

非小細胞肺癌 (NSCLC) FFPE サンプルからの バリエントコールに関するターゲット RNA シーケンシングワークフローの評価

背景および概要

腫瘍学の分野では、多くの研究機関がゲノムの突然変異解析にとどまらず、よりダイナミックなバイオマーカーを探索しています。腫瘍由来サンプルの分子解析に関する RNA ベースのワークフローと解析ソリューションとを組み合わせることで、非小細胞肺癌 (NSCLC) における腫瘍生物学についての理解を深めることができます。

患者から採取される典型的な生検検体は通常、分子検査用の材料として非常に限られた量しかありません。結果を改善するには、限られた試料で徹底的な特性評価を行うことが極めて重要です。

ベルギーのヘントにあるメディカルセンター AZ Sint-Lucas では、分子生物学者である Koen Jacobs 博士と Katrin De Mulder 博士が、RNA ベースのワークフローを開発することにより、NSCLC サンプルの分子解析の改善に取り組んでいます。フィージビリティスタディでは、彼らの研究室において Twist の RNA 解析ソリューションがレトロスペクティブに評価されました。ほとんどのサンプルは、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) ブロックとして入手した腫瘍組織の切除片であり、組織学的解析には理想的なサンプルタイプですが、遺伝物質が分解されていたり、高度に架橋されていたりする場合があります。分子解析には課題となることが多いサンプルです。さらに、利用可能な組織の量は限られていることが多く、NGS ワークフローで使用する可能性が低くなります^{1,2}。全体として、こうした固定検体を用いた NGS 解析が困難であることから、NSCLC は課題の多いケースとなっています³。そのため、RNA シーケンシングワークフローは、サンプルのインプット量が少なくても対応可能で、かつ、予想されるバリエントと予想外のバリエントがいずれも高感度で発見できるものである必要があります。

AZ Sint-Lucas の研究チームには、研究室で実施するソリューションに関して重要な要件がいくつかありました。第一に最も重要なこととして、誤った結論につながりうるアーチファクトがシーケンシングデータへ混入することを最小限に抑えるライブラリ調製方法が必要でした。第二に、低発現遺伝子を頑健に検出する必要があります。場合によっては、正常細胞と比較して腫瘍細胞の割合が低いサンプルをテストするため、低発現遺伝子を高感度に検出して腫瘍の遺伝子発現プロファイルの解析能を全体的に高める必要があります。最後に、彼らが求めていたソリューションは、予想する遺伝的変異の検出だけでなく、選択的スプライシングイベントや新規の融合遺伝子バリエントといった新規の変化も同定可能である必要がありました。

推薦のことは

「トランスクリプトームでは、DNA の「静的な」性質とは対照的に、腫瘍細胞の実際の生物学的状態に迫ることができます。遺伝子発現、フュージョン検出、バリエントコール、腫瘍シグネチャーなどの同時解析が、1回のライブラリ調製と 3～5 枚の FFPE 組織切片からスタートできるため、この RNA エクソームキットは、臨床ルーチンへの導入が将来的に見込まれる有望なアッセイとなっています」

*Koen Jacobs, 分子生物学者,
AZ Sint-Lucas Ghent*

RNA-SEQ 解析のワークフローおよび方法

カスタム RNA パネルデザインによるターゲットエンリッチメント

Twist のターゲット RNA ワークフローは、AZ Sint-Lucas の研究室によって定義されたターゲットに基づく Twist カスタム RNA ターゲットエンリッチメントパネルを用いて評価されました。カスタム RNA パネルは「RNA-O」と命名され、NSCLC に関連する 272 種のがん関連遺伝子をターゲットとしています (表 1)。カスタム RNA パネルのデザインはコーディング領域をターゲットとしているため、遺伝子プロモーターや非転写領域に位置する一部の PGx バリエーションなど、RNA に発現されない領域は検出できないと予想されます。この RNA パネルには、エクソン接合部にプローブ配置を避ける Twist の新しい「Exon-Aware デザインストラテジー」が採用されています。この手法のメリットは、トランスクリプトームにおけるコーディング領域のターゲティングがより完全である点と、典型的に exon-exon 接合部で結合しているフュージョンの新規イベントをキャプチャできる点です。

Twist ターゲット RNA ワークフローのパフォーマンスを、AZ Sint-Lucas が NSCLC 腫瘍検体で日常的に使用している 2 つの独立したワークフローと比較しました。1 つ目は、腫瘍バリエーションのための DNA シーケンシングワークフローで、2 つ目はフュージョン検出に特異的な RNA ワークフローです。この評価では、腫瘍組織と正常組織由来の同じ FFPE サンプルのセットを用いて、NSCLC の DNA 解析 (バリエーションコール) と RNA 解析 (RNA フュージョン検出) のルーチン試験に代わる、単一の RNA ベースワークフローのフィジビリティを評価しました。

サンプルコホート

初回評価コホートには 32 個の FFPE サンプル (NSCLC サンプル 29 個と正常肺組織由来のサンプル 3 個) が含まれました。腫瘍サンプルは、様々なサンプル品質のもと、ミスセンス、インデル、CNV、融合遺伝子など、既知の重要なバリエーションの有無に基づいて選択されました。次に、シーケンシングの結果をルーチンの DNA および RNA シーケンシングの結果と比較し、バリエーションおよび融合転写産物の検出をそれぞれ評価しました。この比較は、DNA と RNA 両方のシーケンシングを含む複雑でリソースを多く消費するアプローチの代わりに、単一の RNA シーケンシングワークフローを使用することの実現可能性を評価することを目的としています。

パネルデザインの 特徴	RNA - 融合 パネル	TWIST カスタム 「RNA-O」 RNA パネル
対象遺伝子	84	272
MSI スクリーニング	N/A	39
染色体異常	N/A	1,921 SNP
プローブ数	7,279	10,123
デザインするターゲット 領域のサイズ	0.36 Mb	0.84 Mb

表 1: 本試験で使用する RNA パネルの特徴。当研究室ではルーチン検査において、DNA ベースのシーケンシングパネルとともに、融合特異的パネルを利用しています。「RNA-O」カスタムパネルは、バリエーション、MSI、染色体異常など、融合以外のトランスクリプトーム領域をターゲットとする、より広範なカバレッジを持っています。

ライブラリ調製

手短かに言えば、5 ミクロン厚の FFPE 薄片 (curl) 3 ~ 5 枚をトータル RNA 抽出処理しました。その後、すべての RNA サンプルを Twist RNA ライブラリ調製キットに含まれるオプションの FFPE 修復モジュールで処理したあと、5 時間以内に完了できる標準的な RNA ライブラリ調製プロトコルに進みました。RNA の完全性および抽出収量の概要を図 1 に示します。全体として、各サンプルは、TapeStation システム (Agilent) と Quantus (Promega) 蛍光測定による DV200 値と RNA 定量に基づき、広範な分解プロファイルと収量を示しました^{4,5}。

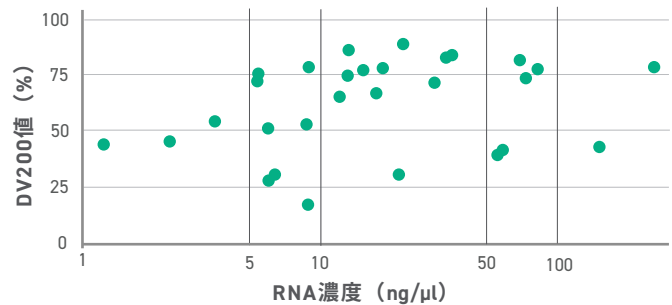


図 1. DV200 値に基づく様々な RNA 分解プロファイルを示す FFPE RNA 抽出コホート。DV200 の算出値が 70% 超のサンプルは高品質、50 ~ 70% は許容可能、30 ~ 50% は低品質と判断します (30% 未満は、NGS 解析には品質が低すぎるとされています)^{4,5}。

ターゲットエンリッチメントおよびシーケンシング

Twist の Standard Hyb v2 プロトコルにて「RNA-O」カスタム RNA パネルを用い、調製したライブラリの濃縮を一晩行ったのち、複数のシーケンシング・ランでシーケンシングして、DNA と RNA のシーケンシングを含むルーチンのワークフローとパフォーマンスを比較しました。すべてのシーケンシングデータを、データ処理およびバリエーションコールのためのカスタムパイプラインで処理し、そのパフォーマンスを同じ腫瘍検体から得られた過去のシーケンシング解析結果と比較しました。

RNA ワークフローの評価結果

Twist の RNA シーケンシングソリューションの評価にあたって、研究チームはルーチンの DNA と RNA のシーケンシングワークフローから得たベースラインのバリエーションおよびフュージョンコールを利用しました。重要な点として、ルーチンのワークフローではいずれも、バリエーションと融合転写産物の双方を単独では検出できなかったため、現在の技術に依存すると、RNA と DNA 両方のシーケンシングのために貴重なサンプルを使用する必要があります。Twist のカスタム RNA-O パネルでは、コーディングバリエーションと融合転写産物の両方を検出できることが証明されました。RNA-O で検出できなかったバリエーションは、コーディング領域外に存在するものだけであり、つまり RNA 転写産物に変換されなかったバリエーションでした。SMARCA4、KRAS、TP53、PIK3CA、MAP2K1、BRAF、RB1、ATM、POLE、ARID1A、SMAD4、MET など、いくつかの臨床的に重要な遺伝子でバリエーションが同定されました。さらに、2 つの EGFR エクソン 19 欠失および 1 つの EGFR エクソン 20 挿入などの転写産物バリエーションも含まれていました。特に、RNA-O を使用した場合に KEAP1 (c.1709-1G>T) のスプライシング部位バリエーションが検出されたことは、mRNA 前駆体がキャプチャされたことを示しています。

各バリエーションは、一塩基バリエーション (SNV) (n=37)、スプライシング部位バリエーション (SS) (n=1)、挿入または欠失 (INDEL) (n=4)、生殖細胞系列の遺伝薬理学的バリエーション (PG) (n=3)、遺伝子プロモーター変異 (GP) (n=2)、融合遺伝子 (F) (n=9) に分類されました。結果の要約を表 2 に示します。これらのバリエーションは、「RNA-O」で適切に検出された、いくつかの遺伝子に存在していました。融合遺伝子 (ALK、RET、MET エクソン 14 スキッピング、NTRK3、FGFR3) の検出も、カスタムパネルデザインとルーチンの DNA ワークフローの間で一致していました。

コーディング配列の遺伝薬理学的バリエーション (DPYD 1 つ、SLCO1B1 2 つ) については、3 つのうち 1 つのバリエーション (DPYD) のみが

RNA-O パネルで検出されました。しかし留意すべきことは、Human Protein Atlas⁶ で示されたように SLCO1B1 の RNA カバレッジが存在しない 2 つのサンプル組織では、SLCO1B1 が発現することが知られておらず、この遺伝子が肺内で通常発現することも知られていないので、この結果は正しくない可能性があります。2 つの遺伝子プロモーター変異が固形腫瘍 DNA パネル (TERT および UGT1A1) で検討されています。いずれのバリエーションもコーディング配列の一部ではないため、RNA-O パネルではこれらのバリエーションは検出できません。これは本パネルの限界のように見えるかもしれませんが、NSCLC における腫瘍プロファイリングの観点からは、プロモーターの変異は重要な臨床所見ではありません。また、プロモーターの変異情報は、遺伝子の異常な発現を推測するために利用されるのが普通です。RNA ベースの解析では、遺伝子自体の発現を測定し、プロモーター配列解析の代替マーカーとして利用することができます。全体として、Twist がデザインしたカスタム RNA パネルは、フュージョンイベントの検出など、様々なバリエーションクラスにわたる腫瘍関連のバリエーションコールに関して、ルーチンの DNA および RNA パネルと高度に一致しています。

変異検出およびフュージョンコールの両方のターゲットを含むカスタム RNA ターゲットエンリッチメントパネルの使用により、迅速かつ信頼性の高いシーケンシングワークフローが構築されます。すべてのコーディング遺伝子が含まれていて、シグネチャーの観点から腫瘍特異的発現パターンが同定できることを考慮すると、このアプローチは、追加の遺伝子バイオマーカーの検討に極めて適切で将来有望なアプローチです。

バリエーションクラス	ルーチンの試験		TWIST RNA 評価	バリエーションコールの一致
	DNA	RNA	カスタム RNA パネル (RNA-O)	
一塩基バリエーション (SNV)	37	N/A	37	37/37
スプライシング部位バリエーション (SS)	1	N/A	1	1/1
挿入/欠失 (INDEL)	4	N/A	4	4/4
生殖細胞系列の遺伝薬理学的バリエーション (PG)	3	N/A	1	1/3
遺伝子プロモーター変異 (GP)	2	N/A	N/A	0/2
融合バリエーション (F)	N/A	9	9	9/9

「N/A」は、各ワークフローが、これらのバリエーションをキャプチャまたはターゲットとするように設計されていないことを示しています。詳細については、本文を参照してください。

表 2: 一致率に関するサマリー指標: Twist Custom RNA エンリッチメントパネル vs. 標準的な DNA もしくは RNA シーケンシングの単独ルーチン試験。
RNA-O パネルを用いた Twist エンリッチメントワークフローは、ルーチンパネルでターゲットとされたバリエーションクラスとの一致を示しています。ルーチンの RNA 試験で検出された 9 つの既知の融合の検出指標については、RNA-O パネルデザインでは他のバリエーションクラスに加えて融合も検出することができました。

参考文献

- De Maglio, G. et al. The storm of NGS in NSCLC diagnostic-therapeutic pathway: How to sun the real clinical practice. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 169, 103561 (2022).
- Penault-Llorca, F. et al. Expert opinion on NSCLC small specimen biomarker testing — Part 1: Tissue collection and management. Virchows Arch. 481, 335-350 (2022).
- Arreaza, G. et al. Pre-Analytical Considerations for Successful Next-Generation Sequencing (NGS): Challenges and Opportunities for Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tumor Tissue (FFPE) Samples. Int. J. Mol. Sci. 17, 1579 (2016).
- Matsubara, T. et al. DV200 Index for Assessing RNA Integrity in Next-Generation Sequencing. Biomed Res. Int. 2020, 9349132 (2020).
- Evaluating RNA Quality from FFPE Samples. Illumina <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/evaluating-rna-quality-from-ffpe-samples-technical-note-470-2014-001.pdf> (2016).
- Thul, P. J. et al. A subcellular map of the human proteome. Science. 356, 6340 (2017).