

ジョルジュ・フランソワ・ルクレールがんセンターにおける RNA-シーケンシング および DNA-シーケンシングの課題への対応

Agilent SureSelect XT HS2 RNA キットと Agilent SureDesign ソフトウェアによって開発されたカスタムパネルが、臨床研究およびトランスレーショナルリサーチラボがホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）サンプルでの遺伝子融合解析を前進させるのに役立ちました。

貴重な FFPE 腫瘍サンプルから高い信頼性で遺伝子融合を検出可能なデータを取得することは困難となる場合がありますが、フランスのディジョンにあるジョルジュ・フランソワ・ルクレールがんセンター（CGFL）の臨床科学者たちは、このようなデータを取得するための優れたメソッドを確立しました。CGFL の腫瘍生物学・病理学部門に属する分子生物学ラボは、臨床研究・トランスレーショナルリサーチと開発、シーケンシングコアサービス、分子診断に注力しています。体細胞遺伝学、体質性遺伝学、分子生物学ラボの責任者を務める Romain Boidot 博士、およびラボ副部長の Sandy Chevrier, M.S. は、DNA-シーケンシングと RNA-シーケンシング両方を対象に、複数のカスタムパネルを開発しました。さらに、Boidot 博士と Chevrier 氏のチームは、このプロセスを通じて、ラボワークフローを最適化し、シーケンス深度を改善し、サンプルスループットを向上させ、解析ターンアラウンドタイムを短縮しました。

癌の特定を促進するカスタムパネルデザイン

臨床研究者たちは、固形腫瘍の体細胞遺伝学を調査するために、CGFL および Gyneco と呼ばれる、DNA-シーケンシング向けの 2 つのパネルを作成しました。CGFL は、肺癌、大腸癌、黒色腫、消化管原癌（GIST）のターゲット遺伝子を解析するためにデザインされています。Gyneco は、卵巣癌、乳癌、子宮内膜癌、前立腺癌の研究を目的としています。これらのパネルは、FFPE 腫瘍サンプル、血漿（cell-free DNA）、脳脊髄液、胸水など、多数のサンプルタイプから取得した DNA に使用されます。

チームはさらに、FFPE 腫瘍サンプルのターゲット RNA-シーケンシングを対象に 2 つのカスタムパネルも作成しました。一方のパネルは Theranostics（therapy と diagnostics を融合した語）上の目的を支援するために遺伝子融合を特定するもので、もう一方のパネルには肉腫の分類に関するマーカーが含まれています。体質性遺伝学の研究では、全血から抽出した DNA を解析するために、チームは 30 の遺伝子をベースに 1 つのパネルをデザインしました。このデザインは乳癌、卵巣癌、消化管癌、前立腺癌の素因をスクリーニングするために使われます。

分子生物学ラボでは、FFPE 腫瘍、新鮮な免疫細胞、ヒト癌細胞、マウス癌細胞など、1 年あたり約 3,000 のサンプルのシーケンスを行っています。しかしラボでは、ルーチンの DNA-Seq および RNA-Seq に留まらず、その他のゲノミクスサービスも提供しています。Boidot 博士は、「DNA シーケンシングコアをサポートし、6 年以上にわたり腫瘍および血液サンプルの全エクソームシーケンス（WES）を日常的に行っています」と、説明しています。シーケンシングサービスの一環として、ラボでは total RNA-シーケンシングと WES も実施しており、その数は年間数百サンプルに及びます。平行して、臨床科学者らは、いくつかの ChIP-シーケンシングおよび small RNA-Seq の実験も手掛けています。単一細胞 3' RNA-Seq や Methyl-Seq を行うこともあります。



Romain Boidot 博士
遺伝学および
分子生物学ラボ責任者



Sandy Chevrier
ラボ副部長

貴重な RNA を維持し、迅速なレポート作成を実現

ジョルジュ・フランソワ・ルクレールがんセンターには、遺伝子融合解析のために、多数の病理学ラボから FFPE 微小生検組織サンプルが届きます。これらのラボはそれぞれ独自の組織調製プロセスを使用しており、それがサンプル品質のばらつきの原因となっています。さらに、FFPE 組織サンプルの前処理におけるホルマリン固定とパラフィン包埋プロセスが核酸分解につながります。このように非常に小さなサンプルから信頼性の高い遺伝子融合のデータを確保することは、技術上の大きな課題となっています。「私たちの方針は、RNA の品質にかかわらず、すべてのサンプルを検査することです。RNA 品質のばらつきは、無効な結果を最小限に抑制するために対処する必要がある、もう 1 つの重要な制約なのです」と、Chevrier 氏は述べています。

ライブラリ失敗率の 15 ~ 20 % は RNA 品質のばらつきによるもので、このようなばらつきによって、Illumina High Output キット (150 サイクルカートリッジ) でマルチプレックスされたのは 6 サンプルのみと、マルチプレックス性能が制限されています。研究チームはこのようなパラメータを改善したいと考え、現在のワークフローを検討するためにアジレントのテクニカルサポートに問い合わせました。アジレントのフィールドアプリケーションサイエンティストは、その優れた融合トランスクリプト検出機能のために、SureSelect XT HS2 RNA キットを推奨しました。

CGFL チームは、Agilent SureDesign と組み合わせた SureSelect XT HS2 RNA キットでカスタムパネルを作成し、20 の遺伝子の解析を対象に、カスタムのキャプチャベースパネルを開発することに成功しました。テクニカルサポートチームはまた、Boidot 博士と Chevrier 氏がパネルを改善するのを支援しました。「すべての検査対象のサンプルに対し、ライブラリ調製プロセスを最適化することができました。それにより、バリデーションを無事に完了させることができました」と Chevrier 氏は語りました。

最適化されたプロセスにより、主要なシーケンシング品質指標が改善されました。Chevrier 氏はさらに、「この技術のおかげで、シーケンス深度を向上させ、サンプルあたりのシーケンシングデータの総量を低減できました」と、説明しています。現在は、Illumina NextSeq 500 Mid Output キット (300 サイクルカートリッジ) で最大 24 のサンプルをマルチプレックスしており、ライブラリ失敗率は 5 %未満にまで低減されました。このような理由から、ラボでは、すべてのルーチンターゲット RNA-Seq アプリケーションのために、SureSelect XT HS2 RNA キットを使用しています。

データが生成されると、ラボや部門のニーズに対応するために、短期間のうちにレポートを届けるする必要があります。「したがって、もとのサンプルの品質にかかわらず、迅速なターンアラウンドタイムを実現する、堅牢性と信頼性に優れた解析プロセスが必要となります」と、Boidot 博士は述べています。ターゲットシーケンシングを用いて生成される遺伝子融合のデータの高い品質と精度により、期待されるタイムラインに対応しやすくなります。「以前の技術はディープな全トランスクリプトーム解析でした。この手法はあたらしい発見のためには興味深いものですが、ターゲット RNA シーケンシングと比較した場合のコストと感度不足の可能性により、診断ソリューションの開発においてはかならずしも優れていません」と、Boidot 博士は説明しています。

今後の展望

RNA-シーケンシングで成果を得られたことから、CGFL チームはすでに、体質性因子の研究のために SureSelect XT HS2 DNA キットの使用を拡大しています。Boidot 博士は次のように述べています。「このキットは、DNA サンプルの品質にかかわらず、さらに堅牢なパネルを開発するのに役立つでしょう」

ラボでは、ライブラリ調整のために、Agilent SureSelect XT パネルから SureSelect XT HS2 DNA キットへ、現在の CGFL および Gyneco DNA パネルのアップグレードを計画しています。Agilent SureSelect All Exon V6 と SureSelect XT ライブラリ調製キットから、Agilent SureSelect All Exon V8 と SureSelect XT HS2 ライブラリ調製キットの組み合わせへ移行する予定です。「これにより、すべての用途のために、同一の最新技術を使用することができます」と、Boidot 博士は語りました。

彼らのゲノミクスの検査手法をアップグレードし最適化する取り組みを通じて、CGFL 分子生物学ラボのチームは目標を達成しています。例えば、貴重な FFPE サンプルからの高い信頼性の融合データの取得、シーケンス深度の改善、サンプルスループットの向上、解析時間の短縮などです。Boidot 博士や Chevrier 氏などの臨床ラボ科学者らのおかげで、ジョルジュ・フランソワ・ルクレールがんセンターの顧客たちは、迅速に生成される、堅牢性の高いゲノミクスレポートに日常的に頼ることができます。

お問い合わせ窓口

アジレント・テクノロジー株式会社

本社 / 〒192-8510 東京都八王子市高倉町9-1

●カスタムコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

mail : email_japan@agilent.com

※仕様は予告なく変更する場合があります。

※本資料掲載の製品はすべて試験研究用です。

診断目的にご利用いただくことはできません。

G230510

<http://www.agilent.com/chem/genomics:jp>

© Agilent Technologies, Inc. 2022

本書の一部または全部を書面による事前の許可なしに複製、改変、翻訳することは、著作権法で認められている場合を除き、法律で禁止されています。

Printed in Japan, September 1, 2022

5994-5192JAJP