1版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５年　６月１２日現在

機関番号：１４３０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｋ０７８８４
研究課題名（和文）シナプス小胞蛋白SV2BとBACE1の新規結合に着目したアルツハイマー病創薬研究

研究課題名（英文）Drug discovery research for Alzheimer's disease targeting a novel SV2B-BACE1 interaction

研究代表者
葛谷　聡（Kuzuya, Akira）

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：３０４２２９５０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、アルツハイマー病（AD）患者サンプルを用いて病因蛋白Aβの産生酵素BACE1の新規結合シナプス蛋白であるSV2Bが孤発性AD病態に関与するかを検証した。結果、AD剖検脳においてSV2Bは他のシナプス蛋白と比較して早期より有意に減少することを見出した。脳脊髄液においてもSV2Bのフラグメントを検出し、新規ADバイオマーカー候補の可能性を示した（現在、特許出願準備中）。脳in vivoマイクロダイアリシス法を用いて、内因性レベルのマウス海馬間質液AβとsAPPβの測定系を構築し、現在系統維持中のSV2Bノックアウトマウスを用いた海馬へのヒトSV2B遺伝子導入実験の予備実験を遂行した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
今回申請者が着目するSV2Bは、主に興奮性シナプスに発現するシナプス小胞蛋白であり、BACE1とともにADの初期病変部である海馬の興奮性プレシナプスに豊富に局在し、BACE1のAPP切断活性の抑制に関わる可能性がある。SV2Bを標的分子とすることにより、興奮性シナプスにおけるBACE1のAPP切断活性の指標となる新規バイオマーカーの創出や抗シナプスAβ療法の開発につながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined whether SV2B, a novel synaptic protein that binds to BACE1, the protease responsible for the production of the pathogenic protein Aβ, is involved in sporadic Alzheimer's disease (AD) pathology using samples from AD patients. The results revealed a significant early reduction of SV2B in AD postmortem brains compared to other synaptic proteins. SV2B fragments were also detected in the cerebrospinal fluid, indicating the potential of SV2B as a candidate biomarker for AD (currently undergoing patent application). Using in vivo microdialysis in mouse brains, we established a measurement system for endogenous levels of Aβ and sAPPβ in the hippocampal interstitial fluids and conducted preliminary experiments for the introduction of human SV2B gene into the hippocampus using SV2B knockout mice, which are currently being maintained.

研究分野：アルツハイマー病の分子生物学

キーワード：シナプス小胞蛋白2B　BACE1　シナプス　アミロイドβ蛋白

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　C－19、F－19－1、Z－19（共通）

１．研究開始当初の背景
近年の各種バイオマーカー研究から、アルツハイマー病（AD）脳では臨床症状出現の20年以上前よりアミロイドβ蛋白（Aβ）の不溶性沈着（老人斑）とともに、シナプス機能が障害されることが明らかとなり、「前臨床期アルツハイマー病」として注目されている。以前より AD の主要病理所見のうち、老人斑や過剰リン酸化されたタウ蛋白が神経細胞内で凝集する神経原線維変化より、シナプス脱落がADの認知機能障害と最も相関することが知られている。さらに最近の AD 患者剖検脳を用いた検討では、シナプスにおける可溶性Aβオリゴマーの局在が神経原線維変化の形成よりも認知機能障害の発症に関与すると報告された(Bilousova T et al. *Am J Pathol* 2016)。認知機能障害出現時には脳内のAβ沈着はほぼプラトーに達し、前臨床期からのAβオリゴマーによるシナプス障害を標的とした先制治療および発症予測バイオマーカーの開発が望まれる。
Aβはアミロイド前駆体蛋白質（APP）がβ、γセクレターゼによる連続切断を受け産生され、細胞外へ分泌される。中枢神経系βセクレターゼ活性を担うβ-site APP cleaving enzyme 1(BACE1)は、脳内の全Aβ産生に必須かつ律速の酵素である。以前より孤発性 AD 患者脳において BACE1の発現量や活性の増加が報告されたが、近年、BACE1によるAPP切断を抑制するAPP変異(A637T)が、孤発性 AD や加齢性認知機能低下に対して予防的な効果を発揮することが示され、BACE1 によるAPP切断活性がAD発症リスクに直結することが判明した(Jonsson T et al. *Nature* 2012)。この発見により、加齢依存的なAD病態において早期のBACE1によるAPP切断活性亢進に伴うAβ産生亢進の寄与が裏付けられた。一方、Aβの生理的な役割は依然不明だが、Aβが神経活動依存的にシナプスで産生、分泌されることが明らかになり、APPやBACE1、Presenilin1(PS1)/γセクレターゼ複合体などのAβ産生の鍵分子がシナプスに局在することが判明した。申請者もシナプス小胞蛋白 synaptotagmin1 が PS1 と Ca^{2+}依存性に結合し、神経活動依存的なAβの産生、分泌の調節に関わることを報告した（Kuzuya A et al. *BMC Biology* 2016）。
一方、シナプスにおける BACE1 の APP 切断活性の分子制御機構についてほとんど明らかにされていない。申請者は先行研究において、シナプトニューロソームを用いたプロテオミクス解析によりBACE1の新規結合シナプス蛋白を探索し、シナプス小胞蛋白のSV2Bを同定した。SV2Bは主に興奮性ニューロンのプレシナプスに局在するシナプス小胞蛋白として知られるが、興味深いことにADの強力な遺伝的危険因子であるAPOE4保有AD患者海馬においてSV2Bの遺伝子発現の有意な減少が報告されている（Xu PT et al. *Neurobiol Dis* 2006）。この報告に合致して、申請者はSV2Bの過剰発現細胞でBACE1のAPP切断およびAβ産生が有意に抑制され、SV2Bノックアウト（KO）マウス海馬組織でAβ量が有意に増加することを発見した（Miyamoto M, Kuzuya A et al. *J Alzheimers Dis* 2020）。この発見により、興奮性プレシナプスにおけるSV2Bを介したBACE1 の APP 切断活性の抑制が破綻し、Aβの過剰産生からオリゴマー化が促進することでシナプス障害に関わる可能性がある。「新たな AD 疾患修飾薬や発症予測バイオマーカーの創出が強く求められる現在、興奮性プレシナプスに局在し、BACE1 と結合する SV2B がこれらの候補となり得るか」というコンセプトのもと、本研究課題の提案に至った。

２．研究の目的
本研究の目的は、孤発性AD病態におけるSV2Bの関与をAD患者サンプル（脳組織、脳脊髄液）で解明するとともに、SV2B が興奮性シナプスに選択性のある新規抗 Aβ療法の開発につながる創薬標的であることを検証することである。具体的には、１）認知症期AD患者脳におけるSV2Bの蛋白発現量とAD病理ステージの関係を明らかに、２）軽度認知障害（MCI）期AD患者髄液におけるSV2Bの蛋白発現量の検討、３）マウスを用いたBACE1のAPP切断活性におよぼすSV2B発現効果のin vivo検証を目的とした。

３．研究の方法
１）認知症期AD患者脳におけるSV2Bの蛋白発現量とAD病理ステージの関係
剖検脳は共同研究先の福祉村ブレインバンクから提供され、年齢が合致した対照群(非認知症)6例、国際的なAD病理診断基準でステージ分類された認知症中期AD群6例、および認知症進行期AD群5例を比較検討する。具体的にはウェスタンブロット法（WB）および免疫組織染色を用いて、脳組織（海馬や大脳皮質）におけるSV2Bの蛋白発現量を比較検討する。
２）MCI期AD患者髄液におけるSV2Bの蛋白発現量の検討
微量であることが予測される患者脳脊髄液中の SV2B 蛋白発現を検出するため、市販の SV2B ELISAキット、免疫沈降／WB、限外濾過フィルター濃縮サンプルのWBなど様々な手法を検証し、本研究で比較検討が可能な測定法を決定する。次に脳脊髄液ADバイオマーカーで診断された37

例の MCI 患者脳脊髄液（non-AD 12 例、AD 25 例）を用いて、髄液 SV2B 蛋白発現量を比較検討する。
３）マウスを用いた BACE1 の APP 切断活性におよぼす SV2B 発現効果の in vivo 検証
共同研究先より SV2B ノックアウト（KO）マウスを譲渡してもらい、当施設で系統維持する。専用透析プローブを用いた脳 in vivo マイクロダイアリシス法で、4-6 ヶ月齢の SV2B KO マウス海馬間質液を採取し、ELISA による間質液中の内因性 Aβや sAPPβなどの AD 関連蛋白質のアッセイ系を構築する。脳定位で一側海馬（歯状回、CA3 領域）にガイドカニューレを挿入後、in vivo 用の BrainFectin キット（OZ Biosciences 社）を用いてヒト SV2B プラスミドまたはコントロールプラズミドの遺伝子導入条件を最適化する。遺伝子導入 48-72 時間後にガイドカニューレ下でマイクロダイアリシスプローブを留置、間質液を採取し、ELISA にて間質液中の sAPPβ，Aβ40，Aβ42 を測定する（各群 6-8 匹）。

４．研究成果
１）AD 患者脳において
剖検脳の大脳皮質（縁上回、中側頭回、中前頭回）の TH，SNS を用いた WB による解析の結果、特に縁上回において SV2B が AD 病理ステージの早い段階から他の主要なシナプス蛋白より有意に減少することを見出した（第 63 回日本神経学会学術大会ポスター発表）。また海馬を用いた SV2B の免疫組織染色では、AD サンプルにおいて対照の synaptophysin と比較し早期から SV2B の免疫反応性が低下することを確認した。
２）MCI 期 AD 患者髄液における SV2B の蛋白発現量の検討
微量な患者脳脊髄液中の SV2B を検出する測定系として、本研究では限外濾過フィルター濃縮髄液サンプルの WB を用いた。脳脊髄液中に全長型 SV2B は検出されず、低分子量域に SV2B の断端フラグメントと推定されるバンドを検出した。本研究成果については、現在、特許出願を検討しており、一時詳細な公表は差し控える。
３）マウスを用いた BACE1 の APP 切断活性におよぼす SV2B 発現効果の in vivo 検証
これまで当研究室では、Aβが過剰発現する APP トランスジェニックマウスを用いて、脳 in vivo マイクロダイアリシス法により海馬間質液中の外因性 Aβ量の測定を行なってきた。今回、野生型マウスを用いて、脳 in vivo マイクロダイアリシス法により高分子ペプチドにも対応する海馬間質液のサンプリングシステムを構築し、内因性に発現する間質液中の Aβと sAPPβ量を ELISA で定量的に測定する系を確立した。また野生型マウスに in vivo 用の BrainFectin キットと EGFP プラズミドを用いて遺伝子導入条件の最適化を行った。しかしながら、研究開始後より新型コロナウイルス感染症流行による影響を大きく受け、共同研究先からの SV2B KO マウスの譲渡に予想以上に時間を要した。現在、SV2B KO マウスの当施設での系統維持が順調に進み、SV2B KO マウス海馬へのヒト SV2B 遺伝子導入の急性レスキュー実験を進めていく予定である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 Mizuki Matsumoto
２．発表標題 Synaptic vesicle protein 2B links aging, synapse and amyloid β in Alzheimer's disease.
３．学会等名 第63回日本神経学会学術大会
４．発表年 2022年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	松本　瑞樹 (Matsumoto Mizuki)		

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関