

# 血液がんの細胞遺伝学的 プロファイリングにおける Agilent の CGH+SNP マイクロアレイの 優れたコピー数検出力

## アプリケーションノート

### 著者

Dr. Klaas Kok, Dr. Eva van den  
Berg-de Ruyter, Lennart Johansson,  
and Hanny Zorgdrager  
University Medical Center Groningen, The  
Netherlands

Paula Costa, Dr. Arne IJpma, and Anniek  
De Witte  
Agilent Technologies, Inc.  
Santa Clara, CA USA

### はじめに

最近の高解像度コピー数解析プラットフォームの比較研究では、コピー数解析に関し、長いオリゴヌクレオチドをもつプラットフォームの方が SNP プラットフォームより常に優れた性能を示します<sup>1,2,3,4</sup>。SNP マイクロアレイは一塩基多型 (SNP) を同定して連鎖解析を行うために開発され、DNAコピー数に変化のないヘテロ接合性の喪失 (LOH) も同時検出が可能です。Agilent は特定の SNP コンテンツを Agilent の CGH+SNP マイクロアレイに加え、高解像度の DNA コピー数変化と LOH の同時検出という利点をもたらしました。このアプリケーションノートでは、慢性リンパ性白血病 (CLL) と多発性骨髄腫 (MM) サンプルから精製した DNA を使って Agilent の CGH+SNP マイクロアレイから得られたコピー数解析と LOH データの品質を Illumina 社の SNP マイクロアレイのものと比較しました。



**Agilent Technologies**

## 実験

2つの市販の高解像度オリゴヌクレオチドマイクロアレイプラットフォームのカタログアレイ、Agilent SurePrint G3 CGH+SNP 2x400K マイクロアレイプラットフォームと Illumina 社 HumanCytoSNP-12v1 を比較しました。各プラットフォームの情報と特徴は表 1 にまとめました。

6 サンプルを選択し、2つのプラットフォーム間の比較に使用しました。DNA は各メーカーのマニュアルに従ってラベル化し、ハイブリダイズしました。データ処理と解析はそれぞれのプラットフォームのためのソフトウェア、Agilent CytoGenomics と Illumina 社 KaryoStudio を使用して、デフォルト設定で行いました。プラットフォームに依存しないコピー数解析は Nexus ソフトウェア (BioDiscovery) でも行いました。Nexus ソフトウェアのアルゴリズムは、がんサンプルから得た Agilent の SNP データを解析するために最適化されてはいません。

## 結果と考察

### B-allele 頻度 (SNP アレイ) と uncut allele の数 (CGH+SNP アレイ)

Illumina 社の SNP データは通常、B-allele 頻度 (BAF) プロットを使って表示されます。一方、Agilent の CGH+SNP マイクロアレイでは、A アレルと B アレルの頻度を計測するかわりに、uncut allele (制限酵素で切断されないアレル) のコピー数と総コピー数を計測します<sup>5,6</sup>。結果として、Agilent の SNP データは uncut allele のコピー数を表示します (図 1)。BAF と uncut allele の数のプロットは、ゲノムの 2 倍体領域では見た目が非常に似ていますが、増幅または欠失した領域では異なります。これはホモ接合体 (AA, BB) とヘテロ接合体 (AB) を表示する時の目盛

表 1. マイクロアレイプラットフォームの特徴

Platform	Oligonucleotide length	Sample labeling	Sample requirement	Number of CGH features	Number of SNP features
Agilent SurePrint G3 CGH+SNP 2 x 400K microarray platform	60 nt	Direct labeling	500 ng	292,097	118,955*
Illumina HumanCytoSNP-12v1	25 nt	WGA amplification	200 ng	0	299,671

\*92 % of SNPs use two SNP probes per SNP

		Diploid	Hemizygous deletion	Trisomy	Tetrasomy (identical copies)	Tetrasomy (non-identical copies)
No. of uncut alleles	4	-----	-----	-----	-----	-----
	3	-----	-----	-----	-----	-----
	2	-----	-----	-----	-----	-----
	1	-----	-----	-----	-----	-----
	0	-----	-----	-----	-----	-----
BAF	1	-----	-----	-----	-----	-----
	0.75	-----	-----	-----	-----	-----
	0.50	-----	-----	-----	-----	-----
	0.25	-----	-----	-----	-----	-----
	0	-----	-----	-----	-----	-----

図 1. uncut allele 数と B アレル頻度 (BAF) の比較

りが Illumina 社の BAF プロットでは常に 0 から 1 であるのに対して、Agilent の SNP コピー数プロットは 0 から 1, 2, 3, … となっているからです。結果として、BAF プロットでは、母方と父方の両方の染色体が増幅した場合のテトラソミーと 2 倍体を区別することができません。さらに、BAF プロットを見ると、特にモザイクサンプル (異常なサンプルに正常なものが混入し希釈されている) では、トリソミー (BAF=0 %, 33 %, 66 %, 100 %) と片方の親の染色体だけが増幅した場合のテトラソミー (BAF=0 %, 25 %, 75 %, 100 %) を区別することが困難です。

### モザイクサンプルでの染色体異常の検出

がんサンプルは通常、正常な核型をもつ細胞と染色体異常がある細胞の両方を含む細胞の混合からなります。Valli らは Agilent の CGH マイクロアレイを使って、先天性および獲得性のモザイクにおいて、異常な細胞が 8 % あれば検出できることを報告しています<sup>7</sup>。Agilent の CytoGenomics ソフトウェアを使って本研究で使用した 6 サンプルの clonal fraction (染色体異常細胞集団の割合) を調べました。clonal fraction は 10 % 未満から 87.5 % まで様々でした (表 2)。1つのサブクローン (28.3 % の細胞) が CLL サンプル 2 で見つかりました。clonal fraction 値は Illumina 社 KaryoStudio や Nexus ソフトウェアでは報告されません。

6つのサンプルで検出された最も大きなゲノム異常を表2にまとめます。結果は文献と一致し、13番染色体長腕での欠失が最も共通する構造異常でした。図2では、モザイクのMMであるサンプル6の13番染色体にある欠失の検出について、AgilentのCGH+SNPとIllumina社のSNPプラットフォームを比較しています。その欠失はAgilentのコピー数(CN)データでは、AgilentのCytoGenomicsでもNexusソフトウェアでも検出されています。AgilentのCytoGenomicsでは、このサンプルのSNPプロットにより、この同じ領域にあるhemizygous欠失が確認されました。AgilentのCytoGenomicsソフトウェアでは、このサンプルのclonal fractionは24.5%と報告されました。この結果はFISHで確かめられ、それによるとその欠失は222細胞中69細胞(31%)で確認されました。

表2. 核型またはFISHの知見、clonal fraction (CytoGenomicsソフトウェアで算出)、および最も顕著なゲノム構造異常

Sample number	Sample type	Karyotype and/or FISH findings	Clonal fraction	Most significant genomic aberrations
1	CLL	nuc ish (CEP12x2,D13S319x1,13q34x2) [260/413] nuc ish (ATMx1,p53x2)[248/358] nuc ish (IGHx2)[400]	62.3 %	Hemizygous deletions on chr. 11 and 13.
2	CLL	nuc ish (CEP12x2,D13S319x1,13q34x2) [89/200] nuc ish (IGHx2)[200] nuc ish (ATMx2,p53x1)[93/200]	48.5 % Subclone 28.3 %	Heterozygous deletions of variable size on chr. 4, 5, 6, 13, 17, and 18. Subclone: additional terminal deletion on chr. 18.
3	MM	42,X,-Y,add(1)(p13),add(6)(q272),add(11)(q13),-13,-14,add(14)(q32),-22[3]/46,XY[12]	13.3 %	Copy number loss of chr. 13, 14, 22, and Y. Extra copy of the distal part of chr 1 and X.
4	CLL	nuc ish (CEP12x2,D13S319x1,13q34x2) [124/200] nuc ish (ATM, p53)x2[200] nuc ish (IGHx2)[200]	87.5 %	Small deletion on chr. 13.
5	MM	46,XX[19] 1 metaphase with 53 chromosomes, 1p+,+3,+4,+5,+9,+11,+15,-16,-18,+19,+19,+19,-20,-21,-22,+3mar nuc ish (D11Z1x3, D13S319x2)[26/200] nuc ish (IGHx2)[200]	<10 %	Copy number gain on chr. 3, 4, 5, 9, 11, 15, and 19.
6	MM	46,XX[20] nuc ish (D11Z1x2,D13S319x1)[69/222](31%) nuc ish (3' IgHx2,5' IgHx1)(3' IgH sep 5' IgH) x1 (22%)	24.5 %	Deletion on chr. 13.

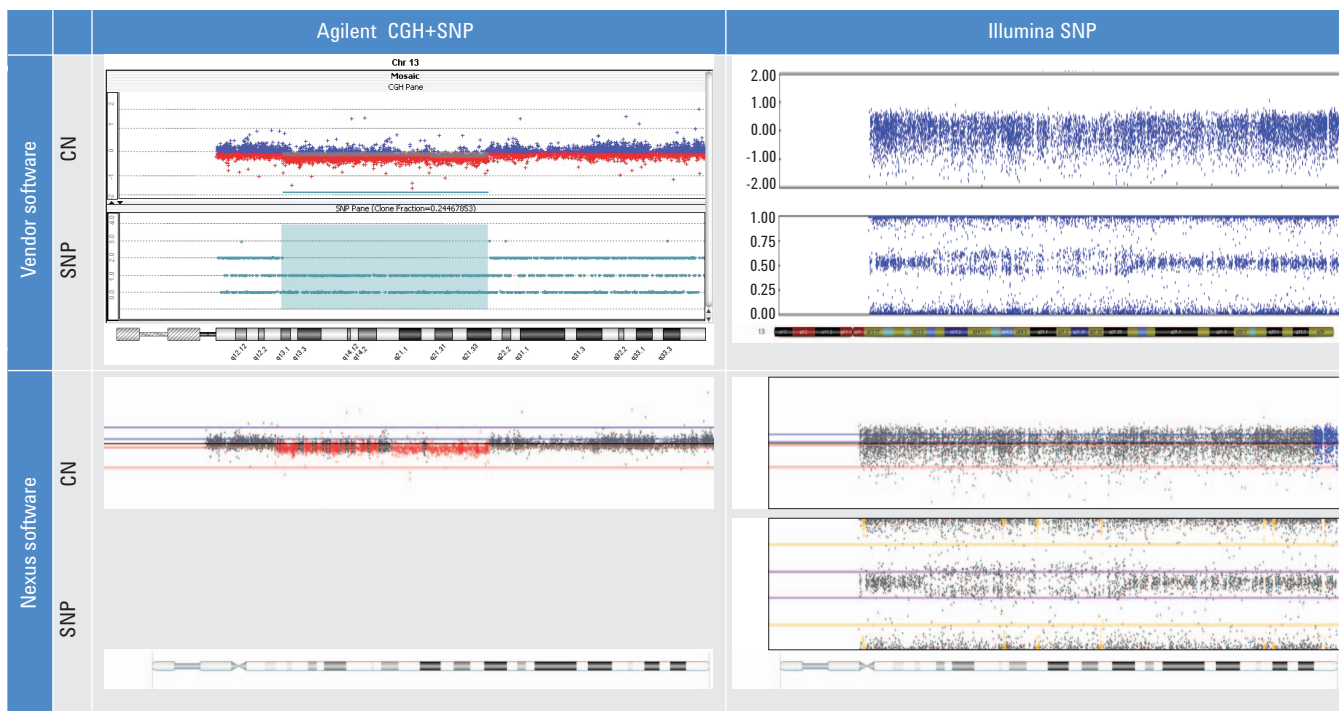


図2. MM サンプル6の13番染色体のDNA CNおよびSNPプロファイル。AgilentのSurePrint G3 CGH+SNP 2x400KマイクロアレイとIllumina社のSNPマイクロアレイにハイブリダイズし、それぞれのメーカーのソフトウェアまたはNexusで解析。結果より、約25%の細胞に存在する欠失は、AgilentのプラットフォームのCNおよびSNPデータでは検出されたが、Illumina社のSNPデータでは構造異常として検出されなかったことが示されました。

この欠失は Illumina 社のコピー数データでは、Illumina 社 KaryoStudio でも Nexus ソフトウェアでも検出されませんでした。しかし、Illumina 社の SNP データでこのサンプルに構造異常があることは確認されました。それに加えて Nexus ソフトウェアでは、13 番染色体の長腕に増幅があると報告されていますが、Agilent の CGH でも SNP データでも認められません。この増幅の検出は偽陽性の疑いがあります。

## 結論

本アプリケーションノートで示されたように、Agilent SurePrint G3 CGH マイクロアレイへの SNP プローブの追加と CytoGenomics ソフトウェアの改良された解析アルゴリズムにより、血液がんサンプルにおいてコピー数変化、およびコピー数変化のない LOH の高感度検出が可能になりました。uncut allele 数のプロットとして SNP データを表示することで、B-allele 頻度プロットと比べて、増幅や欠失領域における親由来の区別が容易になりました。文献に報告されているように、このサンプル群で見つかった最も共通の構造異常は 13 番染色体の欠失でした。約 75 % の正常細胞が混ざったサンプルでも、Illumina 社のコピー数解析では検出できなかった hemizygous 欠失領域において、Agilent のコピー数解析の結果は SNP データと一致しました。

## 参考文献

1. Curtis *et al.* The pitfalls of platform comparison: DNA copy number array technologies assessed. *BMC Genomics*, **2009**, 10:588.
2. Nasri *et al.* Oligonucleotide array outperforms SNP array on formalin-fixed paraffin-embedded clinical samples. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **2010**, 198:1–6.
3. Kresse *et al.* Evaluation of high-resolution microarray platforms for genomic profiling of bone tumours. *BMC Research Notes*, **2010**, 3:223.
4. Krijgsman *et al.* CGH arrays compared for DNA isolated from formalin-fixed, paraffin-embedded material. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **2011**, 51: 344–352.
5. Costa *et al.* Simultaneous detection of copy number and copy-neutral LOH using a single microarray. *Agilent Application Note*, 5990-6247EN.
6. Costa *et al.* Detecting copy-neutral LOH in cancer using Agilent SurePrint G3 Cancer CGH+SNP microarrays. *Agilent Application Note*, 5990-9183EN.
7. Valli *et al.* Comparative genomic hybridization on microarray (a-CGH) in constitutional and acquired mosaicism may detect as low as 8 % abnormal cells. *Molecular Cytogenetics*, **2011**, 4:13.

[www.genomics.agilent.com](http://www.genomics.agilent.com)

このアプリケーションノートに記載されている情報は研究目的のみの使用向けであり、診断目的には対応していません。このアプリケーションノートの情報、記述、および仕様は予告なく変更されることがあります。Agilent Technologies は本書に含まれる誤植、あるいは本品の性能、または使用に関する偶発的ないし間接的な損害に関して責任を負いません。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2012  
Published in Japan, June 20, 2012  
5991-0409JAJP



**Agilent Technologies**