

## ヘルパー T 細胞サブタイプ特異的サイトカイン分泌への没食子酸誘導体の影響

加藤 慶,<sup>a</sup> 山下正三,<sup>a</sup> 北中 進,<sup>b</sup> 豊島 聡\*,<sup>a</sup>  
星薬科大学学生化学教室,<sup>a</sup> 日本大学薬学部<sup>b</sup>

**Effect of Gallic Acid Derivatives on Secretion of Th1 Cytokines and Th2 Cytokines  
from Anti CD3-Stimulated Spleen Cells**

Kei KATO,<sup>a</sup> Shozo YAMASHITA,<sup>a</sup> Susumu KITANAKA,<sup>b</sup> and Satoshi TOYOSHIMA\*,<sup>a</sup>  
Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University,<sup>a</sup> 4-41,  
Ebara 2-chome, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan and College of Pharmacy,  
Nihon University,<sup>b</sup> 7-71 Narashinodai 7-chome, Funabashi 274-8555, Japan

(Received February 21, 2001; Accepted March 27, 2001)

As reported previously (Kosuge *et al.*, *Yakugaku Zasshi*, **120**, 408 (2000)), methyl gallate, a gallic acid derivative, which has been one of compounds isolated from extracts of *Psidium genus* Myrtaceae, selectively suppresses Th2 cytokine secretion. In the present study, to examine more effective compounds than methyl gallate, the effects of various gallic acid derivatives on the secretion of helper T cell subtype specific cytokines from anti CD3-stimulated spleen cells were investigated. Ten  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of methyl gallate and ethyl gallate remarkably suppressed the secretion of IL-4 and IL-5, Th2 cytokines, but did not suppress meaningfully the secretion of IFN- $\gamma$ , a Th1 cytokine. On the other hand, the other gallic acid derivatives suppressed the secretion of both IL-4 and IFN- $\gamma$ . Ten  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of methyl gallate suppressed the secretion of IL-2, a Th1 cytokine, but the same concentration of ethyl gallate did not suppress it. In conclusion, it seemed that ethyl gallate was the most selective inhibitor for the secretion of Th2 cytokines among gallic acid derivatives used in this study.

**Key words**—*Psidium genus* Myrtaceae; methyl gallate; gallic acid; type I allergy; helper T cells; IgE

緒 言

ヘルパー T 細胞は、産生・分泌するサイトカインのパターンにより Th1 細胞と Th2 細胞の 2 つのサブタイプに分類される。<sup>1-4)</sup> Th1 細胞は、interleukin (IL)-2<sup>5)</sup> や interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )<sup>6,7)</sup> を分泌し、細胞性免疫に深く関与しており、Th2 細胞は、IL-4<sup>8-10)</sup> や IL-5<sup>11)</sup> などを分泌し、体液性免疫に深く関与している。<sup>12)</sup> 生体内における免疫調節の恒常性はこのヘルパー T 細胞の 2 つの細胞群のバランスによって保たれていると考えられる。また、この Th1 細胞と Th2 細胞のバランスはサイトカインを介して制御されていると言われている。<sup>13)</sup> 特に IL-4<sup>14-17)</sup> が IgE 抗体産生を惹起することから、I 型アレルギーの発症には、ヘルパー T 細胞の Th1 細胞と Th2 細胞のバランスが IL-4 や IL-5 を産生する Th2 細胞側へ優位に偏ることが関与していると考えられている。したがって、IgE 抗体産生を惹起する IL-4 に対して選択的に分泌抑制効果を有す

る物質が、抗 I 型アレルギー薬となり得ると考えられる。

一方、シジウム (*Psidium guajava*) は、南米原産フトモモ科シジウム属植物の一種で、古来より民間において主にその葉の部分茶剤や入浴剤として使用され、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、花粉症等のアレルギー疾患に対して効果があると言われている。

我々は既に、シジウム抽出物より単離した成分の 1 つで没食子酸 (gallic acid) の誘導体である methyl gallate<sup>18,19)</sup> が Th2 細胞に作用し、サイトカインの分泌を抑制すること、低用量 keyhole limpet hemocyanin (KLH) 免疫し IgE 産生を誘導したマウス<sup>20)</sup> に methyl gallate を投与するとその血清 IgG<sub>1</sub><sup>21)</sup> 量はほとんど変化しないが IgE 量は減少すること、さらにこのマウスの脾リンパ球においては、培養上清への IL-4 分泌が減少し、IFN- $\gamma$  分泌が増加することも見出し、methyl gallate が I 型アレルギーの抑制に有効であることを報告した。<sup>22)</sup>

本研究では、I型アレルギー抑制に methyl gallate よりも有効な物質を検索するため、methyl gallate を含む gallic acid 誘導体 (ethyl gallate, propyl gallate, galocatechin gallate, epigallocatechin gallate<sup>23,24)</sup>) について Th2 サイトカイン分泌への影響を検討した。

## 材料と方法

**1. 材料** 本研究には、gallic acid (GA), methyl gallate (MA), ethyl gallate (EG), propyl gallate (PG), galocatechin gallate (GCG), epigallocatechin gallate (ECG) (和光純薬㈱) の計 6 種類 (Fig. 1) を用いた。それぞれエタノールに溶かし、これをマウス脾リンパ球培養液中での最終濃度が 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (エタノールの最終濃度は 0.1%) になるように用いた。但し書きのないその他の試薬については、和光純薬㈱又はシグマ社製の特級試薬を用いた。

**2. 細胞及び測定試料の調整** CBA/J マウス (6 週齢, 雌, オリエンタル酵母工業㈱) から、脾臓を摘出する。得られた脾細胞を、10% 牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum, HyClone 社) を含む RPMI1640 (大日本製薬㈱) 培地で遠心洗浄した後、細胞数を  $5 \times 10^6$  cells/ml とし、抗マウス CD3 抗体

(Anti-Mouse  $\epsilon$ -T3 Complex (CD3 $\epsilon$ ) Monoclonal Antibody-Ascites, Hornby 社) をプレートコートした 48 穴平底プレート (Corning 社) に加える。この 48 穴平底プレートは、種々濃度の gallic acid あるいはその誘導体の存在下、10% 牛胎児血清 RPMI1640 培地で 2 日間培養する。2 日後、採取した培養上清を遠心分離し、その遠心上清をサイトカイン定量用の試料とした。

**3. サイトカインの定量** 培養上清中に含まれる各サイトカインの定量は、サンドイッチ酵素免疫測定法 (ELISA 法) により行った。固相化抗体には抗マウス IL-4 精製抗体 (Clone: 11B11, rat IgG<sub>1</sub>), 抗マウス IFN- $\gamma$  精製抗体 (Clone: R4-6A2, rat IgG<sub>1</sub>), ラット抗マウス IL-5 精製抗体 (Clone: TRFK5, rat IgG<sub>1</sub>), ラット抗マウス IL-2 精製抗体 (Clone: JES6-1A12, rat IgG<sub>1</sub>) を用いた。検出抗体にはビオチン化ラット抗マウス IL-4 抗体 (Clone: BVD6-24G2, rat IgG<sub>1</sub>), ビオチン化ラット抗マウス IFN- $\gamma$  抗体 (Clone: XMG1.2, rat IgG<sub>1</sub>), ビオチン化ラット抗マウス IL-5 抗体 (Clone: TRFK4, rat IgG<sub>2a</sub>), ビオチン化ラット抗マウス IL-2 抗体 (Clone: JES6-5H4, rat IgG<sub>1</sub>) を用いた。標準品はリコンビナントマウス IL-4 (Source: Baculovirus-infected T. ni cells), リコンビナントマウス IFN- $\gamma$

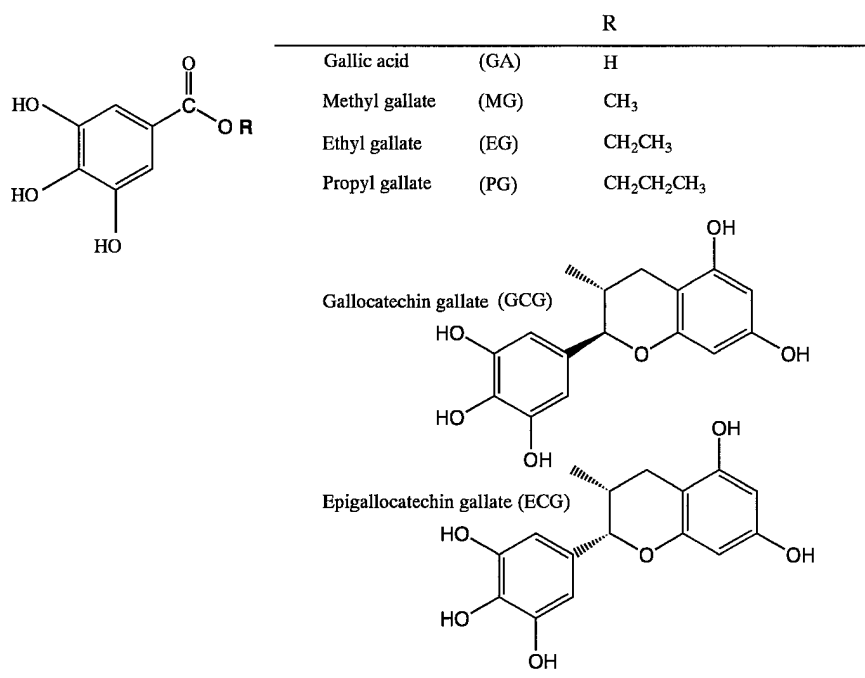


Fig. 1. Structures of Gallic Acid Derivatives

(Source: T. ni insect cells), リコンビナントマウス IL-5 (Source: Baculovirus-infected Sf9 cells), リコンビナントマウス IL-2 (Source: Baculovirus-infected T. ni cells) を用いた。以上の抗体と標準品はいずれも PharMingen. 社製の物を購入し用いた。

4. 統計解析 実験結果は、平均値及び標準偏差で示した。2群間の検定には、Student's *t*-test 又は、Welch's *t*-test の検定を用いた。危険率5%以下の場合を有意差有りとして判定した。

## 結果と考察

1. IL-4 分泌量に対する Gallic Acid 誘導体の影響 Gallic acid, methyl gallate, ethyl gallate, propyl gallate, gallo catechin gallate epigallocatechin gallate をそれぞれ 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加した時、ethyl gallate, propyl gallate, gallo catechin gallate, epigallocatechin gallate は、抗 CD3 抗体刺激マウス脾細胞における IL-4 分泌を抑制した。特に、ethyl gallate は強い抑制効果を示した (Fig. 2 white bars)。10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加ではすべての物質が抗 CD3 抗体刺激マウス脾細胞からの IL-4 分泌抑制効果を示した。特に、methyl gallate, ethyl gallate, propyl gallate では、IL-4 分泌量がかなり減少していた (Fig. 2 stippled bars)。100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加では、すべての物質において抗 CD3 抗体刺激マウス脾細胞からの IL-4 分泌量が減少していた (Fig. 2 hatched bars)。しかし、

gallic acid は、トリパンブルーを用いた色素排除試験の結果、この濃度で細胞毒性を示すことが判明した。

I 型アレルギーを抑制するためには、Th2 細胞のサイトカイン分泌、とりわけ IgE 抗体の産生を惹起する IL-4 に対して選択的抑制効果を示すことが望ましい。Fig. 2 に示す結果より、gallic acid 及びその誘導体は、抗 CD3 抗体刺激マウス脾細胞からの IL-4 分泌を抑制した。しかし、gallic acid は、最終濃度が 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  になるように添加すると、細胞毒性を示した。すなわち、細胞死により IL-4 分泌が抑制されたように思えた可能性が考えられる。したがって gallic acid を除く methyl gallate, ethyl gallate, propyl gallate, gallo catechin gallate, epigallocatechin gallate に、I 型アレルギーの抑制効果が期待できると考えられたことから、次に IL-4 分泌抑制効果の選択性について検討した。

2. IFN- $\gamma$  分泌に対する Gallic Acid 誘導体の影響 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の propyl gallate, gallo catechin gallate, epigallocatechin gallate 存在下では、抗 CD3 抗体刺激マウス脾細胞からの IFN- $\gamma$  分泌量は少し減少した。しかし、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の gallic acid, methyl gallate, ethyl gallate 存在下では、IFN- $\gamma$  分泌量にはほとんど変化が見られなかった (Fig. 3 white bars)。10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の methyl gallate と propyl gallate 存在下では、IFN- $\gamma$  分泌量が少し減少していた。また、

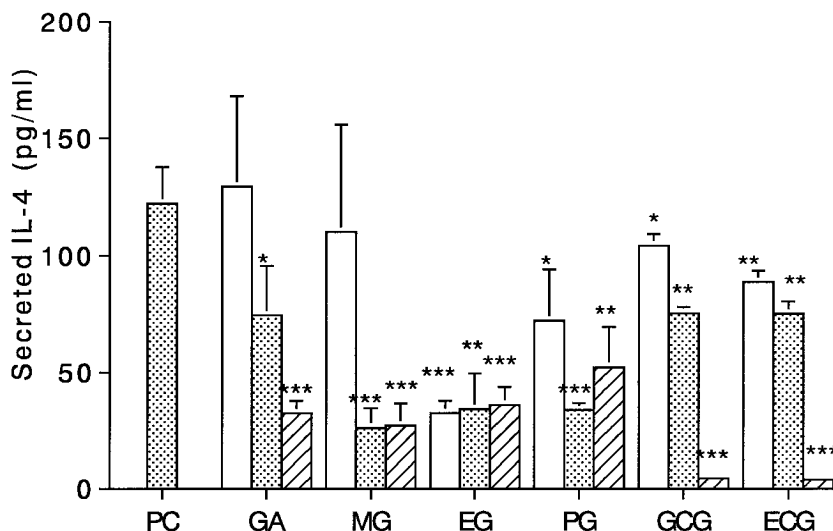


Fig. 2. Effects of Gallic Acid Derivatives on Secretion of IL-4 from Anti CD3-Stimulated Spleen Cells of CBA/J Mice

PC indicates positive control without a gallic acid derivative. White bars: 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , stippled bars: 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , hatched bars: 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . All results were expressed as means  $\pm$  S.D. of quadruplicate determinations. Differences were considered significant if *p* values were 0.05\*, 0.01\*\*, 0.001\*\*\* or less.

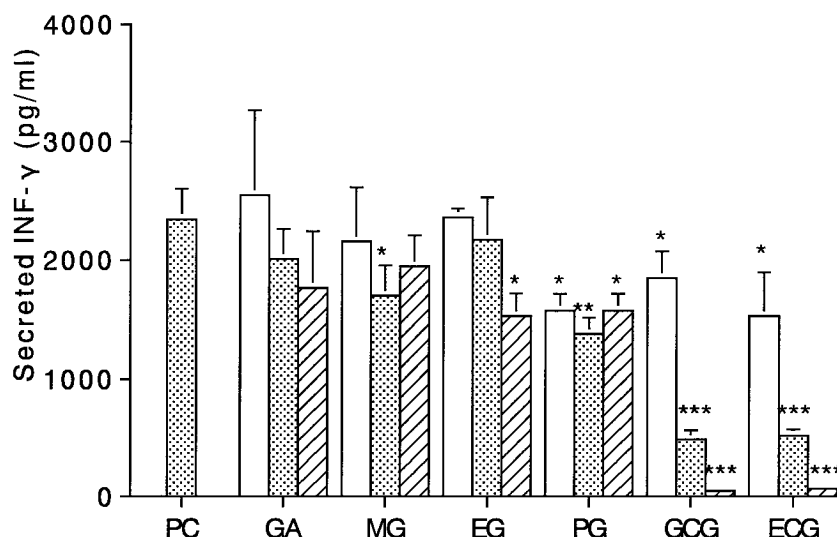


Fig. 3. Effects of Gallic Acid Derivatives on Secretion of INF- $\gamma$  from Anti CD3-Stimulated Spleen Cells of CBA/J Mice

PC indicates positive control without a gallic acid derivative. White bars: 1  $\mu$ g/ml, stippled bars: 10  $\mu$ g/ml, hatched bars: 100  $\mu$ g/ml. All results were expressed as means  $\pm$  S.D. of quadruplicate determinations. Differences were considered significant if  $p$  values were 0.05\*, 0.01\*\*, 0.001\*\*\* or less.

gallo catechin gallate と epigallo catechin gallate 存在下では、INF- $\gamma$  分泌量が IL-4 の場合と同レベルまで減少した (Fig. 2 及び Fig. 3 stippled bars). 100  $\mu$ g/ml の gallic acid と methyl gallate 存在下では、INF- $\gamma$  分泌量にあまり変化がなかった. Ethyl gallate と propyl gallate 存在下では、INF- $\gamma$  分泌量は少し減少していた. また、gallo catechin gallate と epigallo catechin gallate 存在下では、INF- $\gamma$  分泌量が 10  $\mu$ g/ml 添加時以上に減少した (Fig. 3 hatched bars).

INF- $\gamma$ <sup>6,7)</sup> は、マクロファージの強力な活性化因子として知られている. またマウスにおいて IL-4 の免疫グロブリンクラススイッチング作用に拮抗する作用を有する. したがって I 型アレルギーを抑制するには、Th1 細胞による INF- $\gamma$  分泌に影響を及ぼさないものが望ましい. Fig. 3 の結果より、gallic acid, methyl gallate, ethyl gallate, propyl gallate は、どの濃度でも抗 CD3 抗体からの INF- $\gamma$  分泌量を大幅に減少させないが、gallo catechin gallate と epigallo catechin gallate は、高濃度になるに従い IL-4 と INF- $\gamma$  の分泌をほぼ同様に抑制することがわかった. すなわち、これらの物質は、Th1 細胞や Th2 細胞に選択的に作用するのではなく、両方に作用していると考えられた. したがって、100  $\mu$ g/ml で細胞毒性を示した gallic acid と選択性のなかった gallo catechin gallate と epigallo catechin gallate を除

く methyl gallate, ethyl gallate, propyl gallate が INF- $\gamma$  分泌にはほとんど影響せずに選択的に IL-4 分泌を抑制したことから、これらの化合物には I 型アレルギーの抑制効果が期待できると考えられた. なお、以降の IL-5 と IL-2 の分泌に対する影響を検討する実験には、選択性のなかった gallo catechin gallate と epigallo catechin gallate は用いなかった.

3. IL-5 分泌に対する Gallic Acid 誘導体の影響  
1  $\mu$ g/ml の gallic acid, methyl gallate, ethyl gallate, propyl gallate 存在下では、抗 CD3 抗体刺激マウス脾細胞からの IL-5 分泌量は減少していた. 特に gallic acid と methyl gallate では、減少が顕著であった (Fig. 4 white bars). 10  $\mu$ g/ml 添加においては、すべての物質で IL-5 分泌量が 1  $\mu$ g/ml 添加より減少していた (Fig. 4 stippled bars). 100  $\mu$ g/ml 添加時ではすべての物質で IL-5 分泌の抑制がさらに顕著であった (Fig. 4 hatched bars). IL-5<sup>11)</sup> は Th2 細胞や好酸球、肥満細胞から産生されるサイトカインで、B 細胞の増殖や分化を促進するが、アレルギー疾患におけるエフェクター細胞として注目される好酸球の分化、活性化、遊走なども惹起する. また IL-4 による IgE 産生の誘導を増強する作用をも有する. したがって Th2 サイトカインである IL-5 分泌の抑制は I 型アレルギーの抑制に通ずる. Fig. 4 の結果から gallic acid, methyl gallate, ethyl gallate, propyl gallate は、抗 CD3 抗体刺激マウス

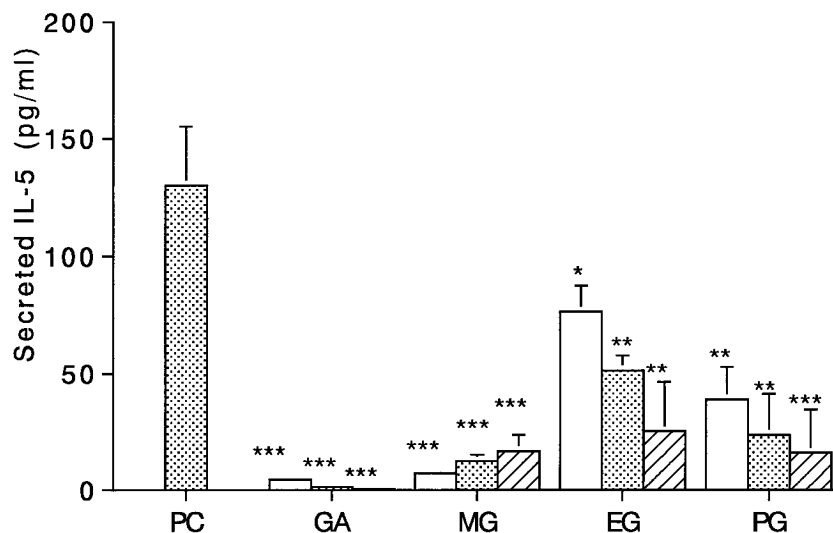


Fig. 4. Effects of Gallic Acid Derivatives on Secretion of IL-5 from Anti CD3-Stimulated Spleen Cells of CBA/J Mice

PC indicates positive control without a gallic acid derivative. White bars: 1 µg/ml, stippled bars: 10 µg/ml, hatched bars: 100 µg/ml. All results were expressed as means ± S.D. of quadruplicate determinations. Differences were considered significant if *p* values were 0.05\*, 0.01\*\*, 0.001\*\*\* or less.

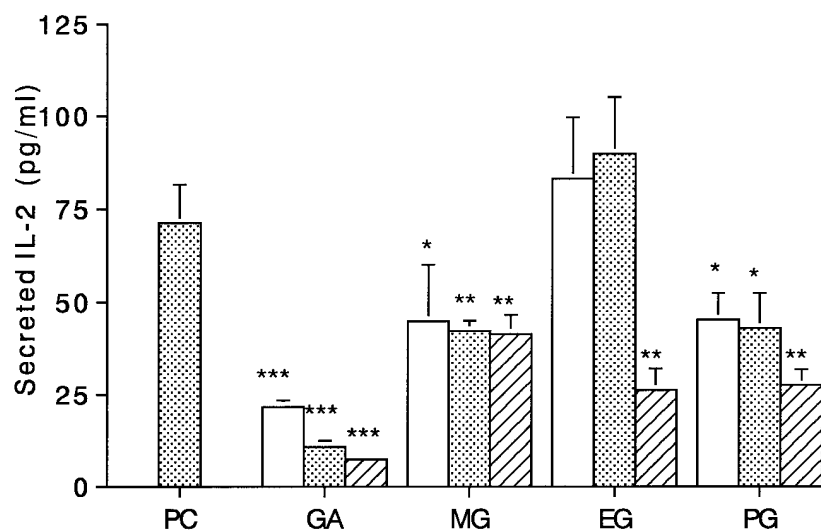


Fig. 5. Effects of Gallic Acid Derivatives on Secretion of IL-2 from Anti CD3-Stimulated Spleen Cells of CBA/J Mice

PC indicates positive control without a gallic acid derivative. White bars: 1 µg/ml, stippled bars: 10 µg/ml, hatched bars: 100 µg/ml. All results were expressed as means ± S.D. of quadruplicate determinations. Differences were considered significant if *p* values were 0.05\*, 0.01\*\*, 0.001\*\*\* or less.

脾細胞からの IL-5 分泌を抑制する効果を有することが明らかとなった。100 µg/ml で細胞毒性を示した gallic acid を除く methyl gallate, ethyl gallate, propyl gallate は、I 型アレルギー疾患の治療に有効であると推測された。

**4. IL-2 分泌に対する Gallic Acid 誘導体の影響**  
1 µg/ml の gallic acid, methyl gallate, propyl gallate 存在下では、抗 CD3 抗体刺激マウス脾細胞からの IL-2 分泌量が減少していた。特に gallic acid で減少が顕著であった (Fig. 5 white bars)。10 µg/ml

添加の場合でも同様の抑制効果が見られた。すなわち、ethyl gallate を除くすべての誘導体が、抗 CD3 抗体刺激マウス脾細胞からの IL-2 分泌を減少させた (Fig. 5 stippled bars)。100 µg/ml 添加の場合には、調べたすべての誘導体が、抗 CD3 抗体刺激マウス脾細胞からの IL-2 分泌を、10 µg/ml 添加時より減少させた (Fig. 5 hatched bars)。IL-2<sup>25)</sup> は、IFN-γ と同様に Th1 細胞から産生されるサイトカインであり、natural killer (NK) 細胞<sup>25)</sup> からの IFN の産生、T 細胞からの IFN-γ の産生を誘導す

Table 1. Inhibitory Effects of Gallic Acid Derivatives on Secretion of IL-4, IL-5, INF- $\gamma$  and IL-2 from Anti CD3-Stimulated Spleen Cells of CBA/J Mice

Gallic acid derivatives	( $\mu$ /ml)	IL-4	IL-5	(% of control)	
				INF- $\gamma$	IL-2
Gallic acid	1	105.8	3.5	108.6	30.4
	10	60.9	1.1	85.7	15.2
	100	26.5	0.4	75.1	10.4
Methyl gallate	1	90.2	5.6	91.9	63.0
	10	21.3	9.5	72.3	59.2
	100	22.0	12.8	83.0	58.1
Ethyl gallate	1	26.5	58.9	100.6	116.7
	10	27.8	39.5	92.5	126.1
	100	29.4	19.4	65.0	36.7
Propyl gallate	1	58.9	29.9	67.0	63.5
	10	27.5	18.2	58.5	60.2
	100	42.6	12.2	67.0	38.5
Galocatechin gallate	1	85.1	—	78.8	—
	10	61.6	—	20.7	—
	100	3.7	—	2.0	—
Epigallocatechin gallate	1	72.5	—	65.1	—
	10	61.4	—	22.1	—
	100	3.1	—	2.9	—

る。したがって、ethyl gallate を除く gallic acid 誘導体の Th1 サイトカインである IL-2 の分泌に対する影響は選択性の低いものと考えられた。

以上の結果から得られた gallic acid とその誘導体存在下での抗 CD3 抗体刺激マウス脾細胞からの各種サイトカイン分泌量の control に対する割合 (% of control) を Table 1 にまとめて示した。他の物質より低濃度で細胞毒性を示した gallic acid, アレルギーを引き起こす物質であることが報告されている propyl gallate,<sup>26,27)</sup> Th1 サイトカインと Th2 サイトカインの分泌に対し選択的抑制効果を示さなかった galocatechin gallate と epigallocatechin gallate は I 型アレルギーの治療にはむかかないと考えられた。Table 1 に示すように ethyl gallate は比較的選択的に Th2 サイトカイン分泌を抑制した。したがって、今回調べた gallic acid 誘導体の中では、ethyl gallate が I 型アレルギーを抑制する物質として、最も有効であると考えられた。

#### REFERENCES

- 1) Mosmann T. R., Cherwinski H., Bond M. W., Giedlin M. A., Coffman R. L., *J. Immunol.*, **136**, 2348–2357 (1986).
- 2) Seder R. A., Paul W. E., *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 635–673 (1994).
- 3) Salgame P., Abrams J. S., Clayberger C., Goldstein H., Convit J., Modlin R. L., Bloom B. R., *Science*, **254**, 279–282 (1991).
- 4) Miner K. T, Croft M., *J. Immunol.*, **160**, 5280–5287 (1998).
- 5) Barve S. S., Cohen D. A., De Benedetti A., Rhoads R. E., Kaplan A. M., *J. Immunol.*, **152**, 1171–1181 (1994).
- 6) Farrar M. A., Schreiber R. D., *Annu. Rev. Immunol.*, **11**, 571–611 (1993).
- 7) Oppenheim J. J., Neta R., *FASEB J.*, **8**, 158–162 (1994).
- 8) Paul W. E., Ohara J., *Annu. Rev. Immunol.*, **5**, 429–459 (1987).
- 9) Paul W. E., Seder R. A., *Cell*, **76**, 241–251 (1994).
- 10) Rapoport M. J., Jaramillo A., Zipris D., Lazarus A. H., Serreze D. V., Leiter E. H., Cyopick P., Danska J. S., Delovitch T. L., *J. Exp. Med.*, **178**, 87–99 (1993).
- 11) Takatsu K., *Curr. Opin. Immunol.*, **4**, 299–306 (1992).

- 12) Su H. C., Cousens L. P., Fast L. D., Slifka M. K., Bungiro R. D., Ahmed R., Biron C. A., *J. Immunol.*, **160**, 5007–5017 (1998).
- 13) Abbas A. K., Murphy K. M., Sher A., *Nature*, **383**, 787–793 (1996).
- 14) Coffman R. L., Ohara J., Bond M. W., Carty J., Zlotnik A., Paul W. E., *J. Immunol.*, **136**, 4538–4541 (1986).
- 15) Finkelman F. D., Katona I. M., Urban J. F., Holmes J., Ohara J., Tung A. S., Sample J. V., Paul W. E., *J. Immunol.*, **141**, 2335–2341 (1988).
- 16) Holmes B. J., MacAry P. A., Noble A., Kemeny D. M., *Eur. J. Immunol.*, **27**, 2657–2665 (1997).
- 17) McKenzie A. N., Culpepper J. A., de Waal Malefyt R., Briere F., Punnonen J., Aversa G., Sato A., Dang W., Cocks B. G., Menon S., DeVries J. E., Banchereau J., Zurawski G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 3735–3739 (1993).
- 18) Dorsch W., Bittinger M., Kaas A, Muller A., Kreher B., Wagner H., *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, **97**, 1–7 (1992).
- 19) Kane C. J., Menna J. H., Sung C. C., Yeh Y. C., *Biosci. Rep.*, **8**, 95–102 (1988).
- 20) Shuler K. R., Dunham R. G., Kanda P., *J. Immunol. Methods*, **156**, 137–149 (1992).
- 21) Davies D. R., Metzger H., *Annu. Rev. Immunol.*, **1**, 87–117 (1983).
- 22) Kosuge T., Shishikura H., Kitanaka S., Toyoshima S., *Yakugaku Zasshi*, **120**, 408–412 (2000).
- 23) Sakagami H., Takeda M., Sugaya K., Omata T., Takahashi H., Yamamura M., Hara Y., Shimamura T., *Anticancer Res.*, **15**, 971–974 (1995).
- 24) Otsuka T., Ogo T., Eto T., Asano Y., Suganuma M., Niho Y., *Life Sci.*, **63**, 1397–1403 (1998).
- 25) Trinchieri G., Matsumoto-Kobayashi M., Clark S. C., Seehra J., London L., Perussia B., *J. Exp. Med.*, **160**, 1147–1169 (1984).
- 26) Serra-Baldrich E., Puig L. L., Gimenez Arnau A., Camarasa J. G., *Contact. Dermatitis*, **32**, 359–360 (1995).
- 27) Nakagawa Y., Tayama S., *Arch Toxicol.*, **69**, 204–208 (1995).