

# Tapestri® Single-cell DNA AML Panelを用いた骨髄異形成症候群のシングルセルDNA解析

## Takeaways

- Tapestri Single-Cell DNA AML Panelは、MDSにおける反復性の体細胞突然変異に対応しています。
- 僅か2細胞を検出し、その感度は0.06%でした。
- シングルセルゲノミクス解析は、共起する変異とクローン進化を明らかにします。

## Abstract

骨髄異形成症候群（MDS）は、血液の疾患です。この疾患は、造血幹細胞で体細胞突然変異が蓄積することによって引き起こされ、無効造血を生じます。遺伝子変異は、病変細胞のクローンの拡大に伴って蓄積され、不均一な細胞集団をもたらします。こうした細胞集団は患者の予後を変化させるおそれがあるため、シングルセルレベルで変異の状態を識別することは、診断精度の向上や治療選択にとって有益です。このアプリケーションノートでは、2例のMDS患者サンプルをTapestri Platformで解析されました。MDS及び急性骨髄性白血病（AML）は、いずれも骨髄球系細胞の疾患です。MDSはAMLに移行することがあるため、両者の分子シグネチャには重複がみられます<sup>1</sup>。このことから、Tapestri Single-Cell DNA AML Panelによって、MDS患者サンプルの変異を解析しました。診断検査と疾患のモニタリングのいずれの解析結果も、高い感度で高解像度なクローン構造を示し、またシングルセル次世代シーケンス

（NGS）解析とバルクNGS解析の変異アレル頻度（VAF）間で高い一致度を示しました。さらに、クローンにおける共起変異を解明することで、クローン進化の再構築とこの患者における疾患の全体像を得ることができました。これらの結果は、Tapestri PlatformによるシングルセルDNA解析の能力を示しています。Tapestri Platformは、各MDS患者からより多くの知見を取得することによって、研究者と臨床医がより多くの情報に基づいた治療決定ができるよう支援します。

## Experiment & Methods

### Tapestri Single-Cell DNA AML Panelを用いたシングルセルDNA解析

Tapestri Platformによって、2例のMDS患者の凍結PBMCを処理し、シングルセルの単離とDNAバーコーディングを行いました。標的領域の増幅は、Tapestri Single-Cell DNA AML Panelによって行いました。このパネルには、MDSに関連する反復性の体細胞突然変異を解析するためのアンプリコンが含まれています<sup>1</sup>。またこのパネルは、関連するスプライシング因子、エピジェネティック調節因子、転写因子及びキナーゼにも対応しています（Table 1）。シングルセルDNAライブラリーをillumina MiSeqで2回シーケンスしました。細胞の生存率は、75-90%であり、1サンプルにつき平均5,459細胞が解析されました。平均カバレッジ深度は36X、細胞にマップされたリードの割合は平均88.5%、パネルの読み取り均一性は平均94.3%でした。シーケンスデータは、Tapestri PipelineとTapestri Insightsによって解析しました。

#### 19-GENE AML PANEL

ASXL1	GATA2	KIT	PTPN11	TP53
DNMT3A	IDH1	KRAS	RUNX1	U2AF1
EZH2	IDH2	NPM1	SF3B1	WT1
FLT3	JAK2	NRAS	SRSF2	-

Table 1 : Tapestri Single-Cell DNA AML Panelの19遺伝子※

# Results

## MDS研究例における疾患モニタリング

MDSと診断された治療抵抗性の79歳の男性から、早期診断時及び治療後に、血液サンプルを採取しました。診断時、この男性では10%の骨髄芽球がみられました（< 5%が正常と考えられています）。このサンプルを用いて、Tapestri Platformによるシングルセルゲノミクス解析を行いました。NRAS G12D、KRAS G13D 及び JAK2 V617D の変異、並びに NRAS G12D/KRAS G13Dの二重変異のクローンが検出されました（Figure 1）。診断時のサンプルで、KRAS及びJAK2変異がそれぞれ0.3%及び0.07%のVAFで検出されました。このことは、本プラットフォームの感度が高いことを示しています。興味深いことに、この症例では骨髄線維症の既往歴がありました。したがって、JAK2クローンが独立しており、かつNRAS又はKRAS変異が共起していないことは、この症例がJAK2クローンからMDSを発症したのではなく、それとは別にMDSを発症したことを示唆しています。

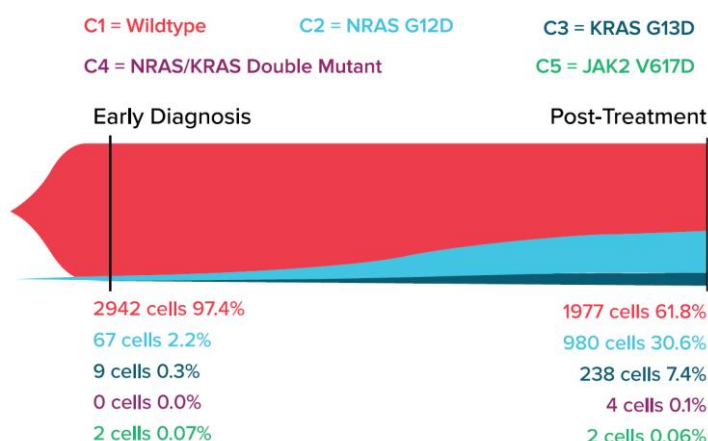


Figure 1 : Fishプロットは、MDSと診断された患者における疾患の進展を示しています。これは、変異クローン数とその割合の経時的変化によって示されています。

## MDS-EB1研究例におけるクローナル変異の共起

MDS-EB1と診断された49歳の女性（骨髄芽球9%）からサンプルを採取しました。MDS-EB1は、希少なタイプのMDSです。このサンプルでは、過去に、バルクNGS解析によって、DNMT3A

R882H、SF3B1 H662Y及びRUNX1 R162Kが明らかにされました。しかし、各変異を有する細胞又はそれらの変異が共起している細胞の割合は、バルク解析では知ることができませんでした。Tapestri Platformによるシングルセルゲノミクス解析の結果は、そのシングルセル疑似VAFとバルクNGS VAF間の強い一致度を示しました（Figure 2）。さらに、シングルセル解析は、2つや3つの変異が共起している細胞集団を明らかにし、患者のクローン系譜の再構築を可能にしました。こうしたクローンにおける共起変異を明らかにすることで、この患者に対する様々な治療法を検討することが可能です。

Gene	Variant	Bulk [%]	Single-cell [%]
DNMT3A	R882H	43.1 %	42.0 %
SF3B1	H662Y	31.0 %	35.0 %
RUNX1	R162K	63.3 %	61.2 %

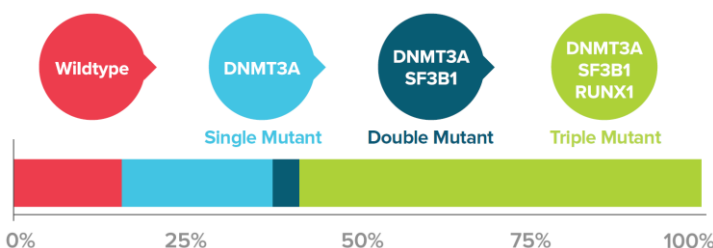


Figure 2 : シングルセルDNAシーケンスによって、MDS-EB1患者におけるバルクNGSとクローンの共起変異の相関が明らかにされました。

## Conclusions

本アプリケーションノートにおいて、MDSの診断時にVAFの低い希少な変異をTapestri Platformが高感度に検出することを紹介しました。Tapestri Platformのシングルセル解析は、堅牢かつ明瞭な方法で共起する変異を検出することによって、クローン進化を明らかにします。

## References

- Walter et al., Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 27, 1275-82 (2013)
- Bejar and Steensma, Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 124, 2793-803 (2014)

©2019 Mission Bio, Inc. All rights reserved. 本製品は研究専用（Research Use Only: RUO）です。診断用には使用できません。本アプリケーションノートの原文「AppNote\_MissionBio\_MDS\_RevB」の翻訳には細心の注意を払っていますが、誤訳等があっても弊社は責任を負いかねます。

AppNote\_MissionBio\_MDS\_RevB\_JP\_v3