



ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織サンプルからのターゲットエンリッチメントプロトコール

プロトコールの改変ポイントと、新鮮凍結組織サンプルとの比較結果

Denise Raterman, PhD, Keynttisha Jefferson, Jennifer Wendt,
Michael Brockman, PhD, and Dan Burgess, PhD
Roche NimbleGen Inc., Madison, WI

はじめに

がんに関連する遺伝子変化を同定することで、標的治療に有用なデータが得られるだけでなく、腫瘍の進行や治療耐性の出現についての理解を深めることが可能となります¹⁻³。中でも、次世代シーケンシング (NGS) による方法は、がんゲノムでの変異パターンやリアレンジメントを同定するための重要なツールとなってきています³。一方で、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織保存法は、組織学研究や臨床サンプルの保管方法として一般的に使用されてきた方法であり^{1,3,4}、4億以上のFFPE保存組織が存在していると推定されています⁴。これらの標本が持つ情報を抽出する効果的な方法が必要ですが、FFPE保存組織から抽出したゲノムDNAサンプルは、核酸の断片化やヌクレオチドの共有架橋結合、脱アミノ化など、固定化プロセスによる化学的なダメージを受けています。これらのダメージは、DNAライブラリの調製、PCR、シーケンシングなどを含む核酸操作と解析の有効性を低くすることが知られています^{4,5}。また、FFPE保存組織からは少量の核酸しか得られないことも特徴として挙げられ、少量でダメージを受けているDNAから、効率的に解析できる方法の確立が必要とされています⁴。

本紙の実験では、同一ドナーからの新鮮凍結組織およびFFPE保存組織から得たゲノムDNAについてRoche NimbleGenのターゲットシーケンシングを実施しています。サンプルライブラリはSeqCap EZ library protocol version 4.2を一部改編した方法で調製しました。網羅的がんパネル (Comprehensive Cancer Panel) をターゲットとしたシーケンシングを実施しましたが、正常組織サンプル (非がん部組織) も検体として使用することで、FFPE保存組織から調製したゲノムDNAのSNV検出エラー率を評価しました。また、初発ゲノムDNA量についても検討を行いました。

本紙で紹介する改変プロトコールにより、FFPE保存組織からも有効なシーケンシング結果が得られることが示されました。一方で、本紙のデータは、A260/A280比が高く、アガロースゲル上でゲノムバンドが視認できる、FFPE保存組織から抽出したゲノムDNAとしては高品質なゲノムDNAを使用した結果であり、全てのFFPE保存組織サンプルで同様の結果を期待することはできないということは留意する必要があります。

材料と方法

Bioserve Biotechnologies (Beltsville, MD)から1名のドナーの新鮮凍結およびFFPE保存の正常大腸組織を入手しました。新鮮凍結組織サンプルはDNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)で、FFPE保存組織サンプルはQIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen)を用いてゲノムDNAを抽出しました。抽出後、A260/A280比を測定し、アガロースゲル電気泳動を行うことでゲノムDNAの品質を確認しました。新鮮凍結組織サンプルおよびFFPE保存組織サンプルのそれぞれについて、500 ng、250 ng、100 ngの3種類のゲノムDNA量から2回ずつ反復した実験を行い、保存方法による比較および初発DNA量の比較をしました。調製したサンプルライブラリはNimbleGenの網羅的がん遺伝子パネル(Comprehensive Cancer Panel)のプロープ溶液とハイブリダイゼーションしました。サンプルライブラリの調製からキャプチャープロセスはNimbleGenの標準的なプロトコール(SeqCap EZ Library SR User's Guide version 4.2)に従って実施しましたが、下記の点について変更を加えています:

■ Chapter 3 Step 2. Preparing the Sample Library, #5.

FFPE保存組織から抽出したゲノムDNAが高品質であり十分量を使用できる場合には、SeqCap Adapter kitの10 μ Mアダプター溶液を5 μ lずつアダプターライゲーション反応に使用することを推奨しています。しかし、ゲノムDNAに分解が見られたり少量であったりする場合には、アダプター分子とインサートとなるゲノム断片の効率的な分子比率を維持するようにアダプター濃度を調整する必要があります。(Appendix FのDNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue is available for library preparationをご参照ください)。本紙の実験では後者を想定し、アダプター溶液の使用量を1 μ lに変更しました。

■ Chapter 4, Step 3. Performing PCR Amplification, #2.

Pre-Capture LM-PCRのプログラムを7から11サイクルに変更しました。

- ステップ 1: 98°C 45 秒間
- ステップ 2: 98°C 15 秒間
- ステップ 3: 60°C 30 秒間
- ステップ 4: 72°C 30 秒間
- <ステップ 2 からステップ 4 を合計 11 回繰り返す>
- ステップ 6: 72°C 1 分間
- ステップ 7: 4°C 保温

■ Chapter 5, Step 5. Prepare the DNA Sample, #2.

500 ngと250 ngのゲノムDNAから調製したサンプルライブラリの場合には、500 ngのPre-Capture LM-PCRサンプルをハイブリダイゼーションに使用しました。一方で、100 ngのゲノムDNAから調製したサンプルライブラリの場合には、300 ngのPre-Capture LM-PCRサンプルをハイブリダイゼーションに使用しました。

■ Chapter 7, Step 2. Preparing the LM-PCR, #1.

Post-Capture LM-PCR反応において、フォワードおよびリバースプライマー(Post-LM-PCR Oligos 1&2)の最終濃度が通常プロトコールの半分の濃度(0.25 μ M)となるように変更しました。

Illumina社HiSeq 2000からのシーケンシングデータは、Illumina社のソフトウェアであるCASAVA version 1.8.2でサンプル毎にデータを分割しました。リードのマッピングには、SOAPソフトウェアパッケージのコンポーネントであるSOAPaligner (v2.18)とSOAPsnp (Crossbowに実装のv1.01)が組み込まれた解析パイプラインを使用しました

(<http://soap.genomics.org.cn/>)。データ間の比較を容易にするため、それぞれのデータからランダムに抽出した1750万の生リードを用いることでデータを正規化して解析を行いました。リードはUCSC Genome Browserサイトからダウンロードしたhg19アセンブリバージョンにマップし、ペアのリードが共にマップされなかったリードについては以降の解析から除外しました。開始位置が同じであるリードペアはPCRによる重複であると判断しました。on-targetリードの割合(少なくとも1bpのターゲット領域の配列を含むリードの割合)はユニークにマップされたリードからPCRによる重複のリードを除いた後に算出しました。均一性は、「fold 80 base penalty」(ターゲット塩基の80%以上でその実験のカバレッジ平均値を得るために必要となる追加のシーケンシング量)という尺度で表現しました。

FFPE保存組織サンプルで正しくSNVを検出しているかどうかを評価するために、新鮮凍結組織サンプルで同定されたSNVをカバレッジ値10とクオリティスコア30でフィルタリングし、かつ2回のレプリケートで共通して検出されたSNVを正しく検出されたSNVデータセットとして、FFPE保存組織サンプルで検出されたSNVと比較しました。このデータセットは3種類の初発DNA量条件のそれぞれで別々に作成しました。FFPE保存組織サンプルの場合、SNVはクオリティスコア30でフィルタリングしました。カバレッジカットオフ値は20と40の2種類を適用しました。

結果および考察

新鮮凍結組織および FFPE 保存組織から抽出したゲノム DNA の A260/A280 比はそれぞれ 2.02、1.94 と共に高かった一方、ゲル電気泳動の結果では、FFPE 保存組織から抽出したゲノム DNA の大部分は 6000 bp 以上の断片サイズであり、新鮮凍結組織から抽出したゲノム DNA と比較して分解されていました。

解析結果の概要を表 1 に示しました。「生リードのマップ率」は、新鮮凍結組織サンプルでは 88.8~89.2%、FFPE 保存組織サンプルでは 85.3~87.9%と、新鮮凍結組織サンプルでやや高い傾向にあるものの互いに類似した値でした。「on-target リード率」は、新鮮凍結組織サンプルと FFPE 保存組織サンプル間での差は認められませんでした。データは示していませんが、均一性の指標値(fold 80 base penalty)を算出した結果、新鮮凍結組織サンプルでは 1.68 1.71、FFPE 保存組織サンプルでは 1.69 1.74 と、両サンプルとも極めて優れた値であり、「均一性」には保存方法による差は認められませんでした。

表 1 に示したように、「重複リード率」は新鮮凍結組織サンプルよりも FFPE 保存組織サンプルで高く、「平均カバレッジ」および「メディアンカバレッジ」は、500ng の新鮮凍結組織サンプルで最も高く、100ng の FFPE 保存組織サンプルで最も低い結果となりました。このカバレッジの違いは、シーケンシング結果における重複リード率の増加の原因となる、FFPE 保存組織サンプル由来のサンプルライブラリの複雑性が低下したためと考えられます。実際、初発 DNA 量を減らした場合、FFPE 保存組織サンプルではカバレッジ値は大きく低下し、FFPE 保存によるゲノム DNA の品質低下の結果と考えられます。特に、初発 DNA 量を 500 ng から 250 ng に減らした場合よりも 250 ng から 100 ng に減らしたときに重複リード率の大きな増加およびカバレッジ値の低下が見られました。重複リード率は Pre-Capture LM-PCR のサイクル数を減らすことで低下させることができるかもしれませんが、LM-PCR のサイクル数を減らすとキャプチャー反応に使用できるサンプル量が十分に得られない可能性があることに注意する必要があります。FFPE 保存組織サンプルを使用する場合は特に、キャプチャー反応に 300ng 以下の LM-PCR 産物を使用することは推奨できません。

初発 DNA 量	生リードのマップ率(%)		重複リード率(%)		On Target リード率(%)	
	新鮮凍結	FFPE	新鮮凍結	FFPE	新鮮凍結	FFPE
500 ng	88.9	85.3	1.8	10.9	70.7	74.5
250 ng	89.2	85.7	2.6	12.3	70.3	70.4
100 ng	88.8	87.9	6.8	39.0	69.7	64.5

初発 DNA 量	平均カバレッジ		メディアンカバレッジ	
	新鮮凍結	FFPE	新鮮凍結	FFPE
500 ng	227.2	209.9	218.6	199.3
250 ng	224.7	194.6	215.7	185.8
100 ng	213.0	128.1	205.6	121.1

表 1: 新鮮凍結組織サンプルと FFPE 保存組織サンプルからの解析結果の比較。生データからランダムな 1750 万リードを抽出してデータの解析を行いました。各結果はそれぞれ 2 回ずつのレプリケートデータの平均値を表示しています。

図 1 に示したように、各 1750 万リードの解析では 100ng の FFPE 保存組織サンプルを除いた全ての条件で、ターゲット塩基の 90%以上が少なくとも 80x 以上でカバーされていました。100ng の FFPE 保存組織サンプルでは、ターゲット塩基の 90%以上が少なくとも 40x 以上でカバーされていました。

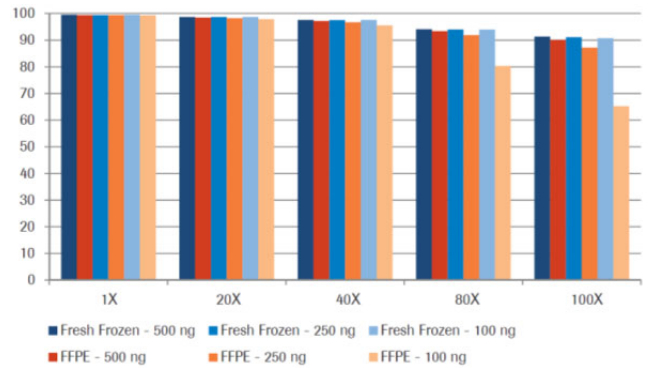


図 1: 各カットオフ以上のカバレッジを持つターゲット塩基の割合。生データからランダムな 1750 万リードを抽出してデータ解析を行いました。横軸はカバレッジのカットオフ値をそれぞれ示しており、縦軸は全ターゲット塩基を 100%とした場合の各条件の塩基の割合 (パーセンテージ) を示しています。各結果はそれぞれ 2 回ずつのレプリケートデータの平均値を表示しています。

図 2 には、FFPE 保存組織サンプルでの SNV 検出結果と、新鮮凍結組織サンプルで検出した SNV との比較結果を示しました。FFPE 保存組織サンプルで特異的に同定される SNV 数は、初発 DNA 量を減らしてもほとんど変化がありませんでした。この FFPE 保存組織サンプルでの SNV 数は、より厳しいフィルタリング条件である 40x カバレッジフィルタリング時の方が 20x よりも少なくなっていました(例: 初発ゲノム DNA 500ng の時 2947 個 (20x) 対 2830 個 (40x))。カバレッジフィルタリング条件を厳しくすると、新鮮凍結組織サンプルと FFPE 保存組織サンプルで共通して検出される SNV 数は減少し(例: 初発ゲノム DNA 500ng の時 2830 個対 2743 個)、FFPE 保存組織サンプルでは検出されない SNV 数(新鮮凍結組織サンプルでのみ同定される SNV)が増加していました(例: 初発ゲノム DNA 500ng の時 101 個対 189 個)。初発 DNA 量を 500ng から 250ng に減らした際には、共通して検出される SNV 数がごく僅か減少しましたが、初発 DNA 量を 100ng に減らした場合は、共通して検出される SNV 数は大きく減少しました。新鮮凍結組織サンプルのみで検出された SNV は、初発ゲノム DNA 量を 500ng から 250ng に減少させると僅かに増加し、100ng まで減少させると大きく増加しました。これらの結果は、最少カバレッジのフィルタリング条件を上げることで SNV 検出の信頼性を上げることができることを示しますが、一方で、厳しすぎるフィルタリング条件はフォールスネガティブを増加させてしまう可能性があり、初発 DNA 量が少ない場合は特にその傾向が顕著であるということを示しています。

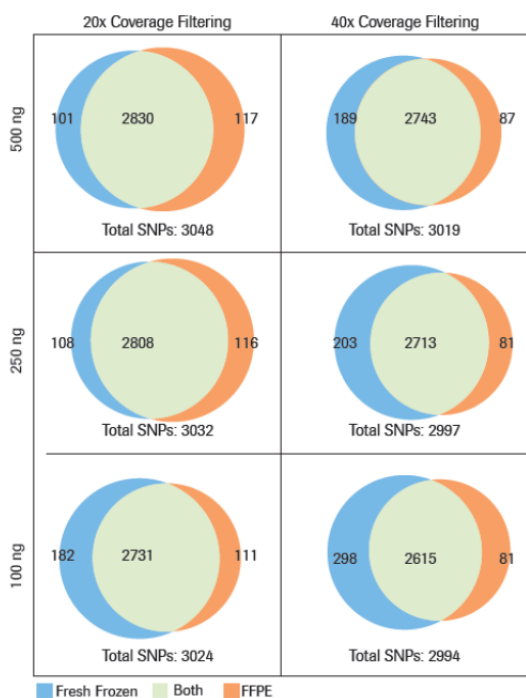


図2: カバレッジ 20x/40x 以上の条件で抽出した FFPE 保存組織サンプルの SNV と、新鮮凍結組織サンプルで同定された SNV との比較。データからランダムな 1750 万リードを抽出してデータの解析を行いました。

まとめ

SeqCap EZ Library SR User's Guide version 4.2 のいくつかの点を改変させたプロトコルを用いることにより、FFPE 保存組織から抽出した 100ng のゲノム DNA を用いた場合でもシーケンシング結果が得られ、そのキャプチャーと SNV 検出のパフォーマンスは、同一ドナーの新鮮組織サンプルと似ていることが示されました。サンプルのプロセッシングとデータ解析の際には、LM-PCR サイクル数や初発ゲノム DNA 量、SNV フィルタリング設定値などのいくつかのトレードオフについて考慮する必要があります。本紙の実験により、NimbleGen SeqCap EZ のターゲットエンリッチメント製品は FFPE 保存組織サンプルから興味のあるゲノム領域を問題無くキャプチャーできることが示され、そのことにより、FFPE 保存された検体群に蓄積しているゲノム情報を本製品により発見することができることが判りました。

本紙の準備中に、NimbleGen のプロープライブラリを用いた FFPE 保存組織からのシーケンスキャプチャー実験の詳細な方法について述べられた、より規模が大きい研究の論文が発表されました⁶。この論文では、同様のアプリケーションにおける効果的なプロトコルの必要性が強調されており、また、本紙の結果を支持する結果が得られています。

参考文献

1. Tackling Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tumor Tissue with Next-Generation Sequencing. Corless CL, Spellman PT. *Cancer Discov.* **2012.** 2(1): 23-4.
2. Genome-Wide Massively Parallel Sequencing of Formaldehyde Fixed-Paraffin Embedded (FFPE) Tumor Tissues for Copy-Number- and Mutation- Analysis. Schweiger MR, et al. *PLoS One.* **2009** May 14. 4(5):e5548.
3. Targeted high throughput sequencing in clinical cancer settings: formaldehyde fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues, input amount and tumor heterogeneity. Kerick M, et al. *BMC Med. Genomics.* **2011** Sep 29;4:68.
4. Functional DNA quantification guides accurate nextgeneration sequencing mutation detection in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor biopsies. Sah S, et al. *Genome Med.* **2013** Aug 30. 5(8): 77.
5. Dramatic reduction of sequence artefacts from DNA isolated from formalin-fixed cancer biopsies by treatment with uracil-DNA glycosylase. Do H, Dobrovic A. *Oncotarget.* **2012** May 24. 3(5): 546-58.
6. Detecting somatic genetic alterations in tumor specimens by exon capture and massively parallel sequencing. Won HH, et al. *J Vis Exp.* **2013** Oct 18;(80).



本資料に記載の情報・説明・仕様等は予告なく変更されることがございます。本製品はライフサイエンス分野の研究のみを目的としています。

For life science research only. Not for use in diagnostic procedures.

NIMBLEGEN and SEQCAP are trademarks of Roche.

All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社
シーケンスソリューション

〒105-0014 東京都港区芝2丁目6番1号
TEL. 03-5443-5287

© 2013 Roche Diagnostics All rights reserved.

1405R