

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.07.002

· 研究快报 ·

原发性浆细胞白血病肿瘤新生抗原的筛查和预测

陈碧清^a, 孔祥图^b, 徐祖琼^b, 代兴斌^b, 于菊华^b, 朱学军^{ab}(江苏省中医院暨南京中医药大学附属医院 a. 中心实验室; b. 血液科, 江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:** 采用基因测序技术结合生物信息分析手段探索原发性浆细胞白血病(PCL)的肿瘤新生抗原。 **方法:** 采集1例原发性PCL患者复发期和缓解期的外周血样本, 利用基于序列分型的聚合酶链式反应进行HLA分型, 利用二代测序技术对全外显子组和转录组进行测序, 利用生物信息学软件NetMHCpan预测新生抗原。 **结果:** 该患者复发期外周血中发现6个肿瘤特异的错义突变基因, 分别为FRG1、MLL3、SVIL、MYOM1、ZDHHC11、RFPL4A基因; 结合患者的HLA亚型, 通过生物信息预测出43条新生抗原。优先选取表达水平较高的FRG1和MLL3基因突变所产生的20条新生抗原, 其中4条新生抗原高度亲合患者的HLA分子, 具有潜在的临床应用价值。 **结论:** 完成了1例原发性PCL肿瘤新生抗原的筛查和预测, 实践说明基于肿瘤特异的体细胞突变预测新生抗原的方法对于原发性PCL同样可行。

[关键词] 原发性浆细胞白血病; 新生抗原; 复发难治; 二代测序; 体细胞突变; 免疫治疗

[中图分类号] R730.51; R733.73 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)07-0730-06

Screening and predication on tumor neoantigen for primary plasma cell leukemia

CHEN Biqing^a, KONG Xiangtu^b, XU Zuqiong^b, DAI Xingbin^b, YU Juhua^b, ZHU Xuejun^{ab} (a. Central Laboratory; b. Department of Hematology, Jiangsu Provincial Hospital of Chinese Medicine & Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the tumor-specific neoantigen for primary plasma cell leukemia (PCL) using gene sequencing technology combined with bioinformatic analysis. **Methods:** Peripheral blood samples of one patient with primary PCL during relapse and remission periods were collected. HLA molecular typing was performed using polymerase chain reaction with sequencing-based typing; whole-exome and transcriptome were sequenced by next-generation sequencing method; and bioinformatics software NetMHCpan was used to predict neoantigens. **Results:** Six tumor-specific missense mutations were found in the patient's peripheral blood during relapse period, located in genes FRG1, MLL3, SVIL, MYOM1, ZDHHC11 and RFPL4A. Considering patient's HLA sub-types, 43 neoantigens were predicted *via* bioinformatics. Considering that FRG1 and MLL3 had relatively high gene expression levels, 20 neoantigens derived from mutations of the two genes were preferentially selected, among which four neoantigens had high affinity with the patient's HLA molecules and thus had potential clinical application value. **Conclusion:** The study has completed a tumor neoantigen screen and prediction for primary PCL. This practice demonstrates that predicting neoantigen based on tumor-specific somatic mutation is feasible for primary PCL.

[Key words] primary plasma cell leukemia; neoantigen; relapsed and refractory; next generation sequencing; somatic mutation; immunotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(7): 730-735. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.07.002]

在肿瘤免疫治疗时代,寻找肿瘤特异性的细胞毒性的治疗靶点,为个体化的治疗方案提供方向显得尤为重要。新生抗原是一种特异性存在于肿瘤细胞表面的主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)的抗原表位肽。对于无病毒性致病源的人类肿瘤而言,这些相对于正常人类基因组而言新产生的抗原仅来源于肿瘤特有的体细胞突变,具有个体差异性和肿瘤特异性,能够被T细胞识别并引起特异性的免疫应答,在个性化免疫治疗领域拥有广阔前景。浆细胞白血病(plasma cell leu-

kemia, PCL)是一种罕见的血液系统肿瘤,其中大部

[基金项目] 江苏省社会发展-临床前沿技术项目(No. BE2016809); 南京市科技发展计划项目(No. 201503011)。Project supported by the Foundation of Jiangsu Social Development-Clinical Frontier Technology (No. BE2016809), and the Nanjing Science and Technology Development Program (No. 201503011)

[作者简介] 陈碧清(1989-),女,博士,主要从事肿瘤基因组学、生物信息学研究, E-mail: chenbiqing333@163.com

[通信作者] 朱学军(ZHU Xuejun, corresponding author), 博士, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事肿瘤免疫治疗的基础与临床研究, E-mail: zhuxuejun@njucm.edu.cn

分伴随发生在多发性骨髓瘤的终末期,属于继发性PCL,余下小部分为更罕见、具有高度侵袭性的原发性PCL。原发性PCL目前尚无有效的治疗方法,对放疗、化疗等常规治疗反应率低,容易快速耐药,大多预后不良,中位生存期不到1年^[1],急需更有效的治疗方法。新生抗原疫苗相对安全性高,如果能找到原发性PCL特有的新生抗原,将为PCL治疗疫苗的研发提供新的思路。江苏省中医院2010年在临床上收治了1例原发性PCL患者,采集了该患者复发期和缓解期的外周血样本,基于全外显子组测序和转录组测序,进行新生抗原的生物信息学分析预测,旨在为该患者的免疫治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 临床资料

患者,男,46岁,2010年5月无明显诱因下出现右侧肋骨压痛、尿中泡沫增多住院。入院检查,血涂片见幼稚细胞(占21%),骨髓增生明显活跃,幼稚浆细胞明显增多(占86.5%);影像检查示双侧股骨、肱骨、肩峰、颅骨板障多发小片状密度减低,腰椎多发椎体及两侧骶骨、髂骨信号异常,综合诊断为PCL。治疗过程中尝试了多种联合化疗方案,疾病间断性缓解,2018年5月疾病再次复发,骨髓浆细胞超过80%。鉴于多种治疗方案对该患者均无效,遂考虑尝试新生抗原免疫治疗方法。治疗前患者充分知晓了抗原免疫治疗的风险并签署了知情同意书。该患者新抗原免疫治疗计划已经医院伦理委员会审查批准。

1.2 研究标本、主要试剂及仪器

患者在初诊期、缓解期、复发期分别采集外周血于肝素抗凝管,用Ficoll/Hypaque密度梯度离心分离出外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。用基因组DNA快速抽提试剂盒DNAfast200提取基因组DNA,用Total RNA快速抽提试剂盒RNAfast200提取总RNA。提取出的总RNA和DNA分装成小管,放在-80℃冰箱保存。

基因组DNA快速抽提试剂盒DNAfast200、Total RNA快速抽提试剂盒RNAfast200购自飞捷生物技术有限公司,SureSelect Human All Exon V5试剂盒购自Agilent Technologies, Inc., VAHTS™ mRNA-seq V2 Library Prep Kit for Illumina®购自诺唯赞生物技术有限公司,Qubit2.0 RNA检测试剂盒和Qubit2.0 DNA检测试剂盒购自Life Technologies公司。Qubit2.0荧光计来自Invitrogen公司,超声波DNA破碎仪来自Covaris公司,Hiseq X Ten测序仪和Hiseq 4000测序仪来自Illumina Technologies, Inc.。

1.3 全外显子组测序技术检测体细胞突变

样本DNA的全外显子组测序在杭州奕真生物科技有限公司完成。DNA样品首先用琼脂糖凝胶电泳分析DNA降解程度及是否存在杂带、RNA及蛋白污染,然后Qubit 2.0对DNA浓度进行精确定量。质量检测后,将基因组DNA经超声波DNA破碎仪随机打断成长度为180~280 bp的片段,用SureSelect Human All Exon V5试剂盒捕获外显子及构建文库。得到的文库经PCR线性扩增后进行文库质检,使用定量PCR方法对文库的有效浓度(3 nmol/L)进行准确定量。最后用Hiseq X Ten测序仪进行Illumina HiSeq PE150测序。

全外显子组测序获得的原始序列经过数据质量评估后,有效测序数据通过BWA软件比对到参考基因组(hg19),用MuTect软件分析寻找体细胞突变位点。用ANNOVAR软件对变异结果进行功能注释。

1.4 转录组测序检测基因表达水平

用VAHTS™ mRNA-seq V2 Library Prep Kit for Illumina®制备RNA-seq文库,Qubit2.0 RNA检测试剂盒和Qubit2.0荧光仪对RNA进行精准定量,琼脂糖凝胶检测RNA完整性以及基因组污染情况。获得的cDNA利用Qubit2.0 DNA检测试剂盒精确定量,cDNA文库用Hiseq 4000测序仪进行测序。测序得到的原始数据先用FastQC进行质量评估,再通过Trimmomatic进行质量剪切,得到相对准确的有效数据。然后,使用HISAT2将样本有效数据比对到参考基因组上,采用RSeQC根据比对结果进行冗余序列和插入片段分布分析,采用Qualimap根据比对结果进行均一性分布检测、基因组结构分布分析,利用BEDTools进行基因覆盖率统计分析和染色体上序列分布分析。使用StringTie和已知的基因模型评估基因的表达量。

1.5 PCR-SBT法检测PCL患者的HLA亚型

基于患者缓解期的PBMC(正常组织样本)的全外显子组测序结果,用HLAminer软件对HLA-I类分子和HLA-II类分子分型进行生物信息学预测。另一方面,用基于序列分型的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction with sequencing-based typing, PCR-SBT)法对该患者的HLA进行高分辨准确分型,采用3.16.0数据库分析。

1.6 生物信息学方法预测新生抗原

取每个体细胞错义突变所在的氨基酸残基和其前后各14个氨基酸残基共同组成的29-mer多肽作为输入的突变肽段,利用NetMHCpan 4.0分别计算HLA-I类分子与突变多肽、野生型多肽的结合能力,使用NetMHCIIpan 3.2分别计算HLA-II类分子与突

变多肽、野生型多肽的结合能力,并将两者的结合能力结果进行比较。预测的结合能力数值以 IC₅₀ (nmol/L)和排名百分数显示。排名百分数定义为该多肽在 2 000 个相同长度的随机自然多肽的亲合力分值中的排名。NetMHCpan 4.0 预测的 HLA-I 类分子结合的抗原肽段长度为 8~14 mer, NetMHCIIpan 3.2 预测的 HLA-II 类分子结合的抗原肽段长度为 15 mer。根据以下规则选择抗原表位多肽(即新生抗原):发生突变的多肽与 HLA 分子亲和值小于 500 nmol/L,同时小于对应野生型多肽与 HLA 分子之间的亲和值。所得的新生抗原按照预测的亲合力排序,已知功能基因或潜在癌基因上的突变在排序时优先。NetMHCpan 4.0 定义排名前 0.5% 为强结合肽,前 2% 为弱结合肽;NetMHCIIpan3.2 定义排名前 2% 为强结合肽,前 10% 为弱结合肽。突变多肽没有表达或表达量很低的体细胞突变不用来预测新生抗原。NetMHC 软件预测时,输入项 HLA 亚型以 PCR-SBT 测得的 HLA 亚型结果为准;对于 HLA-II 类分子的 DQB1,由于软件预测时 DQB1 必须与 DQA1 关联,而 DQA1 无 PCR 实验结果,故 DQA1 亚型以 HLAmimer 软件预测结果为准。

2 结果

2.1 PCR-SBT 法结合生物信息分析确定患者的 HLA 亚型

利用 HLAmimer 软件预测的 HLA 分型如表 1。PCR-SBT 法测得的 HLA 分型结果为 A*02:01/02:06、B*40:01/44:03、C*03:04/04:01、DRB1*07:01/11:01、DQB1*02:02/03:01。以 PCR-SBT 法检测结果对比软件预测结果,HLA 的 B 和 C 亚型被软件成功预测,A*02:06、DRB1*07:01、DQB1*03:01 被软件成功预测,而 A*02:01、DRB1*11:01、DQB1*02:02 的前两位数字被软件准确预测。综合而言,相比于传统实验方法,HLAmimer 软件对 HLA 亚型前两位数字的预测准确性在本例中达到 100%,而对 HLA 亚型的前 4 位数字的预测准确度达到 70%。

2.2 PCL 的肿瘤体细胞突变较少

基于对全外显子组的二代测序分析显示,患者复发期相对于缓解期新产生了 33 个体细胞突变,突变位点均为杂合,即每个等位基因位点产生了 1 个新突变,突变率小于 33%。其中,24 个突变位于编码基因上,10 个突变位于外显子区域,这 10 个突变中的 6 个属于错义突变(表 2)。

转录组测序结果分析显示,错义突变所在的 6 个基因中,RFPL4A 几乎无表达,FRG1 和 MLL3 表达量较高(表 2)。故在后续新生抗原预测中优先考虑由

FRG1 和 MLL3 的突变产生的新生抗原,而 RFPL4A 相关突变 A119G 不纳入后续新生抗原预测分析。

表 1 HLAmimer 软件预测的该患者的 HLA 分型
Tab.1 HLA subtypes of the patient predicted by HLAmimer

| Allele | Score | Expect value |
|-----------------|-----------|--------------|
| HLA-I | | |
| A*02:06P | 7 540.03 | 5.65E-53 |
| A*02:77 | 7 235.04 | 6.95E-51 |
| A*69:01 | 3 015.02 | 1.26E-21 |
| B*40:79 | 8 748.03 | 8.40E-65 |
| B*40:01P | 8 743.05 | 8.40E-65 |
| B*44:03P | 9 962.01 | 1.22E-73 |
| C*03:04P | 7 839.04 | 1.35E-53 |
| C*03:05 | 6 634.03 | 1.84E-45 |
| C*04:01P | 12 368.05 | 4.26E-84 |
| HLA-II | | |
| E*01:03:02:02 | 3 926.00 | 2.90E-14 |
| E*01:03:04 | 2 712.02 | 4.24E-10 |
| F*01:01:03:04 | 2 413.01 | 1.82E-11 |
| F*01:01:01:08 | 2 112.01 | 4.01E-10 |
| G*01:01:01:02 | 2 717.00 | 5.12E-16 |
| G*01:01:01:03 | 1 810.01 | 6.40E-11 |
| DPA1*01:03P | 9 018.14 | 1.07E-21 |
| DPB1*140:01 | 2 411.02 | 1.37E-18 |
| DPB1*17:01:01G | 1 805.02 | 4.00E-14 |
| DQA1*02:01 | 2 415.00 | 1.43E-10 |
| DQA1*05:10 | 906.00 | 2.04E-04 |
| DQB1*03:01:01G | 1 207.00 | 2.06E-10 |
| DQB1*02:01P | 604.00 | 1.43E-05 |
| DQB1*02:13 | 603.00 | 1.43E-05 |
| DRA*01:01:01:02 | 30 162.13 | 1.53E-78 |
| DRA*01:01:01:01 | 27 449.11 | 1.54E-71 |
| DRB1*11:27P | 604.00 | 5.97E-07 |
| DRB1*07:01P | 604.00 | 5.97E-07 |
| DRB1*07:24 | 603.00 | 5.97E-07 |
| DRB3*02:02:01G | 604.00 | 3.70E-04 |
| DRB4*01:01:01G | 1 809.01 | 1.88E-06 |

2.3 生物信息学预测出几十个新生抗原

NetMHC 软件预测结果显示,FRG1 (NM_004477:c. A469G, p. I157V)、MLL3 (NM_170606:c. C925T, p. P309S)、ZDHHC11 (NM_024786:c. G256A, p. V86I)、SVIL (NM_003174:c. G2901A, p. M967I) 这 4 个基因上的突变可以得到符合筛选标准的新生抗原(即突变所在肽段与 HLA 分子的结合能力小于 500 nmol/L,并且小于相应野生型肽段和同一种 HLA 分子的亲合力),所得的和 HLA-I、HLA-II 类分子亲和的新生抗原分别为 9、34 个。其中,SVIL 突变产生的新

生抗原都具有良好的水溶性,而其他新生抗原水溶性较差。所有预测到的新生抗原亲和性结合HLA的A*02:01、A*02:06、DQA1*02:01-DQB1*03:01、DQA1*05:10-DQB1*03:01、DQA1*05:10-DQB1*02:02、DRB1*07:01、DRB1*11:01等7个亚型。18个新生抗原能亲和性结合不止一种HLA分子亚型。12个新生抗原与HLA分子的亲和力比它们相应的野生型多肽的亲和力强100 nmol/L以上。FRG1和MLL3的mRNA表达水平较高,且MLL3与多种癌症密切相关,故新生抗原的选择以FRG1和MLL3的突变产生的为优先(表3)。FRG1 I157V产生的新生抗原LLASNSCFV和

ALLASNSCFV为HLA的A分子的强结合肽,MLL3 P309S产生的新生抗原YHY-SCAAGAGTFQDF、TQMYHYSCAAGAGTF、QM-YHYSCAAGAGTFQ、MYHYSCAAGAGTFQD为DQA1*05:10-DQB1*03:01分子的强结合肽。ALLASNSCFV、TQMYHYSCAAGAGTF、QMYH-YSCAAGAGTFQ、MYHYSCAAGAGTFQD与相应HLA分子的亲和力比它们相应野生型多肽的亲和力强至少一个数量级(亲和力值小150 nmol/L以上),这些新生抗原在实际应用时应优先选择。

表2 PCL特异的错义体细胞突变

Tab. 2 PCL-specific missense somatic mutations

| Genomic location | DNA change | Protein change | Mutated cell (%) | Gene | Expression |
|------------------|---------------|----------------|------------------|---------|------------|
| chr4:190878589 | A469G | I157V | 4.9 | FRG1 | 42.32 |
| chr7:151970877 | C925T | P309S | 3.9 | MLL3 | 25.81 |
| chr10:29779789 | G4179A/G2901A | M1393I/M967I | 8.7 | SVIL | 3.92 |
| chr18:3079218 | G4607A/G4319A | G1536D/G1440D | 7.1 | MYOM1 | 2.77 |
| chr5:848742 | G256A | V86I | 6.3 | ZDHHC11 | 2.35 |
| chr19:56273285 | A119G | K40R | 6.8 | RFPL4A | 0.00 |

Reference genome is hg19. As for genes with alternative splicing, DNA and protein changes in all mRNA/protein subtypes are listed. The unit for expression is thousands per million

表3 表达量较高基因中预测的新生抗原

Tab. 3 Predicted neoantigens with relatively high expressions

| Neoantigen | Related gene | HLA subtype | Affinity [$c_{\text{B}}(\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$] | Rank (%) |
|-----------------|--------------|--|---|-------------|
| LLASNSCFV | FRG1 | A*02:01, A*02:06 | 10,21 | 0.11,0.27 |
| ALLASNSCFV | FRG1 | A*02:01, A*02:06 | 34,84 | 0.45,0.96 |
| YHYSCAAGAGTFQDF | MLL3 | DQA1*02:01-DQB1*03:01,DQA1*05:10-DQB1*03:01 | 41,51 | 2,1.2 |
| MYHYSCAAGAGTFQD | MLL3 | DQA1*02:01-DQB1*03:01,DQA1*05:10-DQB1*03:01,DRB1*07:01 | 42,52,177 | 2.5,1.2,15 |
| QMYHYSCAAGAGTFQ | MLL3 | DQA1*02:01-DQB1*03:01,DQA1*05:10-DQB1*03:01,DRB1*07:01 | 44,52,113 | 2.5,1.3,9.5 |
| TQMYHYSCAAGAGTF | MLL3 | DQA1*02:01-DQB1*03:01,DQA1*05:10-DQB1*03:01,DRB1*07:01 | 48,58,94 | 3,1.5,7.5 |
| HYSCAAGAGTFQDFS | MLL3 | DQA1*02:01-DQB1*03:01,DQA1*05:10-DQB1*03:01 | 57,82 | 3.5,2.5 |
| YSCAAGAGTFQDFSH | MLL3 | DQA1*02:01-DQB1*03:01,DQA1*05:10-DQB1*03:01 | 67,98 | 4.5,3.5 |
| CTQMYHYSCAAGAGT | MLL3 | DQA1*02:01-DQB1*03:01,DQA1*05:10-DQB1*03:01,DRB1*07:01 | 75,90,140 | 5,3,12 |
| KCTQMYHYSCAAGAG | MLL3 | DQA1*02:01-DQB1*03:01,DQA1*05:10-DQB1*03:01,DRB1*07:01 | 100,118,158 | 7,4.5,14 |
| SCAAGAGTFQDFSHI | MLL3 | DQA1*02:01-DQB1*03:01,DQA1*05:10-DQB1*03:01 | 106,150 | 7.5,5.5 |
| MALLASNSCFV | FRG1 | A*02:01, A*02:06 | 130,384 | 1.25,2.84 |
| QMYHYSCAA | MLL3 | A*02:06 | 140 | 1.38 |
| EKCTQMYHYSCAAGA | MLL3 | DQA1*02:01-DQB1*03:01,DQA1*05:10-DQB1*03:01,DRB1*07:01 | 153,178,184 | 11,7,16 |
| QNGKMALLASNSCFV | FRG1 | DQA1*02:01-DQB1*03:01,DQA1*05:10-DQB1*03:01 | 163,372 | 12,14 |
| NGKMALLASNSCFVR | FRG1 | DQA1*02:01-DQB1*03:01,DQA1*05:10-DQB1*03:01 | 176,426 | 12,16 |
| GKMALLASNSCFVRC | FRG1 | DQA1*02:01-DQB1*03:01 | 214 | 14 |
| KMALLASNSCFV | FRG1 | A*02:01 | 237 | 1.83 |
| KMALLASNSCFVRCN | FRG1 | DQA1*02:01-DQB1*03:01 | 273 | 17 |
| MALLASNSCFVRCNE | FRG1 | DQA1*02:01-DQB1*03:01 | 434 | 24 |

3 讨论

随着二代测序和肽段合成的成本下降、多肽免疫原性的生物信息学预测能力的提升,采用新生抗原治疗癌症的安全性和可靠性已经得到了初步认可,新生抗原在肿瘤治疗领域的临床应用价值正逐步显现^[2]。近几年来,已经有研究者利用基于肿瘤新生抗原的个体化肿瘤疫苗成功治疗恶性黑色素瘤^[3-4],但是应用新生抗原治疗血液系统恶性肿瘤的案例还罕见报道。目前国际上已有少量对多发性骨髓瘤应用个体化疫苗治疗的案例^[5-8]。树突状细胞疫苗已被证实对部分类型的多发性骨髓瘤有效^[5-6]。也有报道利用非血液肿瘤来源的个体化疫苗治疗多发性骨髓瘤^[7]。个体化疫苗与骨髓移植、免疫调节剂、免疫检查点阻断等其他治疗手段结合使用后疗效可能更佳^[9]。FOGLIETTA等^[8]发现,异基因移植供者可以被免疫诱导产生新生抗原,并且这些新生抗原能够通过移植转移到骨髓瘤患者体内。在细胞免疫治疗和肿瘤疫苗这两种肿瘤免疫治疗方式中,新生抗原肽段都是激活患者免疫系统的关键因素,因此如何准确、全面地获得新生抗原肽段序列是个体化免疫治疗的重要起始步骤。肿瘤新生抗原预测涉及两个主要关键点,一是对患者的HLA分子进行分型;二是鉴定和选择合适的体细胞突变。本案例提示,虽然基于二代测序结果利用生物信息学软件推断HLA分型有较高的准确率,尤其是对于HLA亚型的前两位数字而言,准确性一般能达到100%,但是软件对HLA亚型的前两位数以后的数字的预测准确率并不高,而肿瘤新生抗原预测一般需要精确到四位数的HLA亚型,因此建议HLA分型应以实验结果为准。选择新生抗原时优先考虑测序深度深、突变频率高、mRNA表达信号强、新生抗原的亲和力(IC₅₀)小(说明与HLA分子结合越强)、新生抗原与其对应野生型多肽的亲和力IC₅₀之比小(意味着新生抗原与HLA分子结合能力远远强于相应野生型多肽与HLA分子的结合力)的新生抗原,此外还需要综合考虑产生新生抗原的突变基因的生物功能,尤其是与所研究疾病的关联性。在本病例中,虽然FRG1 I157V和MLL3 P309S这两个突变的突变频率在该患者的体细胞突变中不是最高的,但是这两个突变的测序深度最深,并且mRNA表达信号显著地强于其他突变。综合以上因素,优先选择这两个突变产生的新生抗原。而且,这两个突变产生的新生抗原与HLA分子的亲和力也是最强的。进一步结合突变基因的生物功能,MLL3 P309S产生的新生抗原应最为优先考虑。肿瘤治疗的关键是杀灭肿瘤干细胞,故而新生

抗原预测中还应该考虑预测得的新生抗原与肿瘤干细胞的关联。肿瘤干细胞特异的体细胞突变产生的新生抗原可能具有更佳的潜在抗肿瘤治疗价值。

该患者的肿瘤新生抗原个数为43,新生抗原频率为1.3^[9],但其中大部分新生抗原的水溶性差,实际可以应用的新生抗原数目并不多,提示针对原发性PCL的免疫治疗很可能效果会不好^[10]。该患者的肿瘤突变负荷约为0.66,比其他肿瘤的突变负荷低很多^[11],也低于血液肿瘤的平均肿瘤突变负荷值(1.7)^[12],这提示原发性PCL疾病本身的肿瘤突变负荷可能就很低。而错义突变的负荷更低,约为0.12,说明能用于产生新生抗原的体细胞突变本来就很少。另一方面,突变的过程不定向,只有少数体细胞突变能成功表达新生抗原。再者,考虑提呈出来的抗原的效果(抗原水溶性、人体毒性)和肿瘤微环境对新生抗原诱导T细胞的影响,能真正在体内发挥作用的新生抗原只有一小部分^[13]。新生抗原对于原发性PCL的治疗效果还有待进一步的临床试验来进行综合评价。

近年来,随着硼替佐米、来那度胺等新药的出现和造血干细胞移植的应用,PCL患者的预后得到了一定的改善,但是目前对原发性PCL的认识依然存在很大不足,治疗效果依然欠缺,亟需引入新兴免疫治疗技术改善治疗现状。基于新生抗原的肿瘤免疫治疗具有以下几点优势:(1)新生抗原只在肿瘤细胞表达,无遗传性;(2)该疗法只激活个体自身的免疫系统,并未导入病毒等个体中原先不存在的物质,风险小;(3)靶向准确性高;(4)治疗成本更低,更容易被患者接受。

本研究通过对患者的肿瘤样本的二代测序和生物信息学分析,成功预测了1例原发性PCL的肿瘤特异的新生抗原,说明基于肿瘤特异的体细胞突变预测新生抗原对于原发性PCL等罕见的非实体肿瘤同样可行,为这些疾病的治疗提供一条新的思路。

[参考文献]

- [1] 王欢,李建勇,孙超,等. 原发浆细胞白血病诊疗进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(6): 1837-1841. DOI:10.7534/j.issn.1009-2137.2017.06.048.
- [2] 周炜均,李玉华. 个体化新抗原疫苗临床转化的机遇与挑战[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(1): 16-21. 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.01.004.
- [3] OTT P A, HU Z T, KESKIN D B, et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma[J / OL]. Nature, 2017, 547(7662): 217-221[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5577644/>. DOI:10.1038/nature22991.
- [4] SAHIN U, DERHOVANESEAN E, MILLER M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immu-

- nity against cancer[J]. *Nature*, 2017, 547(7662): 222-226. DOI: 10.1038/nature23003.
- [5] 陈曦, 蔡真. 疫苗治疗多发性骨髓瘤的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(3): 311-316. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.03.017.
- [6] JUNG S H, LEE H J, VO M C, et al. Immunotherapy for the treatment of multiple myeloma[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017, 111: 87-93. DOI:10.1016/j.critrevonc.2017.01.011.
- [7] TAKEDATSU H, YOSHIMOTO K, OKAMURA T, et al. Immunological evaluation of vaccination of peptides derived from epithelial cancer-related antigens in two patients with hematological malignancy[J]. *Int J Oncol*, 2005, 26(6): 1605-1612. DOI: 10.3892/ijo.26.6.1605.
- [8] FOGLIETTA M, NEELAPU S S, KWAK L W, et al. Neoantigen and tumor antigen-specific immunity transferred from immunized donors is detectable early after allogeneic transplantation in myeloma patients[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2013, 48(2): 269-277. DOI: 10.1038/bmt.2012.132.
- [9] CHAROENTONG P, FINOTELLO F, ANGELOVA M, et al. Pan-cancer immunogenomic analyses reveal genotype-immunophenotype relationships and predictors of response to checkpoint blockade[J]. *Cell Rep*, 2017, 18(1): 248-262. DOI:10.1016/j.celrep.2016.12.019.
- [10] YARCHOAN M, HOPKINS A, JAFFEE E M. Tumor mutational burden and response rate to PD-1 inhibition[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(25): 2500-2501. DOI:10.1056/NEJMc1713444.
- [11] COLLI L M, MACHIELA M J, MYERS T A, et al. Burden of non-synonymous mutations among TCGA cancers and candidate immune checkpoint inhibitor responses[J/OL]. *Cancer Res*, 2016, 76(13): 3767-3772[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4930685/>. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-16-0170.
- [12] GALANINA N, BEJAR R, CHOI M, et al. Comprehensive genomic profiling reveals diverse but actionable molecular portfolios across hematologic malignancies: implications for next generation clinical trials[J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2018, 11(1): E11[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6356731/>. DOI:10.3390/cancers11010011.
- [13] MCGRANAHAN N, FURNESS A J, ROSENTHAL R, et al. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade[J/OL]. *Science*, 2016, 351(6280): 1463-1469[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4984254/>. DOI:10.1126/science.aaf1490.

[收稿日期] 2019-03-25

[修回日期] 2019-06-15

[本文编辑] 党瑞山