

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-19751

(P2017-19751A)

(43) 公開日 平成29年1月26日(2017.1.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/192 (2006.01)	A 6 1 K 31/192	4 B 0 1 8
A 6 1 K 31/352 (2006.01)	A 6 1 K 31/352	4 B 0 6 5
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	4 C 0 8 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 C 2 0 6
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 13 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-139229 (P2015-139229)	(71) 出願人	598162665
(22) 出願日	平成27年7月10日 (2015.7.10)		株式会社山田養蜂場本社
			岡山県苫田郡鏡野町市場194番地
		(74) 代理人	110000796
			特許業務法人三枝国際特許事務所
		(72) 発明者	岡本 能弘
			千葉県戸銚子市潮見町3番地 千葉科学大
			学薬学部内
		(72) 発明者	谷 央子
			岡山県苫田郡鏡野町市場194 株式会社
			山田養蜂場本社内
		(72) 発明者	木村 友香
			岡山県苫田郡鏡野町市場194 株式会社
			山田養蜂場本社内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 IFN- γ 及び／又は IL-17 の産生抑制剤、並びに Th1 細胞及び／又は Th17 細胞の分化抑制剤

(57) 【要約】

【課題】 ケイ皮酸誘導体を有効成分として含有する IFN- γ 及び／又は IL-17 の産生抑制剤、並びに Th1 細胞及び／又は Th17 細胞の分化抑制剤を提供する。さらに、ケイ皮酸誘導体を有効成分として含有する炎症性疾患若しくは自己免疫疾患の治療用及び／又は予防用の医薬組成物を提供する。

【解決手段】 アルテピリンC、ドルパニン、バッカリン、クリフォリン、及びカフェー酸からなる群から選択される少なくとも1種のケイ皮酸誘導体を有効成分として含有する、IFN- γ 及び／又は IL-17 の産生抑制剤、Th1 細胞及び／又は Th17 細胞の分化抑制剤、並びに炎症性疾患若しくは自己免疫疾患の治療用及び／又は予防用の医薬組成物。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アルテピリンC、ドルパニン、バッカリン、クリフォリン、及びカフェー酸からなる群から選択される少なくとも1種のケイ皮酸誘導体を有効成分として含有するIFN- γ 及び／又はIL-17の産生抑制剤。

【請求項 2】

アルテピリンC、ドルパニン、バッカリン、クリフォリン、及びカフェー酸からなる群から選択される少なくとも1種のケイ皮酸誘導体を有効成分として含有するTh1細胞及び／又はTh17細胞の分化抑制剤。

【請求項 3】

アルテピリンC、ドルパニン、バッカリン、クリフォリン、及びカフェー酸からなる群から選択される少なくとも1種のケイ皮酸誘導体を有効成分として含有する、炎症性疾患若しくは自己免疫疾患の治療用及び／又は予防用の医薬組成物。

【請求項 4】

乾癬、神経膠腫、アテローム性動脈硬化症、脊椎関節症、白斑、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、炎症性腸疾患、若しくは多発性硬化症の治療用及び／又は予防用である、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、IFN- γ 及び／又はIL-17の産生抑制剤、並びにTh1細胞及び／又はTh17細胞の分化抑制剤に関する。さらに、本発明は、炎症性疾患若しくは自己免疫疾患の治療用及び／又は予防用の医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫システムの司令塔であるヘルパーT細胞は、細胞内情報伝達物質であるサイトカインの産生パターンの違いでTh1細胞とTh2細胞等に分類される。

【0003】

Th1細胞はインターロイキン2 (IL-2)やインターフェロン γ (IFN- γ)を放出し、T細胞や単球の活性を高め、細胞性免疫を亢進する。Th2細胞は、IL-4等を放出し、抗体産生を高める体液性免疫を亢進する。Th1/Th2に分化する前のナイーブな細胞は、Th0細胞と呼ばれる。マクロファージが分泌するIL-12やTh1細胞自身が分泌するIFN- γ が、Th0細胞のTh1細胞への分化を促進する。

【0004】

これらのTh1/Th2細胞は、感染した病原体の種類に応じて、いずれか一方に優位に分化することで効率よく病原体の排除を行っている。Th1が優位に働くと炎症反応が起こり、Th2が優位になるとアレルギー反応が起こると考えられている。そして、過剰なTh1細胞は多発性硬化症や炎症性腸疾患などの炎症性疾患、自己免疫疾患を増悪させることが知られている。

【0005】

また、近年、Th1及びTh2のいずれにも属さないT細胞サブセットとして、Th17細胞の存在が明らかとなった。Th17細胞が産生するIL-17は炎症性サイトカインの1種であり、自己免疫疾患の病態形成に関与していると考えられている。このように、Th17細胞が産生・分泌するIL-17は細胞外細菌及び真菌からの防御機構として働く一方で、その過剰分泌は関節リウマチ、炎症性腸疾患、多発性硬化症、乾癬、全身性エリテマトーデス、ベーチェット病、高IgE症候群などの炎症性疾患及び自己免疫疾患の原因になることが知られている(非特許文献1-3)。

【0006】

そのため、Th1細胞やTh17細胞への分化を抑制することにより、炎症性疾患や自己免疫疾患に対する予防及び／又は治療効果が期待される。現在、Th1細胞及びTh17細胞の分化

10

20

30

40

50

を抑制する医薬品として、IFN- β 1A（販売名：アボネックス、製造販売元：バイオジェン・ジャパン株式会社）、ウステキヌマブ（販売名：ステラーラ、製造販売元：ヤンセンファーマ株式会社）などが知られている。また、天然素材としては、フラボノイド(flavonoid)は、Th1細胞及びTh17細胞の分化を抑制する効果を有することが報告されている(例えば、非特許文献4-5)。

【0007】

非特許文献4では、フラボノイドである、ケルセチン(Quercetin)を投与することにより、Th細胞増殖とTh1細胞の分化が抑制されたことが報告されている。

【0008】

非特許文献5では、フラボノイドであるBaicalinの投与により、Th17細胞数が有意に減少し、Th17細胞が産生するIL-17量が減少したことが報告されている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Zambrano-Zaragoza JF, Romo-Martinez EJ, Duran-Avelar Mde J, Garcia-Magallanes N, and Vibanco-Perez N. International Journal of Inflammation. 2014 Aug 3, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/651503>

【非特許文献2】Bedoya SK, Lam B, Lau K, and Larkin J 3rd. Clinical and Developmental Immunology. 2013 Dec 26, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/986789>

【非特許文献3】Shabgah AG, Fattahi E, and Shahneh FZ. Postepy Dermatologii i Alergologii. 2014 Aug;31(4):256-61.

【非特許文献4】Muthian G, and Bright JJ, Journal of Clinical Immunology. 2004 December;24(5):542-552

【非特許文献5】Zou Y, Dai SX, Chi HG, Li T, He ZW, Wang J, Ye CG, Huang GL, Zhao B, Li WY, Wan Z, Feng JS, Zheng XB, Arch Pharm Res. 2014 Oct 1;DOI: 10.1007/s12272-014-0486-2

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

前述するように、フラボノイドがTh1細胞及びTh17細胞の分化を抑制することは既に報告されている。しかしながら、ケイ皮酸誘導体がTh1細胞又はTh17細胞の分化を抑制することについては報告されていない。

【0011】

本発明は、ケイ皮酸誘導体を有効成分として含有するIFN- γ 及び／又はIL-17の産生抑制剤、並びにTh1細胞及び／又はTh17細胞の分化抑制剤を提供することを目的とする。さらに、本発明は、ケイ皮酸誘導体を有効成分として含有する炎症性疾患若しくは自己免疫疾患(特に、乾癬、神経膠腫、アテローム性動脈硬化症、脊椎関節症、白斑、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、炎症性腸疾患、若しくは多発性硬化症)の治療用及び／又は予防用の医薬組成物を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者は、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、ケイ皮酸誘導体であるアルテピリンC、ドルパニン、バックリン、クリフォリン、及びカフェー酸が、Th1細胞及び／又はTh17細胞の分化を抑制する作用を有するという知見を得た。これらの効果は、フラボノイドであるケルセチンと比べても優れていた。

【0013】

本発明は、これら知見に基づき、更に検討を重ねて完成されたものであり、次のIFN- γ 及び／又はIL-17の産生抑制剤、Th1細胞及び／又はTh17細胞の分化抑制剤並びに医薬組成物を提供するものである。

【0014】

10

20

30

40

50

項 1. アルテピリンC、ドルパニン、バッカリン、クリフォリン、及びカフェー酸からなる群から選択される少なくとも1種のケイ皮酸誘導体を有効成分として含有するIFN- γ 及び／又はIL-17の産生抑制剤。

項 1-1. 前記ケイ皮酸誘導体がドルパニンである、項 1 に記載の産生抑制剤。

項 2. アルテピリンC、ドルパニン、バッカリン、クリフォリン、及びカフェー酸からなる群から選択される少なくとも1種のケイ皮酸誘導体を有効成分として含有するTh1細胞及び／又はTh17細胞の分化抑制剤。

項 2-1. 前記ケイ皮酸誘導体がドルパニンである、項 2 に記載の分化抑制剤。

項 3. アルテピリンC、ドルパニン、バッカリン、クリフォリン、及びカフェー酸からなる群から選択される少なくとも1種のケイ皮酸誘導体を有効成分として含有する、炎症性疾患若しくは自己免疫疾患の治療用及び／又は予防用の医薬組成物。

項 3-1. 前記ケイ皮酸誘導体がドルパニンである、項 3 に記載の医薬組成物。

項 4. 乾癬、神経膠腫、アテローム性動脈硬化症、脊椎関節症、白斑、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、炎症性腸疾患、若しくは多発性硬化症の治療用及び／又は予防用である、項 3 に記載の医薬組成物。

【発明の効果】

【0015】

ケイ皮酸誘導体は、優れたTh1細胞及びTh17細胞の分化抑制作用を有することから、Th1細胞及びTh17細胞の分化に関連して発症又は増悪する疾患の予防又は治療効果が期待される。

【0016】

そのため、本発明によれば、ケイ皮酸誘導体を有効成分とする、IFN- γ 及び／又はIL-17の産生抑制剤、並びにTh1細胞及び／又はTh17細胞の分化抑制剤を提供することができる。とともに、ケイ皮酸誘導体を有効成分とする、炎症性疾患若しくは自己免疫疾患(特に、乾癬、神経膠腫、アテローム性動脈硬化症、脊椎関節症、白斑、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、炎症性腸疾患、若しくは多発性硬化症)の治療用及び／又は予防用の医薬組成物を提供することができる。

【0017】

また、ケイ皮酸誘導体は、経口的に摂取するものである健康食品、サプリメント等の成分として特に有用である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

以下、本発明について詳細に説明する。

【0019】

なお、本明細書において「含む、含有する(comprise)」とは、「本質的にからなる(essentially consist of)」という意味と、「からなる(consist of)」という意味をも包含する。

【0020】

ケイ皮酸誘導体

本発明において、ケイ皮酸(cinnamic acid)($C_6H_5CH=CHCOOH$)誘導体としては、好ましくは、アルテピリンC (artepillin C)、ドルパニン(drupanin)、バッカリン(baccharin)、クリフォリン(culifolin)、及びカフェー酸(caffeic acid)であり、特に好ましくはドルパニンである。ケイ皮酸誘導体は、1種単独又は2種以上の組み合わせのいずれであってもよい。

【0021】

アルテピリンC、ドルパニン、バッカリン、クリフォリン、及びカフェー酸の構造式を以下に示す。

【0022】

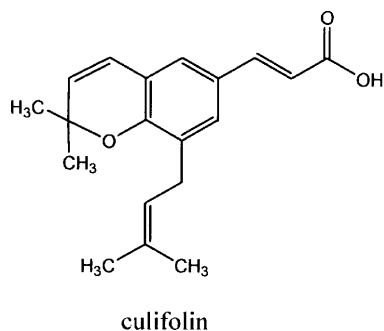
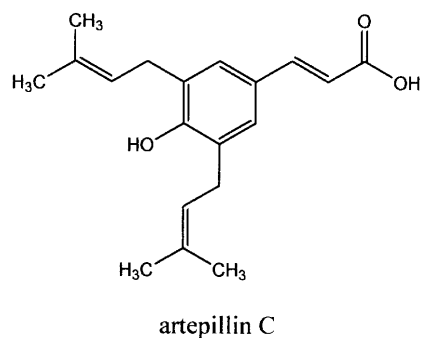
10

20

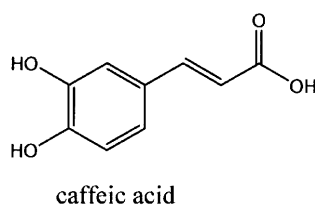
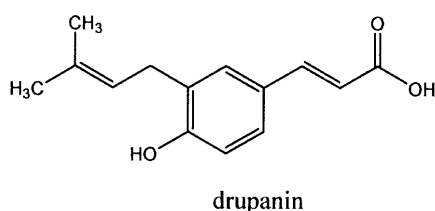
30

40

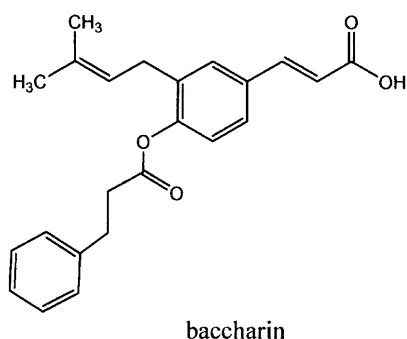
【化 1】



10



20



【0023】

30

本発明において、ケイ皮酸誘導体は、単離又は精製された状態でないもの(粗抽出物)、及び単離又は精製されたもののいずれも使用することができる。

【0024】

本発明において、ケイ皮酸誘導体は、自家調製品又は市販品を問わず用いることができる。ここで、ケイ皮酸誘導体を自家調製する方法としては、特に制限されず、ケイ皮酸誘導体を含む植物及び天然物から抽出する方法、並びに化学的に合成する方法を挙げることができる。

【0025】

ケイ皮酸誘導体を含む植物としては、特に制限されないが、例えば、アレクリンなどのキク科植物などが挙げられる。また、天然物としては、特に制限されないが、例えば、ケイ皮酸誘導体を含有するプロポリスが挙げられる。ケイ皮酸誘導体を含有するプロポリスとしては、ブラジル、中国、ヨーロッパ諸国、オセアニア、アメリカなど、いずれの産地・植物由来のものであってもよい。

40

【0026】

ケイ皮酸誘導体は、フリーの状態で使用してもよいし、又は塩の状態で使用してもよい。塩としては、例えば、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アルミニウム等の無機塩基との塩；メチルアミン、エチルアミン、エタノールアミン等の有機塩基との塩；リジン、オルニチン、アルギニン等の塩基性アミノ酸との塩及びアンモニウム塩が挙げられる。当該塩は、酸付加塩であってもよく、かかる塩としては、具体的には、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の鉱酸；ギ酸、酢酸、プロピオン酸

50

、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸等の有機酸；アスパラギン酸、グルタミン酸等の酸性アミノ酸との酸付加塩が挙げられる。また、ケイ皮酸誘導体にはその水和物、溶媒和や結晶多形なども含まれる。

【0027】

本発明の有効成分はヒトに投与又は塗付することが望ましいが、イヌ、ネコなどの動物／ペット及び馬、牛、豚、家禽などの家畜に投与しても同様に、炎症性疾患若しくは自己免疫疾患(特に、乾癬、神経膠腫、アテローム性動脈硬化症、脊椎関節症、白斑、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、炎症性腸疾患、若しくは多発性硬化症)を予防及び／又は治療することができる。本発明の有効成分は、経口摂取製剤又は塗付剤として利用され得る。本発明の有効成分は、通常、経口投与又は塗付に適した液体製剤又は固体製剤の形態で用いられる。

10

【0028】

本発明の有効成分の投与量の決定に際しては、後述する試験例の最少有効濃度等が指標とされる。

【0029】

IFN- γ 及び／又はIL-17の産生抑制剤

本発明のIFN- γ 及び／又はIL-17の産生抑制剤は、ケイ皮酸誘導体(好ましくは、アルテピリンC、ドルパニン、バックリン、クリフォリン、及びカフェー酸、より好ましくは、ドルパニン)を有効成分とすることを特徴とする。

20

【0030】

本発明のIFN- γ 及び／又はIL-17の産生抑制剤は、ケイ皮酸誘導体のIFN- γ 及び／又はIL-17の産生抑制作用が妨げられない限り、追加の成分が配合されていてもよい。かかる追加の成分を含む場合のIFN- γ 及び／又はIL-17の産生抑制剤中のケイ皮酸誘導体の割合としては、例えば、0.0001～98重量%を例示することができる。

【0031】

本発明のIFN- γ 及び／又はIL-17の産生抑制剤は、その形態を特に問うものではなく、例えば、粉末状、顆粒状、錠剤状、カプセル状、スティック状、ペースト状、ゲル状、液状、懸濁液状、乳液状、軟膏状などの製剤形態を有していてもよい。

【0032】

本発明のIFN- γ 及び／又はIL-17の産生抑制剤は、IFN- γ 及び／又はIL-17の産生抑制作用に基づく免疫抑制作用を有するため、細胞外細菌排除、好中球炎症、炎症性疾患若しくは自己免疫疾患の治療及び／又は予防用の医薬品、医薬部外品並びに食品組成物の有効成分として、好適に使用することができる。

30

【0033】

本発明のIFN- γ 及び／又はIL-17の産生抑制剤は、保健、健康維持、増進等を目的とする飲食品、例えば健康食品、機能性食品、機能性表示食品、栄養補助食品、サプリメント、特定保健用食品、又は栄養機能食品の意味も包含するものである。また、本発明のIFN- γ 及び／又はIL-17の産生抑制剤は、IFN- γ 及び／又はIL-17の産生抑制効果を付与する添加剤についての意味も包含するものである。

40

【0034】

上記の食品には、必要に応じて、賦形剤、光沢剤、ミネラル類、ビタミン類、フラボノイド類、キノン類、ポリフェノール類、アミノ酸、核酸、必須脂肪酸、清涼剤、結合剤、甘味料、崩壊剤、滑沢剤、着色料、香料、安定化剤、防腐剤、徐放調整剤、界面活性剤、溶解剤、湿潤剤等を配合することができる。

【0035】

サプリメントとして使用する際の投与単位形態については特に限定されず適宜選択できるが、例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、液剤、散剤等が挙げられる。

【0036】

上記の食品に含まれるケイ皮酸誘導体の割合は、例えば、0.0001～80重量%の濃度を挙

50

げることができる。

【0037】

上記の食品の摂取量は、摂取者の体重、年齢、性別、症状などの種々の条件に応じて適宜設定することができる。

【0038】

Th1細胞及び／又はTh17細胞の分化抑制剤

本発明のTh1細胞及び／又はTh17細胞の分化抑制剤は、ケイ皮酸誘導体(好ましくは、アルテピリンC、ドルパニン、バッカリン、クリフォリン、及びカフェー酸、より好ましくは、ドルパニン)を有効成分とすることを特徴とする。

【0039】

本発明のTh1細胞及び／又はTh17細胞の分化抑制剤は、ケイ皮酸誘導体のTh1細胞及び／又はTh17細胞の分化抑制作用が妨げられない限り、追加の成分が配合されていてもよい。かかる追加の成分を含む場合のTh1細胞及び／又はTh17細胞の分化抑制剤中のケイ皮酸誘導体の割合としては、例えば、0.0001～98重量%を例示することができる。

【0040】

本発明のTh1細胞及び／又はTh17細胞の分化抑制剤は、その形態を特に問うものではなく、例えば、粉末状、顆粒状、錠剤状、カプセル状、スティック状、ペースト状、ゲル状、液状、懸濁液状、乳液状、軟膏状などの製剤形態を有していてもよい。

【0041】

本発明のTh1細胞及び／又はTh17細胞の分化抑制剤は、Th1細胞及び／又はTh17細胞の分化抑制作用に基づく免疫抑制作用を有するため、Th1細胞又はTh17細胞分化に特異的な症状、細胞外細菌排除、好中球炎症、炎症性疾患若しくは自己免疫疾患の治療及び／又は予防用の医薬品、医薬部外品並びに食品組成物の有効成分として、好適に使用することができる。

【0042】

本発明のTh1細胞及び／又はTh17細胞の分化抑制剤は、保健、健康維持、増進等を目的とする飲食品、例えば健康食品、機能性食品、機能性表示食品、栄養補助食品、サプリメント、特定保健用食品、又は栄養機能食品の意味も包含するものである。また、本発明のTh1細胞及び／又はTh17細胞の分化抑制剤は、Th1細胞及び／又はTh17細胞の分化抑制効果を付与する添加剤についての意味も包含するものである。

【0043】

上記の食品には、必要に応じて、賦形剤、光沢剤、ミネラル類、ビタミン類、フラボノイド類、キノン類、ポリフェノール類、アミノ酸、核酸、必須脂肪酸、清涼剤、結合剤、甘味料、崩壊剤、滑沢剤、着色料、香料、安定化剤、防腐剤、徐放調整剤、界面活性剤、溶解剤、湿潤剤等を配合することができる。

【0044】

サプリメントとして使用する際の投与単位形態については特に限定されず適宜選択できるが、例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、液剤、散剤等が挙げられる。

【0045】

上記の食品に含まれるケイ皮酸誘導体の割合は、例えば、0.0001～80重量%の濃度を挙げることができる。

【0046】

上記の食品の摂取量は、摂取者の体重、年齢、性別、症状などの種々の条件に応じて適宜設定することができる。

【0047】

医薬組成物

本発明の医薬組成物は、ケイ皮酸誘導体(好ましくは、アルテピリンC、ドルパニン、バッカリン、クリフォリン、及びカフェー酸、より好ましくは、ドルパニン)を有効成分とすることを特徴とする。また、本発明の医薬組成物は、ヒトを含む哺乳動物に対して投与又は塗付される。

10

20

30

40

50

【0048】

医薬組成物として調製する場合、ケイ皮酸誘導体を医薬品において許容される無毒性の担体、希釈剤若しくは賦形剤とともに、タブレット(素錠、糖衣錠、発泡錠、フィルムコート錠、チュアブル錠、トローチ剤などを含む)、カプセル剤、丸剤、粉末剤(散剤)、細粒剤、顆粒剤、液剤、懸濁液、乳濁液、シロップ、ペースト、注射剤(使用時に、蒸留水又はアミノ酸輸液や電解質輸液等の輸液に配合して液剤として調製する場合を含む)、軟膏剤などの形態に調製して、医薬用の製剤にすることが可能である。

【0049】

本発明の医薬組成物におけるケイ皮酸誘導体の含量は、医薬組成物全量中0.000001~99重量%、好ましくは0.00001~99重量%、より好ましくは0.0001~98重量%の範囲から適宜選択することが可能である。

10

【0050】

本発明の医薬組成物の投与量又は塗付量は、患者の体重、年齢、性別、症状などの種々の条件に応じて適宜決定することができる。

【0051】

本発明の医薬組成物及び食品は、炎症性疾患若しくは自己免疫疾患(特に、乾癬、神経膠腫、アテローム性動脈硬化症、脊椎関節症、白斑、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、炎症性腸疾患、若しくは多発性硬化症)の治療及び／又は予防に有用である。

【実施例】

【0052】

以下、本発明を更に詳しく説明するため実施例を挙げる。しかし、本発明はこれら実施例等になんら限定されるものではない。

20

【0053】

試験例 1

以下の手順に従い、ケイ皮酸誘導体のTh1細胞分化抑制作用を調べた。いずれの試験においても、IL-12刺激によって分化誘導されたTh1細胞頻度、あるいは分化誘導されたTh1細胞に産生されたIFN- γ 量を基準とし、それよりも分化状態が低くなる濃度を最少有効濃度とした。

【0054】

(i) IL-12刺激によるIFN- γ の産生抑制能

健常なC57BL/6Jマウス(6-8週齢、雄性、日本エスエルシー株式会社)を安楽死させ、脾臓を摘出後、常法に従って、脾細胞浮遊液(4×10^6 cells/ml)を調製した。CD4陽性T細胞画分は、CD4⁺ T cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA)を用いて精製した。

30

【0055】

抗マウスCD3/抗体、及び抗マウスCD28抗体(ともに1 μ g/ml, BioLegend, San Diego, CA, USA)を固相化した培養プレートに10 ng/ml マウスリコンビナントIL-12p70 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、被検サンプル(最終濃度50 nM, 12.5 nM, 3.1 nM, 0.8 nM)、及び脾細胞浮遊液(2×10^6 cells/ml)を添加し、37°Cで5日間培養した。

【0056】

炭酸緩衝液(0.05 M NaHCO₃)中に一次抗体として抗マウスIFN- γ モノクローナル抗体(1/200, BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA)を溶解し、50 μ l/wellずつ96ウェルマイクロプレート(Nunc Immunoplate Maxisop, Thermo Fisher Scientific, Inc., Roskilde, Denmark)に添加し、固相化した(4°C, 一晚)。ブロッキング溶液(1%スクロース、1%ウシ血清アルブミン(BSA)/リン酸緩衝生理食塩水(PBS)-Tween 20溶液)を100 μ l/well加え、室温で90分間ブロッキングを行った。0.05% Tween 20を含んだPBS (PBS-T)でプレートを3回洗浄した後、既知濃度の標準物質(マウスリコンビナントIFN- γ 1000 pg/ml, BioLegend, Inc.)の段階希釈溶液と培養液(検体)とをプレートに添加し、120分間室温で反応させた。

40

【0057】

50

その後、PBS-Tでプレートを3回洗浄した。ビオチン標識抗マウスIFN- γ モノクローナル抗体(1/200, BioLegend, Inc.)を50 μ l/well添加し、120分間室温下で反応させた。反応後、PBS-Tでプレートを3回洗浄を行い、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(1/1000, BioLegend, Inc.)を50 μ l/wellずつ加え、90分間室温下で反応させた。反応後、PBS-Tで3回洗浄を行い、基質溶液(Sure Blue TMB Microwell Peroxidase Substrate, KPL, MD, USA)を50 μ l/well加えて反応させた後、酵素反応を停止するために、全ウェルに50 μ l/wellずつ0.5 M硫酸を加えた。反応停止後、直ちにMicroplate Reader Model 680 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA)にて吸光度(450 nm)を測定した。

【0058】

培養上清中のIFN- γ 量を計測した結果、Th1細胞分化抑制作用が報告されているフラボノイドのケルセチンは(参考文献1)、最少有効濃度50 nMを示した。一方、ケイ皮酸誘導体であるp-クマル酸、アルテピリンC、ドルパニン、カフェー酸は最少有効濃度0.8 nM、バッカリンは最少有効濃度3.1 nMを示し、ケルセチンよりも強いIFN- γ 産生抑制作用が認められた(表1)。

【0059】

【表1】

IFN- γ 産生抑制を示す最少有効濃度

分類	成分名	最少有効濃度(nM)
ケイ皮酸誘導体	p-クマル酸	0.8
	アルテピリンC	0.8
	ドルパニン	0.8
	バッカリン	3.1
	クリフォリン	50
	カフェー酸	0.8
フラボノイド	ケルセチン	50

【0060】

(ii) IL-12刺激によるTh1分化阻害作用

(i)に述べた方法でTh1細胞に分化誘導したT細胞を回収し、ホルボールミリステートAセタート(PMA, 0.05 μ g/ml)及びイオノマイシン(1 μ g/ml)を加えて37℃で4時間培養し、サイトカイン産生を誘導した。この培養の最後の2時間にはタンパク質分泌阻害剤としてブレフェルディンA (BFA, 5 μ g/ml)を加えた。培養後、細胞を回収して蛍光標識抗体にて、染色を行った。初めに細胞表面抗原であるCD4をspectral red (SPRD)標識抗マウスCD4ラット抗体(Beckman Coulter, Inc., Tokyo, Japan)によって標識した。

【0061】

続いて細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.3%サポニンで細胞膜透過処理を行った。透過処理後にR-フィコエリスリン(PE)-標識抗マウスIFN- γ ラット抗体(BioLegend, Inc.)で染色を行った。また、陰性対照(アイソタイプコントロール抗体)としてPE標識ラットIgG抗体(eBioscience)、SPRD標識ラットIgG抗体(eBioscience)を用いて染色を行った。染色した細胞はフローサイトメーターEPICS ALTRA (Beckman Coulter, Inc., Tokyo, Japan)で測定し、そのデータをEXP032 Analysisで解析した。

【0062】

その結果、ケルセチンでは最少有効濃度が12.5 nMであったのに対し、ドルパニンは最少有効濃度3.1 nMを示し、ケルセチンよりも強いTh1細胞抑制作用が認められた(表2)。

【0063】

【表 2】

Th1 細胞分化抑制を示す最少有効濃度

分類	成分名	最少有効濃度 (nM)
ケイ皮酸誘導体	ドルパニン	3.1
フラボノイド	ケルセチン	12.5

【0064】

試験例 2

以下の手順に従い、ケイ皮酸誘導体のTh17細胞分化抑制作用を調べた。いずれの試験においても、IL-6及びTGF- β 刺激によって誘導されるTh17細胞分化を基準とし、それよりも分化状態が低くなる成分をTh17分化抑制作用があると判断した。

【0065】

(i) IL-6、TGF- β 刺激によるIL-17産生抑制能

試験例 1 (i)と同様の方法で脾細胞浮遊液を調製した。抗マウスCD3抗体、及び抗マウスCD28抗体(ともに1 μ g/ml, BioLegend, San Diego, CA, USA)を固相化した培養プレートにIL-6 (20 ng/ml; Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)、TGF- β (1 ng/ml; Peprotech, Inc., NJ, USA)、被検サンプル(最終濃度50 nM, 12.5 nM, 3.1 nM, 0.8 nM)、及び脾細胞浮遊液(2×10^6 cells/ml)を添加し、37°Cで5日間培養した。その後、試験例 1 (i)に記載の方法でELISAを行い、培養上清中のIL-17量を計測した。その際、一次抗体として抗マウスIL-17モノクローナル抗体(1/200, BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA)、二次抗体としてビオチン標識抗マウスIL-17モノクローナル抗体(1/200, BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA)、標準物質としてマウスリコンビナントIL-17A 1000 pg/ml (BioLegend, Inc.)を用いた。

【0066】

培養上清中のIL-17量を計測した結果、IL-17産生量を抑制することが報告されているフラボノイドのケルセチンは(参考文献 2)、最少有効濃度12.5 nMを示した。一方、ケイ皮酸誘導体である、ドルパニン、バックカリン、クリフォリンは最少有効濃度0.8 nM、p-クマル酸、アルテピリンC、カフェー酸は最少有効濃度3.1 nMを示し、ケルセチンよりも強いIL-17産生抑制作用が認められた(表 3)。

【0067】

【表 3】

IL-17 産生抑制を示す最少有効濃度

分類	成分名	最少有効濃度 (nM)
ケイ皮誘導体	p-クマル酸	50
	アルテピリン C	3.1
	ドルパニン	0.8
	バックカリン	0.8
	クリフォリン	0.8
	カフェー酸	3.1
フラボノイド	ケルセチン	12.5

【0068】

(ii) IL-6、TGF- β 刺激によるTh17分化阻害作用

(i)でTh17細胞に分化誘導したT細胞を回収し、試験例 1 (ii)に示す方法でIL-17産生細

10

20

30

40

50

胞数(Th17細胞数)を測定した。透過処理後の染色には、R-フィコエリスリン(PE)-標識抗マウスIL-17ラット抗体(BioLegend, Inc.)を用いた。

【0069】

その結果、ケルセチン、アルテピリンC、ドルパニン、カフェー酸は最少有効濃度3.1 nMを示し、ケイ皮酸誘導体にケルセチンと同様のTh17細胞分化抑制作用が認められた(表4)。

【0070】

【表4】

Th17細胞分化阻害作用を示す最少有効濃度

分類	成分名	最少有効濃度 (nM)
ケイ皮酸誘導体	アルテピリンC	3.1
	ドルパニン	3.1
	カフェー酸	3.1
フラボノイド	ケルセチン	3.1

10

【0071】

参考文献

- 1) Pan L, Chen Z, Wang L, Chen C, Li D, Wan H, Li B, Shi G, Deubiquitination and stabilization of T-bet by USPIO, Biochem Biophys Res Commun. Volume 449(3), July(2014), 289-294.
- 2) Milenkovic M, Arsenovic-Ranin N, Stojic-Vukanic Z, Bufan B, Vucicevic D, Jancic I, Quercetin ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. J Pharm Pharmaceut Sci. Volume 13(3), (2010), 311-319.

20

処方例

以下、本発明の処方例を示す。

【0072】

処方例1

アルテピリンC、ドルパニン、バッカリン、及びp-クマル酸を31.2 g含むエタノール溶液200 gを、乳糖1 kgに噴霧・乾燥し、粉末化して、ハードカプセルに充填し、アルテピリンC、ドルパニン、バッカリン、及びp-クマル酸含有カプセルを得た。

30

【0073】

処方例2

水あめ250 g、砂糖300 g、及び水50 mlを加熱して溶かし、ドルパニンを含むエタノール溶液50 gを加えた。適当な大きさにとりわけ、成型し、ドルパニン含有キャンディを得た。

【0074】

処方例3

ドルパニンを含むエタノール溶液 0.5 g
 アスコルビン酸 300 mg
 蜂蜜 10 g
 レモン果汁 10 ml
 水 適量

40

上記の材料を混合し、全量50 mlのドルパニン含有ドリンクを得た。

【0075】

処方例4

下記の処方の粉末を均一に混合し、常法により打錠機を用いて160 mgの錠剤のサプリメントとした。

50

ドルパニンを含むエタノール溶液の噴霧乾燥物 10 mg
乾燥ビール酵母粉末 50 mg
還元麦芽糖 75 mg
ショ糖脂肪酸エステル 20 mg
セルロース 5 mg

処方例 5

ドルパニンを含むエタノール溶液75 gを粉末化した。これに、コーティング剤としてコーンスターチ32.15 gを添加(コーティング)し、ドルパニン含有コーティング顆粒107.15 gを得た。なお、この顆粒のコーティング比は0.3である。

【0076】

処方例 6

ドルパニンを含むエタノール溶液50 mgに大豆油 150 mg、ミツロウ20 mg、及びグリセリン脂肪酸エステル30 mgを、定法に従って混合しゼラチン軟カプセルに充填し、粒状の健康食品(経口組成物)とした。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/00		
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	17/06		
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	19/02		
A 6 1 P	37/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/04		
A 6 1 K	31/222	(2006.01)	A 6 1 P	37/00		
C 1 2 N	5/0783	(2010.01)	A 6 1 K	31/222		
C 1 2 N	1/00	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	2 0 2 L	
A 2 3 L	33/10	(2016.01)	C 1 2 N	1/00	G	
			A 2 3 L	1/30	B	

(72)発明者 松本 美保

岡山県苫田郡鏡野町市場 1 9 4 株式会社山田養蜂場本社内

F ターム(参考) 4B018 LE02 MD48 ME07

4B065 AA94X AC12 AC14 AC20 BB08 BB26 BB40 CA41 CA44 CA60
 4C086 AA01 AA02 BA08 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA45 ZA68 ZA89
 ZA96 ZB07 ZB15 ZC41
 4C206 AA01 AA02 DA21 DB57 KA01 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA45
 ZA68 ZA89 ZA96 ZB07 ZB15 ZC41