



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

TCR 과 Co-stimulatory ICD 직접 연결
엔지니어링을 통한 TCR-T 기능 향상 가능성

울 산 대 학 교 대 학 원

의 과 학 과

김 종 혁

TCR 과 Co-stimulatory ICD 직접 연결
엔지니어링을 통한 TCR-T 기능 향상 가능성

지 도 교 수 공 경 업

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2024년 8월

울 산 대 학 교 대 학 원

의 과 학 과

김 종 혁

김종혁의 이학석사학위 논문을 인준함

심사위원	이 희 진	인
심사위원	공 경 엽	인
심사위원	이 새 별	인

울 산 대 학 교 대 학 원

2024 년 8 월

감사의 글

2년의 반의 짧은 시간이었지만 결국 졸업을 하게 되었습니다. 정말 많은 분들의 도움이 있었기에 가능했습니다. 제 학위논문이 완성될 수 있도록 도와주신 분들께 감사의 말씀을 전합니다.

먼저 제 지도교수이신 이희진 교수님께 깊은 감사의 말씀을 전합니다. 원래는 석사라는 꿈을 생각하고 있지 않았지만 저에게 영향이 컸던 갑작스럽던 일들과 걱정들 때문에 거의 아무것도 제대로 찾아본 것 없이 얇은 정보만으로 무작정 교수님께 연락을 드렸던 게 기억이 납니다. 첫 통화 때 석사 학위동안 어떤 걸 하는지 보다 제가 걱정되었던 부분들을 더 많이 말씀 드렸던 것 같습니다. 하지만 교수님이 해주신 이야기들로 인해 불안감들이 많이 가라앉게 되었고 정말 많은 힘을 얻을 수 있었습니다. 정말 감사했습니다. 이후 학위동안 좋은 인프라와 환경을 제공해주셨기 때문에 남들은 하지 못하는 다양한 것들을 경험하고 배웠기에 아주 큰 자산이 되었고, 바쁘신 와중에도 누구보다 큰 열정으로 뼈격거리던 저희를 동기부여해 주신 덕분에 학위졸업을 무사히 마칠 수 있었습니다. 주신 가르침들 잘 기억하여 앞으로도 잘 성장할 수 있는 사람이 되겠습니다 정말 감사합니다.

다음으로 김태문 박사님 감사합니다. 학위가 끝나니 박사님께서 해 주신 말들이 이제야 무엇인지 와닿아 조금 더 열심히 해볼걸 아쉬움이 남습니다. 첫 연구주제를 결정하지 못해 어려움을 겪을 때 박사님께서 저희에게 어려운 손 내밀어서 도움 주셨을 때를 잊지 못할 것 같습니다. 학위동안 많은 과정들과 실험들은 물론 쉽게 얻지 못하는 정보들, 아버지처럼 따듯했던 한마디 인자함, 학위를 끝까지 열심히 할 수 있게 이끌어 주셨던 열정 까지 살아가면서 쉽게 얻을 수 없는 인연이 되어주셔서 진심으로 감사드립니다. 박사님께 깊은 지식과 배움에 대한 태도를 배울 수 있었던 것 같습니다. 어디에서나 자랑스럽게 기억될 수 있는 사람이 되도록 하겠습니다 감사합니다.

또한 학위동안 많은 도움 주셨던 제 석사 동기들 박태현, 한도연, 차수민, 박기성. 선배로써 좋은 가르침과 본보기가 되어주신 홍종무, 김지형. 잠깐이었지만 학위수여에 큰 역할 해주신 서세연, 모파잘 학생까지 그동안 참 많은 일들이 있었지만 힘든 시기에도 서로 푹푹 뭉쳐서 웃음을 만들어 주셔서 그만큼 즐거웠고 행복했습니다. 함께 하지 않았다면 쉽게 이룰 수 없었던 것 같습니다. 이제는 새로운 도전을 앞두거나 진행중인 앞날에도 함께 응원하겠습니다. 진심으로 감사드립니다.

마지막으로 무한한 믿음과 신뢰를 주신 부모님께 감사드립니다. 갑작스러운 석사학위 결정에도 아끼지 않고 지원해주셔서 감사합니다. 하나의 주제를 제대로 공부해 볼 수 있는 꿈을 저에게 가지게 해주셔서 감사합니다. 학위동안 배운 지식과 정보들이 사람들에게 앞으로 큰 기여가 될 수 있는 사람이 되었으면 좋겠습니다. 우리 가족 그동안 서로 잘 돕고 의지하고 이겨내느라 너무 수고 많았어요. 이제 앞으로는 모두 건강한 꽃길만 걸을 수 있게 같이 노력해 봅시다. 사랑합니다.

국문요약

본 연구는 면역 항암치료인 adoptive T cell therapy (ACT)의 효율을 향상시키기 위해 새로운 방법을 제시한다. ACT 중 T cell receptor-engineered T (TCR-T)는 환자의 T 세포에 TCR을 발현시켜 종양 항원을 인식하고 이를 통해 암세포를 사멸시키는 치료 전략 중 하나로 고�형암 치료에 적용이 가능하다. 그러나 종양 미세환경에서 T 세포의 활성이 제한되고 효과적인 면역반응을 억제하여 발생하는 저조한 지속력은 ACT 치료의 주요 장애물 중 하나이다. 따라서 우리는 이러한 제한점을 극복하기 위해 TCR-T 시스템을 사용하여 T 세포의 기능을 향상시키는 방향을 연구를 진행했다. Chimeric antigen receptor T (CAR-T)에서 사용되는 방법과 유사하게 T 세포의 공동자극분자의 신호전달도메인(intracellular domain, ICD)을 TCR constant 부분에 직접 연결하는 engineering 방법을 설계하였으며, 이를 통해 T cell의 활성화 및 항종양 효과에 미치는 영향을 조사하고자 했다. Lentivirus system을 이용한 형질 도입을 통해 cell line과 human primary cell 모두에서 안정적인 TCR 발현 수준을 확인하였다. 그러나 기대와는 다르게 human primary cell에서 기존 TCR과 비교하여 항종양 효과를 향상시키지는 못했으며, 몇몇에서는 그 효과가 훼손된 것을 확인했다. 그럼에도 공동자극분자의 ICD를 직접 연결하는 engineering 방식은 기존 TCR과 비교하여 T 세포의 활성화의 수준을 통계적으로 유의미하게 증가시키는 것으로 확인되었다. 이 결과는 CAR-T 연구에서 확인된 활성화 반응의 향상과 유사하며, 신호1과 2를 성공적으로 통합시킨 second-generation TCR-T system으로 TCR의 작동에 문제가 없다는 것을 보여준다. 따라서 TCR에 공동자극분자의 ICD를 직접 결합하는 engineering 방법은 ACT 기능을 향상시키는 데 대한 TCR-T engineering 방법에 새로운 전략을 제공하며, 면역 항암 치료분야의 개선 가능성을 제시할 수 있다.

차례

감사의 글	4
국문요약	5
차례	6
서론	8
재료 및 연구방법	10
1. Cell line culture	10
2. Transfection	10
3. Jurkat-T cell lentiviral transduction	11
4. Flow cytometry	11
5. Luciferase Assay	12
6. PBMC isolation	12
7. Primary cell Activation	13
8. Primary cell Lentiviral transduction	13
9. Primary cell culture	13
10. <i>In vitro</i> cytotoxicity assay	13
11. Quantitative measurement method	14
결과	15
1. 결합된 공동자극분자 ICD는 발현에 영향을 미치지 않는다.	15
2. 결합된 공동자극분자 ICD는 증가된 T 세포의 활성화를 나타낸다.	17
3. 결합된 공동자극분자의ICD는PBMC에서도 발현에 큰 영향을 미치지 않는다.	18
4. 결합된 공동자극분자 ICD는 T 세포의 항종양 효과를 향상시키지는 않는다.	19
5. eTCR의 훼손된 항종양효과는 mis-pairing과 관련이 있다.	20
고찰	22
참고문헌	26
영문요약	28

그림 목차

Figure 1.....	15
Figure 2.....	16
Figure 3.....	17
Figure 4.....	19
Figure 5.....	20
Figure 6.....	21

표 목차

Table 1.....	10
Table 2.....	11
Table 3.....	16

서론

Adoptive cell therapy (ACT)는 환자의 혈액이나 조직에 존재하는 자가 T 세포를 추출한 후 효과가 검증된 T 세포 수용체 (T cell receptor, TCR) 또는 임의로 조작된 chimeric antigen receptor (CAR)를 유전자 변형을 통해 발현시킨 후 배양하여 다시 환자에게 주입하는 치료전략이다. 이를 통해 환자의 T 세포에 향상된 면역 시스템을 부여하여 기존의 면역 시스템보다 효과적으로 cancer에 대응할 수 있게 한다.(1) 그러나 이러한 치료 전략을 어렵게 만드는 주요 장애물 중 하나는 tumor microenvironment (TME)의 다양한 면역 억제의 환경이다. 이러한 환경은 T 세포의 증식, 기능을 억제하는 면역 관문 수용체(PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3, BTLA 등), T 세포에 영향을 주는 신진대사물질(A2AR, IDO, TGF- β 등), hypoxia, fibroblast, angiogenesis 등을 포함하며, T 세포의 빠른 exhaustion과 짧은 지속력을 유발하여 치료에 저조함을 보인다.(2),(3),(4) 따라서 ACT의 치료효과 향상을 위해 표적 항원을 정확하게 식별하는 것과 동시에 면역 억제 환경에서 T 세포 exhaustion같은 단점들을 극복할 수 있는 여러가지 전략이 연구되고 있다.(5) 이 연구에서는 TME에서 억제되는 ACT의 기능을 향상시키기 위한 목적으로 TCR-T system을 활용하여 기능을 강화 시키는 것을 목표로 실험을 진행하였다. 이를 위해 CAR-T cell의 engineering 방법을 참고하여 TCR-T의 기능을 강화할 수 있는 전략에 대한 아이디어를 얻었다.

CAR-T는 현재 항암 치료에서 중요한 치료 전략 중 하나이다. 이는 CAR를 안정적으로 발현시킨 T 세포를 사용하여 암세포 표면에 과발현되어 있는 항원을 특이적으로 인식하여 사멸시키는 방식이다.(6) 초기 1세대 CAR-T는 CAR와 CD3z chain의 intracellular domain (ICD)를 결합하여 endogenous 한 TCR 과 유사한 방식으로 T 세포의 활성화를 유도하였지만, 생체 내에서 T 세포의 증식이 제한적이며, 최종적으로 항종양 효과를 보이지는 못했다.(6) 반면 2세대 CAR-T는 transmembrane domain 하단에 공동 자극분자의 ICD를 결합하여 T 세포의 증식을 효과적으로 유도하고 anti-apoptosis gene인 Bcl-XL을 발현하며, 사이토카인을 분비하여 항종양 효과를 향상 시키는 결과를 확인하였다. 이러한 기능의 향상으로 CAR-T는 대표적으로 B 세포의 항원인 CD19를 표적으로 인식하여 혈액암이나 백혈병의 효과적인 치료제로써 성공적으로 사용되고 있다.(7) (8),(9)

그러나 정상세포에서도 암세포와 동일한 표면항원을 발현하는 세포들이 존재하여 CAR-T가 정상세포를 공격할 수 있는 위험성이 존재하며,(10) 아직까지 적용 가능한 항원이 부족하여 치료 적용 범위가 제한적이기 때문에 고품암에 적용하는 것이 어렵다. 이에 반해 기능이 검증된 TCR을 환자의 T 세포에 안정적으로 발현시키는 치료 전략인 TCR-T를 사용하면 TCR이 MHC class를 통해서 제시되는 endogenous한 항원만을 인식하여 적용 가능한 항원의 종류가 다양하며

암세포에서 특이적으로 발현되는 항원에 반응하여 사멸을 유도할 수 있어(11) 전체 암종의 95%에 해당하는 고형암 치료에도 적용시킬 수 있다. 따라서 공동자극분자의 ICD를 결합하는 CAR-T의 engineering 방식을 TCR-T에 적용하여 유사하게 기능을 증강시킬 수 있는지 확인하고 두가지 다른 세포치료 전략의 장점을 살리고 단점을 보완할 수 있는 새로운 치료 전략을 찾아내고자 연구가 진행되었다.

선행 연구에서 TCR-T system을 적용하여 1g4 TCR을 형질 도입한 후 T 세포의 endogenous CD3z 유전자에 TRAF 결합 모티프를 특이적으로 통합하여 T 세포 활성화 신호1과 2를 동시에 전달할 수 있는 TCR 시그널링 경로를 강화하는 방법을 시도했고, engineering 된 TCR-T는 기존보다 증가된 항종양 효과를 보였다.(12) 우리는 이 연구결과에서 TCR-T도 CAR-T의 engineering 방식과 유사하게 공동자극분자 ICD의 통합이 TCR-T system에서도 유사하게 항종양 효과를 향상시킬 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

선행연구의 결과를 바탕으로 TCR α, β 각 chain에 CD3z와 TNF family인 4-1BB, CD27의(13) ICD를 직접 결합하여 하나의 구조인 single unit의 engineering 방식을 설계했다. 이후 각 실험군을 단계별로 screening하여 다음의 항목들을 확인했다. 첫째로, 공동자극분자 ICD가 결합된 TCR 복합체 구조가 변형되지 않고 안정적으로 발현될 수 있는지 확인했다. 둘째로, 공동자극분자 ICD가 결합된 TCR 복합체가 정상적으로 T 세포 활성화 신호1과 2를 통합하여 T 세포를 활성화시킬 수 있는지 확인했다. 세번째로, primary cell을 이용한 TCR-T가 실제로 항종양 효과의 향상을 성공적으로 이끌어 낼 수 있는지 확인했다. 마지막으로, 특정 공동자극분자의 ICD의 결합이 TCR-T의 기능을 향상시키는지 평가하였다. 이러한 과정을 통해서 TCR-T를 CAR-T와 유사한 system으로 조작성 가능하며, 기능을 증가시켜 기존보다 좋은 효과를 낼 수 있을 것으로 기대했다. 본 연구는 면역 항암 치료 및 면역학 분야에서 중요한 응용 가능성을 갖고 있으며, 향후 연구에서는 이를 더욱 발전시킬 수 있는 방안을 탐구하고 논의할 예정이다.

재료 및 연구방법

1. Cell line culture

Jurkat-Luc, T2, A375-Luc 는 (주)네오젠티씨에서 제공받았다. Jurkat-Luc 는 RPMI1640 (gibco, REF 22400-089)에 추가적으로 neomycin 을 300 µg/ml 농도로 처리하여 배양하였다. T2 는 IMDM(Cat# LM 004-01)를 이용하여 배양하였다. A375-Luc 는 DMEM (WELGENE, cat. LM 001-05)에 puromycin 을 10µg/ml 농도로 처리하여 배양하였다

2. Transfection

Transfection 하루 전 T175 flask에 Lenti-X293T cell 을 3×10^7 /35ml DMEM(10% FBS, 1% P/S) media (WELGENE, cat. LM 001-05)에 맞춰 seeding 한다. overnight 후에 Mixture A (plasmid: 26.25 ug / gag-pol pMD2.5G : 13.13 ug / ENV pMD pRRE : 6.56 ug / REV pRSV-Rev : 6.56 ug / P3000 reagent : 47.5 ul / Opti-MEM : 4.6 ml) 과 Mixture B (Lipofectamine 3000 transfection(Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, cat#L3000015) : 117ul / Opti-MEM : 4.6ml) 을 만든다. A 와 B 를 섞어 RT 에 15min incubation 하였다. 그 사이에 배양 중인 세포의 flask 의 상층액을 suction 하고 DMEM (5% FBS 1% P/S) media 25 ml 을 넣어 치환해준다. A+B 의 mixture 10 ml 을 flask 벽면에 대고 한방울씩 천천히 adding 하여 37°C 5% CO2 incubator 에 48hr 배양하였다. 48hr 후에 상층액을 모두 수거하여 50ml conical tube 넣고 centrifuge 2000RPM/4°C/5min 원심분리 한다. sup 만 모두 0.45µm PES filter 에 걸러 50ml conical tube 에 옮겨 sup 과 LentiX concentrator (TaKaRa, cat#631232)를 3:1 (14 ml:4.7 ml) 비율로 넣어 4°C에서 3 일 incubation 한다. centrifuge 4000RPM/4°C/2hr 로 원심분리 하여 sup 을 제거하고 RPMI1640 media (gibco, REF 22400-089) 300 ul 로 virus pellet 을 조심스럽게 풀어준 후 50 ul 씩 aliquot 하여 -80°C deepfreezer 에 보관하였다. 이후 Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit (Takara, Clontech, Cat# 632200)을 사용하여 정량하였고 각 well 을 microplate reader (spectramax 340PC, Molecular Devices)를 이용하여 측정하였다. 사용된 각 sample 의 LPs 는 다음과 같다 (Table 1)

Table 1. 사용된 LPs 정량값

No	Sample	LPs (TU/ml)
1	pLV-1g4 TCR	2.56E+08
2	pLV-1g4 (m)	2.90E+08
3	pLV-eTCR β-4-1BB(s)	2.81E+08
4	pLV-eTCR β-4-1BB(L)	2.76E+08
5	pLV-eTCR β-CD27	3.73E+08
6	pLV-eTCR β-CD3z	2.18E+08
7	pLV-eTCR α-4-1BB(s)	1.73E+08
8	pLV-eTCR α-4-1BB(L)	1.61E+08
9	pLV-eTCR α-CD27	1.97E+08
10	pLV-eTCR α-CD3z	3.80E+08

3. Jurkat-T cell lentiviral transduction

Jurkat-Luc T cell 을 50ml conical tube 에 모아서 Centrifuge 1,500RPM/Room Temperature (RT)/5min 원심분리 한 뒤 sup 을 제거하고 cell pellet 을 RPMI1640 media (10% FBS, 1% P/S) (gibco, REF 22400-089) 로 잘 풀어주어 cell counting 하였다. 12well plate 에 Jurkat-Luc T cell 를 1×10^6 /well 로 넣어주고 well 에 total 1ml/well 이 되게 4MOI 의 LPs, protamine sulfate (Final con 30 ug/ml) 3 ul 를 넣어주었다. Plate 를 parafilm 으로 sealing 하고 32°C/1200rcf/90min 동안 cytopsin 한 뒤 parafilm 을 벗기고 well 에 RPMI1640 media (10% FBS, 1% P/S) 1ml 을 넣어준 후 37°C 5% CO2 incubator 에서 overnight 하였다. 다음날 T25 flask 로 옮겨주고 RPMI1640 media (10% FBS 1% P/s) (gibco, REF 22400-089)를 추가로 넣어 총 10ml 을 맞추고 37°C 5% CO2 incubator 에 배양하였다.

4. Flow cytometry

세포 염색 전에, 세포의 Fc receptor 는 human BD Fc block (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)와 FACS buffer(PBS 에 2% FBS 를 넣어 줌)를 사용하여 막아줬으며 항체 처리 후, 상온에서 5 분간 방치하였다. MHC-NY-ESO-1 complex 를 사용할 경우 다른 것보다 가장 먼저 염색하였으며, 먼저 MHC-NY-ESO-1 complex tetramer 와 PE-streptavidin 을 4:1 비율로 섞고 차광하여 1 시간 반응시킨 후, 세포에게 가장 먼저 처리하였다. TCR β 13.1 항체의 경우, 단독으로 먼저 처리하였으며 상온에서 10 분 차광하여 방치하였다. 세포 표면의 단백질 발현을 확인하기 항체를 처리하여 함께 암실 4 °C에서 30 분간 방치하였다. 이후 FACS buffer 로 세척 후, DAPI solution 을 이용하여 죽은 세포를 걸러냈다. FACS Canto II (BD Biosciences)를 이용하여 유세포 측정을 하였고 sorting 은 FACS sorter(BD Biosciences)를 사용하였다. FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA)를 이용하여 분석하였다. 사용한 항체는 [Table 2]에 정리하였다

Table 2. FACS antibody

Cat#	Antibody	Company
362410	PE anti-human TCR V β 13.1 Antibody	Biolegend
362408	APC anti-human TCR V β 13.1 Antibody	Biolegend
422302	Human TruStain FcX™	Biolegend
300406	FITC anti-human CD3 Antibody	Biolegend
D3571	DAPI	Invitrogen
405204	PE streptavidin	Biolegend
-	MHC-NY-ESO-1 complex	neogenTC

5. Luciferase Assay

T2 cell 을 50ml conical tube 에 모아서 centrifuge 1500RPM/RT/5min 한 뒤 sup 을 제거하고 cell pellet 을 IMDM (10% FBS 1% P/S) (WELGENE, cat. LM 004-01)로 풀어 cell counting 했다. (1) T2(+) cell 1×10^6 을 분리하여 IMDM (15% FBS, 1% P/S) 로 치환하고 NY-ESo-1 peptide 와 b2m (BD Biosciences, Cat#551089)을 (final con 50 ug/ml (0. 5ul) 3 ug/ml (6 ul)) 가 되도록 ep-tube 에 넣어주고 RT 에서 30min 마다 tapping 해주며 2 시간 반응시킨다. 반응이 끝나면 sup 제거후 DPBS 10ml 을 넣어준 후 centrifuge 1500RPM/RT/5min 한다. 과정을 두 번 반복 후 RPMI1640 (10% FBS, 1% P/S) (gibco, REF 22400-089) 5ml 로 cell pellet 을 풀어서 well 당 $2 \times 10^4/100ul$ 의 농도로 ep-tube 에 준비한다. (2) T2(-)cell 1×10^6 은 RPMI1640 (10% FBS, 1% P/S) 5ml 로 풀어서 well 당 $2 \times 10^4/100ul$ 의 농도로 ep-tube 에 준비한다. eTCR/Jurkat T cell 을 counting 한 후 (3) T2 cell 과 co culture 할 eTCR/Jurkat T cell 2.4×10^6 을 1.2 ml 로 풀어 $2 \times 10^5/100ul$ 의 농도로 ep-tube 에 준비한다. (4) P/I activation control eTCR/Jurkat T cell 은 2×10^6 을 준비하여 (5) RPMI1640 P/I media (PMA 1 ul (1 nmol): Ionomycin 1 ul (1 ug/ml) = 1 ml : 1 ul : 1 ul) 1 ml 로 풀어 $2 \times 10^5/100 ul$ 의 농도로 ep-tube 에 준비한다. 96 well plate 각 1well 당 (1)과 (3)을 각각 100 ul (total 200 ul), (2)과 (3)을 각각 100 ul (total 200 ul), (4)와 (5)를 각각 100 ul (total 200 ul), (3)과 RPMI1640 media 를 각각 100 ul 씩 (total 200 ul) 넣어주었다. 모든 실험군은 triplicate 로 진행했다. 37°C 5% CO2 overnight incubation 하였고 96 well 에 있는 sample 을 96well white plate 로 옮겨 centrifuge 1500RPM/4°C/10min 후 sup 을 90 ul 제거한다. -20°C에 보관되어 있는 Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega Bright-Glo, REF E2620) 시약을 녹인 후 암실에서 100 ul/well 로 처리하고 GloMax® 96 Microplate Luminometer (Promega, USA)로 5min 이내 발광을 측정했다.

6. PBMC isolation

연구에서 사용된 혈액은 서울아산병원 임상시험심사위원회에 허가를 받아 획득하였다(IRB 2020-0910). Blood sample 을 50ml conical Tube 에 넣은 후 blood 와 동량의 DPBS (2% FBS)를 넣고 Pipetting 하여 잘 섞어준다. SEPMATE Tube 에 Lymphoprep (STEMCELL, cat#07851) 13ml 을 기포가 생기지 않게 넣어주고 DPBS (2% FBS)와 섞은 Blood 를 Lymphoprep 과 섞이지 않게 Tube 벽면에 천천히 옮긴다. Centrifuge 1000g /25°C/20min/accel 1/brake 1 한 뒤 새로운 50 ml Conical Tube 에 DPBS (2% FBS)를 15ml 넣어준 후, buffy coat 만을 분리하여 Conical tube 에 옮겨준다. Centrifuge/1500rpm/7min accel 9/brake 9 후 sup 을 제거하여 pellet 을 2ml 의 DPBS (2% FBS)로 풀어준 후 50ml 을 채워준다. 앞 과정을 두 번 더 반복한다. Cryostar CS10 (STEMCELL, REF 100-1061)으로 pellet 을 풀어 cell counting 후 cryovial 에 넣어주고 -80°C deep freezer 1 day 보관 후 다음날 LN2 Tank 에 보관했다.

7. Primary cell Activation

LN2 Tank 에서 꺼낸 PBMC Stock 을 빠르게 37°C water bath 에서 녹인 후 50ml conical tube 에 warming 된 RPMI(2) media (10% FBS, 1% P/S) (gibco, REF 22400-089) 9ml 넣어두고 녹인 PBMC 1ml 을 넣어 Centrifuge 1500rpm/RT/5min 한 뒤 sup 을 제거한 후 cell pellet 을 RPMI(2) media (10% FBS, 1% P/S)로 잘 풀어주어 cell counting 하였다. T25 flask 에 PBMC 2×10^7 를 넣고 media 를 20 ml 맞추어 넣어준 후 T cell TransAct (Miltenyi Biotec)를 vortexing 후 100 ul 와 IL-2 100 IU/ul 기준 4 ul 를(1×10^5 IU/ml) 넣어 준 후 37°C 5% CO2 incubator 에서 48hr 동안 배양하여 PBMC 를 activation 하였다.

8. Primary cell Lentiviral transduction

48hr 후 Activation 된 PBMC 20 ml 을 50 ml conical tube 에 모아서 Centrifuge 300g RT 10min 한 뒤 sup 과 TransAct 를 제거하고 cell pellet 을 RPMI(2) media (10% FBS, 1% P/S) (gibco, REF 22400-089) 로 잘 풀어주어 cell counting 하였다. 6well plate 에 PBMC 를 2×10^6 /well 로 넣어주고 well 에 total 1ml/well 이 되게 PBMC 1×10^6 / 4MOI 의 LPs 를 넣어주고 protamine sulfate (final con 30 ug/ml) 3 ul 를 넣어주었다. Plate 를 parafilm 으로 sealing 하고 32°C/800g/2hr 동안 cytopsin 한 뒤 parafilm 을 벗기고 Transduction 된 PBMC 1ml 을 T25 flask 로 옮겨주고 RPMI(2) media (10% FBS, 1% P/S)를 추가로 넣어 총 10ml 을 맞추어 주었고, IL-2 (1×10^5 IU/ml)을 40ul (400 IU/ml)을 넣어준 후 37°C 5% CO2 incubator 에서 배양하였다.

9. Primary cell culture

PBMC Transduction 을 Day2 로 기준하여 Day4 에 IL-2 (1×10^5 IU/ml)이 섞인 RPMI(2) media (10% FBS, 1% P/S) (gibco, REF 22400-089) 10ml 을 cell 에 damage 가 가지 않게 조심스럽게 추가해주었다. Day6 에 cell counting 후 T75 flask 로 옮겨주고 IL-2 (1×10^5 IU/ml)이 섞인 RPMI(2) media (10% FBS, 1% P/S)를 total cell 수 (5×10^5 /ml) 기준으로 추가해주었다. 이후 Day 8,10 에도 마찬가지로 cell counting 후 total cell 수 6×10^7 기준으로 T175 flask 로 옮겨주었고 IL-2 (1×10^5 IU/ml)이 섞인 RPMI(2) media (10% FBS, 1% P/S)를 total cell 수 (5×10^5 /ml) 기준으로 추가해주었다. Day12 에 total cell 을 counting 하고 FBS:DMSO (9:1) stock media 를 사용하여 cell stock 을 제조하고 cell freezing container 를 사용하여 -80°C deep freezer 에 overnight 후 LN2 Tank 에 stock vial 을 보관하였다.

10. *In vitro* cytotoxicity assay

co-culture 16hr 전 A375-Luc cell 을 50 ml conical tube 에 모아서 centrifuge 1500RPM/RT/5min 한 뒤 sup 을 제거하고 cell pellet 을 DMEM (10% FBS 1% P/S)으로 1ml suspension 후 well 당

2.5x10⁵/50ul 의 농도로 ep-tube 에 준비한다. 96 well white plate 각 1well 당 A375-Luc 를 2.5x 10⁵/50ul 의 농도로 각각 (1) <co-culture> 50 ul 을 넣어주고 RPMI(2) media (10% FBS, 1% P/S)(gibco, REF 22400-089)와 DMEM media (10% FBS, 1% P/S) 를 1:1 로 섞어 준비하여 (1) (total 150ul)와 (2) <co culture x> (total 200 ul)에 각각 100 ul 와 150 ul 를 넣어주고 16 시간 overnight 하였다. 모든 실험군은 triplicate로 진행하였다. eTCR PBMC는 co-culture 전날 T25 flask 에 RPMI(2) media (10% FBS, 1% P/S) 10 ml 을 넣어 thawing 하고 overnight 하였다. A375-Luc 를 넣어주고 16hr 뒤 eTCR PBMC 을 counting 한 후 A375-Luc cell 과 co-culture 할 eTCR-PBMC 를 4.5x10⁵ 을 450ul 로 풀어 5 x 10⁴/50ul 의 농도로 ep-tube 에 준비하여 (1), (2)에 각각 50ul 씩 넣어준다. 이후 28hr 37°C 5% CO₂ incubation 하였다. 28hr 후 centrifuge 1,500RPM/4°C/10min 하였고 sup 을 100 ul 제거하고 -20°C에 보관되어 있는 Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega, Cat#E2620) 시약을 녹인 후 암실에서 100 ul/well 로 처리하고 GloMax® 96 Microplate Luminometer (Promega, USA)로 5min 이내 발광을 측정하였다.

11. Quantitative measurement method

모든 통계분석은 GraphPad Prism9 을 사용하여 Ordinary One-way ANOVA 방법에 의해 분석하였다. 각 유의성은 (Mean ± SD, *P<0.0332, **P<0.0021, ***P<0.0002, ****P<0.0001) 으로 차이를 나타내었다.

결과

1. 결합된 공동자극분자 ICD는 발현에 영향을 미치지 않는다.

우리는 공동자극분자의 ICD가 직접 결합된 enhanced TCR (eTCR)이 TCR-T system에서 정상적으로 TCR 복합체를 형성하여 세포 표면에 발현될 수 있는지 확인했다. 특이적 HLA-A*02 제한 펩타이드 SLLMWITQC (NY-ESO-1 SPEAR T-세포; GSK 794)(14)를 항원으로 인식하는 1g4 TCR을 사용하였다.(15) TCR constant 말단에 CD3z와 T 세포의 공동자극분자인 4-1BB, CD27의 ICD를 α , β chain 각각에 결합하여 하나의 구조로 발현시키도록 설계한 single unit의 vector structure를 제작하였다. 4-1BB ICD는 두종류로 기존의 4-1BB ICD와 (4-1BB(L)이라 명함), 선행연구에서 기능을 개선시킨 4-1BB ICD (4-1BB(s)라 명함)를(12) 사용하였다. 추가로 1g4 TCR에 MCS site의 결합 차이에 의한 발현 수준을 확인하기 위해 1g4 TCR에 MCS를 생성하여 (1g4(m)이라고 명함)을 추가하였다(Figure 1, Table 3).

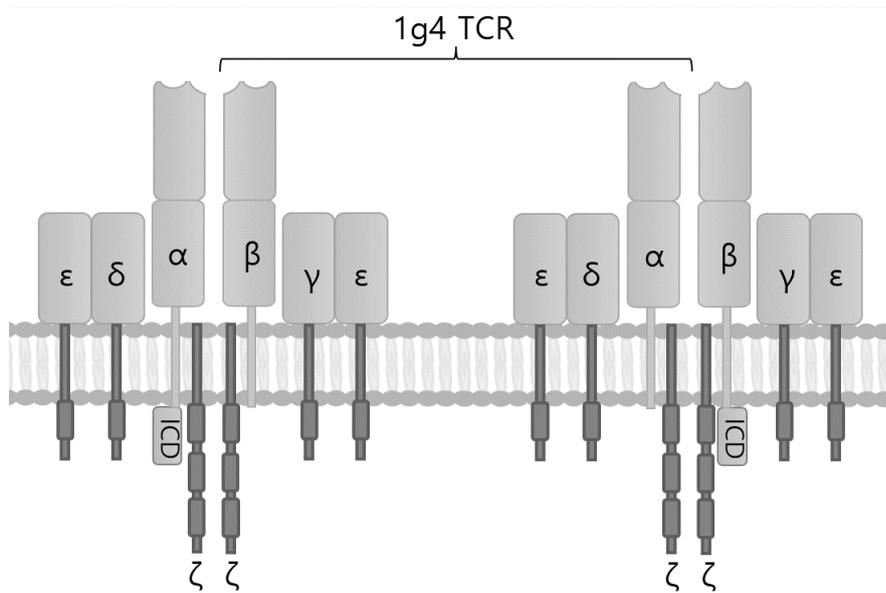


Figure 1. eTCR의 예상 모식도, 1g4 TCR α β chain에 각 공동자극분자 ICD가 결합 되어있는 형태

Table 3. Vector design

1g4 TCR	pLV-1g4-beta-furin cleavage site-GSG linker-P2A-alpha
1g4 (m)	pLV-1g4-beta-GS linker-MCS-furin cleavage site-GSG linker-P2A-alpha-GS linker-MCS
eTCR β -4-1BB(s)	pLV-1g4-beta-(GGGS)3 linker-4-1BB(s) ICD-furin cleavage site-GSG linker-P2A-alpha
eTCR β -4-1BB(L)	pLV-1g4-beta-(GGGS)3 linker-4-1BB(L) ICD-furin cleavage site-GSG linker-P2A-alpha
eTCR β -CD27	pLV-1g4-beta-(GGGS)3 linker-CD27 ICD-furin cleavage site-GSG linker-P2A-alpha
eTCR β -CD3z	pLV-1g4-beta-(GGGS)3 linker-CD3z ICD-furin cleavage site-GSG linker-P2A-alpha
eTCR α -4-1BB(s)	pLV-1g4-beta-furin cleavage site-GSG linker-P2A-alpha-(GGGS)3 linker-4-1BB(s) ICD
eTCR α -4-1BB(L)	pLV-1g4-beta-furin cleavage site-GSG linker-P2A-alpha-(GGGS)3 linker-4-1BB(L) ICD
eTCR α -CD27	pLV-1g4-beta-furin cleavage site-GSG linker-P2A-alpha-(GGGS)3 linker-CD27 ICD
eTCR α -CD3z	pLV-1g4-beta-furin cleavage site-GSG linker-P2A-alpha-(GGGS)3 linker-CD3z ICD

NFAT 이 활성화되면 IL-2 를 대신하여 Luciferase reporter gene 을 발현할 수 있게 설계한 TCR KO Jurkat-Luc 세포에 lentivirus system 을 이용하여 1×10^6 cell/4MOI 기준으로 형질도입하여 eTCR 을 stable 하게 발현할 수 있는 eTCR/Jurkat-Luc stable cell line 을 구축했다. 대조군으로는 공동자극분자를 ICD 를 결합하지 않은 1g4 TCR 을 발현시킨 Jurkat-Luc 세포를 사용하였다. 1g4 TCR 에 MCS 를 결합한 구조는 발현에 영향을 주지 않았다. 대조군인 1g4 TCR/Jurkat-Luc 세포의 발현 수준은 66.2% 정도인 것에 비교하여 1g4(m)과 eTCR/Jurkat-Luc 세포 실험군의 발현 수준은 대략 80~95% 사이의 높은 수준을 나타내었다. 그 중에서도 eTCR α -CD3z 은 75.6%로 eTCR 중 가장 낮은 발현 수준을 보였다(Figure 2). 이러한 결과는 eTCR 의 발현 수준이 1g4 TCR 의 발현과 거의 차이가 없거나 더 높은 수준으로 발현된다는 것을 나타낸다. 따라서 TCR constant 말단에 공동자극분자의 ICD 를 직접 결합한 single unit 의 구조는 TCR 복합체 구조가 형성되는 것을 훼손시키지 않고 eTCR 의 정상적인 세포 표면 발현에 영향을 미치지 않음을 보여준다.

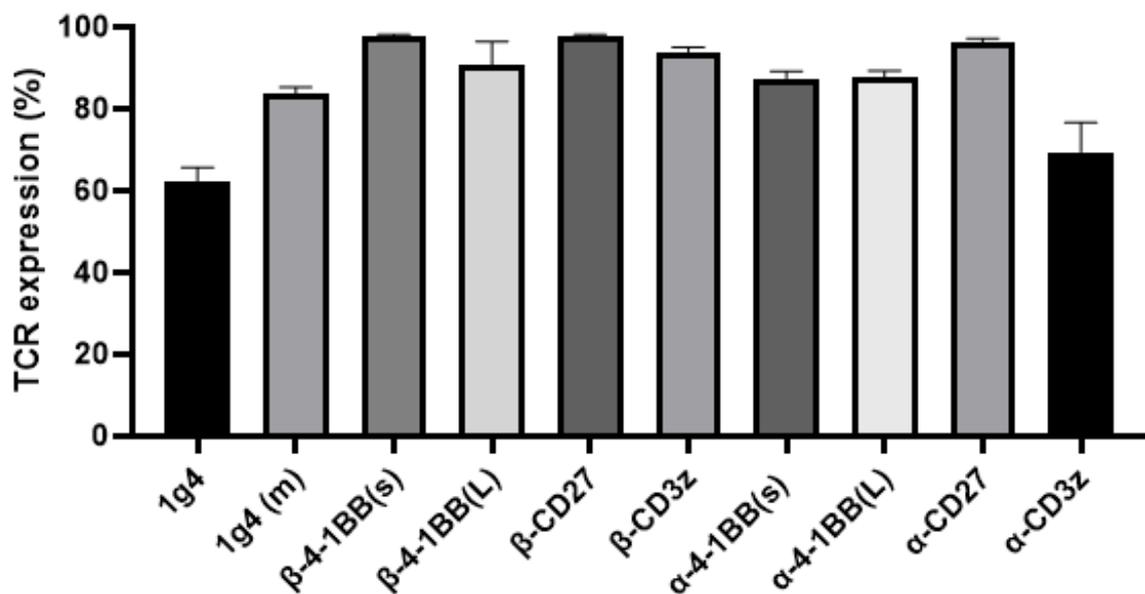


Figure 2. Lentivirus system으로 형질도입 이후 5일째에 FACs 분석에 의해 측정된 Jurkat-Luc 세포에서 eTCR의 발현수준(%) (n=3)

2. 결합된 공동자극분자 ICD는 증가된 T 세포의 활성화를 나타낸다.

우리는 발현된 eTCR 복합체 구조가 정상적으로 작동하는지 확인하기 위해 T 세포의 활성화 상태를 측정했다. 또한 정상적으로 활성화가 이루어진 경우, eTCR이 1g4 TCR과 비교하여 T 세포의 활성화를 유의미하게 향상시킬 수 있는지, 어떤 공동자극분자의 ICD가 차이를 나타내는지 확인하였다.

eTCR이 정상적으로 작동하는지 확인하기 위해 antigen presenting cell (APC)로 HLA-A*02:01 T2 세포를 사용했다. T2 세포에 NY-ESO-1을 pulsing하고 eTCR/Jurkat-Luc 세포와 16시간 동안 coculture를 진행했다. 이후 luciferase-luciferin 시스템을 통해서 eTCR/Jurkat-Luc 세포가 생성한 luciferase 발광값을 측정하고, 이 값을 1g4 TCR/Jurkat-Luc 세포의 luciferase 발광값과 비교하여 eTCR/Jurkat-Luc 세포가 향상된 활성화를 나타내는지 확인했다. 실험에 앞서 대조군인 1g4/Jurkat-Luc, 1g4(m)/Jurkat-Luc 세포는 대조군의 TCR 100% 발현에 대한 활성화의 정확한 비교를 위하여 TCR 발현 수준을 100%로 sorting하여 실험을 진행하였다.

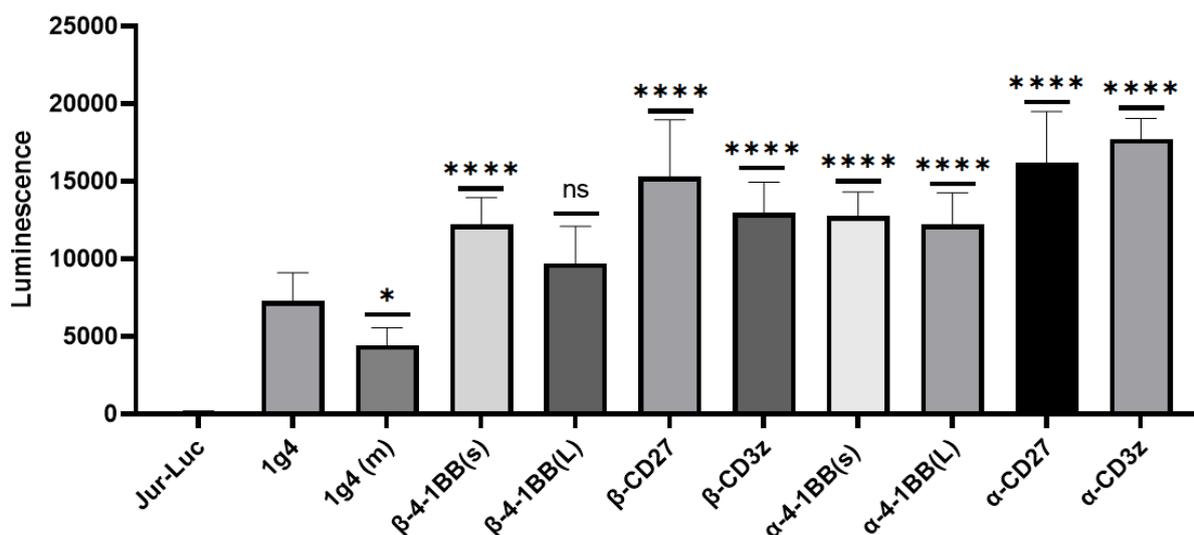


Figure 3. eTCR에 의한 활성화 수준의 영향을 측정하기 위해 eTCR/Jurkat-Luc 세포를 E:T Ratio 10:1 비율로 NY-ESO-1을 pulsing 한 T2세포와 co-culture overnight 진행했다(n=3). Luciferase 발광값은 Promega GloMax® 96 discover system을 사용하여 측정했다. 각 유의성은 (Mean ± SD, *P<0.0332, **P<0.0021, ***P<0.0002, ****P<0.0001) Ordinary One-way ANOVA 방법에 의해 분석하여 차이를 나타냈다. 표시된 P값은 1g4 TCR/Jurkat-Luc 와 eTCR/Jurkat-Luc 그룹의 비교에 해당한다.

1g4 TCR/Jurkat-Luc 과 eTCR/Jurkat-Luc 세포의 활성화 정도를 비교해 본 결과, 모든 실험 그룹에서 NY-ESO-1 이 pulsing 되지 않은 T2 세포와 co-culture 시 발광값은 매우 낮은 수준으로 측정되었다. 그러나 NY-ESO-1 이 pulsing 된 T2 세포와 co-culture 를 진행한 경우 1g4/Jurkat-Luc 세포와 비교하여 eTCR/Jurkat-Luc 세포의 발광값이 통계적으로 유의미하게 증가된 것을 확인하였다. 한편 eTCR β -4-1BB(L)/Jurkat-Luc 은 1g4/Jurkat-Luc 와 유사한 수준의 발광값을 유지하여 유의미한 증가를 보이지 못했다(Figure 3). 이러한 결과는 eTCR 이 항원과 반응하여 정상적으로 작동하는 것에 문제가 없음을 나타내고, 공동자극분자의 ICD 가 TCR 과 직접 연결된 single unit 의 구조가 T 세포의 활성화를 유의미하게 향상시킨 것을 의미한다. 따라서 선행연구에서 TCR 의 신호 1 과 공동자극분자의 신호 2 를 성공적으로 통합시켜 T 세포의 기능을 향상시킨 결과와 유사하다는 것을 나타낸다.(12) 또한 single chain receptor 와 공동자극분자 ICD 의 신호를 통합하여 T 세포의 기능을 향상시킨 CAR-T 의 연구결과와 일치한다.(8) 하지만 특정 공동자극분자에 의한 변화나 TCR α , β 에 결합된 구조에 의한 영향은 확인하지 못했다.

3. 결합된 공동자극분자의 ICD 는 PBMC 에서도 발현에 큰 영향을 미치지 않는다.

우리는 eTCR 을 이용한 TCR-T system 의 기능을 평가하기 위해 human primary cell 에서도 eTCR 이 정상적으로 발현될 수 있는지 확인했다. Lentivirus system 을 이용하여 PBMC 1×10^6 cell/4 MOI 기준으로 형질 도입하여 eTCR 을 안정적으로 발현할 수 있는 eTCR/PBMC stable cell line 을 구축했다. 대조군으로는 공동자극분자 ICD 를 결합하지 않은 1g4 TCR 을 발현시킨 1g4 TCR/ PBMC 을 사용하였다. TCR 발현 수준은 13 일차를 기준으로 평가하였다. 1g4 TCR/PBMC 는 70%의 발현 수준을 나타내었으며, 이와 비교하여 eTCR/PBMC 는 전반적으로 55%에서 65% 사이의 발현 수준을 보였다(Figure 4). 이는 eTCR 의 발현이 1g4 TCR 과 유사한 수준을 보여준다. 따라서 TCR 과 공동자극분자 ICD 가 직접 결합한 single unit 구조가 PBMC 에서도 Jurkat T 세포에서 보여준 것과 동일하게 TCR 복합체 구조를 형성을 훼손시키지 않고 eTCR 이 정상적으로 발현할 수 있음을 보여준다. 그러나 비교적 안정한 immortalized cell line 인 Jurkat T 세포의 TCR 발현율은 높은 수준을 보이는 것에 비해 PBMC 에서의 TCR 발현율은 다소 떨어지는 것으로 확인되었다

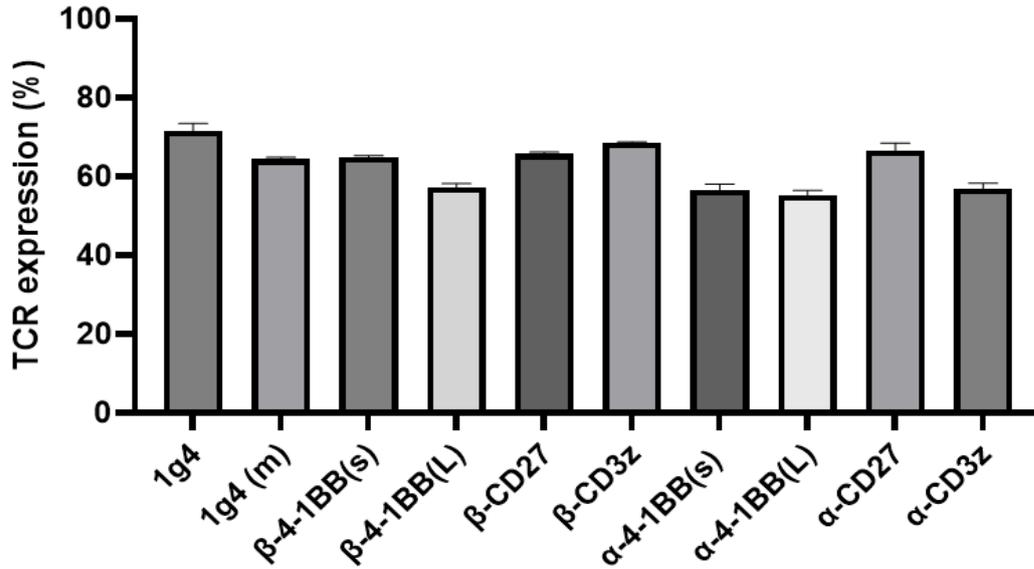


Figure 4. Lentivirus system으로 형질도입 이후 8일째에 FACs 분석에 의해 측정된 human primary 세포에서 eTCR의 발현수준(%) (n=3)

4. 결합된 공동자극분자 ICD는 T 세포의 항종양 효과를 향상시키지는 않는다.

eTCR/PBMC가 증가된 항종양 효과를 나타낼 수 있는지 확인하기 위해 NY-ESO-1을 발현하는 HLA-A*02:01 A375-Luc 흑색종 세포와 공동 배양했다. eTCR/PBMC에 의해서 A375-Luc가 사멸되면서 발광값이 감소하는 것을 측정하여 항종양 효과의 정도를 평가하였다. eTCR/Jurkat T 세포에서 대조군과 비교하여 활성화의 정도를 유의미하게 향상시킨 것과 대조적으로 1g4 TCR/PBMC의 항종양 효과와 비교하여 eTCR β-4-1BB(s), eTCR β-CD27, eTCR β-CD3z, eTCR α-4-1BB(s), eTCR α-CD27/PBMC는 통계적으로 유의미한 차이를 보이지 못했다. 또한 eTCR α-4-1BB(L)/PBMC는 항종양 효과를 거의 보이지 못했고 eTCR β-4-1BB(L), eTCR α-CD3z/PBMC는 대조군인 PBMC와 동일하게 세포사멸을 시키지 못했다(Figure 5). 기대와 달리 결합된 공동자극분자 ICD가 항종양 효과를 향상시키지 못하고 몇몇은 그 효과가 훼손된 것으로 나타났다. 이는 1g4 TCR/PBMC에 비하여 eTCR/PBMC의 항종양 효과가 향상되지 않았음을 보여준다. 또한 특정 공동자극분자에 의한 변화나 TCR α, β에 결합된 구조에 의한 영향은 확인하지 못했다.

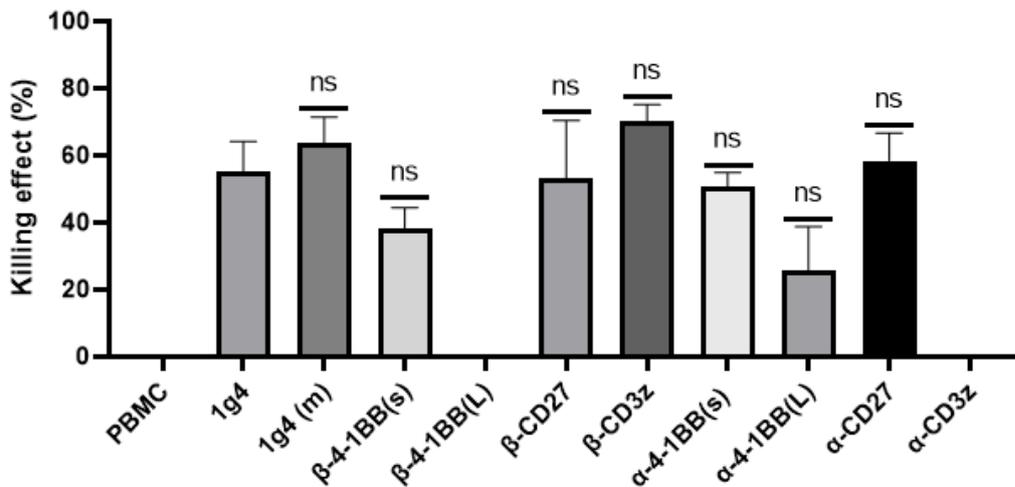


Figure 5. eTCR에 의한 항종양효과의 영향을 측정하기 위해 eTCR/PBMC세포를 E:T Ratio 10:1 비율으로 NY-ESO-1을 발현하는 HLA-A*02:01 A375-Luc 흑색종 세포와 28hr co-culture 진행했다 (n=3). Luciferase 발광값은 Promega GloMax® 96 discover system을 사용하여 측정했다. 각 p값은 (Mean ± SD, *P<0.0332, **P<0.0021, ***P<0.0002, ****P<0.0001) Ordinary One-way ANOVA 방법에 의해 분석하여 차이를 나타냈다. 표시된 P값은 1g4 TCR/PBMC와 eTCR/PBMC 그룹의 비교에 해당한다.

5. eTCR의 훼손된 항종양효과는 mis-pairing과 관련이 있다.

형질도입된 TCR이 PBMC의 endogenous한 TCR gene과의 mis-pairing이 발생하면 항원을 인식할 수 없어 항종양 효과를 보일 수 없다. 따라서 훼손된 항종양 효과가 eTCR 발현율과 별개로 mis-pairing에 의한 영향인지 확인하기 위해 NY-ESO-1 tetramer를 사용하여 NY-ESO-1 binding (%)을 FACS로 확인하였다. 1g4 TCR/PBMC와 비슷한 항종양 효과를 보인 eTCR/PBMC 실험군은 NY-ESO-1 binding이 1g4 TCR/PBMC와 유사한 정도를 보이는 반면 항종양 효과를 거의 보이지 못한 eTCR α-4-1BB(L)/PBMC와 훼손된 항종양 효과를 보인 eTCR β-4-1BB(L), eTCR α-CD3z/PBMC는 다른 실험군들과 비교하여 NY-ESO-1 binding이 낮은 수준으로 확인되었다(Figure 6). 따라서 형질도입한 eTCR의 mis-pairing의 수준은 훼손된 항종양 효과가 연관된 것으로 보인다.

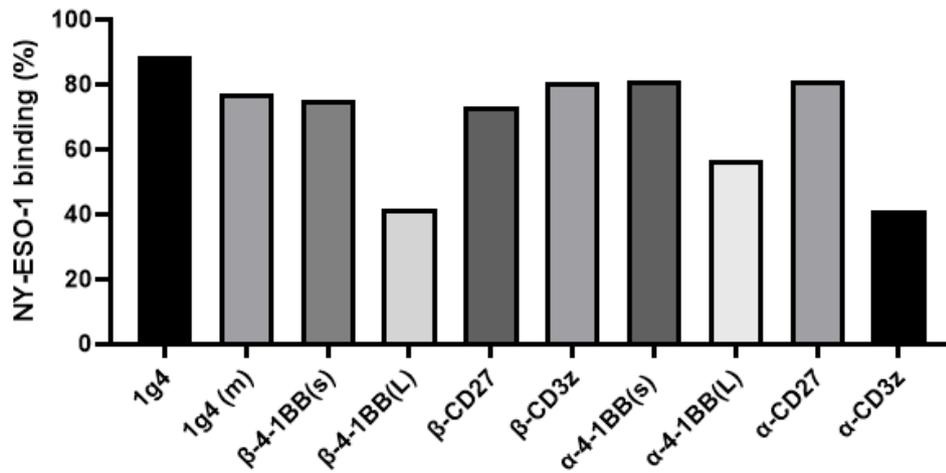


Figure 6. Lentivirus system으로 형질도입 이후 13일째에 human primary 세포에서 FACs 분석에 의하여, 1g4 TCR을 발현하고 있는 population중 NY-ESO-1 tetramer를 binding하는 세포를 gating하여 측정했다.

고찰

TCR-T 치료는 TCR의 기능에 크게 의존한다. 하지만 현재로서는 TCR의 기능을 최적화하거나 우수한 기능을 가진 TCR을 규명해 내기 위한 기술의 많은 한계점들이 존재한다.(16) 결합력을 수정하는 방법 또한 항종양 효과를 향상시킬 수 있는 동시에 교차 반응성을 초래할 수 있는 위험이 존재한다.(17) 이에 따라 조작이 용이한 CAR-T의 engineering 기술과 같이 TCR-T에서도 간단한 engineering을 기술을 적용하여 기능이 좋은 TCR을 찾거나 효과를 향상시키는 기술보다 효과적으로 치료에 적용할 수 있는 방법을 고안했다.

우리는 T 세포의 활성화 과정 중 유도되는 신호들을 하나의 신호로 통합하는 방법을 선택했다. T 세포의 활성화는 T 세포의 생존과 증식을 가능하게 하는 면역반응의 필수적인 과정이다. 이 과정은 TCR이 APC의 MHC class를 통해 제시된 항원을 인식하여 신호 1을 유도하는 것으로 시작된다.(18) 그러나 이 신호만으로는 충분한 신호를 전달하지 못하며 보조적인 신호가 필수적으로 요구된다. 공동자극분자의 상호작용은 신호 2를 유도하고, 이는 신호 1과 통합하여 T 세포 활성화가 가능하게 한다. 만약 공동 자극의 신호가 없으면 무감각 및 면역학적 무지를 유발하게 되어 활성화를 유도할 수 없다. 따라서 두 신호의 통합만이 T 세포의 활성화를 최종적으로 유도할 수 있다.(19) 우리는 TCR의 신호와 공동자극분자의 신호가 연속으로 진행되도록 TCR에 공동자극분자의 ICD를 결합한 single unit의 engineering 방법을 시도했다. 이 방법이 T 세포 활성화 및 항종양 효과에 미치는 영향을 확인하는 것에 중점을 두었으며, 이러한 접근 방식이 TCR-T 치료의 효율성을 향상시킬 수 있는 방법의 가능성을 연구했다.

ACT 치료는 환자 T세포에 향상된 면역기능을 부여하기 위해 형질도입 된 TCR의 높은 발현 수준이 중요하다. (1) 따라서 첫번째로 결합된 공동자극분자의 ICD가 TCR의 발현에 미치는 영향을 조사했다. 다른 형태의 세포 치료제인 CAR-T는 single chain receptor가 하나의 구조로 발현되는 반면 TCR-T 치료에 사용되는 TCR의 구조는 α , β chain이 서로 결합하여 정상적으로 복합체를 형성해야만 발현이 가능한 구조를 가지고 있어(20) CAR-T와 다른 eTCR의 구조가 발현에 미치는 영향을 확인해야 했다. 설계한 TCR 구조는 α , β chain 중 하나의 chain에 공동자극분자 ICD를 결합한 구조로, 이로 인해 하나의 chain이 기존보다 bulky한 상태로 구성되어 결합과정에서 정상적인 TCR 복합체의 구조가 변형될 가능성이 있고, 이러한 변화가 TCR 복합체 형성에 영향을 미쳐 TCR의 발현을 방해할 수도 있다고 가정했다. 또한 형질도입의 효율은 다양한 세포 유형에 따라 차이가 있으며, 일반적으로 표현형이 안정적인 immortalized cell line 보다 비교적 안정하지 않은 primary cell에서는 그 효율이 감소할 수 있다. 이러한 차이를 설명하기 위해서 eTCR의 발현수준을 1g4 TCR과 비교했다. Jurkat T세포에서의 eTCR 발현 수준은 대조군인 1g4 TCR보다 더 높거나 유사한 발현 수준을 나타냈다. 또한 human primary cell 인 PBMC에서 eTCR의 발현

수준은 Jurkat T세포와 비교하여 완전히 동일한 수준은 아니었지만, 대조군인 1g4 TCR과 비슷한 발현 수준을 나타냈다. 이 결과는 공동자극분자의 ICD를 TCR에 직접 결합한 single unit의 engineering이 cell type과 큰 관계없이 TCR 복합체 구조의 형성을 훼손하지 않고 유지하면서 TCR 발현 수준에 큰 영향을 미치지 않음을 강조한다.

선행연구에서는 human primary T cell의 endogenous TCR을 CRISPR/cas9 system을 활용하여 1g4 TCR로 치환하고, T 세포의 endogenous한 CD3z에 4-1BB 의 ICD를 knock in 하여 결합시킨 두 단계의 2 unit의 engineering을 통해 TCR의 증가된 발현과 TCR-T의 기능 향상을 확인했다.(12) 반면 우리의 engineering 시스템은 TCR α , β chain에 직접 공동자극분자 ICD를 결합하여 single unit 으로 발현되도록 설계되었고, 확인된 높은 수준의 TCR 발현은 single unit system으로도 TCR 발현 정도에 영향을 주지 않았음을 보여주었다. 또한 이러한 연구 방식은 CAR-T 치료와 달리 TCR의 정상 구조를 유지하면서 T 세포의 기능을 향상시킬 수 있는 새로운 시스템을 제시한다. 그러나 본 연구에서는 여러 donor에서 eTCR의 발현을 측정하지 않고 한명의 donor에서만 측정했기 때문에 향후 연구에서 eTCR의 발현율이 다른 donor들에서도 동일하게 유지되는지 평가할 필요성이 있다.

다음으로 eTCR 복합체가 형성되어 정상적으로 발현되었어도 공동자극분자 ICD가 결합된 TCR복합체의 구조가 정상적인 구조보다 bulky 하게 구성되어 이러한 구조적 변화로 인해 ITAM에 신호전달 단백질들의 접근이 방해될 가능성을 고려했다. 이런 경우 올바른 신호전달이 이루어지지 못할 수 있으며, 결과적으로 T 세포의 활성화에 영향을 미치지 못할 수 있다고 가정했다. 따라서 TCR의 정상적인 작동여부를 확인하기 위해 T 세포의 활성화가 정상적으로 유도되는지 확인하였다. 또한 정상적으로 활성화가 이루어질 경우 eTCR이 1g4 TCR과 비교하여 T 세포의 활성화를 유의미하게 향상시킬 수 있는지 확인하고, 특정 공동자극분자 ICD 가 활성화 정도에서 차이를 보이는지도 확인했다.

T 세포는 TCR과 항원을 제시하는 APC의 MHC class와의 결합을 통해 T 세포의 활성화를 유도하는 초기신호를 제공한다.(21) TCR을 통해 항원을 인식하면 주요한 신호전달 단백질인 Zap-70이나 LCK 등이 ITAM에 접근하고 결합하여 인산화시키며, 이 과정은 신호를 증폭시키고 다른 신호전달 경로를 활성화하여 단계적으로 T 세포의 활성화를 유도한다.(22),(23) 이 과정은 NFAT 단백질의 활성화로 이어지며, 다양한 사이토카인 및 기타 T 세포 활성화 유도 단백질의 발현을 유도한다.(24) NFAT 단백질은 대표적으로 IL-2 promoter에 결합하여 IL-2 생산을 촉진하며 그 결과로 활성화된 T 세포는 증식과 생존에 필수적인 IL-2를 분비하게 된다.(25) 따라서 T 세포의 활성화 정도를 IL-2 발현 수준을 통해 판단할 수 있다.

실험에서는 NFAT이 IL-2 promoter를 활성화시켜 유도하는 IL-2 gene 대신 luciferase reporter gene을 발현하도록 설계된 Jurkat-Luc에 eTCR을 형질도입하여 stable cell line을 구축하였다. 이후 luciferase 발광값을 측정하여 IL-2의 생산량을 측정했다.(26) NY-ESO-1을 pulsing시킨 HLA-A*02:01 T2 세포와 16시간 동안 co-culture 실험을 통해 활성화 정도를 측정했다. 1g4 TCR/Jurkat-Luc과

비교하여 eTCR/Jurkat-Luc은 T 세포의 활성화 정도를 유의미하게 향상시킨 것을 확인했다. 이러한 결과는 TCR과 공동자극분자 ICD 신호의 통합이 문제없이 이루어졌으며, eTCR이 정상적으로 작동하여 최종적으로 T 세포 활성화를 유도한다는 것을 보여준다. 또한 T 세포의 활성화를 향상시킨 결과는 활성화 이후 변화된 IL-2의 발현을 의미하며 결합된 공동자극분자의 ICD가 활성화의 현상 중 대표적인 IL-2의 발현양을 향상시킬 수 있음을 보여준다.(25) 이는 선행연구에서 CD3z에 공동자극분자의 ICD를 도입하여 T 세포의 기능을 향상시킨 방법과 유사하다.(12) 따라서 우리의 방법이 TCR-T의 function을 강화시킬 수 있는 새로운 가능성을 제시할 수 있다는 점을 제시할 수 있다. 그러나 특정 공동자극분자에 의한 변화나 TCR α , β 에 결합된 구조에 의한 영향은 확인하지 못했다.

다음으로 eTCR이 항종양 효과를 향상시킬 수 있는지 확인하기 위해서 NY-ESO-1을 발현하는 HLA-A*02:01 A375-Luc 흑색종 세포와 eTCR/PBMC를 16시간 동안 co-culture하는 실험을 수행하고 발광값의 감소를 측정하여 항종양 효과를 평가했다. 1g4 TCR/PBMC와 비교하여 eTCR/PBMC의 항종양 효과는 통계적으로 유의미한 차이를 보이지 못했다. 일부에서는 eTCR/PBMC의 항종양 효과가 약간 감소하거나 훼손된 것으로 나타났다. 기대와 달리 결합된 공동자극분자 ICD는 항종양 효과를 향상시키지 못했고, 특정 공동자극분자에 의한 변화나 TCR α , β 에 결합된 구조에 의한 영향도 확인하지 못했다. 이는 부정적인 결과만이 아닐 수 있다. 이전의 연구에서 공동자극분자 ICD를 통합하여 T 세포의 기능을 향상시킨 CAR-T, TCR-T는 우리의 연구와 유사하게 항종양 효과를 크게 향상시키는 경향을 보이지 못했다. 하지만 T 세포가 오래 살아남을 수 있는 장기적인 지속성에서 차이가 관찰됐다. eTCR/PBMC는 항종양 효과가 기존 1g4 TCR 과 비교하여 비슷한 수준으로 유지되었고, eTCR/Jurkat-Luc 에서 관찰된 것과 같이 T세포 생존과 증식과 관련된 IL-2의 발현량을 촉진하는 T 세포의 활성화를 유의미하게 증가시킨 것을 확인했다. 따라서 eTCR도 이전 연구들과 같이 잠재적으로 장기적인 지속성에서 차이를 보일 수 있다.

훼손된 항종양 효과를 보이는 몇몇의 eTCR은 endogenous 한 TCR 간의 mis-pairing과 연관성이 있는 것으로 확인되었다. human primary cell은 endogenous한 TCR gene을 보유하고 있어 형질도입시 eTCR gene과 endogenous한 TCR gene이 mis-pairing 될 가능성이 있다. Mis-pairing 된 TCR은 대상 항원을 인식할 수 없어서 T 세포가 대상 항원에 대한 면역 반응을 유도할 수 없다는 점을 감안할때, 관찰된 훼손된 항종양 효과의 결과는 미스-페어링이 그 원인 중 하나일 수 있음을 시사한다. 또한 Mis-pairing은 자가항원에 특이성을 가질 수 있어 환자에게 심각한 위험을 초래할 가능성이 존재한다.(27) 따라서 TCR의 mis-pairing을 해소하기 위한 전략을 고안해야 한다. 두 개의 chain으로 이루어진 TCR 을 단일 chain으로 엔지니어링 하고(28), TCR의 constant 영역을 mouse segment로 교체하거나(29), PBMC의 endogenous 한 TCR gene을 knock out 하며, TCR-CD3z의 키메라 분자를 생성하는(30) 등 여러가지 방법들이 존재한다. 따라서 향후 연구에서 mis-pairing의 확률을 줄이는 동시에 eTCR의 정확한 pairing의 확률을 높이는 방법을 적용하는 것이 필요하다.

이번 연구에서 확인하지 못한 공동자극분자에 의한 직접적인 T 세포의 기능변화를 평가하기 위해

추가적인 실험이 필요하다. 이를 위해서는 해당 공동자극분자 ICD가 유도하는 사이토카인 분비를 정량화하여 T 세포가 장기적으로 지속되어 오랜시간 생존하며 동시에 항종양 효과를 나타낼 수 있는지 확인하는 것이 필요하다. 뿐만 아니라 T 세포의 cell memory type은 장기 지속성에 중요한 영향을 끼치기 때문에 eTCR-T 세포와 종양세포의 장기적인 상호작용을 통해 특정 공동자극분자 ICD가 유도하는 T 세포 phenotype의 변화를 확인하는 것이 필요하다.

참고문헌

1. Morotti M, Albukhari A, Alsaadi A, Artibani M, Brenton JD, Curbishley SM, et al. Promises and challenges of adoptive T-cell therapies for solid tumours. *Br J Cancer*. 2021;124(11):1759-76.
2. Fridman WH, Zitvogel L, Sautes-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(12):717-34.
3. Rodriguez-Garcia A, Palazon A, Noguera-Ortega E, Powell DJ, Jr., Guedan S. CAR-T Cells Hit the Tumor Microenvironment: Strategies to Overcome Tumor Escape. *Front Immunol*. 2020;11:1109.
4. Antonana-Vildosola A, Zanetti SR, Palazon A. Enabling CAR-T cells for solid tumors: Rage against the suppressive tumor microenvironment. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2022;370:123-47.
5. Zhao L, Cao YJ. Engineered T Cell Therapy for Cancer in the Clinic. *Front Immunol*. 2019;10:2250.
6. David L. Porter MD, Bruce L. Levine PD, Michael Kalos PD, Adam Bagg MD, Carl H. June MD. <Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia.pdf>. *The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE*. 2011.
7. Holstein SA, Lunning MA. CAR T-Cell Therapy in Hematologic Malignancies: A Voyage in Progress. *Clin Pharmacol Ther*. 2020;107(1):112-22.
8. Carpenito C, Milone MC, Hassan R, Simonet JC, Lakhali M, Suhoski MM, et al. <Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains.pdf>. *PNAS*. 2009.
9. Milone MC, Fish JD, Carpenito C, Carroll RG, Binder GK, Teachey D, et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Mol Ther*. 2009;17(8):1453-64.
10. Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J*. 2021;11(4):69.
11. Chandran SS, Klebanoff CA. T cell receptor-based cancer immunotherapy: Emerging efficacy and pathways of resistance. *Immunol Rev*. 2019;290(1):127-47.
12. Lah S, Kim S, Kang I, Kim H, Hupperetz C, Jung H, et al. Engineering second-generation TCR-T cells by site-specific integration of TRAF-binding motifs into the CD247 locus. *J Immunother Cancer*. 2023;11(4).
13. Croft M. Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14(3-4):265-73.
14. Ramachandran I, Lowther DE, Dryer-Minnerly R, Wang R, Fayngerts S, Nunez D, et al. Systemic and local immunity following adoptive transfer of NY-ESO-1 SPEAR T cells in synovial sarcoma. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):276.
15. Rapoport AP, Stadtmauer EA, Binder-Scholl GK, Goloubeva O, Vogl DT, Lacey SF, et al. NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med*. 2015;21(8):914-21.

16. Baulu E, Gardet C, Chuvin N, Depil S. <TCR-engineered T cell therapy in solid tumors State of the art and perspectives.pdf>. SCIENCE ADVANCES. 2023.
17. Spear TT, Evavold BD, Baker BM, Nishimura MI. Understanding TCR affinity, antigen specificity, and cross-reactivity to improve TCR gene-modified T cells for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2019;68(11):1881-9.
18. Chakraborty AK, Weiss A. Insights into the initiation of TCR signaling. *Nat Immunol*. 2014;15(9):798-807.
19. Chambers CA, Allison JP. <Costimulatory regulation of T cell function.pdf>. ScienceDirect. 1999.
20. Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity*. 2006;24(2):133-9.
21. Lee JU, Kim LK, Choi JM. Revisiting the Concept of Targeting NFAT to Control T Cell Immunity and Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2018;9:2747.
22. Zhang W, Sloan-Lancaster J, Kitchen J, Tribble RP, Samelson LE. <LAT The ZAP-70 Tyrosine Kinase Substrate that Links T cell Receptor to cellular Activation.pdf>. 1998.
23. LETOURNEUR F, KLAUSNER RD. <Activation of T Cells by a Tyrosine Kinase Activation Domain in the Cytoplasmic Tail of CD3 ε.pdf>. *Science*. 1992.
24. Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(6):472-84.
25. Fric J, Zelante T, Wong AY, Mertes A, Yu HB, Ricciardi-Castagnoli P. NFAT control of innate immunity. *Blood*. 2012;120(7):1380-9.
26. Miraglia LJ, King FJ, Damoiseaux R. <Seeing the Light Luminescent Reporter Gene Assays.pdf>. BENTHAM SCIENCE. 2011.
27. Xue S, Gillmore R, Downs A, Tsallios A, Holler A, Gao L, et al. Exploiting T cell receptor genes for cancer immunotherapy. *Clin Exp Immunol*. 2005;139(2):167-72.
28. Willemsen RA, Weijtens MEM, Ronteltap C, Eshhar Z, Gratama JW, Chames P, et al. <Grafting primary human T lymphocytes with cancer-specific chimeric single chain and two chain TCR.pdf>. *Gene therapy*. 2000.
29. Cohen CJ, Zhao Y, Zheng Z, Rosenberg SA, Morgan RA. Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-cell receptor (TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability. *Cancer Res*. 2006;66(17):8878-86.
30. Sebestyen Z, Schooten E, Sals T, Zaldivar I, San Jose E, Alarcon B, et al. Human TCR that incorporate CD3zeta induce highly preferred pairing between TCRalpha and beta chains following gene transfer. *J Immunol*. 2008;180(11):7736-46.

영문요약

This study proposes a novel approach to enhance the efficacy of adoptive T cell therapy (ACT), a form of immunotherapy for cancer treatment. Among ACT strategies, T cell receptor-engineered T (TCR-T) therapy can be applied to solid tumors by expressing TCRs on patient T cells to recognize tumor antigens and eradicate cancer cells. However, a significant challenge in ACT is the limited activation of T cells within the tumor microenvironment, leading to suppressed immune responses and reduced effectiveness. Therefore, we investigated methods to improve T cell function using the TCR-T system.

Similar to techniques used in Chimeric Antigen Receptor T (CAR-T) therapies, we designed an engineering approach to directly link the intracellular domain (ICD) of co-stimulatory molecules to the TCR constant region. We aimed to assess the impact of this modification on T cell activation and anti-tumor effects. Using lentivirus-mediated gene delivery, we confirmed stable TCR expression levels in both cell lines and human primary cells. However, contrary to expectations, this modification did not enhance anti-tumor effects compared to conventional TCR in human primary cells; in some cases, these effects were diminished. Nevertheless, the engineering approach of directly linking the ICD of co-stimulatory molecules statistically significantly increased T cell activation levels compared to conventional TCR. These results resemble enhanced activation responses observed in CAR-T research, demonstrating the feasibility of a second-generation TCR-T system that successfully integrates signals 1 and 2.

Therefore, the direct coupling of co-stimulatory molecule ICD to TCR via engineering provides a new strategy in TCR-T engineering to enhance ACT functionality, suggesting potential improvements in the field of immune oncology therapy

