

보도일시	배포 즉시 보도
	2024. 10. 29.(화)
문의	연구책임자 의과대학 성지혜 교수(02-740-8298) / 교신저자
	제1저자: 이해님 공동 교신저자: 의과대학 김항래 교수, 이창한 교수/ 한국과학기술원 장미희 박사

■ 제목/부제

제목	형광공명에너지전이 기반 CAR 바이오센서를 통한 CAR-T 라이브 세포 스크리닝 시스템 개발
----	--

■ 요약

연구 필요성	CAR(chimeric antigen receptor)-T 세포치료제는 환자의 면역세포인 T 세포에 암 세포를 인지하여 T 세포를 활성화시킬 수 있는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현 시킨 후 다시 환자 몸에 주입하여 암세포를 선택적으로 살상하는 최신 면역항암 치료법이다. 성공적인 CAR-T 세포치료제 개발을 위해서는 핵심 작동 원리인 키메라 항원 수용체 CAR의 디자인이 매우 중요하다. 이를 위해 암 항원에 효과적으로 결합하여 T 세포 활성화를 유도할 수 있는 CAR를 살아있는 세포 상태에서 정교하게 스크리닝하는 혁신적인 기술이 필요하다.
연구성과/ 기대효과	본 연구에서는 살아있는 세포에서 효과적인 CAR를 정밀하게 스크리닝할 수 있는 형광공명에너지전이(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) 기반 CAR 바이오센서를 개발했다. 이를 검증하기 위해 고형암 타겟 암 항원 mesothelin을 표적으로 다양한 CAR 라이브러리 센서를 제작하고, 라이브 FRET 모니터링을 통해 암 항원을 인식하고 CAR 활성을 유도하는 최적화된 CAR를 선별한 후, CAR-T 세포의 증진된 암세포 살상 효과를 확인했다. 본 연구를 통해 구축한 라이브 FRET 기반 CAR 벡터 검증 시스템은 효율적으로 CAR-T 세포 치료제를 개발하고 최적화할 수 있는 획기적인 방법으로 다양한 암 항원에 대한 세포 치료제 기술 상용화에 중요한 기반기술이 될 것으로 기대한다.
Journal Link	https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/smt.202401016

■ 본문

□ 연구결과

성공적인 CAR-T 세포치료를 위해서는 핵심 작동 원리인 효과적인 키메라 항원 수용체 (Chimeric antigen receptor, CAR)를 개발하는 것이 중요하다. 키메라 항원 수용체에서 암 항원을 선택적으로 인지하는 부분인 scFv를 스크리닝하기 위해 재조합 단백질 상태의 암 항원과 결합하는 정도를 측정할 수 있는 phage display와 SPR 방법이 사용되고 있다. 그러나 이와 같은 방법으로는 실제 세포에서 발현된 암 항원의 구조나 암 항원 주위 다른 막단백질 등 세포 환경을 충분히 고려하기 어려운 한계점이 있기 때문에, 선별된 키메라 항원 수용체를 CAR-T 세포에 발현시켰을 때 암세포 결합력이나 암 살상 효능이 예상과는 달리 기대에 미치지 못하는 경우가 발생할 수 있다. 이러한 한계점을 극복하기 위한 방법으로, 본 연구에서는 살아있는 세포 표면 발현한 상태에서 키메라 항원 수용체의 암 항원에 대한 결합력과 T 세포 활성화 정도를 통합적으로 모니터링 할 수 있는 라이브 FRET 기반 CAR 바이오센서를 개발했다.

형광공명에너지전이(Fluorescence resonance energy transfer, FRET) 기반 CAR 바이오센서는 키메라 항원 수용체의 scFv가 암 항원과 결합한 후 그 신호를 세포 내부로 전달하여 주요 신호 전달 도메인인 CD3ζ가 인산화되면 청색과 황색 형광단백질 간 FRET 신호가 증가하도록 설계되었다. 따라서 살아있는 세포 내 FRET 신호 측정을 통해, 키메라 항원 수용체가 암 항원 결합하여 유도된 활성화 정도를 실시간 모니터링하는 것이 가능하며 이를 통해 정교한 키메라 항원 수용체 선별이 가능하다. 이를 검증하기 위해 본 연구에서는 고형암 타겟 암 항원 mesothelin을 표적으로 다양한 CAR 라이브러리 센서를 제작하고, 라이브 FRET 모니터링을 통해 암 항원을 인식하고 CAR 활성을 유도하는 최적화된 CAR를 선별한 후, CAR-T 세포의 증진된 암세포 살상 효과를 확인했다.

이 연구는 삼성전자 미래기술육성센터와 한국연구재단의 지원을 받아 수행했고, 연구결과는 Small Methods (IF 10.7)에 게재됐다.

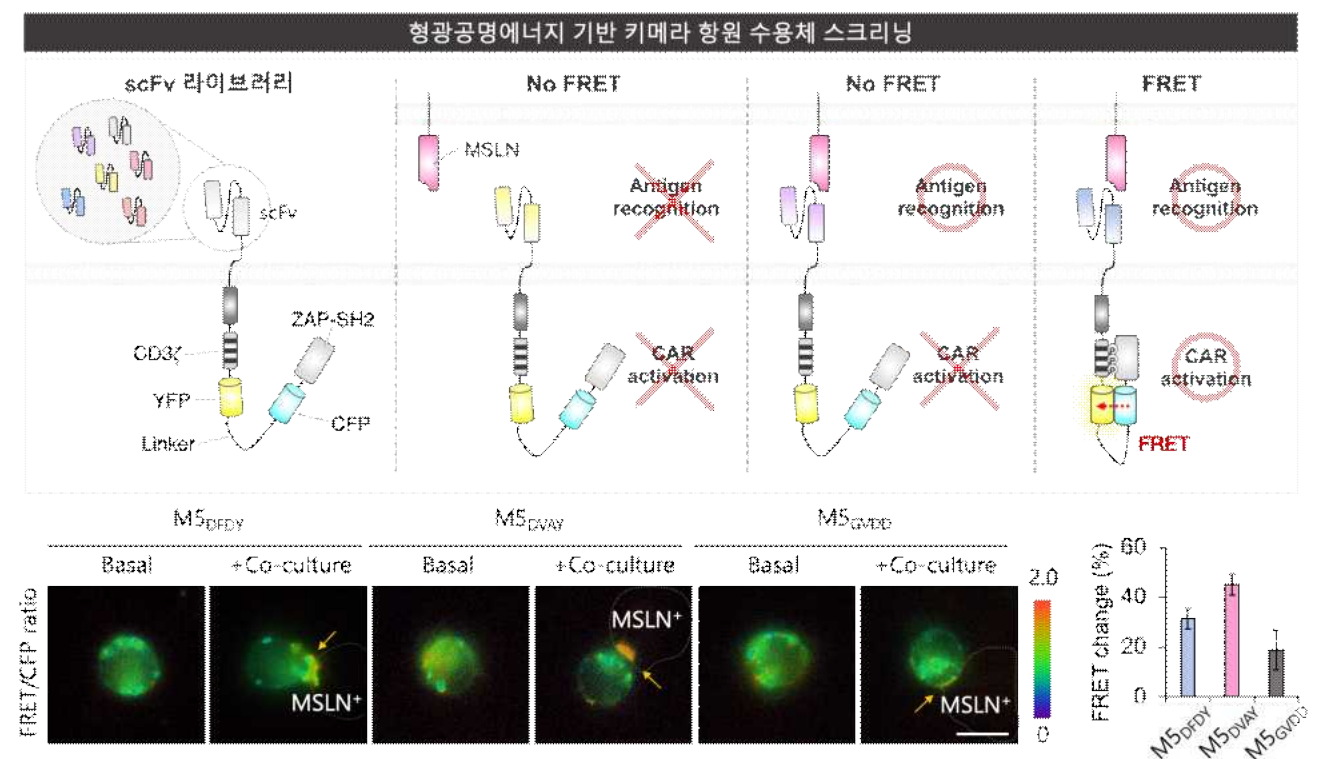
□ 용어설명

- CAR-T 세포 : CAR-T 세포는 면역세포인 T 세포에 암세포 특이적인 CAR (Chimeric antigen receptor)를 발현시킨 세포이며, CAR-T 세포는 암세포 표면의 항원을 인식하여 활성화된 후 암세포를 살상할 수 있다.
- scFv : scFv (single-chain variable fragment)는 항체의 항원 결합 부위인 VH(중쇄의 가변영역)와 VL(경쇄의 가변영역) 영역을 짧은 펩타이드 링커로 연결한 단일 사슬 형태의 항체이다.
- phage display : phage display는 펩타이드, 단백질 혹은 항체 라이브러리를 박테리오파지(세균을 감염시키는 바이러스) 표면에 발현시키는 기술이다. 이를 활용해 항체 라이브러리로부터 특정 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 신규 항체를 발굴할 수 있다.
- SPR : SPR(Surface Plasmon Resonance)은 분자 간 결합 상호작용을 실시간으로 분석할 수 있

는 기술이다. 이 기술은 금속 표면에서 빛의 반사를 측정하여, 두 분자 사이의 결합 강도(K_d), 결합 속도(k_{on}), 해리 속도(k_{off}) 등 정량적인 데이터를 제공한다.

- FRET : Fluorescence resonance energy transfer (FRET)은 두 형광분자 사이의 거리가 매우 가까울 때 (10 nm 이내) donor 형광분자의 에너지가 acceptor 형광분자로 전이되는 현상을 지칭한다. FRET 현상을 일으키는 형광분자 쌍은 donor의 emission 파장과 acceptor의 excitation 파장이 겹친다는 특징을 가지고 있으며, 대표적인 FRET 형광분자 쌍은 청색형광단백질(Cyan fluorescent protein, CFP)과 황색형광단백질 (Yellow fluorescent protein, YFP) 이다.

□ 그림설명



<위: 형광공명에너지 기반 키메라 항원 수용체 바이오센서를 통한 스크리닝 과정의 모식도, 아래: 실제 암세포와 공배양 후 다양한 키메라 항원 수용체의 활성화 정도를 라이브 FRET 신호를 통해 모니터링한 예시>