ctDNA v2による性能の向上

| v2の利点 | TruSight Oncology 500 ctDNA v2 | TruSight Oncology 500 ctDNA v1 |
|---------------|---|--|
| 分析感度の向上 (SNV) | 0.4% VAFで95%の感度 (20 ngインプット) 0.2% VAFで90%の感度 (20 ngインプット) | 0.5% VAFで95%の感度 (30 ngインプット) |
| 分析特異度の向上 | SNVでは > 99.995%、他のすべてのバリエーションでは > 95% | ≥ 95% |
| 高度な二次解析 | DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA v2 Analysis Software v2.1+ (CHフィルタリングの改良を含む) | DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNAパイプライン |

ライブラリー調製

ライブラリーは、各TruSight Oncology 500 ctDNAアッセイのユーザーガイドに指定されているプロトコールに従って手動で調製しました (表5)。

シーケンス

どちらのアッセイも、シーケンスはNovaSeq™ 6000システムで実施しました (表6)。

データ解析

両アッセイのデータ解析は、ローカルDRAGENサーバー上のDRAGEN™ TruSight Oncology 500 ctDNA v2.1パイプラインを使用して実施しました。バリエーションコールとQCメトリクスの追加解析は、JMP統計ソフトウェア、R、およびExcelを使用して実施しました。

表4: 比較試験に使用したサンプル

| LGC Clinical Diagnosticsから購入したコントロールサンプル | |
|--|-----------|
| 製品 | カタログ番号 |
| SeraSeq ctDNA Complete Mutation Mix AF 5% | 0710-0528 |
| SeraSeq ctDNA Complete Mutation Mix AF 2.5% | 0710-0529 |
| SeraSeq ctDNA Complete Mutation Mix AF 1% | 0710-0530 |
| SeraSeq ctDNA Complete Mutation Mix AF 0.5% | 0710-0531 |
| SeraSeq ctDNA Mutation Mix AF 1% | 0710-0140 |
| SeraSeq ctDNA Mutation Mix AF 0.5% | 0710-0141 |
| SeraSeq ctDNA Mutation Mix AF 0.25% | 0710-0142 |
| SeraSeq ctDNA Mutation Mix AF 0.125% | 0710-0143 |
| リアルワールドの臨床サンプル: 匿名化されたがん患者検体 | |
| 生物標本ベンダーから購入したサンプル、または定期的な診療の一環としてアーリーアクセスを実施した施設から受領した研究使用に同意されたサンプルに含まれていたがんの種類: 乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、頭頸部がん、肺がん (非小細胞肺がんを含む)、卵巣がん、前立腺がん。 | |

表5: ライブラリー調製パラメーター

| キット | カタログ番号 | サンプルあたりのインプット量 |
|--------------------------------|----------|----------------|
| TruSight Oncology 500 ctDNA | 20039252 | 30 ng |
| TruSight Oncology 500 ctDNA v2 | 20105899 | 20 ng |

表6: NovaSeq 6000システムのシーケンスランパラメーター

| パラメーター | 値 |
|---------|---|
| リード長 | 151 bp × 2 |
| インデックス長 | v1: 8 bp、デュアルインデックス v2: 10 bp、デュアルインデックス |
| サイクル数 | 300 |
| リード数 | サンプルあたり約4億のペアエンドリード |

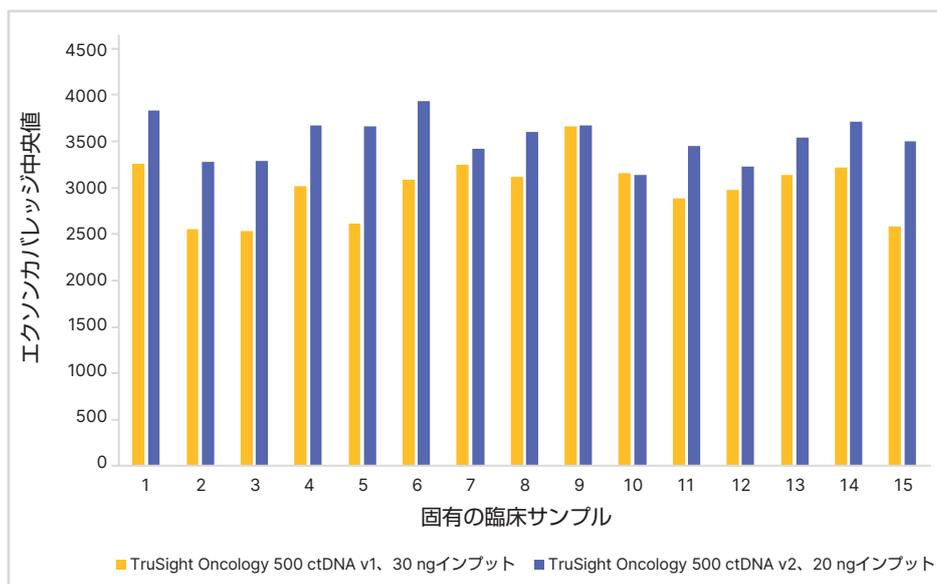
結果

少量のサンプルで高いエクソンカバー率中央値を実現

エクソンカバレッジ中央値 (MEC) は、エクソン領域にわたるリード数を測定します。MECが高いほど、生成されるシーケンスデータの信頼度が高くなります。TruSight Oncology 500 ctDNA v1またはv2アッセイを使用して解析した臨床サンプルでは、内部 (イルミナ)

施設と外部 (アーリーアクセス) 施設の両方で、v2アッセイを使用して調製した臨床サンプルに対して高いMECを示しましたが (図2)、これはライブラリーの変換効率の向上によるものです。このことは、v2アッセイで33%少ないインプット量のcfDNAを使用して達成されたことに注意してください (v2では20 ng、v1では30 ng)。

A. 臨床サンプルを使用したイルミナによる生成データ



B. 臨床サンプルを使用した外部の早期アクセス施設による生成データ

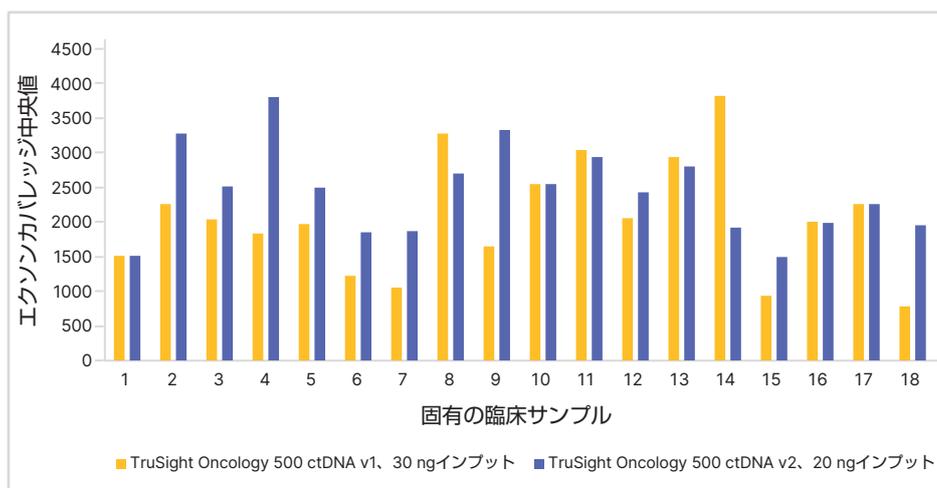


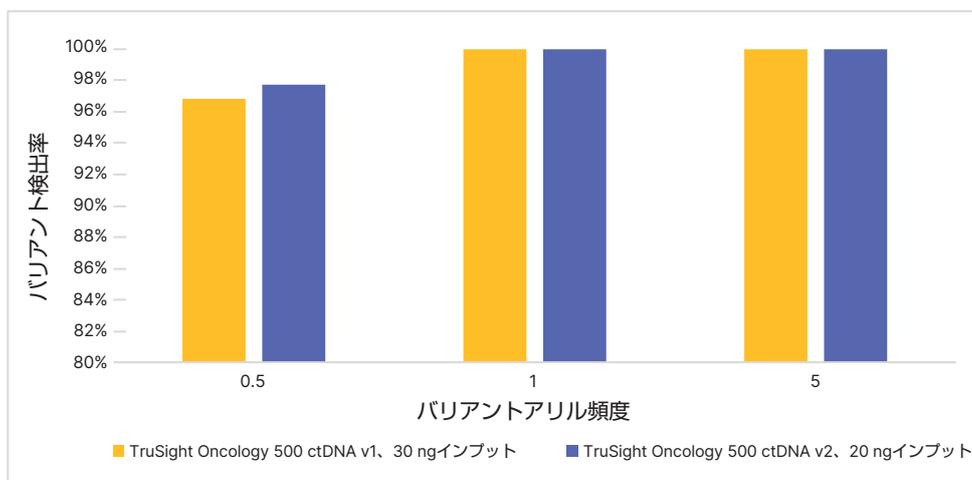
図2: TruSight Oncology ctDNA v2とv1で臨床サンプルを解析すると、より少ないインプット量のcfDNAでも、より高いMECが観察されます: 既知のがんタイプを持つさまざまな臨床サンプルについて、TruSight Oncology 500 ctDNAと30 ngのインプットctDNA、またはTruSight Oncology 500 ctDNA v2と20 ngのctDNAを使用して、イルミナおよび外部施設で解析しました。施設ごとに異なる臨床サンプルを使用しました。

より優れたスモールDNAバリエント検出

TruSight Oncology 500 ctDNAアッセイは、低濃度のバイオマーカーを正確かつ高感度で検出できるように設計されています。スモールDNAバリエントの場合、v1アッセイの分析感度は0.5%バリエントアリル頻度 (VAF) で95%以上 (30 ngのインプットcfDNAに基づいています)、v2アッセイの分析感度は0.2% VAFで90%以上 (20 ngのインプットcfDNAに基づいています) です。複数の外部施設で実施されたSeraSeq ctDNA Complete Mutation Mix

コントロールサンプルを使用した比較試験では、VAFが0.5%超のスモールDNAバリエント検出の高い一致が示されました (図3A)。より低いバリエントアリル頻度をターゲットとするために、SeraSeq Mutation Mix v2コントロールのレプリケートを使用して1カ所の外部施設によって実施された試験では、さらに少ないインプット量を使用して0.5%未満のVAFでより高い感度がさらに示されました (図3B)。

A. SeraSeqコントロールサンプルを使用した複数の施設にわたるデータの集計



B. SeraSeqコントロールサンプルを使用した複数のユーザーにわたるデータの集約

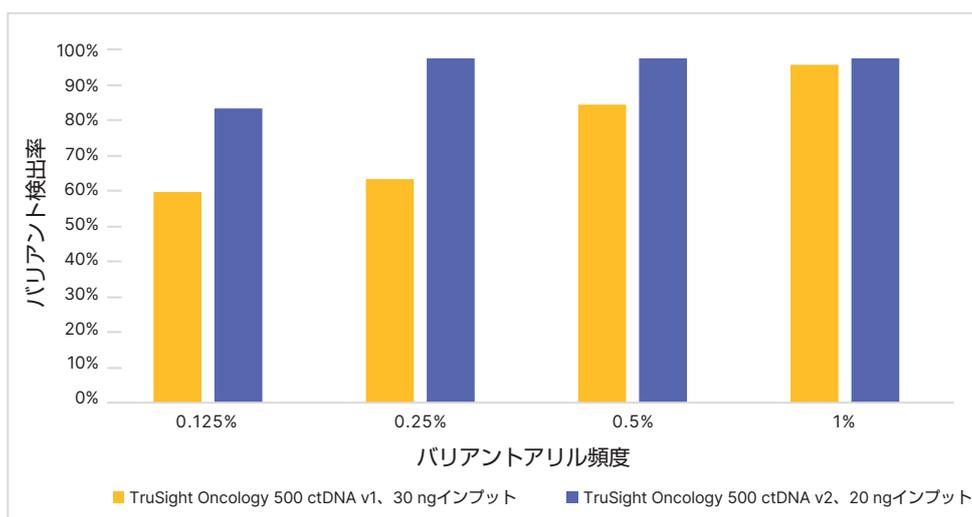


図3: VAF 0.5%未満でのスモールバリエントの検出向上: (A) SeraSeq ctDNA Complete Mutation Mix AF 0.5%コントロールサンプルについて、TruSight Oncology 500 ctDNAと30 ngインプットctDNA (4施設)、およびTruSight Oncology 500 ctDNA v2と20 ng ctDNA (7施設) を使って、複数の外部施設で解析しました。(B) SeraSeq Mutation Mix v2コントロールサンプルについて、TruSight Oncology 500 ctDNAと30 ngインプットctDNA、およびTruSight Oncology 500 ctDNA v2と20 ng ctDNAを使って、1カ所の外部施設で3名のオペレーターが1回検証しました。スモールDNAバリエント、特に0.5%未満のVAFに対する感度は、オリジナルアッセイと比較してv2アッセイで向上しています。

同様に、臨床サンプルを使用して実施した試験では、0.5%超のVAFでスモールバリエント検出の良好な一致が示され、v1アッセイでコールされたすべてのスモールDNAバリエントの86.8%がv2アッセイでも検出されました(表7)[‡]。社内で検証したサンプルの追加評価では、0.5%未満のVAFを含むバリエントに対してv2アッセイを使用することで感度が高くなることが示されました(図4)。また、TruSight Oncology 500 ctDNA v1またはTruSight Oncology 500 ctDNA v2を使って臨床サンプルを使用した外部施設による試験も実施されました。結果より、一部のバリエント、特に少ないインプット量(10 ng、5 ng)のバリエントでは、v2アッセイでは検出が可能でしたが、v1アッセイではバリエントコールが見逃されたことが示されました(表8)。

‡ 表7の脚注を参照してください。

bTMBにおける高い一致性

腫瘍変異負荷(TMB、または血液ベースのサンプルの場合はbTMB)、すなわち腫瘍ゲノムのコード領域内の非同義変異の数は、チェックポイント阻害剤などの免疫療法薬に対する奏効と相関する新たなバイオマーカーです。⁶⁻⁸ 肺がん、結腸直腸がん、卵巣がんなどの臨床サンプルにおけるTruSight Oncology 500 ctDNA v1およびv2を用いたbTMB解析では、高い一致が示されました(図5)。

表7: 0.5%超のVAFの臨床サンプルにおけるスモールバリエントの良好な一致

| バリエントタイプ | v1でコールされたバリエントのうち、v2でも検出されたバリエントの割合 |
|--------------|-------------------------------------|
| スモールバリエントすべて | 86.8% |
| SNV | 88.8% |
| 挿入/欠失 | 71.4% |

TruSight Oncology 500 ctDNA v2解析は、DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA v2解析ソフトウェアを使用して実施します。このソフトウェアは、v1アッセイの解析に使用したオリジナルのDRAGENパイプラインと比較して、改良された生殖系列プロキシフィルタリングとCHフィルタリングを提供します。これらの機能強化により、v2アッセイでコールされるバリエントの一部はより正確に分類され、生殖系列バリエントまたはCHバリエントとして示され、表に示されているスモールバリエント、SNV、またはIndelのカテゴリには当てはまりません。

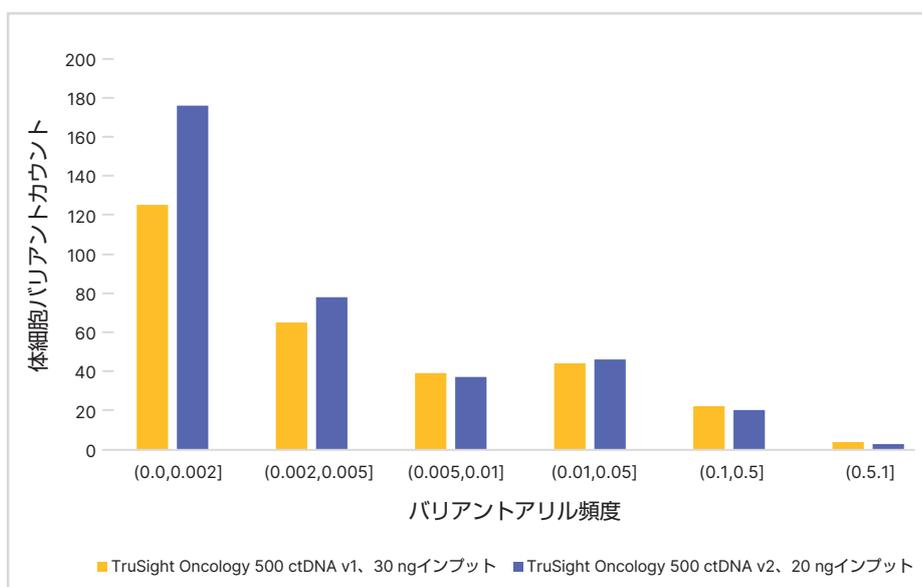


図4: TruSight Oncology 500 ctDNA v2を使用した、VAF 0.5%未満の臨床サンプル中のスモールDNAバリエントの検出向上

表8: TruSight Oncology 500 ctDNA v2は、実際の臨床サンプルの2%未満のVAFのバリエントコールに対してより高い感度を示します

| サンプル番号 | インプット量 ^a | 遺伝子 | バリエント | TruSight Oncology 500 ctDNA v2 | | TruSight Oncology 500 ctDNA v1 | |
|--------|---------------------|---------|------------------|--------------------------------|------|--------------------------------|------|
| | | | | VAF | 深度 | VAF | 深度 |
| 1 | 20 ng/30 ng | ALK | p.G1202R | 0.81% | 2980 | 0.69% | 3352 |
| 2 | 20 ng/30 ng | SMARCA4 | p.Q194fs*93 | 1.37% | 1754 | 1.09% | 827 |
| 2 | 20 ng/30 ng | KEAP1 | p.K97* | 1.71% | 2287 | 1.62% | 2470 |
| 2 | 20 ng/30 ng | STK11 | p.L245F | 1.76% | 1190 | 2.20% | 318 |
| 3 | 20 ng/30 ng | TP53 | p.C238fs*9 | 0.60% | 2822 | 1.18% | 2802 |
| 3 | 20 ng/30 ng | PIK3CA | p.E545G | 0.64% | 2795 | 0.48% | 2897 |
| 3 | 20 ng/30 ng | KRAS | p.G12C | 1.93% | 2179 | 1.91% | 2519 |
| 4 | 20 ng/30 ng | TP53 | p.H193Y | 0.11% | 1838 | 0.11% | 3736 |
| 5 | 20 ng/30 ng | PIK3CA | p.H1047R | 0.23% | 1310 | 0.25% | 839 |
| 5 | 20 ng/30 ng | TP53 | p.R248W | 0.26% | 1550 | 0.18% | 1087 |
| 6 | 20 ng/30 ng | CHEK2 | p.E457* | 0.39% | 1548 | 0.49% | 1635 |
| 7 | 20 ng/30 ng | EGFR | p.E746_A750del | 0.65% | 2271 | 0.72% | 1250 |
| 7 | 10 ng | EGFR | p.E746_A750del | 0.08% | 1217 | コールされず | - |
| 7 | 5 ng | EGFR | p.E746_A750del | 1.08% | 554 | コールされず | - |
| 8 | 20 ng/30 ng | BRCA2 | p.K2170* | 0.87% | 1486 | 2.89% | 173 |
| 8 | 20 ng/30 ng | NBN | p.R632fs*6 | 1.64% | 2262 | 0.68% | 293 |
| 8 | 20 ng/30 ng | TP53 | p.R248Q | 1.73% | 2250 | 0.29% | 342 |
| 8 | 10 ng | BRCA2 | p.Q2164_S2172del | 0.72% | 1104 | コールされず | - |
| 8 | 10 ng | TP53 | p.R248Q | 0.92% | 650 | コールされず | - |
| 8 | 10 ng | BRCA2 | p.K2170* | 0.98% | 815 | コールされず | - |
| 8 | 10 ng | NBN | p.R632fs*6 | 1.44% | 1248 | コールされず | - |
| 8 | 10 ng | TP53 | p.R213* | 1.54% | 1103 | コールされず | - |
| 8 | 5 ng | BRCA2 | p.Q2164_S2172del | 0.52% | 578 | コールされず | - |
| 8 | 5 ng | BRCA2 | p.K2170* | 0.91% | 438 | コールされず | - |
| 8 | 5 ng | NBN | p.R632fs*6 | 1.81% | 662 | コールされず | - |

a. TruSight Oncology 500 ctDNA v2アッセイでは20 ngのインプット量cfDNAを使用し、TruSight Oncology 500 ctDNA v1では30 ngのcfDNAを使用しました。5 ngおよび10 ngでリストされているインプット量は、両方のアッセイで使用したインプット量を示しています。

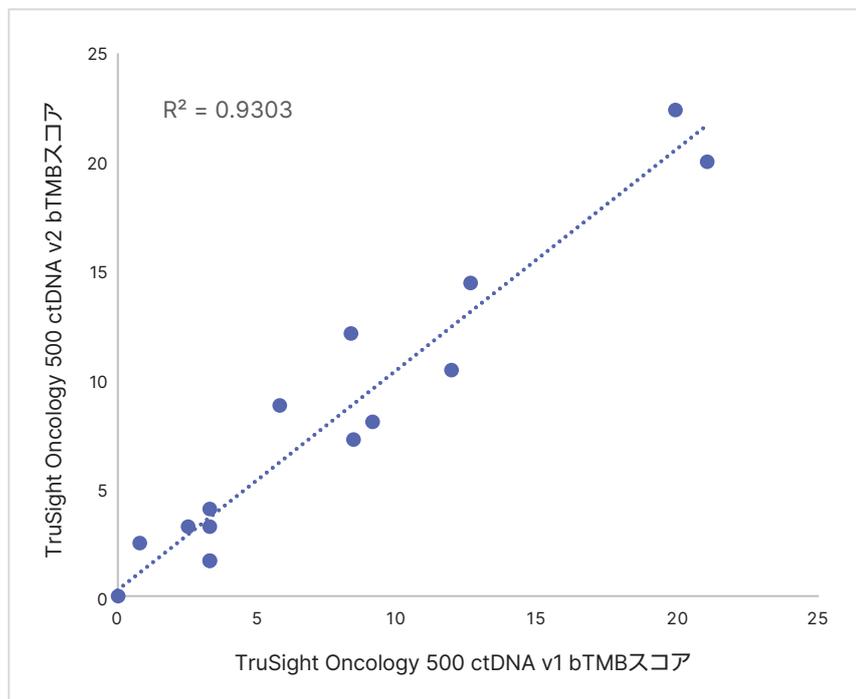


図5：イリミナ社内で検証した臨床サンプルにおける高いbTMBの一致：既知のがんタイプを持つさまざまな臨床サンプルについて、TruSight Oncology 500 ctDNAと30 ngインプットctDNA、およびTruSight Oncology 500 ctDNA v2と20 ng ctDNAを使って、イリミナ施設で解析し、bTMB検出能力を検証しました。

結論

TruSight Oncology 500 ctDNA v2はv1アッセイと同じ包括的コンテンツを提供し、ワークフローの高速化、インプット量の低減、およびより低いVAFレベル（0.2%と0.5%の比較）でのスモールバリアントの検出改善という大きな利点を備えています。臨床サンプルまたはコントロールサンプルを使用して生成されたデータでは、アッセイ間の高い一致が観察されました。

詳細はこちら

[TruSight Oncology 500 ctDNA v2](#)

参考文献

1. Lim C, Tsao MS, Le LW, et al. Biomarker testing and time to treatment decision in patients with advanced nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2015;26(7):1415-1421. doi:10.1093/annonc/mdv208
2. Yu TM, Morrison C, Gold EJ, Tradonsky A, Layton AJ. Multiple Biomarker Testing Tissue Consumption and Completion Rates With Single-gene Tests and Investigational Use of Oncomine Dx Target Test for Advanced Non-Small-cell Lung Cancer: A Single-center Analysis. *Clin Lung Cancer*. 2019;20(1):20-29.e8. doi:10.1016/j.clcc.2018.08.010
3. Hagemann IS, Devarakonda S, Lockwood CM, et al. Clinical next-generation sequencing in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer*. 2015;121(4):631-639. doi:10.1002/cncr.29089
4. Saarenheimo J, Eigeliene N, Andersen H, Tiirola M, Jekunen A. The Value of Liquid Biopsies for Guiding Therapy Decisions in Non-small Cell Lung Cancer. *Front Oncol*. 2019;9:129. doi:10.3389/fonc.2019.00129
5. Illumina. TruSight Oncology 500 ctDNA v2 data sheet. <https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/trusight-oncology-500-ctdna-v2-m-gl-02196/tso500-ctdna-v2-data-sheet-m-gl-02196.pdf>. Accessed January 18, 2024.
6. 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. doi:10.1126/science.aaa1348
7. 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. doi:10.1056/NEJMoa1406498
8. Van Allen EM, Miao D, Schilling B, et al. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science*. 2015;350(6257):207-211. doi:10.1126/science.aad0095

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

© 2024 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。

illumina[®]