

Table 1. Summary of CSF analysis of genetic prion disease cases.

	GSS	FFI	g CJD	
	P102L	D178N	E200K	V203I
Number	20	12	22	2
Age (average year)	55.5±4.45	55.8±13.7	62.7±9.43	73
Sex (m:f)	1:3	3:1	1:1	2:0
positive patients/total (%)				
[95% CI*]				
t-tau protein	4/20 (20%) [2.6–37.4%]	1/12 (8.3%) [0–25.4%]	19/22 (86.3%) [70.2–100%]	1/2 (50%)
14-3-3 protein	4/20 (20%) [2.6–37.4%]	1/12 (8.3%) [0–25.4%]	18/22 (81.8%) [67.4–96.2%]	1/2 (50%)
RT-QUIC	18/20 (90%) [76.5–100%]	10/12 (83.3%) [70.2–100%]	18/22 (81.8%) [67.4–96.2%]	2/2 (100%)

*The 95% confidence interval [CI] was calculated using the adjusted Wald test, and was expressed only in groups of more than seven cases.

doi:10.1371/journal.pone.0054915.t001

We recently developed a new *in vitro* amplification technology, designated “real-time quaking-induced conversion (RT-QUIC)”, for the detection of PrP^{Sc} in CSF of sCJD [2]. The aim of the present study was to determine whether RT-QUIC could also be of value in patients with genetic prion disease, as well as in sCJD.

Materials and Methods

Patients

We retrospectively analyzed 56 CSF samples obtained from gPrD patients in Japan, South Korea and Germany, including 22 cases of E200K gCJD, 20 cases of P102L GSS, 12 cases of FFI and 2 cases of V203I gCJD (Table 1). PrP-genotyping was done using genomic DNA extracted from peripheral blood leukocytes, as described previously [3]. Informed consent was obtained from patients’ families and/or patients. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Nagasaki University Hospital (ID: 10042823) and registered with the University Hospital Medical Information Network (ID: UMIN000003301).

Real-time QUIC and analysis of 14-3-3 and t-tau protein in CSF samples

We analyzed all CSF samples by RT-QUIC method as previously described [2]. 14-3-3 proteins in CSF were analyzed by Western blotting and total-tau protein was measured using an ELISA kit (INNOTEST®) as previously described [3].

Expression and purification of recombinant human PrP

Recombinant PrP, equivalent to residues 23–231 of the human PrP sequence, (codon 129 M) was expressed, refolded into a soluble form (rHuPrP-sen), and purified essentially as described previously [2]. The concentration of rHuPrP-sen was determined by measuring the absorbance at 280 nm. The purity of the final protein preparations was ≥99%, as estimated by SDS-PAGE, immunoblotting, and liquid chromatography-mass spectrometry. Circular dichroism analysis showed the conformation of rHuPrP-

sen was α -helix-rich (data not shown). After purification, aliquots of the proteins were stored at -80°C in 10 mM phosphate buffer, pH 6.8.

Real-time QUIC

We prepared reactions in a black 96-well optical bottom plate (Nunc, Rochester, NY, USA) to a final volume of 100 μl . To avoid contamination, we prepared non-infectious materials inside a biological safety cabinet in a prion-free laboratory and used aerosol-resistant tips. The final concentrations of reaction buffer components were 500 mM NaCl, 50 mM PIPES pH 7.0, 1 mM EDTA and 10 μM Thioflavin T. The rHuPrP-sen concentration was 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and only freshly-thawed rHuPrP-sen was used. CSF (5 μl per well) was used to seed the RT-QUIC reactions. The 96-well plate was covered with sealing tape (Nunc 236366) and incubated at 37°C in a plate reader (Infinite M200 or F200 fluorescence plate reader; TECAN) with intermittent shaking, consisting of 30 s circular shaking at the highest speed and no shaking for 30 s, with a 2 min pause to measure the fluorescence. The kinetics of fibril formation was monitored by reading the fluorescence intensity every 10 min using 440 nm excitation and 485 nm emission and monochromators (Infinite M200) or filters (Infinite F200).

Results (Figure 1, Table 1, 2 and 3)

First we analyzed 22 CSF samples from E200K gCJD patients. The positivities of t-tau protein, 14-3-3 protein and RT-QUIC method were all in the range of 80–85% (Figure 1, Table 1, 2 and 3). Overall, PrP^{Sc} was detected in 18 of the cases by RT-QUIC, all of which were also positive for both t-tau and 14-3-3 proteins. In the GSS and FFI cases, RT-QUIC was positive in 90% of GSS and 83.3% of FFI (Figure 1 and Table 1 and 2). Among the GSS cases, however, 80% showed negative for both t-tau and 14-3-3 proteins, and all but one of the FFI samples were negative for the biomarkers (Figure 1, Tables 1 and 2). Although we were able to analyze only 2 cases of gCJD V203I, both were positive by RT-QUIC and only one was positive for the biomarkers. All gPrD patients were methionine homozygotes at codon 129 of *PRNP*.

We compared the kinetics of recombinant Human PrP (rHuPrP) fibril formation in CSF of sCJD patients with those of gPrD patients, and found no significant difference (Figure 1).

Discussion

The RT-QUIC *in vitro* PrP^{Sc} amplification assay for diagnosis of prion disease has shown 84% sensitivity and 100% specificity in CSF samples from sporadic CJD patients.

To determine the value of RT-QUIC in genetic prion disease diagnosis, we analyzed a total of 56 CSF samples from patients with various genetic forms of human prion disease (Table 1). Our study demonstrated that RT-QUIC was highly positive in all four of the gPrD types we analyzed. Notably, most of the GSS and FFI patients were negative for both 14-3-3 and t-tau, as found in previous studies [4], whereas RT-QUIC showed 90% positivity in GSS.

RT-QUIC method was capable of detecting an extremely low volume of PrP^{Sc}, and we were able to detect as little as ≥ 1 fg of PrP^{Sc} in diluted brain homogenate from sCJD patients. While we were not able to detect PrP^{Sc} in all sCJD CSF samples, the reasons for this are unclear and we assume that the amounts of PrP^{Sc} are very much lower in CSF samples of negative gPrD patients.

Because the majority of GSS patients remain alive with only relatively mild symptoms one year after the onset [5], many

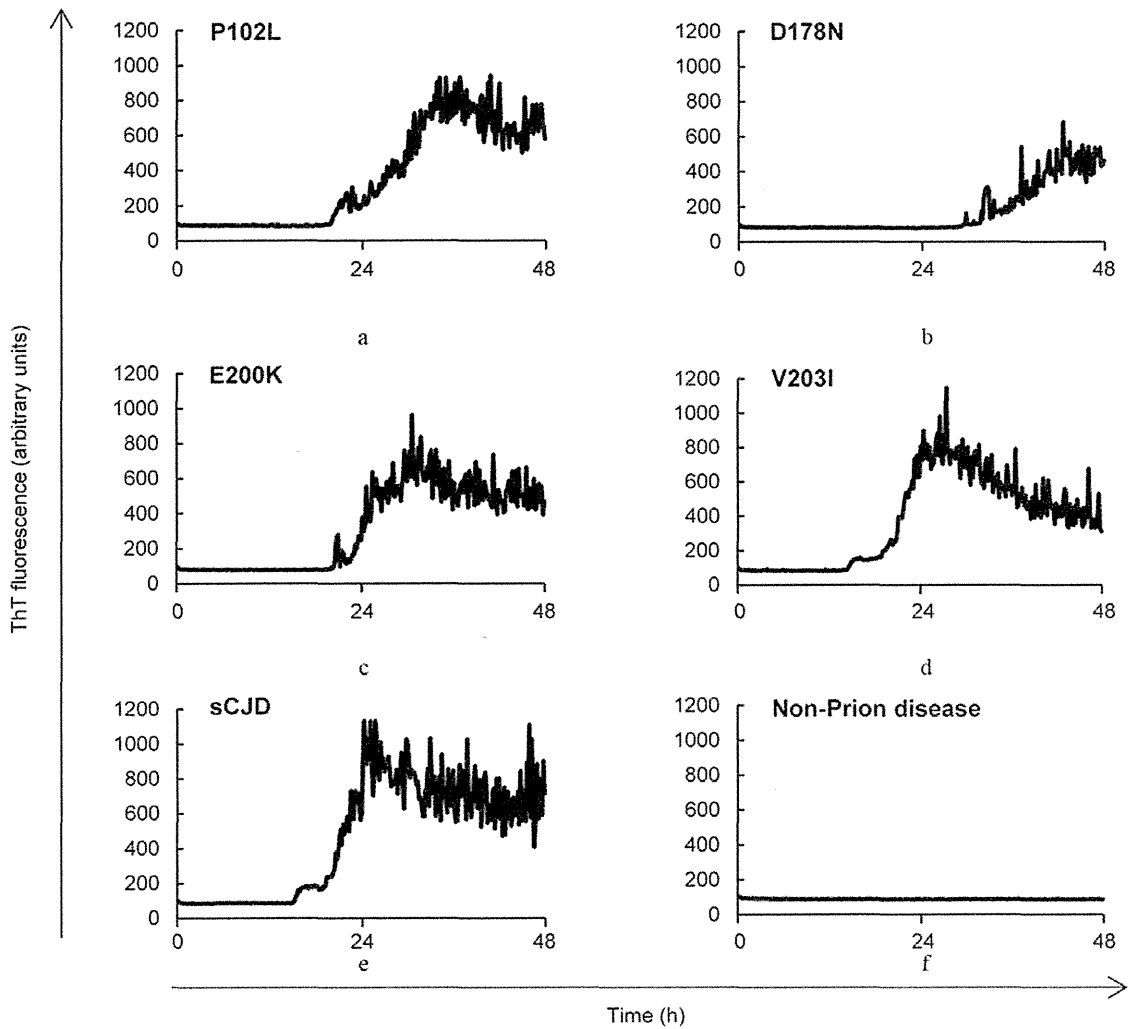


Figure 1. The kinetics of rHuPrP fibril formation with seeds from CSF of GSS, FFI, or gCJD. (a) a GSS P102L patient (b) a FFI D178N patient (c) a gCJD E200K patient (d) a gCJD V203I patient (e) a sCJD (MM1) patient and (f) a control subject. doi:10.1371/journal.pone.0054915.g001

Table 2. Further analysis of CSF samples of P102L GSS patients.

	duration between the symptom onset and lumbar puncture	
	1–12 months	13–77 months
Number	8 samples	12 samples
Age (average year)	56.8±2.14	54.9±5.19
Sex (m:f)	3:5	2:10
positive patients/total (%)		
t-tau protein	3/8 37.5%	1/12 8.3%
14-3-3 protein	3/8 37.5%	1/12 8.3%
RT-QUIC	8/8 100%	10/12 83.3%

doi:10.1371/journal.pone.0054915.t002

Table 3. Further analysis of CSF samples of gCJD E200K patients.

	duration between the symptom onset and lumbar puncture	
	1–3 months	4–48 months
Number	10 samples	12 samples
Age (average year)	61.4±8.96	63.8±9.67
Sex (m:f)	7:3	1:2
positive patients/total patients(%)		
t-tau protein	9/10 90.0%	10/12 83.3%
14-3-3 protein	8/10 80.0%	10/12 83.3%
RT-QUIC	7/10 70.0%	11/12 91.6%

doi:10.1371/journal.pone.0054915.t003

consult a clinician only later in the disease progression. On other hand, the progression of CJD is much more rapid, with most patients exhibiting akinetic mutism within 3 months. For this reason, we define the “early stage” in GSS (P102L) as 1–12 months, and in E200K gCJD as 0–3 months.

Moreover GSS and FFI show considerable phenotypic variability [6,7], and it is very important to distinguish them from non-prion diseases at an early stage. Until now, this has not been possible. Using the RT-QUIC assay, however, we were able to confirm positivity in 100% of GSS patients at an early stage, prior to disease progression (Table 2). Thus, RT-QUIC has application in the laboratory detection of gPrD as well as sCJD, and is likely to be of particular advantage in the differential diagnosis of FFI and GSS, in which biomarkers are usually negative (Tables 2 and 3).

Interestingly, one patient with E200K gCJD was negative by RT-QUIC when sampled at 2 months after the symptom onset, but became positive when a second sample was obtained two months later. Thus, it is important that even if the CSF analysis by RT-

QUIC is negative at an early stage, it should be re-examined at a later time point. Additionally, the use of RT-QUIC along with testing for the biomarkers should prove valuable for monitoring clinical trials of therapeutic agents use in gPrD patients.

We believe that RT-QUIC analysis of CSF will become invaluable in the differential diagnosis of suspected prion diseases, since not all patients with the genetic mutation go on to develop prion diseases. Alpha

In conclusion, RT-QUIC enables the early diagnosis of GSS and FFI in many patients for whom a differential diagnosis is otherwise not currently possible.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: K. Satoh K. Sano RA NN. Performed the experiments: K. Sano K. Satoh RN. Analyzed the data: K. Satoh. Contributed reagents/materials/analysis tools: HT YI MY NS H. Murai H. Mizusawa MS IZ YK. Wrote the paper: K. Sano K. Satoh RN NN.

References

1. Popova SN, Tarvainen I, Capellari S, Parchi P, Hannikainen P, et al. (2012) Divergent clinical and neuropathological phenotype in a Gerstmann-Straussler-Scheinker P102L family. *Acta Neurol Scand*; 126(5): 315–23
2. Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, et al. (2011) Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med*; 17: 175–178.
3. Satoh K, Tobiume M, Matsui Y, Mutsukura K, Nishida N, et al. (2010) Establishment of a standard 14-3-3 protein assay of cerebrospinal fluid as a diagnostic tool for Creutzfeldt-Jakob disease. *Lab Invest*; 90: 1637–1644.
4. Ladogana A, Sanchez-Juan P, Mitrová E, Green A, Cuadrado-Corrales N, et al. (2009) Cerebrospinal fluid biomarkers in human genetic transmissible spongiform encephalopathies. *J Neurol*; 256: 1620–1628.
5. Webb TE, Poulter M, Beck J, Uphill J, Adamson G, et al. (2008) Phenotypic heterogeneity and genetic modification of P102L inherited prion disease in an international series. *Brain*; 131 (Pt 10): 2632–2646.
6. Capellari S, Strammiello R, Saverioni D, Kretzschmar H, Parchi P. (2011) Genetic Creutzfeldt-Jakob disease and fatal familial insomnia: insights into phenotypic variability and disease pathogenesis. *Acta Neuropathol*; 121(1): 21–37.
7. Piccardo P, Dlouhy SR, Lievens PM, Young K, Bird TD, et al. (1998) Phenotypic variability of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease is associated with prion protein heterogeneity. *J Neuropathol Exp Neuro*; 57(10): 979–988.

心臓外科と神経内科における 難治性疾患の克服に向けて

～iPS細胞からドラッグデザインまで～

近年、再生医療や新薬開発の格段の進歩により、これまで難しいとされてきた疾患の治療が大きく変わろうとしています。本シンポジウムでは、心臓疾患の外科手術における再生医療の応用について、日本を代表する心臓外科医が分かりやすく紹介します。また、アルツハイマー病やヤコブ病などの神経疾患に対する最新の創薬開発について、第一線の研究者が分かりやすく紹介します。

プログラム

● 14:00～14:10 開会のあいさつ

● 14:10～15:00

講演1 「心臓血管外科の最新治療」

座長 岐阜大学 大学院医学系研究科
高度先進外科学

竹村 博文 教授

講師 大阪大学 大学院医学系研究科
外科学講座 心臓血管外科学

澤 芳樹 教授

略歴：昭和55年 大阪大学医学部卒業
平成18年 大阪大学大学院医学系研究科 第一外科学教授
平成24年 京都大学iPS細胞研究所 特任教授

● (10分休憩)

● 15:10～16:00

講演2 「治療薬開発の最前線」

座長 岐阜大学 大学院医学系研究科
再生医科学専攻
組織・器官形成分野

國貞 隆弘 教授

講師 岐阜大学 大学院連合創薬医療情報研究科
医療情報学専攻

桑田 一夫 教授

略歴：昭和57年 岐阜大学医学部卒業
平成16年 岐阜大学人獣感染症防御研究センター教授、
センター長

● (10分休憩)

● 16:10～16:50

講師を交えたパネルディスカッション 「再生医療と創薬の実際」

座長 岐阜薬科大学 薬物治療学研究室

保住 功 教授

● 16:50～17:00 閉会のあいさつ

日時 平成25年3月2日(土) 開場13:30

場所 岐阜大学サテライトキャンパス
(岐阜スカイウイング37 東棟4階)



お問い合わせ 岐阜大学 大学院連合創薬医療情報研究科 医療情報学専攻 生命情報研究領域 桑田研究室【金森】
TEL 058-230-6145 FAX 058-230-6144 E-mail ceid@gifu-u.ac.jp

主催：岐阜大学

協賛：厚生労働科学研究費補助金[難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)]重点研究分野(医薬品等医療技術の実用化に関する研究)

再生医療と創薬の最前線

第一回シンポジウム

心臓外科と神経内科 難治性疾患の克服に向けて

iPS細胞からドラッグデザインまで

- 739 -

近年、再生医療や新薬開発が、これまで難しいと言われてきた疾患の治療を大きく変えようとしています。本シンポジウムでは、心臓疾患の外科手術における再生医療の応用について、日本を代表する心臓外科医が分かりやすく紹介します。また、アルツハイマー病やヤコブ病などの神経疾患に対する最新の創薬開発について、第一線の研究者が分かりやすく紹介します。

日時 平成25年3月2日(土) 開場13:30

場所 岐阜大学 駅前サテライトキャンパス
(岐阜スカイウイング37 東棟4階)

プログラム

司会 岐阜大学 生命科学総合研究支援センター
鎌足 雄司 助教

14:00 開会のあいさつ

14:10~15:00 講演1

心血管外科の最新治療

座長 岐阜大学 大学院医学系研究科 高度先進外科学

竹村 博文 教授

講師 大阪大学 大学院医学系研究科 外科学講座 心臓血管外科学

澤 芳樹 教授

(10分休憩)

15:10~16:00 講演2

治療薬開発の最前線

座長 岐阜大学 大学院医学系研究科 再生医科学専攻 組織・器官形成分野

國貞 隆弘 教授

講師 岐阜大学 大学院連合創薬医療情報研究科 医療情報学専攻

桑田 一夫 教授

(10分休憩)

16:10~16:50 パネルディスカッション

再生医療と創薬の実際

座長 岐阜薬科大学 薬学科 薬物治療学研究室

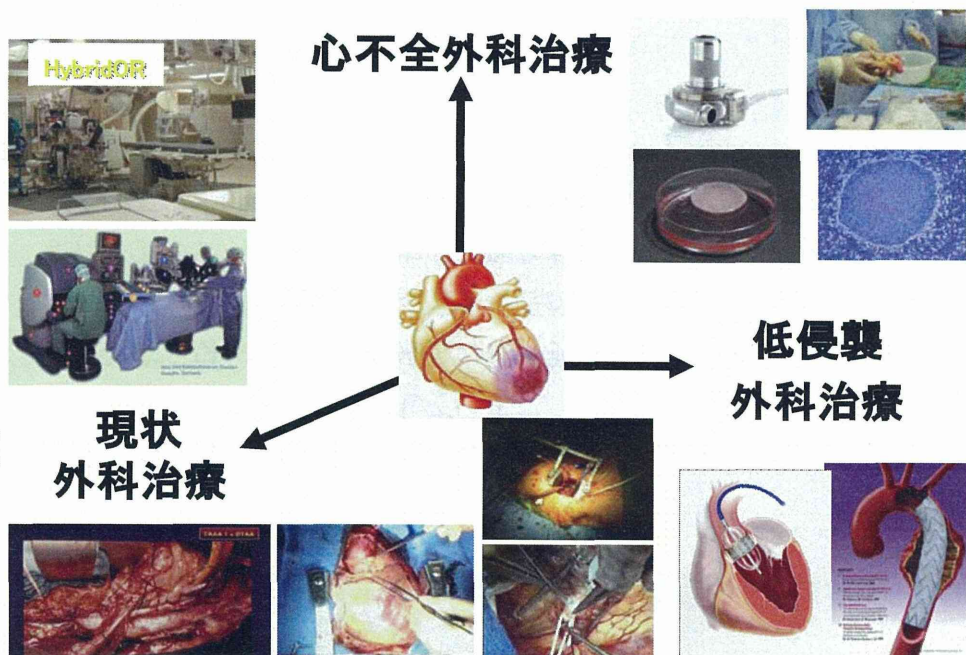
保住 功 教授

16:50 閉会のあいさつ

研究紹介

大阪大学 大学院医学系研究科 外科学講座 心臓血管外科学
澤 芳樹 教授

心臓血管外科学のニューパラダイム



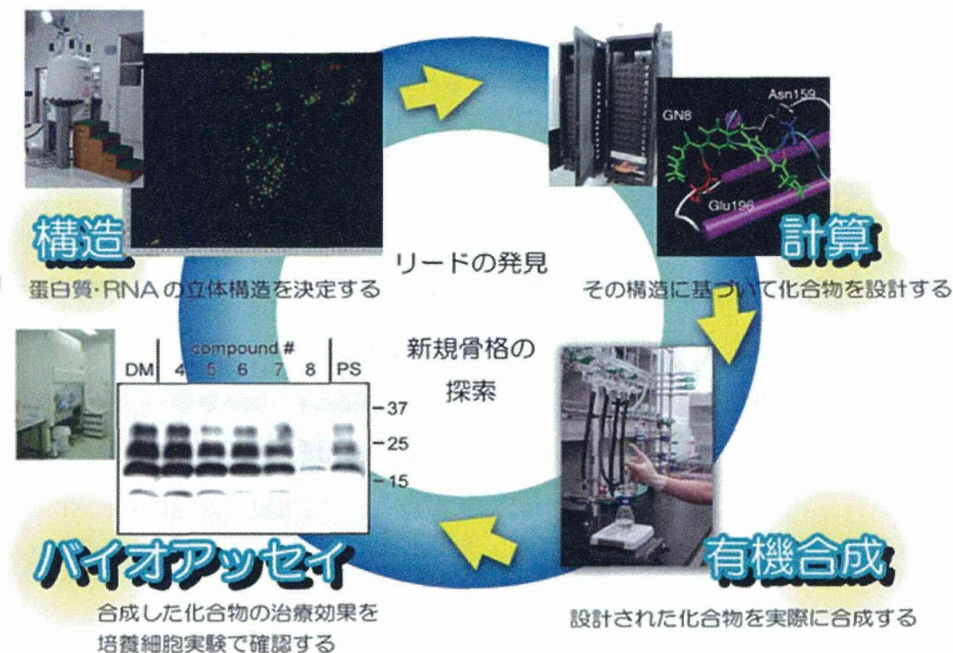
- 740 -

心臓血管外科においては、近年成績はきわめて向上した。しかし、さらなる手術成績の向上と低侵襲、そして現状で克服されていない疾患の治療を目指して、新しい治療法が開発されている。いま、TAVI、VAD そして iPS はニューパラダイムを構築しつつある。

TAVI transcatheter aortic valve implantation 経カテーテル大動脈弁置換術
VAD ventricular assist device 補助人工心臓
iPS cell induced pluripotent stem cell 人工多能性幹細胞

岐阜大学 大学院連合創薬医療情報研究科 医療情報学専攻
桑田 一夫 教授

難治性疾患に対する治療薬開発の最前線



論理的創薬法では、疾患の原因となる蛋白質の立体構造情報に基づき、治療薬候補化合物をコンピューターにより設計し、開発する。同手法は、遺伝子や蛋白質の構造異常に起因する疾患に対する新しい治療薬開発法として期待されている。

岐阜大創薬へ新施設

異常プリオン 難病治療法を試験

クロイツフェルト・

ヤコブ病や牛海綿状脳症(BSE)など、異常型タンパク質「プリオン」が原因となる難病の新薬を開発するための施設が、岐阜大医学部の研究棟に開設される。薬用の化学合成施設で、大学が設置するのは全国で初めて。ヤコブ病などは現在、有効な治療法が確立されておらず、特效薬の開発が期待される。異常型プリオンは体内に入ると、もともと体内にある正常型プリオンの構造を異常型に変化させる。この異常型プリオンが原因で、致死率の高いヤコブ病などが発症する。

体内に入ると、もともと体内にある正常型プリオンの構造を異常型に変化させる。この異常型プリオンが原因で、致死率の高いヤコブ病などが発症する。

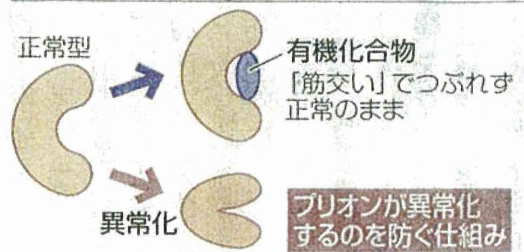
この異常型プリオンが原因で、致死率の高いヤコブ病などが発症する。

この異常型プリオンが原因で、致死率の高いヤコブ病などが発症する。

この異常型プリオンが原因で、致死率の高いヤコブ病などが発症する。

この異常型プリオンが原因で、致死率の高いヤコブ病などが発症する。

異常型プリオンは体内に入ると、もともと体内にある正常型プリオンの構造を異常型に変化させる。この異常型プリオンが原因で、致死率の高いヤコブ病などが発症する。



この異常型プリオンが原因で、致死率の高いヤコブ病などが発症する。

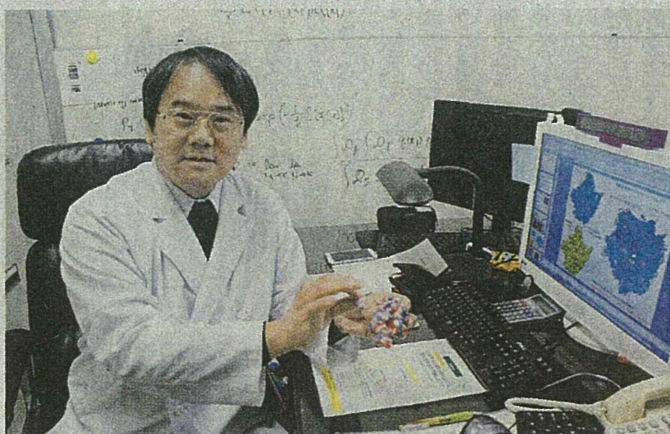
この異常型プリオンが原因で、致死率の高いヤコブ病などが発症する。

今後、この有機化合物をヒトで試験したい考え。試験には有機化合物を合成するための防じん室を造る必要がある。厚生労働省の補助で新施設を三月までに完成させる。有機化合物の臨床試験を二〇一五年から始め、一八年ごろの実用化を目指す。桑田教授は「異常プリオンの病気は、ヤコブ病で百万人に一人と希少なので、大きな需要が見込めず民間の製薬会社は手を出しにくい。大学が先頭を切って創薬を目指したい」と話している。

「ヤコブ病」新薬開発へ

岐阜大に研究施設開設

有効な治療法が確立されていない、異常型のタンパク質「プリオン」が原因の神経変性疾患「クロイツフェル



異常型のタンパク質「プリオン」の研究に取り組む桑田一夫教授＝岐阜市柳戸、岐阜大学医学部

プリオン 異常型のタンパク質の一種。「正常型プリオンタンパク質」は、体内に存在しており無害だが、プリオンが体内に入ると、正常型プリオンタンパク質の構造を異常型に変化させる。プリオンの詳細や感染メカニズムは、明らかになっていない点が多く、研究が進められている。

た。同大学大学院連合創薬医療情報研究科の桑田一夫教授(56)らのグループが中心となって開発を進めており、2018年ごろの実用化を目指す。

ヤコブ病は、プリオンが体内に入ると、もともと体内にある「正常型プリオンタンパク質」の構造を異常型に変えて体内に蓄積させ、やがて脳の神経細胞にたまることで発症する病気。

桑田教授らは、04年ごろから、正常型プリオンタンパク質の構造の解析に取り組み、10年に、正常型の中に組み込み、異常型に変わりにくくする有機化合物「メデイカルシャペロン」を開発した。

同グループではすでに、プリオンに感染させたマウスに、メデイカルシャペロンを投与

する実験を行い、投与しなかったマウスに比べ、長いもので3カ月間、長く生きたという結果だった。

桑田教授らの研究は、本年度の厚生労働省の「難治性疾患克服研究事業」の重点研究に採択されており、治療薬の開発に向けた無菌室などを備えた施設の実験を行い、投与する実験を行い、投与しなかったマウスに比べ、長いもので3カ月間、長く生きたという結果だった。

桑田教授は、「ヤコブ病は100万人に一人とまれな病気のたるとし、「メデイカルシャペロン」が秘める可能性は無量大。いろいろな神経変性疾患の治療に生かされるので」と、早期の実用化に向け、意欲を見せている。

