

学位論文

Doctoral Thesis

細胞膜流動性を標的とした新規抗HIV-1薬の探索

(The screening of novel anti-HIV-1 agents targeting on
cell membrane fluidity)

松田幸樹

Kouki Matsuda

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻

エイズ先端研究者育成コース

指導教員

岡田 誠治 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程エイズ学Ⅲ

2016年3月

目次

1. 要旨	1
2. 発表論文	3
3. 謝辞	4
4. 略語一覧	5
5. 研究の背景と目的	7
5-1) HIV-1感染症の現状	
5-2) HIV-1の感染機構	
5-3) 細胞膜の流動性	
5-4) CEP	
5-5) HL	
5-6) GUT-70	
5-7) 研究目的	
6. 実験方法	18
6-1) 臍帯血単核球 (CBMC) と成人末梢血単核球 (PBMC) の分離と PHA-blast 細胞への誘導	
6-2) 細胞株	
6-3) ウイルスの作製	
6-4) Tetrazolium dye methylthiotetrazole assay (MTT assay)	
6-5) HIV-1 感染実験	
6-6) フローサイトメトリー解析	
6-7) 上清中 HIV-1 p24 抗原量の定量	
6-8) Syncytial formation assay	
6-9) Cell to cell membrane fusion assay	
6-10) HIV-1 viral entry assay	
6-11) 細胞膜流動性の測定	
6-12) 統計学的解析	
7. 実験結果	24
7-1) Biscoclaurine alkaloid Cepharanthine (CEP)による抗 HIV-1 効果の検討	
7-1-1) CEP による細胞毒性の検討	
7-1-2) CEP の HIV-1 感染阻害効果	

7-1-3) CEP の合胞体 (Syncytium) 形成抑制効果	
7-1-4) CEP の膜融合抑制効果	
7-1-5) CEP の膜流動性低下作用	
7-2) 新規ナノ粒子 Hybrid liposome の HIV-1 感染症に与える影響	
7-2-1) HL による細胞毒性の検討	
7-2-2) HL の合胞体 (Syncytium) 形成促進効果	
7-2-3) HL の膜融合促進効果	
7-2-4) HL の HIV-1 感染促進効果	
7-2-5) HL の膜流動性亢進作用	
7-2-6) HL の脂質ラフトへの影響	
7-3) 三環系クマリン化合物 GUT-70 の抗 HIV-1 効果	
7-3-1) GUT-70 による細胞膜流動性低下作用	
7-3-2) GUT-70 の膜融合抑制効果	
7-3-3) GUT-70 の HIV-1 感染抑制効果	
7-3-4) GUT-70 による HIV-1 細胞内侵入阻害効果の検討	
7-3-5) GUT-70 による宿主細胞受容体の発現低下作用	
8. 考察	43
9. 結語	46
10. 参考文献	47

1 要旨

【目的】 HIV-1 は宿主細胞のレセプターである CD4 とケモカインレセプターである CXCR4/CCR5 を介して細胞内に侵入することで感染する。現在は多剤併用抗レトロウイルス療法 (cART) が HIV-1 感染症治療に導入され、先進諸国では AIDS による死亡率が顕著に低下し、患者の予後は飛躍的に改善された。しかし、HIV-1 は突然変異を起こしやすく薬剤耐性ウイルスを誘導してしまう。この薬剤耐性の出現に対して、侵入のステップを標的とした薬剤開発が突破口となりうる可能性がある。近年、細胞膜の流動性の変化が HIV-1 感染に影響を及ぼすことが報告されており、ウイルスの細胞侵入における細胞膜の役割が注目されている。2008 年にケモカインレセプター CCR5 を標的としたウイルス侵入阻害薬であるマラビロクが本邦でも認可され、さらなるウイルス侵入阻害剤の開発が進んでいる。HIV-1 感染症において、cART 導入以降 AIDS 発症を抑制し患者の予後は改善されたが、薬剤耐性ウイルスの出現が効果的な治療の妨げとなっている。なぜなら、現在臨床で用いられている cART は主にウイルス側を標的としており、唯一、ウイルス侵入阻害薬として宿主細胞の受容体である CCR5 を標的としたマラビロクが認可されている。しかし、マラビロクは R5 指向性 HIV-1 にのみ効果的で X4 指向性 HIV-1 には有効ではないという弱点がある。したがって、これまでの薬剤とは作用機序の異なる薬剤の開発が必須となっている。このウイルス侵入を制御することができれば、その後のウイルス複製に至るまでの全てのイベントを止めることが可能である。そこで本研究では、HIV-1 感染の最初のステップであるウイルス侵入過程に着目し、宿主細胞の細胞膜をターゲットとした新たな治療薬の探索を目的とした。まず、既に臨床で用いられており、安全性が確立されている Cefharanthin (CEP) の抗 HIV-1 効果を検討した。次に、細胞膜流動性に影響を与えることが報告されている人口脂質膜 Hybrid liposome (HL) を用いて HIV-1 感染症に与える影響を検討した。最後に、白血病細胞に効果を示すことが報告されている新規抗腫瘍薬 GUT-70 の抗 HIV-1 効果を検討した。

【方法】 蛍光偏光解消法により各薬剤の細胞膜流動性に与える影響を検討した。次に HIV-1 エンベロープ蛋白 (Env) を発現させた細胞株 (293T Env-GFP) と対照となる T 細胞株 (TZM-bl) を共培養し、合胞体形成における各薬剤の効果を蛍光顕微鏡観察により検討した。また、HIV-1 エンベロープ蛋白 (Env) を発現した T 細胞株 (Jurkat_{HXBc2}, Jurkat_{522FY}) と対照となる T 細胞株 (MOLT4) を蛍光色素 (PKH26, 67) で各々染色後、共培養し、細胞融合における各薬剤の効果をフローサイトメトリー解析と蛍光顕微鏡観察により検討した。さらに、フ

ローサイトメトリーを用いた細胞内p24 (Gag蛋白) 染色法とp24 ELISA、Real-time PCR法により、HIV-1感染及びウイルス産生における効果を検討した。

【結果】 CEP が細胞膜流動性を低下させ、CEP 前処理により HIV-1 感染及び細胞融合が濃度依存的に抑制されることが明らかになった。次に、HL が細胞膜流動性を亢進させ、HIV-1 感染及び細胞融合を促進させることが明らかになった。最後に、GUT-70 が細胞膜流動性を低下させ、HIV-1 受容体の発現を低下させることで HIV-1 感染及び細胞融合を抑制することが明らかになった。

【考察】 これらの 3 つの薬剤による HIV-1 感染に対する効果をまとめると、細胞膜流動性を低下させる CEP 及び GUT-70 は顕著に HIV-1 の細胞内侵入を抑制し、細胞膜流動性を増加させる HL は HIV-1 の細胞内侵入を促すことが示唆された。

【結論】 本研究は宿主細胞膜を標的とした新たな治療アプローチの可能性を示し、ウイルス側を標的とした既存の抗 HIV-1 薬による薬剤耐性ウイルスの出現という問題を克服する。

2 発表論文リスト

(1) 関連論文

1. **Matsuda K**, Hattori S, Komizu Y, Kariya R, Ueoka R, Okada S. “Cepharanthine inhibited HIV-1 cell-cell transmission and cell-free infection via modification of cell membrane fluidity.” *Bioorg Med Chem Lett.* 24(9):2115-7. **2014**.
2. **Matsuda K**, Hattori S, Kariya R, Komizu Y, Kudo E, Goto H, Taura M, Ueoka R, Kimura S, Okada S. “Inhibition of HIV-1 entry by a tricyclic coumarin GUT-70 through the modification of membrane fluidity.” *Biochem Biophys Res Commun.* 457(3): 288-98, **2015**

(2) その他の論文

1. Ohkuma K, **Matsuda K**, Kariya R, Goto H, Kamei S, Hamamoto T, Okada S. “Anti-inflammatory effects of activated protein C on human dendritic cells.” *Microbiol Immunol.* 59(7): 381-8, **2015**.
2. Kariya R, **Matsuda K**, Gotoh K, Vaeteewoottacharn K, Hattori S, Okada S. “Establishment of nude mice with complete loss of lymphocytes and NK cells and application for in vivo bio-imaging.” *In Vivo.* 28(5): 779-84, **2014**
3. Tanaka A, Takeda S, Kariya R, **Matsuda K**, Urano E, Okada S, Komano J. “A novel therapeutic molecule against HTLV-1 infection targeting provirus.” *Leukemia.* 27(8): 1621-7. **2013**
4. Goto H, **Matsuda K**, Srikoon P, Kariya R, Hattori S, Taura M, Katano H, Okada S. “Potent antitumor activity of zoledronic acid-induced V γ 9V δ 2 T cells against primary effusion lymphoma.” *Cancer Lett.* 331(2): 174-82. **2013**
5. **松田幸樹**、岡田誠治 “フローサイトメトリーを用いたウイルス侵入阻害薬スクリーニング法の樹立” *Cytometry Research.* 25(1): 25-28. **2015**.

3 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導及びご鞭撻を賜りました熊本大学大学院医学教育部エイズ学Ⅲ分野 岡田誠治 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を行うに際して懇篤なるご指導とご助言を賜りました国立国際医療研究センター研究所 難治性ウイルス感染症研究部レトロウイルス感染症研究室 服部真一郎 博士、熊本大学大学院エイズ学Ⅲ分野 刈谷龍昇 博士に深く感謝の意を表します。

臍帯血をご提供いただいた福田病院の松井和夫院長をはじめ、スタッフの皆様に厚く御礼申し上げます。

Hybrid liposomeをご提供いただいた崇城大学工学部応用生命科学科 上岡龍一教授、古水雄志 助教に厚く御礼申し上げます。

GUT-70をご提供いただいた佐賀大学医学部内科学講座血液・呼吸器・腫瘍内科 木村晋也 教授に厚く御礼申し上げます。

実験をサポートしていただいた技術補佐員の鈴郁子 技官、藤川佐和子 技官、秘書の遠藤由佳 技官、服部京子 技官に厚く御礼申し上げます。

最後に、私の長きにわたる学生生活を暖かく見守り、支え、ご協力頂いた、家族、友人にこの場を借りて心より感謝致します。

4 略語一覽

AC	Asymptomatic carrier
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
APC	Allophycocyanin
cART	Combination antiretroviral therapy
CBMC	Cord blood mononuclear cell
CEP	Cepharanthine
CTB	Cholera toxin subunit B
DDS	Drug delivery system
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
FBS	Fetal bovine serum
GFP	Green fluorescence protein
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus-1
HL	Hybrid liposome
MFI	Mean fluorescence intensity
MTT	Methylthiotetrazole
NNRTI	Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor
NRTI	Nucleoside reverse transcriptase inhibitor
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin

PEL	Primary Effusion Lymphoma
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
rhIL-2	Recombinant human Interleukin-2
RNA	Ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SIV	Simian immunodeficiency virus
T-20	Enfuvirtide
UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

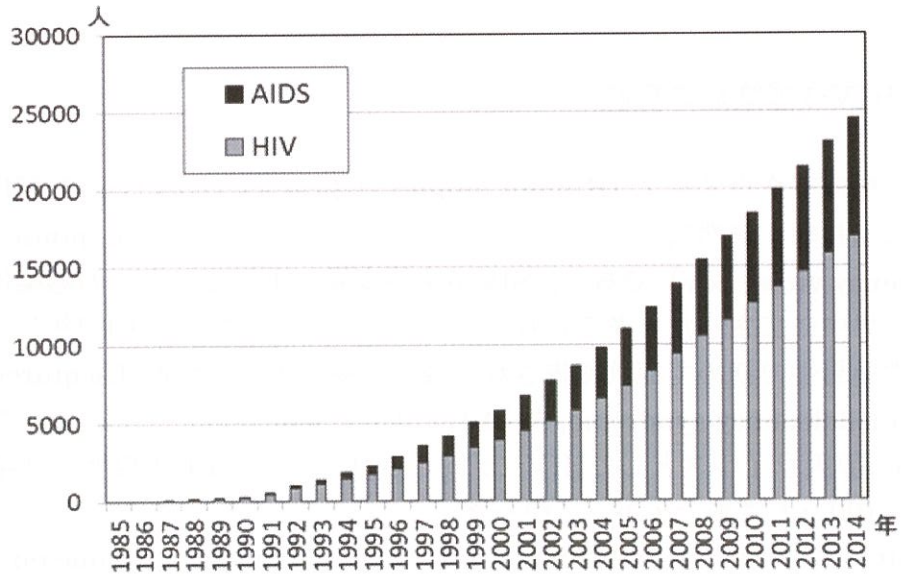
5 背景と目的

5-1) HIV-1感染症の現状

ヒト免疫不全ウイルス (Human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) の起源は霊長類を自然宿主とするサル免疫不全ウイルス (Simian immune deficiency virus, SIV) であり、SIVが突然変異によってヒトへの感染性を獲得し、世界中に広まったと考えられている。ヒトにおいては、1981年にアメリカの同性愛男性で初めて症例報告され、後天性免疫不全症候群 (Acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) と正式に認定された。その後、1983年にAIDSの原因ウイルスとしてHIV-1が同定され、わずか10年程度で感染者は世界中に100万人にまで広がっていった。

WHOの機関であるUNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV and AIDS) のレポートによると2010年現在においてHIV感染者数は約3400万人に達すると報告されており、その中の約270万人が新規感染者である。その拡大の大部分がアジア、アフリカ地域の開発途上国で見られる。サハラ砂漠以南のアフリカには全世界の60%近くのAIDS患者が居住し、その数は増加傾向にあるといわれ、アジア諸国においても急速に感染の拡大が生じて社会問題化している。本邦においては1985年、初めてAIDS患者が確認され、HIV-1感染者の年間報告数は増加傾向が続いた。特に2004年から2008年まで増加が著しく、それ以降横ばい傾向となっている。2014年の新規HIV感染者は1091件であり、累計患者数は1万人を超えている (図 1)。

a



b

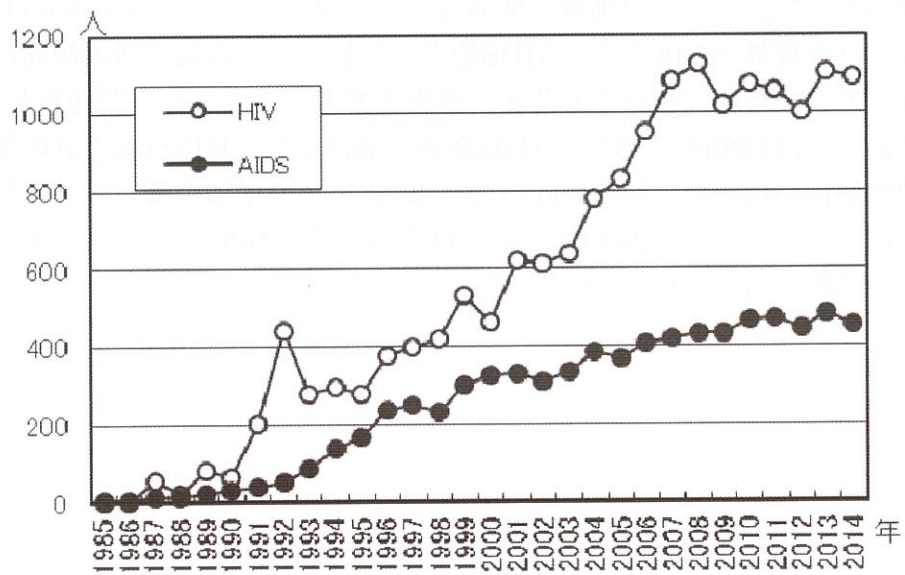


図1. 厚生労働省エイズ動向委員会に報告された本邦におけるHIV感染者・AIDS患者の発生動向 (a) HIV-1感染者・AIDS患者の累計報告数推移 (b) 新規HIV-1感染者及び新規AIDS患者報告数の年次推移 (厚生労働省エイズ動向委員会:2014年エイズ発生動向年報より)

HIV-1の主な標的細胞はCD4陽性T細胞、マクロファージ系の細胞である。HIV-1が細胞に吸着、侵入する際の受容体としてCD4が用いられ、HIV-1外被糖タンパク質であるgp120とCD4とが結合した後、gp120のV3ループとケモカイン受容体CXCR4、CCR5が相互作用し、感染が成立する[1]。感染後は比較的長い潜伏期の後に活性化してCD4陽性T細胞を破壊する[2-4]。まず、HIVに感染して1-2週間程度で、全身倦怠、発熱など軽い風邪に近い症状に加え、突然の全身性の発疹や複数の部位のリンパ節腫脹が見られる。しかし、こういった急性感染期症状に気付いても単なる風邪や蕁麻疹、口内炎として見過ごす場合や、症状が出ず気づかない人も多い。感染後、数週間から1か月程度で抗体が産生され、血中ウイルス量はある程度減少し、セットポイントと呼ばれるレベルとなる。通常HIV感染検査は産生される抗体の有無を検査するため、感染後数週間、人によっては1ヶ月程度経過してからでないと十分な抗体が測定されないため、検査結果が陰性となる場合がある（ウィンドウ期間）。そのため、HIV-1感染後最も早期に出現する（約20日後）HIV-1抗原を測定することができるELISA法等を用いて、抗原と抗体の同時測定を行うことで、ウィンドウ期間の大幅な短縮が可能となった。多くの人は急性感染期を過ぎて症状が軽快し、5-10年は無症状で過ごす。この間、体内でHIVが盛んに増殖を繰り返す一方で、免疫担当細胞であるCD4陽性T細胞も増殖する。HIVがCD4陽性T細胞に感染し破壊するプロセスが繰り返されるため、見かけ上の血中ウイルス量が低く抑えられているという動的な平衡状態にあるが、無症候期を通じてCD4陽性T細胞数は徐々に減少する。無症候期にある感染者は無症候性キャリア（Asymptomatic carrier, AC）とも呼ばれる。血液中のCD4陽性T細胞が200個/ μ l以下に減少すると、身体的に免疫力低下症状を呈するようになる。初期には全身倦怠感、体重の急激な減少、慢性的な下痢、めまい、発疹、口内炎、発熱、喉炎症、咳など、風邪によく似た症状のAIDS関連症状を呈する。その後、日和見感染や悪性腫瘍等、生命に危険が及ぶ症状を呈してくる。また、HIV感染細胞が中枢神経系組織へ浸潤し、脳の神経細胞が冒されるとAIDS脳症と呼ばれ、精神障害や認知症、記憶喪失を引き起こす。このように、HIV感染後は急性期、慢性期、AIDS発症期と大別され、その指標はCD4陽性T細胞数である（図2）。CD4陽性T細胞数の減少に伴い、相対的にCD8陽性T細胞数は増加するため、両者の比（CD4/CD8）は小さくなる[5]。

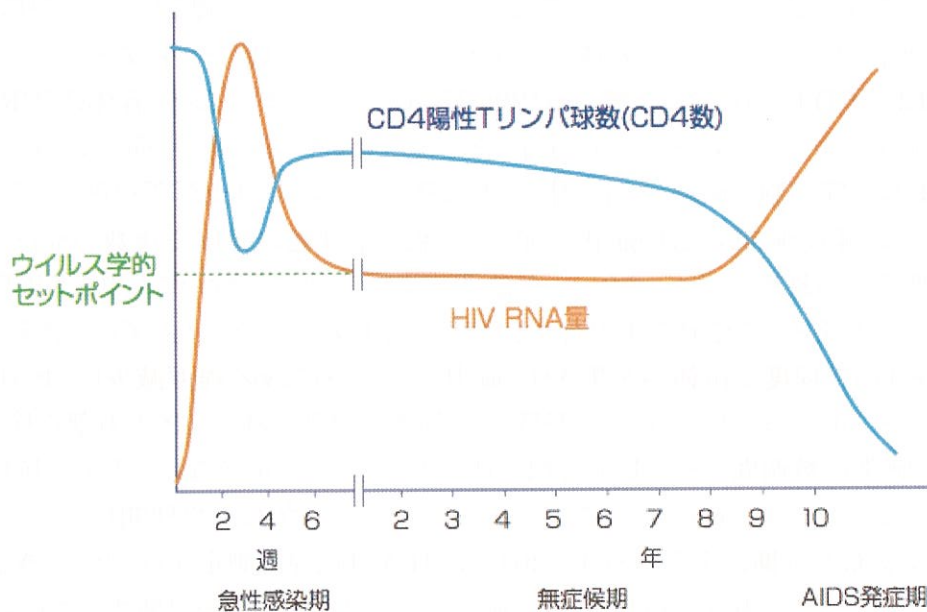


図2. HIV感染からAIDS発症に至るまで（抗HIV治療ガイドライン（2014年版）より）

現在、核酸系逆転写酵素阻害剤（Nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NRTI）、非核酸系逆転写酵素阻害剤（Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NNRTI）、プロテアーゼ阻害剤（Protease inhibitor, PI）等が開発され、治療薬として用いられている。これらを複数組み合わせる多剤併用療法（Combination Antiretroviral therapy, cART）により、HIV感染症は長期にわたりコントロールできる疾患になりつつある。しかしHIV自体を体内から排除する根本治療は存在せず、HIVの体内動態にも未解明の部分が多い。

5-2) HIV-1の感染機構

レトロウイルスであるHIV-1は、宿主の細胞に寄生して、細胞の様々な増殖機構を利用することで自己複製を行う。HIV-1はレトロウイルスに属しており、ウイルス粒子内に逆転写酵素、インテグラーゼ、プロテアーゼという酵素を持ち、各々が特定のライフサイクルに用いられる。まず、細胞とHIV-1が出会うと、gp120と宿主細胞のCD4が結合する。次いで、gp120とケモカインレセプターであるCXCR4/CCR5が結合する。これにより、gp120からgp41が開放され、それまでgp120内に隠れていたgp41の疎水性領域が露出し、その領域が宿主細胞膜に直接挿入される。三量体であるgp41は、膜内在性タンパク質として、一時的に宿主細胞の二重膜を貫通して結合し、そして自発的に配列を変化させ、六つのらせん状の束となる。これらの束が放出するエネルギーは、HIV-1外膜と宿主細胞膜を引き寄せあうことに使われ、膜融合に必要な活性化エネルギーを超える。

そして、ウイルスの膜と細胞膜を融合（膜融合）させることで細胞への侵入を成し遂げる(図 3)。

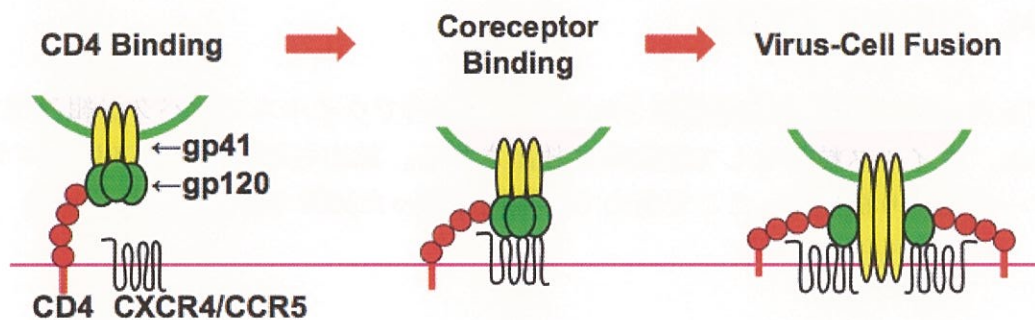


図 3. HIV-1 の侵入メカニズム (松田幸樹、*Cytometry Research*、2015 より)

細胞へ侵入したHIV-1は、RNAを細胞内に放出し、自身が持つ逆転写酵素によってウイルスRNAをウイルスDNAへと変換し、そのDNAはインテグラーゼにより宿主細胞のDNAにプロウイルスDNAとして組み込まれる。

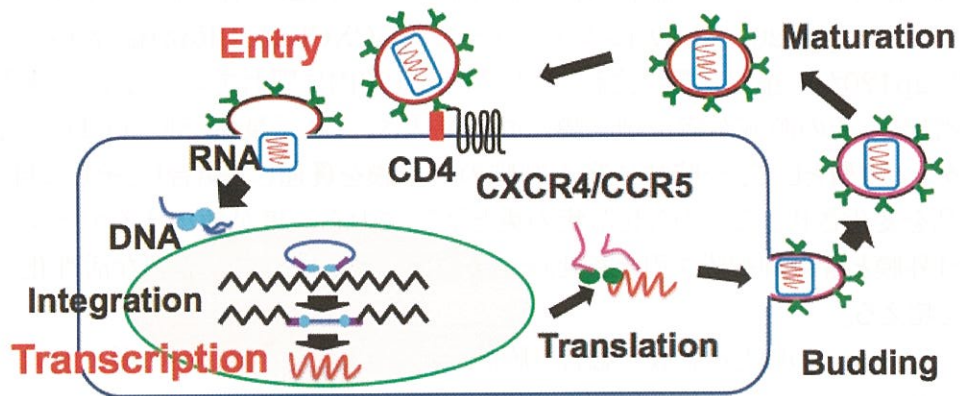


図4. HIV-1の感染機構

プロウイルスDNAは転写翻訳された後、細胞内でウイルスタンパクが組み立てられ、ウイルス粒子として細胞外に放出される。放出されたウイルスはプロテアーゼにより成熟し、ここで初めて感染性を持ったHIV-1が複製される (図 4)。

5-3) 細胞膜の流動性

宿主細胞の細胞膜はリン脂質二重膜から構成されている。リン酸基は親水性の頭部と2本の疎水性の脂肪酸を尾部に有する構造を取っており、頭部を細胞の外側に、尾部を内側にして二層を作って並んでいる。細胞はフリップフラップ運動により恒常的にリン酸基を動かしており、細胞内外からの物質の取り込みやシグナル伝達等、様々な生命活動維持のために働く。細胞膜上にはスフィンゴ脂質とコレステロールに富んだ脂質ラフトが存在しており[6]、細胞膜の中で筏のように浮かんでいる。脂質ラフトは、HIV-1感染に必須であるCD4、CXCR4、CCR5等の様々な膜タンパクを乗せて機能しているため(図5)、HIV-1感染とも密接に関わっている[7]。細胞膜の流動性が上昇すると、脂質ラフトが細胞膜上のある特定の部位に局在(クラスター形成)することが報告されている[8]。また、細胞膜流動性の制御がHIV-1の侵入及び細胞融合を抑制することが報告されている[9, 10]。

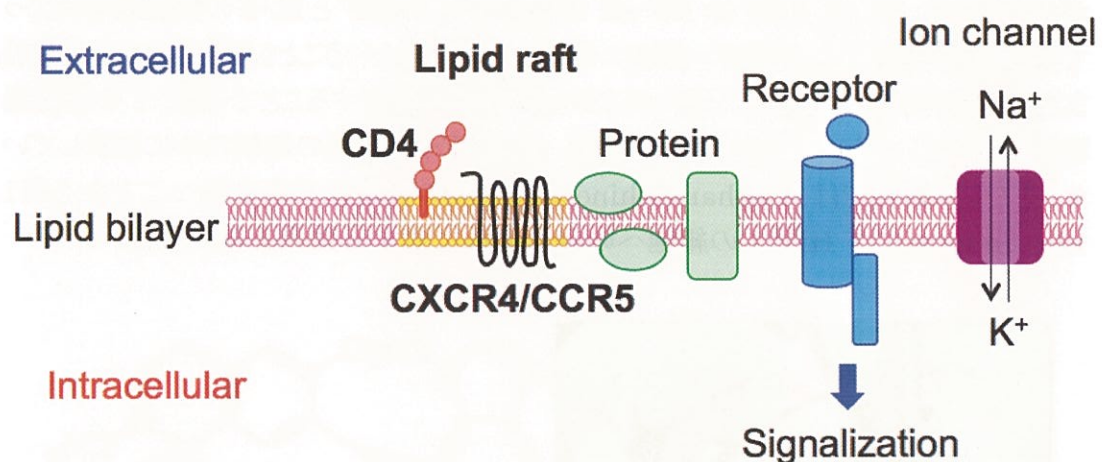


図5. 細胞膜の構造と脂質ラフト

5-4) CEP

CEP は、台湾の山奥に自生しているタマサキツヅラフジという植物から抽出、精製されたアルカロイド製剤である (図 6)。1914 年に台北帝国大学教授であった早田博士がこの植物を発見し、当時は結核の治療薬として用いられていた。また、細胞膜安定化作用[11, 12]、抗炎症作用[13]、免疫調節作用[14]を有することが知られている。現在は放射線による白血球減少症[15]や円形脱毛症[16]、まむし咬傷[17]等に重篤な副作用を与えることなく[18]効果を示すと言われており、現在臨床でも使用されている。特にまむし咬傷に有効だと言われており[18]、第一選択薬となっている。

近年では、CEPは骨髄腫においてアポトーシス経路の活性化とCDK阻害を通して細胞周期を止めるという2つの経路により抗腫瘍効果を示すという報告[19]や、CEPは胆管がん細胞[20]と悪性リンパ腫である PEL (Primary Effusion Lymphoma)[21]において NF- κ B 経路を阻害してアポトーシスを誘導するという報告がされている。そして、CEP は NF- κ B 活性を伴う、VEGF と IL-8 の発現阻害によって血管新生を阻害し、口腔ガン細胞の増殖を抑制するということも報告されている[22]。また、この研究の背景として CEP が NF- κ B 経路を阻害することで HIV-1 の複製過程を抑制しているという報告があるが[23]、全て NF- κ B 経路の抑制のみに注目していた。そこで本研究では、Cepharanthine が細胞膜の安定化作用を持つことから[11, 12]、*in vitro*にて HIV-1 の細胞への侵入過程に対する効果を検討した。

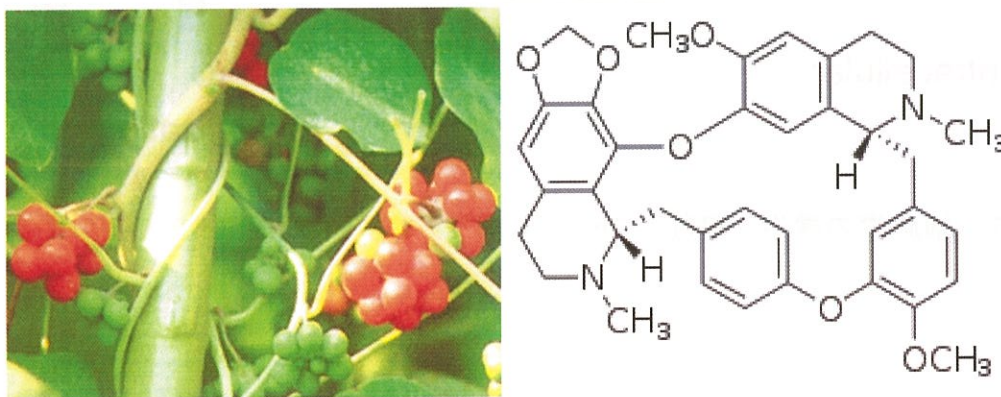


図6. *Stephania cepharantha* Hayataと CEPの構造式

5-5) HL

HLは、リン脂質等のベシクル分子とミセル界面活性剤を緩衝溶液中にて超音波照射することで容易に合成できる人工生体膜である(図7)。HLは元来、抗ガン剤を標的部位に選択的かつ効率よくデリバリーさせる薬物送達システム(Drug delivery system: DDS)への応用を目的として開発された[24]。しかし、HL単体で抗ガン作用を有することから、近年、多岐にわたるガン細胞への応用を目指す研究が成されている。HLは、正常細胞には影響を与えることなく、各種ガン細胞に対して選択的に取り込まれて抗腫瘍効果を有することが報告されている[25]。また、HLは細胞膜の流動性を増加させることで白血病、肝臓ガン、肺ガン、乳ガン、PEL細胞においてアポトーシスによる細胞死を誘導することが報告されており[26, 27]、さらに大腸ガン[28]、CCA細胞において細胞周期停止を引き起こすことが報告されている[29]。

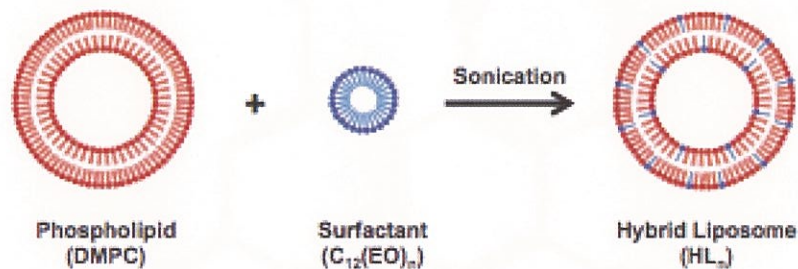


図7. Hybrid Liposomeの構造

5-6) GUT-70

熱帯地域には約 180 種のオトギリ草が存在し、それらから二環系クマリン構造を有する化合物が同定されており[30]、HIV-1 の逆転写酵素を阻害することや[31]、ウイルスの複製を阻害することが報告されている[32]。GUT-70 はブラジルの熱帯雨林に自生するブラジルオトギリ草 (*Calophyllum brasiliense*) の茎から抽出された三環系クマリン構造を有する天然有機化合物である (図 8)。これまでに、GUT-70 が白血病細胞[33]及びリンパ腫[34]に対して抗腫瘍効果を有すること、NF- κ B 経路阻害により HIV-1 感染細胞のウイルス複製を抑制することが報告されている[35]。

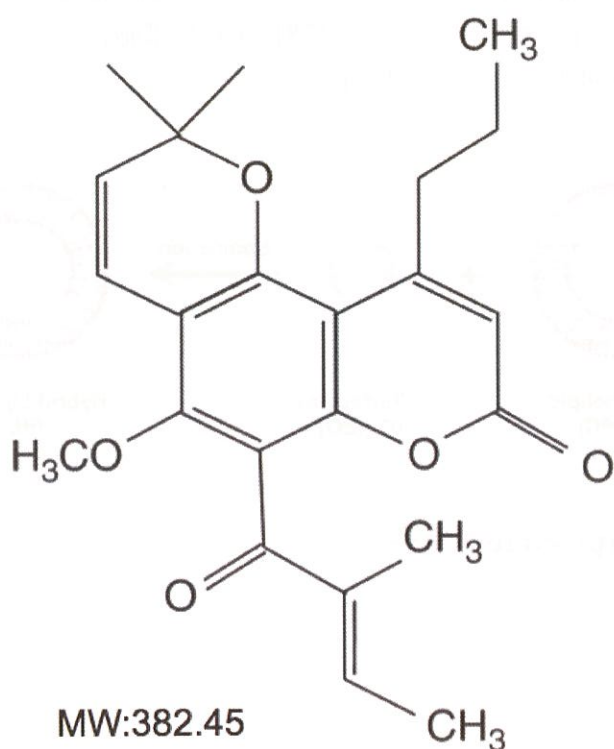


図8. GUT-70の構造式

5-7) 研究目的

本研究では、宿主細胞の細胞膜流動性を標的とした新規抗 HIV-1 薬の探索を目的とし、以下の観点から検討を行った。

1. CEP の抗 HIV-1 効果
2. 細胞膜流動性変化が HIV-1 の細胞内侵入過程に与える影響
3. GUT-70 の HIV-1 侵入抑制効果

以下、得られた結果の詳細を記す。

6 実験方法

6-1) 臍帯血単核球 (CBMC) と成人末梢血単核球 (PBMC) の分離と PHA-blast細胞への誘導

以下の実験は、熊本大学大学院医学薬学教育部等倫理委員会の承認を得て行った。臍帯血は、妊娠37-41週に正常出産した臍帯血を福田病院から供与いただいた。末梢血は、健康成人より採血した。臍帯血は母親の、末梢血は本人のinformed consentを得た後に採血し、実験に用いた。

CBMCとPBMCは、PANCOLL (リンパ球分離溶液; PAN BIOTECH GmbH, Germany) を用いて密度勾配遠心法によって分離した。50 mlファルコンチューブに15mlのPANCOLLを入れ、35 mlの血液を重層後、800 G, 20分間遠心分離を行い、中間層 (単核球層) を採取した。その後溶血させ、PBS (phosphate-buffered saline) で2回洗浄し、 1×10^6 個/ml のCBMC/PBMCをRecombinant human Interleukin-2 (rhIL-2) (200 U/ml) 、PHA (5 μ g/ml) 刺激下で3日間培養してPHA-blast細胞を誘導した後、以下の実験に用いた。

6-2) 細胞株

本研究ではT細胞株であるMOLT4、HUT78、PM1-CCR5、Jurkat_{HXBc2}、Jurkat_{522F/Y} と、TZM-bl、293Tを用いた。これらの細胞はAIDS Research and Reference Reagent Programから入手し、MOLT4、HUT78、PM1-CCR5、Jurkat_{HXBc2}、Jurkat_{522F/Y}は、10% FCS とペニシリン (100 U/ml)、ストレプトマイシン(100 μ g/ml) を含むRPMI 1640中でCO₂インキュベーター (37°C、5%CO₂) にて培養した。TZM-bl、293Tは10% FCS とペニシリン (100 U/ml)、ストレプトマイシン(100 μ g/ml) を含むDMEM中でCO₂インキュベーター (37°C、5%CO₂) にて培養した。

また、Jurkat_{HXBc2}、Jurkat_{522F/Y} は1 μ g/ml テトラサイクリン、200 μ g/ml G418、200 μ g/ml ハイグロマイシン存在下で培養した。これらの抗生物質を除去すると、Jurkat_{HXBc2} はHIV-1 Envを細胞表面に発現し、Jurkat_{522F/Y} はHIV-1 Envの変異型を細胞表面に発現する。Jurkat_{522F/Y} は膜融合能を有しないため、コントロール細胞として用いた。10% FCS とペニシリン (100 U/ml)、ストレプトマイシン(100 μ g/ml) を含むRPMI 1640中でCO₂インキュベーター (37°C、5%CO₂) で3日間培

養した後に膜融合阻害の実験に用いた[36, 37]。

6-3) ウイルスの作製

本研究で用いたウイルスは293T細胞 (3×10^5 個/ml) にHIV-1_{NL4-3} または、HIV-1_{JR-FL} プラスミドDNA (30 μ g) をHilymax (同仁化学, Japan) を用いて遺伝子導入し、作製した。48時後、培養上清を回収し、一旦-80°Cフリーザーで凍結保存した。HIV-1 p24 抗原量はRETRO-TEK HIV-1 p24 Antigen ELISA (Zepto Metrix Corp., Buffalo, N. Y.) を用いて測定した。HIV-1_{JR-FL} は小柳義夫教授 (京都大学) より供与された。

6-4) Tetrazolium dye methylthiotetrazole assay (MTT assay)

CEPのCBMC、PBMC、MOLT4、TZM-blに対する細胞増殖抑制効果をMTT法 (Sigma, ST. Louis, MO) を用いて検討した。 2×10^4 個/wellのCBMC、PBMC、MOLT4、TZM-blを96穴マイクロプレートに各サンプル3つ、100 μ lずつ播種した。その後直ちに最終濃度0, 1, 3, 5, 10 μ g/ml になるようにCEPを処理し、CO₂インキュベーターの中で1時間培養後、PBSで洗浄し、再びCO₂インキュベーターの中で24時間培養した。続いて、MTT (最終濃度 0.5 μ g/ml) 10 μ lを加え、さらに3時間培養、その後100 μ lの0.04N HCl / isopropanolを加え、ピペッティングにより紫色の結晶を完全に溶解した。そして、直ちに595nmの吸光度をマイクロプレートリーダー (Multiskan, Thermo Electron Vantaa, Finland) で計測した。吸光度は未処理のサンプルで標準化した。

6-5) HIV-1感染実験

1×10^6 個/ml のPBMCをRecombinant human Interleukin-2 (rhIL-2) (200 U/ml) 、PHA (5 μ g/ml) 刺激下で3日間培養してPHA-blast細胞を誘導した後、最終濃度0, 1, 5 μ g/ml になるようにCEPを処理し、37°Cにて1時間培養後、37°Cにて2時間、HIV-1_{NL4-3} (p24 濃度; 100 ng/ml) に感染させ、PBSで洗浄した後、再びrhIL-2刺激下で培養した。HIV感染後2、4日目に細胞と上清を回収した。

5×10^5 個/ml のHUT78細胞は、最終濃度0、10、50、100 μ M になるようにHLを処理し、37°Cにて1時間培養後、37°Cにて2時間、HIV-1_{NL4-3} (p24 濃度; 50

ng/ml) に感染させ、PBSで洗浄した後、再び37°Cにて培養した。HIV感染後2、4日目に細胞と上清を回収した。

5×10^5 個/ml のPM1-CCR5細胞は、最終濃度0、30、50、100 μ M になるようにGUT-70を処理し、37°Cにて1時間培養後、37°Cにて2時間、HIV-1_{NL4-3} (p24 濃度; 25 ng/ml) に感染させ、PBSで洗浄した後、再び37°Cにて培養した。HIV感染後2日目に細胞と上清を回収した。

6-6) フローサイトメトリー解析

細胞はPBS にて洗浄後staining medium (2 % fetal bovine serum、0.05 % sodium azido in PBS) に $\sim 2 \times 10^6$ 個になるように再懸濁し、anti-CD4-APC (BioLegend, San Diego, CA) を添加した。氷上暗所にて30分静置した後、staining medium にて洗浄し、パラホルムアルデヒド溶液 (1 %パラホルムアルデヒドin PBS) を加え、室温暗所にて静置し固定した。20分後、staining medium にて洗浄した。続いて、細胞内HIV-1 p24陽性細胞測定のためサポニン溶液 (0.1 %サポニン in staining medium) を加え室温暗所にて細胞膜透過処理を行った。10 分後、anti-HIV-1p24-PE (Beckman Coulter, Fullerton, CA) を加え氷上暗所にて静置した。30 分後、staining medium にて洗浄しLSR-II flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA) にて解析した。フローサイトメトリーデータはFlowJo (Tree Star, San Carlos, CA) ソフトウェアを用いて解析した。

6-7) 上清中HIV-1 p24 抗原量の定量

HIV感染細胞の培養上清中におけるHIV-1 p24 抗原量はRETRO-TEK HIV-1 p24 Antigen ELISA (Zepto Metrix Corp., Buffalo, N. Y.) を用いて測定した。

6-8) Syncytial formation assay

CEP及びHLの合胞体 (Syncytium) に対する抑制効果を検討した。293T細胞に Env-ires-GFP プラスミドをHilymax (同仁化学, Japan) にて遺伝子導入し、293T-Env-ires-GFP細胞を作製した。48時間後細胞を回収し、 5×10^4 個/ml の293T-Env-ires-GFP細胞と 5×10^4 個/ml のTZM-bl細胞を調製した。TZM-bl細胞には、最終濃度0, 1, 3, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ になるようにCEPをまたは、最終濃度0, 10, 50, 100 μM になるようにHLを処理し、CO₂インキュベーターの中で1時間培養した。その後、等量のTZM-bl細胞と共培養し24穴マイクロプレートに各サンプル3つ、500 μl ずつ播種した。48時間後、Biozero (KEYENCE, Japan) で蛍光顕微鏡観察・解析を行った。

6-9) Cell to cell membrane fusion assay

CEP、HL、GUT-70の細胞膜融合に対する抑制効果を検討した。テトラサイクリン存在下で培養しておいたT細胞株 (Jurkat_{HXBc2}、Jurkat_{522FY}) をPBS洗浄によりテトラサイクリンを除去し、3日間培養した。3日後、 2×10^6 個のJurkat_{HXBc2}、Jurkat_{522FY}細胞をPKH 26 Red Fluorescent Cell Linker Kit (SIGMA-ALDRICH, ST. Louis, MO) を用いて染色し、対照となるT細胞株 (MOLT4) をPKH 67 Green Fluorescent Cell Linker Kit (SIGMA-ALDRICH, ST. Louis, MO) を用いて染色した。MOLT4細胞は染色後、最終濃度0, 1, 3, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ のCEP、最終濃度0, 10, 50, 100 μM のHL、最終濃度0, 5, 7.5, 10 μM のGUT-70を処理し、CO₂インキュベーターの中で1時間培養した。その後、等量の両細胞を共培養し24穴マイクロプレートに各サンプル3つ、500 μl ずつ播種した。24時間後、細胞を回収し遠心してペレットをwashing buffer で洗浄、懸濁しLSR-II flow cytometerで解析を行った。PKH 26 Red Fluorescent Cell Linker Kitで染色した細胞はFL-2 (585 nm) で検出し、PKH 67 Green Fluorescent Cell Linker Kitで染色した細胞はFL1 (530 nm) で検出した。データはFlowJoソフトウェアで解析した。また、48時間後、Biozeroで蛍光顕微鏡観察を行った。

6-10) HIV-1 viral entry assay

5×10⁵ 個/ml のPM1-CCR5細胞は、最終濃度0、10、50、100 μM になるようにGUT-70を処理し、37℃にて10分間培養後、37℃にて1時間、HIV-1_{NL4-3} (p24 濃度; 25 ng/ml) またはHIV-1_{JR-FL} (p24 濃度; 50 ng/ml) に感染させ、PBSで洗浄した後、Trypsin-EDTAを5分間処理し、再びPBSで洗浄後、NP-40 bufferを加え1時間インキュベートした。インキュベート後、15,000rpm, 4℃, 15分間遠心し、タンパクを抽出した。得られたタンパクはBCA法を用いて定量した。各タンパク中に含まれるHIV-1 p24 抗原量はRETRO-TEK HIV-1 p24 Antigen ELISA (Zepto Metrix Corp., Buffalo, N. Y.) を用いて測定した。

6-11) 細胞膜流動性の測定

CEP、HL、GUT-70による細胞膜流動性の変化を、蛍光偏光解消法を用いて測定した。まず、T細胞株 (MOLT4細胞) を2.5×10⁶ 個用意して、最終濃度が2×10⁶ M になるようにDPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene) で染色後、遮光下、37℃でインキュベートした。30分後PBS で洗浄して、2.5×10⁵ 個/ml になるようにPBS で細胞を調製した。MOLT-4細胞は染色後、最終濃度0, 1, 5, 10, 20 μg/ml のCEP、最終濃度0, 10, 50, 100, 200 μM のHL、最終濃度0, 10, 50, 100 μM のGUT-70を処理した。処理後10分までの細胞膜流動性の変化をF4500 (HITACHI, Japan) 分光蛍光光度計を用いて測定した。偏光度の測定は、励起波長357nm/蛍光波長432 nm を用いて、37℃下で行った。

膜流動性はまずG値 (補正係数)を測定した。励起側偏光子90°、蛍光側偏光子90° の時のスペクトル (i //) と、励起側偏光子90°、蛍光側偏光子0° の時のスペクトル (i ⊥)を測定し

$$G = i \perp / i \parallel$$

の値を3回測定してその平均値をG値とした。

次にP値 (蛍光偏光度) を測定した。励起側偏光子0°、蛍光側偏光子0° の時のスペクトル (I // (λ)) と、励起側偏光子0°、蛍光側偏光子90° の時のスペクトル (I ⊥ (λ))を測定し

$$P = I \parallel (\lambda) - G \cdot I \perp (\lambda) / I \parallel (\lambda) + G \cdot I \perp (\lambda)$$

の値をP値とした。P値が小さいほど膜流動性が高いことを示し、大きいほど膜流動性が低下していることを示す。本研究では0分におけるP値を1とし、5分後または10分後のP値の変化の割合を算出した。

6-12) 統計学的解析

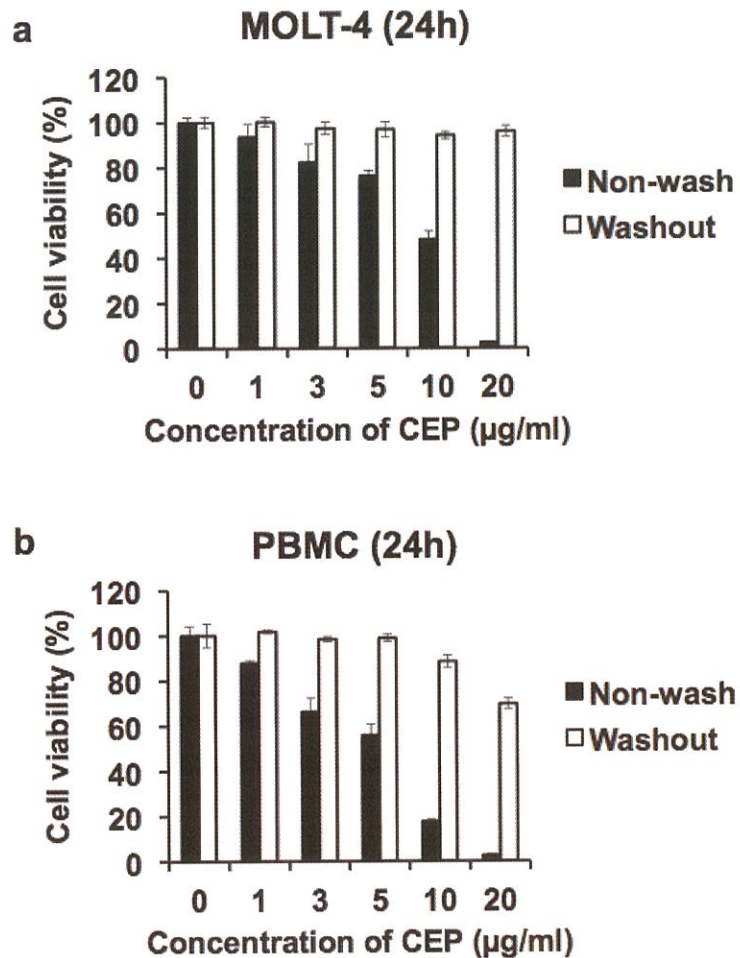
パラメトリック統計解析は Student's T-TEST を用いて行った。P 値は0.05 以下を統計学的に有意差有りと判定した。

7 実験結果

7-1) Biscoclaurine alkaloid Cepharanthine (CEP)による抗HIV-1 効果の検討

7-1-1) CEPによる細胞毒性の検討

まず、MTT法により、CEP処理後の洗浄の有無によるMOLT4, PBMCに対する細胞毒性を検討したところ、洗浄によりCEPが細胞増殖に影響を与えないことが確認された(図 9a, b)。さらにMTT法によりCEPのPBMC、CBMC、MOLT4、TZM-blに対する細胞毒性を検討し、0-10 $\mu\text{g/ml}$ の範囲では顕著な細胞増殖抑制効果は確認されなかった(図 9c)。



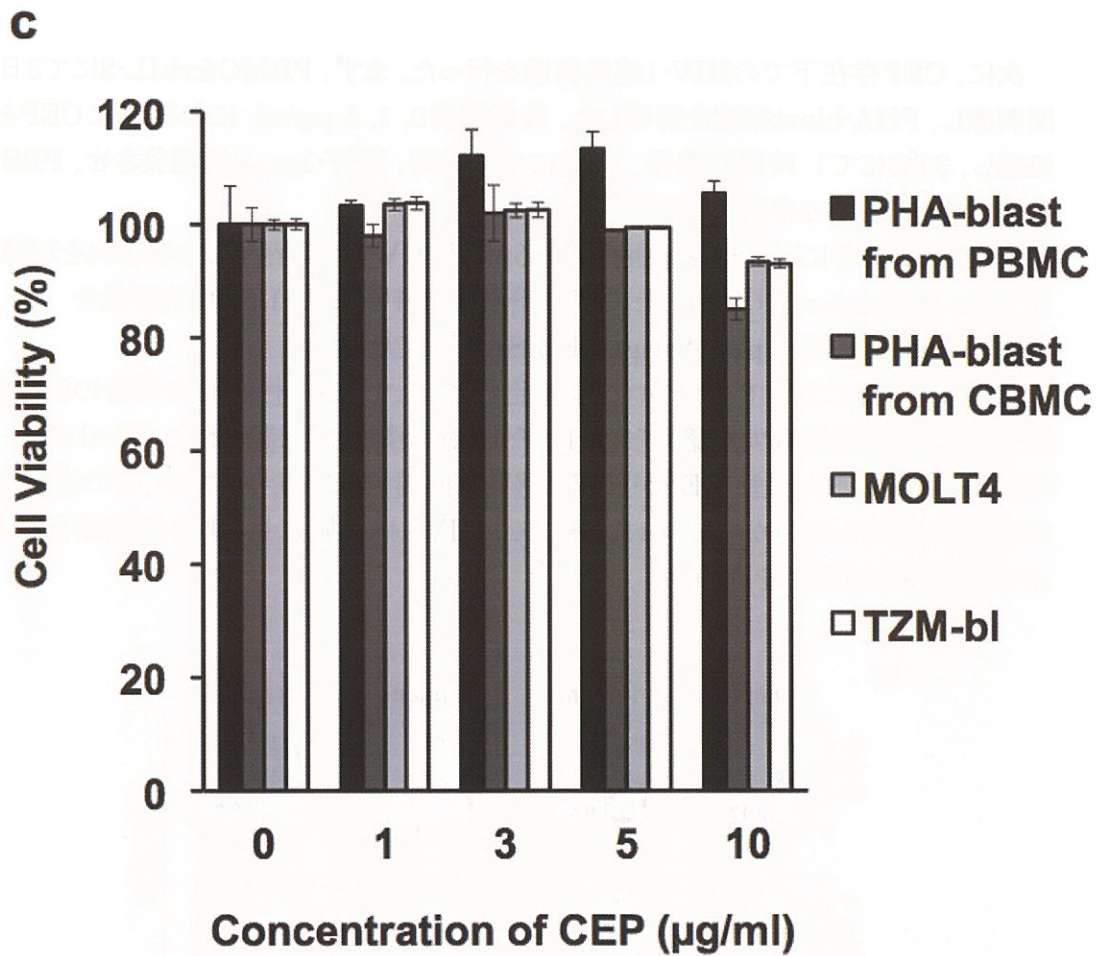


図 9. CEP の細胞毒性

CEP の細胞増殖に与える影響を MTT 法で確認した。(a) (b)MOLT-4 と PHA-blast 細胞を CEP 存在下または CEP を 1 時間処理後洗浄し 24 時間培養した。CEP の短時間処理において、細胞毒性は確認されなかった。Data represent the mean \pm SD. (c) MOLT-4、TZM-bl、PBMC 由来または CBMC 由来の PHA-blast 細胞に CEP を処理し 1 時間培養後、洗浄し、再び 24 時間培養した。結果は平均 \pm 標準偏差で算出した。

7-1-2) CEPのHIV-1感染阻害効果

次に、CEP存在下でのHIV-1感染実験を行った。まず、PBMCをrhIL-2にて3日間刺激し、PHA-blast細胞を誘導した。最終濃度0, 1, 5 $\mu\text{g/ml}$ になるようにCEPを処理し、37°Cにて1時間培養後、37°Cにて2時間、HIV-1_{NL4-3} に感染させ、PBSで洗浄した後、rhIL-2存在下で再び37°Cで培養した。

感染後2,4日目にHIV-1 gag蛋白であるp24とHIV-1の受容体であるCD4をLSR-II flow cytometerにて解析した。また、培養上清中のHIV-1 p24 抗原量をRETRO-TEK HIV-1 p24 Antigen ELISAにて定量した。

感染後4日目において、コントロール細胞と比較してp24陽性細胞の割合の減少と顕著なウイルス複製減少が認められ、HIV-1の感染抑制が確認された ($P < 0.001$) (図 10a, b, c)。これらは、CEPがHIV-1感染を抑制することを示したが、どの過程を抑制しているのかは分からなかった。そこで、HIV-1感染時に見られる細胞融合に焦点を当てさらなる研究を進めた。

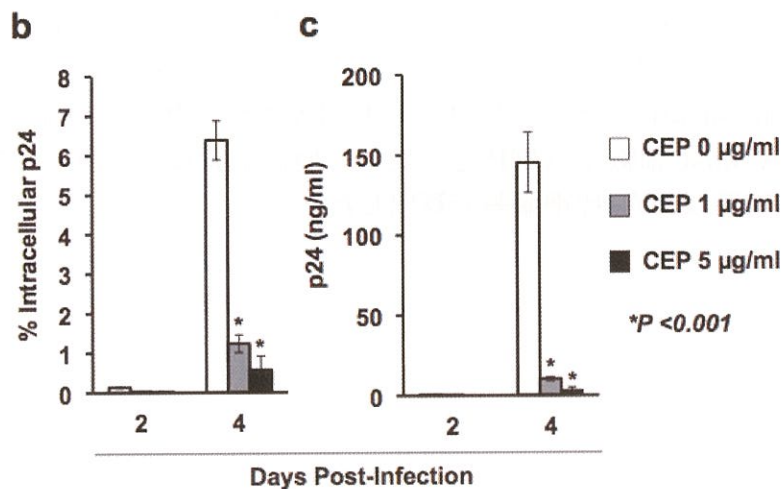
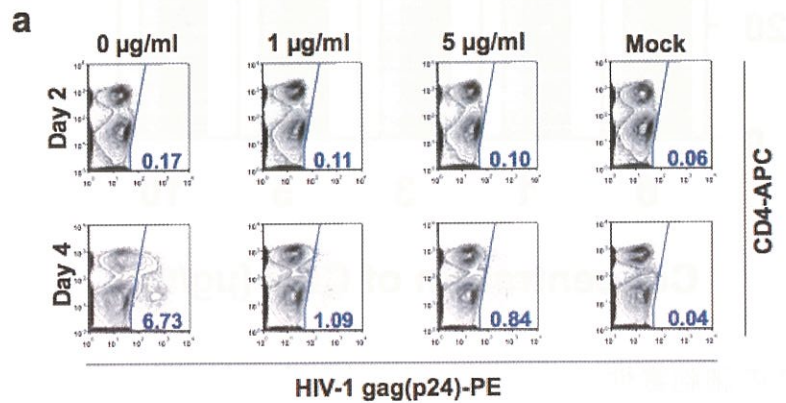


図 10. CEP による HIV-1 感染抑制効果の検討

(a) (b) PHA-blast 細胞に最終濃度 0-5 μ g/ml になるように CEP を前処理し 1 時間培養後、HIV-1_{NL4-3} に 2 時間感染させた。感染後 2 日・4 日後にフローサイトメトリー解析を行った。(c) 培養上清中のウイルス量は p24 ELISA にて定量した。結果は平均 \pm 標準偏差で算出した。* P <0.001

Figure 10 shows the results of the investigation into the inhibitory effect of CEP on HIV-1 infection. The figure is divided into three parts: (a) Flow cytometry analysis of PHA-blast cells at 2 days and 4 days post-infection, showing a decrease in CD4+ T cells in the CEP-treated group compared to the control. (b) Flow cytometry analysis of PHA-blast cells at 2 days and 4 days post-infection, showing a decrease in CD4+ T cells in the CEP-treated group compared to the control. (c) Bar graph showing the quantification of p24 in the culture supernatant, demonstrating a significant reduction in viral load in the CEP-treated group compared to the control.



Figure 10(c) shows the results of the p24 ELISA analysis. The p24 concentration in the culture supernatant is significantly lower in the CEP-treated group compared to the control group at both 2 days and 4 days post-infection. The significance is indicated by an asterisk (*), representing P <0.001.

7-1-3) CEPの合胞体 (Syncytium) 形成抑制効果

CEPによる合胞体形成の阻害効果を検討した。TZM-bl 細胞に最終濃度0, 1, 3, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ になるようにCEPを処理し、CO₂インキュベーターの中で1時間培養した。その後、等量の293T細胞にEnv-ires-GFPプラスミドを遺伝子導入した293T-Env-ires-GFP細胞と共培養し24穴マイクロプレートに播種し、48時間後、Biozeroにより蛍光顕微鏡観察を行った。

CEPは濃度依存的に合胞体形成を阻害した(図 11a)。また、合胞体形成細胞数をカウントしたところ、有意な合胞体形成阻害効果が見られた ($P < 0.001$) (図 11b)。

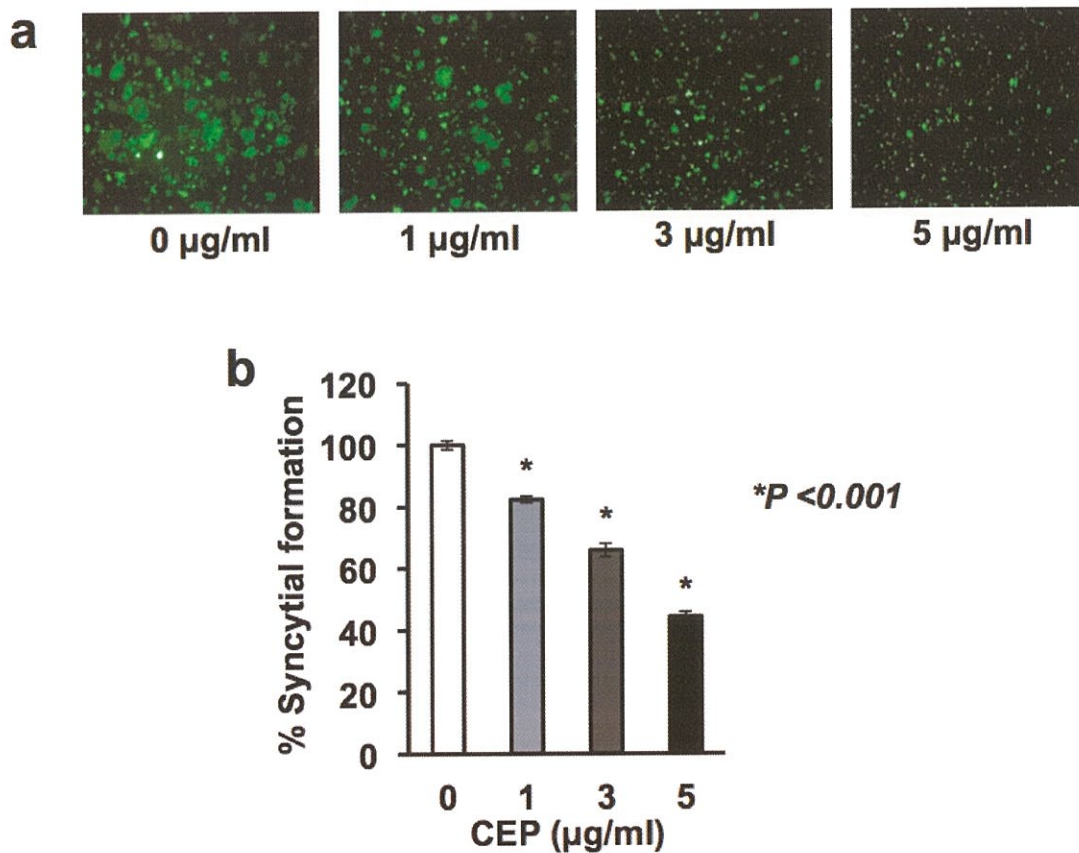


図11. CEPによる合胞体形成阻害効果の検討

(a) 293T Env-GFP細胞とTZM-bl細胞を共培養し、48時間後に蛍光顕微鏡観察を行った。(b) 合胞体形成細胞をカウントして定量した。結果は平均 \pm 標準偏差で算出した。* $P < 0.001$

7-1-4) CEPの膜融合抑制効果

CEPの細胞膜融合に対する抑制効果を検討した。PBS洗浄によりテトラサイクリンを除去し、3日間培養したT細胞株 (Jurkat_{HXBc2}、Jurkat_{522F/Y}) をPKH 67 Green Fluorescent Cell Linker Kit を用いて染色し、対照となるT細胞 (MOLT4) をPKH 26 Red Fluorescent Cell Linker Kit を用いて染色した。MOLT4細胞を染色後、最終濃度0, 1, 3, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ になるようにCEPを処理し、CO₂インキュベーターの中で1時間培養した後、等量の両細胞を共培養し24穴マイクロプレートに播種した。24時間後、細胞を回収しLSR-II flow cytometerで解析し48時間後、Biozeroにより蛍光顕微鏡観察を行った。

ここでもCEPは濃度依存的に膜融合を抑制した (図 12a, c) 。また、統計学的にも有意な膜融合抑制効果が見られた ($P < 0.001$) (図 12b) 。

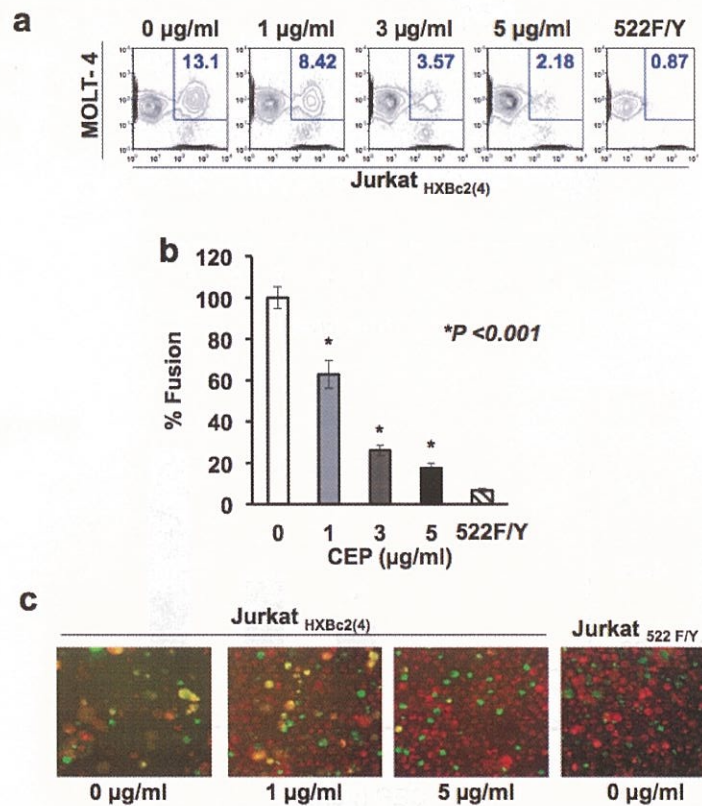


図 12. CEP の Env 依存性細胞融合抑制効果の検討

(a) (b) 細胞融合は24時間後にフローサイトメトリー解析にて定量した。(c) 48時間後に蛍光顕微鏡観察を行った(x 800)。結果は平均 \pm 標準偏差で算出した。* $P < 0.001$

7-1-5) CEPの膜流動性低下作用

CEPによる細胞膜流動性の変化を測定した。T細胞株 (MOLT4細胞) をDPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene) で染色後、最終濃度0, 10 $\mu\text{g/ml}$ になるように CEPを処理した。処理直後から10分後までの細胞膜流動性の変化をF4500 分光蛍光光度計を用いて測定した。

CEPは細胞膜の流動性を低下させた (図 13)。

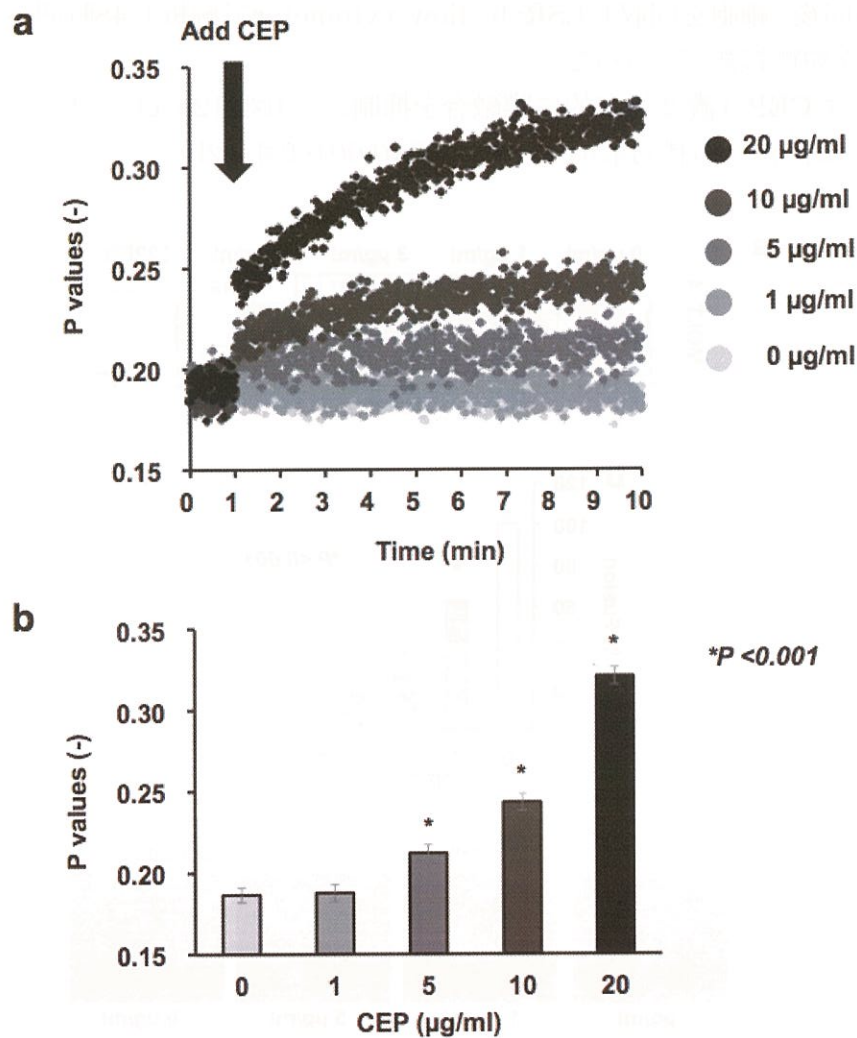


図 13. CEP の細胞膜流動性抑制効果の検討

(a) MOLT4細胞をDPHで染色し最終濃度0-20 $\mu\text{g/ml}$ になるようにCEPを処理した。細胞膜流動性は偏光蛍光解消法にて測定した。(b) CEP処理後9-10分間のP値を測定した。結果は平均 \pm 標準偏差で算出した。 $*P < 0.001$

7-2) 新規ナノ粒子 Hybrid liposome の HIV-1 感染症に与える影響

7-2-1) HLによる細胞毒性の検討

まず、MTT法により、HLのPBMC、CBMC、MOLT4、TZM-bl、HUT78に対する細胞毒性を検討し、0-100 μM の範囲では顕著な細胞増殖抑制効果は確認されなかった(図 14)。

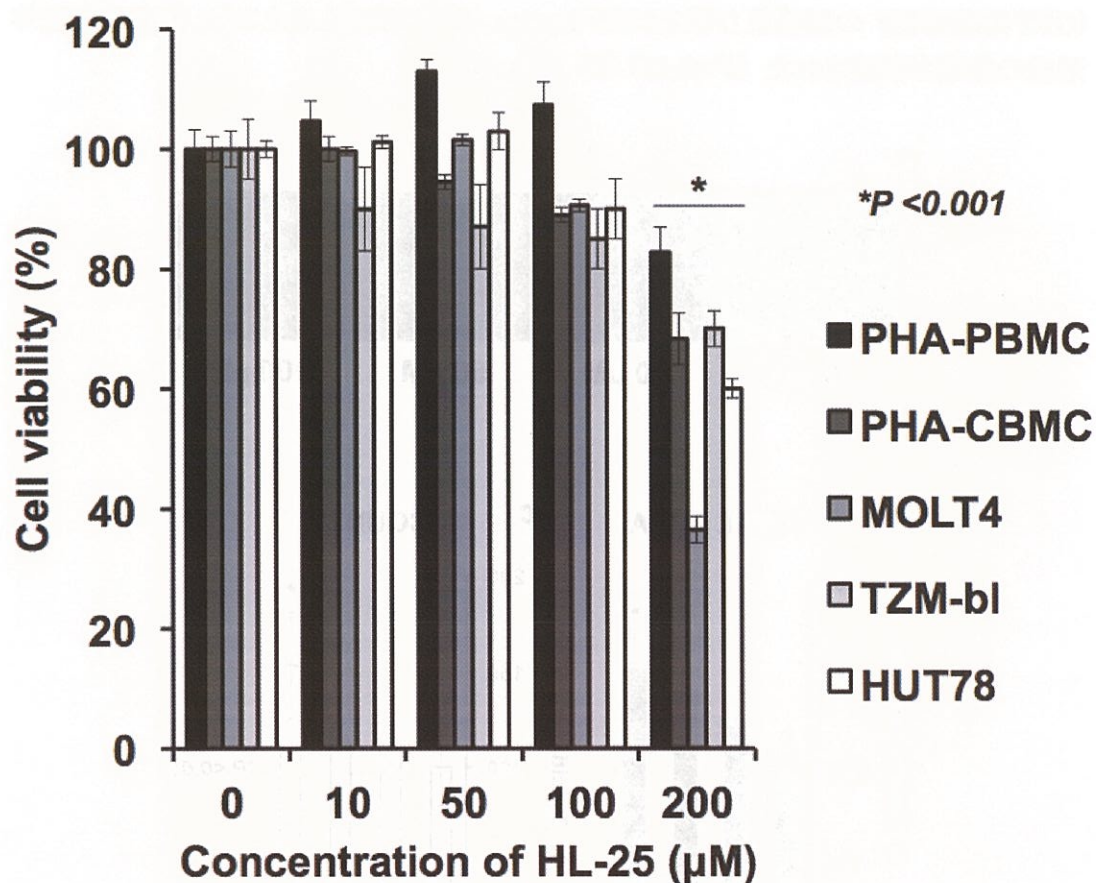


図 14. HL の細胞毒性

HL の細胞増殖に与える影響を MTT 法で確認した。PBMC または CBMC 由来の PHA-blast 細胞、TZM-bl 細胞、MOLT-4 細胞、HUT78 細胞は HL 処理後 1 時間で洗浄し、24 時間培養した。結果は平均 \pm 標準偏差で算出した。

* $P < 0.001$

7-2-2) HLの合胞体 (Syncytium) 形成促進効果

HLの合胞体形成に対する効果を検討した。TZM-bl 細胞に最終濃度0, 1, 3, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ になるようにCEPを処理し、 CO_2 インキュベーターの中で1時間培養した。その後、等量の293T細胞にEnv-ires-GFPプラスミドを遺伝子導入した293T-Env-ires-GFP細胞と共培養し24穴マイクロプレートに播種し、48時間後、Biozeroにより蛍光顕微鏡観察を行った。

HLは濃度依存的に合胞体形成を促進した(図 15a)。また、合胞体形成細胞数(GFP発現細胞)の面積及び数をNIH Image Jにより定量したところ、有意な合胞体形成の促進が観察された ($P<0.05$) (図 15b, c)。

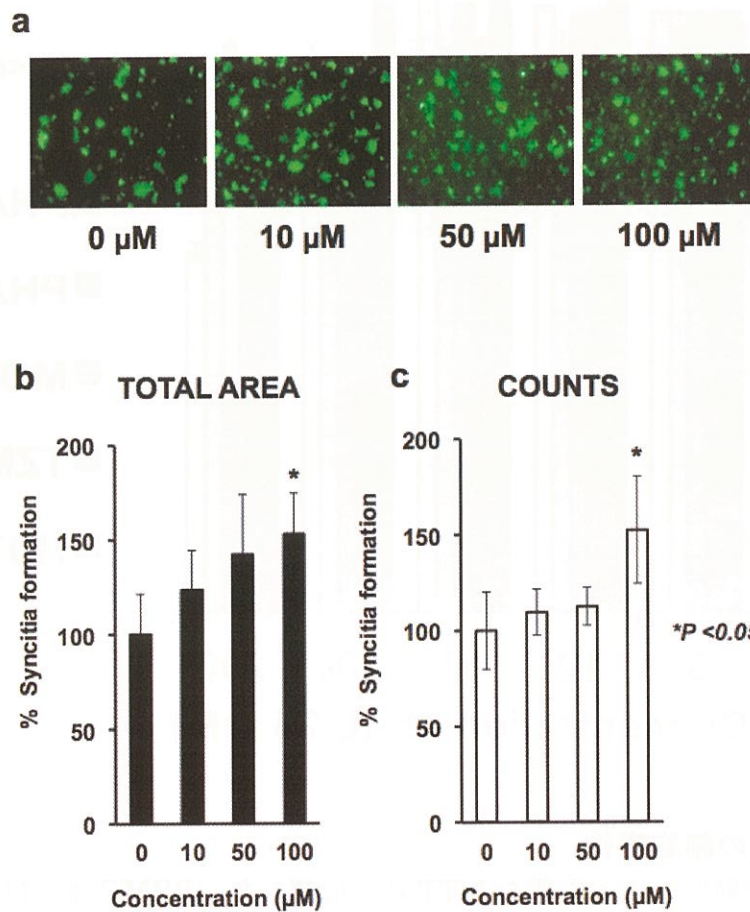


図 15. HLの合胞体形成促進効果の検討 (a) 293T *Env*-GFP細胞とTZM-bl 細胞を共培養し、48時間後に蛍光顕微鏡観察を行った (x 800)。 (b) (c) 合胞体形成細胞の面積及び数をカウントして定量した。結果は平均 \pm 標準偏差で算出した。* $P<0.05$

7-2-3) HLの膜融合促進効果

HLの細胞膜融合に対する効果を検討した。PBS洗浄によりテトラサイクリンを除去し、3日間培養したT細胞株 (Jurkat_{HXBc2}、Jurkat_{522F/Y}) をPKH 67 Green Fluorescent Cell Linker Kit を用いて染色し、対照となるT細胞 (MOLT4) をPKH 26 Red Fluorescent Cell Linker Kit を用いて染色した。MOLT4細胞を染色後、最終濃度0, 50, 100 μM になるようにHLを処理し、CO₂インキュベーターの中で1時間培養した後、等量の両細胞を共培養し24穴マイクロプレートに播種した。24時間後、細胞を回収しLSR-II flow cytometerで解析し48時間後、Biozeroにより蛍光顕微鏡観察を行った。

ここでもHLは濃度依存的に膜融合を促進した (図 16a, b)。また、統計学的にも有意な膜融合促進効果が見られた ($P < 0.01$) (図 16c)。

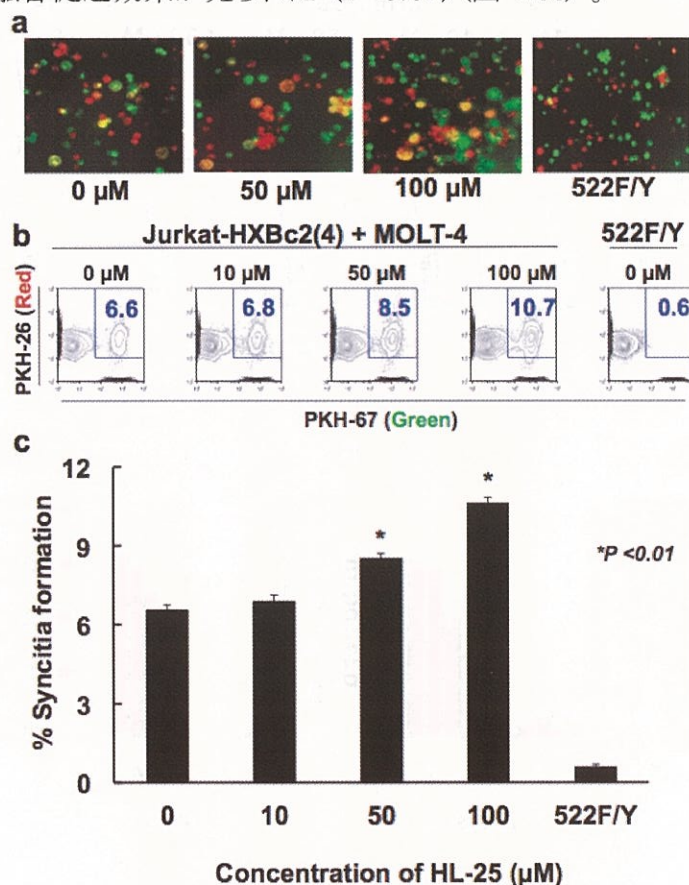


図 16. HL の Env 依存性細胞融合促進効果の検討

(a) 48時間後に蛍光顕微鏡観察を行った (x 800)。 (b) (c) 細胞融合は24時間後にフローサイトメトリー解析にて定量した。結果は平均 \pm 標準偏差で算出した。

* $P < 0.01$

7-2-4) HLのHIV-1感染促進効果

次に、HL存在下でのHIV-1感染実験を行った。まず、T細胞株HUT78に最終濃度0, 10, 50, 100 μM になるようにHLを処理し、37°Cにて1 時間培養後、37°Cにて2 時間、HIV-1_{NL4-3} に感染させ、PBSで洗浄した後、再び37°Cで培養した。

感染後2,4日目にHIV-1 gag蛋白であるp24とHIV-1の受容体であるCD4をLSR-II flow cytometerにて解析した。また、培養上清中のHIV-1 p24 抗原量をRETRO-TEK HIV-1 p24 Antigen ELISAにて定量した。

感染後4日目において、コントロール細胞と比較してp24陽性細胞の割合の増加と顕著なウイルス複製が認められ、HIV-1の感染促進が確認された ($P < 0.01$) (図 17a, b, c)。

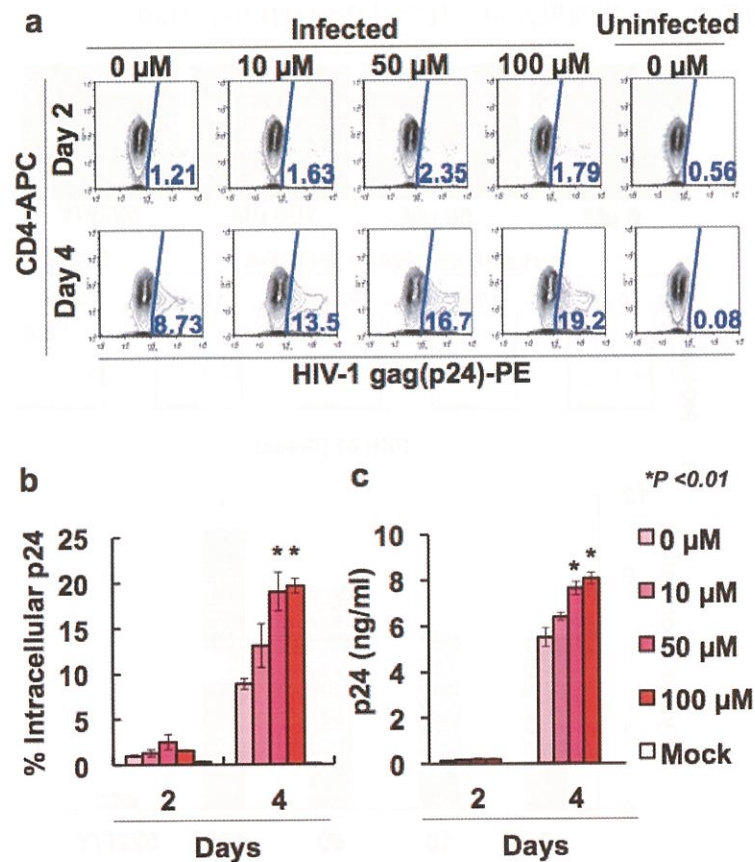


図 17. HL による HIV-1 感染促進効果の検討

(a) (b) HUT78細胞に最終濃度0-100 μM になるようにHLを前処理し1時間培養後、HIV-1_{NL4-3}に2時間感染させた。感染後2日・4日後にフローサイトメトリ解析を行った。(c) 培養上清中のウイルス量はp24 ELISAにて定量した。結果は平均 \pm 標準偏差で算出した。* $P < 0.01$

7-2-5) HLの膜流動性亢進作用

HLによる細胞膜流動性の変化を測定した。T細胞株 (MOLT4細胞) をDPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene) で染色後、最終濃度0, 10, 50, 100, 200 μM になるようにHLを処理した。処理直後から10分後までの細胞膜流動性の変化を、F4500分光蛍光光度計を用いて測定した。

HLは細胞膜の流動性を増加させた。(図 18)。

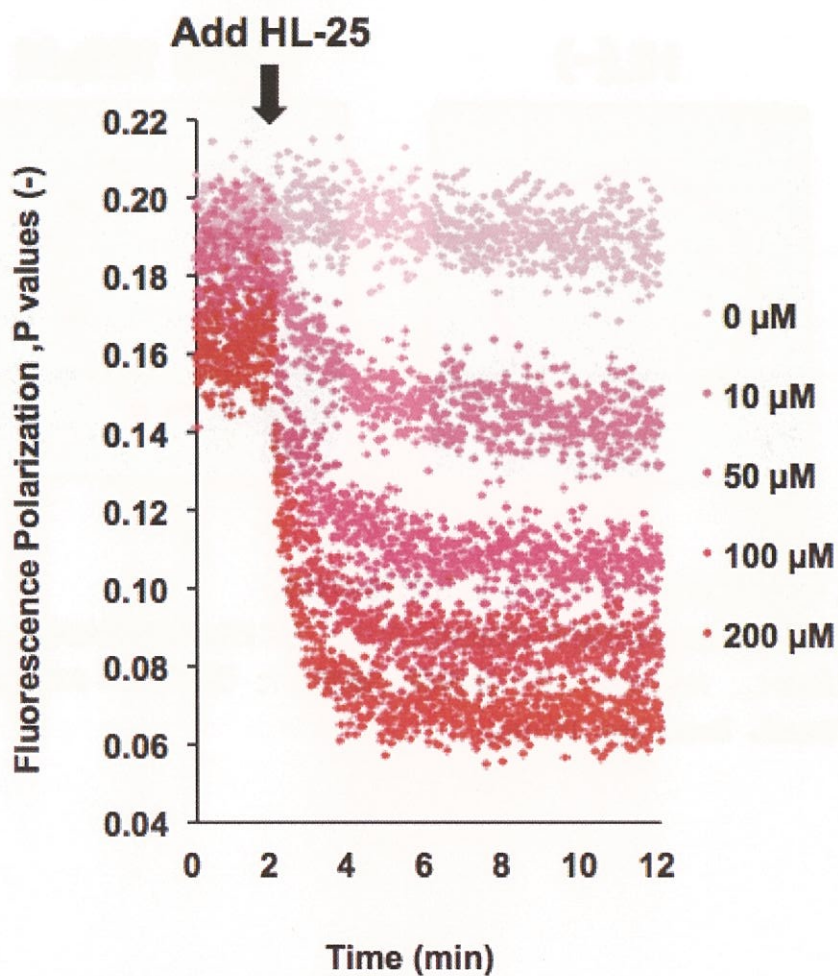


図 18. HL の細胞膜流動性亢進効果の検討

MOLT4細胞をDPHで染色し最終濃度0-200 μM になるようにHLを処理した。HL処理後10分間の細胞膜流動性は偏光蛍光解消法にて測定した。

7-2-6) HLの脂質ラフトへの影響

HLによる脂質ラフトの構造変化を観察した。T細胞株 (MOLT4細胞) をCTB (Cholera toxin subunit B) で染色後、最終濃度0, 100 μM になるようにHLを処理した。10分後に共焦点レーザー顕微鏡 (Leica, TCS-SP) を用いて観察した。

HLは細胞膜の脂質ラフトのクラスター形成を促進した。(図 19)。

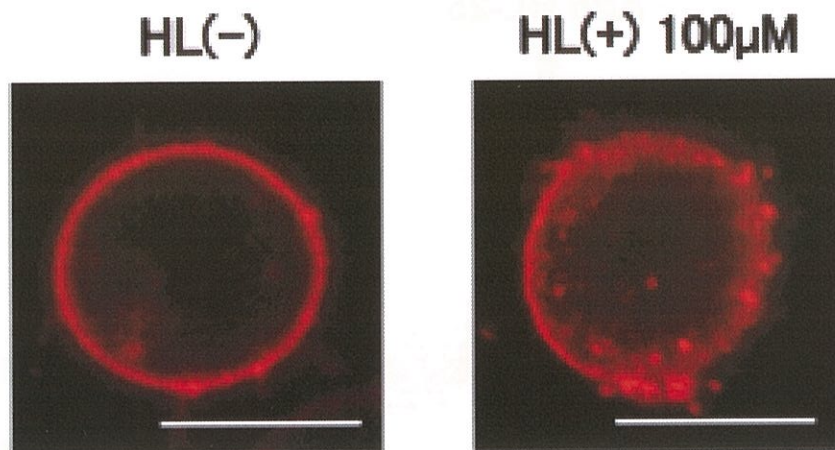


図 19. HL の脂質ラフトに与える影響の検討

(A) MOLT4細胞を最終濃度100 μM になるようにHLを1時間処理した。洗浄後、CTBで染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した (EX/EM = 633 nm/650-670nm)。Scale bar: 10 μm 。

7-3) 三環系クマリン化合物 GUT-70 の抗 HIV-1 効果

7-3-1) GUT-70による細胞膜流動性低下作用

GUT-70による細胞膜流動性の変化を測定した。T細胞株 (MOLT4細胞及びPM1-CCR5細胞) をDPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene) で染色後、最終濃度0, 10, 50, 100 μM になるようにGUT-70を処理した。処理直後から5分後までの細胞膜流動性の変化を、F4500分光蛍光光度計を用いて測定した。GUT-70は濃度依存的に細胞膜の流動性を低下させた。(図 20)。

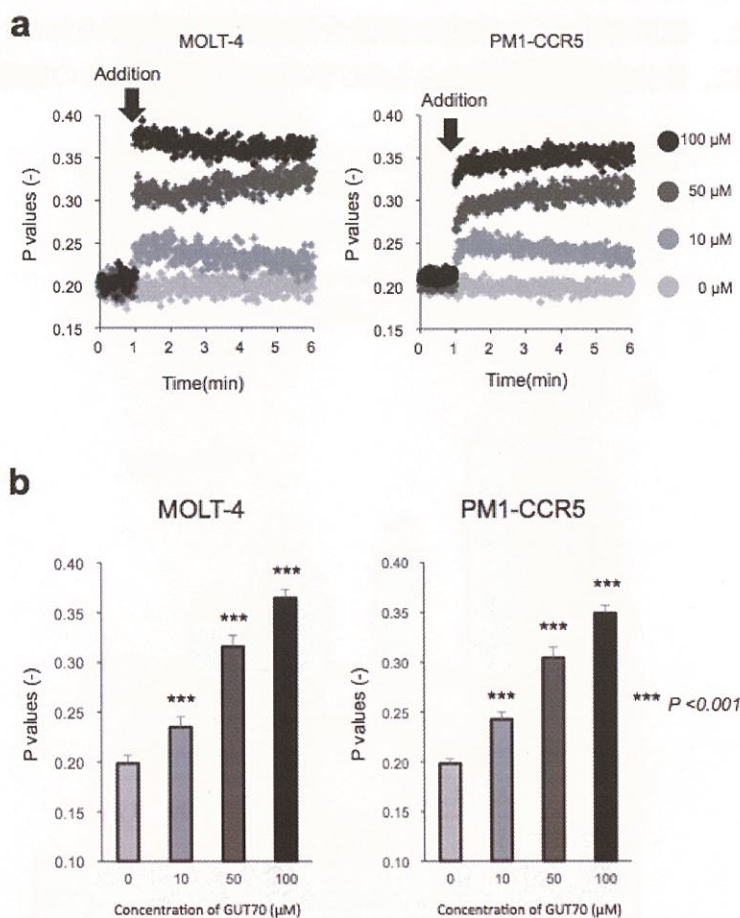


図 20. GUT-70 の細胞膜流動性抑制効果の検討。

(a) MOLT4細胞及びPM1-CCR5細胞をDPHで染色し最終濃度0-100 μM になるようにGUT-70を処理した。細胞膜流動性は偏光蛍光解消法にて測定した。(b) GUT-70処理後4-5分間のP値を測定した。結果は平均 \pm 標準偏差で算出した。

*** $P < 0.001$

7-3-2) GUT-70の膜融合抑制効果

GUT-70の細胞膜融合に対する効果を検討した。PBS洗浄によりテトラサイクリンを除去し、3日間培養したT細胞株 (Jurkat_{HXBc2}、Jurkat_{522FY}) をPKH 67 Green Fluorescent Cell Linker Kit を用いて染色し、対照となるT細胞 (MOLT4) をPKH 26 Red Fluorescent Cell Linker Kit を用いて染色した。MOLT4細胞を染色後、最終濃度0, 5, 7.5, 10 μM になるようにGUT-70を処理し、CO₂インキュベーターの中で1時間培養した後、等量の両細胞を共培養し24穴マイクロプレートに播種した。24時間後、細胞を回収しLSR-II flow cytometerで解析し48時間後、Biozeroにより蛍光顕微鏡観察を行った。GUT-70は濃度依存的に膜融合を抑制した (図 21a)。また、統計学的にも有意な膜融合抑制効果が観察された ($P < 0.001$) (図 21b)。さらに、蛍光顕微鏡観察からもGUT-70の細胞膜融合の抑制が観察された (図 21c)。

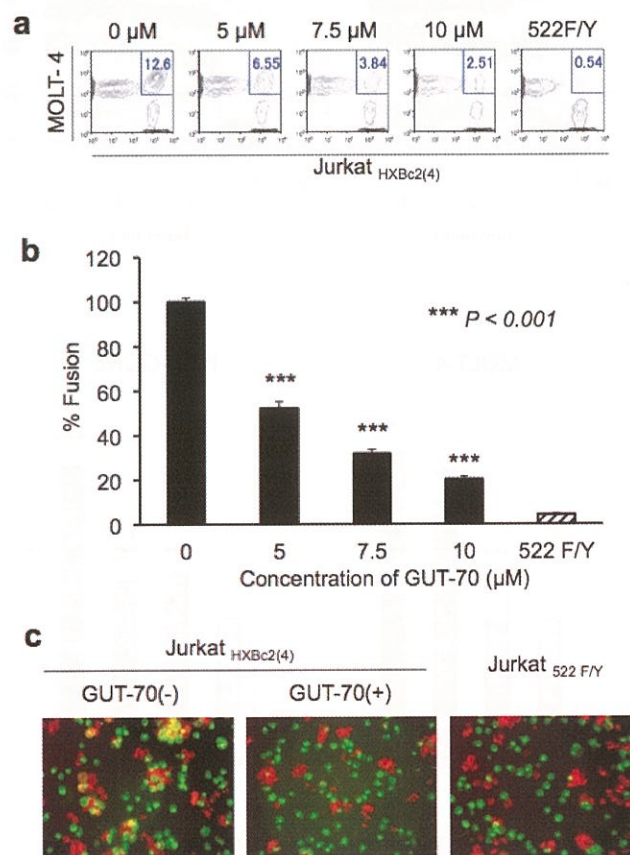


図 21. GUT-70 の Env 依存性細胞融合抑制効果の検討

(a) (b) 細胞融合は24時間後にフローサイトメトリー解析にて定量した。(c) 48時間後に蛍光顕微鏡観察を行った(x 800)。結果は平均 \pm 標準偏差で算出した。

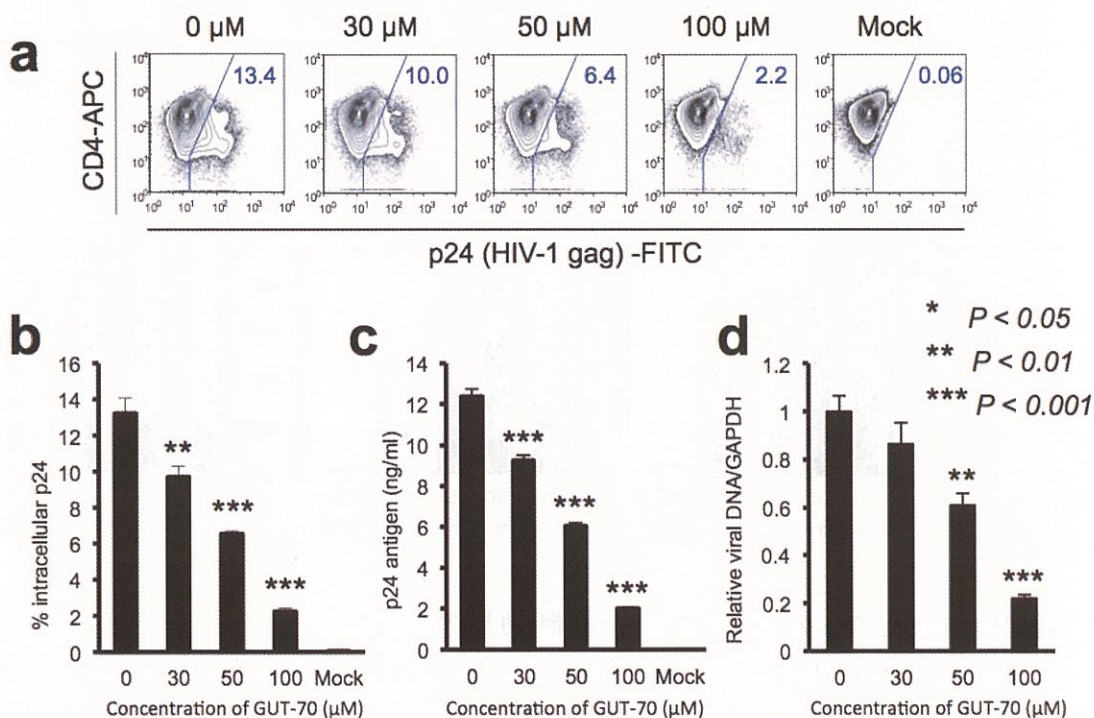
*** $P < 0.001$

7-3-3) GUT-70のHIV-1感染抑制効果

次に、GUT-70存在下でのHIV-1感染実験を行った。まず、T細胞株PM1-CCR5に最終濃度0, 30, 50, 100 μM になるようにGUT-70を処理し、37°Cにて1 時間培養後、37°Cにて2 時間、HIV-1_{NL4-3} に感染させ、PBSで洗浄した後、再び37°Cで培養した。

感染後2日目にHIV-1 gag蛋白であるp24とHIV-1の受容体であるCD4をLSR-II flow cytometerにて解析した。また、培養上清中のHIV-1 p24 抗原量をRETRO-TEK HIV-1 p24 Antigen ELISAにて定量した。コントロール細胞と比較してp24陽性細胞の割合の減少と顕著なウイルス複製の抑制が認められ、HIV-1感染の抑制が確認された ($P < 0.001$) (図 22a, b, c)。

また、宿主細胞に組み込まれた相対的ウイルスDNA量をq-PCRにより定量したところ、統計学的にも有意なGUT-70によるHIV-1感染抑制が確認された。 ($P < 0.001$) (図 22d)。



さらに、R5ウイルスであるHIV-1_{JR-FL}株を用いたGUT-70存在下でのHIV-1感染実験を行った。T細胞株PM1-CCR5に最終濃度0, 30, 50, 100 μM になるようにGUT-70を処理し、37°Cにて1時間培養後、37°Cにて2時間、HIV-1_{JR-FL}に感染させ、PBSで洗浄した後、再び37°Cで培養した。

感染後2日目にHIV-1 gag蛋白であるp24とHIV-1の受容体であるCD4をLSR-II flow cytometerにて解析した。また、培養上清中のHIV-1 p24抗原量をRETRO-TEK HIV-1 p24 Antigen ELISAにて定量した。X4ウイルス株を用いた実験と同様に、コントロール細胞と比較してp24陽性細胞の割合の減少と顕著なウイルス複製の抑制が認められ、HIV-1感染の抑制が確認された ($P < 0.001$) (図 22e, f, g)。

また、宿主細胞に組み込まれた相対的ウイルスDNA量をq-PCRにより定量したところ、有意なGUT-70によるHIV-1感染抑制が確認された。 ($P < 0.001$) (図 22h)。

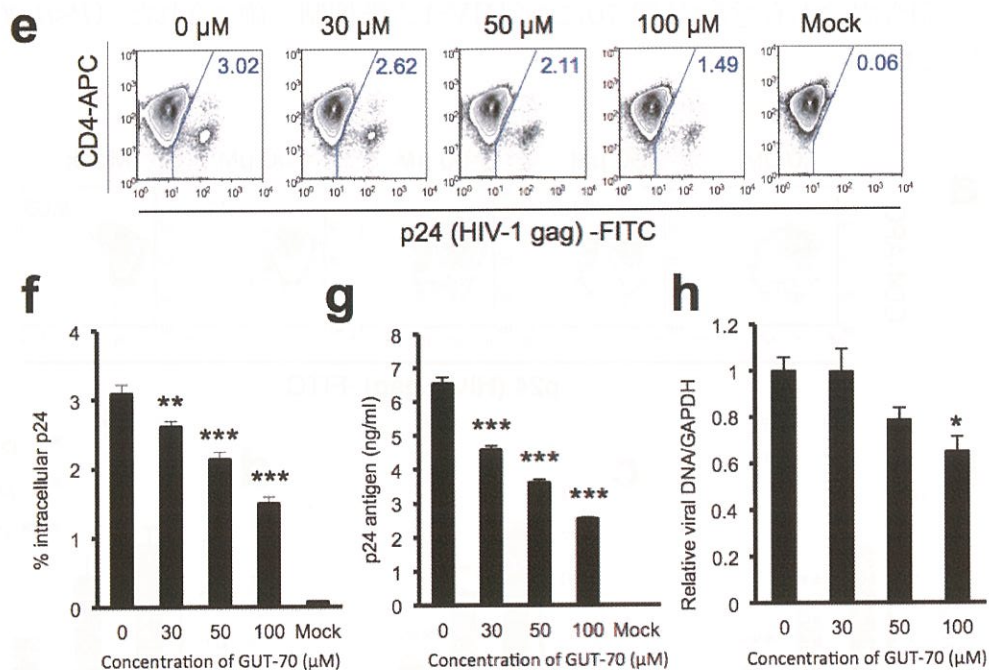


図 22. GUT-70 の HIV-1 感染抑制効果の検討

(A) (B) GUT-70 を 1 時間前処理した PM1-CCR5 細胞を HIV-1_{NL-43} に感染させ 48 時間後にフローサイトメトリー解析を行った。(C) 培養上清中のウイルス量は p24 ELISA にて定量した。(D) Integrated HIV DNA は Q-PCR 法で定量した。(E) (F) GUT-70 を 1 時間前処理した PM1-CCR5 細胞を HIV-1_{JR-FL} に感染させ 48 時間後にフローサイトメトリー解析を行った。(G) 培養上清中のウイルス量は p24 ELISA にて定量した。(H) Integrated HIV DNA は Q-PCR 法で定量した。結果は平均 \pm 標準偏差で算出した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$

7-3-4) GUT-70によるHIV-1細胞内侵入阻害効果の検討

次に、GUT-70のHIV-1細胞内侵入阻害効果を検討した。まず、T細胞株PM1-CCR5に最終濃度0, 10, 50, 100 μM になるようにGUT-70を処理し、37°Cにて10分間培養後、37°Cにて1時間、HIV-1_{NL4-3}またはHIV-1_{JR-FL}に感染させ、PBSで洗浄した後、細胞のタンパク質を回収し、HIV-1の短時間暴露により細胞内に侵入したウイルスタンパク質p24をRETRO-TEK HIV-1 p24 Antigen ELISAにて定量した。コントロール細胞と比較して細胞内に侵入したHIV-1のウイルスタンパクp24の顕著な減少が認められ、HIV-1侵入抑制効果が確認された ($P < 0.001$) (図 23a, b)。

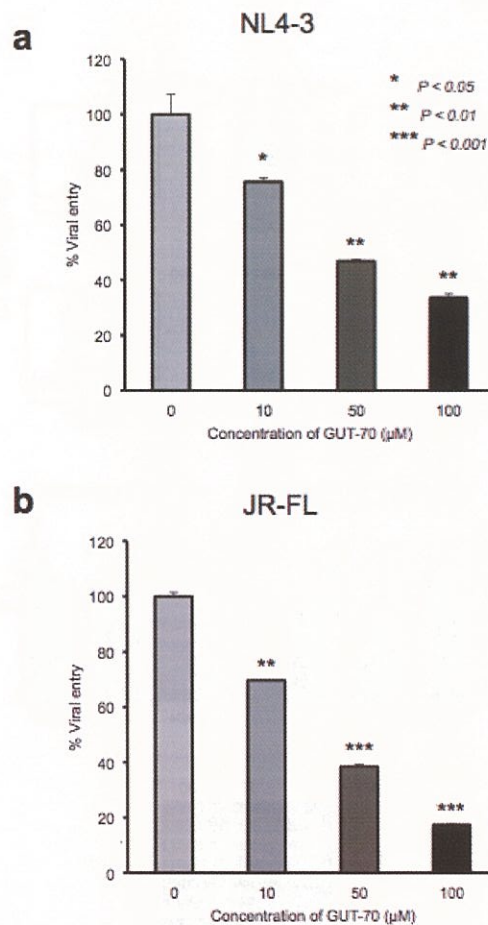


図 23. GUT-70 の HIV-1 細胞内侵入抑制効果の検討

(a) (b) PM1-CCR5 細胞に最終濃度 0-100 μM になるように GUT-70 を 10 分間前処理し、HIV-1_{NL4-3} または HIV-1_{JR-FL} に 1 時間感染させ、タンパク抽出処理を行った。タンパク溶液中のウイルス抗原を p24 ELISA で定量した。結果は平均 \pm 標準偏差で算出した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$

7-3-5) GUT-70による宿主細胞受容体の発現低下作用

最後に、GUT-70の宿主細胞受容体に与える影響を検討した。まず、T細胞株 PM1-CCR5に最終濃度0, 50, 100 μM になるようにGUT-70を処理し、37°Cにて1時間培養した。細胞表面に発現するHIV-1の受容体 (CD4, CXCR4, CCR5) をLSR-II flow cytometerにて解析した。細胞内に存在する受容体タンパクの発現は、細胞内染色法によりLSR-II flow cytometerにて解析した。GUT-70は細胞表面の受容体の発現のみを低下させることが確認された (図 24a, b)。さらにSemi quantitative PCR法によりこれらの受容体のmRNAの発現レベルを確認したところ、顕著な差は確認されなかった (図 24c)。

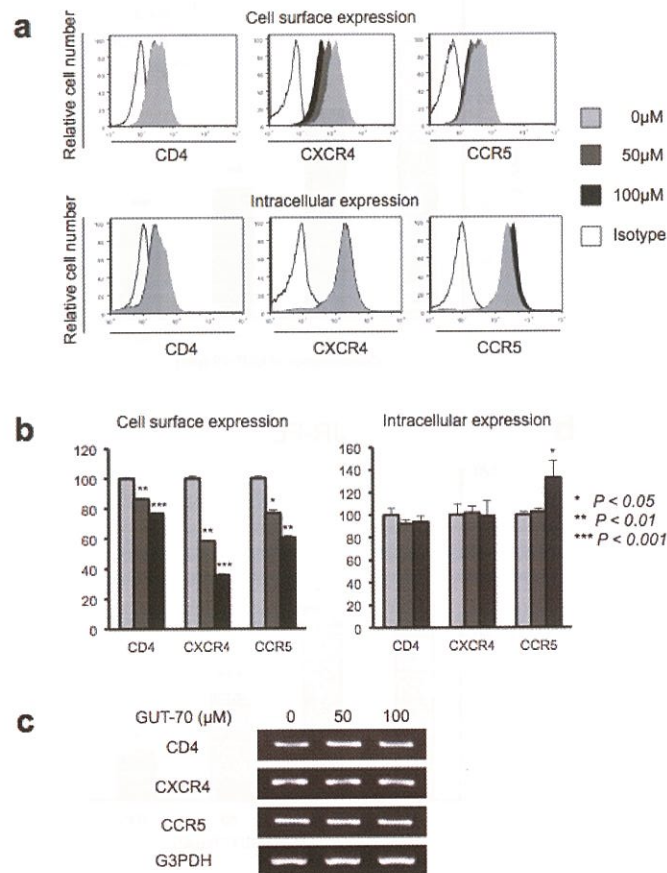


図 24. GUT-70 による宿主細胞受容体の発現低下作用

(A) (B) PM1-CCR5 細胞に GUT-70 を 1 時間処理し、CD4・CXCR4・CCR5 の細胞表面及び細胞内における発現をフローサイトメトリーで解析した。結果は平均 \pm 標準偏差で算出した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ (C) Semi quantitative PCR 法により各受容体の mRNA の発現レベルを確認した。

8 考察

HIV-1は1981年カリニ肺炎を伴う免疫不全患者の報告に始まり、1983年にAIDSの原因であるウイルス、HIV-1が発見された。1987年には満屋博士らにより世界で最初の治療薬であるAZTが作られたが[38-40]、AZT単剤での治療では、薬剤耐性ウイルスの出現が問題であった。その後、1996年にHAARTという治療法がHIV-1感染症治療に導入され、先進諸国ではAIDSによる死亡率が顕著に低下し、患者の予後は飛躍的に改善された[41]。HAARTとは、複数の抗HIV-1薬を患者それぞれの症状・体質に合わせ組み合わせ投与し、ウイルスの増殖を抑えAIDSの発症を防ぐ治療法のことである。HIV-1は突然変異を起こしやすく、単一の薬剤の使用では薬剤耐性ウイルスを誘導してしまう。耐性変異はそれぞれ全く異なる場所に生じるため、核酸系逆転写酵素阻害剤、非核酸系逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、インテグラーゼ阻害剤の4種類の薬剤を組み合わせ使用されているが、未だ薬剤耐性ウイルスによる問題は続いている。また、ウイルス侵入阻害薬として、HIV-1エンベロープのgp41を標的としたT-20 (Enfuvirtide)が開発されたが、本邦では未だ臨床応用されていない。本邦では、ケモカインレセプターであるCCR5を標的としたマラビロクが唯一、ウイルス侵入阻害薬として2008年に認可されているが、さらなる抗HIV-1薬の開発が期待されている。本研究では、宿主細胞膜の流動性に着目し、3つの薬剤のHIV-1感染症に対する効果を検討した。

CEPは、タマサキツヅラフジから抽出、精製されたアルカロイド製剤であり、結核の治療薬、放射線による白血球減少症[15]や円形脱毛症[16]、まむし咬傷[17]等に重篤な副作用を与えることなく効果を示すことが報告されており[18]、臨床でも用いられている。これまでに、NF- κ B経路の阻害によるHIV-1の複製を抑制することが報告されていることから、本研究では、CEPの新たな効果として、HIV-1侵入阻害効果を検討した。その結果、CEPはHIV-1感染に対して強力な阻害効果を有するだけでなく、細胞融合においても有意に融合を阻害することが本研究によって証明された。まず、CEPの細胞増殖抑制（細胞毒性）の検討を行った。PBMC及びMOLT4細胞において、CEPの短時間処理後に洗浄することで細胞毒性は認められないことが明らかになった(図9A,B)。次に、PBMC、CBMC、MOLT4、TZM-bl細胞においても同様に洗浄することにより、顕著な細胞増殖抑制（細胞毒性）は認められなかった(図9C)。これは重篤な副作用を与えることなく効果を示すという過去の報告と一致する[18]。次にCEP存在下でのHIV-1感染実験を行った。CEPは潜伏感染細胞株に対してNF- κ B経路阻害によりウイルスの複製を抑制することが報告がされているが[23]、今回はHIV-1が細胞内に進入する過程に焦点を当て、初代継代細胞である末梢血

単核球から分離し誘導した PHA-blast 細胞を用いた。PHA-blast 細胞を用いた HIV-1 感染実験はより生理的な実験モデルではあるが、感染効率や細胞の増殖が末梢血ドナーによって異なるため、個体差があるものの、flow cytometry と p24 ELISA にて解析した結果、感染後 4 日目において、CEP による HIV-1 感染阻害作用が見られた(図 10A,B,C)。ここで、さらに HIV-1 侵入過程に焦点を当てるために、HIV-1 感染時に見られる細胞融合に注目した。HIV-1 感染細胞は非感染細胞と細胞融合/合胞体形成を起こし、HIV-1 感染の拡大を促す[42]。これが HIV-1 感染後に起こる CD4 陽性細胞の減少の引き金となり、AIDS 発症へと導く[43]。本研究において CEP は合胞体形成/細胞融合を抑制することが明らかになったが(図 11, 12)、これは HIV-1 感染の予防につながり、また、重篤な副作用が少なく臨床でも安全に使用できる可能性を示唆している。CEP のウイルス侵入阻害メカニズムの一つとして、細胞膜安定化作用が挙げられる。そこで、蛍光偏光解消法により細胞膜流動性を測定したところ、CEP は濃度依存的に細胞膜の流動性を低下させることが明らかになった(図 13)。従って、CEP は細胞膜の流動性を低下させ、細胞膜を安定化させることで HIV-1 の侵入を抑制することが示唆された。

HLはこれまでに各種ガン細胞に対してアポトーシスによる細胞死を誘導することが報告されている新規ナノ製剤である[24]。本研究では、HLが細胞膜の流動性を増加させることが報告されていることから、HIV-1感染に対する効果を検討した。まず、HLの細胞毒性を検討した。HLは0-100 μ Mまでは細胞増殖に影響を与えないことが明らかになったことから(図 14)、最大濃度を100 μ Mとして以下の実験を行った。HLは合胞体形成/細胞融合(図 15, 16)を促進し、HIV-1感染も促進することが明らかになった(図 17)。また、細胞膜流動性を測定したところ、HLは濃度依存的に細胞膜流動性を増加させることが明らかになった(図 18)。さらに、脂質ラフトをCTBにて染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ、HL処理により細胞膜近傍での脂質ラフトの凝集が認められた(図 19)。脂質ラフトは細胞膜上で筏の様に存在し、その上には HIV-1感染に必須であるCD4、CXCR4、CCR5を含む多くの受容体が発現していることが報告されている[7]。従って、HLは脂質ラフトの凝集及び細胞膜流動性亢進によりHIV-1の細胞内侵入を促進することが示唆された。

GUT-70 はこれまでに白血病細胞及びリンパ腫において p53 非依存的な抗腫瘍効果を示すこと[34]、薬剤耐性に重要である P 糖タンパクによる薬剤排出を抑制することが報告されている[33]。また、HIV-1 感染細胞に対しても NF- κ B 経路の阻害により、ウイルス複製を阻害することも報告されている[35]。本研究では、GUT-70 の新たな作用として、ウイルス侵入過程に着目し、抗 HIV-1 効果を検討した。まず、GUT-70 の細胞膜流動性に与える影響を検討した。GUT-70 は濃度依存的に細胞膜流動性を低下させることが明らかになった(図 20)。次に GUT-70 が細胞融合及び HIV-1 感染に与える影響を検討した。GUT-70 は濃度

依存的に細胞融合を抑制し (図 21)、HIV-1 感染も抑制することが明らかになった(図 22)。さらにウイルスの細胞内侵入過程に着目するために、Entry assay を行った。これは短時間の HIV-1 暴露により、宿主細胞内に侵入した HIV-1 のタンパク質を回収し、ELISA にて HIV-1 の p24 を検出するというシステムである[44, 45]。GUT-70 は統計学的にも有意に X4 指向性及び R5 指向性 HIV-1 の細胞内侵入を抑制することが確認された(図 23)。さらに、GUT-70 処理により、宿主細胞膜表面に存在する HIV-1 感染に必須な受容体の発現が抑制され、これらの受容体の mRNA レベルでは発現に顕著な差は確認されなかった(図 24)。細胞膜流動性低下は脂質ラフトの局在を変化させることが報告されている[46]。HIV-1 の侵入に必須である受容体は脂質ラフト上に局在しており、脂質ラフトは宿主細胞膜上の CD4 と HIV-1 のエンベロープタンパクの膜融合の過程に重要であることから[47]、脂質ラフトの局在の変化がウイルス侵入阻害に寄与した可能性がある。GUT-70 は細胞膜流動性を低下させることで、CD4、CXCR4、CCR5 の細胞表面発現を減少させ、HIV-1 と細胞の接触を抑えることにより、ウイルス侵入阻害効果を持つことが示唆された。さらに GUT-70 は NF- κ B 経路を阻害し抗腫瘍効果も持つことから、HIV-1 感染初期にはウイルス侵入抑制効果及びウイルス複製阻害効果を有し、AIDS 発症期にも抗腫瘍効果を発揮するという、3つの効果を併せ持つ極めて有用な薬剤であることが示唆された。

これらの3つの薬剤による HIV-1 感染に対する効果をまとめると、細胞膜流動性を低下させる CEP 及び GUT-70 は顕著に HIV-1 の細胞内侵入を抑制し、細胞膜流動性を増加させる HL は HIV-1 の細胞内侵入を促すことが示唆された。これは、宿主細胞膜を標的とした新たな治療アプローチの可能性を示し、ウイルス側を標的とした既存の抗 HIV-1 薬による薬剤耐性ウイルスの出現という問題を克服する。

9 結語

本研究では、細胞膜の流動性を制御することによりHIV-1感染を阻害することを明らかにした。本研究のターゲットであるHIV-1の侵入過程はHIV-1感染を予防するとともに、合胞体形成（感染細胞から非感染細胞への感染）も予防できるという2つの利点を兼ね備えている。合胞体形成細胞は単体細胞よりも約100倍ウイルス産生が盛んであり、AIDS発症を促進させる。また、本研究はウイルス側を標的とした既存の抗HIV-1療法とは異なり、宿主細胞膜を標的とした新たな治療アプローチによりこれまでの課題であった薬剤耐性ウイルスの出現という問題を克服する可能性を示す。

近年、HIV-1侵入阻害薬が注目を浴びているが、細胞膜はウイルス感染防御における重要な標的であることが示唆された。今後、HIV-1感染の予防や治療法として応用につなげたい。

10 参考文献

1. Stevenson M. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* 2003,**9**:853-860.
2. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 1999,**17**:657-700.
3. Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J Exp Med* 1997,**185**:621-628.
4. Littman DR. Chemokine receptors: keys to AIDS pathogenesis? *Cell* 1998,**93**:677-680.
5. Douek DC, Picker LJ, Koup RA. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* 2003,**21**:265-304.
6. Harder T, Scheiffele P, Verkade P, Simons K. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* 1998,**141**:929-942.
7. Popik W, Alce TM, Au WC. Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J Virol* 2002,**76**:4709-4722.
8. Komizu Y, Nakata S, Goto K, Matsumoto Y, Ueoka R. Clustering of Lipid Rafts in Plasma Membranes by Hybrid Liposomes for Leukemia Cells along with Apoptosis. *Chemistry Letters* 2010,**39**:1291-1293.
9. Harada S. The broad anti-viral agent glycyrrhizin directly modulates the fluidity of plasma membrane and HIV-1 envelope. *Biochem J* 2005,**392**:191-199.
10. Harada S, Yusa K, Monde K, Akaike T, Maeda Y. Influence of membrane fluidity on human immunodeficiency virus type 1 entry. *Biochem Biophys Res Commun* 2005,**329**:480-486.
11. Shiraishi N, Arima T, Aono K, Inouye B, Morimoto Y, Utsumi K. Inhibition by biscoclaurine alkaloid of lipid peroxidation in biological membranes. *Physiol Chem Phys* 1980,**12**:299-305.
12. Nagano M, Kanno T, Fujita H, Muranaka S, Fujiwara T, Utsumi K. Cepharanthine, an anti-inflammatory drug, suppresses mitochondrial membrane permeability transition. *Physiol Chem Phys Med NMR* 2003,**35**:131-143.
13. Goto M, Zeller WP, Hurley RM. Cepharanthine (biscoclaurine alkaloid) treatment in endotoxic shock of suckling rats. *J Pharm Pharmacol* 1991,**43**:589-591.
14. Kondo Y, Imai Y, Hojo H, Hashimoto Y, Nozoe S. Selective inhibition of

- T-cell-dependent immune responses by bisbenzylisoquinoline alkaloids in vivo. *Int J Immunopharmacol* 1992,**14**:1181-1186.
15. Ohta T, Morita K. [Effect of cepharanthin on radiotherapy induced leukopenia]. *Rinsho Hoshasen* 1990,**35**:471-474.
 16. Morita K, Nakamura M, Nagamachi M, Kishi T, Miyachi Y. Seventeen cases of alopecia areata: combination of SADBE topical immunotherapy with other therapies. *J Dermatol* 2002,**29**:661-664.
 17. Kimoto T, Suemitsu K, Nakayama H, Komori E, Ohtani M, Ando S. Therapeutic experience of venomous snakebites by the Japanese viper (*Agkistrodon halys Blomhoffii*) with low dose of antivenin: report of 43 consecutive cases. *Nihon Geka Hokan* 1997,**66**:71-77.
 18. Sato T, Ohnishi ST. In vitro anti-sickling effect on cepharanthine. *Eur J Pharmacol* 1982,**83**:91-95.
 19. Kikukawa Y, Okuno Y, Tatetsu H, Nakamura M, Harada N, Ueno S, *et al.* Induction of cell cycle arrest and apoptosis in myeloma cells by cepharanthine, a biscoclaurine alkaloid. *Int J Oncol* 2008,**33**:807-814.
 20. Seubwai W, Vaeteewoottacharn K, Hiyoshi M, Suzu S, Puapairoj A, Wongkham C, *et al.* Cepharanthine exerts antitumor activity on cholangiocarcinoma by inhibiting NF-kappaB. *Cancer Sci* 2010,**101**:1590-1595.
 21. Takahashi-Makise N, Suzu S, Hiyoshi M, Ohsugi T, Katano H, Umezawa K, *et al.* Biscoclaurine alkaloid cepharanthine inhibits the growth of primary effusion lymphoma in vitro and in vivo and induces apoptosis via suppression of the NF-kappaB pathway. *Int J Cancer* 2009,**125**:1464-1472.
 22. Harada K, Ferdous T, Itashiki Y, Takii M, Mano T, Mori Y, *et al.* Cepharanthine inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human oral squamous cell carcinoma cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8. *Int J Oncol* 2009,**35**:1025-1035.
 23. Okamoto M, Ono M, Baba M. Potent inhibition of HIV type 1 replication by an antiinflammatory alkaloid, cepharanthine, in chronically infected monocytic cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998,**14**:1239-1245.
 24. Ueoka R, Matsumoto Y, Moss RA, Swarup S, Sugii A, Harada K, *et al.* Membrane Matrix for the Hydrolysis of Amino-Acid Esters with Marked Enantioselectivity. *Journal of the American Chemical Society* 1988,**110**:1588-1595.
 25. Nagami H, Matsumoto Y, Ueoka R. Induction of apoptosis by hybrid liposomes for human breast tumor cells along with activation of caspases. *Biol Pharm Bull* 2006,**29**:380-381.

26. Towata T, Komizu Y, Suzu S, Ueoka R, Okada S. Highly selective fusion and accumulation of hybrid liposomes into primary effusion lymphoma cells along with induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010,**393**:445-448.
27. Towata T, Komizu Y, Suzu S, Matsumoto Y, Ueoka R, Okada S. Hybrid liposomes inhibit the growth of primary effusion lymphoma in vitro and in vivo. *Leuk Res* 2010,**34**:906-911.
28. Komizu Y, Ueoka H, Goto K, Ueoka R. Remarkable inhibitory effects of hybrid liposomes on growth of human colon cancer cells through induction of cell cycle arrest along with apoptosis. *Int J Nanomedicine* 2011,**6**:1913-1920.
29. Towata T, Komizu Y, Kariya R, Suzu S, Matsumoto Y, Kobayashi N, *et al.* Hybrid liposomes inhibit the growth of cholangiocarcinoma by induction of cell cycle arrest in G1 phase. *Bioorg Med Chem Lett* 2010,**20**:3680-3682.
30. Kashman Y, Gustafson KR, Fuller RW, Cardellina JH, 2nd, McMahon JB, Currens MJ, *et al.* The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*. *J Med Chem* 1992,**35**:2735-2743.
31. Cesar GZ, Alfonso MG, Marius MM, Elizabeth EM, Angel CB, Maira HR, *et al.* Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase, toxicological and chemical profile of *Calophyllum brasiliense* extracts from Chiapas, Mexico. *Fitoterapia* 2011,**82**:1027-1034.
32. Huerta-Reyes M, Basualdo Mdel C, Abe F, Jimenez-Estrada M, Soler C, Reyes-Chilpa R. HIV-1 inhibitory compounds from *Calophyllum brasiliense* leaves. *Biol Pharm Bull* 2004,**27**:1471-1475.
33. Kimura S, Ito C, Jyoko N, Segawa H, Kuroda J, Okada M, *et al.* Inhibition of leukemic cell growth by a novel anti-cancer drug (GUT-70) from *calophyllum brasiliense* that acts by induction of apoptosis. *Int J Cancer* 2005,**113**:158-165.
34. Jin L, Tabe Y, Kimura S, Zhou Y, Kuroda J, Asou H, *et al.* Antiproliferative and proapoptotic activity of GUT-70 mediated through potent inhibition of Hsp90 in mantle cell lymphoma. *Br J Cancer* 2011,**104**:91-100.
35. Kudo E, Taura M, Matsuda K, Shimamoto M, Kariya R, Goto H, *et al.* Inhibition of HIV-1 replication by a tricyclic coumarin GUT-70 in acutely and chronically infected cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2013,**23**:606-609.
36. Huerta L, Lopez-Balderas N, Larralde C, Lamoyi E. Discriminating in vitro cell fusion from cell aggregation by flow cytometry combined with fluorescence resonance energy transfer. *J Virol Methods* 2006,**138**:17-23.
37. Rivera-Toledo E, Lopez-Balderas N, Huerta L, Lamoyi E, Larralde C. Decreased

- CD4 and wide-ranging expression of other immune receptors after HIV-envelope-mediated formation of syncytia in vitro. *Arch Virol* 2010,**155**:1205-1216.
38. Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, St Clair MH, Lehrman SN, Gallo RC, *et al.* 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985,**82**:7096-7100.
 39. Yarchoan R, Klecker RW, Weinhold KJ, Markham PD, Lyerly HK, Durack DT, *et al.* Administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine, an inhibitor of HTLV-III/LAV replication, to patients with AIDS or AIDS-related complex. *Lancet* 1986,**1**:575-580.
 40. Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, *et al.* The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* 1987,**317**:185-191.
 41. Fauci AS. The AIDS epidemic--considerations for the 21st century. *N Engl J Med* 1999,**341**:1046-1050.
 42. Perfettini JL, Castedo M, Roumier T, Andreau K, Nardacci R, Piacentini M, *et al.* Mechanisms of apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *Cell Death Differ* 2005,**12 Suppl 1**:916-923.
 43. Garg H, Joshi A, Freed EO, Blumenthal R. Site-specific mutations in HIV-1 gp41 reveal a correlation between HIV-1-mediated bystander apoptosis and fusion/hemifusion. *J Biol Chem* 2007,**282**:16899-16906.
 44. Inubushi R, Shimano R, Oshima Y, Adachi A. The potential of various HIV-1 mutants to inhibit the replication of wild-type virus. *Biochem Biophys Res Commun* 1998,**247**:349-352.
 45. von Schwedler U, Song J, Aiken C, Trono D. Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J Virol* 1993,**67**:4945-4955.
 46. Abbas W, Herbein G. Plasma membrane signaling in HIV-1 infection. *Biochim Biophys Acta* 2014,**1838**:1132-1142.
 47. Carter GC, Bernstone L, Sangani D, Bee JW, Harder T, James W. HIV entry in macrophages is dependent on intact lipid rafts. *Virology* 2009,**386**:192-202.