

# Asaigermanium Newsletter



2021年3月26~29日に開催された「日本薬学会第141年会」にて、「有機ゲルマニウム化合物 THGP は LPS・ATP 及び SARS-CoV-2 由来タンパク質 ORF3a によるインフラソーム活性化を抑制する」と題して研究成果を報告いたしました。 ※“THGP”とは、水に溶けた状態のアサイゲルマニウムの略称です。

## はじめに

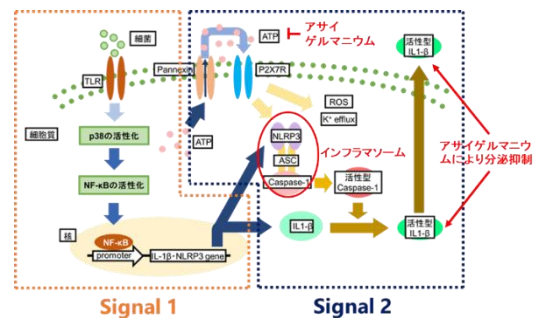
2019年より世界中で流行している新型コロナウイルス感染症(COVID-19)は、ウイルス(SARS-CoV-2)に感染すると肺炎を引き起こし、重症化を引き起こすケースが多数報告されています。重症化に至る原因の一つが、免疫系の暴走と呼ばれる「**サイトカインストーム**」であると考えられています。

最近の研究では、SARS-CoV-2は、「ORF3a」というタンパク質を持っており、このタンパク質が炎症の元凶である「**インフラソーム**」を活性化させ、**サイトカインストーム**を引き起こしていると言われております(J Immunol.

2020;205(2):ji2000513)。

アサイゲルマニウムはこれまでの研究で、下記の内容を報告しています。

- インフルエンザウイルス感染マウスモデルを用いた研究において、肺の炎症(コンソリデーション)を抑制する(麻生久他, Chemotherapy, 34(8) : 665-671, 1986.)。
  - ATPとアサイゲルマニウムが錯体形成することで、インフラソームのSignal2を抑制することを報告したが、ATPと似た形で且つアサイゲルマニウムと錯体形成しない「BzATP」を用いた試験でも、インフラソームを若干抑制する結果を得た(安積遵哉, 第84回日本インターフェロン・サイトカイン学会発表)。
- これらの研究成果を足掛かりに、新たな2つの目的で実験を行いました。



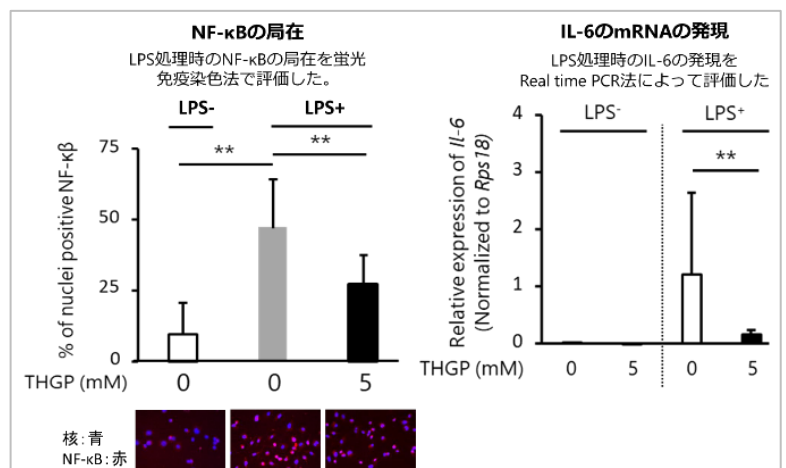
## <本研究の目的>

- ① アサイゲルマニウムの、ATP との錯体形成以外のインフラソーム活性抑制メカニズムの解明
- ② 新型コロナウイルス由来タンパク質「ORF3a」によって誘導されるインフラソーム活性に対するアサイゲルマニウムの抑制作用の検討

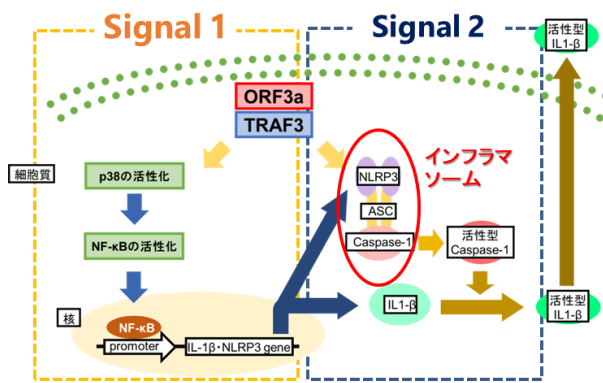
## 実験 1: インフラソームの Signal1 に対するアサイゲルマニウムの影響を検討

先に発表した研究では Signal 2の抑制作用(ATP と錯体形成による)を明らかにしていましたが、本実験では Signal 1に対するアサイゲルマニウムの影響を検討しました。Signal1 では、外敵の物質(LPS など)に細胞が反応することで、細胞内の p38 や NF- $\kappa$ B などのシグナル因子が活性化、核内に移動することで、炎症性サイトカインの遺伝子発現などを促進します。

ここでは細菌が持つ LPS によって「NF- $\kappa$ B」及び炎症性サイトカインである「IL-6」の変化について確認しました。その結果、アサイゲルマニウムは LPS による NF- $\kappa$ B の活性化を抑制し、IL-6 の発現を抑制することがわかりました。



## 実験 2: SARS-CoV-2 由来タンパク質 ORF3a によるインフラマソームに対する影響を検討



新型コロナウイルスを構成するタンパク質の一つに「ORF3a」タンパク質があります。この ORF3a が細胞内に存在する「TRAF3」という分子に作用することで、Signal1、Signal2 両方の経路からインフラマソームの活性化が起こります。これによって、過剰な炎症反応が引き起こされ、新型コロナウイルス感染症の重症化の一因となっていることが報告されています。

本研究では、この ORF3a を用いて、アサイゲルマニウムの効果について検討しました。

### 実験 2-①: SARS-CoV-2 由来タンパク質 ORF3a の局在について

蛍光標識した ORF3a を培地中に添加し、ヒト由来単球細胞 (THP-1) による ORF3a の取込みについて検討しました。

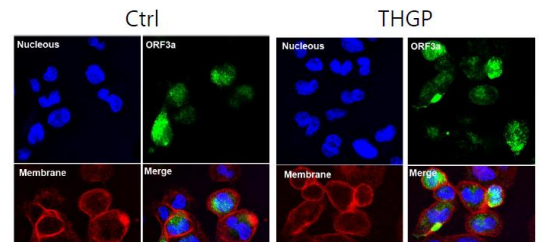
ORF3a を緑、細胞膜を赤、細胞核を青にそれぞれ染色する方法で、通常培養時とアサイゲルマニウム添加培養時の ORF3a の細胞への取込みを比較しました。

その結果、両条件ともに ORF3a は細胞の中に取り込まれ、核の周辺に存在していることが確認されました。

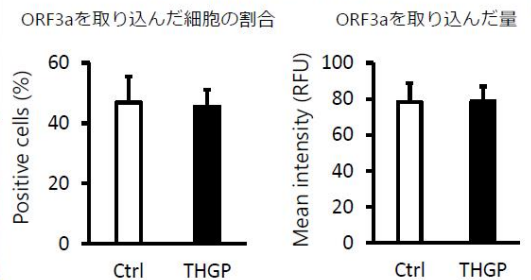
また ORF3a の細胞内の取込み量についても測定しましたが、アサイゲルマニウムを添加しても、通常培養時と比較して差は認められませんでした。

このことからアサイゲルマニウムは、細胞内への ORF3a 取込みには関与せず、その後の Signal1、Signal2 において、インフラマソームの活性化を抑えている可能性が考えられました。

ORF3aのアミノ基 (-NH2)を染色 (緑) 膜タンパク質を染色 (赤) 核を染色 (青)



ORF3aの細胞内への取り込み量

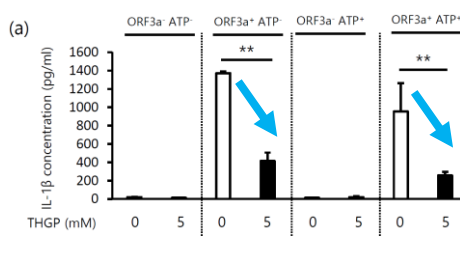


### 実験 2-②: アサイゲルマニウムによる炎症性サイトカイン分泌抑制作用の検討

そこで、実験 2-①と同じ細胞 (THP-1) に ORF3a 及び ATP を添加してインフラマソーム活性化を誘導し、その際のアサイゲルマニウムの有無による 3 種の代表的炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6) 分泌への影響を調べました。

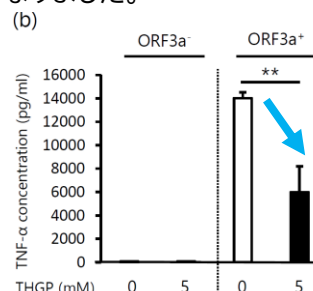
#### (a) IL-1 $\beta$

ORF3a を添加すると、ATP の有無に関わらず、IL-1 $\beta$  の分泌量が増加しました。さらにアサイゲルマニウムを添加すると ATP の有無に関わらず、IL-1 $\beta$  の分泌が抑制される結果となりました。



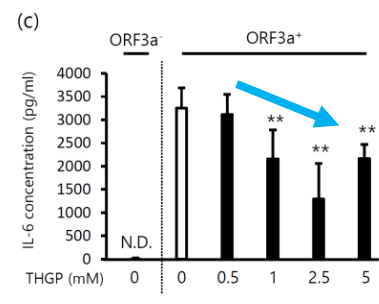
#### (b) TNF- $\alpha$

ORF3a を添加すると、TNF- $\alpha$  の分泌量が増加しましたが、アサイゲルマニウムを添加すると、TNF- $\alpha$  の分泌が有意に抑制される結果となりました。



#### (c) IL-6

ORF3a を添加すると、IL-6 の分泌量が増加しましたが、アサイゲルマニウムを添加すると、IL-6 の分泌が抑制される結果となりました。



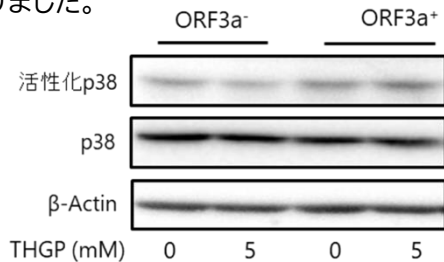
このことから、アサイゲルマニウムは Signal1 または 2 のいずれか、もしくは両方の経路において、インフラマソームの活性化を抑える可能性が考えられました。

## 実験 2-③:アサイゲルマニウムによる signal1 への影響を評価

実験2の冒頭で示したように、ORF3a はインフラマソームの Signal 1 と Signal 2 の両方に影響を与えることがわかっています。ここでは THP-1 を用いて、Signal 1 に対する影響を 4 つの実験で評価しました。

### (a)p38 の活性化

p38 が活性化すると、炎症性サイトカインの前駆体などが産生されます。アサイゲルマニウムを添加しても、これらのバンドの濃さが変わらなかったことから、アサイゲルマニウムは p38 の活性化に影響を与えないことがわかりました。



アサイゲルマニウムの有無でバンド濃度に変化なし

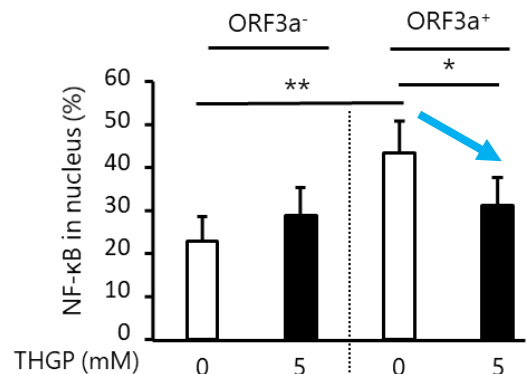


アサイゲルマニウムは p38 に影響しない

### (b)NF-κB の活性化・核内移行

p38 の活性化は、細胞質の NF-κB を活性化させます。すると NF-κB は核内へ移行し、炎症性サイトカインの遺伝子発現を促進します。

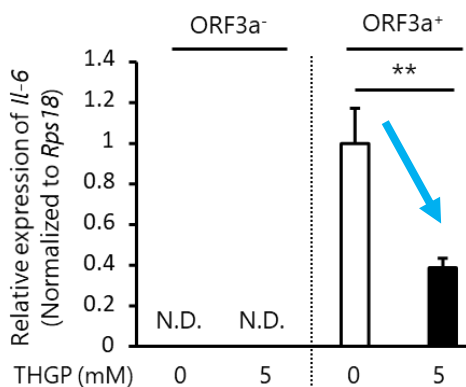
ORF3a を添加すると、核内の NF-κB の量が有意に増えましたが、アサイゲルマニウムがあることで、有意に NF-κB の核内移行を抑制することがわかりました。



### (c)IL-6 の遺伝子発現

(b)の結果から、炎症性サイトカインである IL-6 の遺伝子発現が抑制されることが考えられました。

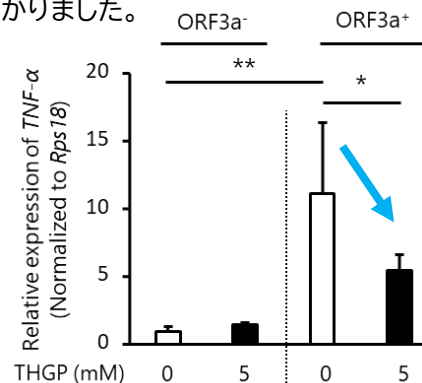
ORF3a を添加したところ、IL-6 の遺伝子発現量が増加しましたが、アサイゲルマニウムを添加すると有意に IL-6 遺伝子発現を抑制することがわかりました。



### (d)TNF-α の遺伝子発現

(c)と同様に(b)の結果から、炎症性サイトカインである TNF-α の遺伝子発現が抑制されることが考えられました。

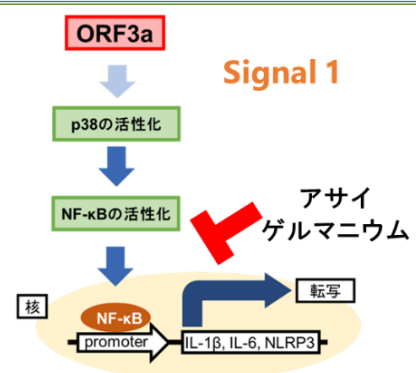
こちらでも ORF3a を添加したところ、有意に TNF-α の遺伝子発現量が増加しましたが、アサイゲルマニウムの添加により、有意に TNF-α の遺伝子発現を抑制することがわかりました。



### <実験2-③のまとめ>

- アサイゲルマニウムは p-38 の活性化は抑制しない。
- 一方でアサイゲルマニウムは、ORF3a による NF-κB の活性化と核内への移行を抑制し、炎症性サイトカイン(IL-6、TNF-α)の遺伝子発現量を抑制した。

つまり、Signal1 における NF-κB の活性化と核内移行を抑えることで、インフラマソームの活性抑制作用があることが示唆されました。



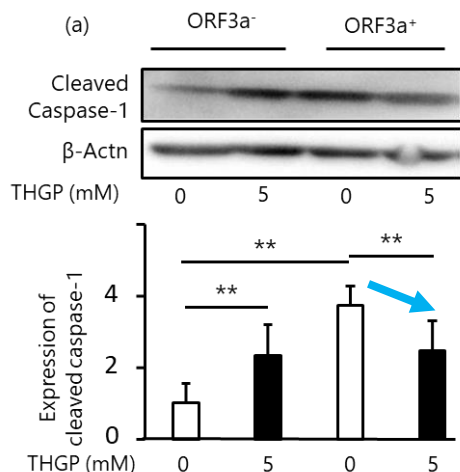
## 実験2-④:アサイゲルマニウムによる Signal 2への影響を評価

ORF3a はインフラマソームの Signal 2のうち、caspase-1 を活性化させ、炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  の産生を促進することが分かっています。この実験ではアサイゲルマニウムの caspase-1 活性化への影響と、caspase-1 依存的に起こる細胞死(パイロトーシス)に対する影響を確認しました。

### (a)caspase-1 の活性化に対するアサイゲルマニウムの影響

THP-1 に ORF3a、アサイゲルマニウムを添加して培養し、活性化した caspase-1 を「ウエスタン・ブロッティング」という手法によって評価しました。

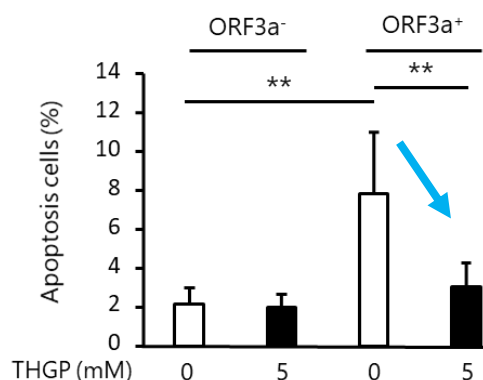
その結果、ORF3a によって活性化した caspase-1 は増加しましたが、アサイゲルマニウムを添加することによって、その量が有意に減少しました。



### (b)細胞死(パイロトーシス)に対するアサイゲルマニウムの影響

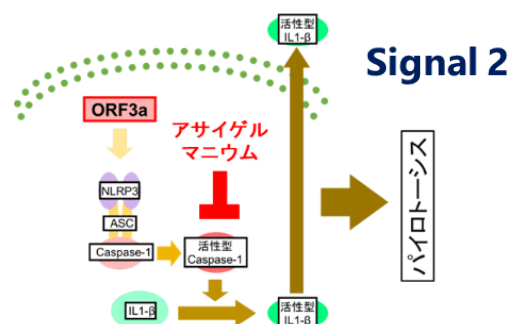
続いて、ORF3a によって誘導される炎症原因性の細胞死(パイロトーシス)に対するアサイゲルマニウムの影響を評価しました。

その結果、ORF3a を細胞に添加した場合は、通常培養時と比較してパイロトーシスを起こした細胞が有意に増加していましたが、アサイゲルマニウムを添加することで、パイロトーシスを起こした細胞の数が有意に減少しました。



### <実験2-④のまとめ>

- アサイゲルマニウムは、ORF3a による caspase-1 の活性化を有意に抑制した。
- アサイゲルマニウムは caspase-1 の活性化によって起こる細胞死(パイロトーシス)を有意に抑制した。



### まとめ

本研究の結果から、以下の内容が明らかになりました。

- ① アサイゲルマニウムはATPとの錯体形成によってインフラマソーム活性を抑制するだけでなく、NF- $\kappa$ Bの核内移行を抑制することでも、インフラマソーム活性を抑制した。
- ② アサイゲルマニウムは新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)由来タンパク質 ORF3a によって誘導される炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ )の産生を抑制した。

これらの結果からアサイゲルマニウムは細菌やウイルス感染によって起こる過剰な炎症反応に対する抑制作用が期待され、新型コロナウイルス感染症(COVID-19)重症化に予防的に作用する可能性が示唆されました。

【本研究に関するお問い合わせ】

### 株式会社浅井ゲルマニウム研究所

〒215-0004 神奈川県川崎市麻生区万福寺 1-1-1

TEL 044-954-2101/FAX 044-954-2066

E-Mail: info@asai-ge.co.jp

URL: https://www.asai-ge.co.jp



有機ゲルマニウムは、原料や製法が違っていると、結晶や不純物などに違いが出て、性質や品質が全く異なるものになります。

当社で製造されたアサイゲルマニウムを使用した製品には、信頼の証である左のロゴマークがついています。

◆本資料は製品開発者・販売者様用に作成したものです。内容を当社の許可なく改変、複製または転載することを禁じます。