

# Asaigermanium Newsletter



ウイルス学研究を対象とするオープンアクセスの科学ジャーナル『Viruses』にて、当社研究部と北海道大学との共同研究の成果が掲載されました。

## 【タイトル】

Dual Effect of Organogermanium Compound THGP on RIG-I-Mediated Viral Sensing and Viral Replication during Influenza A Virus Infection ※“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。

## 【著者】

Sunanda Baidya <sup>1,2</sup>, Yoko Nishimoto <sup>1,2</sup>, Seiichi Sato <sup>1,2</sup>, Yasuhiro Shimada <sup>3</sup>, Nozomi Sakurai <sup>1</sup>, Hiroataka Nonaka <sup>1,2</sup>, Koki Noguchi <sup>1,2</sup>, Mizuki Kido <sup>1,2</sup>, Satoshi Tadano <sup>1,2</sup>, Kozo Ishikawa <sup>1</sup>, Kai Li <sup>1,2</sup>, Aoi Okubo <sup>1,2</sup>, Taisho Yamada <sup>1,2</sup>, Yasuko Orba <sup>4</sup>, Michihito Sasaki <sup>4</sup>, Hirofumi Sawa <sup>4</sup>, Hiroko Miyamoto <sup>5</sup>, Ayato Takada <sup>5</sup>, Takashi Nakamura <sup>3</sup> and Akinori Takaoka <sup>1,2</sup>

1:北海道大学遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野, 2:北海道大学 大学院総合科学院, 3:浅井ゲルマニウム研究所 研究部, 4:北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所 分子病態・診断部門, 5:北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所 国際疫学部門

【掲載誌】 Viruses 2021, 13(9), 1674

【URL】 <https://doi.org/10.3390/v13091674>

## <はじめに>

インフルエンザは例年冬季に流行する感染症です。当社では過去にアサイゲルマニウムがインフルエンザウイルス感染に有効であることを、マウスを使用した研究で明らかにしてきました。しかし、どのようなウイルスに対して有効なのか等、そのメカニズムは不明な部分が多く、アサイゲルマニウムのインフルエンザ感染によって誘導される自然免疫応答への影響についても全くわかっておりませんでした。今回は、その一部が解明された画期的な研究内容となっています。

## 本研究の概要

- ✓ 実験1では、『数あるウイルスの中で、どのような種類のウイルスに有効かを特定し、さらにそのウイルスが持つ特徴的な分子構造』を調べました。  
その結果、“**3pRNA**”をゲノムとして持つウイルスに有効である可能性が高いことがわかりました。
- ✓ 実験2では、『アサイゲルマニウムが、ウイルスの増殖に対してどのように働くか』を調べました。  
その結果、3pRNAを持つウイルスとアサイゲルマニウムが相互作用することがわかり、それによって**ウイルス複製を促す認識機構を阻害し、ウイルスの増殖を抑える**ことがわかりました。
- ✓ 実験3では、『免疫機能が働かないようにしたマウスにインフルエンザウイルスを感染させた場合、アサイゲルマニウムはどのような作用を示すか』を調べました。  
その結果、アサイゲルマニウムを与えていないマウス:7日で全て死亡  
アサイゲルマニウムを与えたマウス:**50%以上が7日以上生存、約20%が14日以上生存**  
という結果が得られました。また、肺組織を観察したところ、**アサイゲルマニウムを与えたマウスはウイルス感染していないマウスの肺組織に近い状態を維持していた**ことが確認されました。

# 実験 1: 3pRNA や 1 本鎖 RNA ウイルス感染に対するアサイゲルマニウムの影響を検討

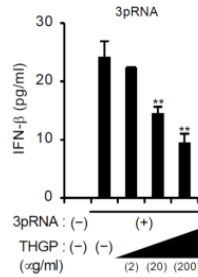
## 実験 1-①:アサイゲルマニウムの、3pRNA や RNA ウイルス感染による I 型インターフェロン誘導抑制を検討

インフルエンザウイルスなどのウイルスに感染すると、ウイルス由来の RNA が細胞内に侵入し、特定の RNA を認識する受容体である RIG-I を介して I 型インターフェロン(IFN-β)や炎症性サイトカインが誘導されます。

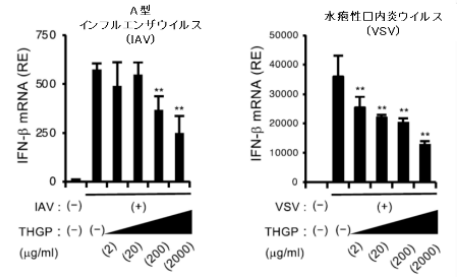
ここでは、まず細胞を用いた実験を行い、3pRNA やインフルエンザウイルス (IAV)、水疱性口内炎ウイルス (VSV) 感染で起こる IFN-β の誘導について、アサイゲルマニウムの影響を確認しました。

その結果、3pRNA を処理したり、3pRNA を持つウイルス (IAV、VSV) が感染することで産生量が上昇する IFN-β が、アサイゲルマニウムによって、有意に抑制されました(右図①②)。しかし 2 本鎖 RNA (polyI:C) や DNA、LPS や、3pRNA を持たないウイルス (脳心筋炎ウイルス:EMCV) では IFN-β の抑制は確認されませんでした。

①ELISA法によるIFN-βの測定



②1本鎖RNAウイルス感染時のIFN-βの測定



## 実験 1-②:3pRNA とアサイゲルマニウムの相互作用に関する検討

実験1-①のような結果になったメカニズムを検討するため、アサイゲルマニウムを表面に固定化したビーズを用いて、アサイゲルマニウムが何と相互作用するかを調べました。

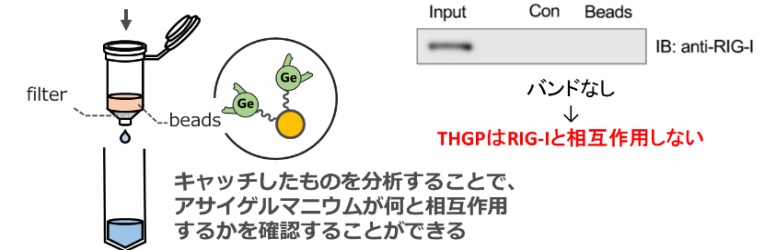
はじめに、特定の RNA ウイルスを認識する RIG-I とアサイゲルマニウムの相互作用について確認しましたが、認められませんでした(図①)。

次に、アサイゲルマニウムと 3pRNA、polyI:C、DNA のうち、強く相互作用する物質を調べるため、同様の実験を行いました。その結果、アサイゲルマニウムは 3pRNA と強く相互作用することが示されました(図②)。

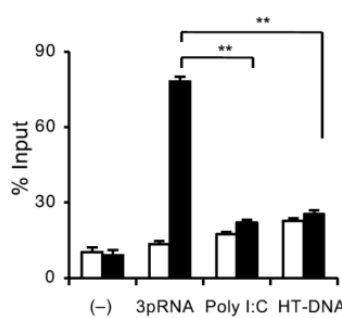
また、RIG-I は、3pRNA の 5' 末端のリン酸基を認識して、下流にシグナル伝達をし、IFN-β が誘導されることが知られています。

ここでは、脱リン酸化した 3pRNA を用いて同様の実験を行ったところ、相互作用が減弱したことから、アサイゲルマニウムは、3pRNA の 5' 末端と相互作用することが示唆されました(図③)。

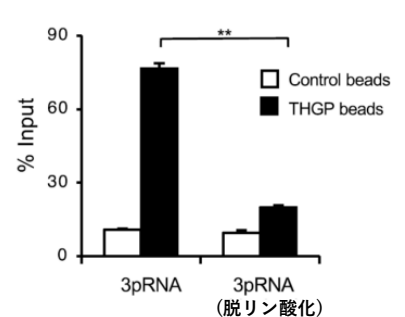
①アサイゲルマニウムとRIG-Iの相互作用検討



②各物質とTHGPとの相互作用検討



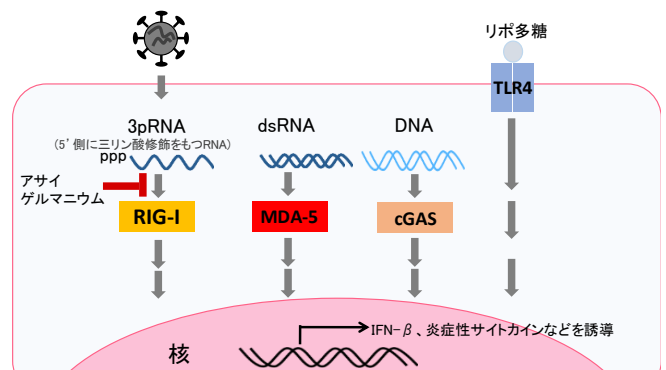
③3pRNA及び脱リン酸化3pRNAとTHGPとの相互作用検討



### 実験 1 のまとめ

- 1) アサイゲルマニウムは、1 本鎖 RNA ウイルスが持つ 3pRNA の 5' 末端のリン酸基と相互作用する。
- 2) 1)により、3pRNA が RIG-I に認識されるのを抑制し、シグナルが下流に進むのを抑制する。
- 3) IFN-β や炎症性サイトカインなどの誘導が抑制される。

アサイゲルマニウムはインフルエンザウイルスゲノムRNAと相互作用し、RIG-Iによる自然免疫応答を抑制します。



## 実験2: ウイルス増殖に対するアサイゲルマニウムの作用を検討

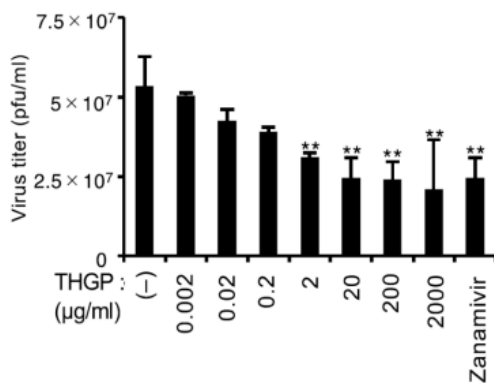
### 実験2-①: ウイルスカ価に対するアサイゲルマニウムの影響検討

RAW264.7 細胞(マウスマクロファージ様細胞)を用いて、インフルエンザウイルス(IAV)の複製に対するアサイゲルマニウムの影響を検討しました。

その結果、アサイゲルマニウム濃度依存的に、IAV のカ価が減少し、ウイルスの複製が抑制されていました。

特に THGP 20  $\mu$ M 以上の濃度で、インフルエンザウイルス感染症の治療薬であるザナミビルと同じレベルの抑制効果を示しました。

①ウイルスカ価に対するアサイゲルマニウムの影響



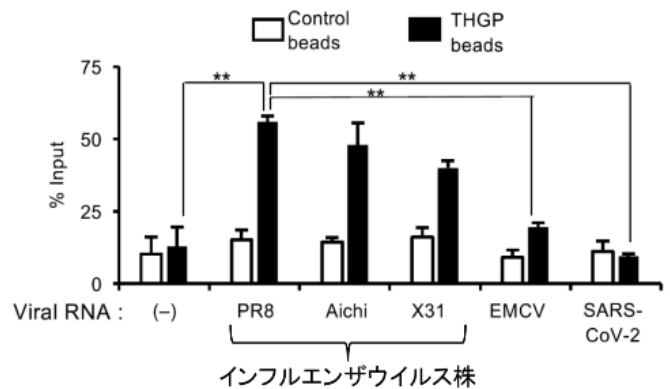
### 実験2-②: アサイゲルマニウムとウイルス RNA の相互作用検討

続いて、アサイゲルマニウムが固定化されたビーズを用いて Pull down アッセイという解析方法で、どのウイルスの RNA と相互作用するかを検討しました。

その結果、脳心筋炎ウイルス(EMCV)や、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)の RNA との相互作用は確認されませんでした。

しかし、インフルエンザウイルス(PR8、Aichi、X31)のRNAはアサイゲルマニウムと強く相互作用することが明らかになりました。

②アサイゲルマニウムと各ウイルスRNAとの相互作用



### 実験2-③: RNAポリメラーゼに対するアサイゲルマニウムの影響検討

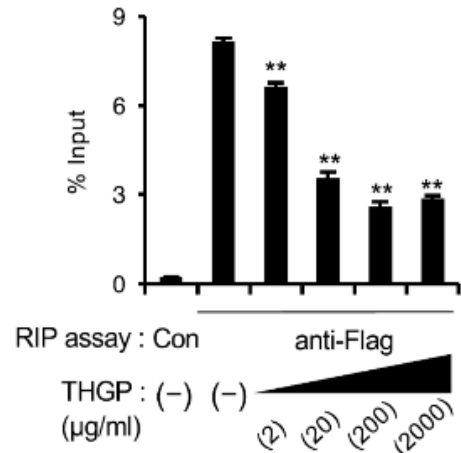
アサイゲルマニウムがウイルスの RNA と相互作用することで、ウイルスの複製に重要な役割を果たす「RNAポリメラーゼ」の認識に対しても影響を与えると考えました。

ここでは RIP アッセイという手法で、RNAポリメラーゼ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、濃度依存的にその活性を抑制していました。

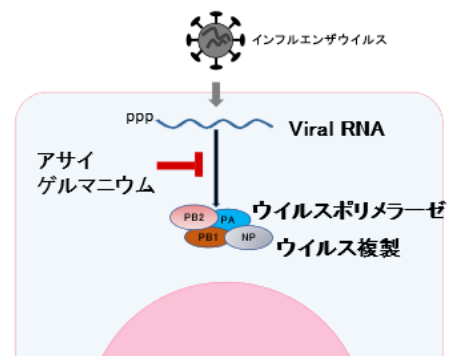
このことからアサイゲルマニウムは、インフルエンザウイルスの RNA と相互作用することで、RNAポリメラーゼによる複製を阻害し、インフルエンザウイルス増殖を抑制していることが示唆されました。

③RNAポリメラーゼに対するアサイゲルマニウムの影響



### 実験2のまとめ

- 1) アサイゲルマニウムは直接インフルエンザウイルスの RNA と相互作用する。
- 2) 1)により、ウイルスの複製に関わる RNAポリメラーゼの認識を抑制する。



### 実験3： インフルエンザウイルス感染マウスに対するアサイゲルマニウム作用を検討

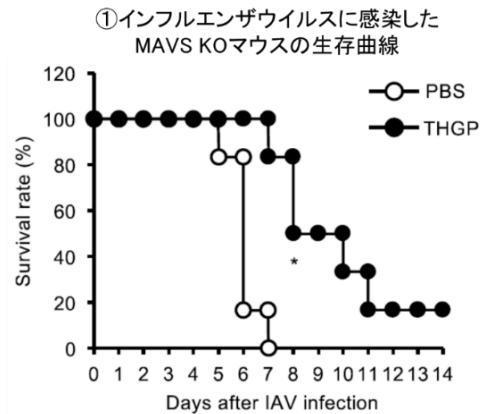
本実験では、遺伝子操作により IFN- $\beta$  が誘導されず、ウイルス感染に対する免疫防御が著しく損なわれた「MAVS ノックアウト(KO)マウス」を用いて、それぞれ実験を行いました。

#### 実験 3-①:インフルエンザウイルス(IAV)に感染した MAVS KO マウスの生存率への影響検討

IAV を感染させた MAVS KO マウスに、生理食塩水(PBS)とアサイゲルマニウムそれぞれを投与し、各群での生存率を比較しました。

その結果、生理食塩水投与群は 7 日で全個体が死亡しました。

対して、アサイゲルマニウム投与群では生存する個体が確認され、有意に生存率を向上させる結果が確認されました。



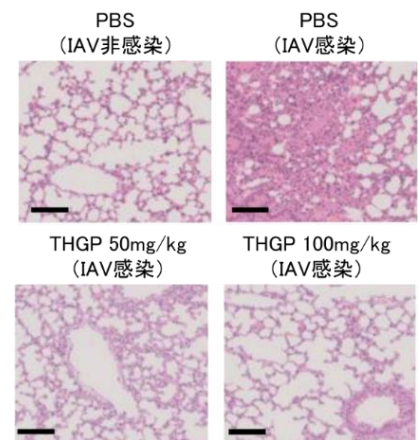
#### 実験 3-②:IAV 感染マウスの肺組織への影響検討

ハマトキシリン・エオジン(H&E)染色によって、IAV 感染マウスの肺組織を観察しました。

その結果、IAV に感染し、生理食塩水(PBS)を投与されたマウスの肺組織は、非感染のものと比較し、炎症によるダメージがあることが確認されました。その一方で、IAV に感染し、アサイゲルマニウムを投与されたマウスの肺組織においては、非感染のマウスの肺組織に近い状態になっていることが確認されました。

この結果は、自然免疫系が働かないマウスにおいてもアサイゲルマニウムによってウイルスの複製が抑制され、炎症が抑制されたことに起因すると考えられます。

②インフルエンザウイルス感染時の MAVS KOマウス肺組織染色図



### 研究のまとめ

本研究によって、アサイゲルマニウムについて下記のことが明らかになりました。

- ① ウイルス認識経路の一つである RIG-I の認識を抑制した。これは、3pRNA を持つ RNA ウイルスに対する有効性を示唆する。
- ② インフルエンザウイルス感染において、RNA と相互作用することにより、ウイルス由来ポリメラーゼのウイルスゲノム RNA の認識を抑制し、ウイルス複製を抑制する。
- ③ インフルエンザウイルス感染時の延命を促し、更に肺の炎症による組織損傷も抑制する。

これまでアサイゲルマニウムによるインフルエンザウイルスの抑制作用を確認してきましたが、本研究により、アサイゲルマニウムは特定のウイルスが保有するゲノム RNA(3pRNA)と相互作用することで、炎症性物質の産生やウイルス複製を抑制することが明らかとなりました。

アサイゲルマニウムのウイルス感染の防御策としてのさらなる貢献が期待され、また RNA が関係する炎症性疾患に対しても役立つ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、原料や製法が違えば、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。