

FAQs

1. Foli-seq™ データの一般的な特徴（例：遺伝子、サンプルあたりのカウント数、これらの指標の異なる範囲でどのような解析が可能か）を教えてください。

一般的に、当社の Foli-seq™ アプローチでは、凍結融解サイクルが 3 回未満のサンプル（直接凍結または保存液に採取）の場合、標的転写産物に 75%以上がアラインされたシーケンスリードを生成します。 Zymo DNA/RNA Shield や 100%エタノールなどの推奨バッファーでサンプルを採取した場合、アライメント率はさらに高くなります（90%以上）。

通常、500~1000 倍の深度（使用する遺伝子パネルに応じて 100 万~600 万リード）でシーケンスを行い、多様なコホートにおいて標的遺伝子の 90%以上を確実に検出・定量化できます。

いくつかの標準的な解析が可能であり、これには（1）バイオマーカー発見のための遺伝子発現差解析、（2）細胞型デコンボリューション、そして（3）遺伝子セット濃縮による経路活性のプロファイリングなどが含まれますが、これらに限定されません。

保存状態の悪いサンプル（例えば、凍結融解サイクルを繰り返したサンプル）の場合、低発現転写産物が失われるためアライメント率が低下する可能性があります。高発現遺伝子は PCA オーディネーションや差次的発現解析などの一般的な解析において定量化可能です。

2. Foli Bio プラットフォームは特定の転写産物を標的とするのでしょうか、それとも全トランスクリプトームのシーケンスを試みるのでしょうか？

Foli Bio 社の Foli-seq™ プラットフォームは、特定の遺伝子パネルを標的とするように設計されています。このアプローチにより、高い感度が得られ、より多くの有用な遺伝子を安定して検出できることがわかっています。これは、高頻度で発現する転写産物（例えばリボソームタンパク質）の過剰サンプリングを回避することで実現できます。これらの転写産物はシーケンスの読み取り結果を支配し、低頻度ながら生物学的に重要な転写産物のシグナルを希釈してしまう可能性があるためです。

Foli Bio 社は、さまざまな用途に最適化された複数のパネルを設計・検証しました。これには、（1）免疫系に特化した 500 遺伝子パネル、（2）腸管機能に特化した 1,800 遺伝子パネル、（3）全トランスクリプトームにわたるほぼすべての主要経路をプロファイリングする 11,000 遺伝子以上のユニバーサルパネルが含まれます。

これらのパネルは、一般的な経路特異的な知見を補完的に利用することで、新たなバイオマーカーの発見につながります。さらに、当社は製薬会社や学術機関と積極的に連携し、特定の疾患に合わせたカスタマイズされ

たパネルを設計しています。例えば、粘膜損傷のモニタリングに特化した遺伝子パネルを社内で開発・検証しました。

3. 糞便中の Foli-seq™ プロファイルにはどのような細胞型が含まれると予想され、どのように決定されたのでしょうか？

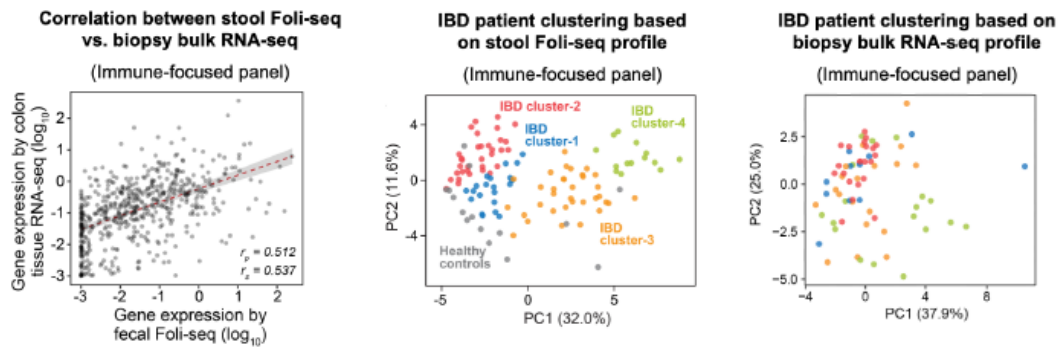
健常者および IBD 患者コホートのデータに基づくと、糞便中の宿主トランスクリプトームプロファイルは主に腸管上皮細胞（健常者コホートで優勢）および粘膜由来の免疫細胞（患者コホートで有意に増加）からの剥離 RNA を表しています。細胞型の構成は、確立された細胞型特異的マーカー遺伝子の発現に基づき計算的デコンボリューションを用いて解析することで推定され、吸収性腸上皮細胞、杯細胞、パネート細胞、および免疫細胞（T 細胞、好中球、マクロファージなど）の明確な特長が認められました。

さらに、細胞型シグナルには疾患部位特異的な違いが観察されました。例えば、大腸症状のみのクローン病患者と比較して、回腸症状のある患者では、小腸のパネート細胞のマーカー遺伝子として知られる DEFA5 および DEFA6 の糞便中発現が有意に増加していました。

4. 糞便検体 Foli-seq™ で得られた特徴は、生検および血清測定で得られた同等の特徴とどの程度相關するのでしょうか？

生検との比較：患者コホートデータに基づくと、Foli-seq で測定した糞便中の宿主トランスクリプトームと、大腸内視鏡検査にて採取した対となる大腸組織生検 RNA-seq データとの間に、中程度の強さの相関が認められました（ $rp = 0.512$ 、 $rs = 0.537$ ）。なお、便検体と生検検体は同時期に採取されたわけではなく、採取時期は 1 週間以内でした。

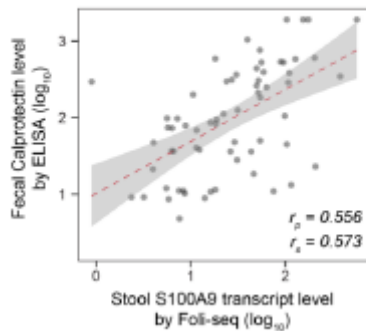
さらに、生検 RNA シーケンスデータを用いた主成分分析（PCA）では、Foli-seq™ による糞便宿主トランスクリプトームプロファイルで観察されたような、患者コホートの明確なクラスター化は認められませんでした。これは、生検サンプルから得られる細胞型のばらつきが大きいこと、および、このようなバルク RNA シーケンス測定におけるノイズの多いシグナルに起因する可能性があります。下図参照。



Confidential – Exempt from Disclosure

糞便カルプロテクチンとの比較： Foli-seq™ で測定した S100A9 転写産物レベル と ELISA で測定した糞便カルプロテクチンタンパク質レベルの間には、中程度の強さの相関関係が認められました ($r_p=0.556$ 、 $r_s=0.573$)。糞便カルプロテクチンの変動性や、糞便サンプルが 7 年以上保存されていたという事実にもかかわらず、このような相関関係が認められました。下図参照。

Correlation between S100A9 level by stool Foli-seq vs. fecal calprotectin

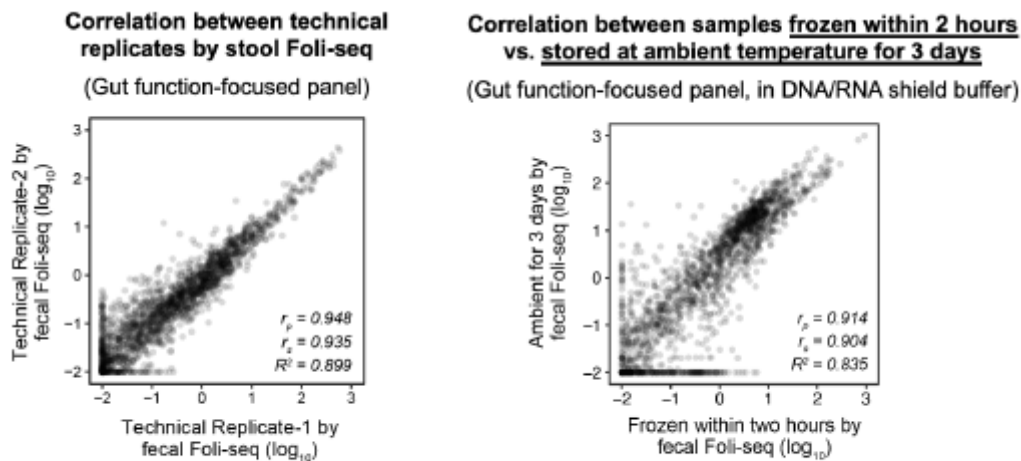


血清との比較： 血清トランスクリプトーム解析は実施していませんが、血清由来バイオマーカー（例：CPR 値） は、糞便中の宿主トランスクリプトームプロファイルで検出された炎症関連マーカーと一般的に同じ方向性を示すことが観察されました。重要な点として、Foli-seq™ による糞便中の宿主トランスクリプトーム測定は、局所的な腸内生物学に対してより高い特異性を提供する一方、血清バイオマーカーはより全身的な炎症反応を捉える傾向があるということです。

5. Foli-seq™ プロファイルの技術的なバラツキは、被験者間、疾患状態、治療時点などの変動と比べどうでしょうか？また、このバラツキは、サンプル採取・処理・保存方法の違いによってどの程度影響を

受けるのでしょうか？

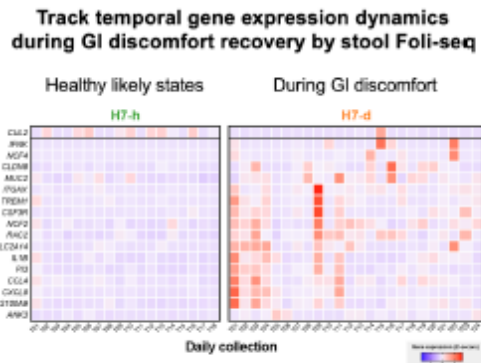
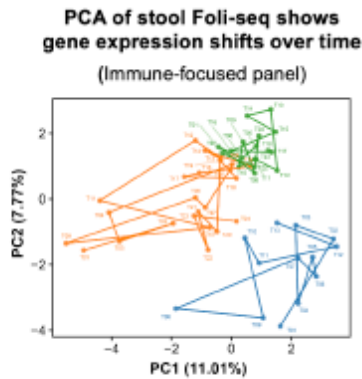
技術的変動性とサンプル保存の影響：技術的複製サンプルと、異なる条件下（例：即時凍結サンプルと室温で3日間保存したサンプル）で採取したサンプルとの相関分析では、一貫して高い再現性が示されました。これは、Foli-seq™による糞便トランスクリプトームプロファイルが技術的に堅牢であり、短期的なサンプル処理の違いによる影響を比較的受けにくいことを示しています。下図参照。



Confidential – Exempt from Disclosure

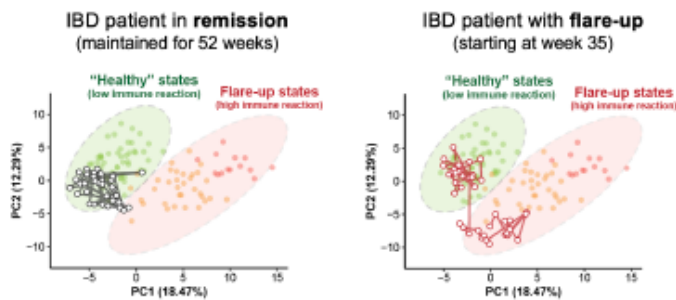
時間的変動と被験者間変動：免疫に焦点を当てたパネルを用いて、Foli-seq™により糞便宿主トランスクリプトームプロファイルを経時的に評価しました。健康なドナーと症状のあるドナーから毎日サンプリングを行った結果、糞便宿主トランスクリプトームには個体内および個体間で変動が見られました。しかし、個体内の時間的変動は、被験者間で観察された差よりも一貫して小さく、トランスクリプトームの状態は2~3週間（H1とH7-h）にわたって比較的安定しており、これらの差は技術的なノイズではなく、生物学的に意味のある本質的な状態を反映していることが示唆されました。症状がみられる期間中のドナーH7の遷移は、明確なPCAパターンと炎症関連遺伝子の動的な変化（H7-d状態からH7-h状態へ）によって捉えられ、Foli-seq™が臨床的に関連のある変動を追跡できることが示されました。下図参照図。

- "Healthy" donor: H1
- "Healthy" donor: H7
 - H7-d: during GI discomfort
 - H7-h: during healthy states



疾患状態に関連する変動：遺伝子発現レベルの変動において、技術的変動や被験者間変動と比較して、疾患状態が最大の要因でした。寛解期にある炎症性腸疾患（IBD）患者を対象に、毎週採取した糞便サンプルを用いて、Foli-seq™ 解析を実施しました。患者によって経時的な変動は見られましたが、臨床的再発を経験した患者では有意なトランスクリプトームの変化が観察されました。さらに、糞便 Foli-seq™ 解析は、症状発現の数週間前から早期の分子シグネチャーを捉えることができることも分かりました。下図参照図。

Longitudinal (weekly) Foli-seq profiling reveals key gene dynamics associated with disease relapse



Fecal Foli-seq captures molecular signals nearly a month before symptoms appear

