

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 によるインフラマ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、水に溶けたアサイゲルマニウムの略称です。

研究背景

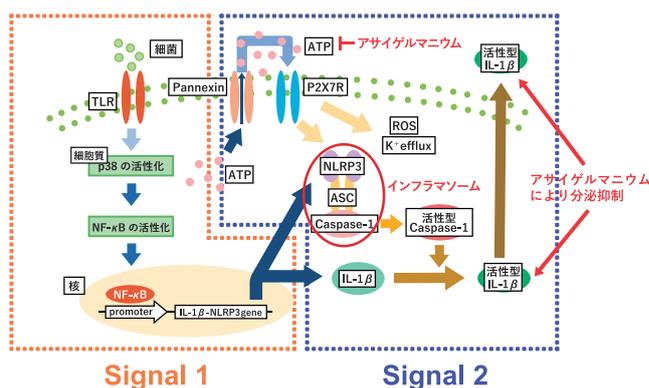
2019年より世界中で流行した新型コロナウイルス感染症の主な症状として、SARS-CoV-2 ウイルスへの感染による肺炎の重症化が多数報告されています。肺炎の重症化の要因の一つが、免疫系の暴走と呼ばれる「サイトカインストーム」です。

最近の研究で、SARS-CoV-2 が持つタンパク質「ORF3a」が炎症の元凶である「インフラマソーム」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います(J Immunol. 2020;205(2):ji2000513)。

当社ではこれまでに、インフルエンザウイルス感染マウスにおいて、アサイゲルマニウムが肺の炎症を抑制すること(※1)や、アサイゲルマニウムが ATP と錯体を形成することで、インフラマソームの活性を抑制すること(※2)など、炎症に関する報告を行っています。

※1. 麻生久他, Chemotherapy, 34(8):665-671, 1986

※2. 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



これらの報告を足掛かりとして、今回の試験を行いました。

<本研究の目的>

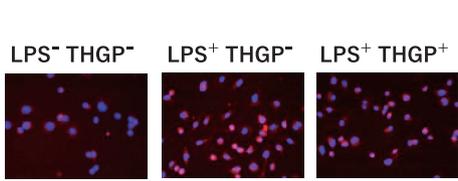
- ① アサイゲルマニウムの、ATP との錯体形成以外のインフラマソーム活性抑制メカニズムの解明
- ② 新型コロナウイルス由来タンパク質「ORF3a」によって誘導されるインフラマソーム活性に対するアサイゲルマニウムの抑制作用の検討

研究の内容

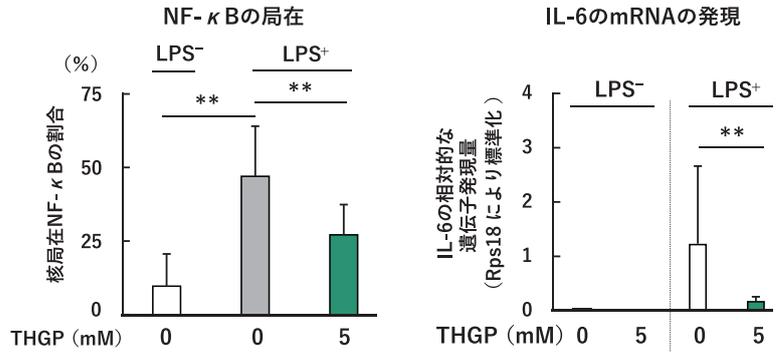
実験 1：インフラマソームの Signal 1 に対するアサイゲルマニウムの影響を検討

これまでに、アサイゲルマニウムと ATP との錯体形成による Signal 2 の抑制作用は明らかになっていました。一方、外敵の物質に細胞が反応して転写因子 (NF- κ B) が活性化し、炎症性サイトカインの遺伝子発現が促進される「Signal 1」への作用に関しては、分かっていませんでした。

そこで実験 1 では、外敵の物質として細菌由来の LPS で細胞を処理した際の NF- κ B の活性化と、炎症性サイトカインである IL-6 の遺伝子発現について調べました。



青：核、赤：NF-κB

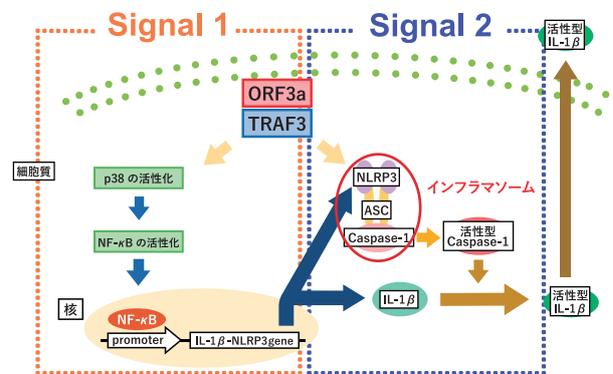


その結果、アサイゲルマニウムは、LPSによるNF-κBの活性化(核内への移行)を抑制し、IL-6の発現を抑制することがわかりました。

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

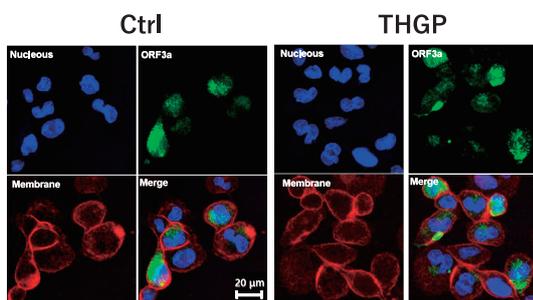
新型コロナウイルス由来のタンパク質「ORF3a」が細胞内に存在する「TRAF3」という分子に作用することで、Signal1、2両方の経路からインフラマソームが活性化されます。これによる過剰な炎症反応が、新型コロナウイルス感染症の重症化の一因となっていることが報告されています。

本研究では、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。

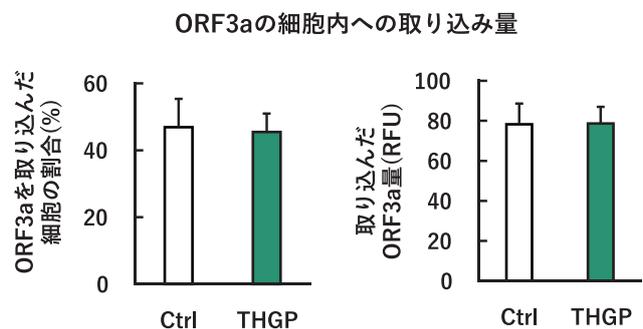


実験2-①：SARS-CoV-2由来タンパク質ORF3aの細胞内局在

蛍光標識したORF3aをヒト由来単球細胞(THP-1)培地中に添加し、通常培養時とアサイゲルマニウム添加培養時のORF3aの細胞への取り込みを比較しました。



(緑) ORF3aの-NH₂基を染色 (赤) 細胞膜を染色 (青) 核を染色



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ました。また、ORF3aの細胞内の取り込み量に違い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取り込みではなく、その後ろのSignal1、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ている可能性が考えられます。

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

THP-1 細胞に ORF3a と ATP を添加してインフラマソーム活性化を誘導した時の炎症性サイトカイン (IL-1 β 、TNF- α 、IL-6)分泌へのアサイゲルマニウムの影響を調べました。

(a) IL-1 β

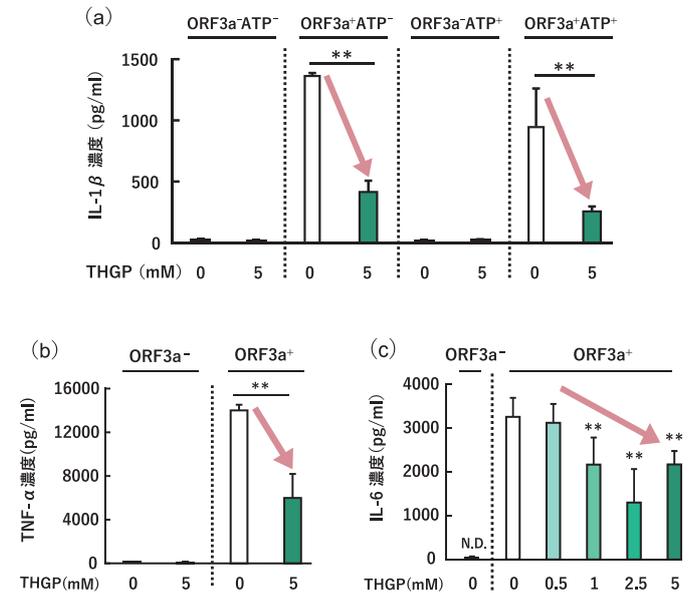
ATP の有無にかかわらず ORF3a を添加すると、IL-1 β の分泌量が増加します。しかし、アサイゲルマニウムを添加することで分泌が抑制されました。

(b) TNF- α

ORF3a 添加により、TNF- α の分泌量が増加しますが、アサイゲルマニウムの添加によって分泌が有意に抑制されました。

(c) IL-6

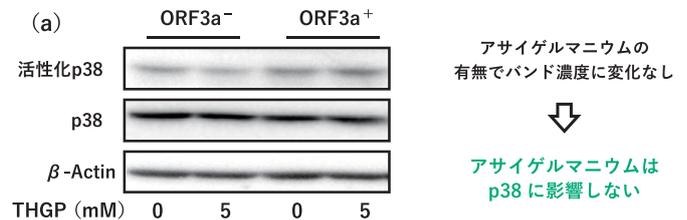
ORF3a を添加すると、IL-6 の分泌量が増加しますが、アサイゲルマニウムを添加することで分泌が抑制されました。



実験 2-③: ORF3a の Signal1 活性化へのアサイゲルマニウムの影響を評価

(a) p38 の活性化

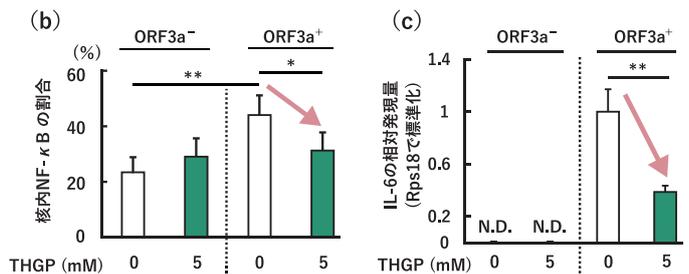
p38 はインフラマソーム活性化に関わる上流の炎症関連因子です。解析により、アサイゲルマニウムは p38 の活性化には影響を与えないことがわかりました。



(b) NF- κ B の活性化・核内移行

p38 の活性化は NF- κ B の核内移行を促進し、炎症性サイトカインの遺伝子発現を促します。

ORF3a 添加により、核内の NF- κ B の量が増えましたが、アサイゲルマニウムにより有意に NF- κ B の核内移行を抑制されました。

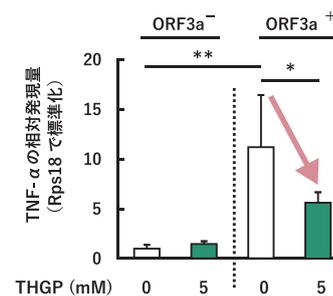


(c) IL-6 の遺伝子発現

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 の遺伝子発現を抑制しました。

(d) TNF- α の遺伝子発現

ORF3a を添加したところ、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しました。



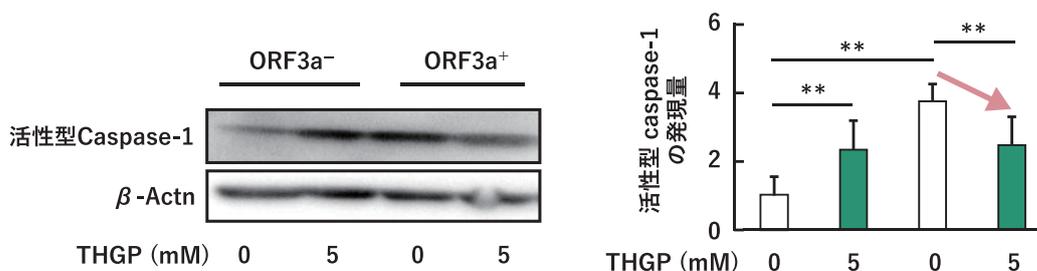
実験 2-④: アサイゲルマニウムによる Signal 2 への影響を評価

ORF3a はインフラサームの 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 β 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 とアサイゲルマニウムを添加して培養し、活性化 caspase-1 の量を評価しました。

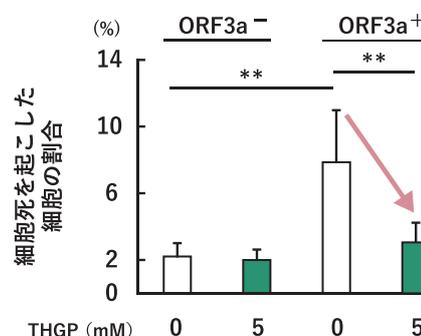
その結果、ORF3a 添加によって活性化した caspase-1 は増加しましたが、アサイゲルマニウムの添加により、その量は有意に減少しました。



(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

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。

ORF3a を細胞に添加すると、パイロトーシスを起こした細胞が有意に増加しました。一方で、アサイゲルマニウムを添加したところ、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。



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 (Signal 2) だけではなく、NF- κ B の核内移行を抑制すること (Signal1) でも、インフラサ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 β 、IL-6、TNF- α) 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。

お問い合わせ



株式会社
浅井ゲルマニウム研究所

ASAI Germanium Research Institute Co., Ltd.

〒215-0004 神奈川県川崎市麻生区万福寺
1-1-1 新百合ヶ丘シティビルディング 3F
TEL: 044-954-2101 FAX: 044-954-2066

無断複写・無断転載禁止