

## 第10回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

## CCR5 阻害剤を中心とした新規抗 HIV 剤の研究

### Basic Research of Novel Anti-HIV Compounds Focusing Mainly on Development of CCR5 Inhibitors

中 田 浩 智

Hirotomo NAKATA

Experimental Retrovirology Section, HIV and AIDS Malignancy Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892

## はじめに

第10回日本エイズ学会 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞の受賞内容である、CCR5 阻害剤を中心とした新規抗 HIV 剤の基礎臨床研究について概説する。

## 研究の背景

HIV-1 に対する多剤併用療法 (highly active antiretroviral therapy : HAART) により HIV-1 治療は格段の進歩を遂げ、その結果 HIV-1 感染症の病態は大きく改善し、死亡者数も激減した<sup>1,2)</sup>。しかしながら、HAART 療法を以ってしても、血液中や感染組織のウイルス reservoir のために HIV-1 を体内から完全に排除するのは現時点では不可能なことでありとされている<sup>3)</sup>。結果として治療は長期にわたるを得ず、治療の長期化は薬剤耐性ウイルスの出現、長期服用に伴う様々な副作用の出現、煩雑な服用によるアドヒアランスの低下といった問題を顕在化して来た。そのため、多剤耐性株にも強力な活性を有し、副作用が最小限に抑えられ、服用しやすい薬剤を開発することが重要な課題となっている。そのような新規抗 HIV 剤開発の方向性は、(1) 既存の逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤等と全く異なる新規の作用機序を有する抗 HIV 剤の開発、(2) 既存の薬剤をベースに抗 HIV 活性、耐性プロフィール、作用時間等を改良した薬剤の開発、の大きく二つに分かれる。我々の研究グループでも、HIV-1 感染の主要なコレセプターのひとつである CCR5 を標的とした CCR5 阻害剤など新たな作用機序の薬剤の開発と並行して、プロテアーゼ阻害剤や逆転写酵素阻害剤の改良を継続して行い、近年も臨床に供された DRV をはじめ様々な薬剤を開発、報告し

著者連絡先 : Experimental Retrovirology Section, HIV and AIDS Malignancy Branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Building 10, Room 5A11, 9000 Rockville Pike, Bethesda, Maryland 20892, U.S.A.

2010年7月8日受付

てきた<sup>4-6)</sup>。その一方で、我々はそれらの薬剤の抗 HIV 活性メカニズムや動物モデルにおける抗 HIV 活性、耐性プロファイルの詳細な検討など、臨床研究への橋渡しとなる基礎研究も積極的に行っている<sup>7-11)</sup>。CCR5 阻害剤を中心にそれらの基礎研究の成果を以下に述べる。

CCR5 阻害剤のモデルマウスにおける *in vivo* 抗 HIV 活性評価

我々は小野薬品との共同研究により一連の spirodiketo-piperazine 誘導体、特に aplaviroc (APL) の研究開発を行ってきた (図 1)。我々は *in vitro* において APL が subnanomolar という強力な抗 HIV 活性を有することを報告した後<sup>5)</sup>、より生体に近い条件下での APL の抗 HIV 活性を調べるため、ヒト PBMC 移植後 HIV-1 を感染させたモデルマウス (human PBMC nonobese diabetic-SCID, IL2R  $\gamma$ -chain-knocked-out AIDS mouse : hu-PBMC NOG mouse) を用いた *in vivo* の APL の抗 HIV 活性評価を行った<sup>10)</sup>。APL の投与は従来の実験でよく見られた予防投与ではなく、治療的投与として HIV 感染後 24 時間経過した時点から開始し、1 日 2 回 15 日間 (感染後 16 日) の投与を行った。感染後 16 日目で回収したヒト PBMC をフローサイトメトリーで解析したところ、無治療群ではヒト CD4 陽性 T 細胞がほぼ消失しているのに対し (CD4<sup>+</sup> cell : 3.9%), APL 投与群では CD4 陽性 T 細胞が 55.1% 残存しており、これはコントロールである ddI 投与群 (CD4<sup>+</sup> cell : 53.2%) や非感染群 (CD4<sup>+</sup> cell : 48.9%) とほぼ同じレベルであった (図 2A)。血清中の HIV-RNA 量についても 5, 9, 16 日目に採血を行い測定した結果、APL 投与群、ddI 投与群ともに治療開始後も RNA 量の増加は持続していたが、その増加は無治療群に比べ、有意に抑制されていた (図 2B)。これらの結果から *in vivo* でも APL が抗 HIV 活性を発揮することが示された。また、APL をマウスに投与後、一定時間毎にヒト PBMC を回収し、CCR5 に対して APL と競合的に結合する抗 CCR5 抗

体(45531)を用いて APL と CCR5 の結合を調べたところ、6 時間後でも抗体の結合は 50% 以上阻害されており、CCR5 との高い親和性により APL が血中から消失後も CCR5 上に長時間存在していることが示唆された (図 3B)。APL のマウスでの血中半減期が 29 分と短いにも関わらず (図 3A)、1 日 2 回の投与で強い抗 HIV 活性を發揮した機序の

ひとつとして、この CCR5 との長時間の結合が考えられ、これらのデータは臨床試験を支持する重要なものとなった。この CCR5 との長時間の結合は臨床試験の際にも確認されており、1 日 2 回の APL 投与を 7 日間行った後では、最終投与から 100 時間以上経過した時点でも 50% 以上の抗体の結合阻害が認められている<sup>12)</sup>。

### CCR5 阻害剤の他剤併用効果

CCR5 阻害剤は R5 ウイルスに選択的に作用するという性質上、十分な治療効果を發揮し、かつ耐性ウイルスの出現を抑制するためには他剤との併用が不可欠となる。そこで我々は Combo method という独自の評価系を確立し、CCR5 阻害剤の他剤との併用効果を調べた<sup>11)</sup>。Combo method は Bliss independence method を基に併用効果評価を行うものであるが<sup>13)</sup>、併用効果を統計学的に解析することでより厳密な併用効果判定を試みたものである。例えば薬剤 A と薬剤 B の併用効果 (A+B) の評価に当たり、同じ評価系で薬剤 A 単剤 (A+A) 或いは薬剤 B 単剤 (B+B) の組み合わせでの抗 HIV 活性評価を行い、単剤のみの組み合わせで得られる“見かけ上の併用効果”を基準となる相加作用と考え、薬剤 A+B の併用で得られる“真の併用効果”と統計学的に比較することで、A+B の効果が A+A 或いは B+B に比べ有意に高い場合に相乗作用、有意差が見られない場合に相加作用、有意に低い場合に拮抗作用と判定する (図 4)。更に我々は、生体内でウイルスが quasispecies に存在している状態に近づけるために、R5 ウイルスと X4 ウイルスをヒト PBMC に混合感染させた状態でも併用効果の評価を

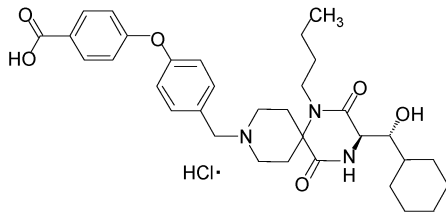


図 1 aplaviroc の構造式

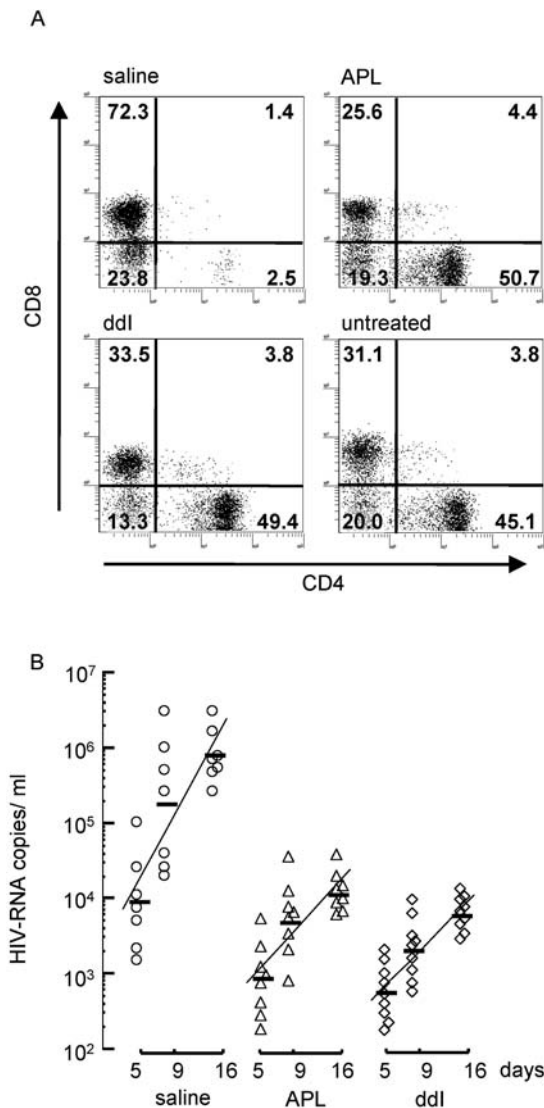


図 2 hu-PBMC NOG mouse における aplaviroc の抗 HIV 活性

(A) HIV 感染後 16 日目のヒト PBMC のフローサイトメトリー解析。ヒト PBMC 移植後 16 日目に R5 tropic HIV-1 (HIV-1<sub>JR-FL</sub>) を感染させ、24 時間後から APL 及び ddl の 1 日 2 回投与を 15 日間行った。感染後 16 日目に回収したヒト PBMC を抗 CD4 抗体、及び抗 CD8 抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。数字は各分画における細胞の割合を示す。無治療群 (saline) で CD4 陽性細胞が著明に減少 (3.9%) にしているのに対し、APL 及び ddl 投与群では非感染群と同程度の CD4 陽性細胞の残存を認める (APL : 55.1%, ddl : 53.4% vs. untreated : 49.1%)。

(B) HIV 感染後の HIV-RNA 量の変化。HIV 感染後 5、9、16 日目に採血を行い、HIV-RNA 量を測定した。無治療群では 5 日目から 16 日目までにかけて  $0.167 \pm 0.042$  の増加率 (実線) を示し、16 日目に  $10^6$  コピー/ml 近くまで増加したのに対し、APL 投与群、ddl 投与群では 16 日目のコピー数が各々 1.6、1.8 log 抑制されており、増加率もそれぞれ  $0.102 \pm 0.041$  と  $0.091 \pm 0.037$  と無治療群に比べ有意に低かった。水平線は各採血日における HIV-RNA 量の平均を示す。

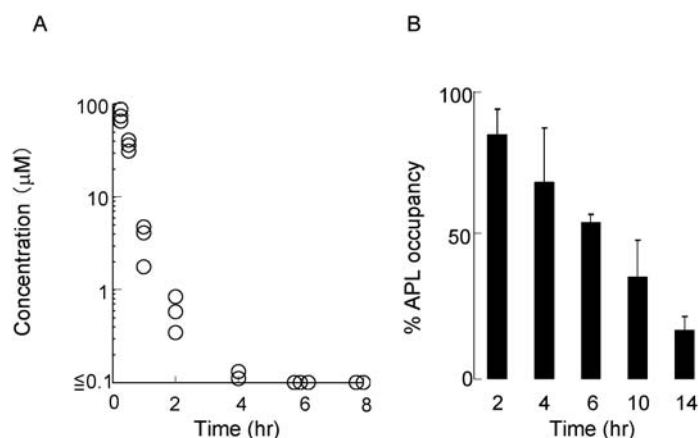


図 3 hu-PBMC NOG mouse における APL の薬物動態

(A) hu-PBMC NOG mouse に 60 mg/kg の APL を投与した後、15, 30, 60, 120, 240, 480, 720 分後に採血を行い、HPLC を用いて APL の血中濃度の測定を行った。APL はマウス血中で速やかに消失しており、血中半減期は 29 分であった。  
 (B) APL の細胞表面への結合。hu-PBMC NOG mouse に APL を単回投与した後、一定時間経過後に採血を行い、抗 CCR5 抗体 (45531) を用い細胞表面の APL の結合を調べた。6 時間後の採血のヒト PBMC でも抗体の結合は 50% 以上阻害されている。

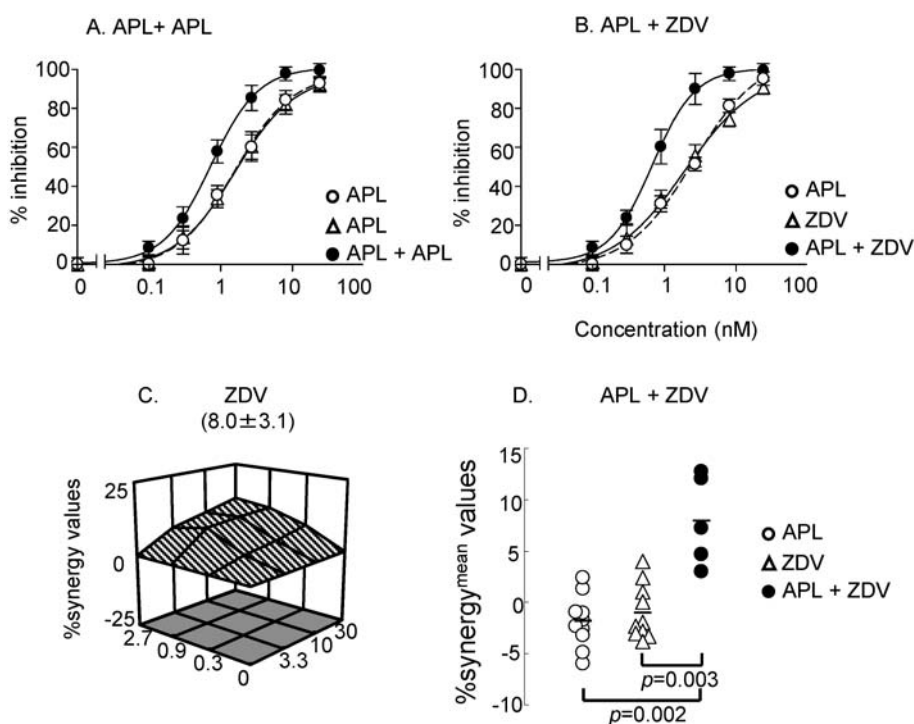


図 4 単剤及び 2 剤併用での用量反応曲線と Combo method による併用効果判定

(A) 単剤 (APL+APL) での用量反応曲線。PBMC に APL のみと APL+APL の薬剤存在下で R5-HIV-1<sub>BA-L</sub> を感染させ、7 日後に細胞上清中の p24 値を測定し抗 HIV 活性を求めた。APL の濃度は 0.1 から 24.3 nM まで連続的な 3 倍希釈系列とした。  
 (B) APL と zidovudine (ZDV) を濃度の比を一定にし (1 : 11), (A) と同様の実験を行った。(C) パネル (A) 及び (B) の結果を基に Bliss independence method により APL と ZDV の各濃度における併用効果 (%synergy) を求め、3-D グラフにした。更にその平均である %synergy<sup>mean</sup> を算出し、Combo method で併用効果の判定を行った (D)。Combo method では APL+APL 及び ZDV+ZDV の %synergy<sup>mean</sup> を基準となる相加作用と考え、この値を APL+ZDV の併用効果と Wilcoxon rank sum test を用いて統計的に比較することで、併用効果を判定する。その結果、APL+ZDV の %synergy<sup>mean</sup> は、APL+APL 及び ZDV+ZDV の %synergy<sup>mean</sup> いずれとも有意差があり、APL+ZDV の併用には相乗作用があると考えられた。

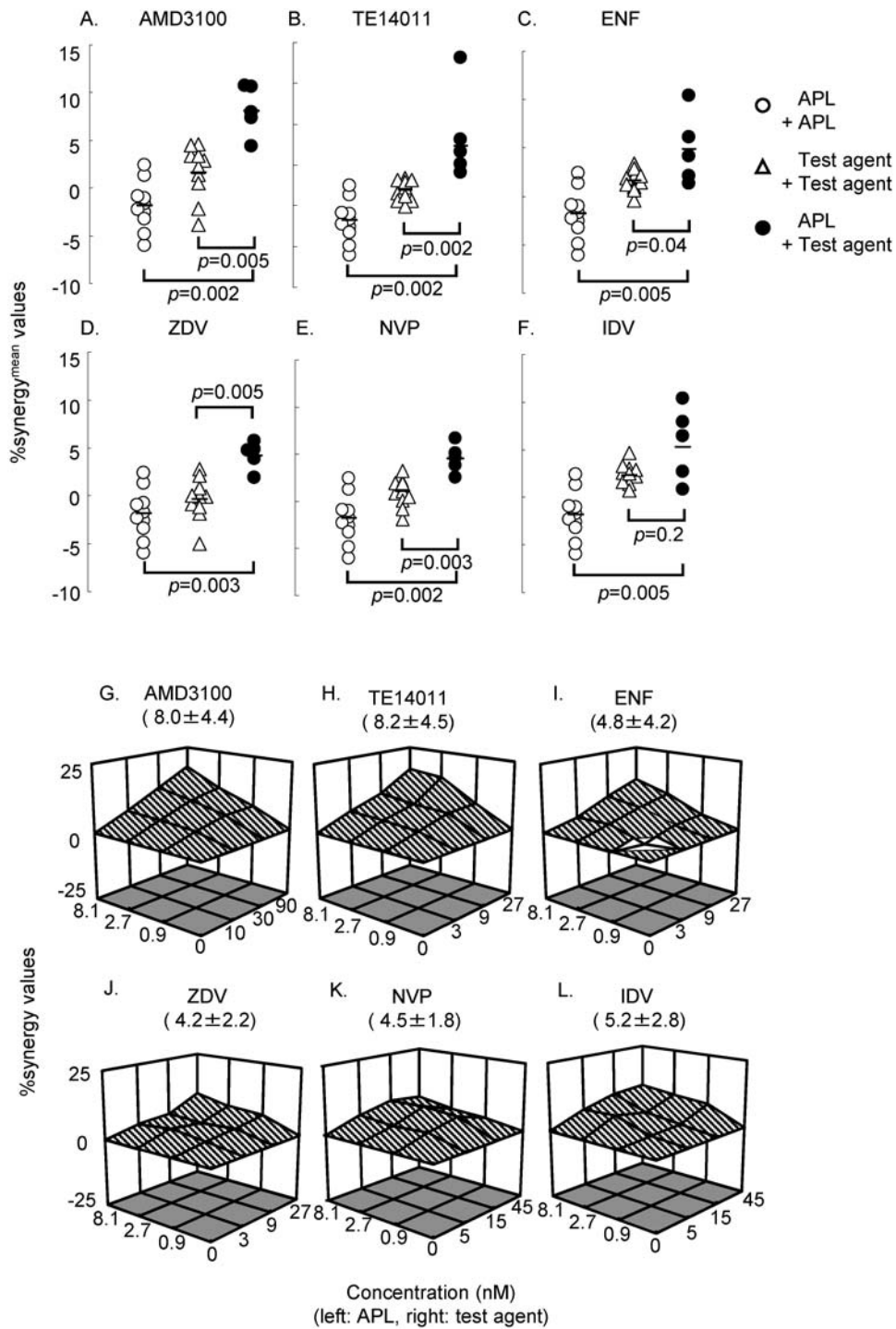


図 5 R5-HIV<sub>Ba-L</sub> と X4-HIV-1<sub>ERS104pre</sub> を混合感染させた状態での APL の併用効果  
 PBMC に R5-HIV<sub>Ba-L</sub> と X4-HIV-1<sub>ERS104pre</sub> を 50 : 50 の割合で感染させたものを APL と他の抗 HIV 薬 (CXCR4 阻害剤 AMD3100 (A), TE14011 (B), 侵入阻害剤 enfuvirtide (ENF) (C), 逆転写酵素阻害剤 ZDV (D), nevirapine (NVP) (E), プロテアーゼ阻害剤 indinavir (IDV) (F) の存在下で 7 日間培養し併用効果を調べた。APL+APL 及び test agent + test agent と APL+test agent との間の %synergy<sup>mean</sup> の差を Wilcoxon rank sum test を用いて統計学的に解析した。有意差は IDV+IDV と APL+IDV 間 ( $p=0.2$ ) を除く全ての組み合わせで認められた。(G-L) APL と test agent の各濃度における %synergy の平均を 3-D グラフで表した。括弧内の数字は全ての濃度での %synergy の平均を示す。

行った。その結果、CCR5 阻害剤は逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤や侵入阻害剤といった様々な作用機序の薬剤と高い併用効果が期待できることが明らかになり、更に、X4 ウイルスと R5 ウイルスが混在した環境下では AMD3100 等の CXCR4 阻害剤との間で最も高い併用効果が認められるという興味深いデータが得られた (図 5)。

### CCR5 阻害剤のケモカイン-CCR5 の生理作用に与える影響の評価

白人の約 1% に CCR5 遺伝子の 32 個の塩基欠損 ( $\Delta 32$ ) により CCR5 が発現せず、その結果 HIV に抵抗性を示す個体群が存在し<sup>14,15)</sup>、それらの人々と健常者との間に明らかな差異を認めないことから、CCR5 が免疫機能の維持に不可欠の分子ではない可能性が提起されたことにより、CCR5 は抗 HIV 薬開発の格好の標的であると考えられてきた。しかしながら、近年、 $\Delta 32$  変異を有する人々でウエストナイルウイルス感染の重症化のリスクが高いことや臓器移植において拒絶反応が少ないなど CCR5 の欠損に由

来すると考えられる免疫異常を示唆する報告が相次いでなされており<sup>16,17)</sup>、CCR5 を長期間抑制することの安全性は必ずしも保証されていない。CCR5 とその生理的リガンドであるケモカインとの相互作用への影響は小さくし、抗 HIV 活性により特化した CCR5 阻害剤の開発はこの問題点を克服し得る可能性がある。

これまで CCR5 阻害剤によるケモカインへの影響を見る手段として、RI 標識したケモカインを用いた binding assay や抗体を用いた internalization の評価、Ca flux, Chemotaxis を観察する方法などが用いられて来たが<sup>5)</sup>、我々はより直接的に CCR5 阻害剤によるケモカイン-CCR5 相互作用への影響を観察するために、YFP (yellow-fluorescence protein) で標識した CCR5 (CCR5<sup>YFP</sup>) を発現させた細胞株 (CCR5<sup>YFP</sup>-U373MAGI cell) を用い、CCR5 阻害剤の存在下で CCR5 の動態がどのように変化するか共焦点顕微鏡を用いて観察した<sup>9)</sup>。CCR5 阻害剤の非存在下ではケモカイン (RANTES, MIP-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ ) の添加により細胞膜上に発現した CCR5<sup>YFP</sup> の internalization が惹起され細胞膜から細胞質内への蛍光

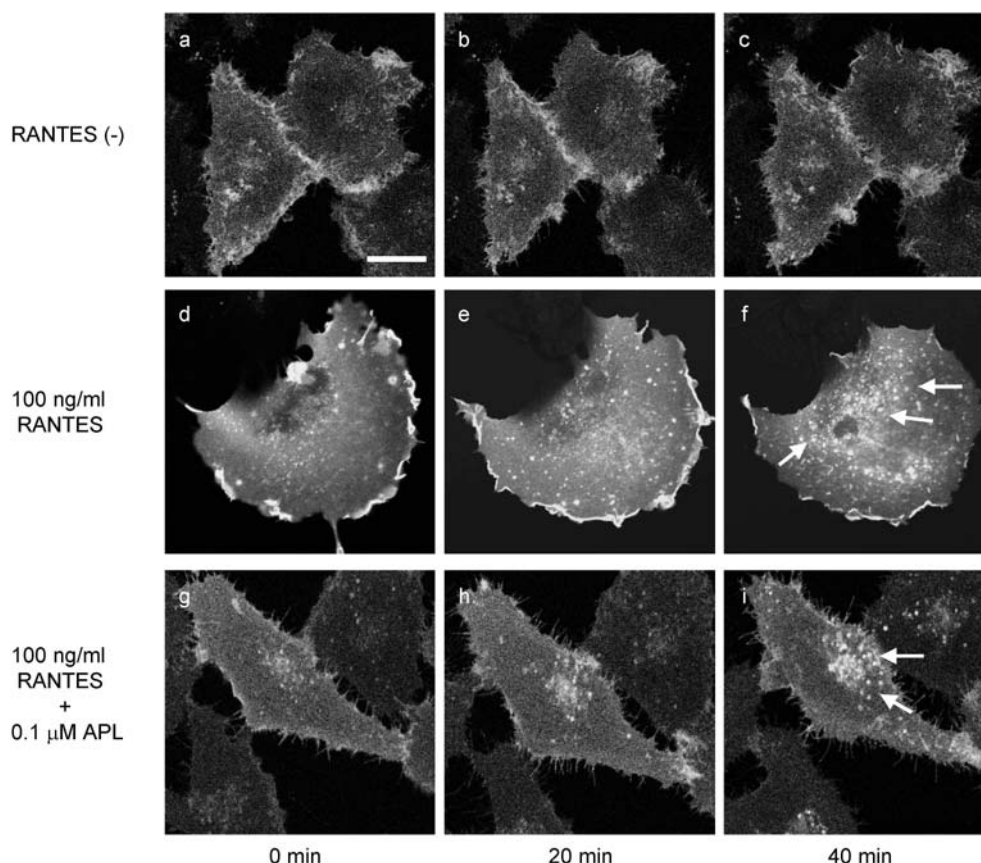


図 6 CCR5<sup>YFP</sup>-U373MAGI cell における CCR5 の internalization

CCR5<sup>YFP</sup>-U373MAGI cell に培地のみ (a-c) 或いは RANTES (100 ng/ml) を添加した後 (d-f)、共焦点顕微鏡を用いて 10 分毎に画像を撮影した。また、APL (0.1  $\mu$ M) に予め 1 時間暴露したものに RANTES を添加し観察を行った (g-i)。図は添加直後、20 分、40 分後の像で、(f) 及び (i) における矢印は細胞質内における蛍光強度の増強を示す。Scale bar は 20  $\mu$ m。

蛋白のシフトが起こり、結果として細胞質内の蛍光強度の上昇が認められる (図 6)。3 種類の CCR5 阻害剤 (APL, TAK779, maraviroc) の存在下で同様の実験を行ったところ IC<sub>50</sub> と同程度の濃度の阻害剤の存在下ではこれらの

internalization は阻害され、蛍光強度の上昇は認められなかった。しかしながら、APL 存在下で RANTES を添加した場合のみ、IC<sub>50</sub> の 16.4 倍の濃度でも 50% 近い internalization が見られた (図 7)。このことは十分な抗 HIV 活性を

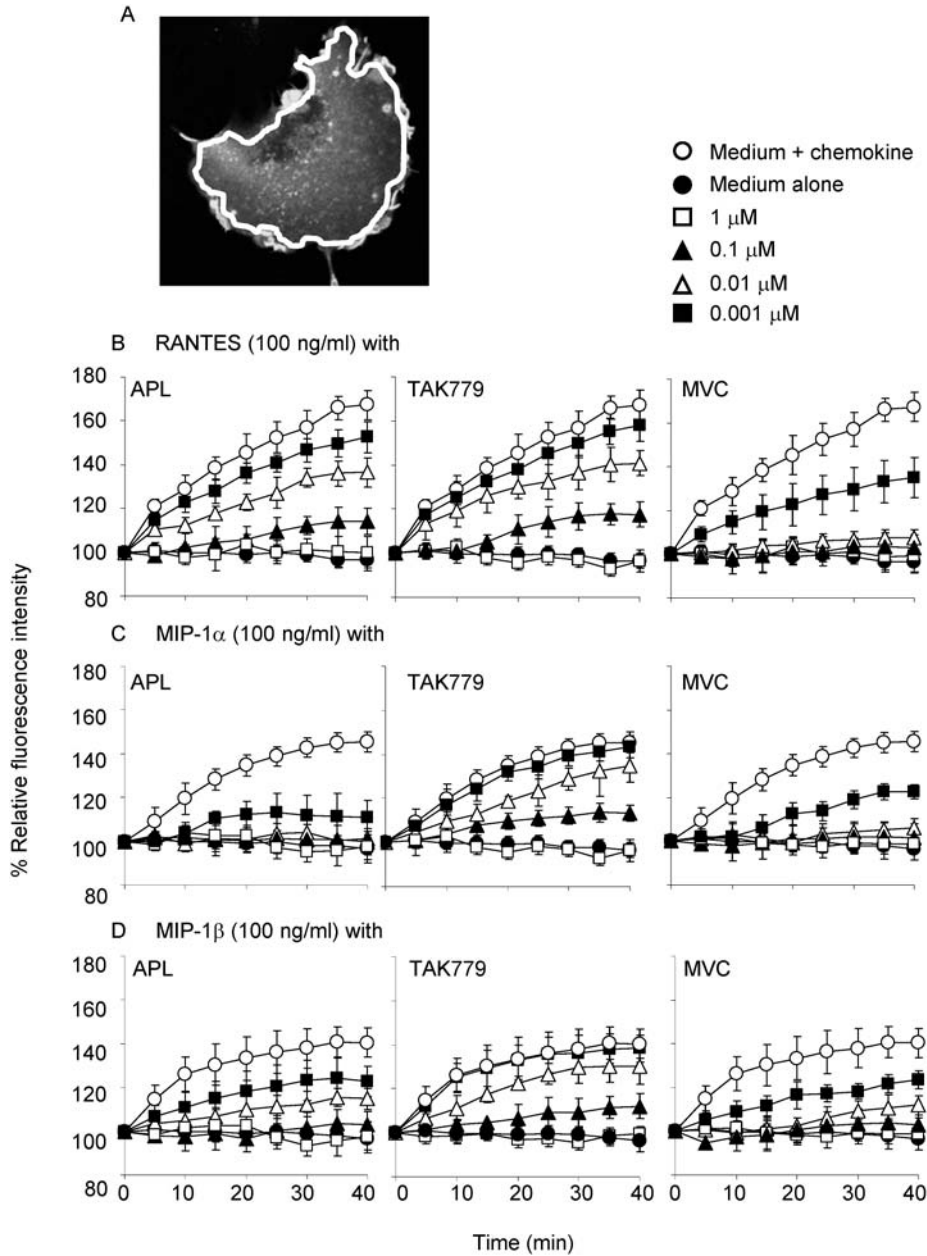


図 7 細胞内蛍光強度のモニター法と CCR5 阻害剤存在下での蛍光強度の変化

(A) 白線のように細胞内で蛍光強度をモニターする範囲を決め、10 分毎に画像がコンピューター内に取り込まれた後、自動的に範囲内の蛍光強度を測定し、その変化を % Relative fluorescence intensity として算出する。(B-D) CCR5 阻害剤 (APL, TAK779, maraviroc : MVC) のケモカインによる CCR5 internalization に与える影響。様々な濃度の CCR5 阻害剤に 1 時間暴露した後、100 ng/ml の (B) RANTES, (C) MIP-1α, (D) MIP-1β を添加し、細胞内蛍光強度の変化をモニターした。0.01 μM の APL 存在下で RANTES を添加すると 40 分後に RANTES のみ添加した場合の 50% 程度まで蛍光強度が増加しているのに対し、同濃度の MVC 存在下では蛍光強度の増強はほとんど見られない。

発揮する濃度でも APL が RANTES と CCR5 の相互作用を部分的にしか阻害していないことを意味する。このような CCR5 阻害剤によるケモカインへの影響の違いは、阻害剤の CCR5 への結合様式の違いがもたらしていると推測されるが、この点を詳細に解析することで、より抗 HIV 効果に特化した CCR5 阻害剤を結合モデルを基に構造学的に設計できる可能性も考えられる。

### おわりに

CCR5 阻害剤以外では新規の逆転写酵素阻害剤である 4'-Ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) の細胞内代謝の解析も行っている<sup>8)</sup>。EFdA は従来の逆転写酵素阻害剤と異なり、五炭糖の 3' の OH が残存したままで、4' にメチル基を付加した構造を有しており (図 8), *in vitro* で IC<sub>50</sub>: 0.4 nM と強力な抗 HIV 活性を発揮する。逆転写酵素阻害剤は

細胞内で 3 リン酸化され活性体となるため、細胞内の 3 リン酸化物の動態を解析することは薬剤の効果持続時間を推測する上で重要なデータとなる。<sup>3</sup>H でラベルした EFdA を用いて HPLC で各リン酸化物のピークを解析するという

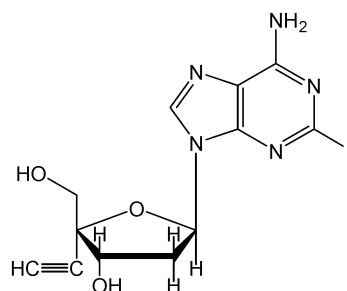


図 8 4'-Ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) の構造

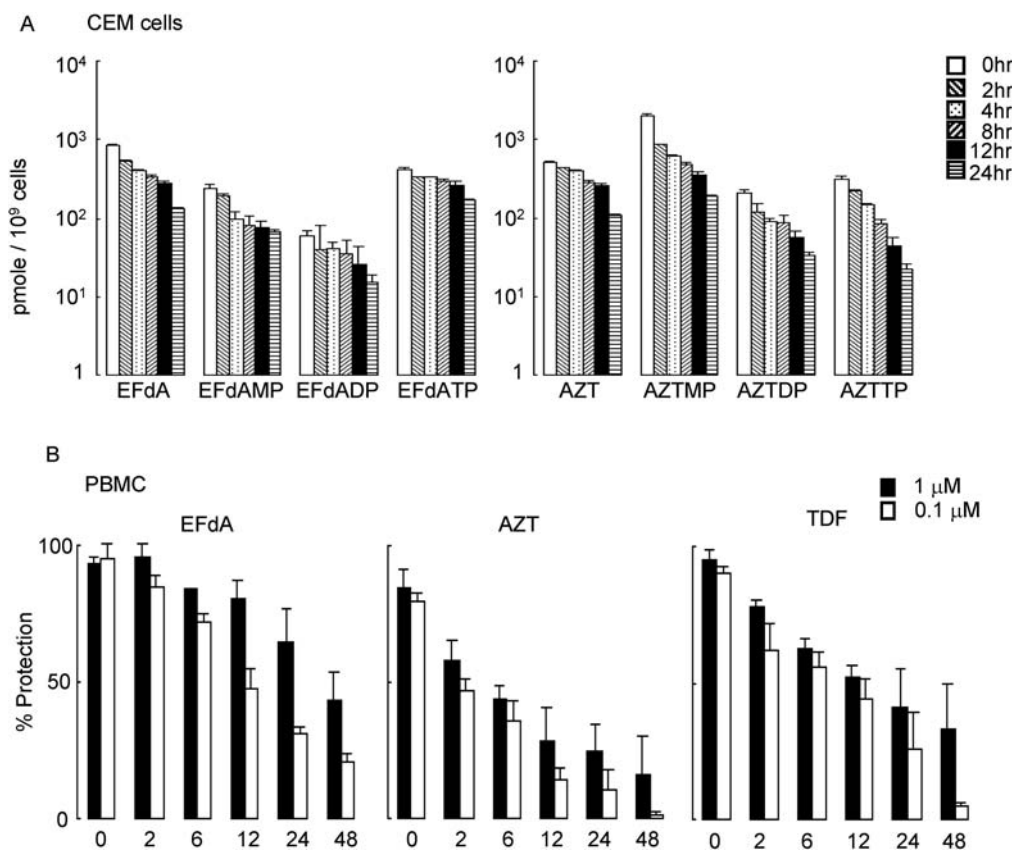


図 9 EFdA の細胞内代謝と抗 HIV 活性の持続

(A) CEM cell を 0.2 μM の <sup>3</sup>H-EFdA または <sup>3</sup>H-AZT 存在下で 6 時間培養した後、細胞外の薬剤を完全に除去し、更に 0, 2, 4, 8, 12, 24 時間培養、細胞内の核酸を抽出し、HPLC でリン酸化物の量を測定した。AZTTP が 3 時間程度で速やかに半減するのに対し、EFdATP は 12 時間後でもほとんど減少は見られない。

(B) PBMC を 0.1 μM 又は 1 μM の EFdA, AZT, tenofovir (TDF) 存在下で 24 時間培養した後、細胞外の薬剤を完全に除去し、更に 0, 2, 6, 12, 24, 48 時間培養後 HIV-1 に感染させ、抗 HIV 活性の持続を調べた。1 μM の EFdA に暴露時には 24 時間経過後も 50% 以上の抗 HIV 活性が維持されている。

方法で EFdA の細胞内代謝を解析した結果、EFdA は細胞内に濃度依存的に取り込まれた後、3リン酸化物 (EFdATP) まで AZT に比べ比較的速やかに代謝されることが分かった。更に EFdATP の細胞内半減期 ( $t_{1/2}$ ) を調べたところ、EFdATP の  $t_{1/2}$  は 17.2 時間と、対照薬の AZTTP の  $t_{1/2}$  2.8 時間に比べ十分に長いものであった (図 9A)。実際、PBMC を  $1\ \mu\text{M}$  の EFdA に暴露した後、細胞外の EFdA を取り除き、一定時間経過後に HIV を感染させ、EFdA の抗 HIV 活性の持続を調べたところ、EFdA 除去後 24 時間経過しても 50% 以上の抗 HIV 活性が見られた (図 9B)。また EFdA の副作用発現の可能性を見るために、DNA polymerase に対する阻害作用を調べたところ、DNA polymerase  $\alpha$ ,  $-\beta$  に対する阻害は  $100\ \mu\text{M}$  でもほとんど認められなかった。一方 DNA polymerase  $\gamma$  に対しては阻害効果が認められたが、 $K_i$  値で  $24.4\ \mu\text{M}$  と ddI の約 5 倍で EFdA の  $\text{IC}_{50}$  ( $0.4\ \text{nM}$ ) に比べ非常に高い値であった。これらの結果は EFdA が 1 日 1-2 回の投与でかつ比較的副作用が少ない薬剤として臨床使用出来る可能性を示唆している。

APL は第 II a 相臨床試験において、10 日間の投与で  $1.66\ \log_{10}$  の HIV-RNA 量の低下を認めるなど良好な臨床効果を認めたが、続く第 II b 相試験において、195 人の APL 投与群の内 4 人の患者で grade3 以上の肝障害を認めたため臨床開発は中断を余儀なくされた<sup>18)</sup>。しかしながら、APL 開発で蓄積されたデータは今後の CCR5 阻害剤の開発に応用可能なものであり、現在も我々は Purdue 大学の Dr. Ghosh との共同研究で、新規の基本骨格を有する CCR5 阻害剤の開発を継続して行っており、すでにいくつかの強力な抗 HIV 活性を有する薬剤を見出している。また、EFdA についても細胞内代謝のデータに基づき、熊本大学岡田誠治教授の研究室との共同研究でマウスを用いた前臨床実験を行い、*in vivo* での優れた抗 HIV 活性を確認しており<sup>19)</sup>、今後の臨床開発が期待される。

## 謝辞

この度、第 10 回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞を受賞することになりましたことを深く感謝いたします。これまでご指導いただきました満屋裕明先生をはじめとした諸先生方、また本賞の選考にあたられました選考委員の先生方に厚くお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Fauci AS : The AIDS epidemic—considerations for the 21st century. *N Engl J Med* 341 : 1046-1050, 1999.
- 2) Mitsuya H, Erickson J : Discovery and development of antiretroviral therapeutics for HIV infection. In *Textbook of AIDS Medicine*. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 751-780, 1999.
- 3) Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, Quinn TC, Chadwick K, Margolick J, Brookmeyer R, Gallant J, Markowitz M, Ho DD, Richman DD, Siliciano RF : Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 278 : 1295-1300, 1997.
- 4) Koh Y, Nakata H, Maeda K, Ogata H, Bilcer G, Devasamudram T, Kincaid JF, Boross P, Wang YF, Tie Y, Volarath P, Gaddis L, Harrison RW, Weber IT, Ghosh AK, Mitsuya H : Novel bis-tetrahydrofuranylurethane-containing nonpeptidic protease inhibitor (PI) UIC-94017 (TMC114) with potent activity against multi-PI-resistant human immunodeficiency virus *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 47 : 3123-3129, 2003.
- 5) Maeda K, Nakata H, Koh Y, Miyakawa T, Ogata H, Takaoka Y, Shibayama S, Sagawa K, Fukushima D, Moravek J, Koyanagi Y, Mitsuya H : Spirodiketopiperazine-based CCR5 inhibitor which preserves CC-chemokine/CCR5 interactions and exerts potent activity against R5 human immunodeficiency virus type 1 *in vitro*. *J Virol* 78 : 8654-8662, 2004.
- 6) Koh Y, Das D, Leschenko S, Nakata H, Ogata-Aoki H, Amano M, Nakayama M, Ghosh AK, Mitsuya H : GRL-02031, a novel nonpeptidic protease inhibitor (PI) containing a stereochemically defined fused cyclopentanyltetrahydrofuran potent against multi-PI-resistant human immunodeficiency virus type 1 *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 53 : 997-1006, 2009.
- 7) Maeda K, Das D, Yin PD, Tsuchiya K, Ogata-Aoki H, Nakata H, Norman RB, Hackney LA, Takaoka Y, Mitsuya H : Involvement of the second extracellular loop and transmembrane residues of CCR5 in inhibitor binding and HIV-1 fusion : insights into the mechanism of allosteric inhibition. *J Mol Biol* 381 : 956-974, 2008.
- 8) Nakata H, Amano M, Koh Y, Kodama E, Yang G, Bailey CM, Kohgo S, Hayakawa H, Matsuoka M, Anderson KS, Cheng YC, Mitsuya H : Activity against human immunodeficiency virus type 1, intracellular metabolism, and effects on human DNA polymerases of 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine. *Antimicrob Agents Chemother* 51 : 2701-2708, 2007.
- 9) Nakata H, Kruhlak M, Kamata W, Ogata-Aoki H, Li J, Maeda K, Ghosh AK, Mitsuya H : Effects of CC chemokine receptor 5 (CCR5) inhibitors on the dynamics of CCR5 and



- CC-chemokine-CCR5 interactions. *Antivir Ther* 15 : 321-331, 2010.
- 10) Nakata H, Maeda K, Miyakawa T, Shibayama S, Matsuo M, Takaoka Y, Ito M, Koyanagi Y, Mitsuya H : Potent anti-R5 human immunodeficiency virus type 1 effects of a CCR5 antagonist, AK602/ONO4128/GW873140, in a novel human peripheral blood mononuclear cell nonobese diabetic-SCID, interleukin-2 receptor gamma-chain-knocked-out AIDS mouse model. *J Virol* 79 : 2087-2096, 2005.
- 11) Nakata H, Steinberg SM, Koh Y, Maeda K, Takaoka Y, Tamamura H, Fujii N, Mitsuya H : Potent synergistic anti-human immunodeficiency virus (HIV) effects using combinations of the CCR5 inhibitor aplaviroc with other anti-HIV drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 52 : 2111-2119, 2008.
- 12) Demarest JF, Sparks SS, Schell K, Shibayama S, McDanal CB, Fang L, Adkison KK, Shachoy-Clark A, Piscitelli SC : In vitro and clinical investigation of the relationship between CCR5 receptor occupancy and anti-HIV activity of Aplaviroc. *J Clin Pharmacol* 48 : 1179-1188, 2008.
- 13) Prichard MN, Shipman C, Jr. : A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions. *Antiviral Res* 14 : 181-205, 1990.
- 14) Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR : Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86 : 367-377, 1996.
- 15) Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M : Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382 : 722-725, 1996.
- 16) Glass WG, McDermott DH, Lim JK, Lekhong S, Yu SF, Frank WA, Pape J, Cheshier RC, Murphy PM : CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection. *J Exp Med* 203 : 35-40, 2006.
- 17) Heidenhain C, Puhl G, Moench C, Lautem A, Neuhaus P : Chemokine receptor 5Delta32 mutation reduces the risk of acute rejection in liver transplantation. *Ann Transplant* 14 : 36-44, 2009.
- 18) Nichols WG, Steel HM, Bonny T, Adkison K, Curtis L, Millard J, Kabeya K, Clumeck N : Hepatotoxicity observed in clinical trials of aplaviroc (GW873140). *Antimicrob Agents Chemother* 52 : 858-865, 2008.
- 19) Hattori S, Ide K, Nakata H, Harada H, Suzu S, Ashida N, Kohgo S, Hayakawa H, Mitsuya H, Okada S : Potent activity of a nucleoside reverse transcriptase inhibitor, 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine, against human immunodeficiency virus type 1 infection in a model using human peripheral blood mononuclear cell-transplanted NOD/SCID Janus kinase 3 knockout mice. *Antimicrob Agents Chemother* 53 : 3887-3893, 2009.