

201420041A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
課題番号 (H25-新興-一般-019)

粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンの開発

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 保富 康宏
独立行政法人医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター

平成27年(2015)年3月

目 次

I. 総括研究報告

粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンの開発

保富 康宏 ----- 1

II. 分担研究報告

1. ワクチン効果の判定と解析

保富 康宏 ----- 3

2. 結核菌抗原遺伝子組み込みパラインフルエンザ2型ウイルスの作製

野阪 哲哉 ----- 8

3. ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス (hPIV2) 感染状況に関する研究

庵原 俊昭 ----- 11

4. ワクチンベクターに対する自然免疫応答および安全性の検討

石井 健 ----- 17

5. 結核ワクチンにおける粘膜免疫応答の解析

國澤 純 ----- 23

6. パラインフルエンザ2型ウイルスベクターの病理学的安全性に関する研究

伊奈田 宏康 ----- 32

7. 遺伝子導入細胞の作製と最適なウイルス増殖法の開発

松尾 和浩 ----- 36

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 41

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 49

厚生労働科学研究費 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
総括研究報告書

医科学研究に重要な霊長類資源の繁殖・育成と疾患モデルの作製・解析

研究代表者 保富康宏 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長

結核に対する唯一のワクチンである BCG は成人の肺結核に対しては明確な予防効果は認められない。本研究ではパラインフルエンザ 2 型ウイルス (HPIV2) に既に報告した抗原に加え、新たな結核抗原を組み込んだ粘膜免疫誘導型結核ワクチンの開発を試み、ワクチン効果および生体内での免疫反応や病理学的変化を検討し、さらにヒトにおける HPIV2 の感染状況も調べた。また、既に報告している HPIV2 の改良も試みた。HPIV2 の自然免疫誘導機序がマウスにおいて示され、また呼吸器局所での二次リンパ節の存在が確認された。この二次リンパ節は経鼻投与カニクイザルにおいては認められなかった。新たに作製した HPIV2 においてもマウス体内において免疫誘導、さらにはワクチン効果を示した。また、ヒトでの HPIV2 感染における疫学調査では広く蔓延していることも確認された。以上の事からマウスから霊長類までを用いた接種実験に加え、ヒトでの疫学調査に至るワクチン開発における大きな進展が認められた。

研究分担者

野阪 哲哉 三重大学大学院医学系研究科感染症制御医学・分子遺伝学分野 教授
庵原 俊昭 (独) 国立病院機構三重病院 院長
石井 健 (独) 医薬基盤研究所プロジェクトリーダー
國澤 純 (独) 医薬基盤研究所プロジェクトリーダー
伊奈田 宏康 鈴鹿医療科学大学・薬学部・病理学研究室 教授
松尾 和浩 日本 BCG 製造 (株) 日本 BCG 研究所 研究開発部 部長

A. 研究目的

エイズ、マラリア、結核 (TB) は世界 3 大感染症と言われ、その中でも結核感染症は空気感染により伝搬することから感染防御が最も困難であると考えられている。更に、近年出現した多剤耐性結核菌 (MDR-TB)、超多剤耐性結核 (XDR-TB) においては、その脅威は著しく増大している。TB 予防ワクチンとしては世界中で BCG が使用されているが、成人の肺結核においての予防効果が認められないために、現在の世界的な蔓延となっている。近年の免疫学の発展により、多くの感染症が成立する呼吸器や消化器等の粘膜での免疫反応は、生体の全身性の免疫反応と異なり、粘

膜において免疫反応を誘導するためには粘膜面に直接抗原を運ぶ必要があることが判明した。このことから現在では肺結核予防のためには粘膜免疫誘導型ワクチンの開発が必須であると考えられている。本研究ではパラインフルエンザ 2 型ウイルス (HPIV2) に結核抗原を組み込んだ新たな粘膜免疫誘導型結核ワクチンの開発を目的とした。

B. 研究方法

分担報告書参照

C. 研究結果

1) 非複製型 rHPIV2-Ag85B を用いた系

では結核に対し有効な免疫反応が誘導されることが確認された (Vaccine 2014)。

- 2) 新たな抗原を用いたワクチンにおいてもワクチン効果、免疫反応の誘導も確認された。
- 3) 新たな非複製型 HPIV2 を作製した。
- 4) HPIV2 の HN 遺伝子発現 Vero 細胞を作製した。
- 5) HPIV2 感染状況を調査し、HPIV2 は自然界に広く蔓延していることが判明した。
- 6) 呼吸器症状を呈して当院を受診した小児から鼻汁・咽頭ぬぐい液から HPIV2 を調査したところ、明確な病原性は低く、学童期までには通常感染していると考えられた。
- 7) rHPIV2 の内因性アジュバント効果とその作用機序の解析したところ、ウイルス RNA が起きく関与していることが判明した。
- 8) マウス肺内に rHPIV2 を投与したところ肺内にリンパ組織が多数形成されていた。

D. 考 察

結核は空気感染により伝播する疾患であるために世界 3 大感染症の中でも最もワクチンの必要な感染症と考えられている。呼吸器粘膜より感染を示す本疾患に関しては呼吸器粘膜に免疫反応を誘導する粘膜免疫誘導型ワクチンが感染防御に効果的であると考えられる。粘膜免疫の誘導のためには抗原を適切に粘膜面に端株が必要である。現在までに結核ワクチンにおいてはヒト治験が 7 件行われているが、その中で粘膜免疫誘導型ワクチンはない。本研究ではヒトの呼吸器粘膜に感染を示し極めて病原性の低い HPIV2 をベクターとした全く新しい粘膜免疫誘導型経鼻投与ワクチンの開発を試みている、

本研究では新規のワクチン特に組み換えウイルスワクチン等の新規技術を用い

たワクチンでは効果の証明 (POC: proof of concept) のみならず、病原性の検討、自然界でのベクターウイルスの蔓延状況等、実用化に向けて必要な知見を広く収集し実用化に向けて取り組んでおり、それらを踏まえ実用化への歩みを加速させていきたいと考えている。

E. 結 論

HPIV2 ベクターを用いた結核ワクチンの開発に向けて多様な知見が得られた。

F. 研究発表

分担研究報告書参照

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

分担研究報告書参照

ワクチン効果の判定と解析

研究分担者：保富康宏 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長

粘膜より感染を示す病原体には粘膜での免疫反応が感染防御等に重要であり、この粘膜免疫を誘導するためには抗原を適切に粘膜面に投与しなければならない。報告者らは既にヒト呼吸器に感染を示すヒトパラインフルエンザ2型ウイルス (HPIV2) を用い呼吸器粘膜に抗原を伝達する手法において肺結核に対し、マウスにおいてワクチン効果があることを既に報告した。本研究ではこのワクチンがカニクイザルにおけるワクチン効果の検討と、従来までの抗原ではなく新たに4種類の抗原を組み込んだ HPIV2 による新規ワクチンの作製を行った。カニクイザルに結核抗原 Ag85B を組み込んだ rHPIV2-Ag85B を3~4回経鼻投与したところ、末梢血ならびに粘膜関連リンパ節、肺胞洗浄液にて Ag85B 特異的免疫反応が認められた。また、従来からワクチン効果があると報告されている抗原 ESA-6、感染非発症個体で認識されている2種類の抗原 (Latency 1、Latency 2) および高病原性変異時に発現する抗原 (Resuscitation) の4種類を組み込んだ rHPIV2-CRL2 を作製しマウスに経鼻投与したところ特異的免疫を誘導し、その免疫反応は従来までの rHPIV2-Ag85B と同時投与にて増強されていることが確認された。

以上の事から HPIV2 を用いた経鼻結核ワクチンは新たなワクチンとなり得る可能性が示された。

A. 研究目的

エイズ、マラリア、結核 (TB) は世界3大感染症と言われ、その中でも結核感染症は空気感染により伝播することから感染防御が最も困難であると考えられている。更に、近年出現した多剤耐性結核菌 (MDR-TB)、超多剤耐性結核 (XDR-TB) においては、その脅威は著しく増大している。TB 予防ワクチンとしては世界中で BCG が使用されているが、成人の肺結核においての予防効果が認められないために、現在の世界的な蔓延となっている。近年の免疫学の発展により、多くの感染症が成立する呼吸器や消化器等の粘膜での免疫反応は、生体の全身性の免疫反応と異なり、粘膜において免疫反応を誘導するためには粘膜面に直接抗原を運ぶ必要があることが判明した。このことから現在では肺結核予防のためには粘膜免疫誘導型ワクチンの開発

が必須であると考えられている。本研究ではパラインフルエンザ2型ウイルス (HPIV2) に結核抗原を組み込んだ新たな粘膜免疫誘導型結核ワクチンの開発を目的とした。

B. 研究方法

1. 挿入抗原の確認：リバーシジェネティクス法にて作製した結核抗原遺伝子組み込み HPIV2 (rHPIV2-CRL2) を Vero 細胞に感染させ、mRNA の発現を確認した。
2. rHPIV2-CRL2 免疫マウスにおける特異的免疫の誘導：BCG 感作マウスにおける免疫反応の測定はマウスに BCG を投与し、6週後から rHPIV2-CRL2 を2週間隔で4回経鼻投与し、最終免疫から2週後に脾細胞において行った。BCG 非感作マウスでは rHPIV2-CRL2 と rHPIV2-Ag85B を混合して2週間隔で4回経鼻投与し、

最終免疫から2週後に脾細胞において特異的免疫反応を測定した (Fig. 1)。

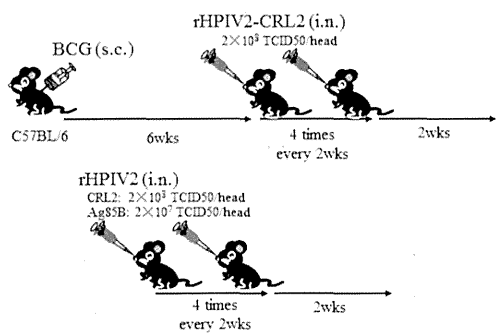


Fig. 1 rHPIV2-CRL2 および rHPIV2-Ag85B 投与スケジュール

3. カニクイザルにおける Ag85B 特異的免疫の誘導: rHPIV2-Ag85B を経鼻投与にてマウスに2週間隔2ないし3~4回投与した。末梢血、各種リンパ節および肺胞洗浄液を用いた Ag85B 特異的 IFN- γ 細胞を ELISPOT にて測定した。また、HPIV2 に対する抗体も測定した。(Fig. 3)。

C. 研究結果

1. 挿入抗原 Ag85B の確認: 挿入抗原である ESAT-6、Latency 1 および Resuscitation の mRNA は rHPIV2-CRL2 感染 Vero 細胞において確認された (Fig. 2)。

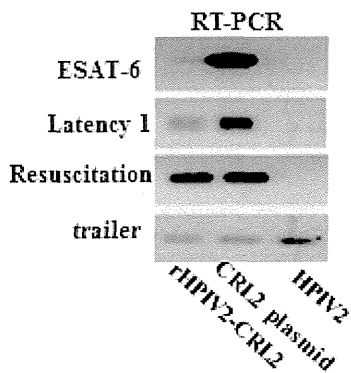


Fig. 2 各 CRL2 mRNA の発現確認

2. rHPIV2-CRL2 免疫マウスにおける特異的免疫の誘導: rHPIV2-CRL2 経鼻投与 BCG 感作マウスにおいて脾細胞の各抗

原特異的免疫反応を見たところ、BCG 単独に比較し、明らかに強い免疫反応が誘導されていた (Fig. 3A)。また、BCG 非感作マウスでは CRL2 各種抗原に対する特異的免疫反応は rHPIV2-CRL2 単独に比較し rHPIV2-Ag85B を混合投与することで増強されていた (Fig. 3B)。

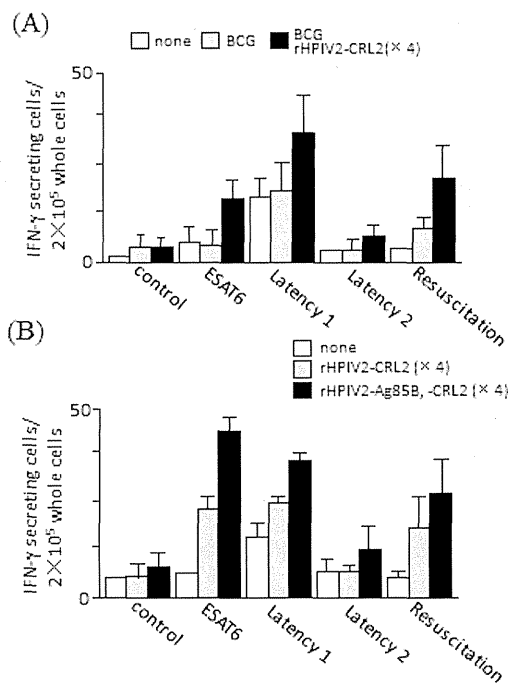


Fig. 3 マウスにおける新規ワクチンの免疫誘導効果

3. カニクイザルにおける Ag85B 特異的免疫と HPIV2 特異抗体の誘導: rHPIV2-Ag85B 免疫カニクイザルにおいて末梢血における Ag85B 特異的免疫反応と血漿中の HPIV2 特異抗体を測定したところ、1 回の免疫でどちらも誘導されていたが、HPIV2 特異抗体の誘導による Ag85B 特異的免疫反応の阻害は認められなかった (Fig. 4)。

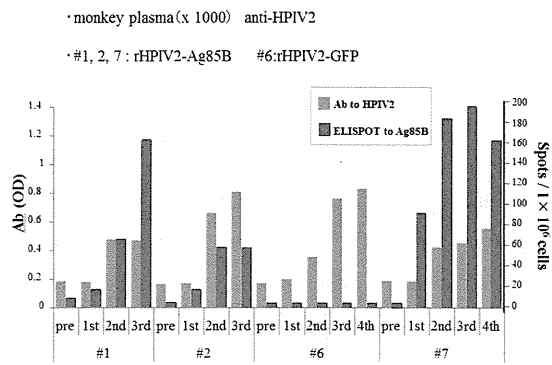


Fig. 4 rHPIV2-Ag85B 投与カニクイザルにおける Ag85B 憶的免疫反応と HPIV2 特異抗体の誘導

4. rHPIV2-Ag85B 経鼻投与カニクイザルにおけるリンパ節および肺胞洗浄液中細胞での Ag85B 特異的免疫反応：経鼻投与カニクイザルのリンパ節と肺胞洗浄液中細胞の Ag85B 特異的免疫反応を見たところ、肺胞リンパ節や腸間膜リンパ節等の粘膜に関わるリンパ節および肺胞洗浄液中細胞で認められた (Fig. 5)。また、リンパ節での反応は体表リンパ節等の粘膜以外の連覇節では認められなかった (data not shown)。

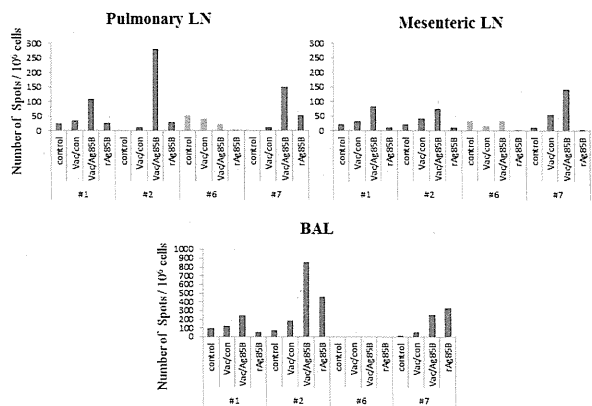


Fig. 5 rHPIV2-Ag85B 経鼻投与カニクイザルにおけるリンパ節および肺胞洗浄液中細胞での Ag85B 特異的免疫反応

D. 考察

肺結核の予防には呼吸器における粘膜免疫の誘導が必要である。現在用いられている結核の唯一のワクチンである BCG

は、小児の結核性髄膜炎並びに粟粒結核に対しては 80%の防御効果を示すが、成人の肺結核に対して明確な予防効果は認められない。これらのことから、新規ワクチン開発は急務であり、我が国はもとより、世界的に見ても重要な課題である。現在、臨床治験進行中および計画をされている結核ワクチンは主に世界的に結核ワクチン開発を行っている国際 NPO 法人 AERAS により示されている (<http://www.aeras.org/candidate>)。それによると臨床治験進行中のものは 7 件、臨床治験準備中のもの 7 件である。その中でウイルスベクターを用いたものは臨床治験に入っているものではアデノウイルス (Ad35)、高度弱毒化改変ワクシニアウイルス Ankara (MVA)、準備中のものではアデノウイルスの血清型の違うもの (Ad4 および ChAd63)、MVA、サイトメガロウイルス (CMV) および我々が開発中のパラインフルエンザ 2 型ウイルス (HPIV2) が示されている。しかしながら本研究で目標としている粘膜免疫の誘導を主眼としたものはない。

粘膜より感染を示す病原体には、感染時の粘膜での免疫反応が感染防御等に重要であり、この粘膜免疫を誘導するためには抗原を適切に粘膜面に投与しなければならない。つまり、肺結核の防御には適切な手法を用いてワクチン抗原を粘膜面へ投与することが重要である。HPIV2 は、ヒトの呼吸器粘膜に感染する病原性の低いウイルスであり、リバーシジェネティック法での作製に成功し、安全なウイルスベクターになり得ることが示された。本ワクチンの特徴としてベクターウイルス抗原より大量かつ早期に挿入抗原が発現することから他のウイルスベクターと異なり、頻回投与が可能であると考えられる。本研究結果でも HPIV2 に対する抗体が誘導されている状態でも、挿入抗原特異的免疫反応の誘導には影響はな

かった。また、本研究では HPIV2 を用いて現在までにワクチン効果の報告の無い非発症個体が認識している抗原および高病原性獲得時に発現する抗原を組み込んだ rHPIV2 も作製した。このことはベクターのみが新規ではなく抗原そのものも世界的に見られないものである。

以上本研究で用いた HPIV2 をベクターとして用いた結核ワクチンは新たなワクチンとしての可能性が示唆された。

E. 結 論

HPIV2 ベクターを用いた結核ワクチンの開発に向けて多様な知見が得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukuyama Y., Yuki Y., Katakai Y., Harada N., Takahashi H., Takeda S., Mjima M., Joo S., Kurokawa S., Sawada S., Shibata H., Park EJ., Fujihashi K., Briles DE., Yasutomi Y., Tsukada H., Akiyoshi K. and Kiyono H. Nanogel-based pneumococcal surface protein A nasal vaccine induces microRNA-associated Th17 cell responses with neutralizing antibodies against Streptococcus pneumonia in macaques. *Mucosal Immunology* 2015 E-pub
2. Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y., Yanagisawa K, Kimura N. Diabetes mellitus accelerates A β pathology in brain accompanied by enhanced GA β generation in nonhuman primates *PLoS One in press*
3. Onishi M, Ozasa K, Kobiyama K, Ohata K, Kitano M, Taniguchi K, Homma T, Kobayashi M, Sato A, Katakai Y, Yasutomi Y., Wijaya E], Igarashi Y, Nakatsu N, Ise W, Inoue T, Yamada H, Vandebon A], Standley DM], Kurosaki T, Coban C, Aoshi T, Kuroda E, Ishii KJ. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin spikes local inflammation that induce Th2 and Tfh responses to the coadministered antigen *J. Immunol.* 2015 *in press*
4. Watanabe K., Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K. and Yasutomi Y. Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization. *Vaccine* 2014;32;1727-1735.
5. Kobiyama K., Aoshi T., Narita H., Kuroda E., Hayashi M., Tetsutani K., Koyama S., Mochizuki S., Sakurai K., Katakai Y., Yasutomi Y., Saijo S., Iwakura Y., Akira S., Coban C. and Ishii KJ. A non-agonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nano-particulate TLR9 agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014;111;3086-3091.
6. Tsujimura Y, Inada H, Yoneda M, Fujita T, Matsuo K. and Yasutomi Y. Effects of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, on allergic inflammation in the lung. *PLoS One* 2014;9: E-pub
7. Saito N, Chono H, Shibata H, Ageyama N, Yasutomi Y. and Mineo J. CD4(+) T cells modified by the endoribonuclease MazF are safe and can persist in SHIV-infected rhesus macaques. *Mol Ther. Nucleic Acids* 2014:E-pub
8. Machino-Ohtsuka T, Tajiri K, Kimura T, Sakai S, Sato A, Yoshida T, Hiroe M, Yasutomi Y., Aonuma K, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C aggravates autoimmune myocarditis via dendritic cell activation and Th17 cell differentiation. *J. Am. Heart Assoc.* 2014 E-pub
9. Tachibana SI, Kawai S, Katakai Y, Takahashi H, Nakade T, Yasutomi Y., Horii T, Tanabe K. Contrasting infection susceptibility of the Japanese macaques and cynomolgus macaques to closely related malaria parasites, Plasmodium vivax and Plasmodium cynomolgi. *Parasitol. Int.* 2014 E-pub

2.学会発表

1.加藤 誠一、岡村 智崇、張 險峰、向井 徹、井上 誠、五十嵐 樹彦、志田 壽利、松尾 和浩、保富 康宏

BCG ウレアーゼ欠損株を用いたエイズワクチンの評価

第 62 回 日本ウイルス学会学術集会

2014 年 11 月 10 日～12 日パシフィコ横浜会議センター

2.Tsujimura Yusuke, Yasutomi Yasuhiro :

Suppressive effect of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, to innate immune response is depending on the interaction with

RIG-I.第 43 回日本免疫学会総会

2014 年 12 月 10 日～12 月 12 日、京都国際会議場

3.藤城（伊藤）康世、鯉江洋、柴田宏昭、岡林佐知、片貝祐子、Boran Osman、金山喜一、保富康宏、揚山直英：再生医療評価系としてのカニクイザル MSC を用いた細胞標識の解析。第 61 回日本実験動物学会学術総会。2014 年 5 月 15-17 日。北海道、札幌市

4.塩釜ゆみ子、小原道法、保富康宏：新規実験動物としての *Tupaia Belangeri* の飼育および繁殖について 第 157 回 日本獣医学会学術集会 平成 26 年 9 月 9 日～9 月 12 日

北海道、札幌

5.塩釜ゆみ子、小原道法、保富康宏：C 型肝炎ウイルスに対する DNA ワクチンと組み換えワクシニアウイルスを用いた Prime/Boost 法による肝炎ウイルス特異的免疫賦活化効果の検討第 18 回 日本ワクチン学会学術集会 平成 26 年 12 月 6 日～12 月 7 日 福岡国際会議場

G.知的所有権の出願・取得状況

1. 2014 年 11 月 6 日

「 NOVEL RECOMBINANT BCG VACCINE」

出願番号: 12832210.4

2. 2014 年 11 月 13 日

特許出願 : 特願 2014-229283

発明の名称 : C型肝炎の治療及び／又は予防用医薬組成物

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
（分担）研究報告書

粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンの開発

結核菌抗原遺伝子組み込みパラインフルエンザ2型ウイルスの作製

分担研究者 野阪 哲哉 三重大学大学院医学系研究科 感染症制御医学分野 教授
河野 光雄 三重大学大学院医学系研究科 感染症制御医学分野 講師

研究要旨 安全性の高い結核ワクチンとして、2種の結核抗原遺伝子を搭載した遺伝子欠損型ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(hPIV2)を作製し、さらにその増殖能等について検討した。

A. 研究目的

パラミクソウイルスでは、RNAポリメラーゼ(pol)遺伝子の特異的領域で、転写の時にゲノムにないグアニン(G)塩基が挿入されるRNA-editingが起こる。hPIV2 RNA-editingにおいて、Gが2個挿入されたmRNAはpol蛋白をコードし、一方、ゲノムから正確に読まれたmRNAは免疫抑制(IS)蛋白をコードしている。結果、RNA-editing siteまでは共通のN末端を所有し、特異的なC末端を持つ2つの蛋白が翻訳される。我々は、これまでにhPIV2が産生するIS蛋白には、STAT蛋白を減少させインターフェロンの産生を阻害する機能があり、それ故hPIV2はインターフェロン抵抗性を持ち、さらに、このIS蛋白の特異的領域が、ウイルスの粒子形成にも関与していることを確認した。そこで本年度は、抗原性が高いと考えられる半増殖(self-inactive)型の結核ワクチンベクターを完成させるために、IS蛋白特異的領域をコードする領域内において、ポリメラーゼ蛋白のアミノ酸に変異を起こさないようなストップコドン挿入可能部位全てにストップコドンを挿入し、IS蛋白のC末端領域を短くすることにより、どの位置においてインターフェロン活性阻害が起こらなくなるか、つまりhPIV2がインターフェロン感受性になるかを調べた。また、IS蛋白のC末端の長さの違うそれぞれのウイルスの増殖曲線を作製し、ウイルス増殖に関するこの蛋白のC末端領域の機能とこのIS蛋白発現細胞におけるウイルス増殖への影響を検討した。

一方、hPIV2のエンベロープ(env)蛋白は、hPIV2の細胞への吸着およびウイルス粒子の放出に関与しており、この遺伝子を取り除くことによって非感染性で安全性の高い完全なる非増殖型結核ワクチンベクターが創生できる。そこで本年度は、昨年度ま

でに作製できなかった2種の結核抗原を搭載したhPIV2-env欠損型ベクターの作製およびそのenv蛋白発現細胞を用いたウイルス増殖について検討した。

B. 研究方法

(組換えウイルス産生用コンストラクトの作製)

2 step-PCR法を用いてIS特異的領域にストップコドンを挿入し、4種のhPIV2 Δ IS系コンストラクトを作製した。同様の手法を用いてenv遺伝子を完全に欠損させたhPIV2 Δ envコンストラクトを作製し、それぞれのベクターのNot I サイトに2種の結核抗原遺伝子ならびにEGFP遺伝子を挿入し、結核ワクチンベクターコンストラクトを完成させた。

(組換えウイルスの作製)

hPIV2ゲノムを含む4種のプラスミドDNA (phPIV2, 10.25 μ g ; NP, 1.25 μ g ; P, 0.25 μ g ; L, 1.25 μ g) をDNA: ViaFect (1:5) で、BSRT7/5細胞(6well)にトランスフェクトし、Vero細胞との共培養により組換えウイルスならびにRNAレプリコン細胞を作製した。さらに、hPIV2 Δ env系ウイルスについては、RNAレプリコン細胞とenv発現Vero細胞(日本ビーシージーより供与)の共培養により作製した。

(倫理面への配慮)

本分担研究は、ベクター産生のための基礎研究の段階であり、臨床検体も扱わないが、ヒトへの投与などを計画する場合は、事前に三重大学の研究倫理審査委員会からの承認を得る予定である。また、関連共同実験である臨床検体を用いた疫学的解析実験に関しては、すでに三重大学の研究倫理

審査委員会の承認を得ている（乳幼児の上気道炎・下気道炎におけるパラインフルエンザ2型ウイルス感染の探索、承認No 2325；成人健常者におけるパラインフルエンザ2型ウイルス抗体の探索、承認No 2319）。組換えDNA実験委員会の機関内承認（医-623(変1)、医-626(変2))および大臣確認(26受文科振第346号、26受文科振第2002号)も得られている。動物実験に際しては三重大学動物実験規約を遵守し、事前に詳細な実験計画を申請する。

C. 研究結果

当初計画していたpol遺伝子セパレート型のウイルス回収はできなかった。そこで、研究目的にも示したようにIS蛋白特異的領域において、pol蛋白のアミノ酸に変異を起こさないようなストップコドン挿入可能部位にストップコドンを挿入し、IS蛋白のC末端翻訳領域を欠損させることにより、異なる特異的C末端をもつ4種のhPIV2 ΔIS-stop系ベクターコンストラクトおよび2種の結核抗原を搭載した結核ワクチンを創生した(図1-3)。

また、昨年度、回収できなかった結核抗原を搭載したhPIV2 Δenv系ワクチンについても、日本ビーシージーより供与されたenv発現細胞を用い、長期間培養を行うことでウイルス産生が確認できた(図4、5)。

D. 考察

以上の結果は、本分担研究が概ね順調に進んでいることを示す。目的としていた結核抗原搭載のself-inactive型ワクチンベクター4種の中で、低収量が予想された最もC末端の短い結核ワクチンベクターにおいても、ウイルス増殖に無血清培地で培養した欠失タンパク(IS)発現Vero細胞(日本ビーシージーより供与)を用いることで、 $1 \times 10^{6 \sim 7}$ (TCID₅₀/ml)程度のウイルス回収ができたことで今後の展望が開けた。また、env欠損型結核ワクチンの中でTh1誘導遺伝子を搭載したワクチンについては、濃縮後に 10^7 (TCID₅₀/ml)以上のウイルスタイターをReal time-PCRを用いて確認しており、問題はないと考えるが、4種の結核抗原を連結した遺伝子搭載のワクチンについては、ウイルス産生のみの確認であり、ウイルスの収量アップが今後の課題である。

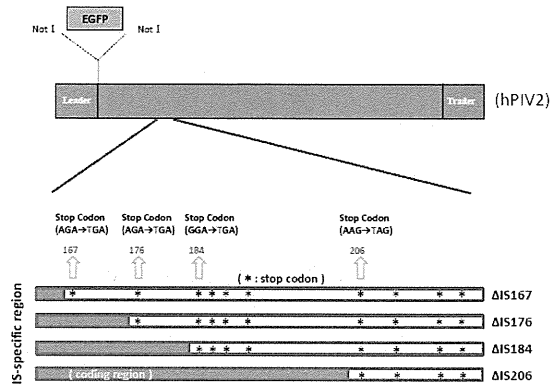


図1. Self-inactive型hPIV2ΔIS-stop

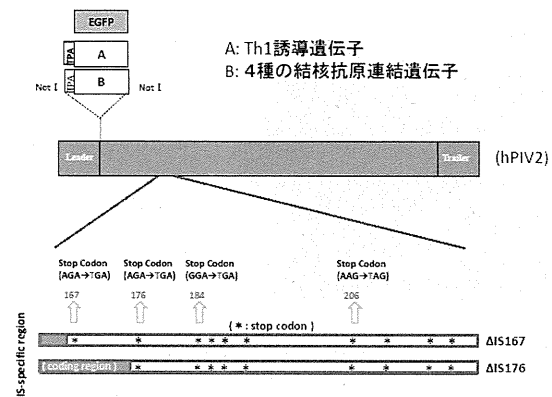


図2. 結核抗原を搭載したSelf-inactive型hPIV2ΔIS-stop

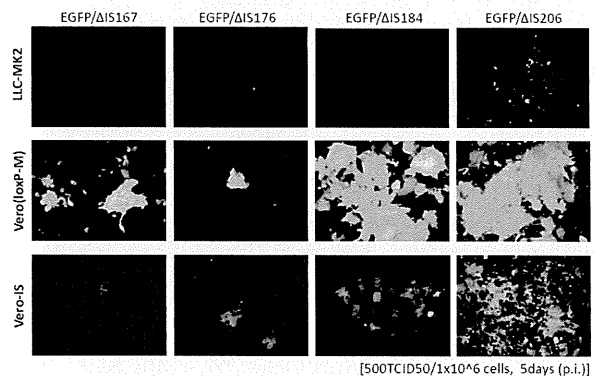


図3. 各種細胞でのSelf-inactive型hPIV2ΔIS-stopの増殖

E. 結論

本年度の目標であった免疫抑制蛋白の一部ならびにエンベロープ蛋白発現を欠失させたhPIV2ベクターを作製し、2種の結核抗原を発現するそれぞれの結核ワクチンを創生した。

F. 健康危険情報

該当せず。

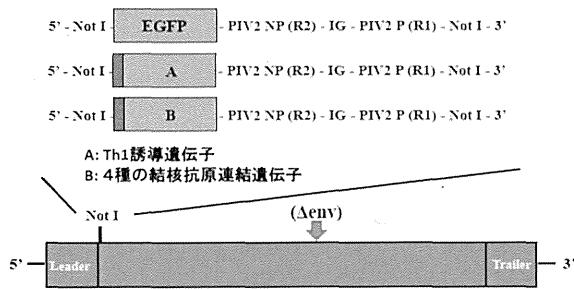


図4. 結核抗原を搭載したhPIV2Δenv

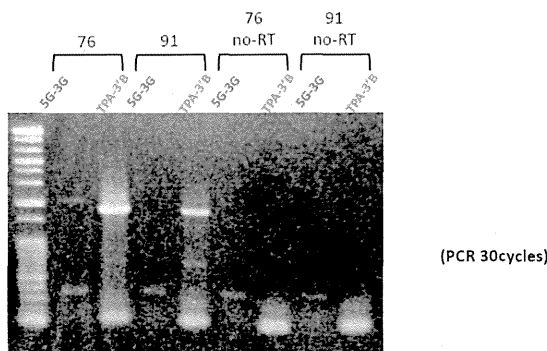


図5. B/Δenv (env-Vero 76・91系)のRT-PCRによる同定

G. 研究発表

1. 論文発表

Watanabe K, Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K, Yasutomi Y. Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization. *Vaccine* 32: 1727-1735, 2014.

Ohtsuka J, Fukumura M, Tsurudome M, Hara K, Nishio M, Kawano M, Nosaka T. Vero/BC-F: an efficient packaging cell line stably expressing F protein to generate single round-infectious human parainfluenza virus type 2 vector. *Gene Ther* 21:775-784, 2014.

Kihira S, Uematsu J, Kawano M, Itoh A, Ookohchi A, Satoh S, Maeda Y, Sakai K, Yamamoto H, Tsurudome M, O'Brien M, Komada H. Ribavirin inhibits human parainfluenza virus type 2 replication in vitro. *Microbiol Immunol* 58: 628-635, 2014.

2. 学会発表

Kobayashi K, Yamaguchi M, Miyazaki K, Imai H, Yokoe K, Ono R, Nosaka T, Katayama N. Expression of LMO3 and SNAP25 in diffuse large B-cell lymphoma cells and its relation to clinical features. 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 12/6-9, 2014. San Francisco.

鶴留雅人、伊藤守弘、大塚順平、駒田洋、西尾真智子、野阪哲哉. パラインフルエンザウイルスのHNとFの機能的相互作用の分子機構：Fとの相互作用におけるHNのHead領域の役割. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 11/10-12, 2014. 横浜.

Ono R, Masuya M, Katayama N, Nosaka T. Analysis of novel molecular mechanisms leading to an aberrant self-renewal by Plzf in leukemogenesis. 第76回日本血液学会学術集会 10/31-11/2, 2014. 大阪.

Nagatake T, Matsumoto N, Shimojou M, Suzuki H, Fukuyama S, Sato S, Ogami K, Tsujimura Y, Kawano M, Nosaka T, Kiyono H, Yasutomi Y, Kunisawa J. Immunological diversity of mucosa-associated lymphoid tissues for the development of mucosal vaccine. 第8回次世代アジュバント研究会 1/20, 2015. 豊中.

H.. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし
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
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

「粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンの開発」

平成26年度 分担研究報告書

ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス (hPIV2) 感染状況に関する研究

研究分担者：庵原 俊昭 (国立病院機構三重病院)

研究協力者：菅 秀、中村 晴奈、長尾 みづほ (国立病院機構三重病院)

矢野 拓弥、西中 隆道 (三重県保健環境研究所)

研究要旨

ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス (hPIV2) をベクターとした粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンを開発する際、健常人における hPIV2 特異的抗体価に関する血清疫学、および上気道感染や下気道炎の症状のある小児においてどの程度 hPIV2 が病態に関与しているかを把握しておくことが重要である。本邦における hPIV2 感染に関する詳細な臨床ウイルス学的文献的報告は乏しく、今回の研究を計画するに至った。①2013年11月以降に三重病院小児病棟に呼吸器症状を呈し入院となった症例 (153検体) の上気道分泌液より hPIV の検出を PCR 法により実施した。hPIV1、hPIV2、hPIV3 がそれぞれ5検体(3.3%)で検出された。hPIV2 は生後3か月、5か月、1歳、2歳、4歳の症例で検出され、発熱、喘鳴を主症状としていた。②三重病院および関連クリニックで、症状の無い健常小児 (0-17歳：300名) および妊婦とその出生児臍帯血 (119ペア) より採取された血清中の hPIV 抗体価を測定した。hPIV1,2,3,4 すべてに対して、5歳以上で90%以上の症例が HI 抗体価10倍以上であった。母体から胎児への経胎盤移行により、新生児の臍帯血 HI 抗体価は母体とほぼ同程度であった。hPIV1,2,4 では出生後に移行抗体が低下して、その後3-5歳にかけて抗体陽性率が上昇していくパターンであった。hPIV3 ではより早期に HI 抗体陽性率が上昇し、かつ全年齢群で HI 抗体価幾何平均値が高値であった。以上の結果より、低頻度ではあるが、hPIV2 は、乳幼児における発熱、喘鳴を伴う呼吸障害を引き起こし、多くが5歳までに初感染することが示唆された。

A. 研究目的

ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス (hPIV2) は乳幼児には感冒様疾患を起こすが、成人には病原性はあまりないといわれている。hPIV2 をベクター化し、外来遺伝子を組み込むことにより、粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンを開発する際、健常人における hPIV2 特異的抗体価に関する血清疫学、および上気道感染や下気道炎の症状

のある小児においてどの程度、hPIV2 が病態に関与しているかを把握しておくことが重要である。本邦における hPIV2 感染に関する詳細な臨床ウイルス学的文献的報告は乏しく、今回の研究を計画するに至った。

本研究では、①hPIV2 の感染の有無を PCR にて探索する同時に、近縁ウイルスである hPIV1、hPIV3、hPIV4 も探索し、感染実態を把握する。患者基本情報及び臨床情

報も併せて解析を実施し、病態との関連を明らかにすること、②健常小児におけるパラインフルエンザ特異的抗体価を測定し、日本における血清疫学を明らかにすること、を目的とする。

B. 研究方法

(1) 呼吸器症状を有する小児における、感染ウイルスの検出、同定

2013年11月より咳嗽、発熱、喘鳴などの症状を呈して国立病院機構三重病院小児病棟に入院した小児より、スワブ採取棒を用いて咽頭粘液を採取した。BDユニバーサルバイラルトランスポート（ベクトンディッキンソン、日本）に浸漬した後、速やかに-80℃で保存した。検体の解析は、三重大学医学系研究科病態解明医学講座（野阪哲哉教授）で実施する。RNA抽出はTRIzol Plus RNA Purification Kitを用いて行い、RT-PCRでhPIV1、hPIV2、hPIV3、hPIV4の検出を行った¹⁾。

(2) hPIV2感染症における臨床的特徴の解析

検体採取可能であった症例においては、年齢、性別、発症月、主症状、診断名、臨床検査データ、治療内容、合併症、転帰などの臨床情報を収集した。クリニカルデータシートを作成し、診療録より情報を収集した。

(3) hPIV感染の血清疫学的解析

hPIV1、hPIV2、hPIV3、hPIV4の特異的抗体価の測定を行った。0から17歳の健常小児の保存血清を使用して、赤血球凝集抑制(HI)抗体価測定を実施した。また、母体から新生児への移行抗体解析のために、臍帯血および母体血におけるHI抗体価の

測定も実施した。抗体価測定は三重県保健環境研究所で実施した。

(倫理面への配慮)

当研究は三重病院倫理審査委員会(受付番号23-24)にて承認を受けた。

(1) 対象となる個人の人権の擁護

本研究では、被験者の氏名、住所などの個人情報収集しない。被験者の同定や照会には、匿名化IDを用いて行われる。すべての関係者は個人情報保護のため最大限の努力を払う。

(2) 対象となる個人への利益と不利益
被験者に直接的な利益はない。検体採取に侵襲性を有するため肉体的、精神的苦痛の不利益が生じる可能性がある。

(3) 対象となる個人から理解、同意を得る方法

文書による説明および文書による同意を得る。具体的には、①研究の目的・背景、②研究方法及びスケジュール、③この研究の成果によって医療にどのように貢献できるか、④本研究に参加することによる利益および不利益、⑤人権、プライバシーの保護、⑥研究協力の任意性と撤回の自由、⑦研究計画書などの開示、⑧費用負担および謝礼に関する事項、⑨研究についての問い合わせ・連絡先、などについて説明する。被験者が小児等の理由で意志の確認が困難な場合は、保護者その他の代理人を代諾者として、同意を得る。

研究内容については各主治医から対象者には文書で充分説明の上同意を得て実施している。

C. 研究結果

(1) 呼吸器症状を有する小児における、

hPIVの検出、同定および臨床像の解析

2013年11月以降に三重病院小児病棟に入院となった患者の中で、呼吸器症状を呈しかつ本研究に関するインフォームドコンセントを取得可能であった症例は現在まで279名であった。症例の臨床的特徴を以下に記載する。男性161名、女性118名で、年齢群別症例数は、0歳90名、1歳以上5歳未満156名、5歳以上10歳未満26名、10歳以上15歳未満6名、15歳以上1名であった。平均月齢28.2か月(中央値18か月)であった。診断名は、肺炎87名が最も多く、その他気管支炎、上気道炎、細気管支炎、気管支喘息、インフルエンザ、などであった(図1)。

採取された咽頭ぬぐい液から、RT-PCR法によりhPIV遺伝子検出を行った。現在まで153検体の解析が終了し、hPIV1、2、3がそれぞれ5検体(3.3%)より検出された。hPIV2が検出された5症例の臨床像は、以下の通りであった。

症例①: 3か月女児。症状: 呼吸困難症状あるが全身状態は中程度不良。バイタルサイン: SpO₂ 96%, 最高体温、呼吸数は不明。

症例②: 5か月男児。最終診断: 肺炎。症状: 喘鳴(その他、発熱、乾性咳、透明鼻汁)。バイタルサイン: SpO₂:97%、最高体温38.5度、HR134/分、RR30/分。

症例③: 1歳0か月男児。最終診断: 気管支炎。症状: 呼吸困難、陥没呼吸、喘鳴あり全身状態不良。バイタルサイン: SpO₂ 99%, RR30/分、最高体温38.5度。

症例④: 2歳6か月男児。最終診断: 喘息様気管支炎。症状: 喘鳴(その他、発熱、湿性咳、透明鼻汁)。バイタルサイン: SpO₂:93%、RR52/分、最高体温38度、

HR128/分。

症例⑤: 4歳3か月男児。最終診断: 急性咽頭喉頭炎。症状: 咽頭痛(その他、発熱のみ)。バイタルサイン: SpO₂:97%、最高体温39.2度。

(2) hPIV感染の血清疫学的解析

0から13歳および17歳での各年齢20検体(計300検体)、また母体から新生児への移行抗体解析のため、臍帯血119検体、母体血119検体をペアでhPIV1,2,3,4特異的HI抗体価測定を実施した。

HI抗体陽性率: hPIV1,2,3,4に対するHI抗体価10倍以上、20倍以上、40倍以上の年齢別割合をグラフに示した(図2)

hPIV1,2,3,4すべてに対して、5歳以上で90%以上の症例がHI抗体価10倍以上であった。hPIV1,2,4では出生後に移行抗体が低下して、その後3-5歳にかけて抗体陽性率が上昇していくパターンであった。しかし、hPIV3抗体は早期に上昇傾向を示し、2歳で18例(90%)がHI抗体10倍以上であった。HI抗体価20倍以上および40倍以上の割合は、hPIV1,2,4では全年齢群で低く、最も陽性率が高い17歳においても、それぞれ4例(20%)、9例(45%)、1例(5%)のみがHI抗体価40倍以上であった。それに対して、hPIV3ではHI抗体価20倍以上、40倍以上の割合は全年齢において高く、4歳以上は80%以上であった。

HI幾何平均抗体価(GMT): hPIV1,2,3,4に対する各年齢でのGMTを示した(図3)。hPIV1,2,4では、年齢とともに緩やかにGMT上昇傾向を示した。17歳におけるGMTはそれぞれ、16.2、24.6、14.6であった。それに対して、hPIV3では全年

齢で他のhPIVに比べて高いGMTを示し、17歳では105.6であった。

母体血および臍帯血のHI抗体陽性率：
hPIV1,2,3,4 に対する母体血および臍帯血での抗体陽性率を示した(図4)。母体血における抗体陽性率は、17歳での陽性率と同様の傾向であった。80%以上の検体でhPIV1,2,3,4 すべてに対して10倍以上のHI抗体価を示したが、40倍以上の抗体陽性率はそれぞれ2%, 37%, 87%, 5%であった。臍帯血におけるHI抗体価陽性率は、母体血とほぼ同様であった。母体血および臍帯血のHI抗体価GMTより、抗体濃縮率を求めた(図5)。hPIV1,2,3,4 に対するHI抗体濃縮率は、それぞれ113%, 93%, 96%, 125%であった。

D. 考察

ヒトパラインフルエンザウイルスは世界中に分布し、全年齢において急性呼吸器感染症を引き起こす²⁾。特に乳幼児においては、軽度の上気道感染症から致死的下気道感染症まで幅広い疾病の原因ウイルスとして重要である。しかしながら、特異的抗ウイルス薬が存在しないこと、ワクチンが存在しないこと、培養細胞を用いたhPIV分離が容易ではなくPCR法による遺伝子検出もあまり積極的に行われていないこと、などの理由から本邦におけるhPIV感染(症)の実態は十分に把握されていない。

三重県における呼吸器系ウイルスの感染症発生動向調査では、2009年から2012年において呼吸器系疾患患者検体からRT-PCR法で17.3%にhPIVが検出されており³⁾、呼吸器感染ウイルスとしてのhPIVの臨床的重要性が示唆されている。本研究

においても、hPIV1,2,3 がそれぞれ呼吸器症状を呈して入院した小児において3.3%ずつ検出された。hPIV2は生後3か月、5か月、1歳、2歳、4歳の症例で検出され、発熱、喘鳴を主症状としていた。いずれも、対症療法で軽快し後遺症は認められていない。低頻度ではあるが、hPIV2は、乳幼児における発熱、喘鳴を伴う呼吸障害を引き起こす原因ウイルスと成り得ることが示唆された。

また、本研究においては小児期におけるhPIV感染状況を、血清疫学的にも明らかにした。母体および臍帯血のHI抗体価解析結果より、母体の保有する抗体は経胎盤的にほぼ同濃度で新生児に移行することが判明した。その結果、新生児(臍帯血)における10倍以上のHI抗体保有率はすべてのhPIVに対して80%以上であった。しかしながら、抗体保有率は1歳以降低下し、2-3歳児では最低値を示しその後上昇カーブを示した。これは、移行抗体の減衰と生後の自然感染により獲得された抗体の推移を示すものであり、hPIVは5歳までに多くが初感染することが示唆された。

E. 結論

低頻度ではあるが、hPIV2は、乳幼児における発熱、喘鳴を伴う呼吸障害を引き起こす原因ウイルスと成り得る。hPIV2初感染の多くは5歳までに起こることが示唆された。

(参考文献)

1) Aguilar JC, Perez-Brena MP, Garcia ML, Cruz N, Erdman DD, Echevarria JE. Detection and Identification of Human Parainfluenza Viruses 1, 2, 3, and 4 in Clinical Samples of Pediatric Patients by Multiplex Reverse Transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 38, 1191-1195: 2000.

2) Karron RA, Collins PL: Parainfluenza viruses. *Fields Virology* 6th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer / Lippincott Williams & Wilkins, 996-1023, 2013

3) 矢野拓弥、前田千恵、楠原一、赤地重宏、松野由香里、山寺基子、岩出義人、片山正彦、山口哲夫：三重県におけるパラインフルエンザウイルスの動向。三重保健研年報 57:53-56, 2012

F. 研究発表

1. 著書、論文

1) Yano T, Maeda C, Akachi S, Matsuno Y, Yamadera M, Kobayashi T, Nagai Y, Iwade Y, Kusuhara H, Katayama M, Fukuda M, Nakagawa Y, Naraya S, Takahashi H, Hiraoka M, Yamauchi A, Nishinaka T, Amano H, Yamaguchi T, Ochiai H, Ihara T, Matsuzaki Y: Phylogenetic analysis and seroprevalence of influenza C virus in Mie Prefecture, Japan in 2012. *Jpn J Infect Dis* 67:127-131, 2014

2) 矢野拓弥、落合 仁、庵原俊昭：三重県における急性呼吸器症状を呈した小児から検出されたコロナウイルス(HCoV-OC43)。感染症学雑誌 88:708-710, 2014

3) 矢野拓弥、落合 仁、渡辺正博、庵原俊

昭：呼吸器症状を呈した小児から検出されたヒトボカウイルスの流行疫学および遺伝子系統樹解析(2010～2013年)。小児感染免疫 26:369-375, 2014

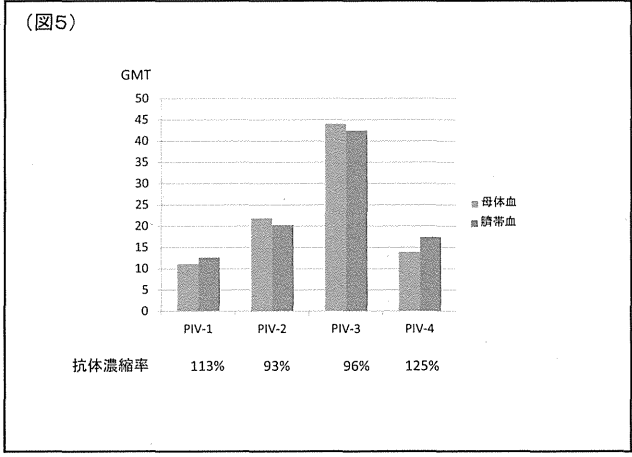
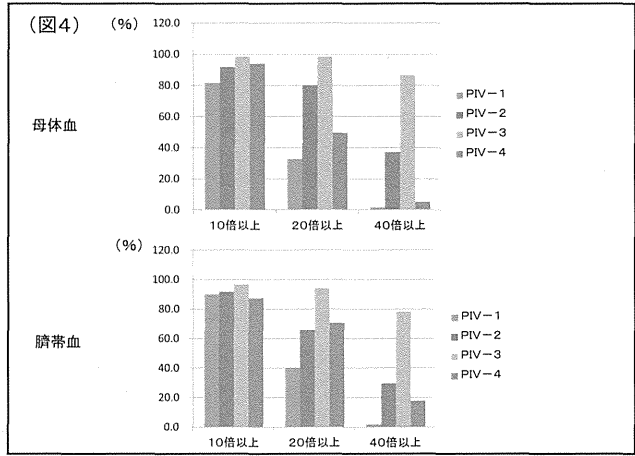
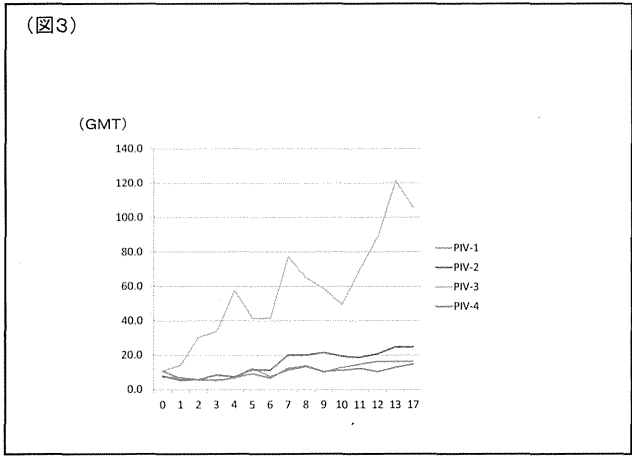
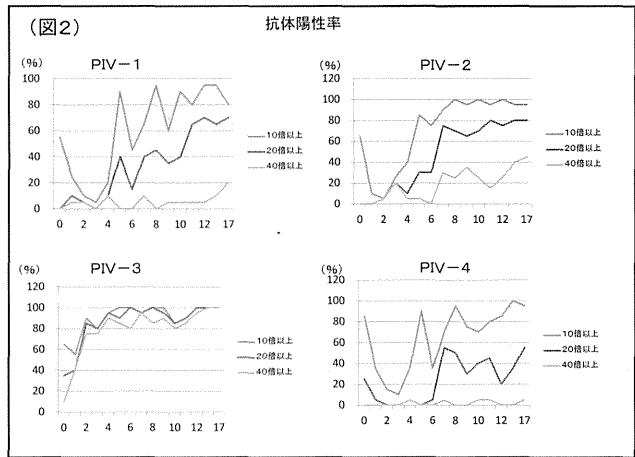
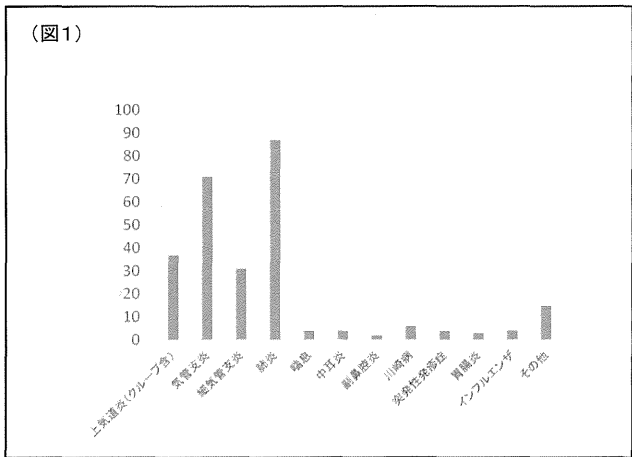
4) Yano T, Fukuda M, Maeda C, Akachi S, Matsuno Y, Yamadera M, Kobayashi A, Nagai Y, Kusuhara H, Kobayashi T, Amano H, Nishinaka T, Ochiai H, Watanabe M, Nakamura H, Suga S, Ihara T: Epidemiological investigation and seroprevalence of human parainfluenza virus in Mie Prefecture in Japan during 2009-2013. *Jpn J Infect Dis* 67:506-508, 2014

2. 学会

なし

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし



ワクチンベクターに対する自然免疫応答および安全性の検討

石井 健 医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクトプロジェクトリーダー

研究要旨：現在、唯一の結核ワクチンとしてBCGが用いられているが、成人の肺結核では予防効果が明確には確認出来ておらず、新しいワクチンの開発が望まれている。ウイルスベクターとして期待されているヒトパラインフルエンザ2型ウイルス (hPIV2) は、病原性の低いウイルスであり、開発中の結核菌ワクチンrhPIV2-Ag85Bは従来のワクチンと比べ効果が高い。しかしながら、PIV2の一部の遺伝子が自然免疫応答、特にI型インターフェロン産生を抑制するなど、自然免疫応答との関連も報告されている。本研究では、新規ワクチンベクターであるhPIV2ウイルスベクターに対する、自然免疫応答の解析と安全性の検討をする事を目的とする。

A. 研究目的

現在開発中の結核菌ワクチン rhPIV-Ag85B は従来のワクチンである BCG に比べ強力に肺結核を抑制する事がマウスを用いた研究により明らかとされている。また非ヒト霊長類であるカニクイザルにおいてもワクチンとしての効果が得られている事からヒトへの応用も期待されている。この hPIV2 は病原性が低く、ウイルスベクターとして有用であると考えられているが、一部の遺伝子が自然免疫応答を抑制するなど、ヒトへの応用へ向けて詳細な作用機序の解析が必要である。本研究では、新規結核ワクチンのウイルスベクターである hPIV2 による自然免疫活性化の作用機序解析および安全性の検討を目的とする。

B. 研究方法

本研究では、hPIV による自然免疫応答

を明らかとするために、種々の自然免疫関連遺伝子を欠損させたマウス胚性繊維芽細胞 (MEF) の作製およびマウス骨髄細胞から樹状細胞を分化させ、hPIV2 感染によって誘導される自然免疫応答の詳細なメカニズムを明らかとする。実際には作製した MEF および樹状細胞に hPIV を感染させ 24 時間後の I 型インターフェロンおよび炎症性サイトカインである IL-6 および KC を測定した。また、本実験には RNA を認識する自然免疫受容体である Toll 様受容体 (TLR)7 およびアダプター分子 MyD88 の欠損マウス、TLR 非依存的自然免疫活性化に重要なアダプター分子である IPS-1 の欠損マウスを用いた。

(倫理面への配慮)

使用された実験動物は、医薬基盤研究所動物実験委員会規程に基づき飼育され、日

本動物学会が定めた、苦痛の軽減等に配慮した指針に従って実験を行った。

C. 研究結果

種々の遺伝子欠損細胞 (MEF および樹状細胞) を用いて、hPIV2 を感染させその後の自然免疫応答を調べたところ、hPIV は細胞により異なる自然免疫受容体に認識される事で、自然免疫応答特に I 型インターフェロン産生を誘導している事が明らかとなった。さらに、炎症性サイトカインに関しては、細胞によって複数の自然免疫受容体が関与している事が示された。

D. 考察

本研究では細胞によって異なる自然免疫受容体を介して、hPIV が自然免疫応答を活性化している事を明らかにした。さらに誘導されるサイトカインも異なる自然免疫受容体によって制御されている事が示唆された。今後は、今回用いた自然免疫欠損マウスに新規結核菌ワクチン hPIV-Ag85B を投与し、その後の獲得免疫応答 (血清抗体価および細胞性免疫) を評価する事で、実際に生体反応に必要な自然免疫応答および細胞の同定を行う。

E. 結論

今回の研究により、hPIV が細胞の違いにより異なる自然免疫受容体または複数の自然免疫受容体によって認識される事で、自然免疫応答を活性化している事を明らかとした。これらの結果をふまえ、次年度では実際に獲得免疫応答に重要な自然免疫受容体及び、免疫担当細胞を同定する事で、

新規結核ワクチンの生体内における作用機序の解析を行う。さらに、V 遺伝子欠損 hPIV2 を用いて、V 遺伝子による自然免疫応答の抑制と、それに伴う獲得免疫誘導能も検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Onishi M, Ozasa K, Kobiyama K, Ohata K, Kitano M, Taniguchi K, Homma T, Kobayashi M, Sato A, Katakai Y, Yasutomi Y, Wijaya E, Igarashi Y, Nakatsu N, Ise W, Inoue T, Yamada H, Vandenberg A, Standley DM, Kurosaki T, Coban C, Aoshi T, Kuroda E, Ishii KJ. Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Spikes Local Inflammation That Induces Th2 Cell and T Follicular Helper Cell Responses to the Coadministered Antigen. *J Immunol.* 2015 Mar 15;194(6):2673-82.
- 2) Koo CX, Kobiyama K, Shen YJ, LeBert N, Ahmad S, Khatoor M, Aoshi T, Gasser S, Ishii KJ. RNA Polymerase III Regulates Cytosolic RNA:DNA Hybrids and Intracellular MicroRNA Expression. *J Biol Chem.* 2015 Mar 20;290(12):7463-73.
- 3) Temizoz B, Kuroda E, Ohata K, Jonai N, Ozasa K, Kobiyama K, Aoshi T, Ishii KJ. TLR9 and STING agonists synergistically induce innate and adaptive type II IFN. *Eur J Immunol.* 2015 Apr;45(4):1159-69.
- 4) Natsuaki Y, Egawa G, Nakamizo S, Ono S, Hanakawa S, Okada T, Kusuba N, Otsuka A, Kitoh A, Honda T, Nakajima S, Tsuchiya S, Sugimoto Y, Ishii KJ, Tsutsui H, Yagita H,