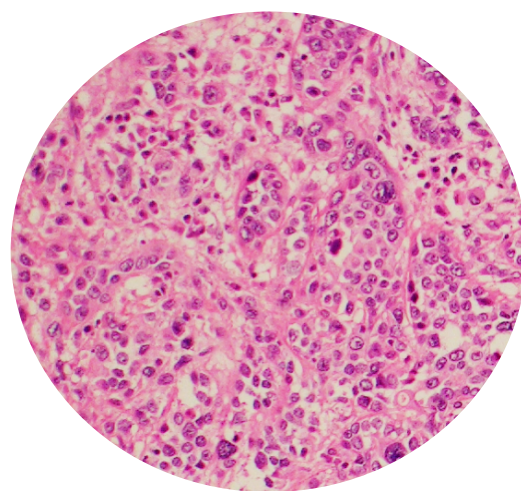
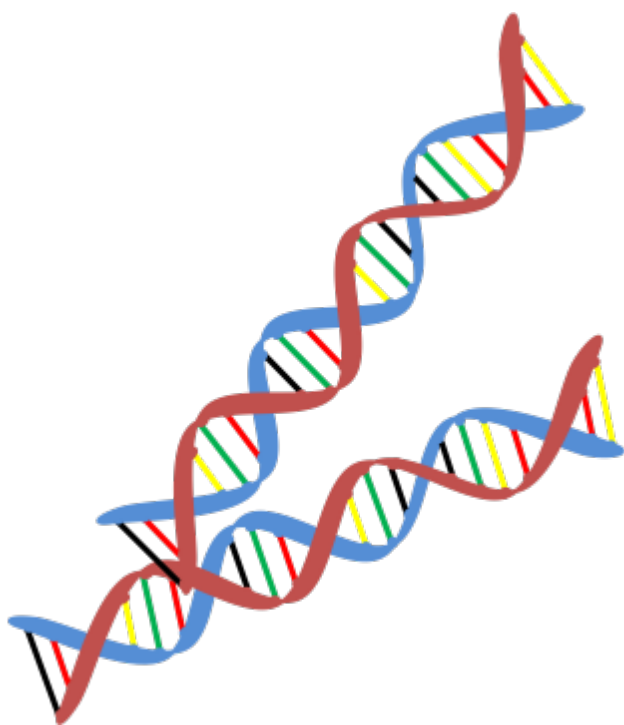


NPIC 主催

次世代シーケンス (NGS) 勉強会

## 病理診断における NGS の利用方法



## 目次

1. 核酸の基礎知識	3
2. 遺伝子解析実施の判断	5
3. 標本の準備	11
4. 核酸抽出	12
5. ライブラリー調整	15
6. NGS 解析(基本)	18
7. 病理診断に役立つパネルの企画デザイン	24

## はじめに

かつては遺伝子検査といえば先天性の遺伝性疾患や血栓症、種々の酵素欠損をはじめとする代謝疾患を対象とした体細胞変異に基づいた疾患を裏付ける検査として行われていました。これらの検査も実施できる施設は限られており、研究レベルで実施することが多く、病院など医療機関での検査室で行われることは極めて稀でした。時代とともに、感染症、癌の診断にPCR法が導入されるようになり、肝炎ウイルスや結核菌、そして今ではCovid19の検査はPCR(RT-PCR)法で行われ、自動化も進み、多くの検査室で行われる時代になりました。悪性腫瘍などにおいても造血器腫瘍の遺伝子検査など多くの検査を行うようになり、実際に検査を担う技師の能力も徐々に向上しつつあります。病理診断においては、肺癌のコンパニオン診断が行われるようになり、一つ一つの遺伝子異常をPCR法やサンガーシーケンス法で行うには追いつかないほどたくさんの情報を要求されるようになり、ついに次世代シーケンス(NGS)の出番となりました。

一方で、DNA, RNAの精度も要求されるようになり、しかも生のサンプルからの核酸抽出だけではなく、何年も保存されたホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)からDNA, RNAを抽出することもできるようになりました。このような技術の進歩がある一方で、組織や血液などのサンプルから核酸を抽出し、遺伝子解析の結果が出るまでの過程は専門技術によって処理されてしまい、また自動化も進むことで、ブラックボックス化してしまいました。パッケージ化されたパネル解析はデザインされた遺伝子の数も多く、情報量も極めて豊富であり、一見よさそうに見えますが、実際に利用するとなると非常に高価で、その利用価値すらはつきりしないこともあり、研究や検討レベルではなかなか手が出せないことも多く、常に確定診断を迫られる病理医にとって日常の病理診断業務において使いたくても使いにくい雲の上の存在になってしまっています。

そこで、もっと身近に、かつパネル検査に近い情報量を使って病理診断の質を向上させようという目的で小規模の癌遺伝子パネル解析を試みています。

今回は、「Molecular biologist」としての知識と技術を「病理医」として生かすために当病理診断学講座で展開している小規模の「遺伝子パネル解析」の基本から実践までをご紹介します。

2021年7月

奈良県立医科大学病理診断学講座

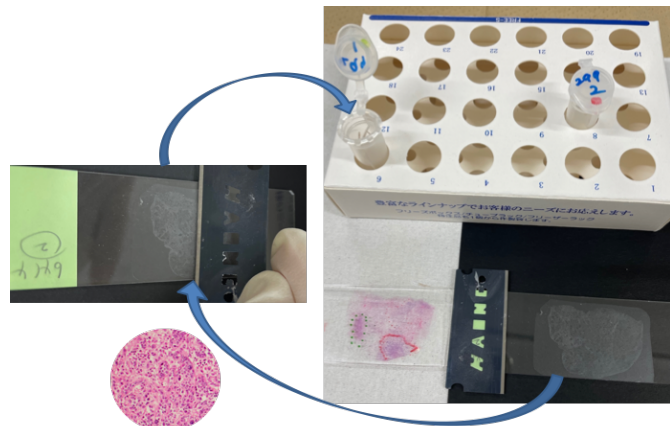
藤井 智美

## 1. 核酸の基礎知識

PCR (RT-PCR) 法を基本とした遺伝子解析には通常は生の血液、細胞、組織から抽出した DNA、RNA を用いますが、病理では一般的にホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織から DNA や RNA を抽出し、解析を行うので、薄切した「未染標本」からの核酸抽出を行うことを前提に解説します。

### 1.1 染色体

病理診断の上で最も身近な遺伝子解析は FISH 法です。FISH 法でわかることは肺癌、肉腫や脳腫瘍、造血器腫瘍でよく見られる染色体転座による融合遺伝子の存在です。切断点を有する遺伝子上の一部の配列に相補的なプローブを設計し、蛍光色素を標識して組織にハイブリダイズします。

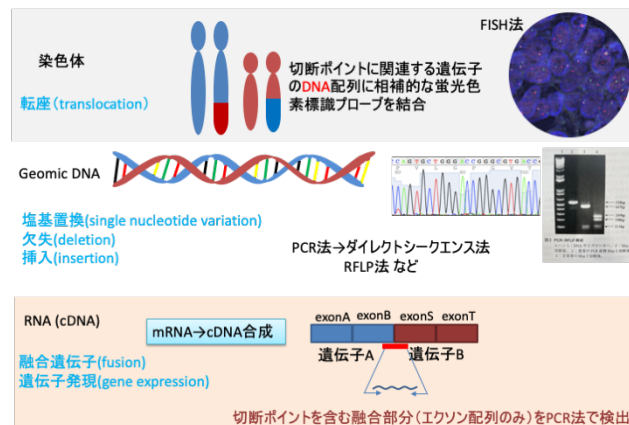


DAPI で核の対比染色を行い、核内の染色体の位置から融合もしくは分離シグナルを確認します。慢性骨髄性白血病の t(9;22) でみられる bcr/abl 融合遺伝子のように融合パートナーが明白で、切断点も明らかな染色体転座については、融合シグナルが観察されるようなプローブを容易に設計できます。一方で、肺癌の ALK や ROS1 融合遺伝子などはパートナーが複数想定される場合は切断されたことを確認する分離シグナル (スプリットシグナル) を確認することで、検出します。

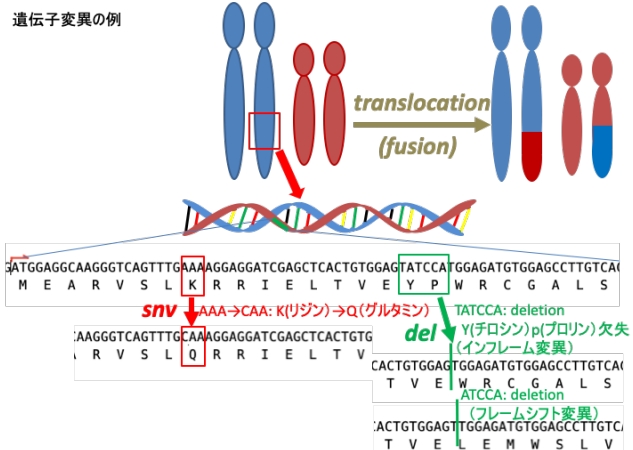
FISH 法を用いた解析としては、遺伝子増幅の検出が有用です。乳癌や胃がんの HER2、脂肪肉腫の CDK4, MDM2 など通常、タンパクの過剰発現を免疫組織化学染色で HER2/neu、CDK4, MDM2 の染色を行います。これらのタンパク質の過剰発現は遺伝子の増幅が原因であることが知られており、これらの染色体上の DNA をプローブで標識することにより、遺伝子の増幅すなわち DNA の過剰複製を観察することができます。従って FISH 法では構造的もしくは数的異常を生じた DNA の異常を観察していることになります。

### 1.2 genomic DNA

病理診断領域では EGFR、BRAF、KRAS の遺伝子異常、すなわち点突然変異は従来的にはサンガーシーケンス法によるシーケンス配列解析、制限酵素切断による RFLP 法がよく行われていました。現在では、PCR 法をベースにした Roche 社の cobas 変異検出キ



ットや NGS によるオンコマイン Dx  
Target Test マルチ(Thermo Fisher Scientific 社)が行われるようになり、ますますブラックボックス化しています。点突然変異としては、塩基置換や塩基欠失 (deletion), 塩基挿入(insertion)があり、これらは配列を直接見ることで正確に確認することができます。技術的には genomic DNA を抽出し、該当する領域を PCR 法で増幅したものをシーケンス



反応を行い、シーケンス解析を実施したり、変異部位に特異的な制限酵素サイトがあれば制限酵素による切断を行い、電気泳動で変異の有無を確認することができます。遺伝子の配列を解析する場合には DNA が対象となります。RNA→cDNA を合成し、cDNA を解析することも可能ですが、操作過程における PCR エラーなどを減らすためにも配列解析はあくまで DNA で行うことが無難です。

### 1.3 RNA (cDNA)

RNA を対象にした解析としては、融合遺伝子を RT-PCR 法で検出する目的が一般的です。研究レベルでは遺伝子発現を見ることができます。RT-PCR 法の正確性を担保するために、融合遺伝子の配列については切断点を含む領域をサンガーシーケンス法で確認することはある意味重要です。

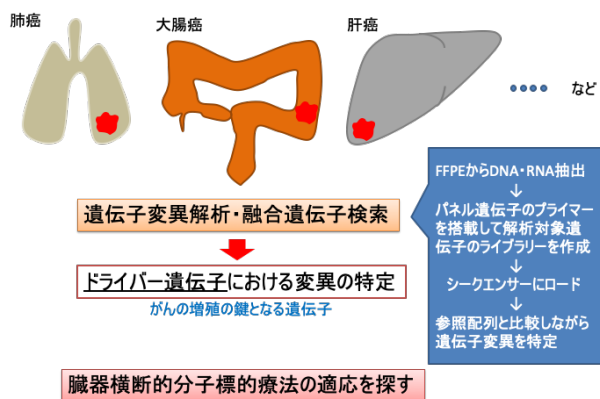
### 1.4 NGS で可能な遺伝子解析

DNA、RNA いずれにおいても PCR をベースとした遺伝子解析であればなんでも出来ます。DNA を対象とした解析としては、点突然変異や塩基の欠失・挿入などが可能であり、RNA を対象とした解析では融合遺伝子の検出、遺伝子発現、さらにはマイクロ RNA の発現解析も可能です。

Memo

## 2. 遺伝子解析実施の判断

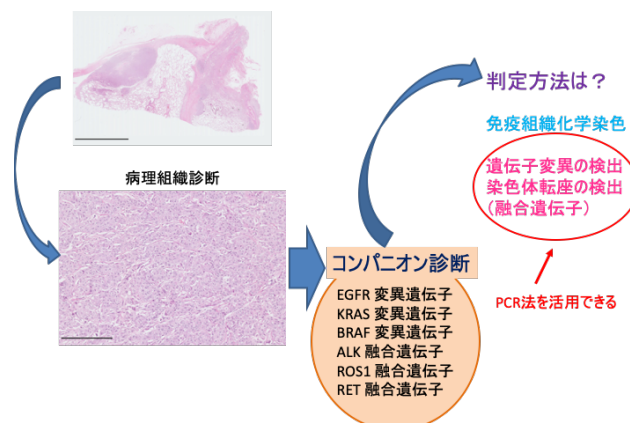
病理診断における遺伝子解析の目的は、癌の遺伝子変異・融合遺伝子を検索し、見出すことで、癌の増幅の鍵となるドライバー遺伝子における変異を特定することです。この結果、適応となる分子標的療法を見つけることが出来ます。白血病や悪性リンパ腫ではかなり以前から行われていますが、今では肺癌を始め多くの癌に適応が広がっています。さらに今では臓器横断的に分子標的療法の適応を探すべく、癌遺伝子パネル検査が行われている時代になり、遺伝子解析が診断にも治療にも重要な位置付けとなっていることは誰もが知るところです。



病理組織標本から得られる情報は、HE 染色標本からは形態学的な情報、免疫組織化学染色、特殊染色から得られる蛋白発現のプロファイリング、そして FISH 法や遺伝子解析による分子レベルでのプロファイリングも重要かつなくてはならない情報になっています。

### 2.1 癌の遺伝子パネル解析

NGS を用いた遺伝子パネル解析、その中でもターゲットシーケンスでは数十種類～数百種類の遺伝子配列を調べることで遺伝子変異を効率よく見出すことが出来ます。一方で、利点と欠点があり、それぞれを理解した上で、実施し、解釈しなければ



いけません。NCC オンコパネルや Foundation One による大規模な癌遺伝子検索は網羅する遺伝子も多く、情報量も多いため有用性が高いですが、非常に高価で検査を行うための適応基準をクリアするには条件が厳しく、手続きも煩雑です。治療法を見出すための検査であるため、結果が治療に生かされることが期待されるわけですが、実際に検査を実施できたとしても有効な治療にたどり着けるのは現時点で約 10%と意外に少ないのが現状です。

以下に、現状の癌遺伝子パネル解析の利点と欠点を挙げてみます。

[利点]

- ① 1つの組織片から DNA・RNA を抽出し、1度にライブラリーを作成し、シーケンサーにかけることで遺伝子変異が検出できる。
- ② 臓器横断的な遺伝子変異を見出すことで、これまでに適応のなかった分子標的薬の利用可能性が広がる。

- ③ 個別に治療方針がプランできる。

[欠点]

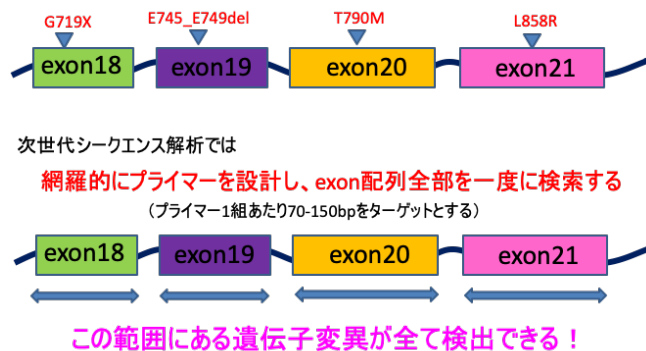
- ① 必ずしも遺伝子変異が見つかるとは限らない。
- ② 見つかったとしても分子標的薬として未開拓の遺伝子異常のことも多い。
- ③ 実際に遺伝子変異に基づいた治療へ繋げられるのは10%程度。



こういった背景を抱える遺伝子パネル解析ですが、病理診断領域にとって NGS は時には非常に有用性の高いツールであることは間違いありません。

病理診断にとって遺伝子パネル解析がどのように有用性が高いかを検討したいと思います。例えば、EGFR 遺伝子変異解析の場合、コンベンショナルな遺伝子検査 (cobas 変異解析など) では治療に適応可能な 42 種類の EGFR 遺伝子変異が検出できます。一方で、

NGS では網羅的にプライマーを設計し、遺伝子変異の hot spot を含むエクソン配列全てを検索することができるため、その領域にある遺伝子変異は全て検出できます。ところが、稀な遺伝子変異は治療効果のエビデンスがなく、治療に結びつかないため、現状では有効性は保証できません。それでも解析する側としては、病理診断上、形態学的特徴と関連性を見出すきっかけとなり、解析経験を積むことで、結果と予後との関連性や新たな薬剤開発への道を模索するきっかけとなる情報を提供することとなります。とはいえ、コストや機器のキャパシティの面からは毎回大規模の遺伝子パネル解析をやるわけにはいきません。そこで、もっと小回りのきく、小規模のパネルをたくさん準備し、病理形態診断の中での「コンパニオン診断」的役割を果たしてくれるような解析ができることが理想です。



では、病理診断においてどんな時に NGS が役に立つかを挙げてみると、

- ① 治療を目的とした遺伝子変異の検出→コンパニオン診断、癌パネル検査
- ② 免疫染色によるタンパク発現亢進の確認検査
- ③ あくまで診断を確信するための遺伝子解析
- ④ 組織量不足など本来の癌パネル検査から脱落したが、情報として必要な解析

①は保険診療内の検査の範疇なので、お任せしてしましましょう。

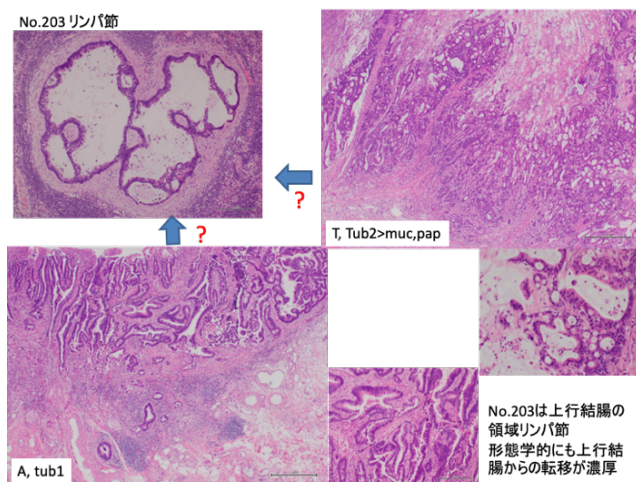
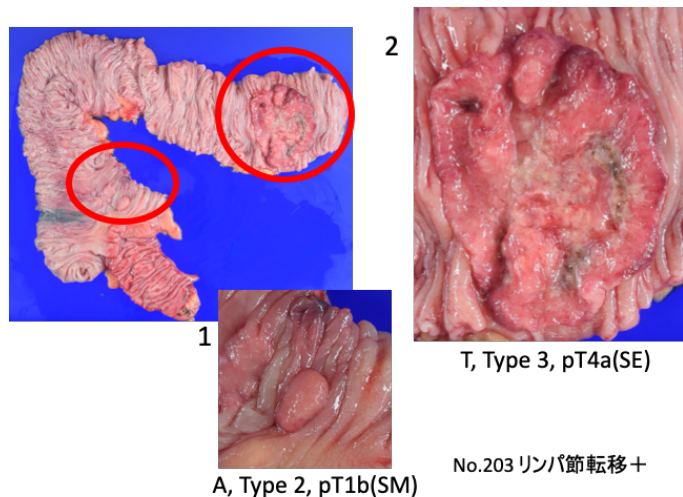
②は 前述の通り、FISH 法でもできますが、PCR ベースでも copy number variation(CNV)としての解析が可能なので、意外と役に立ちます。しかも、ターゲット領域を多く設定できるため、FISH 法で検出できなかった場合でも実際にあれば検出できる可能性が高いです。

③は①とほぼ同義ですが、治療には結び付かなかつたり、診断的意義でしか知られていない場合でも実際に解析してみて検出できれば、診断の裏付けにはなるので、疾患概念として既存の遺伝子異常を証明したい、あるいは新たに概念を見出したいなど病理診断として本当の意味で役に立つ可能性を十分に秘めています。

④は組織量が少量で解析に至らなかった場合、それでも結果が知りたいという時には小規模パネルであれば解析できることも多いです。ただし、固定までの時間、固定時間、ホルマリンの濃度など種々の不確定要素により核酸抽出ができないこともあるため、注意が必要です。

## 2.2 病理組織像を裏付ける遺伝子の変化

病理組織診断の上で、難解症例として最もよく出会うのは原発不明癌かと思えます。既往がわからなければ、転移巣の組織像を見ても原発巣が特定できないことは多々あります。たとえ特定できたとしても重複癌でどの腫瘍が転移したものかを見極める上でも形態学的所見を裏付ける情報があれば非常にありがたいと思えます。そこで、大腸癌の上行結腸と横行結腸の重複癌で No.203 リンパ節転移がどこから来たものかを遺伝子解析で特定した例を示します。この症例は領域リンパ節の位置と組織像から推定は可能でしたが、推定される病変とは異なる部位の方が深達度は進行していました。すなわち形態学的にはリンパ節転移巣の像と上行結腸癌は類似していましたが、上行結腸癌は SM 癌で早期癌でした。一方横行結腸癌は pT4a の進行癌でした。この 3 病変について 50 の癌遺伝子を対象としたターゲットシーケンスパネルの Cancer Hot Spot V2 パネル (Illumina 社) を使って DNA の遺伝子変異解析を行ったところ、





リンパ節転移巣と上行結腸癌の遺伝子変異パターンが一致していました。この結果からも組織像、領域リンパ節の位置、遺伝子プロファイルが一致したことが証明できました。

免疫組織化学染色では判断できない転移病変の推定や長期間生存の後に発生した癌が再発か de novo かを判断する材料にもなり得ます。

リンパ節No.203		上行結腸		横行結腸	
FGFR1	D166del	FGFR1	D166del	BRAF	V600E
TP53	P72R	TP53	P72R	CDKN2A	A102X
				ATM	R337C
				IDH2	G145X
				TP53	P72R

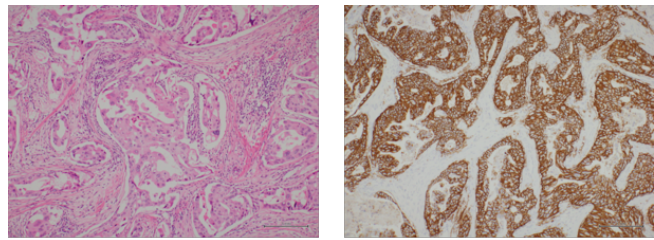
対象DNA遺伝子変異  
(癌関連遺伝子50種類のhot spot)

DNA pool					
ABL1	EGFR	GNAQ	KRAS	PTPN11	
AKT1	ERBB2	GNAS	MET	RB1	
ALK	ERBB4	HNF1A	MLH1	RET	
APC	EZH2	HRAS	MPL	SMAD4	
ATM	FBXW7	IDH1	NOTCH1	SMARCB1	
BRAF	FGFR1	IDH2	NPM1	SMO	
CDH1	FGFR2	JAK2	NRAS	SRC	
CDKN2A	FGFR3	JAK3	PDGFRA	STK11	
CSF1R	FLT3	KDR	PIK3CA	TP53	
CTNNB1	GNA11	KIT	PTEN	VHL	

遺伝子変異のパターンより  
上行結腸の所属リンパ節転移であることが  
確認できた。

### 2.3 免疫組織化学染色を裏付ける遺伝子増幅

乳癌や胃癌においてはHER2の遺伝子増幅を免疫組織化学染色で判定します。DNAを抽出し、NGSで解析することでFISH法と同じように遺伝子の増幅が copy number variation(CNV)として検出できます。これは、AmpliconベースのNGS解析では read depth すなわちコピー数を非腫瘍組織をベースにして比較することによりコピー数の増加を算出



NGSを用いて、ERBB2のcopy number variation (CNV)を解析

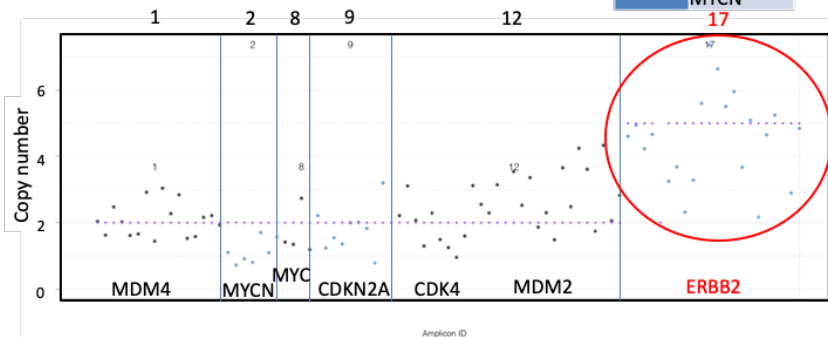
することが出来ます。この技術を使うと、DNAから遺伝子変異とCNVが同時に検出できることとなります。このようにCNVが有用である遺伝子を一つのパネルとしてまとめて作成しておくことで、乳癌や胃癌だけではなく脂肪肉腫、脳腫瘍の一部など他の腫瘍にも応用できます。欠点としては、広範囲の遺伝子欠失があり、検出できない場合もあるため、遺伝子の中でも広くカバーするようにプライマーを設計するなどの工夫が必要です。

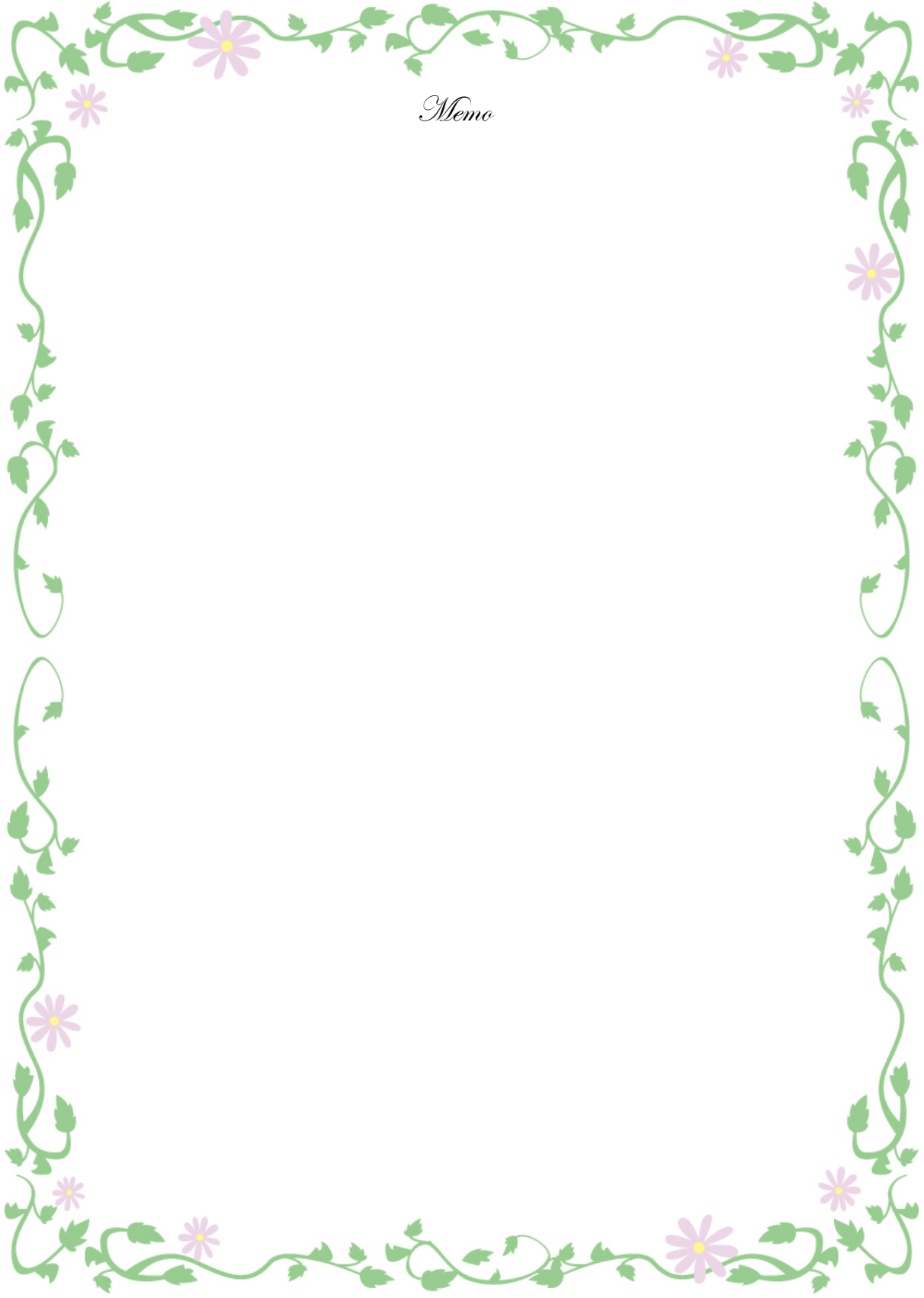
#### Planning

非腫瘍をベースラインにして遺伝子のGainとLossを解析  
アンプリコンベースの解析なので、Gainの方が得意

	MDM4	MYCN	MYC	CDKN2A	CDK4	MDM2	ERBB2
Copy number	2	2	2	2	2	2	5

	CNV panel
Panel gene	CDK4
	MDM2
	ERBB2
	CDKN2A
	MDM4
	MYC
MYCN	



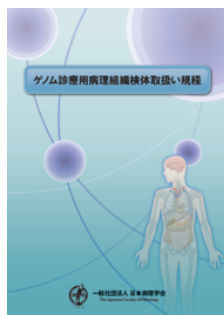


*Memo*

### 3. 標本の準備

#### 3.1 標本選択

NGS で解析をしたいと思う標本中の癌組織の量は多いに越したことはありませんが、小規模パネルの解析ではDNA のインプット量が少なめでも解析が可能なが多いため、できるだけマクロダイセクションで非腫瘍部や壊死組織を減らして解析に進みます。経年保存期間は4年以内が理想的ですが、場合によっては10年でも解析が可能ながあります。一方で、固定液、固定までの時間、固定時間などは重要で、年数にかかわらず、解析できるかどうかはプレアナリシスの影響は大きいです。



- ✓ DNAもRNAもできれば4年以内
- ✓ ただし、それを超えても解析できることは多いです。
- ✓ 一方で、固定までの時間や固定時間、固定液の種類などさまざまな不確定要素により、期間が短い標本でも解析ができないことがあります。

病理側としては・・・

**ホルマリン固定**  
液の組成: 10% 中性緩衝ホルマリン溶液(3.7% ホルムアルデヒド)  
固定時間: 6~48時間  
固定液量: 組織量に対し10倍量  
温度: 室温 (ただし、低いと浸透しにくいいため、恒温器を使うこともあり)

#### 3.2 未染標本の準備

腫瘍が含まれる組織切片を選択したら、最大限にコンタミネーションを防ぐため、未染標本作成時はマイクロームの刃を新しいものにする、浸透のための温水は専用にする、スライドガラスに他のパラフィン組織片が付着することのないように環境をきれいにして作業する、ことを念頭に作成を依頼します。厚さは5-8 $\mu$ m, 大きさによりますが、大体5枚くらい使用します。オンコマインや Foundation One ほど厳密にする必要はありませんが、十分量ある方が安心して核酸抽出に進めます。

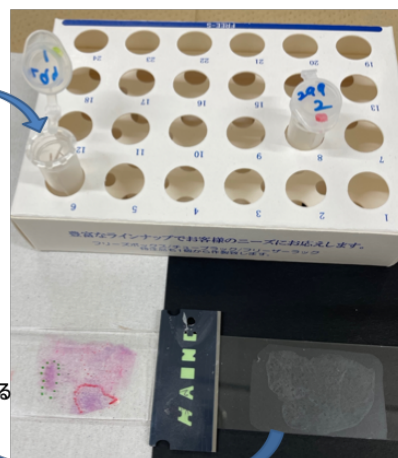
未染標本: 8 $\mu$ mを5枚程度準備  
組織が小さければ枚数を増やす

当ラボではこの状態の標本と腫瘍をマーキングしたHE標本を受け付けています。



フェザー剃刀を使う  
できれば不要なパラフィンは先に剥がして捨てる

1.5ml チューブを準備しておく



マクロダイセクションが必要であればHE標本にマーキング

## 4. 核酸抽出

核酸抽出は NGS 解析のみならず定量的 PCR 法やサンガーシーケンス法、遺伝子発現解析い  
ずれにおいても基本操作となります。使うキットはいろいろありますが、QIAGEN 社のキットが一番  
安定している印象です。当ラボでも QIAGEN 社のキットを最もよく使っているので、紹介します。  
DNA、RNA 抽出および後述するライブラリー調製に共通する必要な機器、消耗品は以下の通りで  
す。

(メーカー問わず)

### [機器]

ブロックインキュベーター

冷却遠心機 (1.5-2.0ml チューブ用)

分光光度計 (核酸の濃度を測れるもの)

エッペンドルフチューブたて

ギルソンピペッター一式もしくはエッペンドルフピペッター一式

### [消耗品]

エッペンドルフチューブ (1.5ml)

ファルコンチューブ (15ml, 50ml)

チップ一式

RNase free H<sub>2</sub>O

エタノール

イソプロパノール

クロロホルム

キシレン

### 4.1 DNA 抽出・RNA 抽出

ここでは、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit  
(QIAGEN 社)を用いた抽出法について紹  
介します。

RNA についてもほぼ同様のステップです  
が、DNase 処理を行うなどのステップがあり  
ます。

#### ① 脱パラフィン

エッペンドルフチューブに入れた組織切片  
にキシレンを添加し、ボルテックスにより十

#### 抽出原理

脱パラフィン  
プロテナーゼ K 処理  
タンパク変性・核酸溶液  
カラム抽出



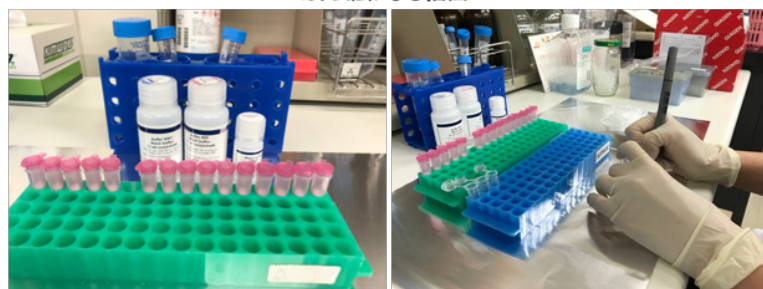
分組織切片と混和し、パラフィン溶解します。

Deparaffinization solution (QIAGEN)や NucleoSpin® totalRNA FFPE (TaKaRa Bio) ではキシレンフリーの Paraffin Dissolver による脱パラフィンを行うため、ドラフトが設置された場所での抽出など特別な環境整備が簡略化できる方法です。

DNA・RNA抽出の場所



カラム法による抽出



## ② Protinase K 処理

キシレンなどの有機溶媒を用いて脱パラフィンを行った

場合、遠心分離法により上清の有機溶媒を除去し、エタノールなどの両親媒性有機溶媒を添加し、残存するキシレンを十分取り除いた後、Protinase K 処理を行います。Protinase K による高温処理により、ホルムアデヒドによるクロスリンクが部分的に外れ、核酸の検出が容易になりますが、長時間インキュベーションを行うと、断片化が進むため、注意が必要です。なお、NucleoSpin DNA FFPE XS (TaKaRa バイオ) などでは脱クロスリンク専用の試薬 (Decrosslink Buffer D-Link) が組み込まれている場合もあり、Protinase K による高温処理を避ける工夫もされています。

## ③ カラム吸着

DNA 溶解液に buffer とエタノールを添加し、ピペッティングにより混和し、沈殿物とともに抽出用のカラムにアプライします。もし、RNA free の DNA が必要であれば、この前に RNase 処理を行うこともあります。10,000rpm、15 秒でスピンドウンし、フロースルーを捨てながら全量吸着し終えるまで繰り返します。

## ⑤ カラム洗浄

エタノールと混合した洗浄用 buffer をカラムの容量に合わせて添加し、10,000rpm、15 秒でスピンドウンします。洗浄操作はキットによって至適回数が見られているため、キットの説明書を参考にを行います。

## ⑥ 溶出

カラムを新しい 1.5ml のコレクション用チューブ (エッペンドルフチューブ) にセットし、15-50  $\mu$ l の滅菌水をカラムのメンブレンに直接添加し、13,500rpm、1 分遠心し、DNA を溶出します。

## ⑦ 保存

得られた DNA や RNA は解析を行うまで、 $-80^{\circ}\text{C}$  の deep freezer で長期保存可能です。

## 4.2 核酸の濃度測定

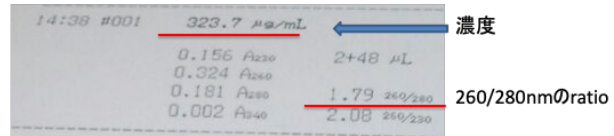
分光光度計で測定するのが一般的ですが、NGSに進む場合は厳密な核酸の濃度が必要なため、Tapestation (Agilent 社) などを使って行います。

厳密に測定された濃度でライブラリー調製のインプット量を決定します。なお、この時に FFPE から得られた DNA、RNA は明らかに分解が進んでいますが、分解の程度を示すとされている DIN 値や RIN 値はライブラリーの出来不出来にはあまり関係がないようです。

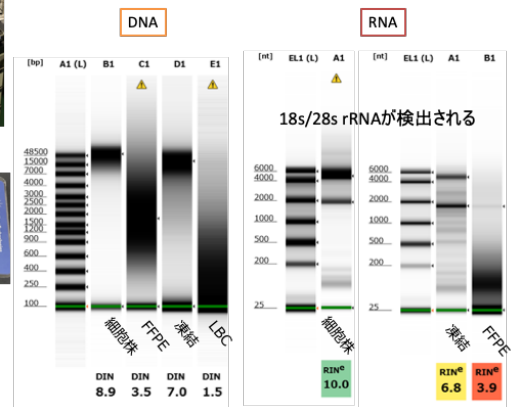
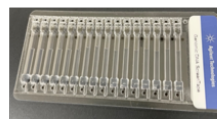
分光光度計による濃度測定と質評価



抽出されたRNAの濃度を測定



Tapestation4200 (Agilent社)



## 4.3 RNA における逆転写反応および cDNA の評価

RNA の場合は NGS 進む最初の段階として逆転写反応による cDNA の合成を行います。サーマルサイクラーを使い、合成した後、ライブラリーに進む前に定量的 PCR 法でアクチンや GAPDH や 18s rRNA といったハウスキーピング遺伝子の発現量を測定し、cDNA を評価します。ここで cDNA ができていればライブラリー調製に進みます。

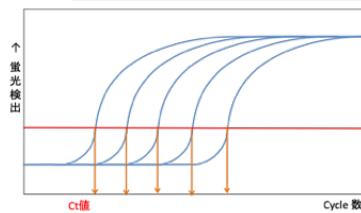
抽出したRNAからcDNAの合成を行う(逆転写反応)。  
↓  
cDNAを鋳型とし、目的の遺伝子を定量的PCR法で検出する。

### 【定量的PCR法の試薬ツール】

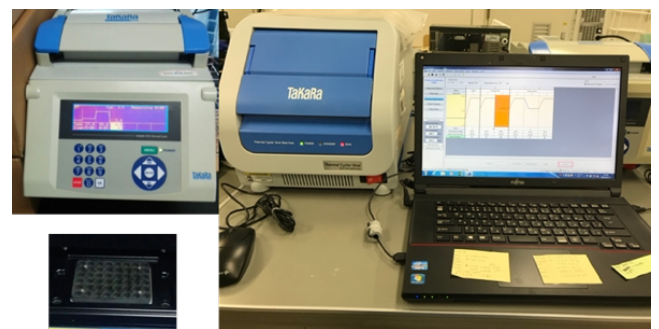
- TaqMan PCR法
- ハイブリダイゼーションプローブ法
- SYBR Greenを用いた定量

✓ SYBR Greenによる定量的PCR法ではRNAの断片化やホルムアルデヒドによるクロスリンクによる検出の低下を考慮し、産物の大きさを50-100bpと小さく設計しておく

DNAやRNA(cDNA)の質の評価にはアクチン、グロビン、GAPDHなどのハウスキーピング遺伝子を使うことが多い



Ct値が低いほど蛍光検出が早い⇒標的遺伝子(遺伝子の発現量)が多い



## 5. ライブラリー調製

ライブラリー調製は、サンガーシーケンス法で言うところのシーケンス反応に相当する手順です。もちろん、サンガーシーケンス法のようにシーケンスプライマーで鋳型 DNA を増やして、Dye terminator といった4種の蛍光色素と片側プライマーで反応させてカラムを通して精製するのみという簡単な手順ではありません。しかもインプットする DNA の量も非常に厳密です。核酸の扱いに熟練した技術者による作業が望まれます。

ここでは、例として Illumina の Ampliseq を使ったライブラリー調整の原理と手順について、解説します。

### 5.1 ライブラリー調製の準備

抽出した DNA および RNA より逆転写反応した cDNA の品質評価および濃度測定が終わったら、ライブラリーの鋳型にインプットする濃度に調整します。この時、オーバーロードするとシーケンス反応自体がうまくいかず、しかもマルチプレックスで解析するため、すべて (miniseq でのターゲットシーケンスでは 24sample) 解析できないという大損失事態になるので、厳密な操作が必要です。なお、DNA も RNA も DIN 値や RIN 値など断片化の指標がありますが、これらはほぼあてに

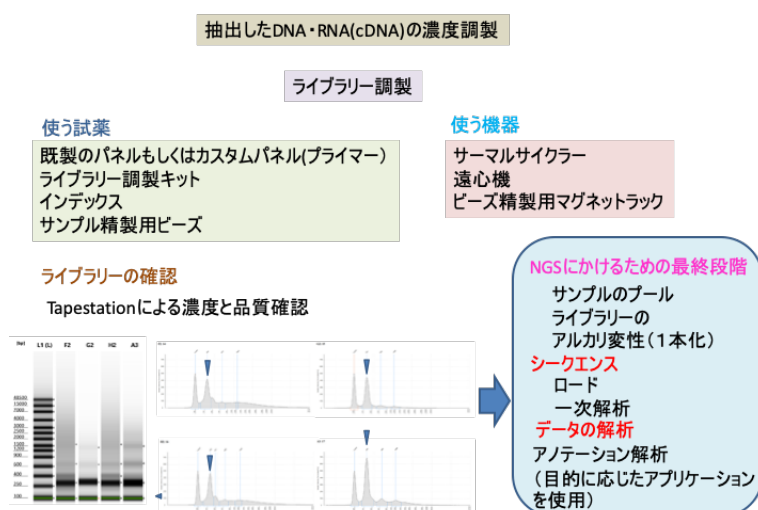
はなりません。なぜなら、どちらも最終的には 150bp 前後の小さいアンプリコンを生成するため、電気泳動で確認できるサイズ、だいたい 300bp はほぼクリアしています。これまでの経験でライブラリーが作成できなかったサンプルを想定すると、むしろ PCR 反応に影響するであろう種々の化学修飾や構造変化(ホルマリンによるクロスリンクやタンパク修飾など)が問題になると考えられます。

使用するパネルの準備はキットのマニュアルを参照し、カスタムパネルの場合は、アンプリコン数も確認して調製の準備をします。

### 5.2 ライブラリーとは

ここでいう“ライブラリー”について簡単に説明します。

NGS 解析でいうライブラリーとは、DNA または cDNA サンプルをランダムに断片化し、シーケンサーで読み取れるようにアダプターを 5' 側と 3' 側にライゲーションにより付加する操作のことで、



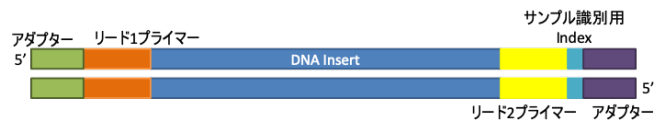
最終的にはマルチプレックス化するためのインデックス(いわゆるバーコード)を付加して、それぞれのアンプリコンを識別しながらシーケンス解析を行えるようにすることをいいます。

そのステップとして、

- ① DNAの断片化: DNAの長さを200-600bp程度に断片化(フラグメンテーション)する
- ② アダプタ配列とプライマー配列を付加する(フローセル上の一本鎖DNAとハイブリし、DNA鋳型増幅を行う)
- ③ 複数サンプルを識別させながら同時にランする(マルチプレックス化)ための技術として、サンプル同士を識別するためのインデックス(バーコード)配列の付加を行う

という操作になります。

DNAの断片化とライゲーションによる種々のラベルの付加によって出来上がる



DNA Insert: 断片化したDNA  
 アダプター: フローセルへの結合を行う  
 プライマー: シーケンスを開始する  
 サンプル識別用Index: サンプルを区別するためのバーコード配列

ペアエンドシーケンス: DNA断片の両端からシーケンスを行うことで、リード数が倍になる。



#### DNA (cDNA)

DNA量: Tapestationによる濃度測定データを使用  
 DNAの分解の指標(例えばDIN値)などはあてにしない

Cancer Hot Spot V2: 100ng  
 カスタムパネル: 250ng

反応は全てサーマルサイクラーを使います。

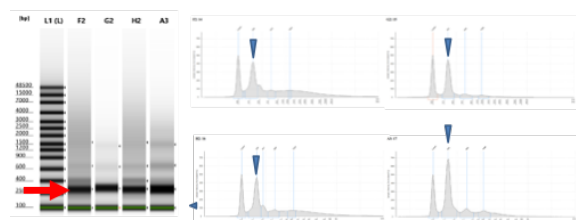
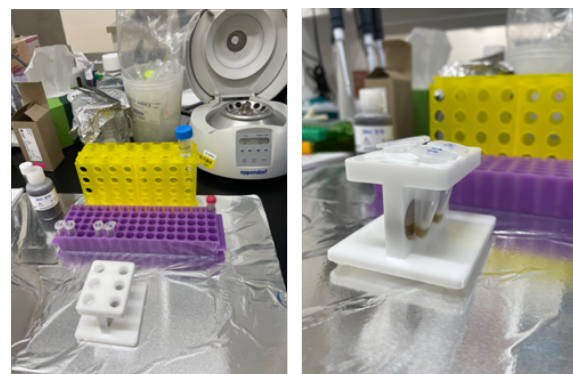
- Step 1: ターゲット領域の増幅
- Step 2: PCRプライマーの部分分解 (FuPa処理)
- Step 3: アダプターライゲーション  
 AMPure ビーズ精製
- Step 4: ライブラリーの増幅  
 AMPure ビーズ精製 (2段階: 高分子・低分子DNAの除去)

#### ライブラリーの評価

Tapestationで行います。

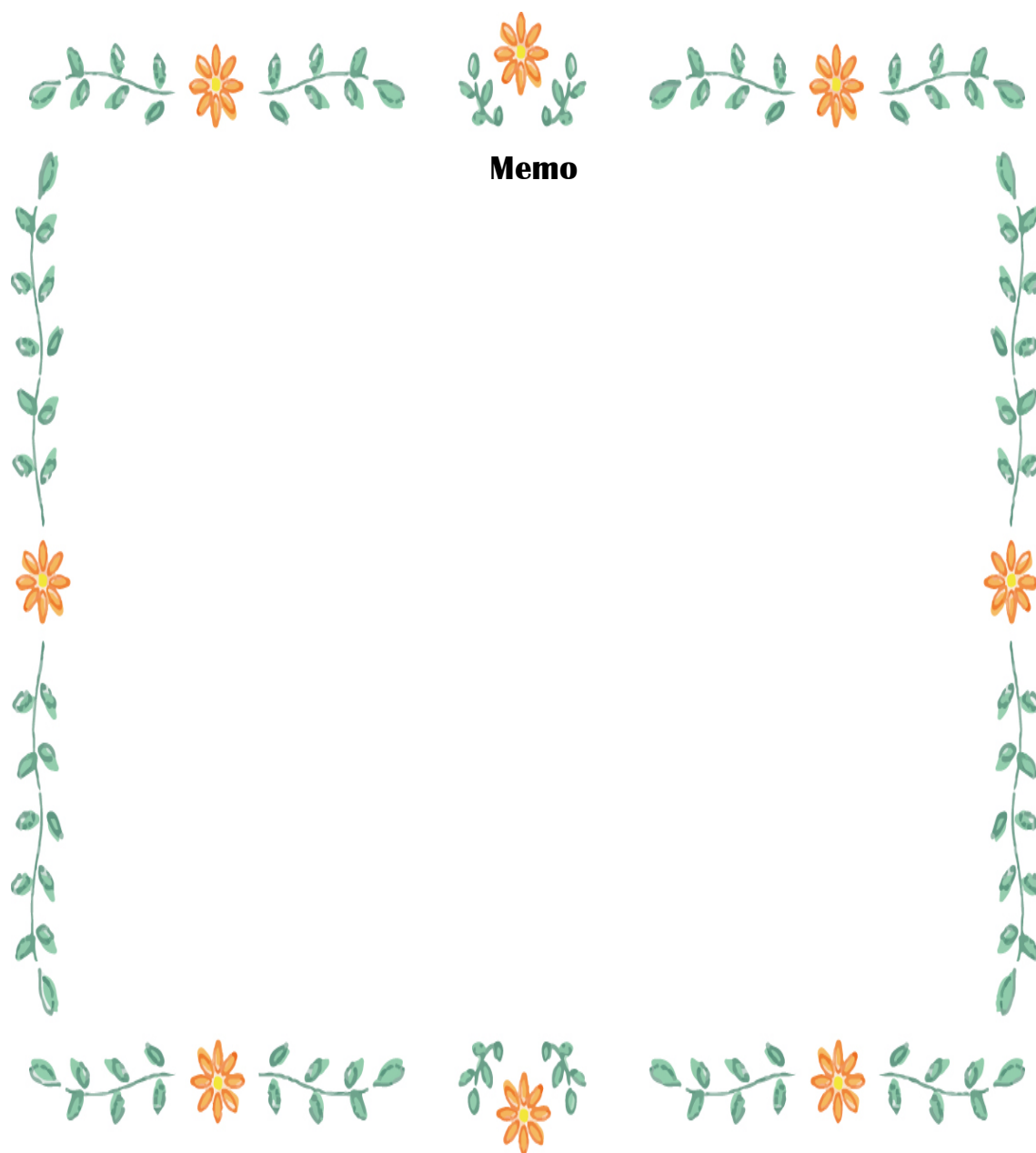
### 5.3 ライブラリー調製の実際

まず RNA でスタートする場合、逆転写反応にて cDNA を合成します。次に DNA/cDNA を鋳型にしてターゲット領域の増幅を行います。ここまではサンガーシーケンス法と似ていますが、サンガーシーケンスでは Dye terminator を用いて、片側プライマーのみで反応し、蛍光色素を標識したターミネーター塩基の付加により種々の長さのアンプリコンが出来上がり、長さの違いを利用して配列を読み取る原理です。NGS ではここから種々のコンポーネントを付加する反応が続きます。まず、プライマー部分を部分分解する FuPa 処理を行い、次にインデックス-アダプターをライゲーションします。ここで一旦ライブラリーをビーズ精製します。ビーズ精製には AMPureXP ビーズを用います。次にライブラリーを増幅し、再びライブラリーを精製しますが、この時の精製では二段階精製を実施します。精製の原理としては AMPureXP





ビーズ溶液と核酸溶液の体積比によって、ビーズに結合する核酸のサイズが変わるのを利用し、不要な高分子量および低分子量の DNA を除去します。すなわち、1段階目では不要な高分子量 DNA を除去し、2段階目で低分子量 DNA を除去します。これによって目的となる大きさのアンプリコンのみを回収することになります。



## 6. NGS の基本

調製されたライブラリーはロードに適する量に希釈調製およびプールし、アルカリ変性ののち、機器へ投入するカートリッジにインプットします。

### 6.1 ライブラリーの希釈

種々の付加を伴ったライブラリーはおよそ 300bp のバンドサイズの DNA が完成します。これを Tapestation で確認し、濃度を測定すると良好であれば 100~200ng/μl のライブラリーが生成されます。シーケンスにかけるためにはフローセルにインプットされる DNA 分子数が重要なので、ここで、ライブラリーは濃度をモル濃度に換算します。ライブラリーのバンドサイズと濃度、核酸の平均分子量を用いて計算します。算出されたライブラリーを 1nM に希釈し、これを 1μl ずつ取り、解析するサンプル全てをプールします。

ライブラリーができたことを確認したら、各々 Tapestation で測定された濃度 (ng/μl) をモル濃度に換算し、1nM に調整してプールする

ライブラリーの濃度: 100~200ng/μl 程度  
平均バンドサイズ: 300bp 程度

塩基の平均分子量: 660

モル濃度への換算

$$\frac{\text{DNA濃度 (ng/μl)}}{660\text{g/mol} \times \text{ライブラリーの平均バンドサイズ (bp)}} \times 10^6 \text{ nM}$$

アルカリ変性・最終濃度調製の後、Output用のカセットにロードする。

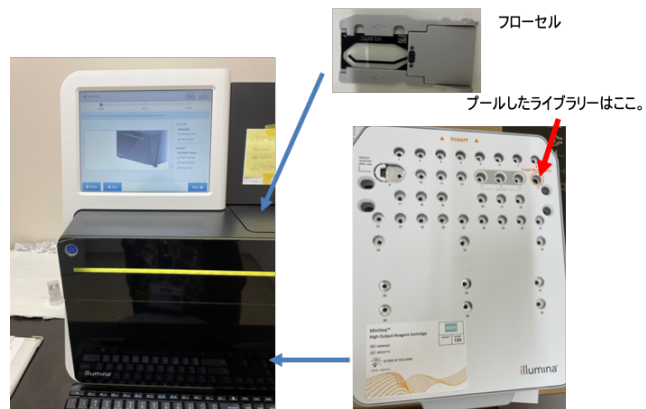
### 6.2 ライブラリーの変性と最終濃度の調製

ライブラリー変性に必要な試薬は、0.1N NaOH 及び 200mM Tris-HCl pH7.0 です。

ライブラリーに変性する NaOH は 1.0N のストック溶液を毎回 0.1N に希釈して使います。変性はプールしたライブラリーを 5μl、0.1N NaOH 5μl を混和し、5分間室温で行います。変性後 220mM Tris-HCl (pH7.0) を 5μl 加えて中性化し、添付の HT1 (Hybridization Buffer) を 985μl 添加して 1000μl にします。この時、ライブラリーは 5 pM の濃度になっています。これを 500μl の 1.1pM ライブラリーを作成するために、5pM ライブラリー 110μl と HT1 を 390μl 混和して調製します。

### 6.3 ライブラリーのインプットと Miniseq のセッティング

500  $\mu$ l のライブラリー溶液をカートリッジの lording spot に全量注入します。なおカートリッジは冷凍保存なので、室温、水浴にて解冻します。完全に解冻するには1-2 時間かかりますので、ライブラリーの最終調製の前に冷凍庫から出しておく必要があります。フローセルは十分に室温に戻してからアルミの包装を開封します。Miniseq はあらかじめ電源を立ち上げ、QuickWash を済ませておきます。



#### 6.4 ランのセッティング

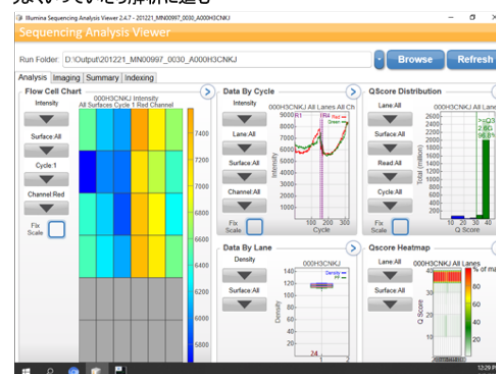
機器のアプリケーションに則ってサンプル情報のセッティングを行い、スタートできる状態にします。(Miniseq では Local Run Manager というアプリケーションを使っています) カートリッジとフローセルをセットし、スタートします。フローセルは読み取り部分をレンズクリーナーで綺麗に磨き、読み取りに支障のない状態にしてセッティングします。スタートするとまず機器のチェックが始まり、フローセルが汚れているとエラーが出ます。その場合は再度戻り、磨き直してスタートします。

#### 6.5 シークエンスの一次解析

シークエンスは 17-20 時間程度で終わります。終了後はシークエンスがうまくいったかどうかをリード数や読み取りの精度などを確認します。この時にシークエンスがうまくいっていなければ、生成された解析ファイルも全て無効になります。うまくいっていたら、次のアノテーション解析に進みます。

#### NGS runの後の解析

「シークエンス」と「解析」は別なので、まずはシークエンスがうまくいったかどうかを確認し、うまくいっていたら解析に進む



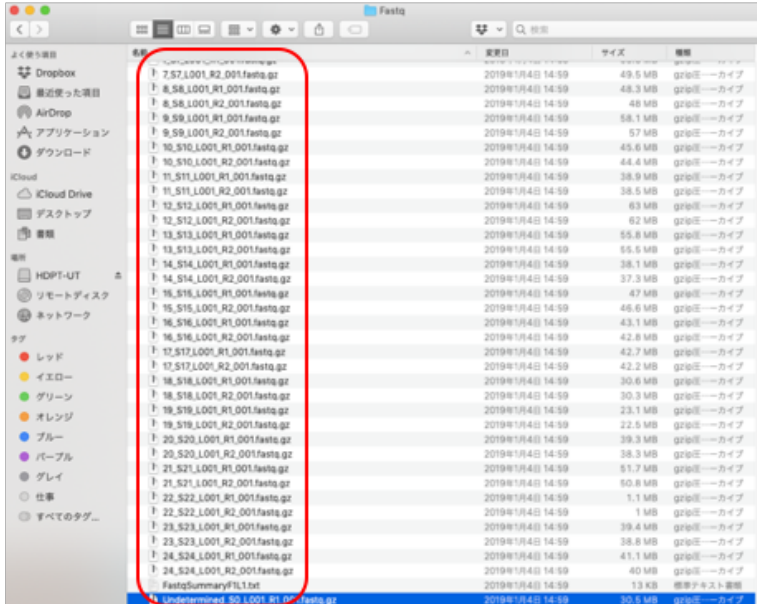
Q Score:30以上が95%以上あれば良好なシークエンスができたと言える

#### 6.6 シークエンスデータの解析(基本)

たくさんのデータファイルが生成されますが、次のアノテーション解析に必要なファイルは Fastq ファイルです。Fastq ファイルを使って参照配列との照合などをアプリケーション上で行っていきます。

解析ファイルを取り出して、参照配列(hg19)と比較する

解析の基本になるファイル: Fastq ファイル



Fastqファイルはペアエンドで解析した場合2つできるので、二つセットで解析用のクラウドアプリケーションにアップロードする。

IlluminaのAmpliseqを使ってシーケンスしたデータの解析に使っているもの


**Basespace : Sequence Hub** たくさんアプリケーションがあります。。

実際に使っているのは、

- DNA遺伝子解析**
  - DNA Amplicon Targeted Sequencing, Va...
- RNA融合遺伝子解析**
  - RNA Amplicon Targeted Sequencing, RN...
- CNV解析**
  - OncoCNV caller Targeted Sequencing
  - OncoCNV trainer Targeted Sequencing

使うアプリケーションは Illumina 社のクラウドソフトで BaseSpace (有償)を使います。このクラウドソフトは解析や後述のカスタムパネルの作成など Ampliseq システムでの NGS 解析に必要な作業がほぼできるようになっています。なお、当ラボで使用している Archer 社のサルコーマパネルは Ampliseq ではないので、このシステムは使えません。Archer 社の提供する解析アプリを使用しています。それぞれのメーカーやキットで解析の仕方は異なりますがシーケンスの一次解析で生成

される「Fastq」ファイルはどのアプリケーションでも機器が対応している限りは共通です。Fastq ファイルを DNA amplicon にアップロードし、生成されたファイルから、それぞれのサンプルの report をチェックします。これによって個々のサンプルがどの程度読めたか、シーケンス解析が有効にできたかを確認します。レポートからリード数、有効に読めたリードの割合、カバレッジなどが確認できます。



DNA Amplicon Sequencing Report illumina

**Sample Information**

Sample ID	Total PF Reads	Percent Q30 Bases	Percent On-target Aligned Reads	Autosome Call Rate
N-DNA-1	1,005,782	96.00%	99.28%	99.85%

**Amplicon Summary**

Manifest	Number of Amplicon Regions	Total Length of Target Regions
CancerHotSpot-v2.dna_manifest.20180509.txt	207	22,027 bp

The number of amplicon regions and total length do not include the expected off-target regions that are included in the read and base level statistics.

**Read Level Statistics**

Read	Total Aligned Reads	Percent Aligned Reads
1	463,447	92.16%
2	463,486	92.16%

**Base Level Statistics**

Read	Percent Q30 Bases	Total Aligned Bases	Percent Aligned Bases	Percent Mismatches
1	95.81%	47,773,307	62.91%	0.25%
2	96.19%	47,792,746	62.94%	0.24%

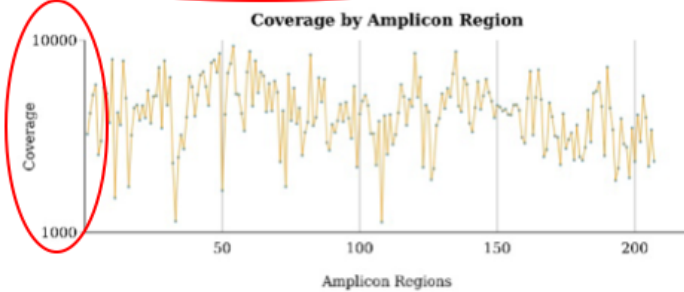
The values for aligned bases exclude bases aligning to the probe sequences.

DNA Amplicon Sequencing Report illumina

**Coverage Summary**

Amplicon Mean Coverage	Uniformity of Coverage (Pct > 0.2*mean)
4445.9	100.00%

**Coverage by Amplicon Region**



Amplicon regions which do not include expected off-targets with coverage values of less than the low coverage threshold (0.2 \* amplicon mean coverage) are highlighted in red. The low coverage threshold is marked by the horizontal red line. The moving average of all coverage values is shown by the orange line. Coverage values for each amplicon (including expected off-targets) can be found in the N-DNA-1\_S2.coverage.csv file.

5%の頻度の体細胞変異の検出には **x500以上**のCoverageが得られていることが必要とされている。

**Coverage depth**

標的領域がどれくらいの厚みで読めたかの指標

**500以上**が推奨

Cancer hot spot V2の場合、癌体細胞変異のMean coverageは2,500~3,300程度と推奨されている。

**Coverage uniformity**

標的領域が均一な厚さで読めたかの指標

**95%以上**が推奨

## 6.7 シークエンスデータのアノテーション解析(DNA amplicon)

個々のシーケンスデータが十分読み取れたことを確認できたら次はスタンドアローンで解析できる Variant Studio (Illumina 社)を使って解析します。このソフトは Windows にインストールして使用できるアプリケーションソフトで、一般的な変異データベースと比較解析できます。ここに DNA amplicon で生成された「vcf.gz」ファイルを BaseSpace 上の DNA amplicon のデータからダウンロードし、Variant Studio にインポートします。

取り込んだデータをアノテーション解析し、Excel ファイルとして出力します。その結果を再度リード数などをチェックした上で、バリエントが有効かどうかを判定します。アノテーション解析で 5%未満の頻度はあらかじめ拾わないように設定するので、前述のシーケンスクオリティーが十分達成できていれば、ほぼ全てのバリエントは有効として読み取ることができます。

バリエントの判定はまずエクソン領域に見られる塩基置換、欠失、挿入が対象になります。アミノ酸置換を伴う missense variant が代表的ですが、小さな欠失や挿入はこの解析で検出することができます。

### DNA遺伝子変異・小さな欠失・挿入のアノテーション解析

The image shows a workflow for variant analysis. It starts with a box for 'DNA Amplicon' (Illumina, Inc. Targeted Sequencing, V...) with the text 'DNA Ampliconで参照配列とのアラインメントを終えたデータ (データ解析)'. This leads to 'Variant Studio' (GAGC CATAC) with the text 'Variant Studioでアラインメントされたバリエントデータをアノテーション解析'. The main part of the image is a screenshot of the Variant Studio application window. The window has a menu bar with 'メニューバー' and a toolbar. Below the toolbar is a table with columns: Gene, Variant, Chr, Coordinate, Classification, Type, Gen... (Genotype), G... (Quality), Inherited, Alt, Variant, Alt, Alt, Alt, Custom. A red box highlights the table area with the label 'バリエントテーブル'. On the left side of the window, there is a 'フィルター' (Filter) button and a 'フィルター履歴' (Filter History) button at the bottom.

VariantStudio v3.0で参照されるデータベース

データベース	
VEP (Ensembl)	Version 84
dbSNP(NCBI)	Version 147
COSMIC	Version 77
ClinVar	Version July 5, 2016



## 7. 病理組織診断に役立つパネルの企画デザイン

各 NGS 取扱メーカーから既に出来上がった便利なパネルが商品として出されているので、まずは比較的安価な規模の小さいパネルから使ってみることが NGS との触れ合いとしていいきっかけにはなります。しかし、これらは安価といっても決して気楽に使えるものでもありません。できれば免疫組織化学染色のセットのようにある程度決まったパターンでの遺伝子解析が小規模でできる方がコストパフォーマンス的にもありがたいので、慣れてきたらカスタムパネルを作成して品揃えしておくことも病理診断医として利用価値が上がるのが期待できます。

### 7.1 カスタムパネルを作る前に知っておくべきこと

カスタムパネルを作るといってもその組み合わせはできれば限定的にならないほうが使いやすさは増します。そのようなことから、作る側、利用する側すなわち診断医としてのどのようなものか、を想定しながら組み立てていきます。一番のポイントはターゲットとなる遺伝子を何にするかです。

作る側としては、

- ① なるべく低コストで作りたい(アンプリコン数、すなわちプライマーセットの数を少なくしたい)
- ② 遺伝子の数は少なく設定したいが過不足なく作りたい
- ③ 複数の腫瘍に共通するパネルにできればありがたい

ということが、利用する側としては、

- ① 情報量は多い方がいい
- ② できるだけカバレッジが高い方がいい(遺伝子検索領域に漏れないようにする)
- ③ 疾患特異的なものは落としてほしくない
- ④ エビデンスにあったものがみたい

ということが経験的には希望するところと考えられます。

まず作りやすさから考えると、できるだけ疾患に合わせたパネルにすればコンパクトなパネルにできるので、臓器を対象にデザインしてみることがスムーズな企画になります。参照するデータは基本的に「ユーザーの希望」ではありますが、そうは言っても十分網羅できなかつたり、実際に何をしたいかを考えるだけでも大変です。そこで、実際には日本癌治療学会・日本癌学会・日本臨床腫瘍学会の三学会が作成している種々のガイダンス資料を参考に組み立て、その中から適宜取捨選択をしながら組み立てていくほうが比較的簡単にデザインすることができます。



## 別表2 エビデンスレベル

別表2 エビデンスレベル(2017年8月21日時点のデータ)

遺伝子	発癌部位	がんの種類	エビデンスレベル	遺伝子	遺伝子	遺伝子	遺伝子
ABL1	発癌	慢性骨髄性白血病慢性リンパ性白血病	治療効果	1A	イマチニブ/ダサチニブ/ニロチニブ/チニチブ	感受性	NCCN Guidelines Chronic Myeloid Leukemia/Acute Lymphoblastic Leukemia
ABL1	V559L, E2556V, V298L, T315A, T315I, F317L, N273C	慢性骨髄性白血病慢性リンパ性白血病	治療効果	1B	イマチニブ/ダサチニブ/ニロチニブ/チニチブ	感受性	NCCN Guidelines Chronic Myeloid Leukemia
ABL2	発癌	急性リンパ性白血病	治療効果	3B	ダサチニブ	感受性	35207766
AC134	発癌	肺癌	治療効果	3		感受性	13494639
AKT1	発癌	急性白血病(T10)	治療効果	3A	AZD5363	感受性	2535323/28489509
AKT1	発癌	急性白血病(T10)	治療効果	3B	アロスタチン/PM1181阻害薬	感受性	1161146/123154726
AKT1	発癌	肺癌	治療効果	3A	シタラチニブ	感受性	1576661
AKT2	発癌	肺癌	治療効果	3B	エペロリムス	感受性	12683012
AKT2	発癌	肺癌	治療効果	3B	MK0756	感受性	16435144/4373
AKT3	発癌	急性白血病	治療効果	4		感受性	11813315
ALK	発癌	非小細胞肺癌	治療効果	1A	クリゾチニブ/レクタニブ/ロシニチブ	感受性	2372481/324870165/28501140
ALK	L1196M/G1209R/G1289A/G1290A	非小細胞肺癌	治療効果	2A	クリゾチニブ	感受性	28185914
ALK	発癌	肺癌	治療効果	3B	クリゾチニブ	感受性	1733210207/2639
ALK	発癌	肺癌	治療効果	3A	lorlatinib	感受性	2533115
ALK	発癌	肺癌	治療効果	3B	クリゾチニブ	感受性	14122046
ALK	発癌	肺癌	治療効果	3A	クリゾチニブ	感受性	14817827
ALK	発癌	肺癌	治療効果	3A	クリゾチニブ	感受性	2542346
ALK	発癌	肺癌	治療効果	3A	クリゾチニブ	感受性	2523869/2523666
ALK	発癌	肺癌	治療効果	2A	クリゾチニブ	感受性	23588171
APC	発癌	大腸がん	診断	1		ACMG SF v2.0/NCCN Guidelines Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal	大腸がん診断における遺伝子検査のガイドライン
APC	発癌	大腸がん	治療効果	3B	タンキラーゼ阻害薬	感受性	24440763
AR	WT47T/87A	前立腺がん	治療効果	3B	エンザルタミド	感受性	33779130/2463396/22400204
AR	F877L	前立腺がん	治療効果	3A	エンザルタミド	感受性	33779130
AR	L702H/T87A	前立腺がん	治療効果	3A	アピラリン/エンザルタミド	感受性	26437268
ARAF	発癌	非小細胞肺癌	治療効果	3B	ソラフィニブ	感受性	1436466
ARAF	発癌	肺癌	治療効果	3B	ベムラチニブ	感受性	24822861
ARID1A	発癌	肺癌	治療効果	3B	EZH2阻害薬	感受性	25881504
ARID1A	発癌	肺癌	治療効果	3B	ダサチニブ	感受性	21364964
ARID1A	発癌	肺癌	治療効果	3		感受性	25171192365/2617
ARID1A	発癌	肺癌	治療効果	3B	PI3K阻害薬	感受性	14374663
ARID1A	発癌	肺癌	治療効果	3		感受性	1252128
ATM	発癌	乳がん	診断	1		NCCN Guidelines Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian	生体組織系別変異
ATM	発癌	乳がん	治療効果	3B	olaparib	感受性	2515000
ATM	発癌	乳がん	治療効果	3A	ATR阻害薬	感受性	17642015/18448
ATM	発癌	乳がん	治療効果	3		感受性	25423555
ATK1	発癌	肺癌	治療効果	3B	votaparib	感受性	27148069
ATK1	発癌	肺癌	治療効果	3	エルロチニブ	感受性	22751068
BAPI1	発癌	急性骨髄性白血病	治療効果	3B	H3AC阻害薬/HDAC阻害薬/HDAC阻害薬	感受性	20238904/2288371/226437366
BAPI1	発癌	肺癌	治療効果	3		感受性	317977562/79263
BCDRL1	発癌	肺癌	治療効果	3A	ダサチニブ	感受性	2225641
BRIP1	発癌	乳がん	診断	1		ACMG SF v2.0/NCCN Guidelines Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal	生体組織系別変異
BRIP1	発癌	乳がん	治療効果	1A	ペムラフェニブ/ダサチニブ	感受性	12265308/2163905/22063011

## 7.2 カスタムパネル作成の実際

遺伝子をリストアップしたら、「igv」という遺伝子マッピングのフリーアプリケーションソフトを入手し、igvを使って参照配列(hg19)を元にプライマーをデザインします。これでFFPEの場合、150bp前後のアンプリコンを想定しながらエクソン領域を中心に(少しイントロンの部分も含みつつ)みたい領域を取り上げていきます。

遺伝子をリストアップしたら、プライマーを設計します。

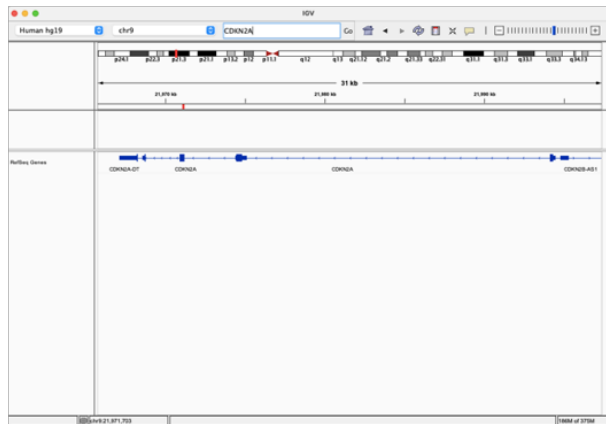


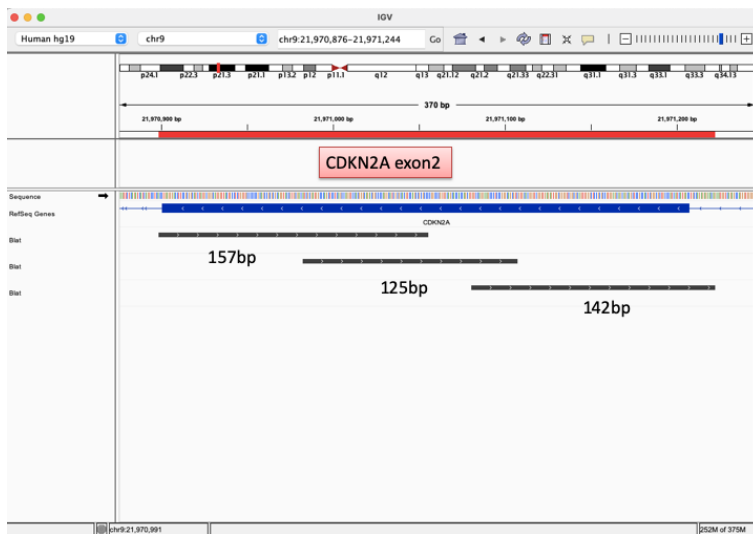
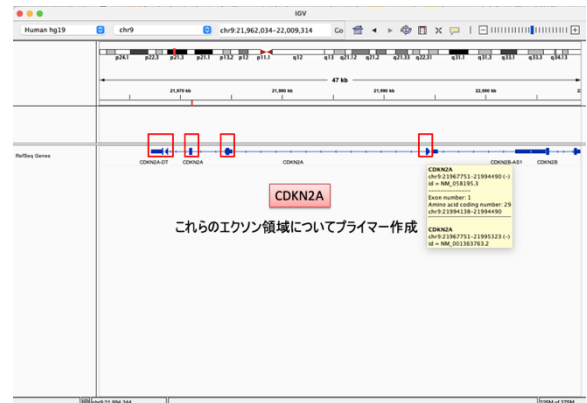
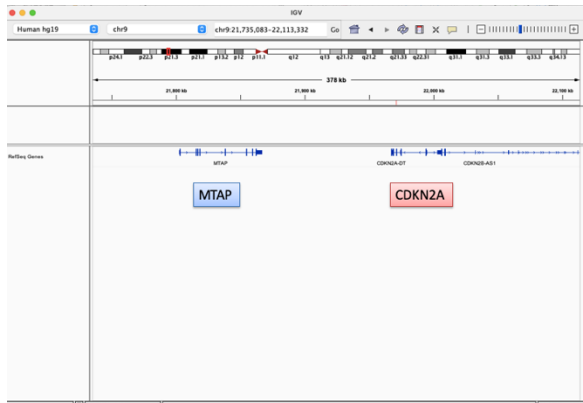
<https://software.broadinstitute.org/software/igv/download>

というフリーソフトをダウンロードし、これを使って1遺伝子ずつ作っていきます。

例

9p21-22の領域にある  
MTAP  
CDKN2A  
を検索





このデータをIlluminaのBasespace「Design studio」にアップロードして至適化されたプライマーをデザインします。

BLAT result for query sequence:  
ACCTGAGGGACCTTCGGCGGATCTATGCGGGCATGTTACTGCCTCTGGTGCCCCCGCAGCCGCGGCAGGTACCGTGCGACATCCGG

Click on a row to go to alignment

chr	start	end	strand	score	match	mis-match	rep. match	N's	Q gap co...	Q gap ba...	T gap co...	T gap ba...
chr9	21970898	21971053	+	1000	157	0	0	0	0	0	0	0
chr9	22006003	22006094	+	477	83	8	0	0	0	0	0	0

BLAT result for query sequence:  
ATCGCGATGGCCAGCTCCTCAGCCAGGTCCACGGGCAGACGGCCCCAGGCATCGCGCAGCTCCAGCCGCGCCCCGGCCCGGTGCAGCAC

Click on a row to go to alignment

chr	start	end	strand	score	match	mis-match	rep. match	N's	Q gap co...	Q gap ba...	T gap co...	T gap ba...
chr9	21970982	21971107	+	1000	125	0	0	0	0	0	0	0
chr9	22006022	22006146	+	896	118	6	0	0	0	0	0	0
chr20	62435806	62435826	+	160	20	0	0	0	0	0	0	0

BLAT result for query sequence:  
TGTCCAGGAAGCCCTCCCGGGCAGCGTCGTGCACGGTTCGGGTGAGAGTGGCGGGTTCGGCGAGTTGGGCTCCGCGCCGTGGAGCAGC

Click on a row to go to alignment

chr	start	end	strand	score	match	mis-match	rep. match	N's	Q gap co...	Q gap ba...	T gap co...	T gap ba...
chr9	21971080	21971222	+	1000	142	0	0	0	0	0	0	0
chr9	22006119	22006261	+	901	135	7	0	0	0	0	0	0
chr17	7251170	7251197	+	154	23	0	0	0	0	0	1	4

デザインした領域の情報を Excel ファイルにコピーし、テキストファイルに変換して Basespace の「Design Studio」にアップロードします。ここでカバレッジなどの条件を整えた形でプライマーがデザインされます。いくつか作成された候補パネルのアンプリコン数やカバレッジをチェックし、作成するパネルを決めて発注します。発注したカスタムパネルは1.5ヶ月から2ヶ月ほどかかって手元に届きます。

以下に使用する種々の資料を挙げます。



<https://software.broadinstitute.org/software/igv/download>

日本癌治療学会診療に関するガイドラインなど

<http://www.jSCO.or.jp/jpn/index/page/id/55>

次世代シーケンサー等を用いた遺伝子パネル検査に基づくがん診療ガイドランス 第2版

[http://www.jSCO.or.jp/jpn/user\\_data/upload/File/sequencer\\_ver2\\_200526.pdf](http://www.jSCO.or.jp/jpn/user_data/upload/File/sequencer_ver2_200526.pdf)

別表1エビデンス分類

[http://www.jSCO.or.jp/jpn/user\\_data/upload/File/55/sequencertable1.pdf](http://www.jSCO.or.jp/jpn/user_data/upload/File/55/sequencertable1.pdf)

別表2エビデンスレベル

[http://www.jSCO.or.jp/jpn/user\\_data/upload/File/55/sequencertable2.pdf](http://www.jSCO.or.jp/jpn/user_data/upload/File/55/sequencertable2.pdf)

別表3治療薬エビデンスレベル参考データベース

[http://www.jSCO.or.jp/jpn/user\\_data/upload/File/55/sequencertable3.pdf](http://www.jSCO.or.jp/jpn/user_data/upload/File/55/sequencertable3.pdf)

## (補足1) NGS の運用コスト

NGS を運用するにあたり、最も気になるコストですが、とにかくお金がかかります。でも使い始めると得られる情報のありがたさもあり、当ラボでは結構稼働しています。現時点でのおよそのコストを参考までに挙げておきます。

### [ハード面]

次世代シーケンサー:800 万円～2000 万円

Tapestation:600 万円

分光光度計:10 万円(キュベットタイプ)～150 万円(超微量)

サーマルサイクラー:50 万円～150 万円

リアルタイム PCR 装置:300 万円～500 万円

冷却遠心機:50 万円

ブロックインキュベーター:5 万円～10 万円

### 試薬(キット)のランニングコスト

#### AmpliSeq Cancer hot spot ver2

パネル	AmpliSeq Cancer hot spot ver2	(24 Reactions) 78,000円
ライブラリ調製キット	AmpliSeq Library PLUS for Illumina	(24 Reactions)372,000円 (96 Reactions) 1,230,000円
インデックス	AmpliSeq CD Indexes Set A for Illumina	(96 Indexes) 80,700円
カートリッジ	MiniSeq Mid Output Kit (300 Cycles)	(1run) 99,600円

合計金額:24検体ラン 630,300円  
1検体あたり26,263円 (23,576円; Library PLUSを96sample用にした時)

#### Fusionplex sarcoma panel

パネル込みライブラリ調製キット	Archer FusionPlex Sarcoma Kit	(8 Reactions) 382,800円
アダプター	Archer MBC Adapters A1-A8	12,800円
コントロール	PhiX Control v3	28,000円
カートリッジ	MiniSeq High Output Kit (150 Cycles)	(1run) 169,200円

合計金額:8検体ラン 564,000円  
1検体あたり70,500円

### カスタムパネルの値段

アンプリコン数	サンプル数		
	50～750	751～3,000	3,001～6,000
12-48	¥47,500	¥190,000	
96	¥95,000	¥380,000	
192	¥190,100	¥380,000	
384	¥380,200	¥760,400	
768	¥760,300	¥1,520,600	
1,536	¥1,520,600	¥3,041,200	
3,072	¥3,041,300	¥6,082,600	
6,144	¥6,082,600	¥12,165,200	
12,288	¥12,165,100	¥24,330,200	

アンプリコンの数が192以上であれば3000検体まで同じ価格

Miniseqのスペックも考慮し、300前後までになるよう調整しています。

(384アンプリコン:380,200円/3000samples)

ライブラリ調製キット	AmpliSeq Library PLUS for Illumina	(24 Reactions)372,000円 (96 Reactions) 1,230,000円
インデックス	AmpliSeq CD Indexes Set A for Illumina	(96 Indexes) 80,700円
カートリッジ	MiniSeq Mid Output Kit (300 Cycles)	(1run) 99,600円

(補足2) 現在運用中パネル

当ラボで運用しているパネルを紹介します。

次世代シーケンサー-MiniSeq (Illumina社) を用いた  
癌パネル解析

使用パネル : Ampliseq Cancer hot spot Ver2 (Illumina社)  
Fusionplex sarcoma panel (Archer社)

DNAベース

DNA遺伝子変異  
(癌関連遺伝子50種類のhot spot)

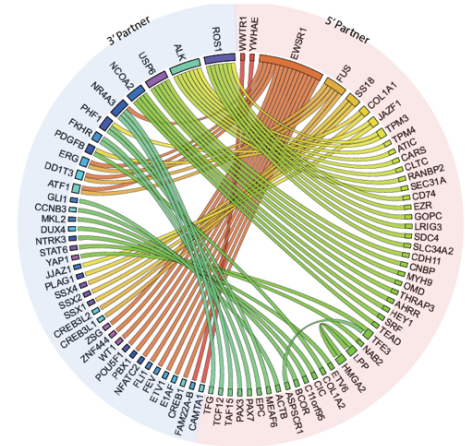
DNA pool				
ABL1	EGFR	GNAQ	KRAS	PTPN11
AKT1	ERBB2	GNAS	MET	RB1
ALK	ERBB4	HNF1A	MLH1	RET
APC	EZH2	HRAS	MPL	SMAD4
ATM	FBXW7	IDH1	NOTCH1	SMARCB1
BRAF	FGFR1	IDH2	NPM1	SMO
CDH1	FGFR2	JAK2	NRAS	SRC
CDKN2A	FGFR3	JAK3	PDGFRA	STK11
CSF1R	FLT3	KDR	PIK3CA	TP53
CTNNB1	GNA11	KIT	PTEN	VHL

RNAベース

RNA融合遺伝子  
(肉腫関連遺伝子26種類)

RNA pool		
ALK	JAZF1	TAF15
CAMTA1	MEAF6	TCF12
CCNB3	MKL2	TFE3
CIC	NCOA2	TFG
EPC1	NTRK3	USP6
EWSR1	PDGFB	YWHAE
FOXO1	PLAG1	
FUS	ROS1	
GLI1	SS18	
HMG2A	STAT6	

Sarcoma Fusion Map



AmpliSeq Custom RNA Fusion Panel (Illumina社)

肺癌パネル”Fusion”  
融合遺伝子[Panel Fusion]

RNAベース

RNA pool
Fusion Drivers
ALK
BRAF
ERBB4
NRG1
NTRK1
RET
ROS1

Original Design Name	Dr Fujii RNA
Design ID	181396
Assay Version	AmpliSeq RNA Fusion
Species	Homo sapiens (hg19)
Solution ID	IAA21714_1
Max Amplicon Length	203
Mean Amplicon Length	138
Median Amplicon Length	139
Min Amplicon Length	88
Number of Amplicons	242
Number of Amplicons per pool	[117,125]
Number of Pools	2
Number of Oligos	288
Fusion Targets	223
Expression Targets	19

\*Fusion partnerはAll settingでplanning

遺伝子と融合パートナー

Gene	ROS1	RET	NTRK1	NRG1	ERBB4	BRAF	ALK
CCDC6	AFAP1	CD74	CD74	EZR	AGK	PTPN3	
CD74	AKAP13	CEL	SLC3A2		AGTRAP	C2orf44	
CEP85L	CCDC6	MIRS48F1			AKAP9	CLIP4	
EZR	CUX1	MPRIP			CDC27	CLTC	
GOPC	ERC1	NFASC			CLCN6	EML4	
LRI3	ERC1_ELKS	TFG			FAM131B	FN1	
SDC4	FKBP15	TPR			FCHSD1	HIP1	
SLC34A2	GOLGA5_PTC5	SQSTM1			GNAI1	KIF5B	
TFG	HOOK3	SSBP2			KCTD7	KLC1	
TPM3	KIAA1468	TFG			KIAA1549	MSN	
KIF5B	TPM3				MACF1	MYH9	
fusion partner	KTN1	TPR			MAD11L	NCOA1	
	NCOA4				MKRN1	NPM1	
	PARG				NUDCD3	PPFBP1	
	PCM1				PAPSS1	PRKAR1A	
	PCM1_PTC4				PLIN3	RNF213	
	PRKAR1A				POR	SQSTM1	
	NCOA4				RNF130	TFG	
	TRIM33				SLC45A3	TPM1	
	TBL1XR1				SND1	TPM3	
	TRIM24				SOX6	TPM4	
	TRIM27				TAX1BP1	TPR	
	TRIM33				TRIM24	VCL	
	TRIM33_PTC7				ZKSCAN5		

AmpliSeq for Illumina Custom DNA Panel (Illumina社)

肺癌パネル”遺伝子変異” 19遺伝子

DNA遺伝子変異 (hot spot)

	Panel 1	Panel 2	Panel 3	Panel 4
	EGFR	POLE	EP300	KEAP1
	MET	STK11	NFE2L2	IGF1R
	KRAS	DDR2	MAP2K1	CREBBP
Panel gene	ROS1		ERBB3	
	ERBB2		AXL	
	ALK			
	RET			
	BRAF			

AmpliSeq for Illumina Custom DNA Panel (Illumina社)

グリオーマパネル”遺伝子変異とCNV”

DNA遺伝子 変異 (hot spot) ・ 増減 (copy number variation:CNV)

	Glioma panel
	H3F3A
	HIST1H3B
	HISTH3C
	ATRX
	TERT
	NF2
Panel gene	NF1
	MDM2
	PIK3CA
	PTEN
	RB1
	TP53
	IDH1
	IDH2
	SMARCB1

## AmpliSeq for Illumina Custom DNA Panel (Illumina社)

DNA遺伝子増減 (copy number variation:CNV)

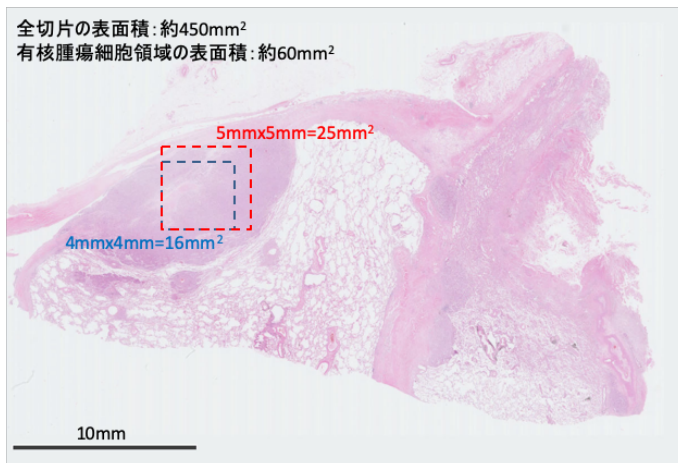
	CNV panel
Panel gene	CDK4
	MDM2
	ERBB2
	CDKN2A
	MDM4
	MYC
	MYCN

### Planning

非腫瘍をベースラインにして遺伝子のGain とLossを解析  
アンプリコンベースの解析なので、Gainの方が得意

(補足3) 病理遺伝子解析のミニ知識

役にたつかどうかわかりませんが、遺伝子用語の代表的なものなどを挙げました。



## 塩基置換

Single nucleotide variation (SNV)

**ミスセンス変異** アミノ酸置換が起こる

例) TP53 A 161 T 一塩基置換の結果、  
遺伝子名 161番目のアミノ酸アラニン(A)がスレオニン(T)に置換

**ナンセンス変異** アミノ酸が終止コドンに置換される

例) CDKN2A E 61 \* 一塩基置換の結果、  
遺伝子名 61番目のアミノ酸グルタミン酸(E)が終止コドンに置換

## 塩基欠失

Deletion (del)

**インフレーム変異** 塩基が3xn個欠失することで、アミノ酸がn個欠失する

例) FGFR1 p.D166del ; c.495-497 del (GAT GAC/GAC)  
遺伝子名  
495-497番目の3塩基欠失の結果、  
166番目のアミノ酸アスパラギン酸(D)が欠失

**フレームシフト変異** 塩基が3xn-1 あるいは3xn-2個欠失することで、  
それ以降のアミノ酸配列が大きく変わる

例) CDKN2A p. LHGA65-68del (LHGA/X) ; c.500-509 del (CTC CAC GGC GCG/CG)  
500-509番目の3塩基欠失の結果、  
65-68番目のアミノ酸が欠失し、かつ以降は元の配列とは全く違うアミノ酸配列となる

## 塩基挿入

Insertion (ins)

### インフレーム変異

塩基が3xn個挿入することで、アミノ酸がn個挿入される

例) *ERBB2* p.A775\_G776insYVMA ; c.2324\_2325insATACGTGATGGC

遺伝子名

2324-2325番目の間にATACGTGATGGCが挿入した結果、  
775-776番目のアミノ酸の間に4つのアミノ酸が挿入

### フレームシフト変異

塩基が3xn-1あるいは3xn-2個挿入することで、  
それ以降のアミノ酸配列が大きく変わる

例) *PTEN* p.T319fs \*6; c.955\_956insA

955-956番目の間にAが挿入した結果、  
319番目以降のアミノ酸配列がフレームシフトにより変異し、そこから6番目のコドンが  
終止コドンに変わった

## 塩基欠失と挿入の組み合わせ

Deletion and Insertion (delins)

例) *EGFR* p.E746\_A750delinsI; c.2238\_2250delinsATT

DNAの2238-2250番の塩基が欠失し、その部位に塩基ATTが挿入した結果、  
コドンの746-750番のアミノ酸が欠失しその部位にイソロシン(I)が挿入

## 塩基の重複

Duplication (dup)

例) *APC* p.R414Tfs \*5 ; c.1239dupA

DNAの1239番の塩基が重複し、414番のアミノ酸以降フレームシフトにより新たなアミノ酸配列に置換され、かつそこから5番目のコドンが終止コドンに変異

## 遺伝子増幅・欠失

Amplification and loss

例) *CDK4* amplification CDK4遺伝子が増幅

例) *CDKN2A* loss CDKN2A遺伝子が欠失

\*これらはNGSではcopy number variation (CNV)として検出する。

欠点: PCR法を原理としているため、既存の正常遺伝子とともに検出されることから  
コントロール(増幅・欠失のない非腫瘍組織)との相対的比較による評価となる

## 遺伝子融合/染色体転座

Fusion/ translocation

例) *SLC34A2-ROS1* fusion t(4;6); (S4; R32) or (S4; R34)

4番染色体と6番染色体の転座によりSLC34A2遺伝子とROS1遺伝子の  
遺伝子融合が生じた。  
切断点はSLC34A2のexon4およびROS1のExon32または34である。

\* 融合遺伝子はRNAを抽出し、cDNAを合成してキメラ遺伝子を検出する。  
多数の融合パートナーを想定する必要がある。

(補足4) 当ラボでの受託解析

AmpliSeq NGS DNA Panel			
項目		単位	料金
核酸準備	DNA抽出	1サンプル	10,000円
	TapeStation (核酸品質check)	1サンプル	10,000円
Library調整+NGS	AmpliSeq NGS DNA Panel	1パネル	40,000円

AmpliSeq NGS RNA Panel			
項目		単位	料金
核酸準備	RNA抽出	1サンプル	10,000円
	TapeStation (核酸品質check)	1サンプル	10,000円
	RT (cDNA合成)	1サンプル	10,000円
Library調整+NGS	AmpliSeq NGS RNA Panel [Lung Fusion]	1パネル	40,000円

Archer NGS Sarcoma Panel			
項目		単位	料金
核酸準備	RNA抽出	1サンプル	10,000円
	TapeStation (核酸品質check)	1サンプル	10,000円
Library調整+NGS	Archer NGS Sarcoma Panel [Sarcoma]	1パネル	80,000円

2021年7月作成

企画・作成

奈良県立医科大学 病理診断学講座

藤井智美、大林千穂

作成協力

奈良県立医科大学 病理診断学講座

武田麻衣子、伊丹弘恵、森田剛平、内山智子、佐々木翔、杉本澄美玲、新田勇治、岡田文美、  
寺田智代子、前防克也、杉本文