

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：37401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656509

研究課題名(和文) 複合脂質膜を用いるエイズ治療に関する基礎および応用研究

研究課題名(英文) Basic and applied study on AIDS-therapy using hybrid liposomes

研究代表者

上岡 龍一 (UEOKA, Ryuichi)

崇城大学・生物生命学部・客員研究員

研究者番号：70099076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：(1)エイズ関連リンパ腫のモデルマウスに対するハイブリッドリポソーム(HL)の治療実験について、肝臓重量測定、HE染色および免疫染色による組織学的解析において、肝臓でのリンパ腫の顕著な増殖抑制と延命効果が明らかとなった。(Nano Bull., 1, 120105(2012))  
(2) エイズ治療の基礎研究として、セファランチン(SEP)のHIV侵入阻害効果およびその機構をin vitroで検討したところ、SEPが細胞膜の流動性を低下させることで、HIVのT細胞への侵入を阻害することが確認された(Bioorg. Med. Chem. Lett., 24, 2115(2014))

研究成果の概要(英文)：We have produced hybrid liposomes (HL) which can be prepared by sonication of vesicular and micellar molecules in a buffer solution. We have investigated the anti-AIDS effects of HL and following results are obtained. (1)Remarkably high therapeutic effects were obtained in the mouse models of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) after the treatment with HL on the basis of relative organ weight and histological analysis using hematoxylin-eosin (HE) and immunohistochemical staining of CD4 and CD25. Prolonged survival was obtained in the mouse models of ATLL after the treatment with HL. (2)The anti-HIV-1 activity of cepharanthine (CEP), a natural product derived from *Stephania cepharantha* Hayata, was evaluated. CEP stabilized plasma membrane fluidity and inhibited HIV-1 envelope-dependent cell-to-cell fusion of HIV-1-infected cells as well as cell-free infection. These findings suggest that HL and CEP should be a new type of nanomedicinal anti-AIDS drug that targets cell-membranes.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学，生物機能・バイオプロセス

キーワード：リポソーム エイズ エイズ関連腫瘍 細胞膜流動性

## 1. 研究開始当初の背景

後天性免疫不全症候群(エイズ)は、原因ウイルス(HIV)の発見から、科学の進歩により、HIVの生物学的な特性が次第に明確になりつつある。そのため、HIVのライフサイクルの特性を標的とした抗HIV剤の開発に注目が集まっている。しかし、現在の抗HIV剤は、耐性ウイルスの出現や潜伏感染などが原因でエイズの根治には至っていない。特にHIVが感染した後、細胞内に潜伏することがエイズの根治を難しくしている一番の原因である。この問題を解決するため潜伏感染細胞の選択的な排除は、エイズ克服のために重要であり、新規の治療薬の開発が望まれている。

一方、申請者らは世界に先駆け1985年に大豆などに含まれるリン脂質や界面活性剤を材料に、HLを創製し(Ueoka *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 2185 (1985))、抗がん剤を含まないHL自身ががん細胞膜に特異的に蓄積した後、アポトーシス誘導型のがん抑制を示すことを発見した(Ueoka *et al.* *Chem. Lett.*, **28**, 53 (1999))。さらに、動物実験レベルでは顕著な延命効果を報告し、さらに、臨床応用ではリンパ腫瘍の患者への高い安全性、延命効果及び腫瘍縮小効果を得ており、すでに国内で十数例の臨床試験が実施されている(Ueoka *et al.* *Anticancer Res.*, **28**, 1187 (2008))。制がん機構に関し、HL自身の膜流動性(揺らぎ)やがん細胞膜の揺らぎと制がん効果との関連性を明らかにした(Ueoka *et al.* *Boorg Med Chem. Lett.*, **16**, 6131 (2006))。これらの研究成果を背景に、本研究において、HIVが感染した細胞は、がん化した細胞と同様に、細胞膜の分子のバランスが乱れていること(揺らぎ)に着目し、HLを用いたエイズ感染細胞膜を標的とする抗ウイルス剤として医用工学的に応用することを着想するに至った。

最近、申請者らはHLがエイズに感染していない細胞と比べると、感染した細胞の増殖を選択的に抑制することを発見した(Ueoka *et al.* *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 613 (2008))。本研究ではこのHIV感染細胞選択的な抑制機構を明らかにし、さらに新規のHLを用いた感染細胞膜を標的とする抗ウイルス剤の開発を試みる。

## 2. 研究の目的

本研究は申請者らが創製した複合脂質膜(ハイブリッドリポソーム:HL)を用いたエイズ感染細胞膜を標的とした細胞増殖抑制機構を解明し、さらにHLを新規の抗ウイルス剤として応用することが目的である。計画している研究項目は次の通りである。

(1) 新規のHLを開発し、新規のHLの創製および膜物性を評価する。

(2) 種々のエイズ感染(急性・潜伏)モデル細胞に対する増殖抑制効果、抗ウイルス活性およびウイルス産生誘導効果について *in vitro* で明らかにする。

(3) 非感染細胞と感染細胞の膜構造特性の

違いを明らかとし、HLの融合性・膜物性との関連性について明確とする。

(4) *in vivo* でエイズ感染動物モデルに対する抗HIV活性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) HLの創製及び膜物性の評価

申請者らは、リン脂質として、ジミリスチルホスファチジルコリン(DMPC)及びミセル分子として、ポリオキシエチレンアルキルエーテル( $C_{12}(EO)_n$ ,  $n=4, 8, 10, 21, 23, 25$ )からなるHL(DMPC/ $C_{12}(EO)_n$ )を用いたHIV潜伏感染(MOLT-4/HIV)細胞に対する増殖抑制効果を見出している。本研究では、さらにジミリスチルホスファチジルセリン(DMPS)、ジミリスチルホスファチジルエタノールアミン(DMPE)、カルジオリピン(CL)を用い、ミセル分子として、ポリオキシエチレンアルキルエーテル( $C_{12}(EO)_n$ ,  $n=4 \sim 25$ )を用い、新規のハイブリッドリポソームを超音波照射により調製する。動的光散乱法及び電子顕微鏡観察により膜サイズや安定性を明確にする。蛍光偏光解消法により、細胞膜の流動性を明らかとする。

### (2) 人工細胞膜モデルの構築、膜融合及び流動性試験

HLとの膜融合性がHIV感染細胞膜に対する増殖抑制効果に關与するかどうかは不明である。種々の培養HIV感染細胞(MOLT-4/HIV、J22-HL-60、HIV-hPBMCs)の脂質及びコレステロール構成成分をHPLCやガククロマトグラフィーにより定量し、得られたデータを基に、種々の脂質(PC、PS、PE、CL)及びコレステロールの比率からなるHIV感染細胞系の人工細胞膜モデルを作成する。上記で作成した新規HLとHIV感染人工細胞膜モデルとの融合現象をカルセインの膜融合アッセイにより明らかにする。さらに、新規HL処理前後でのHIV感染人工細胞膜の流動性の変化を蛍光偏光解消法により明らかとする。

### (3) HLのHIV感染細胞に対する細胞増殖抑制効果および抗HIV活性試験

HLのHIV潜伏感染細胞に対する細胞増殖抑制効果をMTT法により明らかにする。尚、使用細胞として、HIV潜伏感染(MOLT-4/HIV、J22-HL-60)細胞及び非感染(MOLT-4、HL-60)細胞、HIV-1急性感染ヒト末梢血単核細胞(HIV-hPBMCs)及び非感染細胞(hPBMCs)を用いる。さらに、HLの急性感染細胞に対する抗ウイルス活性(HIV産生・複製の抑制)について、HIV侵入阻害及びHIV複製阻害モデルを用い、HIV-1タンパク質(p24)量を指標として明らかにする。さらに、CD4発現HeLa細胞(HeLa CD4/LTR-bGal; 通称MAGI細胞)を用いた測定系(Emerman *et al.*, *J. Virol.* 1992)により、ウイルス感染阻害効果を明らかにする。

(4) HLのHIV潜伏感染細胞に対するウイルス産生効果

HIV が感染した後、細胞内に潜伏することがエイズの根治を難しくしている一番の原因と考えられる。この問題を解決するため、潜伏する HIV を細胞内から追い出すことが重要となる。尚、HIV 潜伏感染(T 細胞由来 ACH-2、マクロファージ由来 J22HL-60) 細胞は、宿主内でプロウイルスの状態のため、通常ウイルス産生能が無く、細胞増殖性をもつ細胞である。そこで、HL を用い、HIV の追い出す量(HIV タンパク p24) を指標にしてウイルス産生効果を明らかにする。

#### (5) HL の HIV 感染細胞に対するアポトーシス誘導の解明

HL は種々のがん細胞に対して、アポトーシス誘導型の制がん機構を明らかにしている(Ueoka *et al. Int. J. Cancer* 2005)。しかし、HIV 感染細胞に対する増殖抑制効果がアポトーシス誘導によるものか不明である。そこで増殖抑制が認められた HL について、DNA の断片化(アガロースゲル電気泳動法、TUNEL 法)、細胞膜の表面変化(Annexin-V 法)、カススペース活性(カススペースフルオロメトリック法、ウエスタンブロット法)、ミトコンドリアの膜電位低下(蛍光プローブ、チトクローム C) によりアポトーシス誘導型の増殖抑制効果を明らかにする予定である。

#### (6) HIV 感染細胞に対する HL の膜融合性の検討

HL の細胞膜融合性について検討するため、バイオイメージング試薬として、蛍光脂質(NBD-PC)含有 HL を調製し(Ueoka *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002)、細胞膜への融合・蓄積現象を共焦点レーザー顕微鏡及びフローサイトメーターを用いて明らかにする。使用細胞として、HIV 潜伏感染(MOLT-4/HIV、J22-HL-60、ACH-2) 細胞及び非感染(MOLT-4、HL-60) 細胞、HIV-hPBMCs 及び非感染 hPBMCs を用いる。

#### (7) *in vivo* での抗 HIV 活性試験及びエイズ関連リンパ腫に対する治療実験

HL が、がん細胞のみに融合・蓄積し、膜タンパク(FADD など)、カススペースカスケード、ミトコンドリアなどの関与を明確にし、アポトーシス誘導シグナル伝達の全容を解明する。HL が、正常細胞の免疫活性を向上させるメカニズムを明確にする。

以上のように、がん細胞に対するアポトーシス誘導と、正常細胞に対する免疫賦活の双方が相乗的ながん治療に関与している可能性を明らかにする。

#### (8) 分子レベルでの膜融合プロセスの解明

*in vitro* で抗ウイルス活性が得られた新規 HL に関し、HIV-1 感染モデルマウス(免疫不全マウスヒト免疫構築モデル) に対する抗 HIV-1 活性について p24 アッセイやウイルス RNA の定量により明らかにする。さらに、エイズ関連リンパ腫モデルマウスに対する HL の治療効果についても明確にする。高い抗 HIV 活性の得られた HL を用い体内動態試験及び安全性試験を実施する。

以上の結果を総合して、*in vitro* でのヒト HIV 感染細胞に対する HL のみによる増殖抑制効果、抗ウイルス効果、ウイルス産生誘導効果、及びアポトーシス誘導効果を明らかにし、メカニズムの解明や新たな素材の開発を目指す。*in vitro* で有効な HL を創製し、*in vivo* での HIV 急性感染モデル動物に対する抗 HIV 効果へとステップアップし、臨床応用に向けた基礎的データを集積する。

#### 4. 研究成果

(1) 成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATLL) は、HTLV- (ヒト T 細胞白血病ウイルス 型) の感染が原因となる T 細胞の悪性腫瘍疾患であり、HTLV- 感染者の一部が ATLL を発症する。そのため、ATLL に対する安全で効果的な新しい治療薬の開発が急務となっている。

リン脂質(DMPC) および PEG 系界面活性剤 C<sub>12</sub>(EO)<sub>25</sub> からなるハイブリッドリポソーム (HL-25)を用い、ATLL モデルマウスに対する *in vivo* でのがん抑制効果について検討した。ATLL モデルの作成として、T 細胞、B 細胞および NK 細胞の免疫機能を欠損した高度免疫不全マウス (Balb/c Rag-2/Jak3) を用い、ATLL (MT-4) 細胞をマウスの脾臓に移植し、ATLL の肝転移モデルを作成した。HL-25 の MT-4 細胞の肝転移モデルマウスへの治療効果を検討したところ、HL-25 の 14 日間の静脈投与後の肝臓重量は、未処理のコントロールおよび DMPC 単一リポソーム投与群と比べ、有意に抑制された ( $p < 0.01$ )。肝臓の組織切片作成後の HE 染色および免疫染色 (CD4, CD25) においても、HL-25 処理により、肝臓での MT-4 細胞増殖を顕著に抑制することが明確となった。次に、HL-25 による ATLL 移植マウスの延命効果について検討した。HL-25 を 14 日間の連続投与した ATLL 移植モデルマウスにおいて、平均生存日数が 72 日であった。一方、コントロールおよび DMPC 単一リポソーム群では、それぞれ、57 日および 56 日であった。さらに、HL-25 投与群の延命率は、125% であり ( $p < 0.01$ )、顕著な延命効果が明らかとなった。( *Nano Bulletin*, 1, 120105-1-4, (2012) )

(2) 現在の抗 HIV 剤は、耐性ウイルスの出現や潜伏感染などが原因でエイズの根治には至っていない。一方、ウイルス感染の発生は、ウイルスと宿主細胞膜との相互作用に依存し、HIV 感染は膜流動性の制御により影響を受けることが知られている。そこで、エイズ治療の基礎研究として、セファランチン (CEP) の HIV 侵入阻害効果およびその機構を *in vitro* で検討した。CEP の細胞毒性試験として、Molt-4 (T 細胞性白血病) 細胞に 0, 1, 3, 5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$  の CEP を 1 時間処理した後、洗浄し、さらに 24h 培養したものの細胞増殖への影響はほとんど観測されなかった。蛍光偏光解消法により、セファランチンによる Molt-4 細胞に対する細胞膜流動性

の硬化作用を明らかにした。HIV 感染実験として、ヒト末梢血由来の PHA-blast 細胞に CEP を 1 時間処理し、HIV-1(NL4-3)を加えて、さらに、2 または 4 日培養した後、HIV-1 量 (p24) を ELISA およびフローサイトメトリーで解析した。その結果、CEP の HIV 感染阻害効果が明らかになった。ウイルス感染細胞 (293T *Env*-GFP) と非感染細胞 (TZM-bl) との融合実験 (細胞間のウイルス感染モデル) として、シンシチウム形成を指標とした実験を行ったところ、CEP がシンシチウム形成を阻害することが分かった。さらに、HIV-1 *Env* タンパク質発現 T 細胞 (Jurkat<sub>HXBc2</sub>) と CEP 処理した Molt-4 細胞との細胞間の HIV 感染モデル実験では、CEP は有意に細胞間の融合を阻害し、HIV 感染を阻害した。これらの結果は、CEP が細胞膜の流動性を低下させることで、HIV の T 細胞への侵入を阻害することが示された (*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **24**, 2115-2117 (2014))

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計 26 件)

Y. Komizu, M. Yukihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, Cell cycle arrest by hybrid liposomes for human lung carcinoma cells, *J. Carcinog. Mutagen.*, **5**, 157-1-6(査読有) (2014).

(DOI: 10.4172/2157-2518.1000157)

H. Ichihara, M. Hino, R. Ueoka, Y. Matsumoto, Therapeutic effects of cationic hybrid liposomes on the hepatic metastasis of colon carcinoma along with apoptosis in vivo, *Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 498-503 (査読有) (2014).

(DOI: 10.1248/bpb.b13-00764)

K. Matsuda, S. Hattori, Y. Komizu, R. Kariya, R. Ueoka, S. Okada, Cepharanthine inhibited HIV-1 cell-cell transmission and cell-free infection via modification of cell membrane fluidity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (査読有) **24**, 2115-2117 (2014).

(DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.03.041)

H. Kitajima, Y. Komizu, H. Ichihara, K. Goto, R. Ueoka, Hybrid liposomes inhibit tumor growth and lung metastasis of murine osteosarcoma cells, *Cancer Med.*, (査読有) **2**, 267-278 (2013).

(DOI: 10.1002/cam4.67)

S. Nakagawa, Y. Matsuoka, H. Ichihara, H. Yoshida, K. Yoshida, R. Ueoka, Therapeutic Effects of autologous lymphocytes activated with Trastuzumab for xenograft mouse models of human breast cancer, *Biol. Pharm. Bull.*, (査読有) **36**, 861-865 (2013).

(DOI: 10.1248/bpb.b12-01084)

Y. Komizu, M. Yukihara, T. Ueoka, H. Ichihara, Y. Matsumoto, S. Okada, R. Ueoka,

Therapeutic effects of hybrid liposomes for mouse models of adult T-cell leukemia/lymphoma *in vivo*, *Nano Bull.*, (査読有) **1**, 120105-1-4 (2012).

(<http://www.gosciences.com/journals/index.php/nano/article/view/nano120105>)

H. Ichihara, M. Hino, M. Umebayashi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, Intravenous injection of hybrid liposomes suppresses the liver metastases in xenograft mouse models of colorectal cancer in vivo, *Eur. J. Med. Chem.*, (査読有) **57**, 143-148 (2012).

(DOI: 10.1016/j.ejmech.2012.08.040)

M. Hino, H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, Anti-tumor effects of cationic hybrid liposomes against colon carcinoma along with apoptosis *in vitro*, *Biol. Pharm. Bull.*, (査読有) **35**, 1213-1215 (2012).

(DOI: 10.1248/bpb.b12-00633)

Y. Komizu, H. Ueoka, R. Ueoka, Selective accumulation and growth inhibition of hybrid liposomes to human hepatocellular carcinoma cells in relation to fluidity of plasma membranes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (査読有) **418**, 81-86 (2012).

(DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.12.134)

K. Cao, K. Tanaka, Y. Komizu, K. Tamiya-Koizumi, T. Murate, R. Ueoka, M. Kyogashima, J. Usukura, T. Takahashi, M. Suzuki, Hybrid liposomes affect cellular lipid constituents and caveolae structures, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (査読有) **22**, 1731-1733 (2012).

(DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.12.093)

##### [学会発表](計 26 件)

刈谷龍昇, 松田幸樹, 中村敬, 古水雄志, 鈴木元, 桑島邦博, 上岡龍一, 岡田誠治, 「HAMLET/BAMLET の原発性滲出性悪性リンパ腫に対する抗腫瘍効果」2013 年 11 月 21 日, 第 27 回日本エイズ学会学会学術集会 (熊本県).

松田幸樹, 服部真一朗, 刈谷龍昇, 古水雄志, 工藤恵理子, 木村晋也, 上岡龍一, 岡田誠治, 「三環系クマリン GUT-70 による HIV-1 侵入抑制効果」2013 年 6 月 22 日, 第 23 回日本サイトメトリー学会学術集会 (東京都).

【Invited Speaker】R. Ueoka 「Membrane-targeted nanotherapy with hybrid liposomes for cancer cells leading to apoptosis」2012 年 12 月 6 日, The 6th International Symposium of “Molecular Science of Fluctuation Toward Biological Functions” (京都府).

北島英樹, 古水雄志, 市原英明, 上岡龍一 「Anti-invasive effect of hybrid liposomes on osteosarcoma cells」2012 年 9 月 20 日, 第 71 回日本癌学会学術総会 (北海道).

上岡 龍一「細胞膜及び人工膜の揺らぎ  
が関与する制がん機能メカニズム」2012  
年 8 月 1 日, 新学術領域研究「揺らぎが  
機能を決める生命分子の科学」平成 24  
年度合同班会議 (宮城県).

〔図書〕(計 3 件)

上岡龍一, 「ハイブリッドリポソームの  
基礎と応用」揺らぎ・ダイナミクスと  
生体機能, Dojin Bioscience, ((株)化学  
同人), 368 (305-313) (2013)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

上岡 龍一 (UEOKA, Ryuichi)  
崇城大学・生物生命学部・客員研究員  
研究者番号: 70099076