

《若手研究者紹介》



縁に支えられたアカデミック研究者キャリア

手 賀 悠 真* Yuma Tega

富山大学学術研究部 薬学・和漢系 薬剤学研究室

1. はじめに

筆者は2022年9月末に米国から帰国し、10月に富山大学学術研究部薬学・和漢系薬剤学研究室に助教として着任した。学部3年生時に初めて研究室に配属されてから13年ほど経過したが、これまでの研究生活の中で様々な出会いに恵まれ、今日までアカデミック研究者を続けることができた。帰国してすぐに、このような執筆の機会をいただいたのも縁のお陰である。本稿では、縁に支えられた筆者のこれまでの研究生生活を振り返りながら、研究内容や経験について紹介させていただきたい。

2. 薬剤学との出会い

高校時代の筆者は、「薬を扱う＝格好いい」という単純な理由で薬学部を目指していた。秋田県の片田舎出身ではあるが、実家には配置薬があり、祖父母から富山の薬売りの話を聞いて育ったこともあって、富山大学薬学部への進学を決めた。高校生までは薬を飲んだら薬理作用が発現して病気に効くという安直な考えしか持っていなかったが、大学で薬剤学・薬物動態学という学問を知ったことで、これら学問領域の創薬への重要性やその奥深さに惹かれていった。そのため、学部3年生の研究室配属では、

細谷健一先生が主宰する薬剤学研究室を希望した。今になって思うと、少し意固地であったようにも感じるが、事前の研究室見学では薬剤学研究室以外は行かなかった。残念ながら当時は、くじ運に恵まれず、薬剤学研究室への配属は叶わなかった。しかし、どうしても諦めきれず、学部時代に配属していた毒性学研究室（現がん細胞生物学研究室）を当時主宰していた教授、根本信雄先生からのご理解を得て、本学大学院医学薬学教育部博士前期課程への進学時に薬剤学研究室の門を叩いた。これが、筆者と薬剤学、そしてトランスポーター研究との出会いであった。

3. トランスポーター研究の始まり

学部時代に在籍していた毒性学研究室では薬物代謝酵素の発現制御に関わる核内受容体についての研究に従事した。リコンビナントタンパク質とDNAプローブとの相互作用について解析していたことから、細胞も実験動物も実習で触ったことがある程度であった。そのため、薬剤学研究室に所属してからは、細胞操作や動物を用いた *in vivo* 輸送解析法の習得に励むと同時に、これら手法を駆使して、ニコチンの脳移行メカニズムについて研究した。ニコチンは、タバコに含まれる代表的な物質の1つであり、心血管疾患リスクの増大やインスリン抵抗性の増悪に関与すると共に、脳内報酬系を賦活化して快感を生じさせるため、依存を引き起こしてしまう。この依存形成は、ニコチンと脳の神経細胞に発現するニコチン性アセチルコリン受容体との結合がトリガーになるため、ニコチンの脳移行性はその依存形成を決定づける上で重要なファクターである。しかし、

*2017年3月富山大学医学薬学教育部博士後期課程修了、博士(薬科学)、同年4月帝京大学薬学部助教、2021年4月ケンタッキー大学薬学部博士研究員、2022年10月富山大学学術研究部薬学・和漢系助教。研究テーマ：中枢神経系と薬物トランスポーター。趣味：バスケットボール、ドライブ、映画鑑賞。連絡先：〒930-0194 富山県富山市杉谷2630
E-mail: tega@pha.u-toyama.ac.jp

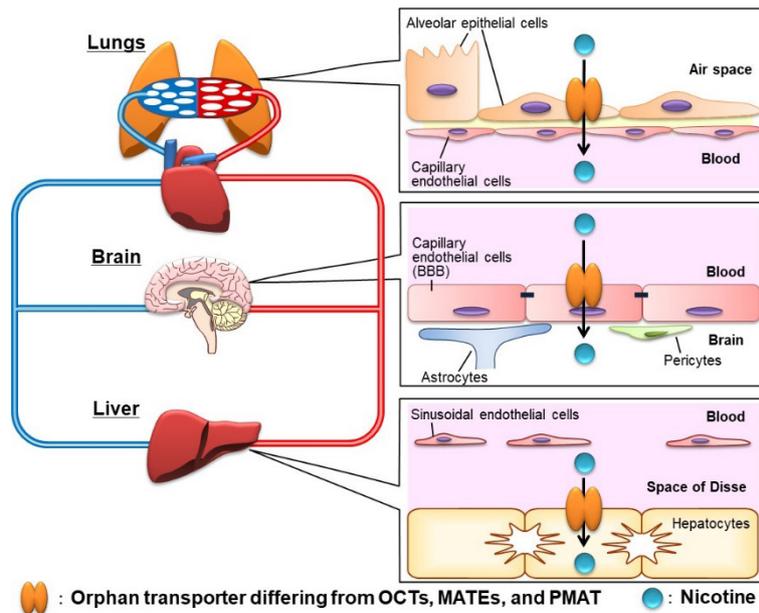


図1 ニコチンの組織分布におけるトランスポーターの関与

その脳分布に関わる詳細なメカニズムについては明らかにされていなかった。そこで、integration plot 法や brain efflux index 法を用いた *in vivo* 速度論的解析を実施したところ、ラット血液から脳への取り込み速度は、反対の排出速度よりも2倍高い値となることが明らかとなった。また、ラット血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) のモデル細胞である TR-BBB13 細胞を用いた取り込み解析において、ニコチン輸送は温度および濃度依存性を示すとともに、取り込み方向とは逆向きの H^+ 勾配によって促進することが示された。さらに、その輸送は organic cation transporters (OCTs), multidrug and toxin extrusion protein (MATE), plasma membrane monoamine transporter (PMAT) といった既知の有機カチオン輸送系の基質存在下では阻害を全く受けず、これらは、ニコチンが既知の有機カチオン輸送系とは異なる機構を介して脳内に能動的に輸送されることを示唆していた。筆者らが論文¹⁾を発表した同時期に、仏国パリ・ディドロ大学の Dr. Cisternino からもマウスを用いて同様の結果が報告され、研究成果の妥当性が支持されるものとなった。

ニコチンの脳分布に関する研究を進めていくにつれて、吸収部位である肺や代謝臓器である肝臓での輸送はどうなっているのか、という ADME 全体について疑問が湧いてきた。そこで、脳以外の組織の細胞系を使用し、各組織でのニコチン輸送について

も解析したところ、いずれも担体介在輸送の寄与が80%以上を占め、その輸送特性は既知の有機カチオン輸送系とは異なるものであった。すなわち、ニコチンを基質とする輸送機構 (H^+ /有機カチオン交換輸送体) は複数の臓器で機能し、組織分布に重要な役割を果たす可能性が示唆されたことから (図1)、組織ごとの発現や輸送への寄与を詳細に解析することは、精密な体内動態および相互作用の予測に繋がると考えられた。

一方で、 H^+ /有機カチオン交換輸送体の分子実体が明らかにされていないことが大きな問題として残された。博士課程後期の残りの期間、その分子実体の解明に向け、研究室内で実施可能な方法を模索し、試行錯誤しながら研究を進める日々が続いた。SLC トランスポーターファミリーには400以上の分子が存在するが、その多くが機能未知のオーファントランスポーターである。そのため、これらオーファントランスポーターのいずれかが H^+ /有機カチオン交換輸送体として機能する可能性が考えられた。そこで、候補となりそうな分子を文献やホモロジーサーチにより絞り込んだ後、そのすべてについて過剰発現細胞を構築し機能解析を実施した。しかし、試した対象分子について、明確なニコチン輸送活性は示されなかった。単分子にフォーカスした解析で見つけ出すのは困難と判断し、網羅的に機能分子を探索する方法として、リガンド結合体と非結合体のタン

パク質分解酵素に対する安定性の違いを利用したり、ガンダー結合タンパク質探索法²⁾も試した。だが、こちらの方法でも、ニコチン輸送を担う実体分子の対象組織における絶対発現量が低いことなどの理由からか、候補となり得る分子の同定には至らなかった。結局、博士課程修了までに分子を特定する目標には届かなかったものの、目標に向けて根気強く、諦めずに努力するという精神はこの経験を通じて鍛練され、筆者のこれまでの研究生活を支える礎になっていることを改めて感じている。

4. アカデミック研究者としてのスタート

博士号を取得後、幸運なことに帝京大学 出口芳春先生の薬物動態学研究室に参加する機会をいただいた。出口先生はBBBを介したカチオン性薬物輸送について長年ご研究されており、カチオン性物質であるニコチンの輸送研究を行ってきた筆者にとって出口先生の下で研究ができることは非常に貴重なことであった。そのため、採用が決まった際には喜びで胸が高鳴ったことを今でも覚えている。着任後早々に、住吉孝明先生（現関西大学医薬品工学研究室教授）との、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤の脳移行に関する共同研究に参画する機会をいただいた。HDAC阻害剤は中枢神経変性疾患の新たな治療薬候補として注目されていたが、HDACの活性中心である亜鉛と相互作用するために極性基を有しており、脳への移行性が低いという問題があった。その問題を解決するため、H⁺/有機カチオン交換輸送体への標的化を目的としてHDAC阻害剤（CI-994）とH⁺/有機カチオン交換輸送体基質（ピリラミン）のハイブリッド化合物が合成された。その輸送特性を、不死化ヒト脳微小血管内皮細胞株（hCMEC/D3細胞）を用いて解析したところ、ハイブリッド化合物はH⁺/有機カチオン交換輸送体を介して輸送され、その細胞内取り込み速度がCI-994と比べて85倍高くなることが示された。また、*in situ*脳灌流法を用いた解析においても、ハイブリッド化合物のラット脳への移行性は顕著に増加した。これらの結果から、BBBに存在するH⁺/有機カチオン交換輸送体が脳への薬物送達を効率化するための有望な標的である可能性が示された³⁾。

このH⁺/有機カチオン交換輸送体の基質認識に関わる特徴的構造が明らかになることで、薬物送達への

応用の幅はさらに広がると考えられた。そこで次に、輸送体の基質認識性を代表的な基質であるジフェンヒドラミンの誘導体を用いて解析した。その結果、3級アミド構造を有する誘導体はH⁺/有機カチオン交換輸送体を介して輸送されなくなることで、ペペリジン環やピロリジン環といった複素環を持つ誘導体は輸送体による細胞内取り込みが高くなることを見出した⁴⁾。実際にFDAに承認された中枢神経系薬には、ペペリジン環やピロリジン環を持つものが多くあり、BBBのH⁺/有機カチオン交換輸送体に認識されるか否かが、開発した中枢神経系作用薬シーズの運命に影響を及ぼす可能性が考えられた。

以上のような研究を進める中、寺崎哲也先生（現東フィンランド大学客員教授）、内田康雄先生（現広島大学医療薬剤学研究室教授）、住吉先生との共同研究によって、H⁺/有機カチオン交換輸送体の分子実体解明に向けたプロジェクトが発足した。本プロジェクトでは、H⁺/有機カチオン交換輸送体は複数の分子から構成されるという「複合体仮説」を提唱し、その仮説の下、オンライン会議にて分子同定戦略についてのディスカッションを重ねた。そして最終的には光アフィニティープローブと網羅的プロテオミクスを組み合わせた新たな手法によってカチオン性薬物輸送に関与する分子が見出された⁵⁾。輸送分子の全容把握は未だ課題であるものの、この研究結果は長年にわたって不明であった分子実体の謎を解く大きな手掛かりになると考えられる。アカデミックでトランスポーター研究を続けてきた中で、博士課程に追い求めていた答えに一步近づくことができたことは非常に嬉しい限りであった。これも、出口先生の研究室に参加できたことを含め、多くの縁に恵まれたお陰であり、これまで支えていただいた先生方へ感謝の念に堪えない。帝京大学において様々な経験ができたことは非常に幸運であったと感じている。

5. 研究留学という転機

アカデミック研究者の道を選んでから、いつかは海外留学をしてみたいという気持ちは常に持っていた。留学の目的としては、最先端の研究に触れる、新しい技術を学びに行くというものが多いうように思うが、薬剤学分野では国内でも世界をリードする研究が行われているため、わざわざ海外に出る必要がないという意見もある。しかし筆者は、海外研究



図2 ケンタッキー大学にてBjoern Bauer先生(左), Anika Hartz先生(右)と

者の研究に対する姿勢や進め方に興味があり、視野や価値観を広げるためにも異なる文化に身を置くという経験を積みたいという思いを抱いていた。帝京大学で研究を始めて3年が経つ頃、富山大学でご指導いただいた赤沼伸乙先生(現富山大学薬剤学研究室准教授)からポスドクを探している海外の研究室があるというお話をいただいた。ご紹介いただいた研究室を主宰するBjoern Bauer先生とその妻であるAnika Hartz先生は(図2)、中枢神経系疾患、特にアルツハイマー病、てんかん、および脳腫瘍の病態と治療法に向けた研究を展開している。筆者はこれまで、正常脳を対象とした薬物輸送機構の研究に従事してきたが、それらの研究を中枢神経系疾患の治療法開発へと発展させたいと考えていたことから、まさに渡りに船であった。出口先生からもご理解をいただき、筆者の気持ちの舵は、一気に留学へと切られた。渡航時期などの詳細についてBauer先生とのskypeでの打ち合わせが進み、留学が現実化してきたものの、そのような中で起こったのが、COVID-19によるパンデミックであった。未曾有の出来事に、当時は感染者数や死亡者数のニュースを観ながら状況を見守ることしかできず、留学についても一時見直しを迫られる事態となった。しかし、捨てる神あれば拾う神あり、という言葉のように、ファイザー製ワクチンがFDAに承認され、米国で渡航者の受け入れも再開されたことから、Bauer先生との改めての話し合いの結果、2021年3月から留学する運びとなった。米国に向かう飛行機の中で感じた安堵と高揚した気持ちは、今になっても強く思い起こされる。

留学をして暫くは、パンデミックの影響もあり、

研究環境も通常とは異なっていた。ミーティングはオンラインになり、デスクも散り散りに配置されていた。そのため、事務的な連絡以外でラボメンバーに話しかける機会が少なく、打ち解けるまでに時間がかかってしまった。細胞操作や画像解析など個室で行う実験については人数制限がかけられており、見学や指導は優先順位が決められ行われた。しかし、普段とは異なる状況下でも仕事や生活の円滑なセッティングをするために英語で上手くコミュニケーションをするという経験は非常に貴重なものであったと感じており、留学をする目的の一つであった視野の拡大や思考力のさらなる醸成に繋がったと思っている。留学前、筆者は英語力に自信があったわけではないものの、帰国してすぐに薬剤学会のGlobal Education Seminar-1st, 2022にて発表する機会をいただき、その中で海外での留学経験の貴重さ・大切さを改めて感じた。

Bauer先生の下で主に行った研究は、脳腫瘍と抗悪性腫瘍薬の脳分布に関わるものであった。1年半という短い期間ではあったが、チロシンキナーゼ阻害剤といった分子標的薬の脳動態解析やノックアウトマウスを用いた薬物輸送解析、脳腫瘍モデルの作製と評価に携わり、脳腫瘍研究における*in vivo*および*ex vivo*解析法を多く学ぶことができた。この研究を進めるにあたって、実験データの正確性や信頼性についても改めて考えさせられた。Bauer先生の研究室ではそれらを何よりも重視しており、印象的なエピソードとして、実験開始当初にラボメンバー全員に課されるBradford法によるタンパク質定量の練習が挙げられる。検量線の各ポイントの標準偏差が0.1未満、そして相関係数が1になるよう繰り返し練習が為され、達成された場合にはピザがふるまわれた。研究不正などが取り沙汰される昨今、信頼されるデータにて最先端の研究について成果を発表することの意味や大切さをBauer先生とHartz先生から改めて学ばせていただき、充実した研究留学であったと実感している。

6. 母校への帰還

留学中に筆者の出身研究室である、富山大学学術研究部薬学・和漢系薬剤学研究室の公募に応募し、2022年10月に、無事に助教として着任することができた。着任から(本稿を執筆している時点で)5

か月が経ち、研究室内で既にアクティブであった研究テーマを進めている学生の指導だけではなく、オリジナルの研究テーマの本格的な始動に向けて準備を進めている。今後は、留学にて構築したBauer先生との縁も生かして、抗悪性腫瘍薬を脳腫瘍へと効率的に送達するための薬剤学的研究を推進していく予定である。帰国前にBauer先生から「日本に戻っても、ここの研究室出身者であり、我々の関係は続く」という言葉をいただいており、現在もBauer先生との定期的な情報共有およびディスカッションを行っている。脳腫瘍に対する薬物療法の改善を現実化するためにも、国内外にて構築した一生の財産である縁を基に、奮励努力していきたいと考えている。今後も研究活動を通して、薬剤学分野、薬剤学会の発展に貢献するとともに、学生への教育・指導から母校に恩返ししていければ望外の喜びである。

7. お わ り に

以上、雑多な感じではあるが、筆者のこれまでの経験を思いのままに書き綴った。最後までお付き合いいただき、心より感謝申し上げます。繰り返しにはなるが、今の筆者があるのは、縁に支えられた、の一言に尽きる。今後も、これら縁を大事にするとともに、他の人との縁を紡げるような存在になりたいと思う。

最後になりますが、これまでの研究生活で懇切丁寧なご指導を賜りました富山大学学術研究部薬学・和漢系 細谷健一教授、赤沼伸乙准教授、帝京大学薬学部 出口芳春教授、久保義行教授、ケンタッキー大

学薬学部 Bjoern Bauer 教授、Anika Hartz 准教授、ならびに、共同研究者の先生方、卒業生および在校生、学生時代を支えていただいた家族と友人に深く感謝申し上げます。また、本稿を執筆する機会を与えてくださった薬剤学編集委員の先生方に厚く御礼申し上げます。

引 用 文 献

- 1) Y. Tega, S. Akanuma, Y. Kubo, T. Terasaki, K. Hosooya, Blood-to-brain influx transport of nicotine at the rat blood-brain barrier: involvement of a pyrilamine-sensitive organic cation transport process, *Neurochem. Int.*, **62**, 173–181 (2013).
- 2) B. Lomenick, R. Hao, N. Jonai, R. M. Chin, M. Aghajan, S. Warburton, J. Wang, R. P. Wu, F. Gomez, J. A. Loo, J. A. Wohlschlegel, T. M. Vondriska, J. Pelletier, H. R. Herschman, J. Clardy, C. F. Clarke, J. Huang, Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 21984–21989 (2009).
- 3) S. Hiranaka, Y. Tega, K. Higuchi, T. Kurosawa, Y. Deguchi, M. Arata, A. Ito, M. Yoshida, Y. Nagaoka, T. Sumiyoshi, Design, synthesis, and blood-brain barrier transport study of pyrilamine derivatives as histone deacetylase inhibitors, *ACS Med. Chem. Lett.*, **9**, 884–888 (2018).
- 4) Y. Tega, H. Tabata, T. Kurosawa, A. Kitamura, F. Itagaki, T. Oshitari, Y. Deguchi, Structural requirements for uptake of diphenhydramine analogs into hCMEC/D3 cells via the proton-coupled organic cation antiporter, *J. Pharm. Sci.*, **110**, 397–403 (2021).
- 5) T. Kurosawa, Y. Tega, Y. Uchida, K. Higuchi, H. Tabata, T. Sumiyoshi, Y. Kubo, T. Terasaki, Y. Deguchi, Proteomics-based transporter identification by the PICK method: Involvement of TM7SF3 and LHF-PL6 in proton-coupled organic cation antiport at the blood-brain barrier, *Pharmaceutics*, **14**, 1683 (2022).