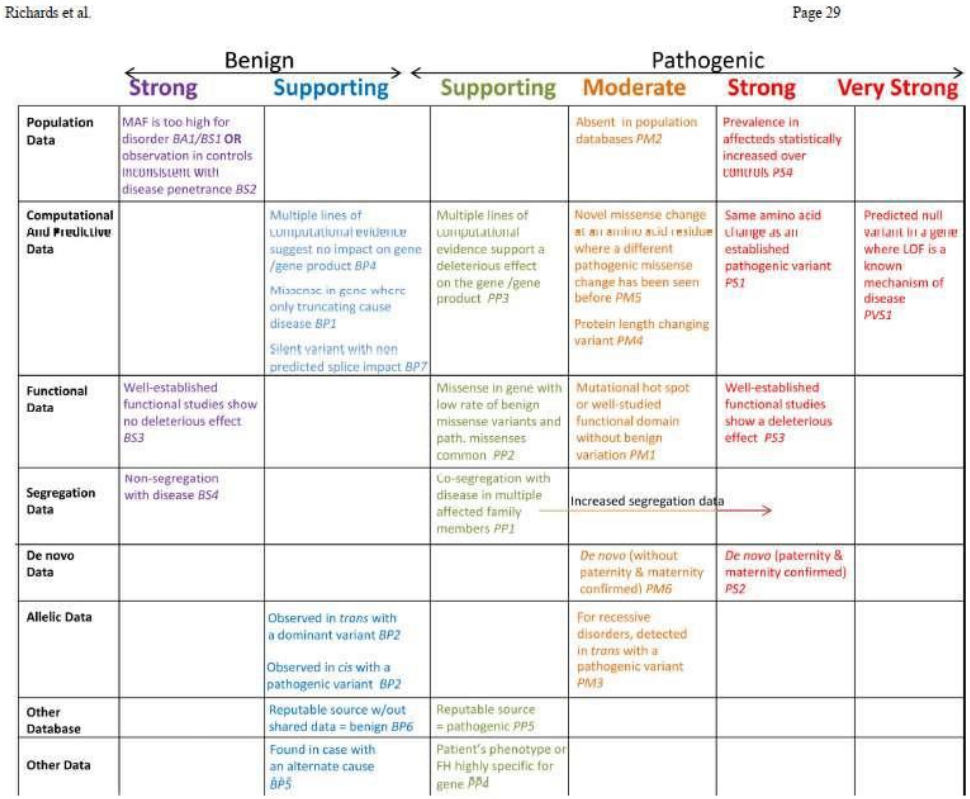
生殖細胞系列バリアントの病原性評価

フィルジェン株式会社　バイオインフォマティクス部
(biosupport@filgen.jp)

はじめに

- 次世代シークエンサーでは膨大な遺伝子バリアントが検出されるが、臨床的な意義が不明なものも多く、その病原性の評価には、文献やデータベース検索、複雑なバイオインフォマティクス解析などが必要

- Golden Helix社VarSeq®の有償アドオンであるVSClinical ACMGでは、ACMGガイドラインに基づき、生殖細胞系列バリアントの病原性を自動で評価することで、遺伝学的検査の結果の解釈を、効率的に行うことが可能



Richards et al. Page 29

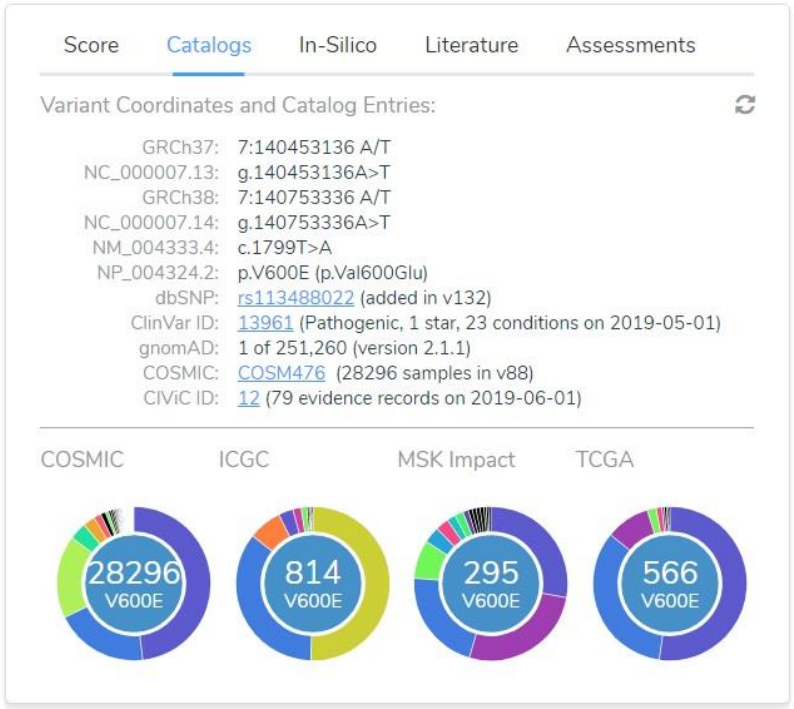
	Benign		Pathogenic			
	Strong	Supporting	Supporting	Moderate	Strong	Very Strong
Population Data	MAF is too high for disorder *BA1/BS1* OR observation in controls inconsistent with disease penetrance *BS2*			Absent in population databases *PM2*	Prevalence in affecteds statistically increased over controls *PS4*	
Computational And Predictive Data		Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene /gene product *BP4* Missense in gene where only truncating cause disease *BP1* Silent variant with non predicted splice impact *BP7*	Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene /gene product *PP3*	Novel missense change at an amino acid residue where a different pathogenic missense change has been seen before *PM5* Protein length changing variant *PM4*	Same amino acid change as an established pathogenic variant *PS1*	Predicted null variant in a gene where LOF is a known mechanism of disease *PVS1*
Functional Data	Well-established functional studies show no deleterious effect *BS3*		Missense in gene with low rate of benign missense variants and path. missenses common *PP2*	Mutational hot spot or well-studied functional domain without benign variation *PM1*	Well-established functional studies show a deleterious effect *PS3*	
Segregation Data	Non-segregation with disease *BS4*		Co-segregation with disease in multiple affected family members *PP1*	Increased segregation data →		
De novo Data				*De novo* (without paternity & maternity confirmed) *PM6*	*De novo* (paternity & maternity confirmed) *PS2*	
Allelic Data		Observed in *trans* with a dominant variant *BP2* Observed in *cis* with a pathogenic variant *BP2*		For recessive disorders, detected in *trans* with a pathogenic variant *PM3*		
Other Database		Reputable source w/out shared data = benign *BP6*	Reputable source = pathogenic *PP5*			
Other Data		Found in case with an alternate cause *BP5*	Patient's phenotype or FH highly specific for gene *PP4*			

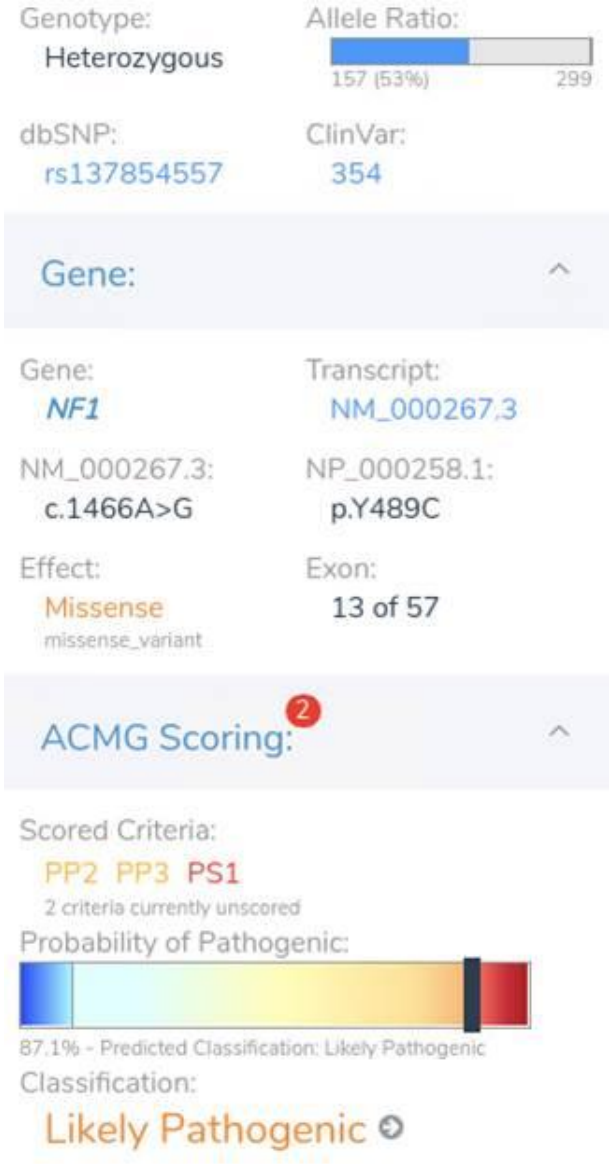
VarSeq®

- キュレーションされた様々なデータリソースを使用し、変異データへアノテーション付けを実行
  - RefSeq Genes
  - dbSNP
  - ClinVar
  - CIVic
  - ICGC / TCGA
  - PhrmaGKB
  - BRCA Exchange
  - 1000 Genomes
  - NHLBI 6500 Exomes
  - ExAC Variant
  - gnomAD Exomes/Genomes
  - dbNSFP
  - 各種遺伝子パネルのターゲットデータ

  …など
- VCFファイルに含まれる変異データから、任意の検索条件でデータのフィルタリングを行うワークフローを作成
- カバレッジ計算やトリオ解析、表現型情報に基づく遺伝子ランキングなどの解析アルゴリズムを搭載
- ゲノムブラウザーを搭載し、BAMファイルデータや各種アノテーションデータをグラフ表示
- 有償アドオンによる機能拡張で、CNVコールやレポート作成、パイプライン機能などが利用可能

VSClinical





- ACMG/AMPガイドラインに基づいた、遺伝子バリアントの自動評価
- 生殖細胞系列バリアントの病原性と、体細胞バリアントの腫瘍原性の評価に対応
- 評価結果および、疾患や治療薬情報などと合わせたレポート出力

VSClinical

VSClinical (ACMG)

- メンデル遺伝病における生殖細胞系列バリアントを、ACMGガイドラインの33種類の評価基準に基づいて分類し、病原性（Pathogenic）や良性（Benign）の判定を行う
- ガイドラインのうち18種類の評価基準については、バリアントのアレル頻度、機能予測、臨床情報データベースなどを用いて、自動分類を実行
- 専用の分類用ツールを実行することで、VCFファイルに含まれる全バリアントに対して一括で評価を行い、評価結果に基づきバリアントのフィルタリングが可能

VSClinical (AMP)

- がんにおける体細胞バリアントの腫瘍原性（Oncogenicity）の評価に使用
- 体細胞バリアントのバイオマーカーとしての評価を、AMPガイドラインのEvidence tierレベルで分類し、治療薬や臨床試験情報を含めたレポートを作成
- 主要ながんにおけるバイオマーカー情報などを収録した、専用の知識ベースGolden Helix CancerKBが利用可能

遺伝学的検査における使用工程

Filgen® biosciences & nanosciences

■ **VarSeq**
- データリソースを利用した、バリアント（VCFファイル）へのアノテーション付け
- データリソースのアノテーションや疾患の遺伝形式などに基づいた、バリアントのフィルタリング
- ゲノムブラウザーでのシークエンスデータ確認

■ **VSClinical**
- ACMGガイドラインに沿った、バリアントごとの病原性評価
- 遺伝子パネル実験のシークエンスカバレッジ確認
- レポート作成

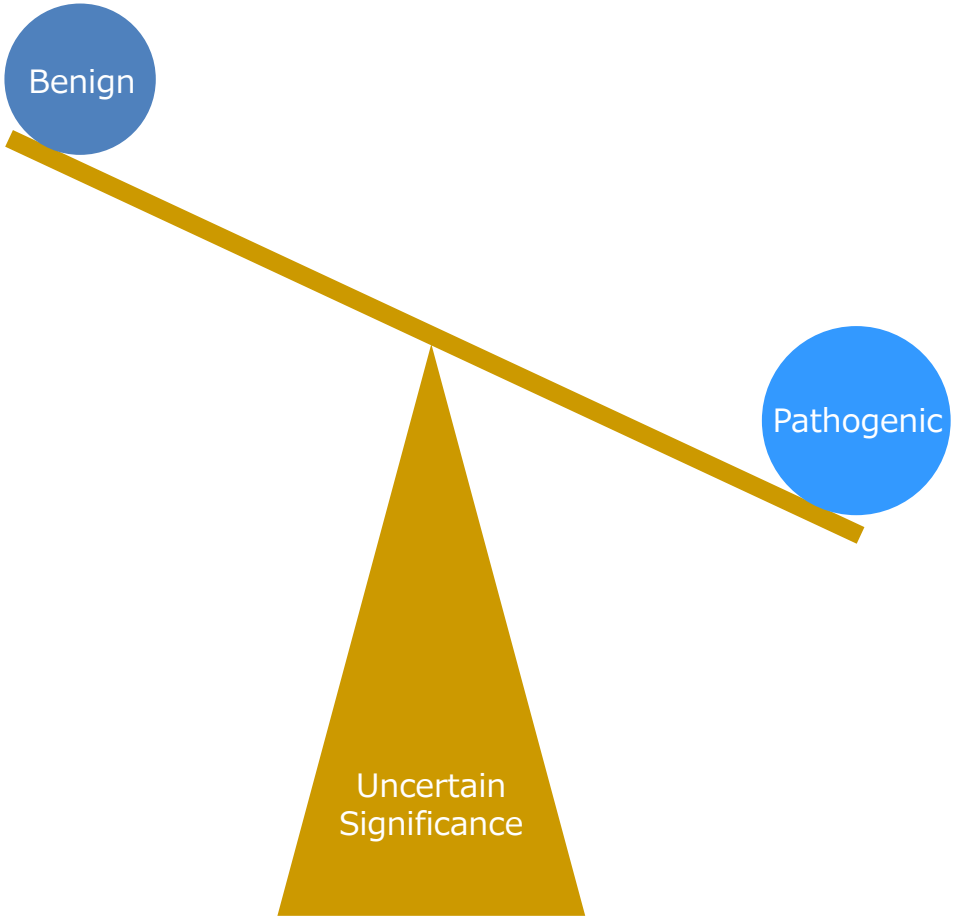
生殖細胞系列バリアントの病原性評価

■ **病原性の評価方法**

- Clinical presentation
- Gene function
- Bioinformatic evidence
- Population frequencies

■ **ACMGガイドライン**

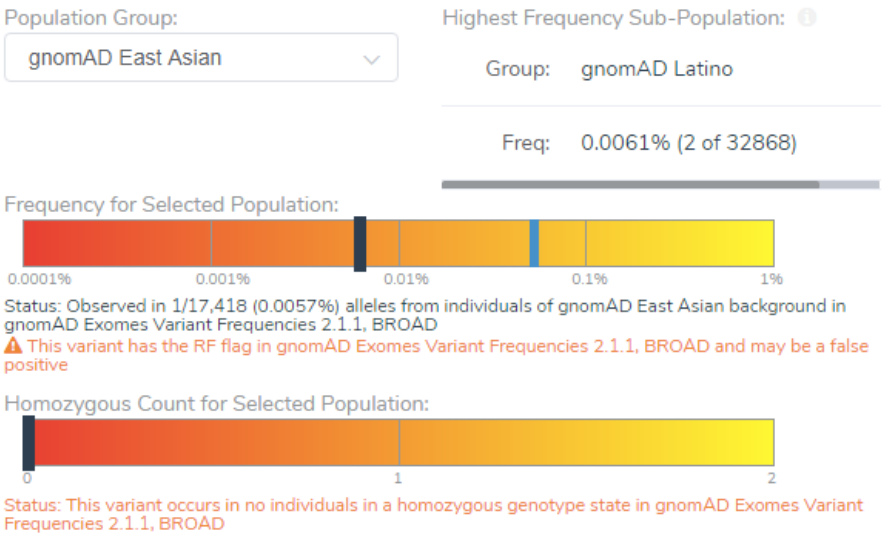
- 33種類の評価項目
- 評価スコアの合計より、バリアントの病原性を5段階に分類

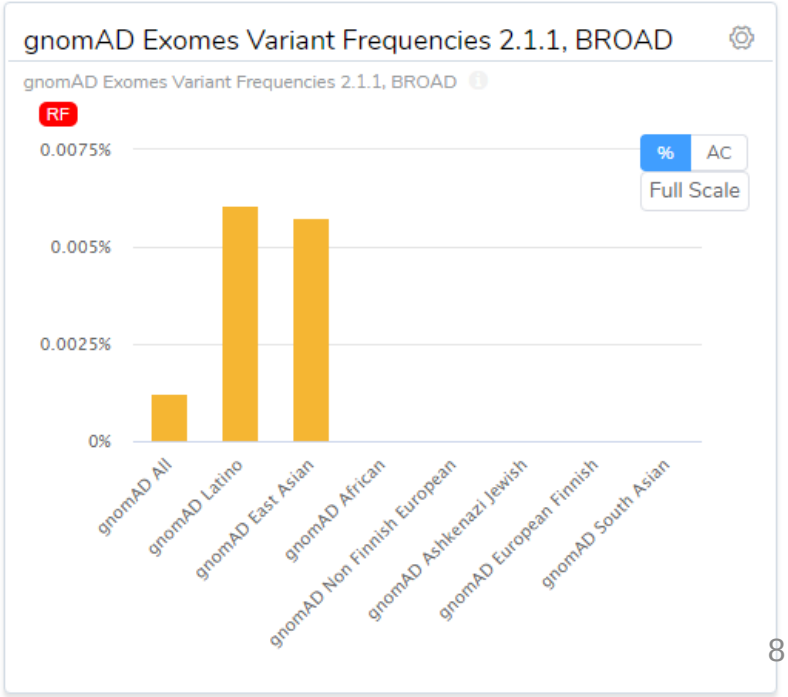


アレル頻度情報による評価

■ **アレル頻度／コントロールデータベースを用いた評価**

- gnomAD, 1000 Genomesおよびユーザーカスタムデータベースを使用
- 集団内のアレル頻度が高いバリアントは良性で、コントロールに存在しないか、または頻度の低いものは病原性とする
- データベース内の集団グループごとの頻度、Homozygous/Heterozygousごとの頻度なども確認可能





遺伝子上の位置情報による評価

Filgen® biosciences & nanosciences

■ **遺伝子上の位置情報を用いた評価**

- バリアントが、遺伝子のホットスポットや機能ドメイン上に存在することによる評価
- ホットスポット上に存在し、なおかつ同じ領域に良性のバリアントが他に存在しない場合、病原性ありとする
- 評価画面上で、近傍領域のバリアント情報を確認

Variant Type: All | Missense | LoF

Within Same: Gene | Exon | Codon

Classification: All | Benign | Pathogenic

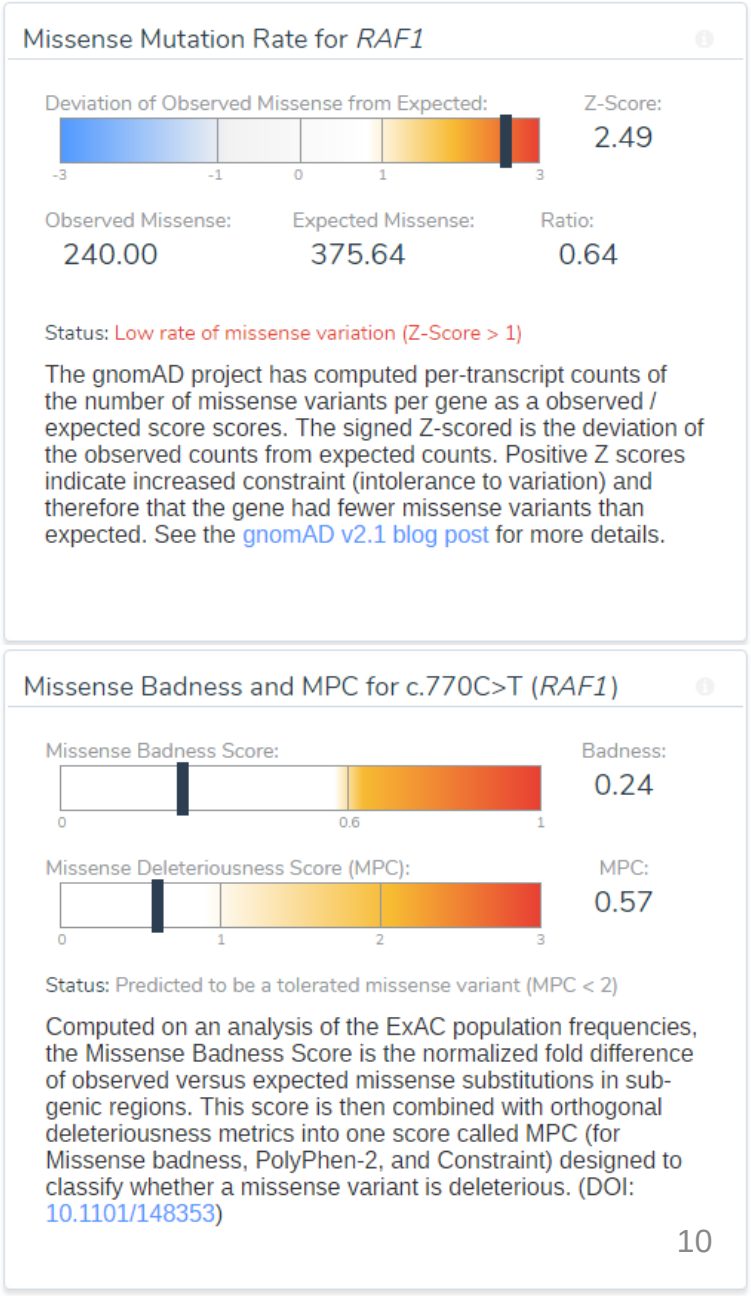
Rating:

Dist AA/bp	Variant	Exon	Effect	Sources	Clinical Significance	Rating/Last Seen
-1 / -4	c.766A>G (p.R256G)	7 / 18	Missense	ClinVar	Likely pathogenic	★★☆☆
-1 / -3	c.767G>C (p.R256T)	7 / 18	Missense	ClinVar	Uncertain Significance	☆☆☆☆
-1 / -2	c.768G>C (p.R256S)	7 / 18	Missense	ClinVar	Likely pathogenic	★☆☆☆
-1 / -2	c.768G>T (p.R256S)	7 / 18	Missense	ClinVar	Pathogenic	★★★☆
0 / -1	c.769T>A (p.S257T)	7 / 18	Missense	ClinVar	Likely pathogenic	★☆☆☆
0 / -1	c.769T>C (p.S257P)	7 / 18	Missense	ClinVar	Likely pathogenic	★★★☆
0 / 0	c.770C>G (p.S257W)	7 / 18	Missense	ClinVar	Uncertain Significance	★☆☆☆
0 / 0	c.770C>T (p.S257L)	7 / 18	Missense	ClinVar	Pathogenic	★★★☆
1 / 3	c.773C>G (p.T258R)	7 / 18	Missense	ClinVar	Likely pathogenic	★☆☆☆
2 / 5	c.775T>A (p.S259T)	7 / 18	Missense	ClinVar	Pathogenic	★★★☆

ミスセンスバリアントの評価

■ **ミスセンスバリアントに関する評価**

- 評価対象の遺伝子において、ミスセンスバリアントが疾患の原因となりうるかの評価
- データベース登録されている、良性のミスセンスバリアントの割合や、コンピュータ予測によって、ミスセンスバリアントの病原性を評価したスコアが計算される
- 良性のミスセンスバリアントが多く、なおかつタンパク質の短縮を引き起こすバリアントが疾患の原因だと考えられる場合は、ミスセンスバリアントは良性と判定される



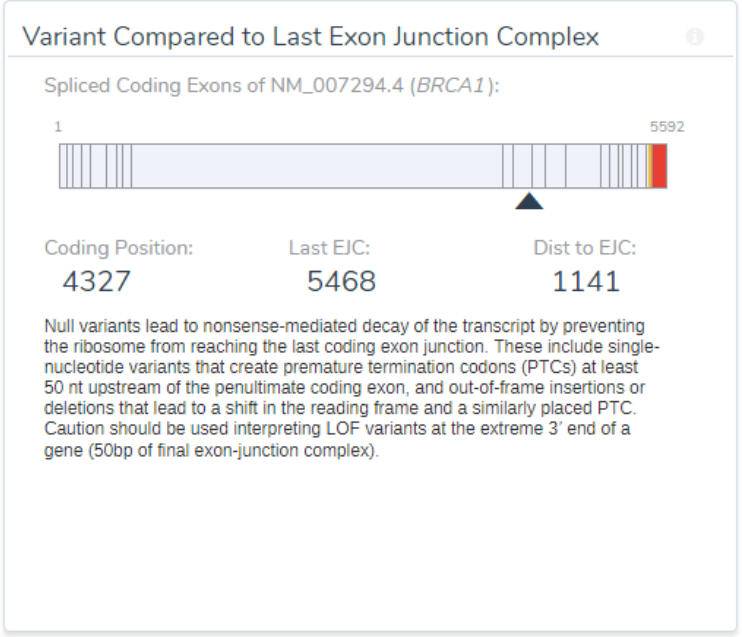
ナンセンスバリアントの評価

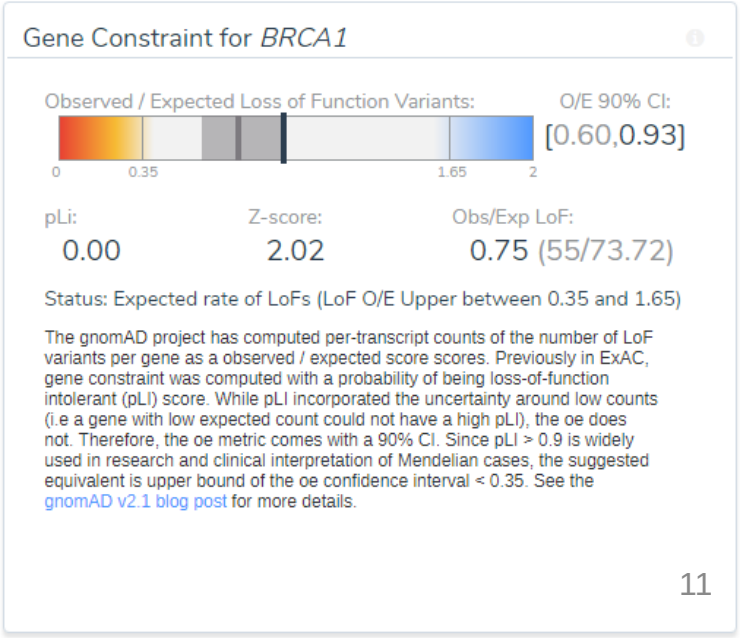
■ **ナンセンスバリアントに関する評価**

- 評価対象の遺伝子において、終止コドンへの置換を引き起こす機能喪失（LoF）バリアントや、フレームシフトを引き起こすバリアントが疾患の原因となりうるかの評価

- 同じ遺伝子上で、評価対象のバリアントより下流に、病原性のナンセンスバリアントが多数報告されている場合は、強い病原性をもつと判定されるが、バリアントが遺伝子の最後のエクソン（または最後から2番目のエクソンの最終50bp以内）に位置する場合は、病原性なしとなる

- 遺伝子ごとに、ナンセンスバリアントの実測値／期待値のスコアが計算されるので、この値に基づいて評価を行うことも可能



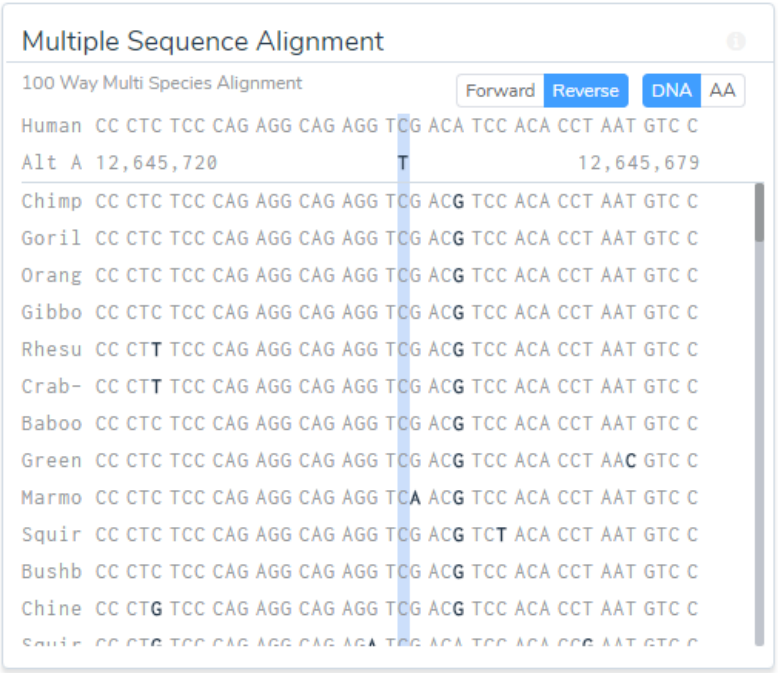


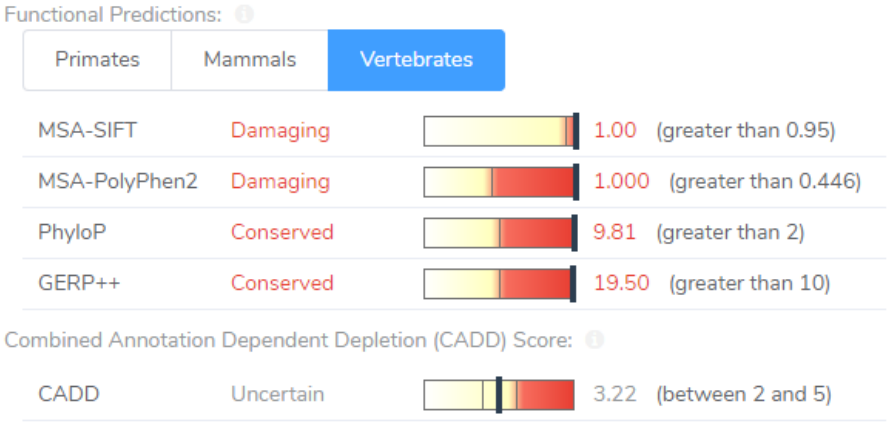
コンピュータ予測による評価

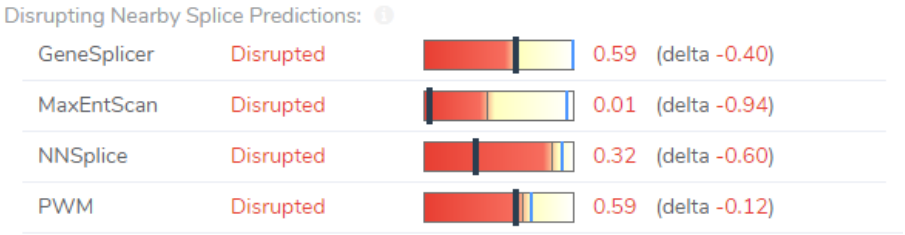
■ **コンピュータ予測を用いた評価**

- 生物種間の保存度や、SIFT, PolyPhen2などの複数のコンピュータ予測用ツールによって、バリアントの有害性を判定する

- 同義バリアントかつ、スプライシング異常を引き起こすものについては、GeneSplicerなどのスプライス部位予測用ツールが使用される



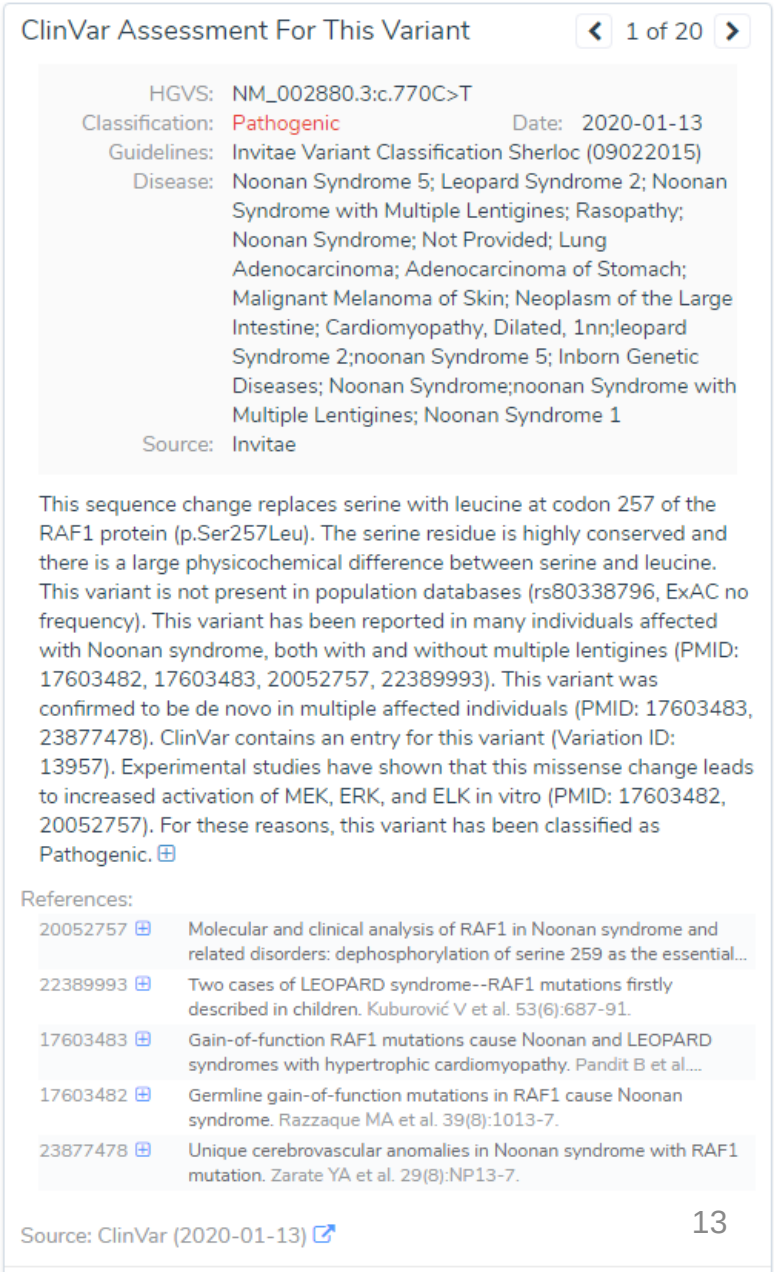




臨床研究情報による評価

■ **既報の臨床研究に基づいた評価**

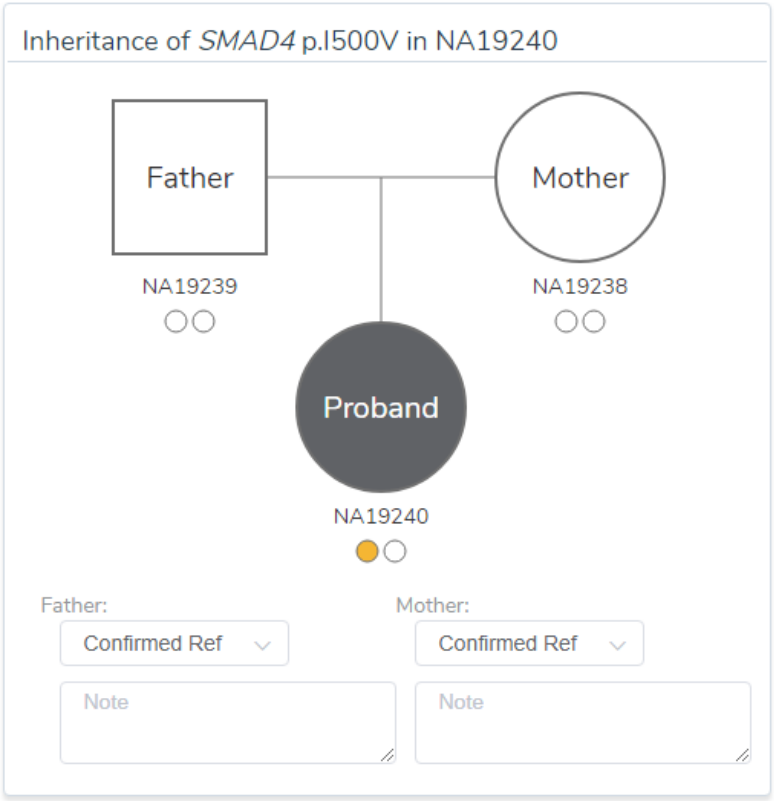
- すでに同じバリアントが、データベース登録されていることに基づいた評価
- データベースで病原性バリアントと登録されているものと同じアミノ酸置換を引き起こすものや、遺伝子上の同じ位置に存在し、異なるアミノ酸置換を引き起こすものに対しての評価が可能
- 評価画面上で、データベース登録されているレコード情報や、出典論文情報なども確認が可能



血縁サンプルを用いた評価

■ **両親のサンプルデータを利用した評価**

- 罹患者のサンプルに加え、その両親のサンプルのバリアントデータを用いた評価
- 両親には存在せず、罹患者のみに存在するバリアント（de Novoバリアント）の場合は、病原性ありと判定される
- 両親がバリアントをもたないことを確認済みの場合は、病原性が強いと判定されるが、未確認の場合は中程度の判定となる



評価結果の確認

■ **最終評価結果**

- クリアした評価項目のID、および病原性の分類結果が表示される
- 各評価項目の強さや、サマリーなども確認が可能

Scoring System:

ACMG Variant Classification (Richards et al. 2015)

To change the classification system close the evaluation and edit the Project Options...

Scored Criteria by Strength:

Pathogenic	Very Strong		x0
	Strong	PS1	x1
	Moderate	PM2, PM1, PM5	x3
	Supporting	PP2, PP3	x2
Benign	Supporting		x0
	Strong		x0
	Stand Alone		x0

ACMG Classification:

Pathogenic

Rule Pathogenic (iii): 1 Strong AND ≥3 Moderate, OR 2 Moderate AND ≥2 Supporting, OR 1 Moderate AND ≥4 Supporting

Recommended Criteria:

- Perform functional assay to determine the effect of the variant in the gene
- Establish the state of the variant in the parents

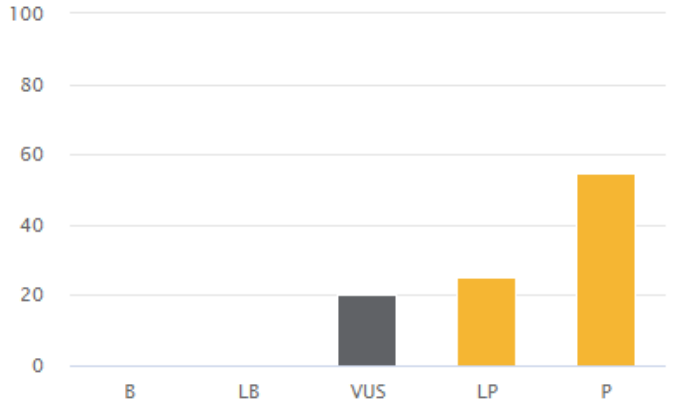
> ACMG Criteria Summary

Golden Helix Classification Prediction

Probability of Pathogenic given Scored Criteria:

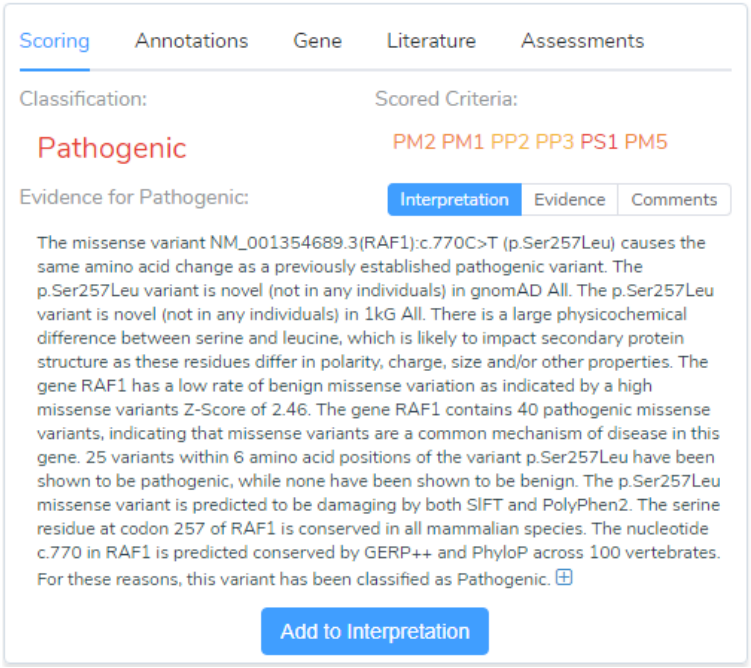
Status: Probability of 88.7% predicting classification of Pathogenic

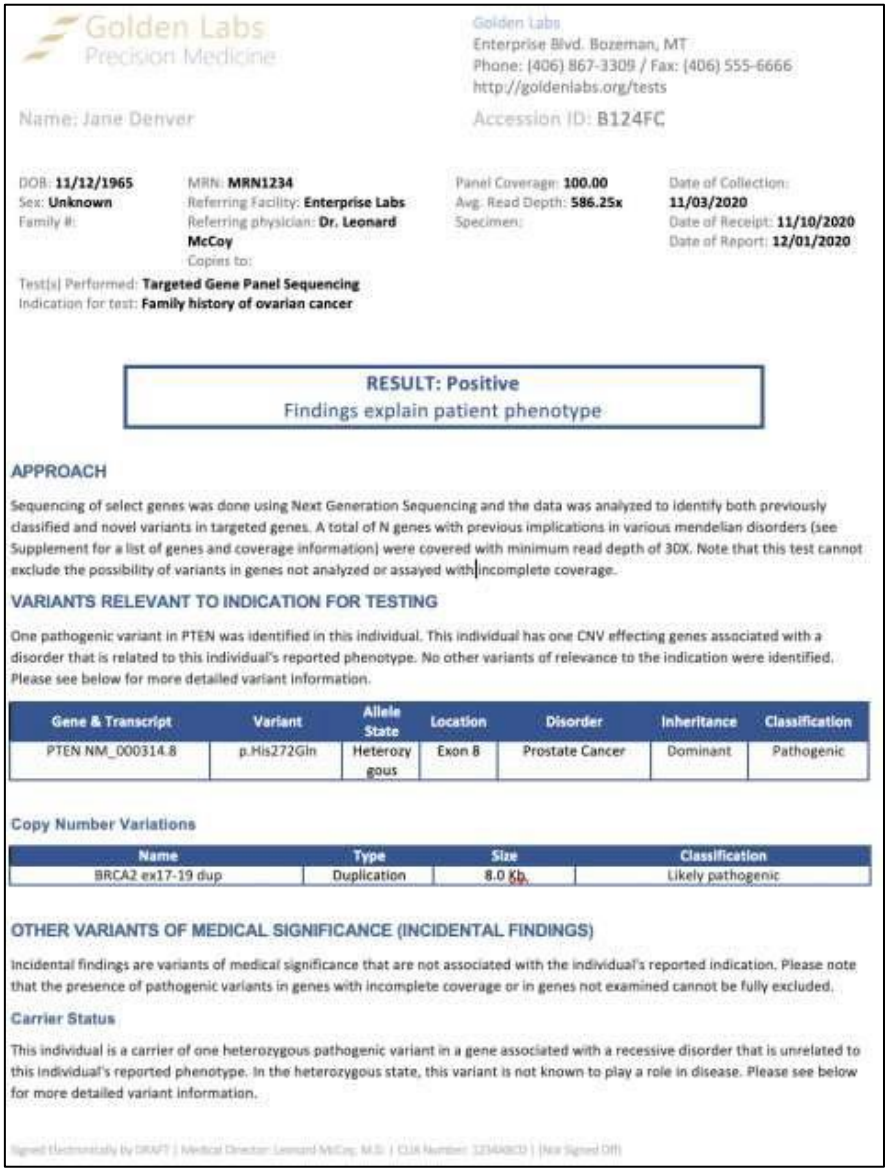
Probability for Each Classification:



A probability model was developed that takes the number of criteria scored at each evidence level and computes a probability of each of the five classifications. It was modeled and trained to agree with ACMG classification rules when provided non-conflicting criteria.

臨床的解釈とレポート作成





■ バリアントの臨床的解釈とレポート

- 評価が完了すると、クリアした評価項目に基づき、バリアントの臨床的解釈のテキストが自動生成される
- 解釈のテキストは、サンプル情報や疾患情報などとともに、レポート出力が可能

評価の実行方法

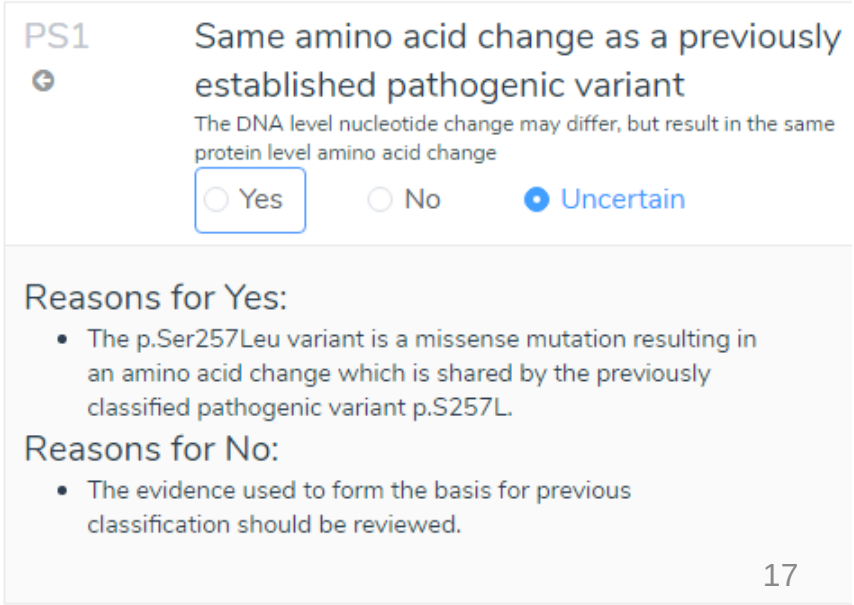
■ **自動分類用ツールから実行する場合（ACMG Sample Classifier）**

- 全バリアント（VCFファイル）へ、評価結果と関連データを自動でアノテーション付け
- レポート作成は不可

Chr:Pos	Ref/Alt	Zygosity	DP	Gene Name	HGVS pDot	Sequence Ontology	Classification	ACMG Classification Criteria
7:107824678	A/G	Homozygous Variant	2	NRCAM	?	splice_region_variant	Benign	BA1,BS2,BP4,BP7
7:117144425	-/A	Heterozygous	15	CFTR	?	splice_region_variant	Likely Benign	PM2,BP4,BP7
7:117176569	GATT/-	Heterozygous	4	CFTR	?	splice_region_variant	Benign	BA1,BP7,BP6
7:117180144	T/-	Heterozygous	5	CFTR	?	splice_region_variant	Likely Benign	PM2,BP4,BP7
7:117199533	G/A	Homozygous Variant	27	CFTR	NP_000483.3:p.Val470Met	missense_variant	Benign	BA1,BS2,BP6
7:117227860	G/A	Heterozygous	12	CFTR	NP_000483.3:p.Gly551Asp	missense_variant	Likely Pathogenic	PM1,PS1,PM5,PP3
7:117242922	G/-	Heterozygous	8	CFTR	?	splice_region_variant	Pathogenic	PM2,PVS1,PP3

■ **グラフィカル画面でバリアントごとに評価を行う場合（Variant Dashbord）**

- バリアントフィルタリングによって抽出された、少数のバリアントのみに対して、評価項目に関する質問の回答を選択していくことで評価を行う
- 推奨される回答は、バリアントデータに基づき、ソフトウェアが自動的にマーク付けする
- 推奨される回答の根拠も、画面上で確認が可能



ACMG Sample Classifier

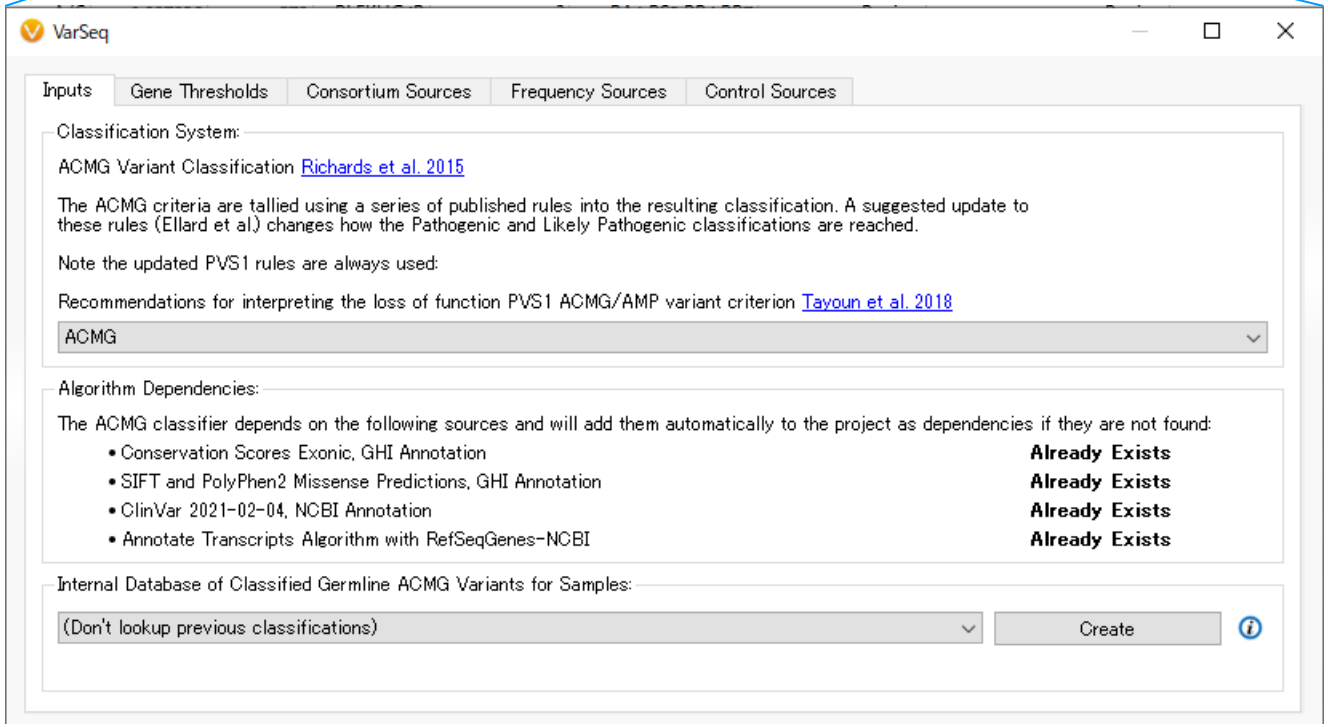
■ **自動分類用ツールから実行する場合**

- 自動分類用ツール（ACMG Sample Classifier）では、全バリアントに対しての一括評価が可能
- 評価に用いるガイドライン（ACMG or ACGS）やアレル頻度データベースの選択も可能

Variant Info		Identified_variants···	
Chr:Pos	Ref/Alt	VAF	DP
10:8116242	-/A	0.379473	1068
10:8116598	G/A	0.536101	554
10:89720636	T/C	1	191
10:89720873	AAGGTCAGT···	0.507937	193

Variant Info		Identified_variants···					
Chr:Pos	Ref/Alt	VAF	DP	Gene Name	HGVS pDot	ACMGClassificatio···	Classification
10:8116242	-/A	0.379473	1068	GATA3	?	PM2,BP4,BP7	Likely Benign
10:8116598	G/A	0.536101	554	GATA3	?	BA1,BP4,BP7,BP6	Benign
10:89720636	T/C	1	191	PTEN	?	PM2,BP4,BP7	Likely Benign
10:89720873	AAGGTCAGT···	0.507937	193	PTEN	NP_000305.3:···	PM2,PVS1 Strong	Likely Pathogenic

評価結果のアノテーション

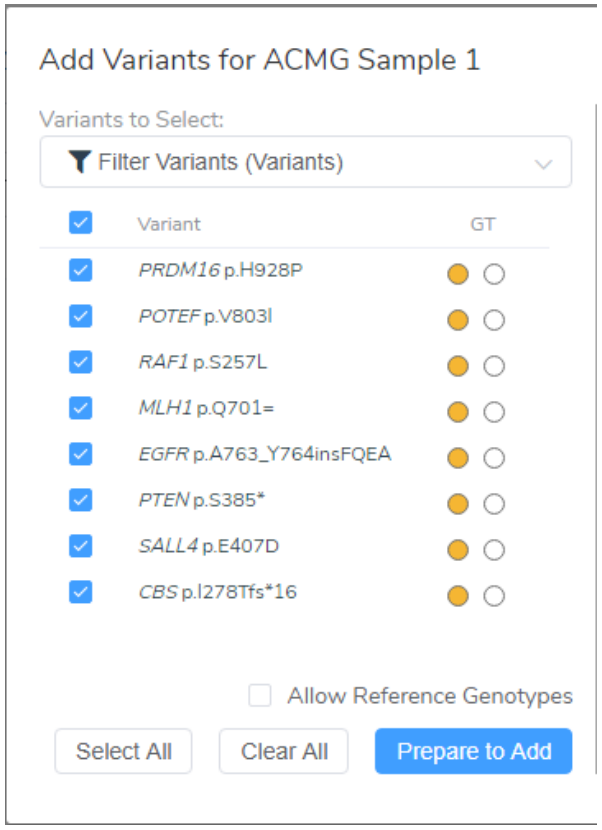


Variant Dashbord

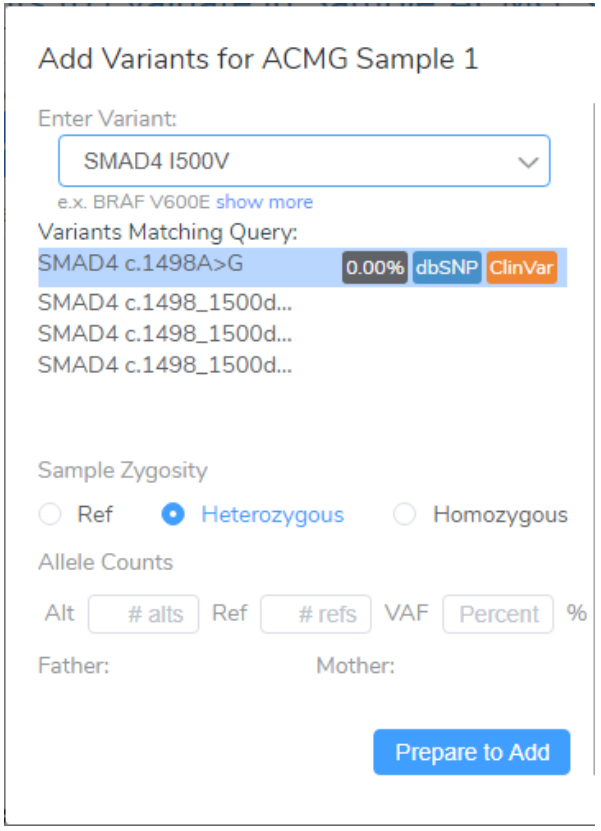
■ **グラフィカル画面でバリアントごとに評価を行う場合**

- バリアントごとに評価を行う場合は、VCFファイル内の全バリアントを、評価に用いる少数のバリアントに絞り込みが必要

- VCFファイルに含まれていないバリアントの場合は、手動でバリアント情報を入力し、評価に用いることも可能



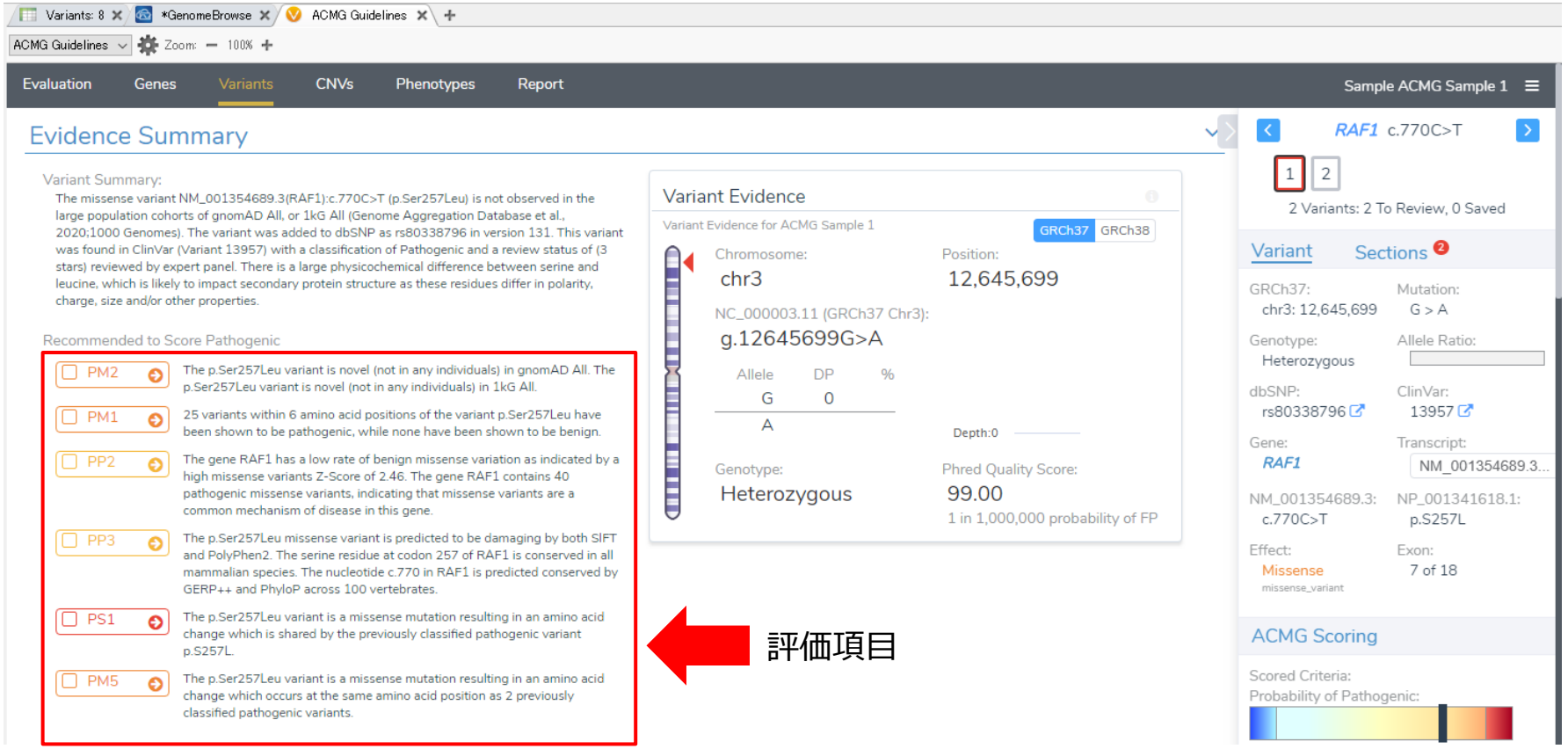
バリアントフィルタリング結果より選択



バリアントを手動で入力

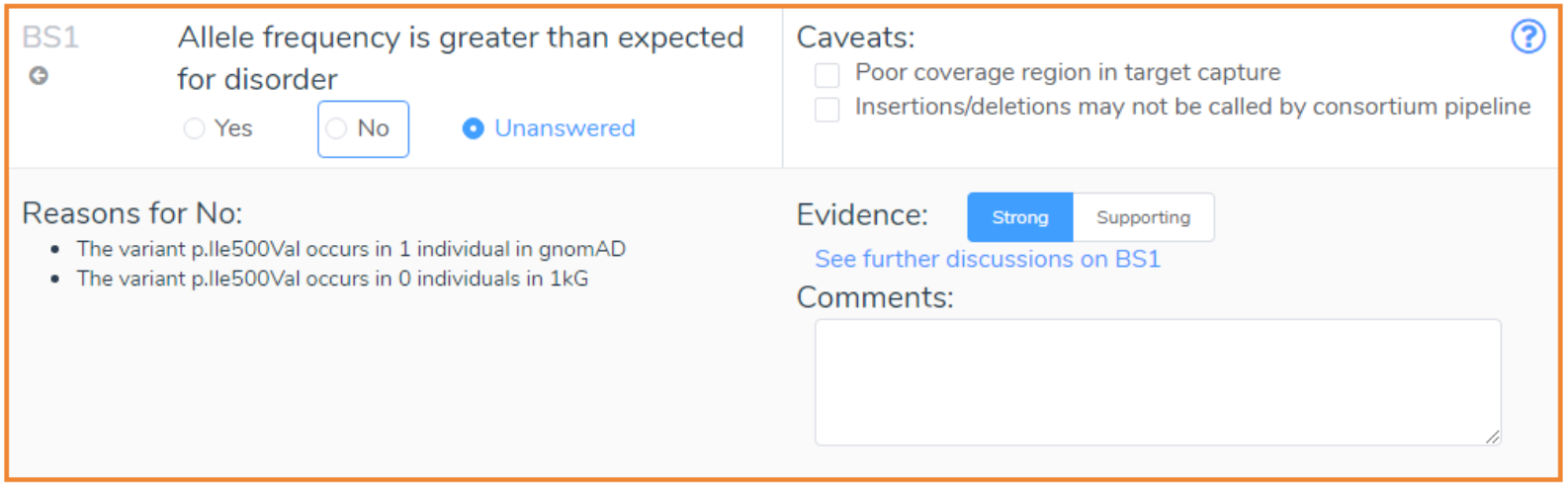
Variant Dashbord

- スタート画面で、各バリアントごとにサマリー情報と、該当する評価項目を確認
- 各評価項目より、評価に関する質問の画面にジャンプする



Variant Dashbord

- 各評価項目の質問に回答すると、最終的な評価スコアが計算される
- 各評価項目では、VSClinicalが判断した適切な回答へのマークや、判断の根拠などが確認できる



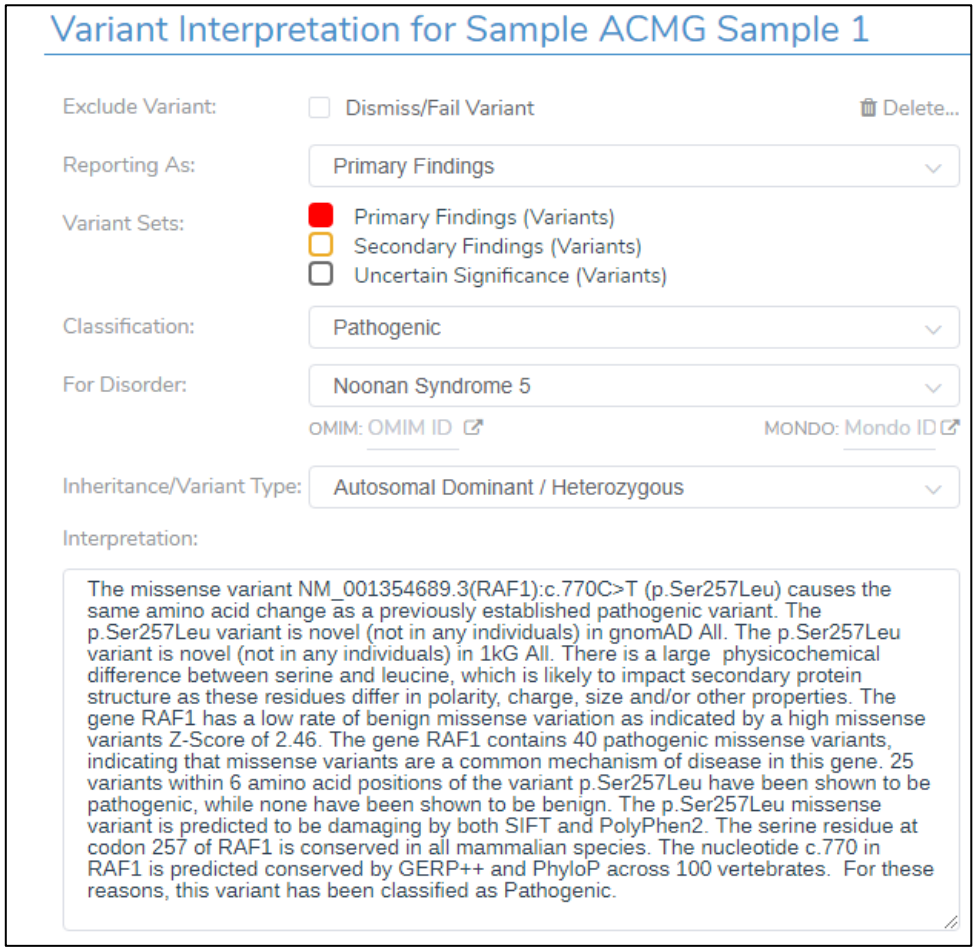
Variant Dashbord

- すべての評価項目に回答すると、クリアした評価項目に基づき、臨床的解釈のテキストが自動生成される

- 必要に応じて、Primary Findings / Secondary Findingsの区別や、疾患名などとともにレポート出力が可能

- レポートには、NGS実験の各種QCデータや、評価に用いたデータベース名、参考論文などの情報を追加が可能

  - ✓ Coverage Summary
  - ✓ Variant Summary
  - ✓ Gene Coverage
  - ✓ Annotation Sources
  - ✓ Inline References …など



お問い合わせ先：フィルジェン株式会社

TEL: 052-624-4388 (9:00～18：00)

FAX: 052-624-4389

E-mail: biosupport@filgen.jp