



OPEN ACCESS

EDITED BY

Peter M. Van Endert,
Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale (INSERM), France

REVIEWED BY

Efthalia Zervoudi,
Cardiff University, United Kingdom
Loulieta Nazerai,
University of Copenhagen, Denmark

*CORRESPONDENCE

Naohide Yamashita
✉ n-yamashita@novacellum.com

RECEIVED 09 April 2025

ACCEPTED 19 June 2025

PUBLISHED 11 July 2025

CITATION

Kobayashi D, Kosumi T, Lam QLK, Fujita S,
Hijikata Y, Takeda K, Narita T, Yamashita N,
Richard G, De Groot AS and Yamashita N
(2025) A method for identifying neoantigens
through isolation of circulating tumor cells
using apheresis among patients with
advanced-stage cancer.
Front. Immunol. 16:1609116.
doi: 10.3389/fimmu.2025.1609116

COPYRIGHT

© 2025 Kobayashi, Kosumi, Lam, Fujita, Hijikata,
Takeda, Narita, Yamashita, Richard, De Groot
and Yamashita. This is an open-access article
distributed under the terms of the [Creative
Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The
use, distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

進行期がん患者において、 アフエーシスを用いた 循環腫瘍細胞 (CTC) の分離を通じて ネオアンチゲンを同定する方法

Daiki Kobayashi^{1,2}, Takuya Kosumi³, Queenie Lai Kwan Lam⁴,
Shigeharu Fujita⁴, Yasuki Hijikata⁵, Kaori Takeda⁶,
Tomoya Narita⁷, Naomi Yamashita⁷, Guilhem Richard⁸,
Anne S. De Groot⁸ and Naohide Yamashita^{9*}

¹ 東京医科大学 茨城医療センター 総合内科部門 内科 (日本・茨城)、² 藤田医科大学 (日本・豊明)、³ グランソール奈良 (日本・奈良)

⁴ 銘煌CITクリニック (日本・東京)、⁵ 土方クリニック (日本・名古屋)、⁶ Biomedica Solution Inc. (日本・大阪)、

⁷ 武蔵野大学 薬学研究所 (日本・東京)、⁸ EpiVax Inc. (米国・ロードアイランド州プロビデンス)、⁹ Novacellum Inc. (日本・東京)

背景: 免疫チェックポイント阻害薬は、腫瘍変異負荷の低い腫瘍では効果が限定的であり、その一因はネオアンチゲン提示の不足にある。

方法: 白血球アフエーシス (leukapheresis) およびフローサイトメトリーを用いて分離した循環腫瘍細胞 (CTC) に基づき、ネオアンチゲンを同定する新規手法を開発した。末梢血単核球 (PBMC) は、ステージIVがん患者11例と健常ボランティア2名から採取した。CTCの濃縮は、CD45陽性の造血系細胞を除去し、CD45陰性・Vimentin陽性細胞を選別することで行い、細胞学的検査により悪性細胞を含むことを確認した。造血系系統解析では、CTC画分の50%超が非造血系細胞で構成されていることが示された。CTC画分および正常造血系画分の双方から抽出したDNAに対してエクソームシーケンスを実施した。ネオアンチゲンの同定には、Ancer® バイオインフォマティクス・プラットフォームを用いた。

結果: 代表例として、胃がんおよび唾液腺がんの患者から、それぞれ94,636個および46,423個のCTCを分離した。得られたDNA量は、増幅や長期の細胞培養を行わずともエクソームシーケンスに十分であった。各対象において、胃がん患者では102個、唾液腺がん患者では108個のネオアンチゲンを同定し、その中には一塩基多型由来変異 (SNV) およびフレームシフト変異に由来するT細胞エピトープが含まれていた。同一手順により、ステージIVがん患者全員のCTCから多数のネオアンチゲンを同定することに成功した。これは、腫瘍生検を必要とせずに、患者個別のネオアンチゲンをCTCから同定可能であることを示す。

本手法は、ペプチドワクチン、樹状細胞ワクチン、mRNAワクチン治療を含む、迅速で個別化された免疫療法戦略の実現に資する可能性を有する。

キーワード

アフエーシス、CTC、ネオアンチゲン、CD45、EpCAM、ビメンチン

はじめに

免疫チェックポイント阻害薬が、2000年代初頭に転移性悪性黒色腫の患者に対して初めて導入され、がん治療における重要な節目となり、免疫療法を広く注目の的とした(1)。免疫チェックポイント阻害薬の完全奏効(CR)率は依然として低いものの、病勢安定(SD)を含む全体の病勢制御率は、多くの患者において全生存期間の延長に寄与してきた(2, 3)。しかしながら、その病勢制御率はなお50%にとどまり(4)、治療成績を改善する新たな手段の必要性を示している。免疫チェックポイント阻害薬の開発初期から反応率は改善してきたとはいえ、切除不能または転移性悪性黒色腫に承認されたイピリマブの推定奏効率は、2011年の0.14%から2018年の12.46%へと向上したにすぎない(5)。免疫チェックポイント阻害薬の奏効率は、患者の腫瘍変異負荷(TMB)、がん種、併用療法により大きく異なる(6)。チェックポイント阻害薬によって解放されたT細胞が標的とする潜在的ネオアンチゲンの数が限られる低TMB患者では、有効性が阻害されやすく、免疫療法薬は大きな課題に直面している(7)。この制約を克服するには、免疫チェックポイント阻害薬の治療有効性を高める追加戦略が必要である。

ネオアンチゲンは、ゲノム変異、RNAスプライシング異常、翻訳後修飾の異常、ウイルスのオープンリーディングフレームなどの機序により腫瘍細胞が産生する腫瘍特異的抗原である(8)。腫瘍随伴抗原(TAA)が非変異の自己抗原であるのに対し、ネオアンチゲンは中枢性T細胞トランスの対象とならず、高い免疫原性を示すことが知られている(9)。中枢トランス機構を回避することで、免疫系はより強力な腫瘍特異的免疫応答を活性化できる。その結果、ネオアンチゲンに基づく治療は、個々の腫瘍を精密に標的化することにより、治療成績を大きく改善し得る可能性を有する。しかし、個別化腫瘍治療を大規模に実現するには、なお多くの課題を克服する必要がある。個別化治療の開発に不可欠な第一歩である腫瘍生検の採取は、実務的かつ倫理的制約を伴い、治療対象を切除可能腫瘍の患者に限定してしまう。血中に放出される循環腫瘍細胞(CTC)は、低侵襲な代替手段を提供する。CTCは、がんの早期診断、予後評価、治療モニタリングのバイオマーカーとして用いられてきた(10)。アフエーシスおよびフローサイトメトリーによるCTC濃縮法は報告されているものの(11–13)、ネオアンチゲン同定への有用性については未解明である。

そこで本研究では、蛍光活性化セルソーティング(FACS)によるCTC分離とエクソームシーケンスを組み合わせ、血液から直接、腫瘍特異的ネオアンチゲンを検出する新規ワークフローを提示し、個別化免疫療法に新たな方向性を示す。

方法

患者選択

本研究は、医療法人「医創会」(承認番号:201903)、特定非営利活動法人「こどもたちのこどもたちのこどもたちのために」(承認番号:21-1)、および武蔵野大学(承認番号:R1-1)の審査委員会の承認を受けた。末梢血単核球(PBMC)は、ステージIVのがん患者11例(肺がん1例、膀胱がん2例、乳頭部がん1例、乳がん2例、肝細胞がん1例、胆道がん1例、横紋筋肉腫1例、胃がん1例、唾液腺がん1例)から、文書によるインフォームド・コンセント取得後に採取した。その後患者は、銘煌CITクリニックまたは九州厚生会クリニックにおいて、腫瘍随伴抗原でパルスした樹状細胞(DC)ベースの免疫療法を受けた。対照として、健常ボランティア2名からも、文書によるインフォームド・コンセント取得後にPBMCを採取した。白血球アフエーシスは、これらのボランティアに対して銘煌CITクリニックで実施した。

白血球アフエーシス

PBMCは、COBE SPECTRA (Cobe Laboratories, Lakewood, CO, USA)を用い、既報(14, 15)のとおり患者および健常ボランティアに実施した5リットルの白血球アフエーシスにより取得した。回収細胞は、Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)を用いた密度勾配遠心により分離した。軽比重画分は42.5–50%界面に位置し、以降の処理のため注意深く回収した。

細胞は冷却したリン酸緩衝食塩水 (PBS) に再懸濁し、10 cm プラスチックディッシュ (Primaria™™, Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA) 上で37°C、30分間インキュベートして付着を促した。インキュベート後、非付着細胞 (単球除去PBMC; m-PBMC) を回収し、循環腫瘍細胞 (CTC) 分離のためCell Banker (ゼノアック、福島、日本) で凍結保存した。残りの付着細胞は樹状細胞 (DC) 調製に用いた。

フローサイトメトリー解析およびソーティング

凍結保存細胞を解凍後、2%胎牛血清 (FBS) および2 mMエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含むPBSで洗浄し、その後の染色解析およびセルソーティングに供した。抗体は最適濃度で添加し、4°Cで30分間インキュベートして標的細胞集団を染色した。本研究で使用した抗体は以下のとおりである: CD45 PE (BioLegend, San Diego, CA, USA)、細胞表面ビメンチン (CSV、クローン84-1) APC (Abnova, Taipei, Taiwan)、PE mouse IgG1 κ アイソタイプコントロールおよびAPC mouse IgG2b κ アイソタイプコントロール (BioLegend)、Pacific Blue™ 抗ヒトLineage カクテル (BioLegend)、Human Lineage Cocktail 4 (BD Biosciences Pharmingen)、EpCAM FITC (Biomab, Taipei, Taiwan)。死細胞除外には、プロピジウムヨウ化物 (PI; Sigma-Aldrich) 染色、または7-アミノアクチノマイシンD (7AAD) を随時利用した。細胞の解析およびソーティングは、SH800セルソーター (Sony, Tokyo, Japan) で実施した。

パパニコロウ染色

前述の手順で得た約2,000~3,000個の細胞を少量のPBSに懸濁し、ガラススライドに塗抹したのち、M-FIX™スプレー (Sigma-Aldrich) で固定した。固定後、細胞学的解析のためにパパニコロウ染色を施した。

デオキシリボ核酸の抽出

ソーティングした各細胞画分からのDNA抽出は、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Germany) を用い、製造業者の手順に従って実施した。全サンプルのDNA濃度は、QuantiFluor® ONE dsDNA System (Promega Corporation) を用い、Quantus™ Fluorometer (Promega Corporation, Madison, WI, USA) で評価した。DNA濃度が少なくとも240 ngのサンプルを、エクソームシーケンス解析に供した。

エクソームシーケンス条件

Twist社のエクソームパネルを使用し、約50 Mbpの領域をカバーした。ライブラリー調製は、Picoruptorによる超音波断片化とKAPA Hyper Prepキットを用いて実施した。

解析条件

解析はDNAチップ研究所で実施した。カバレッジは約100X~200X (Seq QC標準) で、目標リード量は10 Gb、サーフェスカバレッジは200Xとした。参照ゲノムはhg38を用いた。腫瘍—正常の体細胞変異解析はStrelkaで行い、HLAタイピングはKouramiで実施した。カスタムエクソームパネルは、TWIST BiosciencesのTWIST Alliance VCGS ExomeおよびTWIST Exome 2.0の遺伝子領域を統合してカバーした。シーケンシングはIllumina NextSeq2000で150塩基ペアードエンド (PE) モードにより行い、VCFファイルを生成した。

ネオアンチゲン固定

エクソームシーケンスで得られたVCFファイルをAncer®プラットフォーム (EpiVax Therapeutics) で解析し、患者特異的ネオアンチゲンを同定した(16)。概要として、非同義変化を生じる各変異について、正常配列と変異配列のアミノ酸セグメントのペアを抽出した。抽出したペア配列は、患者のHLAに拘束される仮想的なHLAクラスIおよびクラスIIのT細胞エピトープの存在についてEpiMatrixで評価した。腫瘍配列で新たに検出された、または正常側と比較してEpiMatrixスコアに有意な変化がみられた予測T細胞エピトープをネオエピトープとラベル付けした。さらにJanusMatrixにより、ヒトプロテオームとの広範な交差保存性を示す配列をフラグ付けして除外した。次に、変異由来の元配列をトリミングして、自己非由来のHLAクラスIおよび/またはクラスIIネオエピトープを含む14~25-merのネオアンチゲン配列を作成した。最後に、予測免疫原性に基づきネオアンチゲンを順位付けし、Ancerスコアを付与した。

結果

m-PBMCのフローサイトメトリー解析

図1は、乳頭部がんステージIV患者由来のm-PBMCについて、抗EpCAM抗体 (図1A) および抗Vimentin抗体 (図1B) で染色したフローサイトメトリー解析の結果を示す。CD45—EpCAM+細胞およびCD45—Vimentin+細胞の割合は、それぞれ0.43%と0.80%であった。CD45—EpCAM+細胞の染色強度はCD45—Vimentin+細胞よりも著しく低く、図1AではCD45—EpCAM+細胞の存在を確定的に示すことが困難であった。

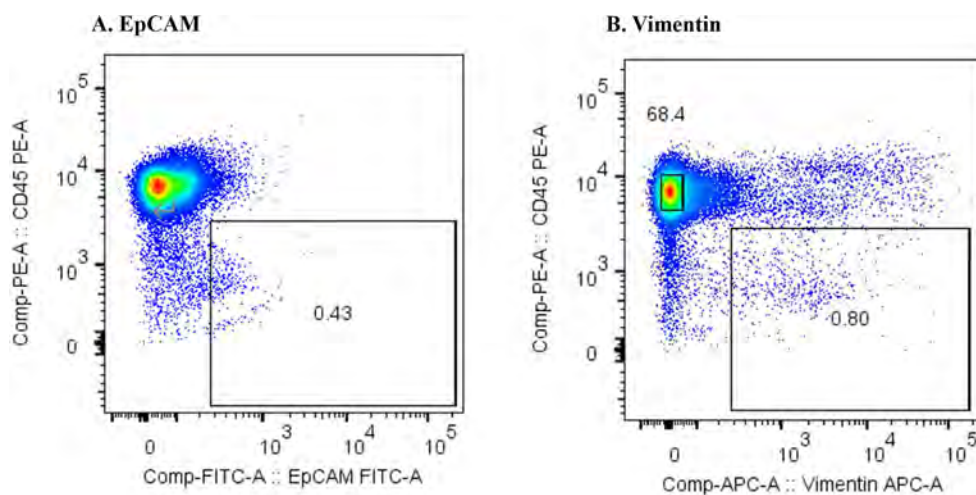


図1

(A) 乳頭部がん患者から得た単球除去PBMC (m-PBMCs) のフローサイトメトリー解析。y軸はCD45 PEの強度、x軸はEpCAM FITCの強度を示す。

(B) 同一患者由来のm-PBMCのフローサイトメトリー解析。y軸はCD45 PEの強度、x軸はVimentin APCの強度を示す。

健常ボランティア2名から採取した試料では、CD45-EpCAM+細胞およびCD45-Vimentin+細胞の割合はいずれも非常に低く、ボランティア1名目ではそれぞれ0.057%および0.083% (図2A、B)、2名目ではそれぞれ0.072%および0.057%であった。図3は、肺癌ステージIV患者由来のm-PBMCの解析結果を示す。CD45-EpCAM+画分 (図3A) に含まれる細胞はごくわずか (0.05%) だったのに対し、CD45-Vimentin+画分 (図3B) は0.32%と高かった。CD45-Vimentin+細胞の染色強度はCD45-EpCAM+細胞より高く、このパターンは本研究で解析したすべてのステージIVがん患者のm-PBMCで一貫して認められた。

上皮性悪性腫瘍細胞は一般に細胞表面に上皮マーカーEpCAMを発現するが、しばしば上皮間葉転換 (EMT) を起こし、EpCAMを喪失してVimentinなどの間葉系マーカーを発現する。EMTは肺癌で高頻度に生じることが知られており (17)、図3の結果と整合する。本研究対象患者のCTCは高度のEMTを経ていた可能性が高く、そのため抗EpCAM抗体で検出される細胞数が減少していたと考えられる。さらに、CTCは抗EpCAM抗体よりも抗Vimentin抗体でより効率よく捕捉されるとする報告もある (18)。このため、以降の研究では抗Vimentin抗体を用いて実施した。

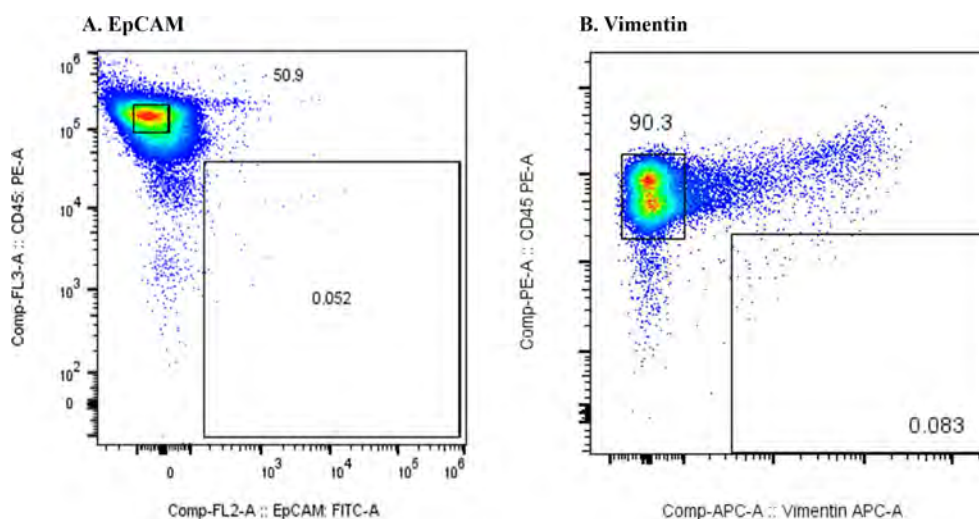


図2

(A) 健常ボランティアから得た単球除去PBMC (m-PBMCs) のフローサイトメトリー解析。y軸はCD45 PEの強度、x軸はEpCAM FITCの強度を示す。

(B) 同一被験者由来のm-PBMCのフローサイトメトリー解析。y軸はCD45 PEの強度、x軸はVimentin APCの強度を示す。

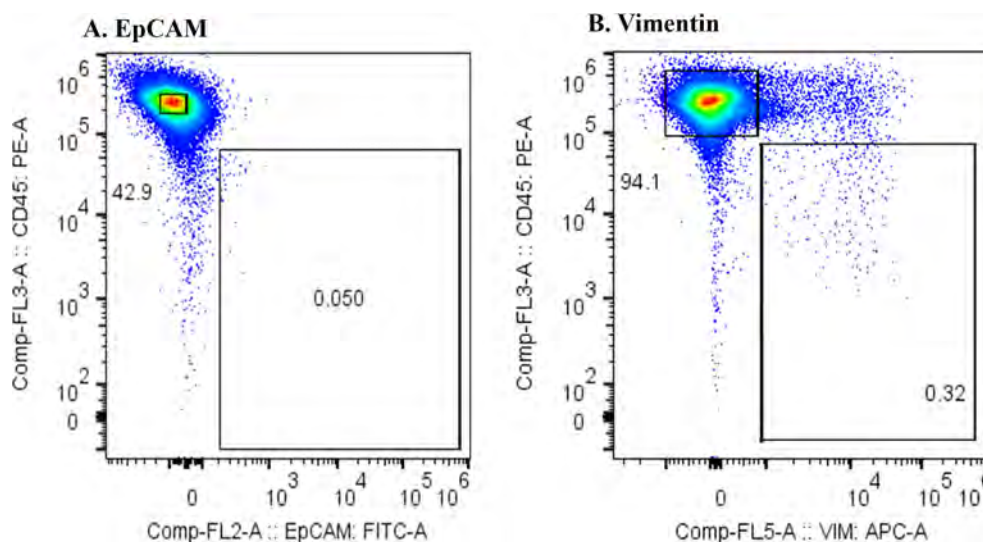


図3

(A) 肺癌患者から得た単球除去PBMC (m-PBMCs) のフローサイトメトリー解析。y軸はCD45 PEの強度、x軸はEpCAM FITCの強度を示す。

(B) 同一患者由来のm-PBMCのフローサイトメトリー解析。y軸はCD45 PEの強度、x軸はVimentin APCの強度を示す。

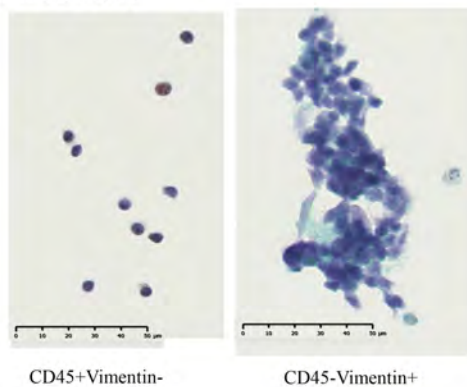
アフエーシスで得た全ステージIVがん患者のm-PBMCに対するフローサイトメトリー解析では、CD45⁺Vimentin⁺画分に有意な数の細胞が認められた一方で、健康者では同画分の細胞は極めて少なかった。これらの所見は、CD45⁺Vimentin⁺画分の細胞が循環腫瘍細胞 (CTC) を表している可能性を示唆する。これを検証するため、以下の実験を行った。

CD45⁺Vimentin⁺画分細胞の細胞学および造血系系統の検討

次に、細胞学的検査により、CD45⁺Vimentin⁺画分にはがん細胞が存在するかどうかを検討した。

CD45⁺Vimentin⁺画分およびCD45⁺Vimentin⁺画分で細胞をソーティングした後、塗抹・固定し、図4に示すようにパピニコロウ染色を行った。図4AはステージIV乳がん患者の結果であり、CD45⁺Vimentin⁺画分に含まれる細胞はすべて正常リンパ球であった。これに対し、CD45⁺Vimentin⁺画分には異型細胞の集簇が認められ、病理診断はClass Vであった。図4BはステージIV肝細胞がん患者の細胞を示す。図4Aと同様に、CD45⁺Vimentin⁺画分では (小型・大型) 正常リンパ球のみが観察された。一方、CD45⁺Vimentin⁺画分でも異型細胞の集簇が確認され、やはり病理診断はClass Vであった。これらの結果に基づき、CTC画分と推定したCD45⁺Vimentin⁺画分には、実際にはがん細胞が含まれていることが示された。

A. Breast cancer



B. Hepatocellular carcinoma

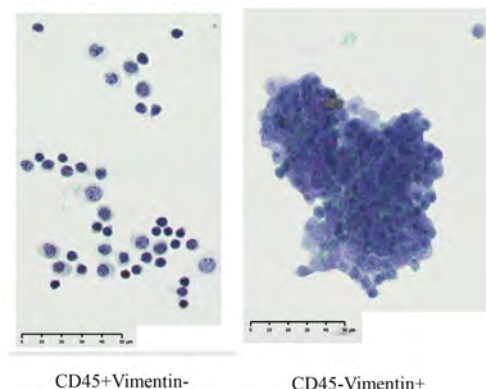


図4

CD45⁺Vimentin⁺画分およびCD45⁺Vimentin⁺画分細胞の細胞学的検査。塗抹・固定細胞にパピニコロウ染色を実施した。

(A) ステージIV乳がん患者由来のCD45⁺Vimentin⁺画分およびCD45⁺Vimentin⁺画分の細胞。

(B) ステージIV肝細胞がん患者由来のCD45⁺Vimentin⁺画分およびCD45⁺Vimentin⁺画分の細胞。

次に、CD45-Vimentin+画分 (CTC画分) におけるがん細胞の割合を検討した。本解析では、CTC画分中の造血系細胞混入の程度を評価するため、多くの造血系細胞に反応するHuman Lineage Cocktail 4 (CD2、CD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD14、CD19、CD20、CD56、CD235aに対する抗体を含む) を用いた。これにより、当該画分におけるがん細胞の割合を推定できる。図5は、肝細胞がん患者のCTC画分における造血系リニエージ解析を示す。該患者のCTC画分 (図5A) を抗CD45抗体および抗ヒトLineage Cocktail 4で再解析したところ、細胞の71.0%が非造血系であることが判明した (図5B: CD45+Vimentin-、図5C: CD45-Vimentin+)。これは、これらの細胞が循環がん細胞であることを示唆する。表1には、さらに4名の患者のm-PBMCにおける造血系リニエージ解析の結果を示し、CTC画分中の細胞の50.2%から73.4%ががん細胞に分類可能であったことが示されている。総じて、これらの結果は、CTC画分に少なくとも50%の純度でがん細胞が存在することを確認するものである。

CTC画分細胞および正常造血細胞を用いたネオアンチゲンの同定

正確なネオアンチゲン同定を達成するには、少数のCTCの場合、DNAを増幅するか、あるいはCTCを培養してエクソームシーケンスを行う必要がある。この様な操作を必要としない場合は、細胞集団の高い純度と、十分量のCTCの双方が求められる。本研究でソーティングしたCTC画分は、核酸増幅や細胞培養を用いることなくこれらの条件を満たし、エクソームシーケンスおよびネオアンチゲン同定を実施可能であった。

図6は、ステージIV胃がん患者由来のm-PBMCのフローサイトメトリー解析を示す。同患者のm-PBMCは4本のバイアルに分注し、そのうち1本の解析結果を図6に示した。ソーティングでは、正常造血細胞から成るCD45+Vimentin-画分 (正常造血画分) と、主としてCTCから成るCD45-Vimentin+画分 (CTC画分) を分離した。CTC画分からは合計45,665個の細胞を得た。正常造血画分のソーティングは、300万個の細胞が回収された時点で終了した。別のバイアルについても同様にソーティングを行い、CTC画分から48,971個の細胞を得た。結果として、2本のm-PBMC/バイアルに含まれるCTC画分から合計94,636個の細胞を回収し、これらの分離CTCからは360 ngのDNAを抽出した。次に、正常造血画分の300万個の細胞から1,260 ngのDNAを抽出した。正常造血画分およびCTC画分から得られたDNAに対してエクソームシーケンスを実施し、その後ネオアンチゲン同定を行った。CD45+Vimentin-細胞 (正常造血画分) およびCD45-Vimentin+細胞 (CTC画分) についてエクソームシーケンスを行い、胃がん患者ではAncerプラットフォームにより102個のネオアンチゲンを同定した。Ancerで同定された上位30個のネオアンチゲンを表2に示す。ここで、長いネオアンチゲンペプチドには、複数の短いHLA結合コアが重なって含まれる場合がある。ネオアンチゲンの大半は一塩基変異 (SNV) に由来していたが、1つ (順位1位) はフレームシフト変異に由来していた。図7はステージIV唾液腺がん患者のフローサイトメトリープロファイルを示し、この患者からCTCを回収した。

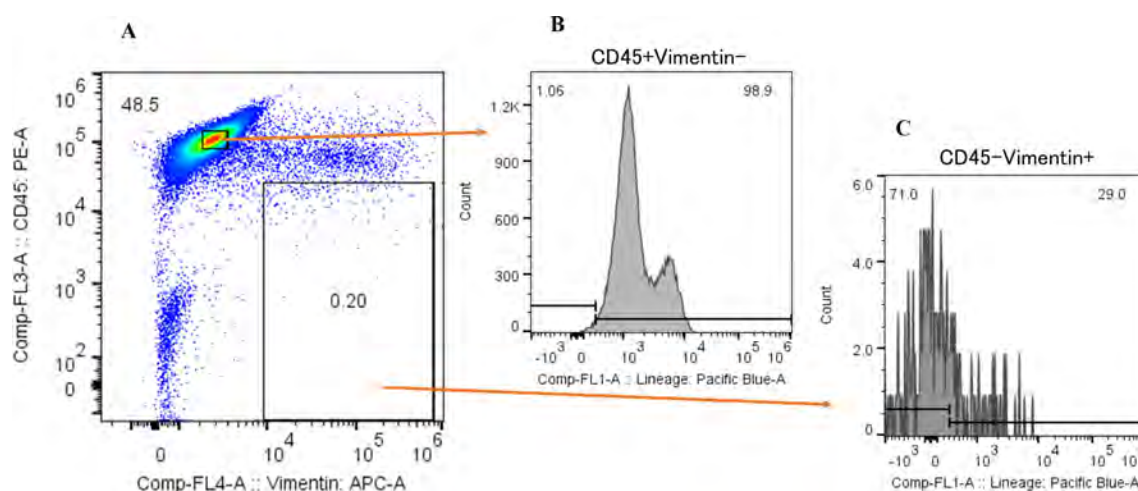


図5

CD45-Vimentin+画分細胞の造血系リニエージ解析。

(A) 肝細胞がん患者由来m-PBMCのフローサイトメトリー解析。y軸はCD45 PEの強度、x軸はVimentin APCの強度を示す。

(B) (A)のCD45+Vimentin-画分細胞のフローサイトメトリーによるリニエージ解析。y軸は細胞イベント数、x軸はhuman lineage cocktail 4 Pacific blueの強度。

(C) (A)のCD45-Vimentin+画分細胞のフローサイトメトリーによるリニエージ解析。y軸は細胞イベント数、x軸はhuman lineage cocktail 4 Pacific blueの強度。

表1 ステージIVがん患者から得たm-PBMCにおける造血系リニエージ解析

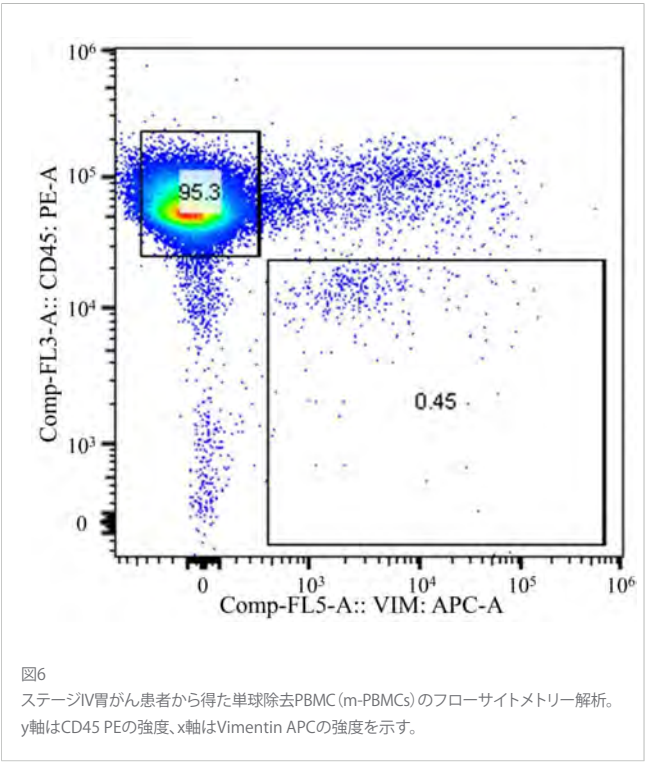
Cancer Type	lineage-(%)	lineage+(%)
hepatocellular carcinoma	71.0	29.0
rhabdomyosarcoma	50.2	49.8
biliary tract cancer	73.4	26.6
breast cancer 1	71.2	28.8
breast cancer 2	72.4	27.8

CTC画分46,423個の細胞から、合計603 ngのDNAを抽出した。CD45+Vimentin-細胞（正常造血画分）およびCD45-Vimentin+細胞（CTC画分）についてエクソームシーケンスを行い、唾液腺がん患者ではAncerプラットフォームにより108個のネオアンチゲンを同定した。上位30個のネオアンチゲンは表3に示し、表2と同様の形式である。フレームシフト変異に由来するネオアンチゲン（順位21位）も検出された。以上の手順により、これまでに解析した全てのステージIVがん患者のCTCから、多数のネオアンチゲンを同定することに成功した。

考察

アフエーシスによるCTC採取

循環腫瘍細胞（CTC）を分離するためのアフエーシスの開発と応用は、がん研究および治療戦略における大きな前進を意味する。CTC採取にアフエーシスを用いた研究の多くは、治療効果の評価（19–21）、予後予測（22, 23）、およびリキッドバイオプシー（24）に焦点を当ててきた。



診断目的の白血球アフエーシスはCTCの検出頻度を大きく改善し、臨床的に安全で有効な方法であることが示された（25）。別の研究では、アフエーシスが多数のCTCを非侵襲的に収集できることがさらに強調された（26）。近年の検討はRNAシーケンス（27）や培養したマンモスフェアのヌードマウスへの移植（28）にまで広がっているが、我々の研究は、核酸増幅や長期の細胞培養を行うことなく、CTCを用いてネオアンチゲンを同定することに初めて成功した。CTC画分に悪性細胞が存在することは細胞学的検査で確認され、フローサイトメトリーによるリニエージ解析では、CTC画分中の細胞の少なくとも50%が造血系由来ではなく、比較的高純度のがん細胞で構成されることが示された。CTC画分からソートした細胞と正常血液細胞を用いることで、腫瘍組織を採取することなく患者由来のネオアンチゲンを同定できた。この成功は、我々のアフエーシス手法が十分な数の高純度CTCを得られたことにより可能となった。

腫瘍内および腫瘍間の不均一性

がんには腫瘍内不均一性と腫瘍間不均一性の両方が存在し、腫瘍全体像を反映するネオアンチゲンの同定を複雑にする（29, 30）。複数の転移部位間で共有されるネオアンチゲンはごく一部にとどまり、肺がん症例では原発巣と転移巣で共有されるネオアンチゲンは平均19.6%であることが示されている（31）。別の研究では、1人の患者において原発巣およびすべての転移巣に共通するネオアンチゲンはわずか4.4%であった（32）。これらの知見は、腫瘍の遺伝学的景観全体を代表するネオアンチゲンを同定するためには、複数の腫瘍部位からの情報を取り入れる必要があることを強調する。先行研究は、CTCが腫瘍不均一性をモニタリングし、診断学的価値を提供し得ることを示している（11）。このことは、CTCは原発腫瘍のバルク解析では検出されない遺伝的変異を捉え得るという大きな利点を有し、包括的なゲノム情報を提供できる点は特筆に値する。さらに、いくつかの研究は、CTCがバルク腫瘍解析で検出されない遺伝的変異を捕捉し得ることを示唆している。例えば、悪性黒色腫および乳がん患者の解析では、原発巣と転移巣の双方に存在するドライバー変異がCTCで検出されるとともに、微小転移部位に由来する追加の変異も同定されている（33, 34）。これらのエビデンスは、CTCを用いて同定されたネオアンチゲンが患者のがん全体の不均一性を代表し得る可能性を示唆しており、個別化免疫療法の有効性向上に資することが期待される。

表2 ステージIV胃癌患者で同定されたネオアンチゲン

Rank	Gene	AA Mutation	Sequence ID	Optimized Mutated Sequence	Immunogenicity Score		VAF	Ancer [®] Score	Minimal Neopeptides: HLA Restriction
					Class I	Class II			
1	ZNF717	Thr577Pro&Ter51	ZNF717_ENST00000478296_THR577PRO&TER51	<u>IRE</u> LTQERNLTYYVMNV <u>E</u> KPFIAHS	13.04	2.7	0.158	2.485	LTQERNLT: DRB1*0101, LTQERNLT: B1501 (strong ligand), TYVMNVKEPF: A2402 (strong ligand), YVMNVKEPF: A2402, YVMNVKEPF: B0702, YVMNVKEPF: B1501 (strong ligand), YVMNVKEPF: B1501, VMNVKEPF: DRB1*1501
2	KLK10	Ala34Val	KLK10_ENST00000309958_ALA34VAL	AQLWAAEA <u>V</u> LLPQNDR	5.71	4.44	0.046	0.470	AQLWAAEA: B1501, LWAAEA: DRB1*0101, LWAAEA: DRB1*1501, LWAAEA: A2402, LWAAEA: A2402
3	FZR1	Thr298Met	FZR1_ENST00000313639_THR298MET	IRFWNNMLTGQPLQC	7.65	3.08	0.042	0.447	FWNNMLTGQPL: A2402 (strong ligand), FWNNMLTGQPL: B0702, WNNMLTGQPL: DRB1*0101 (strong ligand), WNNMLTGQPL: A2402
4	ZNF778	Lys122Thr	ZNF778_ENST00000306502_LYS122THR	IPCQKTLFTIGE <u>Q</u> ESVL	15.06	0	0.028	0.418	IPCQKTLFTI: A2402, IPCQKTLFTI: B0702 (strong ligand), PCQKTLFTI: A2402, KTLFTIGE: B1501, TLTFTIGE: A2402, TLTFTIGE: B1501 (strong ligand), FTFTIGE: B1501
5	LEMD3	Ser164Pro	LEMD3_ENST00000308330_SER164PRO	RDQAGGGGRKDRAPLQYRGLKAPP	5.17	0	0.069	0.355	GGRRKDRAPL: B0702 (strong ligand), APLQYRGLK: B0702, APLQYRGLKA: B0702
6	P14KB	Arg542Trp	P14KB_ENST00000368872_ARG542TRP	REGSPYGHLPNWWLLSVIVKC	20.18	3.82	0.014	0.347	SPYGHLPNWW: A2402, PYGHLPNWWL: A2402 (strong ligand), YGHLPNWWL: DRB1*0101, GHLPNWWL: A2402, LPNWWLLSV: B0702 (strong ligand), LPNWWLLSV: A2402, LPNWWLLSV: B0702 (strong ligand), WWLLSVIVK: DRB1*0101, WWLLSVIVKC: A2402
7	MAML3	Leu77Pro	MAML3_ENST00000509479_LEU77PRO	KHSTVVERQRQEGCRRHHVNC	3.92	0	0.087	0.339	VVERPRQR: B0702, RPRQIEGC: B0702
8	ME3	Arg435His	ME3_ENST00000393324_ARG435HIS	RDMASFHEHP <u>I</u> PFALS	9.83	0	0.034	0.333	RDMASFHEHP: A2402, MASFHEHP: B0702, MASFHEHP: A2402, ASFHEHP: B1501, SFHEHP: A2402

(続く)

表2 続

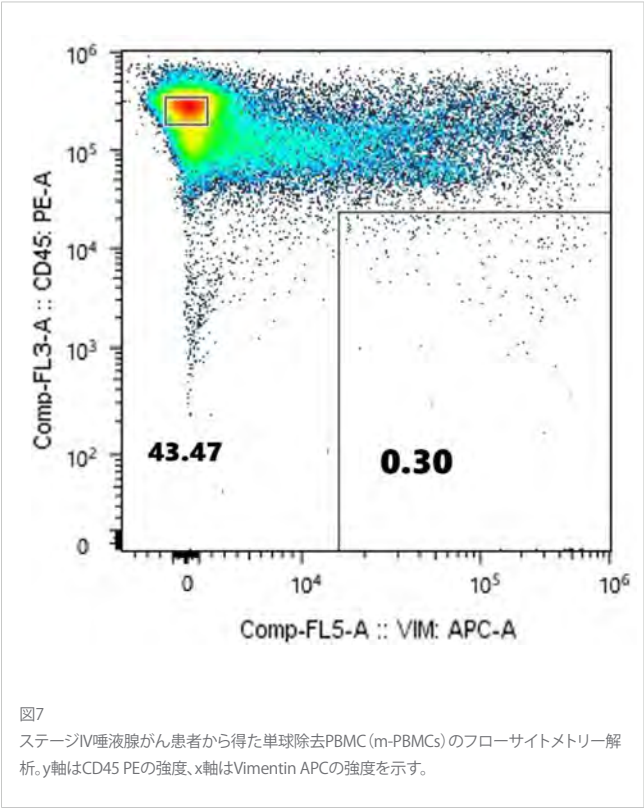
Rank	Gene	AA Mutation	Sequence ID	Optimized Mutated Sequence	Immunogenicity Score		VAF	Ancer® Score	Minimal Neopeptides: HLA Restriction
					Class I	Class II			
9	BHLHE41	Ser147Ala	BHLHE41_ENST00000242728_SER147ALA	TCAKEVLQYLARFESWTPREPRC	7.6	3.86	0.028	0.318	LQYLARFES: DRB1*0101, LQYLARFES: DRB1*1501, LQYLARFESW: A2402, QYLARFESW: A2402 (strong ligand), QYLARFESWT: A2402
10	NUP210	Ala1540Thr	NUP210_ENST00000254508_ALA1540THR	GSVTYYEVTGHLRT	8.39	1.77	0.028	0.282	TVYYEVTGHL: A2402, TVYYEVTGHL: B1501, VYYEVTGHL: A2402 (strong ligand), VYYEVTGHLR: A2402 (strong ligand), YYYEVTGHLR: DRB1*0101
11	IGF2R	Asn2020Ser	IGF2R_ENST00000356956_ASN2020SER	SLVHSGVSYINLC	8.69	4.13	0.022	0.279	SLVHSGVSY: B1501 (strong ligand), SLVHSGVSY: B1501 (strong ligand), LVHSGVSY: B1501 (strong ligand), VHSGVSY: DRB1*0101, VHSGVSY: DRB1*1501 (strong ligand)
12	SAP18	Gly57Ala	SAP18_ENST00000382533_GLY57ALA	RVFTTNNARHHRMDEFSGNVPS	6.42	1.64	0.031	0.248	RVFTTNNAR: B1501, RVFTTNNARH: B1501 (strong ligand), TTNNARHHRM: B1501
13	KCNN3	Ala110Gly	KCNN3_ENST00000271915_ALA110GLY	HSSPTAFRGPPSSNST	4.38	1.87	0.038	0.238	SPTAFRGPP: B0702, SPTAFRGPPS: B0702, FRGPPSSNS: DRB1*1501
14	IRAK1	Phe196Ser	IRAK1_ENST00000369974_PHE196SER	ESSVSLIQGARPSFCWP	10.77	0	0.022	0.237	LLQGARPSF: A2402, LLQGARPSF: B1501 (strong ligand), LQGARPSF: A2402, LQGARPSF: B1501 (strong ligand), GARPSFCW: A2402
15	AATK	Lys181Gln	AATK_ENST00000326724_LYS181GLN	RALQHSNLLQCLAQCAEVT	4.27	3.84	0.025	0.204	RALQHSNLL: DRB1*1501, RALQHSNLL: A2402, RALQHSNLL: B0702 (strong ligand), LQHSNLLQC: DRB1*1501, LQHSNLLQCL: B1501
16	CSNK2A3	Ile133Thr	CSNK2A3_ENST00000528848_ILE133THR	QTLTDYDTRFYMEILK	10.3	0	0.018	0.188	TLTDYDTRF: B1501, TLTDYDTRFY: B1501, LTDYDTRFY: B1501, TDYDTRFYMY: A2402, TDYDTRFYMY: B1501, DYDTRFYMY: A2402
17	PLA2G4D	Ser434Thr	PLA2G4D_ENST00000290472_SER434THR	VDLWALVLETMLHGQV	3.87	1.68	0.033	0.183	LWALVLETM: A2402 (strong ligand), LWALVLETML: A2402 (strong ligand), LETMLHGQV: DRB1*1501

(続)

表2 続

Rank	Gene	AA Mutation	Sequence ID	Optimized Mutated Sequence	Immunogenicity Score		VAF	Ancer® Score	Minimal Neopeptides: HLA Restriction
					Class I	Class II			
18	BCL11B	Cys788Tyr	BCL11B_ENST00000345514_CYS788TYR	KTHGQIGKEYRCDIYQMPSV	6.34	0	0.028	0.180	VYRCDIYQM: A2402 (strong ligand), YRCDIYQMPF: A2402, YRCDIYQMPF: B1501
19	FAT3	Leu1918Gln	FAT3_ENST00000409404_LEU1918GLN	LKVSATDPDSEVPPEQTYSLMEGS	5.24	0	0.034	0.176	VPPEQTYSL: B0702 (strong ligand), VPPEQTYSLM: B0702 (strong ligand)
20	BIN1	Glu347Asp	BIN1_ENST00000259238_GLU347ASP	EQLSLFDDTFVPE	5.79	0	0.030	0.172	QILSLFDDTF: A2402, ILSLFDDTF: A2402, ILSLFDDTF: B1501
21	RNF43	Arg113Gln	RNF43_ENST00000407977_ARG113GLN	ISIVKLESPPQAPRP	0	5.13	0.033	0.171	IVKLESPPQR: DRB1*0101, IVKLESPPQR: DRB1*1501, VKLESPPQRA: DRB1*0101
22	PAQR6	Glu263Lys	PAQR6_ENST00000335852_GLU263LYS	AHWRGVPRPNNSKAPSLT	5.99	0	0.028	0.165	VPRPNNSKA: B0702 (strong ligand), RPNNSKAPS: B0702 (strong ligand), RPNNSKAPSL: B0702 (strong ligand)
23	INTS9	Gln472His	INTS9_ENST00000416984_GLN472HIS	QSHRMDLMIDCHPPAMSYRAE	10.08	0	0.016	0.161	LMIDCHPPA: B0702, LMIDCHPPA: B1501, LMIDCHPPAM: B1501 (strong ligand), MIDCHPPAM: B0702, MIDCHPPAM: B1501
24	PTPN23	Glu603Lys	PTPN23_ENST00000265562_GLU603LYS	VTTDHSEMKKLFKEQLKKYDQLKV	4.3	1.7	0.027	0.160	EMKKLFKEQL: A2402, MKKLFKEQL: DRB1*1501, KLFKEQLKKY: B1501
25	OR52E6	Ser95Pro	OR52E6_ENST00000329322_SER95PRO	WFNIKEIPFGGYLSQ	6.93	0	0.022	0.154	WFNIKEIPF: A2402, NIKEIPFGGY: B1501, KEIPFGGYL: A2402, IPFGGYLSQ: B0702
26	TMEM204	Asp130Asn	TMEM204_ENST00000253934_ASP130ASN	GLVGLPLLSPNAPCWEEAM	5.05	0	0.028	0.141	LPLLSPNAP: B0702, LPLLSPNAPC: B0702, LLSPNAPCW: A2402
27	KDM7A	Arg644Ser	KDM7A_ENST00000397560_ARG644SER	KPLNGHFTSVKSEL	7.03	1.66	0.016	0.136	KPLNGHFTSV: B0702 (strong ligand), GHFTSVKSEL: A2402 (strong ligand), FFTSVKSEL: A2402
28	MRGPRF	Lys16Arg	MRGPRF_ENST00000320913_LYS16ARG	MAGNCSEAHPGNRRNRSATGGGP	3.71	0	0.036	0.133	HPGNRRNRS: B0702, HPGNRRNRSVA: B0702 (strong ligand)
29	PTPRQ	Val687Asp	PTPRQ_ENST00000616559_VAL687ASP	RYAASTHDGESSISENDIFVRT	3.94	0	0.033	0.131	ASTHDGESSI: B0702, STHDGESSI: B1501
30	DKK2	Lys202Gln	DKK2_ENST00000285311_LYS202GLN	CCARHFWTQICKPVLHQGE	6.78	1.84	0.015	0.130	CARHFWTQI: B0702, FWTQICKPVL: A2402 (strong ligand), FWTQICKPVL: B0702, WTQICKPVL: DRB1*0101

下線付きの最適化変異配列(ランク1)はフレームシフト変異を示す。AA Mutation: アミノ酸変異。Optimized Mutated Sequence: 複数の短いT細胞エピトープを含む長鎖ペプチド。ネオエピトープ。Immunogenicity Score: コード化されたネオエピトープの免疫原性をヒトプロテオームとの相同性で調整した指標(スコアが高いほど免疫原性が高いことを示す)。VAF: 変異対立遺伝子頻度。Ancer® Score: 予測T細胞エピトープにおけるHLAおよびTCR相互作用残基への変異の影響と免疫原性の高さの両方に基づき。EpiVax Therapeuticsがネオエピトープを順位付けするために定めた指標。



第一に、この手法は非侵襲的な腫瘍サンプリングを可能にし、患者にとって困難かつリスクとなり得る腫瘍組織の侵襲的生検を不要にする。第二に、新鮮ながん細胞を迅速に収集できるため、解析および治療計画を速やかに開始でき、個別化治療戦略の立ち上げを加速する。第三に、同定されたネオアンチゲンは、ペプチド治療、樹状細胞ワクチン、mRNAワクチン治療など、多様な治療モダリティに広く適用可能であり、その利用可能性を拡大する。最後に、ネオアンチゲンに基づく治療は免疫チェックポイント阻害薬と併用できる可能性があり、その治療効果を高め得る。これらの特徴により、CTC由来のネオアンチゲン同定は、がん免疫療法の精度と有効性を前進させる上で変革的なツールとして位置づけられる。

有望ではあるものの、本研究にはいくつかの限界がある。第一に、CTCがすべての腫瘍病変の遺伝的不均一性をどの程度反映するかについては、なお包括的な検証を要する。我々の知見は、CTCの代表性を支持する既存エビデンスと整合するものの、がん種横断での確認が必要である。第二に、アフエーシスおよびFACSによるCTC分離では、不純物やサンプリングバイアスが生じ得る点に留意すべきである。すなわち、白血球の混入や表面マーカーに基づく選別が、回収率やクローン性に影響を及ぼし得る。さらに、バルクシーケンシングでは混合集団の平均化により、サンプル内不均一性が覆い隠される可能性がある(35)。加えて、CTC自体が高度に不均一である場合、動的なクローン進化の一断面しか反映せず、原発巣または転移巣に存在するマイナーサブクローンを過小評価する可能性がある(36)。

表3 ステージIV唾液腺がん患者で同定されたネオアンチゲン

Rank	Gene	AA Mutation	Sequence ID	Optimized Mutated Sequence		Immunogenicity Score		VAF	Ancestral Score	Minimal Neopeptides: HLA Restriction
						Class I	Class II			
1	DISP2	Trp168Cys	DISP2_ENST00000267889_TRP168CYS	KSYSQLIAECPVAVLML		30.12	0	0.033	0.980	YSQLIAECPV: A0201, YSQLIAECPV: A0207, YSQLIAECPV: B5101 (strong ligand), SQLIAECPV: A0201, SQLIAECPV: A0207, QLIAECPV: A0201, QLIAECPV: A0207, QLIAECPV: A0201 (strong ligand), QLIAECPV: A0207 (strong ligand), LIAECPV: A0201 (strong ligand), LIAECPV: A0207 (strong ligand), LIAECPV: B5101, LIAECPV: A0201, LIAECPV: A0207, LIAECPV: B5101
2	BTBD17	Trp321Cys	BTBD17_ENST00000375366_TRP321CYS	RNTLAPACGAPWVINNP		12.14	0	0.060	0.731	LAPACGAPW: B5101 (strong ligand), LAPACGAPW: B5101, APACGAPW: B5101 (strong ligand), APACGAPW: A0201,

(続く)

表3 続

Rank	Gene	AA Mutation	Sequence ID	Optimized Mutated Sequence	Immunogenicity Score		VAF	Ancel® Score	Minimal Neopeptides: HLA Restriction
					Class I	Class II			
									APACGAPWYI: A0207, APACGAPWYI: B5101 (strong ligand)
3	MOB3C	Gly179Ser	MOB3C_ENST00000271139_GLY179SER	LLMDWIESLNDEEVFPTRVGVP	20.46	1.72	0.029	0.634	LLMDWIESL: A0201 (strong ligand), LLMDWIESL: A0207 (strong ligand), LLMDWIESL: A0201 (strong ligand), LLMDWIESL: A0207 (strong ligand), LLMDWIESL: B5101 (strong ligand), LMDWIESL: A0201, LMDWIESL: A0207, MDWIESLN: DRB1*0403
4	KCNH4	Ile379Val	KCNH4_ENST00000264661_ILE379VAL	AHWMACYWYVIGRRE	18.68	0	0.031	0.581	AHWMACYWYV: A0201, AHWMACYWYV: A0207, HWMACVWYV: A0201 (strong ligand), HWMACVWYV: A0207 (strong ligand), HWMACVWYV: B5101, WMACVWYV: A0201 (strong ligand), WMACVWYV: A0207 (strong ligand), WMACVWYV: B5101
5	PIM1	Val197Leu	PIM1_ENST00000373509_VAL197LEU	DFGSGALLKDTLYTDFDGTR	17.09	0	0.034	0.579	ALLKDTLYT: A0201, ALLKDTLYT: A0201, ALLKDTLYT: A0207, LLKDTLYT: A0201, LLKDTLYT: A0207, TLYTDFDGTR: A0201, TLYTDFDGTR: A0207
6	HMCN2	Arg4966Gln	HMCN2_ENST00000624552_ARG4966GLN	CSQDCCGTGGPSTLQYQLLPLPL	11.35	0	0.048	0.540	GPSTLQYQL: B5101, GPSTLQYQL: B5101, TLQYQLPL: A0201, TLQYQLPL: A0207, LQYQLPLPL: A0201, LQYQLPLPL: A0207, LQYQLPLPL: B5101
7	SGTA	Gln13His	SGTA_ENST00000221566_GLN13HIS	MDNKKRLAYAIHFLHDQLRH	14.05	4.61	0.027	0.507	RLAYAIHFL: A0201 (strong ligand), RLAYAIHFL: A0207 (strong ligand), LAYAIHFL: A0201 (strong ligand), LAYAIHFL: A0207 (strong ligand), LAYAIHFL: B5101 (strong ligand), YAIHFLHD: B5101, IHFLHDQLR: DRB1*0403, IHFLHDQLR: DRB1*0803
8	PLA2G6	Ala333Val	PLA2G6_ENST00000332509_ALA333VAL	NTALLHAVMRNRFDCVIVLLTHGA	13.14	3.83	0.029	0.499	AVMRNRFDCV: A0201, AVMRNRFDCV: A0207, VMRNRFDCV: A0201, VMRNRFDCV: A0207, MRNRFDCV: (続)

表3 続

Rank	Gene	AA Mutation	Sequence ID	Optimized Mutated Sequence	Immunogenicity Score		VAF	Ancestral Score	Minimal Neopeptides: HLA Restriction
					Class I	Class II			
									B5101, FDCVIVLLT: DRB1*0403, VIVLLTHGA: DRB1*0403
9	IGF2	Met9Val	IGF2_ENST00000381389_MET9VAL	MGIPMGKSVLVLLTF	16.86	0	0.030	0.498	MGIPMGKSVL: B5101, GIPMGKSVLV: A0201, GIPMGKSVLV: A0207, IPMGKSVLV: B5101 (strong ligand), IPMGKSVLV: A0201, IPMGKSVLV: A0207, IPMGKSVLV: B5101 (strong ligand)
10	NXF3	Tyr443Phe	NXF3_ENST00000395065_TYR443PHE	HDLSFLVDMWFQTEWMLC	17.35	0	0.028	0.484	FLVDMWFQTE: A0201 (strong ligand), FLVDMWFQTE: A0207 (strong ligand), FLVDMWFQTE: A0201, FLVDMWFQTE: A0207, VDMWFQTEW: B5101, VDMWFQTEWM: B5101, DMWFQTEWML: A0201, DMWFQTEWML: A0207
11	EFR3B	Ala229Val	EFR3B_ENST00000264719_ALA229VAL	RQRLSIDYVLTGSYDGA	15.27	1.06	0.030	0.482	QLRLSIDYV: A0201, QLRLSIDYV: A0207, QLRLSIDYV: B5101, QLRLSIDYV: B5101, YVLTGSYDG: DRB1*0803
12	PHC2	Met838Ile	PHC2_ENST00000257118_MET838ILE	LKEDHLSAINIKL	10.22	4.06	0.032	0.464	HLSAINIKL: A0201 (strong ligand), HLSAINIKL: A0207 (strong ligand), HLSAINIKL: DRB1*0403, HLSAINIKL: DRB1*0803, HLSAINIKL: A0201 (strong ligand), HLSAINIKL: A0207 (strong ligand)
13	BTBD17	Glu186Gln	BTBD17_ENST00000375366_GLU186GLN	HYAVGTGDEALRQSCQLFLAWN	7.61	0	0.061	0.463	ALRQSCQLFL: A0201, ALRQSCQLFL: A0207, RQSCQLFLA: A0201, RQSCQLFLA: A0207
14	CUEDC1	Lys55Thr	CUEDC1_ENST00000360238_LYS55THR	EENQAMDDFTTMFPNMD	10.42	2.36	0.036	0.454	QAMDDFTTM: B5101 (strong ligand), AMDDFTTMF: A0201, AMDDFTTMF: A0207, AMDDFTTMFP: A0201, AMDDFTTMFP: A0207, FTTMFPNMD: DRB1*0803 (strong ligand)

(続)

表3 続

Rank	Gene	AA Mutation	Sequence ID	Optimized Mutated Sequence	Immunogenicity Score		VAF	Ancestral Score	Minimal Neopeptides: HLA Restriction
					Class I	Class II			
15	PHC2	Arg64Trp	PHC2_ENST00000257118_ARG64TRP	KLKCELCGWVDFAYKFKRS	11.55	0	0.039	0.449	KLKCELCGWV: A0201, KLKCELCGWV: A0207, ELCGWVDEFA: A0201, ELCGWVDEFA: A0207, ELCGWVDEAY: A0201, ELCGWVDEAY: A0207
16	BTBD11	His353Tyr	BTBD11_ENST00000280758_HIS353TYR	KFTVETLEYTVNNDSEIWG	9.58	2.1	0.037	0.430	FTVETLEYT: A0201, FTVETLEYT: A0207, FTVETLEYTV: A0201, FTVETLEYTV: A0207, LEYTVNNDSE: DRB1*0403, YTVNNDSEI: A0201, YTVNNDSEI: A0207
17	OR10H4	Pro139Thr	OR10H4_ENST00000322107_PRO139THR	RYNVLMSTRDCAHLVACT	11.21	2.43	0.031	0.427	YNVLMSTRD: DRB1*0803 (strong ligand), VLMSTRDCA: A0201, VLMSTRDCA: A0207, VLMSTRDCAH: B5101, LMSTRDCAHL: A0201, LMSTRDCAHL: A0207, STRDCAHLV: A0201, STRDCAHLV: A0207
18	ADGRD2	Thr701Ser	ADGRD2_ENST00000334810_THR701SER	GCGVSFCALSTTTFLF	16.82	3.8	0.021	0.425	VSFCALSTTF: B5101 (strong ligand), SFCALSTTF: A0201, SFCALSTTF: A0207, FCALSTTF: DRB1*0403, FCALSTTF: DRB1*0803, FCALSTTF: A0201, FCALSTTF: A0207, FCALSTTF: A0201, FCALSTTF: A0207, CALSTTF: A0201, CALSTTF: A0207, CALSTTF: B5101 (strong ligand)
19	CFAP65	Gln957Arg	CFAP65_ENST00000341552_GLN957ARG	LEETKYLRVGMWVWE	13.06	0	0.031	0.408	YLRVGMWV: A0201 (strong ligand), YLRVGMWV: A0207 (strong ligand), YLRVGMWV: B5101, YLRVGMWVW: A0201, YLRVGMWVW: A0207
20	TMEM82	Gly273Cys	TMEM82_ENST00000375782_GLY273CYS	QSQVQIVLRMCGLFV	9.27	2.52	0.034	0.400	VLYRMCGLFV: A0201 (strong ligand), VLYRMCGLFV: A0207 (strong ligand), VLYRMCGLFV: DRB1*0403 (strong ligand), LVRMCGLFV: A0201, LVRMCGLFV: A0207
21	GPR182	His293Tyr	GPR182_ENST00000300098_HIS293TYR	HGTHSLHCLVHLHYF	22.51	0	0.018	0.395	GTHSLHCLV: B5101, THSLHCLV: B5101, HISLHCLV: A0201 (strong ligand), HISLHCLV: A0207 (strong ligand), ISLHCLVHL: A0201,

(続)

表3 続

Rank	Gene	AA Mutation	Sequence ID	Optimized Mutated Sequence	Immunogenicity Score		VAF	Ancestral Score	Minimal Neopeptides: HLA Restriction
					Class I	Class II			
									ISLHCYLVHL: A0207, SLHCYLVHL: A0201 (strong ligand), SLHCYLVHL: A0207 (strong ligand), SLHCYLVHLL: A0201, SLHCYLVHLL: A0207
22	BCOR	Gly254Ser	BCOR_ENST00000342274_GLY254SER	LPPHYVSPHIPSS	9.59	0	0.041	0.391	LPPHYVSP: B5101 (strong ligand), PPPHYVSPHI: B5101, PPPHYVSPHI: B5101 (strong ligand),
23	TCF15	Gly62Arg&Ter117	TCF15_ENST00000246080_GLY62ARGFSTER117	RRRRPPAALHLHLPPQPAQGGWPS	4.58	4.22	0.044	0.386	PPAALHLHL: B5101, LHLPPQPA: DRB1*0403 (strong ligand), LLPQPAQG: DRB1*0803, LPQPAQGGW: B5101 (strong ligand)
24	IRAK1	His85Arg	IRAK1_ENST00000369974_HIS85ARG	NRNARVADLVRLTHLQL	0	6.82	0.056	0.382	LYRLTHLQ: DRB1*0403 (strong ligand), VRLTHLQL: DRB1*0403, VRLTHLQL: DRB1*0803
25	KLHDC3	Leu90Phe	KLHDC3_ENST00000326974_LEU90PHE	YGHSTVLIDDTVFLWGGRND	14.3	0	0.027	0.379	TVLIDDTVFL: A0201, TVLIDDTVFL: A0207, VLIDDTVFL: A0201 (strong ligand), VLIDDTVFL: A0207 (strong ligand), VLIDDTVFLW: A0201, VLIDDTVFLW: A0207
26	ADAMTS14	Val266Ala	ADAMTS14_ENST00000373207_VAL266ALA	IEVLLAVDDSVVRFHGKEHVQ	13.06	1.68	0.025	0.373	VLLAVDDSV: A0201 (strong ligand), VLLAVDDSV: A0207 (strong ligand), VLLAVDDSVV: A0201 (strong ligand), VLLAVDDSVV: A0207 (strong ligand), VLLAVDDSVV: B5101
27	CYHR1	Ala47Val	CYHR1_ENST00000530374_ALA47VAL	AAGQAAAAALGEVAGPGLPDEAGLA	3.99	0	0.093	0.371	ALGEVAGPGL: A0201, ALGEVAGPGL: A0207
28	ZAN	Glu1262Ala	ZAN_ENST00000546292_GLU1262ALA	GASGRFVELQTAFGLRVWRWDGDDQL	10.48	4.09	0.025	0.368	FVELQTAFG: DRB1*0403 (strong ligand), FVELQTAFG: DRB1*0803 (strong ligand), FVELQTAFGL: A0201, FVELQTAFGL: A0207, ELQTAFGLRV: A0201, ELQTAFGLRV: A0207, LQTAFGLRV: A0201, LQTAFGLRV: A0207
29	GDI1	Ser65Thr	GDI1_ENST00000447750_SER65THR	QLLEGPPETMGRGRDWN	7.11	0	0.051	0.366	QLLEGPPETM: A0201, QLLEGPPETM: A0207

(続)

表3 続

Rank	Gene	AA Mutation	Sequence ID	Optimized Mutated Sequence	Immunogenicity Score		VAF	Ancer® Score	Minimal Neopeptides: HLA Restriction
					Class I	Class II			
30	CACNG8	Let50Phe	CACNG8_ENST00000270458_LEU50PHE	YWLYYTRAFICNTTN	10.93	2.18	0.027	0.350	YWLYYTRAFI: DRB1*0803, WLYYTRAFIC: A0201, WLYYTRAFIC: A0207, WLYYTRAFICN: A0201, WLYYTRAFICN: A0207, YTRAFICNTT: A0201, YTRAFICNTT: A0207

下線付きの最適化変異配列(ランク23)はフレームシフト変異を示す。AA Mutation:アミノ酸変異、Optimized Mutated Sequence:複数の短いT細胞エпитオープを含む長鎖ペプチド・ネオエピトープ、Immunogenicity Score:コード化されたネオエピトープの免疫原性をヒトプロテオームとの相対性で調整した指標(スコアが高いほど免疫原性が高いことを示す)、VAF:変異対立遺伝子頻度、Ancer® Score:予測T細胞エピトープにおけるHLAおよびTCR相互作用残基への変異の影響と免疫原性の高さの双方に基づき、EpVax Therapeuticsがネオエピトープを順位付けするために定めた指標。

これらの課題に対処するため、今後は単一細胞シーケンスを活用するか、分離時に複数のマーカーパネルを併用して、がん種横断でCTCの多様性と純度をより正確に捉えるべきである。第三に、プロテオミクスやトランスクリプトミクスなど他のオミクス手法とネオアンチゲン同定を統合することで、腫瘍生物学や治療標的に関する追加の洞察が得られる可能性がある。Ancer®で用いるEpiMatrixおよびJanusMatrixツールについては既報で詳細が記載されている(37)。第四に、CTC採取の再現性とスケーラビリティを確保するため、アフエーシス手順の最適化が広範な臨床応用に不可欠である。本研究では、CTC由来のネオアンチゲンの治療的有用性は評価していないが、今後はより大きなコホートで臨床研究／臨床試験を実施し、これらのネオアンチゲンに対するT細胞応答を評価する計画である。これらの解析により、CTC由来ネオアンチゲンの免疫原性評価が可能になると期待している。さらに、本研究ではCTCから同定したネオアンチゲンと外科的切除腫瘍組織由来のネオアンチゲンとの比較は行っていないが、この比較は重要な次の一歩であり、今後の研究で実施する予定である。

データ可用性に関する声明

本研究で提示したオリジナルの成果は本文および補足資料に含まれている。追加の問い合わせは連絡責任著者に連絡のこと。

倫理声明

本研究は、人を対象とする研究として、医療法人「医創会」(承認番号: 201903)、特定非営利活動法人「こどもたちのこどもたちのこどもたちのために」(承認番号: 21-1)、武蔵野大学(承認番号: R1-1)の審査委員会による承認を受けた。研究は、地域の法令および所属機関の要件に従って実施した。参加者からは、本研究への参加について文書によるインフォームド・コンセントを取得した。本論文に含まれる、個人が特定され得る画像またはデータの公表についても、当該個人から文書による同意を得た。

著者貢献

- DK: 原稿執筆(初稿)、原稿の査読・編集、可視化
- TK: 実験・調査、原稿の査読・編集、監督
- QL: 監督、実験・調査、原稿の査読・編集
- SF: 監督、原稿の査読・編集、実験・調査
- YH: 実験・調査、原稿の査読・編集、監督
- KT: 実験・調査、監督、原稿の査読・編集
- TN: 原稿の査読・編集、実験・調査、監督
- NmY: 監督、原稿の査読・編集、実験・調査
- GR: 実験・調査、原稿の査読・編集、監督
- AD: 監督、原稿の査読・編集、実験・調査

NhY: 方法論、構想、実験・調査、原稿の査読・編集、資源の提供、監督、研究費獲得、プロジェクト運営、データキュレーション

資金提供

著者は、本研究および／または本論文の公表に対して資金的支援を受けたことを宣言する。Novacellum Inc. 連絡責任著者である山下博士が本研究を立案し、計画した。山下博士は当初、東京大学の名誉教授として武蔵野大学と共同研究を行った。これらの知見に基づき、Novacellum Inc. を設立した。設立後、研究を進めるための資金を調達し、その過程で山下博士は研究デザイン、データの収集・解析・解釈、報告書の執筆、および論文投稿の決定に積極的に関与した。本研究に関連する特許（特許第7426165号）も出願・成立しており、発明者として山下博士が記載されている。したがって山下博士は、Novacellum Inc. を通じた資金的支援に加え、本研究のあらゆる側面において重要な知的貢献を行ってきた。

謝辞

本研究に対する継続的な励ましに感謝の意を表する。Mr. Joshua Ho に深く感謝する。

References

- Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ, Haluska FG, Butler M, Seiden MV, et al. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2003) 100:4712–7. doi: 10.1073/pnas.0830997100
- Hammershoi Madsen AM, Lovendahl Eefsen RH, Nielsen D, Kumler I. Targeted treatment of metastatic triple-negative breast cancer: A systematic review. *Breast J*. (2024) 2024:9083055. doi: 10.1155/2024/9083055
- Yau T, Kang YK, Kim TY, El-Khoueiry AB, Santoro A, Sangro B, et al. Efficacy and safety of nivolumab plus ipilimumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma previously treated with sorafenib: the CheckMate 040 randomized clinical trial. *JAMA Oncol*. (2020) 6:e204564. doi: 10.1001/jamaoncol.2020.4564
- Cao J, Ding X, Ji J, Zhang L, Luo C. Efficacy and safety of immune checkpoint inhibitors rechallenge in advanced solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Front Oncol*. (2024) 14:1475502. doi: 10.3389/fonc.2024.1475502
- Haslam A, Prasad V. Estimation of the percentage of US patients with cancer who are eligible for and respond to checkpoint inhibitor immunotherapy drugs. *JAMA Netw Open*. (2019) 2:e192535. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2019.2535
- McGrail DJ, Pillie PG, Rashid NU, Voorwerk L, Slagter M, Kok M. High tumor mutation burden fails to predict immune checkpoint blockade response across all cancer types. *Ann Oncol*. (2021) 32:661–72. doi: 10.1016/j.annonc.2021.02.006
- Jardim DL, Goodman A, de Melo Gagliato D, Kurzrock R. The challenges of tumor mutational burden as an immunotherapy biomarker. *Cancer Cell*. (2021) 39:154–73. doi: 10.1016/j.ccell.2020.10.001
- Xie N, Shen G, Gao W, Huang Z, Huang C, Fu L. Neoantigens: promising targets for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther*. (2023) 8:9. doi: 10.1038/s41392-022-01270-x
- Sahin U, Oehm P, Derhovanessian E, Jabulowsky RA, Vormehr M, Gold M. An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma. *Nature*. (2020) 585:107–12. doi: 10.1038/s41586-020-2537-9
- Salu P, Reindl KM. Advancements in circulating tumor cell research: bridging biology and clinical applications. *Cancers (Basel)*. (2024) 16(6):1213. doi: 10.3390/cancers16061213

利益相反

著者KTはBiomedica Solution Inc.に雇用されていた。著者GRおよびADはEpiVax Inc.に雇用されていた。著者NYはNovacellum Inc.に雇用されていた。

残る著者は、本研究が潜在的な利益相反と解釈され得るいかなる商業的または金銭的関係もない状況で実施されたと宣言する。

本研究はNovacellum Inc.からの研究資金により実施された。Naohide YamashitaはNovacellum Inc.の会長である。

生成AIに関する声明

一部の著者は英語のネイティブではないため、英語の編集にAIを使用した。著者は、本稿の作成において生成AIを使用したことを宣言する。

出版社注記

本記事に示されたすべての主張は著者のみの見解であり、著者の所属機関、出版社、編集者、査読者の見解を必ずしも代表するものではない。本記事で評価される可能性のあるいかなる製品や、その製造元による主張についても、出版社が保証または支持するものではない。

- Rieckmann LM, Spohn M, Ruff L, Agorku D, Becker L, Borchers A, et al. Diagnostic leukapheresis reveals distinct phenotypes of NSCLC circulating tumor cells. *Mol Cancer*. (2024) 23:93. doi: 10.1186/s12943-024-01984-2
- Mihalcioiu C, Li J, Badescu D, Camirand A, Kremer N, Bertos N. Improved platform for breast cancer circulating tumor cell enrichment and characterization with next-generation sequencing technology. *Am J Cancer Res*. (2023) 13:25–44.
- Chauhan A, Pal A, Sachdeva M, Boora GS, Parsana M, Bakshi J. A FACS-based novel isolation technique identifies heterogeneous CTCs in oral squamous cell carcinoma. *Front Oncol*. (2024) 14:1269211. doi: 10.3389/fonc.2024.1269211
- Nagayama H, Sato K, Morishita M, Uchamaru K, Oyaizu N, Inazawa T, et al. Results of a phase I clinical study using autologous tumour lysate-pulsed monocyte-derived mature dendritic cell vaccinations for stage IV Malignant melanoma patients combined with low dose interleukin-2. *Melanoma Res*. (2003) 13:521–30. doi: 10.1097/00008390-200310000-00011
- Thurner B, Roder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, et al. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods*. (1999) 223:1–15. doi: 10.1016/S0022-1759(98)00208-7
- Richard G, Princiotta MF, Bridon D, Martin WD, Steinberg GD, De Groot AS. Neoantigen-based personalized cancer vaccines: the emergence of precision cancer immunotherapy. *Expert Rev Vaccines*. (2022) 21:173–84. doi: 10.1080/14760584.2022.2012456
- Usman S, Waseem NH, Nguyen TKN, Mohsin S, Jamal A, Teh MT, et al. Vimentin is at the heart of epithelial mesenchymal transition (EMT) mediated metastasis. *Cancers (Basel)*. (2021) 13(19):4985. doi: 10.3390/cancers13194985
- Neal C, Sukumaran S, Gupta V, Jafferji I, Hasegawa D, Melnikova VO, et al. Capture of EpCAM-negative and vimentin-positive circulating cancer cells (CCCs) from blood of metastatic breast cancer patients using ApoStream. *J Clin Oncol*. (2012) 30:e21029–9. doi: 10.1200/jco.2012.30.15_suppl.e21029
- Solano C, Badia B, Lluch A, Marugan I, Benet I, Arbona C, et al. Prognostic significance of the immunocytochemical detection of contaminating tumor cells (CTC) in apheresis products of patients with high-risk breast cancer treated with high-dose

- chemotherapy and stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl.* (2001) 27:287–93. doi: 10.1038/sj.bmt.1702782
20. Mout L, van Dessel LF, Kraan J, de Jong AC, Neves RPL, Erkens-Schulze S, et al. Generating human prostate cancer organoids from leukapheresis enriched circulating tumour cells. *Eur J Cancer.* (2021) 150:179–89. doi: 10.1016/j.ejca.2021.03.023
21. Stoecklein NH, Fischer JC, Niederacher D, Terstappen LW. Challenges for CTC-based liquid biopsies: low CTC frequency and diagnostic leukapheresis as a potential solution. *Expert Rev Mol Diagn.* (2016) 16:147–64. doi: 10.1586/14737159.2016.1123095
22. Fischer JC, Niederacher D, Topp SA, Honisch E, Schumacher S, Schmitz N. Diagnostic leukapheresis enables reliable detection of circulating tumor cells of nonmetastatic cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2013) 110:16580–5. doi: 10.1073/pnas.1313594110
23. Tamminga M, Andree KC, van den Bos H, Hiltermann TJN, Mentink A, Spierings DCJ. Leukapheresis increases circulating tumour cell yield in non-small cell lung cancer, counts related to tumour response and survival. *Br J Cancer.* (2022) 126:409–18. doi: 10.1038/s41416-021-01634-0
24. Andree KC, Mentink A, Zeune LL, Terstappen L, Stoecklein NH, Neves RP. Toward a real liquid biopsy in metastatic breast and prostate cancer: Diagnostic LeukApheresis increases CTC yields in a European prospective multicenter study (CTCTrap). *Int J Cancer.* (2018) 143:2584–91. doi: 10.1002/ijc.31752
25. Fehm TN, Meier-Stiegen F, Driemel C, Jager B, Reinhardt F, Naskou J, et al. Diagnostic leukapheresis for CTC analysis in breast cancer patients: CTC frequency, clinical experiences and recommendations for standardized reporting. *Cytometry A.* (2018) 93:1213–9. doi: 10.1002/cyto.a.23669
26. Lambros MB, Seed G, Sumanasuriya S, Gil V, Crespo M, Fontes M. Single-cell analyses of prostate cancer liquid biopsies acquired by apheresis. *Clin Cancer Res.* (2018) 24:5635–44. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0862
27. Lightbody ED, Firer DT, Sklavenitis-Pistofidis R, Tsuji J, Agius MP, Dutta AK, et al. Single-cell RNA sequencing of rare circulating tumor cells in precursor myeloma patients reveals molecular underpinnings of tumor cell circulation. *Blood.* (2022) 140:602–3. doi: 10.1182/blood-2022-162851
28. Alix-Panabieres C, Bartkowiak K, Pantel K. Functional studies on circulating and disseminated tumor cells in carcinoma patients. *Mol Oncol.* (2016) 10:443–9. doi: 10.1016/j.molonc.2016.01.004
29. Ramon YCS, Sese M, Capdevila C, Aasen T, De Mattos-Arruda L, Diaz-Cano SJ. Clinical implications of intratumor heterogeneity: challenges and opportunities. *J Mol Med (Berl).* (2020) 98:161–77. doi: 10.1007/s00109-020-01874-2
30. Wolf Y, Samuels Y. Intratumor heterogeneity and antitumor immunity shape one another bidirectionally. *Clin Cancer Res.* (2022) 28:2994–3001. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-1355
31. Jiang T, Cheng R, Pan Y, Zhang H, He Y, Su C, et al. Heterogeneity of neoantigen landscape between primary lesions and their matched metastases in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* (2020) 9:246–56. doi: 10.21037/tlcr.2020.03.03
32. Chen R, Li J, Fujimoto J, Hong L, Hu X, Quek K. Immunogenomic intertumor heterogeneity across primary and metastatic sites in a patient with lung adenocarcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* (2022) 41:172. doi: 10.1186/s13046-022-02361-x
33. Sementsov M, Ott L, Kott J, Sartori A, Lusque A, Degenhardt S. Mutation analysis in individual circulating tumor cells depicts intratumor heterogeneity in melanoma. *EMBO Mol Med.* (2024) 16:1560–78. doi: 10.1038/s44321-024-00082-6
34. Rothe F, Venet D, Peeters D, Rouas G, Rediti M, Smeets D. Interrogating breast cancer heterogeneity using single and pooled circulating tumor cell analysis. *NPJ Breast Cancer.* (2022) 8:79. doi: 10.1038/s41523-022-00445-7
35. Jew B, Alvarez M, Rahmani E, Miao Z, Ko A, Garske KM, et al. Accurate estimation of cell composition in bulk expression through robust integration of single-cell information. *Nat Commun.* (2020) 11:1971. doi: 10.1038/s41467-020-15816-6
36. Lin D, Shen L, Luo M, Zhang K, Li J, Yang Q, et al. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduct Target Ther.* (2021) 6:404. doi: 10.1038/s41392-021-00817-8
37. De Groot AS, Moise L, Terry F, Gutierrez AH, Hindocha P, Richard G. Better epitope discovery, precision immune engineering, and accelerated vaccine design using immunoinformatics tools. *Front Immunol.* (2020) 11:442. doi: 10.3389/fimmu.2020.00442