

201409054A

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業（早期探索的・国際水準臨床研究事業）

京都大学臨床研究ハイウェイを活用した難治疾患・がん等の
新規治療法の開発

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 三嶋 理晃

平成27（2015）年 5月

目 次

I. 総括研究報告 京都大学臨床研究ハイウェイを活用した難治疾患・がん等の新規治療法の開発 三嶋 理晃	-----	1
II. 分担研究報告 新規C1k阻害剤の開発、新規DYRK1A阻害薬の開発 萩原 正敏、喜井 勲、高橋 良輔	-----	4
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	10
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	11

厚生労働科学研究費補助金
(医療技術実用化総合研究事業(早期探索的・国際水準臨床研究事業))
総括研究報告書

京都大学臨床研究ハイウェイを活用した難治疾患・がん等の
新規治療法の開発

研究代表者 三嶋 理晃 京都大学医学部附属病院長

研究要旨

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対する有効な治療法はなく、現在、DMD に対する治療として、エクソンスキッピング誘導による治療法の開発が試みられている。しかし、このエクソンスキッピング誘導療法の治療薬候補物質は、アンチセンス・オリゴヌクレオチド等であり、有効性・安全性・生産性などの面において様々な問題がある。本研究の候補化合物は、我々が世界で初めて発見した、ジストロフィン遺伝子のエクソンスキッピングを誘導する低分子化合物 (C1k 阻害剤) である。本化合物の発見は、エクソンスキッピング誘導療法を低分子化合物により可能とする、全く新しい、臨床応用性が極めて高い治療法の確立に大きく貢献するものである。

ダウン症の原因療法的な治療薬は皆無であり、本治療薬の開発は患者本人だけでなく、患者家族及びそれを支える社会に対しても大きな副音をもたらすことが予想される。本研究の候補化合物は、21 番染色体のダウン症責任領域 (DSCR) に含まれる DYRK1A を阻害する低分子化合物であることから、原因療法につながる可能性が高い。さらに、治験により DYRK1A 阻害剤の POC が明らかとなれば、ダウン症に対する新たな創薬標的が見出されたことにもつながり、この分野の研究進歩にも大いに貢献できると考えられる。

研究分担者氏名・所属研究機関名および所属研究機関における職名

萩原 正敏	・ 国立大学法人京都大学	・ 医学研究科形態形成機構学 教授
喜井 勲	・ 国立大学法人京都大学	・ 医学研究科形態形成機構学 特定助教
高橋 良輔	・ 国立大学法人京都大学	・ 医学研究科神経内科学 教授

A. 研究目的

本研究は、筋ジストロフィーに対する治療薬及びダウン症患者に好発するアルツハイマー病等の精神疾患に対する治療薬の創出を目的とする。

B. 研究方法

【筋ジストロフィー】

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、ジストロフィン遺伝子の異常により、骨格筋でジストロフィンが欠損することで発症する極めて重篤な遺伝病である。また、出生男児 3,500 人に 1 人の割合で発症する希少疾病でもある (日本における患者数は約 4,000 人)。現在、DMD に対する有効な治療法はなく、エクソンスキッピング誘導治療の開発等が試みられている。本治療の候補化合物として、様々なアンチセンス・オリゴヌクレオチドが検討され、臨床試験を実施している化合物もある。一方、我々は、エクソンスキッピングを誘導する候補化合物として、低分子化合物 (C1k 阻害剤) を世界で初めて発見した。本化合物の発見は、エクソンスキッピング誘導療法を低分子化合物により可能とすることによって、遺伝性難治疾患に対する全く新しい、薬物治療法の確立に道を拓いた。本研究では、見出すことに成功した開発候補化合物を用いて製剤規格化、非臨床 GLP 試験、GMP 製剤化を行った後、医師主導の臨床治験や臨床研究における POC の取得を目指す。

【ダウン症患者におけるアルツハイマー病等の精神疾患】

ダウン症候群は、母体の出産年齢が 35 歳以上で約 400 人に 1 人と高い割合で発症する染色体異常疾患である。候補化合物の標的因子は、DYRK1A であり、ダウン症候群の原因である第 21 番染色体トリソミーのダウン症責任領域に位置し、ダウン症患者の脳内で発現が亢進している。また、アルツハイマー病発症の原因として有望視されているタウ蛋白質の異常リン酸化を、DYRK1A が誘導することが示されている。以上より、DYRK1A はダウン症候群の精神・神経疾患発症の原因である可能性が高く、その活性を阻害することで、治療や予防が可能になると期待できる。本研究では、1~2 年目にモデルマウスにおいて、バイオマーカーを用いた薬効評価を実施。2~4 年目には *in vivo* 行動薬理評価、毒性試験・安全性薬理試験・薬効薬理試験・薬物動態試験・製剤化を検討する。4 年目以降に GMP 合成をすすめ、5 年目以降に医師主導治験あるいは臨床研究に取り組む。また、開発資金を得るために、製薬企業への導出を目指す。

C. 研究結果

【筋ジストロフィー】

開発候補化合物を用いて製剤規格化、非臨床試験、GMP 製剤化を行った後、臨床治験或いは臨床研究における POC の取得を目指す。平成 26 年度は毒性試験や安全性薬理試験を行うために経口投与可能な候補化合物の大量合成検討を実施した。また、TG003 とは別の選択的スプライシング介入化合物 RECTAS を発見し、より多くの患者を治療できる可能性を見出した。

【ダウン症患者におけるアルツハイマー病等の精神疾患】

開発候補化合物を用いてバイオマーカーを指標とした *in vivo* での薬効評価を実施した後、行動薬理評価を進め、さらに毒性試験などの非臨床試験を行う。製剤化と原薬の大量合成を検討後に薬事戦略相談を行って、医師主導治験に取り組むためのプロトコール作成を進める。平成 26 年度は様々な精神疾患モデル動物を用いた薬効評価を進め、アルツハイマー病モデル以外に、うつ病モデルにおいて治療効果を有することを見出した。一方で、ダウン症患者におけるアルツハイマー病の診断基準が定まっていないこと、認知機能とは異なる新規のエンドポイントを開発して POC 試験を組む必要があることが明らかとなり、一般のアルツハイマー病での治験は莫大な費用が必要となることから、平成 26 年度は、対象疾患の見直しを行うとともに製薬企業へのライセンスアウトを目指して交渉を進めた。

D. 考察

平成 26 年度の研究結果を踏まえ、本研究は、「筋ジストロフィー」と「ダウン症患者におけるアルツハイマー病等の精神疾患」とともに順調に推進している。

E. 結論

「筋ジストロフィー」と「ダウン症患者におけるアルツハイマー病等の精神疾患」とともに順調に推進しており、特に、候補化合物の大量合成検討をすすめたことで、毒性試験や安全性薬理試験を行うことが可能となった。また、新たな選択的スプライシング介入化合物を発見したことで、これまで対象外としていた患者を治療できる可能性を見出しており、社会が待ち望む治療薬の研究にさらに応えようとする力強い姿勢が示された。精神疾患治療薬の開発においては、ダウン症患者を対象とした臨床開発が困難であると判明したことから、一般のアルツハイマー病での治験を視野に入れて製薬企業へのライセンスアウト交渉を進め、同時に、うつ病などの精神疾患のモデル動物における治療効果を見出した。対象疾患の見直しを行う上で、候補化合物の *in vivo* における薬効を明らかにした点は特筆すべきであると考えられる。これら難治性疾患に対する治療薬は、世界中の人々が渴望するものであり、これら候補化合物についての迅速な研究と臨床展開を進めることには大きな意義があると考えられる。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

【筋ジストロフィー】

開発候補化合物の特許は、2004年1月に出願済みで、アメリカ、オーストラリアでは特許査定となっている。

出願番号：特願2010-146699

発明者：萩原正敏、片岡直行、松尾雅文、西田篤史

発明の名称：遺伝性疾患の予防・改善剤

出願人：国立大学法人神戸大学 国立大学法人東京医科歯科大学

日本出願日：2010年6月28日

PCT出願日：2011年6月27日 (PCT/JP2011/003655)

上記とは別に、開発候補化合物の特許として、本学と国立大学法人東京医科歯科大学および国立大学法人鹿児島大学との共同出願で2013年に出願を行った。

出願番号：特願2013-261396

発明者：萩原正敏、豊本雅靖、細谷孝充、吉田優、栗原崇

発明の名称：疼痛に関する化合物及び医薬組成物

出願人：国立大学法人京都大学、国立大学法人東京医科歯科大学、国立大学法人鹿児島大学

日本出願日：2013年12月18日

開発化合物が対象とする異常スプライシングとは異なる原因の異常スプライシングを是正できるスプライシング操作薬に関する特許として、本学と国立大学法人東京医科歯科大学との共願で2013年に出願を行った。

出願番号：特願2013-261396

発明者：萩原正敏、吉田優、細谷孝充

発明の名称：FD薬スクリーニング

出願人：国立大学法人京都大学、国立大学法人東京医科歯科大学

日本出願日：2013年7月12日

【ダウン症患者におけるアルツハイマー病等の精神疾患】

開発候補化合物の特許は、本学と国立大学法人東京医科歯科大学および（株）キノファーマとの共願で2012年に出願を行った。

出願番号：特願2012-168850

発明者：萩原正敏、小野木博、喜井勲、細谷孝充、隅田有人

発明の名称：精神神経疾患又は悪性腫瘍に関する化合物及び医薬組成物

出願人：国立大学法人京都大学、国立大学法人東京医科歯科大学、株式会社キノファーマ

日本出願日：2012年7月30日

上記に関連する特許として、本学と国立大学法人東京医科歯科大学との共願で2012年に出願を行った。

出願番号：特願2012-129094

発明者：萩原正敏、喜井勲、細谷孝充、隅田有人、吉田優

発明の名称：スクリーニング方法、タンパク質の不安定性及び/又は安定性を誘導する物質、及び、タンパク質の活性評価

出願人：国立大学法人京都大学、国立大学法人東京医科歯科大学

日本出願日：2012年6月6日

開発候補化合物の新たな用途の特許は、本学より2013年に出願を行った。

出願番号：特願2013-252443

発明者：萩原正敏、小林亜希子

発明の名称：神経新生に関する化合物及び医薬組成物

出願人：国立大学法人京都大学

日本出願日：2013年12月5日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
(医療技術実用化総合研究事業(早期探索的・国際水準臨床研究事業))
分担研究報告書

京都大学臨床研究ハイウェイを活用した難治疾患・がん等の
新規治療法の開発

研究分担者

萩原 正敏	京都大学医学研究科	形態形成機構学	教授
喜井 勲	京都大学医学研究科	形態形成機構学	特定助教
高橋 良輔	京都大学医学研究科	神経内科学	教授

研究要旨

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対する有効な治療法はなく、現在、DMD に対する治療として、エクソンスキッピング誘導による治療法の開発が試みられている。しかし、このエクソンスキッピング誘導療法の治療薬候補物質は、アンチセンス・オリゴヌクレオチド等であり、有効性・安全性・生産性などの面において様々な問題がある。本研究の候補化合物は、我々が世界で初めて発見した、ジストロフィン遺伝子のエクソンスキッピングを誘導する低分子化合物 (Clk 阻害剤) である。本化合物の発見は、エクソンスキッピング誘導療法を低分子化合物により可能とする、全く新しい、臨床応用性が極めて高い治療法の確立に大きく貢献するものである。

ダウン症の原因療法的な治療薬は皆無であり、本治療薬の開発は患者本人だけでなく、患者家族及びそれを支える社会に対しても大きな副音をもたらすことが予想される。本研究の候補化合物は、21 番染色体のダウン症責任領域内に含まれる DYRK1A を阻害する低分子化合物であることから、原因療法につながる可能性が高い。さらに、治験により DYRK1A 阻害剤の POC が明らかとなれば、ダウン症に対する新たな創薬標的が見出されたことにもつながり、この分野の研究進歩にも大いに貢献できると考えられる。

A. 研究目的

本研究は、エクソンスキッピングを誘導する Clk 阻害剤について、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) 治療薬としてヒトにおける POC の取得を目的とする。また、ダウン症患者に好発するアルツハイマー病などの精神疾患に対する治療薬の創出を目的とする。

B. 研究方法

【筋ジストロフィー】

DMD は、進行性の筋萎縮を呈する極めて重篤な遺伝病であり、その原因はジストロフィン遺伝子の異常による骨格筋のジストロフィン欠損である。DMD に対する有効な治療法はなく、現在、特定の欠陥のあるエクソンのスキッピングを誘導して、エクソンの配列を mRNA から取り除き、アミノ酸読み取り枠をインフレームにかえ、サイズの小さなジストロフィンを発現させるという、エクソンスキッピング誘導治療の開発が試みられている。このような療法の候補として、様々なアンチセンス・オリゴヌクレオチドがあるが、様々な問題点がある。一方、本研究で用いる Clk 阻害剤 TG003 は、世界で初めて発見された、ジストロフィン遺伝子のエクソンスキッピングを誘導する低分子化合物である。革新的細胞解析研究プログラム (セルイノベーション) において、C2C12 筋芽細胞株を用いたトランスクリプトーム解析で、TG003 が影響を与える遺伝子の網羅的解析を行い、安全評価のための基礎データが取得された。そこで、この基礎データから薬効および副作用のバイオマーカーを見出し、候補化合物の最適投与量などを算定する評価系を構築し、開発化合物の薬効および毒性をモニターしていく計画を想定している。加えて本事業では、TG003 と Clk 阻害能を示す構造類似化合物 (GIF304 など) の、ジストロフィン遺伝子のエクソンスキッピングなどの薬効、および代謝・毒性データを取得し、DMD の治療薬として最適な候補化合物を選択して、本研究を進める。さらに、平成 24 年度に、筋ジストロフィー治療薬候補化合物の中から、マウス炎症性疼痛モデルに投与することで鎮痛作用を発揮する化合物群を見出した。筋ジストロフィーは臨床症状として筋肉などの痛みが現れるため、鎮痛薬が処方されることから、筋ジストロフィー患者の抱える疼痛を同時に緩和できる治療薬としての可能性を探るため、薬理作用などの検討を進める。

【ダウン症患者におけるアルツハイマー病等の精神疾患】

ダウン症候群は、母体の出産年齢が 35 歳以上で約 400 人に 1 人と高い割合で発症する染色体異常疾患の中で最も頻度が高い疾患であり、治療薬は未だ皆無である。DYRK1A は、ダウン症候群の原因である第 21 番染色体トリソミーのダウン症責任領域に位置し、マウスでは DYRK1A の単独過剰発現によりダウン症に類似した精神・神経疾患を発症する (J Neuropathol Exp Neurol. 2004; 63:429-440, Hum Mol Genet. 2001;10:1915-1923)。さらに、DYRK1A 遺伝子はダウン症患者及びダウン症モデルマウスの脳内で発現が亢進している (Neurosci Lett. 2007;413:77-81)。これらのことは、DYRK1A がダウン症候群における精神・神経疾患発症の原因因子で

ある可能性を強く示唆している。一方、アルツハイマー病発症の原因では、現在タウ蛋白質の異常リン酸化が最も有望視されている。DYRK1Aは、タウ蛋白質の異常リン酸化を誘導することが示唆されていることから、DYRK1Aはアルツハイマー病様の精神・神経疾患と密接な関係を持つリン酸化酵素であると考えられ、その活性を阻害すれば、それらの精神・神経疾患の治療や予防が可能になると期待できる。加えてDYRK1Aなどに対する阻害剤は、他の疾患に対する治療効果も期待されるので、これらの検討も進める。本事業では創製に成功したDYRK1A阻害剤やそのバックアップ化合物の*in vivo*行動薬理評価を進めると共に、製剤化検討をおこない、最適な開発化合物を決定し、毒性試験・安全性薬理試験・薬効薬理試験・薬物動態試験データを取得し、臨床試験への導入を目指す。

(倫理面への配慮)

本研究において実施する動物実験については、京都大学動物実験委員会の「動物実験関連法等 - 動物の愛護・管理」を遵守し実施した。また、動物実験の一部は受託試験であり、AAALAC International (The Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International/国際実験動物管理公認協会)により認証されている(認証番号:001107)試験施設において、「動物の愛護及び管理に関する法律」及び「株式会社イナリサーチ動物実験指針」を遵守し、試験施設の動物実験審査委員会(IACUC)による審査を受けた試験計画書に従って適正に実施され、あるいは、動物の愛護及び管理に関する法律「昭和48年法律第105号」の改正法(日本)(平成23年8月30日)及び株式会社浜松ファーマリサーチの動物実験規定に基づいて実施された(動物実験計画書承認番号HPRIRB-104)。

C. 研究結果

【筋ジストロフィー】

開発候補化合物を用いて製剤規格化、非臨床試験、GMP製剤化を行った後、臨床治験或いは臨床研究におけるPOCの取得を目指す。平成25年度までに、薬効薬理試験や薬物動態試験を行った結果、TG003よりも経口吸収性に優れ、経口投与可能な構造類似化合物を開発候補化合物として見出している。さらに、筋ジストロフィー患者が抱える疼痛も同時に緩和出来る可能性を有する開発候補化合物も見出している。平成26年度は毒性試験や安全性薬理試験を行うために経口投与可能な候補化合物の大量合成検討を実施した。医薬品開発の第一段階としてGLP基準に準拠した非臨床試験が必要であり、そのためにはGLP基準に準拠した候補化合物原体が必要とされる。原体製造には原体の原料を調達する必要があるが、合成に必要な量の原料を購入することができないため、まずその原料の合成検討を委託した。その後、原料の合成が齟齬なく進められると確認できたため、さらに原料のスケールアップ合成検討を委託した。スケールアップ合成も予定通り進められたことから、原体の製造を実施し、候補化合物5.8 kgを取得した。一方で、TG003とは異なる遺伝子配列を操作できる選択的スプライシング介入化合物RECTASを発見した(Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112:2764)。これはTG003とは異なる作用、すなわちエクソンインクルージョンを誘導する活性を示すことから、これまで対象外としていた患者を治療できる可能性を見出した。

【ダウン症患者におけるアルツハイマー病等の精神疾患】

開発候補化合物を用いて、バイオマーカーを指標とした*in vivo*での薬効評価を実施した後、行動薬理評価を進め、さらに毒性試験などの非臨床試験を行う。製剤化と原薬の大量合成を検討後に薬事戦略相談を行って、臨床治験に取り組むためのプロトコール作成を進める。平成25年度までに、候補化合物の*in vivo*での薬効や、神経幹細胞での安全性の確認、更に、ダウン症の白血病治療にも効果を有することを明らかにしている。また、原薬の大量合成経路確立を目的として、開発候補化合物および、その中間体化合物のスケールアップ合成を検討し、入手性・反応条件・工程数が優位である合成ルートを確認させている。平成26年度は、様々な精神疾患モデル動物を用いた薬効評価を進め、アルツハイマー病モデル以外に、コルチコステロン投与によるうつ様モデルや社会的ストレスうつ病モデルにおいて治療効果を有することを見出した。具体的には、明暗往来テストにおいて、マウスへのコルチコステロン投与による不安様行動の亢進が、30 mg/kgの開発化合物を3週間連日経口投与することによって改善された。あるいは、社会挫折ストレスうつ病モデルの社会忌避行動が、候補化合物の1週間連日経口投与によって改善された。また、平成25年度に合成した候補化合物を用いて遺伝毒性試験を委託し、「細菌を用いる復帰突然変異試験」において候補化合物の遺伝子突然変異誘発性が陰性であること、「マウス*in vivo*小核試験」において候補化合物の赤血球小核誘発能が陰性であることを確認した。

一方、革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業(厚生労働省)「アルツハイマー病に対する創薬の非臨床評価及び薬剤疫学を踏まえた実臨床における留意点及び課題」(国立大学法人 京都大学大学院医学研究科 平成27年2月)において、ダウン症患者におけるアルツハイマー病の診断基準が定まっていないこと、認知機能とは異なる新規のエンドポイントを開発してPOC試験を組む必要があることが明らかとなり、一般のアルツハイマー病での治験は莫大な費用が必要となることから、2014年度は、対象疾患の見直しを行うとともに製薬企業へのライセンスアウトを目指して交渉を進めた。

D. 考察

平成26年度の研究結果を考慮するに、本研究「筋ジストロフィー」と「ダウン症患者におけるアルツハ

イマー病等の精神疾患」はともに順調に推進している。平成26年度は筋ジストロフィー治療薬候補化合物の大量合成を実施し、平成27年度における毒性試験や安全性薬理試験の実施が可能となった。臨床試験へ向けて着実に前進していると考えられる。また、新規の選択的スプライシング介入化合物 RECTAS の発見は、特筆すべき成果であり、臨床応用への可能性が期待できることから、さらに検討を進めるべきであると考えられる。精神疾患治療薬候補化合物についても、平成26年度は遺伝毒性試験を実施した一方で、対象疾患の可能性を探る検討や製薬企業との交渉を進めており、プロジェクトの「出口」であるライセンスアウトに向けて推進していると考えられる。

E. 結論

筋ジストロフィーに関しては、平成26年度に大量合成した候補化合物原体を用いて、原薬・製剤の規格化を進め、被験物質の特性試験、安定性試験、細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験などの毒性試験や中枢神経系・呼吸・循環器などへの薬理作用を評価する安全性薬理試験を開始する。さらに、医師主導臨床治験或いは臨床研究プロトコルの検討および作成を進める。同時に、鎮痛作用メカニズムの解明や新規の選択的スプライシング介入化合物の適応を目指して検討を進める。

アルツハイマー病等の精神疾患に関しては、アルツハイマー病、タウオパチー、パーキンソン病、うつ病など、様々な適応疾患への可能性を探りながら、臨床治験のプロトコル検討を進める。同時に、安全性薬理試験・毒性試験の検討も行う。また、治験費用獲得のため、製薬企業へのライセンスアウトを目指して交渉を行う。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記入

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamamoto M, Onogi H, Kii I, Yoshida S, Iida K, Sakai H, Abe M, Tsubota T, Ito N, Hosoya T, and Hagiwara M

CDK9 inhibitor FIT-039 prevents replication of multiple DNA viruses.
J Clin Invest. 2014;124(8):3479-3488

2) Kuwasako K, Takahashi M, Unzai S, Tsuda K, Yoshikawa S, He F, Kobayashi N, Guntert P, Shirouzu M, Ito T, Tanaka A, Yokoyama S, Hagiwara M, Kuroyanagi H, and Muto Y.
RBF0X and SUP-12 sandwich a guanine base to form a stable complex and regulate tissue-specific splicing.

Nat. Struct. Mol. Biol. 2014;21(9):778-786

3) Yoshida M, Kataoka N, Miyauchi K, Ohe K, Iida K, Yoshida S, Nojima T, Okuno Y, Onogi H, Usui T, Takeuchi A, Hosoya T, Suzuki T, and Hagiwara M

Rectifier of aberrant mRNA splicing recovers tRNA modification in familial dysautonomia.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(9):2764-2769.

2. 学会発表

【国際】

1) Masatoshi Hagiwara

"Challenges to cure genetic diseases with RNA-targeting chemical compounds"

2014 COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES RNA Biology

2014. 11. 10-14 Suzhou, China

会場：Suzhou Industrial Park Conference Center

発表：2014年11月12日（口頭）

2) Akihide Takeuchi, Kei Iida, Kensuke Ninomiya, Mikako Ito, Kinji Ohno, Masatoshi Hagiwara

"RNA-Binding Protein Sfpq is required for the transcriptional elongation of long neuronal genes essential for brain development and relating to schizophrenia"

2014 COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES RNA Biology

2014. 11. 10-14 Suzhou, China

会場：Suzhou Industrial Park Conference Center

発表：2014年11月14日（口頭）

3) Akihide Takeuchi, Kei Iida, Kensuke Ninomiya, Mikako Ito, Kinji Ohno, Masatoshi Hagiwara
"RNA Binding Protein Sfpq is required for the expression of schizophrenia-related long neuronal genes"
Society for Neuroscience 2014 Annual Meeting
2014. 11. 15-19 Washington DC, USA
会場：Washington DC Convention Center
発表：2014年11月18日（ポスター）

【国内】

- 1) 二宮賢介、佐古有季哉、萩原正敏
「変異ジストロフィン遺伝子の新規エキソスキップ誘導法による筋ジストロフィー治療法開発の試み」
第9回日本ケミカルバイオロジー学会年会
9th Annual Meeting of Japanese Society for Chemical Biology
2014. 6/11-13, 大阪
会場：大阪大学 豊中キャンパス 大阪大学会館
発表：2014年6月12日（ポスター）
- 2) 豊本雅靖、喜井勲、栗原崇、木村亮、小野木博、山本誠、吉田優、細谷孝充、萩原正敏
「副作用を示さない新規疼痛治療薬候補化合物の発見」
第9回日本ケミカルバイオロジー学会 年会
9th Annual Meeting of Japanese Society for Chemical Biology
2014. 6. 11-13, 大阪
会場：大阪大学 豊中キャンパス 大阪大学会館
発表：2014年6月12日（口頭）
- 3) 喜井勲、奥野友紀子、隅田有人、後藤利保、吉田優、澁谷浩司、安倍美奈子、伊藤暢聡、細谷孝充、萩原正敏
「リン酸化酵素 DYRK1A のフォールディング中間体を標的とした新規阻害剤の開発」
第125回日本薬理学会近畿部会 岡山
2014. 6. 20
会場：岡山コンベンションセンター
発表：2014年6月20日（金）14:30～15:30（口演）
- 4) 片岡直行、吉田真弓、宮内健常、大江賢治、薄井知美、鈴木勉、萩原正敏
「家族性自律神経失調症における *IKBKAP* 遺伝子の異常スプライシングの低分子化合物による是正」
第16回日本RNA学会年会
2014. 7/23-25
会場：ウイנקあいち
発表：2014年7月23日（口頭）
- 5) 王丹、二宮賢介、北嶋真、萩原正敏、大野睦人、片岡直行
「ヒト神経細胞内における翻訳休止状態の mRNA 輸送複合体」
第16回日本RNA学会年会
2014. 7. 23-25
会場：ウイנקあいち
発表：2014年7月25日（口頭）
- 6) 武内章英、飯田慶、二宮賢介、坪田智明、出縄政嗣、伊藤美佳子、大野欽司、萩原正敏
「RNA 結合タンパク質 Sfpq は、統合失調症に関連する神経特異的な長い遺伝子の転写に必須である」
第16回日本RNA学会年会
2014. 7. 23-25
会場：ウイנקあいち
発表：2014年7月24日（ポスター）

7) 栗原崇、櫻井絵里、豊本雅靖、喜井勲、川元大輔、朝田俊秀、田邊勉、吉村恵、萩原 正敏、宮田篤郎
「炎症性疼痛モデルマウスに対するカゼインキナーゼ1 (CK1) 阻害薬の抗侵害効果」
第37回日本神経科学大会
Neuroscience2014, The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
2014. 9/11. 13
会場：パシフィコ横浜
発表：2014年9月11日（ポスター）

8) 祖納元りえ、喜井勲、小池悠華、萩原正敏
「リン酸化酵素とシャペロンの結合を指標とした阻害剤評価系の構築」
第37回日本分子生物学会年会
2014. 11. 25-27 横浜
会場：パシフィコ横浜
発表：2014年11月27日（ポスター）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

【筋ジストロフィー】

開発候補化合物の特許は、2004年1月に出願済みで、アメリカ、オーストラリアでは特許査定となっている。

出願番号：特願2010-146699

発明者：萩原正敏、片岡直行、松尾雅文、西田篤史

発明の名称：遺伝性疾患の予防・改善剤

出願人：国立大学法人神戸大学 国立大学法人東京医科歯科大学

日本出願日：2010年6月28日

PCT出願日：2011年6月27日 (PCT/JP2011/003655)

上記とは別に、開発候補化合物の特許として、本学と国立大学法人東京医科歯科大学および国立大学法人鹿児島大学との共同出願で2013年に出願を行った。

出願番号：特願2013-261396

発明者：萩原正敏、豊本雅靖、細谷孝充、吉田優、栗原崇

発明の名称：疼痛に関する化合物及び医薬組成物

出願人：国立大学法人京都大学、国立大学法人東京医科歯科大学、国立大学法人鹿児島大学

日本出願日：2013年12月18日

開発化合物が対象とする異常スプライシングとは異なる原因の異常スプライシングを是正できるスプライシング操作薬に関する特許として、本学と国立大学法人東京医科歯科大学との共願で2013年に出願を行った。

出願番号：特願2013-261396

発明者：萩原正敏、吉田優、細谷孝充

発明の名称：FD薬スクリーニング

出願人：国立大学法人京都大学、国立大学法人東京医科歯科大学

日本出願日：2013年7月12日

【ダウン症患者におけるアルツハイマー病】

開発候補化合物の特許は、本学と国立大学法人東京医科歯科大学および（株）キノファーマとの共願で2012年に出願を行った。

出願番号：特願2012-168850

発明者：萩原正敏、小野木博、喜井勲、細谷孝充、隅田有人

発明の名称：精神神経疾患又は悪性腫瘍に関する化合物及び医薬組成物

出願人：国立大学法人京都大学、国立大学法人東京医科歯科大学、株式会社キノファーマ

日本出願日：2012年7月30日

上記に関連する特許として、本学と国立大学法人東京医科歯科大学との共願で2012年に出願を行った。

出願番号：特願2012-129094

発明者：萩原正敏、喜井勲、細谷孝充、隅田有人、吉田優

発明の名称：スクリーニング方法、タンパク質の不安定性及び/又は安定性を誘導する物質、及び、タンパク質の活性評価

出願人：国立大学法人京都大学、国立大学法人東京医科歯科大学

日本出願日：2012年6月6日

開発候補化合物の新たな用途の特許は、本学より2013年に出願を行った。

出願番号：特願2013-252443
発明者：萩原正敏、小林亜希子
発明の名称：神経新生に関する化合物及び医薬組成物
出願人：国立大学法人京都大学
日本出願日：2013年12月5日

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamamoto M, Onogi H, <u>Kii I</u> , Yoshida S, Iida K, Sakai H, Abe M, Tsubota T, Ito N, Hosoya T, and <u>Hagiwara M</u> .	CDK9 inhibitor FIT-039 prevents replication of multiple DNA viruses.	J Clin Invest.	124 (8)	3479-3488	2014
Kuwasako K, Takahashi M, Unzai S, Tsuda K, Yoshikawa S, He F, Kobayashi N, Güntert P, Shirouzu M, Ito T, Tanaka A, Yokoyama S, <u>Hagiwara M</u> , Kuroyanagi H, and	RBFOX and SUP-12 sandwich a guanine base to form a stable complex and regulate tissue-specific splicing.	Nat. Struct. Mol. Biol.	21 (9)	778-786	2014
Yoshida M, Kataoka N, Miyauchi K, Ohe K, Iida K, Yoshida S, Nojima T, Okuno Y, Onogi H, Usui T, Takeuchi A, Hosoya T, Suzuki T, and <u>Hagiwara M</u> .	Rectifier of aberrant mRNA splicing reverses tRNA modification in familial dysautonomia.	Proc Natl Acad Sci U S A.	112 (9)	2764-2769	2015
<u>萩原正敏</u>	「より多様なウイルスに効く次世代抗ウイルス薬を開発 萩原正敏教授（京都大学大学院医学研究科）に聞く」	月刊「化学」	Vol. 69 No. 9	73	2014
木村亮、 <u>萩原正敏</u>	「RNA病」	分子精神医学	Vol. 14 No. 2	62-63	2014

CDK9 inhibitor FIT-039 prevents replication of multiple DNA viruses

Makoto Yamamoto,^{1,2,3} Hiroshi Onogi,² Isao Kii,³ Suguru Yoshida,⁴ Kei Iida,⁵ Hiroyuki Sakai,⁶ Minako Abe,⁷ Toshiaki Tsubota,³ Nobutoshi Ito,⁷ Takamitsu Hosoya,⁴ and Masatoshi Hagiwara^{3,5}

¹Department of Developmental and Regenerative Biology, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan. ²KinoPharma Inc., Tokyo, Japan. ³Department of Anatomy and Developmental Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan. ⁴Laboratory of Chemical Bioscience, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan. ⁵Medical Research Support Center, Kyoto University, Kyoto, Japan. ⁶Department of Viral Oncology, Institute for Virus Research Kyoto University, Kyoto, Japan.

⁷Laboratory of Structural Biology, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan.

A wide range of antiviral drugs is currently available; however, drug-resistant viruses have begun to emerge and represent a potential public health risk. Here, we explored the use of compounds that inhibit or interfere with the action of essential host factors to prevent virus replication. In particular, we focused on the cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) inhibitor, FIT-039, which suppressed replication of a broad spectrum of DNA viruses through inhibition of mRNA transcription. Specifically, FIT-039 inhibited replication of herpes simplex virus 1 (HSV-1), HSV-2, human adenovirus, and human cytomegalovirus in cultured cells, and topical application of FIT-039 ointment suppressed skin lesion formation in a murine HSV-1 infection model. FIT-039 did not affect cell cycle progression or cellular proliferation in host cells. Compared with the general CDK inhibitor flavopiridol, transcriptome analyses of FIT-039-treated cells revealed that FIT-039 specifically inhibited CDK9. Given at concentrations above the inhibitory concentration, FIT-039 did not have a cytotoxic effect on mammalian cells. Importantly, administration of FIT-039 ameliorated the severity of skin lesion formation in mice infected with an acyclovir-resistant HSV-1, without noticeable adverse effects. Together, these data indicate that FIT-039 has potential as an antiviral agent for clinical therapeutics.

Introduction

The number of available antiviral drugs has increased continually since the development of azidothymidine and acyclovir (ACV) in the 1970s (1, 2). However, this has resulted in the emergence of drug-resistant viruses, including HIV, hepatitis B, and the herpes simplex virus (HSV), which cause drug failures (3, 4). Although the drug resistance of HSV to ACV and related drugs, such as famciclovir or valacyclovir, rarely occurs in immunocompetent individuals, it has been more commonly reported in immunocompromised patients, including patients with HIV and transplant recipients (5). A focus on host cellular proteins (6–8) is necessary to overcome drug resistance to antiviral agents, because viruses often change their genomic sequences and acquire drug resistance (4). We have developed chemical inhibitors that target host kinases as antiviral agents, which prevent the replication of several viruses, including the hepatitis C virus, dengue virus, and Sindbis virus (9–12). To develop novel drugs, we have been recently focusing on cyclin-dependent protein kinases (CDKs), which are known to be used for virus replication (13–16).

CDKs comprise a family of serine/threonine kinases that play essential roles in the regulation of multiple cellular processes and can be divided into two major groups: CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, and CDK6 are directly involved in cell cycle regulation, while CDK5, CDK7, CDK8, CDK9, CDK11, CDK12, and CDK13

have been implicated in the control of gene transcription (17, 18). The virus-specific regulation of CDK activity has been reported, as described below. CDK1 was shown to activate the expression of HSV-1 late genes (19), while CDK2 promoted the replication of adenovirus, papillomavirus, and herpes virus DNAs (7). CDK7 and CDK9 were shown to activate viral RNA transcription in HIV and HSV (7, 14, 15, 20–24). Feichtinger et al. recently described the interaction between CDK9/cyclin T1 and viral mRNA export factor pUL69 in human cytomegalovirus (HCMV), which belongs to the β subgroup of *Herpesviridae* (20). In mammalian cells, CDK9/cyclin T1 (or T2) is part of the subunit of the positive transcription elongation factor b (P-TEFb) complex and reportedly initiated the transcriptional elongation of genes by phosphorylating the carboxyterminal domain (CTD) of RNA polymerase II at Ser2 (25). These findings indicate that CDKs are also used in viral DNA replication and transcription.

Flavopiridol is a pan-specific CDK inhibitor that has been shown to inhibit CDK1, CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, and CDK9 and suppress the replication of HSV, HCMV, human adenovirus (HAdV), and HIV (15). Roscovitine, an oligo-specific CDK inhibitor that inhibits CDK1, CDK2, CDK5, CDK7, CDK9, and CDK12, suppresses the transcription of immediate-early genes (IEGs) of HCMV and prevents viral replication in vitro (14, 26–28). However, these broad-spectrum CDK inhibitors often negatively affect cell cycle progression and elicit adverse effects, which lead to difficulties in the development of antiviral drugs (29).

In this study, we developed the CDK9 inhibitor, FIT-039, which suppressed the replication of HSV and other DNA viruses, including

Conflict of interest: Makoto Yamamoto and Hiroshi Onogi are employees of KinoPharma Inc. Masatoshi Hagiwara owns equity in and is a consultant for KinoPharma Inc.

Submitted: October 17, 2013; **Accepted:** May 23, 2014.

Reference information: *J Clin Invest*. 2014;124(8):3479–3488. doi:10.1172/JCI73805.

HCMV and HAdV. It also suppressed the replication of ACV-resistant HSV-1, not only in vitro, but also in vivo. Our ongoing preclinical studies have shown no significant adverse effects. These findings suggest that FIT-039 is a promising compound for the therapeutic treatment of drug-resistant HSVs and other DNA viruses.

Results

Requirement of CDK9 for HSV-1 replication but not for host cell cycle progression. To establish whether CDK9 was required for HSV-1 replication, we investigated the replication level of HSV-1 in HeLa cells transfected with CDK9 siRNA or scramble dsRNA as a negative control (Supplemental Figure 1A; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI73805DS1). The cells were infected with HSV-1 at a MOI of 0.1 PFU per cell, and the copy number of HSV-1 genomic DNA was measured using real-time PCR. Knockdown of CDK9 significantly suppressed the replication of HSV-1 genomic DNA (Supplemental Figure 1B), which demonstrated the necessity for CDK9 in the replication of HSV-1. In addition, knockdown of CDK9 had a similar effect on cell cycle progression to that of the negative control, whereas CDK4 reduced the number of S-phase cells (Supplemental Figure 1, C and D). These results support our hypothesis that CDK9 is a potential target for anti-HSV-1 drug discovery.

Identification of a CDK9-selective inhibitor. To obtain a selective inhibitor for CDK9, we performed in vitro screening assays on our original synthetic chemical library to identify small molecules that suppressed the kinase activity of CDK9 but not that of CDK4. As a result, we found a good candidate, *N*-[5-fluoro-2-(1-piperidinyl)phenyl]isonicotinethioamide (Figure 1A), which we refer to herein as FIT-039 (Figure 1A), which we refer to herein as FIT-039. This compound suppressed the in vitro kinase activity of CKD9/cyclin T1 with an IC_{50} value of 5.8 μ M but did not have a marked inhibitory effect on CDK4/cyclinD3 up to 30 μ M (Figure 1B). FIT-039 also did not inhibit other CDKs, including CDK2/cyclinB1, CDK2/cyclinE1, CDK5/p25, CDK6/cyclinD3, or CDK7/cyclinH/MAT (Supplemental Figure 2). We checked the effect of FIT-039 on other kinases and found that FIT-039 potently suppresses 8 kinases (GSK3 β , PKN1, haspin, p70s6K, DYRK1B, GSK3 α , IRR, and DYRK3) other than CDK9 on the 332-kinase panel (Figure 1C and Supplemental Table 1).

To examine whether FIT-039 bound to the ATP-binding pocket of CDK9, we analyzed the inhibitory action of FIT-039 on CKD9/cyclin T1 activity with a double-reciprocal Lineweaver-Burk plot, which demonstrated that FIT-039 competed with ATP for CDK9 (Supplemental Figure 3). We then performed a docking simulation to verify the binding properties of FIT-039 to the ATP-binding pocket of CDK9. LYS48 and CYS106 of CDK9 were speculated to interact with FIT-039 by forming hydrogen bonds with the fluoride group and nitrogen atom of pyridine, respectively (Figure 1D). On the other hand, LYS35 of CDK4, which corresponds to LYS48 of CDK9, appeared to serve as a steric hindrance to the binding of FIT-039 to the ATP-binding pocket of CDK4 (Figure 1E), which rationalized the selective inhibition of CDK9 by FIT-039.

FIT-039 suppressed viral replication without affecting the host cell cycle. The anti-HSV-1 activity of FIT-039 was examined with a plaque reduction assay using Vero cells at a MOI of 100 PFUs per well. FIT-039 suppressed plaque formation in a dose-dependent

manner as potently as ACV, which was used as a positive control (Figure 1F). To investigate how FIT-039 suppressed plaque formation, we first examined the effect of FIT-039 on the replication of HSV-1 genomic DNA. FIT-039 inhibited replication of the HSV-1 genome in a dose-dependent manner (EC_{50} and EC_{80} were 0.69 μ M and 4.0 μ M, respectively), without any adverse effect on cell viability until levels of FIT-039 reached the solubility limit (Figure 1G). Although flavopiridol also suppressed replication of the HSV-1 genome (EC_{50} and EC_{80} were 34 nM and 79 nM, respectively), cell viability was also reduced at the same dose range (data not shown). These results demonstrate that FIT-039 is a novel type of CDK9 inhibitor, which has the potential to be an anti-HSV-1 drug.

Anti-HSV-1 activity of FIT-039 was brought through CDK9 inhibition. To assess the relationship between the inhibitory potency of FIT-039 on CKD9/cyclin T1 activity and HSV-1 replication, we synthesized some amide and thioamide analogs with different nitrogen substituents, including hexamethyleneimine and an indolyl group, and evaluated their CDK9 inhibitory activity and anti-HSV-1 effects (Figure 1H). Substitution of the piperidinyl group at the R_1 position with a larger homopiperidinyl group and of sulfur at the R_2 position with oxygen decreased both the anti-HSV-1 and CDK9 inhibitory activities. On the other hand, the loss of inhibitory activity was observed when the R_1 group was changed to indolyl. The anti-HSV-1 activities of these compounds correlated with their inhibitory activities on CDK9 ($R^2 = 0.92$), which strongly suggested that the antiviral effect of FIT-039 was triggered by the inhibition of CDK9.

FIT-039 inhibited viral transcription. CDK9 is part of the subunit of the P-TEFb complex and promotes transcriptional elongation through phosphorylation of the CTD of RNA polymerase II (25). To elucidate the antiviral mechanism of FIT-039 on the HSV-1 replication, we investigated whether FIT-039 affects the phosphorylation of the CTD of RNA polymerase II, because several CDKs, including CDK9, phosphorylate the CTD of RNA polymerase II (18). HEK293 cells were infected with HSV-1 at a MOI of 0 or 0.1 PFUs per cell and then were treated with FIT-039 or flavopiridol for 3 hours. FIT-039 decreased phosphorylated CTD in the infected or noninfected cells to a level lower than that shown by flavopiridol (Figure 2A). Accordingly, FIT-039 reduced the expression levels of HSV-1 IEGs and early and late genes (Figure 2B and Supplemental Figure 4). IEGs are transcribed immediately after the viral infection, and their encoded proteins regulate the transcription of early and late viral genes (30). These results indicated that the antiviral mechanism may be attributed to the inhibition of the viral transcription through suppression of the CTD phosphorylation of RNA polymerase II.

Effect of FIT-039 on transcriptome of host cells. We next evaluated the effect of FIT-039 on host cellular transcriptome. HeLa cells were incubated with FIT-039 or flavopiridol at the concentration of IC_{80} for 24 hours, and cellular RNAs were collected and subjected to microarray analysis. The solvent DMSO was used as a negative control. We compared divergences in gene expression between FIT-039 and flavopiridol with scatter plots (Figure 2, C and D) and *F* tests. We found that fold changes in FIT-039/DMSO were smaller than those in flavopiridol/DMSO. The *F* test showed that the difference between SDs of these 2 data sets was statistically significant ($P < 10^{-10}$, Figure 2E), which implied that FIT-039 produced a less

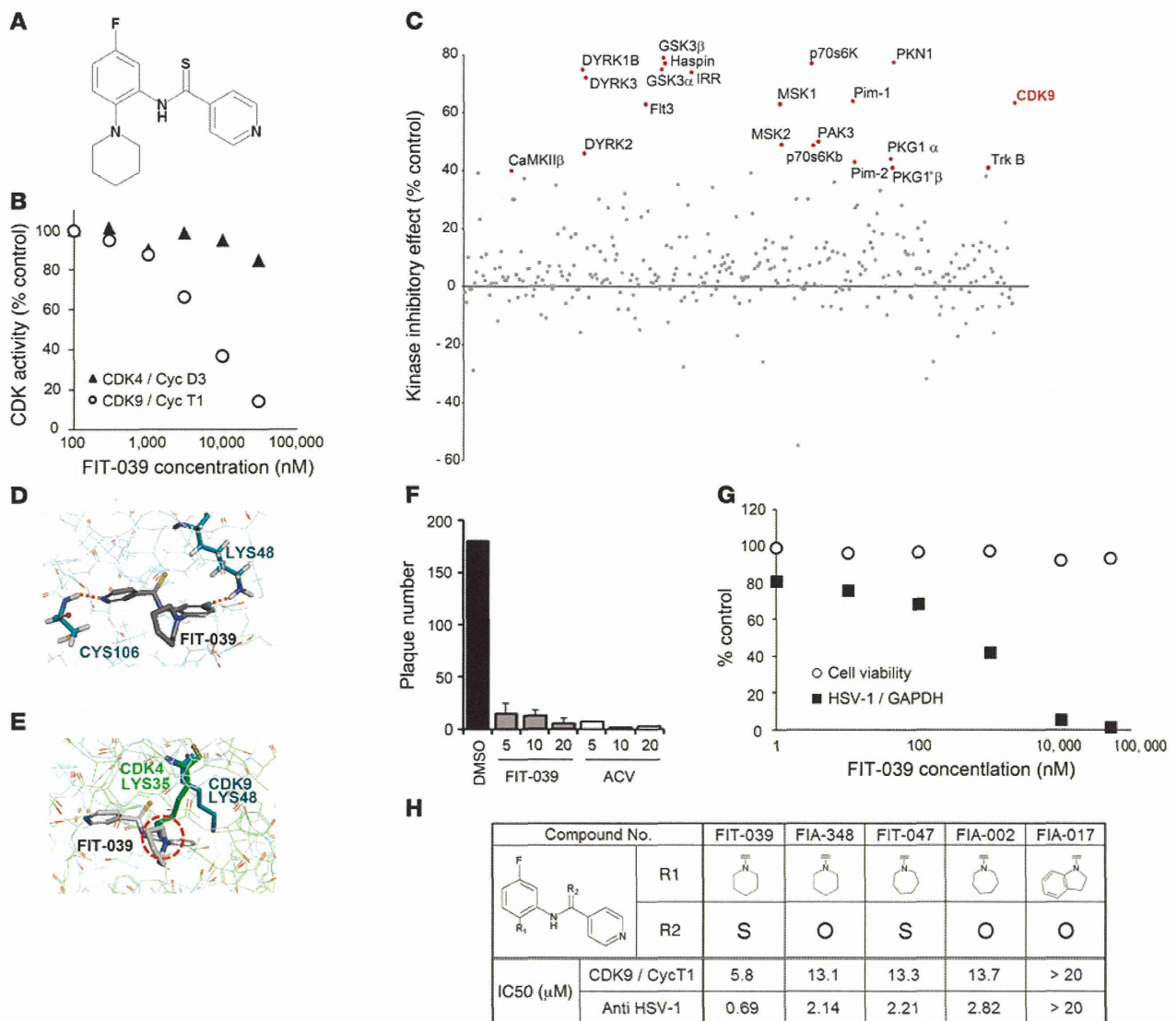


Figure 1. Identification of the CDK9-selective inhibitor FIT-039, which suppressed the replication of HSV-1. (A) Chemical structure of FIT-039. (B) In vitro kinase assay of CDK9/cyclin T1 and CDK4/cyclinD3. An increased amount of FIT-039 inhibited CDK9/cyclin T1 but not CDK4/cyclinD3. (C) Scatter plots of the 332-kinase panel of FIT-039 (10 μM). Red dots indicate greater than 40% inhibition. (D) A structural model for FIT-039 bound to CDK9. FIT-039 formed 2 hydrogen bonds in the ATP-binding pocket, in which LYS48 and CYS106 interacted with the fluoride moiety and nitrogen atom of the pyridine of FIT-039, respectively. (E) The ATP-binding pocket of CDK4 (thin green lines) was superimposed onto that of CDK9 (thin blue lines) in the CDK9/FIT-039 complex model shown in Figure 2D. The different orientation of the side chain of LYS35 of CDK4, which corresponds to the LYS48 of CDK9, would hinder the binding of FIT-039 to CDK4. (F) FIT-039 suppressed the plaque formation caused by the HSV-1 infection in a dose-dependent manner. HSV-1 plaque reduction assay was performed in Vero cells treated with DMSO, FIT-039, and ACV. (G) FIT-039 inhibited the replication of HSV-1 genomic DNA in a dose-dependent manner without cytotoxicity. HSV-1 replication and cytotoxicity were analyzed by real-time PCR and the WST-8 assay, respectively. (H) Structure-activity relationship. The chemical structures of FIT-039 and its derivatives are shown. IC₅₀ values of anti-HSV-1 activity were determined by real-time PCR of HSV-1 genomic DNA replication in infected HeLa cells. The IC₅₀ values of CDK9/cyclin T1 inhibitory activity were calculated by the in vitro kinase assay. The IC₅₀ values of anti-HSV-1 activity were correlated with those of CDK9/cyclin T1 activity ($R^2 = 0.92$).

significant effect on cellular transcriptome than that of flavopiridol, whereas FIT-039 and flavopiridol similarly suppressed the viral transcription of IEGs and early and late genes of HSV-1 under these experimental conditions (Supplemental Figure 4).

To verify the difference in cytotoxicity between FIT-039 and flavopiridol, we examined the effect of these compounds on the cell cycle at a concentration 10 times higher than the IC₈₀. FIT-039 did not affect cell cycle progression up to 40 μM, whereas flavopiridol arrested the cell cycle at the G₂/M phase (Figure 2F),

which demonstrated that flavopiridol caused a severe adverse effect. On the other hand, a preclinical study showed that FIT-039 did not affect body weight gain in mice administrated with an overdose of this compound (1,000 mg/kg/d) for 14 days (Figure 2G), and no changes were observed in biological markers in their blood (Supplemental Table 2).

Therapeutic activity of FIT-039 in mice. The therapeutic effect of FIT-039 was evaluated in the murine zosteriform spread model, which mimics recurrent cutaneous herpetic disease. FIT-039

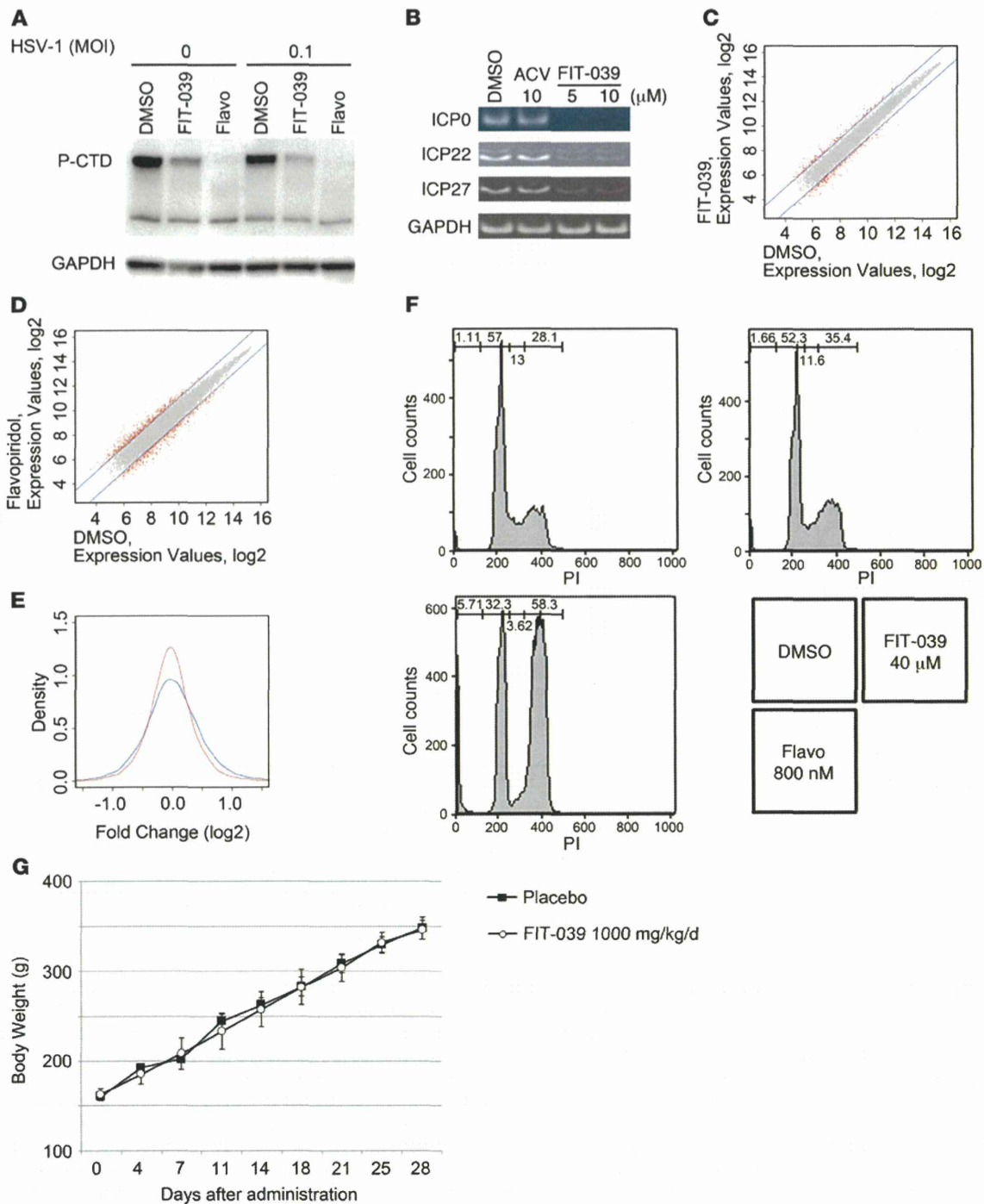


Figure 2. FIT-039 inhibited the transcription of HSV-1 IEGs. (A) HEK293 cells were infected with HSV-1 at a MOI of 0.1 PFUs per cell, and then the cells were treated with FIT-039 (30 μ M) or flavopiridol (1 μ M) for 3 hours. RNA polymerase II was detected by antibody against RNA polymerase II with Western blotting analysis. P-CTD, phosphorylated RNA polymerase II CTD. (B) HSV-1-attached cells were incubated for 3 hours with the indicated compounds. HSV-1 IEGs were analyzed by RT-PCR. (C and D) Overlaid scatter plots comparing mRNA expression. Two comparisons of the expression signals (C) between the FIT-039 and DMSO and (D) between the flavopiridol and DMSO treatments were analyzed. Two-fold variations in expression signals were plotted in red. (E) *F* tests comparing the divergences of gene expression between FIT-039 (red line) and flavopiridol (blue line). (F) HeLa cells were treated with FIT-039 and flavopiridol at a concentration 10-fold higher than that of the IC_{50} value of anti-HSV-1 for 24 hours. The cells were stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry. (G) Two-week repeated-dose oral toxicity study in rats. FIT-039 (1,000 mg/kg) or the solvent (carboxymethylcellulose) were administered orally to male rats once a day for 14 days. Body weights and general conditions were determined for 28 days from the first administration. Flavo, flavopiridol.

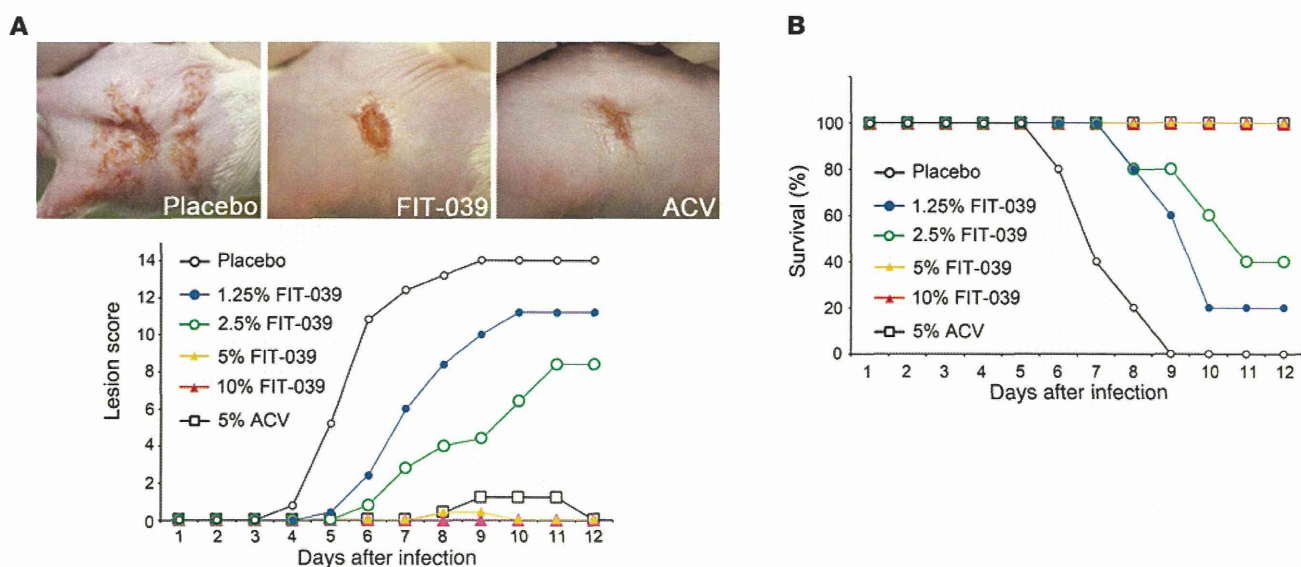


Figure 3. The FIT-039 ointment suppressed skin lesions caused by HSV-1 infection. The scratched skins of mice were infected intracutaneously with HSV-1 and then treated with ointments containing the indicated concentrations of FIT-039. The ACV ointment was used as a positive control. Five mice were subjected to each experimental group. (A) The lesion score and (B) survival rate were determined. (A) Representative photographs of the infected mice 7 days after infection are shown. Each point represents the average of the results ($n = 5$).

ointment containing 10% lactic acid and polyethylene glycol was administered topically to mice. ACV ointment was used as a positive control. The mid-flanks of male BALB/c mice were clipped and chemically depilated. The naked skins of mice were scratched 2 or 3 days later, and a HSV-1 suspension of 1×10^6 PFUs was then applied to the scarified area. The intradermal infection of mice at the mid-flank led to local HSV-1 replication, followed by entry of the virus into the nerves innervating the skin, and its spread to the ganglia. Following replication in the ganglia, the virus disseminated along the sensory nerves, leading to sacculation in the whole innervated dermatome after 3 to 4 days and the subsequent formation of a zosteriform lesion (31). This viral spread from sensory ganglia to the innervated skin has been used as a model for recrudescence diseases (32). The appearance of infected mice was similar to that of uninfected controls for the first 2 days after the infection. Redness in the skin began to appear on day 3 in placebo-treated mice, blisters became obvious and developed into ulcers by day 4 to 5, and all infected mice succumbed to lethal encephalitis and died on day 9.

Treatment with the FIT-039 ointment twice a day suppressed skin lesions (Figure 3A) and rescued mice from lethality (Figure 3B) in a dose-dependent manner. The healing of lesions was observed with 5% to 10% FIT-039 ointment, leading to the complete regression of zosteriform spread on day 10, which was also observed with the 5% ACV ointment. Furthermore, no skin irritation was observed with the FIT-039 treatment in mice (Figure 3A) or rabbits during a preclinical irritation test (Supplemental Figure 5). These results confirmed the CDK9 inhibitor FIT-039 as a potential candidate for a novel therapeutic drug to treat HSV-1 infections.

Replication of a broad spectrum of DNA viruses was suppressed by FIT-039. Since CDK9/cyclin T1 complex was reported previously to be required for the replication of other viruses of *Herpesviridae* origin, we next verified the antiviral effect of FIT-039 on

HSV-2 and HCMV. FIT-039 suppressed the replication of HSV-2 in a dose-dependent manner, and its potency was similar to that of ACV (Figure 4, A and B). FIT-039 also inhibited HCMV genomic DNA replication, similar to ganciclovir (GCV) (Figure 4C). Furthermore, compared with cidofovir (CDV), FIT-039 potentially inhibited the genomic DNA replication of HAdV type 5, which was obtained from a patient's throat (Figure 4D), as well as type 53 (Figure 4E) and type 19 and type 37 (data not shown), which was obtained from a patient's eyelid, which indicated that FIT-039 inhibited the replication of DNA viruses other than *Herpesviridae*. We also observed that FIT-039 reduced the expression of E1A, an early gene of HAdV, whereas CDV could not (Figure 4F). These results demonstrated that FIT-039 suppressed the replication of a broad spectrum of DNA viruses.

Therapeutic effect of FIT-039 on mice infected with ACV-resistant HSV-1. We next examined the antiviral effect of FIT-039 on ACV-resistant HSV-1. In the plaque reduction assay, FIT-039 significantly reduced the plaque number in Vero cells infected with ACV-resistant HSV-1, whereas GCV did not, due to cross resistance (Figure 5A). Furthermore, the effect of FIT-039 on ACV-resistant HSV-1 infection was also evaluated in the murine zosteriform spread model, in which treatment with ACV ointment did not prevent the development of lesions (Figure 5B). In contrast, treatment with the FIT-039 ointment prevented zosteriform spread (Figure 5B) and rescued mice from lethality (Figure 5C), which indicated that FIT-039 was also therapeutically effective against ACV-resistant HSV-1.

Discussion

In this study, we successfully identified the novel CDK9 inhibitor FIT-039 and showed that CDK9 is a promising drug target for a broad spectrum of DNA viruses. CDK9 paired with cyclin T1 forms the human P-TEFb complex and stimulates productive transcrip-

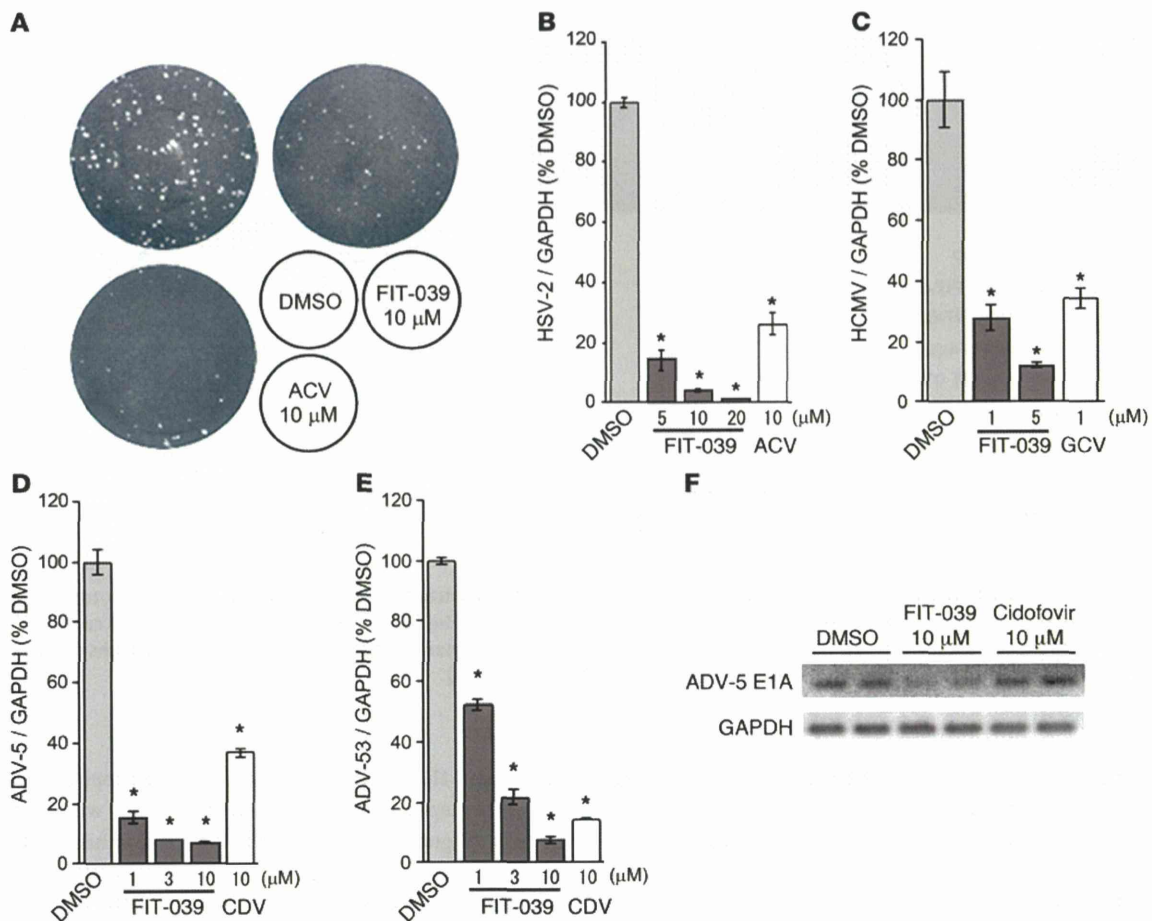


Figure 4. FIT-039 suppressed the replication of HSV-2, HCMV, and HAdVs. (A) FIT-039 suppressed the plaque formation caused by the HSV-2 infection in a dose-dependent manner. HSV-2 plaque reduction assay was performed in Vero cells treated with the indicated concentrations of FIT-039 and ACV. (B) FIT-039 suppressed the replication of HSV-2 genomic DNA in a dose-dependent manner. HSV-2 replication was analyzed by real-time PCR at the indicated concentrations of FIT-039. ACV was used as a positive control. (C) FIT-039 suppressed the replication of HCMV genomic DNA in a dose-dependent manner. HCMV replication was analyzed by real-time PCR at the indicated concentrations of FIT-039. GCV was used as a positive control. (D and E) FIT-039 suppressed the replication of HAdV genomic DNA in a dose-dependent manner. HAdV replication was analyzed by real-time PCR at the indicated concentrations of FIT-039 and CDV. (D) HAdV type 5 and (E) HAdV type 53 were examined. CDV was used as a positive control. (F) FIT-039 inhibited transcription of the HAdV gene *E1A*. A549 cells were infected with HAdV-5 and treated with FIT-039 at 10 μM for 6 hours. The cells were subjected to RT-PCR. In B–E, each point represents the average ± SD of the results from 3 experiments performed in duplicate. **P* < 0.001, versus DMSO treatment, Student's *t* test.

tion through phosphorylation of the CTD of RNA polymerase II and viral proteins, such as the ICP22 of HSV. The ICP22-CDK9 complex was reported previously to phosphorylate the CTD of RNA polymerase II and regulate the transcription of HSV (20, 22). A previous study showed that CDK9 was localized to nuclear viral transcriptosomes at the immediate-early stage of the HCMV infection, which allowed the active transcription of HCMV IEGs (14). The suppression of HAdV replication by FIT-039 demonstrated that HAdVs also depend on the CDK9-regulated transcription elongation machinery for their synthesis of viral RNAs. Vijayalingam et al. reported recently that the HAdV large-E1A protein activated viral transcription by recruiting the RNA polymerase II mediator complex (33); however, the effect of CDK9 on large-E1A-mediated transcription remains to be clarified. The above data suggest that these viruses take advantage of the viral protein CDK9 complexes to hijack the host transcription and perform the viral-specific transcription.

The IC_{50} value of FIT-039 for CDK9 inhibition is higher than the EC_{50} value of FIT-039 for anti-HSV-1 activity. The IC_{50} val-

ues of kinases show the comparative specificity of the compound but cannot be compared directly with the effect *in vivo*, because the kinase assay condition may not recapitulate the intracellular environments. However, we cannot deny the possibility that the antiviral activity of FIT-039 is due to a synergistic effect by inhibiting kinase(s) other than CDK9. The CTD phosphorylation is catalyzed by CDK7, CDK8, CDK11, CDK12, and CDK13, in addition to CDK9. Our preliminary experiment using siRNA against these CDKs showed that knockdown of CDK11 or CDK13 suppressed the HSV-1 replication, though the suppression was not as potent as that of CDK9 (data not shown). Furthermore, FIT-039 potentially inhibited kinases, as shown in the large-panel kinase screening (see Supplemental Methods and Supplemental Table 1). GSK3 (34), PAK3 (35), DYRK3 (36), Pim1 (37), PKG1 (38), p70s6k (39), Flt3 (40), and MSK1 (41) were reported to be involved in the replication of various viruses. In addition, 6BIO, an inhibitor of GSK3, and its derivatives were reported to suppress the replication of HSV-1 and HIV (42, 43).

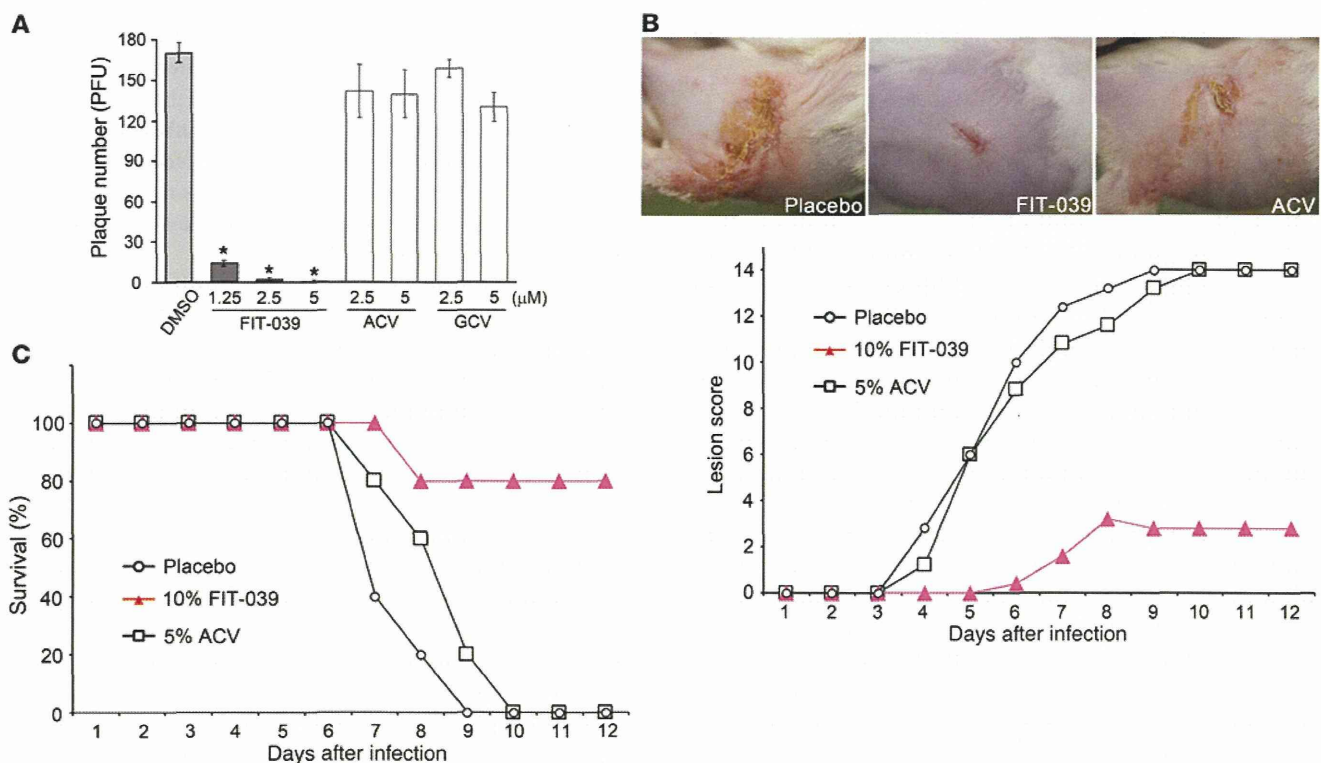


Figure 5. FIT-039 inhibited the replication of ACV-resistant HSV-1. (A) FIT-039 suppressed the plaque formation caused by the ACV-resistant HSV-1 infection in a dose-dependent manner. Plaque reduction assay was performed in Vero cells treated with the indicated concentrations of FIT-039, ACV, and GCV. Living cells were stained with crystal violet, and the number of plaques was then counted. ACV and GCV did not suppress the plaque formation. Each point represents the average \pm SD of the results from 3 experiments performed in duplicate. * $P < 0.001$, versus DMSO treatment, Student's *t* test. (B and C) The scratched skins of mice were infected intracutaneously with ACV-resistant HSV-1 and were then treated with ointments containing the indicated concentrations of FIT-039. Five mice were assigned to each experimental group. (B) The lesion score and (C) survival rate were determined. (B) Representative photographs of the infected mice 7 days after infection are shown. The ACV ointment did not suppress skin lesions or lethality. Each point represents the average of the results ($n = 5$).

FIT-039 selectively inhibited viral transcription with minimal effect on cellular transcription, indicating the possibility that cellular transcription is regulated not only by CDK9 but also other CDKs, such as CDK7, CDK8, CDK11, CDK12, and CDK13, and that viral gene expression may more depend on the ICP22-CDK9 complex than cellular genes. Thus, it is conceivable that FIT-039 produced less effect on cellular transcription than on viral transcription. This study suggests that FIT-039 is a promising drug against a broad spectrum of DNA viruses.

In addition to DNA viruses, cyclin T1/CDK9 has been shown to interact with RNA viral proteins, such as the influenza virus polymerase of influenza A virus and Tat proteins of HIV, and facilitate its association with cellular RNA polymerase II (44, 45). Flavopiridol inhibited the transcription elongation activity and suppressed replication of the influenza virus (46, 47). The anti-influenza virus activity of FIT-039 was also examined. FIT-039 suppressed the replication of influenza virus H1N1 (Supplemental Figure 6). FIT-039 inhibited the HIV-Tat-dependent transcription (Supplemental Figure 7), which is regulated by CDK9 (48, 49). Furthermore, FIT-039 also suppresses the replication of HIV (M. Okamoto and M. Baba, et al., unpublished observations). These studies demonstrate the possibility that FIT-039 suppresses the replication of RNA viruses as well as DNA viruses. A drug such as FIT-039, which selectively targets the key mole-

cules in host cells and exhibits an antiviral effect on a broad spectrum of viruses, may be able to cope with new types of viruses emerging in the future.

We are now preparing a clinical trial for FIT-039 in patients infected with ACV-resistant HSV-1 and thus investigating toxicities of FIT-039. Although mice with knockout of the target kinases, which FIT-039 potentially inhibited in this study, are known to show the phenotypes raised in Supplemental Table 3, our ongoing preclinical studies have indicated that FIT-039 does not induce significant adverse effects under a high-dose oral administration protocol in rats and dogs (Supplemental Figure 8), mutagenic toxicity (Supplemental Tables 4 and 5), or irritation activity on the skin. These results are consistent with the effects of FIT-039 on cells, which does not affect cell cycle progression or cell viability.

Considering the results of toxicity tests, FIT-039 could be available for systemic treatment. However, the topical medicines described in this manuscript have following advantages: (a) the drug is easily delivered to the infectious site, and (b) the risk of adverse effects can be further reduced. Therefore, FIT-039 ointment is also unlikely to cause any side effect in the preclinical study. Furthermore, FIT-039 has an agreeable pharmacokinetic profile (Supplemental Figure 9). These results indicate that FIT-039 could be developed as oral preparations against viral infectious diseases, such as herpetic encephalitis, HCMV infectious mononucleosis,

and HAdV pharyngitis. These outcomes indicate that FIT-039 is a promising novel antiviral agent for clinical therapeutics.

Methods

Viruses and cells. The HSV strains used were HSV-1 (F strain) and HSV-2 (G strain), which were provided by Y. Kawaguchi, University of Tokyo, Tokyo, Japan. The HCMV strain used was the Towne strain, which was provided by N. Shimizu, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan. The following HAdV strains were used: HAdV-5, obtained from National Institute of Infectious Diseases, Japan, as well as HAdV-19, HAdV-36, and HAdV-53, provided by K. Aoki and S. Ohno, Hokkaido University, Sapporo, Japan. These virus stocks were prepared in Vero cells and quantified by the plaque reduction assay. Human cervix epithelial (HeLa cells, CCL-2), African green monkey kidney (Vero cells, CCL-81), human lung fibroblast (HFL-1 cells, CCL-153), human embryonic kidney (HEK293 cells, CRL-1573), and human lung epithelial (A549 cells, CCL185) cells were grown in Minimum Essential Medium (Nacalai Tesque Inc.) supplemented with 10% FBS (Nichirei Biosciences Inc.). These cells were purchased from ATCC.

Isolation of ACV-resistant HSV-1. ACV-resistant HSV-1 was obtained from Vero cells infected with HSV-1, which were cultured in EMEM with 1% FBS containing 20 μ M ACV. Plaques appeared 2 days after the infection, and we then isolated ACV-resistant HSV from these plaques. Viral titers were determined as PFUs per ml using a plaque-forming assay in Vero cells.

Drugs. ACV was purchased as a powder from Wako Pure Chemical Industries Ltd. GCV and CDV were purchased as powders from Sigma-Aldrich.

RNA interference. The inhibition of CDK9 and CDK4 was achieved by siRNA Design Service (Nippon Gene Co. Ltd.) and Silencer Select siRNAs (Life Technologies Japan Ltd.). siRNA was transfected using Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies Japan Ltd.) according to the manufacturer's instructions. The downregulation of CDK9 and CDK4 was investigated by Western blotting 48 hours after transfection. The siRNA sequences used for our experiments were as follows: CDK9 siRNA-1, 5'-GGAGAAUUUUACUGUGUUUdTdT-3'; CDK9 siRNA-2, 5'-CCGCGCAAGGGUAGUAUAdTdT-3'; CDK4 siRNA, 5'-UGCUGACUUUAACCCACAdTdT-3'; and negative control siRNA, 5'-GGUUUAGGGUUAUUCUAUdTdT-3'. Negative control siRNA was a scramble sequence of CDK9 siRNA-1.

Antibodies and immunoblotting. Anti-CDK9 (D-7) (Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-CDK4 (DCS156) (Cell Signaling Technology Inc.), anti-GAPDH (Ambion), anti-RNA polymerase II (Millipore), and goat pAb to Ms IgG (Abcam) were used in this study. Total proteins were separated in Bolt 4%–12% Bis-Tris Plus (Life Technologies), transferred to a PVDF membrane, and probed with the antibodies listed above. Signals were developed by Super Signal West Dura (Thermo Scientific) and then detected and captured by ChemiDoc (Bio-Rad).

Analysis of the cell cycle. HeLa cells were plated in a 6-cm culture dish at a density of 1×10^6 cells per dish. Cells were treated with siRNAs for 48 hours or incubated with FIT-039 or flavopiridol at 4 μ M or 800 nM, respectively. Cells were stained with propidium iodide following these incubations and analyzed using FACSCalibur (BD Biosciences).

CDK9 inhibitor screening. We screened our kinase-focused library consisted of 144 compounds. In vitro kinase assays were performed in 96-well format using 100 ng CDK9 (Carna Biosciences), 2 μ M CDK7/9 tide (Millipore), and 100 nM ATP per well in reaction

buffer (8 mM of MOPS-NaOH [pH 7.0] and 20 μ M EDTA) with 1 μ M compounds or 4% DMSO as negative control. After 2 hours of incubation at 30°C, the amounts of remaining ATP in the kinase reaction were quantified by kinase Glo (Promega). The inhibition of kinase activity by each compound was calculated as follows: inhibition (%) = $[1 - (A - B)/(C - B)] \times 100$, where *A* is the response with the compound, *B* is the background response with kinase, and *C* is the response with negative control (4% DMSO).

Docking simulation study. Three crystal structures of human CDK9 (PDB IDs: 3TN8, 3BLQ, 3BLR) were selected as the template for docking simulations with FIT-039. Simulations were performed by CDOCKER and related modules in Discovery Studio 3.0 (Accelrys Inc. USA). The same procedure was applied to human CDK4 (PDB IDs: 2W9Z, 2W96) but failed to produce a reasonable complex model. Thus, the CDK4 structure was superimposed on that of CDK9 in the CDK9/FIT-039 complex.

Plaque reduction assay. Wild-type and ACV-resistant HSV-infected Vero cells were incubated with 150 PFUs per 1 ml for 1 hour at 37°C, and the culture media were then changed to fresh media containing various concentrations of FIT-039 and ACV. After 2 days of incubation, the infected cells were fixed with 100% methanol and stained with crystal violet solution (2.5% crystal violet, 30% ethanol, and 1% ammonium oxalate). The number of plaques was counted under a microscope.

Quantitative PCR analysis. HeLa cells, HFL-1 cells, and A549 cells were infected with HSVs, HCMV, and HAdVs, respectively, at a MOI of 0.1, with chemical compounds. HSV-, HCMV-, and HAdV-infected cells were incubated for 24, 72, and 24 hours, respectively. After incubation, these cells were harvested and their DNA was isolated. HSVs, HCMV, and HAdVs, genomic DNA, and cellular GAPDH were quantitative by real-time PCR. Analyses of HSV-1, HSV-2, HAdV-5, and GAPDH were performed using FastStart Universal Probe Master (ROX) (Roche Applied Science). Analysis of HAdV-19 was performed using FastStart Universal SYBR Green Master (Roche Applied Science). PCR was performed with an initial denaturation reaction at 95°C for 1 minute and then amplified with 40 cycles of 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds. The amplification was monitored on Step One Plus (Applied Biosystems Inc.). The primers used are shown in Supplemental Table 5.

MTT assay. Cytotoxicity was evaluated by the MTT reduction assay. HeLa cells were seeded at a concentration of 1×10^4 cells per well in 96-well tissue culture plates and grown at 37°C for 1 day. The culture medium was replaced by fresh medium containing FIT-039 at various concentrations (1–50,000 nM), and cells were grown for a further 24 hours. After incubation, the water-soluble tetrazolium salt, WST-8 (Nacalai Tesque Inc.), solution was added to media. Cells were incubated at 37°C for 2 hours, followed by plate reading on a ARVO X5 microplate reader (PerkinElmer Inc.), using a test wavelength of 450 nm and reference wavelength of 600 nm.

RT-PCR and quantitative RT-PCR analysis. HeLa cells and A549 cells were infected with HSV-1 and HAdV-5, respectively, at MOI of 0.1, with chemical compounds. HSV-1- and HAdV-5-infected cells were incubated for 3 hours or 6 hours, respectively, following total RNA extraction using Sepasol RNA-1 Super (Nacalai Tesque Inc.). Reverse transcription was performed with PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara Bio Inc.), using oligo (dT) primer. The IEGs of HSV-1, E1A of HAdV, and cellular GAPDH were then amplified by PCR. PCR was performed using PrimeStar HS DNA Polymerase with GC Buffer (Takara Bio Inc.). PCR was performed with an initial denaturation