



Q&A

FFPEによるNGS解析を成功させるための10の質問

Jung Doh, Ph.D., Senior Applications Scientist, Beckman Coulter, Inc.

大量のショートリードデータを生み出す次世代シーケンス (NGS) 技術は、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織サンプルから抽出したDNAの解析に大きな道筋をつけました。

本稿では、FFPE組織からのDNA抽出に関する10のFAQについて議論します。

① NGS解析における、新鮮凍結サンプルに対するFFPEサンプルの利点は？

新鮮凍結サンプルはDNA抽出の材料としては非常に優れていますが、サンプル調製と保存に費用がかかるため汎用的なサンプル形態とはいえません。そのため、新しい治療法を生み出す可能性があるような大規模な癌研究の材料に向いているとはいえません。

対してホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織サンプルは、医療現場において日常的に作製・保存され、推計4~10億ものFFPEサンプルが世界中の病院や組織バンクに眠っています^{1,2}。FFPEサンプルに対して、臨床診断、治療記録、薬物応答、再発状況などの臨床的な記載がされている現場も多く見受けられ、臨床成績や長期的なフォローアップとも紐付けをすることができます³。

腫瘍組織によってはFFPEサンプルからのみDNAが得られるような場合もあり、稀少症例の場合には極めて重要なデータ源となり得ます^{4,5}。

② FFPEサンプルのNGS解析は、新鮮凍結サンプルのデータ品質と比べて遜色ないのか？

遜色ありません。現在の論文数ではFFPEサンプルが圧倒しています。多くのショートリードを生み出すNGSのパフォーマンスは、FFPEサンプル由来の断片化されたDNAを解析するのに最も適した技術となる可能性があります⁶。

最近の研究において、新鮮凍結 (FF) またはFFPEサンプルから抽出された胃腸間質腫瘍からの全エキソームシーケンス (WES) が報告されました。FFPE由来のDNAはRAPD PCR法で品質評価され、高品質/低品質 (HQ/LQ) として分類されました。LQ-FFPEは低収量でライブラリのインサートサイズも小さいものですが、DNAライブラリ調製とエキソームキャプチャについてはHQ/LQともに問題なく行うことができ、とりわけHQ-FFPEでは新鮮凍結 (FF) に匹敵するデータ量が得られていました⁷。

ほかのケースでは、FFとFFPEサンプルのNGSデータとの間に強い相関があることが示されました^{6,8-10}。このような背景から、FFPE腫瘍組織由来の微量なDNAサンプルからでも、高品質なライブラリとシーケンス結果を得られるようになったといえます。

③ FFPEからの抽出工程は、DNAの収量や品質に影響するか？

影響します。ホルムアルデヒド (ホルマリンの主成分) が組織サンプルの保存に適した固定液であると発見された120年前は、この点は問題にはなりません¹²。病理学者や組織学者はホルマリン固定を100年以上行っていました¹³が、1970年代初頭になり、ようやくホルマリンがタンパク質やDNAなどの細胞内高分子間にクロスリンクを作ることが発見されました¹⁴。ホルマリン固定によりDNAの断片化が引き起こされ、PCR増幅可能なテンプレート量が減少してしまいます¹⁵。ホルマリン固定状態での長期保存においても、外部環境要因により断片化が進むとも考えられています^{16,17}。

それでもなお、PCRとNGSの両方の検出法で、FFPEサンプルから抽出したDNAを使用する解析が数多く報告されています^{5,18,19}。DNAの断片化は大きなサイズのアンプリコンを作製するような系では悪影響を及ぼしますが、小さなアンプリコンの採用により断片化の問題を回避しています²⁰。

さらに、ホルマリンによるDNA塩基修飾の一部 (クロスリンク) を修復する方法が報告²¹され、この方法は現在では多くのFFPEからの核酸抽出キットに採用されています¹⁰。FFPEサンプルでのシーケンスのアーティファクト (主にC:G > T:A塩基置換) は高頻度で起きることが報告^{9,22-24}されていますが、ほかのアーティファクトは殆ど見られません^{5,25}。C:G > T:A塩基置換アーティファクトは、シトシンの脱アミノによるウラシル化によって引き起こされるため、PCR増幅の前にウラシル-DNAグリコシラーゼでFFPE DNAを処理することによりウラシルを除去し、本来の変異配列に影響を与えずに有意にアーティファクトを減少させることができます⁴。

FFPEサンプルの室温での長期保存は、DNAの1塩基変異 (SNV) や塩基の挿入/欠失 (indels) を生じます。しかしながら、このようなDNA損傷はランダムな位置で生じるため、シーケンシングの量を増やし、高いカバレッジで解析することにより、この問題を回避することができます。よって、FFPEサンプルをシーケンスする場合には、最低80倍のカバレッジが推奨されています⁵。

脱パラフィンのプロトコルは、PCR増幅に影響します²⁶。融解温度が高いほど二本鎖DNAを変性させる可能性が高くなります。また、温度が低すぎるとパラフィンが完全に融解しない可能性があり、核酸収量が低下します。FFPE組織の種類によって適したパラフィン溶解温度と時間が異なる場合もあり、溶解温度、DNA品質、DNA収量についてうまくバランスを取る必要があります。推奨最高温度は90℃であり、それよりも高い温度では変性が引き起こり、一本鎖DNAが生じます。75℃で5分間の条件でもパラフィンを十分に溶解させることができます。また、DNAの変性も起こらないという報告もあります⁵。

④ FFPEサンプルの保存年数は、シーケンスライブラリの品質に影響するか？

長期間保存されたFFPEサンプルのライブラリ調製、シーケンスは難しいと考えられていますが、どのように固定・保存され、そしてどのような方法でライブラリ調製がされるかによって、その成否は大きく変わってきます。

保存期間3年未満のFFPEサンプルの場合は、94%の成功率でシーケンス可能なライブラリの調製ができましたが、14～21年の古いサンプルでは50%にまで低下することが最近報告されています²⁷。また、11～12年、5～7年、1～2年保存のFFPE組織と、固定後1年以内のものでは、核酸の状態に大きな差はないという報告もあります²⁸。さらに、20年間保存されたFFPE組織からRNAを抽出し、ライブラリ調製に成功した例もあります⁶。

⑤ 10～20年前のFFPEサンプルから本当に高品質なシーケンスデータが得られるのか？

10年以上前のFFPEサンプルでもシーケンス品質には問題はなく²⁹、14年前、18年前といったさらに古いサンプルの場合においても経時による結果への影響は見られないという報告があります²⁵。保存期間20年までであれば、FFPE組織から抽出したDNA/RNAはNGSで解析できるという見方もあります⁶。解析方法によっては、40年以上前のFFPE組織から抽出された核酸であっても使えることもあります³⁰。

⑥ FFPE由来のDNAサンプルの品質は、下流のゲノミクス解析アプリケーションに影響するか？

ホルマリン固定が下流ゲノミクス解析アプリケーションに影響を及ぼすことはよく知られています。DNA - DNA間のクロスリンクが1本鎖化を阻害したり、DNA - タンパク質間のクロスリンクがポリメラーゼ反応を阻害したりして、PCRに大きな影響を及ぼします³¹。FFPE DNAのサンプル品質が変異スクリーニングの結果に影響に及ぼすことも同様に懸念されています。この懸念点には、アーティファクト、偽陰性変異、変異検出アルゴリズムへの影響があり、それぞれがどの程度結果に影響するかはまだ明らかではありません³²。

DNAの分解や化学修飾などによる配列アーティファクトによって、誤ったシーケンス結果を変異配列として誤認識することは起こり得ます。DNAの分解については、小さなアンプリコンを調製することにより問題回避できますが、配列アーティファクトの問題についてはPCR増幅前にFFPE DNAをウラシル-DNAグリコシダーゼで処理する以外には、まだ十分な対策および理解がされていない部分があります⁴。このような状況でも、FFPE DNAサンプルを用いた単一遺伝子の変異解析やコピー数解析^{33, 34}だけでなく、全エクソーム^{5, 35}や全ゲノム解析²⁵においても多数の成功例があります。FFPE RNAサンプルは、新鮮凍結サンプル同様、遺伝子発現解析において成功を収めています⁸。

⑦ NGS解析には、どのぐらいのFFPEサンプルが必要か？

解析方法により大きく異なります。FFPE DNA 250 ng以下では、エクソーム解析で十分なシーケンスカバレッジを得るには不十分であると報告³⁵されていましたが、FFPE 96サンプルを解析した最近の報告³⁶では、僅か16 ngのDNAからのシーケンスに成功しています。FFPE DNA 10 ngから全ゲノムシーケンスを行った事例もありますが、これは染色体コピー数の解析に限られていました³⁷。さらに5 ng程度の微量FFPE DNAでもライブラリ調製を行うことができ、DNA 1 mgから作製したカリオグラム（染色体写真）と同様な染色体コピー数解析結果が得られていました³⁷。

FFPEから抽出される比較的短く断片化したDNAのNGS解析により、一塩基変異、挿入/欠失、転座などの検出ができることを多くの研究者が認識しています^{29, 38}。

⑧ FFPEサンプルからのRNAやmiRNA抽出はできるか？

可能ですがRNAはDNAよりも不安定であるため、FFPEサンプルのRNAシーケンスは難度が高くなっています。FFPEサンプルから抽出したRNAは一般的なサンプルよりも分解が進んでいる可能性があります。FFPEから抽出したmiRNAについてはシーケンスによるプロファイリング解析は問題なく行うことができます³⁹。サイズが小さいmiRNAは分解や修飾が起こりにくいため、mRNAよりも良好で、新鮮な組織から抽出したものと同様なPCR増幅が可能です。

17種類の組織、65サンプルのFFPEから抽出された272サンプルのRNAの解析から分かったことは、miRNAは実験しやすいだけでなく、保存された臨床検体から有益なmiRNAに関する情報が得られる可能性があることです⁴⁰。新規のmiRNA検出が目的である場合、NGS解析だけで完結されることができ、参照配列を事前に用意する必要もありません³⁹。

⑨ FFPE組織から、過去に流行したウイルスDNAを検出することができるか？

この点については、まだ明らかではありません。FFPE組織から1918年に流行した「スペイン」インフルエンザA / H1N1ウイルスの抽出とシーケンスを行う新規手法が開発されています。パンデミックの犠牲者の肺FFPE組織サンプルから抽出されたRNAを使い、ウイルスを同定する逆遺伝学的手法です⁴¹。また、配列に依存しないPCR増幅（ライブラリ調製）とNGS解析により、様々なFFPEサンプルからの未知のウイルスを検出する手法もありますが、過去のパンデミックに由来するFFPEサンプルからNGSを用いて既知および未知ウイルスの検出ができるかは、まだはっきりしていません⁴²⁻⁴⁴。

⑩ NGSのバイオフィォマティクスツールは、FFPE解析でも信頼性を得られるものか？

まだ難しいところがあります。多くの研究者が、第3世代のシーケンシング技術の登場を予想しているにもかかわらず、NGSデータ解析のゴールドスタンダードはいまだ定まっておらず⁴⁵、さらにシーケンスのQCに関する標準化もなされていない状況です⁴⁶。NGSデータ解析のための様々なバイオフィォマティクス解析ツールが開発されていますが、その再現性については改善の余地があるようです⁴⁷。

現時点では、市販されるNGS機種ごとに異なるシーケンスエラー傾向やエラー率があるため、個別のエラーについて慎重に評価して、下流分析への悪影響を最小限にする必要があります。ほかとは違うようなバイオフィォマティクス戦略を採用すると、NGSのデータ分析に影響を与える可能性があります。そのため、各解析ツールの原理、利点、および限界を理解して、結果について慎重に判断および評価する必要があります⁴⁶。

REFERENCES

- 1 Sah S, Chen L, Houghton J, et al. Functional DNA quantification guides accurate next-generation sequencing mutation detection in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor biopsies. *Genome Med* 2013;5:77.
- 2 Blow N. Tissue preparation: tissue issues. *Nature* 2007;448:959-63.
- 3 Li P, Conley A, Zhang H, et al. Whole-Transcriptome profiling of formalin-fixed, paraffin-embedded renal cell carcinoma by RNA-seq. *BMC Genomics* 2014;15:1087.
- 4 Do H, Dobrovic A. Dramatic reduction of sequence artefacts from DNA isolated from formalin-fixed cancer biopsies by treatment with uracil- DNA glycosylase. *Oncotarget* 2012;3:546-558.
- 5 Kerick M, Isau M, Timmermann B, et al. Targeted high throughput sequencing in clinical cancer settings: formaldehyde fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues, input amount and tumor heterogeneity. *BMC Med Genomics* 2011;4:68.
- 6 Hedegaard J, Thorsen K, Lund MK, et al. Next-generation sequencing of RNA and DNA isolated from paired fresh-frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples of human cancer and normal tissue. *PLoS One* 2014;9:e98187.
- 7 Astolfi A, Urbini M, Indio V, et al. Whole exome sequencing (WES) on formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor tissue in gastrointestinal stromal tumors (GIST). *BMC Genomics* 2015;16:892.
- 8 Graw S, Meier R, Minn K, et al. Robust gene expression and mutation analyses of RNA-sequencing of formalin-fixed diagnostic tumor samples. *Sci Rep* 2015;5:12335.
- 9 Spencer DH, Sehn JK, Abel HJ, et al. Comparison of clinical targeted next-generation sequence data from formalin-fixed and fresh-frozen tissue specimens. *J Mol Diagn* 2013;15:623-633.
- 10 Norton N, Sun Z, Asmann YW, et al. Gene expression, single nucleotide variant and fusion transcript discovery in archival material from breast tumors. *PLoS One* 2013;8:e81925.
- 11 Munchel S, Koestler DC, Bibikova M. Targeted or whole genome sequencing of formalin fixed tissue samples: Potential applications in cancer genomics. *Oncotarget* 2015;6(28):25943-61.
- 12 Blum F: Der Formaldehyde als Hartungsmittel. *Z wiss Mikr* 1893;10:314.
- 13 Dove A. Hard-core sequencing. Science/AAAS Custom Publishing Office. 2016. Available from: URL: <http://www.sciencemag.org/custom-publishing/technology-features/hard-core-sequencing>.
- 14 Feldman MY. Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1973;13:1- 49.
- 15 Sikorsky JA, Primerano DA, Fenger TW, et al. DNA damage reduces Taq DNA polymerase fidelity and PCR amplification efficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;355(2):431-437.
- 16 Bruskov VI, Malakhova LV, Masalimov ZK, et al. Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. *Nucleic Acids Res* 2002;30(6):1354-1363.
- 17 Pfeifer GP, You YH, Besaratinia A. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res* 2005;571(1-2):19-31.
- 18 Wagle N, Berger MF, Davis MJ, et al. High-throughput detection of actionable genomic alterations in clinical tumor samples by targeted, massively parallel sequencing. *Cancer Discov* 2012;2:82-93.
- 19 Yost SE, Smith EN, Schwab RB, et al. Identification of high-confidence somatic mutations in whole genome sequence of formalin-fixed breast cancer specimens. *Nucleic Acids Res* 2012;40(14):e107.
- 20 Wong SQ, Li J, Tan AY, et al. Sequence artefacts in a prospective series of formalin-fixed tumours tested for mutations in hotspot regions by massively parallel
- 21 Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, et al. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res* 1999;27:4436-4443.
- 22 Do H, Wong SQ, Li J, Dobrovic A. Reducing sequence artifacts in amplicon-based massively parallel sequencing of formalin-fixed paraffin-embedded DNA by enzymatic depletion of uracil-containing templates. *Clin Chem* 2013;59:1376 - 83.
- 23 Anaka M, Hudson C, Lo PH, et al. Intratumoral genetic heterogeneity in metastatic melanoma is accompanied by variation in malignant behaviors. *BMC Med Genomics* 2013;6:40.
- 24 Do H, Dobrovic A. Limited copy number-high resolution melting (LCN-HRM) enables the detection and identification by sequencing of low level mutations in cancer biopsies. *Molec Cancer* 2009;8:82.
- 25 Schweiger MR, Kerick M, Timmermann B, et al. Genome-wide massively parallel sequencing of formaldehyde fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues for copy-number- and mutation-analysis. *PLoS ONE* 2009;4:e5548.
- 26 Sengüven B, Baris E, Oygur T, et al. Comparison of methods for the extraction of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. *Int J Med Sci* 2014;11(5):494-99.
- 27 Bolognesi C, Forcato C, Buson G, et al. Digital Sorting of Pure Cell Populations Enables Unambiguous Genetic Analysis of Heterogeneous Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tumors by Next Generation Sequencing. *Sci Rep* 2016;6:20944.
- 28 Kokkat TJ, Patel MS, McGarvey D, et al. Archived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks: A valuable underexploited resource for extraction of DNA, RNA, and protein. *Biopreserv and Biobank* 2013;11(2):101-06.
- 29 Corless CL, Spellman PT. Tackling formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue with next-generation sequencing. *Cancer Discov* 2012;2:23-24.
- 30 Ludyga N, Grünwald B, Azimzadeh O, et al. Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchows Arch* 2012;460(2):131-40.
- 31 Gilbert MT, Haselkorn T, Bunce M, et al. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *PLoS One* 2007;2(6):e537.
- 32 Wang M, Escudero-Ibarz L, Moody S, et al. Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues by Fluidigm Multiplex PCR and Illumina Sequencing. *J Mol Diagn* 2015;17:521e532.
- 33 Ausch C, Buxhofer-Ausch V, Oberkanins C, et al. Sensitive detection of KRAS mutations in archived formalin-fixed paraffin-embedded tissue using mutant-enriched PCR and reverse-hybridization. *J Mol Diagn* 2009;11:508-513.
- 34 Solassol J, Ramos J, Crapez E, et al. KRAS Mutation Detection in Paired Frozen and Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Colorectal Cancer Tissues. *Internat J Mol Sci* 2011;12:3191-3204.
- 35 Beltran H, Yelensky R, Frampton GM, et al. Targeted Next-generation Sequencing of Advanced Prostate Cancer Identifies Potential Therapeutic Targets and Disease Heterogeneity. *Eur Urol* 2013;63:920-26.
- 36 Van Allen EM, Wagle N, Stojanov P, et al. Whole-exome sequencing and clinical interpretation of formalin-fixed, paraffin-embedded tumor samples to guide precision cancer medicine. *Nat Med* 2014;20:682-8.
- 37 Wood HM, Belvedere O, Conway C, et al. Using next-generation sequencing for high resolution multiplex analysis of copy number variation from nanogram quantities of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *Nucleic Acids Res* 2010;38:e151.
- 38 Duncavage EJ, Magrini V, Becker N, et al. Hybrid capture and next-generation sequencing identify viral integration sites from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn* 2011;13:325-33.
- 39 Chatterjee A, Leichter AL, Fan V, et al. A cross comparison of technologies for the detection of microRNAs in clinical FFPE samples of hepatoblastoma patients. *Sci Rep* 2015;5:10438.
- 40 Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, et al. Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn* 2008;10(3):203-11.
- 41 Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* 2005;310:77-80.
- 42 van den Brand JM, van Leeuwen M, Schapendonk CM, et al. Metagenomic analysis of the viral flora of pine marten and European badger feces. *J Virol* 2012;86:2360-65.
- 43 Bodewes R, van de Bildt MW, Schapendonk CM, et al. Identification and characterization of a novel adenovirus in the cloacal bursa of gulls. *Virology* 2013a;440:84-88.
- 44 Bodewes R, van Run P, Schürch AC, et al. Virus characterization and discovery in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J Virol Meth* 2015;214:54-59.

ベックマン・コールター株式会社

本社：〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー

お客様専用 ☎ 0120-566-730 ☎ 03-6745-4704 FAX 03-5530-2460
e-mail bckkcas@beckman.com URL <http://www.beckmancoulter.co.jp>