



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

# Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/eng](http://www.elsevier.com/locate/eng)



## Research

### New Technology of Tumor Diagnosis and Treatment—Article

## 肿瘤特异性环状 RNA 来源抗原肽被证实存在于肝胆肿瘤中

王文闻<sup>a, #</sup>, 马莉丽<sup>b, c, #</sup>, 邢政<sup>b, c, #</sup>, 苑廷淦<sup>b, c, d</sup>, 包金霞<sup>e, f</sup>, 朱妍静<sup>g, h</sup>, 赵晓芳<sup>a</sup>, 赵燕<sup>i</sup>, 宗雅丽<sup>i</sup>, 张雅妮<sup>i</sup>, 莘似韵<sup>g, h</sup>, 邱辛瑶<sup>a</sup>, 杨帅<sup>a</sup>, 王红阳<sup>a, g, h, \*</sup>, 高栋<sup>c, j, k, \*</sup>, 王鹏<sup>b, c, l, \*</sup>, 陈磊<sup>a, h, m, \*</sup>

<sup>a</sup> Fudan University Shanghai Cancer Center, Shanghai 200032, China

<sup>b</sup> Bio-Med Big Data Center, CAS Key Laboratory of Computational Biology, Shanghai Institute of Nutrition and Health, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

<sup>c</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

<sup>d</sup> School of Life Science and Technology, ShanghaiTech University, Shanghai 201210, China

<sup>e</sup> State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology & Model Animal Research Center of Nanjing University and MOE Key Laboratory of Model Animal for Disease Study, Nanjing University, Nanjing 210061, China

<sup>f</sup> School of Medicine, Nanjing University, Nanjing 210093, China

<sup>g</sup> The International Cooperation Laboratory on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

<sup>h</sup> National Center for Liver Cancer, Shanghai 200441, China

<sup>i</sup> Institute of Metabolism and Integrative Biology, Fudan University, Shanghai 200433, China

<sup>j</sup> State Key Laboratory of Cell Biology & Shanghai Key Laboratory of Molecular Andrology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

<sup>k</sup> Institute for Stem Cell and Regeneration, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>l</sup> Faculty of Health Sciences, University of Macau, Macao 999078, China

<sup>m</sup> Key Laboratory of Signaling Regulation and Targeting Therapy of Liver Cancer (SMMU), Ministry of Education & Shanghai Key Laboratory of Hepatobiliary Tumor Biology (EHBH), Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 18 March 2022

Revised 21 May 2022

Accepted 7 June 2022

Available online 20 July 2022

### 关键词

肿瘤抗原

患者来源肝胆肿瘤类器官

环状 RNA

基于质谱的免疫肽组学

## 摘要

由于缺乏经证实具备免疫原性的多肽,基于肿瘤抗原的免疫治疗应用受到限制。在本研究中,利用肝胆肿瘤类器官分析了环状 RNA (circRNA) 作为肿瘤抗原肽新来源的潜力。使用 RNA 测序 (RNA-seq) 和基于算法的评分工具,预测出 27 个类器官中 3950 个肿瘤特异性 circRNA 可翻译 18 971 条抗原肽。抗原图谱显示,11 个氨基酸长度 (mer) 的肽和人类白细胞抗原 (HLA)-A 结合肽的免疫原性相关评分最高。通过对 5 个类器官进行基于质谱的免疫肽组学分析,直接证实其中三个类器官的 13 条抗原肽为 HLA-A、HLA-B 和 HLA-C (HLA-ABC) 结合肽。通过流式细胞仪和酶联免疫分析发现,HLA-ABC 呈递的 circRNA 来源肿瘤特异性肽可以刺激 CD8 T 细胞,使其 CD107a 和干扰素  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) 共表达提高、IFN $\gamma$  分泌增加。细胞杀伤实验证实,经 circRNA 来源免疫原性肽活化的 T 细胞可杀伤类器官细胞。值得注意的是,来自 circTBC1D15 的抗原肽 YGFNEILKK 不仅可以被 HLA-ABC 呈递,还能活化 T 细胞,显著降低肿瘤类器官活率。本研究的发现提供了一种产生肿瘤抗原的重要来源,提示肿瘤特异性 circRNA 可作为抗肿瘤靶点。

© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [hywangk@vip.sina.com](mailto:hywangk@vip.sina.com) (H. Wang), [dong.gao@sibcb.ac.cn](mailto:dong.gao@sibcb.ac.cn) (D. Gao), [wangpeng@picb.ac.cn](mailto:wangpeng@picb.ac.cn) (P. Wang), [chenlei@smmu.edu.cn](mailto:chenlei@smmu.edu.cn) (L. Chen).

# These authors contributed equally to this work.

2095-8099/© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

英文原文: *Engineering* 2023, 22(3): 159–170

引用本文: Wenwen Wang, Lili Ma, Zheng Xing, Tinggan Yuan, Jinxia Bao, Yanjing Zhu, Xiaofang Zhao, Yan Zhao, Yali Zong, Yani Zhang, Siyun Shen, Xinyao Qiu, Shuai Yang, Hongyang Wang, Dong Gao, Peng Wang, Lei Chen. Tumor-Specific CircRNA-Derived Antigen Peptide Identification for Hepatobiliary Tumors. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.06.008>

## 1. 引言

肿瘤抗原一般分为肿瘤相关抗原和肿瘤特异性抗原, 均可被T细胞识别[1]。活化后的T细胞可以据此区分肿瘤细胞和正常细胞, 并启动一系列靶向肿瘤细胞的级联反应, 最终清除肿瘤细胞[2]。既往研究显示, 大部分肿瘤抗原源自基因组编码区, 如肿瘤特异性单核苷酸位点变异 (SNV) [3–4]、插入和缺失 (InDel) [5]、融合基因[6]。但在验证实验中, 仅有一小部分 (约2%) 的肽段在不同癌种中表现出免疫原性。

环状RNA (circRNA) 是一种稳定内源性RNA, 通过反向剪接的方式, circRNA的3'剪接位点和上游5'剪接位点相连接, 形成连续的共价闭环环状结构[7–8]。既往体内外研究均证实肿瘤特异性circRNA的存在, 并具备可翻译性[7,9–10]。circRNA的高度保守开放阅读框 (ORF) 通过非依赖5'帽子结构方式编码多肽, 如由内部核糖体进入位点 (IRES) 介导[11–12]。另外, 包含反向剪接连接位点的新ORF编码的功能肽很可能和正常编码蛋白转录本不同, 因此, circRNA来源的候选抗原肽更可能被T细胞受体 (TCR) 作为异己成分识别。

候选抗原肽的数量对于临床试验来说过于庞大, 并且不同患者很少拥有相同的候选抗原肽[3–4,13]。通过体外实验评估T细胞对候选抗原的反应性及活化T细胞的抗肿瘤活性, 在临床试验前筛选出个体化治疗靶标可以解决这些问题。患者来源的肿瘤类器官 (PDO) 采用模拟肿瘤微环境的三维培养体系, 长期体外培养仍能保留来源肿瘤特征[14–15]。肿瘤类器官和免疫细胞共培养检测体系是优化个体化免疫治疗方案的有效途径, 在嵌合抗原T细胞 (CAR-T) 和过继T细胞 (ACT) 疗法中均有应用[16–20]。因此PDO平台的搭建为分析circRNA来源免疫原性肽可否激活T细胞、杀伤肿瘤提供了可能。

肝癌是致死率第二高的恶性肿瘤, 但缺乏有效治疗手段[21]。为探索肝胆肿瘤治疗策略, 本研究描绘了类器官中circRNA来源肿瘤抗原图谱, 证实肿瘤特异性circRNA来源肽具有免疫原性, 并且探讨了肽活化CD8 T细胞的肿瘤杀伤能力。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 人来源样本

从2018年7月到2020年10月, 共收集来自27位肝胆肿瘤确诊患者的手术切除肿瘤样本 (1~3 cm<sup>3</sup>) 和外周血

样本 (3~5 mL), 来自47位肝胆肿瘤确诊患者的癌旁组织样本 (1~3 cm<sup>3</sup>) 以及来自6位健康供者的外周血样本 (1~3 mL)。附录A中的表S1汇总了患者的临床信息, 表S2提供了患者和健康供者的人类白细胞抗原 (HLA) -A、HLA-B和HLA-C (HLA-ABC) 信息。本研究经上海东方肝胆外科医院伦理委员会批准, 所有参与者均已签署知情同意书。

### 2.2. 外周血单个核细胞的分离

使用Ficoll-Paque分离液 (GE Healthcare, 英国), 采用密度梯度离心法从外周血中分离外周血单个核细胞 (PBMC), 使用CryoStor CS10细胞冻存液 (STEMCELL Technologies, 加拿大) 在液氮中保存以备后续实验。

### 2.3. 肿瘤类器官培养

沿用之前报道的肝胆肿瘤类器官构建和培养方法[22]。概述如下: 使用消化液 (杜氏改良Eagle培养基 (DMEM; Gibco, 美国), 添加4 mg·mL<sup>-1</sup> 胶原酶D (Roche, 德国)、0.1 mg·mL<sup>-1</sup> 脱氧核糖核酸酶I (DNase I; Sigma-Aldrich, 美国)、2 μmol·L<sup>-1</sup> Rho相关激酶抑制剂 (Y27632; Sigma-Aldrich) 以及100 μg·mL<sup>-1</sup> Primocin抗生素 (InvivoGen, 美国), 在37 °C下消化小块肿瘤组织 (0.5~1.5 cm<sup>3</sup>) 30~90 min, 使用70 μm细胞滤网 (Falcon, 美国) 过滤。使用冷的改良的DMEM/F12 (Gibco) 清洗两遍, 使用类器官培养基重悬细胞沉淀。类器官培养基由改良的DMEM/F12加入1%青霉素/链霉素、1%谷氨酰胺 (Glutamax)、10 mmol·L<sup>-1</sup> 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)、100 μg·L<sup>-1</sup> Primocin抗生素、1:50的B27添加剂 (无维生素A)、1.25 mmol·L<sup>-1</sup> N-乙酰-L-半胱氨酸、50 ng·mL<sup>-1</sup> 重组小鼠表皮生长因子 (EGF)、100 ng·mL<sup>-1</sup> 重组人源成纤维细胞生长因子10 (FGF10)、1 ng·mL<sup>-1</sup> 重组人源成纤维细胞生长因子-basic、25 ng·mL<sup>-1</sup> 重组人源肝细胞生长因子 (HGF)、10 μmol·L<sup>-1</sup> 毛喉素、5 μmol·L<sup>-1</sup> 转化生长因子β受体1抑制剂 (A8301)、10 μmol·L<sup>-1</sup> Y27632、10 mmol·L<sup>-1</sup> 烟酰胺、10% (体积分数) Rspo-1条件培养基、30% (体积分数) Wnt3a条件培养基、5% (体积分数) Noggin条件培养基组成。将获得的细胞悬液和冷的Matrigel基质胶 (Corning, 美国) 混合, 在6孔悬浮板中37 °C孵育30 min后加入培养基。传代时, 胰酶替代物 (Gibco) 消化类器官至单细胞状态, 37 °C孵育5 min, 用新的培养基-基质胶继续培养, 约每周传代一次。5到30代之间的类器官用于后续实验。

## 2.4. 测序分析

使用胰酶替代物将类器官消化成单细胞。用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤两次后, 制备细胞沉淀用于 RNA 测序 (RNA-seq) 和全基因组测序 (WGS)。RNA 提取、文库构建、RNA 测序和 WGS 由晶能生物技术有限公司 (中国) 完成。这些文库按照制造商说明采用 Illumina Nova-Seq 6000 平台进行测序 (Illumina Inc., 美国)。RNA 测序的覆盖深度为 10~12 Gb; WGS 组织和类器官的覆盖深度为 240 Gb, 对照血细胞覆盖深度为 120 Gb。

## 2.5. HLA 分型

基于 WGS 数据 (晶能生物技术有限公司), 利用 Athlates [23]、HLA-HD [24]、HLA-VBSeq [25] 分析样本的 HLA-I 类四位数分型。每个样本的 HLA-I 类等位基因由上述三种软件的重叠结果决定。PBMC 和用于肽验证实验的 5 个类器官的 HLA-I 类分型采用聚合酶链反应-直接测序法 (PCR-SBT; 深圳荻硕贝肯精准医学有限公司) 进行检测确定。

## 2.6. circRNA 的检测和定量

利用 Trimmomatic (v0.39) † 删除测序数据中接头和低质量片段。利用 CIRCexplorer2 检测 27 个类器官和 47 个癌旁样本的 circRNA [26], 跨剪切位点序列用于 circRNA 检测。从 ENCODE 数据库 (<https://www.encodeproject.org>) 下载正常细胞系的总 RNA 测序和去聚腺苷化 polyA 尾的 RNA 测序数据, 包括源于 61 个正常细胞系的 145 个样本, 并运用上述方法进行 circRNA 检测。来自加利福尼亚大学圣克鲁兹分校 (UCSC) 数据库 (<http://genome.ucsc.edu/>) 的 hg38 作为参考基因组进行比对和后续分析。为获取类器官特异性 circRNA, 排除了正常细胞系以及癌旁组织中检测到的 circRNA。使用 SRPBM (每十亿碱基的剪切数目) 对类器官特异性 circRNA 进行标准化定量,  $SRPBM = \text{跨剪切位点读段数目} / \text{比对到的所有读段数目} \times 1\,000\,000\,000$ 。

## 2.7. 确定 circRNA 的翻译潜能

利用 IRESfinder 预测每个 circRNA 的 IRES 组件 [12]。ORFfinder 由美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) 开发, 可预测每个 circRNA 的 ORF 组件。

## 2.8. 抗原肽预测

利用生物信息学评分法预测 9~11 个氨基酸长度

(mer) 的类器官特异性 circRNA 衍生肽, 预测的肽段跨剪切位点且和 HLA-ABC 结合 [27]。接着对预测的肽段进行免疫原性评估: 利用 NetCTLpan1.1 评估蛋白酶体切割和抗原呈递相关转运蛋白 (TAP) 的转运效率; 利用 NetMHCpan4.1 评估与主要组织相容性复合体 (MHC) 的结合亲性; 评估 TCR 识别性。PepMatch 工具可评估预测多肽与参考蛋白数据库 (UniProt) 中人正常组织多肽的相似性。非配对数量用于判别预测多肽与数据库 (<https://pypi.org/project/pepmatch/>) 多肽的序列差异大小。选择与每个 HLA 等位基因结合、免疫原性相关评分最高且排序前 0.5 的肽进行验证实验。

## 2.9. 基因本体富集分析

对标准化的类器官特异性 circRNA 表达水平进行排序, 选择产生最多 circRNA 的亲本基因。采用 ClusterProfiler 软件包分别对基因列表中的基因进行基因本体 (GO)、生物过程 (BP)、细胞成分 (CC) 和分子功能 (MF) 富集分析, Benjamini-Hochberg 校正 *P* 值小于 0.05 认为有统计学意义 [28]。

## 2.10. 肽段合成

将购自吉尔生化 (上海) 有限公司的定制肽溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中, 用于后续实验。

## 2.11. 通过免疫共沉淀和质谱分析纯化 HLA I 类抗原肽

通过免疫共沉淀 (CO-IP) 和质谱 (MS) 分析纯化 HLA I 类抗原肽, 具体方法如下: 收集类器官, 用胰酶替代物消化成单细胞。PBS 洗涤两次后, 在类器官细胞沉淀 ( $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$  个细胞) 中加入含蛋白酶抑制剂混合物 (上海碧云天生物技术公司) 的冷 Western 和免疫沉淀 (IP) 裂解缓冲液, 在冰上振荡 40 min 进行裂解。细胞裂解物在  $4\text{ }^\circ\text{C}$  下  $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min。然后根据制造商说明书, 将可溶性细胞裂解物与抗 HLA I 类抗体 (W6/32; Abcam, 英国) 以及蛋白 A/G 磁珠 (MedChemExpress, 美国) 共孵育。洗涤并洗脱磁珠, 保留上清液用于 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)。电泳完成后, 收集凝胶并与  $50\text{ }\mu\text{L}$  二硫苏糖醇 (DTT) 溶液 ( $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 在  $56\text{ }^\circ\text{C}$  下反应 30 min, 继续加入  $50\text{ }\mu\text{L}$  碘乙酰胺溶液 ( $55\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 在  $37\text{ }^\circ\text{C}$  下避光反应 10 min。用纯乙腈使凝胶片收缩。随后弃液, 将凝胶片置于胰蛋白酶缓冲液 ( $13\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 溶于  $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  含 10% 的乙腈) 中, 在  $37\text{ }^\circ\text{C}$  下孵育过夜。过夜后向凝胶中依次加入含 0.1% 甲酸的 50% 乙腈溶液、含

† <http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic>.



0.1%甲酸的80%乙腈溶液以及纯乙腈溶液，对消化后的肽进行提取。

通过配有EASY-nanoLC 1000系统(Thermo Fisher Scientific, 美国)的Q Exactive Plus质谱仪(上海科杰生物技术有限公司), 采用在线纳米喷雾液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)对样品进行分析。同时, 建立PEAKS数据库(Bioinformatics Solutions Inc., 加拿大)比对检索uniprot人样本数据库(版本201907, 20 414条记录)与本研究的预测抗原肽数据库。

### 2.12. 肽段体外共培养

在37 °C 5% CO<sub>2</sub>条件下, 使用添加25 μL·mL<sup>-1</sup> ImmunoCult人CD3/CD28T细胞激活剂和10 ng·mL<sup>-1</sup>人重组IL-2的ImmunoCult-XF T细胞扩增培养基(STEM-CELL Technologies)扩增健康人来源PBMC(1 × 10<sup>6</sup>细胞数·mL<sup>-1</sup>) 3~6天, 且每3天更新一次培养基。准备一个96孔U底板, 4 °C下用5 μg·mL<sup>-1</sup>的抗CD28抗体(克隆28.2; eBioscience, 美国)包被孔板并过夜。第0天, 包被后的96孔板每孔加入200 μL T细胞培养基[AIM-V培养基添加10%人AB血清(Gemini, 美国)、1%超谷氨酰胺(Lonza, 瑞士)、1%青霉素/链霉素、IL-2(100 U·mL<sup>-1</sup>; PeproTech, 美国)、IL-7(10 ng·mL<sup>-1</sup>; PeproTech)以及IL-15(10 ng·mL<sup>-1</sup>; PeproTech)]、1 × 10<sup>5</sup>个PBMC以及25 μmol·L<sup>-1</sup>肽段(阴性对照为DMSO)共孵育, 每组至少两个重复。第三天, 细胞液均匀分孔, 加入100 μL两倍浓度的T细胞培养基。第6天, 每孔更新一半的培养基, 新加培养基同样添加肽段和两倍浓度的细胞因子。收集细胞培养上清进行酶联免疫吸附试验(ELISA)分析。经过三轮刺激后, 收集PBMC进行流式细胞仪分析。

### 2.13. 流式细胞仪分析T细胞应答

收集用同种肽刺激的PBMC, 室温(RT)下FV450[Becton, Dickinson and Company (BD), 美国]染色15 min, 然后加入抗CD107a藻红蛋白Cy7复合染料(PE-Cy7)、抗CD3异硫氰酸荧光素(FITC)、抗CD45别藻蓝蛋白Cy7复合染料(APC-Cy7)、抗CD4藻红蛋白(PE)和抗CD8别藻蓝蛋白(APC)(BD) 4 °C下染色30 min。使用固定/透化试剂盒(PeproTech)对细胞进行清洗、固定和破膜, 4 °C下用IFN $\gamma$  BV510(BioLegend, 美国)胞内染色15 min。随后洗涤细胞, 用Canto II(BD)或Cyto-FLEX(Beckman Coulter, Inc., 美国)流式细胞仪进行分析。

### 2.14. IFN- $\gamma$ ELISA检测

根据制造商说明书, 用人IFN $\gamma$ 高灵敏度ELISA试剂盒(Abcam)对共培养上清液中的IFN $\gamma$ 浓度进行定量。

### 2.15. 类器官杀伤实验

PBMC与肽共孵育9天, 期间进行三轮刺激。之后洗涤PBMC, 并用抗CD3 AF700、抗CD8 APC和碘化丙啶(PI;BD)进行染色。使用荧光激活细胞分选法(FACS)分选CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>细胞, 用于类器官杀伤实验。用胰酶替代物将类器官消化为单细胞, 用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE;BD)标记, 并与分选后的T细胞以10:1的效靶比进行共培养。三天后收集类器官和T细胞, 随后洗涤细胞, 加入抗CD45 APC-Cy7、Annexin V PE以及7-氨基放线菌素D(7-AAD)(BD)在Annexin V缓冲液(BD)中RT下染色15 min。用Canto II(BD)或CytoFLEX(Beckman Coulter, Inc.)流式细胞仪分析CFSE标记类器官的凋亡。FITC<sup>+</sup>CD45 APC-Cy7<sup>-</sup>用于类器官的设门, Annexin V<sup>-</sup>7-AAD<sup>-</sup>用于识别活细胞。

### 2.16. 统计分析

使用SPSS Statistics 23(SPSS Inc., 美国)进行统计学分析。所有数值均以平均值 $\pm$ 标准差(SD)或平均值标准误(SEM)的形式表示。在多组比较中采用双尾配对和非配对*t*检验。*P*值小于0.05表明差异具有统计学显著性。

## 3. 结论

### 3.1. 肝胆肿瘤类器官是研究circRNA的可靠模型

在之前的研究中, 建立了可长期传代的患者来源肝胆肿瘤类器官(PDHO)[22]。本研究中, 证实PDHO可作为RNA测序后分析circRNA和评估circRNA来源肽免疫原性的平台[图1(a)]<sup>†</sup>。以61个人正常细胞系和47个癌旁组织作为对照, 在27个PDHO中发现7465个肿瘤特异性circRNA[图1(b)]。为进一步分析这些肿瘤特异性circRNA的特性, 通过对比发现, circRNA来源基因主要富集于1号染色体。进一步计算不同染色体上每兆碱基对(Mb)长度产生的circRNA相对数量后, 发现17号染色体是产生circRNA的极度活跃区[图1(c)]。既往研究表明, 17号染色体上有大量重要突变, 包括乳腺癌1号基因(BRCA1)和肿瘤蛋白P53(TP53), 提示肝胆肿瘤特异性circRNA产生过程中该染色体发挥重要作用。在所有

<sup>†</sup> Elements provided by <https://biorender.com/>.

circRNA 中，由单外显子衍生的 circRNA 数目显著高于其余方式[图 1 (d)]。除单外显子衍生的 circRNA 外，每个环状体的外显子长度随着外显子数目的增加而延长。可见单外显子衍生的 circRNA 在肝胆肿瘤中存在重要意义，有待进一步探讨。

分析 27 个 PDHO 中共享的 circRNA，发现 15 个 circRNA 存在于至少 4 个 PDHO 中。其中分布最广泛的是动力蛋白轴丝重链 14 (DNAH14) \_chr1\_225038693\_225051795\_+，可以在 6 个 PDHO 中检测到；其次为甲胎蛋白 (AFP) \_chr4\_73450614\_73455290\_+，可以在 5 个

PDHO 中检测到[图 1 (f)]。在泛癌研究中，DNAH14 被认为是 circRNA 最常见的来源基因，说明 PDHO 可保留来源组织的 circRNA 特征[29]。

大部分 (超过 99%) 亲本基因产生的 circRNA 数量在 10 个以内，产生 circRNA 最多的亲本基因是 Pals1 相关紧密连接基因 (PATJ)，共计 39 个[图 1 (g)]。在癌基因相关评分最高的前 30 个基因<sup>†</sup>中，预测 17 个癌基因可产生 circRNA，其中预计产生 circRNA 数量最多的两个癌基因分别是可以产生 11 个 circRNA 的共济失调毛细血管扩张突变基因 (ATM)，以及乳腺癌 2 号基因 (BRCA2)、

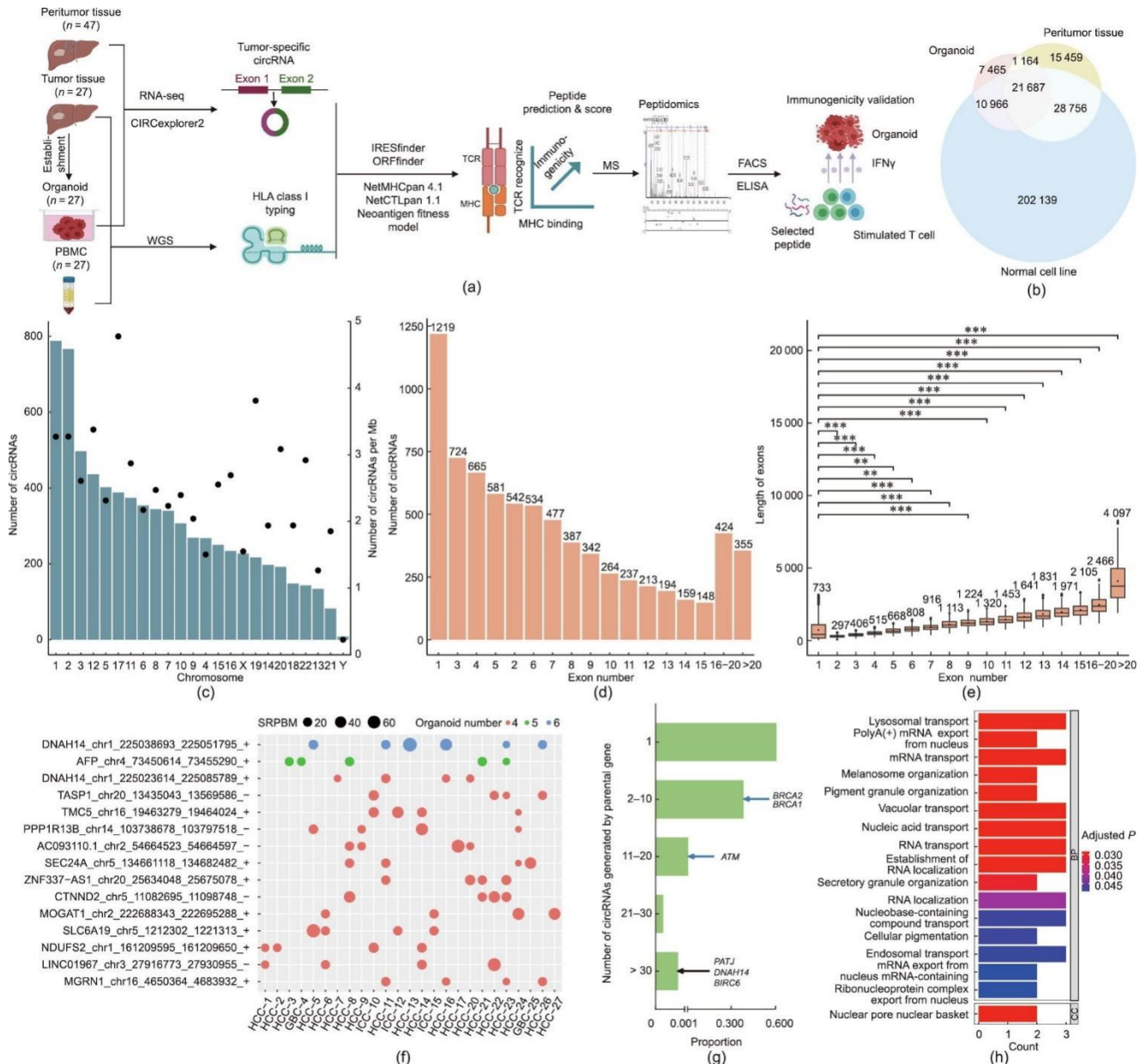


图 1. 在肝胆肿瘤类器官中可检测到肿瘤特异性 circRNA。

<sup>†</sup> The oncogene list and each gene's relevance score are publicly available at <https://www.genecards.org/>.

*BRCAl* [图 1 (g)]。由于 circRNA 与其亲本基因关系密切 [30]，本文对表达量前 20 的 circRNA 相关亲本基因进行了 GO 富集分析。16 个 GO BP、1 个 GO CC (核孔核篮) 和 0 个 GO MF 表现出显著富集 [校正  $P$  值低于 0.05, 图 1 (h)]。GO 富集分析显示三个基因富集到溶酶体运输、mRNA 运输、囊泡运输、核酸运输、RNA 运输和 RNA 亚细胞定位通路 ( $P = 0.028$ )，提示运输过程在 circRNA 相关肿瘤生成和进展过程中发挥重要潜在作用。

### 3.2. circRNA 预测可产生抗原肽

在 27 个类器官中，预测 7815 个肿瘤特异性 circRNA 中 5937 个包含 IRES，5130 个跨剪接位点具备蛋白翻译潜能，占有肿瘤特异性 circRNA 的 65.64% [图 2 (a)]。使用一项先前发表的打分工具 [27] 定量评估这些肽的免疫原性潜能，对预测的 18 971 条可翻译的 circRNA 来源肽按照免疫原性相关评分进行排序 (平均值 0.037, 范围 0~0.954) [图 2 (b)]。对产生 circRNA 来源肽量前 10 的亲本基因进行 GO 富集分析，发现 23 个 GO BP、7 个 GO CC 和 9 个 GO MF 显著富集 (校正  $P$  值低于 0.05)。其中两个基因与鸟嘌呤核苷酸交换因子活性、GTP 酶激活蛋白活性、GTP 酶调节蛋白活性和核苷三磷酸酶调节蛋白活性相关 [ $P = 0.0426$ , 图 2 (c)]，提示这些基因在肿瘤抗原形成过程中发挥潜在作用。可翻译的肿瘤特异性 circRNA 数量和 circRNA 衍生抗原负荷 (即预测的 circRNA 衍生抗原肽数量) 个体变化表现出一致性趋势 [图 2 (d)]。然而，两者都不与肿瘤突变负荷 (TMB) 存在一致性趋势。在进一步相关性分析中，circRNA 数量和 circRNA 衍生抗原肽负荷之间存在显著正相关，而 TMB 和 circRNA 衍生抗原肽负荷之间无显著正相关性 [图 2 (e)、(f)]，提示 circRNA 衍生抗原肽负荷与突变负荷无关，而与对应的 circRNA 负荷相关。对于缺乏非同义突变来源新抗原的肿瘤患者，circRNA 衍生抗原可能可以作为潜在治疗靶点。新抗原负荷与肝细胞癌 (HCC) 患者预后相关 [31]。对不同原发灶-淋巴结-远处转移 (TNM) 分期患者进行对比发现，circRNA 衍生抗原负荷在分期较晚的肿瘤患者中相对更低 [图 2 (g)]。遗憾的是，可能由于样本量过少，并未观察到显著差异。

### 3.3. 基于肝胆肿瘤类器官的 circRNA 衍生 HLA I 类抗原图谱

对 circRNA 进行特征分析，以表征预测可产生免疫原性肽且具备翻译性的肿瘤特异性 circRNA (简称 Ag-circRNA)，结果显示 17 号染色体是每 Mb 染色体片段生成

Ag-circRNA 量最多的染色体，是生成 circRNA 和 Ag-circRNA 的活跃区域 [图 1 (c)、图 3 (a)]。接着对 Ag-circRNA 和非 Ag-circRNA 进行比较，发现二者亲本基因染色体分布不同，产生 Ag-circRNA 和非 Ag-circRNA 的外显子数量也不同。Ag-circRNA 亲本基因主要位于 2 号染色体，而非 Ag-circRNA 亲本基因主要位于 1 号染色体 [图 3 (b)]。Ag-circRNA 主要由 3、4 或 1 个外显子产生，非 Ag-circRNA 则大多由 1 个外显子产生 [图 3 (c)]。除了单外显子产生的 Ag-circRNA 外，Ag-circRNA 对应的外显子长度随 circRNA 环对应的外显子数量的增加而延长，这一特征与图 1 (e) 所示的 circRNA 类似 [图 3 (d)]。详细的比较分析显示，单外显子和超过 20 个外显子的 Ag-circRNA 的外显子长度显著大于同等外显子数目的非 Ag-circRNA [图 3 (e)]。这些差异揭示了 Ag-circRNA 的多个特征，有助于在肝胆肿瘤中优化 Ag-circRNA 的识别。

构建群体共享的肿瘤抗原肽库，为肿瘤患者及时提供有效的治疗靶点，具有重要意义。高频 Ag-circRNA 如图 4 (a) 所示。在 27 个类器官中，21 种 Ag-circRNA 出现在三个以上的类器官中，包括在 6 个类器官中均出现的 circDNAH14。值得注意的是，circDNAH14 在图 1 (f) 所示的肿瘤特异性 circRNA 分析中也是最高频的 circRNA。

评估了来自 3950 个 circRNA 的总计 18 971 条预测抗原肽，以揭示 circRNA 衍生抗原肽的特征。研究发现候选肽的长度大多为 9 mer，但是 HLA-ABC 等位基因的分布无明显差异 [图 4 (b)]。此外，11 mer 肽以及 HLA-A 结合肽的免疫原性相关评分最高，且有显著性差异 [图 4 (c)]。

### 3.4. MS 证实 circRNA 来源 HLA-ABC 呈递肽

为评估 circRNA 产生抗原肽的潜力，以癌旁组织和正常细胞系作为对照分别对 5 个 PDHO 进行分析，总共鉴定出了 1609 个肿瘤特异性 circRNA，随后排除了 568 个未检测到翻译能力 (即不编码蛋白) 的 circRNA。平均每个 PDHO 可由 156 个肿瘤特异性可翻译 circRNA 预测得到 698 条 9~11 mer 的 HLA-ABC 结合肽 [图 5 (a)]。采用基于 MS 的蛋白质组学分析对这些候选抗原肽进行筛选 [32]，其中 13 条抗原肽在三个 PDHO 中被鉴定为 HLA-ABC 呈递肽 [见图 5 (a)、(b) 及附录 A 中的图 S1]。胰蛋白酶消化会导致在 MS 分析中检测到富含赖氨酸-精氨酸 (KR) 末端的抗原肽。今后需开发一种优化的用于 MS 鉴定的凝胶内蛋白消化方法。本研究的数据显示，这些 circRNA 来源的编码肽段与 HLA I 类分子表现出较高的亲和力，表明 circRNA 是一种抗原的潜在来源。



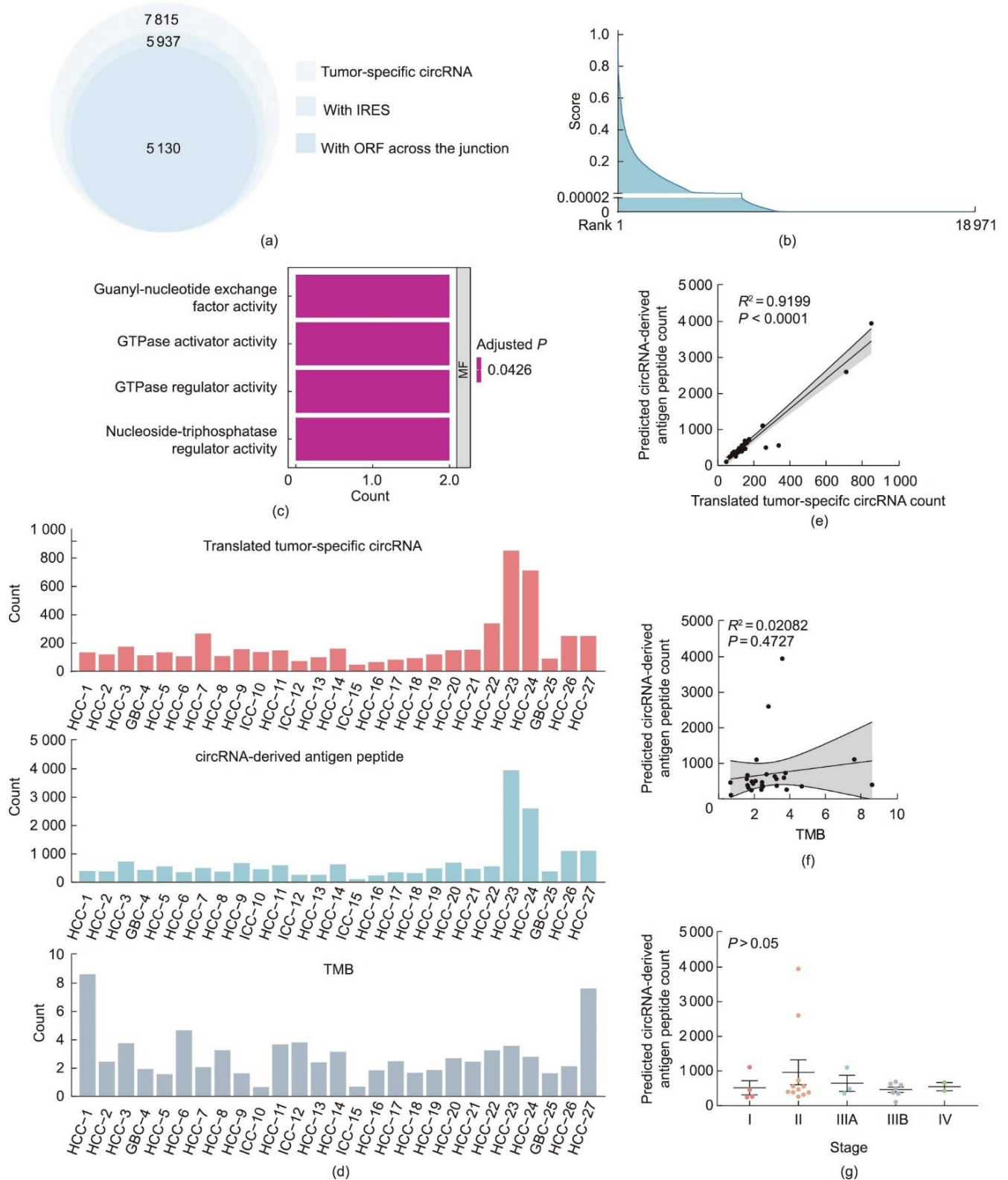


图2. TMB或circRNA来源抗原负荷与肿瘤分期的相关性。

### 3.5. circRNA来源抗原肽的免疫原性验证

为了验证候选circRNA来源抗原肽的免疫原性，评估

了经肽刺激的T细胞反应及抗肿瘤活性[图6(a)]<sup>†</sup>。通过MS检测和(或)在基于算法抗原肽预测中评分高且排序

<sup>†</sup> Elements used provided by <https://biorender.com/>.

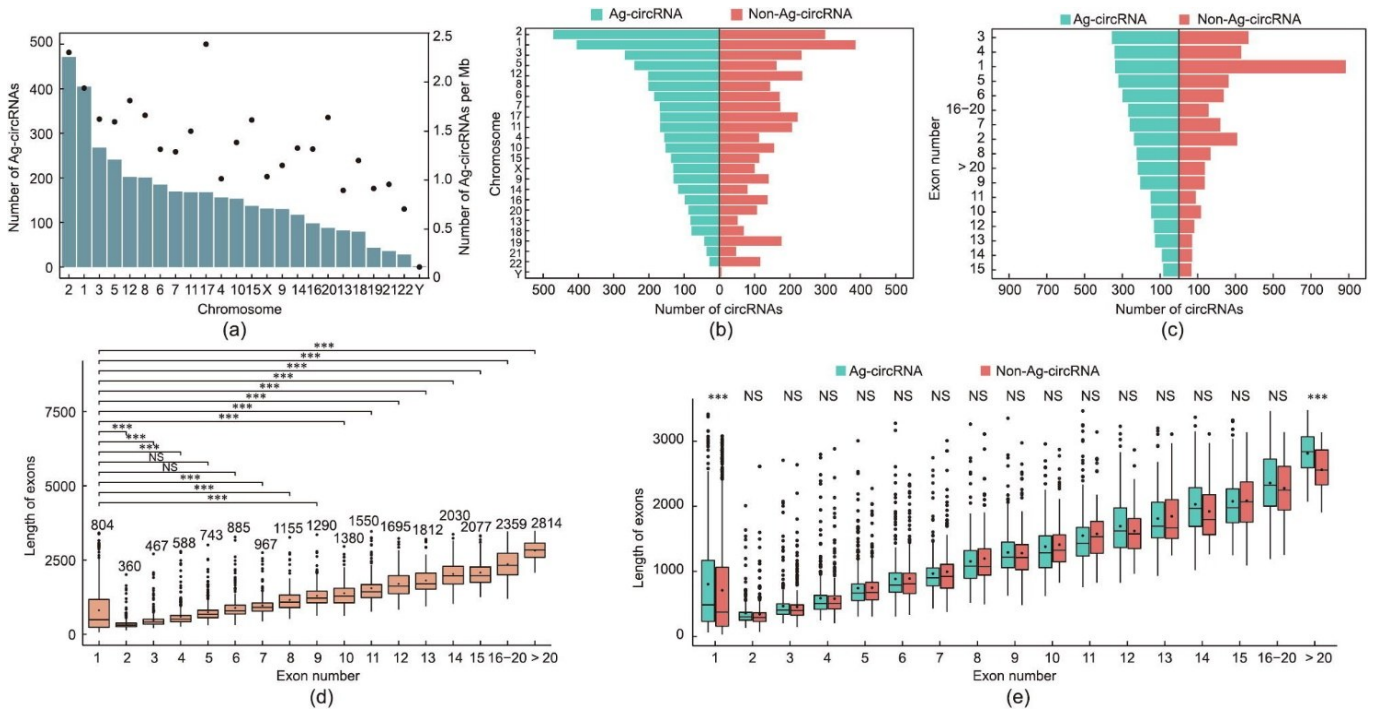


图3. 肝胆肿瘤类器官中 Ag-circRNA 特征。

在 0.5 之前的肽段被挑选用于验证实验（见附录 A 中的表 S3）。用于验证实验的肽段和配对的野生型肽段的免疫原性潜能相关评分见附录 A 中的表 S4。通过对肽刺激后的 T 细胞  $IFN\gamma$  胞内表达、脱粒标记 CD107a 表达、共培养上清液中的  $IFN\gamma$  分泌进行检测，以评估肽的免疫原性[33]。与 DMSO 处理的对照组相比，经肽（赖氨酸-亮氨酸-脯氨酸-赖氨酸-缬氨酸-天冬酰胺-缬氨酸-色氨酸-精氨酸，KLPKVNWR, HCC-27 Pep 3）刺激后， $CD8^+$  T 细胞中  $CD107a^+IFN\gamma^+$  细胞的比例提高了 1.5 倍以上[见图 6 (b) 和附录 A 中的图 S2]。肽反应性  $CD8^+$  T 细胞的  $CD107a^+IFN\gamma^+$  原始比例见附录 A 中的表 S5。某些多肽能刺激 T 细胞高比例共表达  $CD107a^+IFN\gamma^+$ ，同时分泌较高水平的  $IFN\gamma$ ，这些结果证实肽活化 T 细胞具备肿瘤杀伤潜力[图 6 (c)]。有趣的是，HCC-20 的 Pep 3 和 HCC-27 的 Pep 4 在测试的 5 个个体中有 4 个表现出最强的免疫原性，意味着这两种肽可能可用于补充共享抗原肽库。

### 3.6. 肽反应性 $CD8^+$ T 细胞具备肿瘤类器官杀伤能力

为了评估肽反应性 T 细胞能否根除肿瘤细胞，使用能刺激产生最高频  $CD107a^+IFN\gamma^+CD8^+$  T 细胞的肽，以肿瘤类器官作为靶点，进行杀伤实验[图 6 (a)]。肽反应性 T 细胞能降低类器官活率[图 6 (d)]。值得注意的是，DMSO 处理下能存活的 HCC-27 类器官中有 38% 被 Pep 4（酪氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-天冬酰胺-谷氨酸-异亮氨酸-亮氨酸-赖氨酸-赖氨酸，YGFNEILKK）刺激的  $CD8^+$  T 细胞

额外杀死，仅 36% 的类器官细胞存活，表明靶向 circRNA 来源肿瘤抗原具有抗肿瘤治疗价值[图 6 (e)]。对照组类器官的低存活率意味着共培养条件对于类器官来说并不完美，因此，未来应优化共培养体系。总的来说，肽反应性 T 细胞的肿瘤杀伤作用证实了 circRNA 可作为肿瘤抗原的潜在来源，以及基于类器官平台鉴定免疫原性抗原肽的可行性。

## 4. 讨论

原发性肝癌（PLC）[14]和胆道肿瘤（BTC）[15]类器官的构建均有报道。在目前转化医学应用中，肿瘤类器官主要用作抗肿瘤药物筛选的体外模型[14–15,34]。基于类器官的肿瘤抗原研究罕有报道。本研究成功建立了可长期传代的类器官[22]。据了解，这是第一个利用肿瘤类器官作为平台进行 circRNA 来源的肿瘤抗原肽预测和验证的研究。

得益于改进的高通量 RNA 测序技术和生物信息学算法，越来越多可靠的 circRNA 被识别[35]。不断有证据表明异常表达的高稳定肿瘤 circRNA 有助于肿瘤发生和转移，是可靠的治疗靶点[7,36–37]。根据 RNA 测序分析，在 27 个已构建的类器官中，可检测到 41 282 个 circRNA，其中有 5130 个被判断为具有翻译性的外显子来源的肿瘤特异性 circRNA。这一结果表明类器官模型用于 circRNA



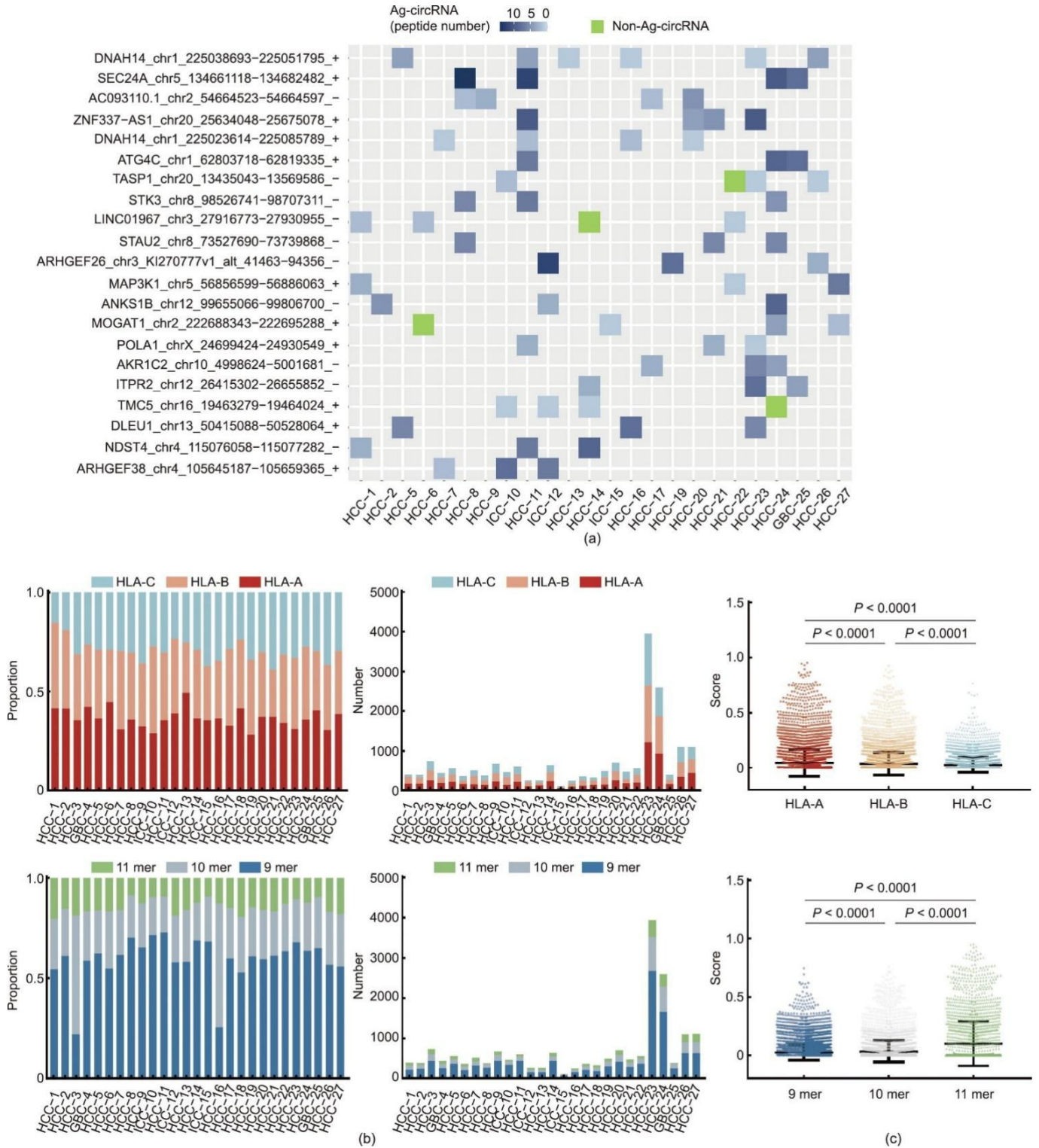


图4. 预测的 circRNA 来源抗原肽的特征。

研究的可行性。

数百条抗原肽已在各癌种中被证实<sup>†</sup>。前期大多数报道主要以基因组的编码区域作为新抗原来源。然而，仅仅错误单核苷酸衍生的新抗原可能在下游临床使用中

是不实用的，因为只有一个氨基酸改变，能产生免疫原性肽的概率很低，并表现出有限的免疫原性[3-4]。开发非常规肿瘤抗原的兴趣逐渐显现，导致一些研究重点关注异常转录、翻译、翻译后功能的编码区，甚至非编码区是否

<sup>†</sup> Elements provided by <https://biorender.com/>.

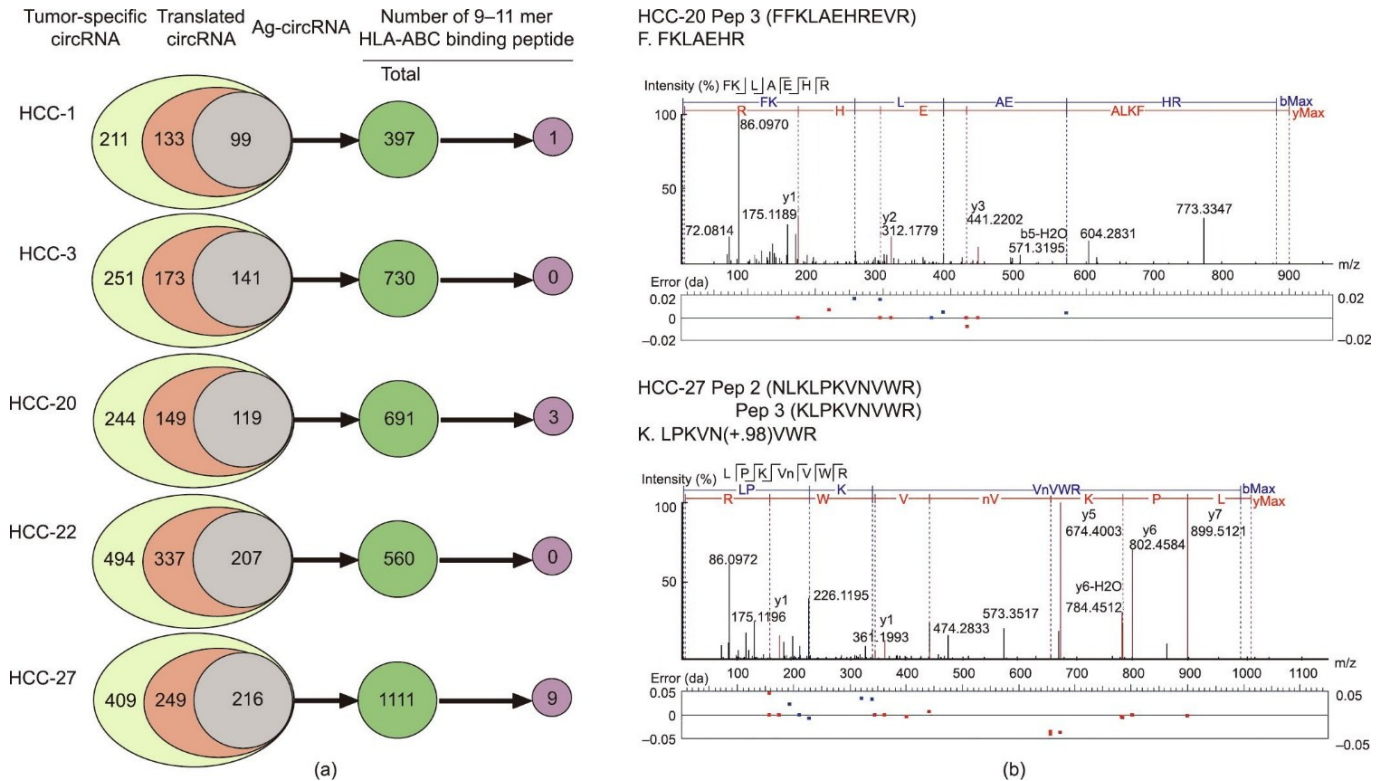


图5. HLA-ABC呈递抗原肽的预测和证实。

具备产生肿瘤抗原潜能[38–43]。根据肿瘤抗原的定义，本研究推测肿瘤特异性 circRNA 的反向剪接连接处 ORF 的翻译产物可能是肿瘤抗原的一个新来源。为了克服可能的中枢免疫耐受，只在肿瘤组织中表达，而不在肿瘤周围组织或正常细胞中表达的肿瘤特异性 circRNA 被优先作为肿瘤抗原来源考虑。

基于 RNA 测序生成数据的分析显示，3950 个 circRNA 预测具有启动翻译和生成肿瘤抗原肽的能力。通过基于 MS 的免疫肽组学可直接评估 HLA-ABC 递呈肽库[44–46]。基于 RNA 测序计算算法预测的 circRNA 来源抗原肽可在 MS 分析中检测到。尽管 MS 方法存在缺陷，如检测灵敏度有限，只能检测到与 HLA-ABC 较高亲和度的肽[44–45,47]，但 circRNA 的翻译能力和 circRNA 编码肽的递呈能力仍然可以通过这种方式得到证实。除了短肽外，来自 circRNA 的长肽作为另一种抗原来源值得在未来进行研究，细胞表面肽也应通过 LC-MS/MS 进行验证。

对候选肽进行实验验证可克服基于算法预测的不足。来源肿瘤组织的组织学结构、基因组变异和表达谱被证明在类器官中得以保存[14–15]，从而奠定了类器官作为新抗原反应性 T 细胞攻击目标的可行性[18,48–49]。在本研究中，定量分析显示免疫原性肽可活化 T 细胞（即

CD107a、IFN $\gamma$  表达升高和 IFN $\gamma$  分泌增加)。类器官杀伤实验进一步证实了经免疫原性肽刺激的 CD8 T 细胞具备肿瘤清除能力。值得注意的是，在 HCC-27 中，MS 检测到的肽（YGFNEILKK 来自 circTBC1D15）可刺激 T 细胞介导肿瘤破坏，这有力地证实了 circRNA 来源抗原肽的存在和抗肿瘤能力。基于类器官平台，通过这种模式验证了 circRNA 可作为肿瘤抗原肽的潜在来源。每个患者更多的免疫原性 circRNA 来源抗原肽将在未来得到验证。如果用免疫原性肽组合刺激，肽反应性 CD8 细胞的肿瘤杀伤效果可能会提升。这项研究受到其小样本量的限制，因此将这种方法进行大规模应用，更精确地识别 circRNA 来源的肿瘤抗原是有意义的。在未来，本研究团队还将研究体细胞基因改变相关的 circRNA 作为新抗原来源的潜力。

预测的抗原相关 circRNA 的特征（例如，亲本基因富集在 2 号染色体来源，由 3 个、4 个或 1 个外显子产生）和具有相对较高免疫原性相关评分的 circRNA 来源抗原肽特征（如 HLA-A 结合和 11 mer 长度），有助于优化算法提高预测精确性。需要注意的是，患者共享的高频抗原相关肿瘤特异性 circRNA，包括 circDNAH14（最常见的 circRNA）需被特别关注，因为它们可以补充肿瘤抗原库。

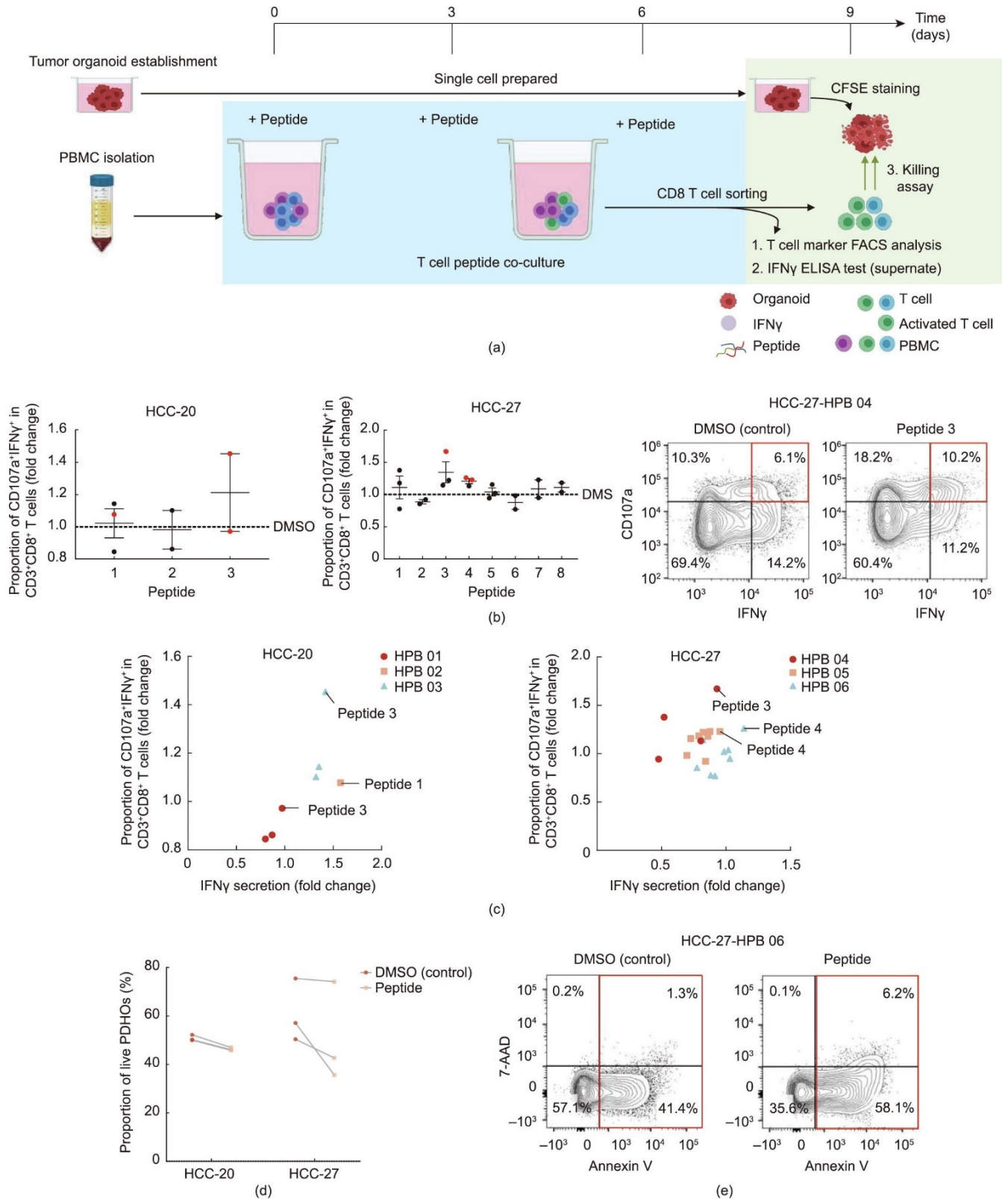


图6. 通过T细胞肽共培养和肽反应性T细胞杀死肿瘤器官鉴定肽段的免疫原性。

## 5. 结论

类器官是实用的肿瘤抗原肽评估模型。RNA 测序结

合MS免疫肽组学可用于预测肿瘤抗原肽，并勾勒出类器官中circRNA来源抗原图谱。由肽反应性T细胞触发的肿瘤类器官细胞毒性为circRNA介导T细胞免疫治疗提供了



理论依据。circRNA 提供了一种新的肿瘤抗原来源，可作为临床应用中的免疫治疗靶点。

## 致谢

本研究由国家自然科学基金(U21A20376、82102871、81988101、81903184、81790633、81830054)、上海市教委创新计划(2019-01-07-00-07-E00065)、上海市自然科学基金(21XD1404600、21JC1406600、22140901000)、中国博士后科学基金(2020M671007)资助。

## Authors' contribution

Lei Chen and Peng Wang designed experiments. Hongyang Wang, Dong Gao, Peng Wang, Lei Chen, Wenwen Wang, Lili Ma, Zheng Xing, and Yanjing Zhu developed methods. Jinxia Bao, Yanjing Zhu, Xiaofang Zhao, Yan Zhao, Siyun Shen, Xinyao Qiu, and Shuai Yang collected samples. Wenwen Wang, Tinggan Yuan, Yanjing Zhu, Jinxia Bao, Yali Zong, and Yani Zhang performed experiments. Wenwen Wang, Lili Ma, Zheng Xing, and Tinggan Yuan analyzed data. Wenwen Wang, Lili Ma, and Zheng Xing wrote the manuscript. All authors revised the manuscript and approved the final version. Lei Chen, Peng Wang, Hongyang Wang, and Dong Gao supervised the project.

## Compliance with ethics guidelines

Wenwen Wang, Lili Ma, Zheng Xing, Tinggan Yuan, Jinxia Bao, Yanjing Zhu, Xiaofang Zhao, Yan Zhao, Yali Zong, Yani Zhang, Siyun Shen, Xinyao Qiu, Shuai Yang, Hongyang Wang, Dong Gao, Peng Wang, and Lei Chen declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.06.008>.

## References

- [1] Hu Z, Ott PA, Wu CJ. Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer. *Nat Rev Immunol* 2018;18(3):168–82.
- [2] Basu R, Whitlock BM, Husson J, Le Floch A, Jin W, Oyler-Yaniv A, et al. Cytotoxic T cells use mechanical force to potentiate target cell killing. *Cell* 2016;165(1):100–10.
- [3] Parkhurst MR, Robbins PF, Tran E, Prickett TD, Gartner JJ, Jia L, et al. Unique neoantigens arise from somatic mutations in patients with gastrointestinal cancers. *Cancer Discov* 2019;9(8):1022–35.
- [4] Cohen CJ, Gartner JJ, Horovitz-Fried M, Shamalov K, Trebska-McGowan K, Bliskovsky VV, et al. Isolation of neoantigen-specific T cells from tumor and peripheral lymphocytes. *J Clin Invest* 2015;125(10):3981–91.
- [5] Hansen UK, Ramskov S, Bjerregaard AM, Borch A, Andersen R, Draghi A, et al. Tumor-infiltrating T cells from clear cell renal cell carcinoma patients recognize neoepitopes derived from point and frameshift mutations. *Front Immunol* 2020;11:373.
- [6] Yang W, Lee KW, Srivastava RM, Kuo F, Krishna C, Chowell D, et al. Immunogenic neoantigens derived from gene fusions stimulate T cell responses. *Nat Med* 2019;25(5):767–75.
- [7] Pamudurti NR, Bartok O, Jens M, Ashwal-Fluss R, Stottmeister C, Ruhe L, et al. Translation of circRNAs. *Mol Cell* 2017;66(1):9–21.e7.
- [8] Vo JN, Cieslik M, Zhang Y, Shukla S, Xiao L, Zhang Y, et al. The landscape of circular RNA in cancer. *Cell* 2019;176(4):869–881.e13.
- [9] Wang Y, Wang Z. Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs. *RNA* 2015;21(2):172–9.
- [10] Zhang M, Zhao K, Xu X, Yang Y, Yan S, Wei P, et al. A peptide encoded by circular form of LINC-PINT suppresses oncogenic transcriptional elongation in glioblastoma. *Nat Commun* 2018;9(1):4475.
- [11] Chen CY, Sarnow P. Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs. *Science* 1995;268(5209):415–7.
- [12] Zhao J, Wu J, Xu T, Yang Q, He J, Song X. IRESfinder: identifying RNA internal ribosome entry site in eukaryotic cell using framed k-mer features. *J Genet Genomics* 2018;45(7):403–6.
- [13] Deniger DC, Pasetto A, Robbins PF, Gartner JJ, Prickett TD, Paria BC, et al. T-cell responses to TP53 “Hotspot” mutations and unique neoantigens expressed by human ovarian cancers. *Clin Cancer Res* 2018;24(22):5562–73.
- [14] Broutier L, Mastrogianni G, Versteegen MM, Frances HE, Gavarró LM, Bradshaw CR, et al. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat Med* 2017;23(12):1424–35.
- [15] Saito Y, Muramatsu T, Kanai Y, Ojima H, Sukeda A, Hiraoka N, et al. Establishment of patient-derived organoid model and drug screening for biliary tract carcinoma. *Cell Rep* 2019;27(4):1265–76.e4.
- [16] Zumwalde NA, Haag JD, Sharma D, Mirrielees JA, Wilke LG, Gould MN, et al. Analysis of immune cells from human mammary ductal epithelial organoids reveals Vδ2<sup>+</sup> T cells that efficiently target breast carcinoma cells in the presence of bisphosphonate. *Cancer Prev Res* 2016;9(4):305–16.
- [17] Rogoz A, Reis BS, Karssemeijer RA, Mucida D. A 3-D enteroid-based model to study T-cell and epithelial cell interaction. *J Immunol Methods* 2015;421:89–95.
- [18] Dijkstra KK, Cattaneo CM, Weeber F, Chalabi M, van de Haar J, Fanchi LF, et al. Generation of tumor-reactive T cells by co-culture of peripheral blood lymphocytes and tumor organoids. *Cell* 2018;174(6):1586–98.e12.
- [19] Jacob F, Salinas RD, Zhang DY, Nguyen PTT, Schnoll JG, Wong SZH, et al. A patient-derived glioblastoma organoid model and biobank recapitulates interand intra-tumoral heterogeneity. *Cell* 2020;180(1):188–204.e22.
- [20] Schnalzger TE, de Groot MH, Zhang C, Mosa MH, Michels BE, Röder J, et al. 3D model for CAR-mediated cytotoxicity using patient-derived colorectal cancer organoids. *EMBO J* 2019;38(12):38.
- [21] Villanueva A. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2019;380(15):1450–62.
- [22] Zhao Y, Li ZX, Zhu YJ, Fu J, Zhao XF, Zhang YN, et al. Single-cell transcriptome analysis uncovers intratumoral heterogeneity and underlying mechanisms for drug resistance in hepatobiliary tumor organoids. *Adv Sci* 2021;8(11):e2003897.
- [23] Liu C, Yang X, Duffy B, Mohanakumar T, Mitra RD, Zody MC, et al. ATHLATES: accurate typing of human leukocyte antigen through exome sequencing. *Nucleic Acids Res* 2013;41(14):e142.
- [24] Kawaguchi S, Higasa K, Shimizu M, Yamada R, Matsuda F. HLA-HD: an accurate HLA typing algorithm for next-generation sequencing data. *Hum Mutat* 2017;38(7):788–97.
- [25] Nariai N, Kojima K, Saito S, Mimori T, Sato Y, Kawai Y, et al. HLA-VBSeq:

- accurate HLA typing at full resolution from whole-genome sequencing data. *BMC Genomics* 2015;16(S2):S7.
- [26] Zhang XO, Wang HB, Zhang Y, Lu X, Chen LL, Yang L. Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell* 2014;159(1):134–47.
- [27] Wei Z, Zhou C, Zhang Z, Guan M, Zhang C, Liu Z, et al. The landscape of tumor fusion neoantigens: a pan-cancer analysis. *iScience* 2019;21:249–60.
- [28] Wu T, Hu E, Xu S, Chen M, Guo P, Dai Z, et al. ClusterProfiler 4.0: a universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innovation* 2021;2(3):100141.
- [29] Wang X, Dong Y, Wu Z, Wang G, Shi Y, Zheng Y. Machine learning-based comparative analysis of pan-cancer and pan-normal tissues identifies pancancer tissue-enriched circRNAs related to cancer mutations as potential exosomal biomarkers. *Front Oncol* 2021;11:703461.
- [30] Tian J, Fu Y, Li Q, Xu Y, Xi X, Zheng Y, et al. Differential expression and bioinformatics analysis of circRNA in PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cells. *Front Genet* 2020;11:530.
- [31] Li Z, Chen G, Cai Z, Dong X, He L, Qiu L, et al. Profiling of hepatocellular carcinoma neoantigens reveals immune microenvironment and clonal evolution related patterns. *Chin J Cancer Res* 2021;33(3):364–78.
- [32] Newey A, Griffiths B, Michaux J, Pak HS, Stevenson BJ, Woolston A, et al. Immunopeptidomics of colorectal cancer organoids reveals a sparse HLA class I neoantigen landscape and no increase in neoantigens with interferon or MEK-inhibitor treatment. *J Immunother Cancer* 2019;7(1):309.
- [33] Lorenzo-Herrero S, Sordo-Bahamonde C, Gonzalez S, López-Soto A. CD107a degranulation assay to evaluate immune cell antitumor activity. *Methods Mol Biol* 2019;1884:119–30.
- [34] Sachs N, de Ligt J, Kopper O, Gogola E, Bounova G, Weeber F, et al. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity. *Cell* 2018;172(1–2):373–86.e10.
- [35] Salzman J, Chen RE, Olsen MN, Wang PL, Brown PO. Cell-type specific features of circular RNA expression. *PLoS Genet* 2013;9(9):e1003777.
- [36] Guarnerio J, Bezzi M, Jeong JC, Paffenholz SV, Berry K, Naldini MM, et al. Oncogenic role of fusion-circRNAs derived from cancer-associated chromosomal translocations. *Cell* 2016;165(2):289–302.
- [37] Conn SJ, Pillman KA, Toubia J, Conn VM, Salmanidis M, Phillips CA, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. *Cell* 2015;160(6):1125–34.
- [38] Coulie PG, Lehmann F, Lethé B, Herman J, Lurquin C, Andrawiss M, et al. A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(17):7976–80.
- [39] Wang RF, Parkhurst MR, Kawakami Y, Robbins PF, Rosenberg SA. Utilization of an alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen. *J Exp Med* 1996;183(3):1131–40.
- [40] Michaux A, Larrieu P, Stroobant V, Fonteneau JF, Jotereau F, van den Eynde BJ, et al. A spliced antigenic peptide comprising a single spliced amino acid is produced in the proteasome by reverse splicing of a longer peptide fragment followed by trimming. *J Immunol* 2014;192(4):1962–71.
- [41] Smart AC, Margolis CA, Pimentel H, He MX, Miao D, Adeegbe D, et al. Intron retention is a source of neoepitopes in cancer. *Nat Biotechnol* 2018;36(11):1056–8.
- [42] Hanada K, Yewdell JW, Yang JC. Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature* 2004;427(6971):252–6.
- [43] Xiang R, Ma L, Yang M, Zheng Z, Chen X, Jia F, et al. Increased expression of peptides from non-coding genes in cancer proteomics datasets suggests potential tumor neoantigens. *Commun Biol* 2021;4(1):496.
- [44] Kote S, Pirog A, Bedran G, Alfaro J, Dapic I. Mass spectrometry-based identification of MHC-associated peptides. *Cancers* 2020;12(3):12.
- [45] Bassani-Sternberg M, Pletscher-Frankild S, Jensen LJ, Mann M. Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation. *Mol Cell Proteomics* 2015;14(3):658–73.
- [46] Abelin JG, Keskin DB, Sarkizova S, Hartigan CR, Zhang W, Sidney J, et al. Mass spectrometry profiling of HLA-associated peptidomes in mono-allelic cells enables more accurate epitope prediction. *Immunity* 2017;46(2):315–26.
- [47] Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, Gholami AM, Lieberenz M, Savitski MM, et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature* 2014;509(7502):582–7.
- [48] Liu T, Tan J, Wu M, Fan W, Wei J, Zhu B, et al. High-affinity neoantigens correlate with better prognosis and trigger potent antihepatocellular carcinoma (HCC) activity by activating CD39<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells. *Gut* 2021;70(10):1965–77.
- [49] Shi R, Tang YQ, Miao H. Metabolism in tumor microenvironment: implications for cancer immunotherapy. *MedComm* 2020;1(1):47–68.