

日本人類遺伝学会・日本遺伝カウンセリング学会・日本遺伝子診療学会

希少疾患分野における次世代シーケンサーを使用した  
網羅的遺伝子解析のバリエーション解釈に係るガイダンス

2023 年 10 月 5 日 第 1.0 版

## 目次

1. 本ガイドンスについて.....	3
2. 次世代シーケンサーを使用した検査に関する留意事項.....	4
2.1. 次世代シーケンサーを使用した検査システムの流れと主な管理の考え方.....	4
2.2. 臨床検査室における精度管理.....	5
2.3. 臨床的意義付け(解釈)のためのデータベース(知識ベース)の選択.....	5
2.4. 報告書作成について.....	5
2.5. スタッフの教育.....	6
2.6. ハードウェア・ソフトウェアの取扱い.....	6
2.7. データ蓄積とシェアリング.....	6
3. 希少疾患における生殖細胞系列バリエントの解釈に関わるガイドンス.....	7
3.1. 臨床的解釈の妥当性.....	7
3.2. 臨床的解釈のプロトコル構築.....	7
3.3. 臨床的解釈の実施者について.....	7
3.4. 臨床的解釈の実施.....	8
3.4.1. 解釈に有用なデータベースの選定.....	8
3.4.2. 変異予測プログラムの利活用.....	8
3.4.3. バリエント頻度と対照集団の使用.....	9
3.4.4. 新規検出バリエントの種類ごとの具体的な評価手法.....	9
3.4.5. 家系図からの検討.....	12
3.4.6. 臨床的解釈の最終決定.....	12
3.5. 遺伝学的検査の結果報告書の記載内容発行.....	13

## 1. 本ガイドンスについて

次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析の臨床への実装が着実に進んでいる。希少疾患分野においては、これまで診断のつかなかった患者に対して、疾患原因である病原性バリエントを特定することが可能となりつつある。がんゲノム分野では、包括的ゲノムプロファイリング検査による多数の遺伝子の情報に基づき、高い治療効果を期待できる治療法を選択する診療が実現していることを踏まえると、今後は希少疾患分野においても、次世代シーケンサーを用いた検査法が臨床実装され、Personalized Medicine, Precision Medicine の時代が到来することに疑いはない。未診断疾患あるいは診断困難な希少疾患と考えられる患者に対する網羅的遺伝子解析は、疾患の確定診断のための検査として将来的に中心的な位置づけを占めると考えられる。

がんゲノム分野においてはゲノム解析の主たる目的は治療に有効な抗がん剤の選択にある。現在はがん遺伝子パネルを用いた解析が主流であり、2019年より保険収載されたがんゲノムプロファイリング検査(がん遺伝子パネル検査)では、治療反応性と関連がある可能性のある数百の遺伝子について高深度で読みだしバリエントを検出する。その結果に対し、さまざまな専門家が集まり、臨床上どのような意味を持つかを解釈するエキスパートパネル会議を行い、治療法や有用な抗がん剤の選択が行われる。臨床的意義付けを行うにあたり、各遺伝子バリエントの治療反応性のエビデンスをまとめるだけではなく、臨床試験情報、薬事承認情報等の情報の提示も重要である。一方、希少疾患分野においてはゲノム解析の目的は疾患の確定診断にある。患者から検出される多数の生殖細胞系列バリエントから疾患を惹起する1つないし2つのバリエントに絞り込むことが求められる。比較的頻度の高い疾患についても新規疾患原因遺伝子が次々と同定されるため、さらには希少疾患分野では患者ごとに複雑な表現型を呈する場合が多く、限られた遺伝子を標的としたパネル解析が最適とは言えない場合も多いため、特定のパネル検査を使用する方法よりも、全遺伝子・全ゲノムを網羅的にスクリーニングする方法が世界的な潮流である。解析の結果、患者の疾患原因の候補として多数のバリエントが示されるが、最終的な原因を決める際には患者の臨床症状と一致するかを十分に検討しなければならない。

上述のように、希少疾患におけるバリエントの解析に際して、全ゲノムないしエクソームを対象とする網羅的手法の場合には、診断に際し探索的な要素も含むことから、その結果の臨床的意義付けにおいて希少疾患のゲノム解析に最適化された配慮を要する。希少疾患のバリエントの「臨床的意義付け」において必要とされるプロセスについて多角的立場から検討を行い、希少疾患分野の医療現場において質が担保された網羅的遺伝子解析を運用する際の推奨事項として、本ガイドンスを取りまとめた。また、次世代シーケンサーによる解析が従前の検査と異なる発展中の新規技術であること、さらなるバリエントデータの蓄積に際して一定の質の担保が重要と考えられることから、本ガイドンスにおいては精度保証に向けて推奨される事項についても記載している。

最新の検査技術を臨床へ実装するにあたり、患者の利益が最大限となるよう本ガイドンスを活用し、希少疾患を対象とする網羅的遺伝子解析による医療の質を保証することが望まれる。なお、遺伝学的検査においては日本医学会「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライ

ン」(2022年3月改定)が、さらに検査の実施において医療法等に示された検査の品質・精度の基準を確保するには、「難病領域の診療における遺伝学的検査の指針」(2021年3月31日)等を踏まえることが必要となる。

## 2. 次世代シーケンサーを使用した検査に関する留意事項

### 2.1. 次世代シーケンサーを使用した検査システムの流れと主な管理の考え方

さまざまな学会・研究会等が次世代シーケンサーを使用した検査の精度管理について言及している。次世代シーケンサーを使用する検査は、①各種サンプル(血液、唾液等)から DNA を抽出する工程、②さまざまなキットを用いて DNA から全ゲノム領域・エクソーム領域・ターゲットとする領域などを濃縮し、次世代シーケンサーに対応するライブラリを作成する工程、③次世代シーケンサーを用いてデータ(fastq ファイル)を作成する工程、④データ(fastq ファイル)をヒトゲノムの参照配列にマッピングし、バリエーションを検出しリスト(vcf ファイル)を作成する *in silico* の工程、⑤得られたバリエーション群にさまざまな情報を付与(アノテーション)し、結果を解釈する工程の5つに分類される。①の DNA を抽出する工程に関しては従来の遺伝学的検査と同様の扱いが求められるため、日本臨床検査標準協議会の遺伝子関連検査検体品質管理マニュアル等を参照されたい。②のライブラリの作成における工程では、各種機器を製造するメーカーによりライブラリ作成におけるチェックポイントで検体のクオリティチェックが求められるため、マニュアルに従い確認を行う。③次世代シーケンサーの定期的なメンテナンスについては各機器のマニュアルに従った保守点検を実施する。④のデータから解釈可能な vcf ファイルを得るまでには、さまざまなツールが利用される。パイプラインの一例として Broad Institute が提唱する GATK (Genome Analysis ToolKit) Best practice 等が知られているが、これに限るものではない。さまざまな解析ソフト、ツールを用いることが可能だが、解析の際に使用したソフト名、バージョン等の管理が推奨される。⑤のアノテーションおよび結果の解釈については各論で記載する。

遺伝学的検査に使用する次世代シーケンサーについては、ヒトゲノム標準試料(例えば、ヒト標準試料の HG001 (NA12878))を使用した解析等によりターゲットとなる遺伝子領域の 95%以上においてカバレッジが確保されていることが望ましい。求められる深度については検査手法や目的により異なってくるため、適切な深度が確保されるように設計されていることの確認が推奨される。このヒトゲノム標準試料 DNA は米国のバイオバンク (Coriell Institute) より入手可能である。

一般に次世代シーケンサーを用いたバリエーションコールは、得られたリードをヒトの参照ゲノムにマッピングする、すなわち「リシーケンス」アプローチで行われる。バリエーションコールにおけるエラーはベースコールとマッピングの両方の過程で起こりうる点に留意する必要がある。ベースコーリングの精度については Phred スコアが広く使われ、低品質のリードを除外することが可能である。マッピングの精度については、タンデムリピート、ホモポリマー、その他の低複雑性領域 (LCR)、偽遺伝子の存在などにより精度が下がる場合がある。既存の Mapping Quality Score で定量的に評価されるが、マッピングに使用する局所のヒト参照ゲノム配列とリードの品質の両方に依存する。従来、ゲノム参照配列上の特定の塩基の難読性の評価は困難であったが、公開され

ている 10 万を超える同型次世代シーケンサーを用いた蓄積データの機械学習の結果から、対象ゲノム解析領域に次世代シーケンサーでの難読領域が含まれているかどうかの評価が可能となっている。患者の疾患発症原因の候補遺伝子領域の中に難読領域が含まれる場合には、バリエーションが真に存在するかどうか、別の方法でのバリエーションの確認作業などの慎重な検討が必要である。

## 2.2. 臨床検査室における精度管理

遺伝学的検査を行う検査室には、機器の保守管理、コンタミネーションの防止など高度な管理が求められる。標準操作手順書、作業日誌等の整備が必要である。次世代シーケンサーの精度管理として、各機器のマニュアルに従い、保守管理を定期的に行う。次世代シーケンサーからの出力データは、適切なクオリティコントロール(QC)を実施し、具体的には塩基の平均クオリティスコアや Q30 のスコアを有する塩基の割合の確認、ターゲット領域が一定の読み深度が得られているかの確認、クオリティの低いリードのフィルタリング、重複(デュプリケート)リードの割合の確認、必要に応じてリードに含まれるアダプター配列の除去(トリミング)、等を実施し、一定水準の品質を満たしているかを随時確認する。さらに、配列既知のヒトゲノム標準試料を用いて自施設の次世代シーケンシング系の内部精度管理を定期的に行うことが推奨される。具体例として、国際的に広く使われるヒト標準試料(HG001 等)について信頼性の高い既知のバリエーションリストが Genome In A Bottle(GIAB, <https://www.nist.gov/programs-projects/genome-bottle>) データベースに登録されているので、自施設で同一バリエーションが検出できているかの確認を定期的に行う確認する、という方法が挙げられる。すなわち、検出されるべきバリエーションが正しく検出されているかを Recall、Precision、F1 値などを用いて、その品質を検証することが推奨される。外部精度管理調査を通じて、自施設の検査の質を把握しておくことが望まれる。

## 2.3. 臨床的意義付け(解釈)のためのデータベース(知識ベース)の選択

希少疾患分野の場合には、データベース上で類似する臨床症状を示すことが報告されているバリエーションを探るか、または逆に臨床症状を示さない一般的な健常者のデータベースを探す。がんの場合は特定のバリエーションと治療効果との関連が知られている情報を探す目的でデータベースを利用するケースが多いが、希少疾患分野においてはデータベースの使用目的が異なる部分が多い。数多くのバリエーション・変異情報が収録された信頼できるデータベースの利用が非常に有用であり、日々データが蓄積し更新されていく点はがん分野と希少疾患分野で共通である。代表的な有用データベースとして、海外では ClinVar や OMIM、gnomAD など、国内では MGenD や jMorp などが挙げられる。

## 2.4. 報告書作成について

遺伝学的検査においては、検査の依頼から結果の活用まで複数名の関係する専門家(臨床遺伝専門医、認定遺伝カウンセラー等のメディカルスタッフ、バイオインフォマティシャン、等)が存在

する。報告書の作成においては、いずれの医療関係者にも理解可能な内容と特定の専門家にのみ有意義な内容に区分し、記載する。また、希少疾患分野に通暁し、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析について技術的な知識を有する医師が報告書作成のプロセスに関与することが推奨される。

遺伝学的検査のみでは、臨床的に有用な情報が得られないこともある。主治医は報告書の内容と患者の病像・臨床像に矛盾がないことを必ず確認することが求められる。必要時には専門家の判断を仰ぐことも重要である。

とくに慎重な対応を要する事項として、病原性かどうか判定不能なバリエーション (variant of uncertain significance: VUS) がある。バリエーションの病原性を過剰に高く判断することは患者に不安を与えることにつながるため、十分な科学的合理性が認められるか慎重に判断することが推奨される。

## 2.5. スタッフの教育

網羅的遺伝子解析は急速な発展を遂げつつある分野であるため、解析に関わるすべてのスタッフに対して定期的な教育を行い最新の知見を提供することが推奨される。

## 2.6. ハードウェア・ソフトウェアの取扱い

網羅的遺伝子解析は、コンピュータのハードウェア・ソフトウェアの使用を前提としている。ハードウェア・ソフトウェアともに日々急速な進歩を遂げており、陳旧化した機器、ソフトウェアのバージョンを固定して使うことは患者の恩恵とはならない。参照するソフトウェアやデータベースはできるだけ最新のバージョンにアップデートしておくことが望ましい。上記のヒト標準試料や信頼性の高い既知のバリエーションリスト、コントロールデータの使用、施設間の双方向バリデーション等の内部精度管理・外部精度管理などの方法を用いて、ハードウェア・ソフトウェアの質の保証を行うことが推奨される。

## 2.7. データ蓄積とシェアリング

検査の普及により膨大なゲノム解析データとそれに付随する臨床情報が生み出される。これらの実臨床データは将来的な診断、治療のエビデンスのもととなるものであり、広く収集し、適切な倫理的手続きを経て、蓄積・共有していくことが望ましい。解釈結果はエビデンスの蓄積により変化するものであることに留意されたい。

### 3. 希少疾患における生殖細胞系列バリエントの解釈に関わるガイダンス

未診断疾患あるいは診断困難な希少疾患と考えられる患者に対する確定診断に向けて実施される網羅的遺伝子解析は、現在のところ多くは研究ベースで行われているが、医療実装も検討されている。網羅的遺伝子解析では参照配列とは異なるアレルをもつバリエントが多数検出され、その解釈にはデータベースによるフィルタリングが必須である。一般集団を対照データとした頻度情報によるフィルタリングの他、疾患特異的データベースを活用することで診断効率および精度の向上が見込まれる。本ガイダンスは、未診断や診断困難希少疾患に対して網羅的遺伝子解析を行った際にどのような解釈がなされるべきか、またその際に利用可能な質の高いデータベースはどのようなものであるべきかについて記載したものである。

#### 3.1. 臨床的解釈の妥当性

未診断疾患や診断困難希少疾患の患者における次世代シーケンサーを使用した網羅的遺伝子解析は、検出される多くのバリエントから真に疾患の原因となるバリエントを特定し、診断に結びつけることを目的として実施される。希少疾患では多数の新規のバリエントを評価することが必要だが、新規バリエントの情報は不足しておりエビデンスに基づく評価や解釈はきわめて困難である。

2015年に日本人のバリエントデータベースとして Integrative Japanese Genome Variation Database (iJGVD) が公開され、現在は Japanese Multi Omics Reference Panel (jMorp) として更新されている。対照データとして利用可能となり、解析精度が飛躍的に向上した。一方で、不完全浸透のため家族歴と完全に一致しない病原性バリエントや同一バリエントでも多彩な表現型を呈するバリエントも数多く発見されており、画一的な解釈は困難である。検出されたバリエントが病原性であるかどうかを判断するためには過去の論文報告や ClinVar の報告情報等が有用である。

#### 3.2. 臨床的解釈のプロトコル構築

診断のために必要となる臨床的解釈をどのようなプロセスをもとに行うかについて定めたプロトコルを作成・共有し、標準化する必要がある。最終的に発行される報告書は、主治医が正しく理解できるように明確に記載することが推奨される。また検査担当者側も検査依頼する主治医に対して予め結果報告の範囲および報告書に記載する項目を明示しなければならない。

#### 3.3. 臨床的解釈の実施者について

臨床的解釈を行う際のエビデンスとなる、既報の論文、あるいはそれらのデータを収載した「疾患ゲノムデータベース」の整備が国内外、公的あるいは商用ベースで進められている。「疾患ゲノムデータベース」とは、バリエントと臨床診断(病名)に関する情報を整理したデータベースである。臨床的解釈の実施者はこれらのデータベースを活用し、結論を導くことができる難病領域のゲノム解析の研修と診療・研究の経験を有する臨床遺伝専門医であることが求められる。最新の各情報リソースの性質や限界をよく理解したうえで、適切な情報を利用し、バリエントについて適切

に臨床的解釈を行うとともに、バリエントの病原性を過剰に高く評価しないように注意を払う必要がある。

### 3.4. 臨床的解釈の実施

#### 3.4.1. 解釈に有用なデータベースの選定

バリエントの臨床的解釈には、主に疾患(病名)とバリエントを結びつける「疾患ゲノムデータベース」と臨床所見がない人のバリエントおよびその頻度情報を集積した「一般集団データベース」が使用される。「疾患ゲノムデータベース」については、臨床的解釈に係る信頼性の高いデータベースを使用することが推奨され、下記の項目が明確に記載された標準操作手順書(SOP)が存在するデータベースを使用することが推奨される。

##### ① データベースの運用体制

データベースの運用体制として SOP が公開されていることが必要である。バリエント情報が変更されることも含まれるため、データ登録日、更新日を記録していることが必要である。

##### ② セキュリティの確保

データベースの全体的な安定性および構築には、データの関連付けを確実に維持する必要がある。全ての日本の関係法令(保護された健康情報、患者プライバシー、データセキュリティに関する改正個人情報保護法および人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針を含む)を遵守し、個人情報および保護された健康情報における機密保持およびプライバシーを保証するための、セキュリティ対策を講じる必要がある。

##### ③ キュレーション、バリエント評価、および再評価システムの構築

データの品質保証のためのプロセスを明記し、データベースの運営機関においてデータのキュレーションが実施されていることが必要である。キュレーションの方法や、実施者の質などの実施体制が公開されていることが望ましい。また、誤った意義付けを行うリスクを回避するため、情報の定期的な更新がされていることが望ましい。

キュレーションにおいては、その病原性バリエントがどの情報リソースに収載されたものか示されていることが重要であり、当該情報リソースにアクセス可能である必要がある。単報の症例報告、複数の施設からの報告、バリエントの機能解析の有無、などの情報によりバリエントの意義の信頼度が異なるため、根拠となる文献、研究名等が明記されていることが望ましい。バリエントの評価分類として、その病原性は pathogenic、likely pathogenic、uncertain significance (VUS)、likely benign、benign の 5 つに分類されるが、具体的にどのようなプロセスで収載されたバリエントを分類したのかを記載することが望ましい。

#### 3.4.2. バリエント病原性分類手法の活用

希少疾患におけるバリエントの評価では、既報論文あるいはデータベースに収載されたバリエントと同一座標のバリエントが検出されることは少なく、報告のない新規のバリエントを評価する必要がある。その方法の 1 つとして 2015 年に発表された American College of Medical Genetics and



Genomics (ACMG) / Association for Molecular Pathology (AMP) ガイドラインに準拠して実施することが挙げられる。このガイドラインではアレル頻度、発症者の家族情報、遺伝子の機能解析の有無など多方向からのスコアリング付けに基づき、バリエントの病原性を pathogenic、likely pathogenic、uncertain significance、likely benign、benign の 5 つに分類する方法が提唱されている。このようなバリエントの病原性をスコアリングするプログラムの結果は補助診断として参考に利用することが推奨されるが、直接的な確定診断の根拠とするべきではない。スコアリングによる分類が benign であっても実際は病的意義を有する場合や、スコアが likely pathogenic であっても全く病的意義が無い場合もあり得ることは留意しておく必要がある。

### 3.4.3. バリエント頻度と対照集団の使用

潜在的病原性を評価する際には、最初に対照集団または一般集団におけるバリエント頻度を考慮する。アレル頻度は由来する祖全集団により大きく異なる場合があるため、世界的な頻度情報と共に、被検者の祖先系集団を一致させた対照者データとして公的に入手可能な集団データベース、すなわち日本人においては東北メディカル・メガバンクの全ゲノム解析に基づく「日本人ゲノム多様性情報の統合されたデータベース (<https://jmorp.megabank.tohoku.ac.jp>)」を検索すること等により評価する。

対照集団におけるアレル頻度が疾患頻度から予測される数値以上に大きい場合は、稀なメンデル遺伝病の原因である可能性は低く、病的意義のないバリエントである強い裏付けとみなす。

さらに、研究対象の疾患が年少時に発症する常染色体顕性遺伝(優性遺伝)疾患である場合、バリエントが健康成人集団で見られることは病的意義のないバリエントであることを支持するエビデンスとなる。

別のデータベースにおける過去の文献でバリエントが病原性である、もしくは病原性の可能性が高いと判断されたとしても、アレル頻度基準から良性とみなされる場合には、当該バリエントは良性の可能性が高い。

### 3.4.4. 新規検出バリエントの種類ごとの具体的な評価手法

#### a. *de novo* バリエント

親の遺伝型データが利用可能である場合に両親のいずれも当該バリエントを持たないことが示され、新生突然変異として発生したと考えられる *de novo* バリエントの場合は、患者の臨床症状が候補遺伝子と矛盾しない場合には病原性バリエントである可能性が高い。両親の陰性結果は、サンガー法、あるいは次世代シーケンサーによる場合は、バリエント位置での十分数のリード深度によって確認されなければならない。他のバリエントの父母子にける分離のパターンが生物学的親子関係に矛盾しないか確認する。

#### b. ヌルバリエント

ヌルバリエントとは、ナンセンスバリエント、フレームシフトバリエント、エクソンとイントロンの境界領域近傍に多いスプライシング異常を起こすバリエント、開始コドン内のバリエント、および単一エクソンまたは複数エクソンの欠失を意味する。これらは転写欠如あるいは変異転写物のナンセンス変異依存分解機構による遺伝子産物の欠損につながることから、遺伝子機能を乱すと予測される。ヌルバリエントがみられ、疾患遺伝形式と一致するものに関しては病原性と考える。

常染色体顕性遺伝(優性遺伝)疾患において、患者がヌルバリエントを有していて、患者の表現型が遺伝子と関連する疾患と合致し、関連性と一致する場合、かつ当該遺伝子の機能喪失非許容スコア(pLIスコア)の値が0.9以上の場合は、患者の発症機序はハプロ不全である可能性が高い。なお、短縮型バリエントが、文献で病原性が確定している最も3'末端側の短縮型バリエントの下流に位置する場合、(予測される終止コドンが最後のエクソンで起きた場合、あるいは最後から2番目のエクソンの最後の50塩基対で起きた場合に特に当てはまる)、ナンセンス変異依存分解機構は予測されない。

#### c. スプライス部位のバリエント

エクソンとイントロンの境界領域近傍のバリエントは、前記の「ヌルバリエント」の項目の記載の通り、転写欠如あるいは変異転写物のナンセンス変異依存分解機構による遺伝子産物の欠損につながり、遺伝子機能を乱すと想定される場合が多い。一般に、エクソンの両端から±1または2の基準スプライス部位にあるバリエントがあり、当該遺伝子の異常により予測される症状が患者の表現型に一致する場合は病原性とみなす。

上記以外のスプライス部位のバリエントによっても、エクソンが飛ばされるエクソンスキッピングや短縮、本来のスプライス部位以外でコンセンサス配列と類似した配列にスプライシングが起きるなど、アミノ酸配列の異常をきたすことがある。バリエントによるスプライシング異常を高精度に予測できるプログラム(SpliceAI等)の利用も推奨される。コンピュータプログラムあるいはソフトウェアによるエビデンスからスプライシングに影響しうることが示唆された場合、もしくはその影響の疑いが生じた場合(例:バリエントがトランスにおいて潜性遺伝(劣性遺伝)疾患の遺伝子における既知の病原性バリエントと共に生じた場合)、当該バリエントは、機能的な評価(RNAを用いたスプライシング異常産物の確認実験等)により影響の最終的評価が得られるまで、あるいは病原性の関与を否定するその他のエビデンスが得られるまで、病的意義不明(VUS)として分類するのが無難である。この影響がRNAまたはタンパク質分析による機能解析によって裏付けられ、患者の表現型が妥当な特異度を伴って遺伝子の疾患関連性と一致した場合、そのバリエントは病原性と判断する。

#### d. ミスセンスバリエント

頻度基準および *de novo* 基準を前述のように適用する。ミスセンスバリエントの病原性が特定不能である場合、以下の評価を実施する。

#### (1) 同一アミノ酸置換

新規のミスセンスバリエントであっても既知のミスセンスバリエントであっても病原性が既に報告されているミスセンスバリエントと同一のアミノ酸変化を来す場合、変化したアミノ酸配列により異常を来すことが考えられる。患者の表現型と既報の病原性の既報のミスセンスバリエントに伴う疾患の表現型が一致するとき、既知の病原性のミスセンスバリエントと同一のアミノ酸置換を来すものは病原性ありとみなす。

#### (2) 同じコドンにある新規ミスセンスバリエント

既知の病原性を伴うミスセンスバリエントの変化と同じコドンで起こる新規ミスセンスのアミノ酸置換は、患者の表現型と既報の病原性の既報のミスセンスバリエントに伴う疾患の表現型が一致する場合、病原性がある可能性が高い。

#### (3) 変異のホットスポットまたは十分に確立された重要な機能ドメイン

タンパク質機能にとって重要であることが知られている特定のタンパク質ドメインのミスセンスバリエントは、患者の表現型と既報の遺伝子変異に伴う疾患の表現型が一致する場合、かつ下記の両条件を満たす場合、病原性がある可能性が高い。

- i) 現在までに同定されているドメインにおける多くのミスセンス変異体が病原性であると明らかにされている。
- ii) これらのドメインに良性バリエントが報告されていないか低頻度にしか存在しない。

特に、成人期より前に発症する重篤な疾患が除外されている集団である gnomAD データベースにおいて良性バリエントがないことを示唆する Z スコアが 2 以上であること。

#### (4) コンピュータ (*in silico*) の予測

ミスセンスバリエントについて、Combined Annotation Dependent Depletion (CADD: [cadd.gs.washington.edu/](http://cadd.gs.washington.edu/)) スコアや Mutpred2 ([mutpred.mutdb.org](http://mutpred.mutdb.org)) スコアをはじめとする各種スコアが算出され、参照される。ただし、コンピュータの予測を病原性評価のための唯一のエビデンスとして使用してはならない。病原性の有無は包括的・総合的に評価する必要があり、多角的な検討を行い、結論を出す必要がある。

#### e. インフレーム欠失/ 挿入およびストップロスによるタンパク質の全長の変化

終止コドンがアミノ付加コドンに変わることによる 1 個以上のアミノ酸の挿入ならびにタンパク質の伸展(例: ストップロスバリエント)は、タンパク質の長さの変化の結果として、ミスセンス変化の単独よりもタンパク質の機能を乱す可能性が高い。そのため、インフレーム欠失/ 挿入およびストップロスは、中程度の病原性のエビデンスとみなされる。欠失、挿入または伸展が大きいほど、タンパク質への影響が大きくなるため、さらに病原性を裏付ける十分なエビデンスとなる。対照的

に、リピート領域または分子進化論的に保存されていない領域に存在する小さいインフレーム欠失/挿入は病原性の可能性が低い。

#### f. 同義バリエーション

一般に同義バリエーションは病原性がない場合が多い。ヌクレオチドの位置が進化の過程で保持されている領域内の同義バリエーションでは、ヌクレオチドの変化によりスプライシング異常につながる可能性がある。同義バリエーションであっても「スプライス部位のバリエーション」で記載した予測アルゴリズムによりスプライシングへの影響を予測し、評価することが推奨される(3.4.4.c 参照)。

### 3.4.5. 家系図からの検討

常染色体潜性遺伝(劣性遺伝)形式の疾患が想定され、2 か所以上のバリエーションが認められたとき、それぞれのバリエーションがシスの関係(相同染色体の同一染色体上)、トランスの関係にあるか(相同染色体の異なる染色体上)にあるか検討を考慮する。また、複数の家系もしくは大家系からバリエーションの病原性を推測する場合には分離分析による検討を考慮する。

#### a. シス・トランス

常染色体潜性遺伝(劣性遺伝)疾患の遺伝子において 2 個のヘテロ接合性バリエーションが同定された際には、両者がシス(同一染色体上)またはトランス(異なる染色体上)のいずれの関係にあるか確認するため、両親の協力を得て、両親のサンプルの検査が有用である。あるバリエーションが病原性と分かっている場合、トランスに存在する別のバリエーションは「病原性の可能性が高い」とみなされる。成人患者の場合、その両親検体の入手が困難な場合も想定され限界もある。ロングリードシーケンサーなどにより、シス・トランスを解析することも選択肢の一つとして考えられる。

#### b. 分離分析

家系内において特定のバリエーションが有症状者のみに認められることは、当該バリエーションが病原性を有することを支持する。家族の表現型と特定バリエーションの分離は、疾患と遺伝子座位が連鎖しているエビデンスとなる。しかしバリエーションそのものの病原性に関するエビデンスとはならない。

家系内において、特定のバリエーションの有無と臨床症状の有無が一致しない場合は、そのバリエーションは良性である可能性が高い。しかし他の非生物学的な関係(養子縁組、提供精子・卵子の使用、父親が子の生物学的父親ではないなど)を除外するため、生物学的な家族関係の確認を要する場合がある。

### 3.4.6. 臨床的解釈の最終決定

臨床的解釈は、データベースや変異予測プログラム、家系図を利用し、その結果を臨床遺伝専門医、認定遺伝カウンセラー等のメディカルスタッフ、その他の医療専門家、当該疾患の遺伝医

療の経験が豊富な医師など、そして患者を直接診察している主治医を含めた検討会で多角的に評価し、検出されたバリエーションの解釈が妥当なものか最終的に決定する。

### 3.5. 遺伝学的検査の結果報告書の記載内容

(1) 多職種での検討会を経て、最終的な報告書を発行する。

報告書には実施機関の方針によって報告書の記載範囲および報告書に記載する項目を定めておく必要がある。

(2) 病原性バリエーションが見出された場合は、報告書にそのバリエーションが目立つように記載を行う。

リル

バリエーションや疾患名は誤認のないように統一された形式を取る必要がある。遺伝子の転写産物登録番号(ID)は必ず併記が必要であり、そのIDは Matched Annotation from NCBI and EMBL-EBI (MANE) の転写産物の RefSeqID または Ensembl ID を用いることが推奨される。ただし、歴史的に別の転写産物IDを用いることが通例となっている遺伝子の場合や、発現量の多い主要な転写産物が異なる場合は、その限りではない。バリエーションの記載法(ゲノム上の位置や、cDNA の情報、タンパク質のアミノ酸変化の情報の記載法)は Human Genome Variant Society (HGVS) の記載法(<http://varnomen.hgvs.org>)に従うことが望ましい。疾患名は名称と OMIM 番号を記載する。

(3) 報告書の内容には下記の内容を含めることが望ましい。

- 報告したバリエーションの解釈を支持する臨床症状に関する所見の説明
- 患者の表現型と関連する遺伝子の要約
- バリエーション解釈のために依拠したデータベース
- 報告書の記載範囲
- データベースへのアクセス日・利用したデータベース情報の更新日等
- 臨床的解釈は今後変わりうるものである、等の留意事項

(4) 予め定めるべき報告方針

- どのクラスのバリエーションが報告されているかを明示し、報告書に記載されていないバリエーションが存在する可能性について記載する。
- 二次的所見の取扱いについて。検査の実施前にその方針を説明して、患者の同意をうける。
- 意義不明のバリエーションの取扱いについて

(5) 発行後の対応

- 報告書を発行した後には、原則的に改訂せず、発行日を明確に記載することが推奨される。
- 発行後に医学的情報の更新があった場合には、自動的に再発行をする必要はないが、最新の情報による結果解釈を求められた場合にはこれらに応じるべきである。