

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22792117

研究課題名（和文）iPS 細胞由来の樹状細胞を応用した歯周病ワクチンの効能

研究課題名（英文）Characterization of Periodontitis Vaccine, Dendritic Cells from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells

研究代表者

関根 伸一 (SEKINE SHINICHI)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：70506344

研究成果の概要（和文）：マウス iPS 細胞から樹状細胞（DCs）を千住らの方法(Stem cells, 27:1021, 2009)で作成した。iPS 由来 DCs が抗原提示細胞の機能を有するか調べるために、OT-II マウスからナイーブ CD4⁺T 細胞を FACS Aria™ で精製した。iPS 由来 DCs を OVA 存在下で 24 時間培養後、培地を交換し、OVA 特異的な CD4⁺T 細胞と共に 3 日間培養した。細胞増殖は Cell counting Kit-8（同仁堂）を用いて確認した。OVA 存在下で培養した iPS 細胞はコントロール（OVA 非添加）群と比較して細胞増殖能を有した。また iPS-DCs の抗原特異的な抗体産生能を調べたところ、膣洗浄液、唾液などで IgA 抗体の産生を認めた。これらの結果から iPS-DCs は効果的な粘膜ワクチンとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We have succeeded to generate dendritic cells (DCs) from mouse induced pluripotent stem (iPS) cells according to reported procedures (Senju *et al*, Stem cells, 27:1021, 2009). To assess the whether iPS-DCs possess Ag-presenting Cell (APC) function, OVA-specific naïve CD4⁺ cells from OT-II Tg mice were purified by FACS Aria™. The iPS cell-derived DCs (iPS-DCs) were suspended in complete RPMI 1640 and incubated with or without OVA for 24hr. Complete RPMI containing OVA was replaced with OVA-specific CD4⁺ T cells for 3 days. CD4⁺ T cells co-cultured with iPS-DCs showed higher proliferative responses when compared with control. When we examined adjuvanticity of iPS-DCs, significant levels of mucosal IgA Ab responses were also induced. These results demonstrate that iPS-DCs offer an attractive possibility for an effective mucosal vaccine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：樹状細胞・ワクチン・iPS 細胞・歯周病

1. 研究開始当初の背景

日本人の 80%以上が罹患している歯周病

に対して有効な免疫療法を行うためには、歯周病原性細菌に対して、適切な免疫応答を賦

活化する必要がある。生体外で培養した樹状細胞(DC)に病原因子の抗原を負荷し生体内に移入する細胞ワクチンが、抗がん治療を中心に知られていたが、抗原特異的な免疫誘導を促すDCワクチンに対する知見は少なかった。

2. 研究の目的

歯周病原性の抗原を iPS 細胞由来の樹状細胞に負荷した DC ワクチンを応用し、抗菌周病免疫応答の誘導およびその解析を目的とした。

3. 研究の方法

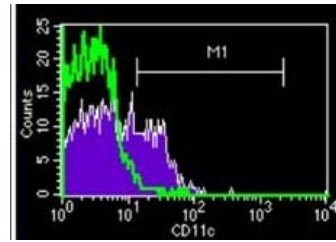
(1) マウス歯肉細胞から得られた iPS 細胞が樹状細胞に分化誘導可能か調べた。iPS 細胞を OP9 細胞フィーダーと共培養し、適切なタイミングで CM-CSF を加えることで DC を得た。また TNF- α 、IL-4、及び anti CD40 などに加え成熟 DC 得た。

(2) iPS 細胞から得られた DC が抗原提示能を示すか調べた。DC を卵白アルブミン(OVA)と O/N 培養した後、OVA を除去した。その後、DC を OT-II マウス由来の CD4⁺T 細胞と 3 日間培養した。

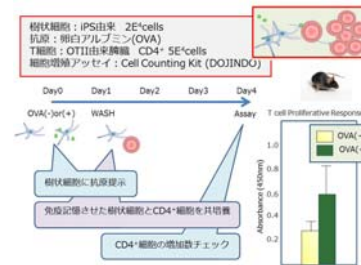
(3) iPS から得られた DC が抗原特異的な抗体産生を誘導するか調べた。DC を OVA と O/N 培養した後、OVA を除去した。DC(5E5)を 1 週間おきに腹腔内に 3 回注射し、その 1 週間後に OVA を経鼻投与、その 2 週間後に抗体価を測定した。

4. 研究成果

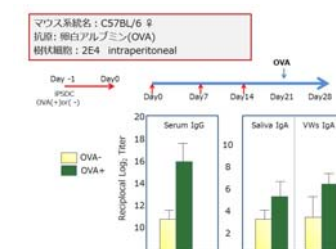
(1) iPS 細胞から誘導した DC は位相差顕微鏡下にて DC 細胞特有の形態を示した。また FACS で確認したところ、表面マーカー(CD11c 陽性)からも確認することができた。



(2) OVA 非添加群 (コントロール群) と比較して OVA 共培養群は OVATg マウスとして知られている OT-II マウス由来の CD4⁺T 細胞の数を増加させた。すなわち、iPS 由来 DC は抗原提示能を有することが示された。



(3) OVA 共培養群は OVA 非添加群 (コントロール群) と比較して抗原特異的な抗体産生を誘導することが出来た。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

①Fukuyama Y, Tokuhara D, Sekine S,

Kataoka K, Markham JD, Irwin AR, Moon GH, Tokuhara Y, Fujihashi K, Davydova J, Yamamoto M, Gilbert RS, Fujihashi K. Notch-ligand expression by NALT dendritic cells regulates mucosal Th1- and Th2-type responses. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 418(1):6-11. (査読有)

②Asanuma H, Zamri NB, Sekine S Fukuyama Y, Tokuhara D, Gilbert RS, Fukuiwa T, Fujihashi K, Sata T, Tashiro M, Fujihashi K. A novel combined adjuvant for nasal delivery elicits mucosal immunity to influenza in aging. *Vaccine*. 2012 30(4):803-12. (査読有)

③Gilbert RS, Kobayashi R, Sekine S, Fujihashi K. Functional transforming growth factor- β receptor type II expression by CD4⁺ T cells in Peyer's patches is essential for oral tolerance induction. *PLoS One*. 2011 6(11):e27501. (査読有)

④Kataoka K, Fujihashi K, Terao T, Gilbert RS, Sekine S, Kobayashi R, Fukuyama Y, Kawabata S, Fujihashi K. Oral-nasopharyngeal dendritic cells mediate T cell-independent IgA class switching on B-1 B cells. *PLoS One*. 2011 6(9):e25396. (査読有)

⑤Kataoka K, Fujihashi K, Oma K, Fukuyama Y, Hollingshead SK, Sekine S, Kawabata S, Ito HO, Briles DE, Oishi K. The nasal dendritic cell-targeting Flt3 ligand as a safe adjuvant elicits effective protection against fatal pneumococcal pneumonia. *Infect Immun*. 2011 79(7):2819-28. (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

①関根伸一, 岩崎未央, 永田英樹, 天野敦雄: 歯肉由来 iPS 細胞を利用した樹状細胞の免疫誘導能解析: 22th 近畿・中国・四国口腔衛生学会総会, Oct 1 2011, 徳島

②Asanuma H, Sekine S, Fukuyama Y, Aina A, Hsegawa H, Tashiro M, Fujihashi K. Effectiveness of pre-administered nasal adjuvants for the induction of influenza-specific IgA antibody responses in the upper respiratory tract. :15th ICMI. July 8 2011, Paris (France).

③Kataoka K, Oma K, Fukuyama Y, Hollingshead S, Sekine S, Kawabata S, Briles D, Oishi K, Fujihashi K. Nasal dendritic cell targeting Flt3 ligand as a safe adjuvant elicits effective protection against fatal pneumococcal pneumonia. :15th ICMI, July 8 2011, Paris (France)

④Kobayashi R, Sekine S, Fujihashi K, Gilbert RS, Fukuyama Y, Yamamoto M, Fujihashi K. Kinetic Analysis of the Development of Effector- and Memory-type CD4⁺ T Cells in the Intestinal Mucosa. :15th ICMI, July 7 2011, Paris (France)

⑤Fukuyama Y, Sekine S, Kobayashi R, Gilbert RS, Fujihashi K. CCR5 and CCR6 Play Central Roles in Adenovirus Expressing Flt3 Ligand-induced NALT Dendritic Cell Migration and S-IgA Ab Responses in Mucosal Effector Tissues. :15th ICMI, July 6 2011, Paris (France)

⑥関根伸一, 片岡宏介, 東江正裕, 橋野恵衣, 岩崎未央, 田中宗雄, 新庄文明: 佐用町台風 9 号災害における住民の口腔保健調査: 59th 日本口腔衛生学会, Oct 8 2010, 新潟

⑦東江正裕, 関根伸一, 橋野恵衣, 岩崎未央, 田中宗雄: ウラジロガシ抽出物配合チューイ

ングガムによる口臭の即効性消臭効果:クロスオーバー二重盲検試験:59th日本口腔衛生学会, Oct 7 2010, 新潟

⑧片岡宏介, 関根伸一, Tselmeg B, Sapta M, 福井誠, 金川裕子, 伊藤博夫: 遺伝子改変植物による歯周病原菌定着阻害を有するヒト唾液タンパク質スタセリンペプチドの発現: 59th日本口腔衛生学会, Oct 7 2010, 新潟

⑨関根伸一, 片岡宏介, 橋野恵衣, 岩崎未央, 田中宗雄, 永田英樹: Flt3 ligand cDNA 及び CpG ODN は粘膜アジュバントとして *P. gingivalis* 抗原特異的抗体反応を誘導する: 53th 秋期日本歯周病学会, Sep 9 2010, 高松

⑩片岡宏介, 関根伸一, 福井誠, 横山正明, 伊藤博夫: 粘膜アジュバント CpG オリゴヌクレオチドによる *P. gingivalis* 線毛抗原特異的抗体反応の誘導: 53th 秋期日本歯周病学会, Sep 9 2010, 高松

⑪Sekine S, Kobayashi R, Sasaki M, Fukuyama Y, Asanuma H, Gilbert RS, Fujihashi K, Kataoka K, Fujihashi K.: Characterization of mucosal immunosenescence in nasopharyngeal-associate lymphoreticular tissue. 14th ICI, Aug 26 2010, Kobe (Japan)

⑫Kobayashi R, Kubagawa H, Takai T, Sekine S, Fujihashi K, Gilbert RS, Fukuyama Y, Fujihashi K.: Both mucosal and systemic IgA responses are enhanced in orally immunized PIR-B-deficient mice. 14th ICI, Aug 26 2010, Kobe (Japan)

⑬Asanuma H, Sekine S, Suzuki Y, Sata T, Tashiro M, Fujihashi K.: Nasal influenza vaccines containing pFL and CpG ODN as mucosal adjuvant elicit cross-reactive functional S-IgA antibody. 14th ICI, Aug 25 2010, Kobe (Japan)

⑭Kataoka K, Fujihashi K, Kobayashi R, Gilbert RS, Sekine S, Fukui M, Fukuyama Y,

Kawabata S, Ito HO, Fujihashi K.: Nasal cholera toxin activated mucosal dendritic cells, but not CD4⁺ T cells elicit TI-IgA class switching recombination by B-1 B cells. 14th ICI, Aug 24 2010, Kobe (Japan)

⑮片岡宏介, 中垣晴男, 関根伸一, 福井誠, 伊藤博夫, 零石聰: *F. nucleatum* 表層タンパク質 FomA と唾液高チロシンタンパク質スタセリンペプチドとの相互作用: 53th 春期日本歯周病学会, May14-5 2010, 盛岡

[その他]

ホームページ等

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~prevent/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根 伸一 (SEKINE SHINICHI)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 70506344