

|                |  |
|----------------|--|
| ふ り が な<br>氏 名 | おおしま たかし<br>大 島 隆志   |
| 学 位 の 種 類      | 博士（歯学）   |
| 学 位 記 番 号      | 乙 第 1610 号   |
| 学位授与の日付        | 平成 30 年 3 月 29 日   |
| 学位授与の要件        | 学位規則第 4 条第 2 項に該当  |
| 学 位 論 文 題 目    | Effect of IL-12 family cytokines on NK92 cells<br>(IL-12 ファミリーサイトカインの NK92 細胞に対する<br>影響について) |
| 学 位 論 文 掲 載 誌  | Journal of Osaka Dental University 第 51 巻 第 2 号<br>平成 29 年 10 月                              |
| 論 文 調 査 委 員    | 主 査 西川 泰央 教授<br>副 査 大浦 清 教授<br>副 査 池尾 隆 教授   |

#### 論文内容要旨

慢性歯周炎などの炎症歯周組織には、リンパ球をはじめとする免疫担当細胞の浸潤が認められることにより、局所的免疫反応が歯周疾患の発症と進展の要因の一つであると考えられる。NK 細胞は免疫担当細胞の中でも自然免疫を担っており、ウイルス感染細胞の傷害や IFN- $\gamma$  の産生により初期の生体防御において重要な働きをしている。IL-12 は NK 細胞を活性化し細胞傷害能やサイトカイン産生を促すことが知られている。IL-12 と相同性をもつ IL-12 ファミリーサイトカインとして、IL-23, IL-27 と IL-35 が存在する。今回 IL-12 ファミリーサイトカインの NK92 細胞に対する影響について検討した。

NK 細胞には 2 つの主要なサブセットである CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim/-</sup> と CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> が存在する。CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim/-</sup> は細胞傷害能が弱くサイトカイン産生能が高いこと、CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> は細胞傷害能が強くサイトカイン産生能が低いことが知られている。NK92 細胞がどちらのサブセットに属するのかを Fluorescence-activated cell sorting (FACS) 解析にて確認した。NK92 細胞を抗 CD16 抗体と抗 CD56 抗体にて標識後、細胞表面における発現を確かめたところ、NK92 細胞は CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> のサブセットに属することを確認した。次に、IL-12 ファミリーサイトカインの刺激が細胞内顆粒産生に及ぼす影響について検討した。2.0×10<sup>5</sup> 個の NK92 細胞を 24 穴プレートに播種し、10 ng/mL の IL-2 と IL-12 ファミリーサイトカイン (IL-12, IL-23, IL-27 と IL-35) で 19 時間刺激した。刺激後、抗パーフォリン 1 抗体にて細胞内染色を行い FACS にて解析した。以下の実験では、IL-2 と IL-12 刺激はポジティブコントロールとして使用した。IL-2 と IL-12 刺激においてパーフォリン 1 のわずかな産生が認められた。しかし、IL-23, IL-27 と IL-35 刺激によるパーフォリン 1 の産生は認められなかった。グランザイム B の産生についても同様の方法にて検討した。IL-2 と IL-12 刺激においてグランザイム B のわずかな産生が認められた。IL-23 刺激はグランザイム B 産生に影響を及ぼさなかった。IL-27 と IL-35 刺激では

かすかにグランザイム B の産生が認められた。IL-12 ファミリーサイトカインの IFN- $\gamma$  産生について検討した。IL-2 と IL-12 刺激により IFN- $\gamma$  の産生が認められた。しかし、IL-23, IL-27 と IL-35 刺激による IFN- $\gamma$  の産生は認められなかった。

以上の結果より、IL-12 ファミリーサイトカインの IL-23, IL-27 と IL-35 は NK92 細胞のパーフォリン 1 と IFN- $\gamma$  の産生に影響を及ぼさない可能性が示唆された。しかし、グランザイム B 産生においては IL-27 と IL-35 がわずかに増強する可能性が示唆された。

## 論文審査結果要旨

慢性歯周炎などの炎症歯周組織には、リンパ球をはじめとする免疫担当細胞の浸潤が認められることにより、局所的免疫反応が歯周疾患の発症と進展の要因の一つであると考えられる。NK 細胞は免疫担当細胞の中でも自然免疫を担っており、ウイルス感染細胞の傷害や IFN- $\gamma$  の産生により初期の生体防御において重要な働きをしている。IL-12 は NK 細胞を活性化し細胞傷害能やサイトカイン産生を促すことが知られているが、IL-12 と相同性をもつ IL-12 ファミリーサイトカイン (IL-23, IL-27, IL-35) の NK 細胞に対する影響についてはほとんど解明されていない。

筆者は、NK92 細胞の細胞傷害能とサイトカイン産生能に対する IL-12 ファミリーサイトカイン (IL-23, IL-27, IL-35) の影響についてフローサイトメーターを用いて調べている。

NK 細胞には細胞傷害能が弱くサイトカイン産生能が高い CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim/-</sup>と細胞傷害能が強くサイトカイン産生能が低い CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup>の主要な 2 つサブセットが存在するが、NK92 細胞は CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup>のサブセットに属することを明らかにした。次に、IL-12 ファミリーサイトカインの刺激が細胞内顆粒産生に及ぼす影響についてパーフォリン 1 とグランザイム B に焦点をあて調べている。パーフォリン 1 産生において、ポジティブコントロールである IL-2 と IL-12 刺激ではわずかな産生が認められたが、IL-23, IL-27 と IL-35 刺激によるパーフォリン 1 の産生は認められなかった。グランザイム B の産生についても、ポジティブコントロールである IL-2 と IL-12 刺激ではわずかな産生が認められたが、IL-23 刺激によるグランザイム B の産生は認められなかった。しかし、IL-27 と IL-35 刺激ではかすかにグランザイム B が産生されることを明らかにした。さらに、IL-12 ファミリーサイトカインの刺激がサイトカイン産生に及ぼす影響については、NK 細胞が産生する主要なサイトカインの 1 つである IFN- $\gamma$  を調べている。ポジティブコントロールである IL-2 と IL-12 刺激では IFN- $\gamma$  産生が認められたが、IL-23, IL-27 と IL-35 刺激による IFN- $\gamma$  の産生は認められなかった。

以上の結果より、NK92細胞におけるパーフォリン1とIFN- $\gamma$ の産生にIL-12ファミリーサイトカインのIL-23, IL-27とIL-35は影響を及ぼさない可能性を示し、グランザイムB産生においてはIL-27とIL-35が増強する可能性を見出した点で、本論文は博士（歯学）の学位を授与するに値すると判定した。