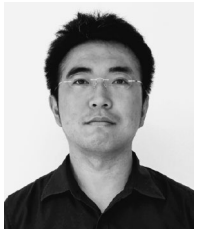
薬 剤 学, **76** (6), 387–391 (2016)

≪若手研究者紹介≫



失敗を繰り返す研究人生の飽くなき挑戦

鈴 木 亮 佑* Ryosuke SUZUKI
神戸学院大学薬学部臨床薬剤学研究室

1. は じ め に

何を書いたらよいものか．冒頭からこの有様である．本来であれば筆者の研究内容を字数制限に挑戦しつつ書くものである．本稿執筆依頼を快諾したまではよかったのだが，紹介できる内容が僅かしかない．ダメダメである．ダメ人間である．本当にそう言われた時期もあり，また，いろいろな側面でかなり成長したと個人的に思っても周囲との相対的な差からすれば未だダメ人間のままかもしれない．そんな輩でもひとつ言えることは，ダメ人間であったとしても周囲にいろいろ言われようとも，必死に取り組み続ければ成長はできるということである．本稿タイトルの末尾は「飽くなき挑戦」としてあるが，「諦めの悪い挑戦」といった方が実情に近い．非常に泥臭い話であるが，諦めが悪かったからこそ努力を認めてくださる恩師に巡り会うこともできた．諦めが悪かったからこそ，今ようやく自身の研究を軌道に乗せることができつつある．閑話休題，何を書いたらよいのかであった．ダメ人間である筆者が失敗を繰り返しつつ研究に取り組んでいく様を主に紹介しつつ，現在取り組んでいる研究内容についても紹介させて頂く．学生であれ若手研究者であれ，誰か一人でも筆者のダメ人間史が研究に対する悩みの解決の役に立つことを願うばかりである．

*2006 年 3 月星薬科大学卒業．2011 年 3 月北海道大学大学院生命科学院にて博士号取得．2009～2010 年度にわたり日本学術振興会特別研究員 DC2．同年 4 月神戸学院大学薬学部臨床薬剤学研究室講師に着任．趣味：酒（飲み歩き含む）．連絡先：〒650–8586 兵庫県神戸市中央区港島 1–1–3
E-mail: ryosukes@pharm.kobegakuin.ac.jp

2. 浮気が一生モノとなった学部時代

最初に筆者が目指していたのは実を言うと有機合成だった．高校 3 年最後の化学においてＴ先生がアルカロイドについて喋り倒した時，パクリタキセルかビンクリスチンだったか，極めて複雑な構造式を綺麗だと思ったことがきっかけだった．この時から研究に対する漠然とした興味をもち，進学後は森博嗣のミステリィにより研究を面白そうなものと捉えるようになった（主人公である犀川創平助教授への憧れは多少なりともあった）．しかし，有機合成は実習での再結晶操作・融点測定が壊滅的に下手だったために早々に断念し，薬剤学へ目を向けることとなった．2 年生後期の薬剤学系講義において，髙山幸三先生（星薬科大学薬剤学教室教授）が楽しく語られる曲路率 τ（マトリックス型徐放性製剤からの薬物放出量を求めるヒグチ式のパラメータ）の算出方法を面白そうだと思ったのである．髙山先生は普段からニコニコされていて優しい話し方をされるが，それを考慮しても楽しそうだった．髙山先生のご厚意により 2 年生ながら個人的に詳細を教えて頂く機会にも恵まれ，薬剤学を目指すようになった．そうこうするうちに 3 年生，就職活動ガイダンスの開始とともに卒論配属教室に関する噂話が流れるようになった．その頃には噂話も気にせず薬剤学教室を希望するようになっていた．就職活動に真剣に取り組む同期を見て，大学院へ進学するにしても自分は何になりたいのか，そう思った．筆者は研究者になりたいと答えを出した．自分はこのままで本当に研究者になれるのか．配属前なので研究のことは分からなくて当然なのだが，それでもロクに勉強せずサボ

り癖のついた当時の筆者にとって極めて困難なのは明白だった．無謀は承知で髙山先生に相談したところ，いくつか他大学の研究室を紹介して頂き，北海道大学薬学部薬剤分子設計学研究室を見学する機会を与えてくださった．院試が終了した直後でかなりのフライングにもかかわらず，同研究室を主宰される原島秀吉先生は快く迎えてくださった．研究室のテーマについて熱く語られる原島先生に髙山先生とは異なる人間的魅力を覚えたこともあり，原島先生が提示された可能性を自分で切り拓いてみたいと思った．最大の問題は定員数が限られることと，これまでに外部生が配属に至った例がほとんどなかったことだった．筆者よりはるかに頭の良い北大薬学部生との競争なので，今までだったら勝負前に白旗を揚げていただろう．しかし，やりたいことができたならば是が非でも眼前の壁を越えるしかなかった．秋には薬剤学教室への配属が決まり，希望が叶いマトリックス型徐放性製剤を扱うテーマが与えられた．覚悟を決めた時期が早かったことと筆者を指導する院生の配慮により，テーマ決定後は人一倍実験をさせてもらうことができた．院試が近くなると，ここで負けたらこれからも負け続けると言い聞かせ体調を多少悪くするまで勉強していた．北大とは別の大学院を志望した同期が一人いたことも大きかったと思う．院試当日はアウェイそのものであったが，不思議と冷静に解くことができた．余談ながら，高校同期宅に泊めてもらっていたこともあり院試後はサッポロビール園でしこたま飲まされ，なぜかトイレで千葉大院生（男子である）に熱く抱擁された果てにメガネを園内で失くした．その同期にはメガネを捧げたからだと未だに言われるが，薬剤分子設計学研究室へ配属されることとなった．目標とそれが達成されなかった時の自身への影響が明確となると死に物狂いで取り組むことを初めて経験した．秋の病院実習（当時は１カ月もなかった）では極めて予後の悪い急性骨髄性白血病（FAB 分類 M6 赤白血病）の患者さんとお会いし，難病に立ち向かうモノづくりの重要性を痛感した．その後は髙山先生の予想よりもテーマを前進させることができ，「poly（2-hydroxyethyl methacrylate）膜のフラクタル構造と薬物放出性との関連性」というタイトルで卒論の完成に至った．

3. 研究のイロハを学んだ大学院時代

薬剤分子設計学研究室における大学院５年間は，守破離の「守」に相当したと思う．日本国語大辞典（第二版）によると，守破離は「剣道や茶道で，修行上の段階を示したもの．守は，師や流派の独自な教え，型，技を確実に身につける段階，破は，他の師や流派の教えについて考え，良いもの，望んでいる方向へと発展する段階，離は，一つの流派から離れて，独自の新しいものを確立する段階.」とある．筆者は研究する上で必要となるあらゆることを本格的に学んだ．直接の指導は当時 D2 であった山田勇磨先生（同研究室現准教授）にして頂くことになり，原島先生からは多機能性エンベロープ型ナノ構造体（MEND）の設計・調製方法を利用したタンパク質送達システムの開発をテーマとして与えられた．本来は負電荷の核酸（プラスミド DNA（pDNA）やオリゴヌクレオチドなど）をポリカチオンの有する正電荷によってナノ粒子化するところを，タンパク質でやってみようということであった．ステアリル化アルギニン８量体の静電的・疎水性相乗的相互作用によって初めて緑色蛍光タンパク質（GFP）がナノ粒子化されることは山田先生が見出されていた．それでも筆者にとっては艱難辛苦の始まりとなった．まずはなんといっても時間だった．コアタイム（9：30〜18：00）がきっちり守られていたことに加えて人生初の一人暮らしであったために，遅刻し注意されることがたびたびあった．不器用だったことも含めて時間の使い方も下手だった．資料作成となれば徹夜は当たり前，合計作業時間を考えず GFP 発現大腸菌を溶菌したために，精製のために山田先生まで深夜まで巻き込むこともやらかした．プレゼンで言いたいことを相手が理解できる言葉で満足に説明できていなかったし，ディスカッションで何を聞かれても的外れの回答を連発した．同期に面と向かってダメ人間と言われる有様だった．それでも自身で選んだ道であり，逃げ出したくても逃げるわけにはいかなかった．指摘されたことはその通りにするのみであった．ハンドアウトや文章は余白が修正で埋め尽くされても，その通りに全て直した．嫌味も言わず怒ることもなく（本当は言いたかったかもしれない）筆者の改善点を提案してくださった山田先生，雑用にすら愚直に取り組む姿勢を陰ながら評価して

くれる周囲の存在は非常に大きかった．今までにないやりがいが救いだった一方で，就職活動をするか博士後期課程へ進むかについてはやはり悩まざるを得なかった．こんな体たらくでやっていけるのかが最大の懸念だったが，結局は研究したいという当初からの意思を優先することとなった．M1 夏の終わりとともに進路の悩みはなくなり，GFP 封入 MEND の実験に打ち込んだ．結果がまとまり，論文[1]や学会に発表させて頂けた時は感無量だった．

M2 になると，遺伝子デリバリーへとテーマが変わった．MEND の中身である，ポリカチオンにより形成されるナノ粒子化 pDNA はほどけづらいのが問題点だった．ポリカチオンとは対照的に電荷が 1 しかないカチオン性界面活性剤は 1 分子 pDNA ナノ粒子を形成するだけでなく，チオール基によるジスルフィド結合の形成を介して安定化させることもできた．一方でジスルフィド結合は 1 分子 pDNA ナノ粒子を過剰に安定化させてしまうことが問題だった．ならば，チオール基をもたないモノカチオン性界面活性剤（mono-cationic detergent；MCD）で形成した pDNA ナノ粒子をジスルフィド結合のかわりにリポソームへの封入によって安定化させようというわけであった．テーマ変更とともに，日本学術振興会特別研究員の研究計画書執筆が始まった．研究資金に関わる文章への初挑戦だった．「出せば通る」という言葉を鵜呑みにした側面は否めず，文章やイラストを作成しては修正することを必死に何度も繰り返す中にどこか慢心・油断があった．その結果，第 1 段審査不採択という形で見事に反映された．被採択者に見せてもらった申請書のスタイルに影響され，自身のスタイルとぶつかったこともあった．たとえ採用常連の研究室であっても採用に値しない申請書は容赦なく落とされることを知った．結果的には 1 回失敗しておいてよかったと思う．D1 に再度挑戦した時は一切の慢心を捨て作成・修正のサイクルを繰り返した．余談ながら，声が聞こえてしまう周囲にとってはこの時の山田先生とのディスカッションは心理的負担だったらしく，よく平気でいられるねと言われたこともあった（思ったことは全て言って欲しいと M1 初日にお願いしていたこともあり，筆者には日常の出来事に過ぎなかった）．危機感をもって臨んだ再挑戦は第 1 段審査採択という形で報われた．簡潔で分かりやすい表現ながら濃密な内容を文とイラストの両方によって成立させることの大事さを知ることができた．2 度の特別研究員申請を経て MCD は pDNA だけでなく siRNA においても行うこととなった．さらに，特定の MCD のみが極度に小さな粒子径の MEND を形成するために，リポソーム形成時における脂質膜枚数制御能[2]の可能性も浮上し，最終的にこれらをまとめ博士号を取得させて頂くことができた（D 論発表当日朝，横断歩道を渡ろうとしたら地吹雪によりメガネが吹っ飛びどこかへ転がっていった．山田先生は意気消沈した筆者をフォローしようとしてくださったが，事情を話したら大笑いしていた．人生大一番の勝負にいつもメガネをなくす筆者である）．

4. 現在：疎水性薬物搭載極小ナノカプセルの開発

縁あって神戸学院大学薬学部に着任してからは，「守」が「破」になったと思う．臨床薬剤学研究室教授である福島昭二先生の判断により，研究テーマについては裁量権を与えられた．今まで与えられたテーマに取り組んできた筆者が，ある日突然，テーマそのものから考え出すことになった．結果的にはよかったのだが，当時は途方に暮れた．自身の知識のなさを痛感した．血中滞留性と腫瘍内動態の両方を考慮したナノ粒子を作ろうとしたり，すい臓がんの標的化システムを作ろうとしたりしたが，ここでは割愛させて頂きたい．戦略的失敗を繰り返すうち，研究を遂行していく上での妥協や甘え（依存）がなくなった．試薬を購入する時は底値となるメーカーを探すようになったし，手元にある設備で安価に済ませることも覚えた．

テーマ上の悩みが消えたきっかけは，Pieter Cullis 先生（University of British Columbia）が日本薬剤学会主催英語セミナーで特別講演をされた時だった．薬剤分子設計学研究室の卒業とともにオリゴ核酸デリバリーからも遠ざかっていたので，siRNA を封入した lipid nanoparticles（LNP）の超微細構造[3]には驚いた．リポソームの特徴である内水相がなかった．いや，あるにはあった．siRNA とそのごく僅かな範囲にしかない内水相がクラスター状に存在していた．脂質＝内水相形成という図式の崩れ去ったことが，リポソーム内水相を疎水性コアに変えた構造の発想に至った．ちょうどその頃，筆者はフィトケミカルに注目しだしていた．フィトケミカルは単

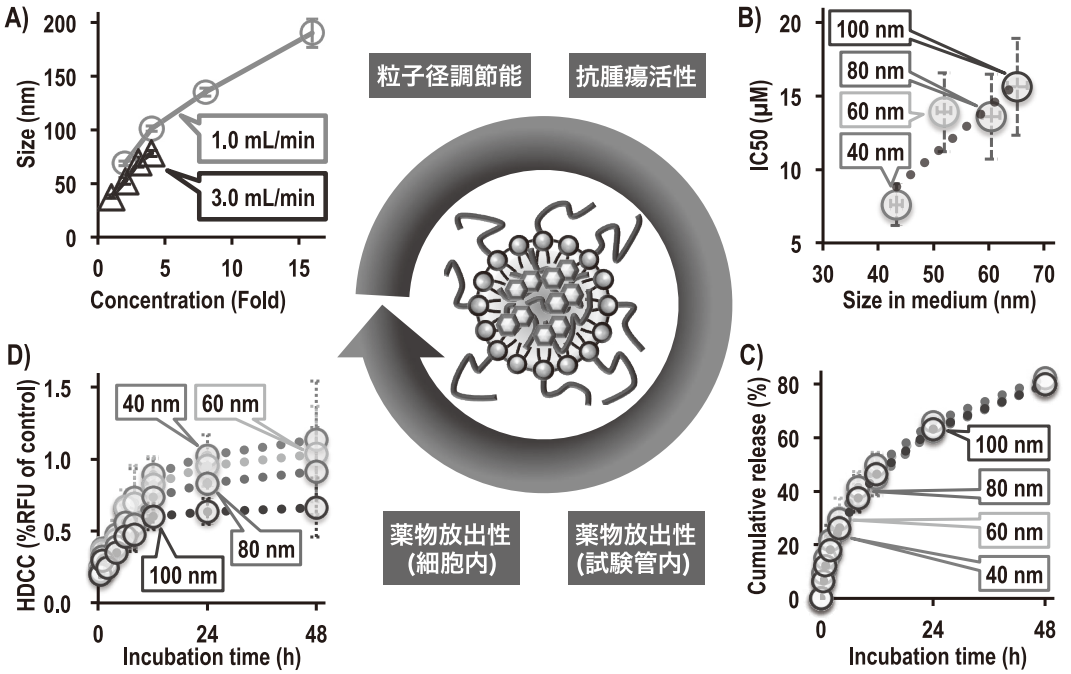


図 1　ナノカプセルの粒子径調節性およびその粒子径が抗腫瘍活性・薬物放出性に及ぼす影響．本ナノカプセルは生分解性高分子からなる疎水性コア部が脂質膜で覆われた構造を有する．同一組成比での各成分濃度の調節および疎水性成分アセトン溶液の注入速度による粒子径調節能（A），40，60，80 および 100 nm からなる Trimethoxy-trans-stilbene 封入ナノカプセルの，4T1 細胞における抗腫瘍活性（B），PBS 中における透析膜からの試験管内薬物放出性（C），細胞内に取り込まれた Hexyl 7-(Diethylamino)coumarin-3-carboxylate（HDCC）量（D）．

独でも抗腫瘍活性を有する上にマイクロ RNA 発現挙動を変化させるエピジェネティックな性質も明らかとなりつつあった．また，高分子ミセルのような超極小粒子径の重要性も認識していた．リポソームではあまりに粒子径を小さくすると高曲率となり脂質組成によっては不安定となる．これらの要素が一つに集まり，疎水性のフィトケミカルを生分解性高分子からなる疎水性コア部へ封入し，脂質膜が高曲率となっても疎水性コア部との疎水性相互作用によって安定化させる粒子径可変型コア-シェル構造ナノカプセルの着想に至った．悩んだ期間の分だけ科研費は不採択が続いていたが，筆者が自身の設計に自信をもてたこと，申請書で要求される項目（意義など）の本質に至るまで考え抜いたことの相乗効果により 5「戦目」にして初の採択とすることができた．

腫瘍への受動的薬物送達において，ナノ粒子の粒子径は細胞内取込から漏出腫瘍血管からの浸透，生体内分布にまで影響する因子である．効果の最大化には粒子径の最適化が必要だが，粒子径を自在に調節できることが前提となる．ナノカプセル調製時におけるアセトン溶液の水中注入速度と成分濃度（成分比は固定）を変えることで，35〜200 nm における容易な粒子径可変性をナノカプセルへ付与することができた（図 1）．40，60，80，100 nm からなる Trimethoxy stilbene（TMS）封入ナノカプセルは，マウス乳がん由来 4T1 細胞において粒子径が小さいほど IC_{50} 値が小さくなることを明らかとした．このメカニズムを解明すべく，はじめに *in vitro* 試験管内放出実験を行った．48 時間で 80% 程度の TMS が放出されたが，粒子径による TMS 放出プロファイルへの影響はみられなかった．そこで細胞内取り込み量の評価を行った．TMS 蛍光測定時における細胞自家蛍光の影響を考慮し，Hexyl 7-(Diethylamino)coumarin-3-carboxylate(HDCC) を封入した Rhodamine 標識ナノカプセルを用いた．ナノカプセルの取込があれば HDCC, Rhodamine 両方の蛍光が検出され，どちらか一方の蛍光のみが検出された場合にはそうでない何かが起こっていることになる．二重標識にしておいて幸いだった．48 時間にわたっ

て評価したにもかかわらず, Rhodamine 蛍光は全時間においてほとんど検出されなかった．一方で，HDCC は経時的かつ粒子径依存的にその蛍光強度が増大した．*in vitro* 試験管内放出実験との結果の食い違いについては血清タンパク質が放出挙動に影響しているのかもしれない．本ナノカプセルは一定の成果となったが，脂質組成や調製方法など課題が山積しており，現在は 1 つずつ課題の解決に取り組んでいる最中である．また，腫瘍組織への新規アクティブターゲティング戦略もアイデア段階にあり，一刻も早く形にしていきたい．

5. お わ り に

いかがであったろうか．内容の薄さに憤慨された読者と，何かしらの参考になった読者に二分されるのは言うまでもないだろう．前者がほとんどだろうと仮説を立てているので，駄文とお叱りを受ける覚悟はできている（ないにこしたことはないが）．駄文と言われても強調したいことはひとつ，やりたいこと・なりたいものがあるなら諦めず，できないなりに挑戦し続けることの大事さである．2010 年に北大若手研究者の会で講演をされた植松努氏（植松電機専務取締役）は「どうせ無理」をなくしたいと仰っていた．D2 のとある日，原島先生は「どんなに僅かでもいいから世界を変えていくんだ」と非常階段で手稲山を眺めつつ仰っていた．こうした言葉は，研究で生きる道を選んだ筆者を励まし続けてくれている．本稿を執筆することで自身の過去・現在・未来について考える機会を得ることができた．守破離の「離」にいつ至るのかは分からないが，眼前に広がる荒野をバカ正直に開拓し続けていきたい．最後に，謝辞を述べさせていただきたい．筆者を薬剤学に導き，温かく北海道へ送り出してくださった星薬科大学薬剤学教室 髙山幸三教授に，そして，何もできなかった筆者を厳しくも忍耐強く指導し研究者としての基盤を作り上げてくださった北海道大学薬学部薬剤分子設計学研究室 原島秀吉教授, 山田勇磨准教授に心より感謝致します．

引 用 文 献

1) R. Suzuki, Y. Yamada, H. Harashima, Efficient cytoplasmic protein delivery by means of a multifunctional envelope-type nano device, *Biol. Pharm. Bull*., **30** (4), 758–762 (2007).
2) R. Suzuki, Y. Yamada, E. Kawamura, H. Harashima, Mono-cationic detergents play a critical role in the development of liposome-based gene vector via controlling its lamellarity, *J. Nanopart. Res*., **16**, 2227 (2014).
3) A. K. Leung, I. M. Hafez, S. Baoukina, M. M. Belliveau, I. V. Zhigaltsev, E. Afshinmanesh, D. P. Tieleman, C. L. Hansen, M. J. Hope, P. R. Cullis, Lipid nanoparticles containing siRNA synthesized by microfluidic mixing exhibit an electron-dense nanostructured core, *J. Phys. Chem. C*, **116** (34), 18440–18450 (2012).