

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

軽度認知機能障害の簡易スクリーニング法および予防介入効果の評

価法の開発に関する研究

平成 18 年度 総括研究報告書

主任研究者 浦上 克哉

平成 19 年 (2007 年) 3 月

## 目 次

I. 総括研究報告書	
軽度認知機能障害の簡易スクリーニング法および予防介入効果の 評価法の開発に関する研究 .....	1
浦上 克哉	
II. 分担研究報告書	
1. 軽度認知機能障害の簡易スクリーニング法および予防介入効果の 評価法の開発に関する研究 .....	4
浦上 克哉	
2. 軽度認知機能障害の簡易スクリーニング法および予防介入効果の 評価法の開発に関する研究 .....	6
井上 仁	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	8
IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	10

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

研究題名：軽度認知機能障害の簡易スクリーニング法および予防介入効果の評価法の開発に関する研究

主任研究者	浦上克哉	鳥取大学医学部保健学科生体制御学・教授
分担研究者	千葉潜	青南病院・病院長
	山崎学	慈光会病院・病院長
	井上仁	鳥取大学総合メディア基盤センター・助教授
	谷口美也子	鳥取大学医学部保健学科生体制御学
分担研究協力者	宮永和夫	群馬県こころの健康センター
	大谷るみ子	大牟田市認知症ケア研究会

研究要旨

我々が開発したタッチパネル式コンピューターを用いた認知症スクリーニング機器を使って65歳以上の地域住民の認知症予防検診を実施した。この検診で軽度認知障害と考えられた認知症のハイリスク者について介入プログラムを実施し、その有効性を評価した。

A. 研究目的

近年認知症の早期発見、予防介入の重要性が認識され、いろいろな地域で認知症の検診や予防教室が試みられている。しかし、その方法は確立されていない。特にこれまで用いられてきた方法は、集団でスクリーニングするものが多く、個別的なスクリーニングが求められる。また、多数のマンパワーが必要であり、緊縮財政の市町村で行うことが極めて困難な状況にある。そこで、我々はこの問題点を解決できる方法を開発した。それは、スクリーニングにタッチパネル式コンピューターを用いる方法で、1次スクリーニングは5分以内で簡単に行え、且つ感度、特異度が極めて高いものである<sup>1)</sup>。2次スクリーニングとして世界的な認知症の治療評価法として確立されているADASを導入したもの（TDAS）である<sup>2)</sup>。これらを用いた方法と従来から行われている方

法（1次スクリーニングとして自記式アンケートを、2次スクリーニングとしてMMSEを用いる）を比較して、有効性や簡便度を検討した。

B. 研究方法

青森県五所川原市、群馬県高崎市、福岡県大牟田市、鳥取県琴浦町の4地区で実施した。青森県五所川原市、群馬県高崎市においては、認知症の一次スクリーニングとして脳健康度チェック、タッチパネル式スクリーニング検査を、2次検診としてMMSE、TDASを行なった。それぞれ両方法の有効性を比較した。また、被検者、検者にアンケートを実施した。一次スクリーニングは、脳健康度チェック表で5項目以上のもの、タッチパネル検査で15点満点中13点以下のものを2次スクリーニング対象者とした。2次検査は、MMSE24点以下のもの、T

DASは7点以上のものを陽性者としてピックアップした。要精密検査と考えられたものは専門医療機関へ紹介した。

福岡県大牟田市では、タッチパネル式スクリーニングとTDASにより検診を行った。ハイリスク者に認知症予防教室への参加を促した。認知症予防教室は、ゲームや参加者との語らいを通して運動や知的活動を促進するもので、週1回3ヶ月間行い、予防教室の前後でタッチパネル検査とTDAS検査を行う。TDAS検査は満点が0で誤りが多いほど得点が大きくなる。介入プログラム前後の検査得点については対応のあるt検定で平均値の差の検定を行う。統計処理はSPSS Windows 版Ver.11を用いる。

鳥取県琴浦町では、一次スクリーニングをタッチパネル式スクリーニングを用い、15点中13点以下の被検者を認知症ハイリスク者として認知症予防教室への参加を促した。認知症予防教室は週1回3ヶ月間おこない、予防教室の前後でタッチパネル式検査とADAS検査を行った。予防教室前後の得点についてはt検定で平均値の差の検定を行い、統計処理はSPSS Windows版 Ver.11を用いた。。

## C. 研究結果

### 1) 青森県五所川原市

基本検診受診者302名中154名(51%)が1次スクリーニングを受けた。2次検査としてMMSEを受けたもの21名(13.6%)、TDASを受けたもの32名(20.8%)であった。MMSE陽性者7名、TDAS陽性者6名であった。このうち6名が専門医療機関で精査を受け、5名が認知症、1名が精神発達遅滞と診断され、的中率は85%であった。アンケート結果では、タッチパネル式スクリーニング検査は「楽しかった」、「ゲームみたい」、「もっとやりたい」など大変好評であった。

### 2) 群馬県高崎市榛名町

対象者73名中1次スクリーニングとして脳の健康度チェックを受けたもの73名、タッチパネルスクリーニング検査を受けたもの66名であった。2次検査として、MMSEは脳の健康度チェックを受けたもの73名中16名が対象となり、うち5名が陽性であった。TDASはタッチパネルスクリーニング検査を受けたもの66名中11名が対象となり、10名が実施し5名が陽性と判定された。うち3名がかかりつけ医に相談、1名が専門医へ紹介となった。

アンケート結果では、タッチパネル式スクリーニング検査は「楽しかった」、「簡単」、「近代的方法で良いと思う」など大変好評であった。2次検査のTDASについても「やや難しい」というコメントもあったが、「良い」と「やや良い」が80%以上を占めていた。

### 3) 福岡県大牟田市

145名の対象者に1次スクリーニングとしてタッチパネル式スクリーニング検査を実施し、13点以下のものが50名をであった。2次検診は46名に実施し、6点以下10名、7~13点14名、14点以上22名であった。このうち41名が予防教室に参加した。教室は現在まだ実施中で評価に至っていない。

### 4) 鳥取県琴浦町

男性148名、女性309名の計457名の対象者に一次スクリーニングとしてタッチパネル式スクリーニング検査を行った。得点分布は15点が135名、14点が203名、13点が63名、12点が23名、11点が17名、10点が4名で9点以下が14名であった。13点のハイリスク者は121名で、全被験者の26%であり、男性が34名で全男性被験者の23%、女性が87名で全女性被験者の28%であった。

13点以下のハイリスク者121名のうちで1回でも予防教室に参加し、なおかつ予防教室前後でタッチパネル検査とADAS検査の両方を受診した被験者は65名では、予防教室前後のタッチパネル検査の平均点はそれぞれ11.8点と12.9点で1.1点の有意に向上した。一方、ADAS検査の予防教室前後の平均点はそれぞれ8.7点と9.0点であり、0.3点の減少であったが有意差は認められなかった。また、予防教室参加回数と得点変化にも有意な関係は認められなかった。

一次スクリーニングで特に認知症が強く疑われる38名について医療機関に紹介して精密検査の受診を勧めたところ、20名はアルツハイマー型認知症、1名は脳血管性認知症、2名はその他の疾患であることが分かった。

#### D. 考察

今回の検討では、われわれの開発したタッチパネルを用いたスクリーニング法の有効性は確認できたと思われる。検診は被験者に負担無く気軽に参加してもらえることが望ましく、アンケート結果からこの方法が概ね期待に答えられていることが分かった。自記式のチェックは簡便であり、時間を要しないが、漏れがある可能性が考えられる。認知症になってしまうと自分が忘れてしまうことを忘れてしまうことがしばしばある。我々も以前の疫学的検討の中で、自記式アンケートを1次スクリーニングに用いたところ、その段階見逃した例が多くあることに気づいた<sup>3)</sup>。このことから、直接1次スクリーニング検査を被検者に行うことが良いと考える。

2次検査として用いたTDASについては、検診全体の時間的な問題などもあり、改良の必要があると考えられた。MMSEはTDA Sより簡便ではあるが、MMSEは本来スク

リーニング検査であり評価に用いるべきではない。これまで、多くの報告で用いられてきたのは、他に適切なものが無かったためである。その点TDASで使っている質問項目はADASという世界的に治療評価法として確立されているものである。しかし、この方法の問題点として、専門の臨床心理士を必要とすること、時間が60分と長いことである。我々の開発したTDASは、臨床心理士を必要とせず、時間も20分～30分と所要時間を短縮したものである。ただ、検診は限られた時間内で行う必要があり、次年度は問題数を減らす外の改善を加えて、信頼性の相関を検討したいと考える。

#### 参考文献

- 1) 浦上克哉、谷口美也子、佐久間研司、他：アルツハイマー型痴呆の遺伝子多型と簡易スクリーニング法. 老年精神医学, 13, 5-10 (2002) .
- 2) 齊藤潤、井上仁、北浦美貴、谷口美也子、木村有希、佐藤智明、馬詰美保子、福田由貴子、山本照恵、浦上克哉：認知症予防教室における対象者の判別法と評価法の検討. *Dementia Japan* 19: 177-186, 2005.
- 3) Urakami K, Adachi Y, Wakutani Y, Isoe K, Ji Y, Takahashi K, Nakashima K : Epidemiologic and genetic studies of dementia of the Alzheimer type in Japan. *Dement Geriatr Cogn Disord* 9 : 294-298, 1998.

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

研究報告書

研究課題名：軽度認知機能障害の簡易スクリーニング法および予防介入効果の評価法の開発に関する研究

主任研究者 浦上克哉 鳥取大学医学部保健学科・生体制御学  
分担研究者 千葉潜 医療法人青仁会 青南病院  
分担研究者 山崎学 医療法人慈光会 慈光会病院  
分担研究協力者 宮永和夫 群馬県こころの健康センター  
分担研究協力者 大谷るみ子 大牟田市認知症ケア研究会

研究要旨

我々が開発したタッチパネル式コンピューターを用いた認知症スクリーニング機器を使って65歳以上の地域住民の認知症予防検診を実施した。この検診で軽度認知障害と考えられた認知症のハイリスク者について介入プログラムを実施し、その有効性を評価した。

A. 研究目的

近年認知症の早期発見、予防介入の重要性が認識され、いろいろな地域で認知症の検診や予防教室が試みられている。しかし、その方法は確立されていない。特にこれまで用いられてきた方法は、集団でスクリーニングするものが多く、個別的なスクリーニングが求められる。また、多数のマンパワーが必要であり、緊縮財政の市町村で行うことが極めて困難な状況にある。そこで、我々はこの問題点を解決できる方法を開発した。それは、スクリーニングにタッチパネル式コンピューターを用いる方法で、1次スクリーニングは5分以内で簡単に行え、且つ感度、特異度が極めて高いものである<sup>1)</sup>。2次スクリーニングとして世界的な認知症の治療評価法として確立されているADASを導入したもの（TDAS）である<sup>2)</sup>。これらを用いた方法と従来から行われている方法（1次スクリーニングとして自記式アンケートを、2次スクリーニングとしてMMSEを用いる）を比較して、有効性や簡便度を検討した。

B. 研究方法

青森県五所川原市、群馬県高崎市、福岡県大牟田市の3地区で実施した。青森県五所川原市、群馬県高崎市においては、認知症の一次スクリーニン

グとして脳の健康度チェック、タッチパネル式スクリーニング検査を、2次検診としてMMSE、TDASを行なった。それぞれ両方法の有効性を比較した。また、被検者、検者にアンケートを実施した。一次スクリーニングは、脳の健康度チェック表で5項目以上のもの、タッチパネル検査で15点満点中13点以下のものを2次スクリーニング対象者とした。2次検査は、MMSE24点以下のもの、TDASは7点以上のものを陽性者としてピックアップした。要精密検査と考えられたものは専門医療機関へ紹介した。

福岡県大牟田市では、タッチパネル式スクリーニングとTDASにより検診を行った。ハイリスク者に認知症予防教室への参加を促した。認知症予防教室は、ゲームや参加者との語らいを通して運動や知的活動を促進するもので、週1回3ヶ月間行い、予防教室の前後でタッチパネル検査とTDAS検査を行う。TDAS検査は満点が0で誤りが多いほど得点が大きくなる。介入プログラム前後の検査得点については対応のあるt検定で平均値の差の検定を行う。統計処理はSPSS Windows 版Ver.11を用いる。

C. 研究結果

### 1) 青森県五所川原市

基本検診受診者302名中154名(51%)が1次スクリーニングを受けた。2次検査としてMMSEを受けたもの21名(13.6%)、TDASを受けたもの32名(20.8%)であった。MMSE陽性者7名、TDAS陽性者6名であった。このうち6名が専門医療機関で精査を受け、5名が認知症、1名が精神発達遅滞と診断され、的中率は85%であった。アンケート結果では、タッチパネル式スクリーニング検査は「楽しかった」、「ゲームみたい」、「もっとやりたい」など大変好評であった。

### 2) 群馬県高崎市榛名町

対象者73名中1次スクリーニングとして脳の健康度チェックを受けたもの73名、タッチパネルスクリーニング検査を受けたもの66名であった。2次検査として、MMSEは脳の健康度チェックを受けたもの73名中16名が対象となり、うち5名が陽性であった。TDA Sはタッチパネルスクリーニング検査を受けたもの66名中11名が対象となり、10名が実施し5名が陽性と判定された。うち3名がかかりつけ医に相談、1名が専門医へ紹介となった。アンケート結果では、タッチパネル式スクリーニング検査は「楽しかった」、「簡単」、「近代的方法で良いと思う」など大変好評であった。2次検査のTDASについても「やや難しい」というコメントもあったが、「良い」と「やや良い」が80%以上を占めていた。

### 3) 福岡県大牟田市

145名の対象者に1次スクリーニングとしてタッチパネル式スクリーニング検査を実施し、13点以下のものが50名をであった。2次検診は46名に実施し、6点以下10名、7~13点14名、14点以上22名であった。このうち41名が予防教室に参加した。教室は現在まだ実施中で評価に至っていない。

## D. 考察

今回の検討では、われわれの開発したタッチパネルを用いたスクリーニング法の有効性は確認できたと思われる。検診は被験者に負担無く気軽に参加してもらえることが望ましく、アンケート

結果からこの方法が概ね期待に答えられていることが分った。自記式のチェックは簡便であり、時間を要しないが、漏れがある可能性が考えられる。認知症になってしまうと自分が忘れていたということを忘れてしまうことがしばしばある。我々も以前の疫学的検討の中で、自記式アンケートを1次スクリーニングに用いたところ、その段階見逃した例が多くあることに気づいた<sup>3)</sup>。このことから、直接1次スクリーニング検査を被検者に行うことが良いと考える。

2次検査として用いたTDASについては、検診全体の時間的な問題などもあり、改良の必要があると考えられた。MMSEはTDASより簡便ではあるが、MMSEは本来スクリーニング検査であり評価に用いるべきではない。これまで、多くの報告で用いられてきたのは、他に適切なものが無かったためである。その点TDASで使っている質問項目はADASという世界的に治療評価法として確立されているものである。しかし、この方法の問題点として、専門の臨床心理士を必要とすること、時間が60分と長いことである。我々の開発したTDASは、臨床心理士を必要とせず、時間も20分~30分と所要時間を短縮したものである。ただ、検診は限られた時間内で行う必要があり、次年度は問題数を減らす外の改善を加えて、信頼性の相関を検討したいと考える。

## 参考文献

- 1) 浦上克哉、谷口美也子、佐久間研司、他：アルツハイマー型痴呆の遺伝子多型と簡易スクリーニング法。老年精神医学, 13, 5-10 (2002) .
- 2) 斉藤潤、井上仁、北浦美貴、谷口美也子、木村有希、佐藤智明、馬詰美保子、福田由貴子、山本照恵、浦上克哉：認知症予防教室における対象者の判別法と評価法の検討。Dementia Japan 19: 177-186, 2005.
- 3) Urakami K, Adachi Y, Wakutani Y, Isoe K, Ji Y, Takahashi K, Nakashima K: Epidemiologic and genetic studies of dementia of the Alzheimer type in Japan. Dement Geriatr Cogn Disord 9: 294-298, 1998.

研究課題：軽度認知機能障害の簡易スクリーニング法および予防介入効果の評価法の開発に関する研究

分担研究者 井上 仁 鳥取大学総合メディア基盤センター

### 研究要旨

我々が開発したタッチパネル式コンピュータ検査システムを用いて地域住民の認知症有病率の調査を行った。さらにハイリスク者としてスクリーニングされた対象者について介入プログラムを実施し、その有効性について評価を行った。

### A. 研究目的

急激な高齢化社会に突入している我が国においては、増加する認知症の予防対策が急務となっている。認知症の予防は早期発見・早期対応が重要であり、そのためには地域住民を対象としたスクリーニングとハイリスク者に対する介入プログラムが有効である。我々は、認知症の一次スクリーニング（タッチパネル検査）及び認知症に対する治療効果判定用検査（ADAS検査）の為にコンピュータシステムを開発してきた。今回の目的は1）我々が開発したタッチパネル検査およびADAS検査の有効性を評価すること、2）コンピュータスクリーニングにより、地域住民の認知症有病率の実態を調査すること、3）認知症予防の為に介入プログラムの有効性を評価することである。

### B. 研究方法

鳥取県琴浦町の住民に対して認知症の一次スクリーニングを実施した。被験者は男性148名、女性309名の合計457名である。被験者の年齢は59歳から96歳で、男性と女性および全体の平均年齢はそれぞれ75.7歳、75.9歳と75.8歳である。一次スクリーニングはタッチパネル検査で行い、15点満点中13点以下の被験者を認知症ハイリスク者として抽出した。ハイリスク者には認知症予防教室への参加を促した。認知症予防教室は、ゲームや参加者との語りを通して運動や知的活動を

を促進するもので、週1回3ヶ月間行った。予防教室の前後でタッチパネル検査とADAS検査を行った。ADAS検査は満点が0で誤りが多いほど得点が大きくなる。介入プログラム前後の検査得点についてはt検定で平均値の差の検定を行った。統計処理はSPSS Windows版Ver.11で行った。

### C. 研究結果

一次スクリーニングの得点分布は15点が135名、14点が203名、13点が63名、12点が23名、11点が17名、10点が4名で9点以下が14名であった。13点のハイリスク者は121名で全被験者の26%であった。ハイリスク者の内訳は、男性が34名で全男性被験者の23%、女性が87名で全女性被験者の28%であった。

13点以下のハイリスク者121名のうちで1回でも予防教室に参加し、なおかつ予防教室前後でタッチパネル検査とADAS検査の両方を受診した被験者は65名であった。その65名の予防教室前後のタッチパネル検査の平均点はそれぞれ11.8点と12.9点で1.1点の向上があり、有意水準5%で有意差が認められた。一方、ADAS検査の予防教室前後の平均点はそれぞれ8.7点と9.0点であり、0.3点の減少であったが両郡の平均値には有意差は認められなかった。また、予防教室参加回数と得点変化にも有意な関係は認められなかった。

今回の一次スクリーニングで特に認知症が強く疑われる38名について医療機関に紹介し



て精密検査の受診を勧めたところ、20名はアルツハイマー型認知症、1名は脳血管性認知症、2名はその他の疾患であることが分かった。13名は未受診である。

#### D. 考察

65歳以上の地域住民を対象とした認知症の一次スクリーニングに我々の開発したコンピュータを用いたタッチパネル検査を用いた。一次スクリーニングでは多数の被験者を迅速に同一の判定基準で検査する必要がある。従来の人手による対面式検査では検査者の違いや、同一検査者でも長時間に渡る場合のバイアスが危惧されるが、コンピュータの場合は全てが同一の基準で検査できるという利点がある。今回の被験者のほとんどが高齢者であることから、コンピュータを用いる際の注意点として、操作性が挙げられる。本システムは音声と画面表示で質問を提示し、被験者はそれに対して画面に表示されるアイコンボタンにタッチするという応答方式を採用した。それによって高齢者でも容易に操作することができた。しかしながら、聴力に衰えがある一部の高齢者にはスタッフがナレーションを代行するというような配慮も必要であった。本システムは約5分間で検査を終了することができることから、今回のような多数の地域住民を対象とした一次スクリーニングには適したシステムであると考えている。

藤原ら<sup>1)</sup>はMMSEを用いたスクリーニング検査で、65歳以上の住民の約24%をハイリスク群として選別している。また村田<sup>2)</sup>は55%を認知症予備軍として選別している。タッチパネル検査に関する我々の先の報告<sup>3)</sup>では、感度と特異度のバランスを考慮してカットオフ値として12を提案した。しかしながら、今回のスクリーニングでは13点をカットオフ値として用いた。これは、特異度を犠牲にしてもなるべく取りこぼしの無い方がスクリーニングとしては有効<sup>4)</sup>であると考えたからである。その結果、今回は

参加者の26%をハイリスク群として選別したが、これは藤原らの報告に近い値であった。

認知症予防教室の効果については、会の前後でタッチパネル検査の平均点は有意な得点向上が認められたものの、ADAS検査の平均点では変化が認められなかった。ADAS検査の結果をより詳しく見てみると、65名中4名は10点以上得点が悪化しており、35点もの悪化を示した参加者が1名いた。これら一部の高い悪化を示した参加者の得点が予防教室後のADAS全体の平均点に影響したのと考えている。どうして一部の参加者の得点が大きく悪化したのかについては今後の検討が必要であるが、タッチパネル得点に向上が認められたこととADASにおいても半数の参加者に得点の向上が見られたことから、予防教室の効果があったものと考えている。

#### 参考文献

- 1) 藤原佳典、天野秀紀、森節子等：地域における老年期痴呆の早期発見・早期対応システムの構築にむけての取り組み。日本公衆衛生雑誌, 50(8), 739-747 (2003) .
- 2) 村田啓子：利根町における痴呆対策予防事業の取り組み。地域保健, 35(1), 29-42 (2001) .
- 3) 浦上克哉、谷口美也子、佐久間研司、他：アルツハイマー型痴呆の遺伝子多型と簡易スクリーニング法。老年精神医学, 13(増刊号), 5-10 (2002) .
- 4) 田辺 等：痴呆の早期スクリーニングと早期対応。生活教育, 45(12), 13-19 (2001) .

研究成果に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kuwano R, Miyashita A Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, Tsukie T, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I	Dynamin-binding protein gene on chromosome 10q is associated with late-onset Alzheimer s disease	Human Molecular Genetics	15(13)	2170-2182	2006
浦上克哉	認知症と遺伝環境相互作用	分子精神医学	6	35-39	2006
Urakami K	Mild cognitive impairment: Biological diagnostic markers for early stages of Alzheimer s disease	Psychogeriatrics	6	26-29	2006
浦上克哉	Alzheimer病の早期診断と軽 度認知症障害(MCI)	Mebio	6	106-109	2006
浦上克哉	認知症の予防と早期発見	クリニカルプラ クティス	6	5994-5996	2006
神保大樹、浦上克哉	認知症に対するアロマセラ ピーの効果とアロマセラピ ー研究の戦略	JS of Aromatherapy	5	17-24	2006
浦上克哉、谷口美也子	アルツハイマー病早期診断 に役立つ生物学的診断マー カー	Medical Practice	7	1167-1169	2006
谷口美也子、浦上克哉	生物学的診断マーカー	Pharma Medica	7	39-42	2006
浦上克哉	アルツハイマー病は血管病 として治療すべき	日本老年医学会 雑誌	4	453-454	2006
浦上克哉	軽度認知障害(MCI)	モダンフィジシ ヤン	8	1376-1383	2006
井上仁、浦上克哉	たっちぱねる式 認知症(痴 呆)スクリーニング	老年期認知症ナ ビゲーター		250-251	2006
谷口美也子、浦上克哉	診断マーカー	老年期痴呆症ナ ビゲータ		252-253	2006
涌谷陽介、和田健二、 浦上克哉、中嶋健二	APP遺伝子変異とアルツハイ マー病			286-287	2006
浦上克哉	かかりつけ医に役立つアル ツハイマー型認知症のかん いしんだんと治療(私の診察 経験から)	臨床と研究	9	109-111	2006
浦上克哉	認知症の神経学的所見のと り方. 臨床医のためのアルツ ハイマー型認知症	実践診療ガイド		45-49	2006
浦上克哉	画像診断と生物学的診断マ ーカー②臨床医のためのア ルツハイマー型認知症	実践診療ガイド		64-68	2006

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
浦上克哉	タッチばねる式コンピューターを用いた認知症スクリーニング法の開発と認知症予防検診への活用	CLINICIAN	553	76-80	2006
浦上克哉、谷口美也子	認知症のリスクファクター	遙か EPS Magazine	3	14-18	2006
浦上克哉	認知症の基礎知識	ヘルスケア・レストラン	11	16-17	2006
浦上克哉	いつまでも住みなれたまちで暮らしたい	もの忘れフォーラム講演資料		6-7	2006
浦上克哉	認知症の疫学	最新医学	61	12-19	2006
浦上克哉	認知症検診	EBMジャーナル	2	108-111	2007
浦上克哉	認知症は治療可能な時代に — 認知症早期発見・予防の課題と展望	判例地方自治	285	7	2007
浦上克哉	タッチパネル式のスクリーニングで予防教室を展開	かいごのほけん	24	28-31	2007
浦上克哉、藤原静香	認知症になっても安心して暮らせるまちづくり(2)	Dementia Care Support		6-8	2006

# Dynamin-binding protein gene on chromosome 10q is associated with late-onset Alzheimer's disease

Ryozo Kuwano<sup>1,2,\*</sup>, Akinori Miyashita<sup>1,2</sup>, Hiroyuki Arai<sup>3</sup>, Takashi Asada<sup>4</sup>, Masaki Imagawa<sup>5</sup>, Mikio Shoji<sup>6</sup>, Susumu Higuchi<sup>7</sup>, Katsuya Urakami<sup>8</sup>, Akiyoshi Kakita<sup>9</sup>, Hitoshi Takahashi<sup>9</sup>, Tamao Tsukie<sup>1</sup>, Shinichi Toyabe<sup>10</sup>, Kohei Akazawa<sup>10</sup>, Ichiro Kanazawa<sup>11</sup> and Yasuo Ihara<sup>12</sup>; The Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer's Disease

<sup>1</sup>Genome Science Branch, Center for Bioresource-Based Researches, Brain Research Institute, Niigata University, Niigata 951-8585, Japan, <sup>2</sup>Center for Transdisciplinary Research, Niigata University, Niigata 951-8585, Japan, <sup>3</sup>Department of Geriatric and Complementary Medicine, Advanced Research Center for Asian Traditional Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai 980-8574, Japan, <sup>4</sup>Department of Psychiatry, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8575, Japan, <sup>5</sup>Department of Neuropsychiatry, Imagawa Clinic, Fukushima-ku, Osaka 553-0003, Japan, <sup>6</sup>Department of Neurology, Neuroscience and Biophysiological Science, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry, Okayama 700-8558, Japan, <sup>7</sup>Division of Clinical Research, Kurihama Alcoholism Center, National Hospital Organization, Yokosuka 239-0841, Japan, <sup>8</sup>Department of Biological Regulation, Section of Environment and Health Science, Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago 683-8503, Japan, <sup>9</sup>Department of Pathology and the Resource Branch for Brain Disease, Brain Research Institute, Niigata University, Niigata 951-8585, Japan, <sup>10</sup>Department of Medical Informatics, Niigata University, Niigata 951-8520, Japan, <sup>11</sup>National Center for Neurology and Psychiatry, Kodaira 187-8502, Japan and <sup>12</sup>Department of Neuropathology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

Received April 25, 2006; Revised and Accepted May 24, 2006

The apolipoprotein E (*APOE*) gene has been consistently shown to be a major genetic risk factor; however, all cases of Alzheimer's disease (AD) cannot be attributed to the  $\epsilon 4$  variant of *APOE*, because about half of AD patients have the *APOE*- $\epsilon 3^*3$  genotype. To identify an additional genetic risk factor(s), we performed large-scale single nucleotide polymorphism (SNP)-based association analysis of 1526 late-onset AD patients and 1666 control subjects in a Japanese population. We prepared two independent sets consisting of exploratory and validation samples, respectively, with only the *APOE*- $\epsilon 3^*3$  genotype, and first carried out genotyping for the exploratory set with 1206 SNPs in the region between 60 and 107 Mb on chromosome 10q that is implicated by linkage studies as containing an AD susceptibility locus. Thirty-five SNPs that showed significant values ( $P < 0.01$ ) were followed-up to detect any association with the validation samples. Finally, six SNPs exhibited replicated significant associations ( $P = 0.000035$ – $0.00048$ ) on meta-analysis of both sets. These SNPs were clustered in a locus spanning 220 kb at genomic position 101 Mb, and three of the six SNPs were located in the dynamin-binding protein (*DNMBP*) gene. Quantitative real-time RT-PCR analysis demonstrated that neuropathologically confirmed AD brains exhibit a significant reduction of *DNMBP* mRNA compared with age-matched ones ( $P < 0.0169$ ). Thus, we confirmed the association of *DNMBP* with AD individuals with the *APOE*- $\epsilon 3^*3$  genotype or lacking the  $\epsilon 4$  allele, and *DNMBP* may be one of the susceptibility genes for AD.

\*To whom correspondence should be addressed: Tel: +81 25 227 2343; Fax: +81 25 227 0793; Email: ryosun@gene.med.niigata-u.ac.jp

4. Hochli, M. and Hackenbrock, C.R. (1976) Fluidity in mitochondrial membranes: thermotropic lateral translational motion of intramembrane particles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **73**, 1636–1640.
5. Hackenbrock, C.R., Chazotte, B. and Gupte, S.S. (1986) The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **18**, 331–368.
6. Schagger, H. and Pfeiffer, K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J.*, **19**, 1777–1783.
7. Schagger, H. (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1555**, 154–159.
8. Schagger, H., de Coo, R., Bauer, M.F., Hofmann, S., Godinot, C. and Brandt, U. (2004) Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.*, **279**, 36349–36353.
9. Schafer, E., Seelert, H., Reifschneider, N.H., Krause, F., Dencher, N.A. and Vonck, J. (2006) Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.*, **281**, 15370–15375.
10. Bianchi, C., Genova, M.L., Parenti Castelli, G. and Lenaz, G. (2004) The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J. Biol. Chem.*, **279**, 36562–36569.
11. DiMauro, S. (2004) Mitochondrial diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1658**, 80–88.
12. Chen, H. and Chan, D.C. (2005) Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum. Mol. Genet.*, **14** (Spec no. 2), R283–R289.
13. Ono, T., Isobe, K., Nakada, K. and Hayashi, J.I. (2001) Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat. Genet.*, **28**, 272–275.
14. Takai, D., Isobe, K. and Hayashi, J. (1999) Transcomplementation between different types of respiration-deficient mitochondria with different pathogenic mutant mitochondrial DNAs. *J. Biol. Chem.*, **274**, 11199–11202.
15. Rana, M., de Coo, I., Diaz, F., Smeets, H. and Moraes, C.T. (2000) An out-of-frame cytochrome b gene deletion from a patient with parkinsonism is associated with impaired complex III assembly and an increase in free radical production. *Ann. Neurol.*, **48**, 774–781.
16. D'Aurelio, M., Pallotti, F., Barrientos, A., Gajewski, C.D., Kwong, J.Q., Bruno, C., Beal, M.F. and Manfredi, G. (2001) *In vivo* regulation of oxidative phosphorylation in cells harboring a stop-codon mutation in mitochondrial DNA-encoded cytochrome c oxidase subunit I. *J. Biol. Chem.*, **276**, 46925–46932.
17. D'Aurelio, M., Gajewski, C.D., Lin, M.T., Mauck, W.M., Shao, L.Z., Lenaz, G., Moraes, C.T. and Manfredi, G. (2004) Heterologous mitochondrial DNA recombination in human cells. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 3171–3179.
18. King, M.P. and Attardi, G. (1989) Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*, **246**, 500–503.
19. Mattiazzi, M., Vijayvergiya, C., Gajewski, C.D., DeVivo, D.C., Lenaz, G., Wiedmann, M. and Manfredi, G. (2004) The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 869–879.
20. Hao, H., Morrison, L.E. and Moraes, C.T. (1999) Suppression of a mitochondrial tRNA gene mutation phenotype associated with changes in the nuclear background. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 1117–1124.
21. Deng, J.H., Li, Y., Park, J.S., Wu, J., Hu, P., Lechleiter, J. and Bai, Y. (2006) Nuclear suppression of mitochondrial defects in cells without the ND6 subunit. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 1077–1086.
22. Ugalde, C., Janssen, R.J., van den Heuvel, L.P., Smeitink, J.A. and Nijtmans, L.G. (2004) Differences in assembly or stability of complex I and other mitochondrial OXPHOS complexes in inherited complex I deficiency. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 659–667.
23. Nakada, K., Inoue, K., Ono, T., Isobe, K., Ogura, A., Goto, Y.I., Nonaka, I. and Hayashi, J.I. (2001) Inter-mitochondrial complementation: mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat. Med.*, **7**, 934–940.
24. Enriquez, J.A., Cabezas-Herrera, J., Bayona-Bafaluy, M.P. and Attardi, G. (2000) Very rare complementation between mitochondria carrying different mitochondrial DNA mutations points to intrinsic genetic autonomy of the organelles in cultured human cells. *J. Biol. Chem.*, **275**, 11207–11215.
25. Legros, F., Lombes, A., Frachon, P. and Rojo, M. (2002) Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol. Biol. Cell.*, **13**, 4343–4354.
26. Buchet, K. and Godinot, C. (1998) Functional F1-ATPase essential in maintaining growth and membrane potential of human mitochondrial DNA-depleted rho degrees cells. *J. Biol. Chem.*, **273**, 22983–22989.
27. Stroh, A., Anderka, O., Pfeiffer, K., Yagi, T., Finel, M., Ludwig, B. and Schagger, H. (2004) Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 5000–5007.
28. Acin-Perez, R., Bayona-Bafaluy, M.P., Fernandez-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Perez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C.T. and Enriquez, J.A. (2004) Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol. Cell*, **13**, 805–815.
29. Blakely, E.L., Mitchell, A.L., Fisher, N., Meunier, B., Nijtmans, L.G., Schaefer, A.M., Jackson, M.J., Turnbull, D.M. and Taylor, R.W. (2005) A mitochondrial cytochrome b mutation causing severe respiratory chain enzyme deficiency in humans and yeast. *FEBS J.*, **272**, 3583–3592.
30. Diaz, F., Thomas, C.K., Garcia, S., Hernandez, D. and Moraes, C.T. (2005) Mice lacking COX10 in skeletal muscle recapitulate the phenotype of progressive mitochondrial myopathies associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 2737–2748.
31. Shoubridge, E.A. (2001) Cytochrome c oxidase deficiency. *Am. J. Med. Genet.*, **106**, 46–52.
32. Herrmann, J.M. and Funes, S. (2005) Biogenesis of cytochrome oxidase-sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane. *Gene*, **354**, 43–52.
33. Ohnishi, S.T., Ohnishi, T., Muranaka, S., Fujita, H., Kimura, H., Uemura, K., Yoshida, K. and Utsumi, K. (2005) A possible site of superoxide generation in the complex I segment of rat heart mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **37**, 1–15.
34. Trounce, I.A., Kim, Y.L., Jun, A.S. and Wallace, D.C. (1996) Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and trans-mitochondrial cell lines. *Meth. Enzymol.*, **264**, 484–509.
35. Fato, R., Cavazzoni, M., Castelluccio, C., Parenti Castelli, G., Palmer, G., Degli Esposti, M. and Lenaz, G. (1993) Steady-state kinetics of ubiquinol–cytochrome c reductase in bovine heart submitochondrial particles: diffusional effects. *Biochem. J.*, **290**, 225–236.
36. Nijtmans, L.G., Henderson, N.S. and Holt, I.J. (2002) Blue native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods*, **26**, 327–334.
37. Brookes, P.S., Pinner, A., Ramachandran, A., Coward, L., Barnes, S., Kim, H. and Darley-Usmar, V.M. (2002) High throughput two-dimensional blue-native electrophoresis: a tool for functional proteomics of mitochondria and signaling complexes. *Proteomics*, **2**, 969–977.

## INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is neuropathologically characterized by a loss of synapses, extracellular deposition of amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ), intracellular formation of neurofibrillary tangles and neuronal cell death. AD is thought to be a multifactorial disease probably caused by complicated interactions between genetic and environmental factors. The apolipoprotein E (*APOE*) gene located on chromosome 19q13.2 was the first identified genetic risk factor associated with late-onset AD (LOAD) (1,2). To date only the *APOE*- $\epsilon 4$  allele has been universally recognized as a major risk factor for LOAD and also as being associated with lowering of the age at onset (AAO) (3). However, about 50% of AD patients do not carry the *APOE*- $\epsilon 4$  allele, and only 20% of AD patients and <10% of the variance in AAO appear to be explained by the *APOE*- $\epsilon 4$  allele (4,5). The sibling recurrence risk ratio ( $\lambda_s$ ) (6) in AD was estimated to be 3.5–5 based on epidemiological data. Assuming that *APOE* was the only genetic risk factor, gene-specific  $\lambda_{gs}$  (*APOE*) was estimated to be 1.7–2.5. Because  $\lambda_s > \lambda_{gs}$  (*APOE*), there should be an additional genetic risk factor(s) for AD (7,8). The identification of an additional genetic risk factor(s) would greatly facilitate our understanding of the neuropathological findings, the clinical manifestations and the varying responses to drugs.

Genome-wide linkage studies on LOAD have provided informative data on putative susceptibility genes on several chromosomes (9–15). Chromosomes 1, 9, 10, 12, 21 and X have linkage peaks that have also been observed in *APOE*- $\epsilon 4$  negative sib pairs (9,10). There are several candidate genes that are near the chromosome 10 linkage peaks and that are thought to be implicated in LOAD, including the catenin (cadherin-associated protein) alpha 3 (*CTNNA3*) (16,17), the insulin-degrading enzyme (*IDE*) (11,18–21), the urokinase-plasminogen activator (*PLAU*) (22–24) and the glutathione S-transferase omega-1 and 2 (*GSTO1* and *GSTO2*) (25–27) genes. However, the association results regarding these candidate genes have not been consistently replicated.

To determine whether or not there are additional genes causing susceptibility to *APOE*- $\epsilon 4$  negative LOAD, we screened the region between 60 and 107 Mb on chromosome 10q with 1206 single nucleotide polymorphisms (SNPs). We found that the gene encoding dynamin-binding protein (DNMBP) (28) was significantly associated with LOAD lacking the *APOE*- $\epsilon 4$  allele. DNMBP was discovered as a novel scaffold protein that brings the dynamin and actin regulatory proteins together and is concentrated at synapses in the brain. To date expression of its gene in the brain has not been demonstrated. In this study quantitative real-time RT-PCR analysis clearly showed that neuropathologically confirmed LOAD brains contain significantly reduced levels of *DNMBP* mRNA compared with those in age-matched controls. On microarray analysis, the gene expression related to synaptic vesicle trafficking was found to be decrease in the frontal cortex of AD patients (29). In addition, A $\beta$  induces a decrease in the dynamin I level at synaptic sites in rat cultured hippocampal neurons (30). In view of the fact that synaptic dysfunction precedes A $\beta$  deposition in the brains of AD patients (31), our observations raise the possibility that DNMBP, as a risk factor, might play a predominant role in

the early stage of LOAD with *APOE*- $\epsilon 3^*3$  or lacking the *APOE*- $\epsilon 4$  allele.

## RESULTS

### Genetic screening

Although the *APOE*- $\epsilon 4$  allele is a strong genetic risk factor for LOAD, about half of the Japanese LOAD patients (46%) have the *APOE*- $\epsilon 3^*3$  genotype (Table 1). To identify an additional susceptibility gene(s) for LOAD with the *APOE*- $\epsilon 3$  allele, we performed SNP-based two-step screening. This two-step procedure was used to examine an exploratory sample set to find significant markers and to confirm their significance with a validation sample set. Both *APOE*- $\epsilon 4$  positive and negative subjects show linkage peaks for chromosomes 1, 9, 10, 12, 21 and X (9,10). In this study, we screened a wide region of chromosome 10q showing linkage peaks with a relatively high density of SNP markers. With this strategy, we selected 1322 SNPs (Supplementary Material, Tables S1 and S2) in the region from 60 to 107 Mb on chromosome 10q, of which 1206 were polymorphic, finding no significant deviation ( $P > 0.05$ ) from the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) in a Japanese population.

Using these 1206 SNPs, we first scanned an exploratory sample set. In the first-step screening, 131 of the 1206 SNPs showed allelic  $P$ -values of <0.05, and 35 of them showed more significant values (allelic  $P < 0.01$ ). To determine whether or not these markers exhibit associations, we genotyped these apparently significant SNPs in another sample set (validation samples), because a large number of SNPs probably exhibit false-positive associations. Replication in both exploratory and validation sample sets strongly suggests a true association of particular SNPs with LOAD. As a result, six of the above 35 SNPs (rs911541, rs3740066, rs11190302, rs11190305, C\_11214959\_10 and rs3740058) exhibited replicable associations (allelic  $P < 0.05$ ), which remained significant on Mantel–Haenszel meta-analysis of the two sample sets ( $P = 0.00003485$ – $0.0004757$ ) (Table 2). These  $P$ -values remained at significant levels even after Bonferroni's correction with 35 tests ( $P = 0.001220$ – $0.01665$ ).

The six significant SNPs were located in a region spanning ~220 kb between 101.4 and 101.6 Mb on chromosome 10q (Table 3 and Fig. 1). This associated region contains five genes: the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7 (*ENTPD7*), the cytochrome c oxidase subunit 15 (*COX15*), the cutC copper transporter homolog (*Escherichia coli*) (*CUTC*), the ATP-binding cassette sub-family C member 2 (*ABCC2*) and *DNMBP* genes. SNP rs911541, lying about 171 kb apart from rs3740066, is located in the third intron of *ENTPD7*, which consists of 13 exons. Five SNPs, i.e. rs3740066, rs11190302, rs11190305, C\_11214959\_10 and rs3740058, are clustered in an ~51.8 kb region including the 3' flanking regions of both *ABCC2* and *DNMBP* (Fig. 1). SNP rs3740066 is a synonymous SNP (ATC  $\rightarrow$  ATT, Ile1324Ile) as to exon 28 in *ABCC2* that comprises 32 exons. SNP rs11190302 is an intergenic SNP between *ABCC2* and *DNMBP*, lying about 7.0 kb from rs11190305 in *DNMBP*. The other three SNPs, i.e. rs11190305, C\_11214959\_10 and rs3740058, spanning about 16.1 kb have been mapped to

Table 1. Summary of overall subjects collected by JGSCAD

Overall subjects	LOAD		Control	
	Female	Male	Female	Male
Number of subjects	1103	423	998	668
AAO/AE (mean $\pm$ SD)	73.5 $\pm$ 6.6	73.3 $\pm$ 6.6	73.0 $\pm$ 7.9	73.1 $\pm$ 7.7
MMSE (mean $\pm$ SD)	15.7 $\pm$ 7.0	18.4 $\pm$ 6.6	28.0 $\pm$ 1.8	28.1 $\pm$ 1.8
<i>APOE</i>				
2*2	0	1	2	1
2*3	31	18	77	55
2*4	13	4	9	6
3*3	491	208	748	495
3*4	465	148	152	104
4*4	103	44	10	7
<i>APOE-<math>\epsilon</math>3*3</i> sample set				
Exploratory				
Number of subjects	249	114	223	114
AAO/AE (mean $\pm$ SD)	74.3 $\pm$ 6.2	74.6 $\pm$ 6.8	80.2 $\pm$ 4.1	80.6 $\pm$ 4.0
Validation				
Number of subjects	242	94	213	159
AAO/AE (mean $\pm$ SD)	75.0 $\pm$ 7.7	72.6 $\pm$ 7.6	75.5 $\pm$ 4.7	75.7 $\pm$ 4.5

AAE, age at examination of control subjects. The *APOE- $\epsilon$ 3\*3* sample sets (exploratory and validation) used in the first- and second-step screenings are also summarized.

*DNMBP*, which consists of 17 exons. SNP rs11190305 is a non-synonymous SNP (TGT  $\rightarrow$  TGG, Cys1413Trp) as to exon 16. Both C\_11214959\_10 and rs3740058 are intronic SNPs, the former being in intron 11 and the latter in intron 10.

#### Stratified analysis with entire samples

As the next step, the significantly replicated markers were tested by stratified analysis using entire samples with all *APOE*-genotypes, i.e. in 1526 LOAD samples and 1666 control samples (Table 4). It became clear that the six SNPs were strongly associated with *APOE- $\epsilon$ 4* negative LOAD (sample set Negative- $\epsilon$ 4: range of allelic  $P = 0.00005699 - 0.001164$ ), whereas none of the six SNPs showed any significant association with *APOE- $\epsilon$ 4* positive LOAD at all (sample set Positive- $\epsilon$ 4: range of allelic  $P = 0.7271 - 0.988$ ). We cannot exclude the possibility that the lack of significance may be due to the small sample size, because the *APOE- $\epsilon$ 4* allele is fairly rare in controls (frequency 0.0915) in comparison with in LOAD (frequency 0.3027).

#### Linkage disequilibrium and case-control haplotype analyses

To further characterize these significantly associated SNPs detected on the two-step screening, linkage disequilibrium (LD) and case-control haplotype analyses were performed (Tables 5 and 6). Pair-wise LD measures,  $|D'|$ , are given in Table 5 for LOAD and control subjects with the *APOE- $\epsilon$ 3\*3* genotype. We found a strong correlation between the six SNPs and confirmed that the LD block was highly structured in the associated locus identified here. There was no difference in the LD structure between LOAD and control subjects.

In this LD block, five common haplotypes were inferred with the expectation-maximization (EM) algorithm in four sample sets examined: [H1]A-C-C-T-G-G, [H2]G-T-T-G-C-A, [G3]G-T-T-G-C-G, [H4]A-T-T-G-C-A and

[H5]A-C-T-G-C-A (Table 6). Haplotype H1, composed of all major alleles of the six SNPs, exhibited the highest frequency (range 0.7118–0.7681) and haplotype H5 the lowest (range 0.0087–0.0188). Haplotype H2 consisted of all minor alleles. For case-control haplotype analysis, the haplotype frequencies in LOAD subjects were compared with those in controls. In the Positive- $\epsilon$ 4 sample set, no haplotypes exhibited a significant difference. Global tests also did not give statistically significant results ( $P = 0.7872$ , permutation  $P = 0.8388$ ). However, regarding All, Negative- $\epsilon$ 4 and  $\epsilon$ 3\*3, two haplotypes, H1 and H2, showed significant association. The most significant difference between these two haplotypes was observed for the sample set composed of only *APOE- $\epsilon$ 3\*3* subjects: H1,  $P = 0.0001958$  and permutation  $P = 0.0001$ ; H2,  $P = 0.00006021$  and permutation  $P < 0.0001$ . The frequency of the most common haplotype, H1, was significantly decreased in LOAD, whereas that of the H2 haplotype comprising all minor alleles was significantly increased in LOAD. In contrast, the other three haplotypes, H3, H4 and H5, exhibited no association in any sample set. These findings do not appear to be more significant than the results for the individual SNP, which may be due to the fact that the six SNPs are in one strong LD block and have very similar minor allele frequencies.

#### Expression of *DNMBP* in the human brain

As *DNMBP* was found to be genetically associated with LOAD, we measured the expression levels of *DNMBP* in autopsy-confirmed LOAD brains using quantitative real-time RT-PCR (Fig. 2). A summary of the brains examined is given in Supplementary Material, Table S3. The mean age at death for LOAD was  $76.1 \pm 5.5$  years, which was not significantly higher ( $P = 0.0725$ ) than that for controls ( $72.7 \pm 6.1$  years). To select an appropriate internal standard for the normalization of *DNMBP* mRNA levels, we evaluated, using the TaqMan<sup>®</sup> Human Endogenous Control Plate

**Table 2.** Statistics for six replicated SNPs found on the two-step screening involving *APOE-ε3\**<sup>3</sup>

dbSNP/Celera	Exploratory				Validation				Exploratory + validation <sup>a</sup>					
	Genotype	Number of subjects (frequency)		Allele (frequency)	OR (95% CIs)	P-value	OR (95% CIs)	Genotype	Number of subjects (frequency)		Allele (frequency)	OR (95% CIs)	P-value	OR (95% CIs)
		LOAD	Control						LOAD	Control				
rs911541	GG	19 (0.0534)	14 (0.0420)	G	1.43 (1.09–1.87)	0.009394	1.43 (1.09–1.87)	GG	19 (0.0578)	12 (0.0324)	G	1.42 (1.09–1.85)	0.002612	1.42 (1.18–1.72)
	GA	119 (0.3343)	82 (0.2462)	A	555 (0.7795)	556 (0.8348)	GA	108 (0.3283)	100 (0.2703)	A	512 (0.7781)	616 (0.8324)		
	AA	218 (0.6124)	237 (0.7117)	Sum	712	666	AA	202 (0.6140)	258 (0.6973)	Sum	658	740		
	Sum	356	333				Sum	329	370					
rs3740066	TT	27 (0.0752)	16 (0.0482)	T	1.44 (1.11–1.86)	0.005546	1.44 (1.11–1.86)	TT	27 (0.0833)	14 (0.0380)	T	1.49 (1.16–1.92)	0.002054	1.46 (1.22–1.75)
	TC	128 (0.3565)	95 (0.2861)	C	536 (0.7465)	537 (0.8087)	TC	115 (0.3549)	113 (0.3071)	C	479 (0.7392)	595 (0.8084)		
	CC	204 (0.5682)	221 (0.6657)	Sum	718	664	CC	182 (0.5617)	241 (0.6549)	Sum	648	736		
	Sum	359	332				Sum	324	368					
rs11190302	TT	29 (0.08010)	15 (0.0457)	T	1.44 (1.12–1.85)	0.004923	1.44 (1.12–1.85)	TT	27 (0.0811)	14 (0.0381)	T	132 (1.03–1.70)	0.0003953	1.38 (1.15–1.65)
	TC	131 (0.3659)	101 (0.3079)	C	527 (0.7360)	525 (0.8003)	TC	116 (0.3483)	123 (0.3351)	C	496 (0.7447)	583 (0.7943)		
	CC	198 (0.5531)	212 (0.6463)	Sum	716	656	CC	190 (0.5706)	230 (0.6267)	Sum	666	734		
	Sum	358	328				Sum	333	367					
rs11190305	GG	27 (0.0763)	14 (0.0420)	G	1.39 (1.08–1.80)	0.009946	1.39 (1.08–1.80)	GG	27 (0.0821)	14 (0.0385)	G	1.35 (1.05–1.74)	0.0004675	1.37 (1.15–1.64)
	GT	130 (0.3672)	106 (0.3183)	T	524 (0.7401)	532 (0.7988)	GT	117 (0.3356)	122 (0.3352)	T	487 (0.7401)	578 (0.7940)		
	TT	197 (0.5565)	213 (0.6396)	Sum	708	666	TT	185 (0.5623)	228 (0.6264)	Sum	658	728		
	Sum	354	333				Sum	329	364					
C_11214959_10	CC	29 (0.0817)	15 (0.0450)	C	1.42 (1.10–1.82)	0.006617	1.42 (1.10–1.82)	CC	27 (0.0813)	14 (0.0379)	C	1.33 (1.03–1.70)	0.0004757	1.37 (1.15–1.63)
	CG	130 (0.3662)	105 (0.3153)	G	522 (0.7352)	531 (0.7973)	CG	118 (0.3554)	126 (0.3415)	G	492 (0.7410)	584 (0.7913)		
	GG	196 (0.5521)	213 (0.6396)	Sum	710	666	GG	187 (0.5633)	229 (0.6206)	Sum	664	738		
	Sum	355	333				Sum	332	369					
rs3740058	AA	24 (0.0680)	13 (0.0388)	A	1.59 (1.22–2.06)	0.0005534	1.59 (1.22–2.06)	AA	17 (0.0520)	8 (0.0220)	A	1.35 (1.03–1.78)	0.00006305	1.47 (1.22–1.78)
	AG	128 (0.3626)	90 (0.2687)	G	530 (0.7507)	554 (0.8269)	AG	101 (0.3089)	101 (0.2782)	G	519 (0.7936)	609 (0.8388)		
	GG	201 (0.5694)	232 (0.6925)	Sum	706	670	GG	209 (0.6391)	254 (0.6997)	Sum	654	726		
	Sum	353	335				Sum	327	363					

<sup>a</sup>Allelic P-values are indicated. OR, odds ratio; CIs, confidence intervals. <sup>a</sup>Computed by the method of Mantel and Haenszel.



**Table 3.** Summary of associated SNPs

dbSNP/Celera	Genomic position (bp) <sup>a</sup>	Gene (portion)	Function	Alleles <sup>b</sup>	Frequency <sup>c</sup>	HWE <sup>d</sup>
rs911541	101,423,382	<i>ENTPD7</i> (intron 3)	—	A/G	0.807/0.193	0.0760
rs3740066	101,594,197	<i>ABCC2</i> (exon 28)	Synonymous (Ile1324Ile)	C/T	0.776/0.224	0.2882
rs11190302	101,622,905	— (intergene)	—	C/T	0.767/0.231	0.9244
rs11190305	101,629,867	<i>DNMBP</i> (exon 16)	Non-synonymous (Cys1413Trp)	T/G	0.769/0.232	0.8284
C_11214959_10 <sup>e</sup>	101,642,926	<i>DNMBP</i> (intron 11)	—	G/C	0.766/0.234	0.8625
rs3740058	101,645,972	<i>DNMBP</i> (intron 10)	—	G/A	0.803/0.197	0.6722

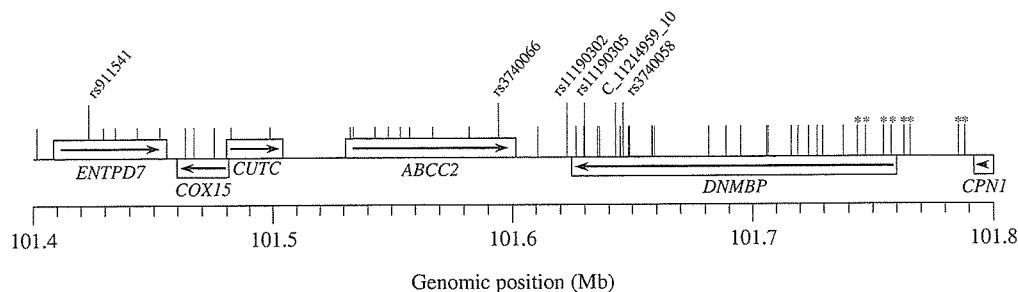
<sup>a</sup>On the basis of dbSNP build 125 on NCBI build 35.

<sup>b</sup>Nucleotides of the major allele/minor allele.

<sup>c</sup>The major allele/minor allele frequency, calculated using genotype data obtained for the 699 LOAD patients and 709 controls with *APOE-ε3\*3* in the exploratory and validation sample sets.

<sup>d</sup>*P*-values were calculated in the HWE test using 709 control subjects with *APOE-ε3\*3* in the exploratory and validation sample sets (Table 1).

<sup>e</sup>Assay ID in Celera (CA, USA).



**Figure 1.** Genomic position of an associated locus. Vertical lines indicate the SNPs used in this study: six significantly associated SNPs, rs911541, rs3740066, rs11190302, rs11190305, C\_11214959\_10 and rs3740058, are indicated by the long-labeled vertical lines. These SNPs are located in a genomic region in which five genes, *ENTPD7*, *COX15*, *CUTC*, *ABCC2* and *DNMBP*, are clustered, spanning ~350 kb. The asterisked vertical lines in the 5' region of *DNMBP* show the SNPs additionally designed and analyzed after real-time RT-PCR experiments. Horizontal arrows within open boxes indicate the transcription orientations of individual genes. The mapping position of each SNP is according to dbSNP build 125 on NCBI build 35. *CPN1*, gene encoding carboxypeptidase-N-polypeptide 1, 50 kDa.

described under Materials and Methods, the expression levels of endogenous housekeeping genes in eight brains consisting of four LOAD ones and four control ones. The transcripts of  $\beta$ -glucuronidase (*GUSB*) and 18S rRNA genes were found to exhibit little variation within the eight brains (data not shown).

After this preliminary experiment, we increased the samples to 41 and assessed the correlation between the expression of *DNMBP*, *GUSB* and 18S rRNA and age and gender. Neither age- nor gender-dependent significant differences between LOAD patients and controls were observed in the levels of transcripts of *DNMBP*, *GUSB* and 18S rRNA (data not shown). Normalization relative to the quantity of total RNA revealed statistically significant differences between LOAD patients and controls (Fig. 2A,  $P = 0.0003$ ). As can be seen in Figure 2B and C, there was a significant reduction in the *DNMBP* mRNA levels in AD brains compared with that in age-matched controls following normalization as to either *GUSB* ( $P = 0.0002$ ) or 18S rRNA ( $P = 0.0169$ ).

To address whether or not the expression differences between LOAD and control brains are due to genetic variability in *DNMBP*, we first genotyped three associated SNPs (rs11190305, C\_11214959\_10 and rs3740058) using 41 brain tissue specimens. There were no minor-allele homozygotes in the control brains (Supplementary Material, Table S4), therefore we compared the expression levels of

*DNMBP* in total samples with a dominant model (minor-allele homozygotes + heterozygotes versus major-allele homozygotes) (Fig. 2D–F). Two-way ANOVA with the genotype and case–controls as independent variables showed the significant effects of the diagnosis and genotypes examined in this study: rs11190305,  $P = 0.0190$ ; C\_11214959\_10,  $P = 0.0234$  and rs3740058,  $P = 0.0205$ . However, no significant interactions of *DNMBP* expression, SNPs and diagnosis were observed (Fig. 2D–F).

To determine whether or not the reduced expression of *DNMBP* mRNA was caused by genetic variation including the 5' upstream region of *DNMBP*, we genotyped the exploratory sample set with eight additional SNPs (indicated by asterisked vertical lines in Figure 1). We did not detect any association of these eight SNPs with LOAD (range of allelic  $P$ , 0.00526–0.875).

## DISCUSSION

This paper describes an attempt to identify an additional susceptibility gene(s) for LOAD with a high density of SNPs in two independent *APOE-ε3\*3* sample sets and to verify the finding, if any, in the entire samples. Like many complex diseases, LOAD is caused by interactions between environmental and genetic factors. As genetic risk factors for complex diseases are thought to be of lower penetrance

**Table 4.** Allelic association of six SNPs in sample sets stratified as to the *APOE* genotype

dbSNP/Celera	Negative-ε4 <sup>a</sup>						Positive-ε4 <sup>b</sup>						AllF														
	Genotype		Number of subjects (frequency)		Allele		Number of alleles (frequency)		P-value		OR (95% CIs)		Genotype		Number of subjects (frequency)		Allele		Number of alleles (frequency)		P-value		OR (95% CIs)				
	LOAD	Control	LOAD	Control	LOAD	Control	LOAD	Control	LOAD	Control	LOAD	Control	LOAD	Control	LOAD	Control	LOAD	Control	LOAD	Control	LOAD	Control	LOAD	Control			
rs911541	GG	42	43	329	492	G	23	14	0.0009932	1.30	(1.11-1.52)	GG	23	14	G	289	110	0.8625	0.98	(0.77-1.25)	GG	65	57	G	618	602	
		(0.0566)	(0.0314)	(0.2217)	(0.1797)		(0.0299)	(0.0486)		(0.1877)	(0.1978)		(0.0430)	(0.0344)		(0.0244)	(0.1817)		(0.0430)	(0.0344)		(0.0430)	(0.0344)		(0.0244)	(0.1817)	
	GA	245	406	1155	2246	A	243	82				GA	243	82	A	1251	446				GA	488	488	A	2406	2712	
		(0.3302)	(0.2966)	(0.7783)	(0.8203)		(0.3156)	(0.2847)		(0.8123)	(0.8022)		(0.3228)	(0.2945)		(0.7956)	(0.8183)		(0.3228)	(0.2945)		(0.3228)	(0.2945)		(0.7956)	(0.8183)	
	AA	455	920	1484	2738	Sum	504	192				AA	504	192	Sum	1540	556				AA	959	1112	Sum	3024	3314	
	(0.6132)	(0.6720)				(0.6545)	(0.6667)				Sum	770	288						(0.6543)	(0.6711)		Sum	1512	1657			
rs3740066	TT	57	54	378	559	T	31	15	0.0001551	1.33	(1.15-1.55)	TT	31	15	T	333	128	0.7271	0.96	(0.76-1.21)	TT	88	69	T	711	687	
		(0.0771)	(0.0396)	(0.2558)	(0.2049)		(0.0402)	(0.0523)		(0.2160)	(0.2230)		(0.0583)	(0.0418)		(0.22354)	(0.2081)		(0.0583)	(0.0418)		(0.0583)	(0.0418)		(0.22354)	(0.2081)	
	TC	264	451	1100	2169	C	271	98				TC	271	98	C	1209	446				TC	535	549	C	2309	2615	
		(0.3572)	(0.3306)	(0.7442)	(0.7951)		(0.3315)	(0.3415)		(0.7840)	(0.7770)		(0.33543)	(0.3325)		(0.7646)	(0.7919)		(0.33543)	(0.3325)		(0.33543)	(0.3325)		(0.7646)	(0.7919)	
	CC	418	859	1478	2728	Sum	469	174				CC	469	174	Sum	1542	547				CC	887	1033	Sum	3020	3302	
	(0.5656)	(0.6298)				(0.6083)	(0.6063)				Sum	771	287						(0.5874)	(0.6257)		Sum	1510	1651			
rs1190302	TT	61	57	395	598	T	36	14	0.0003934	1.30	(1.13-1.51)	TT	36	14	T	349	129	0.988	1.00	(0.80-1.26)	TT	97	71	T	744	727	
		(0.0822)	(0.0415)	(0.2662)	(0.2178)		(0.0468)	(0.0491)		(0.2266)	(0.2263)		(0.0642)	(0.0428)		(0.2460)	(0.2192)		(0.0642)	(0.0428)		(0.0642)	(0.0428)		(0.2460)	(0.2192)	
	TC	273	484	1089	2148	C	277	101				TC	277	101	C	1191	441				TC	550	585	C	2280	2589	
		(0.3679)	(0.3525)	(0.7338)	(0.7822)		(0.3597)	(0.3544)		(0.7734)	(0.7737)		(0.3638)	(0.3528)		(0.7540)	(0.7808)		(0.3638)	(0.3528)		(0.3638)	(0.3528)		(0.7540)	(0.7808)	
	CC	408	832	1484	2746	Sum	457	170				CC	457	170	Sum	1540	570				CC	865	1002	Sum	3024	3316	
	(0.5499)	(0.6060)				(0.5935)	(0.5965)				Sum	770	285						(0.5721)	(0.6043)		Sum	1512	1658			
rs119305	GG	59	55	385	590	G	34	14	0.001164	1.28	(1.10-1.48)	GG	34	14	G	343	128	0.9076	0.99	(0.78-1.24)	GG	93	69	G	728	718	
		(0.0806)	(0.0407)	(0.2630)	(0.2184)		(0.0447)	(0.0498)		(0.2254)	(0.2278)		(0.0623)	(0.0423)		(0.2438)	(0.2200)		(0.0623)	(0.0423)		(0.0623)	(0.0423)		(0.2438)	(0.2200)	
	GT	267	480	1079	2112	T	275	100				GT	275	100	T	1179	434				GT	542	580	T	2258	2546	
		(0.3648)	(0.3553)	(0.7370)	(0.7816)		(0.3614)	(0.3559)		(0.7746)	(0.7722)		(0.3630)	(0.3554)		(0.7562)	(0.7800)		(0.3630)	(0.3554)		(0.3630)	(0.3554)		(0.7562)	(0.7800)	
	TT	406	816	1464	2702	Sum	452	167				TT	452	167	Sum	1522	562				TT	858	983	Sum	2986	3264	
	(0.5546)	(0.6040)				(0.5940)	(0.5943)				Sum	761	281						(0.5747)	(0.6023)		Sum	1493	1652			
C_11214959_10	CC	60	56	390	597	C	35	14	0.001039	1.28	(1.10-1.48)	CC	35	14	C	351	127	0.8253	1.03	(0.82-1.29)	CC	95	70	C	741	724	
		(0.0810)	(0.0410)	(0.2632)	(0.2184)		(0.0453)	(0.0491)		(0.2273)	(0.2228)		(0.0628)	(0.0424)		(0.2449)	(0.2191)		(0.0628)	(0.0424)		(0.0628)	(0.0424)		(0.2449)	(0.2191)	
	CG	270	485	1092	2137	G	281	99				CG	281	99	G	1193	443				CG	551	584	G	2285	2580	
		(0.3644)	(0.3548)	(0.7368)	(0.7816)		(0.3640)	(0.3474)		(0.7727)	(0.7772)		(0.3642)	(0.3535)		(0.7551)	(0.7809)		(0.3642)	(0.3535)		(0.3642)	(0.3535)		(0.7551)	(0.7809)	
	GG	411	826	1482	2734	Sum	456	172				GG	456	172	Sum	1544	570				GG	867	998	Sum	3026	3304	
	(0.5547)	(0.6042)				(0.5907)	(0.6035)				Sum	772	285						(0.5730)	(0.6041)		Sum	1513	1652			
rs3740058	AA	46	45	337	482	A	30	9	0.00005699	1.38	(1.18-1.61)	AA	30	9	A	301	113	0.7695	0.96	(0.76-1.23)	AA	76	54	A	638	595	
		(0.0631)	(0.0334)	(0.2311)	(0.1790)		(0.0398)	(0.0327)		(0.1996)	(0.2055)		(0.0512)	(0.0333)		(0.2151)	(0.1835)		(0.0512)	(0.0333)		(0.0512)	(0.0333)		(0.2151)	(0.1835)	
	AG	245	392	1121	2210	G	241	95				AG	241	95	G	1207	437				AG	486	487	G	2328	2647	
		(0.3361)	(0.2912)	(0.7689)	(0.8210)		(0.3196)	(0.3455)		(0.8004)	(0.7945)		(0.3277)	(0.3004)		(0.7849)	(0.8165)		(0.3277)	(0.3004)		(0.3277)	(0.3004)		(0.7849)	(0.8165)	
	GG	438	909	1458	2692	Sum	483	171				GG	483	171	Sum	1508	550				GG	921	1080	Sum	2966	3242	
	(0.6008)	(0.6753)				(0.6406)	(0.6218)				Sum	754	275						(0.6210)	(0.6663)		Sum	1483	1621			

Allelic P-values are indicated.

<sup>a</sup>Non-carriers of the *APOE-ε4* allele (2\*2, 2\*3 and 3\*3) comprising 749 LOAD patients and 1378 controls.

<sup>b</sup>Carriers of the *APOE-ε4* allele (2\*4, 3\*4 and 4\*4) comprising 777 LOAD patients and 288 controls.

<sup>c</sup>All *APOE* genotypes (*APOE-ε2*\*2, 2\*3, 2\*4, 3\*3, 3\*4 and 4\*4) comprising 1526 LOAD patients and 1666 controls.

**Table 5.** LD measures,  $|D'|$ , for six SNPs associated with LOAD

dbSNP/Celera	rs911541	rs3740066	rs11190302	4s11190305	C_11214959	rs3740058
rs911541	*	0.9535	0.8958	0.8986	0.8955	0.6865
rs3740066	0.9509	*	0.9403	0.9434	0.9402	0.8609
rs11190302	0.9094	0.9562	*	1.0000	1.0000	0.9537
rs11190305	0.9025	0.9466	0.9954	*	1.0000	0.9533
C_11214959_10	0.9089	0.9565	0.9955	1.0000	*	0.9541
rs3740058	0.5749	0.7795	0.9297	0.9369	0.9376	*

For LD computation, 699 LOAD patients and 709 controls (Table 3) were used. The upper-right half shows LOAD patients and the lower-left half controls.

**Table 6.** Case-control haplotype analysis

Sample set	Number of subjects		Haplotype <sup>a</sup>	Frequency		Number of estimated alleles		P-value	Permutation P-value (10,000)	OR (95% CIs)
	LOAD	Control		LOAD	Control	LOAD	Control			
All	1526	1666	[H1] A-C-C-T-G-G	0.7367	0.7629	2248	2542	<b>0.0152</b>	<b>0.0204</b>	0.87 (0.78–0.97)
			[H2] G-T-T-G-C-A	0.1562	0.1282	477	427	<b>0.001276</b>	<b>0.0017</b>	1.26 (1.09–1.45)
			[H3] G-T-T-G-C-G	0.0364	0.0430	111	143	0.1812	0.2026	0.84 (0.65–1.08)
			[H4] A-T-T-G-C-A	0.0346	0.0294	106	98	0.2274	0.2458	1.19 (0.90–1.57)
			[H5] A-C-T-G-C-A	0.0168	0.0158	51	53	0.7999	0.8435	1.05 (0.71–1.55)
			Others <sup>c</sup>	0.0194	0.0206	59	69	—	—	—
			Sum	1.000	1.000	3052	3332	—	—	—
			Global	—	—	—	—	0.0695	<b>0.0401</b>	—
Negative-ε4	749	1378	[H1] A-C-C-T-G-G	0.7118	0.7635	1067	2105	<b>0.0002293</b>	<b>0.0001</b>	0.77 (0.66–0.88)
			[H2] G-T-T-G-C-A	0.1644	0.1236	246	341	<b>0.0002549</b>	<b>0.0003</b>	1.39 (1.17–1.66)
			[H3] G-T-T-G-C-G	0.0413	0.0453	62	125	0.5466	0.5826	0.91 (0.67–1.24)
			[H4] A-T-T-G-C-A	0.0382	0.0287	57	79	0.0965	0.1011	1.34 (0.95–1.90)
			[H5] A-C-T-G-C-A	0.0188	0.0172	28	47	0.6982	0.7167	1.10 (0.68–1.76)
			Others <sup>c</sup>	0.0255	0.0216	38	59	—	—	—
			Sum	1.000	1.000	1498	2756	—	—	—
			Global	—	—	—	—	<b>0.0289</b>	<b>0.01</b>	—
ε3*3 <sup>b</sup>	699	1243	[H1] A-C-C-T-G-G	0.7141	0.7681	998	1909	<b>0.0001958</b>	<b>0.0001</b>	0.75 (0.65–0.88)
			[H2] G-T-T-G-C-A	0.1645	0.1185	230	295	<b>0.0006021</b>	<b>&lt;0.0001</b>	1.46 (1.21–1.76)
			[H3] G-T-T-G-C-G	0.0409	0.0457	57	114	0.4585	0.5023	0.88 (0.64–1.22)
			[H4] A-T-T-G-C-A	0.0384	0.0286	54	71	0.088	0.0859	1.37 (0.95–1.96)
			[H5] A-C-T-G-C-A	0.0165	0.0171	23	43	0.845	0.9026	0.95 (0.57–1.58)
			Others <sup>c</sup>	0.0255	0.0218	36	54	—	—	—
			Sum	1.000	1.000	1398	2486	—	—	—
			Global	—	—	—	—	<b>0.008367</b>	<b>0.0026</b>	—
Positive-ε4	777	288	[H1] A-C-C-T-G-G	0.7608	0.7599	1184	438	0.9429	0.9576	1.01 (0.81–1.26)
			[H2] G-T-T-G-C-A	0.1482	0.1505	230	87	0.8612	0.8891	0.98 (0.75–1.28)
			[H3] G-T-T-G-C-G	0.0316	0.0317	49	18	0.9736	1.0000	1.01 (0.58–1.75)
			[H4] A-T-T-G-C-A	0.0311	0.0331	48	19	0.8054	0.7871	0.93 (0.54–1.60)
			[H5] A-C-T-G-C-A	0.0149	0.0087	23	5	0.2707	0.3934	1.72 (0.65–4.53)
			Others <sup>c</sup>	0.0134	0.0161	20	9	—	—	—
			Sum	1.000	1.000	1554	576	—	—	—
			Global	—	—	—	—	0.7872	0.8388	—

See Table 4 for the information on each sample set, All, Positive-ε4 and Negative-ε4. Statistically significant haplotypes and P-values and permutation P-values are highlighted in bold.

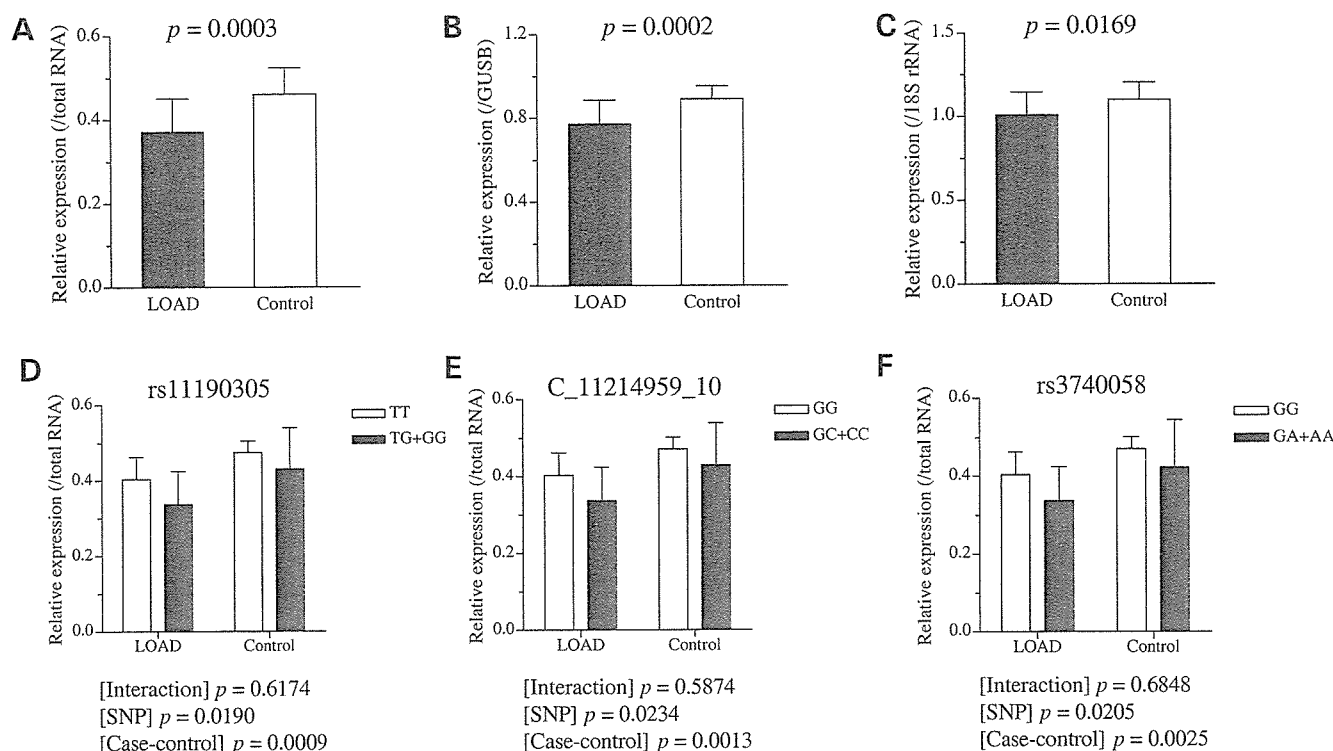
<sup>a</sup>The SNP order, from left to right, is as follows: rs911541, rs3740066, rs11190302, rs11190305, C\_11214959\_10 and rs3740058.

<sup>b</sup>A sample set stratified as to the *APOE*-ε3\*3 genotype, including 699 LOAD patients and 1243 controls.

<sup>c</sup>Haplotypes with frequencies of <0.01 in both LOAD and control subjects.

and heterogeneous, the replication of genetic risk factors in well-characterized case-control samples is critical for validating the markers associated with a complex disease. A strong association between the *APOE*-ε4 allele and LOAD has been repeatedly reported by a number of groups. However, as about 50% of AD patients do not carry the *APOE*-ε4

allele, the remaining AD cases must be attributed to other risk factors or environmental factors. Thus, to identify a genetic risk factor(s) other than the *APOE*-ε4 allele, we prepared two independent sample sets, exploratory and validation ones, from only *APOE*-ε3\*3 subjects. Our strategy was to scan a broad region on chromosome 10q with a high density of



**Figure 2.** Expression levels of *DNMBP* in post mortem brain tissues. Real-time RT-PCR assaying was carried out to determine the steady-state mRNA level of *DNMBP* by using the standard curve method recommended by the manufacturer. *DNMBP* expression was normalized as to the concentration of total RNA (A) used for first-strand cDNA synthesis and the amounts of *GUSB* (B) and 18S rRNA (C) expression. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values were computed with the two-sided Student's *t*-test. Relative expression of *DNMBP* in LOAD patients and controls was examined with a dominant model (D-F) by means of two-way ANOVA.

SNPs in the exploratory samples and to follow-up the significant initial markers in the other set (validation samples) and then to examine the significant replicated markers in the entire samples consisting of all *APOE* genotypes. This is similar to the strategy that was adopted for genome-wide (32) or chromosome-wide scanning (33,34). Using this strategy, Grupe *et al.* (34) performed a chromosome 10-specific association study involving 1412 gene-based SNPs. They found one marker, rs498055 (97,344,904 bp), located in a gene homologous to *RPS3A* (*LOC439999*) significantly associated with LOAD.

In a case-control association study involving 1206 SNPs on chromosome 10q, we found a novel locus in which six SNPs, rs911541, rs3740066, rs11190302, rs11190305, C\_11214959\_10 and rs3740058, were significantly associated with *APOE-ε3*\*3-LOAD (Table 2) but not with *APOE-ε4*-LOAD (Table 4). No significant interaction was observed between the *APOE-ε4* allele and the SNPs identified here by logistic regression analysis (data not shown). However, as *APOE-ε4* allele positive samples are fairly rare among controls, we cannot exclude the possibility that the lack of significance in the *APOE-ε4* positive group is due to the small sample size. Further analyses are necessary to determine the interaction of the six SNPs and *APOE* genotypes in a sufficient number of controls.

The six SNPs are located in a locus between 101.4 and 101.7 Mb, which is far from D10S1225 (64.4 Mb) in the strong linkage region described by several groups. Two peaks were found for chromosome 10q when a sample was

stratified as to *APOE* genotype on genome-wide linkage analysis (9,10). There was a major peak around 80 cM and another small peak was observed at marker D10S1265 (102.6 Mb) near the six SNPs. The linkage was found in different conditions: in familial AD (9-11,13,15), with plasma A $\beta$  levels as an intermediate quantitative trait (12) and with AAO in AD (14). In this broad region, candidate genes were presumed to be as follows: *CTNNA3* (16,17), *PLAU* (22-24), *IDE* (18-21), *GTSO1* and *GTSO2* (25-27). *CTNNA3* was identified in high plasma A $\beta$ 42 pedigrees, and both *IDE* and *PLAU* are suggested to be involved in the degradation of A $\beta$ . We also measured the plasma A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 levels in the samples to determine whether or not the SNP genotype influences the plasma A $\beta$  level. We did not observe any relationship between the six SNPs identified in this study and the plasma A $\beta$  level (data not shown). Li *et al.* (14) analyzed transcripts in the hippocampus and reported decreased expression of *GSTO1* and *GSTO2* in the region between D10S1239 (98.9 Mb) and D10S1237 (116.1 Mb). We genotyped 167 SNPs in *CTNNA3* (67.35-69.10 Mb), five SNPs in *PLAU* (75.33-75.35 Mb), 19 SNPs in *IDE* (94.20-94.33 Mb), two SNPs in *GTSO1* (106.00-106.02 Mb) and five SNPs in *GTSO2* (106.01-106.05 Mb) (Supplementary Material, Table S1) in the exploratory samples, but found no association with LOAD. Recently, Grupe *et al.* (34) reported that SNP rs498055 (97,344,904 bp), a locus for the *RPS3A* homolog, is associated with LOAD as described above. The SNPs neighboring the *RPS3A* homolog locus, rs526928