

| | |
|---------------|--|
| 氏 名 | りんしあの さら LINCIANO SARA |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (学 術) |
| 学 位 記 番 号 | 博 甲 第 1110 号 |
| 学 位 授 与 の 日 付 | 令和 6 年 3 月 25 日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 |
| 研究科・専 攻 | 工芸科学研究科 物質・材料化学専攻 |
| 学 位 論 文 題 目 | Molecular analyses and application of serum albumin interactions with small chemical and biological molecules (血清アルブミンと低分子化学物質および生体分子との相互作用の分子解析と応用) |
| 審 査 委 員 | (主査)准教授 熊田 陽一 教授 堀内 淳一 教授 小堀 哲生 Associate Professor, Ca' Foscari University of Venice *Angelini Alessandro |

論文内容の要旨

アルブミンは 66.5 kDa の非グリコシル化タンパク質で、哺乳動物の血中およびリンパ液中に高濃度に存在し、高度な溶解性と安定性を有する。血中における半減期は最大 19 日であり、多様な低分子ならびに中分子化合物を吸着可能である。ヒト血清アルブミン (hSA) には 7箇所の脂質結合ポケットが同定されており、これらポケット位置に低分子薬物を担持させた薬物-アルブミン複合体は薬物の代謝半減期を飛躍的に延長可能であることから有用とされ、hSA をドラッグキャリアとした薬物送達システム (DDS) の研究が盛んに行われている。

本研究では、血中における薬物-アルブミン複合体の安定な複合体形成と細胞内における積極的な薬物徐放の効率化を目的とし、ヒト血清アルブミン (hSA) と各種脂肪酸、低分子薬物、中分子ペプチドの相互作用部位の特定と親和力制御に関する研究を行った。特に、薬物-hSA 複合体の結晶構造から結合ポケットを特定し、各結合ポケット内および近傍のアミノ酸残基と低分子薬物との相互作用メカニズムを明らかにした。さらに、得られた知見を基に、ペプチドワクチンや免疫調節ペイロード (IMM) などに応用可能な hSA 親和性環状ペプチドの単離技術について研究を展開した。特に、酵母表層提示技術を基に、環状ペプチドライブラリを独自に構築・改良し、アルブミンに対して高い特異性・親和性・交差反応性を併せ持つ脂質修飾環状ペプチドの単離に成功した。これらの成果を基にドラッグキャリアとしての血清アルブミンの有用性と医薬品開発戦略についてまとめている。本論文は 8 章で構成されている。

第 1 章では、血清アルブミンの三次元構造、基本的な物性、従来行われてきた低分子・中分子・高分子バイオ医薬品の特徴とそれらのスクリーニング手法について体系的に記述している。

第 2 章では、hSA と脂肪酸の相互作用の解析と治療への応用について述べられている。hSA-脂肪酸複合体の結晶構造から結合位置を特定するとともに、それらの分子間相互作用について解析し、低分子医薬品の導入位置について考察している。

第 3 章では、hSA と分岐型短鎖パーフルオロアルキル化合物 (short-chain PFAS) との相互作

用の研究について述べられている。PFAS と hSA との相互作用の強さを Isothermal Titration Calorimetry (iTC) によって定量評価するとともに共結晶の構造解析によって相互作用部位を明らかにした。これらの知見より PFAS の体内動態と残留リスクについて考察を行っている。

第4章では、酵母表層提示系を利用した分子進化法による交差反応性分子の単離技術について、原理、戦略を含めて記述している。特に、酵母表層提示系を用いたタンパク質/ペプチドライブライアリからの MACS/FACS を用いた分子進化スクリーニング戦略と相互作用・交差反応性評価について、原理と応用例を紹介している。応用の一例として、ヒトおよびマウスの血清アルブミンにおける単ドメイン抗体 (VHH) の交差反応性結合部位について報告している。上記の分子進化スクリーニング法を用いて、ヒトおよびマウス血清アルブミンに交差反応性のある VHH を単離し、VHH とアルブミンの結晶構造からヒトおよびマウス血清アルブミンの共通のエピトープを同定できることを示している。

第5章では、免疫調節中分子としてのペプチドとアルブミンを活用した新しいがん免疫療法の戦略について述べている。特に、これまで報告ならびに承認してきたペプチドワクチンの特徴や構造・物性を比較するとともに、これらを長期間体内循環させるためのアルブミンを利用した戦略について述べている。

第6章では、分子進化法を用いた高親和性環状ペプチドの迅速な選択と特性評価のための酵母表層提示プラットフォームについて述べている。独自に構築した複数のシステイン残基によって構造形成される多様な環状ペプチドを酵母細胞表層に提示し、これをライブライアリとして様々なターゲットタンパク質に対して高親和的な環状ペプチドを探索できることを実証している。本手法の構築によって解離定数 $1\text{ nM} \sim 1\text{ }\mu\text{M}$ 程度の親和性ペプチドを短期間に単離可能となった。

第7章では、ヒトおよびマウス由来の血清アルブミンに結合可能な環状ならびに二環状ペプチドのスクリーニングについて述べられている。上述の環状ペプチドライブライアリを hSA に適用し、ヒトおよびマウスの同じエピトープを認識可能なペプチド探索を行い、交差反応性ペプチド Alb23 他を同定した。これらの相互作用解析ならびに結合部位の特定も報告している。

第8章では、血清アルブミンに対して結合可能な脂質修飾環状ペプチドの単離について述べている。前述の環状ペプチドライブライアリに非天然アミノ酸を導入するとともにクリック反応を用いて脂肪酸（ミリスチン酸ならびにパルミチン酸）を導入した脂質修飾環状ペプチドライブライアリの構築に成功した。これを用いてアルブミンの脂質結合ポケットへの結合志向性を高めるとともに、ヒト/マウスに交差反応可能な脂質付加環状ペプチドの単離に成功した。以上、得られたペプチド分子の配列、物理化学的特徴、立体構造、交差反応性を考察し、アルブミンを利用したドラッグデリバリーシステムの有用性について論じた。

論文審査の結果の要旨

ヒト血清アルブミン (hSA) は 血中およびリンパ液中に高濃度に存在する非グリコシル化タンパク質で、血中半減期は最大 19 日である。薬物-hSA 複合体は代謝半減期を飛躍的に延長可能であることから、近年、新たなドラッグキャリアとして注目されている。本学位論文では、脂肪酸、低分子薬物、環状ペプチドをターゲット分子とし、血中における hSA との複合体形成に寄与する

吸着サイトを特定し、さらに相互作用メカニズムを解明した。また、独自に設計・構築した脂肪酸修飾環状ペプチドライブアリを用いて、hSA に対して選択的かつ高親和的に相互作用可能なペプチドドラッグ候補が獲得できることを証明した。本学位論文では hSA の基本的物性と研究動向（第 1 章）、低分子化合物-hSA 複合体の吸着サイトの特定と相互作用メカニズム（第 2 章、第 3 章）、酵母細胞表層提示系によるスクリーニングシステムの構築（第 4 章）、ペプチド医薬品の有用性と課題（第 5 章）、酵母表層提示系による環状ペプチドライブアリの設計と分子進化的手法に基づくスクリーニング（第 6 章）、環状ペプチドライブアリを用いた hSA 高親和性ペプチドの探索（第 7 章）、脂肪酸修飾環状ペプチドライブアリを用いた交差反応性 hSA 高親和性ペプチドの探索（第 8 章）から成る。これらの成果に基づき、以下の点において研究の独自性・新規性という観点から大きな意義があると判断した。

第 1 に、hSA の薬物吸着サイトならびに相互作用メカニズムを明らかにした。

第 2 に、環状ペプチドライブアリを用いた分子進化的スクリーニング手法を確立した。

第 3 に、アルブミン交差反応性を有する脂肪酸修飾環状ペプチドの単離に成功した。

なお、本学位論文は、査読制度のある学術雑誌に掲載済みおよび掲載予定の以下の論文 6 編を基礎としており、2 報は申請者が筆頭著者、1 報は申請者が第二著者である。1 報は申請者が第四著者、1 報は申請者が第五著者、1 報は申請者が第六著者である。

学位論文の基礎となった学術論文

- [1] **Sara Linciano**, Giulia Moro, Alessandro Zorzi, Alessandro Angelini, Molecular analysis and therapeutic applications of human serum albumin-fatty acid interactions, *Journal Control Release*, 348, 115-126 (2022) <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.05.038>
- [2] **Sara Linciano**, Ee Lin Wong, Ylenia Mazzocato, Monica Chinellato, Tiziano Scaravetti, Alberto Caregnato, Veronica Cacco, Zhanna Romanyuk, Alessandro Angelini, Guidelines, Strategies and principles for the directed evolution of crossreactive antibodies using yeast surface display technology, *Methods in Molecular Biology*. 2491, 251-262 (2022) https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2285-8_14
- [3] Stefano Liberi, **Sara Linciano**, Giulia Moro, Luca De Toni, Laura Cendron, Alessandro Angelini, Structural analysis of human serum albumin in complex with the fibrate drug gemfibrozil, *International Journal of Molecular Sciences*. 23, 1769 (2022) <https://doi.org/10.3390/ijms23031769>
- [4] Giulia Moro, Stefano Liberi, Filippo Vascon, **Sara Linciano**, Sofia De Felice, Silvano Fasolato, Carlo Foresta, Luca De Toni, Andrea Di, Nisio, Laura Cendron, Alessandro Angelini, Investigation of the interaction between human serum albumin and branched short-chain perfluoroalkyl compounds, *Chemical Research in Toxicology*. 35, 2049-2058 (2022) <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.2c00211>
- [5] Sofia De Felice, Zhanna Romanyuk, Monica Chinellato, Giulia Zoia, **Sara Linciano**, Yoichi Kumada, Els Pardon, Jan Steyaert, Alessandro Angelini, Laura Cendron, Crystal structure of human serum albumin in complex with megobody reveals unique human and murine cross-reactive binding site, *Protein Science*, in press <https://doi.org/10.1002/pro.4887>
- [6] Lorenzo Maso, Matteo Trande, Stefano Liberi, Giulia Moro, Elise Daems, **Sara Linciano**, Frank Sobott, Sonia Covaceuszach, Alberto Cassetta, Silvano Fasolato, Ligia Maria Moretto, Karoline De Wael, Laura Cendron, Alessandro Angelini, Unveiling the binding mode of perfluoroctanoic acid to human serum albumin, *Protein Science*. 30, 830-841 (2021) <https://doi.org/10.1002/pro.4036>