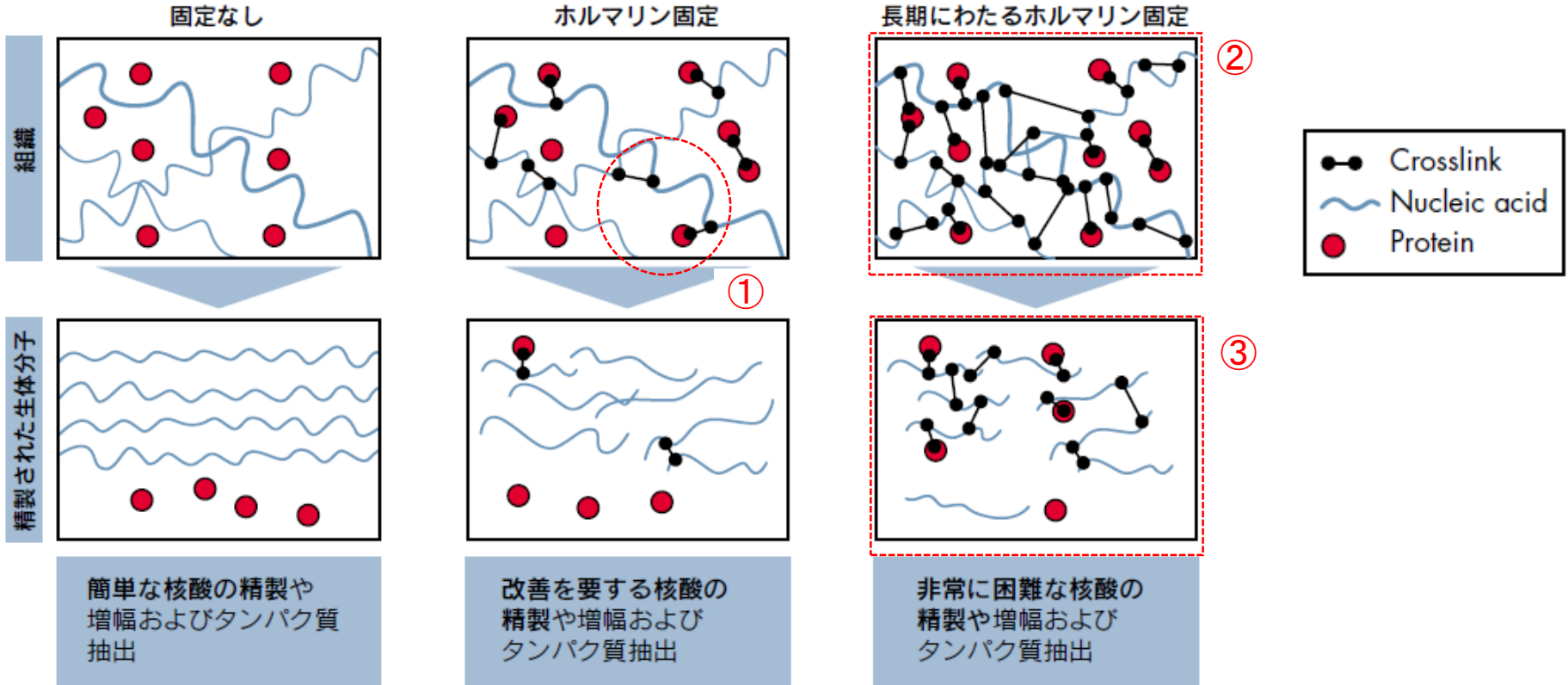




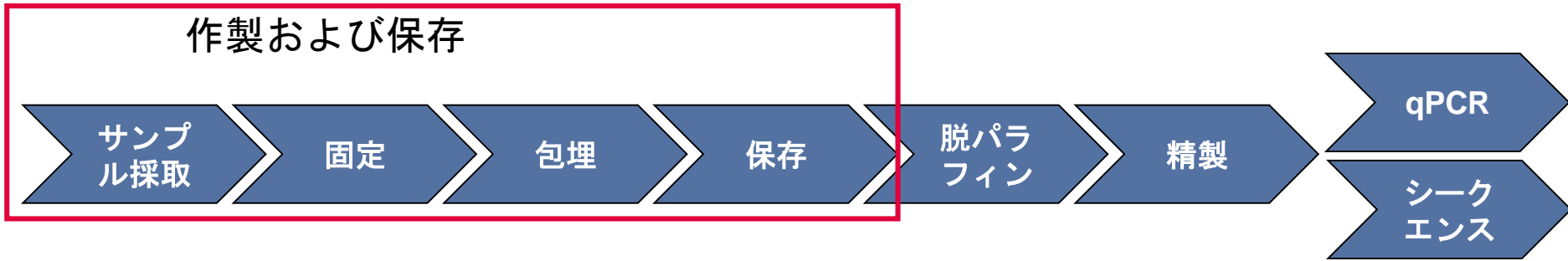
FFPE 検体の適切な前処理から遺伝子検査まで

株式会社キアゲン テクニカル・アプリケーションカスタマーサポート部



- ① ホルマリン固定により、DNA, RNAとタンパク質のアミノ基間でクロスリンク [methylene 架橋 (N-CH<sub>2</sub>-N)] が生じる
- ② 固定時間が長くなるとクロスリンクの密度が増加する
- ③ 過剰なクロスリンクにより、収量の低下、核酸の断片化、酵素反応阻害、が進む

## 作製および保存



要因	影響
固定までの時間	組織の自己分解やRNAの分解を防ぐため、摘出後の組織を出来るだけ早く固定する

# FFPEサンプルからのRNA精製: 固定時の組織のサイズ

サンプル: ラット腎臓あるいは脳

[検討条件]  $\leq 4\text{ mm}$ 、あるいは 臓器丸ごと(約1cm) の組織

ホルマリン固定/パラフィン包埋

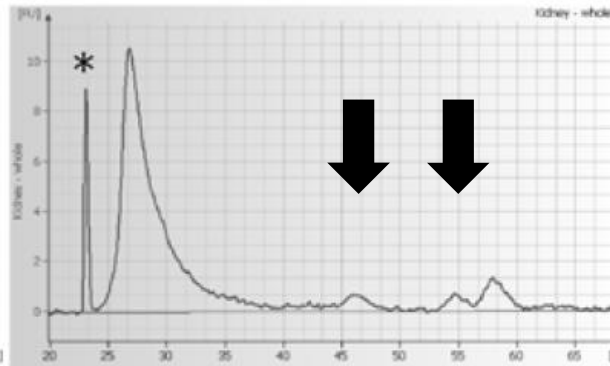
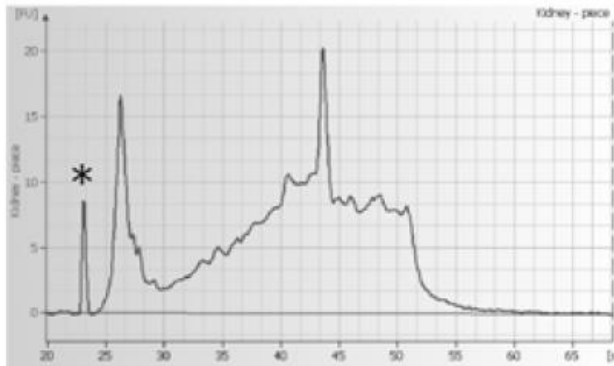
精製: 包埋3日後にRNeasy FFPE Kit を用いてRNA 精製

検出: Agilent 2100にて泳動

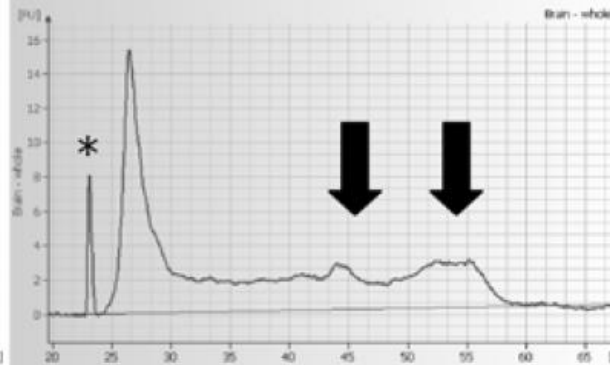
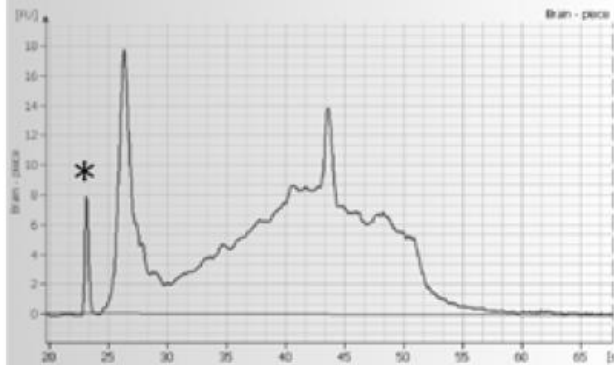
$\leq 4\text{mm}$  の組織

臓器丸ごと(約1cm)

腎臓



脳

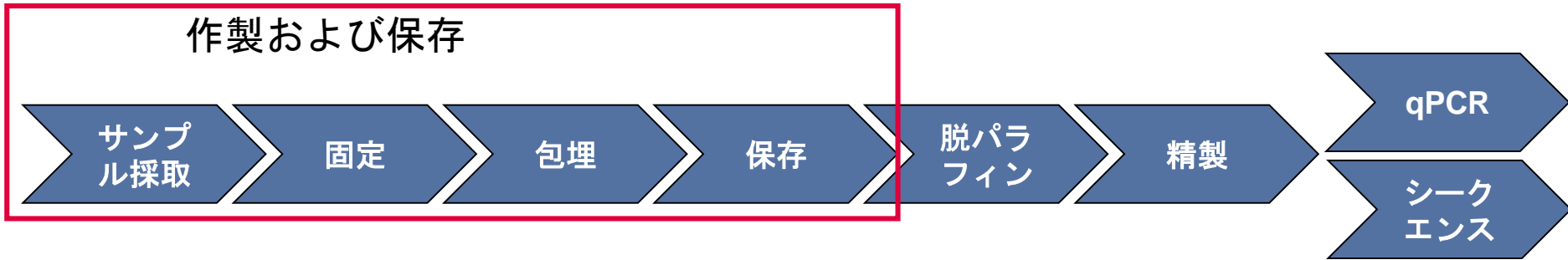


28S/18S rRNA が  
分解している

(Data excerpted from von Ahlfen et al. [2007] Determinants of RNA quality from FFPE samples. PLoS ONE 12, e1261.)

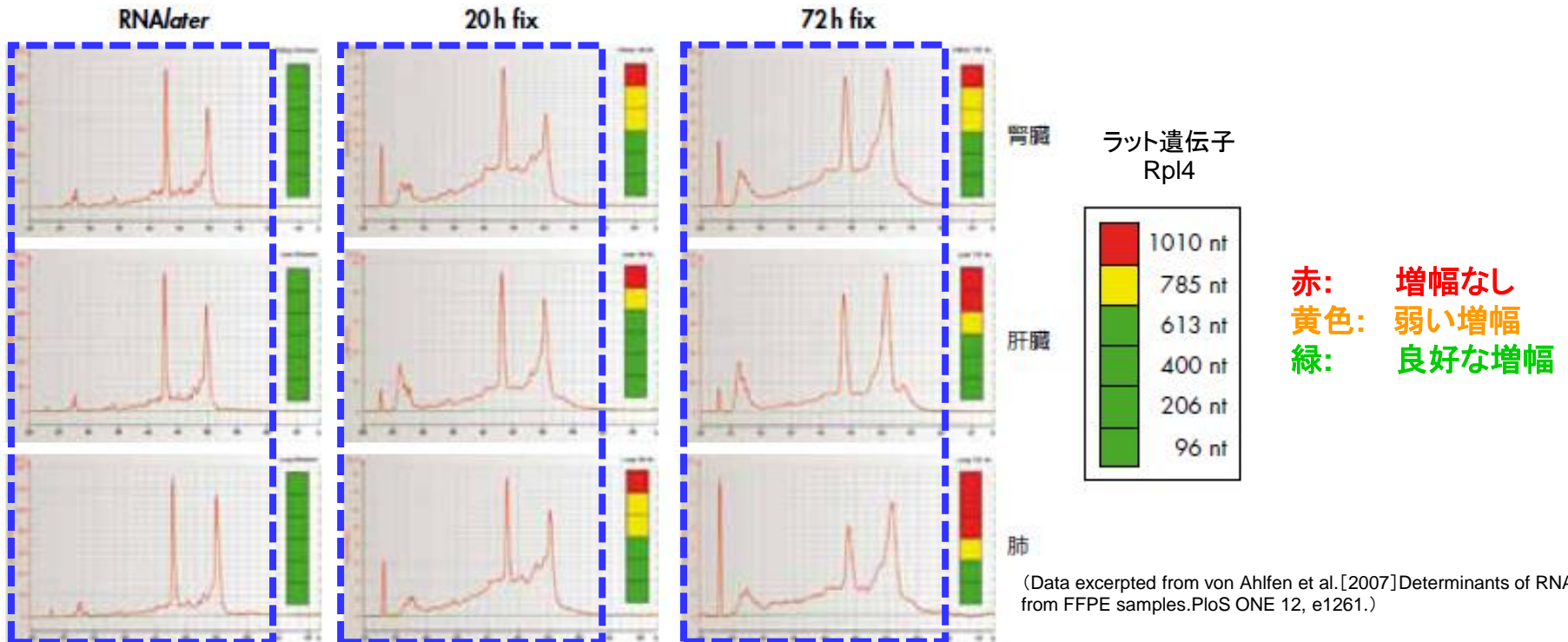
- ▶ 厚い組織のまま固定すると、組織内部の核酸が分解
- ▶ 固定時、組織は出来れば厚さ5mm以下にカットする

## 作製および保存



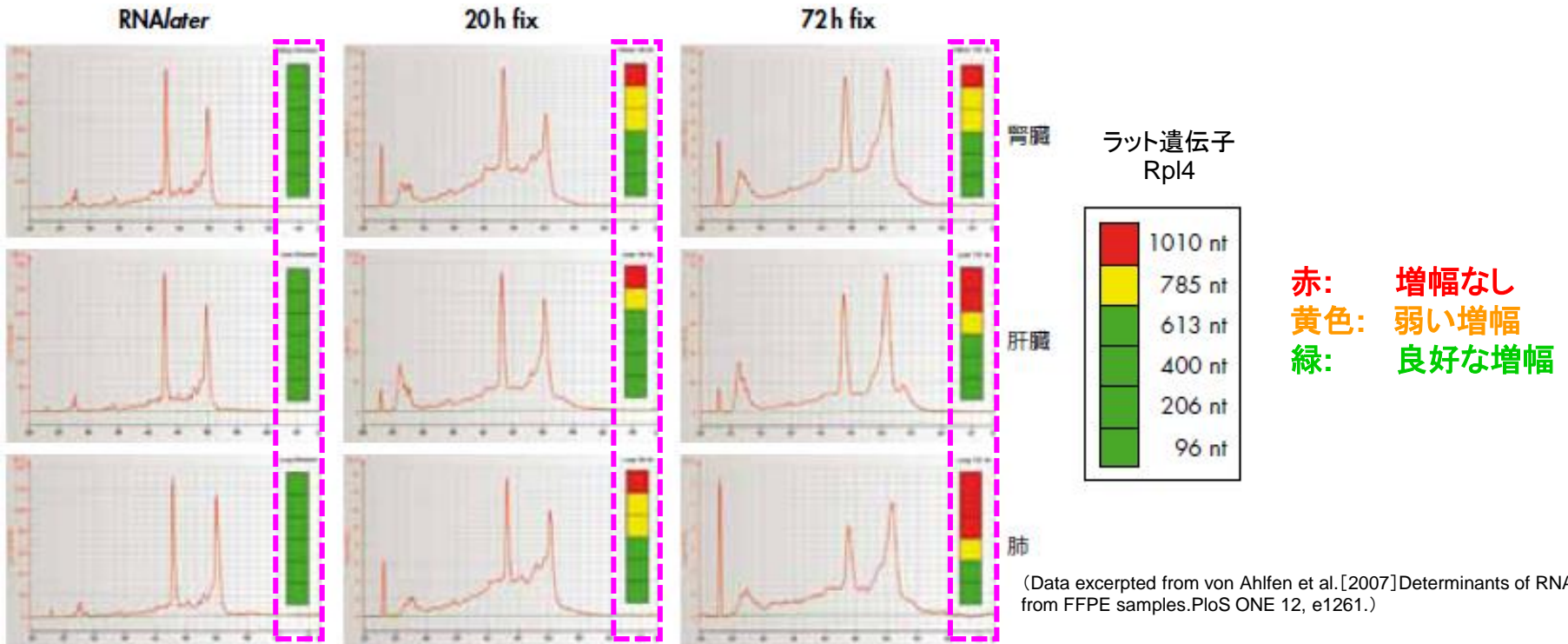
要因	影響
固定までの時間	組織の自己分解やRNAの分解を防ぐため、摘出後の組織を出来るだけ早く固定する
組織のサイズ	厚さ 5mm 以下にカットして固定を推奨
固定	ホルマリン: 中性緩衝ホルマリン (4-10% ホルマリン) を推奨。緩衝作用のないホルマリンあるいは酸性ホルマリンは、核酸の断片化が早い

**[条件検討] ホルマリン固定時間: 20hrs、72hrs、** ControlとしてRNAlaterで安定化  
 精製: 包埋3日後, RNA 精製 (RNeasy FFPE Kit)  
 泳動: Agilent 2100 Bioanalyzer  
 RT-PCR: OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) による1 ステップRT-PCR  
 Primer Assays: ラット遺伝子Rpl4 に対する、アンプリコンサイズの異なるプライマーペア



▶ 電気泳動によるIntegrity (分解の程度) に大きな差はなかった

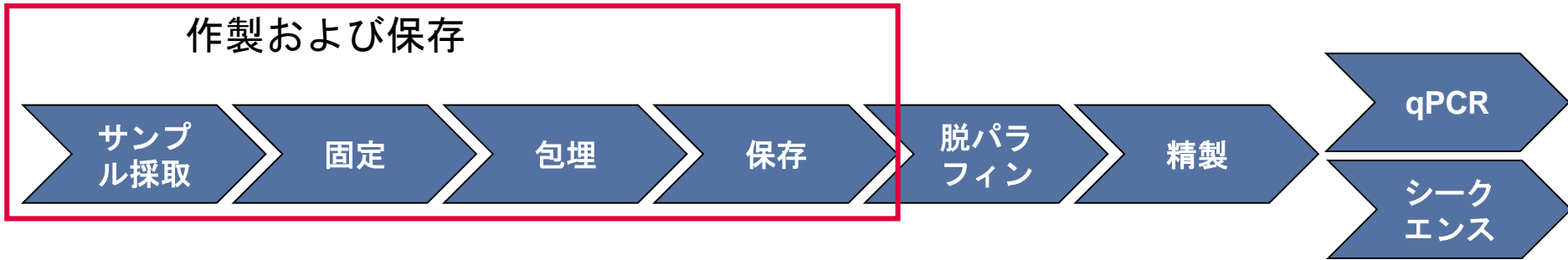
**[条件検討] ホルマリン固定時間: 20hrs、72hrs、** Control として RNAlater で安定化  
 精製: 包埋3日後, RNA 精製 (RNeasy FFPE Kit)  
 泳動: Agilent 2100 Bioanalyzer  
 RT-PCR: OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) による1 ステップRT-PCR  
 Primer Assays: ラット遺伝子Rpl4 に対する、アンプリコンサイズの異なるプライマーペア



(Data excerpted from von Ahlhen et al. [2007] Determinants of RNA quality from FFPE samples. PloS ONE 12, e1261.)

- ▶ FFPE由来の核酸は、過固定により、酵素反応が阻害される
- ▶ 酵素反応に使用できる核酸かどうかは、酵素反応を試してみないと分からない

## 作製および保存



要因	影響
固定までの時間	組織の自己分解やRNAの分解を防ぐため、摘出後の組織を出来るだけ早く固定する
組織のサイズ	厚さ 5mm 以下にカットして固定を推奨
固定	ホルマリン: 中性緩衝ホルマリン (4-10% ホルマリン) を推奨。緩衝作用のないホルマリンあるいは酸性ホルマリンは、核酸の断片化が早い 固定時間: 24hrs 以内の固定を推奨
脱水/透徹	包埋前の不完全な脱水により、その後、核酸の断片化や Proteinase K の阻害(水分に含まれるホルマリンによる)が生じる 再利用したエタノールやキシレンには水分が蓄積されるため、出来るだけ未使用なエタノール/キシレンを使用し、十分に脱水する
包埋/保存	包埋: (RNA 精製の場合) 低融点のパラフィンを推奨



サンプル: ラット脾臓

**[条件検討]** 包埋3日(T<sub>0</sub>)後、4°C、室温(RT)、37°C で1年間保存後

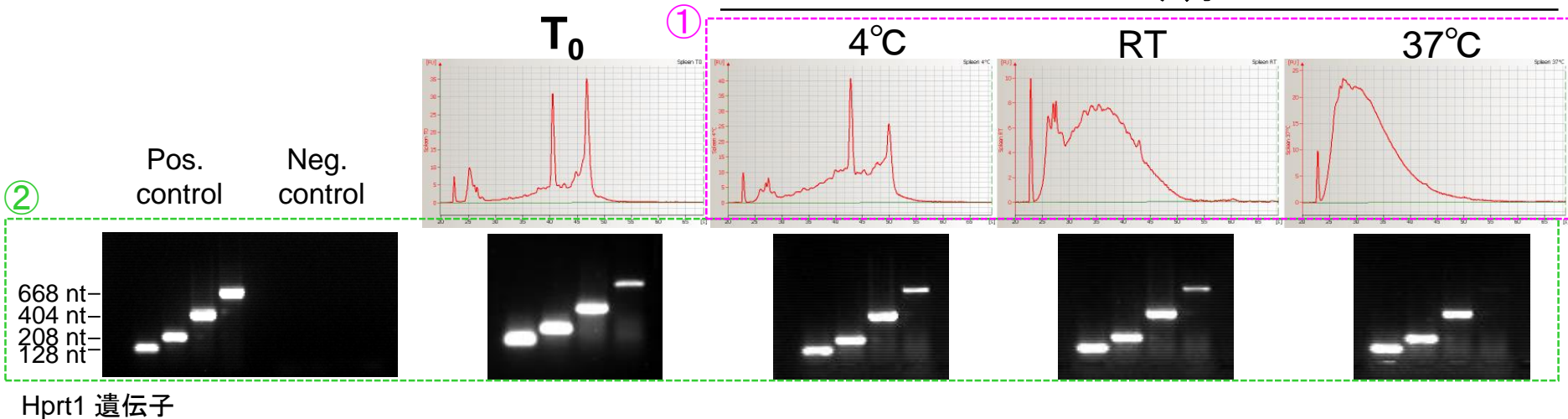
精製: RNeasy FFPE Kit

泳動: Agilent 2100 Bioanalyzer

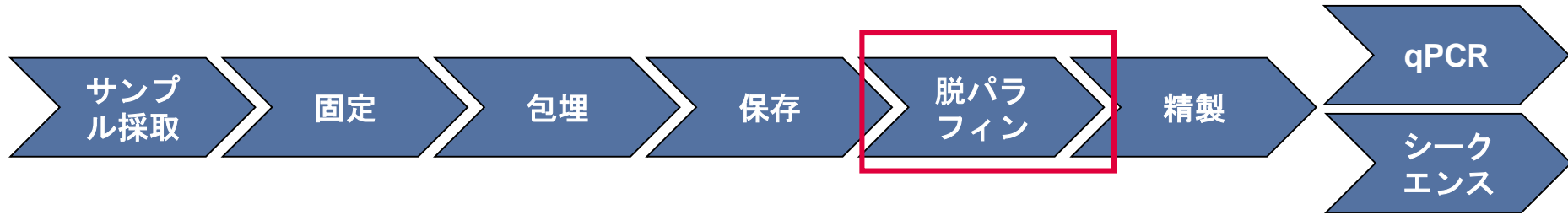
RT-PCR: QIAGEN OneStep RT-PCR Kit を用いた1ステップRT-PCR

Primer Assay: ラットHprt1 遺伝子に特異的なアンプリコンサイズの異なるプライマーペア

12ヶ月



- ① FFPEサンプル由来RNAは、保存温度が高い程分解が進む
- ② アンプリコンサイズを小さくする事で、検出の可能性が高くなる





## Deparaffinization Solution

キシレンに代わる、脱パラフィン試薬  
キシレンのような劇物ではないため**ハンドリング**や保管が**容易**  
遠心によるペレット化 / 上清除去の操作が無く、ロスが少ない  
単品販売、又は GeneRead DNA FFPE Kit に付属

## キシレンを用いる方法

- ✓ 切片をチューブに入れる
- ✓ キシレン1mlを添加しボルテックスミキサーで10秒間混合する。
- ✓ **遠心し、上清をピペットで除去する。**

## Deparaffinization Solutionを用いる方法

- ✓ 溶解bufferを添加し
- ✓ 遠心する。溶けたパラフィン、上層に
- ✓ 下層にProteinase Kを添加し、ピペッティングで混合



ペレット化しない

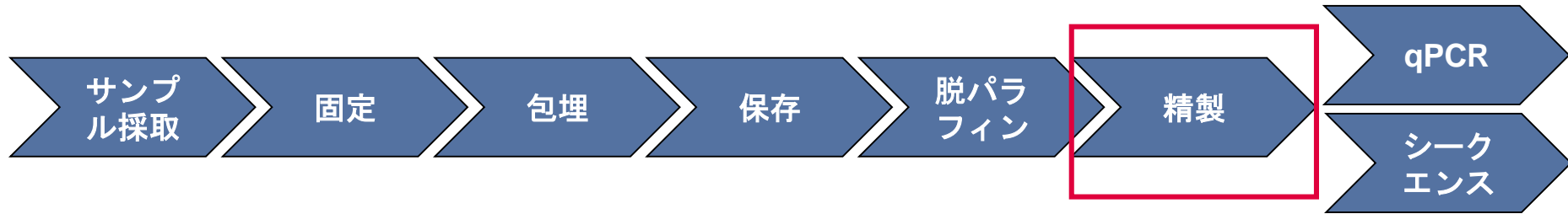


静電気で浮いてしまう



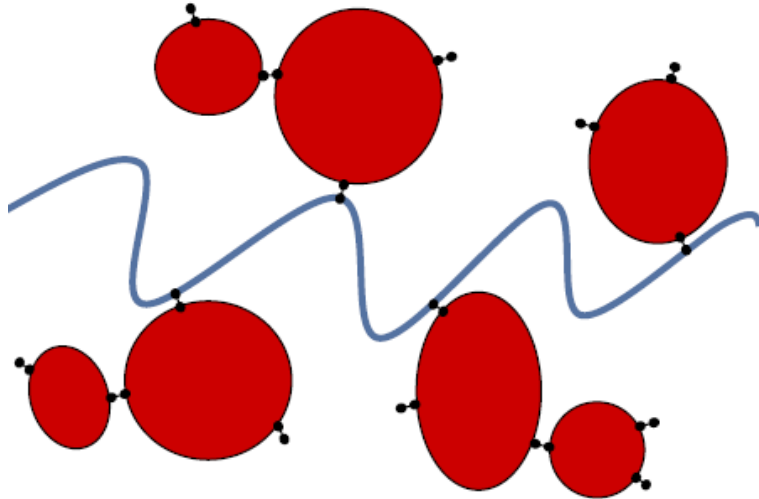
ペレット作製の必要無し

: 使用する精製キットによって、Deparaffinization Sol. の使用方法は異なります

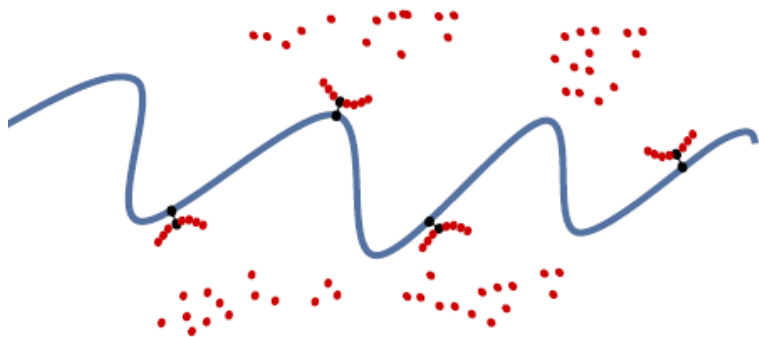


## 1. Proteinase K 処理

- ✓ ホルマリンクロスリンクされた核酸 - タンパク質から **タンパク質を分解**
- ✓ **核酸の可溶化**
- ✓ methylene架橋はProteinase K で解離せず、核酸 - アミノ酸間の結合は維持され、得られた核酸は酵素反応が阻害される

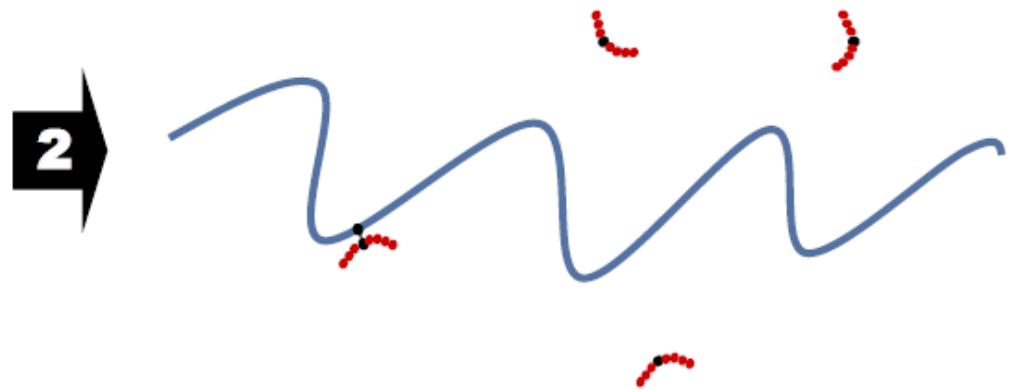


**1**



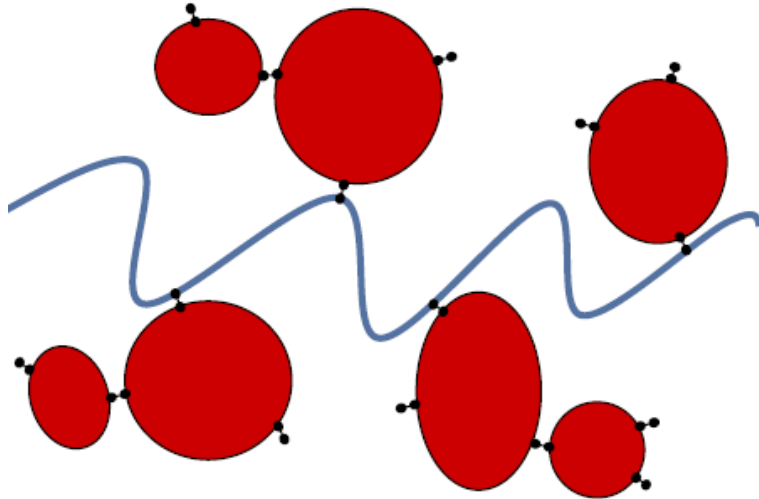
**2**

● Protein  
● Amino Acid  
~ Nucleic acid

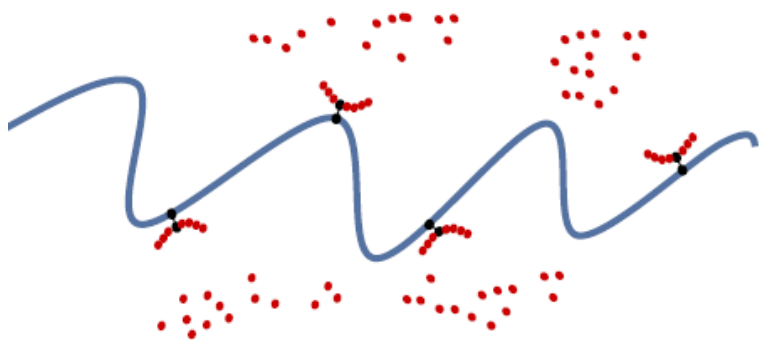


## 1. Proteinase K 処理

- ✓ ホルマリンクロスリンクされた核酸 - タンパク質から **タンパク質を分解**
- ✓ **核酸の可溶化**
- ✓ methylene架橋はProteinase K で解離せず、核酸 - アミノ酸間の結合は維持され、得られた核酸は酵素反応が阻害される

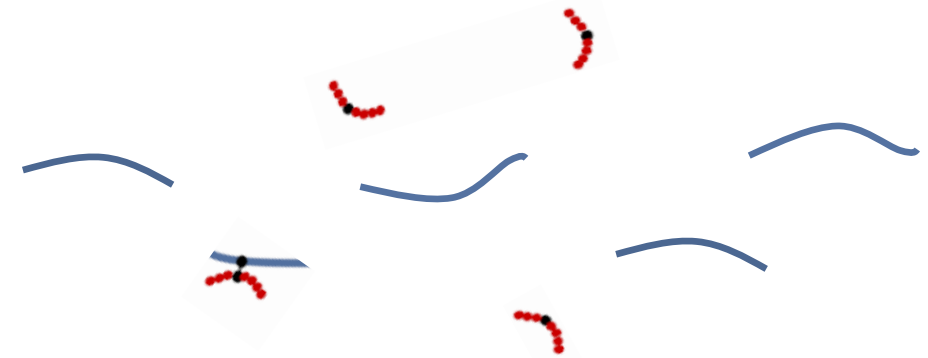


**1**



● Protein  
● Amino Acid  
~ Nucleic acid

**2**





**QIAamp DNA FFPE Tissue Kit**  
FFPE サンプルからのgDNA精製



**RNeasy FFPE Kit**  
FFPE サンプルからのトータルRNA 精製 (70nt 以上)

**miRNeasy FFPE Kit**  
FFPE サンプルからの 18 nt以上のRNA を含むトータルRNA 精製

**AllPrep DNA/RNA FFPE Tissue Kit**  
1つのFFPE切片からDNAおよびRNAをそれぞれ精製



## 収量 (ug) による脱クロシリンクの最適化

サンプル: ラット肝臓FFPE 切片  
Proteinase K 処理, 56°C, 1 時間

[条件検討]

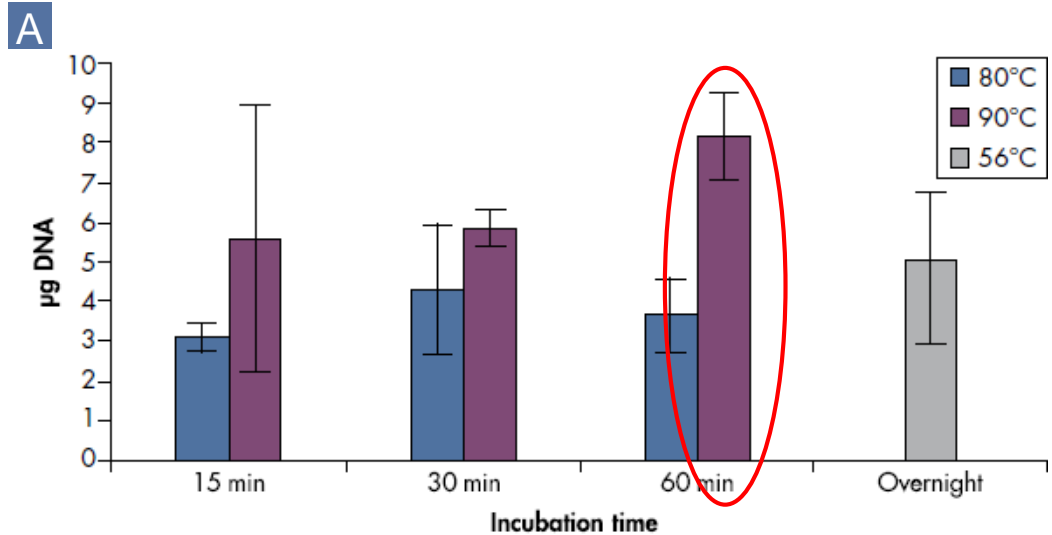
15min: 80°C、90°C

30min: 80°C、90°C

60min: 80°C、90°C

Overnight: 56°C (Control)

精製: QIAamp DNA FFPE Tissue Kit  
定量: 分光光度計



## 酵素反応 (Ct 値) による最適化

サンプル: ラット肝臓FFPE 切片  
Proteinase K 処理, 56°C, 1 時間

[条件検討]

15min: 80°C、90°C

30min: 80°C、90°C

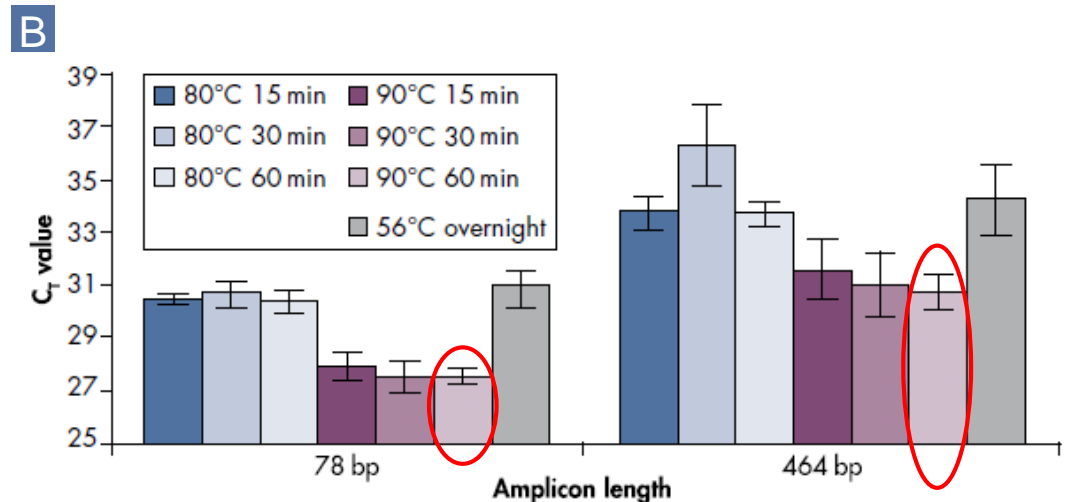
60min: 80°C、90°C

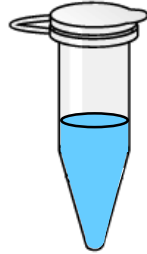
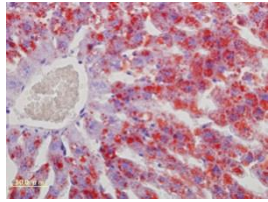
56°C: Overnight (Control)

精製: QIAamp DNA FFPE Tissue Kit  
定量: qPCR

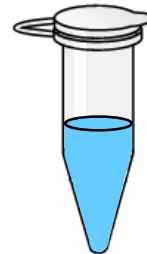
QuantiTect SYBR Green PCR Kit

Pmp2 遺伝子 (増幅産物; 78 bp あるいは 464 bp)

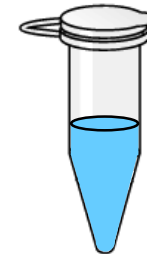




パラフィン除去



56°C 1時間  
Proteinase K処理  
溶解



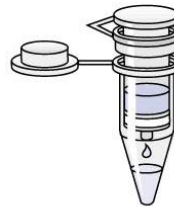
90°C 1時間加熱  
脱クロスリンク



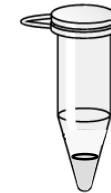
DNA結合



洗浄



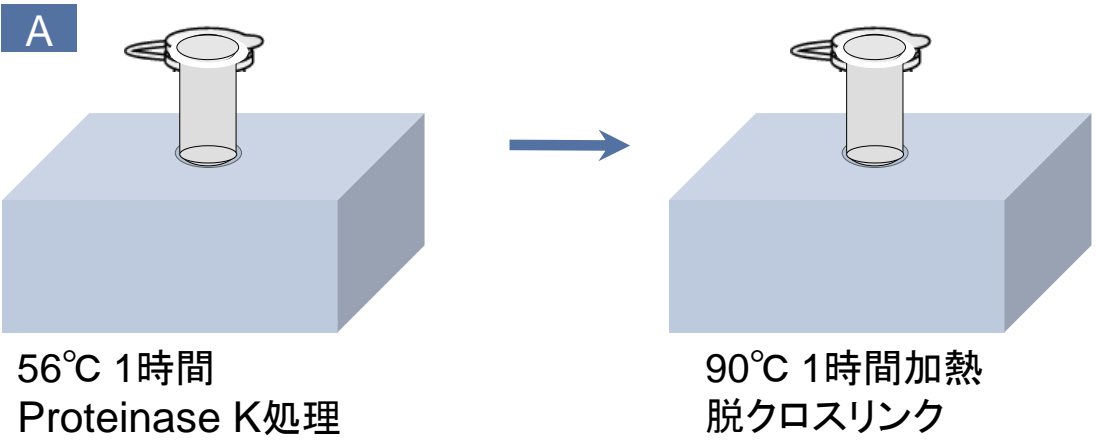
溶出



Ready-to-use DNA

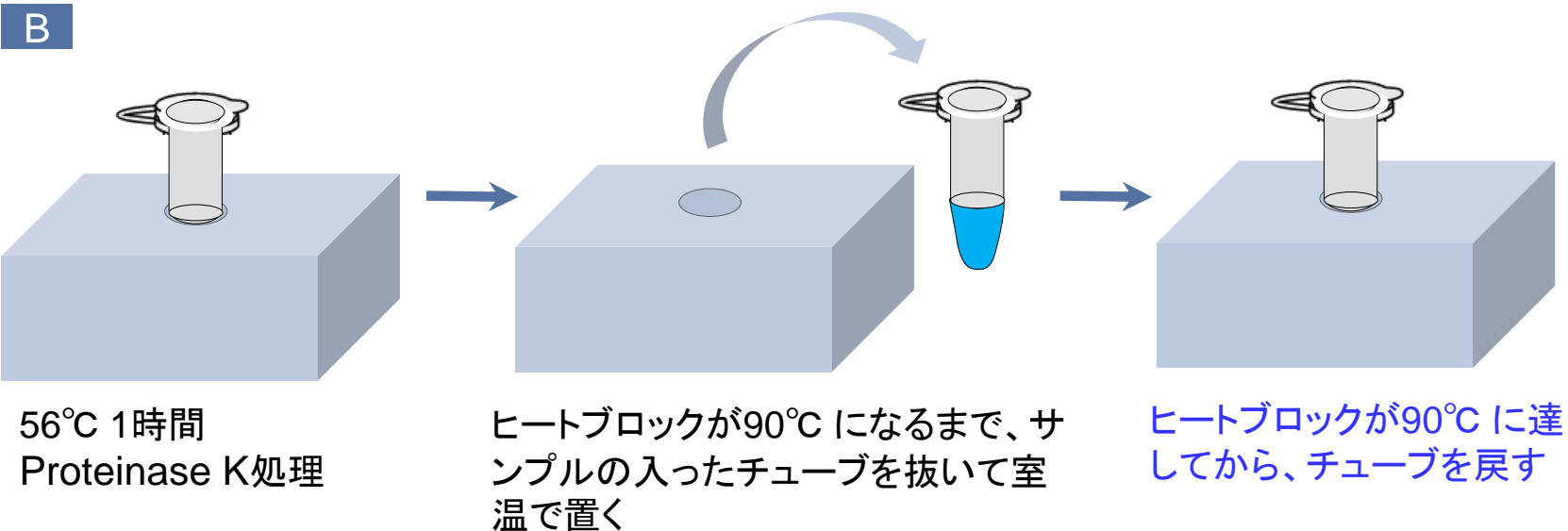
組織サンプルを溶解した後、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit の操作は 30 分以内

▶ 56°Cから90°Cの反応が重要

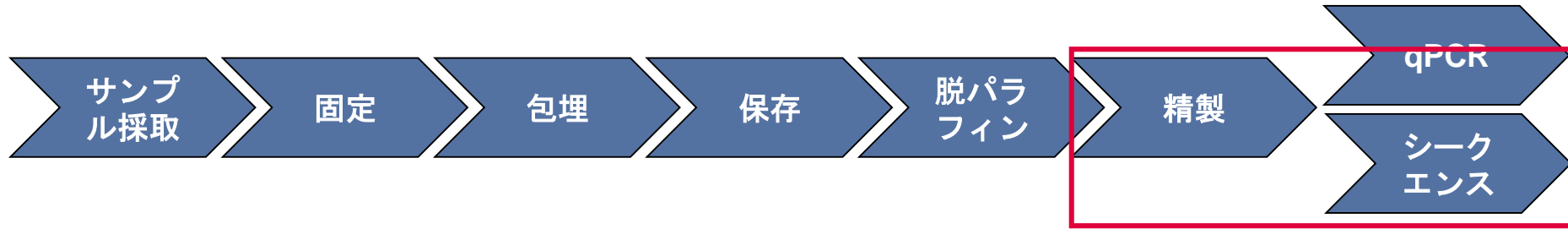


56°Cから90°Cへの温度上昇過程で、サンプルに余計な熱量を与えてしまう

**核酸の断片化  
推奨しない**



**▶ 90°Cの熱処理は、1時間厳守が重要**



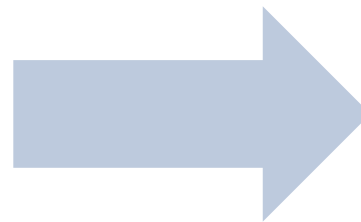
# ホットトピックス: FFPE 中のDNA 塩基置換

## Technical Advance

A High Frequency of Sequence Alterations Is Due to Formalin Fixation of Archival Specimens

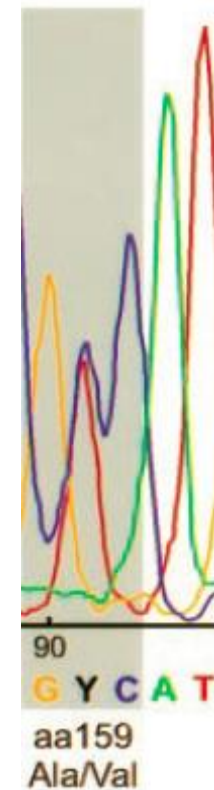
Williams et al., 1999. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol* 155(5): 1467-1571

凍結サンプル



変異 C → T

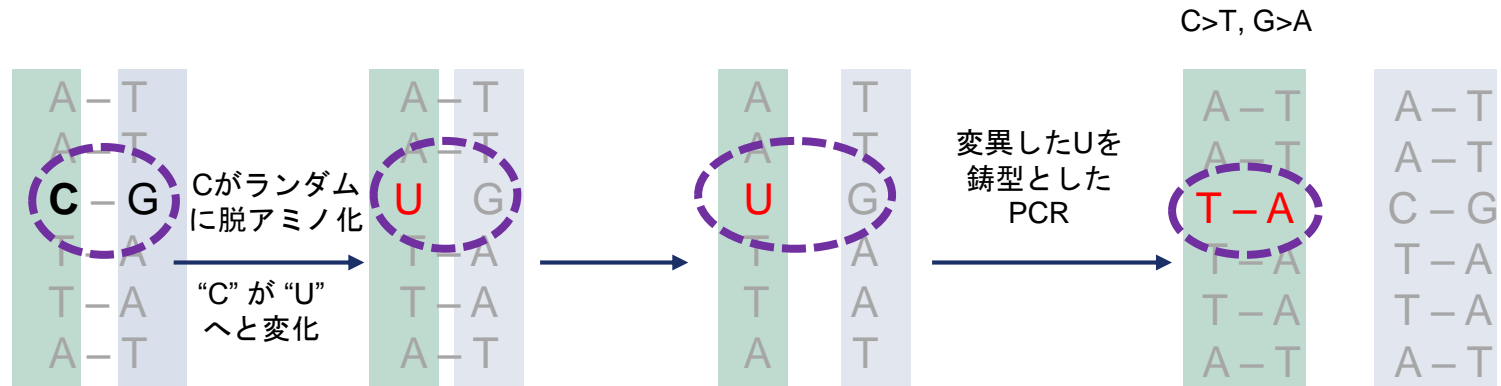
FFPEサンプル



▶ FFPE サンプルのDNA には、アーティフィシアルな塩基置換が生じる

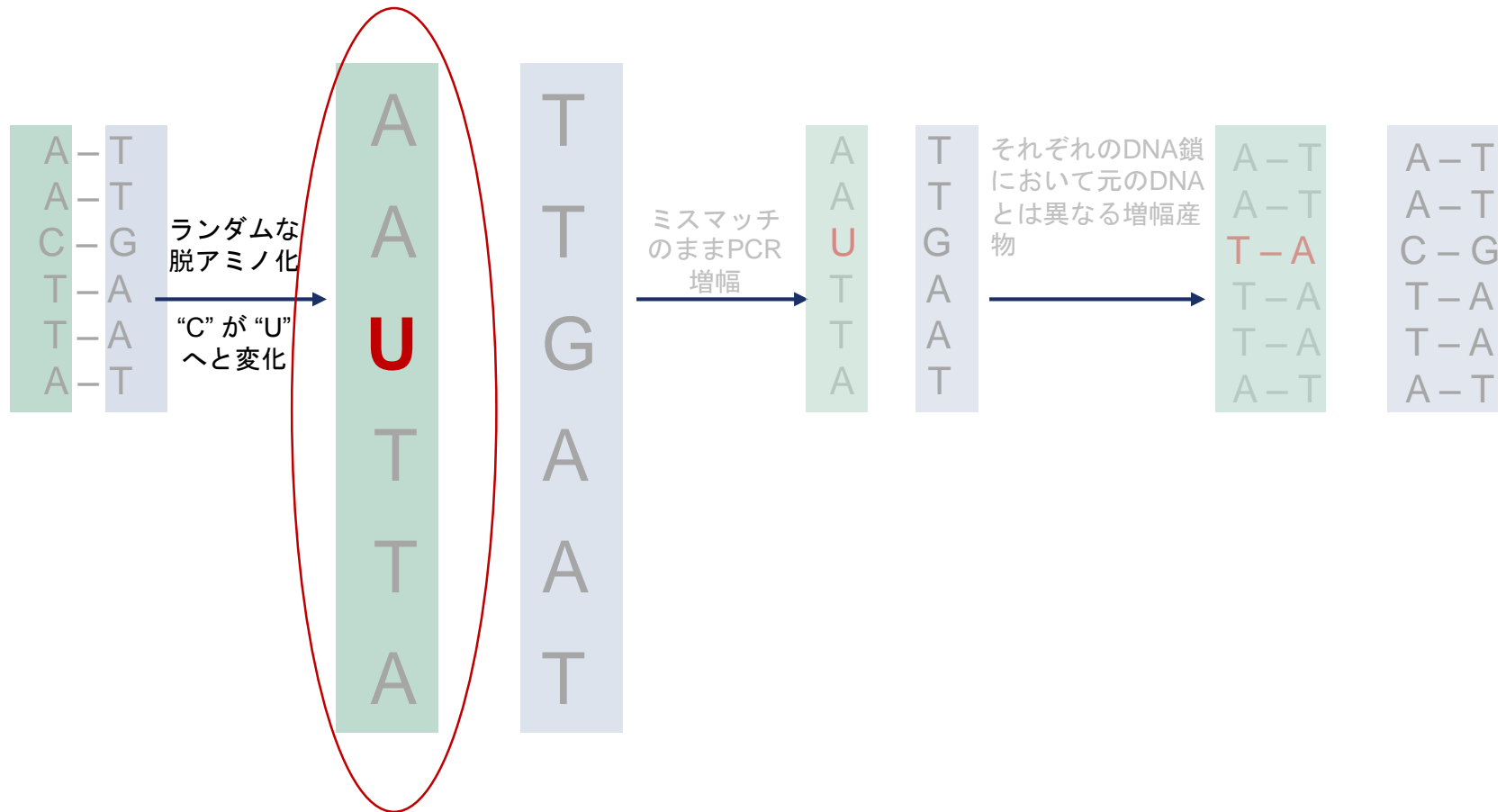
# FFPE 中のDNA 塩基置換：シーケンス結果への影響

- FFPEサンプルのDNAのシトシンが脱アミノ化され、シトシンはウラシルへと変換される
- この変換は、ホルマリン固定と保存期間中にランダムに起こると考えられている
- この反応の機序はまだ分かっていない

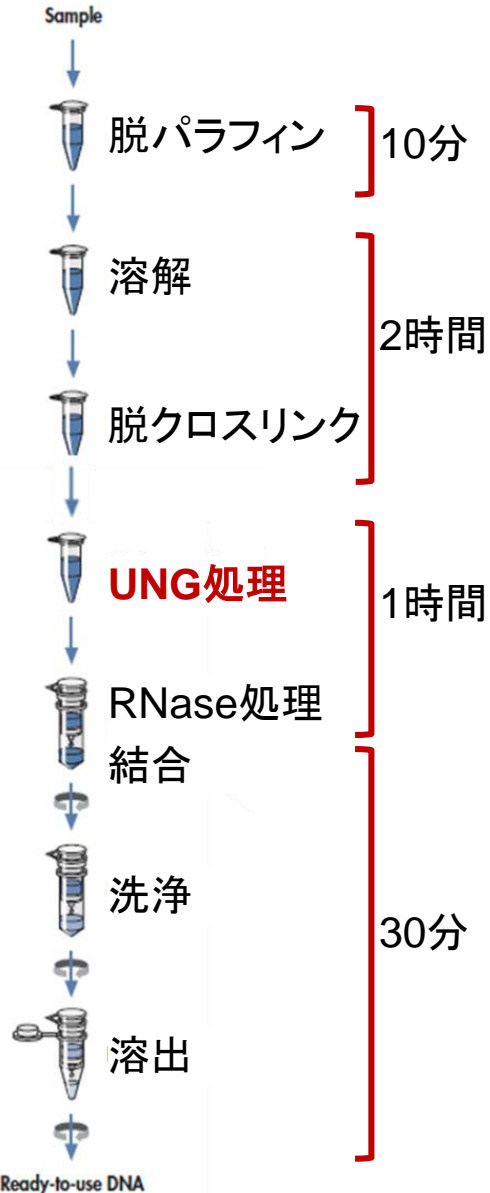


- ▶ 変換したUはPCRによりTとなり、シーケンスによってC>T 又は G>A の変異として検出される
- ▶ 擬陽性の変異として検出されてしまう

# FFPE によって置換した塩基の除去



▶ uracil- DNA glycosylase (UNG)により分解・除去が可能



## UNG 処理付きFFPE DNA 精製キット GeneRead DNA FFPE Kit

- ✓ FFPE サンプルからDNAを精製する過程にUNG 処理があり、アーティフィシナルな変異部位を除去し、gDNA 精製する

- ▶ FFPE によるC > Tの変異はランダムに起きるため、変異頻度は低くなる
- ▶ UNG 処理により除去される変異は、変異頻度が低い事が予想される



# UNG 処理による擬陽性変異の除去

- ✓ サンプル: 15年前に作成した肝臓由来カルシノーマFFPE サンプル
- ✓ 精製: **UNG 無し** (QIAamp FFPE) および **UNG 有り** (GeneRead FFPE)
- ✓ 変異検出: 次世代シーケンス: GeneRead DNAseq Comprehensive Cancer Panel (QIAGEN)

Chrom	Pos	COSMIC ID	dbSNP ID	Gene Name	Ref	Var	QIAamp FFPE	GeneRead FFPE
chr1	226595647	COSN392383	rs907187	PARP1	C	G	0.95	1.00
chr2	29416481	COSM1130802	rs1881420	ALK	T	C	1.00	1.00
chr2	48032105	COSM13342	-	MSH6	C	T	0.13	0.00
chr3	30713126	COSM149346	rs11466512	TGFBR2	T	A	0.51	0.45
chr3	47125385	COSM149376	rs4082155	SETD2	G	A	0.59	0.63
chr4	1807130	COSM327089	-	FGFR3	C	T	0.16	0.00
chr4	55152040	COSM22413	rs2228230	PDGFRA	C	T	0.63	0.67
chr4	55595519	COSM12708	rs121913516	KIT	C	T	0.31	0.56
chr5	35861068	COSM149813	rs1494558	IL7R	T	C	0.53	0.50
chr5	35871190	COSM149814	rs1494555	IL7R	G	A	0.49	0.47
chr5	35875593	COSN167436	rs987106	IL7R	A	T	0.66	0.49
chr5	180036871	COSN167671	rs2242219	FLT4	C	G	0.60	0.59
chr7	55214348	COSM42978	rs2072454	EGFR	C	T	1.00	1.00
chr9	21968199	COSM14251	rs11515	CDKN2A	C	G	0.99	0.99
chr9	139397707	COSM33747	rs10521	NOTCH1	G	A	1.00	1.00
chr11	64572018	COSM255213	rs2959656	MEN1	T	C	0.99	1.00
chr12	121426785	COSM46438	-	HNF1A	G	A	0.20	0.00
chr16	3828705	COSM970602	-	CREBBP	C	T	0.10	0.00
chr17	41244000	COSM148277	rs16942	BRCA1	T	C	0.40	0.52

- ▶ **UNG無し** で検出された変異頻度の低い4つの変異は **UNG有り** で除去されており、アーティフィシヤルな変異だった
- ▶ その他の変異の変異頻度はほとんど変わらない
- ▶ UNG 処理はアーティフィシヤルな変異は除去し、真の変異には影響しない

実証データ⑧

FFPE ブロックの保管期間延長による塩基置換アーティファクトの生成と UNG 処理によるアーティファクトの除去効果

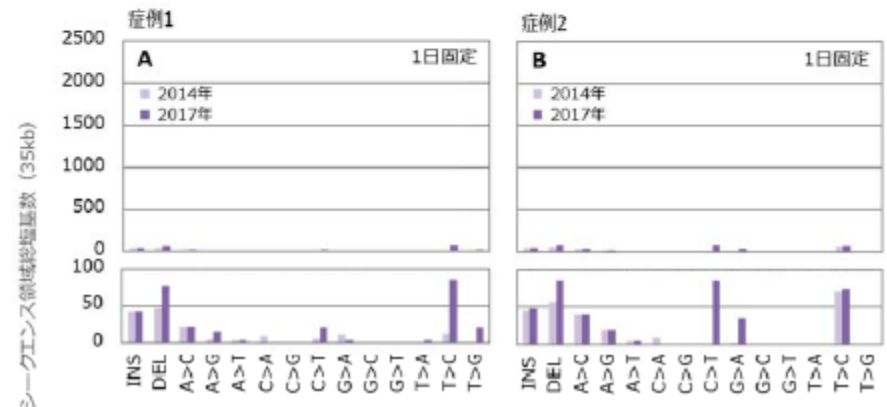
HOME > 新着情報 > 「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」

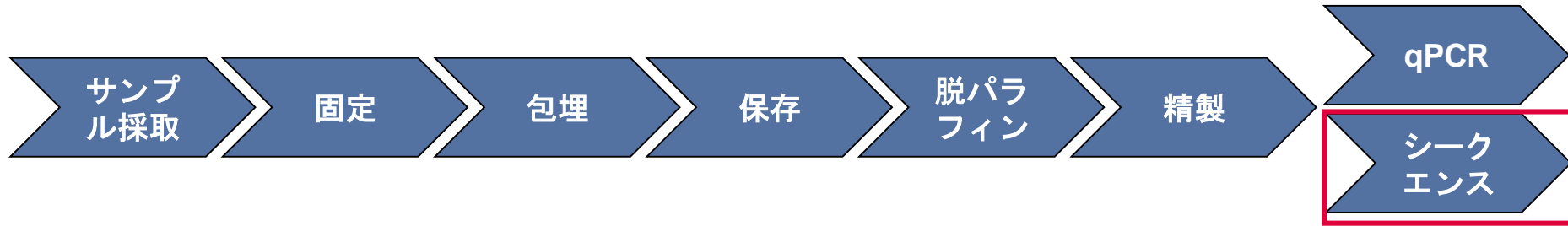
「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」

《内容》

- ・ 1日および3日固定を施した2症例の大腸癌手術検体を対象に TruSeq Amplicon Cancer Panel (イルミナ社) を用いたアンプリコンシークエンスによる解析を実施した。解析は2014年 (FFPE ブロック作製直後) および2017年 (作製3年後) の2回実施した。
- ・ 2017年に実施した解析では、UNG 処理の効果を確認するため、3日固定検体を用いて、2種の核酸抽出キット (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit [処理なし] および GeneRead DNA FFPE Kit [処理あり]; キアゲン社) を用いた比較検討を行った。

ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程





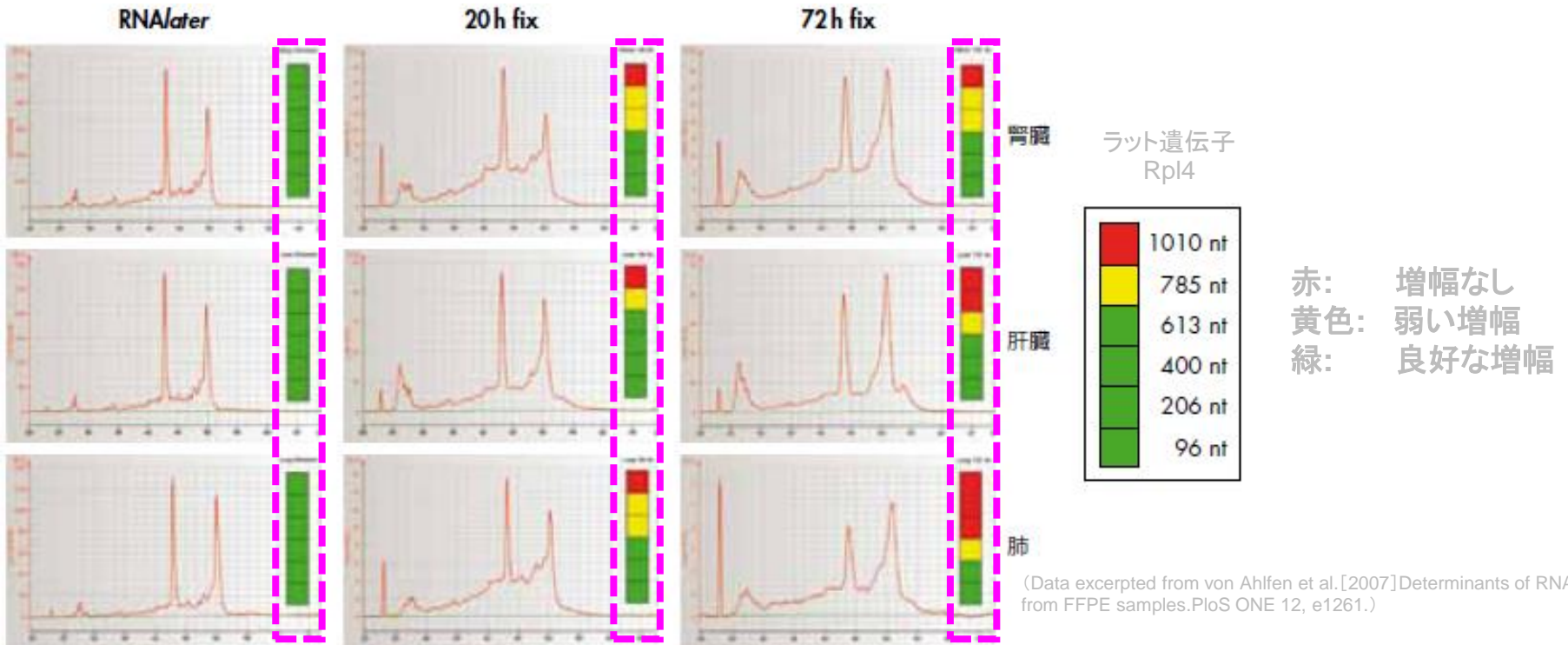
[条件検討] ホルマリン固定時間: 20hrs、72hrs、 Control として RNAlater で安定化

精製: 包埋3日後, RNA 精製 (RNeasy FFPE Kit)

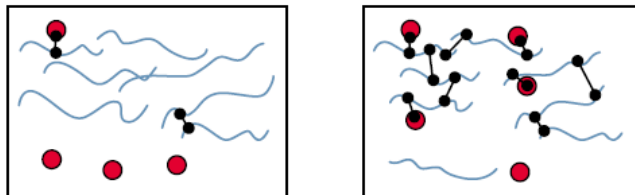
泳動: Agilent 2100 Bioanalyzer

RT-PCR: OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) による1 ステップRT-PCR

**Primer Assays: ラット遺伝子Rpl4 に対する、アンプリコンサイズの異なるプライマーペア**

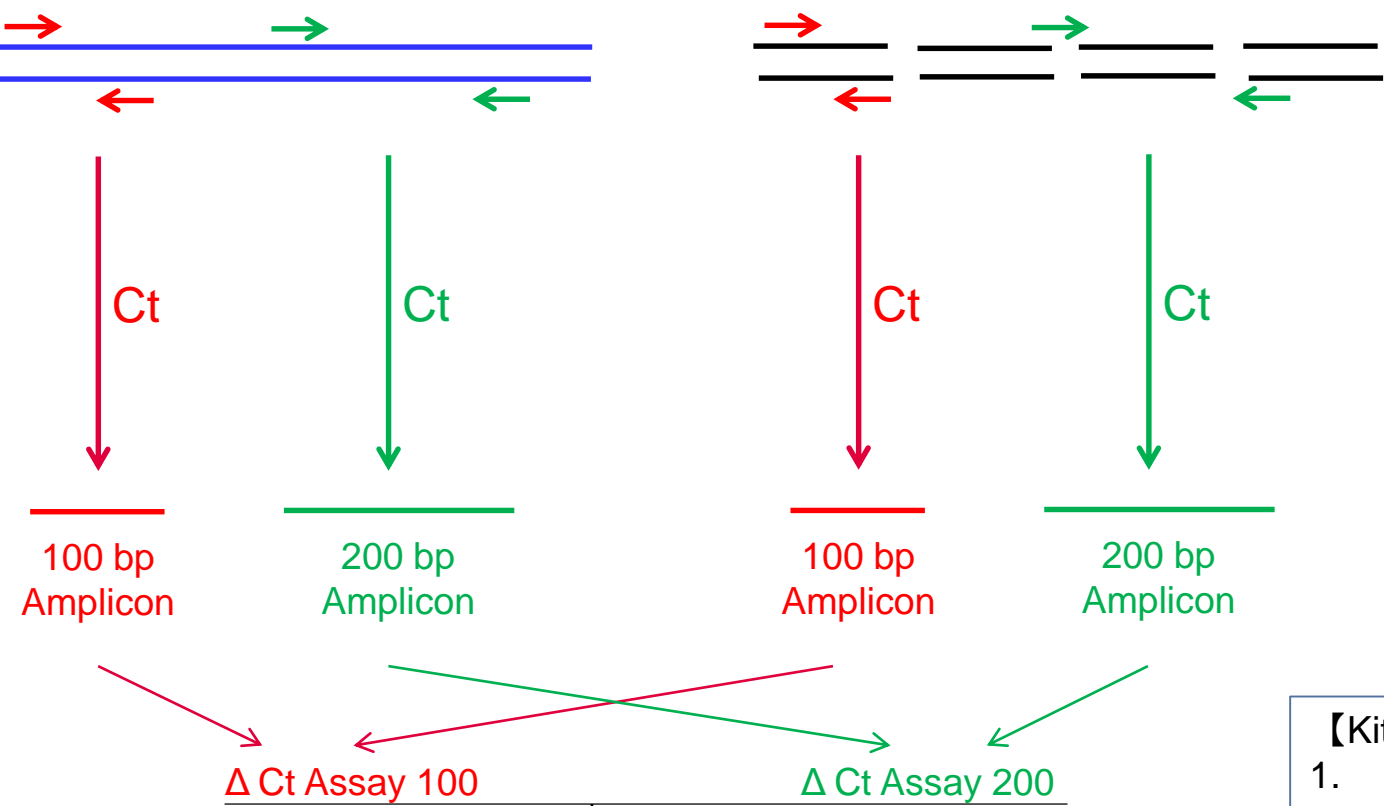


(Data excerpted from von Ahlfen et al.[2007]Determinants of RNA quality from FFPE samples.PloS ONE 12, e1261.)



Intact Control DNA (Kit 付属)

FFPE DNA (fragmented DNA)



増幅可能なDNAの量と長さを評価

【Kit 内容】

1. ヒトgDNA用Primer  
Assay 100bp  
Assay 200bp
2. ヒト Control DNA (Intact)
3. SYBR Green Mastermix

## 関数入りデータ解析用エクセル

Row Ct 値をペースト

Well	Raw Data
A01	26.67
A02	26.52
A03	26.59
A04	26.47
A05	26.46
A06	26.59
A07	29.76
A08	30.15
A09	30.13
A10	30.05
A11	29.84
A12	29.85
B01	28.19
B02	28.13
B03	27.89
B04	28.97
B05	29.01
B06	28.93
B07	27.44
B08	31.29



Sample ID	Quality Control Results		
	Assay QC	QC Score	QC Call
#1 B909142	Pass	0.025	High
#2 B909143	Pass	0.038	High
#3 B909144	Pass	0.028	High
#4 B909145	Pass	0.031	High
#5 B909146	Pass	0.052	Low
#6 B909147	Pass	0.067	Low
#7 B909154	Pass	0.045	Low

QC score  $\leq 0.04$  => 最大100ng DNA を使用

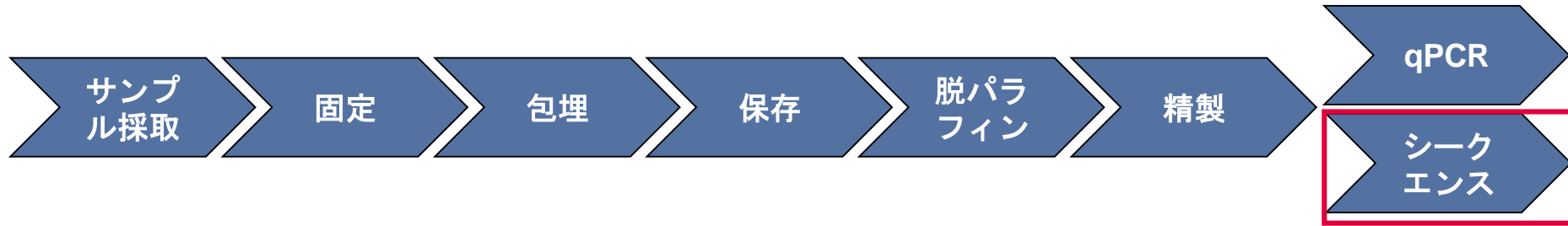
QC score  $> 0.04$  => 最大250ng DNA を使用

推奨 Input DNA量

Sample ID	Quality Control Results			Sample Conc. (ng/μL)	Sample Vol. to Use (μL)	Sample Amount to Use (ng)	Comment
	Assay QC	QC Score	QC Call				
#1 B909142	Pass	0.025	High	15.94	2.5 – 6.3 μL	40–100ng	
#2 B909143	Pass	0.038	High	21.97	1.8 – 4.6 μL	40–100ng	
#3 B909144	Pass	0.028	High	32.03	1.2 – 3.1 μL	40–100ng	
#4 B909145	Pass	0.031	High	23.71	1.7 – 4.2 μL	40–100ng	
#5 B909146	Pass	0.052	Low	18.01			We do not recommend proceeding with this sample
#6 B909147	Pass	0.067	Low	16.56			We do not recommend proceeding with this sample
#7 B909154	Pass	0.045	Low	45.52	2.6 – 5.5 μL	120–250ng	
#8 B909155	Pass	0.038	High	10.22	3.9 – 9.8 μL	40–100ng	

QC スコアが悪く (長いアンプリコンの増幅が悪い)  
シーケンスに進む事を推奨しない

▶ qPCR 法にて、QIAseq DNA Panel 用にFFPE DNA の増幅可能な量や、  
シーケンス可否を予測することが出来る



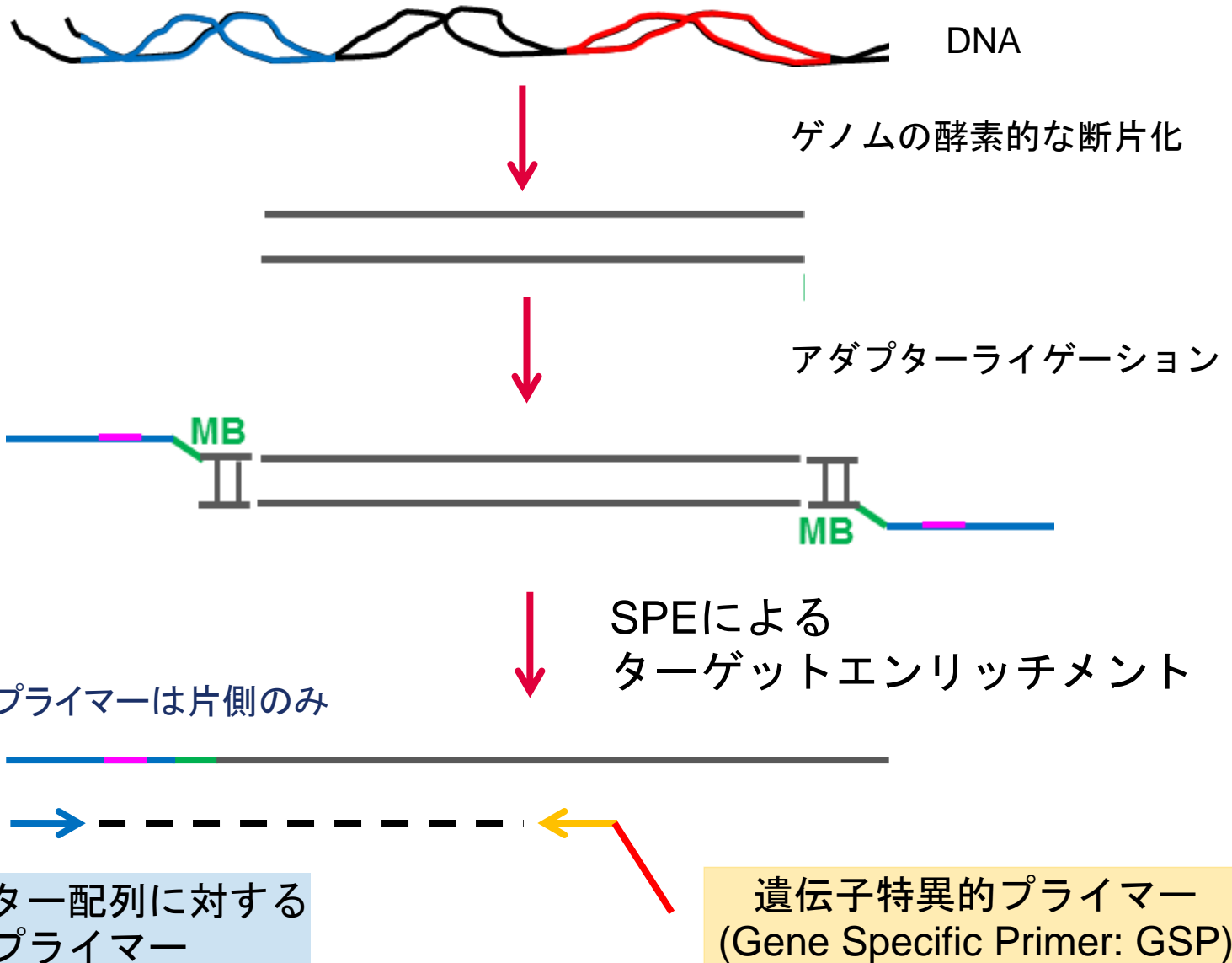


分子バーコードを使用した、正確な変異検出NGS パネル

## 特徴

1. マルチプレックスPCR により、最少10 ngのDNAインプット量
2. 分子バーコードにより擬陽性を排除
3. 片側遺伝子特異的プライマー(SPE\_Single Primer Extension) 技術

Panel	Variant (Cat) number	Number of genes	Number of primers	Type of coverage
<b>Breast cancer panel</b>	DHS-001Z	93	4,831	全エクソン
<b>Colorectal cancer panel</b>	DHS-002Z	71	2,929	全エクソン
<b>Myeloid Neoplasms panel</b>	DHS-003Z	141	5,887	全エクソン
<b>Lung cancer panel</b>	DHS-005Z	72	4,149	全エクソン
<b>Actionable solid tumor panel</b>	DHS-101Z	23	651	全エクソン or ホットスポット
<b>BRCA1 and BRCA2 panel</b>	DHS-102Z	2	223	全エクソン
<b>BRCA1 and BRCA2 Plus panel</b>	DHS-103Z	6	348	全エクソン
<b>Pharmacogenomics panel</b>	DHS-104Z	39	146	SNPs
<b>Mitochondria panel</b>	DHS-105Z	Chromosome M	222	全クロモソーム
<b>Inherited diseases panel</b>	DHS-3011Z	298	11,579	全エクソン
<b>Comprehensive cancer panel</b>	DHS-3501Z	275	11,311	全エクソン

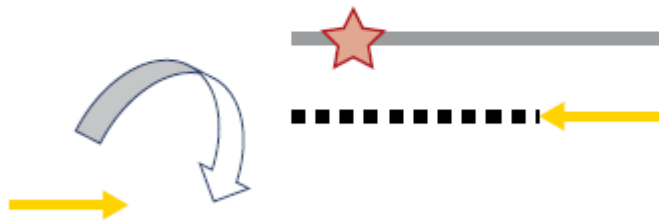


## PCR

通常組織由来の長い DNA 断片



FFPE や cfDNA 由来の短い DNA 断片



## SPE

アダプター



アダプター



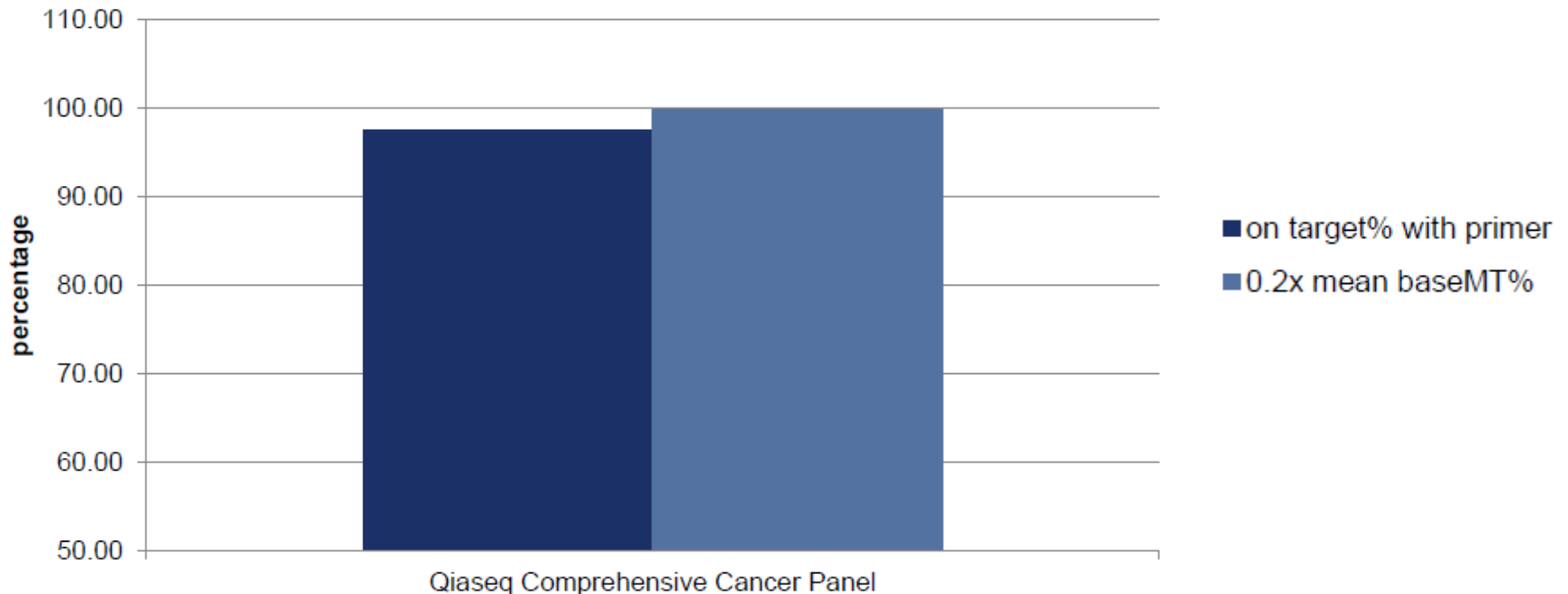
← アダプター  
に対するプライマー

← 遺伝子特異的な  
プライマー

- 片側 遺伝子特異的プライマーがアニーリングすれば増幅可能

# FFPE sample の結果

- QIAseq DNA Comprehensive Cancer Panel  
11,311 primers, 約836 Kb
- Horizon HD700 Standard DNA  
NA24385 DNA にて 1:5 x 希釈  
40ng
- NextSeq Mid Output Kit  
130M reads, 2800 mean baseMT, average 5.6 readpairs/MT
- **約 97% On Target reads, 99% coverage uniformity**





Question ?