

KAPA NHLパネル

非ホジキンリンパ腫におけるctDNA検出

血漿検体からの 高感度な遺伝子変異 検出ソリューション (研究用)

KAPA NHLパネルはKAPA HyperCap Design Share Panel (プレデザインパネル) の一つで、非ホジキンリンパ腫 (NHL) の血中ctDNAを次世代シーケンサーにより高感度に検出し、経時的な解析を行うための研究用パネルです。NHLに関連する383遺伝子(遺伝子全体または一部)と追加の遺伝子間領域の合計341 Kbをカバーしています。

このパネルは、ハイブリダイゼーションをベースとしたKAPA HyperCap ワークフロー¹と、オープンソースのバイオインフォマティクス解析ツール²を組み合わせで使用します。遺伝子変異の高感度検出と経時的解析を目的とするため、主にSNVを検出するようデザインされています。

高感度なctDNAモニタリングを自施設で

- 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
- 柔軟な対応 (変化) とデータの蓄積でNHL研究を前進

大規模研究³で実証されたパネルデザイン

- 学術研究者やロシュの科学者による10年以上にわたる研究開発を踏襲した実験系¹
- 1,000以上の検体での解析実績³
- proof of principleデータ^{1,2}からのインサイト

シンプルで信頼性の高いワークフロー

- 堅牢なKAPA HyperCap ワークフロー¹を使用
- 研究ニーズに応じてカスタマイズ可能なオープンソースの解析パイプライン²
- 自動化に適したワークフローでスケールアップが容易



高いシーケンシング品質

- 十分なユニークdepth (5,000x以上 : 図1A) : 高感度なctDNA検出
- 高い特異性 (全データの74%以上がターゲット塩基 : 図1B) : 効率の良い解析
- 低いエラー率 (約 2.5×10^{-4} : 図1C) : 結果への信頼性

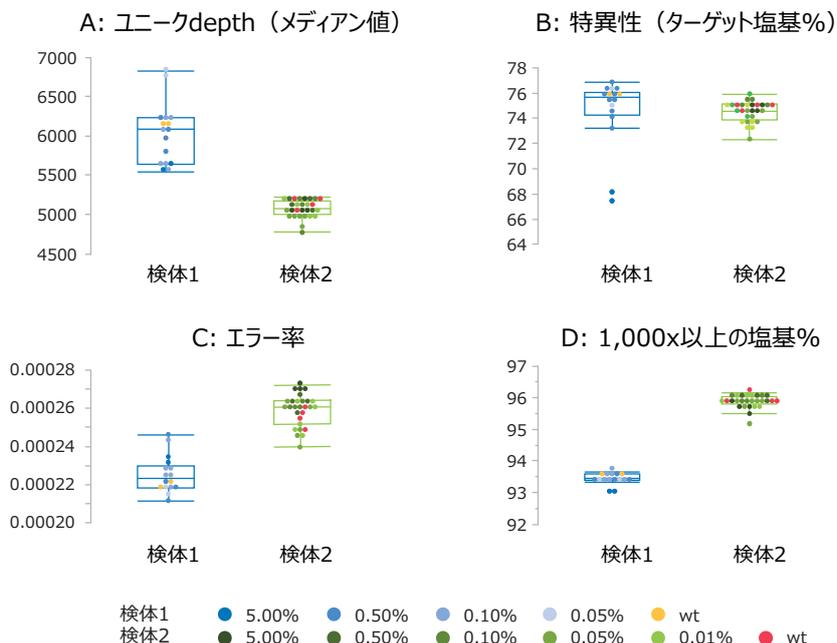


図1. KAPA NHLパネルのシーケンシングメトリック

模擬NHL検体として、0%から5%のアレル頻度(AF)のバリエーションを含むように市販のcfDNAリファレンス検体 (検体1、検体2) を人工的に調製し、KAPA NHL Plasma cfDNAワークフローの手順に従いNGSライブラリー作成及びエンリッチメントを行いました¹。イルミナ社のNextSeq™ 500/550の1ランで8検体のシーケンシングを実施して1検体あたり平均8,800万以上のリードを取得し、オープンソースのバイオインフォマティクスツールを使用してデータ解析を行いました²。Unique molecular identifiers (UMI) による重複分子の除去後のメディアン解析リード数は、検体1で44M、検体2では33Mでした。これはそれぞれ6,100x及び5,000xのユニークdepth (メディアン値) に相当しました。高い再現性で主要な性能メトリックを十分に満たすことが示され、KAPA NHLパネルにより効率良くシーケンスできることを示唆しています。

信頼できるバリエントコール

- 0.5% AFのバリエーションも高感度で再現性良く検出 (図2)
- 高い特異性でのバリエーションコール*

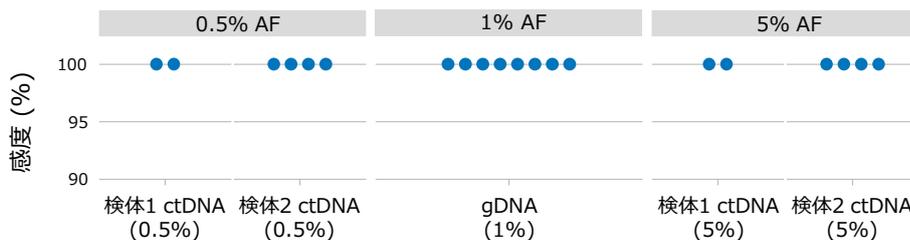


図2. 0.5%、1%、5% AFのバリエーションを再現性良く高感度に検出

人工的に調製した検体で感度と再現性の検証を行いました。ジャームラインバリエーションの検出感度を評価するために、NA24631 (98%) とNA24149 (2%) のゲノムDNAを混合して1% AFを調製し、KAPA NHL gDNAワークフローを実施しました。青いドットは反復実験での結果を示しています。その結果、1% AF (真陽性のSNV) 10か所全てを8回の反復実験のいずれにおいても検出しました。ctDNAバリエーションの検出感度の評価として、市販のcfDNAリファレンス検体 (検体1、検体2) で0.5%または5%AFを調製し、KAPA NHL Plasma cfDNAワークフローを実施して検証しました。この結果、予想されるSNV (検体1ではSNV3か所、検体2ではSNV12か所) の全てが、全ての反復実験 (検体1は2回、検体2は4回) で検出されました。

* 図表では示ませんが、KAPA NHLパネルが高い特異性でバリエーションコールできることは次の検証により示されました。NA24149とNA24631の混合ゲノムDNAを用いた検証実験において、8回の反復実験全てで、53か所の全てが真陰性(TN)と判定されました。また、変異を持たないと仮定する23名の健康なドナー検体を用いた検証実験では、10Kbあたり0.06個というレベルでのみバリエーションが検出され、バリエーションコールのエラー率が非常に低いことが示されました。

高感度の微小残存病変 (MRD) 解析

- バックグラウンド補正により結果の信頼性が向上
- 0.05% AFのバリエーションの経時的な陽性検出率は100%
- 高い再現性で0.01%AFのバリエーションを検出

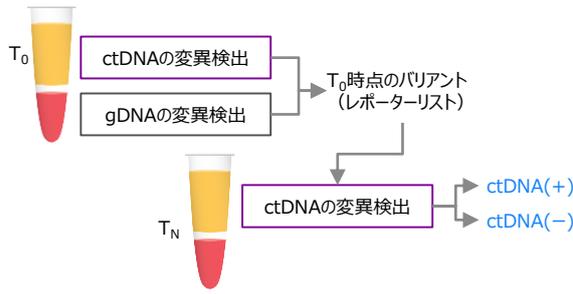


図3. MRD解析模式図

MRD解析は3つのステップで構成されます。まず健康者のcfDNA検体を用いてSNVプロックリストを作成します。次に、ベースライン検体 (T₀) からレポーターリストを作成します (血漿検体と血漿除去後検体での差分とSNVプロックリストの除外)。最後に、フォローアップ検体 (T_N) の血漿検体でctDNA陽性または陰性を判定します。

表1. 人工的に調製したcfDNAリファレンス検体を用いた経時的な変異検出解析結果

検体	レポーターバリエーション数	変異を含むリード数 (平均)	p値	判定
AF 0.5%	9	199	0.0001	陽性: 100%
AF 0.1%	9	43	0.0001	陽性: 100%
AF 0.05%	9	25	0.0001	陽性: 100%
AF 0.01%	9	11	0.0001 - 0.2858	陽性: 83%
WT (AF 0%)	9	8	0.0031 - 0.1217	陰性: 100%

レポーターバリエーションは全てのT_N検体で検出されましたが、AFが低いほどサポートリードがゼロではないレポーターバリエーションの数は減少し、また、変異を含むリード数も減少しました。T_N検体でのctDNA陽性/陰性を判定するためのモンテカルロ p値^{4,5}のしきい値は、AF 0%検体で観測された最も低い値である0.003に設定しました。AF0.5%、AF0.1%、AF0.05%では全ての反復実験でctDNA陽性と正確に判定されました。AF0.01%では、6回の反復実験のうち5回でctDNA陽性と判定されました。AF 0%検体では全ての反復実験で陰性と判断されました。

ターゲット遺伝子

- 専門家が選択した遺伝子や領域を1つのパネルにすることで、複数のNHLサブタイプに対応
- ctDNA検出、MRD解析、細胞起源決定のような様々な研究に応用可能
- 予後バイオマーカーとしてのctDNAを検証した第3相POLARIX研究³で使用されたパネルデザイン

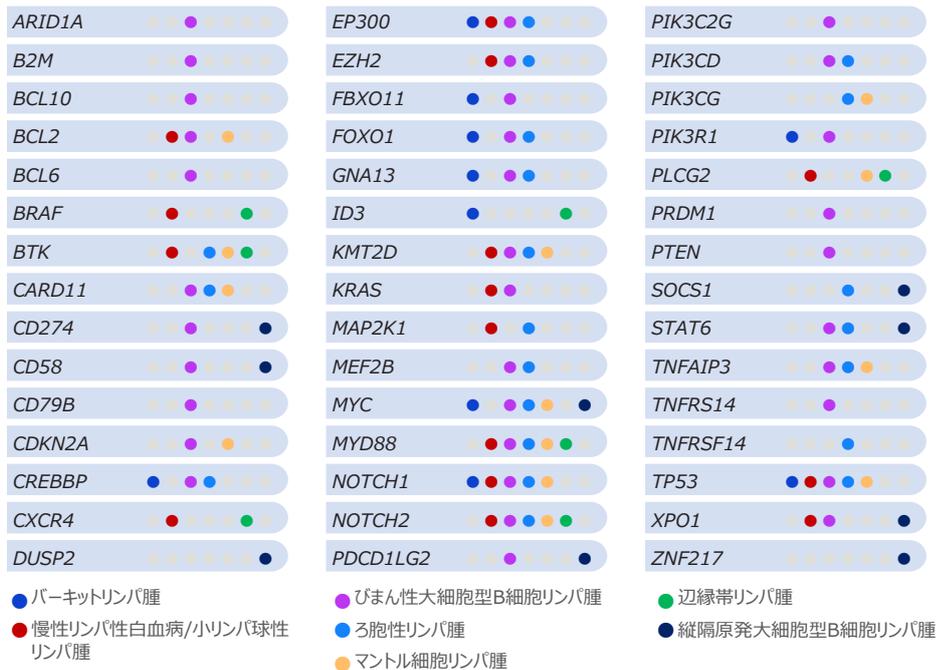


図4. KAPA NHLパネルがターゲットとしている遺伝子の一部

この図では各リンパ腫との関連が確認されている遺伝子のみを示しています。KAPA NHLパネルの完全なターゲット領域情報は、<https://sequencing.roche.com/global/en/products/group/design-share.html>にアクセスして取得してください。

製品情報

KAPA NHLパネルでは血漿(Plasma cfDNAワークフロー)と血漿除去後検体(gDNAワークフロー)の両方を使用します。実験操作手順や必要試薬の詳細はLongitudinal detection of non-Hodgkin lymphoma ctDNA white paper¹をご参照ください。

製品番号	製品	検体数	ワークフローまたはコメント
お問い合わせ	KAPA NHL cfDNA 試薬セット	24	KAPA NHL Plasma cfDNAワークフロー
お問い合わせ		96	
お問い合わせ	KAPA NHL gDNA 試薬セット	24	KAPA NHL gDNAワークフロー
お問い合わせ		96	
09052593001	KAPA HyperChoice MAX 3Mb T1 (IRN: 1000028225)	24	試薬セットには本パネルは含まれません。 96反応よりも大きい包装サイズの製品もございます。
09052615001		96	

KAPA NHL Plasma cfDNAワークフローでは、KAPA NGS FFPE DNA QC Kit (KAPA NHL cfDNA 試薬セットに含まれる)を用いた品質評価を推奨しています。cfDNAの品質評価専用に設計されたプライマーセット(キット外)を用いてQ-ratio(330/66)を評価します⁶。Q-ratio値が高いほど高分子DNA(ゲノムDNA)が混入しているとみなされ、最終的なデータ品質に影響を及ぼします⁶。KAPA NHL Plasma cfDNAワークフローでは、Q-ratio値に応じてワークフローに用いるインプット量を変更します。

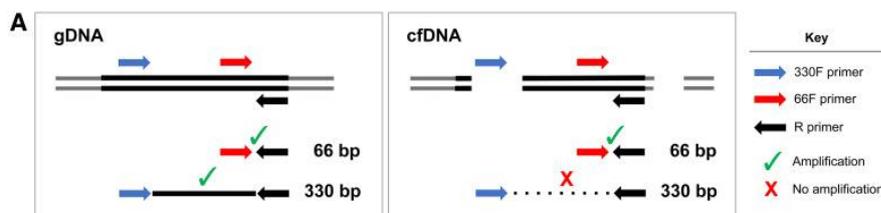


図5. cfDNAの品質評価アッセイの模式図(参考資料6より引用)

参考資料

- 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.
- Chien, R. KAPA bioinformatics analysis for longitudinal detection of circulating tumor DNA. Roche white paper. MC--12095.
- Herrera *et al.* Risk Profiling of Patients with Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) By Measuring Circulating Tumor DNA (ctDNA): Results from the POLARIX Study. *Blood* 2022; 140 (supplement 1): 1297 – 1300. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2022-157559>.
- Newman AM, Lovejoy AF, Klass DM, *et al.* Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. *Nature Biotechnol* 2016;34(547 – 555). doi: 10.1038/nbt.3520.
- Alkodsí A, Meriranta L, Pasenen A, Sirpa Leppä. ctDNAtools: An R package to work with sequencing data of circulating tumor DNA. *bioRxiv* 2020.01.27.912790. doi: 10.1101/2020.01.27.912790.
- Saelee SL *et al.* Quantitative PCR-Based Method to Assess Cell-Free DNA Quality, Adjust Input Mass, and Improve Next-Generation Sequencing Assay Performance. *J Mol Diagn.* 2022 Jun;24:566-575. doi: 10.1016/j.jmoldx.2022.02.005.

研究にのみご利用ください。診断目的での使用を意図したものではありません。

RJ2405

KAPA, KAPA EVOPLUS, KAPA HYPERPLUS, KAPA HYPERPREP, KAPA HYPERPURE, KAPA HYPERPETE, HYPERCAP, HYPERDESIGN, and AVENIO are trademarks of Roche. All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

本誌は日本ジェネティクス株式会社から販売している製品の情報を含みます。



ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社
〒108-0075 東京都港区港南1-2-70