

MRD 検査

LymphoTrack®アッセイを利用した検査

次世代シーケンシング (NGS) による微小残存病変 (MRD) 検査は悪性血液腫瘍を管理する際に役立つ頼れるツールです。

LymphoTrack®アッセイはNGSを利用したシーケンシング・アッセイで、標的T細胞受容体 (TCR) または免疫グロブリン (Ig) 遺伝子座内で起こる再構成を 実質的にすべて 検出します。これは腫瘍に 特異的な バイオマーカーターゲットがすべての被検者で容易に同定可能であることを示唆しています。ひとたび特異的 遺伝子 再構成 (クローン型) が同定されると、LymphoTrackアッセイは LymphoTrack® Low Positive Control、LymphoQuant® Internal Control及び LymphoTrack® MRD ソフトウェアと共にこれらの 同定された クローン型集団の追跡を可能にします。

これらの製品は研究用のみに販売しています。診断用には使用できません。

 LymphoTrack®
Assay

These products are sold for Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

1. NGS-MRD法の長所

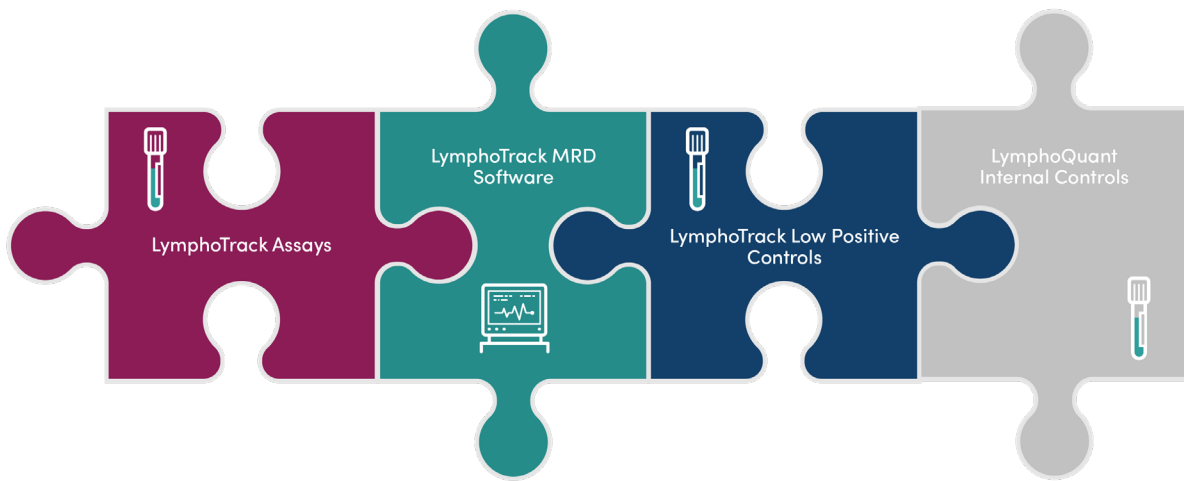
NGSによるMRD検査は残存病変の存在の検出に他に類を見ない感度と特異度性を示し、フローサイトメトリーやアレル特異的オリゴヌクレオチドPCRなどの他の手法に対して多数の長所を持っています。1 MRDの状態と全生存率の相関は当初慢性リンパ性白血病(CLL)被検者に関してマルチパラメータ・フローサイトメトリー解析を用いて示されましたが、フローサイトメトリー解析を利用した手法は施設間での標準化が困難であることが知られています。2

しかしながら、多数の研究者がNGSを使ってCLLや急性リンパ性白血病(ALL)などのリンパ性悪性腫瘍におけるMRDの検出と追跡に成功を示した手法について述べています。3,4

それらの報告には以下の長所が報告されています。:

- » 配列特異的なDNA標的の追跡により世界中で一致した客観的で標準化された検査を提供する。
- » 追跡サンプルにおいてクローンや新規に出現したクローン、サブクローンを検出する。
- » 調査対象となったDNAインプット量と配列リード数によってのみ制限される感度および信頼のレベルで検査を行う。
- » 予後マーカーとして配列特異的な体細胞高頻度突然変異(SHM)だけでなくB細胞およびT細胞の遺伝子再構成を検査する。

参考文献:(1)Blood 125:3501-08, 2015 and Blood 126:1045-47, 2015 (2) JCO 23(13):2884, 2005 (3) Leukemia 27:1659-1665, 2013 (4) Blood 120:5173-5180, 2012



2. 実験のデザイン - MRD検査のためのコントロール

MRD検査にLymphoTrack®アッセイを利用する際は、ラボラトリーでのランの都度3つ以上のコントロールを用いることをお勧めします：(1) テンプレートなしのコントロール (NTC)、(2) 低陽性コントロール*および(3) 陰性コントロール。サンプリングする細胞数の長期的なキャリブレーションのために4つ目のスパイクイン内部コントロールを検討すべきです。

- » NTC: テンプレートなしのコントロール (NTC) はPCRでサンプルDNAの代わりに水を使用します。NTCはPCRにマスターミックス (1インデックス) の使用を必要としますが、この反応の配列決定には必要ありません。
- » 陰性コントロール: 各LymphoTrackアッセイキットでは [NEG (-)] が提供されます。このテンプレートにはIg/TRクローン型が含まれておらず、PCRのセットアップ前にさらに希釈する必要がありません。
- » 低陽性コントロール: MRD検査用に設計されたもので、LymphoTrack低陽性コントロールはLymphoQuant内部コントロールとの組み合わせで機能するように最適化されています。目的通りに一緒にランを行うと、これらのコントロールで、MRDの感度レベルをLymphoQuant内部コントロールが使用されている他のサンプルにおいて自信を持って調べられるようにします。

新鮮な低陽性コントロールの調製。それぞれのB細胞またはT細胞の標的テンプレートについては、クローナルコントロールDNAをバックグラウンドのポリクローナルコントロールDNAで系列希釈して最終濃度を1:10,000とします。この希釈はLymphoTrack低陽性コントロールの代わりに利用可能で、サンプルと並行してランを行うべきです。

*LymphoTrackキットにはMRD検査には必要でない陽性コントロールテンプレート [POS (+)] が含まれています。正確に言えば、以下の品番の製品は別売されており、調製に必要な構成要素です。

表1:コントロール - 購入に関する問い合わせ

LYMPHOTRACK® ASSAY	LYMPHOTRACK® LOW POSITIVE CONTROL	LYMPHOQUANT® INTERNAL CONTROL
IGHV Leader, IGH FR1 1/2/3	LymphoTrack® B-cell Low Positive Control Catalog #:4-088-0098	LymphoQuant® B-cell Internal Control Catalog #:4-088-0118
TRG, TRB	LymphoTrack® T-cell Low Positive Control Catalog #:4-088-0108	LymphoQuant® T-cell Internal Control Catalog #:4-088-0128

3. サンプルの調製:DNAの適格性および定量

MRD検査を行うDNAテンプレートはPCR増幅阻害物質が含まれていない状態でなければなりません。したがって、高品質の精製されたゲノムDNAが常に推奨されます。調製されたDNAのAbs260/280比はサンプルの純度を反映し、1.8~2.0の範囲になるはずです。二本鎖DNA (dsDNA) に特異的な手法によるDNA濃度の評価も必要です。同様の二本鎖DNA (dsDNA) 結合蛍光染色アッセイであることから標準的なPico Greenプロトコールが適しています。

DNAインプットが分解せず、定性評価に適したものとするために、InvivoscribeのSpecimen Control Size Ladderマスターミックス [カタログ番号 2-096-0021: ABI検出、カタログ番号: 2-096-0020: ゲル検出] を用いて検査することができます。このマスターミックスは0100、200、300、400および600塩基対のPCR産物の増幅用のハウスキーピング遺伝子を標的としています。これは元々EuroClonalityグループによってBIOMED-2共同研究プロジェクトの一部として設計されたものでした (Leukemia 17:2257-2317, 2003)。ここで説明した良好な適格性の確認および複合定量測定は、それぞれ、LymphoTrack MRD検査へのインプットとしてDNAテンプレートを使用する前に行うことをお勧めします。

4. DNAインプット量

DNAインプット量は実験デザインの重要な要素の一つです。MRD検査を行う際はDNAインプット量を多くすることが推奨されていますが、これは全体的な細胞相当量がMRDアッセイの感度を決定付けるからです。LymphoTrackアッセイを利用する際は、1回のPCRにつき最高2 µLのDNAインプットが推奨されます。MRD検査を行う際は、合計5～10 µLのDNAインプット量が利用可能です。例えば、2 µLのスパイクイン内部コントロールを添加するとサンプルの最高DNAインプット量は8 µLとなるでしょう。

ルーチンのクローン追跡は、わずか200 ngのインプットDNA10,000個の細胞のバックグラウンド中に1個のクローン細胞を検出することで確実に達成可能です(図1、表3)。低い感度を希望する場合は、ヒト細胞には約6.5 pgのDNAが含まれることに留意することが重要です。95%信頼水準で10⁻⁴、10⁻⁵および10⁻⁶の感度を目標としたサンプルのセットアップ例を表3に示しました。これらの例にはさまざまな感度レベルでの報告に対するリードデプスの要件の詳細が含まれています。もう一つの方法として、LymphoTrack® MRDソフトウェアの「プロジェクト計画」ツールを用いて所望するMRD検査の信頼水準の達成に必要なとされるDNA量を決定することができます(セクション6参照)。

表2. DNAインプット量とリードデプスの例

さまざまな感度レベルにおいて真のMRD陰性サンプルを95%の信頼率で判定		
感度	1レプリケートあたりのDNA量	1レプリケートあたりのリードデプス
1x10 ⁻⁴	200 ng	500,000
1x10 ⁻⁵	2 µg	4,400,000
1x10 ⁻⁶	20 µg	44,400,000

Note: Total **DNA Input** and **Total Read Depth** are divided across replicates tested, and a replicate is an independent PCR reaction with input DNA from the same subject. Read depth requirements assume 100% target cells. Read depth requirements may vary dependent on replicate numbers used to reach total DNA inputs.

Also, note: A DNA concentration step is often required to achieve the higher levels of DNA input.

5. 実験のデザイン: サンプルのバッチ化(インデックス)およびアッセイの多重化

THE RELATIONSHIP BETWEEN DNA INPUT, READ DEPTH, AND CONFIDENCE LEVEL MUST BE CONSIDERED IN MRD STUDIES.

The Project Planner tool in the LymphoTrack MRD Software can be used to create an experimental design that allows a user to optimize confidence in the result using the available sample and read depth. This tool allows for user-defined permutations to DNA input, read depth, and/or replicates; performing calculations based on these permutations to determine confidence levels at various sensitivity levels. These numerical outputs can be used to generate confidence models as shown in **Figure 1**.

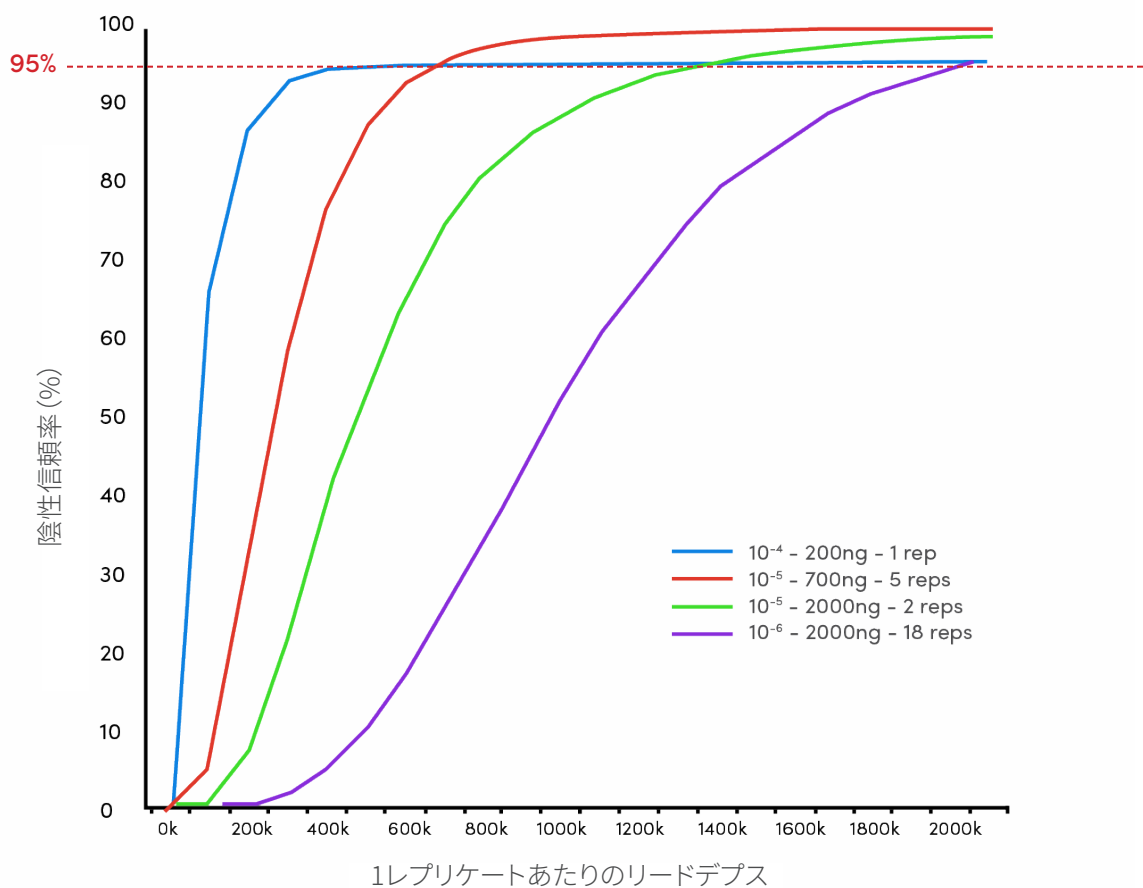


図1. さまざまな感度レベルで真のMRD陰性サンプルを95%の信頼率で判定

さまざまなDNAインプット量および得られたシーケンシングのリード数に応じたレプリケートでのクローン型検出(5リード以上で検出)に関する信頼水準。赤色の破線は95%信頼水準を示しています。

図1に示したクローン型配列検出の信頼水準は統計モデルを用いて算出しました。このモデルにはPCRバイアスを組み込んでおらず、結果として、算出された信頼水準は理論的なものであり、経験的に判定されたものではありません。

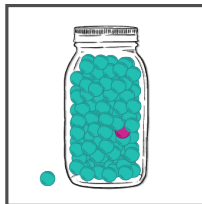
CONFIDENTLY REPORT TRUE NEGATIVE RESULTS WITH 10^{-6} SENSITIVITY

Increased DNA inputs are required to achieve greater sensitivity in MRD testing due to the probability that a measured specimen will contain a subject's cancer cells. **Figure 2** explains in detail the cell sampling required to reach 10^{-6} sensitivity with 95% confidence.

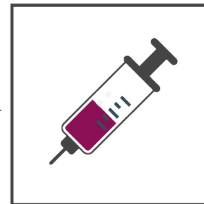
HOW MANY CELLS MUST BE TESTED TO REACH 1×10^{-6} SENSITIVITY WITH >95% CONFIDENCE THAT IT IS A TRUE NEGATIVE RESULT?

10% Maroon Marble in 90% Teal Marbles

If we pick 1 marble we have a 10% probability of picking a **maroon** marble and 90% probability of picking a **teal** marble.

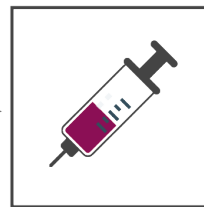
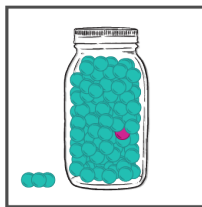


10% Clonal Cancer Cells in 90% Non-Clonal Cells



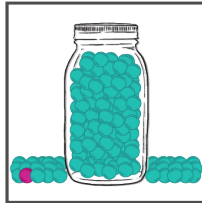
This is akin to testing 667 ng of DNA (1/30th of the 20µg total suggested, or ~100k cells). The calculated probability of detecting the cancer cell is only 9.75%.

If we pick 3 marbles we have a 27% probability of picking at least 1 **maroon** marble and 73% probability of picking all **teal** marbles.



This is akin to testing 2000 ng of DNA (3/30th of the 20µg total suggested, or ~310,000 cells). The calculated probability of detecting the cancer cell is 26.5%.

If we pick 30 marbles we have a 95.8% probability of picking at least 1 **maroon** marble and only a 4.2% probability of picking all **teal** marbles.



This is akin to testing 20 µg of DNA (30/30th of the 20µg total suggested, or ~3.1m cells). The calculated probability of detecting the cancer cell is 95.38%.

Figure 2: 20 µg DNA input minimum must be tested to establish a true negative result with 1×10^{-6} sensitivity (>95% confidence).

In this example, the maroon marble(s) found in the teal marble background represents the rare clonal cancer cell(s) in a subject's otherwise non-clonal cell background. The 3 scenarios presented here demonstrate that laboratories must test 20 µg of DNA for 95% confidence that they can find 1 rare clonal cell in 1 million cells (1×10^{-6} sensitivity). It is important to note that the probability is entirely dependent on the assumed proportion of maroon marbles (or clonal cells). If we KNOW there should be 10% maroon marbles, then picking 30 teal marbles tells us we are 95.8% sure that the jar does not have 10% maroon marbles. This is the same logic that is used for confidence in a negative MRD signal using 20 µg of DNA. The actual proportion might be less than 1×10^{-6} sensitivity, but we are 95% sure it is not equal to or higher than 1×10^{-6} .

6. DESIGN OF EXPERIMENT: SAMPLE BATCHING AND ASSAY MULTIPLEXING

LymphoTrack® Assays are available for use with the MiSeq®, Ion S5™ and Ion PGM™ sequencing platforms. The LymphoTrack® Assays are designed to provide the end user efficient and flexible workflow options. Users can design cost-effective MRD runs by multiplexing assays and batching samples, while remaining mindful of the NGS flow cell capacity and the desired MRD sensitivity.

Assay Multiplexing: The full LymphoTrack® Clonality Suite consists of 7 independent assays each targeting one of the following respective loci (*IGHV* Leader, *IGH* FR1/FR2/FR3, *IGK*, *TRG* and *TRB*). These assays were specifically designed so that up to 7 clonality targets can be multiplexed together in a single LymphoTrack® MiSeq® run. Up to 5 independent targets (*IGH* FR1/FR2/FR3, *IGK*, and *TRG*) can be multiplexed together if using the LymphoTrack Assays for Ion S5™ or Ion PGM™.

Sample Batching: LymphoTrack® one-step PCR incorporates indices (molecular barcodes) onto each amplicon. By design, a unique index is used for each specimen. The sample indices are read during sequencing and used by the LymphoTrack® (MRD) Software to de-multiplex samples.

» LymphoTrack® Assay or Panel kits for the MiSeq® are provided with up to 24 different indices (up to 48 with *IGH* FR1). Thus, when tracking clonal sequences, these panels allow 22 different subject samples to be run along with 2 external controls on a single flow cell (or up to 46 different FR1 subject samples).

» LymphoTrack® Assay kits for the Ion S5/PGM™ are provided with 12 different indices, thus allowing 10 different subject samples to be run along with 2 external controls on a single sequencing chip.

7. LYMPHOTRACK® MRD SOFTWARE

The LymphoTrack® MRD Software seamlessly automates control and sample analyses. The powerful bioinformatics software facilitates the longitudinal assessment of up to 5 clonal populations by providing multiple functionalities to the user for project planning, data analyses and reporting. Project planner features assist the user in design of experiment and project management with a built in "project" feature to save and load "projects" as additional time points are tested. When Invivoscribe® LymphoTrack® MRD controls are used, the software automates MRD tracking, reports clonal counts and frequencies, and provides multiple graphs to visualize changes in clonal frequencies over time. **Refer to the LymphoTrack® MRD Software Technical Bulletin for additional details.**

PROJECT PLANNER TOOL

This application provides design of experiment features including a confidence interval calculator. The software embedded calculator considers sample replicate count, resequencing count, read depth, and DNA input amount to determine the confidence level of a true MRD negative sample. This tool also allows the user the ability to customize the desired levels of confidence to ensure the experimental design meets the user-defined specification for combined sensitivity and confidence for MRD monitoring.

AUTOMATED BIOINFORMATICS DATA ANALYSES

The LymphoTrack® MRD software facilitates tracking of up to 5 defined clonal sequences as well as the degree of mismatches (0, 1, 2). It further calculates clonal read frequency, analyzes multiple samples and/or resequencing replicates, and reports the level of confidence when the clonal sequence is not detected at various levels.

LYMPHOTRACK® MRD SUMMARY REPORT

MRD総括レポートでは、追跡したクローンの配列の状況について説明します。また、LymphoQuant Internal Controlが使われていれば、それらの割合は自動的に時系列のグラフで示されます。

下記の事項について最終タイムポイントの時点での詳細が報告されます。

>>検体の詳細：(a)検体のタイプ、(b)総DNA使用量、(c)検体採取日・タイムポイント

>>MRDの結果: 検出の有無

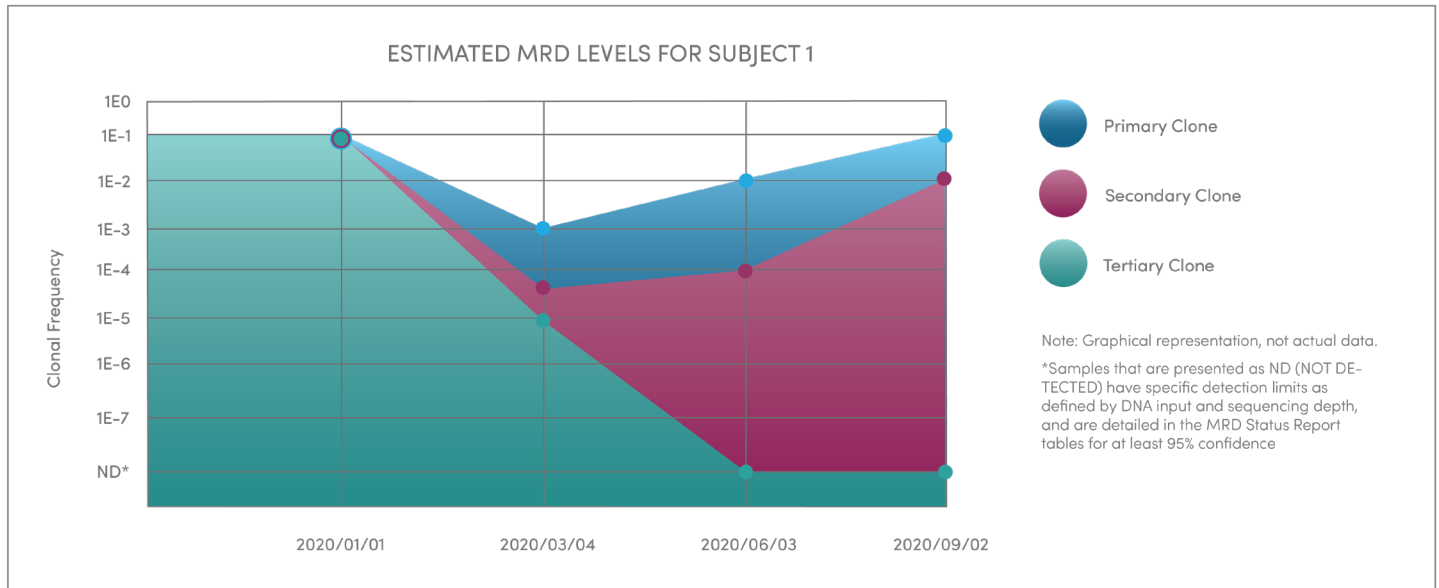
>>クローンの割合* (有りの場合) もしくは真陰性信頼度 (無しの場合)

>>概算クローン細胞相当数*

>>有核細胞数 1×10^6 あたりの概算クローン細胞相当数*

*LymphoQuant Internal Controlを使用する必要があります。

Figure 3: Estimated MRD Levels



NOTE: Graphical representation only

LYMPHOTRACK® MRD SAMPLE REPORT

The MRD Sample Report provides a summary table for the latest time point for all clonal sequences. Details are included for each sequence analyzed including the Clonal Frequency if DETECTED and the % Confidence if NOT DETECTED. Detailed information applicable to analysis is summarized for the most recent time point as follows:

- » Clonal Sequence(s) Detected or Not Detected
- » Number of PCR Replicates
- » Total Read Number Analyzed
- » Cumulative Target Read Number
- » LymphoQuant® Internal Control Read Number
- » When a clonal sequence of interest is Not Detected, the call confidence is reported for various sensitivities.

8. アッセイの性能

MRD検査に関するLymphoTrackアッセイの直線性、精度および検出限界 (LOD) を示すために、再構成と配列が判明しているB細胞株を希釈してLymphoTrack MRD検査に付しました。

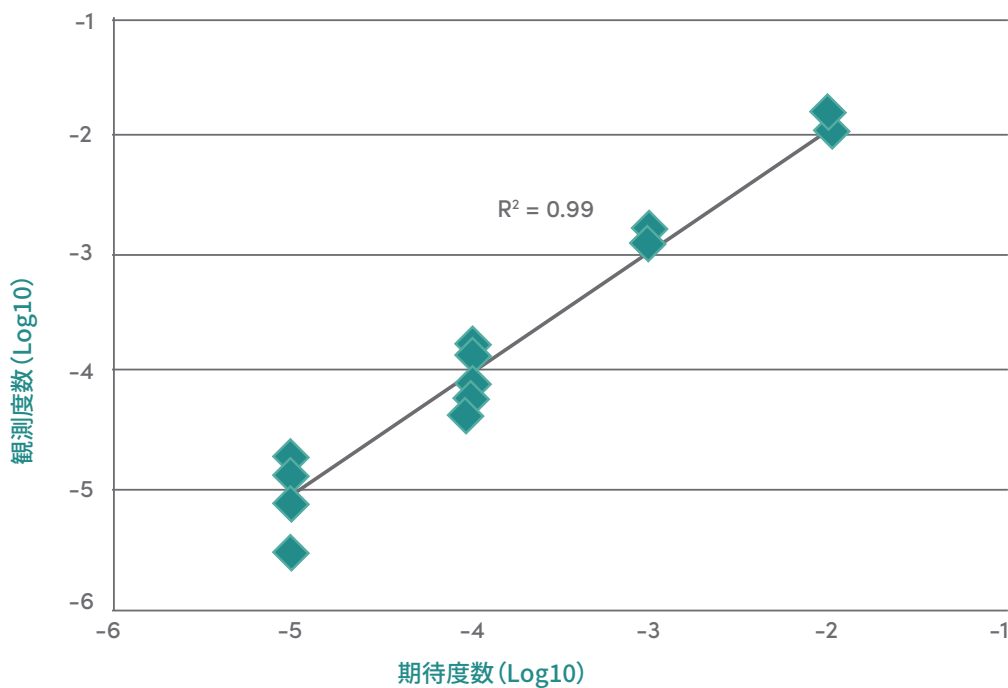
MATERIALS & METHOD

V_H-J_H再構成が判明しているB細胞株のDNAを扁桃腺由来DNA（T細胞およびB細胞が豊富）をバックグラウンドとして系列希釈して10⁻²倍から10⁻⁵倍までのクローン型の度数分布を作成しました。インプットするDNA量を各希釈ポイントで700 ngに調節し、LymphoTrackアッセイを用いて配列決定しました。全例で、サンプルの検査はMiSeq[®]またはS5/PGM[™]用のLymphoTrack IGH FR1アッセイとLymphoTrack MRDソフトウェアによるバイオインフォマティクス解析で実施しました。このソフトウェアは既知のクローン配列を自動検出し、さらにクローン型の度数を報告します。

結果および結論

10⁻²倍から10⁻⁵倍までの希釈系列で優れた直線性が観察されています(図3)。観測度数と期待度数の間に認められた相関関係はさらに検査した各サンプルにおいて示されました(図3)。検査したサンプル1件あたりの総リードカウントは253,295から663,625でした。

図4: 希釈系列はLymphoTrack[®]アッセイの直線性を示している。



関連するLYMPHOTRACK製品

4-088-0098	LymphoTrack® B-cell Low Positive Control	IGHV Leader, IGH FR1/2/3, & IGK Compatible
4-088-0108	LymphoQuant® T-cell Low Positive Control	TRG & TRB Compatible
4-088-0118	LymphoQuant® B-cell Internal Control	IGHV Leader, IGH FR1/2/3, & IGK Compatible
4-088-0128	LymphoQuant® T-cell Internal Control	TRG & TRB Compatible

ASSOCIATED LYMPHOTRACK® PRODUCTS

カタログ番号	製品名	量
7-121-0057	LymphoTrack® IGH FR1/2/3 Assay - S5/PGM™	インデックス12 (各5反応分)
7-121-0007	LymphoTrack® IGH FR1 Assay - S5/PGM™	インデックス12 (各5反応分)
7-121-0037	LymphoTrack® IGH FR2 Assay - S5/PGM™	インデックス12 (各5反応分)
7-121-0047	LymphoTrack® IGH FR3 Assay - S5/PGM™	インデックス12 (各5反応分)
7-122-0007	LymphoTrack® IGK Assay - S5/PGM™	インデックス12 (各5反応分)
7-227-0007	LymphoTrack® TRG Assay - S5/PGM™	インデックス12 (各5反応分)
7-121-0129	LymphoTrack® IGH FR1/2/3 Assay Kit A - MiSeq*	インデックス8 (各5反応分)
7-121-0139	LymphoTrack® IGH FR1/2/3 Assay Panel - MiSeq*	インデックス24 (各5反応分)
7-121-0009	LymphoTrack® IGH FR1 Assay Kit A - MiSeq*	インデックス8 (各5反応分)
7-121-0039	LymphoTrack® IGH FR1 Assay Panel - MiSeq*	インデックス24 (各5反応分)
7-121-0149	LymphoTrack® IGH FR1 Assay Panel B - MiSeq*	インデックス 25-48 (各5反応分)
7-121-0089	LymphoTrack® IGH FR2 Assay Kit A - MiSeq*	インデックス8 (各5反応分)
7-121-0099	LymphoTrack® IGH FR2 Assay Panel - MiSeq*	インデックス24 (各5反応分)
7-121-0109	LymphoTrack® IGH FR3 Assay Kit A - MiSeq*	インデックス8 (各5反応分)
7-121-0119	LymphoTrack® IGH FR3 Assay Panel - MiSeq*	インデックス24 (各5反応分)
7-122-0009	LymphoTrack® IGK Assay Kit A - MiSeq*	インデックス8 (各5反応分)
7-122-0019	LymphoTrack® IGK Assay Panel - MiSeq*	インデックス24 (各5反応分)
7-225-0009	LymphoTrack® TRB Assay Kit A - MiSeq*	インデックス8 (各5反応分)
7-225-0019	LymphoTrack® TRB Assay Panel - MiSeq*	インデックス24 (各5反応分)
7-227-0019	LymphoTrack® TRG Assay Kit A - MiSeq*	インデックス8 (各5反応分)
7-227-0009	LymphoTrack® TRG Assay Panel - MiSeq*	インデックス24 (各5反応分)

BIOINFORMATICS SOFTWARE

7-500-0009	LymphoTrack® Software - MiSeq*	購入時にCD 1枚を無償提供
7-500-0007	LymphoTrack® Software - S5/PGM™	購入時にCD 1枚を無償提供
7-500-0008	LymphoTrack® MRD Software	Inquire for availability

これらの製品は研究用のみに販売しています。診断用には使用できません。

M-0036 Rev02 October 2023



Invivoscribe, Inc.
Tel +1 858.224.6600 | Fax +1 858.224.6601
sales@invivoscribe.com

LabPMM 合同会社
電話 (日本国内) 044 281.1500 | Fax (日本国内) 03 6745.9346
services@labpmm.co.jp

©2021 Invivoscribe, Inc (Invivoscribe®) 無断複写・転載を禁じます。ここに記載されている商標はInvivoscribe®およびその関連会社、またはここに記載されている他社の商標については、それぞれその所有者に帰属します。ILLUMINA®およびMiSeq®はIllumina, Inc.の登録商標です。Ion S5TMおよびIon PGM™はThermo Fisher Scientificの商標です。