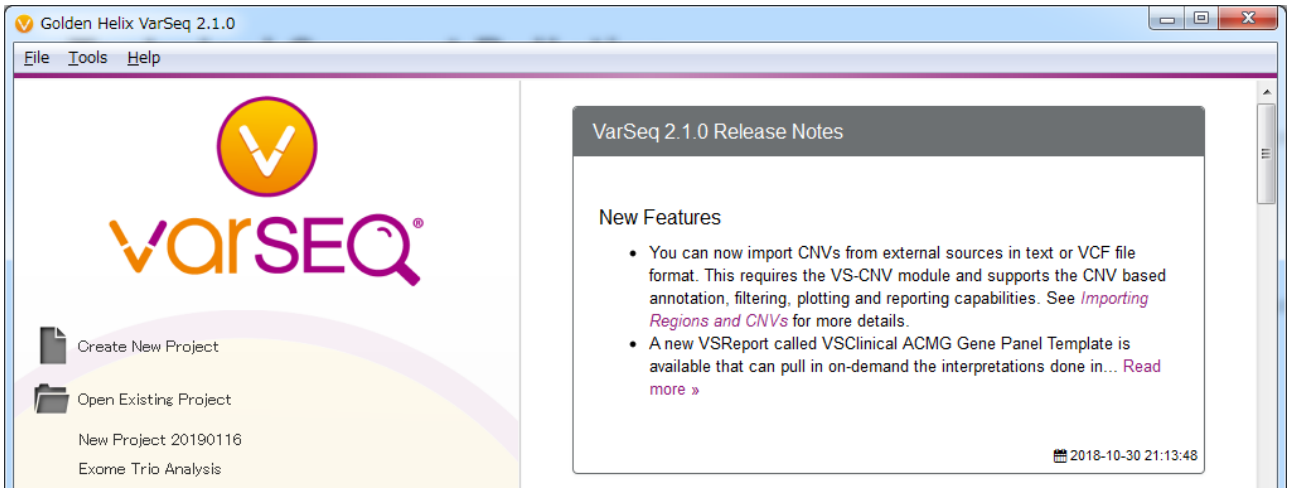
2019年11月15日　臨床ゲノム情報解析ハンズオントレーニング

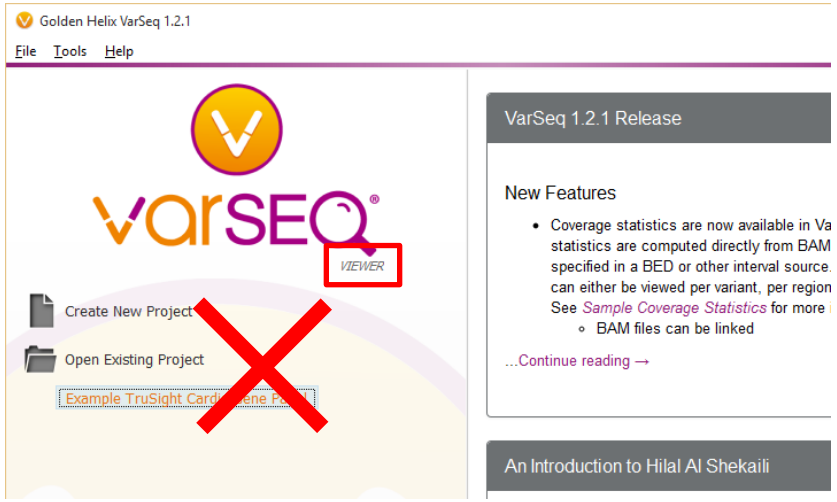
VarSeq
（クリニカルシークエンス編）

フィルジェン株式会社　バイオサイエンス部
(biosupport@filgen.jp)

VarSeq起動画面の確認

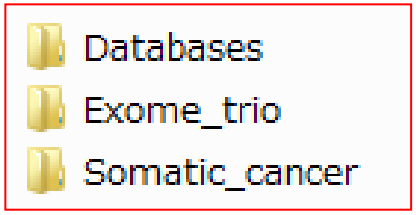
○





- VarSeqを起動した際に、上の図のように表示されていることをご確認ください。下の図のように、ログイン画面や、「Viewer」と表示されている状態では、ソフトウェアを使用できません。

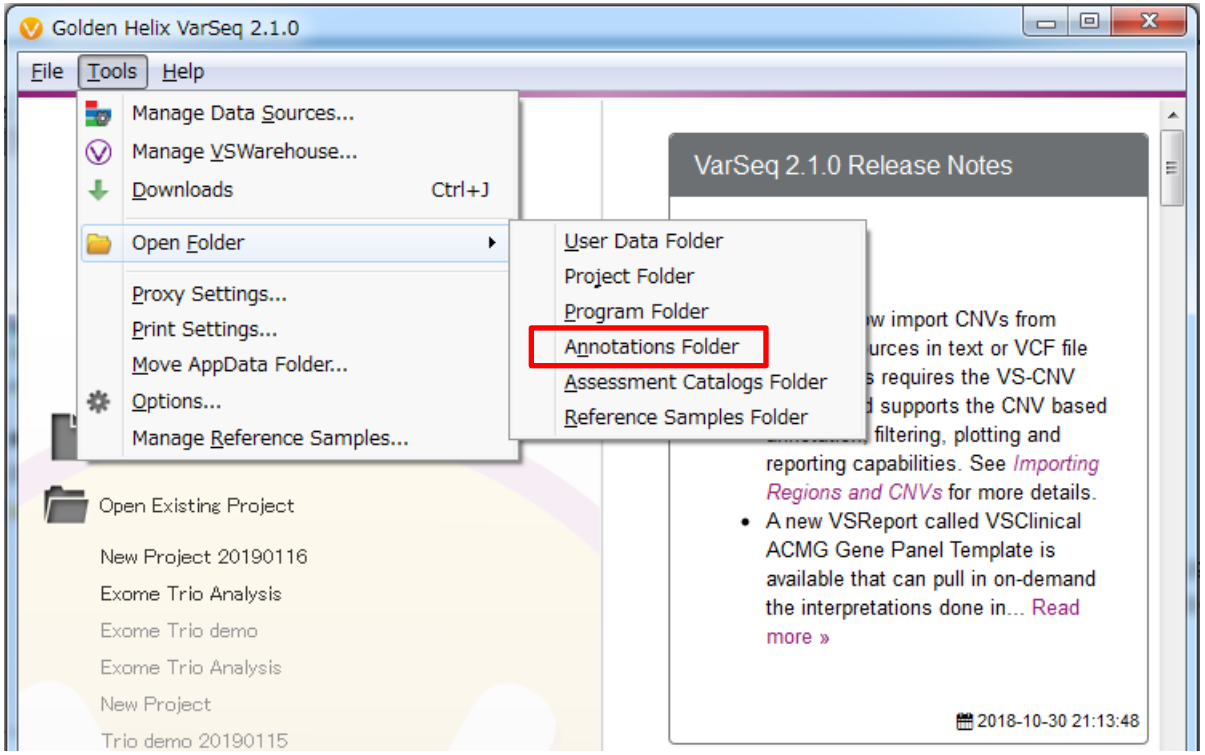
本日使用するデータ



- ✓ **Databases**
  - 各種データベースのアノテーションファイルが納められている。
- ✓ **Exome_trio**
  - 遺伝性疾患の解析に用いるサンプルデータが納められている。
- ✓ **Somatic_cancer**
  - がん体細胞変異の解析に用いるサンプルデータが納められている。

- USBメモリで配布した「VarSeq」フォルダを、PC上の任意の場所（デスクトップなど）にコピーしてください。
- VarSeqフォルダ内に、上記3つのフォルダが入っていることを確認してください。

本日使用するデータ



- VarSeq上より、Tools -> Open Folder -> Annotations Folderをクリックし、フォルダを開きます。
- 配布した「Databases」フォルダ内のすべてのファイルを、 Annotations Folder内にコピーしてください。

体細胞変異解析ワークフロー

手順1： サンプルデータのインポート

- 解析プロジェクトを作成
- 腫瘍・正常サンプルそれぞれのVCF, BAMファイルをインポート

手順2： アノテーション付加

- 変異データに対して、様々なデータベースを用いたアノテーション付加の実行

手順3： フィルタリング

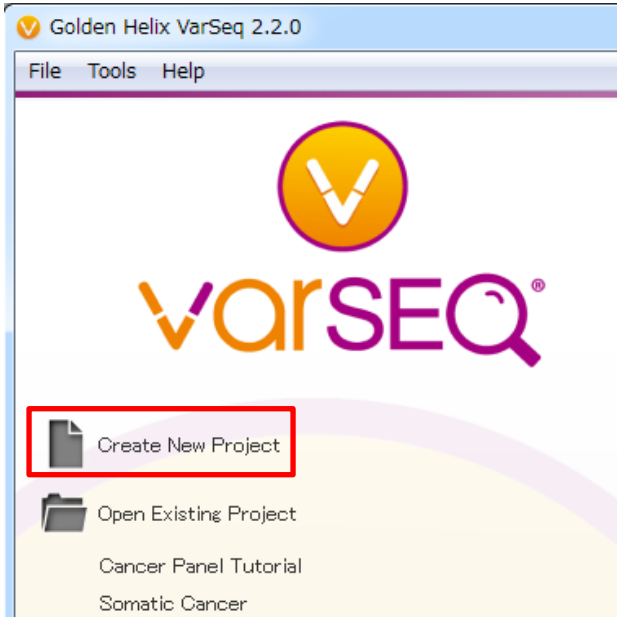
- 体細胞、生殖細胞系列変異の抽出
- ゲノムブラウザーによる確認

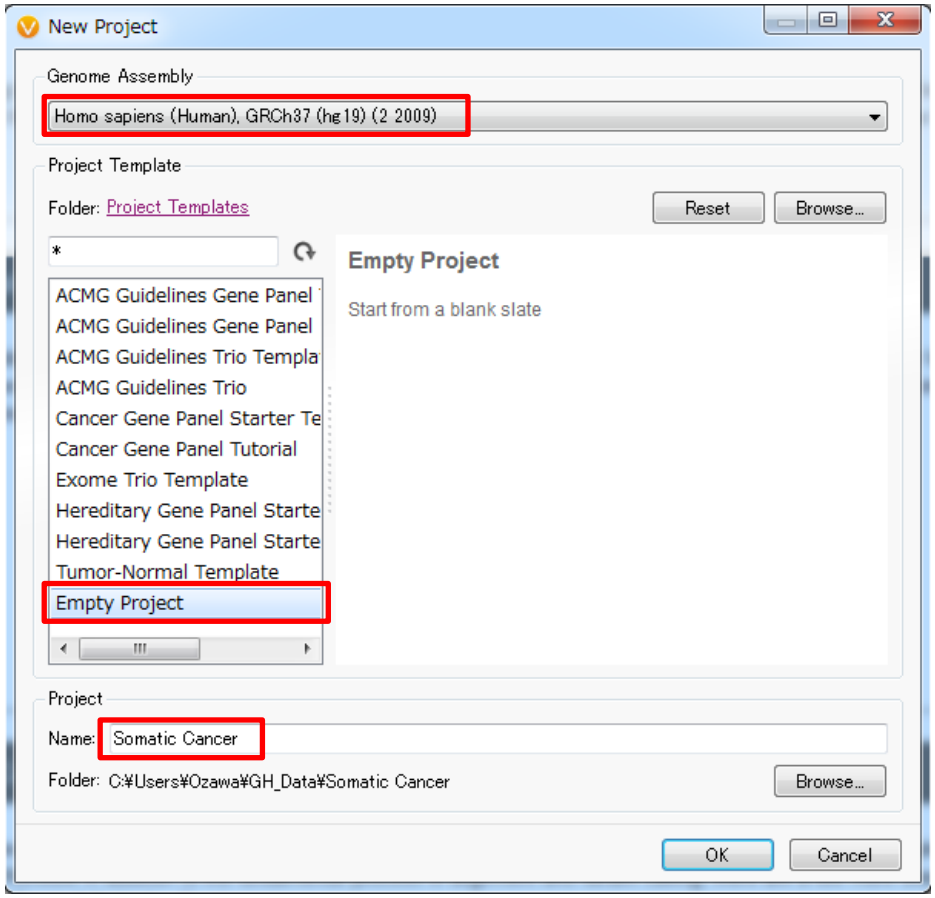
手順4： レポート作成

- 抽出変異情報を用いてレポートの作成

手順1. サンプルデータのインポート

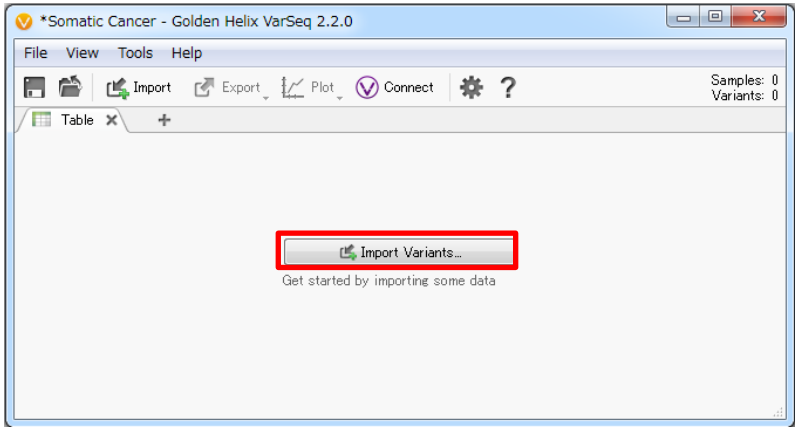
プロジェクトの作成

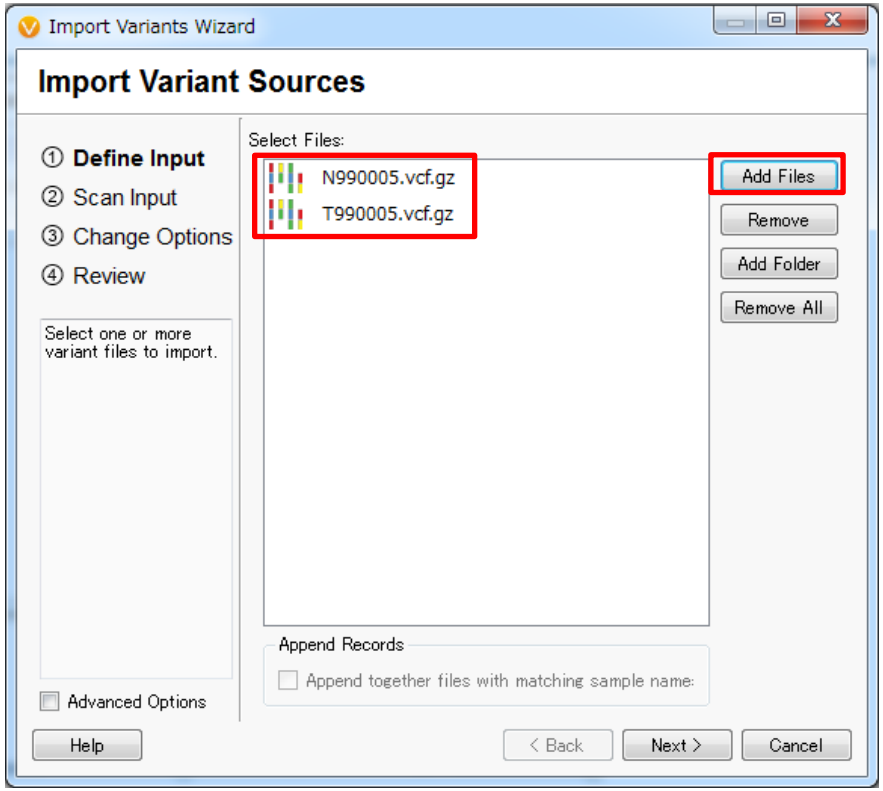




1. メイン画面の「Create New Project」をクリック
2. 任意のプロジェクト名を入力し、またProject Templateに「Empty Project」、Genome Assemblyが「Homo sapiens (Human), GRCh37 (hg19) (2 2009)」となっていることを確認したら「OK」をクリック

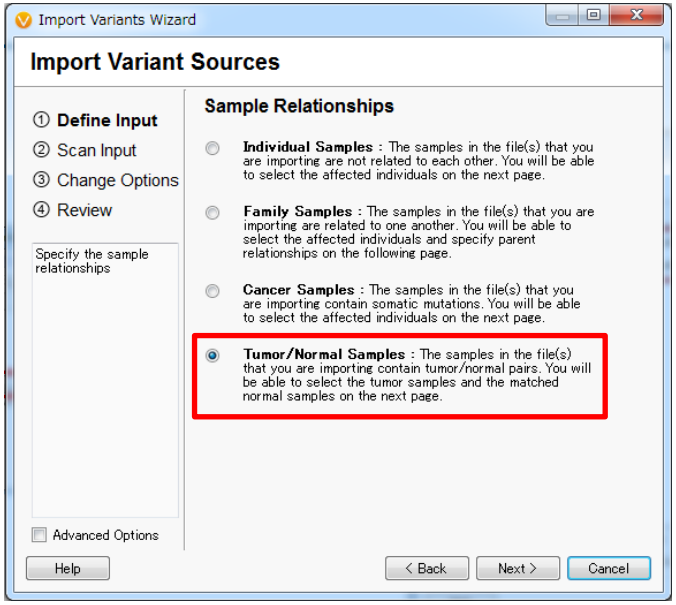
腫瘍・正常サンプルファイルのインポート

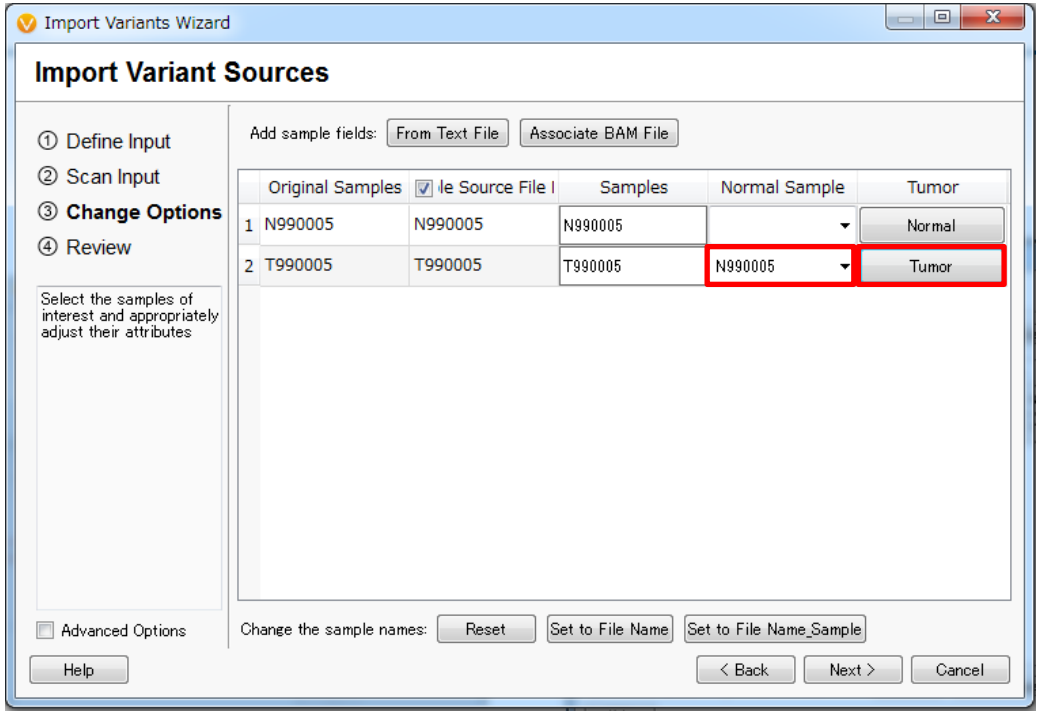




3. 次の画面で、「Import Variants」をクリック
4. Import Variant Sources画面で「Add Files」をクリックし、Somatic_cancerフォルダ内の「N990005.vcf.gz」と「T990005.vcf.gz 」を選択
5. Import Variant Sources画面に両ファイルが表示されたら、「Next」をクリック

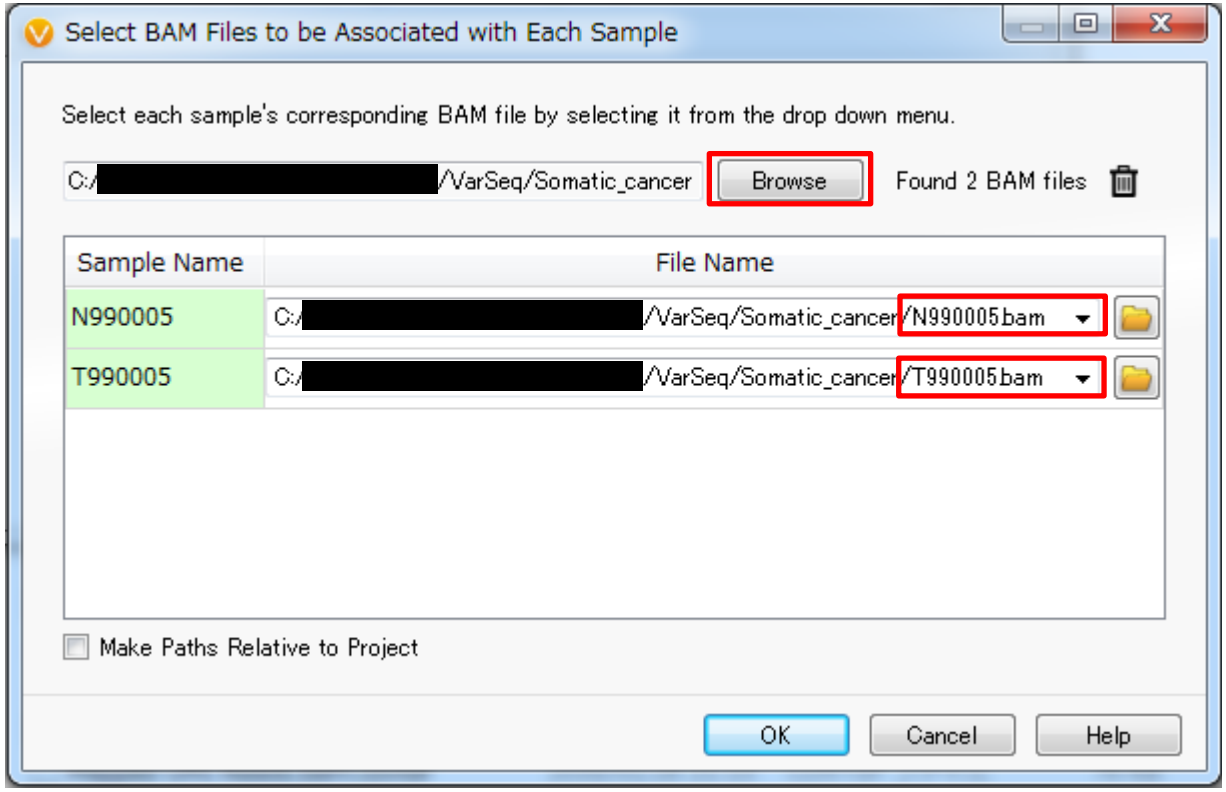
腫瘍・正常サンプルファイルのインポート





6. Sample Relationshipsで、「Tumor/Normal Samples」を選択し、Nextクリック
7. サンプル情報の入力画面で、「T990005」のNormal Sampleフィールドに「N99005」、Tumorフィールドに「Tumor」を選択
8. Add sample fieldsの「Associate BAM File」をクリック

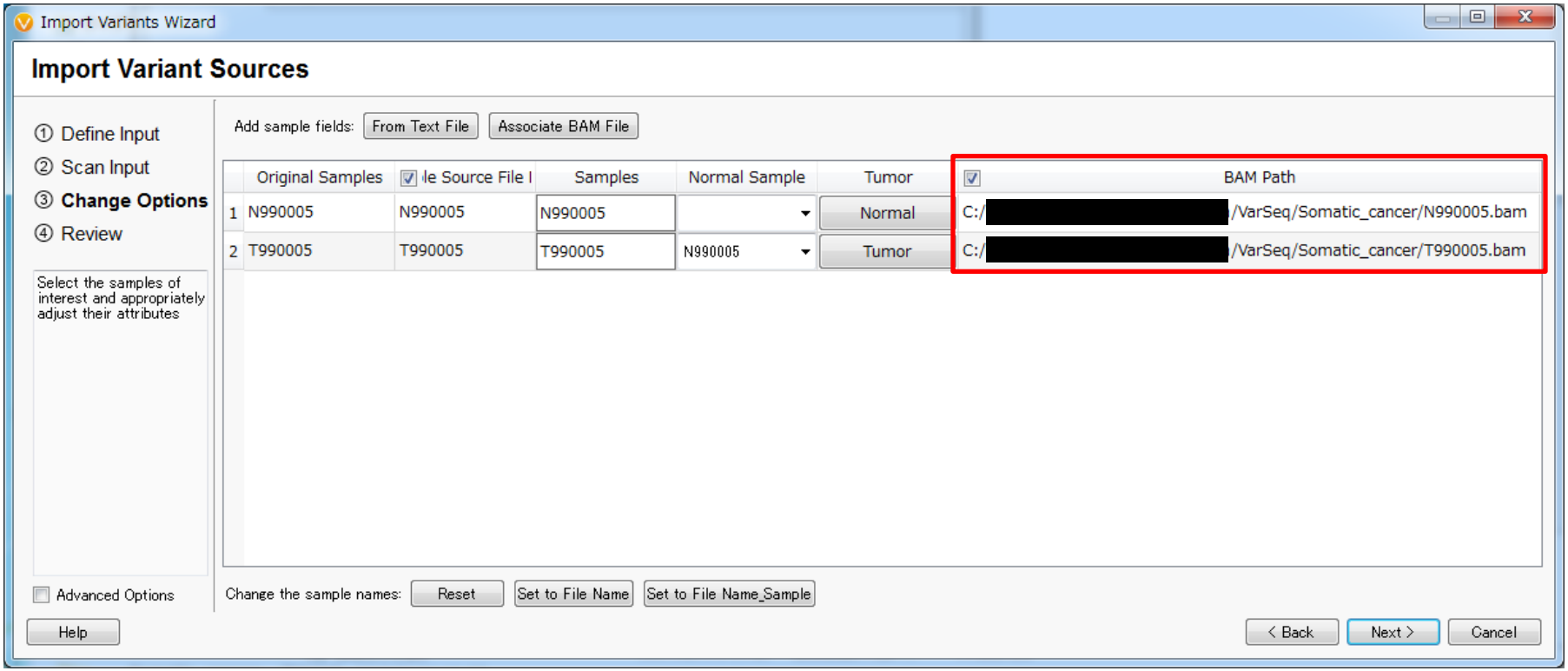
腫瘍・正常サンプルファイルのインポート



9. 各サンプルのFile Nameフィールドのドロップメニューより、各サンプル名のBAMファイルを選択し、「OK」をクリック

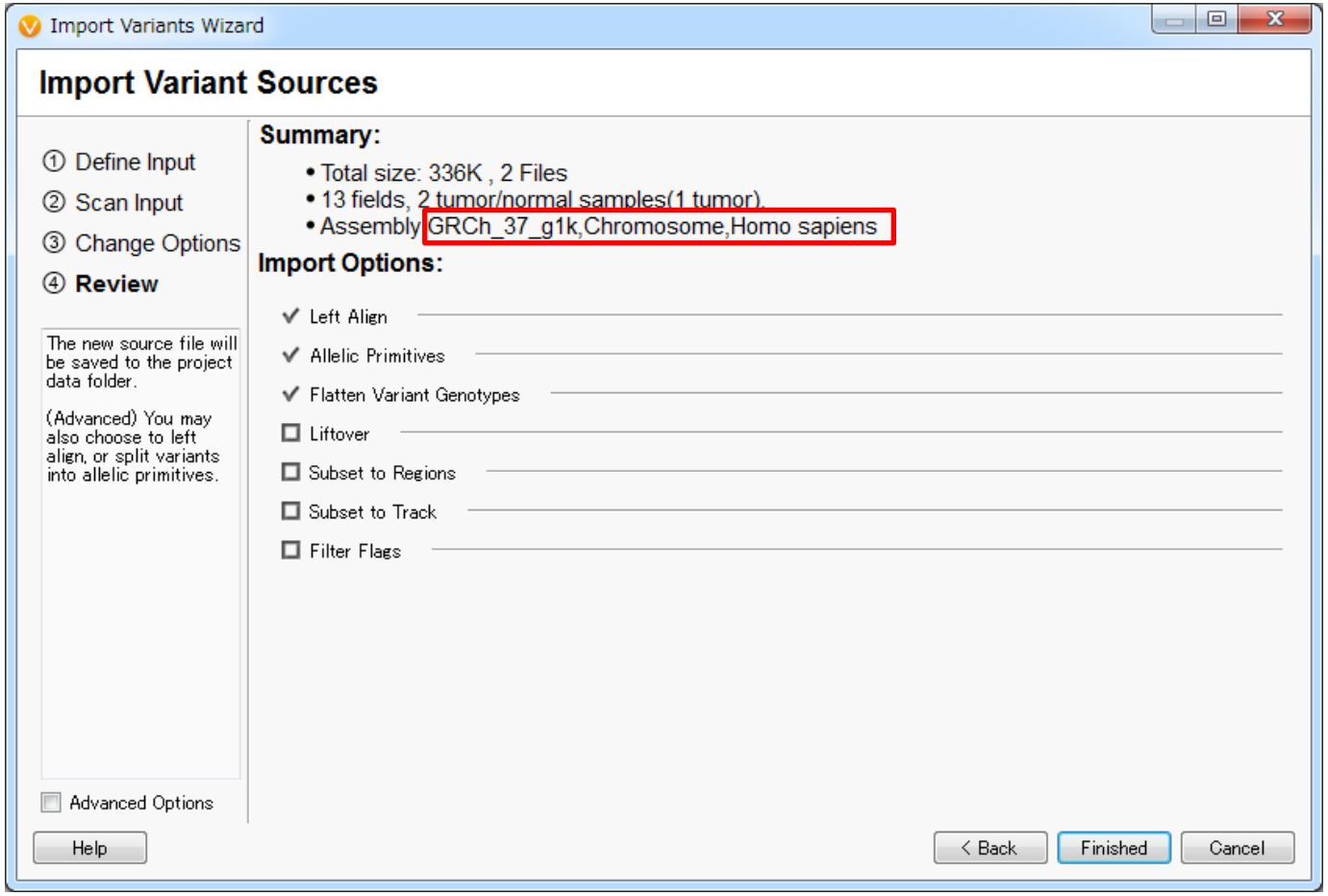
＊ドロップメニューにBAMファイルが表示されない場合は、上部の「Browse」よりSomatic_cancerフォルダを選択する

腫瘍・正常サンプルファイルのインポート



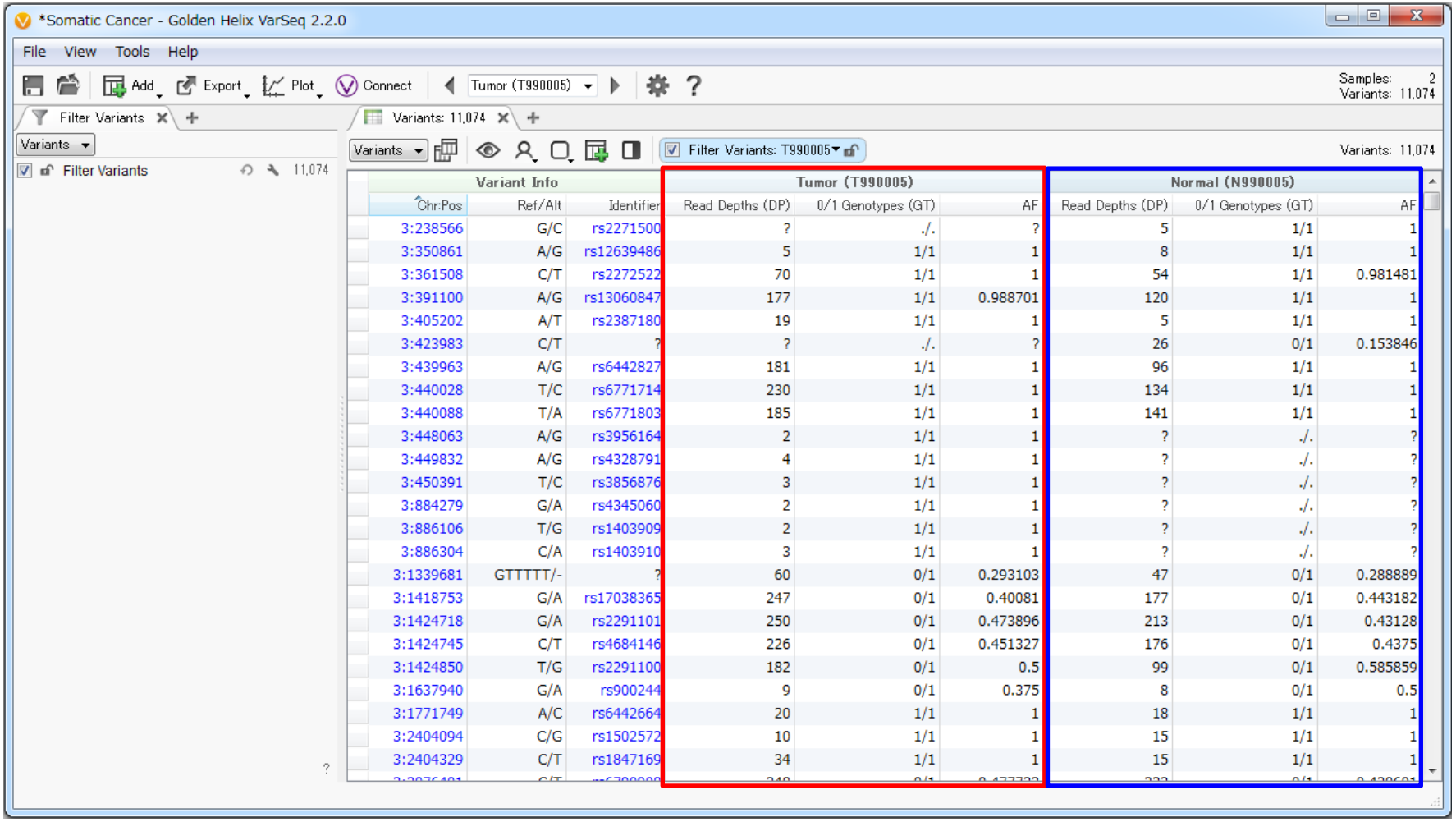
10. 各サンプルのBAM Pathフィールドに、先の画面で指定したBAMファイルへのパスが正しく表示されていることを確認し、「Next」をクリック

腫瘍・正常サンプルファイルのインポート



11. Assemblyに、「GRCh_37_g1K, Chromosome, Homo sapiens」と表示されていることを確認し、「Finished」をクリック

腫瘍・正常サンプルファイルのインポート

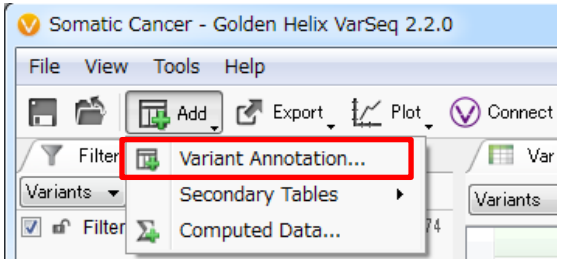


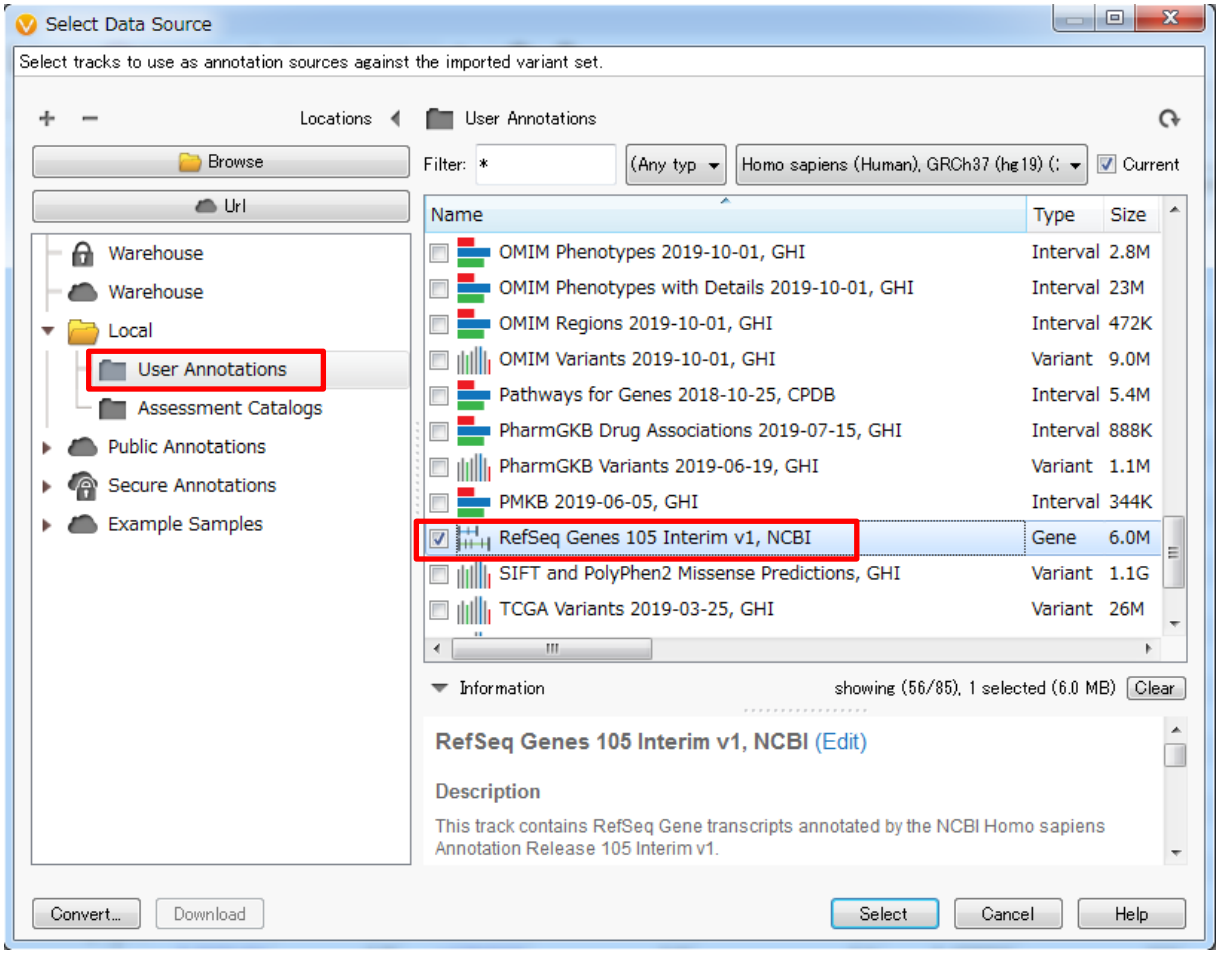
Variant Info			Tumor (T990005)			Normal (N990005)		
Chr:Pos	Ref/Alt	Identifier	Read Depths (DP)	0/1 Genotypes (GT)	AF	Read Depths (DP)	0/1 Genotypes (GT)	AF
3:238566	G/C	rs2271500	?	./.	?	5	1/1	1
3:350861	A/G	rs12639486	5	1/1	1	8	1/1	1
3:361508	C/T	rs2272522	70	1/1	1	54	1/1	0.981481
3:391100	A/G	rs13060847	177	1/1	0.988701	120	1/1	1
3:405202	A/T	rs2387180	19	1/1	1	5	1/1	1
3:423983	C/T	?	?	./.	?	26	0/1	0.153846
3:439963	A/G	rs6442827	181	1/1	1	96	1/1	1
3:440028	T/C	rs6771714	230	1/1	1	134	1/1	1
3:440088	T/A	rs6771803	185	1/1	1	141	1/1	1
3:448063	A/G	rs3956164	2	1/1	1	?	./.	?
3:449832	A/G	rs4328791	4	1/1	1	?	./.	?
3:450391	T/C	rs3856876	3	1/1	1	?	./.	?
3:884279	G/A	rs4345060	2	1/1	1	?	./.	?
3:886106	T/G	rs1403909	2	1/1	1	?	./.	?
3:886304	C/A	rs1403910	3	1/1	1	?	./.	?
3:1339681	GTTTTT/-	?	60	0/1	0.293103	47	0/1	0.288889
3:1418753	G/A	rs17038365	247	0/1	0.40081	177	0/1	0.443182
3:1424718	G/A	rs2291101	250	0/1	0.473896	213	0/1	0.43128
3:1424745	C/T	rs4684146	226	0/1	0.451327	176	0/1	0.4375
3:1424850	T/G	rs2291100	182	0/1	0.5	99	0/1	0.585859
3:1637940	G/A	rs900244	9	0/1	0.375	8	0/1	0.5
3:1771749	A/C	rs6442664	20	1/1	1	18	1/1	1
3:2404094	C/G	rs1502572	10	1/1	1	15	1/1	1
3:2404329	C/T	rs1847169	34	1/1	1	15	1/1	1

12. Tumor (T990005)とNormal (N990005)両サンプルの変異データがインポートされ、プロジェクト画面に表示される

手順2. アノテーション付加

RefSeq Genesアノテーションの付加





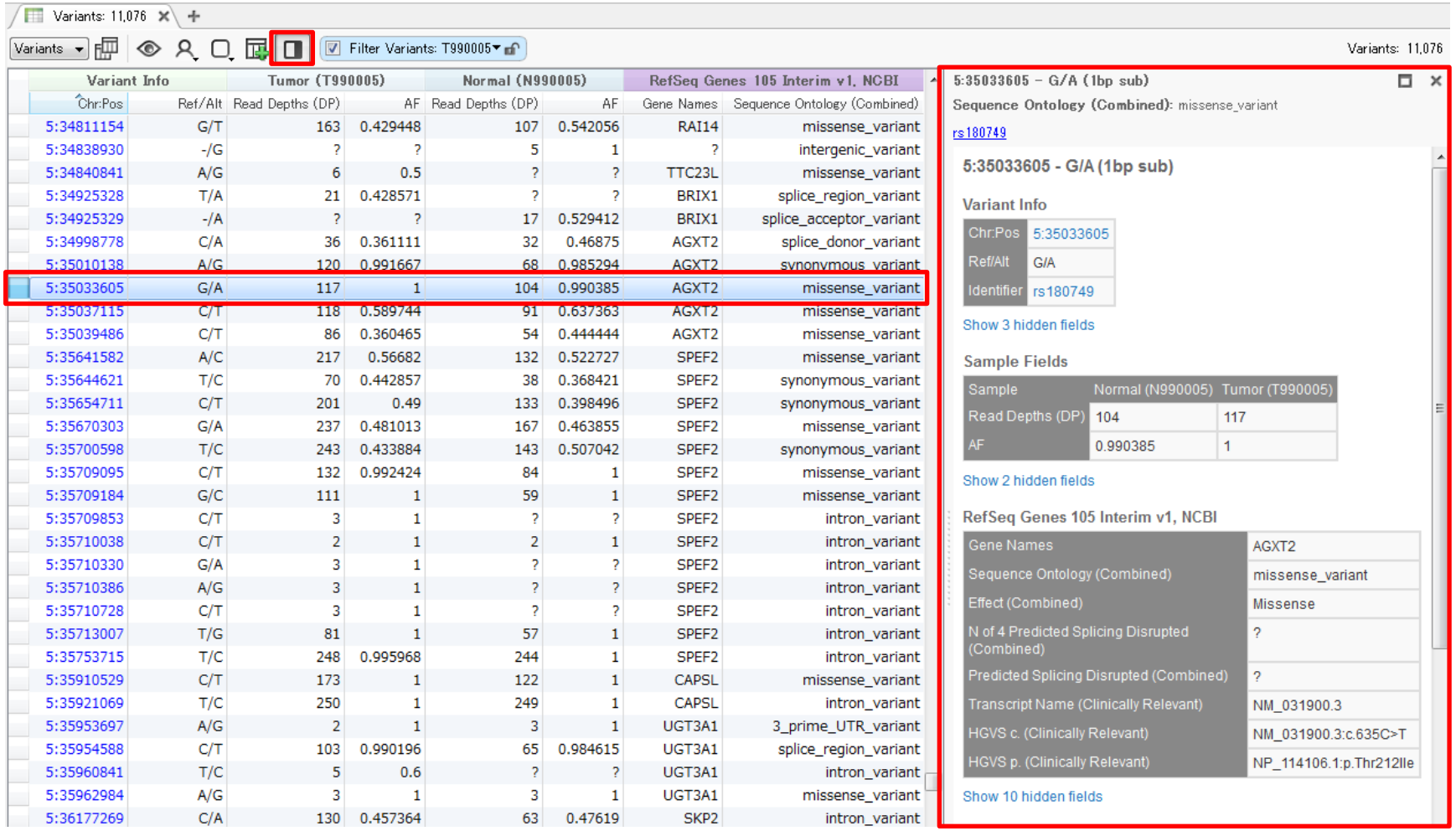
1. プロジェクト画面の「Add」をクリックし、メニューより「Variant Annotation」を選択してクリック
2. Select Data Source画面において、画面左側のLocationに「User Annotations」を選択し、続く画面右側のデータベースリストより「RefSeq Genes 105 Interim v1, NCBI」にチェックを入れ、「Select」をクリック

RefSeq Genesアノテーションの付加

RefSeq Genes 105 Interim v1, NCBI						
Gene Names	Sequence Ontology (Combined)	Effect (Combined)	Nof4PredictedSplicingDisruptedCombined	Predicted Splicing Disrupted (Combined)	Transcript Name (Clinically Relevant)	HGVS c. (Clinically Relevant)
RAI14	missense_variant	Missense	?	?	NM_001145525.1	NM_001145525.1:c.497G>T
?	intergenic_variant	Other	?	?	?	?
TTC23L	missense_variant	Missense	0 of 4 Predicted Splicing Disrupted	?	NM_001317949.1	NM_001317949.1:c.92A>G
BRIX1	splice_region_variant	Other	0 of 4 Predicted Splicing Disrupted	?	NM_018321.3	NM_018321.3:c.793-3T>A
BRIX1	splice_acceptor_variant	LoF	3 of 4 Predicted Splicing Disrupted	GeneSplicer,MaxEntScan,NNSplice	NM_018321.3	NM_018321.3:c.793-2dupA
AGXT2	splice_donor_variant	LoF	2 of 4 Predicted Splicing Disrupted	MaxEntScan,PWM	NM_031900.3	NM_031900.3:c.*46G>T
AGXT2	synonymous_variant	Other	?	?	NM_031900.3	NM_031900.3:c.1305T>C
AGXT2	missense_variant	Missense	?	?	NM_031900.3	NM_031900.3:c.635C>T
AGXT2	missense_variant	Missense	?	?	NM_031900.3	NM_031900.3:c.418G>A
AGXT2	missense_variant	Missense	?	?	NM_031900.3	NM_031900.3:c.305G>A
SPEF2	missense_variant	Missense	?	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.211A>C
SPEF2	synonymous_variant	Other	0 of 4 Predicted Splicing Disrupted	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.579T>C
SPEF2	synonymous_variant	Other	?	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.861C>T
SPEF2	missense_variant	Missense	?	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.1498G>A
SPEF2	synonymous_variant	Other	0 of 4 Predicted Splicing Disrupted	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.2142T>C
SPEF2	missense_variant	Missense	?	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.2711C>T
SPEF2	missense_variant	Missense	?	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.2800G>C
SPEF2	intron_variant	Other	?	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.2839+630C>T
SPEF2	intron_variant	Other	?	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.2839+815C>T
SPEF2	intron_variant	Other	?	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.2839+1107G…
SPEF2	intron_variant	Other	?	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.2839+1168A…
SPEF2	intron_variant	Other	?	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.2839+1505C…
SPEF2	intron_variant	Other	0 of 4 Predicted Splicing Disrupted	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.2914+19T>G
SPEF2	intron_variant	Other	0 of 4 Predicted Splicing Disrupted	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.3331-11T>C
CAPSL	missense_variant	Missense	?	?	NM_144647.3	NM_144647.3:c.254G>A
CAPSL	intron_variant	Other	0 of 4 Predicted Splicing Disrupted	?	NM_144647.3	NM_144647.3:c.137+17A>G
UGT3A1	3_prime_UTR_variant	Other	?	?	NM_152404.3	NM_152404.3:c.*607T>C
UGT3A1	splice_region_variant	Other	0 of 4 Predicted Splicing Disrupted	?	NM_152404.3	NM_152404.3:c.1296-8G>A

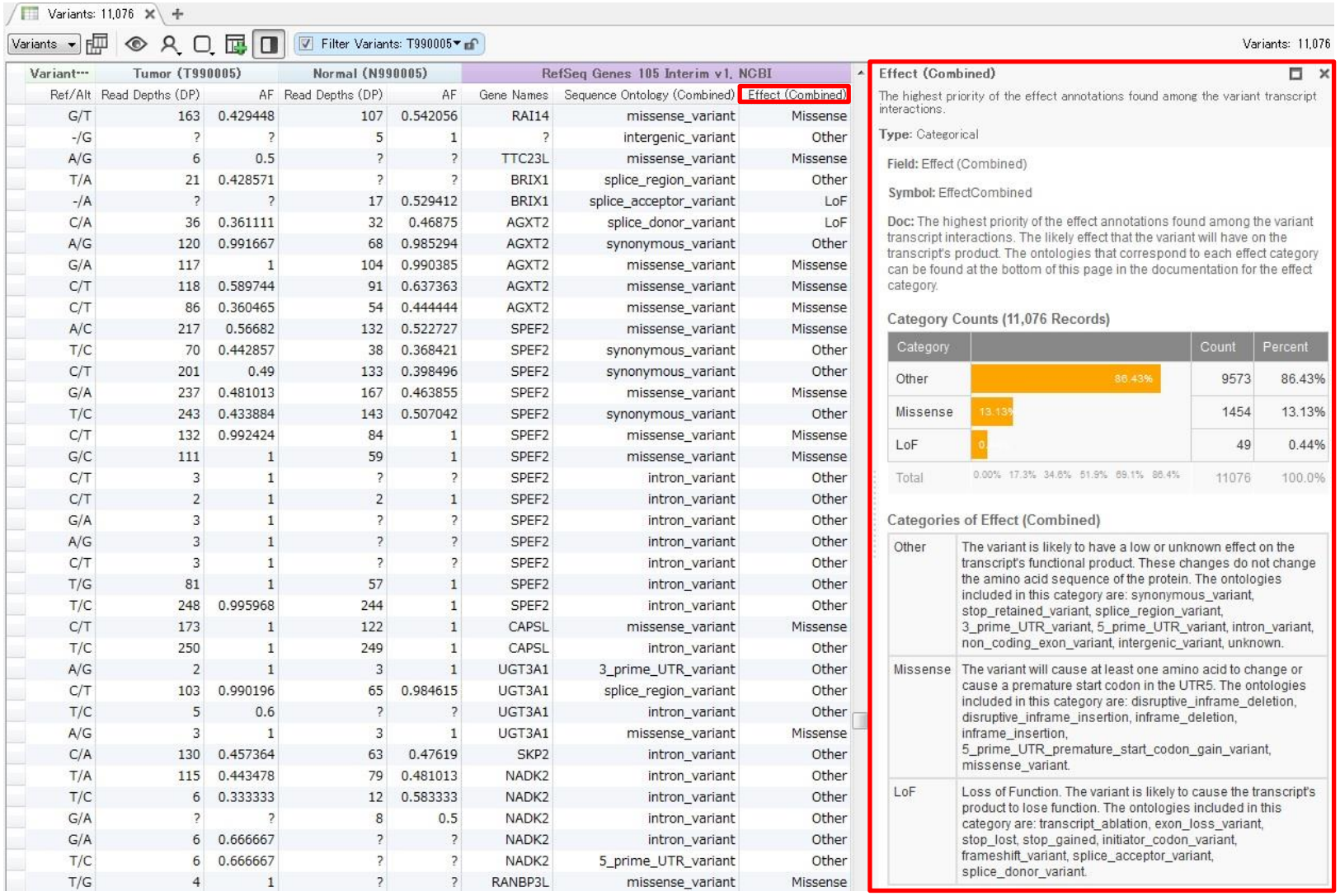
3. アノテーション付加が完了すると、変異データテーブルにRefSeq Genesデータベースのアノテーション列が追加される

RefSeq Genesアノテーションの付加



4. 変異テーブル上部の「Hide/Show details window」をクリックすると、テーブル右側に詳細データの表示スペースが現れ、テーブル上で選択した変異に付加されたアノテーション情報を確認できる

RefSeq Genesアノテーションの付加



Variant	Tumor (T990005)		Normal (N990005)		RefSeq Genes 105 Interim v1, NCBI		
Ref/Alt	Read Depths (DP)	AF	Read Depths (DP)	AF	Gene Names	Sequence Ontology (Combined)	Effect (Combined)
G/T	163	0.429448	107	0.542056	RAI14	missense_variant	Missense
-/G	?	?	5	1	?	intergenic_variant	Other
A/G	6	0.5	?	?	TTC23L	missense_variant	Missense
T/A	21	0.428571	?	?	BRIX1	splice_region_variant	Other
-/A	?	?	17	0.529412	BRIX1	splice_acceptor_variant	LoF
C/A	36	0.361111	32	0.46875	AGXT2	splice_donor_variant	LoF
A/G	120	0.991667	68	0.985294	AGXT2	synonymous_variant	Other
G/A	117	1	104	0.990385	AGXT2	missense_variant	Missense
C/T	118	0.589744	91	0.637363	AGXT2	missense_variant	Missense
C/T	86	0.360465	54	0.444444	AGXT2	missense_variant	Missense
A/C	217	0.56682	132	0.522727	SPEF2	missense_variant	Missense
T/C	70	0.442857	38	0.368421	SPEF2	synonymous_variant	Other
C/T	201	0.49	133	0.398496	SPEF2	synonymous_variant	Other
G/A	237	0.481013	167	0.463855	SPEF2	missense_variant	Missense
T/C	243	0.433884	143	0.507042	SPEF2	synonymous_variant	Other
C/T	132	0.992424	84	1	SPEF2	missense_variant	Missense
G/C	111	1	59	1	SPEF2	missense_variant	Missense
C/T	3	1	?	?	SPEF2	intron_variant	Other
C/T	2	1	2	1	SPEF2	intron_variant	Other
G/A	3	1	?	?	SPEF2	intron_variant	Other
A/G	3	1	?	?	SPEF2	intron_variant	Other
C/T	3	1	?	?	SPEF2	intron_variant	Other
T/G	81	1	57	1	SPEF2	intron_variant	Other
T/C	248	0.995968	244	1	SPEF2	intron_variant	Other
C/T	173	1	122	1	CAPSL	missense_variant	Missense
T/C	250	1	249	1	CAPSL	intron_variant	Other
A/G	2	1	3	1	UGT3A1	3_prime_UTR_variant	Other
C/T	103	0.990196	65	0.984615	UGT3A1	splice_region_variant	Other
T/C	5	0.6	?	?	UGT3A1	intron_variant	Other
A/G	3	1	3	1	UGT3A1	missense_variant	Missense
C/A	130	0.457364	63	0.47619	SKP2	intron_variant	Other
T/A	115	0.443478	79	0.481013	NADK2	intron_variant	Other
T/C	6	0.333333	12	0.583333	NADK2	intron_variant	Other
G/A	?	?	8	0.5	NADK2	intron_variant	Other
G/A	6	0.666667	?	?	NADK2	intron_variant	Other
T/C	6	0.666667	?	?	NADK2	5_prime_UTR_variant	Other
T/G	4	1	?	?	RANBP3L	missense_variant	Missense

Effect (Combined)

The highest priority of the effect annotations found among the variant transcript interactions.

Type: Categorical

Field: Effect (Combined)

Symbol: EffectCombined

Doc: The highest priority of the effect annotations found among the variant transcript interactions. The likely effect that the variant will have on the transcript's product. The ontologies that correspond to each effect category can be found at the bottom of this page in the documentation for the effect category.

Category Counts (11,076 Records)

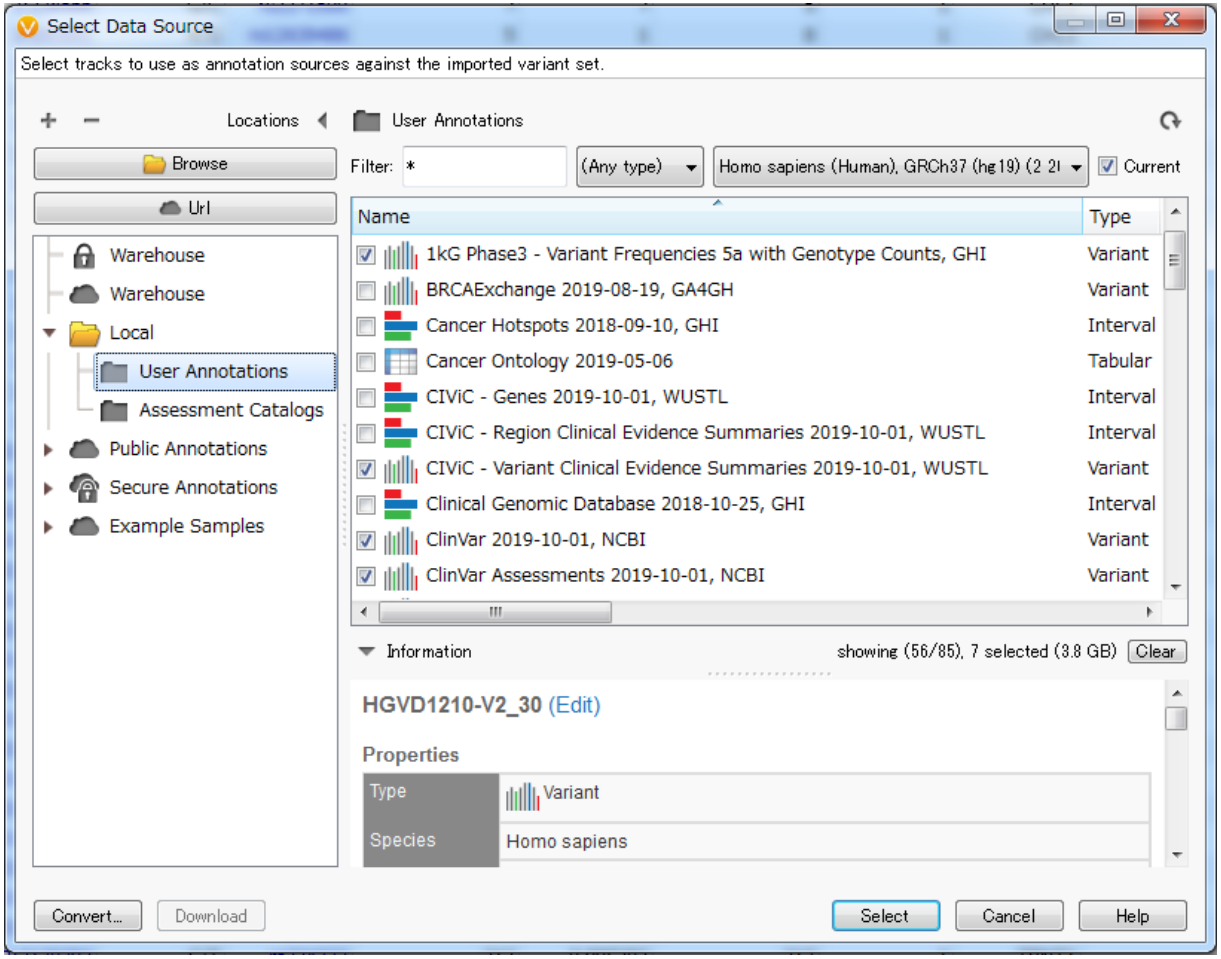
Category		Count	Percent
Other	86.43%	9573	86.43%
Missense	13.13%	1454	13.13%
LoF	0	49	0.44%
Total	0.00% 17.3% 34.6% 51.9% 69.1% 86.4%	11076	100.0%

Categories of Effect (Combined)

Other	The variant is likely to have a low or unknown effect on the transcript's functional product. These changes do not change the amino acid sequence of the protein. The ontologies included in this category are: synonymous_variant, stop_retained_variant, splice_region_variant, 3_prime_UTR_variant, 5_prime_UTR_variant, intron_variant, non_coding_exon_variant, intergenic_variant, unknown.
Missense	The variant will cause at least one amino acid to change or cause a premature start codon in the UTR5. The ontologies included in this category are: disruptive_inframe_deletion, disruptive_inframe_insertion, inframe_deletion, inframe_insertion, 5_prime_UTR_premature_start_codon_gain_variant, missense_variant.
LoF	Loss of Function. The variant is likely to cause the transcript's product to lose function. The ontologies included in this category are: transcript_ablation, exon_loss_variant, stop_lost, stop_gained, initiator_codon_variant, frameshift_variant, splice_acceptor_variant, splice_donor_variant.

5. 変異テーブル上のフィールドのヘッダーをクリックすると、現在表示されている変異データから選択フィールドの項目を集計したグラフが、詳細データの表示スペースに表示される

その他アノテーションの付加

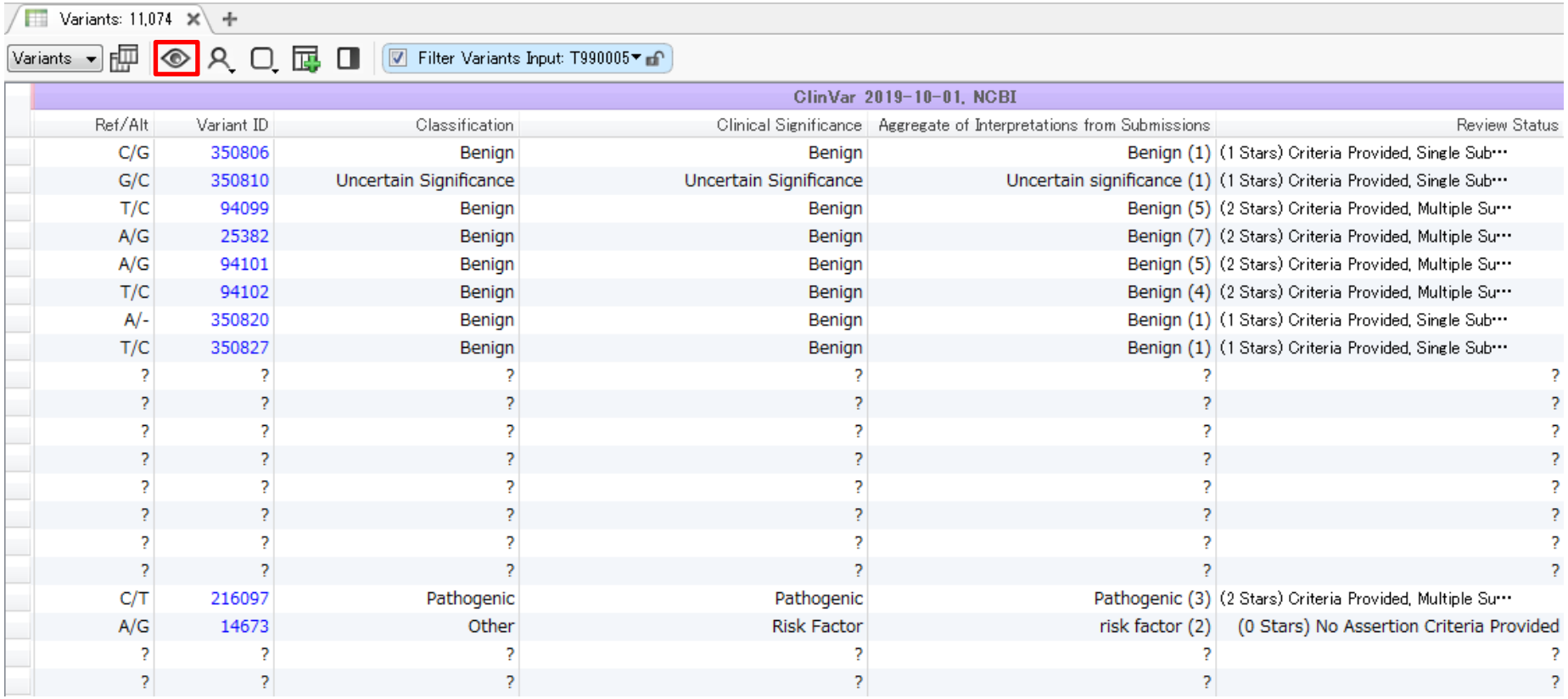


選択データベースリスト

- 1kG Phase3 - Variant Frequencies
- CIViC - Variant
- ClinVar
- ClinVar Assessments
- COSMIC Mutations 89
- dbNSFP Functional Predictions 3.0
- HGVD1210-V2_30

1. 再びプロジェクト画面の「Add」をクリックし、メニューより「Variant Annotation」を選択してクリック
2. Select Data Source画面において、上記データベース名にすべてチェックを入れ、「Select」をクリック

その他アノテーションの付加

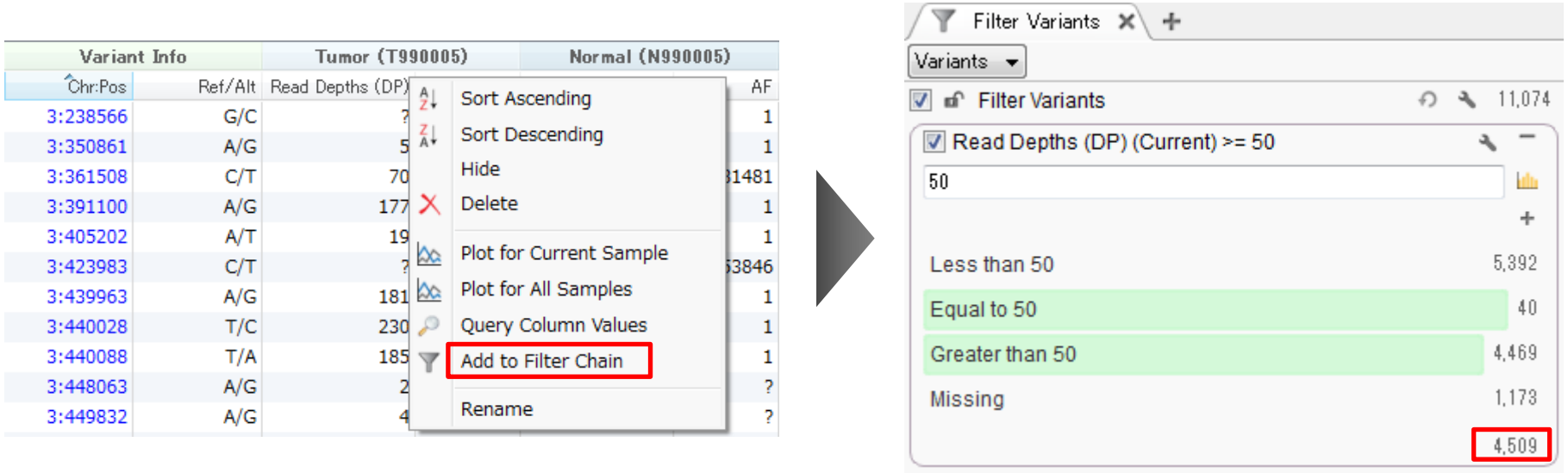


			ClinVar 2019-10-01, NCBI		
Ref/Alt	Variant ID	Classification	Clinical Significance	Aggregate of Interpretations from Submissions	Review Status
C/G	350806	Benign	Benign	Benign (1)	(1 Stars) Criteria Provided, Single Sub…
G/C	350810	Uncertain Significance	Uncertain Significance	Uncertain significance (1)	(1 Stars) Criteria Provided, Single Sub…
T/C	94099	Benign	Benign	Benign (5)	(2 Stars) Criteria Provided, Multiple Su…
A/G	25382	Benign	Benign	Benign (7)	(2 Stars) Criteria Provided, Multiple Su…
A/G	94101	Benign	Benign	Benign (5)	(2 Stars) Criteria Provided, Multiple Su…
T/C	94102	Benign	Benign	Benign (4)	(2 Stars) Criteria Provided, Multiple Su…
A/-	350820	Benign	Benign	Benign (1)	(1 Stars) Criteria Provided, Single Sub…
T/C	350827	Benign	Benign	Benign (1)	(1 Stars) Criteria Provided, Single Sub…
?	?	?	?	?	?
?	?	?	?	?	?
?	?	?	?	?	?
?	?	?	?	?	?
?	?	?	?	?	?
?	?	?	?	?	?
?	?	?	?	?	?
C/T	216097	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic (3)	(2 Stars) Criteria Provided, Multiple Su…
A/G	14673	Other	Risk Factor	risk factor (2)	(0 Stars) No Assertion Criteria Provided
?	?	?	?	?	?
?	?	?	?	?	?

3. 変異データテーブルに、選択した全データベースのアノテーション列が追加される
4. アノテーションフィールドの表示・非表示や順序を変更する場合は、変異テーブル上部の「Hide/Show columns and column groups」をクリックして実行する

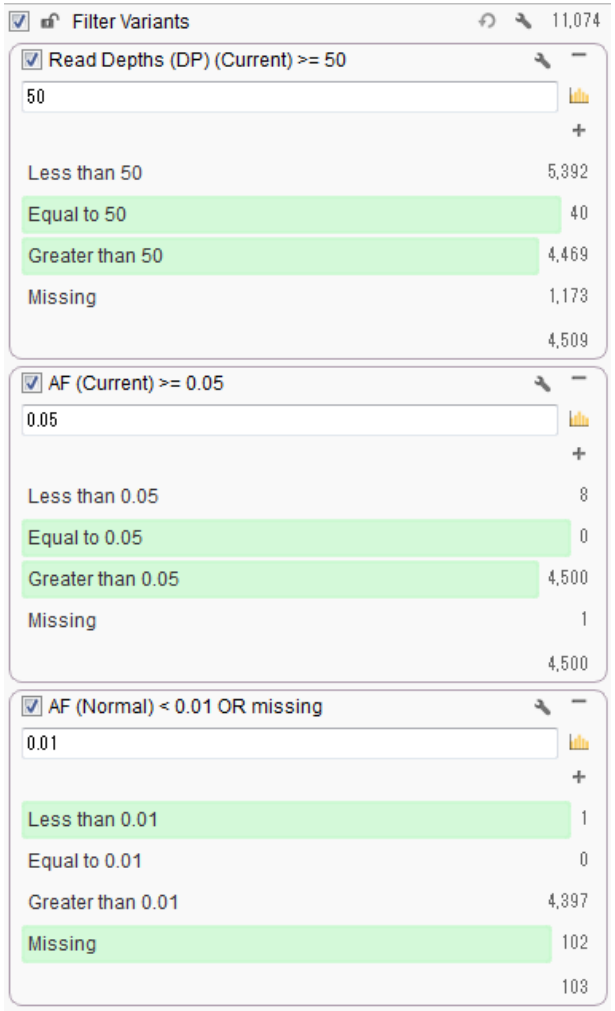
手順3. フィルタリング

フィルターコンテナの作成



1. 変異テーブル上で任意のフィールドのヘッダー（この例では「Tumor (T990005)」の「Read Depths (DP)」）を右クリックし、メニューより「Add to Filter Chain」を選択してクリック
2. 画面左側のFilter Variantsに、選択したフィールドのフィルターコンテナが表示されるので、任意の検索条件を指定する
3. コンテナ内の右側に表示される各数字は、指定された条件で抽出される変異数を表し、この数字をクリックすると、変異テーブルに表示される変異データ数も変更される

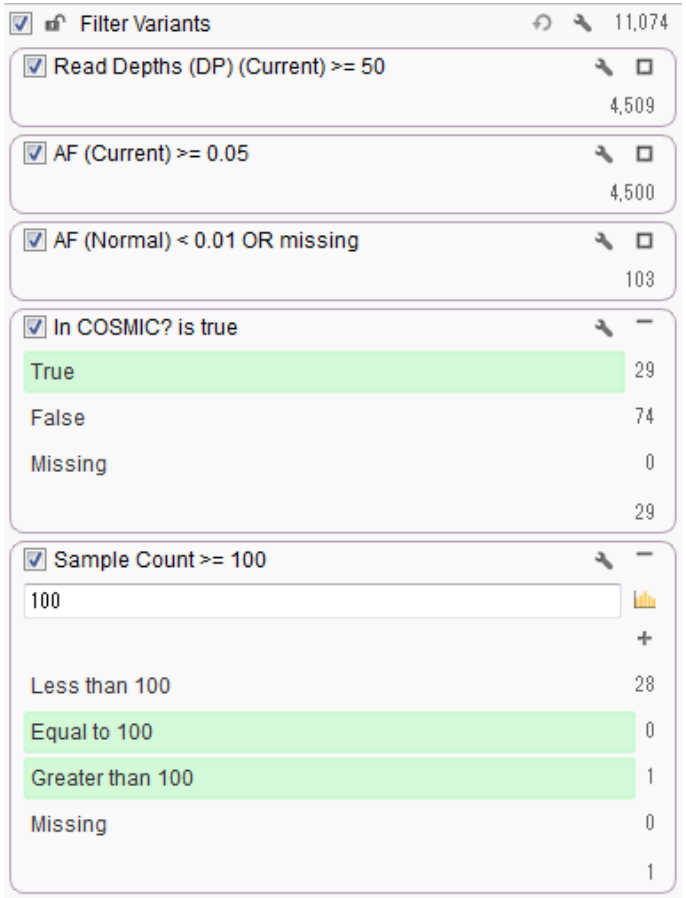
体細胞変異抽出ワークフローの作成



- Tumor (T990005)の「Read Depths (DP)」≧ 50
- Tumor (T990005)の「AF」≧ 0.05
- Normal (N990005)の「AF」< 0.01 or Missing

1. 腫瘍サンプルにおける体細胞変異抽出のため、T990005（Currentサンプル）の「Read Depths (DP)」と「AF」、さらにN990005（Normalサンプル）の「AF」の3フィールドのコンテナをつくり、上記のとおり検索条件を指定する

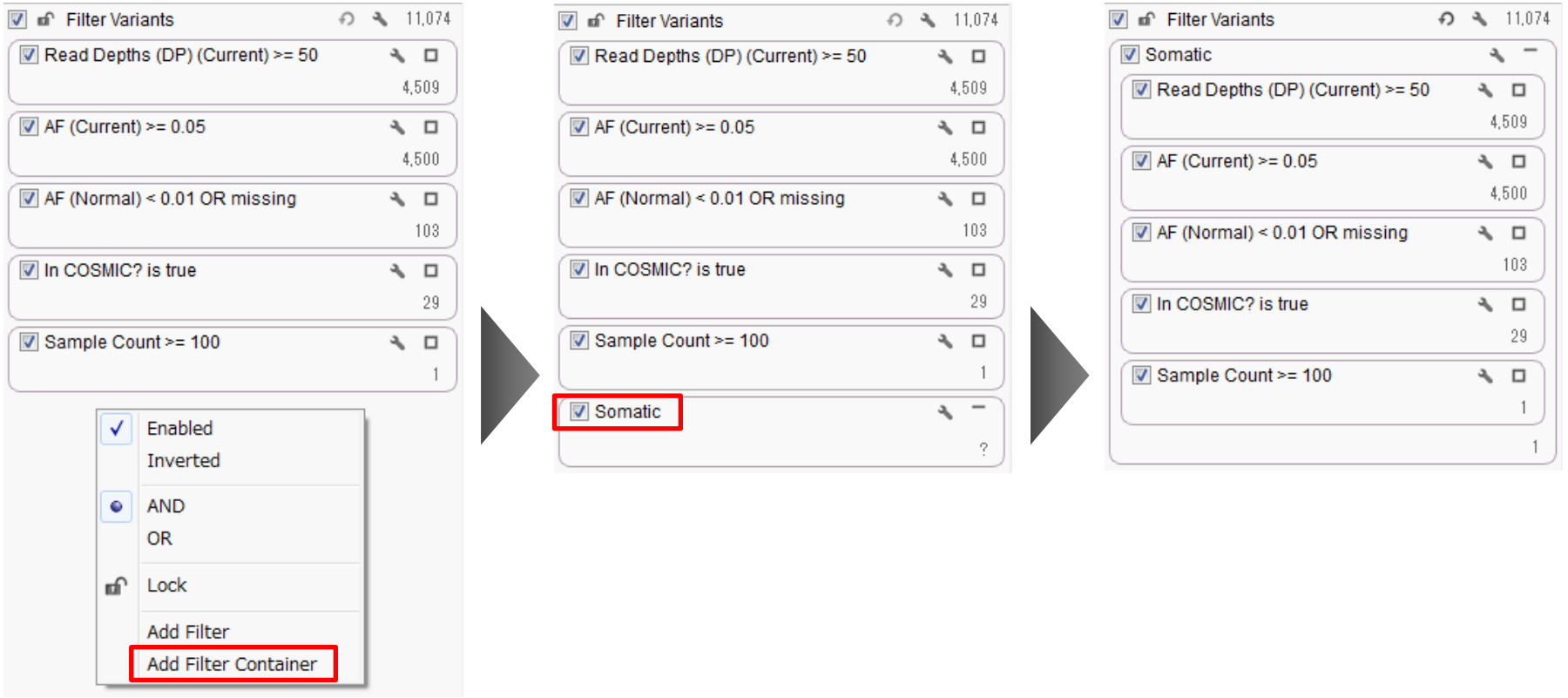
体細胞変異抽出ワークフローの作成



- COSMIC Mutationsの「In COSMIC?」is TRUE
- COSMIC Mutationsの「Sample Count」≧ 100

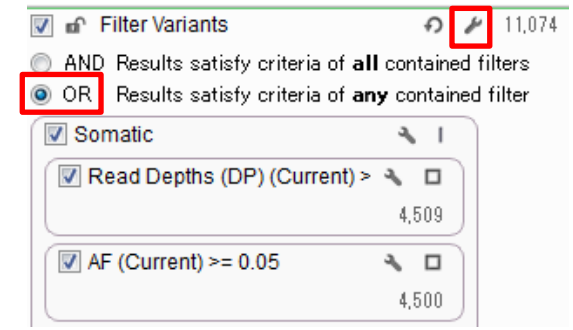
2. データベースに高頻度に登録されている生体に有害な変異の抽出のため、COSMIC Mutationsの「In COSMIC?」、「Sample Count」の2フィールドのコンテナをつくり、上記のとおり検索条件を指定する

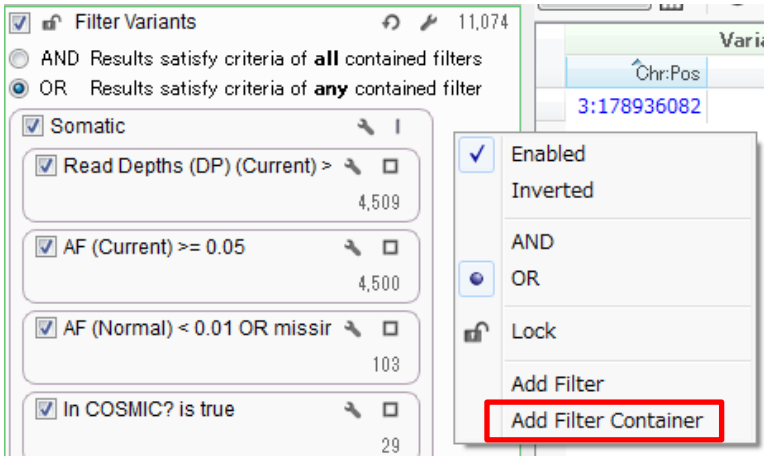
体細胞変異抽出ワークフローの作成

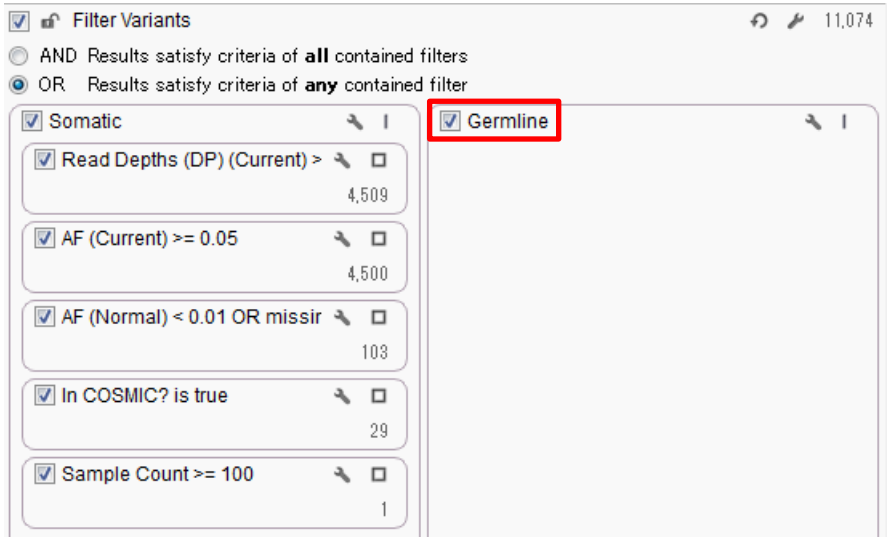


3. ワークフロー下側の空きスペース上で右クリックし、メニューから「Add Filter Container」選択してクリック
4. 新たなコンテナが作成されるので、コンテナ名をダブルクリックし、「Somatic」に変更
5. Somatic以外のコンテナをすべて選択し、Somaticコンテナ内にドラッグ＆ドロップ

生殖細胞変異抽出ワークフローの作成

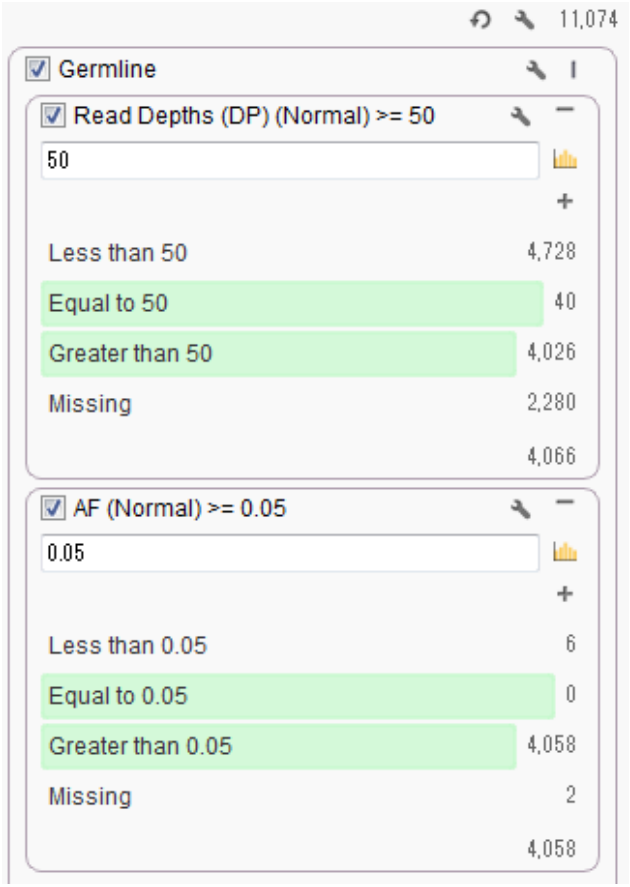






1. ワークフロー最上段の「Filter Variants」の「Show Filter Configuration」をクリックし、検索条件に「OR」を指定
2. Somaticワークフロー右側の空きスペースで右クリックし、メニューから「Add Filter Container」を選択してクリック
3. 新たなコンテナが作成されるので、コンテナ名をダブルクリックし、「Germline」に変更

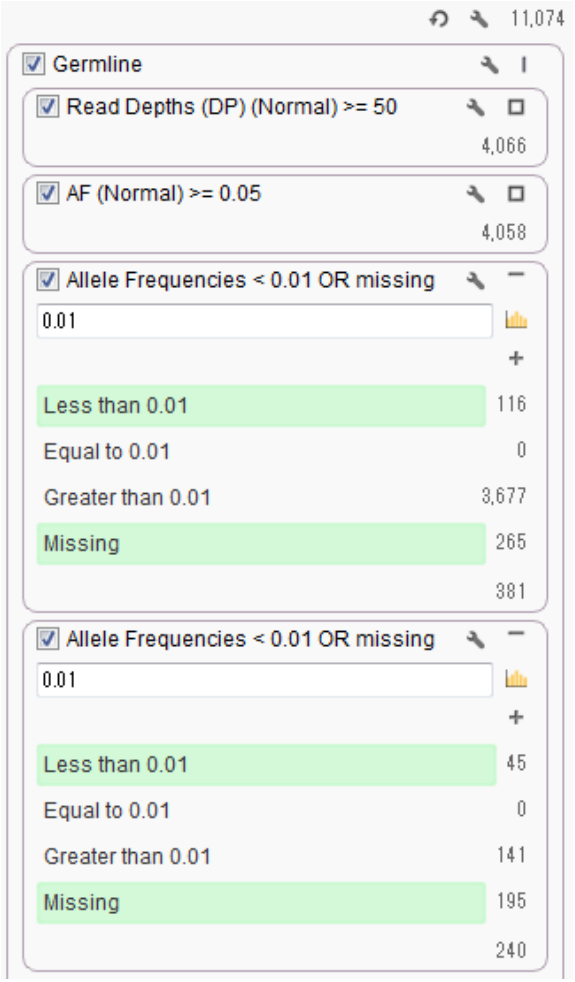
生殖細胞変異抽出ワークフローの作成



- Normal (N990005)の「Read Depths (DP)」≧ 50
- Normal (N990005)の「AF」≧ 0.05

4. 正常サンプルにおける生殖細胞変異抽出のため、N990005（Normalサンプル）の「Read Depths (DP)」と「AF」の2フィールドのコンテナをつくり、上記のとおり検索条件を指定する

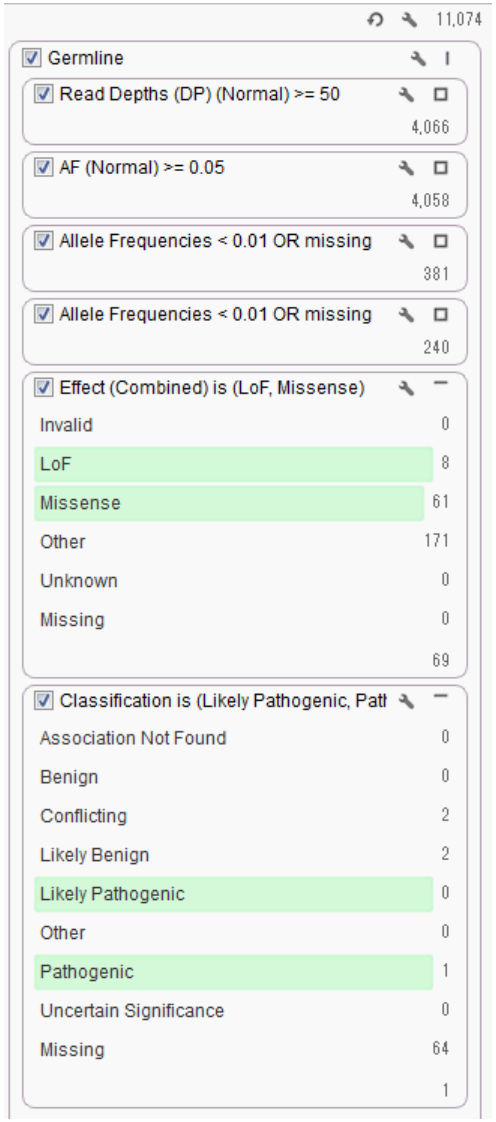
生殖細胞変異抽出ワークフローの作成



- 1kG Phase3 - Variant Frequenciesの「Allele Frequencies」< 0.01 or Missing
- HGVD1210-V2_30の「Allele Frequencies」< 0.01 or Missing

5. 人種特異的なSNPの除去のため、1kG Phase3 - Variant Frequenciesの「 Allele Frequencies」、さらにHGVD1210-V2_30の「Alt_allele_freq」の2フィールドのコンテナをつくり、上記のとおり検索条件を指定する

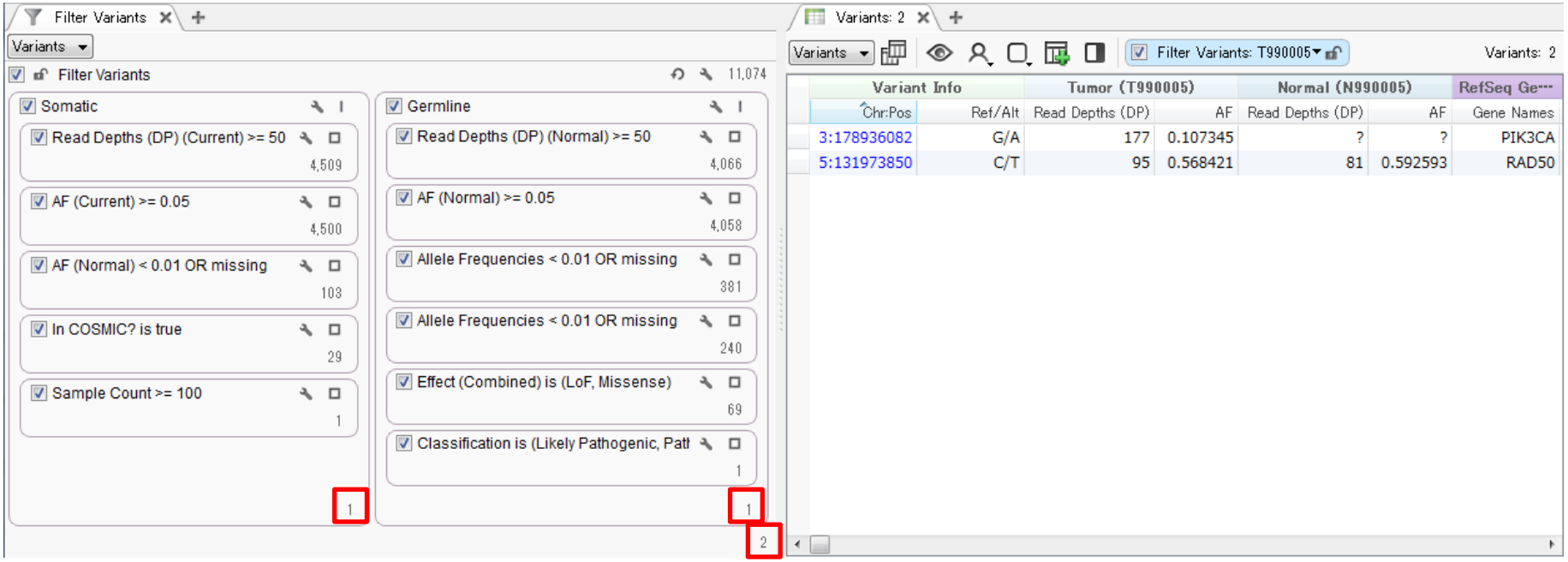
生殖細胞変異抽出ワークフローの作成



- RefSeq Geneの「Effect (Combined)」is LoF, Missense
- ClinVarの「Classification」is Likely Pathogenic, Pathogenic

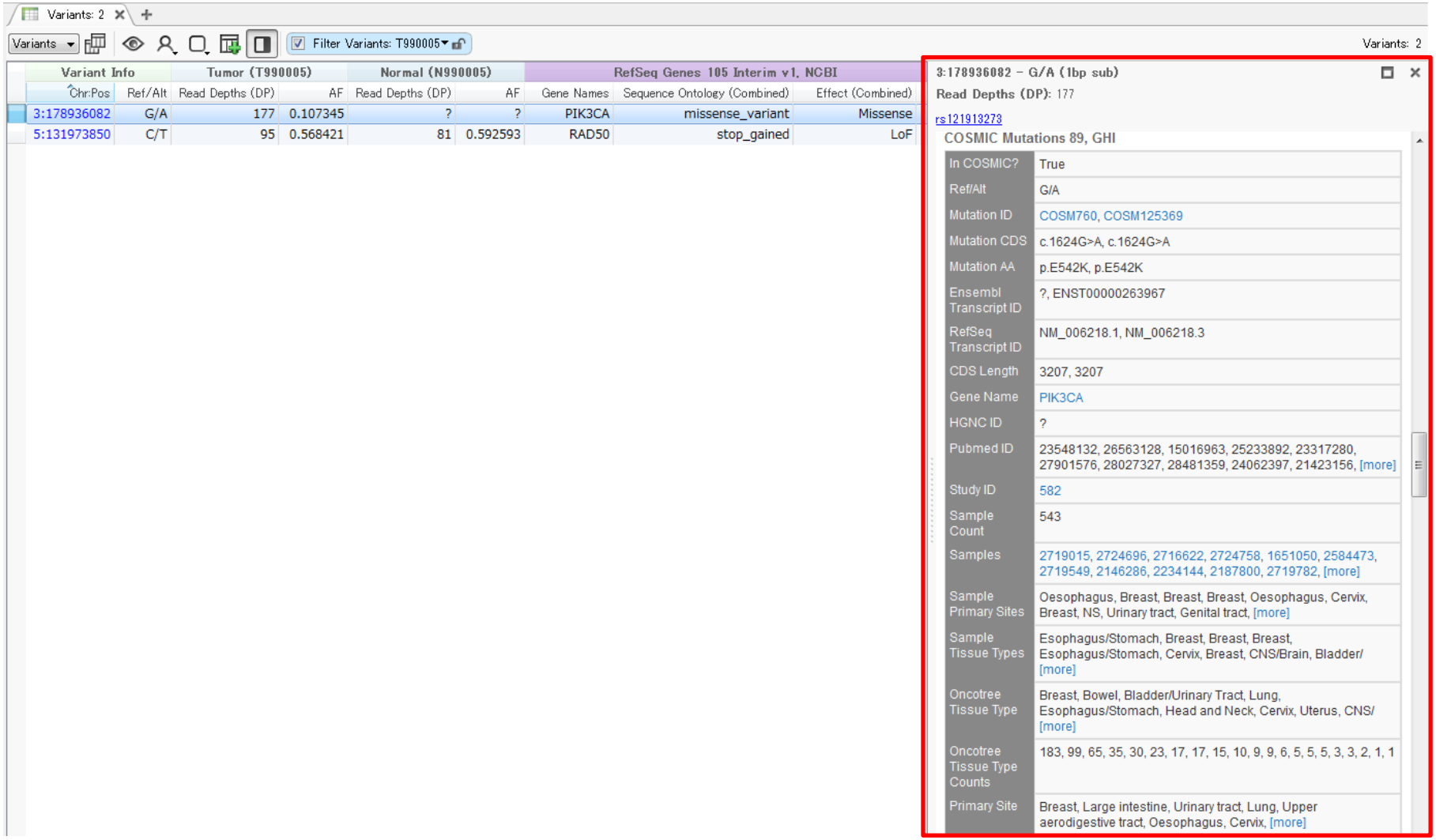
6. データベースに登録されている生体に有害な変異の抽出のため、RefSeq Geneの「Effect (Combined)」、ClinVarの「Classification」の2フィールドのコンテナをつくり、上記のとおり検索条件を指定する

ワークフロー解析結果の確認



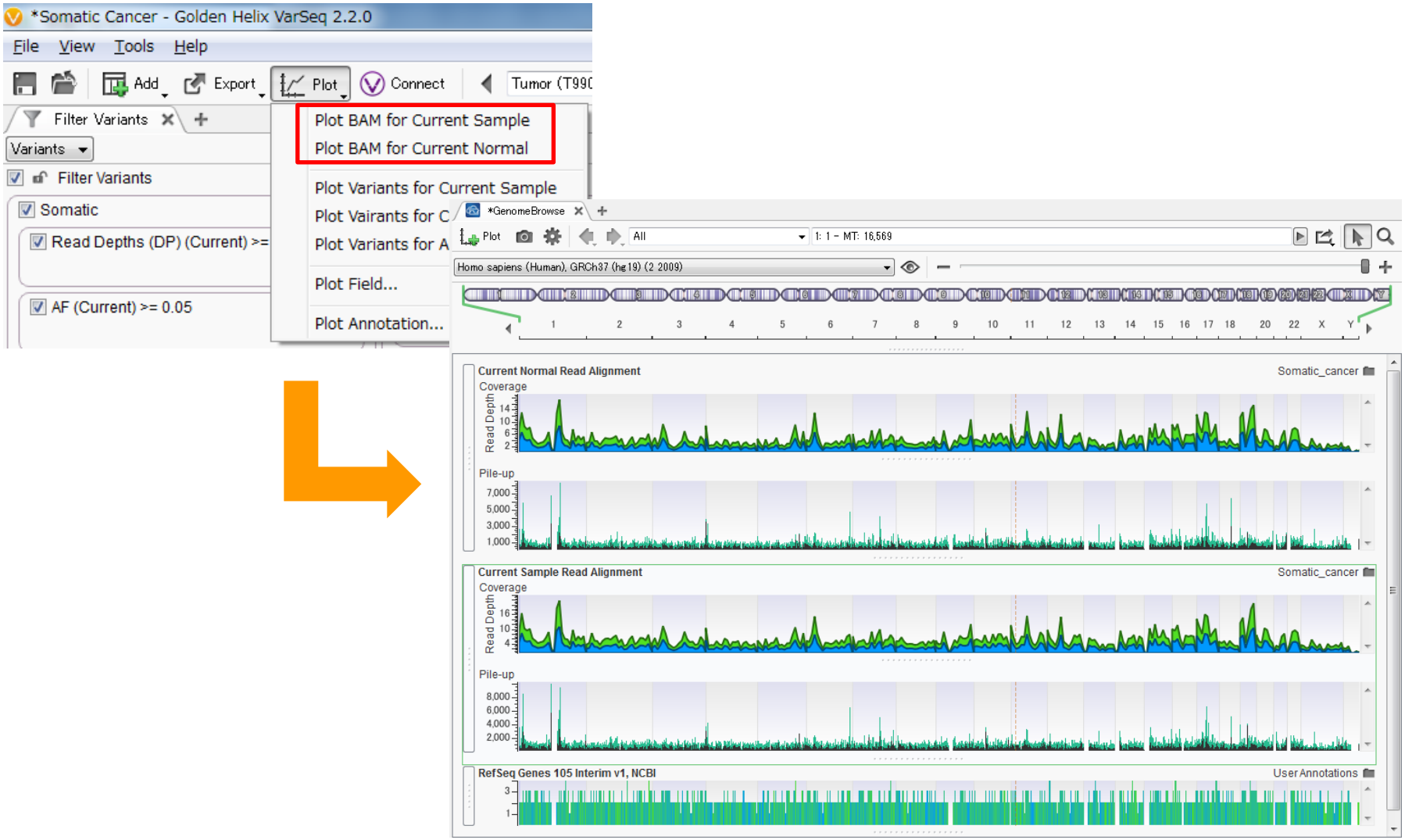
1. SomaticワークフローGermlineワークフローでそれぞれ1つずつ変異が検出され、合計2種類の変異がテーブルに表示される

ワークフロー解析結果の確認



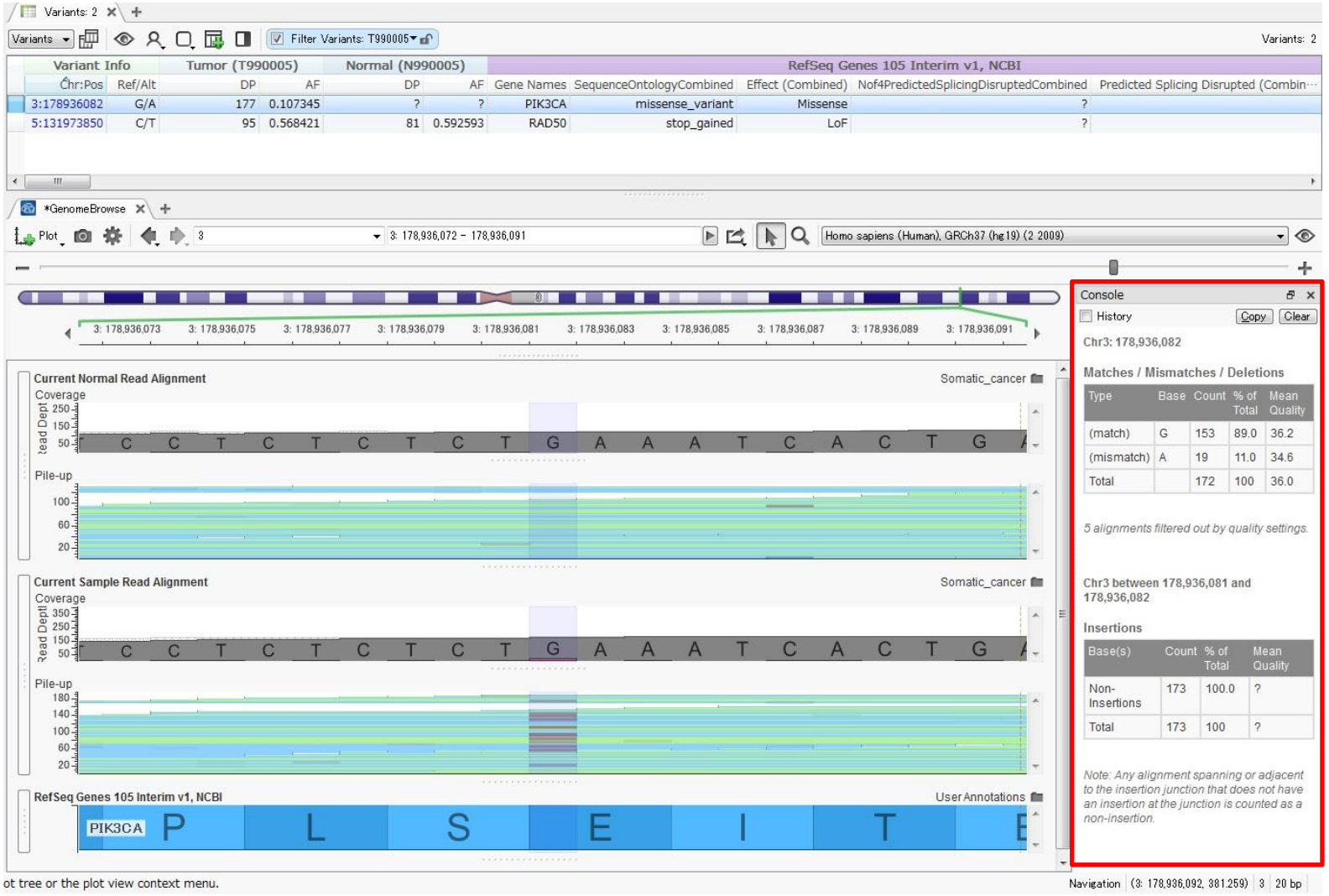
2. 詳細データ表示スペースより、各変異のアノテーション情報を確認する

ゲノムブラウザーの表示



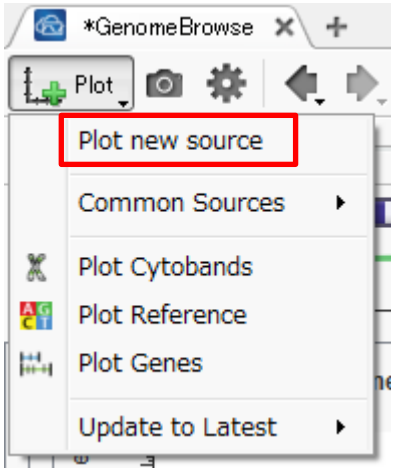
1. プロジェクト画面の「Plot」をクリックし、メニューより「Plot BAM for Current Sample」を選択してクリック
2. ゲノムブラウザーが起動し、CurrentサンプルのRead Alignmentデータが表示されたら、同じくPlot -> Plot BAM for Current Normal」を選択してクリック

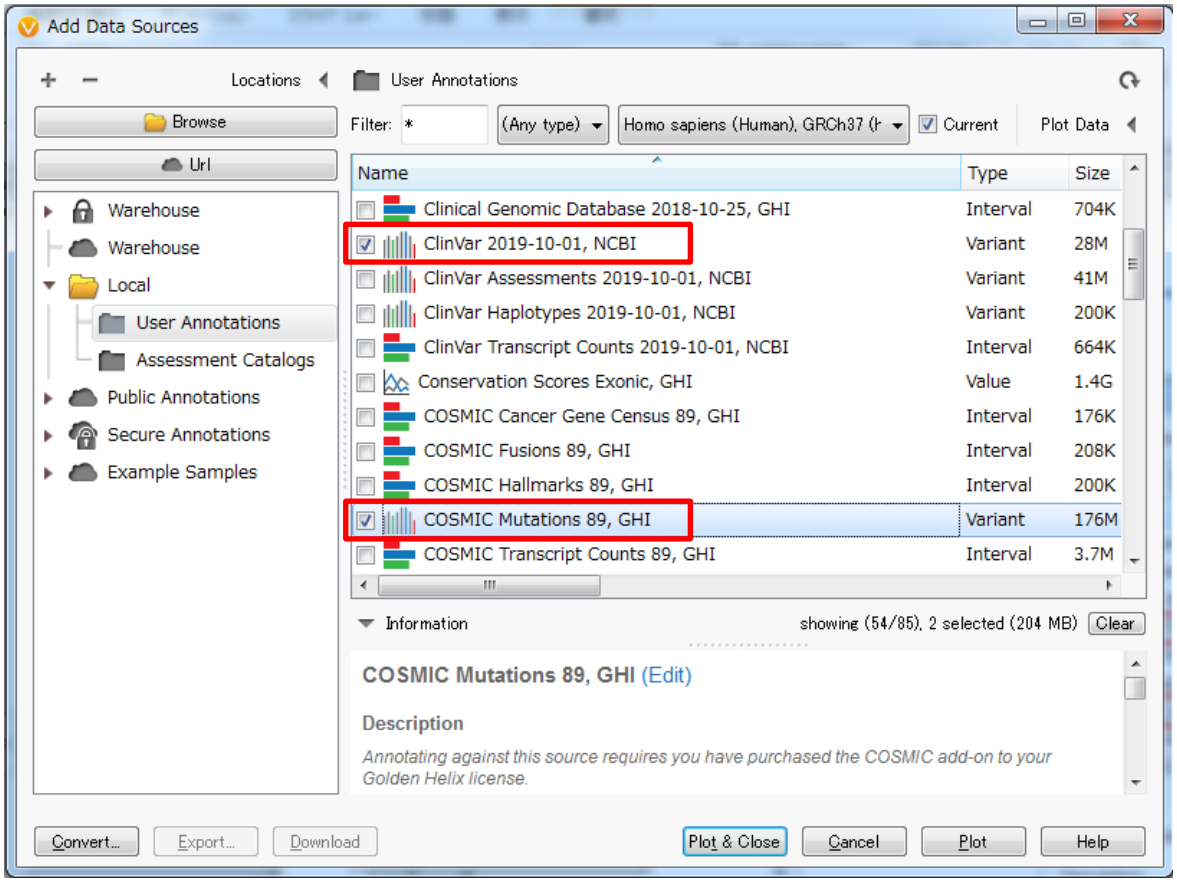
ゲノムブラウザーの表示



3. 変異テーブルの任意の変異データをクリックすると、ゲノムブラウザーの該当位置に自動的に移動する
4. 各サンプルのCoverageグラフの任意の位置をクリックすると、リード数の集計データなどが表示される

ゲノムブラウザーの表示





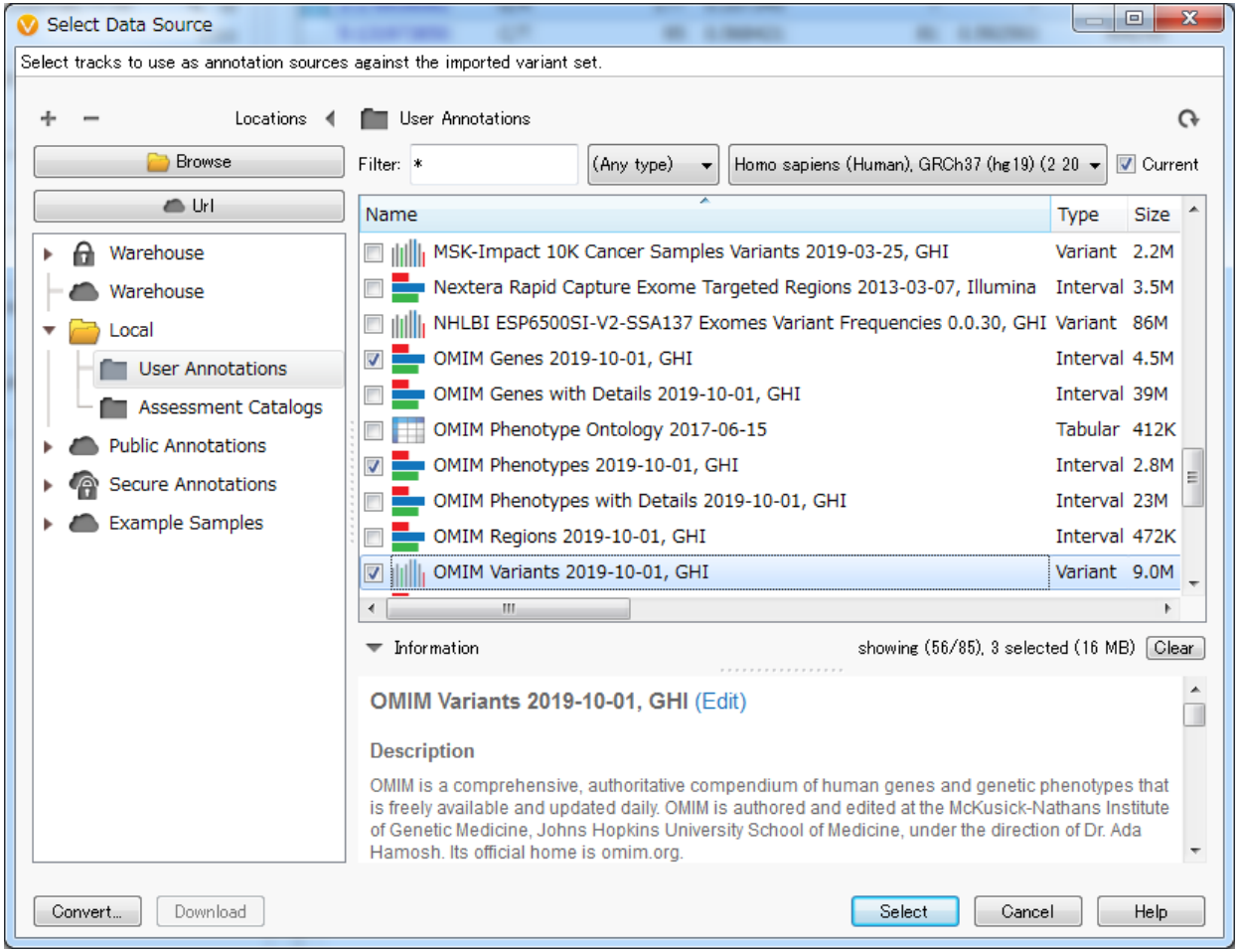
5. ゲノムブラウザーの「Plot」をクリックし、メニューより「Plot new source」を選択してクリック
6. Select Data Source画面において、データベースリストより「ClinVar」と「COSMIC Mutation」にチェックを入れ、「Plot & Close」をクリック

ゲノムブラウザーの表示

7. ゲノムブラウザーに、データベースのアノテーションがプロットされる
8. プロットされた任意のアノテーションをクリックすると、アノテーションの詳細が表示される

手順4. レポート作成

OMIMアノテーションの付加

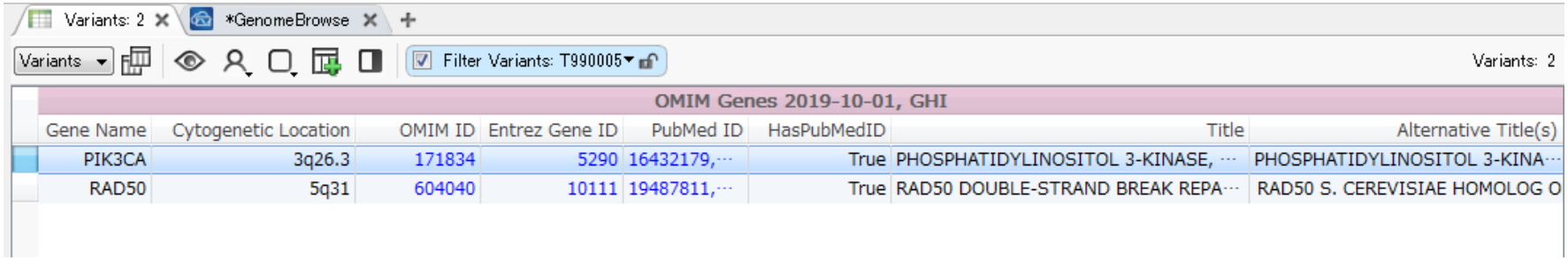


選択データベースリスト

- OMIM Genes
- OMIM Phenotypes
- OMIM Variants

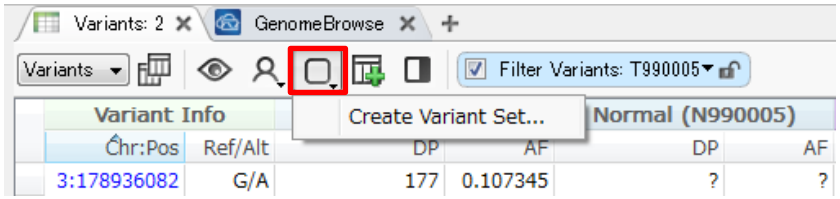
1. 再びプロジェクト画面の「Add」をクリックし、メニューより「Variant Annotation」を選択してクリック
2. Select Data Source画面において、上記3つのOMIMデータベース名にすべてチェックを入れ、「Select」をクリック

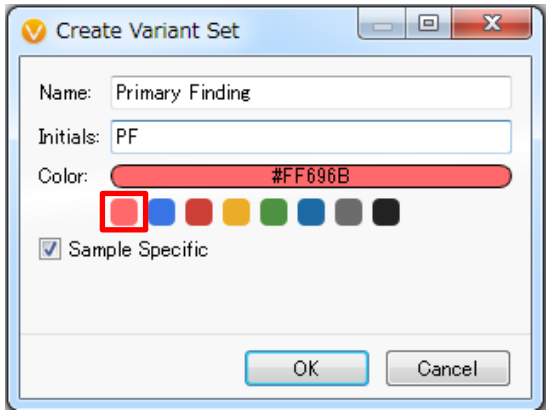
OMIMアノテーションの付加

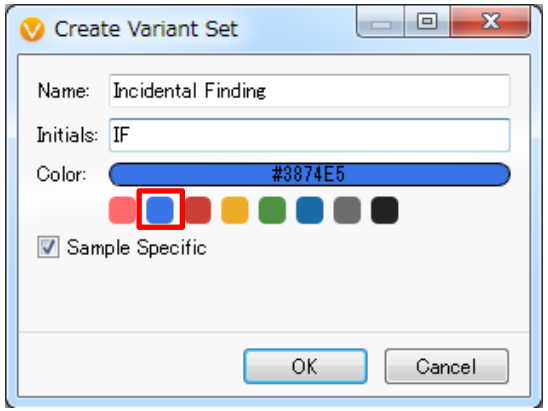


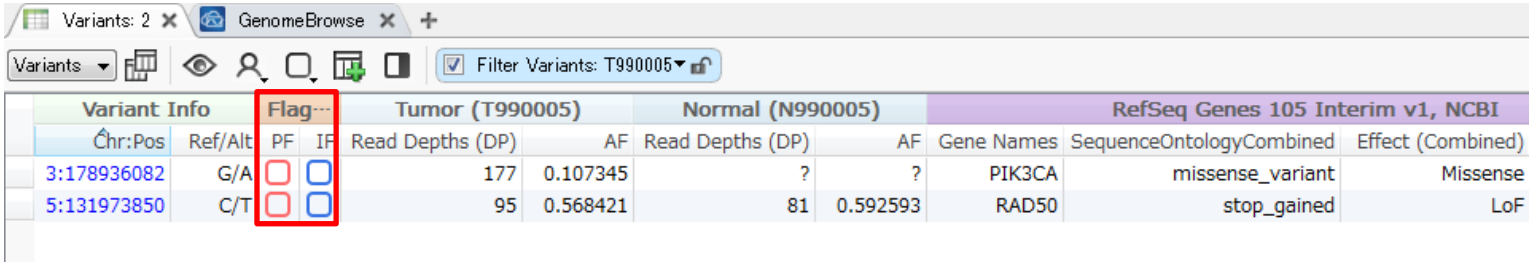
3. 変異データテーブルに、選択した3種類のOMIMデータベースのアノテーション列が追加される

変異セットの作成



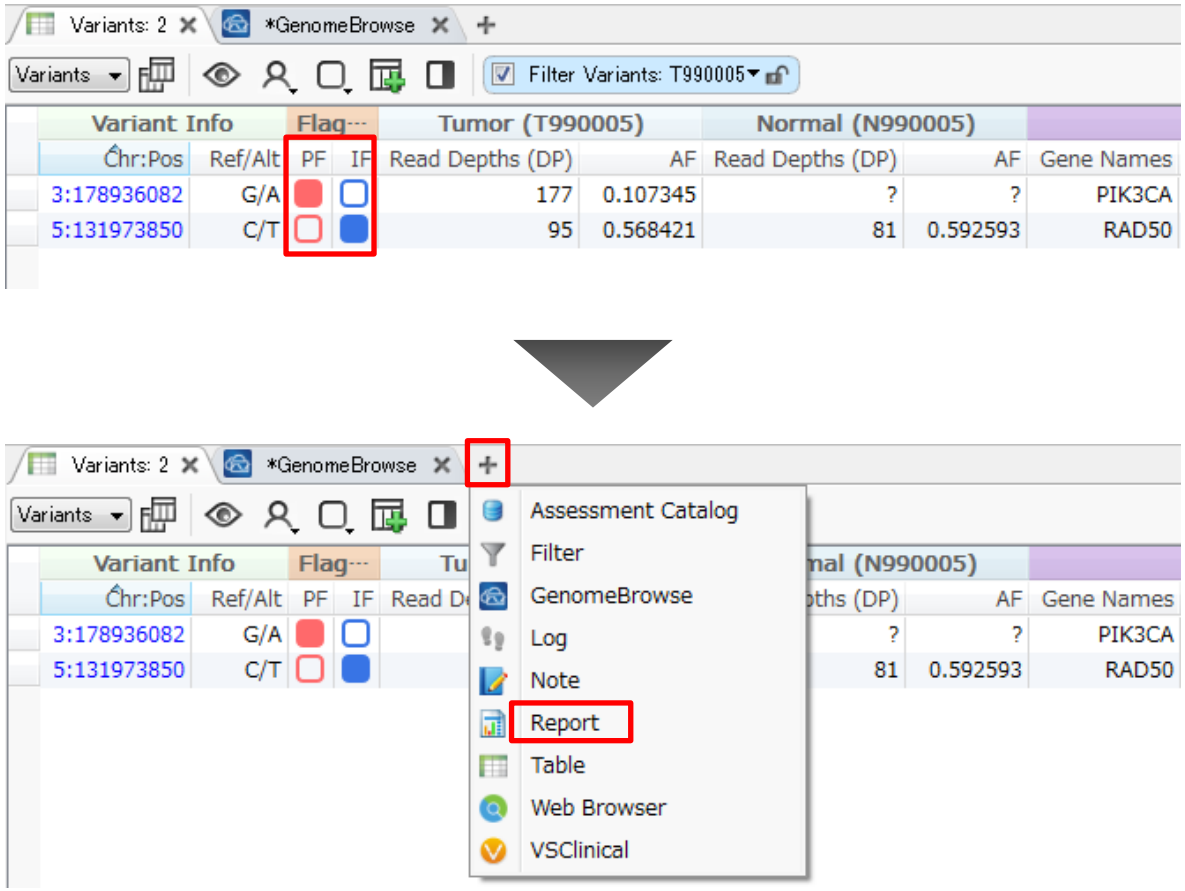






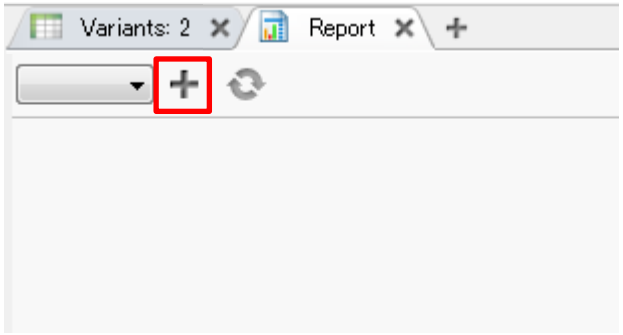
1. 変異テーブル上部の「Manage Variant sets」をクリックし、メニューより「Create Variant Set」を選択してクリック
2. Primary FindingとIncidental Findingの2セットを、任意のColorで作成すると、変異テーブルにフラグが表示される

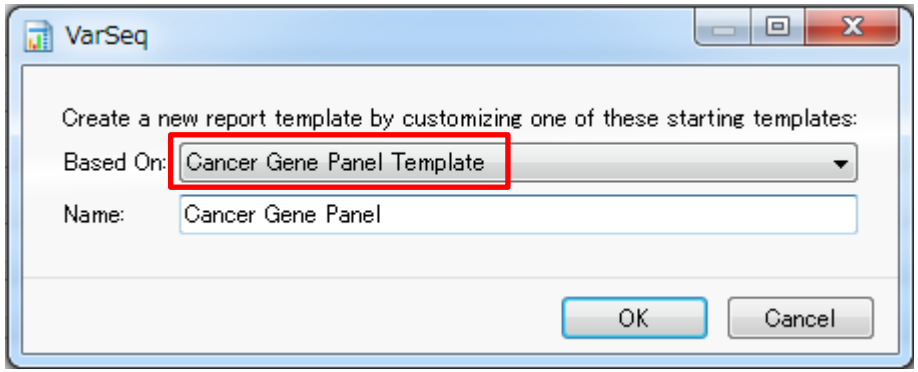
レポート作成



1. 変異テーブル上で各フラグをクリックし、任意の変異をPrimary FindingとIncidental Findingに指定（この例ではPIK3CA遺伝子の変異をPF、RAD50遺伝子の変異をIFに指定）
2. 「Open a new tab」をクリックし、メニューより「Report」を選択してクリック

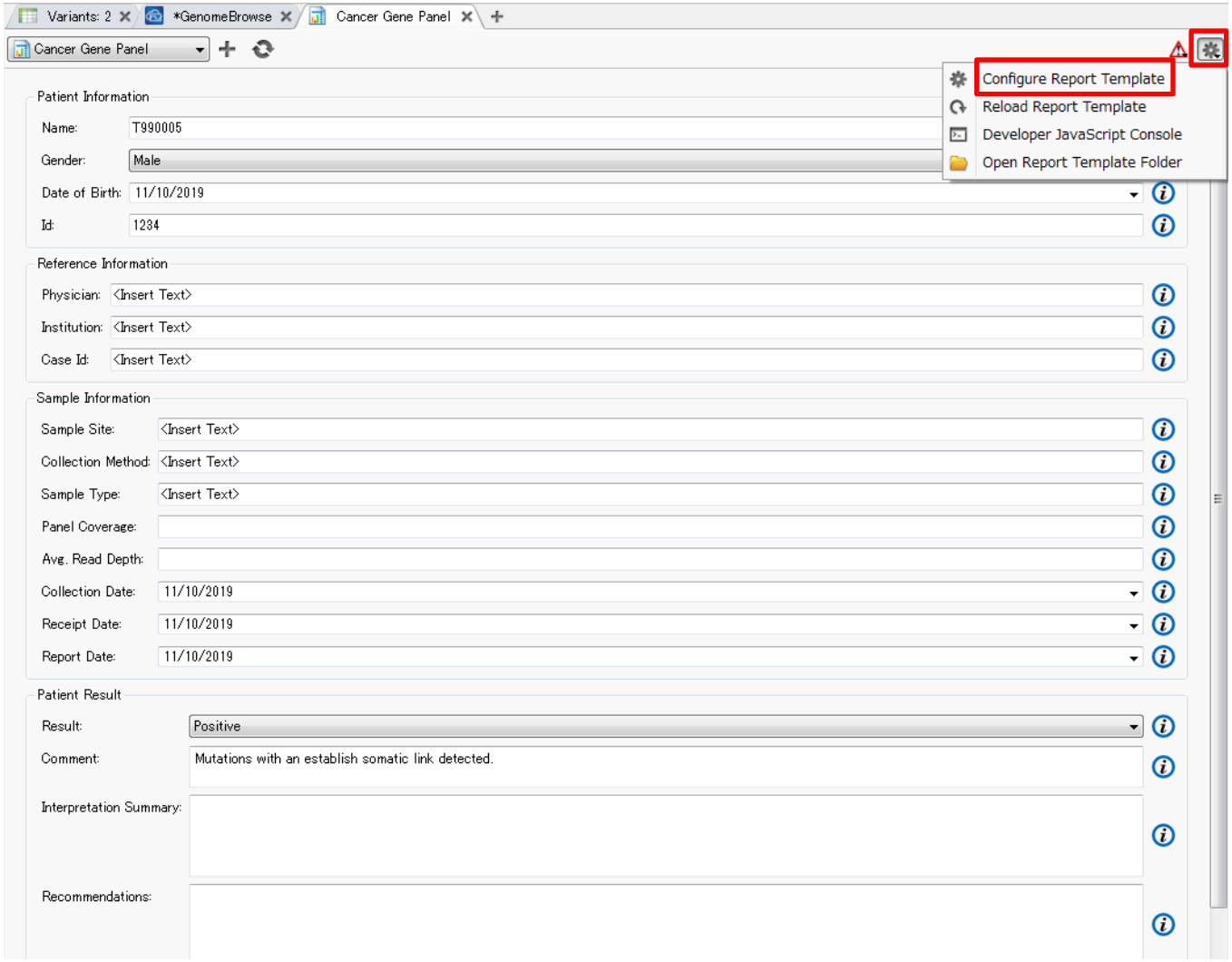
レポート作成





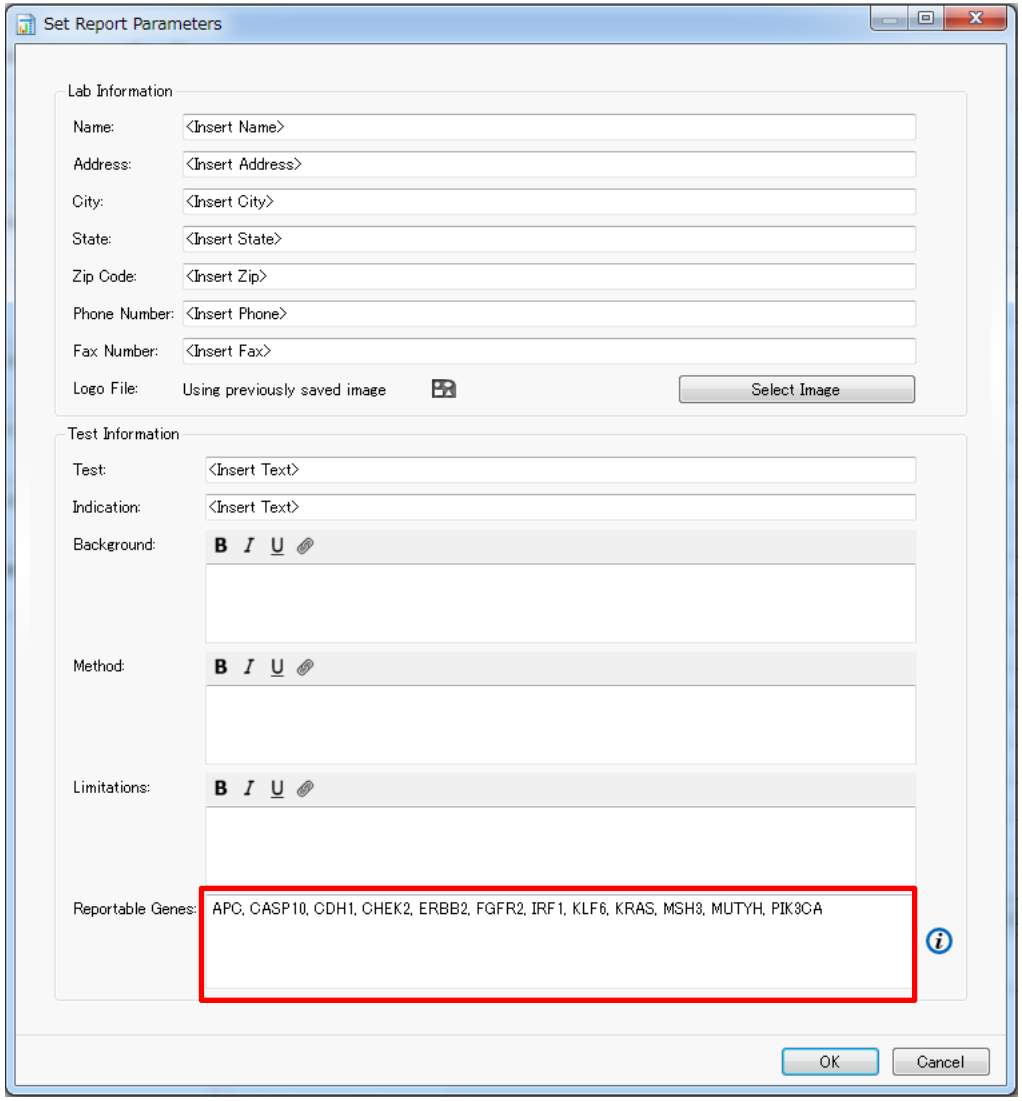
3. 「Create a New Report Template」をクリック
4. レポートテンプレートの選択で、「Based On:」に「Cancer Gene Panel Template」を選択し、「Name:」に任意の名前（この例ではCancer Gene Panel）を入力し、「OK」をクリック

レポート作成



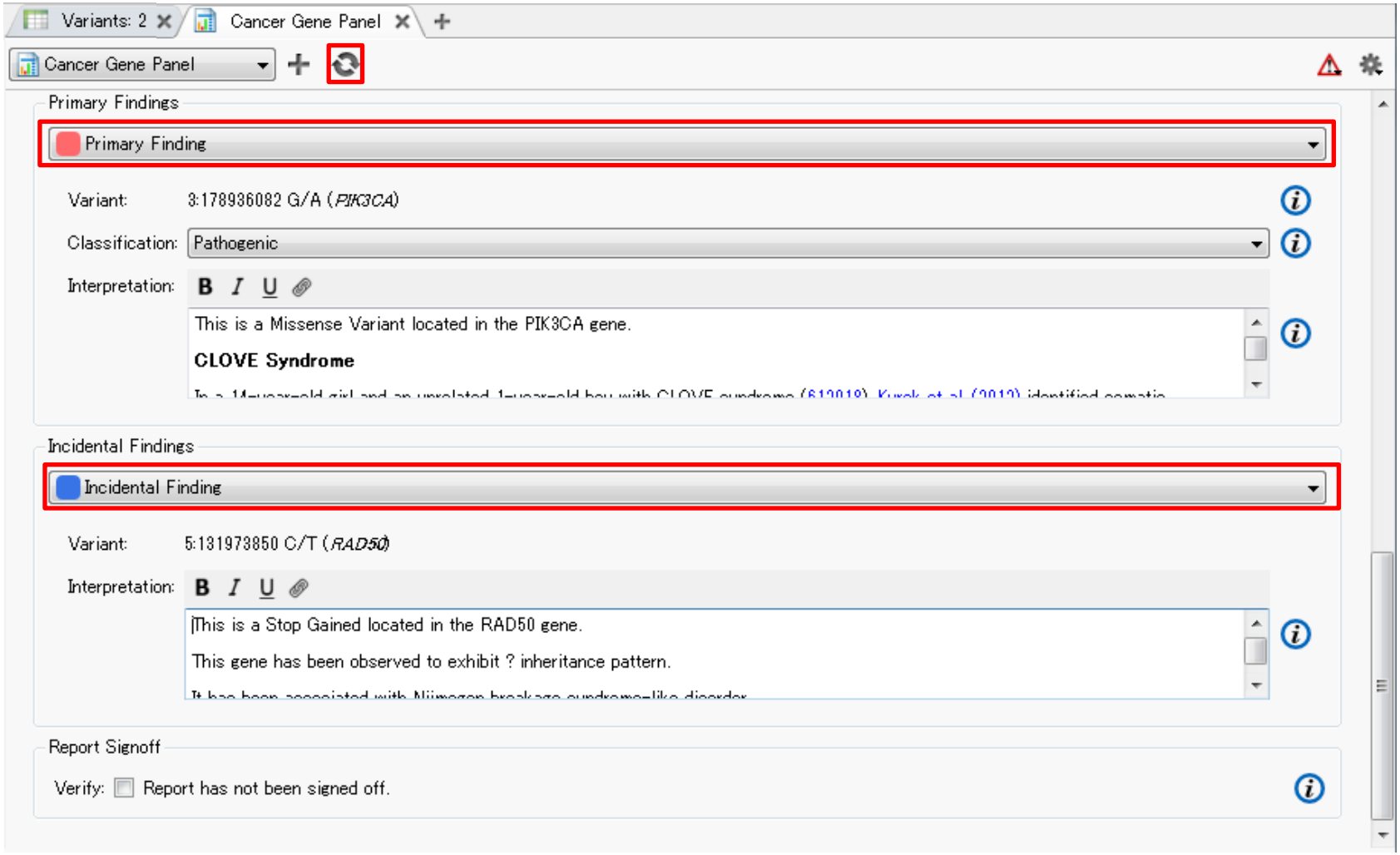
5. レポートの情報入力画面で、必要に応じてサンプル情報やコメントなどを入力
6. 最上段右側の「Configure and reload this report template」をクリックし、メニューより「Configure Report Template」を選択してクリック

レポート作成



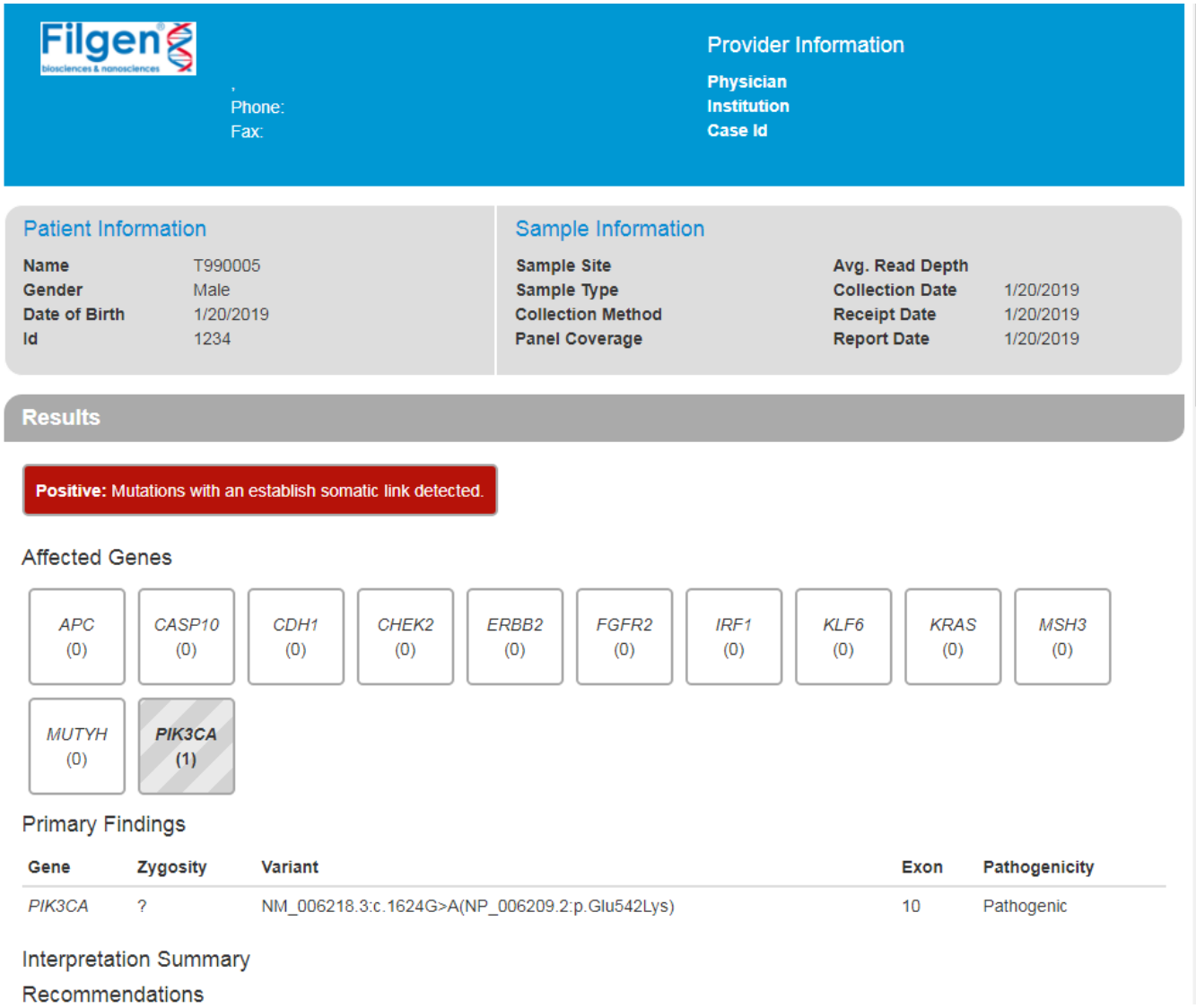
7. Somatic_cancerフォルダ内の「Gene_list.txt」の遺伝子名リストをコピーし、Set Report Parametersの「Reportable Genes」にペーストして「OK」をクリック

レポート作成



8. Reportタブに戻り、「Primary Findings」と「Incidental Findings」のそれぞれの「Select a Variant set」に、フラグ付けした変異セットを選択
9. 最上段の「Create the Report」をクリック

レポート作成



Filgen
biosciences & nanosciences

,
Phone:
Fax:

Provider Information
Physician
Institution
Case Id

Patient Information

Name	T990005
Gender	Male
Date of Birth	1/20/2019
Id	1234

Sample Information

Sample Site		Avg. Read Depth	
Sample Type		Collection Date	1/20/2019
Collection Method		Receipt Date	1/20/2019
Panel Coverage		Report Date	1/20/2019

Results

Positive: Mutations with an establish somatic link detected.

Affected Genes

APC (0)	*CASP10* (0)	*CDH1* (0)	*CHEK2* (0)	*ERBB2* (0)	*FGFR2* (0)	*IRF1* (0)	*KLF6* (0)	*KRAS* (0)	*MSH3* (0)
MUTYH (0)	***PIK3CA*** **(1)**								

Primary Findings

Gene	Zygosity	Variant	Exon	Pathogenicity
PIK3CA	?	NM_006218.3:c.1624G>A(NP_006209.2:p.Glu542Lys)	10	Pathogenic

Interpretation Summary

Recommendations

10. フラグ付けした変異セットのOMIMアノテーションの情報をまとめたレポートが作成される

単一遺伝子病解析ワークフロー

手順1： サンプルデータのインポート

- 解析プロジェクトを作成
- 患者、父親、母親サンプルのVCFファイルをインポート

手順2： アノテーション付加

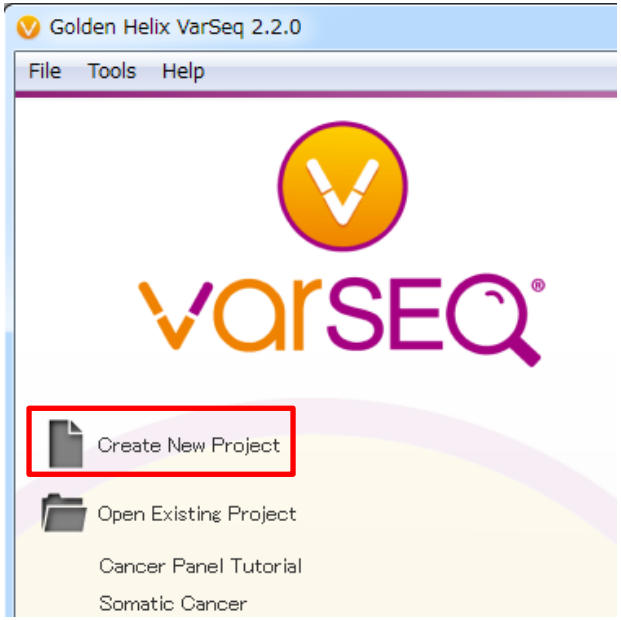
- 変異データに対して、様々なデータベースを用いたアノテーション付加の実行

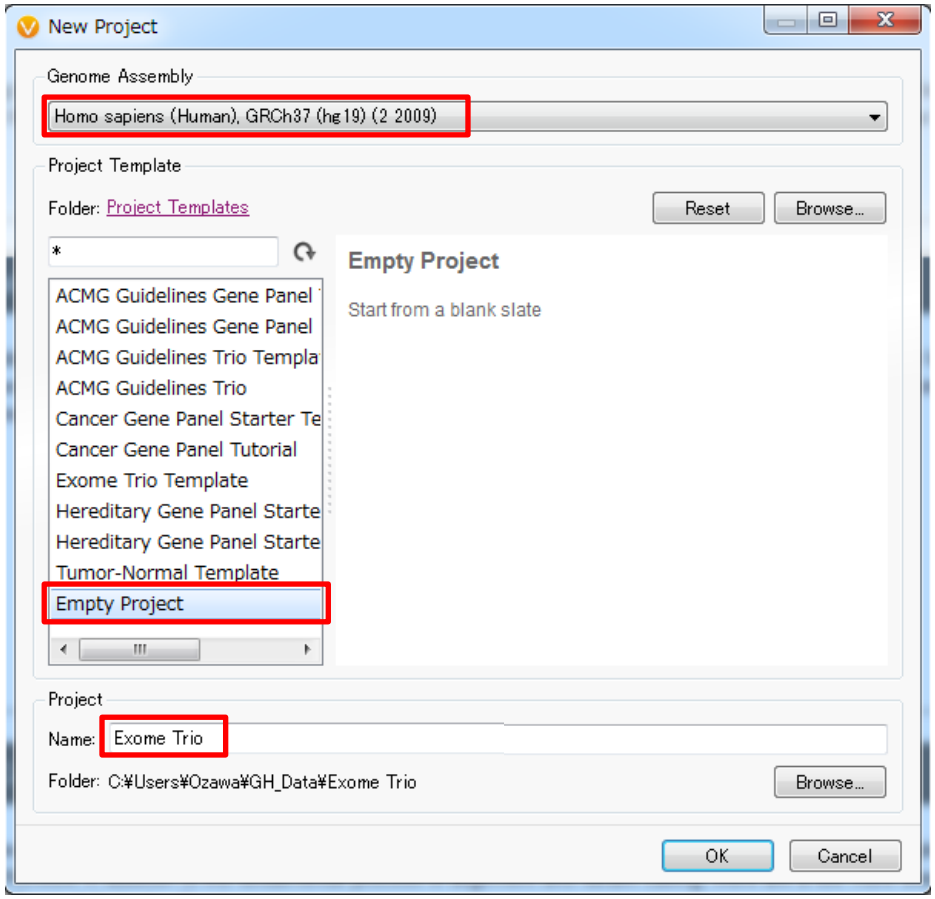
手順3： フィルタリング

- 遺伝形式に基づいた変異の抽出
- 表現型関連変異のスコアリング

手順1. サンプルデータのインポート

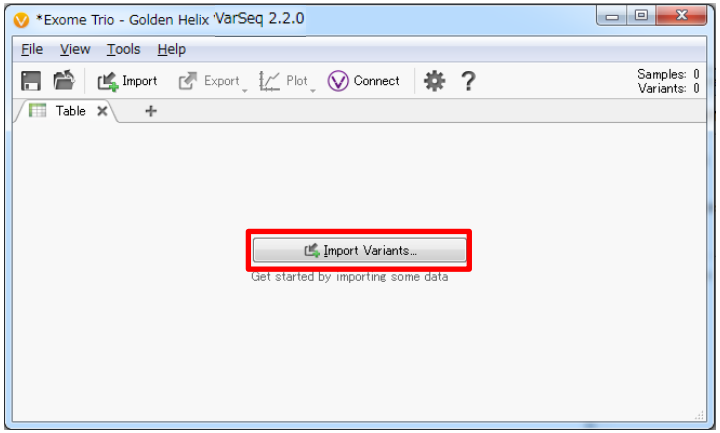
プロジェクトの作成

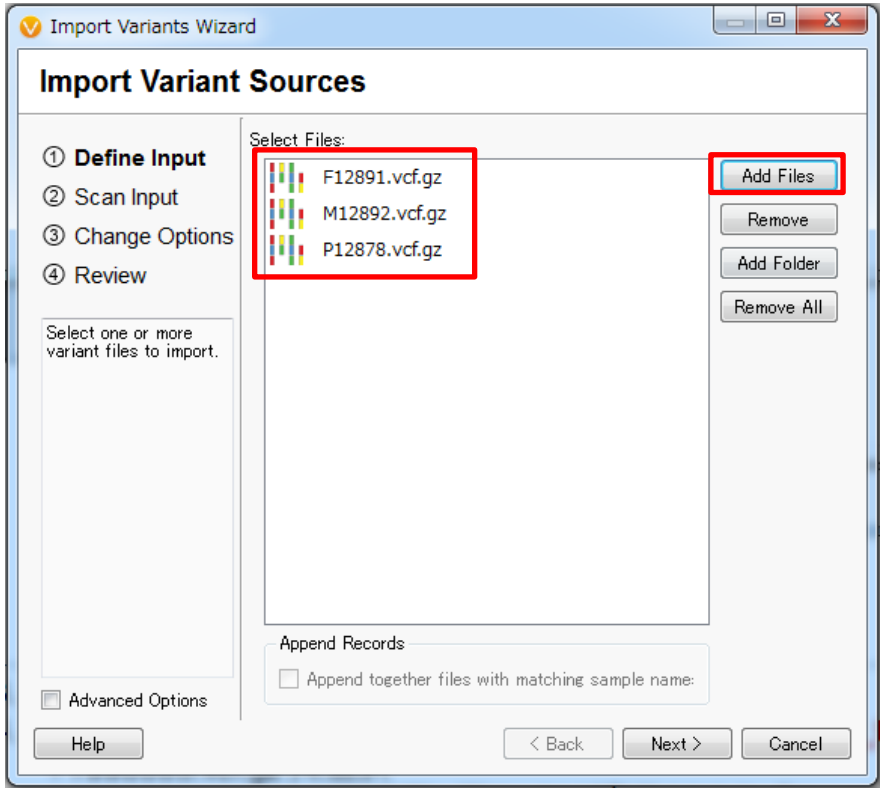




1. メイン画面の「Create New Project」をクリック
2. 任意のプロジェクト名を入力し、またProject Templateに「Empty Project」、Genome Assemblyが「Homo sapiens (Human), GRCh37 (hg19) (2 2009)」となっていることを確認したら「OK」をクリック

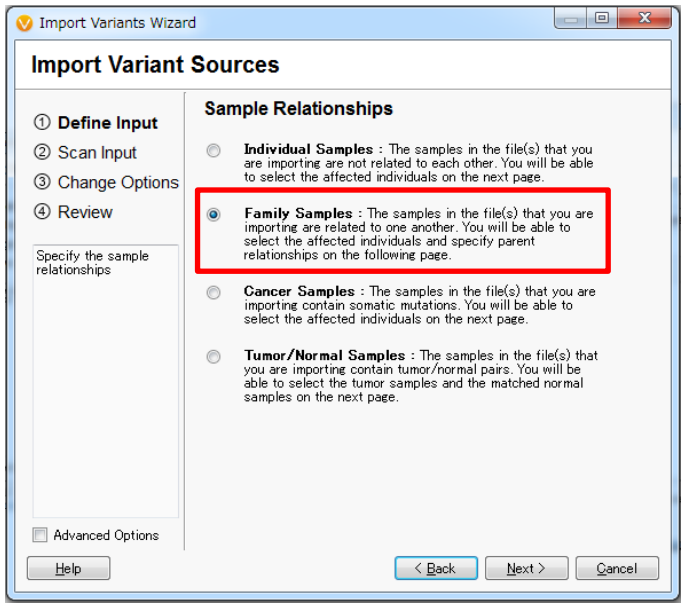
家族サンプルファイルのインポート

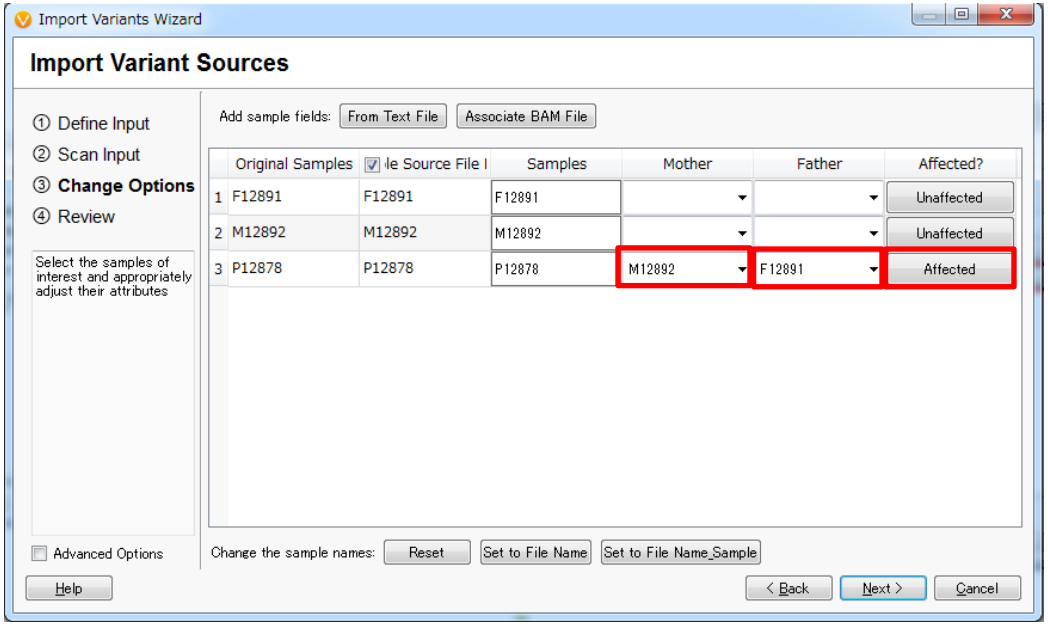




3. 次の画面で、「Import Variants」をクリック
4. Import Variant Sources画面で「Add Files」をクリックし、Exome_trioフォルダ内の「F12891.vcf.gz」「M12892.vcf.gz」「P12878.vcf.gz 」を選択
5. Import Variant Sources画面に両ファイルが表示されたら、「Next」をクリック

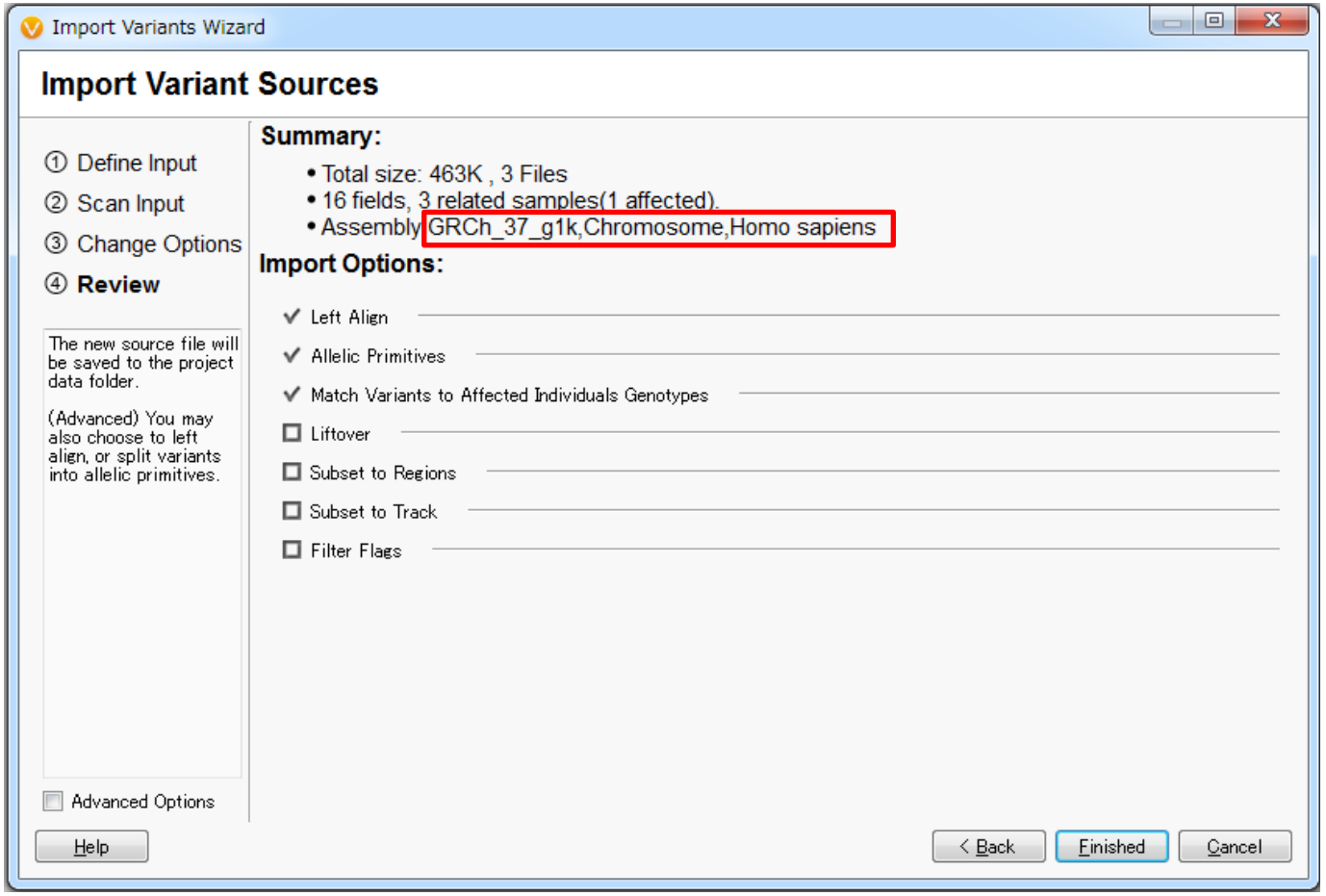
家族サンプルファイルのインポート





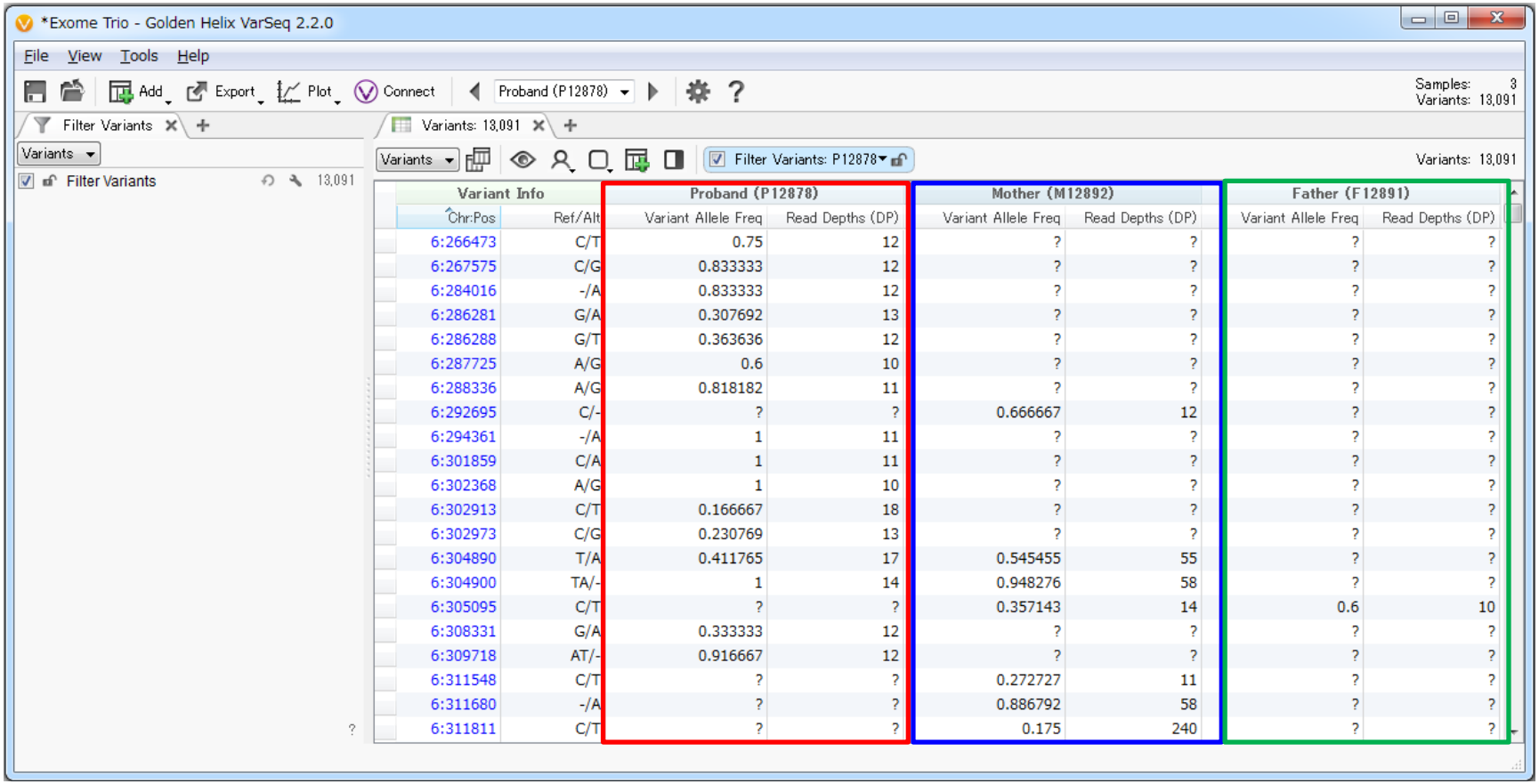
6. Sample Relationshipsで、「Family Samples」を選択し、Nextをクリック
7. サンプル情報の入力画面で、「P12878」のMotherフィールドに「M12892」、Fatherフィールドに「F12891」、Tumorフィールドに「Affected」を選択してNextをクリック

家族サンプルファイルのインポート



8. Assemblyに、「GRCh_37_g1K, Chromosome, Homo sapiens」と表示されていることを確認し、「Finished」をクリック

家族サンプルファイルのインポート

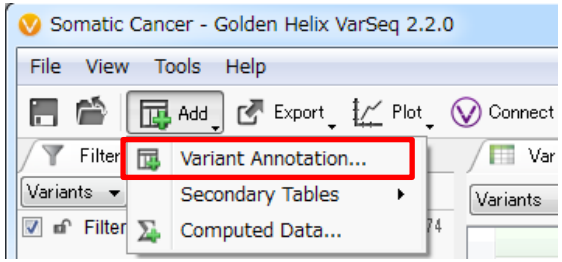


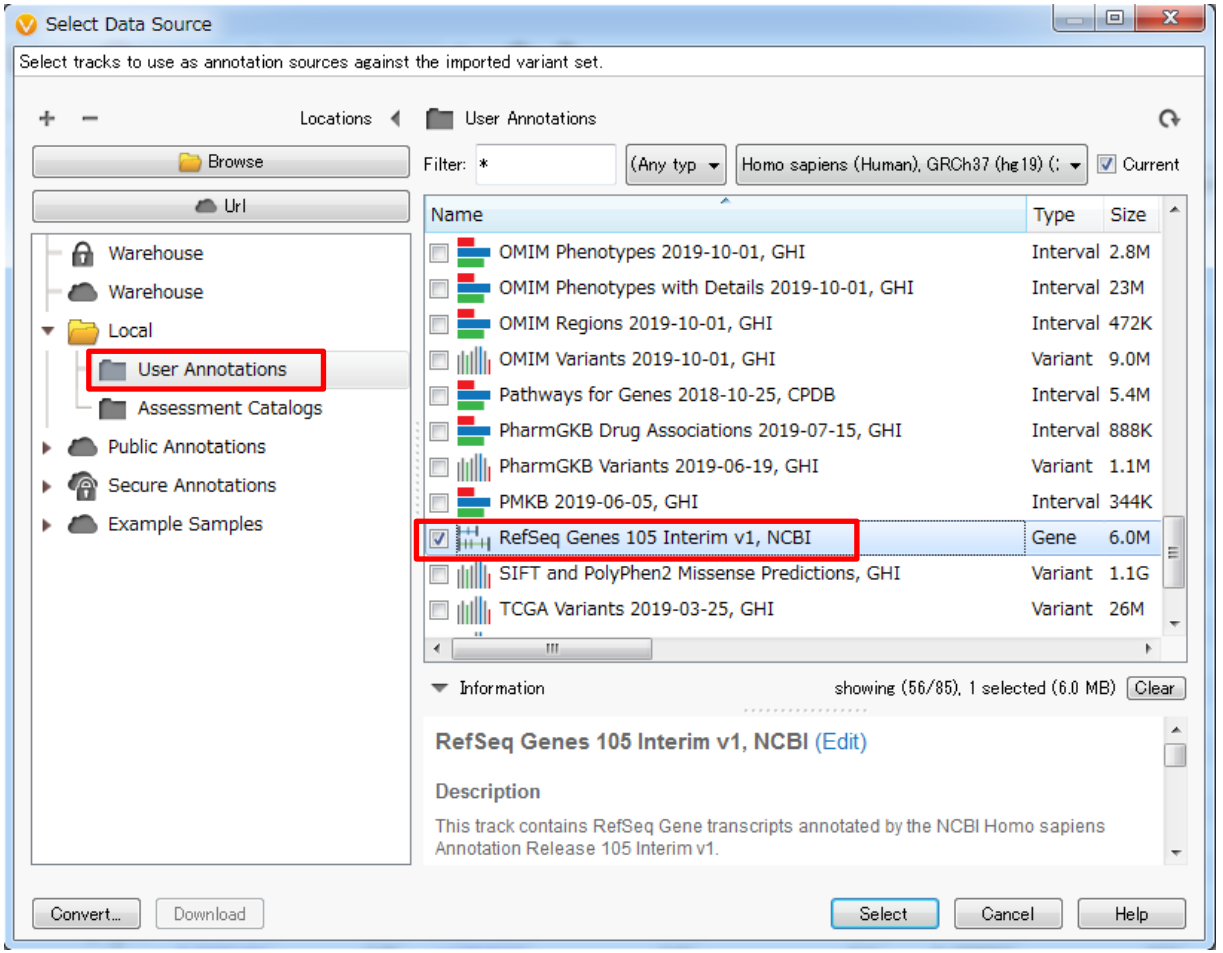
Variant Info		Proband (P12878)		Mother (M12892)		Father (F12891)	
Chr:Pos	Ref/Alt	Variant Allele Freq	Read Depths (DP)	Variant Allele Freq	Read Depths (DP)	Variant Allele Freq	Read Depths (DP)
6:266473	C/T	0.75	12	?	?	?	?
6:267575	C/G	0.833333	12	?	?	?	?
6:284016	-/A	0.833333	12	?	?	?	?
6:286281	G/A	0.307692	13	?	?	?	?
6:286288	G/T	0.363636	12	?	?	?	?
6:287725	A/G	0.6	10	?	?	?	?
6:288336	A/G	0.818182	11	?	?	?	?
6:292695	C/-	?	?	0.666667	12	?	?
6:294361	-/A	1	11	?	?	?	?
6:301859	C/A	1	11	?	?	?	?
6:302368	A/G	1	10	?	?	?	?
6:302913	C/T	0.166667	18	?	?	?	?
6:302973	C/G	0.230769	13	?	?	?	?
6:304890	T/A	0.411765	17	0.545455	55	?	?
6:304900	TA/-	1	14	0.948276	58	?	?
6:305095	C/T	?	?	0.357143	14	0.6	10
6:308331	G/A	0.333333	12	?	?	?	?
6:309718	AT/-	0.916667	12	?	?	?	?
6:311548	C/T	?	?	0.272727	11	?	?
6:311680	-/A	?	?	0.886792	58	?	?
6:311811	C/T	?	?	0.175	240	?	?

9. Proband (P12878)、Mother (M12892)、Father (F12891) の変異データがインポートされ、プロジェクト画面に表示される

手順2. アノテーション付加

アノテーションの付加





選択データベースリスト

- RefSeq Genes
- 1kG Phase3 - Variant Frequencies
- ClinVar
- ClinVar Assessments
- dbNSFP Functional Predictions 3.0
- HGVD1210-V2_30

1. プロジェクト画面の「Add」をクリックし、メニューより「Variant Annotation」を選択してクリック
2. Select Data Source画面において、上記データベース名にすべてチェックを入れ、「Select」をクリック

アノテーションの付加

RefSeq Genes 105 Interim v1, NCBI						
Gene Names	Sequence Ontology (Combined)	Effect (Combined)	Nof4PredictedSplicingDisruptedCombined	Predicted Splicing Disrupted (Combined)	Transcript Name (Clinically Relevant)	HGVS c. (Clinically Relevant)
RAI14	missense_variant	Missense	?	?	NM_001145525.1	NM_001145525.1:c.497G>T
?	intergenic_variant	Other	?	?	?	?
TTC23L	missense_variant	Missense	0 of 4 Predicted Splicing Disrupted	?	NM_001317949.1	NM_001317949.1:c.92A>G
BRIX1	splice_region_variant	Other	0 of 4 Predicted Splicing Disrupted	?	NM_018321.3	NM_018321.3:c.793-3T>A
BRIX1	splice_acceptor_variant	LoF	3 of 4 Predicted Splicing Disrupted	GeneSplicer,MaxEntScan,NNSplice	NM_018321.3	NM_018321.3:c.793-2dupA
AGXT2	splice_donor_variant	LoF	2 of 4 Predicted Splicing Disrupted	MaxEntScan,PWM	NM_031900.3	NM_031900.3:c.*46G>T
AGXT2	synonymous_variant	Other	?	?	NM_031900.3	NM_031900.3:c.1305T>C
AGXT2	missense_variant	Missense	?	?	NM_031900.3	NM_031900.3:c.635C>T
AGXT2	missense_variant	Missense	?	?	NM_031900.3	NM_031900.3:c.418G>A
AGXT2	missense_variant	Missense	?	?	NM_031900.3	NM_031900.3:c.305G>A
SPEF2	missense_variant	Missense	?	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.211A>C
SPEF2	synonymous_variant	Other	0 of 4 Predicted Splicing Disrupted	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.579T>C
SPEF2	synonymous_variant	Other	?	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.861C>T
SPEF2	missense_variant	Missense	?	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.1498G>A
SPEF2	synonymous_variant	Other	0 of 4 Predicted Splicing Disrupted	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.2142T>C
SPEF2	missense_variant	Missense	?	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.2711C>T
SPEF2	missense_variant	Missense	?	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.2800G>C
SPEF2	intron_variant	Other	?	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.2839+630C>T
SPEF2	intron_variant	Other	?	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.2839+815C>T
SPEF2	intron_variant	Other	?	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.2839+1107G…
SPEF2	intron_variant	Other	?	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.2839+1168A…
SPEF2	intron_variant	Other	?	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.2839+1505C…
SPEF2	intron_variant	Other	0 of 4 Predicted Splicing Disrupted	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.2914+19T>G
SPEF2	intron_variant	Other	0 of 4 Predicted Splicing Disrupted	?	NM_024867.3	NM_024867.3:c.3331-11T>C
CAPSL	missense_variant	Missense	?	?	NM_144647.3	NM_144647.3:c.254G>A
CAPSL	intron_variant	Other	0 of 4 Predicted Splicing Disrupted	?	NM_144647.3	NM_144647.3:c.137+17A>G
UGT3A1	3_prime_UTR_variant	Other	?	?	NM_152404.3	NM_152404.3:c.*607T>C
UGT3A1	splice_region_variant	Other	0 of 4 Predicted Splicing Disrupted	?	NM_152404.3	NM_152404.3:c.1296-8G>A

3. アノテーション付加が完了すると、変異データテーブルに各データベースのアノテーション列が追加される

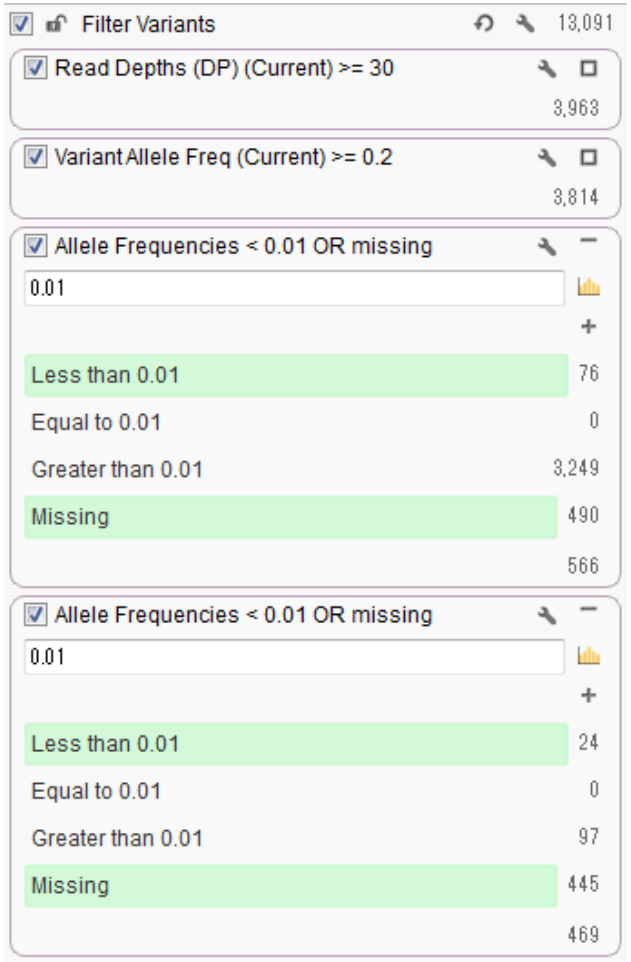
手順3. フィルタリング

基本ワークフローの作成

- Proband (P12878)の「Read Depths (DP)」≧ 30
- Proband (P12878)の「Variant Allele Freq」≧ 0.2

1. Proband (P12878サンプル）の「Read Depths (DP)」と「Variant Allele Freq」の2フィールドのコンテナをつくり、上記のとおり検索条件を指定する

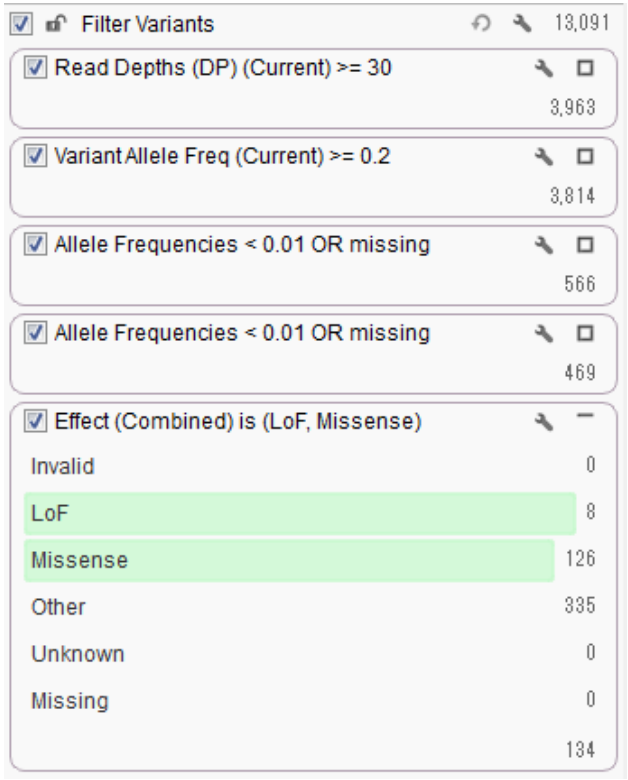
基本ワークフローの作成



- 1kG Phase3 - Variant Frequenciesの「Allele Frequencies」< 0.01 or Missing
- HGVD1210-V2_30の「Allele Frequencies」< 0.01 or Missing

2. 人種特異的なSNPの除去のため、1kG Phase3 - Variant Frequenciesの「Allele Frequencies」、さらにHGVD1210-V2_30の「Allele Frequencies」の2フィールドのコンテナをつくり、上記のとおり検索条件を指定する

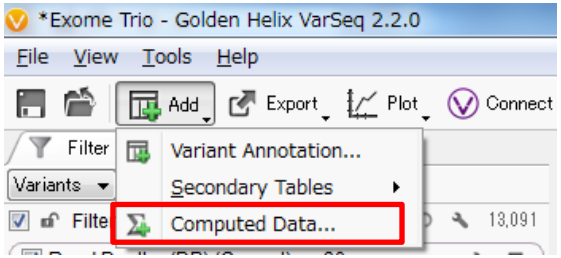
基本ワークフローの作成

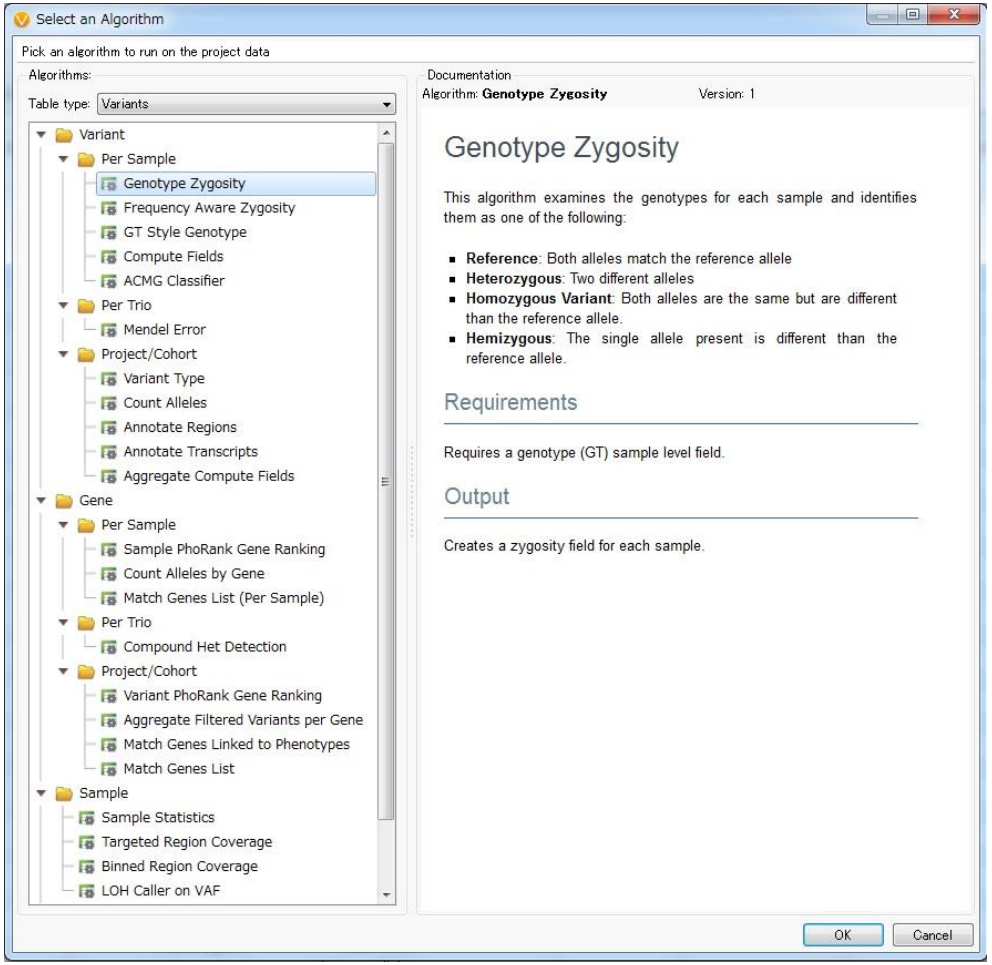


- RefSeq Geneの「Effect (Combined)」is LoF, Missense

3. 生体に有害な変異の抽出のため、RefSeq Geneの「Effect (Combined)」のフィールドのコンテナをつくり、上記のとおり検索条件を指定する

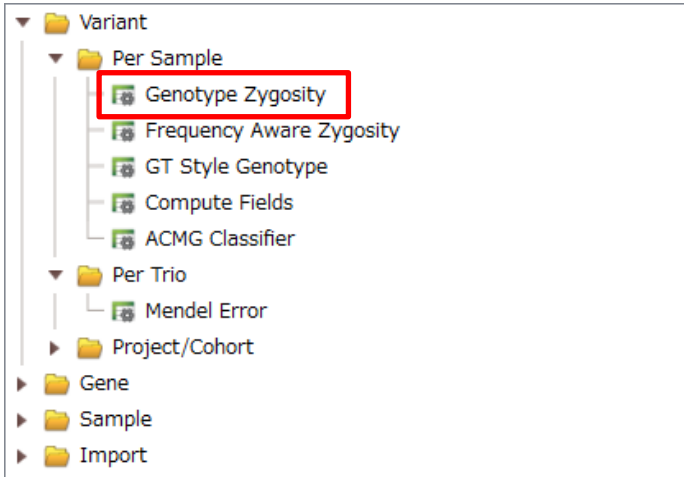
解析アルゴリズムの実行





1. プロジェクト画面の「Add」をクリックし、メニューより「Computed Data」を選択してクリック
2. Select an Algorithm画面において、任意の解析アルゴリズムを選択して、「OK」をクリック
3. 解析アルゴリズムの種類によっては、計算時のパラメータなどを指定する
4. 多くの解析アルゴリズムでは、計算が終了すると、変異テーブルに計算結果のアノテーションが付加され、フィルタリングに使用できるようになる

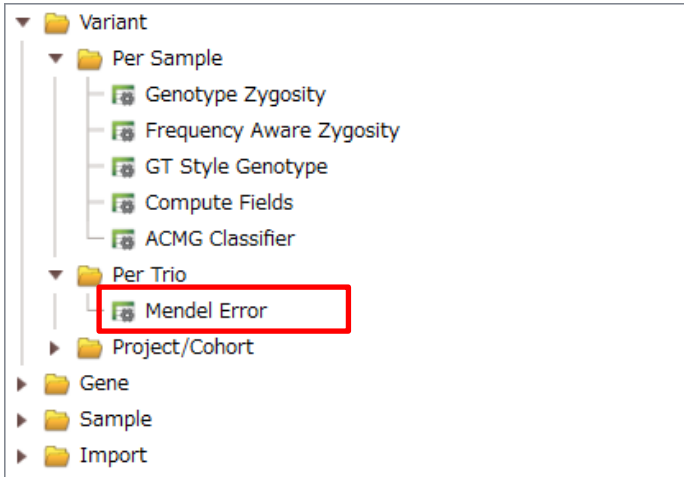
接合体情報の付加



Variant Info		Proband (P12878)			Mother (M12892)			Father (F12891)		
Chr:Pos	Ref/Alt	Variant Allele Freq	Read Depths (DP)	Zygosity	Variant Allele Freq	Read Depths (DP)	Zygosity	Variant Allele Freq	Read Depths (DP)	Zygosity
6:564567	C/G	0.393443	122	Heterozygous	?	?	?	0.496552	145	Heterozygous
6:7405508	G/A	0.457143	70	Heterozygous	0.514925	134	Heterozygous	?	?	?
6:8428249	A/C	0.505155	194	Heterozygous	?	?	?	?	?	?
6:10626704	T/G	0.409836	122	Heterozygous	0.46	150	Heterozygous	?	?	?
6:10709632	G/A	0.552941	85	Heterozygous	?	?	?	0.514563	103	Heterozygous
6:12124988	T/C	0.433862	189	Heterozygous	?	?	?	?	?	?
6:12290906	G/T	0.336538	104	Heterozygous	0.369295	241	Heterozygous	0.38806	67	Heterozygous
6:15501276	C/G	0.417722	79	Heterozygous	?	?	?	?	?	?
6:17794528	A/C	0.381818	112	Heterozygous	?	?	?	?	?	?
6:18208415	G/A	0.416667	110	Heterozygous	?	?	?	0.481481	135	Heterozygous
6:24850081	A/C	0.603239	250	Heterozygous	?	?	?	0.58871	250	Heterozygous
6:26056427	T/G	0.462963	162	Heterozygous	?	?	?	0.443787	169	Heterozygous
6:26108282	C/A	0.245902	62	Heterozygous	?	80	Heterozygous	?	?	?
6:26234929	T/G	0.42029	138	Heterozygous	0.513043	115	Heterozygous	0.470588	153	Heterozygous
6:26506950	T/G	0.389558	249	Heterozygous	0.512295	245	Heterozygous	0.436214	243	Heterozygous
6:27420048	G/C	0.44697	132	Heterozygous	0.446541	160	Heterozygous	?	?	?

1. Select an Algorithm画面より「Genotype Zygosity」を選択して「OK」をクリック
2. 変異テーブルに、各サンプルの各変異ごとに接合体情報のフィールドが追加される

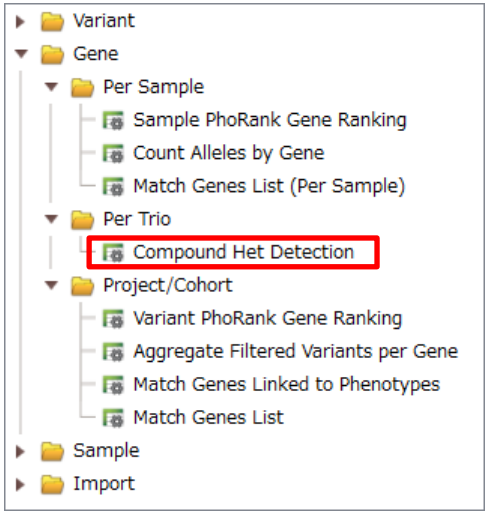
メンデル遺伝情報の付加

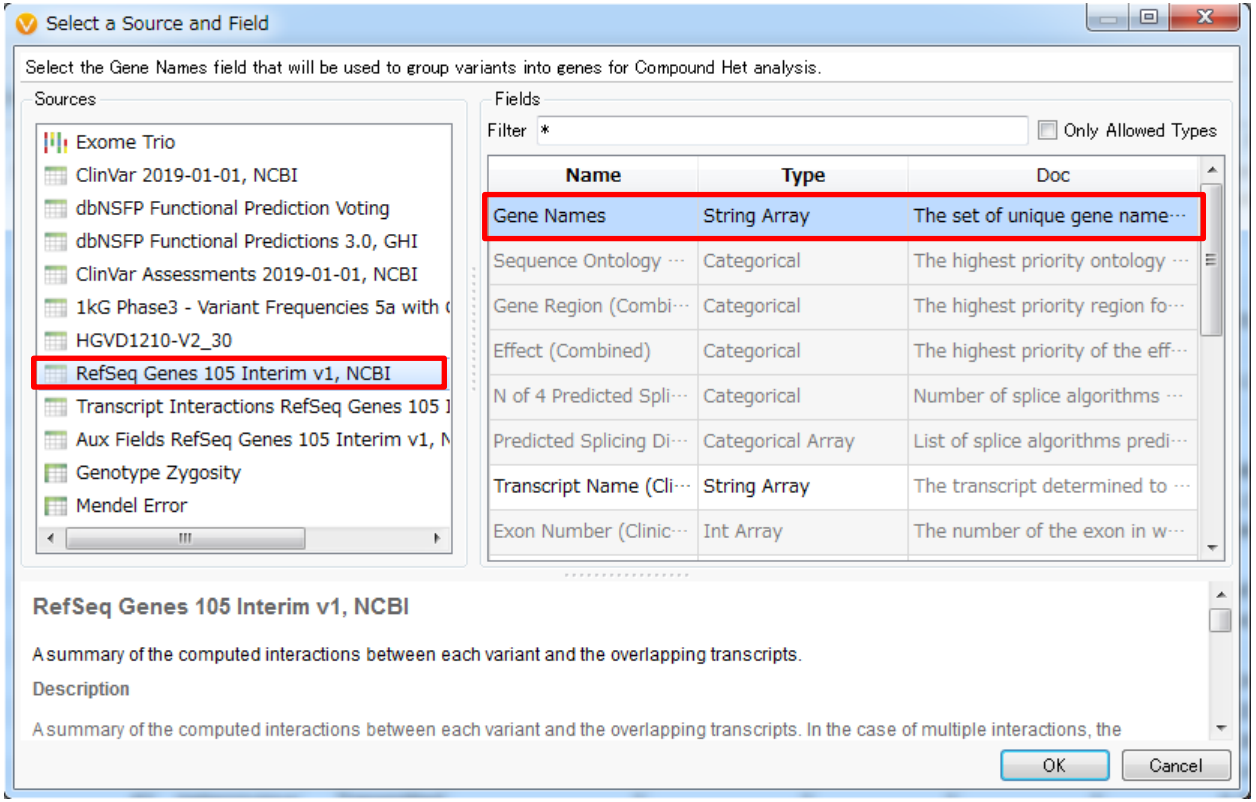


Variant Info		Proband (P12878)				Mother (M12892)				Father (F12891)			
Chr:Pos	Ref/Alt	Variant Allele Freq	Read Depths (DP)	Zygosity	Mendel Error	Variant Allele Freq	Read Depths (DP)	Zygosity	Mendel Error	Variant Allele Freq	Read Depths (DP)	Zygosity	Mendel Error
6:564567	C/G	0.393443	122	Heterozygous	Transmitted	?	?	?	?	0.496552	145	Heterozygous	?
6:7405508	G/A	0.457143	70	Heterozygous	Transmitted	0.514925	134	Heterozygous	?	?	?	?	?
6:8428249	A/C	0.505155	194	Heterozygous	de Novo Allele	?	?	?	?	?	?	?	?
6:10626704	T/G	0.409836	122	Heterozygous	Transmitted	0.46	150	Heterozygous	?	?	?	?	?
6:10709632	G/A	0.552941	85	Heterozygous	Transmitted	?	?	?	?	0.514563	103	Heterozygous	?
6:12124988	T/C	0.433862	189	Heterozygous	de Novo Allele	?	?	?	?	?	?	?	?
6:12290906	G/T	0.336538	104	Heterozygous	Transmitted	0.369295	241	Heterozygous	?	0.38806	67	Heterozygous	?
6:15501276	C/G	0.417722	79	Heterozygous	de Novo Allele	?	?	?	?	?	?	?	?
6:17794528	A/C	0.381818	112	Heterozygous	de Novo Allele	?	?	?	?	?	?	?	?
6:18208415	G/A	0.416667	110	Heterozygous	Transmitted	?	?	?	?	0.481481	135	Heterozygous	?
6:24850081	A/C	0.603239	250	Heterozygous	Transmitted	?	?	?	?	0.58871	250	Heterozygous	?
6:26056427	T/G	0.462963	162	Heterozygous	Transmitted	?	?	?	?	0.443787	169	Heterozygous	?
6:26108282	C/A	0.245902	62	Heterozygous	Transmitted	?	80	Heterozygous	?	?	?	?	?
6:26234929	T/G	0.42029	138	Heterozygous	Transmitted	0.513043	115	Heterozygous	?	0.470588	153	Heterozygous	?
6:26506950	T/G	0.389558	249	Heterozygous	Transmitted	0.512295	245	Heterozygous	?	0.436214	243	Heterozygous	?
6:27420048	G/C	0.44697	132	Heterozygous	Transmitted	0.446541	160	Heterozygous	?	?	?	?	?

1. Select an Algorithm画面より「Mendel Error」を選択して「OK」をクリック
2. 変異テーブルのProbandサンプルにおいて、各変異ごとのメンデル遺伝情報のフィールドが追加される

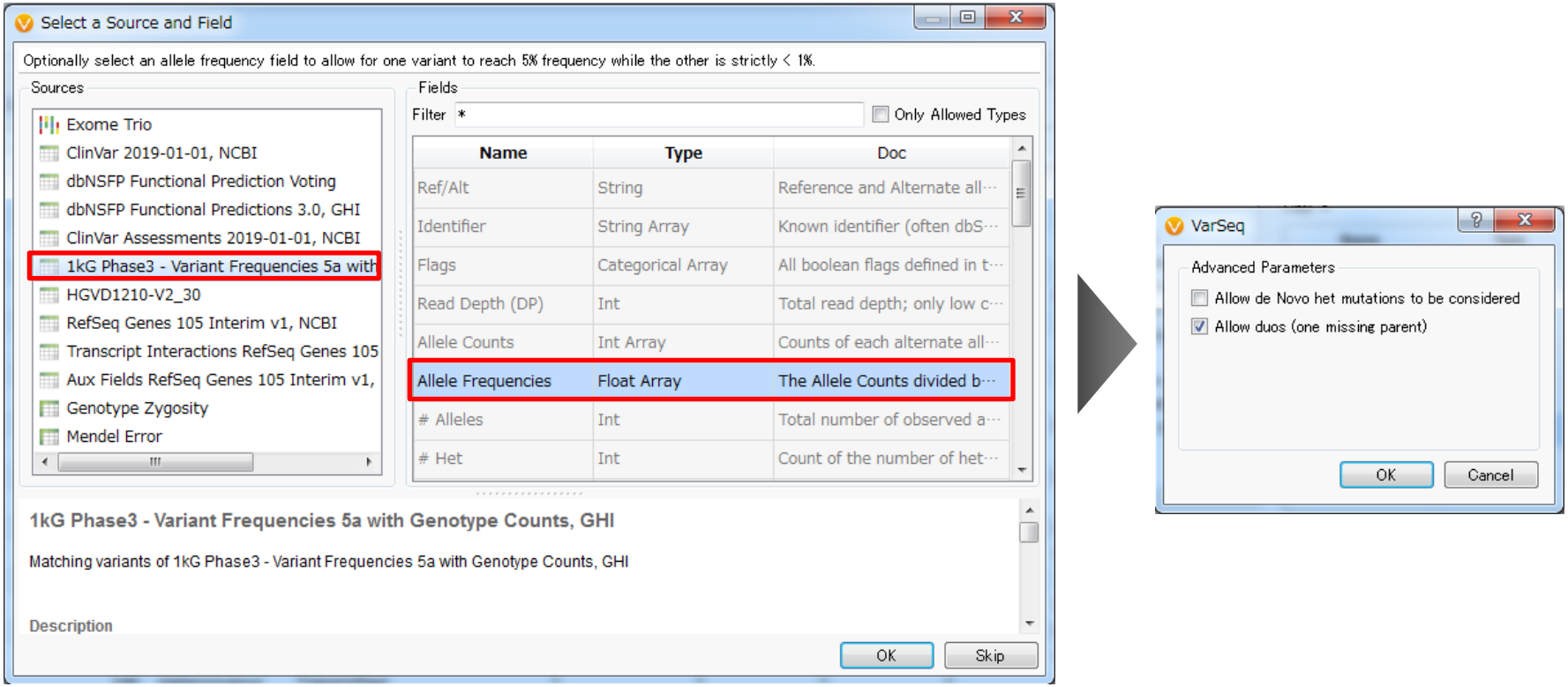
複合ヘテロ接合体の検出





1. Select an Algorithm画面より「Mendel Error」を選択して「OK」をクリック
2. Select a Source and Field画面において、変異テーブル上の遺伝子名のフィールド（この例では RefSeq GenesのGene Namesフィールド）を選択して、「OK」をクリック

複合ヘテロ接合体の検出

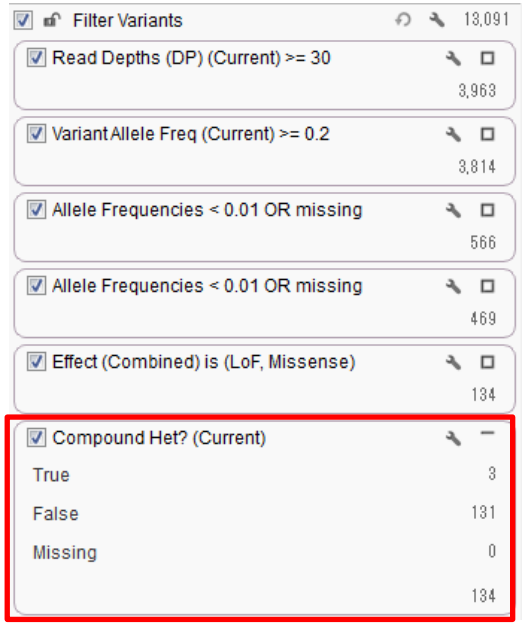


3. 2つ目のSelect a Source and Field画面において、変異テーブル上のアレル頻度データのフィールド（この例では1kG Phase3のAllele Frequenciesフィールド）を選択して「OK」または「Skip」をクリック
   ＊本トレーニングでは「Skip」をクリック

4. Advanced Parametersで、de Novoのヘテロ接合性変異を含めるか、また片親だけのサンプルデータしか存在しない場合も計算を行うかどうかを指定し、「OK」をクリック

複合ヘテロ接合体の検出

ワークフロー



変異テーブル

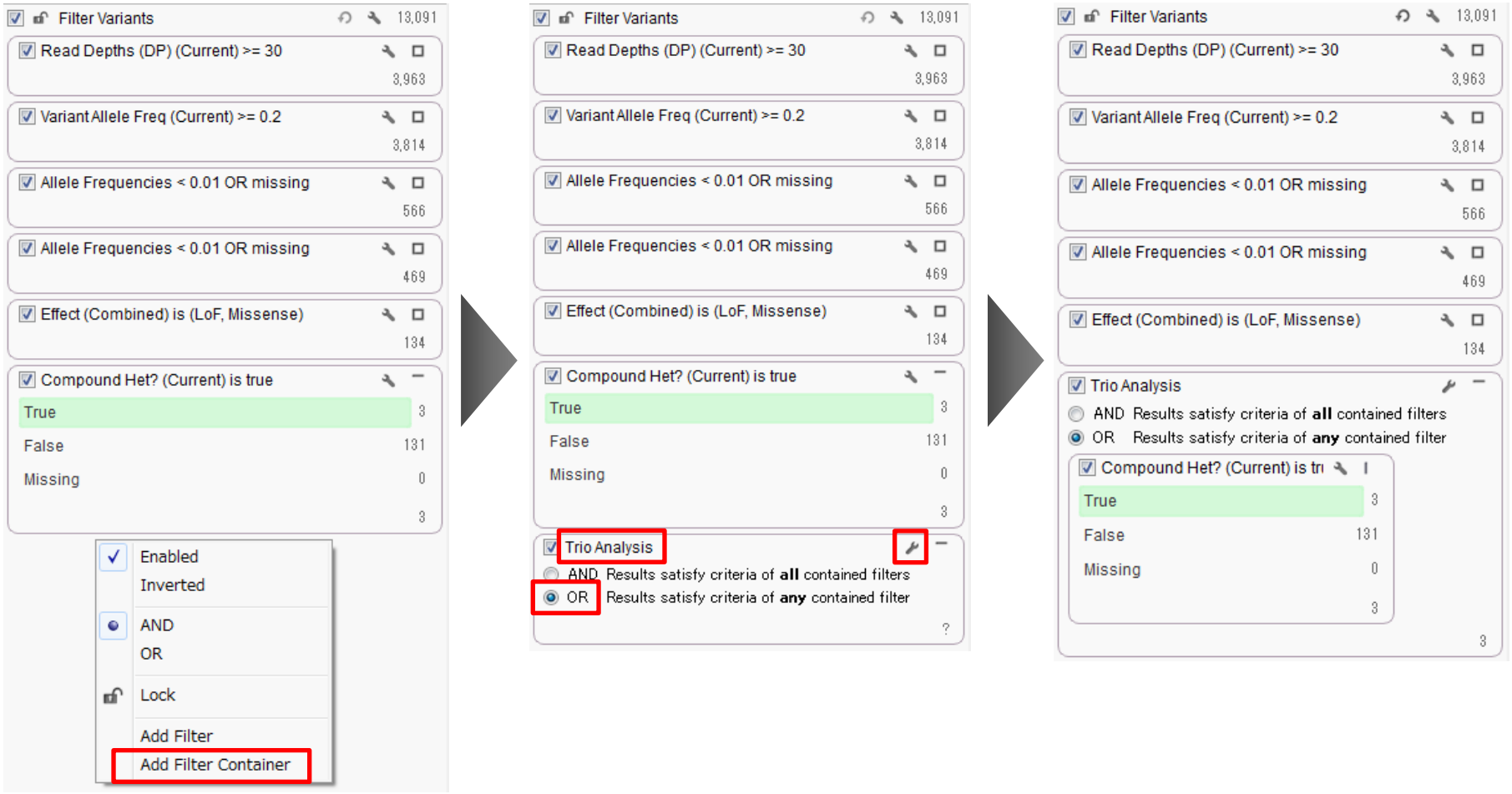
Gene	Compound Het Variants for---		Compound Het Genes for Proband (P12878)				
Gene Names	Compound Het?	Inherited From	Has Compound Het?	Inherited from Father	Inherited from Mother	Inherited Total	Hets In Both Parents
EXOC2	False	NA	False	1	0	1	0
RIOK1	False	NA	False	0	1	1	0
SLC35B3	False	NA	False	0	0	0	0
GCNT2	False	NA	False	0	1	1	0
PAK1IP1	False	NA	False	1	0	1	0
HIVEP1	False	NA	False	0	0	0	0
EDN1	False	NA	False	0	0	0	1
JARID2	False	NA	False	0	0	0	0
KIF13A	False	NA	False	0	0	0	0
KDM1B	False	NA	False	1	0	1	0
FAM65B	False	NA	False	1	0	1	0
HIST1H1C	False	NA	False	1	0	1	0
HIST1H1T	False	NA	False	0	1	1	0
HIST1H1D	False	NA	False	0	0	0	1

遺伝子テーブル

Variant Gene Info	Compound Het Genes for Proband (P12878)				
Gene Names	Has Compound Het?	Inherited from Father	Inherited from Mother	Inherited Total	Hets In Both Parents
AARS2	False	0	0	0	0
ABCC10	False	0	0	0	0
ABCF1	False	0	0	0	0
ABHD16A	False	0	0	0	0
ABRACL	False	0	0	0	0
ABT1	False	0	0	0	0
ACAT2	False	1	0	1	0
ACOT13	False	0	0	0	0
ADAT2	False	0	0	0	0
ADGB	False	0	0	0	0
ADGRB3	False	1	0	1	0
ADGRF1	False	0	0	0	0
ADGRF2	False	1	0	1	0

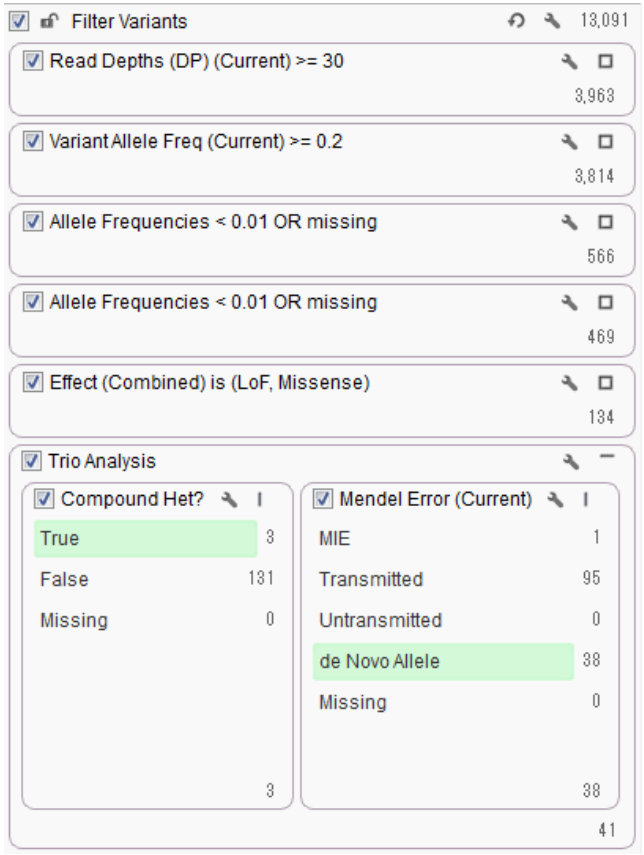
5. ワークフローに自動的にCompound Het?のフィルターコンテナが作成される
6. 同時に変異テーブルへアノテーション付けされ、別タブで情報が付加された遺伝子テーブルも作成される

トリオ解析ワークフローの作成



1. ワークフロー下側の空きスペース上で右クリックし、メニューから「Add Filter Container」選択してクリック
2. 新たなコンテナが作成されるので、コンテナ名をダブルクリックして「Trio Analysis」に変更し、さらに「Show Filter Configuration」をクリックし、検索条件に「OR」を指定
3. Compound Het?コンテナを選択し、Trio Analysisコンテナ内にドラッグ＆ドロップ

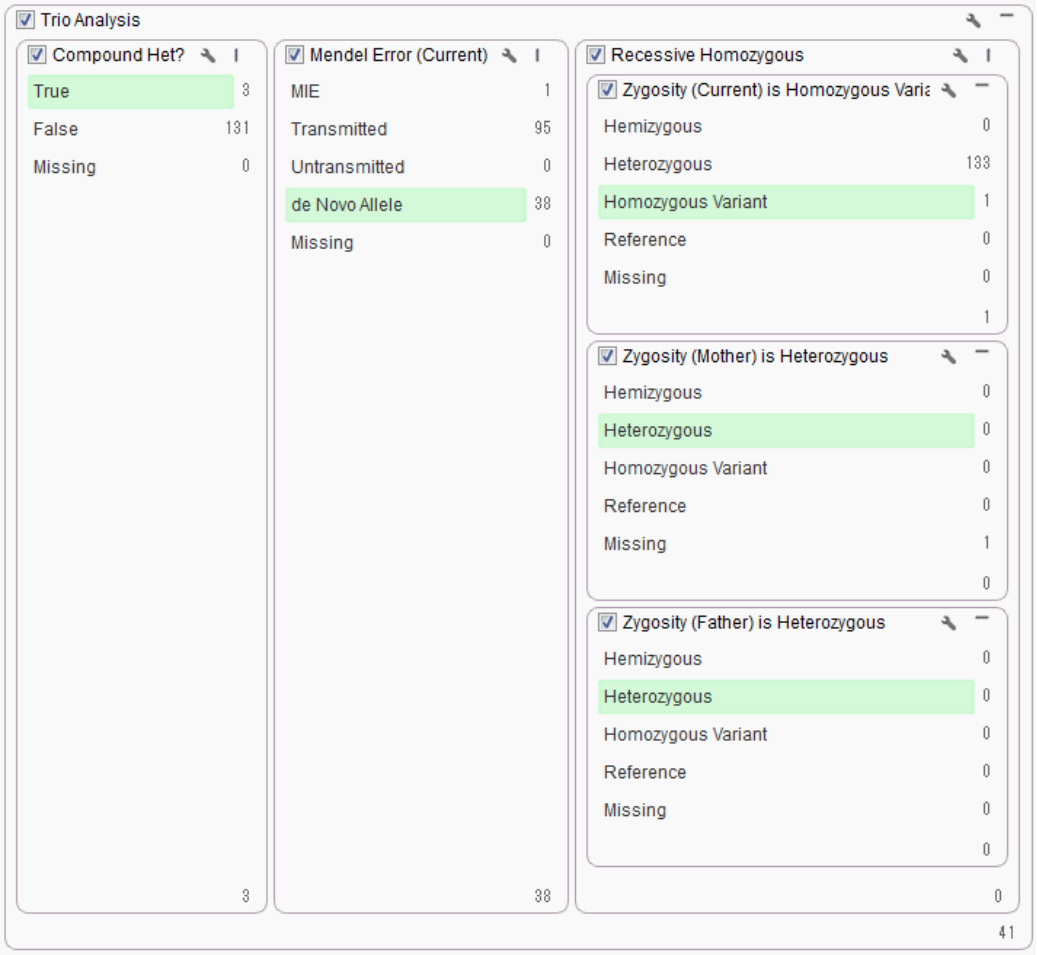
トリオ解析ワークフローの作成



- Proband (P12878)の「Mendel Error」is de Novo Allele

4. Proband (P12878サンプル）の「Mendel Error」のフィールドのコンテナをつくり、上記のとおり検索条件を指定する

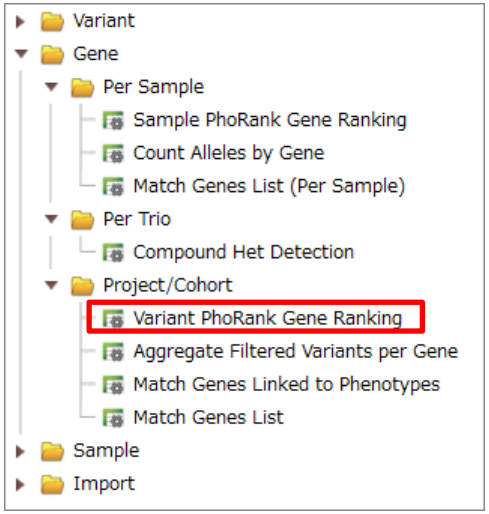
トリオ解析ワークフローの作成

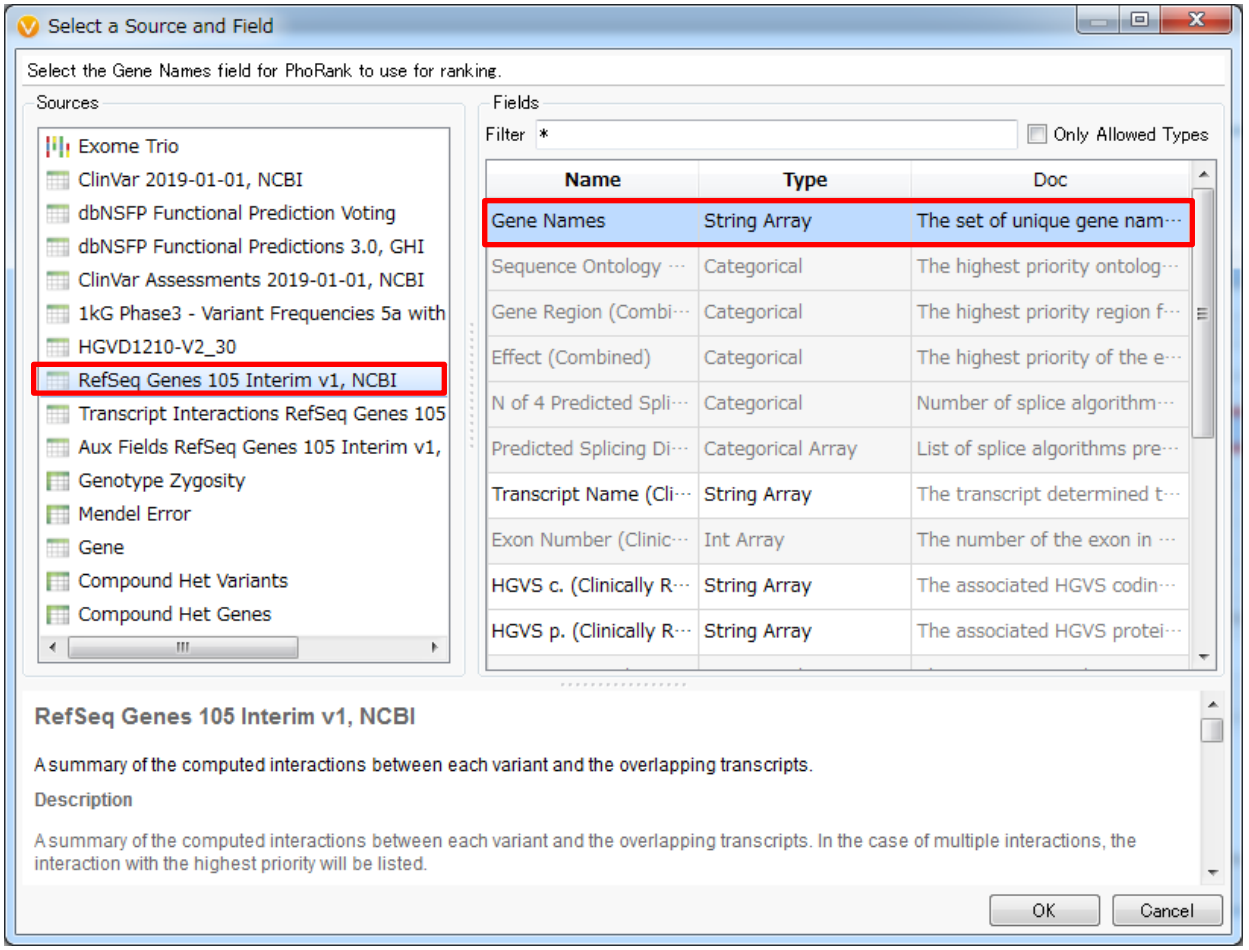


- Proband (P12878)の「Zygosity」is Homozygous Variant
- Mother (M12892)の「Zygosity」is Heterozygous
- Father (F12891)の「Zygosity」is Heterozygous

5. Trio Analysisコンテナ内の空きスペース上で右クリックし、メニューから「Add Filter Container」選択してクリック
6. 新たなコンテナが作成されるので、コンテナ名をダブルクリックして「Recessive Homozygous」に変更
7. Proband (P12878サンプル)、Mother (M12892サンプル)、Father (F12891サンプル)それぞれの「Zygosity」のフィールドのコンテナをつくり、上記のとおり検索条件を指定する

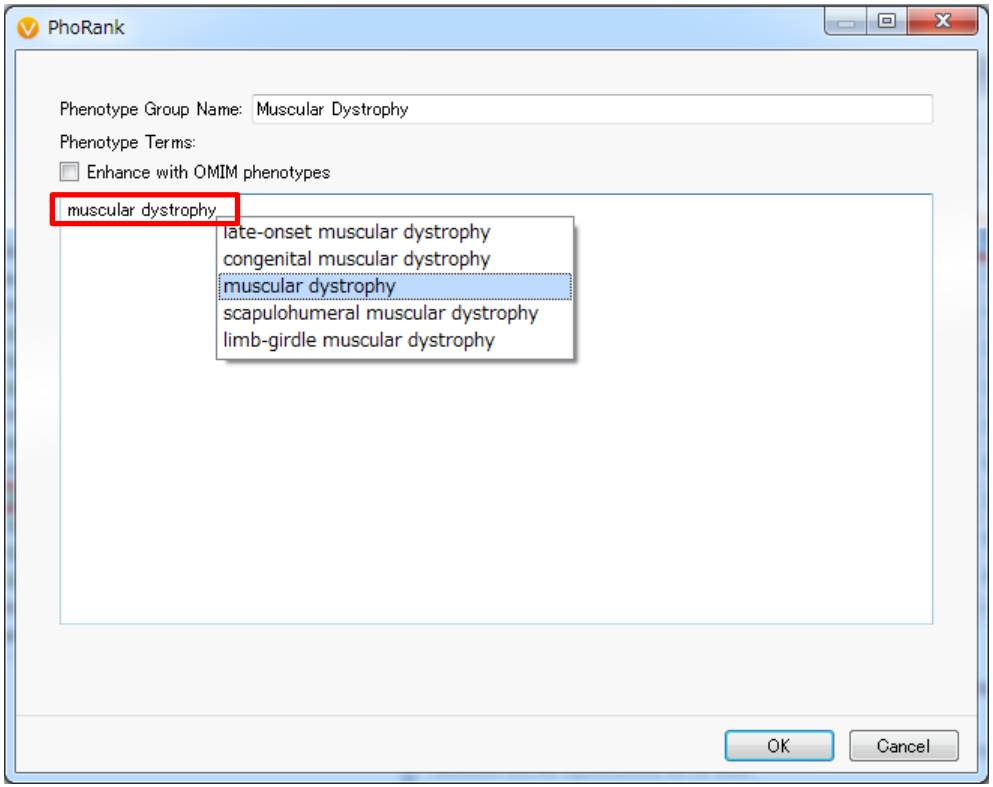
遺伝子ランキングの計算





1. Select an Algorithm画面より「Variant PhoRank Gene Ranking」を選択して「OK」をクリック
2. Select a Source and Field画面において、変異テーブル上の遺伝子名のフィールド（この例ではRefSeq GenesのGene Namesフィールド）を選択して、「OK」をクリック

遺伝子ランキングの計算

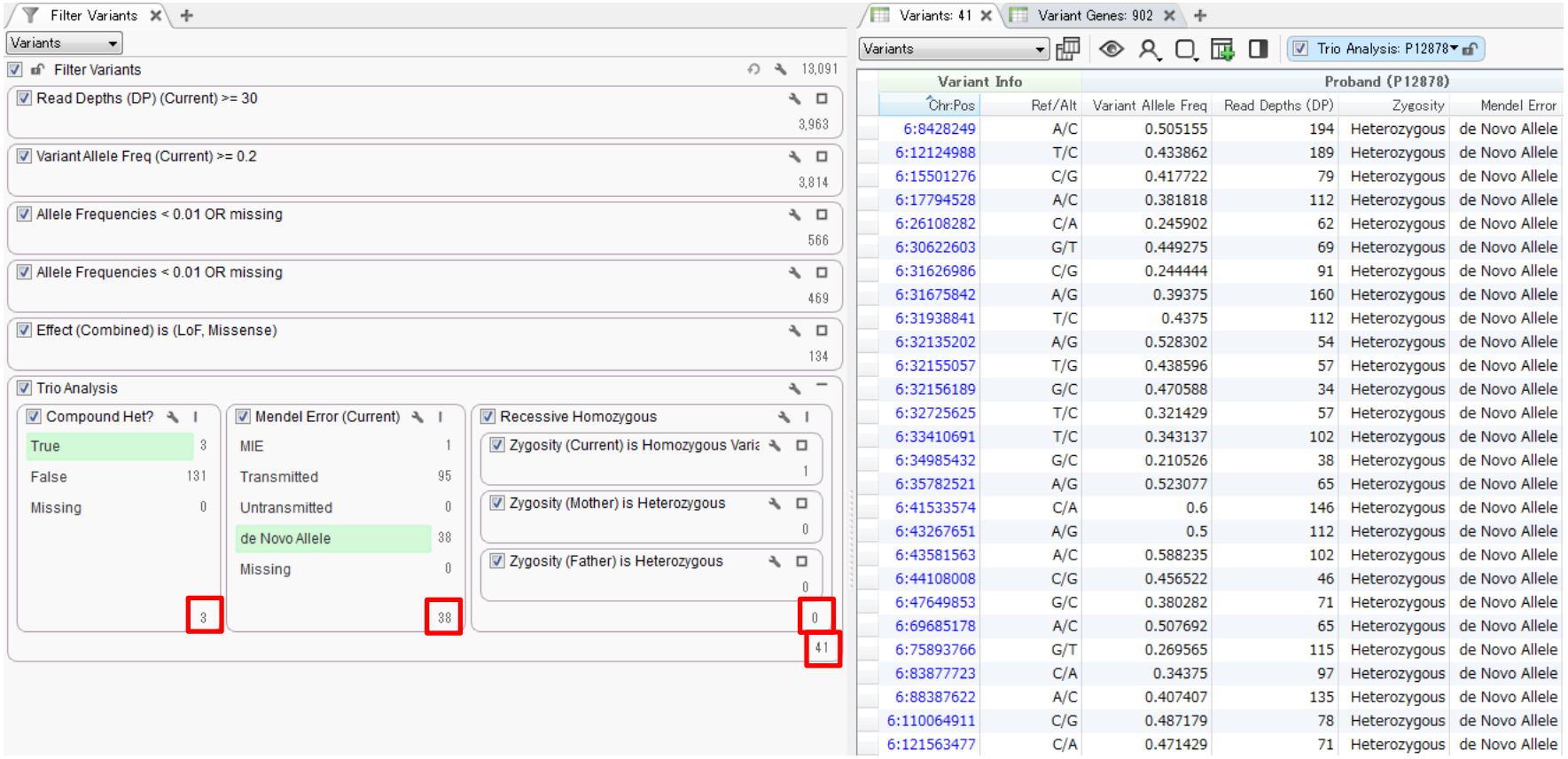


Muscular Dystrophy PhoRank

Gene Rank	Gene Score	Path
0.425273	0.00136835	SLC35B3 / G…
0.221142	0.000465594	HIVEP1 / GO…
0.379101	0.000974205	JARID2 / GO…
0.281896	0.000590947	KIF13A / GO…
0.377886	0.000968939	DHX16 / GO:…
0.247874	0.000517044	C6orf47 / GO…
0.215067	0.000437204	LY6G6F / GO…
0.247874	0.000517044	DXO / GO:00…
0.336574	0.000794162	EGFL8 / GO:…
0.221142	0.000465594	PBX2 / GO:0…
0.221142	0.000465594	PBX2 / GO:0…
0.36695	0.000910578	HLA-DQB2 / …
0.550425	0.00761623	SYNGAP1 / …

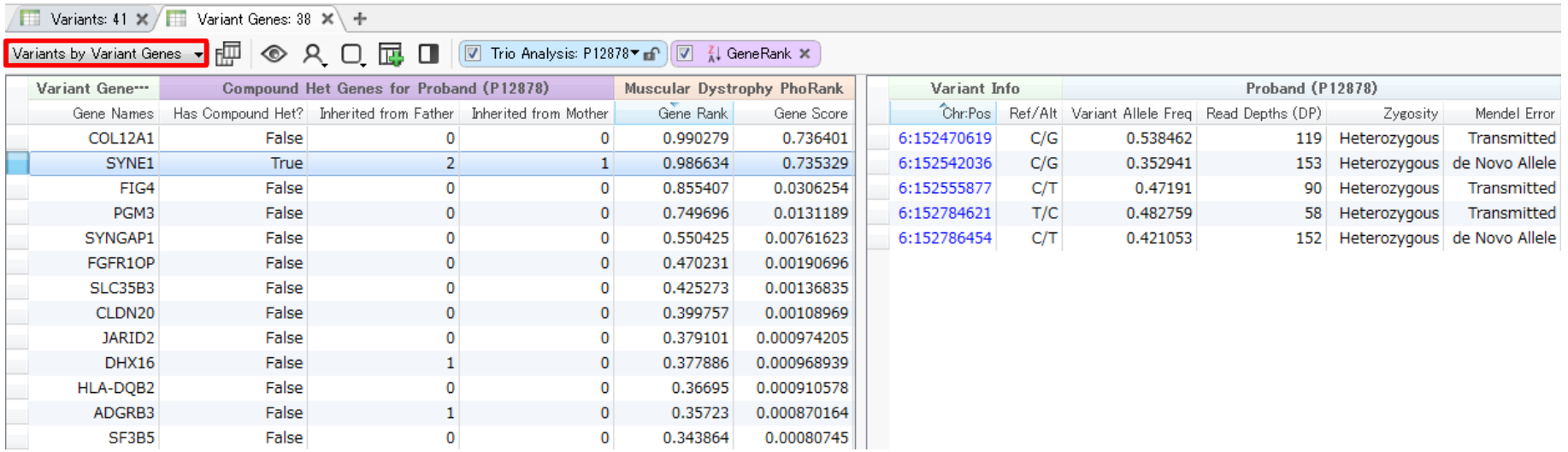
3. PhoRank画面において、Phenotype Terms:に任意のHPO Term（この例ではmuscular dystrophy）を入力、あるいはTermの候補リストから選択して、「OK」をクリック
4. 変異あるいは遺伝子テーブルに、遺伝子ごとの入力HPO Termとの関連の強さを数値化したフィールドが追加される

ワークフロー解析結果の確認



1. 複合ヘテロ接合体では3つ、de Novoアレルでは38個、劣性ホモ接合体では0個の変異が検出され、合計41個の変異がテーブルに表示される

ワークフロー解析結果の確認



Variant Gene···	Compound Het Genes for Proband (P12878)			Muscular Dystrophy PhoRank	
Gene Names	Has Compound Het?	Inherited from Father	Inherited from Mother	Gene Rank	Gene Score
COL12A1	False	0	0	0.990279	0.736401
SYNE1	True	2	1	0.986634	0.735329
FIG4	False	0	0	0.855407	0.0306254
PGM3	False	0	0	0.749696	0.0131189
SYNGAP1	False	0	0	0.550425	0.00761623
FGFR1OP	False	0	0	0.470231	0.00190696
SLC35B3	False	0	0	0.425273	0.00136835
CLDN20	False	0	0	0.399757	0.00108969
JARID2	False	0	0	0.379101	0.000974205
DHX16	False	1	0	0.377886	0.000968939
HLA-DQB2	False	0	0	0.36695	0.000910578
ADGRB3	False	1	0	0.35723	0.000870164
SF3B5	False	0	0	0.343864	0.00080745

Variant Info		Proband (P12878)			
Chr:Pos	Ref/Alt	Variant Allele Freq	Read Depths (DP)	Zygosity	Mendel Error
6:152470619	C/G	0.538462	119	Heterozygous	Transmitted
6:152542036	C/G	0.352941	153	Heterozygous	de Novo Allele
6:152555877	C/T	0.47191	90	Heterozygous	Transmitted
6:152784621	T/C	0.482759	58	Heterozygous	Transmitted
6:152786454	C/T	0.421053	152	Heterozygous	de Novo Allele

2. Variants by Variant Genesテーブルでは、フィルタリングの結果抽出された変異に対して、画面左側に遺伝子名、右側に該当する変異をテーブル表示
3. 必要に応じて、複合ヘテロ接合体のHas Compound Het?フィールドや遺伝子ランキングのGene Rankフィールドで表示を並び替え、複合ヘテロ接合体の構成変異や、表現型との関連が高い遺伝子の変異を確認する

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