

重症呼吸器ウイルス感染症関連ウイルスの防御抗体産生機構および制御に関する研究
ーヒトパラインフルエンザ3型新規ワクチン開発と感染細胞モデル系の構築ー

研究分担者 梁 明秀 横浜市立大学医学部微生物学

研究要旨

ヒトパラインフルエンザウイルス3型(human parainfluenza virus type 3,hPIV3)は小児や乳幼児の急性呼吸器感染症の主要な原因ウイルスであり、感染喘息の原因因子となることが知られている。しかしながら、hPIV3 感染症に対する有効な感染阻止法や治療法は確立されていない。また、病原体分離や阻害剤スクリーニングのための優れた培養細胞モデル系は構築されていない。我々は、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて hPIV3 外被タンパク質 hemagglutinin-neuraminidase (HN) を合成し、マンノース被覆リポソームと組み合わせた新しいワクチンを開発した。また、HN 全長タンパク質を抗原としたモノクローナル抗体を新たに作製した。さらに、広いウイルス感染トポロジーを有する培養細胞の樹立を目指し、ヒト胎児肺線維芽細胞 MRC-5 の不死化とレポーター遺伝子の導入を行いこれに成功した。

A. 研究目的

ヒトパラインフルエンザウイルス(hPIV)は、パラミクソウイルス科、パラミクソ亜科に属する一本鎖負センス RNA ウイルスである。hPIV は 1950 年代後半に発見されたウイルスであり、1、2、3、4A、4B 型の 4 つの異なるタイプが同定されている。そのうち 3 型(hPIV3)は 83%の小児が 1-2 歳までに感染し、その感染が下気道まで至る場合は気管支炎、細気管支炎、肺炎を起こすことが知られており、2009 年 1 月～2012 年 7 月までに小児の呼吸器系疾患患者から採取した咽頭ぬぐい液、気管吸引液等 503 検体中 24 例(4%)から PIV3 が分離・検出されている。現在までに不活化ワクチン、キ

メラウイルスワクチン、弱毒生ワクチン等の様々な開発が行われているが、防御的な免疫応答が得られないか、または安全性に懸念があり頻繁な有害事象が問題となっており、実用化に至るような成果は得られていない。

今回、我々は、hPIV-3 ワクチン開発に向け、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いたりコンビナントウイルス外被タンパク質 (PIV-3-HN) の大量精製を行い、それをマンノース被覆リポソームに封入することで、新規ワクチン抗原・アジュバント複合体ワクチン開発を行った。また、hPIV3 の感染を阻止する中和抗体を作製することを目的とし、HN の全長タンパク質を抗原としたモノクロ

ーナル抗体の作製を試みた。さらには、ウイルス感染に感受性を有する不死化ヒト細胞にレポーター遺伝子を導入することで簡易にウイルス感染を定量・モニタリングできる細胞系を構築した。

B. 研究方法

1. コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた

PIV-3-HN 合成

真核生物型無細胞タンパク質合成技術であるコムギ胚芽タンパク質合成システムを用いてリコンビナント PIV-3-HN 全長タンパク質の作成を試みた。コムギ無細胞系発現ベクター pEU-E01-GST-PIV3HN および pEU-E01-His-PIV3HN を構築し、コムギ無細胞タンパク質合成系を用い、PIV-3-HN 全長タンパク質の合成を行った。精製はグルタチオンセファロースまたはニッケルアガロースビーズによるカラム法を用いた。GST-PIV3HN 間の切断は TEV プロテアーゼを用いて行った。

2. ヒト胎児肺線維芽細胞 MRC-5 細胞不死化およびレポーター細胞の構築

正常細胞の不死化を誘導するレンチウイルスベクターとして pLenti6_TERT, pLenti6_HPVI6-E7, pLenti6_sh-p16_TetOff_FRT-GFP-BSD を作製した。作製したベクターを用い、MRC-5/TERT 細胞に不死化誘導因子を導入した。次にこれらの細胞株に pNifty-ISREx5-AP-1x5-NF-kBx5-SEAP 遺伝子または pIRES-ISREx5-AP-1x5-NF-kBx5 -GFP 遺伝子を導入し、抗生物質である Zeocin または Puromycin を用いて安定発現系細胞株を樹立した。

3. 呼吸器ウイルス感染感受性アカゲザル細胞モデル系の構築

アカゲザル皮膚線維芽細胞に細胞初期化因子導入後、Embryoid body 形成法を用いて細胞分化を行った。ウイルス感受性試験では RSV および PIV3 を MOI=1 で標的細胞に感染させ、48 時間後に細胞障害性および合胞体の形成を観察した。また感染細胞から RNA を抽出し、RT-PCR を用いてウイルス遺伝子の発現レベルを測定した。

4. リポソーム封入タンパク質の確認と定量

マンノース被覆 リポソーム (Mannose coated liposome: MCL) を PBS で希釈後、SDS で脂質膜破壊サンプルバッファーと混合し、100°C で加熱処理した。リポソームのコレステロール量が 5 もしくは 10 μg になるように、ゲルにアプライし、電気泳動後、ゲルを固定化し、Quick-CBB PLUS (Wako, 178-00551) で染色し、ルミノ・イメージ・アナライザー LAS-3000 (FULIFILM) にとりこみ、汎用解析ソフト Multi Gauge (FUJIFILM) にて定量した。

C. 研究結果

1. コムギ無細胞を用いた hPIV-3-HN タンパク質の合成

真核生物型無細胞タンパク質合成技術であるコムギ胚芽タンパク質合成システムを用いてリコンビナント PIV-3-HN 全長タンパク質の作成を試みた。無細胞合成用の pEU-E01-GST ベクターに PIV3-HN 全長 cDNA をサブクローニングした。

次に全自動コムギ無細胞タンパク質合成装置 PROTEMIST-DT-II を用いて GST 融合 PIV3-HN タンパク質の大量合成を行った。合成した GST 融合 PIV3-HN タンパク質をグルタチオンセファロースビーズ法を用いて回収し、TEV プロテアーゼを用いて GST タグを切断した。本法により一度の合成で約 200 μ g の精製タンパク質が作製できた。また、ヒスチジンタグを付加した PIV3-HN タンパク質についても上記と同様の手法に合成が出来たが、可溶化が低下したため、8M 尿素入りバッファーを用いたところ、500 μ g 以上のタンパク質を作製することができた。

2. マンノース被覆リポソーム型を活用した新規 hPIV3 ワクチンの開発

新規 hPIV3 経鼻ワクチンの開発のための基盤研究を実施した。本法は、樹上細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞に直接的かつ効率的に抗原を運ぶことが可能であり、従来と比較して少量の抗原タンパク質で免疫誘導が可能である。我々はマンノース被覆リポソームを用いたワクチンデバイスを開発するため、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作製した hPIV3-HN 全長タンパクを MCL 内に封入した。タンパク質封入後の HN-MCL を 1 μ m フィルターに通過させ、タンパク凝集物を除去した。続いて、リポソーム内に封入されているタンパク質の定量を行ったところ、1 mg chol.あたりの HN タンパク封入量が 32 μ g にまで増加した。これらの HN-MCL を 5 μ g タンパク/ 15 μ L (マウス 1 匹分) になるよう調製し、polyIC アジュバント存在下または非存在下にて

Balb/C マウスに経鼻投与した。また、コントロールとして、polyIC のみおよび MCL のみの投与も行った。結果として、HN-MCL と polyIC と共投与した群では、抗原特異的な血中 IgG および鼻洗浄液中の IgA 抗体が認められた。しかしながら、他の群では顕著な特異的抗体の誘導は認められなかった。また、HN-MCL+polyIC 群で誘導された血中 IgG の hPIV3 感染中和活性を測定したところ、3 匹中 1 匹のマウス血清において有意な中和活性が認められた。今後は、抗原量や投与方法を再検討することで、より効果的なワクチン投与プロトコルを作製する。

3. PIV3 外被タンパク質 HN を標的としたモノクローナル抗体の開発

PIV3 感染症を阻止できるモノクローナル抗体を作製するため、上記のとおりコムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作製した PIV3-HN 全長タンパク質を BALB/c マウスにアジュバントとともに足底に免疫し、4 週間後に脾細胞を分離し、マウスミエロマー細胞を用いたハイブリドーマを作製した。これらのうち、HN に特異的なクローンが、48 種類樹立出来た。このうち、ELISA にて活性の高い 13 種類のハイブリドーマ上清がウェスタンブロット解析に使用できるか否かについて検討した。方法として、まず、抗原に用いたリコンビナント hPIV3-HN タンパク質を用いてウェスタンブロット解析を行った。その結果 13 種類全てのハイブリドーマ上清がリコンビナント hPIV3-HN タンパク質を特異的に認識できることが確認された。次に hPIV3 感染または非感染 HeLa

細胞の細胞可溶化液を用いてウェスタンブロット解析を行ったところ、13種類のハイブリドーマ上清全てが hPIV3 感染 HeLa 細胞中の HN を認識できることが確認された。続いて、13種類のハイブリドーマ上清が免疫染色に使用できるか否かについて検討した。方法として、HeLa 細胞を hPIV3 感染させ HN の細胞内局在を観察した。その結果、13種類のうち5種類の抗体が、hPIV3 感染 HeLa 細胞の細胞質中に HN が顆粒状に分布していることを確認することができた。また、2つのモノクローナル抗体について中和活性を調べたが、ともに感染を阻止することは出来なかった。今後は各抗体の認識エピトープを確認するとともに、免疫沈降法による宿主因子の探索、ウイルス感染診断キットの作製等に利用する予定である。

4. 呼吸器ウイルス感染感受性レポーター細胞の構築と阻害剤スクリーニング

ヒト胎児肺由来線維芽細胞 MRC-5 細胞に hTERT および p16INK4 に対する shRNA を定常的に導入し、通常培養法にて長期培養を行った。現段階で少なくとも 120 回以上の継代が可能な不死化 MRC-5/hTERT_shp16 細胞を樹立した。また、これらの細胞株にウイルス感染時に上清中に分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)を分泌するレポーター遺伝子 pIRES- ISREx5-AP-1x5-NF-kBx5-SEAP を導入し、ウイルス感染を定量的に検出できる細胞系を構築した。本細胞は TNF α や LPS 刺激により細胞上清中に SEAP を分泌することから、ウイルス感染に伴う pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を検出する新たなアッ

セイ系としても活用可能である。我々は本レポーター細胞を用いていくつかの天然化合物の抗ウイルス活性を確認している。今後はさらに大規模な阻害剤のアッセイを実施することで新たな抗ウイルス薬の開発に結びつくことが期待される。

5. 新しい呼吸器ウイルス感染感受性培養細胞モデル系の構築

広いウイルス感染トポロジーを有する細胞を樹立する目的で、アカゲザル皮膚線維芽細胞に細胞初期化因子を導入し、Rhesus Monkey Stem Cell (rSC) を作成した。ウイルス感染感受性試験により、rSC は RSV と PIV-3 に感染し、多核細胞や合胞体を形成することが確認された。また、感染細胞から RNA を抽出し、RSV G 遺伝子および PIV-3 HN 遺伝子領域の RT-PCR を行ったところ、ウイルス転写産物を確認した。

D. 考察

今回、我々は呼吸器ウイルス抗原タンパク質の合成にコムギ無細胞タンパク質合成系を活用した。大腸菌や培養細胞などの生細胞を基盤とする従来の遺伝子発現方法には、生産できるタンパク質の分子種、量等に限界があり、特に細胞毒性を有するウイルスタンパク質の合成は難しかった。また、タンパク質の立体構造上の問題等のワクチン抗原としての品質の問題も多分にあった。無細胞タンパク質合成法は、生体の遺伝情報発現系を人工容器内に取り揃え、遺伝子 DNA からタンパク質を鋳型合成する試験管内合成法であるため、これらの問題が全て解決できている。その中でも、コム

ギ無細胞系は真核生物のマルチドメインタンパク質の合成に優れた性能を発揮し、特にウイルスタンパク質のエピトープ領域の合成に優れている。高効率コムギ無細胞タンパク質合成法の基盤として、(1) 高翻訳促進能を有する mRNA の5'末端及び3'末端非翻訳配列の設計、(2) 専用高発現ベクターの構築、(3) 新規改良 PCR 法を用いる転写鋳型構築法、(4) 高効率翻訳反応方法、などのキー技術があげられる。これらはワクチン抗原としてのウイルスタンパク質の合成法として優れていると考えられる。

今回我々は、マンノース被覆リポソームという標的化能を持つキャリアーにウイルス抗原タンパク質を包埋、投与することで、通常のワクチン抗原投与と同等、それ以上のワクチネーション効果を示す新規のワクチンを開発した。hPIV3 ワクチンは、未だ実用化されたものがなく、かつ、MCL という高いアジュバント効果を持つ DDS キャリヤーを使用することで強い効果、特に、強い細胞性免疫を付与できるワクチンとなることが期待される。

今回コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作製した抗原タンパク質を元に作製したマウス抗 HN モノクローナル抗体の作製に成功した。これらの抗体は抗原認識特異性が高く、イムノプロットや免疫染色でも活用できることが分かった。しかし、確認した限りにおいて hPIV3 に対する中和活性が認められなかった。中和活性が得られなかった原因としてまず hPIV3-HN 抗原合成後の精製時に尿素で可溶化したため、HN タンパク質が

変性しその構造を保持できなかったことが考えられる。次に、糖修飾された抗原を免疫すると hPIV3 感染を防御できたという報告があることから、本研究で用いた HN 抗原が糖修飾されていないことが原因と考えられる。以上より hPIV3 に対して中和活性をもつ抗体を作製するためには二次構造を維持し、かつ糖修飾されている抗原を用いることが重要であると考えられる。

E. 結論

今回我々は PIV-3 ワクチン開発に向け、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いたリコンビナントウイルス外被タンパク質 (PIV-3-HN) のベクター構築および機能的タンパク質の大量精製に成功した。また、ヒト胎児肺線維芽細胞 MRC-5 の不死化を行うことで病原体分離や阻害剤スクリーニングのための優れた培養細胞モデル系の構築に成功した。また、アカゲザル皮膚線維芽細胞から幹細胞を誘導することで呼吸器ウイルス感染感受性を示す培養細胞を樹立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Akiyama T, Abe Y, Iida H, Endo H, Hosono K, Yoneda K, Takahashi H, Inamori M, Ryo A, Yamanaka S, Inayama Y, Nakajima A: Endoscopic therapy using an endoscopic variceal ligation for minute cancer of the esophagogastric junction complicated with esophageal varices: a case report.

- J Med Case Reports. 2010 May 23;4:149.
- (2) Pulikkan JA, Dengler V, Peer Zada AA, Kawasaki A, Geletu M, Pasalic Z, Bohlander SK, Ryo A, Tenen DG, Behre G: Elevated PIN1 expression by C/EBPalpha-p30 blocks C/EBPalpha- induced granulocytic differentiation through c-Jun in AML. *Leukemia*. 2010 May;24(5):914-23.
 - (3) Kanzaki S, Yamaguchi A, Yamaguchi K, Kojima Y, Suzuki K, Koumitsu N, Nagashima Y, Nagahama K, Ehara M, Hirayasu Y, Ryo A, Aoki I, Yamanaka S: Thymic Alterations in GM2 Gangliosidosis Model Mice. *PLoS ONE*. 2010 Aug 10;5(8). pii: e12105.
 - (4) Tsukagoshi H, Masuda Y, Mizutani T, Mizuta K, Saitoh M, Morita Y, Nishina A, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H: Sequencing and phylogenetic analyses of Saffold coronavirus (SAFV) genotype 3 isolates from children with upper respiratory infection in Gunma, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2010 Sep;63(5):378-80.
 - (5) Kojima Y, Ryo A: Pinning down viral proteins: A new prototype for virus-host cell interaction. *Frontiers in Microbiology*. 1:107, 2010.
 - (6) Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Lee SW, Yamamoto N, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem.*, 286(13):11593-11603, 2011.
 - (7) Yoshizaki S, Nishi M, Kondo A, Kojima Y, Yamamoto N, Ryo A. Vaccination with human induced pluripotent stem cells creates an antigen-specific immune response against HIV-1 gp160. *Frontiers in Microbiology*. 2:27, 2011.
 - (8) Fujitsuka A, Tsukagoshi H, Arakawa M, Goto-Sugai K, Ryo A, Okayama Y, Mizuta K, Nishina A, Yoshizumi M, Kaburagi Y, Noda M, Tashiro M, Okabe N, Mori M, Yokota S, and Kimura H.: A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness, *BMC Infect Dis*, 11: 168 2011.
 - (9) Tsukagoshi H, Mizuta K, Abiko C, Itagaki T, Yoshizumi M, Kobayashi M, Kuroda M, Kozawa K, Noda M, Ryo A, and Kimura H.: The impact of Saffold coronavirus in patients with acute respiratory infections in Yamagata Japan, *Scand J Infect Dis*, 43: 669-671 2011.
 - (10) Arakawa M, Okamoto-Nakagawa R, Toda S, Tsukagoshi H, Kobayashi M, Ryo A, Mizuta K, Hasegawa S, Hirano R, Wakiguchi H, Kudo K, Tanaka R, Morita Y, Noda M, Kozawa K, Ichiyama T, Shirabe K, and Kimura H.: Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan, *J Med Microbiol*, 61:410-9, 2012.
 - (11) Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, Sato H, Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, Ryo A. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *J*

Proteomics. 75(15): 4863-73, 2012.

(12) Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Tokarev A, Quinn G, Kimura H, Nomaguchi M, Adachi A, Yamamoto N, Guatelli J, Ryo A.

Interferon-induced SCYL2 limits release of HIV-1 by triggering PP2A-mediated dephosphorylation of the viral protein Vpu. *Sci Signal.* 245(5): ra73, 2012.

(13) Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, Kimura H, Perrem K, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. Induction of cells with cancer stem-cell properties from non-tumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene.* 2013.

2. 学会発表等

国際学会

(1) Y Kojima, S Gotoh, A Kondo, S Kinoshita, A Ryo: A Critical Role for Pin1 in IL-6 Production via C/EBP- β in Rheumatoid Arthritis Synoviocytes. The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, PA, Dec 11-15, 2010.

(2) K Miyakawa, M Nishi, N Yamamoto, A Ryo: The Tumor Suppressor APC Regulates HIV-1 Assembly and Release. IUMS 2011 International Congress of Virology, Sapporo, Sep 11-16, 2011, Sapporo, Sep 11-16, 2011.

(3) Matsunaga S, Furukawa A, Kojima Y, Morishita R, Sawasaki T, Takaori-kondo A, Sugiura W, Katahira M, Ryo A: An in vitro cleavage assay system for XMRV protease by wheat-germ cell free protein production. IUMS 2011 International Congress of Virology, Sapporo, Sep 11-16, 2011.

(4) Kanuma T, Kudoh A, Jounai N, Takeshita F, Sawasaki T, Ryo A: Immune evasion by HIV-1 protease-mediated cleavage of TBK1. IUMS 2011 International Congress of Virology, Sapporo, Sep 11-16, 2011.

(5) Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Kimura H, Yamamoto N, Guatelli J, Ryo A: Identification of SCYL2 as an interferon-inducible antagonist of HIV-1 Vpu. 6th German-Japanese HIV Symposium, Ruhr-Universität Bochum, German, Nov 21-22, 2011.

(6) Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Sugiura S, Sato H, Ryo A: An in vitro cleavage assay system for retrovirus protease by wheat germ cell-free protein production. 6th German-Japanese HIV Symposium, Ruhr-Universität Bochum, German, Nov 21-22, 2011.

国内学会

(1) 島田 勝, 吉崎慎二, 奥田研爾, 梁 明秀: DNA Vaccine Expressing HIV-1 gp120/immunoglobulin Fusion Protein Enhances Cellular Immunity. 2010年11月7日~9日、第58回ウイルス学会学術集会、あわぎんホール、

徳島.

(2) 近藤麻美, 野村 渉, 玉村哲和, 鈴木陽一, 梁明秀: 亜鉛フィンガー-LEDGF 融合タンパクを用いた LV ベクターの配列特異的挿入法の開発の試み. 2010 年 11 月 7 日~9 日, 第 58 回ウイルス学会学術集会, あわぎんホール, 徳島.

(3) 松永智子, 小島良績, 澤崎達也, 森下 了, 佐久間龍太, 岩谷靖雅, 杉浦 互, 山本直樹, 梁明秀: コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた新規ガンマレトロウイルス XMRV プロテアーゼの解析. 2010 年 11 月 7 日~9 日, 第 58 回ウイルス学会学術集会, あわぎんホール, 徳島.

(4) 松永智子, 澤崎達也, 小島良績, 森下 了, 佐藤裕徳, 大出裕高, 杉浦 互, 梁明秀: コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) プロテアーゼの解析. 日本プロテオーム学会, 2011 年 7 月 28~29 日, 新潟.

(5) 鈴木智恵, 川上志保, 松永智子, 松尾 泉, 梁明秀: ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型 (hPIV3-HN) 全長タンパク質を抗原としたモノクローナル抗体作製の試み. 日本プロテオーム学会 2012 年大会. 2012 年 7 月 26~27 日, 東京.

(6) 泉地 恭輔, 松永 智子, 松尾 泉, 梁明秀: パラインフルエンザウイルス 3 型全長 HN タンパク質を封入した新規経鼻投与型 OML ワクチンの開発. 日本プロテオーム学会 2012 年大会. 2012 年 7 月 26~27 日, 東京.

(7) 松永智子, 泉地 恭輔, 梁 明秀: パラインフルエンザウイルス 3 型全長 HN タンパク質を封入した新規経鼻投与型ワクチンの開発. 日本ウイルス学会 2012 年大会. 2012 年 11 月 13~15 日, 大阪.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

- 1) Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Matsuzaki Y, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Noda M, Kimura H, Ahiko T. Seasonal patterns of respiratory syncytial virus, influenza A virus, human metapneumovirus, and parainfluenza virus type 3 infections based on virus isolation data between 2004 and 2011 in Yamagata, Japan. *Jpn J Infect Dis.* in press.
- 2) Kiyota N, Kushibuchi I, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Ryo A, Nishimura K, Hirata-Saito A, Harada S, Arakawa M, Kozawa K, Noda M, Kimura H. Genetic analysis of VP4/VP2 coding region in human rhinovirus species C detected from the patients with acute respiratory infection in Japan. *J Med Microbiol.* In press.
- 3) Seki E, Yoshizumi M, Tanaka R, Ryo A, Ishioka T, Tsukagoshi H, Kozawa K, Okayama Y, Goya T, Kimura H. Cytokine profiles, signaling pathways, and effects of fluticasone propionate in respiratory syncytial virus-infected human fetal lung fibroblasts. *Cell Biol Int.* in press.
- 4) Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, Kimura H, Perrem K, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. Induction of cells with cancer stem-cell properties from non-tumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene* 2013 : 1-10.
- 5) Abiko C, Mizuta K, Aoki Y, Ikeda T, Itagaki T, Noda M, Kimura H, Ahiko T. An outbreak of parainfluenza virus type 4 infections among children with acute respiratory infections, in the 2011-12 winter season in Yamagata, Japan. *Jpn J Infect Dis.* in press.
- 6) Sakano C, Kuroda M, Sekizuka T, Ishioka T, Morita Y, Ryo A, Tsukagoshi H, Kawai Y, Inoue N, Takada H, Ogasawara Y, Nishina A, Shimoda M, Kozawa K, Oishi K, Kimura H. Genetic analysis of non-hydrogen sulfide-producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Infantis isolates in Japan. *J Clin Microbiol.* 51(1):328-330, 2013.
- 7) Nakamura M, Hirano E, Ishiguro F, Mizuta K, Noda M, Tanaka R, Tsukagoshi H, Kimura H. Molecular epidemiology of human metapneumovirus from 2005 to 2011 in Fukui, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 66(1): 56-59, 2013.
- 8) Kobayashi M, Tsukagoshi H, Ishioka T, Mizuta K, Noda M, Morita Y, Ryo A, Kozawa K, Kimura H. Seroepidemiology of scaffold cardiovirus (SAFV) genotype 3 in Japan. *J Infect.* 66(2):191-193, 2013.
- 9) Saitoh M, Takeda M, Gotoh K, Takeuchi F, Sekizuka T, Kuroda M, Mizuta K, Ryo A, Tanaka R, Ishii H, Takada H, Kozawa K, Yoshida A, Noda M, Okabe N, Kimura H. Molecular evolution of hemagglutinin (H) gene in measles virus genotypes D3, D5, D9, and H1. *PLOS ONE.* 7(11):e50660, 2012.
- 10) Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Matsuzaki Y, Noda M, Kimura H, Ahiko T. Epidemiology of parainfluenza virus types 1, 2 and 3 infections based on virus isolation between 2002 and 2011 in Yamagata, Japan. *Microbiol Immunol.* 56(12):855-858, 2012.
- 11) Mizuta K, Kuroda M, Kurimura M, Yahata Y, Sekizuka T, Aoki Y, Ikeda T, Abiko C, Noda M, Kimura H, Mizutani T, Kato T, Kawanami T, Ahiko T. Epidemic myalgia in adults associated with human parechovirus type 3 infection, Yamagata, Japan, 2008. *Emerg Infect Dis.* 18(11):1787-1793, 2012.
- 12) Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Tokarev A, Quinn G, Kimura H, Nomaguchi M, Adachi A, Yamamoto N, Guatelli J, Ryo A. Interferon-Induced SCYL2 Limits Release of HIV-1 by Triggering PP2A-Mediated Dephosphorylation of the Viral Protein Vpu. *Sci Signal.* 5(245):ra73, 2012.
- 13) Obuchi M, Toda S, Tsukagoshi H, Oogane T, Abiko C, Funatogawa K, Mizuta K, Shirabe K, Kozawa K, Noda M, Kimura H, Tashiro M. Molecular analysis of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus genome associated

- with fatal infection cases in Gunma, Tochigi, Yamagata, and Yamaguchi Prefectures, Japan during the first pandemic wave. *Jpn J Infect Dis.* 65(4):363-367, 2012.
- 14) Nidaira M, Taira K, Hamabata H, Kawaki T, Gushi K, Mahoe Y, Maeshiro N, Azama Y, Okano S, Kyan H, Kudaka J, Tsukagoshi H, Noda M, Kimura H. Molecular epidemiology of human metapneumovirus (HMPV) from 2009 to 2011 in Okinawa, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 65(4):337-340, 2012.
 - 15) Kato M, Ishioka T, Kita H, Kozawa K, Hayashi Y, Kimura H. Eosinophil granular proteins damage bronchial epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *Int Arch Allergy Immunol.* 158(1):11-18, 2012.
 - 16) Kon M, Watanabe K, Tazawa T, Watanabe K, Tamura T, Tsukagoshi H, Noda M, Kimura H, Mizuta K. Detection of human coronavirus NL63 and OC43 from children with acute respiratory infections in Niigata, Japan, between 2010 and 2011. *Jpn J Infect Dis.* 65(3):270-272, 2012.
 - 17) Yoshida A, Kiyota N, Kobayashi M, Nishimura K, Tsutsui R, Tsukagoshi H, Hirano E, Yamamoto N, Ryo A, Saitoh M, Harada S, Inoue O, Kozawa K, Tanaka R, Noda M, Okabe N, Tashiro M, Mizuta K, Kimura H. Molecular epidemiology of attachment glycoprotein (G) gene in respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection in Japan in 2009/2010. *J Med Microbiol.* 61:820-829, 2012.
 - 18) Ikeda T, Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Matsuzaki Y, Fuji N, Imamura T, Oshitani H, Noda M, Kimura H, Ahiko T. Acute respiratory infections due to enterovirus 68, in Yamagata, Japan between 2005 and 2010. *Microbiol Immunol.* 56(2):139-143, 2012.
 - 19) Arakawa M, Okamoto-Nakagawa R, Toda S, Tsukagoshi H, Kobayashi M, Ryo A, Mizuta K, Hasegawa S, Hirano R, Wakiguchi H, Kudo K, Tanaka R, Morita Y, Noda M, Kozawa K, Ichiyama T, Shirabe K, Kimura H. Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan. *J Med Microbiol.* 61(Pt 3):410-419, 2012.
 - 20) Otsuki N, Sekizuka T, Seki F, Sakai K, Kubota T, Nakatsu Y, Chen S, Fukuhara H, Maenaka K, Yamaguchi R, Kuroda M, Takeda M. Canine Distemper Virus with the Intact C Protein Has the Potential to Replicate in Human Epithelial Cells by Using Human Nectin4 as a Receptor. *Virology.* (in press)
 - 21) Pratakpiriya W, Seki F, Otsuki N, Sakai K, Fukuhara H, Katamoto H, Hirai T, Maenaka K, Techangamsuwan S, Lan NT, Takeda M, Yamaguchi R. (2012) Nectin4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus and involved in the neurovirulence. *J Virol.* 86. 10207-10.
 - 22) Kawase M, Shirato K, van der Hoek L, Taguchi F, Matsuyama S. Simultaneous treatment of human bronchial epithelial cells with serine and cysteine protease inhibitors prevents severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *J Virol.* 2012 Jun; 86(12):6537-45.
 - 23) Okayama Y, Kashiwakura J, Sasaki-Sakamoto T, Matsumoto K, Hashimoto N, Ohmori K, Kawakami T, Saito H, Ra C. Omalizumab inhibits acceleration of FcεRI-mediated responsiveness of immature human mast cells by IgE. *Ann Allergy Asthma Immunol* 108(3): 188-194, 2012.
 - 24) Kashiwakura J, Okayama Y, Furue M, Kabashima K, Shimada S, Ra C, Shiraganian RP, Kawakami Y, Kawakami T. Most highly cytokinergic IgEs have polyreactivity to autoantigens. *Allergy, Asthma & Immunology Research* 4(6):332-340, 2012.
 - 25) Lee H, Kashiwakura J, Matsuda A, Watanabe Y, Sakamoto-Sasaki T, Matsumoto K, Hashimoto N, Saito S, Ohmori K, Nagaoka M, Tokuhashi Y, Ra C, Okayama Y. Activation of human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through FcγRI and FcγRII. *Arthritis Rheum Oct 10.* doi: 10.1002/art.37741, 2012

- 26) Okayama Y, Kashiwakura J, Matsuda A, Sasaki-Sakamoto T, Nunomura S, Yokoi N, Ebihara N, Kuroda K, Ohmori K, Saito H, Ra C. The interaction between Lyn and FcεRIβ is indispensable for FcεRI-mediated human mast cell activation. *Allergy* 67(10):1241-9, 2012.
- 27) Ohtsubo-Yoshioka M, Nunomura S, Kataoka TR, Okayama Y, Ra C. Fc receptor beta chain deficiency exacerbates murine arthritis in the anti-type II collagen antibody-induced experimental model. *Mod Rheumatol* Oct 6. [Epub ahead of print] 2012.
- 28) Kataoka TR, Fujimoto M, Moriyoshi K, Koyanagi I, Ueshima C, Kono F, Tsuruyama T, Okayama Y, Ra C, Haga H. PD-1 regulates the growth of human mastocytosis cells. *Allergol Int* in press.
- 29) Ra C, Nunomura S, Okayama Y: Fine-tuning of mast cell activation by FcεRIβ chain. *Frontiers Immunol* doi: 10.3389/fimmu.2012.00112
- 30) Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, Sato H, Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, Ryo A. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *J Proteomics*. 2012 Aug 3;75(3):4863-73.
- 31) 松田俊二, 小村珠喜, 塚越博之, 野田雅博, 木村博一. 重症心身障害児(者)病棟におけるヒトメタニューモウイルス感染症の流行. *感染症学雑誌*. 86(2):109-114, 2012.
- 32) 松田俊二, 小村珠喜, 塚越博之, 野田雅博, 木村博一: 重症心身障害児(者)病棟におけるヒトメタニューモウイルス感染症の流行. *感染症学雑誌*, 86 (2), 109-114, 2012
- 33) 水田克巳: 呼吸器感染症の病原診断、エンテロウイルス・ライノウイルス. *臨床とウイルス* 40、134-141、2012
- 34) 横井一, 田中俊光, 水村綾乃, 北橋智子: Real-time RT-PCR 法による RS ウイルス遺伝子の検出とサブグループ型別. *感染症学雑誌*, 86(5), 569-576, 2012
- 35) 吉岡政純, 石川和弘, 池田雄史, 清水恒広, 野田雅博, 木村博一: 小児における呼吸器感染症から検出されたヒトメタニューモウイルスに関する分子疫学および臨床医学的検討. *感染症学雑誌*, 86, 2012 (印刷中)
- 36) Okayama Y, Matsuda A, Kashiwakura J, Sasaki-Sakamoto T, Nunomura S, Ohmori K, Gon Y, Asano M, Akihisa T, Terui T, Saito H, Ra C. Distribution and localization of FcεRIβ subunit in human mast cells. In: Marone G, Triggiani M and Genovese A (eds). *Translational Science: from Basic to Clinical Immunology and Allergy*. pp. 105-108. Pacini Editore, Pisa, Italy, 2012.
- 37) 松田俊二, 小村珠喜, 塚越博之, 野田雅博, 木村博一: 重症心身障害児(者)病棟におけるヒト・メタニューモウイルス感染症の流行. *感染症学雑誌*, 86(2), 109-114, 2012
- 38) 木村博一, 塚越博之, 石井晴之, 吉田綾子, 野田雅博, 小澤邦壽. 呼吸器関連ウイルス(RSV)の基礎と分子疫学. *臨床免疫・アレルギー科*, 58(4): 414-418, 2012.
- 39) 木村博一, 梁明秀, 岡山吉道. 急性呼吸器ウイルス感染と喘息. *感染・炎症・免疫*, 42(2)59-63, 2012.
- 40) 岡山吉道, 柏倉淳一, 羅智靖: ヒトマスト細胞のサブセットとその性状. *臨床免疫・アレルギー科* 57(6):597-600, 2012
- 41) 柏倉淳一, 岡山吉道, 羅智靖: 神経ペプチドによるマスト細胞の活性化. *臨床免疫・アレルギー科* 57(6):634-638, 2012
- 42) 岡山吉道, 柏倉淳一, 大森一光, 羅智靖: アナフィラキシーショックの病態生理. *臨床免疫・アレルギー科* 58(5): 571-574, 2012.
- 43) 岡山吉道: マスト細胞とアレルギー. *日大医学雑誌* 71 (3):203-206, 2012.

- 44) 柏倉淳一, 岡山吉道, 羅智靖: ヒトマスト細胞活性化における PAF および神経ペプチドの役割 臨床免疫・アレルギー科 58(5): 565-570, 2012.
- 45) 岡山吉道, 柏倉淳一, 大森一光, 羅智靖: アナフィラキシーショックの病態生理 臨床免疫・アレルギー科 58(5): 571-574, 2012.
- 46) 岡山吉道, 片岡竜貴: Systemic mastocytosis 日本臨床 別冊 2012 in press
- 47) Nishina A, Kimura H, Kozawa K, Sommen G, Nakamura T, Heimgartner H, Koketsu M, Furukawa S, A superoxide anion-scavenger, 1,3-selenazolidin-4-one suppresses serum deprivation-induced apoptosis in PC12 cells by activating MAP kinase. *Toxicol Appl Pharmacol.* 257(3):388-395, 2011.
- 48) Mizuta K, Saitoh M, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Aoki Y, Ikeda T, Abiko C, Katsushima N, Itagaki T, Noda M, Kozawa K, Ahiko T, Kimura H. Detailed genetic analysis of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein gene in human parainfluenza virus type 1 isolates from patients with acute respiratory infection between 2002 and 2009 in Yamagata prefecture, Japan. *Virology* 433(1):533, 2011.
- 49) Sakano C, Morita Y, Goto K, Yokota Y, Annaka H, Fujita M, Kobatake S, Ishioka T, Hoshino T, Boonmar S, Pulsrikarn C, Nishina A, Kozawa K, Yamamoto S, Kimura H. Prevalence and genotype of *Salmonella Choleraesuis* in Gunma Prefecture, Japan. *Thai J Vet Med.* 41(3):321-326, 2011.
- 50) Itagaki T, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Mizuta K, Noda M, Kimura H, Matsuzaki Y. Saffold cardiovirus infection in children associated with respiratory disease and the similarity to coxsackievirus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 50(8):680-683, 2011.
- 51) Tsukagoshi H, Mizuta K, Abiko C, Itagaki T, Yoshizumi M, Kobayashi M, Kuroda M, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. The impact of saffold cardiovirus (SAFV) in patients with acute respiratory infection in Yamagata, Japan. *Scand J Infect Dis.* 43(8):669-671, 2011.
- 52) Fujitsuka A, Tsukagoshi H, Arakawa M, Goto-Sugai K, Ryo A, Okayama Y, Mizuta K, Nishina A, Yoshizumi M, Kaburagi Y, Noda M, Tashiro M, Okabe N, Mori M, Yokota S, Kimura H. A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness. *BMC Infect Dis.* 11:168, 2011.
- 53) Nishi M, Akutsu M, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Sam W. Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem.* 286(13):11593-11603, 2011.
- 54) Nakamura M, Taira K, Tsukagoshi H, Itokazu K, Nidaira M, Okano S, Kudaka J, Noda M, Takeda M, Kimura H. Detection of various respiratory viruses in patients with influenza-like illness before and after emergence of the 2009 Pandemic H1N1 influenza virus in Okinawa. *Jpn J Infect Dis.* 64(1):87-89, 2011.
- 55) Tanaka T, Yokoi H, Kobayashi K, Iwanade H, Noguchi Y, Mitsui Y, Okamoto A, Saitoh M, Noda M, Takeda M, Okabe N, Kimura H. First detection of measles virus genotype G3 in a Japanese woman: An imported case. *Jpn J Infect Dis.* 64(3):262-263, 2011.
- 56) Omura T, Iizuka S, Tabara K, Tsukagoshi H, Mizuta K, Matsuda S, Noda M, Kimura H. Detection of human metapneumovirus (HMPV) genomes during an outbreak of bronchitis and pneumonia in an old-age home in Shimane, Japan, in autumn 2009. *Jpn J Infect Dis.* 64(1):85-87, 2011.
- 57) Kato M, Tsukagoshi H, Yoshizumi M, Saitoh M, Kozawa K, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Kimura H. Different cytokine profile and eosinophil activation are involved in rhinovirus- and RS virus-induced acute exacerbation of childhood wheezing. *Pediatr Allergy Immunol.* 22(1 Pt 2):e87-94, 2011.

- 58) Ishioka T, Kimura H, Kita H, Obuchi M, Hoshino H, Noda M, Nishina A, Kozawa K, Kato M. Effects of respiratory syncytial virus infection and major basic protein derived from eosinophils in pulmonary alveolar epithelial cells (A549). *Cell Biol Int*. 35:467-474, 2011.
- 59) Hasegawa S, Hirano R, Okamoto-Nakagawa R, Ichiyama T, Shirabe K. Enterovirus 68 infection in children with asthma attacks: Virus-induced asthma in Japanese children *Allergy* 2011; 66(12) 1618-1620.
- 60) Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Shirabe K, Fukano R, Ichiyama T. Serum and cerebrospinal fluid cytokine profile of patients with 2009 pandemic H1N1 influenza virus-associated encephalopathy. *Cytokine*. 2011; 54(2):167-72.
- 61) Matsuyama S. [Protease-dependent cell entry mechanism of coronaviruses]. *Uirusu*. 2011 Jun; 61(1):109-16. Review. Japanese.
- 62) Gon Y, Matsumoto K, Terakado M, Sekiyama A, Maruoka S, Takeshita I, Kozu Y, Okayama Y, Ra C, Hashimoto S. Heregulin activation of ErbB2/ErbB3 signaling potentiates the integrity of airway epithelial barrier. *Exp Cell Res* 317:1947-53, 2011.
- 63) Hasegawa S, Hirano R, Hashimoto K, Haneda Y, Shirabe K, Ichiyama T. Characteristics of atopic children with pandemic H1N1 influenza viral infection: pandemic H1N1 influenza reveals 'occult' asthma of childhood. *Pediatr Allergy Immunol*. 2011 ;22, 119-23
- 64) 板垣勉、松寄葉子：ヒトメタニューモウイルス感染症の臨床経過とウイルス排泄期間の検討. *日本小児科学会雑誌*、115(4)、782-787、2011
- 65) Okabe N, Watanabe H, Ando S, Arakawa Y, Fujimoto T, Ikebe T, Imaoka K, Ishii N, Ito K, Kato H, Kimura H, Kobayashi M, Kurane I, Nozaki T, Sata T, Shimizu H, Tada Y, Takeda M, Tani N, Taniguchi K, Tashiro M, Taya K, Terajima J, Yamashita K, Wakita T. Annual Report on Findings of Infectious Disease Agents in Japan 2008. *Jpn J Infect Dis*. 62(supplement):1-131, 2011.
- 66) Yoshizaki S, Nishi M, Kondo A, Kojima Y, Yamamoto N, Ryo A. Vaccination with human induced pluripotent stem cells creates an antigen-specific immune response against HIV-1 gp160. *Frontiers in Microbiology*. 2:27, 2011.
- 67) 岡山吉道, 柏倉淳一, 権寧博, 相良博典, 大森一光, 照井正, 橋本修, 羅智靖: マスト細胞 救急医学 35(5): 533-535, 2011.
- 68) 岡山吉道, 柏倉淳一, 照井正, 権寧博, 浅野正岳, 秋久俊博, 松田彰, 羅智靖: マスト細胞の Fc レセプターI 鎖ペプチドによる IgE 依存性の脱顆粒抑制 臨床免疫・アレルギー科 56(5):648-653, 2011.
- 69) Yoshizumi M, Kimura H, Okayama Y, Ryo A, Nishina A, Noda M, Tsukagoshi H, Kozawa K, Kurabayashi M. Relationships between cytokine profiles and signaling pathways in parainfluenza virus-infected lung fibroblasts. *Front Microbiol*. 1: Article 124, 1-7, 2010.
- 70) Goto-Sugai K, Tsukagoshi H, Mizuta K, Matsuda S, Noda M, Sugai T, Saito Y, Okabe N, Tashiro M, Kozawa K, Tanaka R, Morita Y, Nishina A, Kimura H. Genotyping and phylogenetic analyses of major genes in respiratory syncytial virus isolated from infants with bronchiolitis in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 63(6):393-400, 2010.
- 71) Tsukagoshi H, Masuda Y, Mizutani T, Mizuta K, Saitoh M, Morita Y, Nishina A, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. Sequence and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus (SAFV) genotype 3 isolates from children with upper respiratory infection in Gunma, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 63(5):378-380, 2010.

- 72) Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Itagaki T, Katsushima N, Matsuzaki Y, Hongo S, Noda M, Kimura H, Ahiko T. Endemicity of human metapneumovirus subgenogroups A2 and B2 in Yamagata, Japan between 2004 and 2009. *Microbiol Immunol.* 54(10):634-638, 2010.
- 73) Okazaki K, Kondo M, Kubota M, Kakinuma R, Hoshino A, Kimura H, Itoh S. High-dose usage of lorazepam for refractory seizure in a Japanese infant of holoprosencephaly with cortical dysplasia. *Pediatr Int.* 52(4):e664-667, 2010.
- 74) Nakamura M, Itokazu K, Taira K, Kawaki T, Kudaka J, Nidaira M, Okano S, Kimura H, Noda M. Detection and phylogenetic analysis of human rhinoviruses from Okinawa, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 63(3):221-223, 2010.
- 75) Itagaki T, Abiko C, Ikeda T, Aoki Y, Seto J, Mizuta K, Ahiko T, Tsukagoshi H, Nagano M, Noda M, Mizutani T, Kimura H. Detection and phylogenetic analysis of Saffold cardiovirus (SAFV) from children with exudative tonsillitis in Yamagata, Japan. *Scand J Infect Dis.* 42:950-952, 2010.
- 76) Toda S, Kimura H, Noda M, Mizuta K, Matsumoto T, Suzuki E, Shirabe K. Phylogenetic analysis of human metapneumovirus from children with acute respiratory infection in Yamaguchi, Japan during summer 2009. *Jpn J Infect Dis.* 63(2):139-140, 2010.
- 77) Mizuta K, Hirata A, Suto A, Aoki Y, Ahiko T, Itagaki T, Tsukagoshi H, Morita Y, Obuchi M, Akiyama M, Okabe N, Noda M, Tashiro M, Kimura H. Phylogenetic and cluster analysis of human rhinovirus genogroup A (HRV-A) isolated from children with acute respiratory infections in Yamagata, Japan. *Virus Res.* 147(2):265-274, 2010.
- 78) Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, Kawase M, Takeda M, Taguchi F. Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *J Virol.* 2010 Dec; 84(24):12658-64.
- 79) Matsuda A, Ebihara N, Yokoi N, Okayama Y, Watanabe Y, Kawasaki S, Tanioka H, Kawasaki S, Walls AF, Hamuro J, Kinoshita S, Murakami A: Basophils in the giant allergic keratoconjunctivitis. *Brit J Ophthalmol* 94(4):513-518, 2010.
- 80) Kajiwara N, Sasaki T, Bradding P, Cruse G, Sagara H, Ohmori K, Saito H, Ra C, Okayama Y: Activation of human mast cells through the platelet activating factor receptor. *J Allergy Clin Immunol* 125(5):1137-1145, 2010.
- 81) Fukunaga M, Nunomura S, Nishida S, Endo K, Gon Y, Hashimoto S, Hashimoto Y, Okayama Y, Makishima M, Ra C: Mast cell death induced by 24(S),25 -epoxycholesterol. *Exp Cell Res* 316:3272-3281, 2010.
- 82) Kyuwa S, Takagaki S, Matsuyama S, Taguchi F, Saegusa J, Iwakura Y, Tagawa Y, Yoshikawa Y. Characterization of a variant virus from ascitic fluid of subacute granulomatous serositis in interferon-gamma-deficient C57BL/6 mice persistently infected with murine coronavirus strain JHM. *Viral Immunol.* 23(4):437-442, 2010.
- 83) Watanabe S, Maeda K, Suzuki K, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Shimoda H, Kato K, Yoshikawa Y, Morikawa S, Kurane I, Akashi H, Mizutani T. Identification of a novel betaherpesvirus in bats using a rapid determination system for viral RNA sequences (RDV). *Emerg Infect Dis.* 16:986-988. 2010.
- 84) Watanabe S, Mizutani T, Sakai K, Iizuka I, Shiota T, Sayama Y, Tsuda S, Kato K, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Shimada M, Yoshizaki S, Jounai N, Kondo A, Ichino M, Ryo A, Okuda K. DNA vaccine expressing HIV-1 gp120/immunoglobulin fusion protein enhances cellular immunity. *Vaccine.* 28(31):4920-4927, 2010.

- 85) Pulikkan JA, Dengler V, Peer Zada AA, Kawasaki A, Geletu M, Pasalic Z, Bohlander SK, Ryo A, Tenen DG, Behre G. Elevated PIN1 expression by C/EBPalpha-p30 blocks C/EBPalpha-induced granulocytic differentiation through c-Jun in AML. *Leukemia*. 24(5):914-923, 2010.
- 86) Akiyama T, Abe Y, Iida H, Endo H, Hosono K, Yoneda K, Takahashi H, Inamori M, Ryo A, Yamanaka S, Inayama Y, Nakajima A: Endoscopic therapy using an endoscopic variceal ligation for minute cancer of the esophagogastric junction complicated with esophageal varices: a case report. *J Med Case Reports*. 2010 May 23;4:149.
- 87) Kanzaki S, Yamaguchi A, Yamaguchi K, Kojima Y, Suzuki K, Koumitsu N, Nagashima Y, Nagahama K, Ehara M, Hirayasu Y, Ryo A, Aoki I, Yamanaka S: Thymic Alterations in GM2 Gangliosidosis Model Mice. *PLoS ONE*. 2010 Aug 10;5(8). pii: e12105.
- 88) Kojima Y, Ryo A: Pinning down viral proteins: A new prototype for virus-host cell interaction. *Frontiers in Microbiology*. 1:107, 2010.
- 89) 木村博一, 野田雅博, 水田克巳, 松田俊二, 田代真人. ウイルス疾患の遺伝子解析と臨床への応用. *日本臨床*, 68(8):139-143, 2010.
- 90) 岡山吉道, 松田彰, 布村聡, 佐々木朋美, 羅智靖: マスト細胞と高親和性 IgE 受容体 beta 鎖 臨床免疫・アレルギー科 53(5):481-485, 2010.
- 91) 岡山吉道, 梶原直樹, 佐々木朋美, 羅智靖: 血小板活性化因子(platlet activating factor; PAF)によるマスト細胞活性化 アレルギー・免疫 17(6):124-129, 2010.
- 92) 岡山吉道, 権寧博, 浅野正岳, 秋久俊博, 照井正, 羅智靖: PAF レセプターによるマスト細胞の活性化 臨床免疫・アレルギー科 54(2):149-154, 2010.
- 93) 岡山吉道, 松田彰, 佐々木朋美, 羅智靖: アトピー関連遺伝子 ST2, IL-33 のアレルギー疾患における発現とその機序 臨床免疫・アレルギー科 54(5):553-557, 2010.
- 94) 木村博一, ウイルスと細菌の滅菌・消毒法. 木村博一編集, 食の安全に関する必要知識と実践, 大阪:メディカルレビュー社, 2012:49-57.
- 95) 木村博一, 菅井和子, 田代真人. Respiratory Syncytial(RS)ウイルス. 牛島廣治, 田代真人監修, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011:40-43.
- 96) 木村博一, 水田克巳, 調恒明, 田代真人. ヒトメタニューモウイルスウイルス. 牛島廣治, 田代真人監修, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011:57-59.
- 97) 田代真人, 木村博一. 臨床ウイルス感染症学概論. 牛島廣治, 田代真人監修, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011:24-30.
- 98) 岡山吉道, 木村博一, 羅智靖. ライノウイルス. 牛島廣治, 田代真人監修, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011:44-47.
- 99) 水田克巳, 木村博一, 吉住正和, 田代真人. ヒトパラインフルエンザウイルス. 牛島廣治, 田代真人監修, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011:36-38.
- 100) 水田克巳, 調恒明, 木村博一, 田代真人. ヒトアデノウイルス. 牛島廣治, 田代真人監修, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011:52-55.
- 101) 野田雅博, 水田克巳, 木村博一, 田代真人. ウイルス感染症の実験室内検査診断の概要と実際. 牛島廣治, 田代真人監修. ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011:202-204.
- 102) 塚越博之, 調恒明, 木村博一. ウイルス遺伝子増幅及び解析法. 牛島廣治, 田代真人監修, ウイルス

感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011:269-290.

103) 水田克巳, 木村博一. 調 恒明, 酵素免疫測定法・免疫クロマト法. 牛島廣治, 田代真人監修, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011:344-351.

104) 塚越博之, 小澤邦壽, 木村博一. 蛍光抗体法. 牛島廣治, 田代真人監修, ウイルス感染症の検査・診断スタンダード, 第1版, 東京:羊土社, 2011:352-362.



ORIGINAL ARTICLE

Induction of cells with cancer stem cell properties from nontumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors

M Nishi¹, Y Sakai¹, H Akutsu², Y Nagashima³, G Quinn¹, S Masui⁴, H Kimura⁵, K Perrem⁶, A Umezawa², N Yamamoto⁷, SW Lee⁸ and A Ryo¹

Cancer stem cells (CSCs), a small and elusive population of undifferentiated cancer cells within tumors that drive tumor growth and recurrence, are believed to resemble normal stem cells. Although surrogate markers have been identified and compelling CSC theoretical models abound, actual proof for the existence of CSCs can only be had retrospectively. Hence, great store has come to be placed in isolating CSCs from cancers for in-depth analysis. On the other hand, although induced pluripotent stem cells (iPSCs) hold great promise for regenerative medicine, concern exists over the inadvertent co-transplantation of partially or undifferentiated stem cells with tumorigenic capacity. Here we demonstrate that the introduction of defined reprogramming factors (OCT4, SOX2, Klf4 and c-Myc) into MCF-10A nontumorigenic mammary epithelial cells, followed by partial differentiation, transforms the bulk of cells into tumorigenic CD44⁺/CD24^{low} cells with CSC properties, termed here as induced CSC-like-10A or iCSC-10A cells. These reprogrammed cells display a malignant phenotype in culture and form tumors of multiple lineages when injected into immunocompromised mice. Compared with other transformed cell lines, cultured iCSC-10A cells exhibit increased resistance to the chemotherapeutic compounds, Taxol and Actinomycin D, but higher susceptibility to the CSC-selective agent Salinomycin and the Pin1 inhibitor Juglone. Restored expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a abrogated the CSC properties of iCSC-10A cells, by inducing cellular senescence. This study provides some insight into the potential oncogenicity that may arise via cellular reprogramming, and could represent a valuable *in vitro* model for studying the phenotypic traits of CSCs *per se*.

Oncogene advance online publication, 14 January 2013; doi:10.1038/onc.2012.614

Keywords: cancer stem cell; reprogramming factors; oncogenesis; MCF-10A; p16INK4a

INTRODUCTION

Recent advances in stem cell and cancer biology have provided strong, although indirect or retrospective, evidence for the existence of cancer stem cells (CSCs) in a variety of both solid and hematopoietic tumors.^{1–3} In solid tumors, a small subset of CSCs appear to reside within the tumor mass and this population constitutes a reservoir of cancer-initiating cells with the exclusive ability to self-renew and maintain this mass.⁴ This cell population has come to be implicated as the source of disease recurrence and metastasis during the long period of cancer development.^{1–3} Most CSCs exhibit resistance to conventional anticancer therapies including chemotherapeutic agents and ionizing radiation.⁵ The development of novel drugs that target CSC-specific factors should aim to effectively eliminate the CSC population within the tumor, resulting in complete cure of the disease.⁶ To date, however, evaluation of drugs that specifically target CSCs has been hampered because of the difficulty in isolating CSCs from the bulk of tumor tissues, and the manipulation of pure populations *ex vivo*.^{7,8}

In common with normal stem cells, CSCs are defined by their double capacity for self-renewal and tissue regeneration through

differentiation, and can give rise to phenotypically diverse cells.⁴ It is quite plausible that CSCs may use the molecular machinery and factors that control normal stem cell function to maintain their oncogenic existence.^{9–11} It almost goes without saying that deeper comprehension of the characteristics of CSCs and their parallels with normal stem cells will in turn further our understanding of cancer pathogenesis.^{7,12} To date, the characterization of CSC properties has been limited, and the putative factors directing both normal and transformed stem cell processes have not been elucidated, largely because of the difficulty in obtaining CSCs *in vitro*.

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are generated from nonpluripotent cells, typically adult somatic cells, through the ectopic expression of the transcription factors OCT4 and SOX2 combined with either Klf4 and c-Myc, or Lin28 and Nanog.^{13,14} The iPSCs acquire the features of embryonic stem cells (ESCs) including immortal cell growth and pluripotency, thus enabling their self-renewal and differentiation into multiple lineages.^{13,14} Although it is widely believed that iPSC technology has great therapeutic potential and other medical applications, the molecular events occurring during and after the reprogramming

¹Department of Microbiology, Yokohama City University School of Medicine, Yokohama, Japan; ²Department of Reproductive Biology, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan; ³Department of Molecular Pathology, Yokohama City University School of Medicine, Yokohama, Japan; ⁴Center for iPS Cell Research and Application (CIRA), Kyoto University, Kyoto, Japan; ⁵Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan; ⁶The Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO), Dickson, Australian Capital Territory, Australia; ⁷Department of Microbiology, National University of Singapore, Singapore and ⁸Cutaneous Biology Research Center, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Charlestown, MA, USA. Correspondence: Professor A Ryo, Department of Microbiology, Yokohama City University School of Medicine, 3-9 Fuku-ura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan.
E-mail: aryo@yokohama-cu.ac.jp

Received 25 May 2012; revised 16 November 2012; accepted 17 November 2012

process in these cells have not been clarified. Furthermore, the delineation of molecular signatures to detect malignant transformation among human iPSCs represents an important new challenge in both stem cell and cancer biology. In this regard, several recent studies describe attempts to create CSC-like cells via the ectopic expression of reprogramming factors in already transformed cell lines including gastrointestinal cancer, chronic myeloid leukemia and melanoma.^{15–17} In these studies, however, it is believed that CSC-like properties pre-existed in the original tumorigenic cell line, and could be selected for during the reprogramming step.

In the current study, we used iPSC technology to reprogram nontumorigenic human MCF-10A mammary epithelial cells. The resultant cells possess the hallmarks of CSCs and generate tumors in an immunosuppressed mouse model comprising cells of multiple lineages. These results help shed light on the possibility for tumorigenicity of epithelial cells by defined reprogramming factors, and provide a potentially valuable system for the study of CSCs *in vitro*.

RESULTS

Reprogramming of human immortalized mammary epithelial MCF-10A cells by defined reprogramming factors

MCF-10A is a mammary epithelial cell line, immortalized by a disruption of the p16 tumor-suppressor gene due to a spontaneous chromosomal translocation.^{18,19} Like normal human breast epithelial cells, MCF-10A cells have no tumor initiation ability, but have been shown to be more susceptible to oncogenic transformation than primary cells.²⁰ The retroviral-mediated introduction of OCT4, SOX2, Klf-4 and c-Myc into MCF-10A cells, followed by growth in human ESC (hESC) culture medium supplemented with basic fibroblast growth factor on mouse embryonic fibroblast (MEF) feeder cells, gave rise to iPS-like (iPSL) colonies after 14 days (Figures 1a and b). The sole introduction of the c-Myc oncogene did not generate iPS-like colonies (data not shown). The colonies that formed demonstrated well-defined phase-bright borders surrounded by feeder cells and comprising small cells with high nuclear/cytoplasmic ratios and prominent nucleoli, indistinguishable from standard iPSCs (Figure 1b).

These iPSL colonies were continually cultured up to 21 days and 11 alkaline phosphatase-positive representative colonies were picked up. Of these, four clones (designated iPSL-10A1–4) were chosen at random and further analyzed. Immunocytochemical analysis revealed the expression of pluripotent stem cell markers including OCT4, SOX2, Nanog and TRA-1-60 (Figure 1b). Stem cell marker expression was also confirmed in these clones by reverse transcriptase-PCR and immunoblotting (Figures 1c and d). Conversely, expression of the differentiated epithelial cell marker cytokeratin 7 (CK7) was silenced during the reprogramming process (Figure 1d). Additionally, expression of Pin1 was activated in iPSL-10A cells (Figure 1d), as is the case for normal iPS cells²¹ (Figure 1d). iPSL-10A colonies could be expanded in an undifferentiated state beyond 20 passages (data not shown). Analysis with an Illumina Human Methylation 27 Bead Chip (MBL, Nagoya, Japan) revealed that the DNA methylation patterns of iPSL-10A cells were closer to those of normal iPSCs than to the parental MCF-10A cells (Figure 1e).

We next examined whether the reprogramming in these cells might be associated with the insertion of the transgenes in specific regions of the genome by using linear amplification-mediated PCR and sequencing analysis of proviral integration sites among the iPSL-10A cell clones. The linear amplification-mediated PCR results revealed that the transgenes that were detectable were inserted at different, random chromosomal loci among the four clones (Figure 1f). Moreover, comprehensive karyotyping revealed that iPSL-10A cells were indistinguishable from the parental MCF-10A cells (Figure 1g).

In vitro differentiation of iPSL-10A cells into CSC-like cells

We next attempted to differentiate the iPSL-10A cells *in vitro*, based on the rationale that a differentiation step would be incorporated into any type of regenerative medicine application involving cell transplantation using iPSCs. A standard and general method for ESC differentiation *in vitro* is via the formation of cell aggregates in nonadherent spheroids known as embryoid bodies (EBs).²² As for normal iPSCs, the iPSL-10A cells formed EB-like spherical aggregates in suspension culture containing differentiation-promoting medium (Figures 2a and b). iPSL-10A-derived EB-like colonies were subsequently transferred into culture dish-attachment conditions and allowed to continue to differentiate for a further 7 days (Figures 2a and b). The attached cells were then exposed to maintenance cell culture medium for a further 15 days, and the surviving cells designated as iCSCL-10A. As a control, we performed the same procedure for standard iPSCs derived from normal human mammary epithelial cells, the products of which were designated as iPSC-EBD (iPS cells having undergone EB-mediated differentiation). Immunofluorescence analysis revealed that >90% of iCSCL-10A cells express the CSC markers CD44 and ABCG2 as well as the stem cell marker SOX2, but negligible levels of differentiated epithelial markers CK7, CK8 and smooth muscle actin (Figure 2c). In contrast, iPSC-EBD cells did not express any of the three CSC markers, but expressed all three differentiation markers (Figure 2c). Importantly, the majority of parental iPSL-10A cells expressed CD44 and ABCG2 at very low levels. However, a very small population of these cells exhibited levels of expression of both proteins that were comparable to iCSCL-10A cells (Supplementary Figure S1).

Most interestingly, iCSCL-10A cells were found to have acquired malignant properties in focus formation (Figures 3a and b), colony formation (Figures 3c and d) and cell invasion assays (Figures 3e and f), whereas the iPSC-EBD cells showed no malignant phenotype in any of these assays (Figures 3a–f). These results indicate that the iCSCL-10A cells had undergone malignant transformation following nuclear reprogramming.

Characterization of the CSC properties of the iCSCL-10A clones

Subsequent to 30 days of differentiation/maintenance of iPSL-10A cells, flow cytometric analysis revealed that each of the resulting iCSCL-10A1–4 cells harbored a population (>90%) with a CD44⁺/CD24^{low} marker profile (Figure 4a) that has previously been associated with CSCs.²³ The iCSCL-10A cells had ability to form tumor spheres as an *in vitro* assay of the self-renewal capacity of CSCs. Indeed, iCSCL-10A cells showed an ~10-fold higher tumor sphere-forming ability relative to MCF7 or MCF-10A-Ras cells, transformed by the introduction of the HrasV12 oncogene into MCF-10A cells²³ (Figures 4b and c).

Reverse transcriptase-PCR analysis revealed that iCSCL-10A cells, but not MCF7 and MCF-10A-Ras cells, expressed aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) as a CSC marker²⁴ (Figure 4d). The iCSCL-10A cells also expressed the epithelial-to-mesenchymal transition-related genes Snail and Slug (Figure 4d). Immunofluorescent analysis revealed the nuclear localization (a hallmark of activation) of Gli1 (hedgehog signaling) and Notch1 (Notch signaling), but not β -Catenin (Wnt signaling) in iCSCL-10A cells (Supplementary Figure S2a). Furthermore, the transforming growth factor- β signaling proteins Smad1, Smad3 and Smad5 were preferentially activated in these cells as revealed by immunoblotting analysis with phospho-Smad-specific antibodies (Supplementary Figure S2b).

As Slug has been shown to induce the CSC phenotype in MCF-10A cells,²⁵ we performed a knockdown analysis of this gene in iCSCL-10A cells and found in a tumor sphere assay that slug-shRNA-transduced cells exhibited reduced growth and self-renewal ability compared with control cells (Supplementary

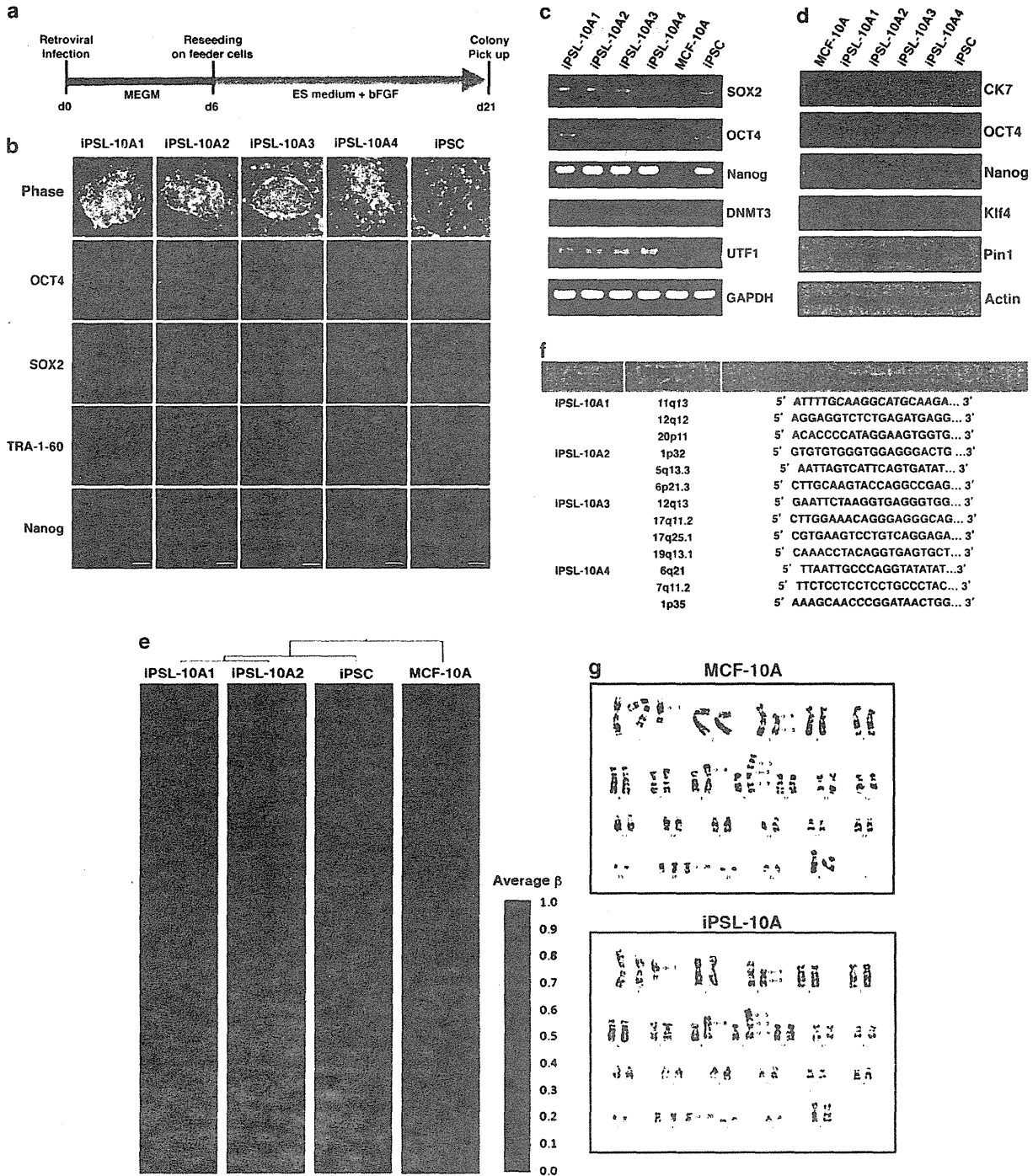


Figure 1. Reprogramming of human MCF-10A mammary epithelial cells. **(a)** Experimental scheme for the reprogramming of MCF-10A cells. **(b)** Phase-contrast images and immunofluorescence images of iPSC-like colonies from MCF-10A cells (iPSL-10A) and normal human iPSCs stained with antibodies against OCT4, SOX2, TRA-1-60 and Nanog. Scale bar, 500 μ m. **(c)** Semiquantitative reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) analysis of iPSC markers in iPSL-10A cell clones 1–4, normal human iPSCs and MCF-10A cells. SOX2 and OCT4 are endogenously derived. **(d)** Immunoblotting of the stem cell marker proteins in iPSL-10A cell clones 1–4, normal human iPSCs and MCF-10A cells. **(e)** DNA methylation ‘heat map’ of iPSL-10A cells. DNA methylation analysis was performed using an Illumina Human Methylation 27 Beads Chip (MBL) with genomic DNA extracted from iPSL-10A clones 1 and 2, normal human iPSCs and MCF-10A cells. The β -value was calculated by a quantitative measure of the DNA methylation levels at specific CpG islands. Average β -values were subjected to unsupervised hierarchical clustering based on the Manhattan distance and average linkage. **(f)** High-resolution insertion-site analysis by linear amplification-mediated PCR (LAM PCR). Genomic DNA was prepared using phenol/chloroform extraction and subjected to LAM PCR. Amplicons were validated by sequencing. **(g)** Standard G-band chromosome analysis of MCF-10A and iPSL-10A cells. Arrows indicate identifiable aberrations common to both cell types.