



Application

次世代シーケンサー (NGS) を用いたヒトの主要組織適合遺伝子複合体 (HLA) タイピング法の開発

製品名

Library Amplification Kit (KK2611, KK2612)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

このアプリケーションノートは、国立遺伝学研究所 人類遺伝研究部門 細道一善 様のご厚意により掲載させていただきました。

開発の目的と経緯

次世代シーケンサー (NGS) の技術により、大規模なゲノム配列決定のみならず、ゲノム上の特定の領域にターゲットを絞り、多検体を迅速にリシーケンシングすることも可能となった。変異の検出や検証、スクリーニングのための効率的な手法であるターゲットリシーケンシングの一つとして、我々はヒトの主要組織適合遺伝子複合体 (HLA) 遺伝子のリシーケンシングによる HLA タイピング法の開発をすすめている。

HLA 領域は第6番染色体 6p21.31 に位置し、免疫応答をつかさどる HLA 遺伝子を含む 3.8 Mb から構成される。ヒトゲノムの中でも群を抜いて多型性に富むゲノム領域であり、HLA 遺伝子 6 座 (HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ, -DP) に計 8,700 種類を超える膨大な HLA アレルがこれまでに同定されている。この HLA アレルはリウマチや糖尿病など 100 種近くの生活習慣病、自己免疫疾患、がん、造血幹細胞移植に伴う GVH 病、ウイルス感染症における防御と重症化など数多くの医学的興味を有し、さらに HLA 分子による抗原提示を利用したワクチンによる感染防御の有用性とがんの免疫療法の新しい展開が期待されている。特に、スティーブンスン・ジョンソン症候群、中毒性表皮壊死融解症および薬剤性過敏症候群などの薬剤副作用と HLA アレルはオッズ比が 1,000 を超えるなど、極めて強い関連が複数報告されており、HLA アレルが薬剤副作用に大きく寄与していることが知られている。

現在の HLA タイピングは蛍光ビーズ法による PCR-Sequence Specific Oligonucleotide (PCR-SSO) およびダイレクトシーケンスによる PCR-Sequencing Based Typing (PCR-SBT) により行われており、これらの技術は 10 年以上もの間置き換わっていない。PCR-SSO は高頻度アレルのみを同定する手法であり、低頻度のものを同定できない。また、塩基配列を直接決定する PCR-SBT は HLA-A, B および C それぞれの遺伝子座で 8,000、18,000 および 5,000 以上の HLA アレルの組み合わせにおいて phase ambiguity に起因する曖昧なタイピング結果が得られるという問題点がある。

本アプリケーションノートでは我々がすすめている HLA 遺伝子のリシーケンシングにおけるライブラリ調製の問題点とその解決法に焦点をあて、実例を紹介したい。実験の詳細および解析手法は、リファレンスを参照いただきたい。

実験方法

■ ワークフロー



KAPA Library Amplification Kit

反応組成

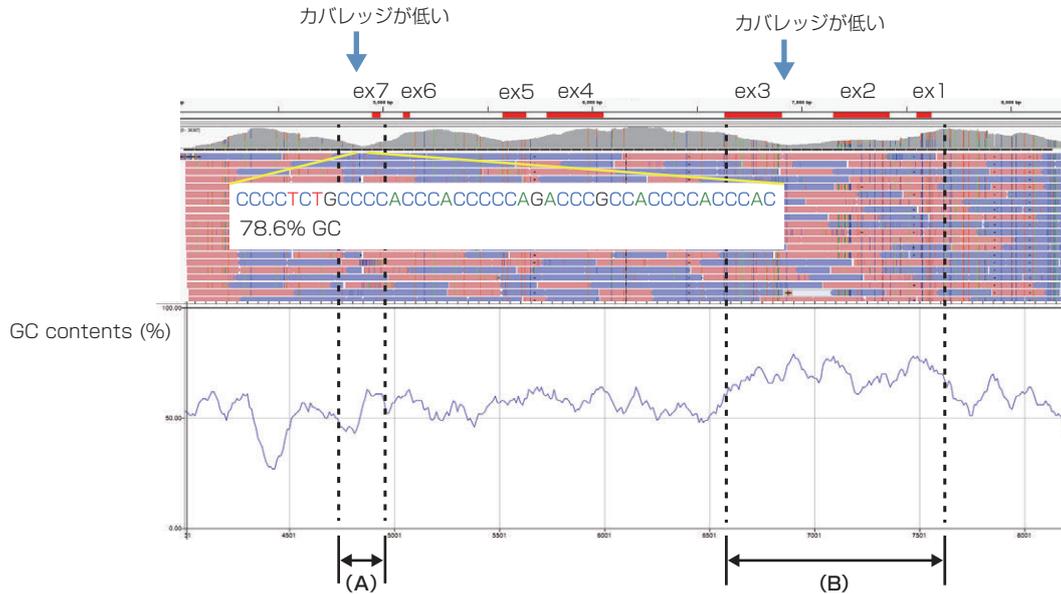
2×Kapa HiFi HS RM	25uL
PCR Primer Cocktail	5uL
Inde×1 primer	5uL
Inde×2 primer	5uL
Tagmented Library	10uL
	50uL RXN

PCR サイクル

Initial Extension	72°C	3min	
Denaturation	98°C	30sec	
Denaturation	98°C	10sec	} 7cycles
Annealing	63°C	30sec	
Extension	72°C	3min	
Hold	10°C		

結果

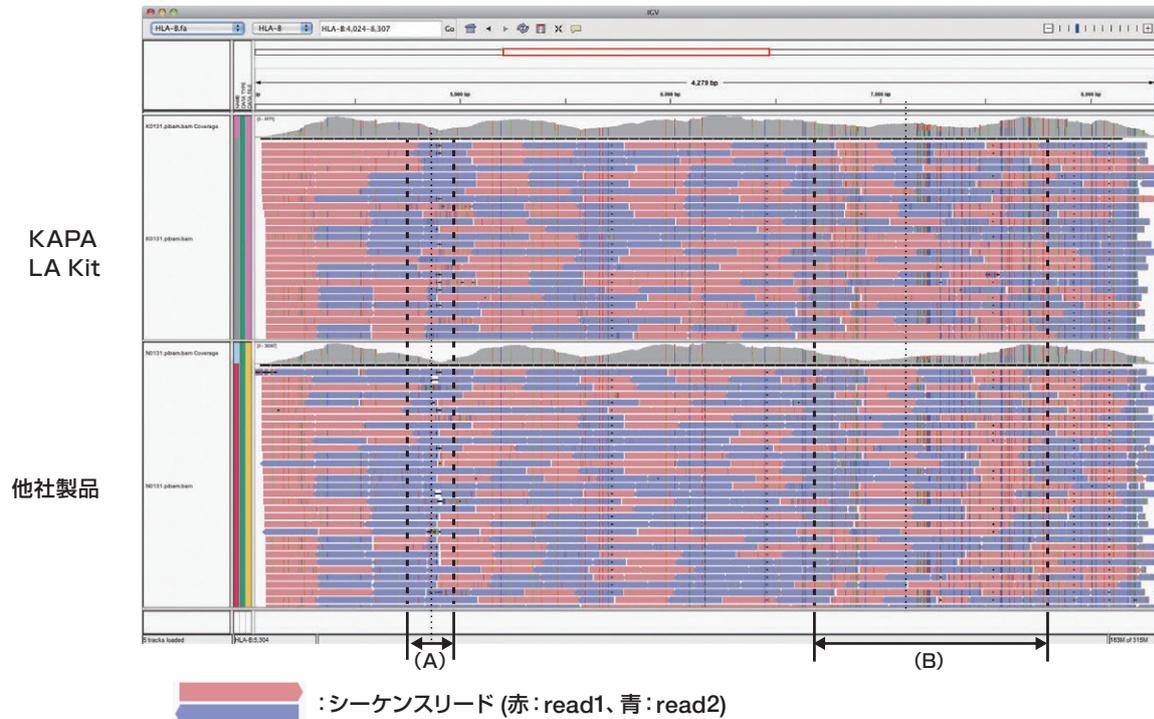
GC含量とカバレッジの関連



次世代シーケンサーの欠点としてGC含量の高い領域ではリードのカバレッジが少なくなる傾向が知られており、HLA遺伝子においては最も重要なエクソン2、および3において高いGC含量を示す。我々の解析では1つのペアエンドのシーケンスリードによって2つ以上の塩基変異(SNV)情報を物理的な情報として結合し、相の特定を行うことで2つのHLA遺伝子配列を構築する。このとき、カバレッジが低いことはこの相の特定がうまくいかない一つの要因であり、解決すべき問題点であった。

解析結果の可視化

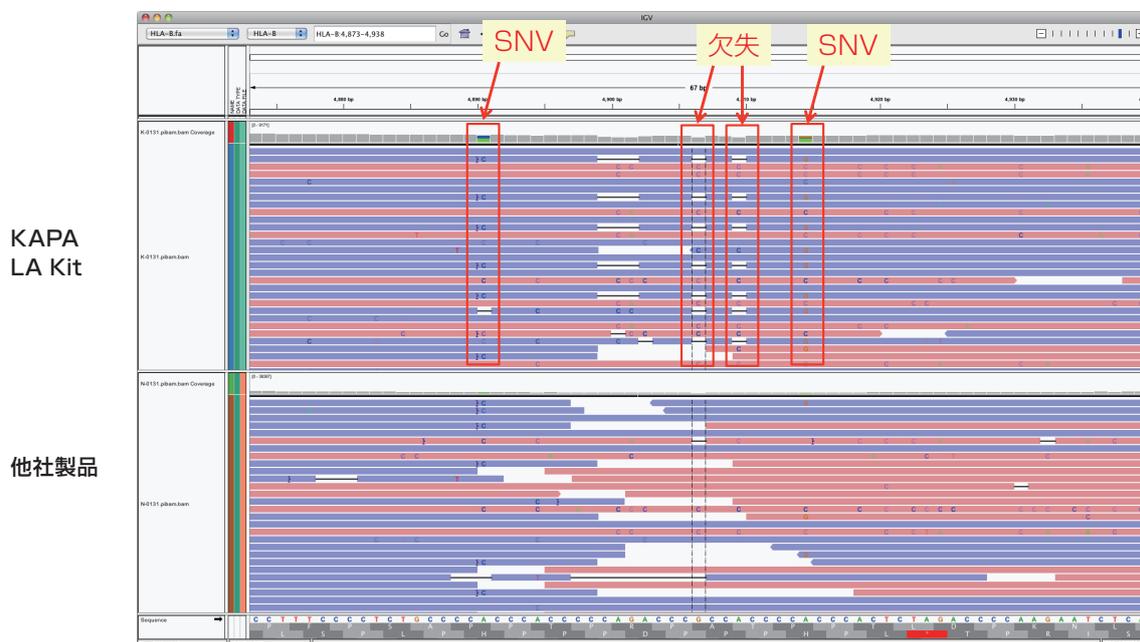
Integrative Genomics Viewer (IGV)



KAPA LA Kitによるライブラリ調製の結果、極端にカバレッジの低かった2カ所の領域(A)および(B)で、他社でのライブラリ調製に比べてX倍ものリードがアライメントされる結果となった。その結果、GC含量に起因するバイアスが解消され、より均一なカバレッジのアライメント結果となっている。カバレッジの低い領域の解消は、より少ないデータ量でも正確なデータを得られることに繋がるため、シーケンシングコストの削減およびハイスループット化に寄与することが期待される。

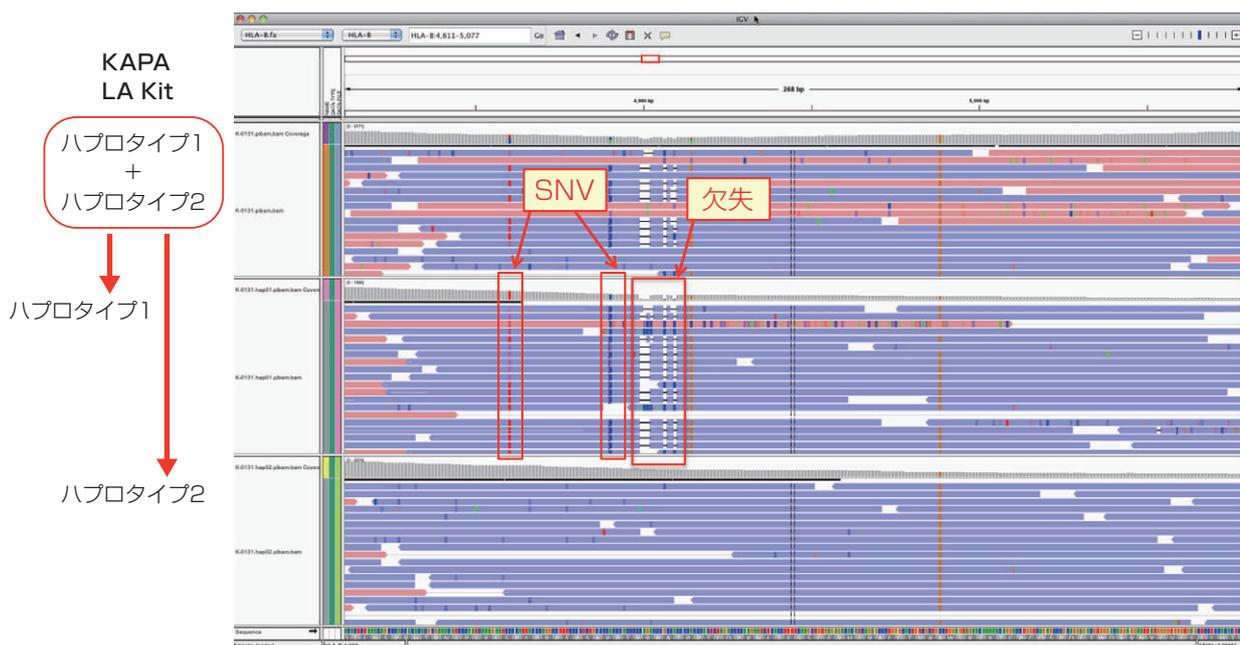
結果

欠失およびSNVの検出と比較



他社調製法によるライブラリは、高GC含量領域でアライメントされるリードが極端に少なく、領域をカバーするリードそのものが少ないことにより、欠失をうまく検出できなかった。これはリード数の偏りによるミスアライメントによるものであり、さらに欠失近傍のSNVの検出感度が低下していた。KAPA LA Kitで調整したライブラリは高GC含量領域においてもアライメントされるリードが均一であり、欠失およびその近傍のSNVをうまく検出できた。

欠失およびSNVのハプロタイプの決定



さらに高い信頼性で欠失とSNVを検出できたことにより、ヘテロ接合として検出されたこれらの変異を2つのハプロタイプに分けることも可能であった。変異がどちらの染色体にあるかを分類することはHLAアレルの決定には必要不可欠であり、我々の解析法で最も重要なポイントである。

結果

HLAタイピング結果の比較 (HLA-B, cDNA database)

Sample name	PCR-SSO法 (従来法)		KAPA LA Kit		他社製品		Depth	
	allele 1	allele 2	allele 1	allele 2	allele 1	allele 2	KAPA LA	他社製品
サンプル1	B*54:01:01	B*57:01:01	B*54:01:01	B*57:01:01	No call	No call	5140.46	5329.84
サンプル2	B*38:01:01	B*58:01:01	B*38:01:01	B*58:01:01	No call	B*58:01:01	4852.13	5612.92
サンプル3	B*15:02:01	B*51:01:01	B*15:02:01	B*51:01:01	No call	No call	5692.53	5903.77
サンプル4	B*48:01:01	B*58:01:01	B*48:01:01	B*58:01:01	B*48:01:01	B*58:01:01	5948.66	5443.36
サンプル5	B*40:49	B*58:01:01	B*40:49	B*58:01:01	B*40:49	B*58:01:01	5878.22	3029.58

No call : カバレッジの低い部分のハプロタイプを完全に分けることができず、完全長のHLA遺伝子のシーケンスが得られなかった。

HLAアレルを正確に決定できるか否かがHLAタイピング法の評価の全てである。我々が開発した解析パイプラインを同一パラメーターにより処理した結果、他社のライブラリ調製法で得られたデータはHLAアレル決定のためにはデータの補正が必要であったが、KAPA LA Kitで得られたデータは解析パイプラインのみで正確なHLAアレルタイピングが可能であった。多検体を想定した場合、安定したデータ処理の自動化が望まれる。偏りの少ないライブラリ調製は良質なシーケンスデータ産生に最も影響するステップであり、KAPA LA Kitは解析負荷を軽減する点においても効果的であった。

謝辞

本研究は国立遺伝学研究所 人類遺伝研究部門、井ノ上逸朗 教授と、日本赤十字社中央血液研究所、清水まり恵 様、中島文明 様の共同研究であり、手法開発にあたり、ご協力頂きましたことを深謝致します。

まとめ

これまで、GC含量の高い領域ではカバレッジが低下するという問題を抱えていました。Nextera DNA Sample Prep Kit は短時間で簡便にライブラリ調整可能な優れた製品ですが、プロトコールの一部であるPCR増幅にKAPA Library Amplification Kitを用いたところ、GC含量の高い領域でも十分なシーケンスリードが得られ、問題になっていたGCバイアスが劇的に改善されました。カバレッジのバイアス軽減はより少ないシーケンスリード数でも信頼性の高い解析を可能としますので、より多くのサンプルを一度にシーケンスすることが可能となりました。全ての例にあてはまるわけではありませんが、本ケースでは対象が高GC含量の遺伝子であったことから、KAPA Library Amplification Kitの使用は効果的で、結果として低コストでよりハイスループットに塩基配列を決定できるようになりました。

リファレンス

次世代シーケンサー：目的別アドバンスドメソッド (細胞工学別冊)、秀潤社