

《若手研究者紹介》



多様な経験を糧に革新的な医薬品開発を目指して

木 下 遼* Ryo Kinoshita

第一三共株式会社 製薬技術本部 製剤技術研究所

1. はじめに

研究者として浅学非才の私であるが、ありがたくも本コラムを執筆する機会を頂いたので、これまでの研究人生について改めて振り返ってみた。2009年4月に熊本大学薬学部創薬・生命薬科学科に入学し、2011年4月の研究室配属を研究人生のスタートとするならば、博士前期課程・博士課程を経て、私の研究生活は今年で10年目となる。この研究人生の中で私は現所属も含めて計4箇所の異なる研究室・研究所に所属して研究に取り組んできた。今回は、これまでの研究生活における日々や影響を受けた人物との出会い、印象に残る出来事、その中で学んだことについて紹介させて頂きたい。

2. 研究生活のスタート (学部生時代)

話を大学入学前まで戻すが、私が熊本大学薬学部を受験したきっかけは、何となく薬学に興味があったことと、実家から通える大学であることといった短絡的なものであった。高い志を持ち合わせていなかったため、入学以降の大学生活は褒められたものではなく、進級に必要な単位を取得するという目的

でしか講義や実習を受けておらず、所属していた準硬式野球部での活動やアルバイト、加えて友人達との遊びに興じる日々を過ごしていた。2年次年度末の配属先研究室選定を迎え、演習で一度お世話になったという理由で中島誠教授主宰の分子薬化学研究室を希望し、3年次から配属されたところから私の研究生活はスタートした。分子薬化学研究室は有機合成化学を専門とする研究室であり、現在でこそ薬剤学研究に携わっているが、私の研究人生のスタートは有機化学であった。杉浦正晴准教授（現崇城大学薬学部教授）指導の下、「ボロン酸の不斉有機触媒共役付加反応：シクロペンテノン合成への展開」という研究テーマに取り組んだ。

ここで、本研究内容について説明させて頂く。ボロン酸の不斉共役付加反応は、有用な炭素-炭素結合反応であり、遷移金属触媒もしくは有機分子触媒を用いた例が報告されている。分子薬化学研究室では、 α,β -不飽和カルボニル化合物へのボロン酸の共役付加反応において、キラルなモノアシル酒石酸が触媒として有効に機能し、高収率、高立体選択的に目的物が得られることを報告している。そこで、本触媒を用いるジエノンへのボロン酸の共役付加反応を検討し、その生成物を天然物や医薬品において重要な構造モチーフであるシクロペンテノンへと誘導することを目指した (図1)。

研究室に配属されワクワクと不安の入り混じる中、早速実験に着手した。実験手技を身につけるため、過去に先輩方が行った実験をトレースして同等の結果が得られるかを確認していったのだが、元来不器用である私にとって、細かな作業を要する小スケールでの実験は困難を極め、結果を確認するどこ

*2015年3月、熊本大学大学院薬学教育部博士前期課程修了。2019年3月、熊本大学大学院薬学教育部博士課程修了、博士(薬学)を取得。その間、2017年4月～2019年3月まで日本学術振興会特別研究員(DC2)に採択。2019年4月、第一三共(株)入社。注射剤の開発研究に従事。受賞歴として、AFPS Nagai Best Poster Award 2015 “Silver Medal”, 第44回製剤・創剤セミナー Postdoctoral Presentation Award 等を受賞。趣味：野球、お酒、散歩等。連絡先：〒254-0014 神奈川県平塚市四之宮 1-12-1
E-mail: kinoshita.ryo.xu@daiichisankyo.co.jp

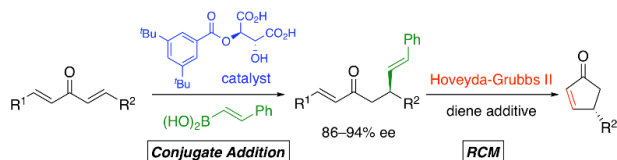


図1 ボロン酸の不斉有機触媒共役付加反応：シクロペンテンオン合成への展開

ろか最後まで順調に実験工程を進めることすらできなかった。それでも、研究室の先輩方からもサポートを受けつつ取り組んだ結果、何とか先輩方の実験と同等の結果を得ることができた。実験してデータを出すというのは、研究者としては基礎的なことではあるが、この経験は自分の研究人生の中では記念すべき大きな一歩目であり、薄層クロマトグラフィーやNMRから目的の生成物が確認されたことや最終的な重量から同等の収率が算出されたこと、HPLCで同等の立体選択性を示すピークが出たことなど今でも鮮明にそれらの瞬間を記憶している。実験手技も身に付いたところで、与えられたテーマに基づいて実験を開始した。しかしながら、実験を上手く遂行することができても好ましい結果が出ない。条件を色々と変えてみたり、先生方から色々提案やアドバイスを頂き、それらを実行してみるものの一向に状況は変わらない。その一方で、同期の学生は着実に研究成果を出していく。そのうち私の研究に対してのモチベーションは低下し、研究室に居ても真摯に取り組まずダラダラと過ごしていく日々となり、「頑張っって取り組んでも結果が出ないのだから面白くない」という不貞腐れた態度を露骨に出していった。そうしていく内に、当然の如く研究の取り組み方に対して先生方からお叱りを受けた。「君は本当に頑張ったというところまで取り組んだのか？私の目には真摯に取り組んでいるようには見えない。」「結果を出して楽をしたいのならば、しっかりと考えて取り組みなさい。」といった叱責の言葉を受け、それと合わせて「君には研究者としての素質はあるのだからもうちょっと納得できるまでやってみなさい。」と励ましの言葉も頂いた。この出来事以降、少しずつ研究に対するやる気を取り戻すことができた私は、これまでとは変わり、関連論文を読み込み、自分から積極的に先生方とディスカッションすることで研究戦略を練り、実験の手数も増やしていった。たと思えるように反応が進まなかつ

たとしてもネガティブデータをしっかりと見つめ、なぜそのようになったのかを深く考察するようになり、トライアンドエラーを繰り返すうちに、如実に好ましい結果が出るようになった。初めて研究が楽しいと感じることができた私は、実験に没頭し、ついにはデータを論文に持ち込むことができた¹⁾。4年次の卒論発表においても他研究室の学生や先生方から好評を頂いた。分子薬化学研究室において、研究に対して粘り強く取り組むこと・考えることの重要性を学ぶことができ、ここで得たものは私が今まで続けることができた研究人生のルーツとなっている。

3. 薬剤学との出会い（博士前期課程時代）

有機化学からスタートした研究人生であったが、学部4年次において転機は訪れた。それまでは「モノを創る」ことをメインとした研究に取り組んできたのであるが、3年次に受けた講義や実習、さらに聴講した他分野の先輩方の研究発表などをきっかけに、新たに創ったモノが実際に生体内でどのような挙動を取るのかを評価する研究に対して興味を持つようになり、実際にそのような研究に取り組みたいという思いが膨らんできた。熊本大学薬学部における丸山徹教授主宰の薬剤学研究室では、モノを創るところから、体内動態や薬理効果を評価するところまで幅広い内容の研究を取り扱っており、先述の私が聴講した研究発表で最も興味をそそられた研究内容は薬剤学研究室における成果であり、大学院入試を控えた4年次には、学部卒業後の博士前期課程からは薬剤学研究室に入りたいという気持ちが強くなっていった。熊本大学薬学部には出身高校の所在地ごとに分かれた県人会なるものがあり、年に数回教員と学生を交えて県人会の懇親会が開催されるが、奇しくも私の所属する県人会のトップは丸山先生であり、私はこの県人会の懇親会には欠かさず参加していたため、入学以来丸山先生にはよくお世話になっていた。4年次春に開催された懇親会にて、丸山先生に博士前期課程から薬剤学研究室で研究を行いたいという気持ちがあると相談したところ、「もし君が来たいのであれば歓迎するよ！」と快諾して頂いた。分子薬化学研究室の先生方も「君が挑戦したいのであれば頑張っって来なさい。ただ、学部生の間は分子薬化学の学生なのだから、学部卒業までにはしっか

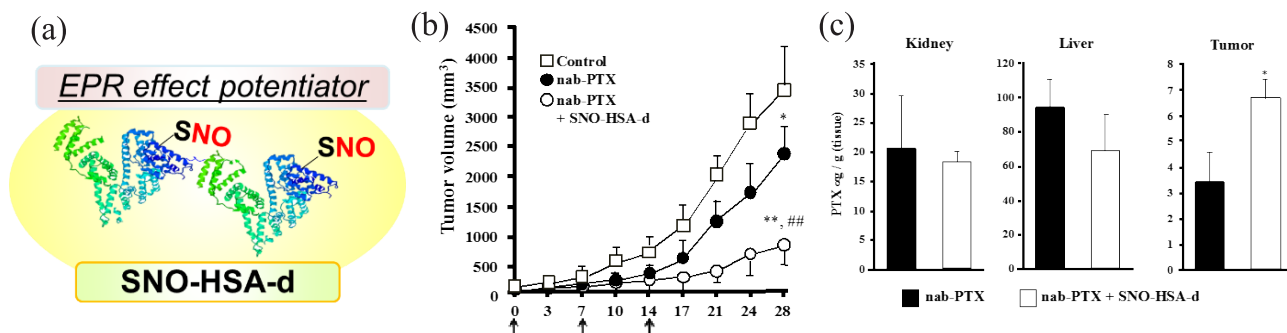


図2 SNO-HSA-dによるEPR増強戦略

(a) SNO-HSA-d構造. (b), (c) C26モデルにおけるnab-PTXの抗腫瘍効果及び臓器分布への影響評価.

りと成果を出しなさい。」と背中を押して頂いた。こういった経緯で博士前期課程から薬剤学研究室の門を叩き、私の「薬剤学」研究はスタートした。薬剤学研究室では、渡邊博志准教授をはじめ、私の所属していた準硬式野球部の出身の方々も多かったため温かく迎えて頂いた（実際の所は、当初は野球経験者の私の加入による毎年春開催の研究室対抗ソフトボール大会における薬剤学研究室の戦力アップに対する歓迎の側面が強かったのだが）。研究については、異島優助教（現徳島大学薬学部准教授）指導の下、「新規EPR増強剤としての一酸化窒素搭載型アルブミンダイマーの有用性評価」という研究テーマに取り組んだ。

ここで、本研究テーマについて背景を説明させて頂く。腫瘍部位において、高分子化合物が血管外腔に漏出し、腫瘍局所に長時間留まる現象である Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果は、ナノDDS抗がん剤開発の基盤をなしている。しかしながら、EPR効果のみでは腫瘍集積性が十分とは言えず、不十分な治療効果や副作用の発現が指摘されるようになってきた。この課題を克服するため、本研究では新規ナノEPR増強剤を開発すべく、EPR増強因子である一酸化窒素(NO)に着目した。NOそのものでは生体半減期が短く、腫瘍移行性も低いため、がん治療へのNOの応用には、NOの生理活性を維持しながら腫瘍へ効率的に送達するためのキャリアが必須となる。そこで、EPR効果により高い腫瘍移行性を示すヒト血清アルブミン(HSA)二量体をキャリアとし、それにNOを付与したNO搭載型アルブミンダイマー(SNO-HSA-d)を新規EPR増強剤として開発し、機能評価を行った(図2)。

本テーマを進めるにあたり、まずはEPR増強剤のキャリア部分であるHSA-dの作製に取り掛かった。学部時代に取り組んだ研究とは同じモノづくりというカテゴリーではあるが、対象が低分子化合物から高分子化合物に変わり、酵母(*Pichia pastoris*)を用いるなど実験様式も大きく異なる。これまでは主に試験管や100 mL大のフラスコしか使用したことのない私にとって、1 L以上のスケールで大量の培地を調製し、プレートへの播種から培養・精製まで1週間以上かけて行う実験はかなり新鮮であった。学部時代に培ったモノづくりにおける条件検討の考え方なども活かしながら取り組み、培養・精製の方法を調整していくことで、従来の方法よりタンパク質の発現量を増やすことに成功した時は大変喜ばしかった。SNO-HSA-dの調製が完了し、動物実験の練習を行い尾静脈内投与等の手技を身につけた上で、実際に担がんマウスを用いてSNO-HSA-dによるEPR効果増強作用の評価に臨んだ。C26マウス大腸がん皮下移植モデルにおけるSNO-HSA-dのEPR効果増強作用の解析を行うべく、EPR効果の指標とされるエバンスブルー(EB)を用いた検討を実施したところ、SNO-HSA-d投与によってEBの腫瘍内浸透性が亢進することが認められた。また、本作用が機能するタイムラインを追ったところ、興味深いことにSNO-HSA-dによるEPR増強作用は投与後0.5~3hの間で起こる一過的な作用であった。腫瘍微小環境において血管透過性を亢進することは、抗がん剤だけでなく腫瘍にとって栄養源となる物質の腫瘍移行量も増加させ、腫瘍成長を助長する恐れがあるため、SNO-HSA-dによる時間限定的なEPR増強作用は、常時あるいは長時間にわたり血管透過性を亢進させる方法よりも非常に合理的な

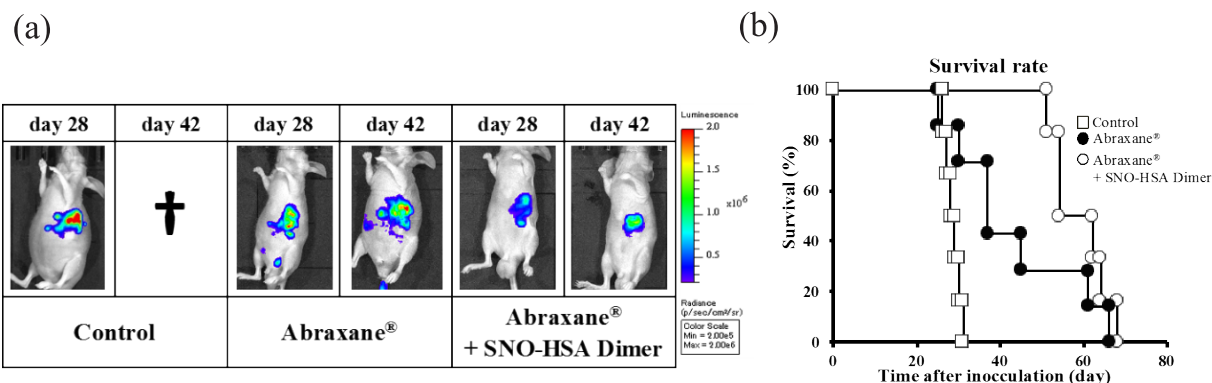


図3 SUIT2 ヒト膵臓がん同所移植モデルにおける nab-PTX と SNO-HSA-d の併用療法
(a) IVIS による腫瘍体積変動評価, (b) 生存率評価.

戦略と言える。さらに同モデルにおいて、リポソーム製剤 (Doxil[®]) や HSA 結合型抗がん剤 (nab-PTX), ミセル製剤 (HPMA-ZnPP) による治療において SNO-HSA-d を併用した際の波及効果を評価したところ, これらナノ DDS 抗がん剤の単独投与群と比較して, SNO-HSA-d との併用投与を行った群では高い腫瘍増殖抑制効果が確認された (図 2)。臓器分布の評価では, SNO-HSA-d を併用することでナノ DDS 抗がん剤の腫瘍集積性が亢進していることが明らかとなり, この結果は先述の治療効果の増強を裏づけるものとなった (図 2)^{2, 3)}。また, 血管透過性が低くナノ DDS 抗がん剤単独ではあまり治療効果の見込めない B16F10 マウスメラノーマ皮下移植モデルにおいても同様に, SNO-HSA-d を併用することで, ナノ DDS 抗がん剤の腫瘍移行性並びに治療効果が亢進することが明らかとなった^{2, 3)}。自ら調製したモノがどのような生体内で機能を発揮するのかを自らの目で確認することができる研究は, 実際に行ってみると想像していたよりも非常にやりがいのあるものであった。

4. 薬剤学の探求 (博士課程時代)

自身の行っていた研究をさらに突き詰めたいという思いから, 博士前期課程修了後は博士課程へ進学した。博士課程進学後は, まず先述の SNO-HSA-d の適応範囲の拡大を目指すべく, 難治性膵臓がんモデルでの検討を試みた。前臨床試験におけるナノ DDS 抗がん剤の評価では, がん細胞を皮下に移植したモデルが汎用されているものの, 皮下移植モデルと実際の臨床におけるがんの病態像との間には乖離がみられることが指摘されている。近年では, ヒト

由来のがん細胞を同所に移植したモデルが, 皮下移植モデルと比較して臨床像の再現度は高いとされており, 事実, 同系統のヒト由来膵臓がん細胞を用いてモデル作成を行った場合, 皮下移植モデルと比べ, 同所移植モデルにおける腫瘍では膵臓がんの臨床像と同様に血管密度は低くなっていることが明らかとなっている。そこで, SUIT2 ヒト膵臓がんをマウスの膵体部に移植することで作成した SUIT2 ヒト膵臓がん同所移植モデルにおける SNO-HSA-d の EPR 増強剤としての有用性を評価した。本モデルの作成や評価については, 崇城大学薬学部 中村秀明講師のご指導を仰いだ。熊本大学薬学部から約 6 km 離れた崇城大学で動物実験を行っていたため, 必要な試薬・資材や調製したサンプルを抱えて原付バイクで崇城大学まで通う日々を過ごしていた。モデルの作成方法を習い, モデルの病態進行状況から適切な投与タイミングや評価ポイントを見定めた上で, SNO-HSA-d と nab-PTX による併用治療の検討を行った。IVIS を用いた腫瘍体積変動の結果から, 先述の皮下移植モデルで得られた結果と同様に, nab-PTX 単独投与と比較して SNO-HSA-d との併用投与を行った群では腫瘍成長抑制効果が亢進しており, これを反映して生存期間も延長することが確認された (図 3)。これまでの結果から, SNO-HSA-d は併用するナノ DDS 抗がん剤の剤型や治療標的とするがん種を問わず, 汎用性の高い EPR 増強剤として機能することが実証された^{2, 3)}。

博士課程 2 年次 6 月からの 2 年間は長年住んでいた熊本を離れ, 徳島大学薬学部にて研究を遂行した。私の研究の指導教諭である異島先生の徳島大学薬学部 薬物動態制御学分野 (石田竜弘教授主宰) への異

動が決定し、その際に「一緒に徳島で研究をやってみないか」とお声がけを頂いたことがきっかけである。こちらの研究室では、これまで自身が取り組んできた腫瘍 DDS に加え、腫瘍免疫システムの応用に関連する研究等も行われていたことから、新たな研究のノウハウや今まで以上に多様な角度からの考え方などを身につけ、薬剤学研究者としての引き出しを増やすことができた。特に、博士課程では先述の EPR 増強剤である SNO-HSA-d の研究に加え HSA ナノ粒子を基盤とする新規腫瘍 DDS プラットフォームの構築を目指した研究（未発表データが多いため詳細内容については割愛させていただく）を遂行していたが、リポソームの応用研究において実績のある研究室に身を置けたことはナノ粒子の調製や機能評価を行うにあたり、強力な追い風となった。

2年間の徳島での生活の後、博士課程最後の1年間は熊本大学に戻り研究を遂行し、博士論文執筆・発表を経て無事に学位を取得することができた。入学当初の何の志も持たず、ぼんやりとした将来しか見ていない大学生活を送っていた自分からすると、とても想像できない未来であったが、「研究」というものに触れてから様々な出会いや経験を通して、自分の人生を有意義にするためのきっかけを掴むことができたと考えている。そして、がん治療に関する薬学研究に取り組み、がんという疾患の現状や研究に関する技術や知識を会得していく中で、研究の難しさや奥の深さを感じるとともに、「研究者として革新的ながん治療薬を創出し、がんで苦しむ世界中の人々の命を救いたい」という明確なビジョンを抱くことができた。

5. おわりに

博士号取得後のキャリアについては新薬開発の研究基盤が整った製薬企業、特にがんに強みを持つ企業が自分の目標を具現化するためのキャリアに最適な環境であると考え、就職活動を経て2019年4月より第一三共株式会社に入社以降、西本典広グループ長の下、注射剤の開発研究に従事している。製薬企業での研究者としては駆け出しであるが、様々なことにチャレンジしながら製剤研究の深掘りによって無菌製剤の開発に関する企業独自の専門性を高め、学生時代に博士号取得の中で培った研究の基盤と組み合わせることで、博士号持ちの製剤研究者独自の強みを伸ばしていきたいと考えている。

最後になりますが、若手研究者紹介として寄稿する機会を提供して頂いた薬剤学編集委員の皆様方に御礼申し上げます。また、学生時代の研究において御指導を賜りました先生方や支え励まして下さった先輩、同期、後輩の皆様、さらに第一三共株式会社、同社製剤技術研究所の皆様がこの場を借りて深く感謝致します。

引用文献

- 1) M. Sugiura, R. Kinoshita, M. Nakajima, O-Monocyltartaric acid-catalyzed enantioselective conjugate addition of a boronic acid to dienones: Application to the synthesis of optically active cyclopentenones, *Org. Lett.*, **16**, 5172–5175 (2014).
- 2) R. Kinoshita, Y. Ishima, *et al.*, S-Nitrosated human serum albumin dimer as novel nano-EPR enhancer applied to macromolecular anti-tumor drugs such as micelles and liposomes, *J. Controlled Release*, **217**, 1–9 (2015).
- 3) R. Kinoshita, Y. Ishima, *et al.*, Improved anticancer effects of albumin-bound paclitaxel nanoparticle via augmentation of EPR effect and albumin-protein interactions using S-nitrosated human serum albumin dimer, *Biomaterials*, **140**, 162–169 (2017).