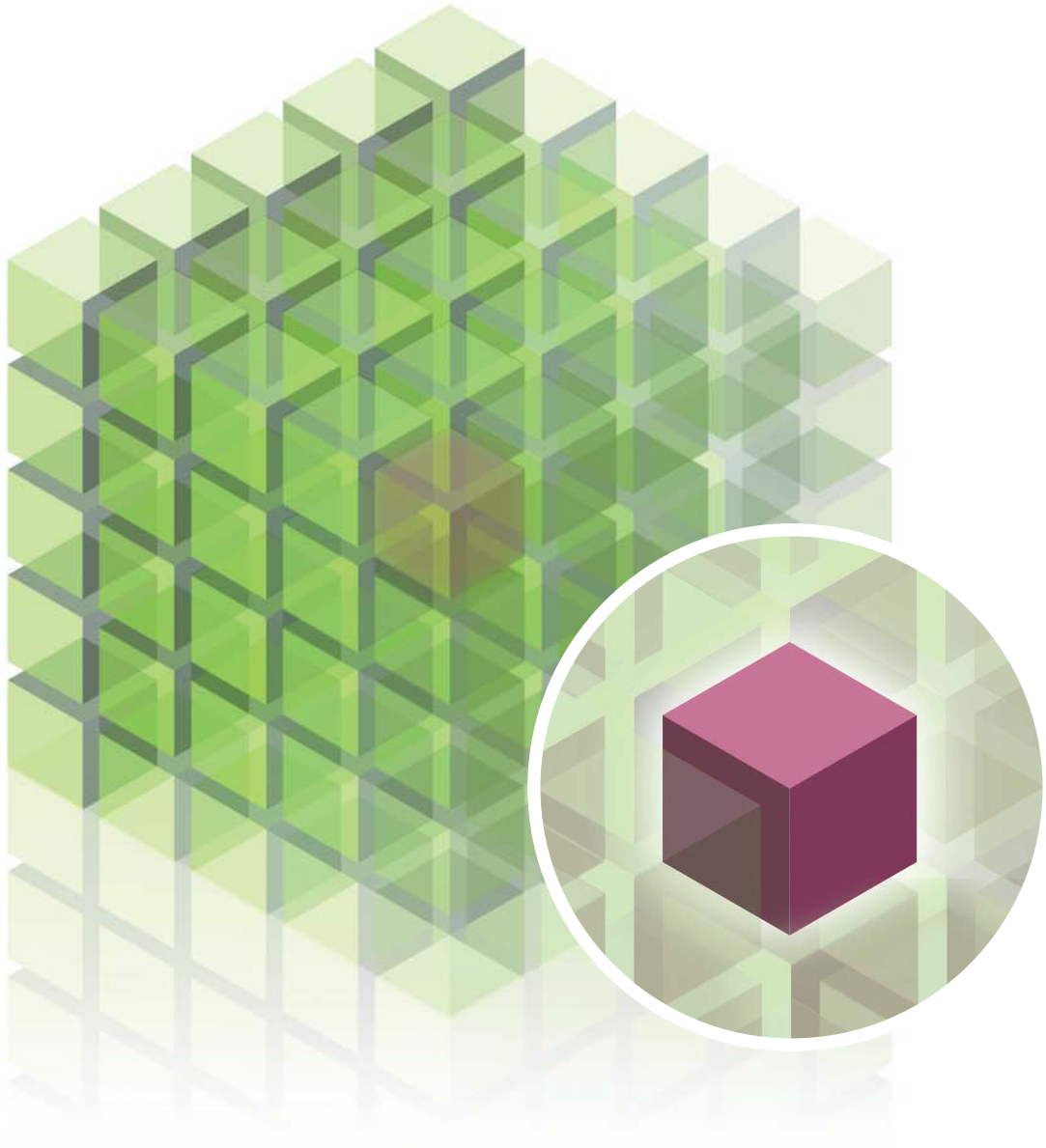
An Innovative NGS powering MRD assay



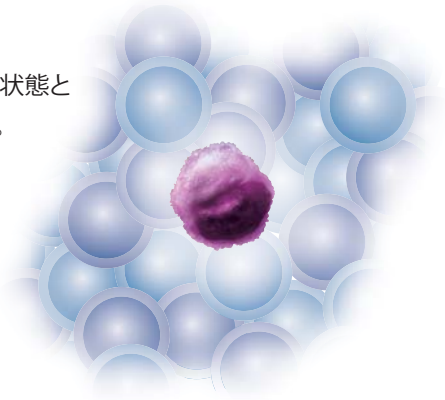
NGSを用いた微小残存病変解析　研究用

clonoSEQ® 受託解析サービス

rikengenesis　Adaptive biotechnologies™

微小残存病変解析サービス――clonoSEQ®

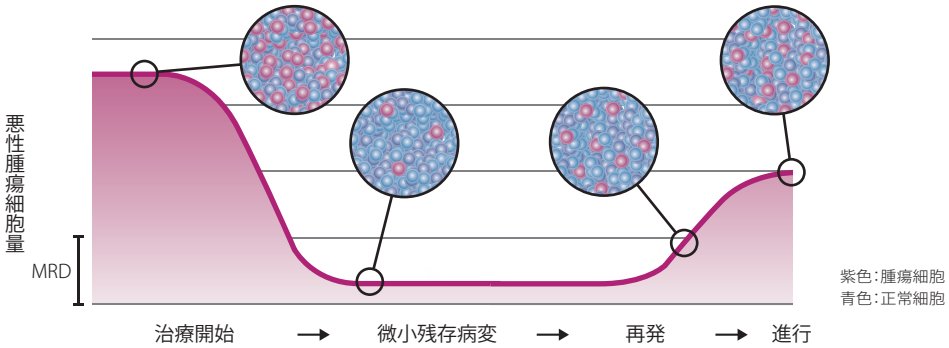
理研ジェネシスは、国内ラボとして初めてのclonoSEQ®受託解析サービスを提供します。



Adaptive Biotechnologies開発のclonoSEQ®は、B細胞リンパ系腫瘍を対象とした、
治療中および治療後に残存するわずかながん病変（minimal residual disease；MRD）の状態と
その腫瘍量の変化を評価する、次世代シーケンサーを用いた研究用アッセイです（**図1**）。
マルチプレックスPCR[*1]をベースとしたNGS[*2]技術による、
ハイスループットなB細胞受容体（BCR）シーケンシング解析により、
①多様なレパートリーから構成されるB細胞受容体の包括的な評価と、
②何百万もの正常な細胞を含む検体から、残存する非常に少数の腫瘍B細胞の検出を
可能とするため、微小残存病変の評価の強力なアプローチとなります。

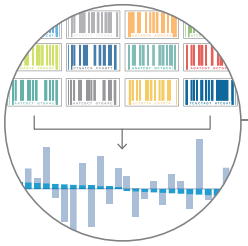
＊1 PCR：ポリメラーゼチェーンリアクション
＊2 NGS：次世代シーケンシング

図1. 治療中・治療後のMRDステータスと経時変化



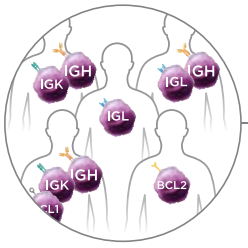
clonoSEQ®の特長

clonoSEQ®は、マルチプレックスPCR、NGS、独自のバイオインフォマティクスを組み合わせた革新的な解析技術により、
他にはない高精度なMRD解析を可能にしました。



● PCR増幅バイアスの抑制

遺伝子再構成により多様性を獲得したBCR CDR3配列を、マルチプレックスPCRにより網羅解析するときに、発生するPCR増幅バイアスの問題に対処した解析手法です。独自のバイアスコントロール技術により、**微小残存病変の非常に正確で再現性の高い定量**が可能です。



● 腫瘍特異的配列の検出率向上

IgH（VDJ）、IgH（DJ）、IGK、IGLおよびIGH-BCL1/IGH-BCL2転座のプライマーセットを備え、測定の度に、検体中の**BCRレパートリー全体を包括的に評価するハイスループットアッセイ**です。
腫瘍細胞のマーカーとして識別された配列をモニタリングするだけでなく、新たに出現した腫瘍クローン配列の検出も可能です。

● MRD評価能力を最大化するバイオインフォマティクス

NGSから出力されるシーケンス生データから、臨床研究用に理解しやすいMRD解析結果を抽出します。独自のアルゴリズムを用いて、**残留する増幅バイアスの修正後、B細胞のクロナリティを評価し、追跡可能な腫瘍特異的配列を同定**します。使用サンプル量に基づいたアッセイの検出限界および定量限界を算出するため、ノイズを除いた検出シグナルによるMRD評価が可能です。

clonoSEQ®の解析原理

B細胞受容体シーケンシング

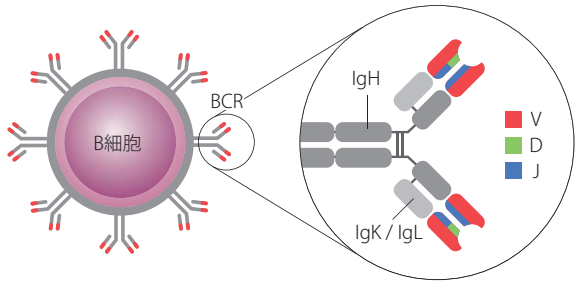
解析バックグラウンド

● B細胞受容体とは

B細胞表面に発現するB細胞受容体（BCR）（**図2**）は、免疫グロブリン（Ig）受容体とも呼ばれ、多種多様な外部抗原を特異的に認識する分子として、獲得免疫システムにおける重要な役割を担っています。

BCRは免疫グロブリンH鎖（IgH）、免疫グロブリンL鎖（IgK/IgL）によりエンコードされた2つのペプチド鎖で構成されており、Bリンパ球の抗原特異性は主にB細胞受容体の超可変的相補性決定領域3（CDR3）のアミノ酸配列によって決定されます。

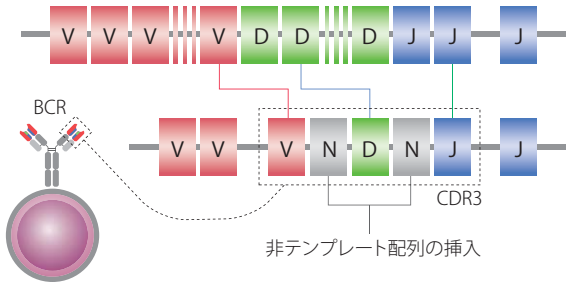
図2. B細胞受容体



● 遺伝子再構成によるB細胞受容体の多様性

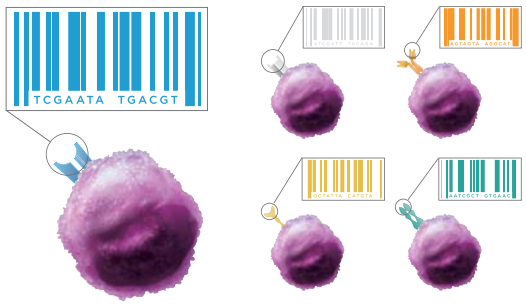
B細胞はその分化過程で免疫グロブリン遺伝子のV（D）J断片組換え（再編成）が起こります（**図3**）。ゲノムDNA上には複数のVおよびJ遺伝子セグメントが存在しているため、その組み合わせにより、多様なBCRが形成されます。さらに、超可変的領域のCDR3には、V-J、V-D、およびD-J接合部での非テンプレート配列挿入・削除や体細胞超変異などが含まれるため、受容体の潜在的な多様性が増加します。

図3. V（D）J遺伝子再構成



こうした受容体の潜在的多様性により、特定のCDR3配列を有するB細胞に偏って存在する可能性は非常に低く、膨大な種類からなる各CDR3配列が実質的にB細胞クローンを識別できる固有のタグとなります（**図4**）。

図4. B細胞の多様性



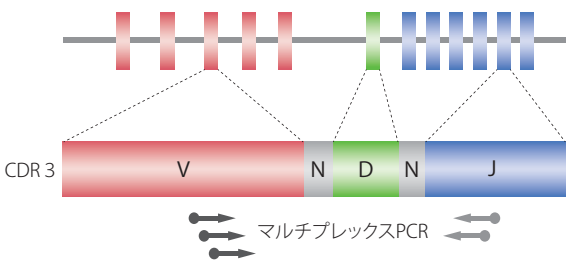
解析原理

● 多様なB細胞受容体のハイスループットシーケンシング

clonoSEQ®は、再構成されたBCR CDR3配列を増幅してIgH V-J、D-JおよびIgK/L遺伝子座の再構成、ならびにBcl1-IgHおよびBcl2-IgHの転座を解析するマルチプレックスPCR法をベースとしたBCRシーケンシングです（**図5**）。

BCRシーケンシングにより、クロナリティを評価し、追跡可能な腫瘍特異的BCR CDR3配列（ドミナントシーケンス）を同定します。腫瘍特異的配列の同定後、フォローアップサンプルにおいてBリンパ球のクローン性を評価し、ドミナントシーケンスの検出と定量化、およびその他特徴的なBCR CDR3配列を調べることによりMRDを評価します。

図5. BCRシーケンシング



clonoSEQ®は、多様なBCR CDR3配列の網羅的解析に対応するため、VおよびJセグメントに設計された複数のプライマーを使用し、マルチプレックスPCRを行います。

clonoSEQ®

解析フロー

備考

● 検体条件

clonoSEQ®によるMRD解析には2種類の検体が必要です。

IDサンプル：クローン多様性を決定し、クローン特異的BCR遺伝子配列を同定する検体

MRDサンプル：IDサンプルで同定されたBCR遺伝子配列を追跡するフォローアップ検体

gDNA[*3]	IDサンプル	MRDサンプル
検体量	1μg以上	20μg以上[*4]
検体濃度	15ng/μL以上	200ng/μL以上[*4]

＊3：gDNA抽出前検体（骨髄検体、血液検体など）からの受入も可能です。臨床検体条件につきましては、別途ご相談ください。

＊4：100万個の正常細胞中に1個の腫瘍細胞（検出感度10^{-6}）を95%信頼区間で検出する場合の推奨gDNA量および濃度です。使用gDNA量は研究目的により異なりますので、別途ご相談ください。

● 研究対象例

多発性骨髄腫　急性リンパ性白血病　慢性リンパ性白血病　非ホジキンリンパ腫　など

clonoSEQ®は、様々なB細胞性リンパ性急性腫瘍のMRDアッセイに使用できます。

● 納品物

- 作業報告書
- 解析データ（エクセルファイル）：Assay Report（検体と解析結果に関する重要な情報）、Clonality Report（識別されたドミナントシーケンス情報）、Tracking Report（追跡されたシーケンス情報）

clonoSEQ®受託解析サービスに関するお問い合わせは

株式会社理研ジェネシス　営業部

電話でのお問い合わせ　03-5759-6042

Webでのお問い合わせ　info2@rikengenesis.jp

※本解析は研究用です。診断目的には使用できません。

販売元

株式会社理研ジェネシス

〒141-0032 東京都品川区大崎1-2-2　アートヴィレッジ大崎セントラルタワー 8 階

TEL : 03-5759-6042 / FAX : 03-5759-6043 / URL: https://www.rikengenesis.jp

取扱代理店

®：弊社または各社の商標または登録商標です

D06-003-20H-01