



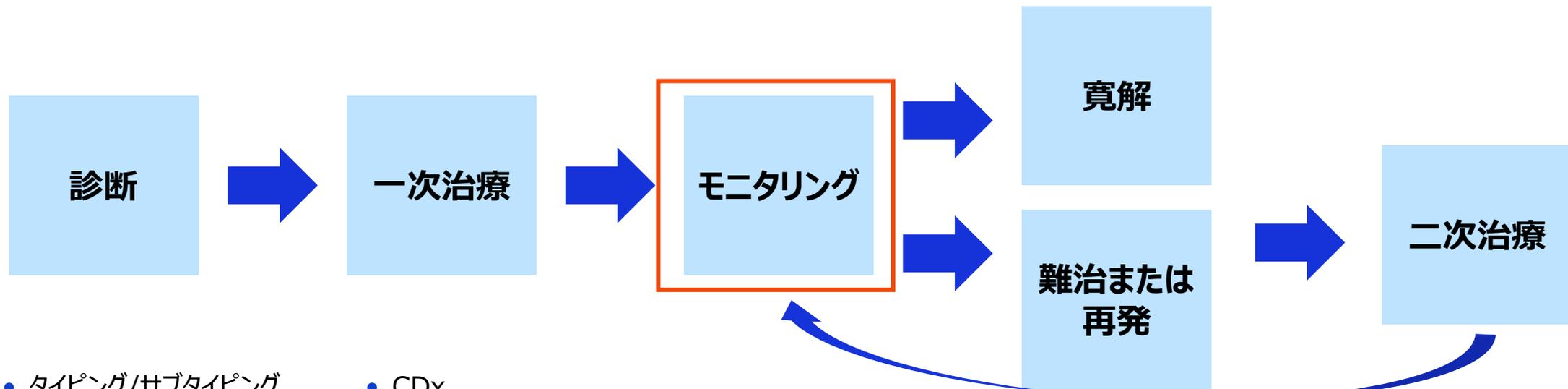
# 悪性リンパ腫の 高感度遺伝子変異モニタリング



研究用

# 血液がんへのアプローチ

KAPA NHLパネルでは、ctDNAをバイオマーカーとしてモニタリング研究に応用



- タイピング/サブタイピング
- 細胞起源(COO)
- 患者のリスク階層化
- 予後予測

- CDx
- 早期分子反応 (EMR) の評価/治療の選択

- 微小残存病変 (MRD) 検出/経時的モニタリング

- 治療の選択

# KAPA NHLパネル

KAPA HyperCap Design Share NHL panel



## 非ホジキンリンパ腫の 血中ctDNAを高感度に検出し、 経時的な解析を行うための研究用パネル

- 高感度なctDNAモニタリングを自施設で
- 大規模研究<sup>1</sup>で実証されたパネルデザイン
- シンプルで信頼性の高いワークフロー

1. POLARIX Study: Herrera et al. Blood 2022; 140: 1297 – 1300.

# KAPA NHLパネル

## パネルデザイン概要

KAPA HyperCap Design Share NHL panel (IRN - 100028225)	
パネルデザイン	<h3>非ホジキンリンパ腫 (NHL) 用パネル</h3> <p>主に DLBCL および FL 検体での使用を想定していますが、BL、MCL、SLL/CLL、MZL、PMBL など、他の NHL サブタイプに関連する遺伝子も含まれています。</p>
カバーされている遺伝子	383 遺伝子
キャプチャーターゲットサイズ	341 Kb
必要検体	全血： <b>血漿 + 血漿除去後検体</b> (各30 ng cfDNA + 100 ng gDNA)

# KAPA NHLパネル

## 使用用途

- 微小残存病変 (MRD) の検出／経時モニタリング
- 反応性・応答の評価
- サブタイピング (細胞起源)
- 分子プロファイリング

# KAPA NHL パネルのターゲット遺伝子リスト

## 383遺伝子(全体または一部) と追加の遺伝子間領域をカバー

- POLARIX試験<sup>1</sup>で使用された実績のあるコンテックス
- 疾患マネジメントのためのSNV検出 (パッセンジャー遺伝子領域)
- NHLサブタイプとの関連が報告されている遺伝子もカバー

ABC11	BCL2	CD58	CXCR4	ENSG00000282988	GRM7	H3C2	IGHV2-26	IGHV4-31	IGKV5-2	IGLV3-10	IRAG2	LIPM	MYC	PCSK5	RASSF9	STAT3	WDPCP
ACAD8	BCL6	CD70	CXCR5	ENSG00000285938	GSDMC	H3C3	IGHV2-5	IGHV4-34	IGLJ2	IGLV3-12	IRF1	LIPN	MYD88	PCSK7	RBFA	STAT6	WRAP73
ACSS1	BCR	CD79B	DIFFB	ENSG00000285938	H1-2	H3C4	IGHV3-11	IGHV4-39	IGLJ3	IGLV3-16	IRF4	LRP10	MYD15A	PDCD1	REL	STAT6	XBP1
ACTA2	BNC2	CD83	DHX33	ENSG00000285947	H1-3	H3C7	IGHV3-13	IGHV4-59	IGLJ4	IGLV3-19	IRF8	LRP1B	NARS1	PDCD1LG2	RER1	TAF1	XPO1
ACTB	BORCS8	CDH12	DKC1	EP300	H1-4	H4C12	IGHV3-15	IGHV5-51	IGLJ5	IGLV3-21	ITPK8	LRP2	NCAPD3	PIK3C2G	RFTN1	TAS2R16	YTHDF2
ACTG1	BORCS8-MEF2B	CDH19	DLAT	EP300	H1-5	HAS2	IGHV3-16	IGHV6-1	IGLJ7	IGLV3-22	IZUMO3	LRRN3	NCSTN	PIK3CD	RHOA	TBC1D22A	ZEB2
ACVR2A	BRAF	CDKN2A	DNAH5	EPHA7	H2AC11	HQAC7	IGHV3-20	IGHV7-81	IGLJ5	IGLV3-25	JUNB	LRRM4	NEED4L	PIK3CG	RHOH	TBL1XR1	ZFP36L1
ADAMTS1	BRAF	CDKN2B	DPAGT1	EPS8	H2AC16	HMCN1	IGHV3-21	IGKV1-5	IGLV10-54	IGLV3-27	KCND2	MAGEB16	NEXMIF	PIK3R1	RIMS2	TCL1A	ZFP42
ADAMTS16	BRCA2	CEP104	DRG2	ERICH1	H2AC17	ID3	IGHV3-23	IGKV1-6	IGLV11-55	IGLV3-32	KHDRBS3	MAGEC2	NFATC1	PIM1	RNF213	TET2	ZMYM6
ADAMTS9	BRINP3	CFAP276	DSEL	EZH2	H2AC6	IGHA1	IGHV3-30	IGKV1-8	IGLV11-55	IGLV3-39	KIF28	MAP2K1	NFIA	PLCG2	RNLS	TGFB1	ZNF217
AFF1	BTG1	CFI1	DTX1	F2RL2	H2AC8	IGHA2	IGHV3-33	IGKV10-17	IGLV1-40	IGLV4-3	KLF10	MAP3K13	NFKBIA	PLCL1	STPR2	THBD	ZNF577
AHCYL1	BTG2	CLSTN2	DUSP2	FAS	H2BC11	IGHG2	IGHV3-35	IGKV10-43	IGLV1-44	IGLV4-60	KLHL14	MCSR	NFKB	POM121L2	SCML4	THY1	ZNF608
ANKRD22	BTG3	CNTNAP2	DUSP3	FAT1	H2BC12	IGHG4	IGHV3-38	IGKV10-8	IGLV1-47	IGLV4-69	KLHL25	MDH1	NOTCH1	POU2F2	SERPINE3	TLR2	ZNF649
APC	BTK	COL22A1	EBF3	FBXO11	H2BC14	IGHM	IGHV3-43	IGKV2-24	IGLV1-50	IGLV5-37	KLHL4	MED12	NOTCH2	POU2F3	SGK1	TMEM30A	ZNF678
ARHGAP5	CACNA1E	COL24A1	EDIL3	FBXW7	H2BC17	IGHV1-18	IGHV3-48	IGKV2-30	IGLV1-51	IGLV5-45	KLHL6	MEF2B	NTNG1	PPP2R1B	SI	TMSB4X	
ARID1A	CACNA1S	CREBBP	EFEMP1	FGFR4	H2BC4	IGHV1-2	IGHV3-49	IGKV20-26	IGLV2-11	IGLV5-48	KLK11	MEX3C	P2RY8	PPP4C	SLC22A16	TNFAIP3	
ATP1B4	CAPZA3	CRISPLD1	EGR1	FOCAD	H2BC5	IGHV1-24	IGHV3-64	IGKV20-29	IGLV2-14	IGLV5-52	KLK13	MFHAS1	PABPC1	PRDM1	SLC9A4	TNFRS14	
ATP8B1	CARD11	CRYAB	EHBP1	FOXO1	H2BC8	IGHV1-3	IGHV3-7	IGKV20-30	IGLV2-18	IGLV6-57	KMT2D	MPOZ	PANK1	PSD3	SLITRK1	TNFRSF14	
B2M	CCND3	CSMD1	ELAC1	FXYD6	H2BC9	IGHV1-45	IGHV3-72	IGKV3-20	IGLV2-23	IGLV7-43	KRAS	MPEG1	PAPSS2	PSRC1	SMAD4	TP53	
BCHE	CD274	CSMD3	ELAVL1	FXYD6-FXYD2	H3C1	IGHV1-46	IGHV3-73	IGKV3D-11	IGLV2-33	IGLV7-46	LAMA1	MRO	PCDH17	PTEN	SODCS1	TRPS1	
BCL10	CD36	CTNNA2	ENSG00000281179	GK2	H3C10	IGHV1-58	IGHV3-74	IGKV3D-20	IGLV2-8	IGLV8-61	LINGO2	MSH6	PCDH46	PWWP3A	SORCS2	USP34	
BCL11A	CD53	CTNND2		GNA13	H3C11	IGHV1-69	IGHV4-28	IGKV4-1	IGLV3-1	IGLV9-49	LIPH	MTAP	PCL0	PXDN	SRRM2	VPS8	

### Genes known to be associated with NHL

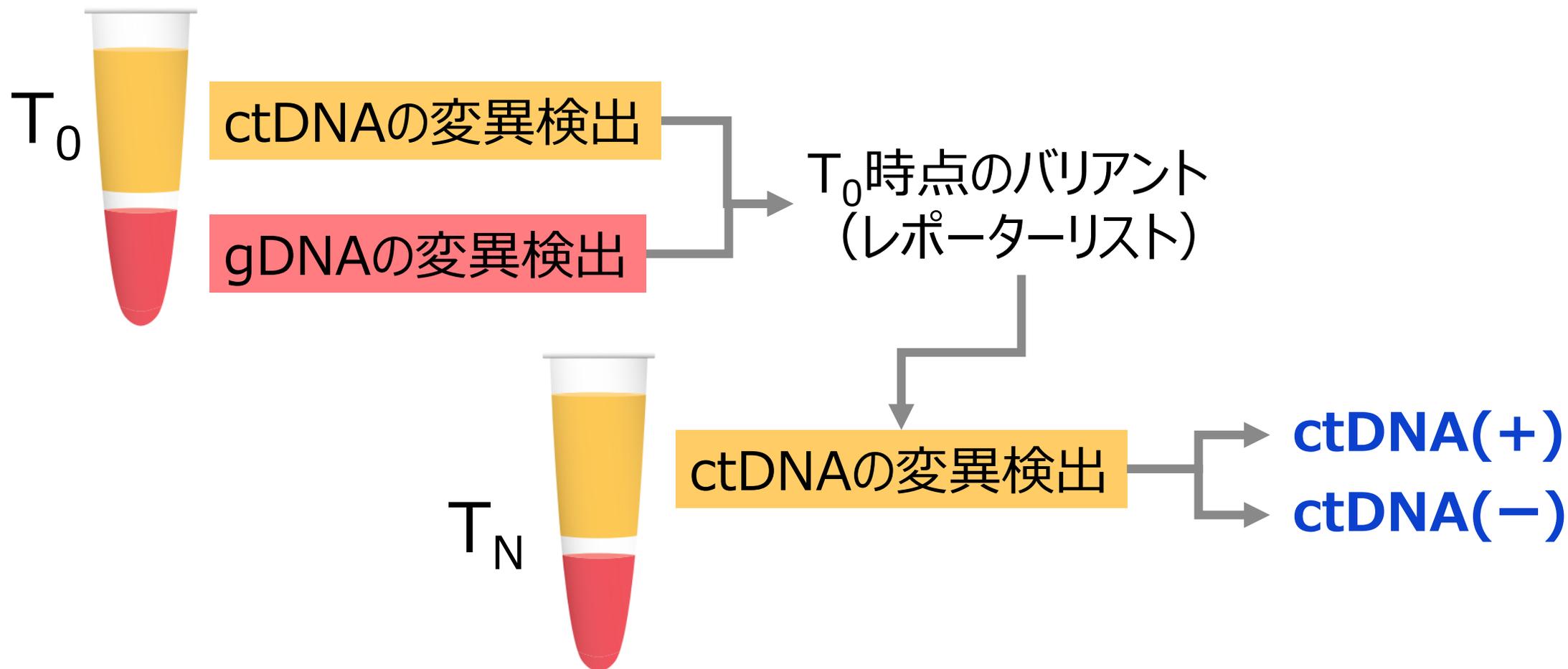


1. POLARIX Study: Herrera et al. Blood 2022; 140: 1297 – 1300.



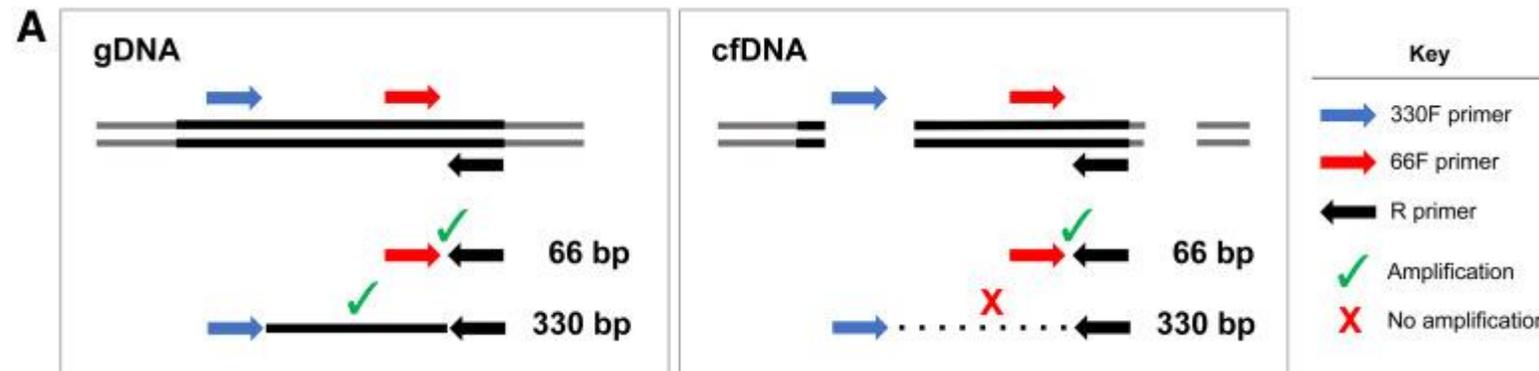
# MRD解析

gDNAのサブトラクションにより腫瘍由来変異の同定



# 安定的にデータを得るための工夫 ゲノムDNAコンタミを考慮したプロトコール

## cfDNAの品質評価



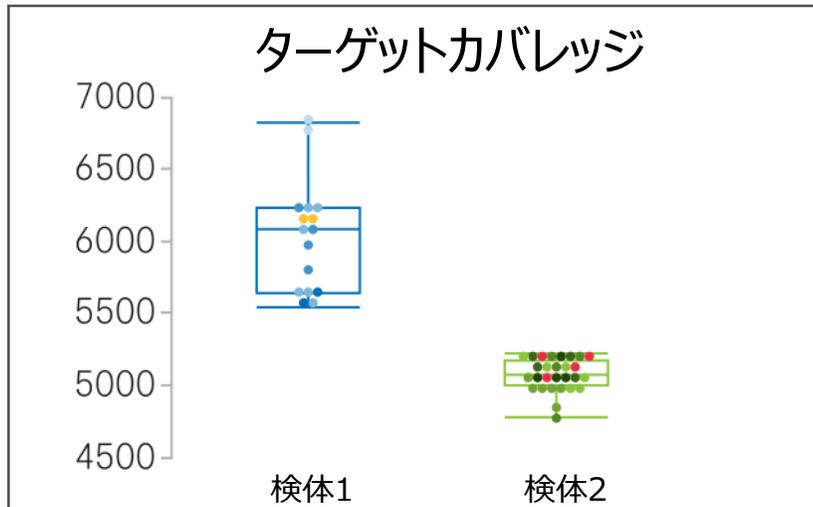
Q-ratio (330/66) からインプットサンプル中のHMW DNA の割合を算出<sup>1</sup>:  
 $HMW\% = 1.106 * \text{normalized Q score} - 0.16$

例)

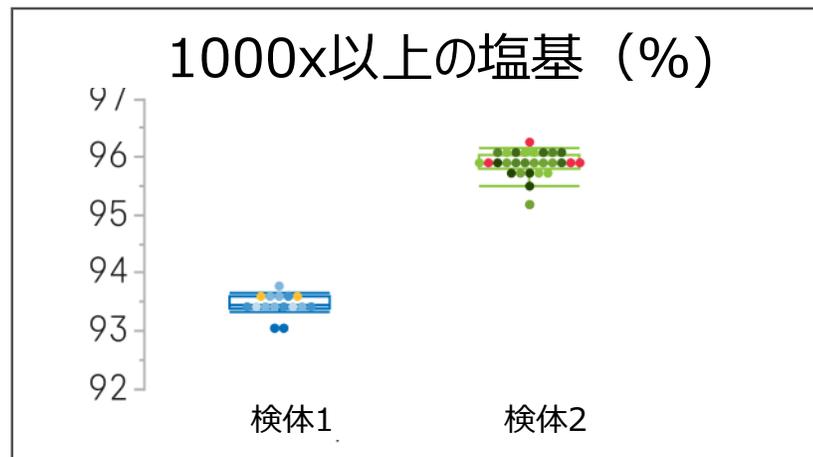
インプットDNAサンプル50 ngに20ngの高分子DNAが混入している場合、真のcfDNAは30ngのみとなるため、真に50ngのcfDNAを初発サンプルとするためには、約84ngをライブラリ調製に使用します。

<sup>1</sup>. Saelee et al. J Mol Diagn. 2022; 566-575.

# パネル／WFの検証より：シーケンス品質 高いシーケンス品質を実現

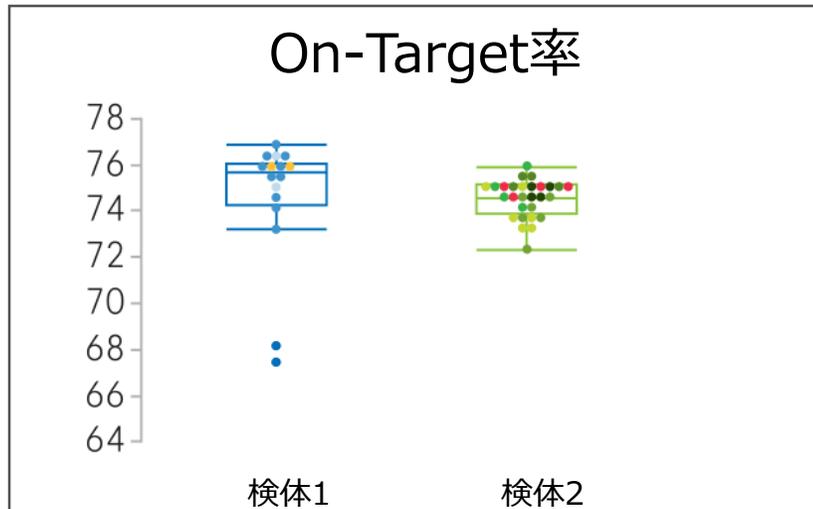


- **5,000x以上のユニークカバレッジ**  
による高感度の ctDNA検出

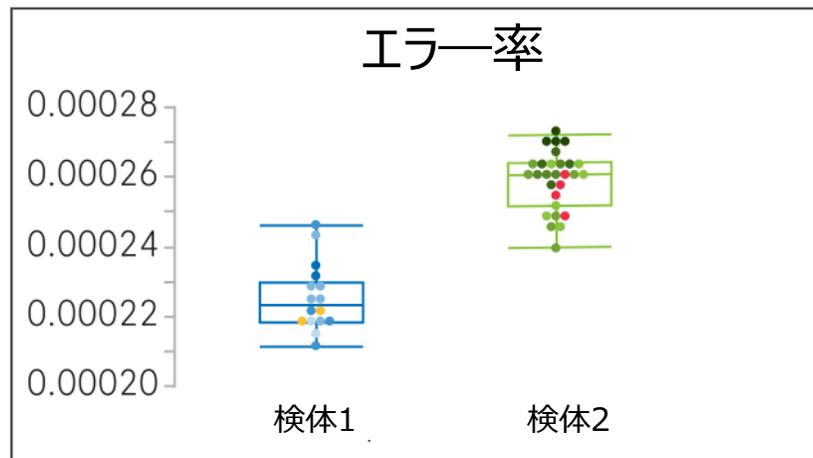


引用：社内データ  
市販の参照サンプル2種類（検体1、検体2）を用いて、それぞれAF 0%から5%の既知のバリエーションを含む「人工」サンプルを調製し、ワークフローパフォーマンスを検証しました。

# パネル／WFの検証より：シーケンス品質 高いシーケンス品質を実現



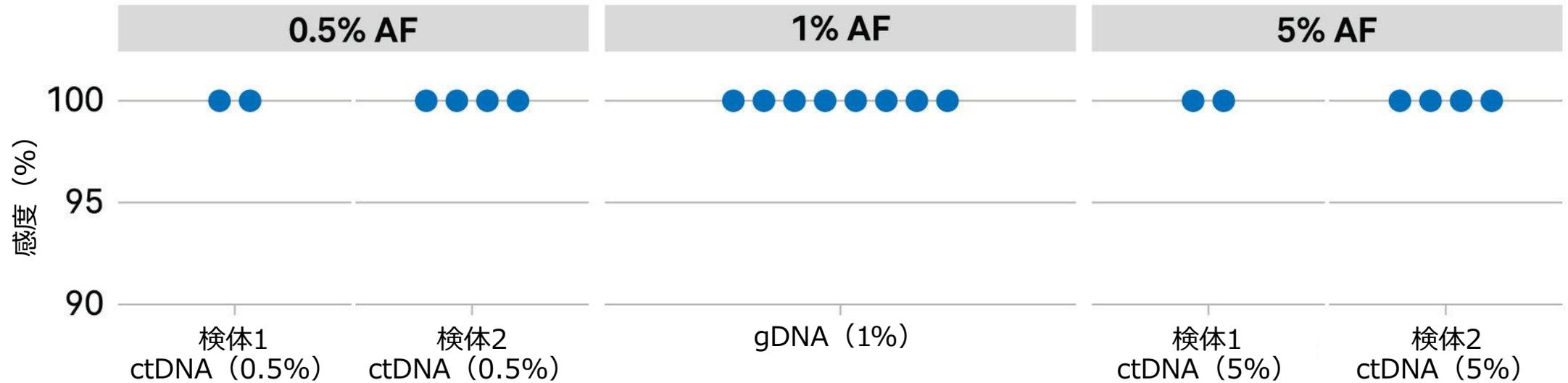
- 特異度の高いエンリッチメント：  
**On-Target率74%以上**



- UMIによる低いエラー率**

引用：社内データ  
市販の参照サンプル2種類（検体1、検体2）を用いて、それぞれAF 0%から5%の既知のバリエーションを含む「人工」サンプルを調製し、ワークフローパフォーマンスを検証しました。

# パネル／WFの検証より：バリエントコール 信頼できるバリエントコール



• **0.5% AFのバリエントも感度100%で検出**

# パネル／WFの検証より：MRD解析

## 高感度のMRD解析

Sample	p-value	decision
AF 0.5%	0.0001	100% positive
AF 0.1%	0.0001	100% positive
AF 0.05%	0.0001	100% positive
AF 0.01%	0.0001 - 0.2858	83% positive
WT (AF 0%)	0.0031 - 0.1217	100% negative

- **バックグラウンド補正**により結果の信頼性が向上
- **AF0.05%を100%判定**

必要試薬 & 資料

# 血漿 (cfDNA) 解析に必要な試薬

## 24検体

### ロシュ製品

品番	品名	販売元	包装サイズ	備考
07247737190	コバス DNA サンプルリプレーションキット(cfDNA)	RDKK	24	統一商品コード518-497422
09217193001	KAPA NGS FFPE DNA QC Kit	NGC	24	同梱のプライマーミックス (66bp、191 bp) は使用しません。
07962347001	KAPA HyperPrep Library Preparation Kit	NGC	24	
08963835001	KAPA HyperPure Beads (5 mL)	NGC	5ml	
09329838001	KAPA UDI Primer Mixes, 97-192	NGC	96	
09329862001	KAPA Universal UMI Adapter, 960 uL	NGC	96	
09075780001	KAPA HyperCapture Bead kit	NGC	24	
09052593001	KAPA HyperChoice MAX 3Mb T1 (IRN: 1000028225)	NGC	24	NHLパネルの本体
09075810001	KAPA HyperCapture Reagent kit	NGC	24	
09075879001	KAPA Probes resuspension buffer, 1 mL	NGC	1ml	

96反応等、別包装サイズもございます

### ロシュ製品以外の必要試薬

- forward primers 66F: 5'-TTGCGGAAGTCAGTGTGG-3'
- forward primers 330F: 5'-CAAACAACCCCATCAAAAAGTG-3'
- reverse primer, 5'-GATGGCTGGGTCAAATGGTA-3'
- Qubit (Quant-iT dsDNA High-Sensitivity Assay Kit, Thermo Fisher Scientific)
- Bioanalyzer (High Sensitivity, Agilent Technologies)

など

# PBMC (gDNA) 解析に必要な試薬

## 24検体

### □シユ製品

品番	品名	販売元	包装サイズ	備考
09189823001	KAPA NGS DNA Extraction Kit	NGC	24	
07962401001	KAPA HyperPlus Library Preparation Kit	NGC	24	
08963835001	KAPA HyperPure Beads (5 mL)	NGC	5ml	
09329838001	KAPA UDI Primer Mixes, 97-192	NGC	96	
09329862001	KAPA Universal UMI Adapter, 960 uL	NGC	96	
09075780001	KAPA HyperCapture Bead kit	NGC	24	
09052593001	KAPA HyperChoice MAX 3Mb T1 (IRN: 1000028225)	NGC	24	NHLパネルの本体
09075810001	KAPA HyperCapture Reagent kit	NGC	24	
09075879001	KAPA Probes resuspension buffer, 1 mL	NGC	1ml	

### □シユ製品以外の必要試薬

- Qubit (Quant-iT dsDNA High-Sensitivity Assay Kit, Thermo Fisher Scientific)
  - Bioanalyzer (High Sensitivity, Agilent Technologies)
- など

96反応等、別包装サイズもございます

## 製品情報等

ご不明な点がありましたらお知らせください

### ■ 製品情報

- Webページ ([製品ページ](#))
- デザインファイル：[DSページ](#)からダウンロード
- パフォーマンスデータ：共有可能

### ■ オーダー情報

- KAPA HyperChoice MAX 3Mb T1、  
IRN1000028225
- 09052593001 for 24 rxn
- 09052615001 for 96 rxn  
(その他の包装サイズもございますので、お問い合わせください)
- 納期:8週間

### ■ 資料

- [パンフレット](#)
- White Paper ([wet](#), [dry](#))
- [ウェビナー録画](#)

まとめ

## ctDNAベースのNHL研究を、ラボで実施 ラボで使用することで、NHL研究を前進させる

- 新しいNHL臨床研究を開始可能
- さまざまなNHLサブタイプに使う事ができる
- ラボで実施することで、柔軟な対応（改変）が可能



## 実績のある独自のパネル設計

長年にわたる厳密な研究と、POLARIX 研究<sup>1</sup>で使用されたパネル

- 10年以上の研究開発を踏襲したデザイン
- 1,000以上の検体での解析実績<sup>1</sup>
- White Paperやproof of principleデータを参照可能



<sup>1</sup>. POLARIX Study: Herrera et al. Blood 2022; 140: 1297 – 1300.

# シンプルで信頼性の高いワークフロー

## 堅牢で合理化されたKAPA ワークフロー

- 堅牢なKAPA HyperCap ワークフロー<sup>1</sup>の活用。
- オープンソースの解析パイプライン<sup>2</sup>はカスタマイズが可能（研究ニーズに応じた改変が可能）
- 自動化に適したワークフローのため、スケールアップに容易に対応



1. Bermejo C, Agarwal P, Chien R et al. The KAPA HyperCap Design Share NHL Panel enables highly sensitive, longitudinal detection of non-Hodgkin lymphoma circulating tumor DNA. Roche white paper. MC--11981. Accessed 22 June, 2023.  
2. Chien, R. KAPA bioinformatics analysis for longitudinal detection of circulating tumor DNA. Roche white paper. MC--12095. Accessed 22 June, 2023.

**Doing now what patients need next**