

単一のNGSアッセイで、 長期保存腫瘍検体のメチル化 および体細胞バリエーションを検出

FFPE DNA解析にIllumina 5-Base DNA Prepを
使用する際の推奨事項



DNAの損傷を抑える穏やかなケミストリーを用いて、FFPEサンプルからの検出力を最大化



クオリティが異なるインプット量40 ngのFFPE DNAから高精度なゲノムおよびメチロームの洞察を取得



簡単なアッセイの変更により、低インプット量のFFPE DNAサンプルからロバストな結果を生成

はじめに

がんはゲノムとエピゲノム両方が関わる疾患です。¹ 腫瘍の増殖を促進するゲノム変異とDNAメチル化異常を同定することは、がんの発症、進行および治療反応の理解や予測において極めて重要です。ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織検体は、がん研究における長期保存ゲノム材料の貴重な供給源です。しかし、FFPE DNAの品質劣化により、これらのサンプルの包括的な分子プロファイリングの実施は困難です。

Illumina 5-Base DNA Prepは、独自のケミストリーと最適化された解析法を用いて、アデニン（A）、チミン（T）、グアニン（G）、シトシン（C）、5-メチルシトシン（5mC）の5つの塩基を検出する、全ゲノムシーケンス（WGS）とメチル化シーケンスを1つに組み合わせた効率的なアッセイです。² また、シングルステップの穏やかなメチル化塩基交換により、DNAの品質を維持し、FFPEサンプルからの検出力を最大限に高めます。本アプリケーションノートでは、FFPE腫瘍サンプルを用いる際のIllumina 5-Base DNA Prepの使い方と、高精度なメチロームおよび体細胞バリエーションコールを得るためのプロトコール上の推奨事項をご紹介します。

手法

ゲノムおよびメチローム解析

肺がん、黒色腫、結腸直腸がん、結腸がん、乳がん、腎がんなど、10種のがん種サンプルについて、標準的なFFPE組織ブロックからゲノムDNAを抽出しました。（表1）。FFPE DNAのクオリティ（ΔCq）は、TruSight™ FFPE QC Kit（イルミナ、カタログ番号：20139070）を用いて測定しました。各FFPEサンプルについて、Illumina 5-Base DNA Prep（イルミナ、カタログ番号：20140364）を用いてインプット量40 ngのDNAを調製しました。3種のFFPEサンプルについては、標準プロトコールに若干の変更を加え、25 ng、10 ngおよび1 ngのインプットから追加で調製しました（表2）。すべての5-base FFPEライブラリーは、151 bp × 2リード長、500Mクラスター（10億ペアエンドリード）で、NovaSeq™ X Plusシステムでシーケンスしました。二次解析はDRAGEN™ Somaticパイプライン（v4.4.6）で実施しました。

表1: 解析したFFPE腫瘍サンプル

FFPE サンプル	組織の種類	クオリティ（ΔCq）	インプットDNA
1	肺がん	1.00	40 ng、25 ng、10 ng、1 ng
2	肺がん	1.00	40 ng
3	肺がん	1.00	40 ng
4	黒色腫	1.21	40 ng
5	結腸直腸がん	1.50	40 ng
6	結腸がん	2.01	40 ng、25 ng、10 ng、1 ng
7	結腸がん	3.40	40 ng
8	乳がん	4.11	40 ng
9	黒色腫	4.11	40 ng、25 ng、10 ng、1 ng
10	腎がん	5.00	40 ng

Tumor-Normal体細胞バリエーション解析

乳がん細胞株HCC1395（ATCC、カタログ番号：CRL-324）および対応する正常細胞株HCC1395BL（ATCC、カタログ番号：CRL-2325）を培養し、DNA抽出前に新鮮凍結細胞ペレットとして処理するか、またはFFPE用の試料に調製しました。ライブラリーはIllumina 5-Base DNA Prepを用いて調製し、標準プロトコールによる2つのレプリケートに加え、WGS専用コントロールとして、イルミナのメチル化変換酵素を用いずに調製した2つのレプリケートを含めました。ライブラリーはNovaSeq X Plusシステムでシーケンスし、データはDRAGEN Somatic v4.5で解析しました。Tumor-Normalバリエーションコールでは、等しいリード深度で5-baseデータとWGSデータを比較しました。また、5-baseデータのTumor-Normalバリエーションコールでは、より高い深度のカバレッジでも検証しました。

結果

クオリティが異なるFFPE DNAサンプルに対する高性能なゲノムおよびメチロームシーケンス

推奨されるインプット量40 ngを用いて、クオリティが異なるFFPE腫瘍DNAから調製したIllumina 5-Base DNAライブラリーは、高いマップリード率を示し（図1A）、ほとんどのサンプルで少なくとも30 ×カバレッジを達成し、ロバストなシーケンス性能を示しました（図1B）。クオリティが低いサンプル（ $\Delta Cq \geq 3$ ）で30 ×カバレッジを達成するには、より多くのシーケンスが必要になる場合があります。インサートサイズ中央値は約110~150 bpであり、クオリティが低いFFPEサンプルは、より短いインサートサイズを示しました（図1C）。

FFPE腫瘍サンプル由来のIllumina 5-Base DNAライブラリーは、高精度なメチル化検出を示しました（図2）。ヒト正常組織の全体的なCpG*メチル化率は、通常70%~80%です。腫瘍サンプルは、正常組織と比較してゲノム全体の低メチル化を特徴とするため、観察された約50%~70%のメチル化率は想定と一致していました（図2A）。観察されたCHGおよびCHH*のメチル化率は低く（< 2%）、これも期待される範囲内でした（図2A）。FFPEサンプルに添加した、ゲノムDNAメチル化コントロール（GDMC）由来のLambdaおよびpUC19に分類されるリードは、サンプル間で高い真陽性率と低い偽陽性率を示しました（図2B）。

* CpG：シトシン-グアニンジヌクレオチド。シトシンのメチル化に対するその他のコンテキストには、CHGおよびCHHがあり、HはA、CまたはTを表します。

表2：低インプット量のFFPEサンプルを用いる際のIllumina 5-Base DNA Prepのプロトコル変更内容および条件

プロトコルステップ		断片化 ^b	ライゲーション		インデックスPCR	ポストPCRのクリーンアップ
プロトコル変更		GDMC量 ^b	UMI3量 ^c	RSB量 ^c	PCRサイクル数 ^c	SPRI比 ^d
FFPE DNAインプット量	40 ng ^a	2.5 μL	5 μL	–	8	0.8 ×
	25 ng	2.5 μL。1:10希釈GDMC ^b	2 μL	3 μL	9	0.8 ×
	10 ng		1 μL	4 μL	10	0.8 ×
	1 ng		1 μL	17 μL ^c	12	0.8 ×

a. Illumina 5-Base DNA Prepを用いたFFPE DNAの場合、推奨インプット量は40 ngです。

b. 断片化条件および反応量はFFPEに対して最適化されています。40 ngの場合、ストックのゲノムDNAメチル化コントロール（GDMC）を2.5 μL、40 ng未満の場合は、再懸濁バッファー（RSB）で1:10希釈したGDMCを2.5 μL添加します。超低インプット量（1 ng）のFFPE DNAの場合は、さらに希釈して、コントロールDNA由来のリードを減らすことが望ましい場合があります。「サイズ選択した断片化DNAの調製」ステップは省略してください。このステップは、FFPEサンプル処理時には保持すべき小さな断片を除去するためです。RSBを用いて、末端平滑化に対応した最適な容量になるようにサンプルを調整します。

c. 希釈したアダプター-UMI3には、5 μLのみ添加します。アダプターの添加量およびPCRサイクル数を調整し、アダプターダイマーを防ぎ、過剰増幅なく十分な収量を得るようにします。UMI：分子バーコード、RSB：再懸濁バッファー。

d. 残存するアダプターダイマーを除去するために比率を調整しました。SPRI：solid-phase reversible immobilization。

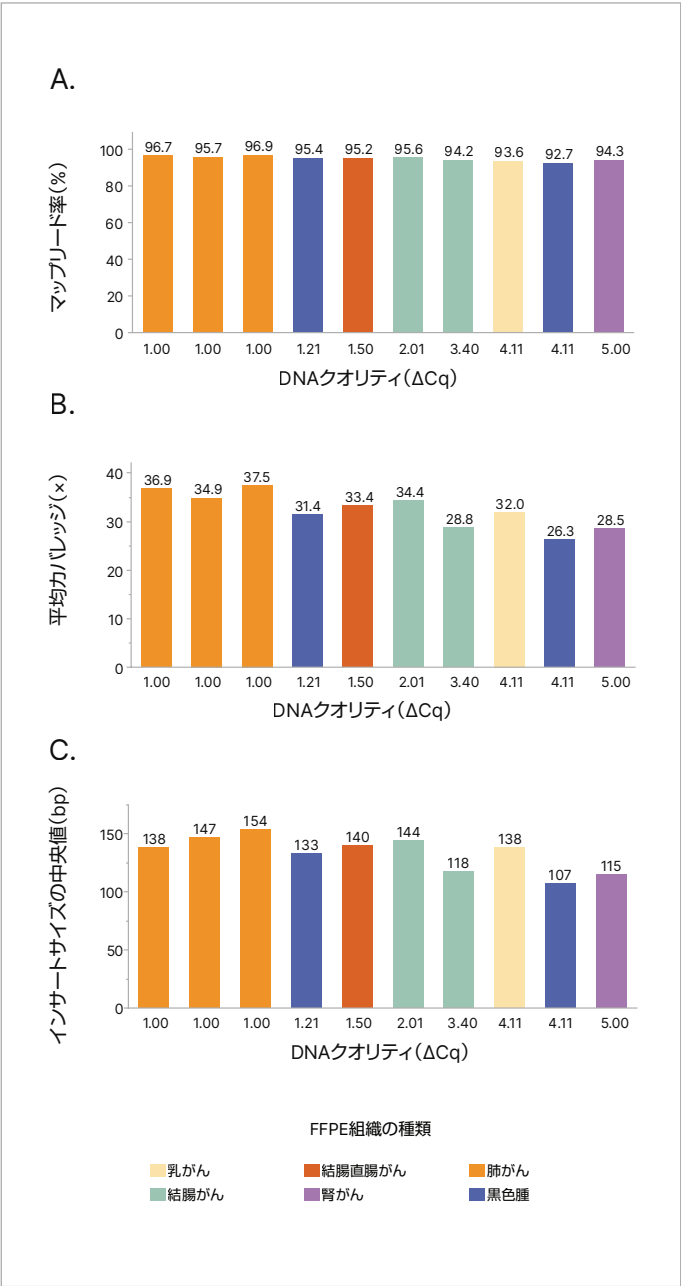


図1: Illumina 5-Base DNA Prepを用いた、クオリティが異なるFFPE DNAからのロバストなシーケンス性能

Illumina 5-Base DNA Prepを用いた、インプット量40 ngの10種のFFPE腫瘍サンプル (表1) のDRAGEN Somaticライブラリーメトリクス。(A) 幅広い組織およびクオリティ (ΔCq) にわたり、高いマッピング率を示されました。マッピング率の算出には、ゲノムDNAメチル化コントロール (GDMC) 由来のLambdaおよびpUC19に分類されたリードは含まれていません。(B) 平均カバレッジは、試験したサンプルすべてにおいて26 ×~38 ×の範囲でした。クオリティが低いFFPEサンプル (ΔCq ≥ 3) で30 ×カバレッジを達成するには、より高いシーケンス深度が必要になる可能性があります。(C) インサートサイズ中央値は約110~150 bpであり、クオリティが低いFFPEサンプルは、より短いインサートサイズを示しました。ライブラリーは151 bp × 2でシーケンスし、500Mクラスターまでダウンサンプリングしました。

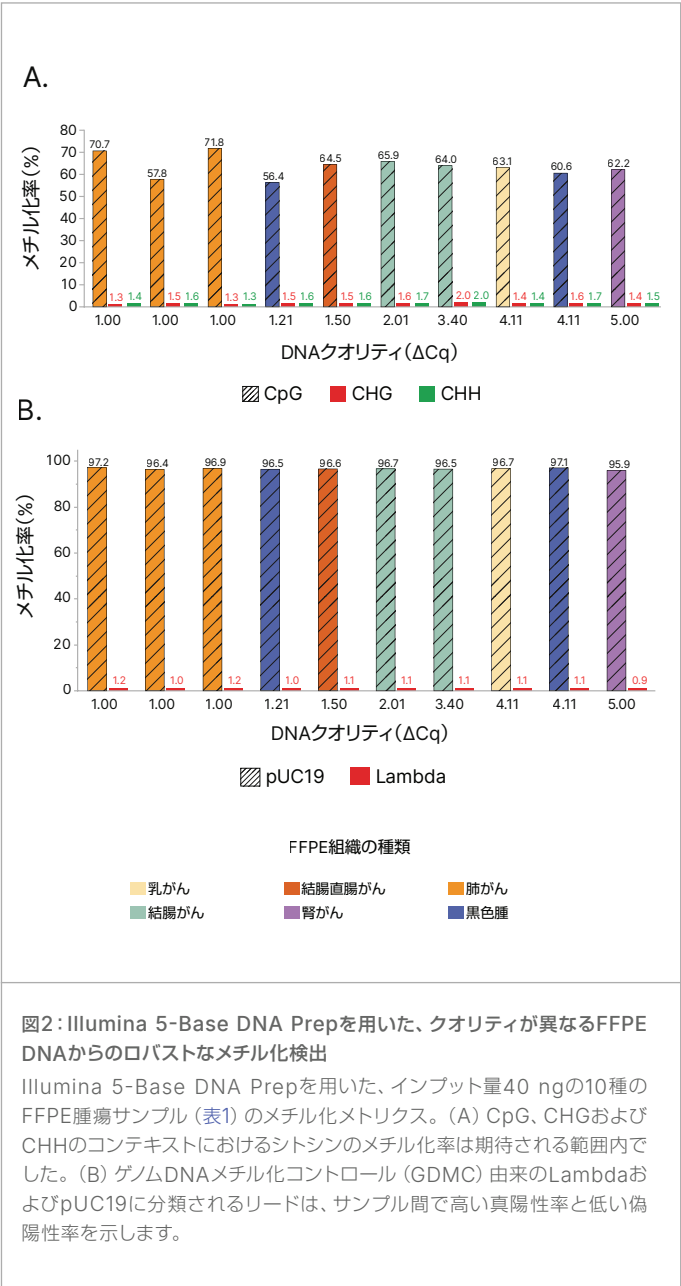


図2: Illumina 5-Base DNA Prepを用いた、クオリティが異なるFFPE DNAからのロバストなメチル化検出

Illumina 5-Base DNA Prepを用いた、インプット量40 ngの10種のFFPE腫瘍サンプル (表1) のメチル化メトリクス。(A) CpG、CHGおよびCHHのコンテキストにおけるシトシンのメチル化率は期待される範囲内でした。(B) ゲノムDNAメチル化コントロール (GDMC) 由来のLambdaおよびpUC19に分類されるリードは、サンプル間で高い真陽性率と低い偽陽性率を示します。

低インプット量のFFPE DNAに対するロバストなゲノムおよびメチロームシーケンス

解析できるFFPE試料が限られている場合、DNAインプット量の要件が制約となることがあります。UMI3アダプターの希釈、GDMCの希釈、PCRサイクルの調整など、簡単な変更を行うことで、インプット量が少ないサンプルでもアッセイを実施できる場合があります（表2）。これらの調整を行うことで、Illumina 5-Base DNA Prepは、幅広いインプット量およびサンプル品質において、シーケンスに十分なライブラリー収量（ ≥ 4 nM）を生成することができます（図3）。

インプット量40 ng未満で試験した3種のFFPE腫瘍サンプル（表1）の場合、25 ngおよび10 ngのDNAインプット量で、ロバストなシーケンスメトリクスおよびメチル化検出が認められました（図4、図5）。インプット量1 ngでは、最終ライブラリー中のFFPE DNAに対するLambdaおよびpUC19ゲノムの割合が増加するため、マップリード率の低下が観察されました。これは、GDMCメチル化コントロールを省くことで、さらに軽減できる可能性があります。また、インプット量1 ngでは、カバレッジの低下と重複率の上昇が予想されます（図4）。

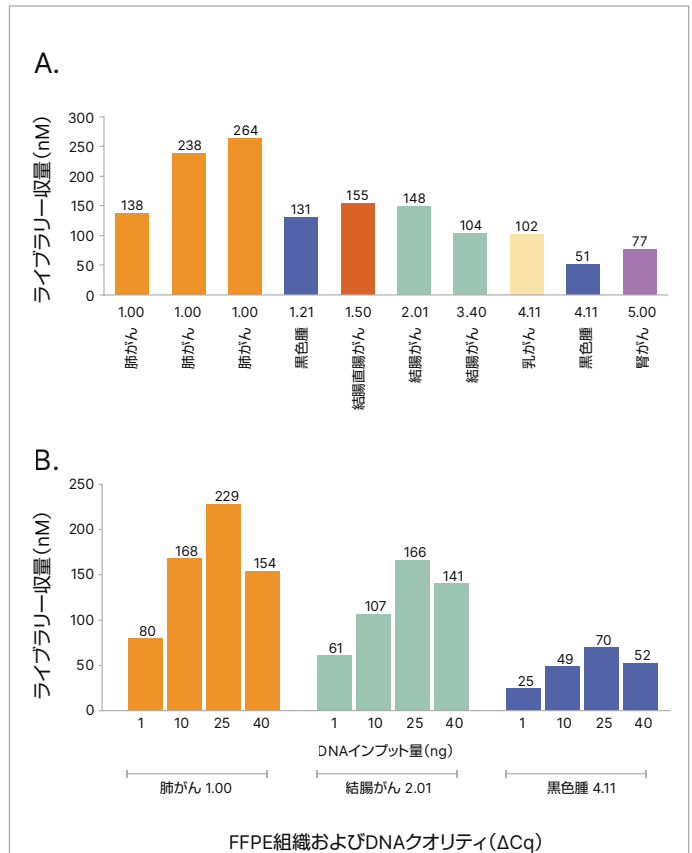


図3: Illumina 5-Base DNA Prepを用いた、インプット量とクオリティが異なるFFPE DNAに対するライブラリー収量

(A) インプット量40 ngの10種のFFPE腫瘍サンプル、および (B) 40 ng、25 ng、10 ngおよび1 ngインプット量で試験した3種のFFPE腫瘍サンプル（表1）について、プロトコルを変更し（表2）、Illumina 5-Base DNA Prepを用いた場合のライブラリー収量に関するQubitによるDNA定量。

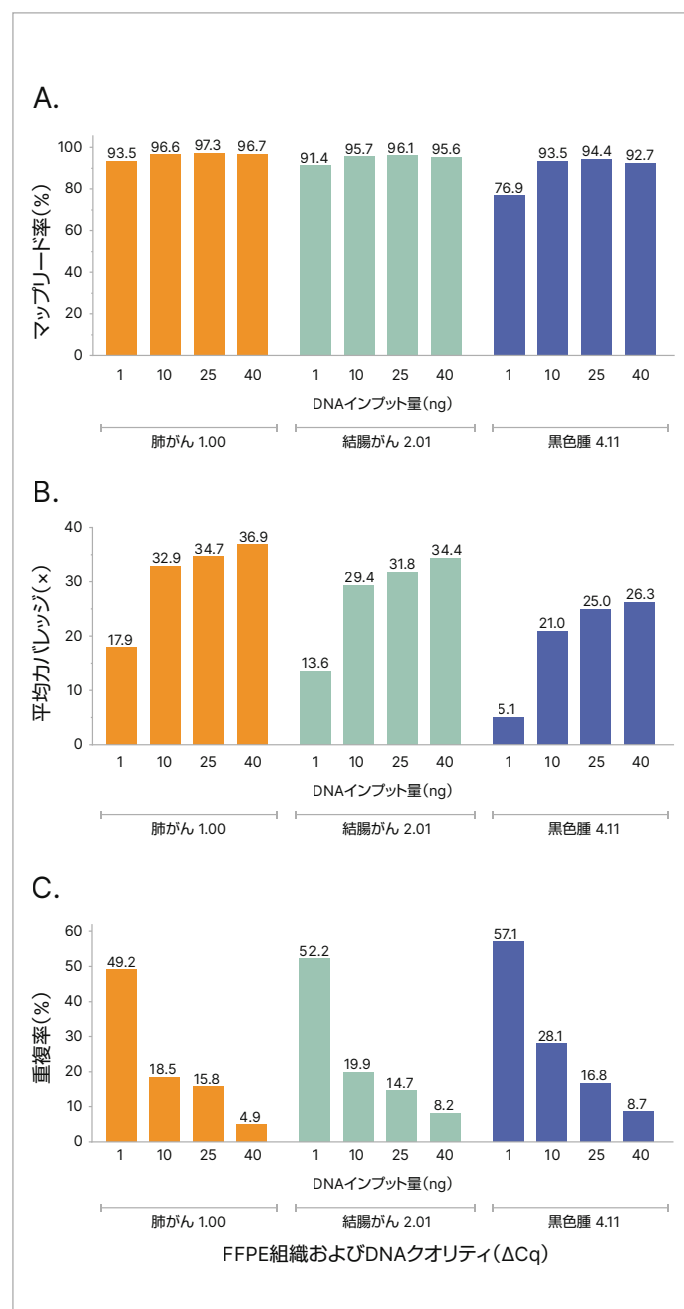


図4：幅広いインプット量のFFPE DNAに対するIllumina 5-Base DNA Prepのロバストなシーケンス性能

プロトコールを変更し(表2)、Illumina 5-Base DNA Prepを用いた場合の、インプット量40 ng、25 ng、10 ngおよび1 ngの3種のFFPE腫瘍サンプル(表1)のDRAGEN Somaticライブラリーメトリクス。インプット量10 ng超のクオリティが高いFFPE DNAは、(A) 高いマッピング率、(B) 29 x~37 x平均カバレッジ、および(C) 低い重複率を示しました。クオリティが低いFFPEサンプル(ΔCq ≥ 3) および低インプット量で30 xカバレッジを達成するには、より高いシーケンス深度が必要になる可能性があります。ライブラリーは151 bp × 2でシーケンスし、500Mクラスターまでダウンサンプリングしました。

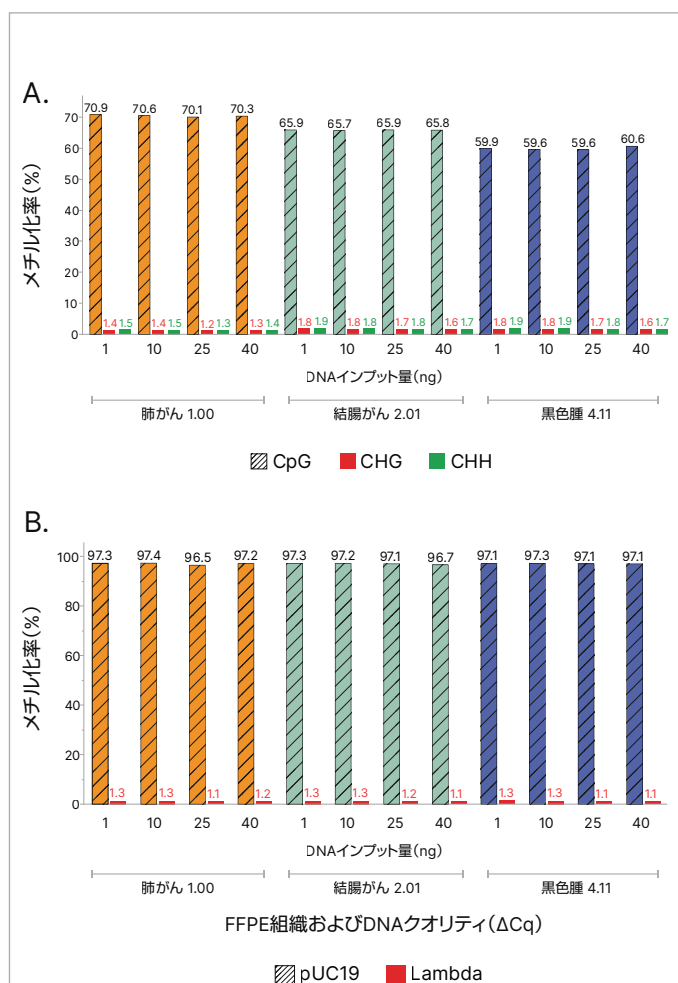


図5：Illumina 5-Base DNA Prepを用いた幅広いFFPE DNAインプット量に対するロバストなメチル化検出

プロトコールを変更し(表2)、Illumina 5-Base DNA Prepを用いた場合の、インプット量40 ng、25 ng、10 ngおよび1 ngの3種のFFPE腫瘍サンプル(表1)のメチル化メトリクス。(A) CpG、CHGおよびCHHのコンテキストにおけるシトシンのメチル化率は、いずれのインプット量でも一致しました。(B) ゲノムDNAメチル化コントロール(GDMC)由来のLambdaおよびpUC19に分類されるリードは、各DNAインプット量で高い真陽性率と低い偽陽性率を示しました。

新鮮凍結サンプルまたはWGS単独の結果と同等のFFPEサンプルの体細胞バリエーション検出

対応する腫瘍/正常細胞株を新鮮凍結またはFFPEとして処理し、Illumina 5-Base DNA Prepを用いた場合、1塩基変異 (SNV) および挿入欠失 (Indel) に対して、高感度の体細胞バリエーションコールが生成されました (図6)。100 ×/40 ×カバレッジの5-baseライブラリーのSNVおよびIndel感度は、変換していないWGSライブラリーを同等の深度でシーケンスした場合の感度の約2%以内でした。シーケンス深度を150 ×/50 ×カバレッジに増加すると、5-baseライブラリーの感度はWGSと同等になりました。ホルマリン固定は、精度に影響を及ぼすDNA損傷を引き起こしますが、FFPEサンプルの5-baseライブラリーの精度は90%を超えました (図6)。

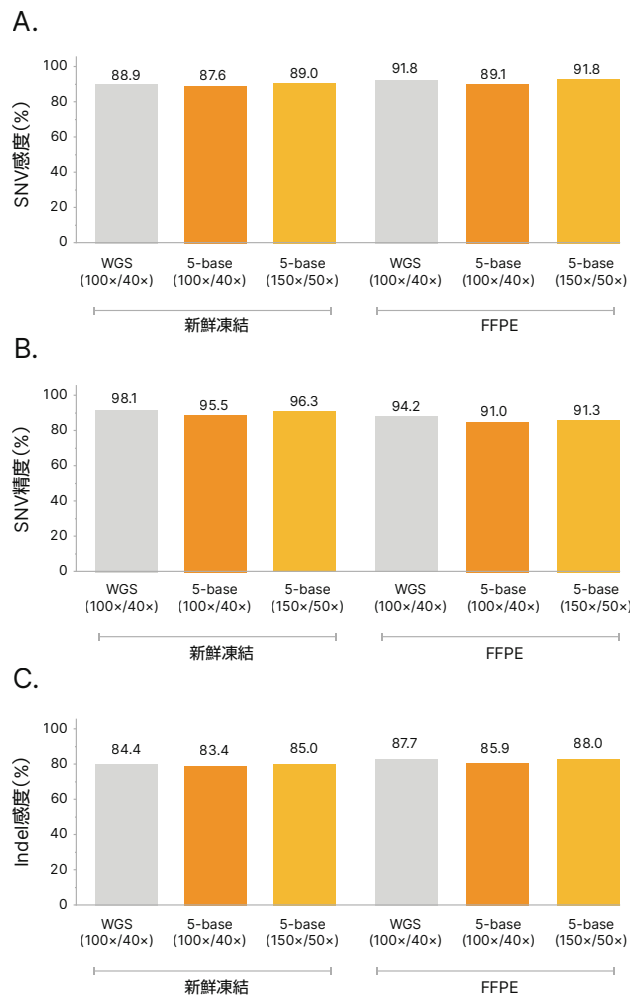


図6: Illumina 5-Base DNA Prepを用いた新鮮凍結およびFFPE処理細胞株に対するTumor-Normal体細胞バリエーションコール

新鮮凍結またはFFPE処理した、HCC1395乳がん細胞株および対応するHCC1395BL正常細胞株に対する、1塩基変異 (SNV) の (A) 感度および (B) 精度、ならびに (C) 挿入/欠失 (Indel) コールの感度。ライブラリーはIllumina 5-Base DNA Prepを用いて調製し、WGS専用コントロール (灰色) として、イルミナのメチル化変換酵素を用いずに調製したレプリケートライブラリーを含めました。データは、腫瘍サンプルに対しては100 ×カバレッジ (オレンジ) または150 ×カバレッジ (黄色) (24億または40億ペアエンドリード)、正常サンプルに対しては40 ×カバレッジ (オレンジ) または50 ×カバレッジ (黄色) (9.5億または14億ペアエンドリード) にダウンサンプリングしました。HCC1395にはSEQC2 v1.2.2 Truthセットを使用しました。

まとめ

Illumina 5-Base DNA Prepは、ゲノムシーケンスとメチロームシーケンスを1つに組合せた効率的なワークフローであり、FFPEサンプルにも対応しています。穏やかな変換ケミストリーによりDNAの品質を維持することで、クオリティが異なるFFPE DNAのデュアル解析が可能になります。簡単なアッセイの変更を行うことで、限られたサンプルインプット量からロバストな結果が得られます。Illumina 5-Base DNA Prepを用いることで、貴重な長期保存腫瘍組織から、高精度な体細胞バリエーションとメチル化検出が実現します。

詳細はこちら

[Illumina 5-Base DNA Prep](#)

[Illumina 5-baseソリューション](#)

[ゲノムおよびメチロームシーケンス](#)

参考文献

1. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. [Epigenetics in cancer](#). *Carcinogenesis*. 2010;31(1):27-36. doi:10.1093/carcin/bgp220
2. Illumina. Illumina 5-Base DNA Prep data sheet. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-5-base-dna-prep-data-sheet-m-gl-03689/illumina-5-base-dna-prep-data-sheet-m-gl-03689.pdf](#). Published 2025. Accessed June 18, 2026.

イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22 階
Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810
jp.illumina.com

 www.facebook.com/illuminakk

販売店

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。販売条件：jp.illumina.com/tc

© 2026 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc. または各所有者に帰属します。

商標および登録商標の詳細は jp.illumina.com/company/legal.html をご覧ください。

予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。

