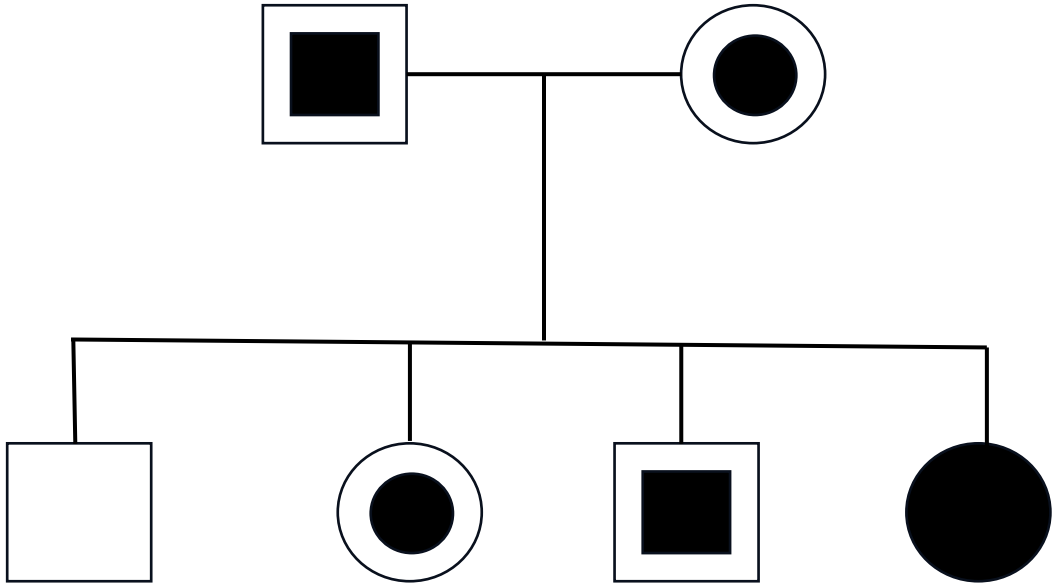
NGSを利用したキャリアスクリーニング

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

- 妊娠前のカップルに対してキャリアスクリーニングを実施することで、子どもの遺伝性疾患の発症リスクを予測することができます。

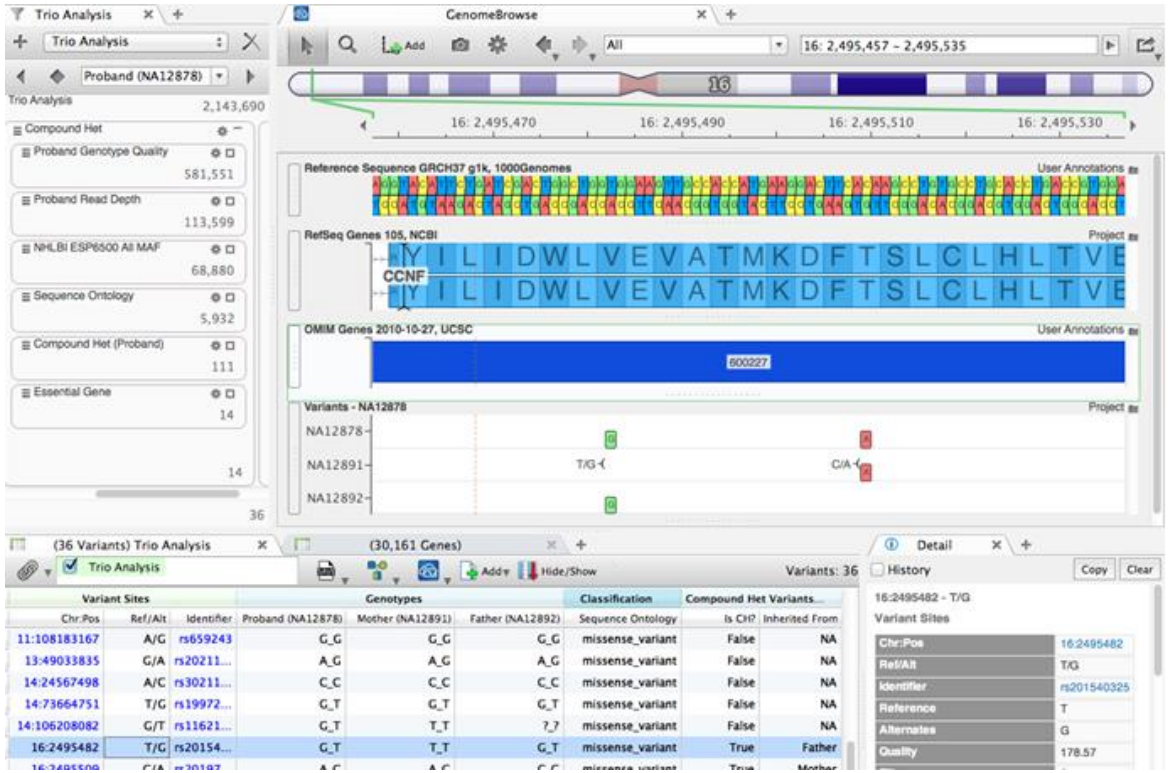
- Golden Helix社VarSeq®ソフトウェアでは、次世代シークエンサーより得られたバリアントデータをもとに、ACMGガイドラインに基づいた遺伝性疾患の病的バリアントの検出とリスク計算、レポート出力を行うことができます。



VarSeq®

Annotation

Variant Filtering



Data Analysis

Genome Browser

■ 様々なデータベースを用いて、バリアントデータ（VCFファイル）へアノテーション付けを実行

- RefSeq Genes
- dbSNP
- ClinVar
- OMIM
- CIViC
- ICGC / TCGA
- MSK Impact
- Orphanet
- BRCA Exchange
- PMKB
- dbNSFP
- REVEL
- CADD
- 1000 Genomes
- NHLBI 6500 Exomes
- ExAC Variant
- gnomAD Exomes/Genomes
- GenomeAsia 100K
- 各種遺伝子パネルのターゲットデータ

...など

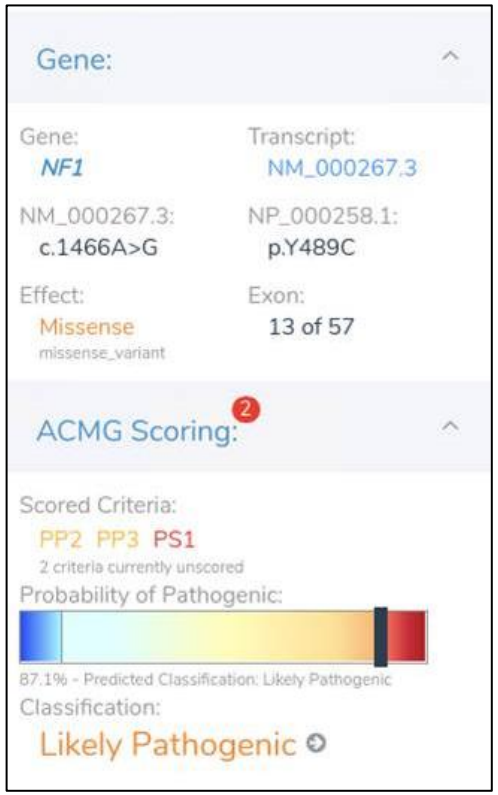
■ アノテーション付けされたバリアントデータより、任意の検索条件でデータのフィルタリングを行うワークフローを作成

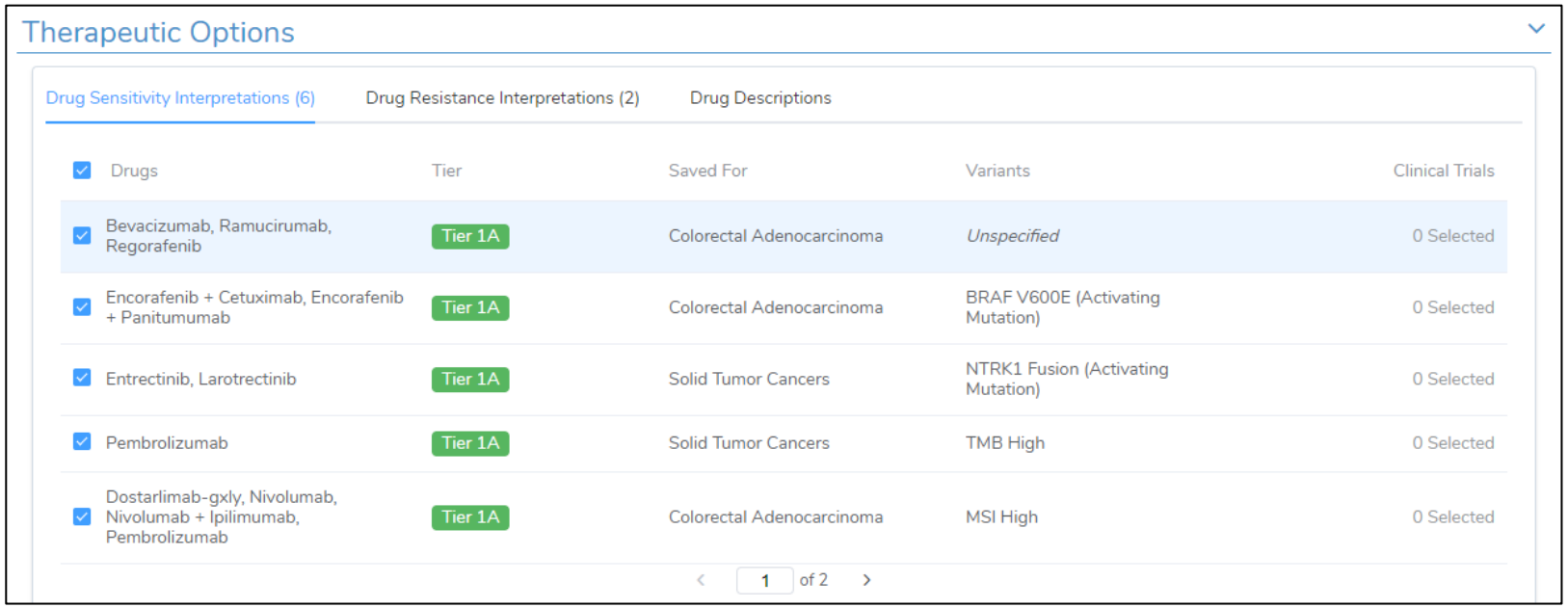
■ カバレッジ計算やトリオ解析、表現型情報に基づく遺伝子ランキングなどの解析アルゴリズムを搭載

■ ゲノムブラウザーにより、サンプルのバリアントデータやリードアライメントデータ（BAM/CRAMファイル）、また各種アノテーションを可視化

■ 有償アドオンによる機能拡張で、CNV検出や臨床的意義の自動評価、パイプライン機能などが利用可能

VSClinical





■ VSClinical ACMG Guideline

- 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

- 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 Guideline

- 各種バイオマーカー（SNV, InDels, CNV, 融合遺伝子, TMB/MSIなど）をAMPガイドラインのエビデンスレベルで分類し、がんの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

データ解析の手順

VCFファイルのインポート

- ✓ 夫婦またはカップルのVCFファイルをインポート

キャリアバリアントの抽出

- ✓ 常染色体劣性、またはX連鎖性疾患の病的バリアントの抽出
- ✓ ACMGキャリアスクリーニングパネル搭載の遺伝子の絞り込み

varSEQ®

バリアントの病原性評価

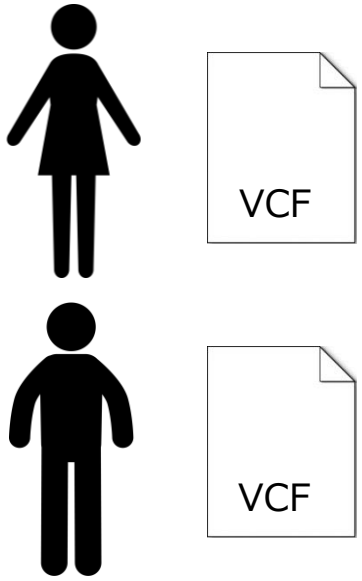
- ✓ ACMGガイドラインに基づいたバリアントの病原性評価

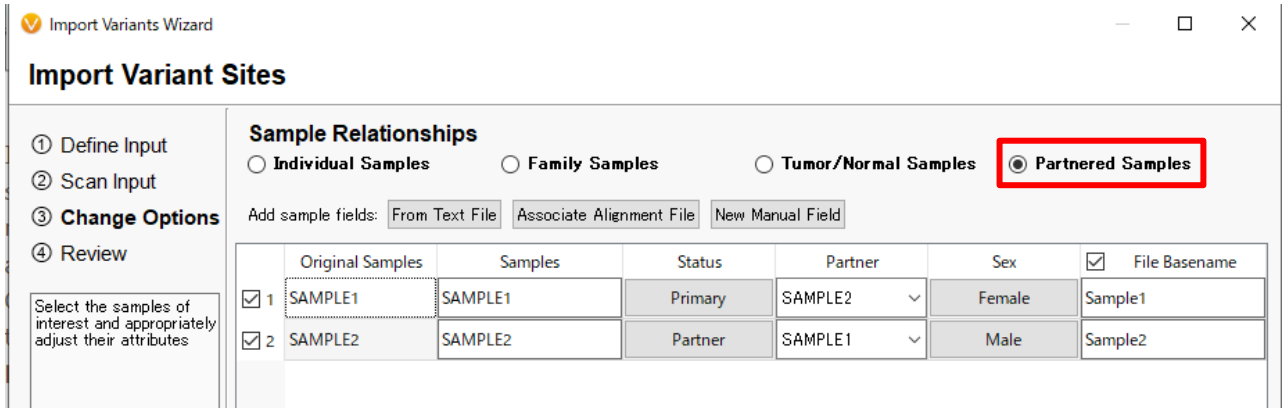
レポート作成

- ✓ サンプル情報、バリアント情報、さらにバリアントと関連する遺伝性疾患の子どもの発症リスクが記載されたレポートを出力

VSClinical®

VCFファイルのインポート





■ それぞれパートナーを指定してVCFファイルをインポート

Variants: 255,021 | Variant Genes: 13,092 | Samples: 2

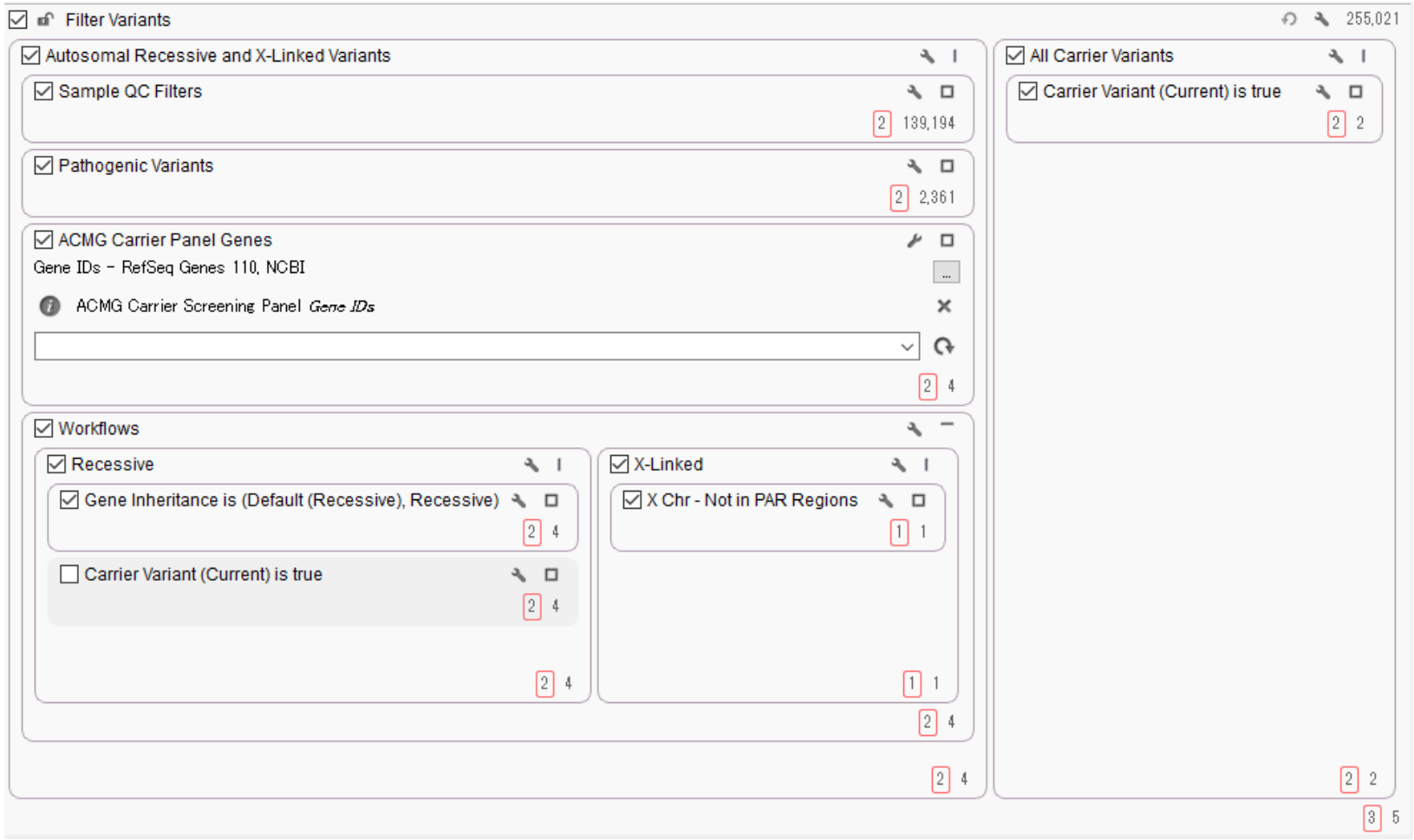
Variants | Filter Variants Input: SAMPLE1

Variant Info			SAMPLE1					Partner (SAMPLE2)				
Chr:Pos	Ref/Alt	Identifier	VAF	AD	GQ	GT	Zygosity	VAF	AD	GQ	GT	Zygosity
1:16487	T/C	?	0.280702	41,16	99	0/1	Heterozygous	?	?,?	?	./.	?
1:16495	G/C	?	0.464286	30,26	99	0/1	Heterozygous	0.48	26,24	99	0/1	Heterozygous
1:16534	C/T	?	0.2	44,11	99	0/1	Heterozygous	?	?,?	?	./.	?
1:16949	A/C	?	?	?,?	?	./.	?	0.305085	41,18	99	0/1	Heterozygous
1:16963	G/A	?	0.101695	53,6	92	0|1	Heterozygous	0.114286	62,8	99	0|1	Heterozygous
1:16977	G/A	?	0.136364	57,9	99	0|1	Heterozygous	0.101449	62,7	99	0|1	Heterozygous
1:17020	G/A	?	0.166667	60,12	99	0/1	Heterozygous	0.202899	55,14	99	0/1	Heterozygous
1:17385	G/A	?	0.287879	47,19	99	0/1	Heterozygous	0.125	63,9	61	0/1	Heterozygous
1:109488	G/A	?	?	?,?	?	./.	?	0.140351	49,8	55	0/1	Heterozygous
1:120983	C/T	?	?	?,?	?	./.	?	0.3	42,18	99	0|1	Heterozygous

キャリアスクリーニング用ワークフロー

■ **Couples Carrier Screening Template**

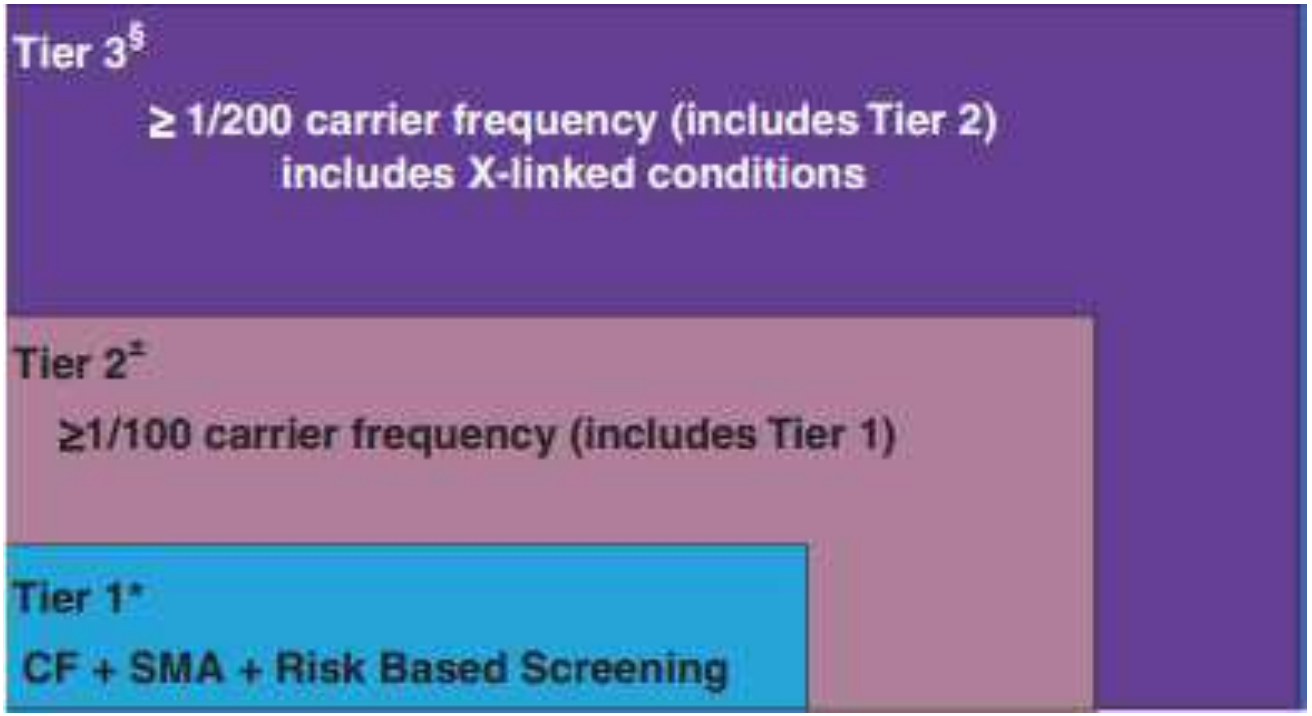
- カップルのサンプルデータを使用して、遺伝性疾患と関連する病的バリアントを絞り込むためのワークフロー
- ACMGキャリアスクリーニングパネル搭載の遺伝子を対象に、ClinVarまたはACMGガイドラインで病的と判定されたバリアントを自動で検出
- 両方のサンプルで病的バリアントが検出された遺伝子の同定も可能



遺伝子パネルの選択

■ **ACMG Carrier Screening Panel**

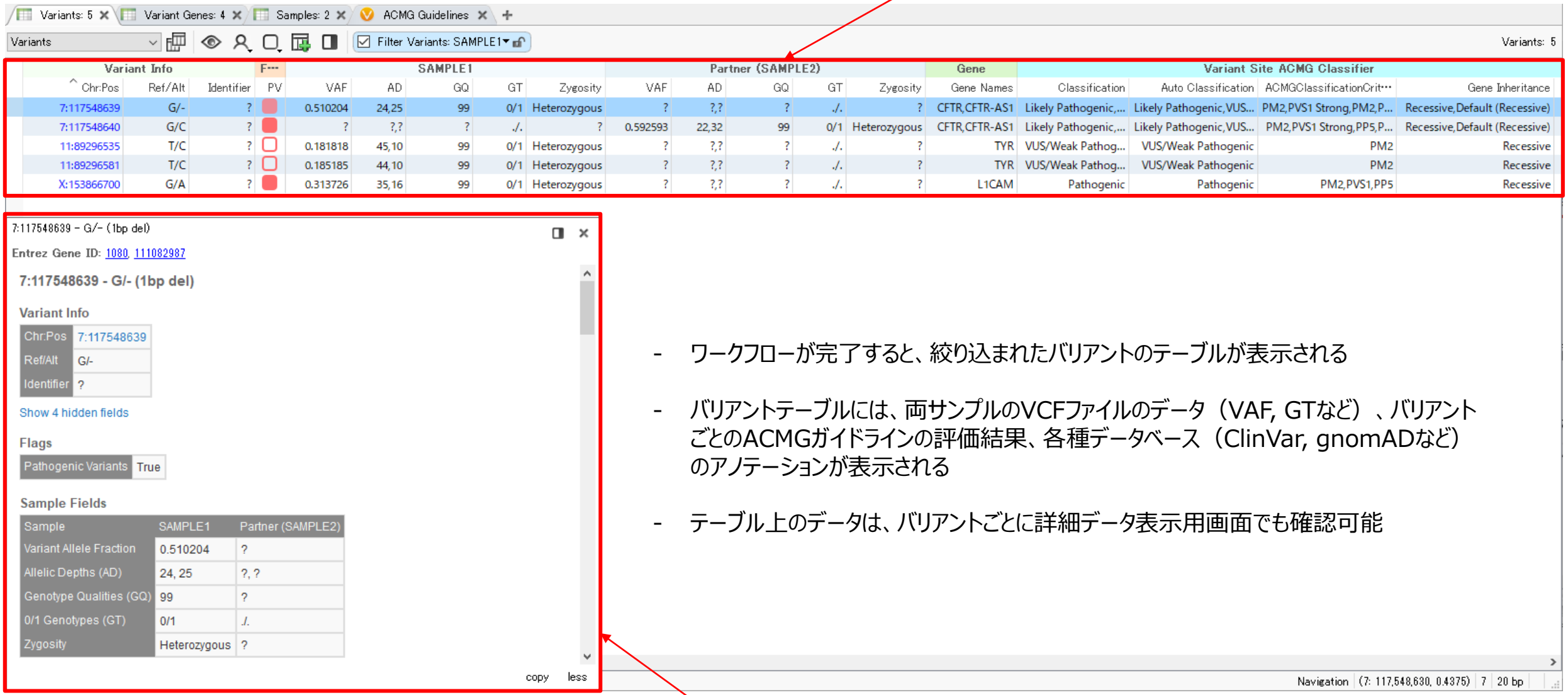
- 米国人類遺伝学会（ACMG）が発表した、人種を問わず使用可能なキャリアスクリーニング用の遺伝子パネル
- ワークフローでは、保因者頻度が1/200以上の常染色体劣性と、有病率が1/40,000以上のX連鎖性遺伝性疾患の原因遺伝子を解析に用いる
- 必要に応じて遺伝子の追加や削除も可能



Gregg, A.R., Aarabi, M., Klugman, S. *et al.* Screening for autosomal recessive and X-linked conditions during pregnancy and preconception: a practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* **23**, 1793–1806 (2021).

ワークフロー実行結果

バリアントテーブル



- ワークフローが完了すると、絞り込まれたバリアントのテーブルが表示される
- バリアントテーブルには、両サンプルのVCFファイルのデータ（VAF, GTなど）、バリアントごとのACMGガイドラインの評価結果、各種データベース（ClinVar, gnomADなど）のアノテーションが表示される
- テーブル上のデータは、バリアントごとに詳細データ表示用画面でも確認可能

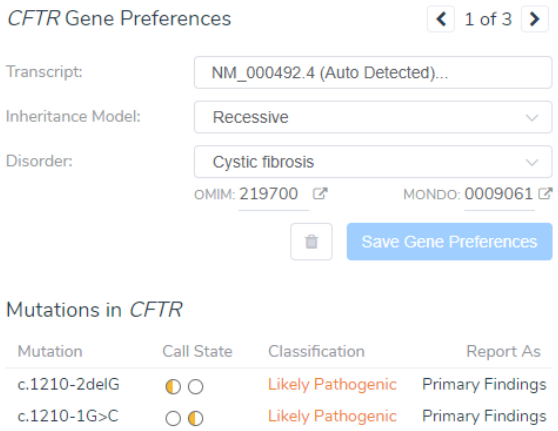
詳細表示用画面

VSClinicalによる解析

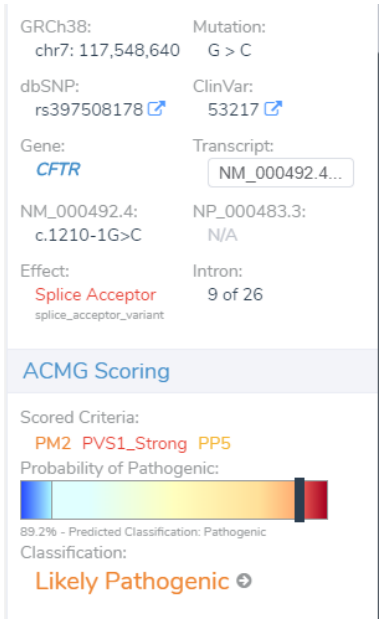
絞り込んだバリアント

VSClinical®

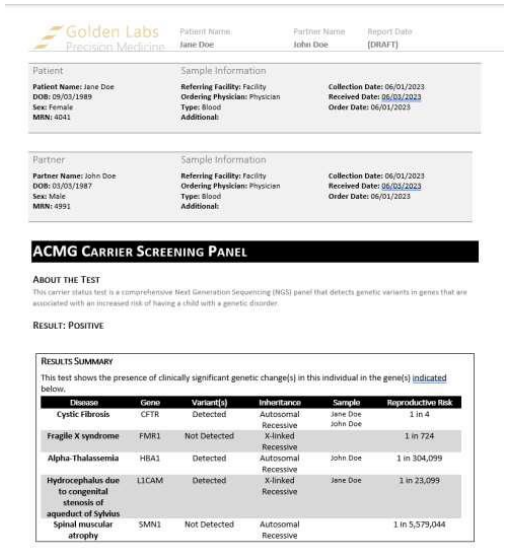
遺伝子／疾患情報の確認



バリアントの病原性評価

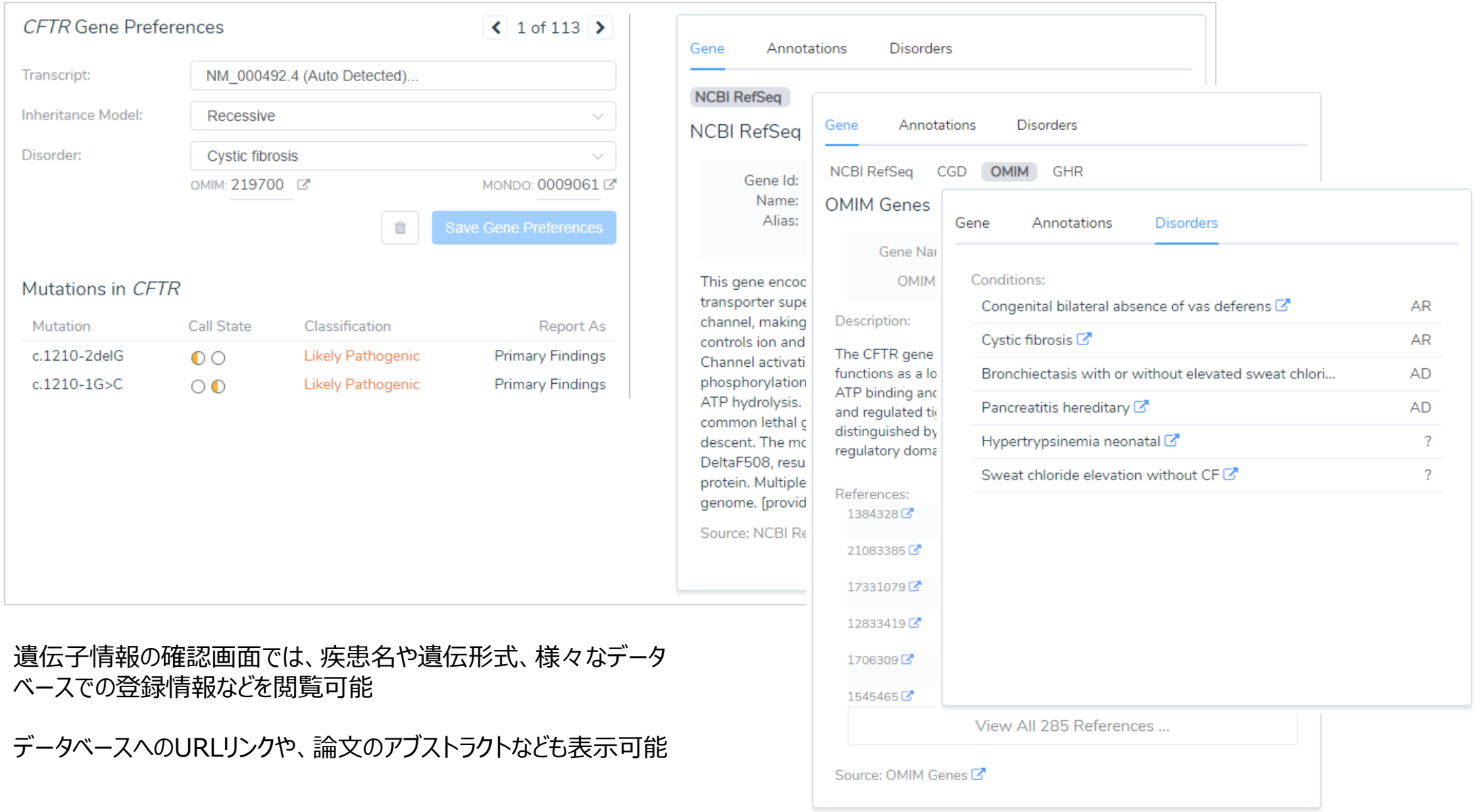


レポート出力



- **VSClinical**
  - バリアントの絞り込みを行った後は、VSClinicalのダッシュボード画面で続きの解析を行う
  - VSClinicalのダッシュボードでは、データベースや論文の内容を確認しながら、評価結果やレポート内容の編集などを行う

遺伝子情報の確認



- 遺伝子情報の確認画面では、疾患名や遺伝形式、様々なデータベースでの登録情報などを閲覧可能

- データベースへのURLリンクや、論文のアブストラクトなども表示可能

バリアントの病原性評価

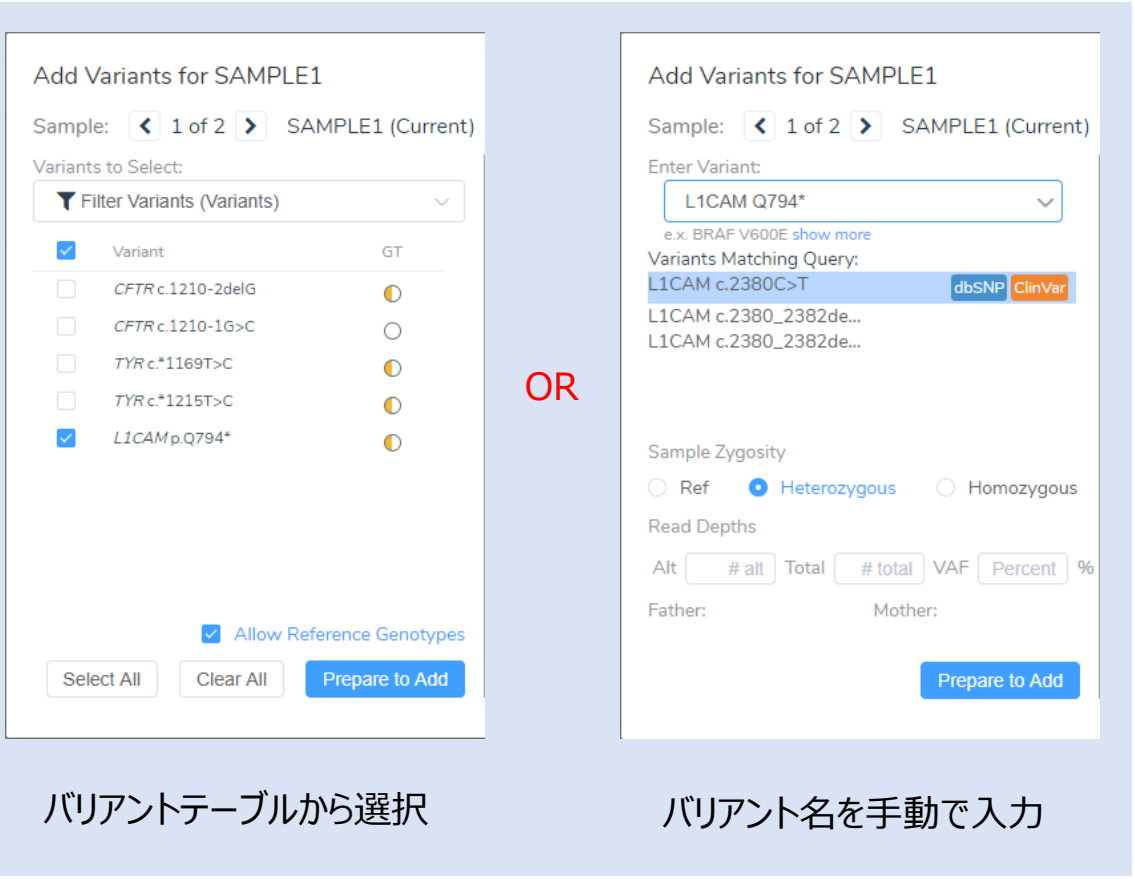
■ **ACMGガイドラインによるバリアントの病原性評価**

- バリアントの一般集団内のアレル頻度、コンピュータによる機能予測、既知の臨床情報などを利用し、バリアントの病原性スコアを自動計算

- VSClinicalのダッシュボードでは、データベースの情報を閲覧しながら、評価結果やスコアなどをユーザーが調節可能

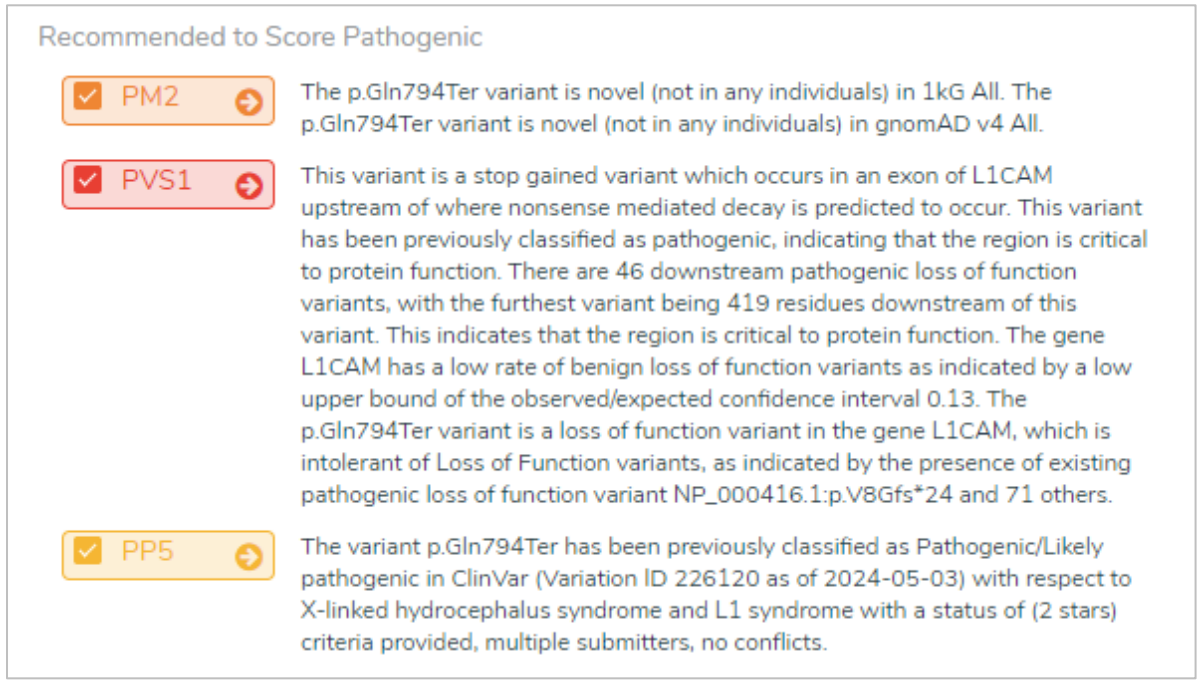
	Benign		Pathogenic			
	Strong	Supporting	Supporting	Moderate	Strong	Very Strong
Population Data	MAF is too high for disorder *BA1/BS1* **OR** observation in controls inconsistent with disease penetrance *BS2*			Absent in population databases *PM2*	Prevalence in affecteds statistically increased over 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*			

評価の開始



バリアントテーブルから選択

バリアント名を手動で入力

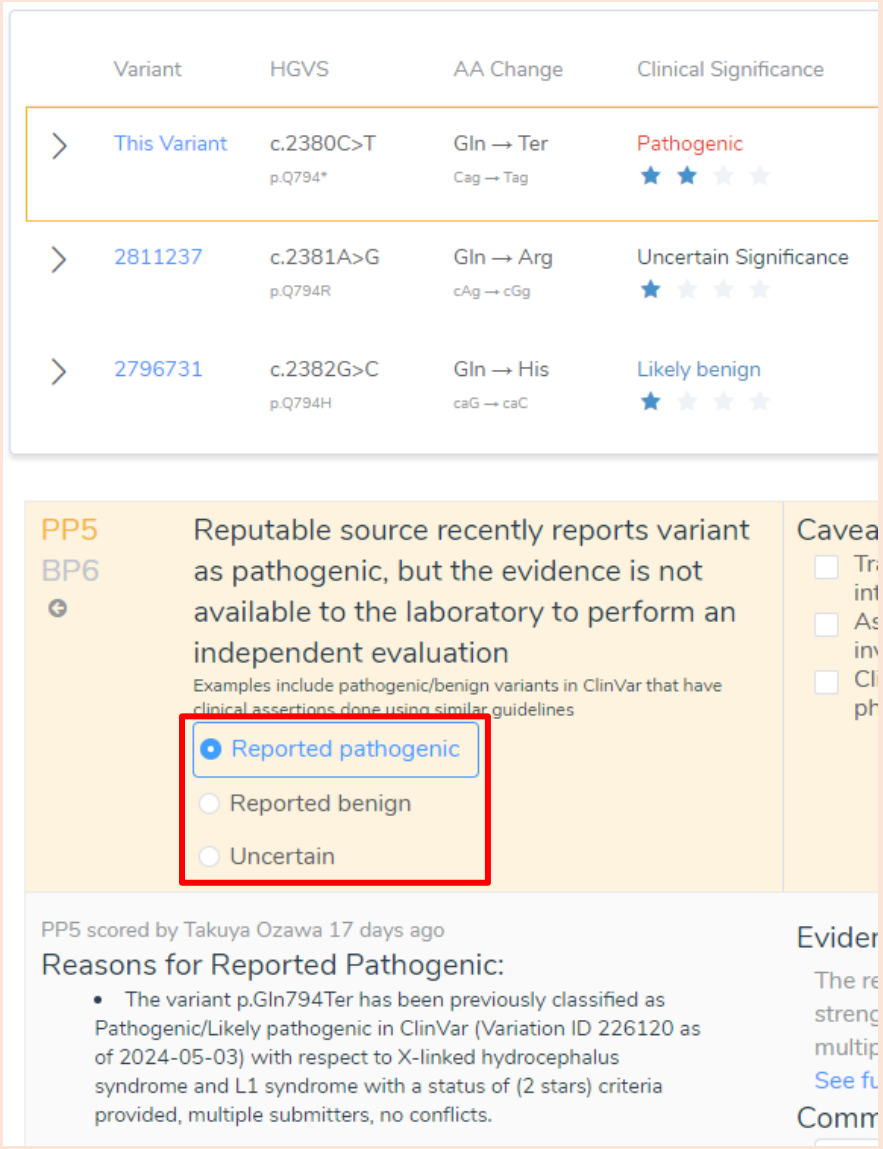


バリアントに該当する評価項目と結果を自動検出

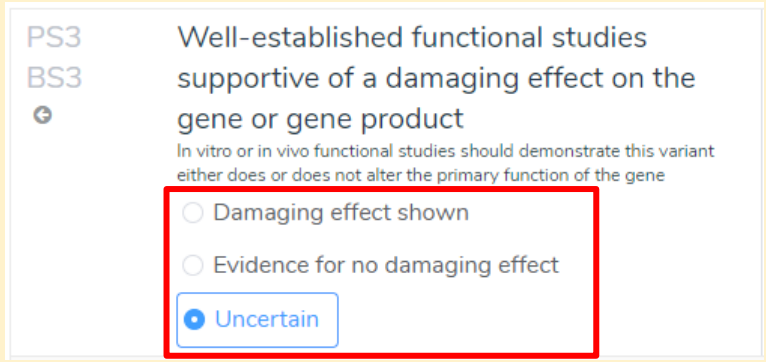
- 評価に用いるバリアントは、VCFファイルよりインポートしたバリアントテーブルより選択するか、キーボードでバリアント名を直接入力することも可能

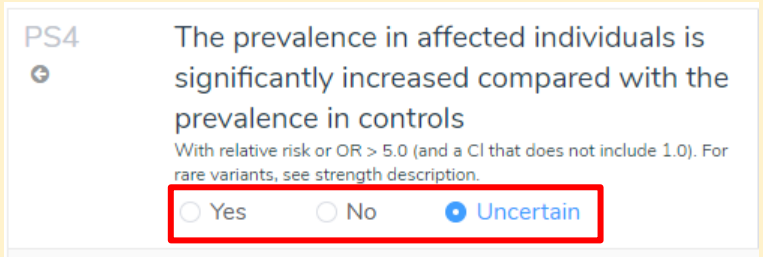
- バリアントを指定すると、該当する評価項目が自動で検出され、評価結果のテキストとともに表示される

評価結果の編集



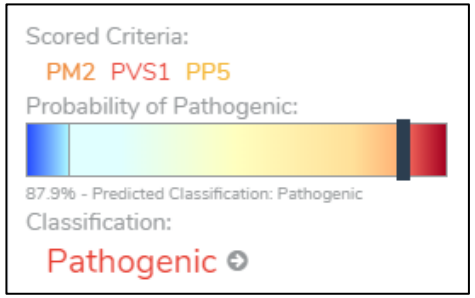
自動評価の結果を編集



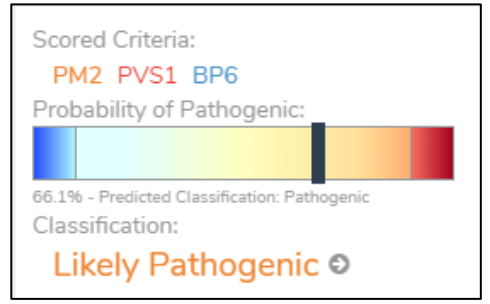


自動検出できない項目の評価結果を追加

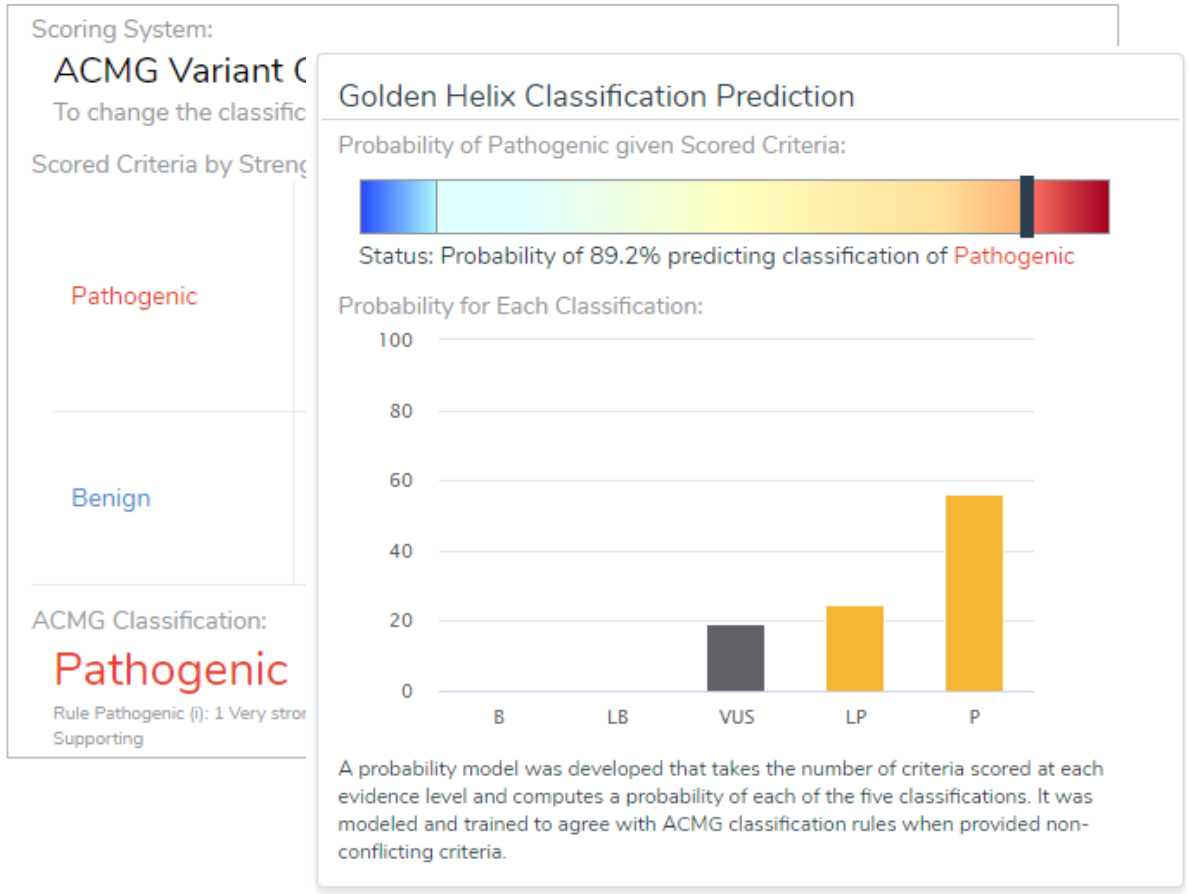
- データベースの引用データの表示画面で、評価結果を手動で編集することができ、その結果病原性スコアが変化する
- ACMGガイドラインの評価項目には、VSClinicalで自動検出できない項目もあり、このような項目は手動で評価結果を追加することが可能



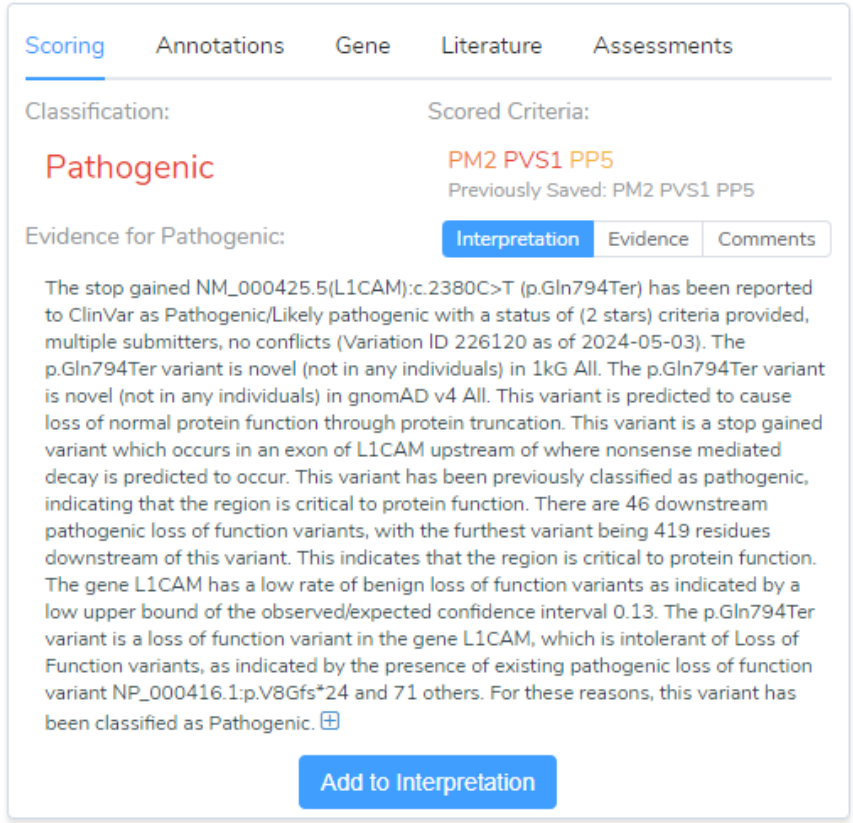
評価結果を編集



病原性スコアと臨床的解釈



評価結果サマリー



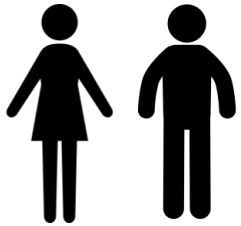
レポート用テキスト

- 評価結果の編集の完了後、各項目が病原性の可能性を示唆するスコアや良性の可能性を示唆するスコア、最終的な判定結果をまとめたサマリーを表示

- 同時にレポートに記載される臨床的解釈のテキストも出力

レポート出力手順

サンプル情報の入力



✓ カップルそれぞれのサンプル詳細情報（名前、性別など）を入力

AND

バリアント情報の入力

1. 評価するバリアントの指定
2. バリアントの評価の実行
3. バリアントごとのレポート上の記載を指定
（Primary Findings, Secondary Findings, VUSなど）

レポートテンプレートの選択

✓ 遺伝性疾患
✓ キャリアスクリーニング
✓ がん遺伝子パネル　…など

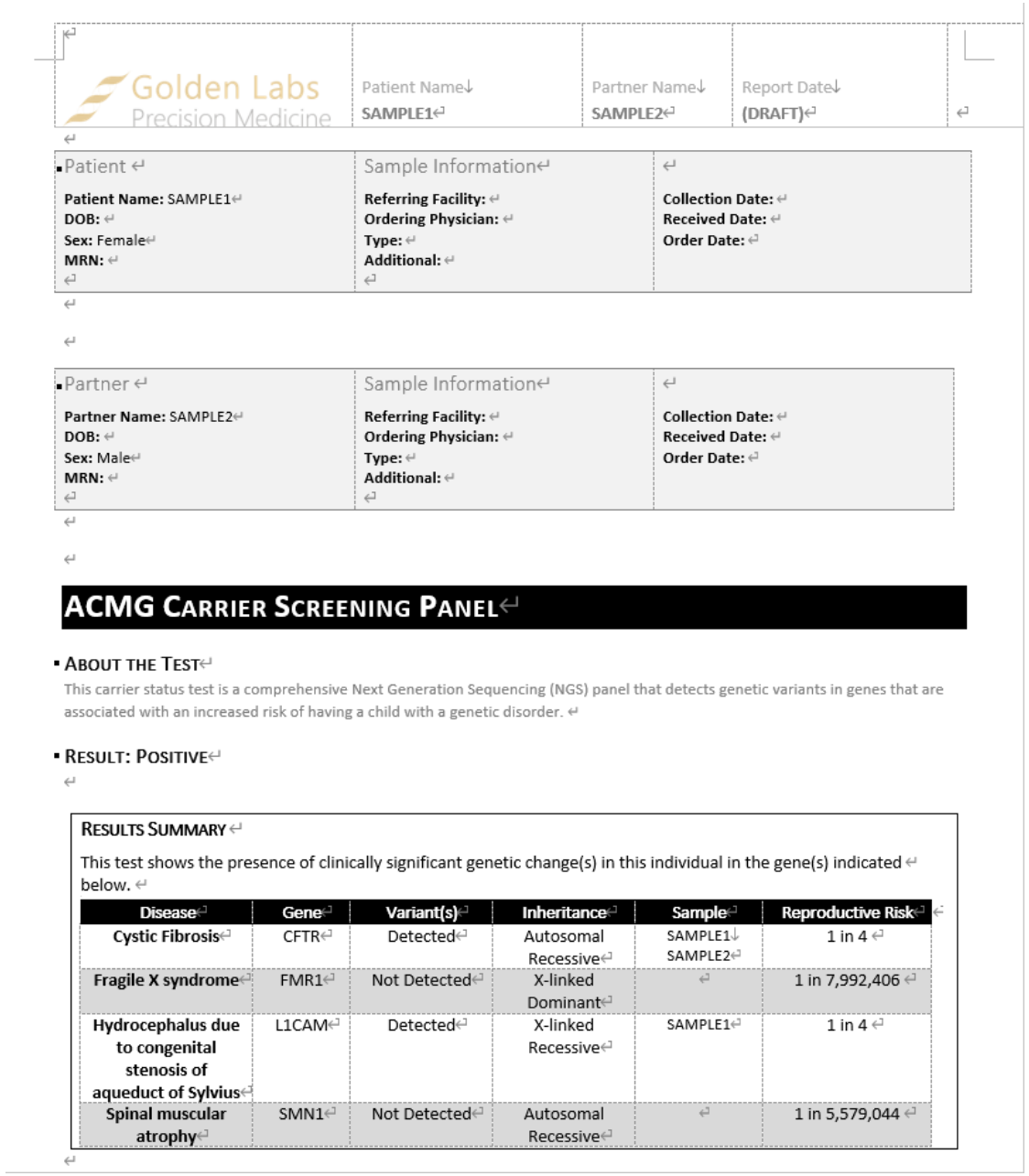
✓ Word
✓ PDF
✓ JSON

- VSClinicalにて、サンプル情報の入力とバリアントの評価を行い、レポートテンプレートを選択すれば、レポートが自動で作成される
- サンプルやバリアント情報を変更して、レポートを出力し直すことも可能

キャリアスクリーニング用レポートテンプレート

■ **Carrier Screening Report Template**

- **マルチサンプルに対応：**サンプル別にサンプル詳細情報と、検出されたバリアントをレポートに記載
- **疾患のリスク計算：**バリアントが検出された遺伝子と対応する疾患の生殖リスクを計算
- **バリアント情報：**検出されたバリアントのACMGガイドラインによる評価結果と臨床的解釈をレポート出力
- **疾患の詳細情報：**OMIMに登録されている疾患情報をレポート出力



Golden Labs Precision Medicine

Patient Name	Partner Name	Report Date
SAMPLE1	SAMPLE2	(DRAFT)

Patient

Patient Name: SAMPLE1
DOB:
Sex: Female
MRN:

Sample Information

Referring Facility:
Ordering Physician:
Type:
Additional:

Collection Date:
Received Date:
Order Date:

Partner

Partner Name: SAMPLE2
DOB:
Sex: Male
MRN:

Sample Information

Referring Facility:
Ordering Physician:
Type:
Additional:

Collection Date:
Received Date:
Order Date:

ACMG Carrier Screening Panel

About the Test

This carrier status test is a comprehensive Next Generation Sequencing (NGS) panel that detects genetic variants in genes that are associated with an increased risk of having a child with a genetic disorder.

Result: Positive

Results Summary

This test shows the presence of clinically significant genetic change(s) in this individual in the gene(s) indicated below.

Disease	Gene	Variant(s)	Inheritance	Sample	Reproductive Risk
Cystic Fibrosis	CFTR	Detected	Autosomal Recessive	SAMPLE1 SAMPLE2	1 in 4
Fragile X syndrome	FMR1	Not Detected	X-linked Dominant		1 in 7,992,406
Hydrocephalus due to congenital stenosis of aqueduct of Sylvius	L1CAM	Detected	X-linked Recessive	SAMPLE1	1 in 4
Spinal muscular atrophy	SMN1	Not Detected	Autosomal Recessive		1 in 5,579,044

生殖リスクの計算

RESULTS SUMMARY

This test shows the presence of clinically significant genetic change(s) in this individual in the gene(s) indicated below.

Disease	Gene	Variant(s)	Inheritance	Sample	Reproductive Risk
Cystic Fibrosis	CFTR	Detected	Autosomal Recessive	SAMPLE1↓ SAMPLE2	1 in 4
Fragile X syndrome	FMR1	Not Detected	X-linked Dominant		1 in 7,992,406
Hydrocephalus due to congenital stenosis of aqueduct of Sylvius	L1CAM	Detected	X-linked Recessive	SAMPLE1	1 in 4
Spinal muscular atrophy	SMN1	Not Detected	Autosomal Recessive		1 in 5,579,044

解析結果サマリー

DISEASE	GENE	ETHNICITY	CARRIER FREQUENCY	CARRIER REPRODUCTIVE RISK
Surfactant metabolism dysfunction, pulmonary 3	ABCA3	General	1 in 116	1 in 21,178,404
Stargardt Disease, Type 1	ABCA4	General	1 in 20	1 in 580,644
Diabetes mellitus, permanent neonatal 3	ABCC8	General	1 in 82	1 in 10,510,564
Adrenoleukodystrophy	ABCD1	General	1 in 15,000	1 in 1,199,924
Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency	ACADM	General	1 in 60	1 in 5,579,044
Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency	ACADVL	General	1 in 156	1 in 38,464,804
α-Methylacetoacetic aciduria	ACAT1	General	1 in 200	1 in 633,933,769

全疾患のリスク計算の一覧

- 解析結果サマリーには、バリアントが検出された遺伝子と疾患名、および疾患の生殖リスクが記載される
- 嚢胞性線維症、脆弱Ｘ症候群、脊髄性筋萎縮症は、遺伝子にバリアントが検出されなかった場合でもNegative findingsとして記載される
- バリアントが検出されなかった場合の残留リスクは、各疾患の保因者頻度と検出率をもとに、ベイズの定理で計算される
- バリアントが検出されなかったすべての遺伝子は、疾患名と保因者頻度、残留リスクの一覧表が、補足データとしてレポートに記載される

その他のレポート出力項目

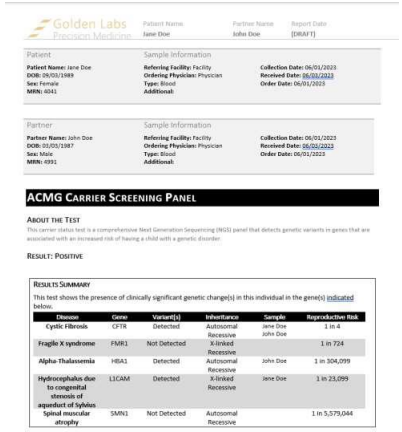
Patient Variant Summary

Variants of Clinical Significance

Gene & Transcript	Variant	Criteria	Classification
CFTR NM_000492.4	c.1210-2delG	PM2, PVS1_Strong	Likely pathogenic
Location	**Allele State**	**1kG All (Novel) Allele Frequency**	
Intron 9	Heterozygous	Novel	
Genomic Position		**NGS Reads Supporting Change**	
g.117548639delG		51.02% (25 of 49)	

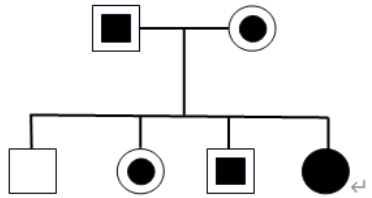
Variant Interpretation: The splice acceptor variant NM_000492.4(CFTR):c.1210-2delG has not been reported previously as a pathogenic variant nor as a benign variant, to our knowledge. The c.1210-2delG variant is novel (not in any individuals) in 1kG All. The c.1210-2delG variant is novel (not in any individuals) in gnomAD_v4 All. This variant mutates a splice-acceptor sequence, but is predicted to preserve the reading frame, resulting in in-frame exon skipping. This variant results in the loss of an acceptor splice site for the clinically relevant transcript. There are 9 pathogenic variants in the same region as the variant c.1210-2delG, indicating that the region is critical to protein function. The c.1210-2delG variant is a loss of function variant in the gene CFTR, which is intolerant of Loss of Function variants, as indicated by the presence of existing pathogenic loss of function variant NP_000483.3:p.M1Sfs*39 and 701 others. For these reasons, this variant has been classified as Likely Pathogenic.

バリアント情報



- レポートにはバリアントの詳細データや評価結果の情報、疾患の詳細説明などが自動で書き込まれる

Autosomal Recessive Inheritance



What is Spinal muscular atrophy?

A rare, genetic, neuromuscular disease characterized by proximal muscle weakness with an early involvement of foot and hand muscles following normal motor development in early childhood, a rapidly progressive disease course leading to generalized areflexic tetraplegia with contractures, severe scoliosis, hyperlordosis, and progressive respiratory insufficiency leading to assisted ventilation. Cranial nerve functions are normal and tongue wasting and fasciculations are absent. Milder phenotype with a moderate generalized weakness and slower disease progress was reported.

疾患情報

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