

出血や血液疾患、外科手術などに適応される血小板輸血液は安定性が低く、厳しい保管条件の下でも採血からわずか4日しか利用できない。これまでに受け入れ先研究室では、安定した血小板供給を目的として血清アルブミンやポリマーを用いた人工血小板を開発している[1, 2]。

これまでの報告により、がん細胞が血小板を活性化すること、活性化血小板が腫瘍に蓄積することが明らかになっている。さらに、血小板を標的としたナノ粒子が、乳がん組織へ蓄積することが報告されている[5]。本研究では、人工血小板の腫瘍移行性を評価することにより、人工血小板の抗がん剤送達の可能性を評価した。

【人工血小板の腫瘍指向性評価】

ポリマー-X に 2 種類の血小板様ペプチドを融合した人工血小板を作製した。マウス乳がん細胞である 4T1 細胞を mammary fat pad へ同所移植した担がんモデルマウスにて、人工血小板とポリマー-X の腫瘍指向性を評価した。

人工血小板および比較対象であるポリマー-X は Alexa Fluor 647 で蛍光標識した。本蛍光物質が IVIS Spectrum (Perkin Elmer)装置にて観察出来るか否か、また、どのフィルターが適切であるかを評価した (図 6)。AF647 の蛍光は励起光 640 nm および蛍光 680 nm の組み合わせで最も強いものが得られた。

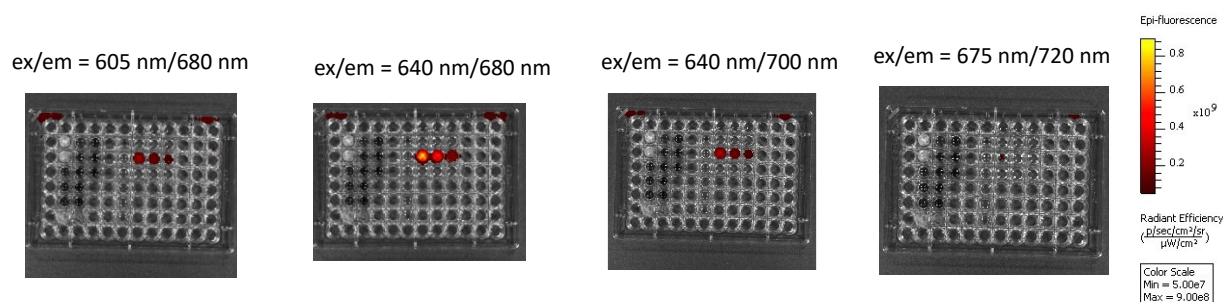


図 1 生体内イメージング装置における定量の最適化評価

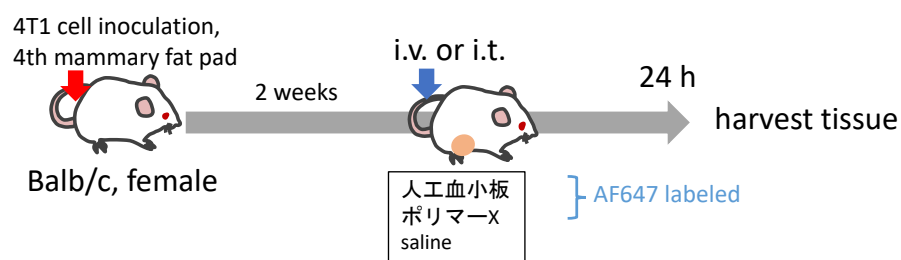


図 2 投与スケジュール

上図のように、Balb/c 雌マウスの第四乳房に 4T1 細胞を移植し、2 週間後、蛍光標識した人工血小板及びポリマー-X を投与した (図 2)。投与から 1, 2, 6, 24 時間後に IVIS 装置にて ex/em = 640/680 nm の蛍光を測定した。また、投与から 24 時間後に安楽死させたのち、下大静脈から採血をし、さらに心臓から PBS を灌流した。各臓器 (腫瘍、肝臓、脾臓、腎臓、肺、心臓) を回収した。臓器に対して 10 倍量の RIPA buffer を加え、ホモジナイズした。腫瘍と肺の一部は OCT コンパウンド中で凍結させ、凍結切片に用いた。



図3 マウス乳がん同所移植モデル

静脈内投与後の各臓器の蛍光を測定することによる体内分布を評価したところ、ポリマー-X と人工血小板の間に有意な差は認められなかった (n=4-7, 図4)。また、腫瘍内投与 (n=2) の場合、人工血小板の方がポリマー-X よりも全体的に高い蛍光が得られたが、分布に差は見られなかった (図4)。

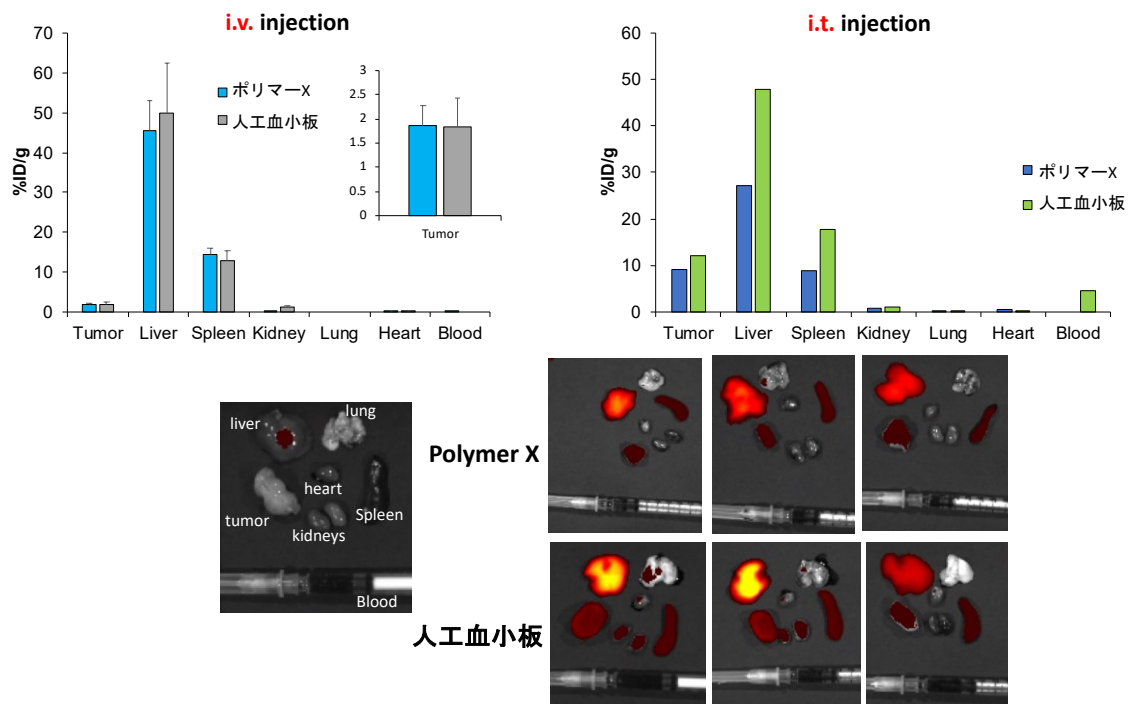


図4 生体内分布評価

また、生体内イメージング装置 IVIS による投与後のマウスの蛍光の経時変化は図 5,6 のようになった。ポリマー-X (図 5)、人工血小板 (図 6) とともに、マウス全体に焦点を合わせた場合、自家蛍光以上の蛍光を得ることはできなかった。一方、腫瘍の周囲を黒紙で覆うと、投与前後で蛍光に変化が見られたことから、腫瘍の蛍光を観察することに成功した。これを定量したものを図 7 に示す。図 4 の結果に同じく、投与後 24 時間後においてはポリマー-X と人工血小板の蛍光にほとんど差は見られなかったものの、投与後 6 時間後においては人工血小板の方がポリマー-X よりもより腫瘍に蓄積している傾向が得られた (図 7)。

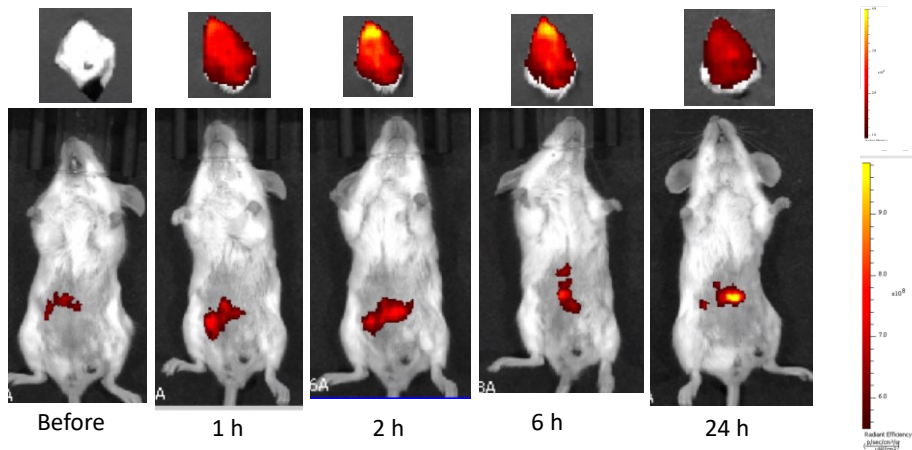


図5 ポリマーXの体内分布

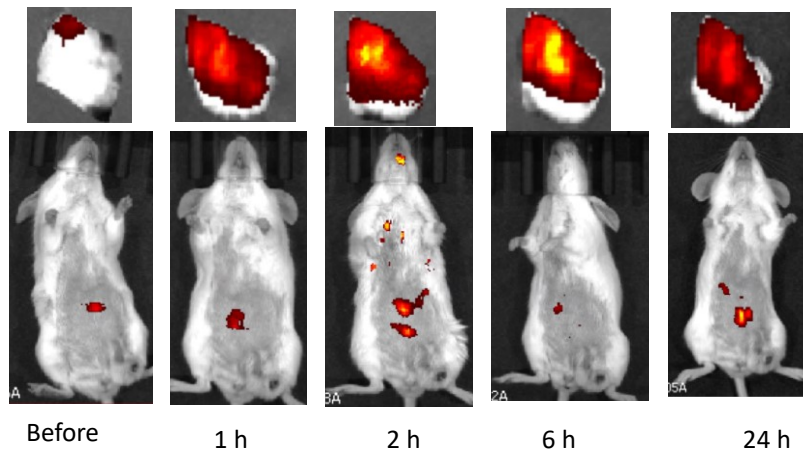


図6 人工血小板の体内分布経時変化

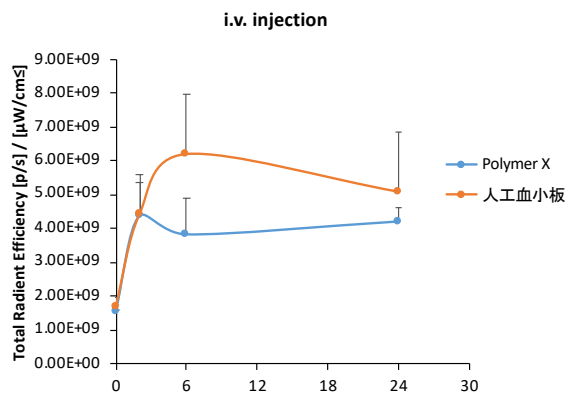


図7 腫瘍分布の経時変化

以上、仮説と異なり本人工血小板は、ポリマーXよりも高い腫瘍移行性を示すことが出来なかった。今回人工血小板の作製に利用したポリマーXは、分子量が大きいため、肝臓で捕捉されたのではないかと考えられる。そこで、現在分子量がポリマーXと比較して10分の1以下のポリマーXを使った人工血小板を作製し、評価中である。図7の結果を踏まえて、ポリマーXをベースとした人工血小板においては、投与後6時間後と24時間後の2点で臓器を採取し、評価する。

【Ex vivo 結合活性試験】

上述の通り、ポリマーXを基に新たな人工血小板を作製した。In vivo 腫瘍移行性については現在評価中であるが、ex vivoでの腫瘍結合性について評価を行ったので報告する。Saline投与群の腫瘍について8 μmの凍結切片を作製し、ポリマーX及びポリマーXをベースに作製した人工血小板(人工血小板)をインキュベートした。ポリマーX及び人工血小板は赤色の蛍光にて標識されている。インキュベート後PBSにて洗浄後に封入し、共焦点顕微鏡にて蛍光を観察した。

その結果、ポリマーXは腫瘍の間質に結合した一方で、人工血小板は凝集塊を形成しながら間質及び

腫瘍細胞へ結合した (図 8)。このメカニズムについて、人工血小板は腫瘍内に血小板が凝集したポイントへ集積したのではないかと考えられる。今後、血小板と共染色したり、コラーゲン抗体との競合性評価をすることにより、この結合様式の違いについて明らかにしたいと考えている。

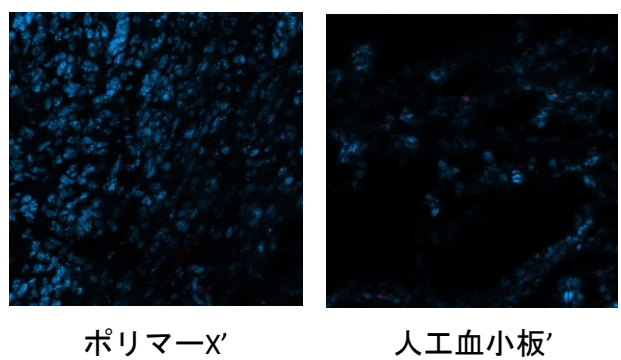


図 8 ex vivo 結合実験

【ブロメライン付加工人血小板の作製】

ポリマーXをベースとした人工血小板が仮説通り腫瘍移行性を示す場合、血小板の分布同様に、人工血小板は腫瘍のより外側に存在する細胞外マトリックスへより多く接着すると考えられる。腫瘍における細胞外マトリックスは、腫瘍微小環境を形成し、薬物送達を妨げることが知られている。そこで、人工血小板に微小環境改善剤をコンジュゲートしたものを作製し、後に投与する抗がん剤の効果を増強する治療法を考案した。

ブロメラインは分子量約 30kDa のシステインプロテアーゼであり、パイナップルの茎などに存在する。日本では壊死組織の分解を目的に、創傷部位への利用が認められている。また、血栓溶解や抗炎症作用、抗がん作用などを有することも明らかになっている[3]。さらに、ブロメラインは細胞外マトリックスを分解することから、腫瘍へのナノ薬物の蓄積を促進する[4]。

まず、ポリマーXとブロメラインの融合体を作製した (図 9)。15 mg のポリマーXを 3 mL の 50% DMSO に溶解し、室温下で 1 時間攪拌した (800 rpm)。150 mg/mL の sulfo-NHS を 57.3 mL、50 mg/mL の EDC を 151.7 mL 加え、室温でさらに 1 時間攪拌した。PBS に溶解した 1.5 mL の 10 mg/mL Bromelain を加え、室温で 24 時間攪拌し、反応後、30% DMSO、10% DMSO で透析した後、さらに 5 回のイオン交換水での透析を行った。

得られた反応物について、タンパク質が結合しているか否かを BCA protein assay にて評価した。なお、パンデミックの影響で機器トレーニングを受けることが制限されており、プレートリーダーには渡米後数ヶ月アクセス出来なかったことから、まず定性的評価を行い、ポリマーX-ブロメライン融合体にタンパク質が存在することを確認した (図 9 左)。一方、ブロメラインは等電点 9.55 の塩基性タンパク質であることから、架橋剤である sulfo-NHS および EDC を用いずともポリマーXへ結合するのではないかと考えた。そこで、ポリマーXとブロメラインを混和しただけのものを作製し、ポリマーX-ブロメライン融合体とのタンパク質量を比較した。その結果、架橋剤を用いないとブロメラインはポリマーXへ結合しなかった (図 9)。またこのとき、1つのポリマーXに約1つのブロメラインが結合していることが計算上明らかになった。

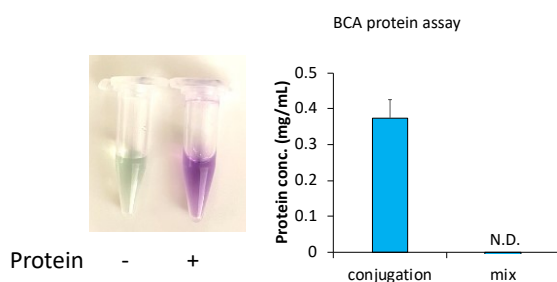


図 8 ヒアルロン酸へのブロメラインの結合性評価

次に、コラーゲンを用いたブロメラインの活性評価を行った。5%ゼラチンを 37°C で融解し、バイアルに分注した後に室温で一晩放置した。コラーゲングルが固まったことを確認した後、ネガティブコントロールとして超純水 (DW)をポジティブコントロールとしてブロメラインを添加し、ポリマーX-ブロメライン融合体と比較した。室温で 24 時間放置したのちの写真を図 10 に示す。ブロメラインによるコラーゲンの分解が確認された一方で、ポリマーX-ブロメライン融合体は酵素活性を維持していないことが

示された。

Bromelain activity test (qualitative)

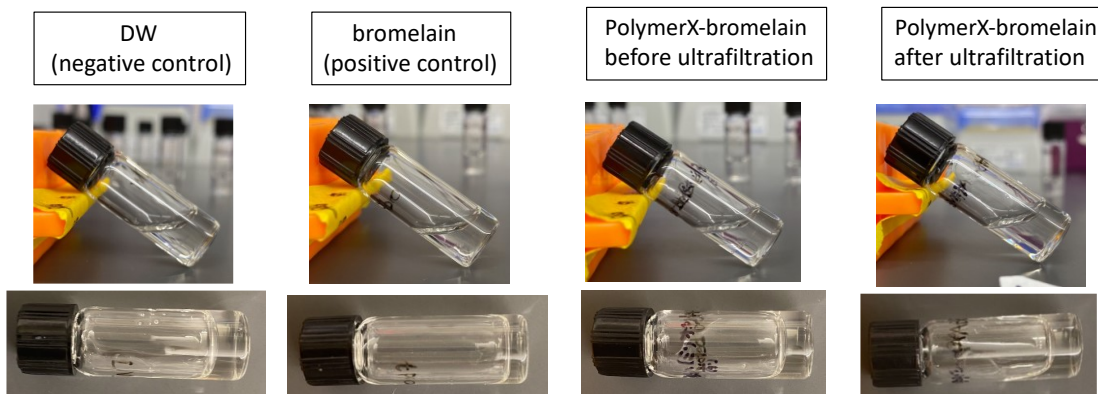
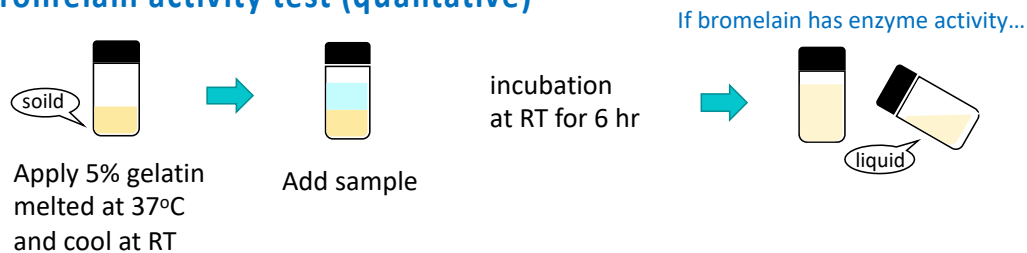


図9 ブロメライン活性試験 (1)

ブロメライン活性が失活した理由について、透析中の自己分解が原因ではないかと考え、透析を室温から氷浴上に変更した。この時点でプレートリーダーが使えるようになったため、本試験では既報に従い、24時間反応後の上清をタンパク質定量することで活性を求めた。その結果、ポジティブコントロールのブロメラインと比較して、ポリマーX-ブロメライン融合体は約80%の活性を維持していることが示された(図10)。

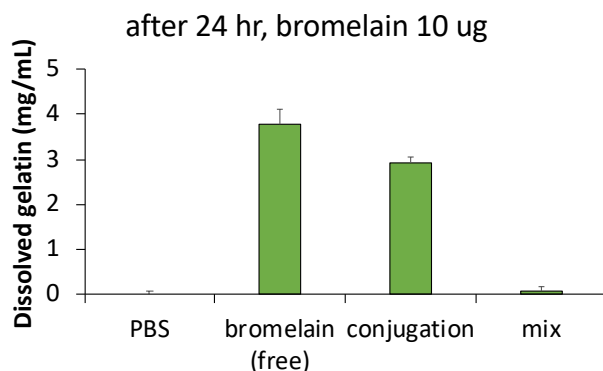


図10 ブロメライン活性試験 (2)

以上、ブロメラインとポリマーXの融合体を作製することに成功した。ブロメラインがポリマーXベースの人工血小板にも結合するか否かについては、現在評価中である。

【結論】

人工血小板の腫瘍指向性は、本人工血小板の材料であるポリマーXとの間に差は見られなかった。評価時間やポリマーXの分子量を変えることにより、今後より高い腫瘍移行性を示す抗がん剤のキャリアの作製及び評価が期待される。また、腫瘍微小環境改善作用を有するタンパク質ブロメラインとポリマーXを結合させることに成功した。今後、抗がん剤と併用した際の抗腫瘍効果について評価する。

【謝辞】

本留学にあたり、ご支援いただいた公益財団法人アステラス病態代謝研究会に深く感謝申し上げます。

- [1] Y. Gao, A. Sarode, N. Kokoroskos, A. Ukidve, Z. Zhao, S. Guo, R. Flaumenhaft, A.S. Gupta, N. Saillant, S. Mitragotri, A polymer-based systemic hemostatic agent, *Science Advances*, 6 (2020) eaba0588.
- [2] A.C. Anselmo, C.L. Modery-Pawlowski, S. Menegatti, S. Kumar, D.R. Vogus, L.L. Tian, M. Chen, T.M. Squires, A. Sen Gupta, S. Mitragotri, Platelet-like nanoparticles: mimicking shape, flexibility, and surface biology of platelets to target vascular injuries, *ACS nano*, 8 (2014) 11243-11253.
- [3] Z. Manzoor, A. Nawaz, H. Mukhtar, I. Haq, Bromelain: Methods of extraction, purification and therapeutic applications, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59 (2016).
- [4] T. Higashi, T. Kogo, N. Sato, T. Hirotsu, S. Misumi, H. Nakamura, D. Iohara, R. Onodera, K. Motoyama, H. Arima, Efficient Anticancer Drug Delivery for Pancreatic Cancer Treatment Utilizing Supramolecular Polyethylene-Glycosylated Bromelain, *ACS Applied Bio Materials*, (2020).
- [5] X. Chen, Q. Wang, L. Liu, T. Sun, W. Zhou, Q. Chen, Y. Lu, X. He, Y. Zhang, Y. Zhang, Double-sided effect of tumor microenvironment on platelets targeting nanoparticles, *Biomaterials*, 183 (2018) 258-267.

