

しかもこれが実験によるアーティファクトではないことが確認されている¹²⁾。当然ながら、このようなApoE分子間の相互作用は、ApoE機能を左右する。システイン112はN末端側ドメインに存在するが、二量体を形成したApoEは、N末端のみならずC末端側ドメイン機能、例えば受容体結合効率や脂質との結合効率などに影響を及ぼすと考えられる。二量体を形成したApoE3は、単体に比べてHDLへの結合親和性が有意に増加する¹²⁾。最近のわれわれの研究でも、ApoE3における二量体形成が、ApoE3とApoE4におけるHDL産生能のアイソフォーム特異性発現に関与することを確認している。

2 脳内における ApoE 産生とその制御

従来から、ApoEはアストロサイトやオリゴデンドロサイト、あるいは上皮細胞によって産生され、神経細胞では産生されないと考えられてきた。しかし近年の研究から、アストロサイトに比べれば濃度が低いものの、脳内の神経細胞においてApoEが発現することがタンパク質レベルおよびmRNAレベルで確認され、しかも低濃度で作用をもつことが報告された¹³⁾。われわれの検討では少なくとも神経細胞の純粋培養系においては、培地中のApoEの分泌濃度はウエスタンブロット解析の検出限度以下であることから、例えば0.2 μM以上の濃度が必要なコレステロール搬出（HDL産生）作用などは引き起こさないと考えられる。したがって、神経細胞でのApoE産生の意義は、（もしあるとすれば）低濃度でも効率的に働く別の機序にかかわっていると考えるのが妥当であろう。

では神経細胞内で産生されるApoEはどのような作用をもつのであろうか。こうした神経細胞で産生されるApoEは、神経細胞特異的に発現しているキモトリプシン様のプロテアーゼでアミノ酸残基272番目と283番目で切断され、そのN末端側断片に活性があるとされる¹⁴⁾。この断片はアルツハイマー病脳で高濃度に検出されるとされ、かつApoE4の方がより切断を受けやすいとされる¹⁵⁾。その細胞障害機序の詳細は不明であるが、結果として細胞内ミトコンドリア障害を引き起こすと考えられている。神経細胞内ApoE産生は、さまざまな病理学的状況—例えば毒性をもつAβへの暴露、脳外傷、酸化ストレス暴露など—で促進されることから、病的な脳内変化を受けてApoE産生が増加

し、ApoE4はより多くが断片化されて細胞死への過程を促進している可能性も考えられる。

3 ApoE 遺伝子多型とアルツハイマー病

ApoEは299のアミノ酸からなる34kDのタンパク質であり、ApoE2、ApoE3、ApoE4の主要な3つのアイソフォームが存在する。ApoE2、ApoE3、ApoE4のアイソフォームの違いは、112番目と158番目のアミノ酸が1つずつ異なることによって生じる。ApoE3は112番目がシステインで158番目がアルギニンであるが、ApoE2は両方ともシステインであり、ApoE4は両方ともアルギニンである。これらApoEタンパク質は、それぞれ3つの対立遺伝子ε2、ε3、ε4の遺伝子産物である。これらの遺伝子多型のなかでApoEε3/ε3型が最も多く、およそ全体の50～70%を占め、ε3遺伝子をもつ割合は全体の70～80%に達することが示されている。これに対して、ε2およびε4の遺伝子頻度は、10～15%および5～10%であることが示されている。

'93年以前にApoEが細胞外に沈着する老人斑あるいは細胞内に形成される神経原線維変化と共局在していることが報告されており、ApoEとアルツハイマー病病理との関連が示されていた。しかしApoEとアルツハイマー病発症との関連を明らかにしたのは、ε4遺伝子をもつ頻度が晩期発症型の家族性アルツハイマー病で著しく高いことを示した報告¹⁶⁾である。この傾向は孤発性アルツハイマー病でも確認され、さらにε4遺伝子を多くもつほど発症の危険が増大し、発症が早まること（ε4アレル数依存性）が明らかにされた。これらの結果は、わが国においても早速検討され、同様の結果を得ている。また、頭部外傷後にアミロイドβタンパク質の沈着した人のApoE遺伝子型を調べたところ、ApoEε4遺伝子の割合が52%であったとする報告がなされ、ApoE4の作用としてAβの沈着を増強することが示された。これは外傷後に神経修復（コレステロール供給などが重要な要素となる）などにApoEが重要な役割を果たしていることを示唆していると筆者は考えている。さらにPS1に遺伝子変異をもつ家族性アルツハイマー病の家系においてもApoEε4遺伝子をもつ人では発症が早まることが報告されており¹⁷⁾、ApoE4は原因遺伝子PS1の作用に相加的に働き、発症を早めている可能性がある。

4 ApoE とアルツハイマー病病理

1) A β 除去, 老人斑形成への影響

脳内 A β 濃度の上昇や A β 沈着がアルツハイマー病病態の中心的な役割を果たすと考えられている (アミロイドカスケード仮説)。アルツハイマー病病理の鍵分子である A β と ApoE は, SDS や塩酸グアニジンに抵抗性である複合体を形成し, ApoE4 の方が ApoE3 よりも結合速度が速く¹⁶⁾, さらに長いインキュベーションによって ApoE4 の方が線維化 A β を形成しやすいと報告された。これらの結果から, ApoE4 が A β に結合しやすく毒性の強い A β 重合体や線維化 A β を形成して老人斑の沈着を誘導すると考えられる。しかし, 一方で A β との結合や線維化促進・抑制に ApoE アイソフォーム特異性はないとの結果も報告されており¹⁸⁾, 議論を整理する必要がある。また, 脂質と結合した ApoE と遊離した ApoE では A β との結合結果が異なることが明らかにされた。生理的条件下では ApoE は主に HDL 粒子と結合して存在するが, こうした ApoE は A β に対して ApoE3 が ApoE4 の 20 倍以上の結合親和性を示すことが示された¹⁹⁾。これらの結果は, ApoE3 は A β により強く結合して脂質複合体をつくるために HDL 取り込みを介して A β を除去し, 毒性の強い A β 重合体形成を防いでいる可能性がある。

次に, ApoE の A β 沈着に対する役割に関する研究について記したい。変異ヒトアミロイド前駆体タンパク質 (APP) のトランスジェニックマウスと ApoE 欠損マウスとを交配させたマウス脳を解析すると脳内 A β 沈着が劇的に減少した²⁰⁾。このことから, ApoE は A β 沈着を促進する, あるいは必須であると考えられた。しかし, ApoE 欠損マウスにヒトの ApoE3, ApoE4 を導入したマウスで同様の実験をしたところ, ヒトの ApoE は, ApoE 欠損よりもさらに A β 沈着を減少させ²¹⁾, しかもこの減少作用は ApoE3 > ApoE4 であった。以上から, マウス ApoE は, A β 沈着を促進するが, ヒトの ApoE は A β 沈着を軽減し, しかもその作用は ApoE アイソフォーム特異的であると考えられる。この違いは, マウスとヒトの ApoE のアミノ酸の違いが約 25% 程度あることで説明ができるかもしれない。

さらに筆者の注目する点を挙げれば, ApoE 野生型マウスと ApoE 欠損マウスの双方の脳内での A β 沈着

部位に明瞭な違いがある点である²¹⁾。ApoE 野生型マウスでは海馬 CA1~CA2 に老人斑形成が限局されているのに対し, ApoE 欠損マウスでは海馬歯状回に限局した沈着がみられる。ApoE の発現・非発現で A β の沈着する部位が異なるとすれば, ApoE は脳の部位別に強弱を含めて異なる作用をもつことを意味し, 同時に A β 沈着メカニズムも脳の部位によって異なることを示すことになるからである。

2) ApoE とタウタンパク質

ApoE とタウタンパク質との関連についての最初の報告は '94 年になされ, ApoE3 は, その N 末端側ドメインを介してタウタンパク質と結合し SDS 抵抗性の複合体を形成するが ApoE4 は形成しないというものであった⁵⁾。その後もミトコンドリアさらには神経原線維変化に ApoE の C 末端断片が局在・結合するとの報告¹⁴⁾ がなされている。分泌タンパク質である ApoE がどのような機構で細胞質に移行しミトコンドリアやタウタンパク質と関係するかについての詳細な機構の解明が必要であろう。その後も, ヒト型タウタンパク質を神経細胞で発現させたマウスではタウタンパク質のリン酸化亢進が起こるが, アストロサイトに発現させたマウスではリン酸化亢進が起こらなかったとする報告がなされ²²⁾, タウタンパク質に対する ApoE の影響は, 神経細胞特異的であると考えられる。またこれらのことは, 外から取り込まれたものではなく, 内在性に発現された ApoE がタウタンパク質との直接相互作用を起こす可能性を示唆しており, 今後の検討が必要である。

5 ApoE と認知能力

ApoE 欠損マウスにヒト ApoE3, ApoE4 を発現させたマウス (ノックインマウス) を用いた研究により, ApoE4-ノックインマウスは水迷路試験などによって学習能力が低下していることが示された⁴⁾。こうした学習障害は加齢とともに増悪し, またメスにのみみられた。また ApoE 欠損マウス脳でみられた加齢依存的な神経細胞変性を ApoE3 は抑制したが, ApoE4 は抑制しなかった。また, 他のトランスジェニックマウスを用いた研究からも, ApoE4 型マウスでは, 著しいワーキング記憶の低下がみられたことが報告されている²³⁾。ApoE4 型のヒトであっても発育・成長には影響がないと考えられてきたことから, これらがマウス

のみにみられることなのか、ヒトにも当てはまることか、さらに加齢依存的・性差があるのか等について慎重に検討する必要がある。

6 ApoEと脳内コレステロール代謝

1) 脳内コレステロール代謝の特異性

さらに、体循環系と脳内との間には血液脳関門が存在するために、脳内には体循環系とはその制御が異なった独自のコレステロール代謝系が存在する。例えば、血液中にはLDL, VLDL, IDL, HDL, カイロミクロンなどのリポタンパク質（脂質とタンパク質からなる粒子）が存在し、血液中でそれぞれが運搬・代謝されているが、中枢神経系（脳脊髄液中）にはHDLのみが存在する。これは、血液脳関門によって血液中のLDL, VLDL, IDL, カイロミクロンなどのリポタンパク質が脳内に入れないことを示している。

さて、エステル化されていない遊離コレステロールはすべての細胞膜を構成する重要な脂質である。しかし、中枢神経系でのコレステロールのもつ意義について特筆すべきは、脳を構成する脂質量の多さと神経系細胞構造の特殊性がある。中枢神経系の重量は体重の2.1%に過ぎないが、体全体の23%の非エステル化コレステロールを含むことが知られている。多くの動物における中枢神経の発達には、生後数週間から数年の間に起こるが、ミエリネーションや神経ネットワークの構築などの分化・発達に必要とされるコレステロールはすべて脳内での産生に依存し、食事からの供給には依らない。さらに構造の特徴として、神経細胞の形態および機能が他の細胞と大きく異なる点と、よく発達したミエリン構造としての膨大な膜成分の存在がある。神経細胞は、莫大な膜面積を有する神経突起を有することが知られており、神経突起の膜の表面積は細胞体のその数十～数百倍に及ぶ。またシナプス可塑性が起こっている突起末端では、24時間以内に全シナプスの20%以上がturn overするほど激しく変化するとされる。おそらく、神経突起末端での膜の変化の維持には、細胞体からのコレステロール供給（輸送）以外に、末端局所でのコレステロール代謝機構の果たす役割が大きい²⁴⁾と考えられる。神経突起末端での膜の変化の維持に、末端局所でのコレステロール代謝機構の果たす役割が大きいことを示す研究として、細胞外液中のHDL-コレステロールがシナプス可塑性維持に

重要な役割を果たすことが示された²⁵⁾。

2) ApoEのHDL産生作用におけるアイソフォーム依存性

脳内コレステロール代謝を制御する主要な因子の1つがApoEである。ApoEが産生するHDLはApoE受容体を介して細胞に取り込まれ再利用される。すなわちApoEはHDLの産生と供給を司る鍵分子である。実はこのHDL産生作用がApoE3とApoE4では大きく異なり、ApoE3は効率よくHDLを産生するが、ApoE4はその作用が弱くApoE3に比べて半分以下の能力しかないことがわれわれの研究から明らかになった。

3) コレステロール代謝とApoE遺伝子多型

アルツハイマー病発症と発症前の高コレステロール血症との間に有意な相関が存在することが報告され、アルツハイマー病のみならずMCI (mild cognitive impairment) 発症率をも高めるということも報告された。血清コレステロール値とApoEの遺伝子多型との関係については、すでに多くの論文があり、血清コレステロール値はApoE2 < ApoE3 < ApoE4の順に高くなることが示されている²⁶⁾。これらから、ApoE4は血清コレステロール高値を招くためにアルツハイマー病発症の危険因子である、と考えることができる。しかし、アルツハイマー病は中枢神経系の疾患であるから、血清コレステロール高値の意義が動脈硬化など血管性の要因なのか、それとも血清コレステロール値が脳内コレステロール値と相関することによって発症メカニズムにかかわっているのかをはっきりさせておくことが重要になる。これに関しては、血清のコレステロール値と髄液中のそれとは相関がないとされている²⁷⁾。また、脳内のリポタンパク質はHDL様の粒子のみであるとされることから、両者の相関のなさ、あるいは脳内脂質代謝の独立性が容易に想定される。その原因は血液脳関門の存在による。しかし、両者の間に面白い相関も読み取れる。血清HDL-コレステロール値に着目すると、その値は総コレステロール値（あるいはLDLコレステロール値）とは逆に、高い順にApoE2 > ApoE3 > ApoE4になるのである²⁶⁾。このHDL-コレステロール値におけるApoEのアイソフォーム依存性はわれわれが報告したように、ApoEによるHDL新生作用におけるApoEのアイソフォーム依存性で説明できるかもしれない^{8) 9)}。すなわち、アル

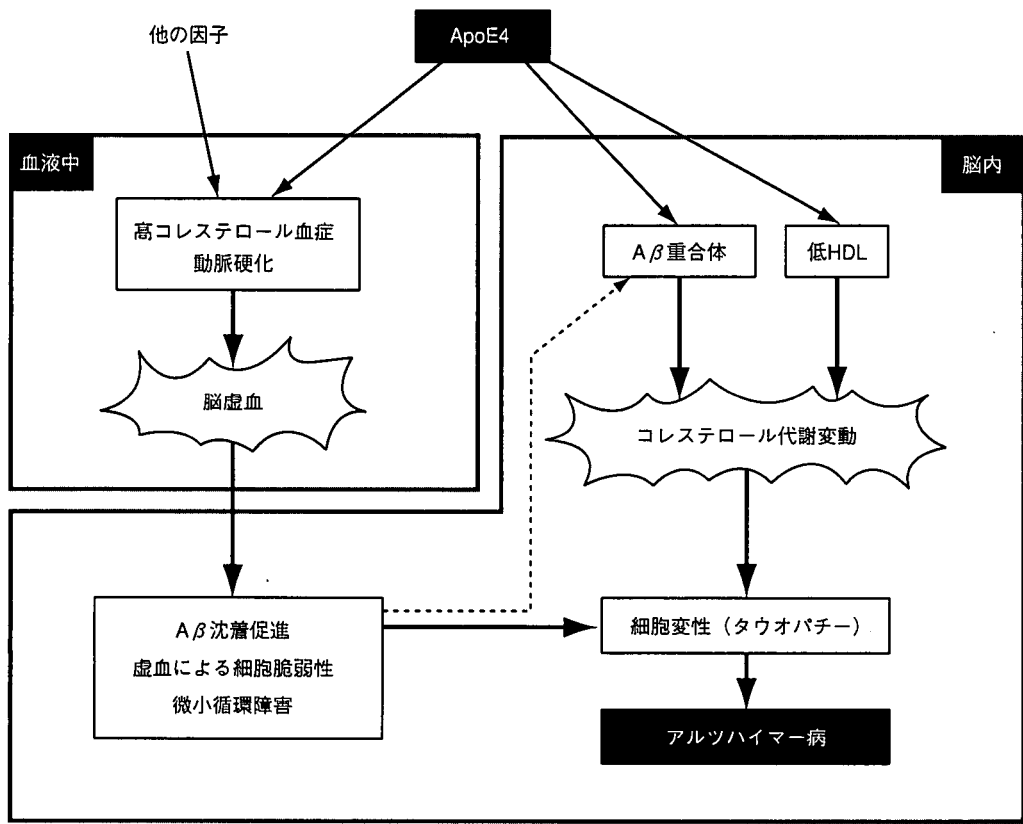


図2 コレステロールパラドックスを紐解く

血中コレステロール値が高いことがアルツハイマー病発症の危険因子であることが報告される一方、脳内コレステロール値 (HDLコレステロール値) はむしろ低いとする報告がある。これらを説明するための1つの考え方を示した。すなわち、血液中における高コレステロール値は、高血圧などとともに動脈硬化促進を介して脳虚血をもたらし、それが脳内Aβ代謝や神経細胞の脆弱性を招来してアルツハイマー病病理発症の閾値を下げる方向に働く。一方、脳内コレステロール代謝はApoEによるHDL産生と供給によって担われているが、その機能はApoE3 > ApoE4であるためApoE4では代謝破綻からタウオパチーやシナプス障害を誘導するという考え方である。体循環系と脳内のコレステロール代謝の議論を混同しないことが重要である

アルツハイマー病患者血清ではLDLコレステロールは高値だが、HDLコレステロールは低値であり、髄液HDLコレステロール値がアルツハイマー病患者で低値である²⁸⁾という結果に矛盾しない。いずれにしても、コレステロール値とApoEのアイソフォーム依存性を論じる場合には、着目すべき視点であると思われる。

その後、血清コレステロール高値がアルツハイマー病の危険因子であることそのものを否定するデータがいくつか発表されている。例えば、高コレステロール血症はむしろアルツハイマー病発症を抑制し、スタチン服用でアルツハイマー病発症頻度を下げることができないとしている²⁹⁾。このような乖離が起こるのは、

どうしてであろうか。中年期の血清コレステロール高値が、どのようなメカニズムでアルツハイマー病発症と関連しているのであろうか。1つの可能性として虚血性心疾患と同様に動脈硬化をきたした結果、脳循環障害・虚血によってアルツハイマー病発症に関与する可能性があるのではないかと筆者は考えている。実際、動脈硬化ならびにその関連因子とアルツハイマー病発症との相関は、多くの研究が指摘している³⁰⁾。最近、低HDL血症を含むメタボリック症候群が、アルツハイマー病発症と強く相関することが示されており、アルツハイマー病発症の背景に血管性要因(動脈硬化)が関与することが示唆されている³¹⁾。そのメカニズム

として、脳虚血状態ではAPPの代謝が変化しA β 産生の上昇が起こる³²⁾とされ、また血液脳関門の機能が障害されA β の排出が障害され、A β 沈着が増悪する³³⁾とされている(図2参照)。

おわりに—今後の展望

ApoE4が最も強い危険因子であることが指摘されて11年が経過し、さらにコレステロール代謝変動とアルツハイマー病との強い相関が指摘されているにもかかわらず、これらに関する知見からの有力な予防法や治療法は未だ確立していない。われわれの研究室では現在、HDL産生におけるApoE4の劣った機能を補い、HDL産生を増強させる薬剤開発を行っている。HDLは神経細胞へのコレステロール供給以外にもA β と結合してその除去に働くことから、この戦略は二重の意味で効果があると期待している。しかし、いずれにしても今までの研究から明らかになったことは、ApoEが実に多様な機能をもつということであり、したがってアルツハイマー病発症にも複数のメカニズムを介してかかわっている可能性があるということである。これは治療標的も複数存在することを意味する。理論的あるいは予備的研究から、ApoE4のドメイン間相互作用の抑制、ApoE3の脳内遺伝子導入によるA β 沈着の抑制³⁴⁾、ApoE発現調節(スタチンやFGF-1などがApoE発現を強めることが知られている)、他のlipid acceptorによるHDL形成の調節、ApoE4依存的なA β 凝集の抑制³⁵⁾、ApoE4型に対する抗酸化剤や神経保護薬の投与³⁶⁾などが挙げられ、今後それぞれのメカニズムに応じた研究を通じて予防法や治療法の開発が求められている。

文献

- 1) Corder, E. H. et al. : Science, 261 : 921-923, 1993
- 2) Nathan, B. P. et al. : Science, 264 : 850-852, 1994
- 3) Buttini, M. et al. : J. Neurosci., 19 : 4867-4880, 1999
- 4) Raber, J. et al. : Nature, 404 : 352-354, 2000
- 5) Strittmatter, W. J. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91 : 11183-11186, 1994
- 6) Miyata, M. & Smith, J. D. : Nat. Genet., 14 : 55-61, 1996
- 7) Tamaoka, A. et al. : Neurology, 54 : 2319-2321, 2000
- 8) Michikawa, M. et al. : J. Neurochem., 74 : 1008-1016, 2000
- 9) Gong, J. S. et al. : J. Biol. Chem., 277 : 29919-29926, 2002
- 10) Holtzman, D. M. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97 : 2892-2897, 2000
- 11) Dong, L. M. & Weisgraber, K. H. : J. Biol. Chem., 271 : 19053-19057, 1996
- 12) Weisgraber, K. H. & Shinto, L. H. : J. Biol. Chem., 266 : 12029-12034, 1991
- 13) Aoki, K. et al. : Acta. Neuropathol. (Berl) , 106 : 436-440, 2003
- 14) Huang, Y. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98 : 8838-8843, 2001
- 15) Harris, F. M. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 : 10966-10971, 2003
- 16) Strittmatter, W. J. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 1977-1981, 1993
- 17) Pastor, P. et al. : Ann. Neurol., 54 : 163-169, 2003
- 18) Naiki, H. et al. : Biochemistry, 36 : 6243-6250, 1997
- 19) LaDu, M. J. et al. : J. Biol. Chem., 269 : 23403-23406, 1994
- 20) Bales, K. R. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96 : 15233-15238, 1999
- 21) Holtzman, D. M. et al. : J. Clin. Invest., 103 : R15-R21, 1999
- 22) Tesseur, I. et al. : Am. J. Pathol., 157 : 1495-1510, 2000
- 23) Hartman, R. E. et al. : Exp. Neurol., 170 : 326-344, 2001
- 24) Hayashi, H. et al. : J. Biol. Chem., 279 : 14009-14015, 2004
- 25) Mauch, D. H. et al. : Science, 294 : 1354-1357, 2001
- 26) Braeckman, L. et al. : Atherosclerosis, 120 : 67-73, 1996
- 27) Fagan, A. M. et al. : Ann. Neurol., 48 : 201-210, 2000
- 28) Demeester, N. et al. : J. Lipid Res., 41 : 963-974, 2000
- 29) Reitz, C. et al. : Arch. Neurol., 61 : 705-714, 2004
- 30) Honig, L. S. et al. : Neurology, 64 : 494-500, 2005
- 31) Vanhanen, M. et al. : Neurology, 67 : 843-847, 2006
- 32) Bennett, S. A. et al. : Neurobiol. Aging, 21 : 207-214, 2000
- 33) Lin, B. et al. : Acta. Neuropathol. (Berl) , 97 : 359-368, 1999
- 34) Dodart, J. C. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102 : 1211-1216, 2005
- 35) Sadowski, M. et al. : Am. J. Pathol., 165 : 937-948, 2004
- 36) Raber, J. et al. : J. Neurosci., 22 : 5204-5209, 2002

<著者プロフィール>

道川 誠：1985年、東京医科歯科大学医学部卒。'96年3月、国立長寿医療研究センター痴呆疾患研究部室長。2005年10月より現職。研究所専門：アルツハイマー病の基礎研究、脂質生化学、神経内科。

Alzheimer病研究の進歩と治療戦略

Recent advances in Alzheimer's disease



道川 誠

Makoto MICHIKAWA

国立長寿医療センター研究所アルツハイマー病研究部

◎Alzheimer病は、記憶・記憶、思考、判断力の低下などの認知機能障害を中核病態とする神経変性疾患である。高齢社会に突入したわが国では現在約170万人の認知症患者がいると推定されるが、その約半数はAlzheimer病患者であり、今後もその数は増大すると考えられており、予防・治療法の開発が急がれている。Alzheimer病の病理学的特徴はアミロイドの沈着と神経原線維変化形成であるが、近年、原因遺伝子の同定とその機能解析が進み、加齢や遺伝子変異に伴って、脳内で凝集・沈着するアミロイドβ蛋白が引き金となってシナプス障害、神経原線維変化(タウ病変)、神経細胞脱落を引き起こし、やがて認知症を引き起こす(アミロイドカスケード仮説)と考えられている。現在、この仮説に基づいた治療法の開発が複数試みられている。

Key word Alzheimer病, アミロイドカスケード仮説

Alois Alzheimer が Alzheimer 病患者の第一例を報告してから101年が経つが、わが国において Alzheimer 病が社会的に広く知られるようになったのはそう古い話ではない。おそらく1972年に発表された有吉佐和子の小説『恍惚の人』が Alzheimer 病を広く社会に知らしめたものであったように思う。この小説はきたるべき高齢化社会を見通して長寿社会の影の部分の鋭い問題意識で描いた作品であり、当時の人びとに与えたインパクトは大きかった。しかし、当時の行政機関や社会全体が Alzheimer 病や認知症を現在ほど差し迫った医療ならびに社会の問題として考えていたわけではなかった。差し迫った問題として認識されるには高齢者の割合があるレベルを超える高齢社会の到来が必要であった。現在、わが国の65歳以上の人口は2,500万人を超え、高齢社会に突入した。認知症患者数は現在170万人ともいわれるが、その数は今後も増加すると考えられ、20年後には300万人に達すると予測されている。その過半数が Alzheimer 病患者と考えられており、その克服はまさしく国家的な課題となっている。

本稿では、生化学的・分子生物学的的方法論の導

入によって Alzheimer 病研究が飛躍的に進んだ経過を解説し、病態メカニズムの大枠が解明された基盤のうえから行われている予防・治療法開発の現状と可能性について述べたい。

原因遺伝子APPの発見

Alzheimer 病はどこまで理解され、予防・治療に関する研究はどこまで進んだのか。Alzheimer は最初の報告で51歳の認知症の女性患者の臨床症状と脳内に沈着する老人斑と神経原線維変化の2大病理学的変化を記載したが、現在でもこれらに関する研究が主流になっている。Alzheimer の報告から数十年間はその実体が不明のまま分子基盤の解明がなされない状況が続いた。しかし、1980年代に入ってからアミロイドを構成する主要な蛋白の同定に焦点がそそがれた。その結果、2つの病理学的特徴をなす蓄積物である老人斑と神経原線維変化の主要成分がそれぞれアミロイドβ蛋白(amyloid β-protein: Aβ)ならびにタウ蛋白であることが明らかになった。

Glennner と Wong は Alzheimer 病患者脳の小血管に沈着したアミロイドを精製し、4 kDa 蛋白の

アミノ酸配列を部分的に決定し、それを A β と命名した¹⁾。その直後に Beyreuther, Master らは Alzheimer 病患者脳に沈着した老人斑から同じ蛋白を同定した。ほぼ同時期には微小管関連蛋白であるタウが神経原線維変化を構成する主要な蛋白であることが同定された。病理的特徴である老人斑ならびに神経原線維変化を形成する主要な蛋白質が同定され、病理の実体が明らかになったことで Alzheimer 病研究の進歩は速度を増した。21 番染色体のトリソミーを病因とする Dawn 症患者では脳内に老人斑と神経原線維変化がみられることが知られていたが、1987 年、Beyreuther らは 21 番染色体長腕に局在する 1 回膜貫通型の蛋白であるアミロイド蛋白前駆体蛋白質 (APP) の遺伝子配列を決定した。APP は 1 回膜貫通型の蛋白で神経細胞にも非神経細胞にもユビキタスに発現しているものである。

1987 年に β アミロイド前駆体蛋白 (APP) が 21 番染色体上に同定されると、複数の常染色体優性遺伝を示す家族性 Alzheimer 病の家系の連鎖解析から 21 番染色体との連鎖が示唆され、1990 年にはオランダ型遺伝性脳出血において A β の第 22 残基の Glu を Gln に置換する変異が発見された²⁾。この家系の病型は、いわゆる Alzheimer 病とは異なっていたものの、沈着する老人斑の構成成分はまぎれもなく A β そのものであり、APP が病因遺伝子となることがはじめて示された。さらに 1991 年には APP717 位における London 型変異³⁾が、1992 年には APP670/671 の 2 つのアミノ酸置換を有するスウェーデン型変異が発見され⁴⁾、その後も家族性 Alzheimer 病の APP における別の変異が気づきに発見された。

アミロイドカスケード仮説

こうした発見によって APP が Alzheimer 病の原因遺伝子であることが明らかになり、その結果、A β の沈着が Alzheimer 病にみられる一連の病態を引き起こすカスケードの引き金になる、というアミロイドカスケード仮説が提案された⁵⁾。この仮説は、その後多少の修正を加えつつ、広く受け入れられる仮説として発展した。

従来の研究では比較的簡単に検出できる線維化

した A β に毒性があると考えられていたが、認知症の程度と線維化した A β の量 (沈着量) との間の相関性は弱い点が指摘されてきた。これはしばしばアミロイドカスケード仮説を否定する論拠となったが、最近の研究から可溶性の線維化していない A β (オリゴマー A β) が神経毒性を発揮する主体であることが明らかになり^{6,7)}、このオリゴマー A β はシナプス脱落や認知症の程度によく相関することが示されている⁸⁾。すなわち A β オリゴマーがシナプス機能障害、ミクログリア・アストログリアの活性化、タウ蛋白のオリゴマー・線維化、そして神経伝達物質の低下を伴う神経細胞死と認知障害を引き起こす原因分子であると考えられている (図 1)。APP における遺伝子変異の多くは β あるいは γ 切断部位周囲に集中しており、A β 産生に関連していることを示唆している。A β 内変異も複数報告されているが、これらは A β 凝集に関連していると考えられている⁹⁾。アミロイドカスケード仮説が正しいとすれば、理論的にはこのカスケードのどの点に介入しても予防・治療法の開発は可能であると考えられることから、現在この理論に基づいた複数の治療法開発が行われている (図 1)。

原因遺伝子プレセニリンの発見

A β が Alzheimer 病病態を引き起こす鍵分子であるとするこの仮説は、さらに別の原因遺伝子の同定からも支持されることになる。すなわち、A β を切り出す酵素のひとつであるプレセニリンにおける遺伝子変異が家族性 Alzheimer 病家系で数多く発見されたことである。1 回膜貫通型蛋白である APP の N 末端側は膜の内腔側で切断を受け、膜貫通部分を含むその C 末端側が、さらに膜内切断を受けて産生されること、すなわち最初の切断を担うのが β -site APP-cleaving enzyme (BACE) であり、さらに膜内切断を担うのがプレセニリン複合体であることがわかった¹⁰⁾ (図 2-A)。APP の N 末端側には 2 つの切断部位が存在し、 α セクレターゼ (メタルプロテアーゼの ADAM family に属する酵素) が行う切断からは A β が産生されないが、 β セクレターゼで切断を受けるとその断片はさらに γ セクレターゼによって膜内切断を受け

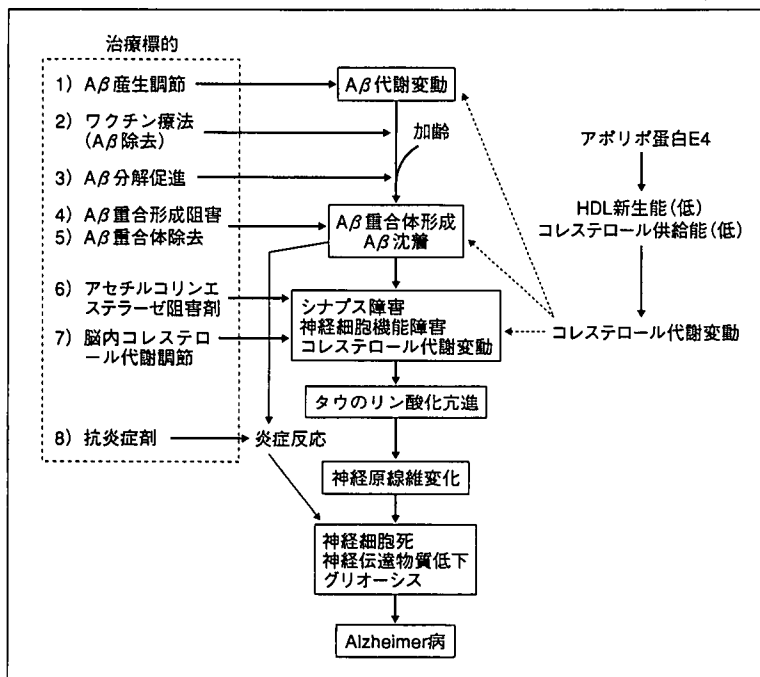


図 1 アミロイドカスケード仮説と治療戦略

Aβが産生されうることになる(図2-A)。γセクレターゼは単一の分子ではなく、活性中心はプレセニリンであるものの、そのほかにニカストリン、Aph1が活性発揮に必須な複合体から形成されることが明らかになった^{11,12)}。

その後の研究からγ切断部位は複数あることが明らかになった(図2-B)。どの部位で切断されるかはその後のAβの自己凝集に大きな影響を与えるため重要である。すなわち、Aβ42はAβ40やAβ38などに比べて非常に凝集能が高いため、毒性をもつオリゴマーを形成しやすいからである。

🍷 Aβの神経毒性

いったいなにが、間欠的に生じる海馬神経機能障害やエピソード記憶の障害を引き起こすのか。アミロイドカスケード仮説からはAβが中心的な役割を果たしていると考えられるが、どのようなAβがいかなる分子機構で神経機能障害を引き起こすのかはいまのところ不明である。認知障害のない剖検脳において、しばしば辺縁系や皮質連合野にかなりの量のアミロイド沈着がみられることや、アミロイド沈着と認知機能障害とに相関がない、などの批判があったが、ELISA法を用いた生

化学的解析によって脳内可溶性Aβ(オリゴマーAβを含む)量と認知障害の程度は老人斑数との比較に比べてよく相関することが示されている¹³⁾。老人斑の単位Aβ量当りの表面積は可溶性Aβオリゴマーのそれと比べるとはるかに低値であり、また後者はシナプス間隙にアクセスできるが、前者はできないなど、すくなくともシナプス機能障害発揮の本体は小さな可溶性Aβオリゴマーである可能性が高いと考えられる。一方、高度に凝集したアミロイド凝集塊は神経毒性が弱いことが示されている。しかし、アミロイド凝集塊としての老人斑にはdystrophic neuriteがみられ、また周囲にはより小さなAβ凝集体が存在することから、老人斑が直接神経細胞障害を引き起こしているのかどうかを確認することは困難である。しかし、すくなくともAlzheimer病発症の初期の段階においてシナプス機能障害を引き起こす責任分子として可溶性Aβオリゴマーを考えることは以下の事実から間違いではないと考えられる。

🍷 Aβオリゴマーのさまざまな種類

すでに多くの報告があるように、Aβオリゴマーはその作成方法や抽出方法に従ってさまざまであ

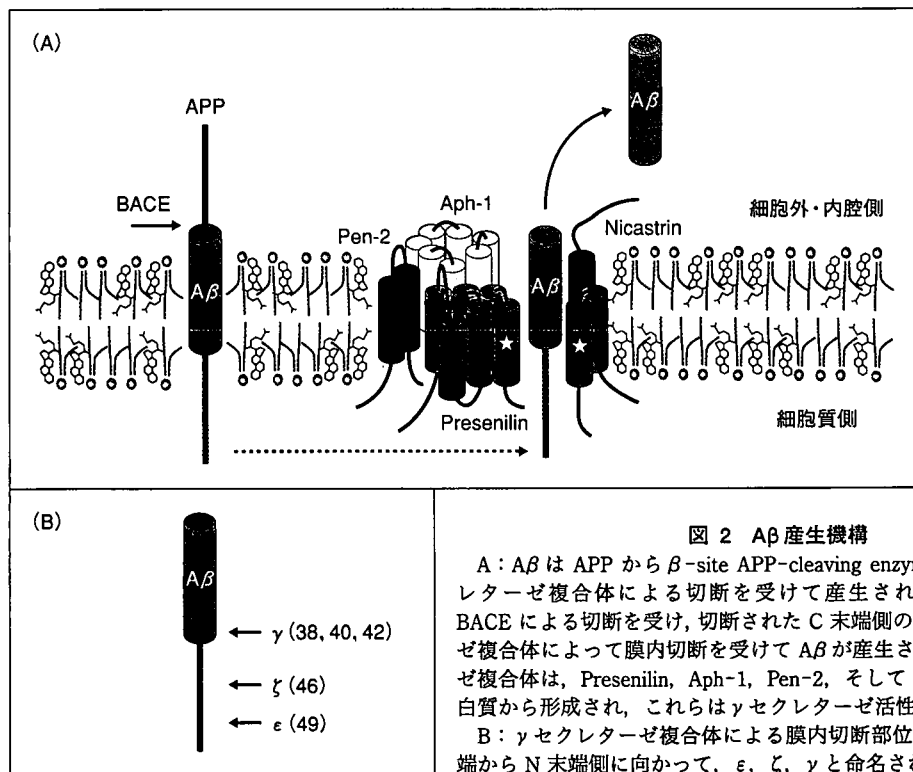


図 2 Aβ 産生機構

A : Aβ は APP から β-site APP-cleaving enzyme (BACE) と γセクレターゼ複合体による切断を受けて産生される。APP は最初に BACE による切断を受け、切断された C 末端側の断片が γセクレターゼ複合体によって膜内切断を受けて Aβ が産生される。γセクレターゼ複合体は、Presenilin、Aph-1、Pen-2、そして nicastrin の 4 つの蛋白質から形成され、これらは γセクレターゼ活性発揮に必須である。

B : γセクレターゼ複合体による膜内切断部位。切断部位は、C 末端から N 末端側に向かって、ε、ζ、γ と命名されている。

る。可溶性オリゴマーは生物材料中に存在するものあるいは合成 Aβ で作成したものを問わず、超遠心してもペレット分画には回収されないものと定義される。合成 Aβ で作成したもの以外にも可溶性 Aβ オリゴマー(二量体、三量体)は脳脊髄液や培養細胞の培地中에서도検出され、Aβ*56 などの十二量体オリゴマー⁶⁾などと同じように、シナプス障害さらに記憶障害を引き起こす共通の特性をもっている可能性が示されている。

すでに細胞から分泌生成されるオリゴマー(二~三量体のオリゴマー)は、nmol 濃度以下でも強いシナプス機能障害(LTP 抑制)作用をもつことが示されている⁷⁾。こうしたオリゴマーの毒性発揮の機序は不明であるが、たとえばシナプス膜に結合し受容体やチャネル蛋白との相互作用を介してシグナル系に作用しシナプス可塑性を障害する可能性が考えられている。細胞間液における Aβ 濃度はシナプス活動と相関していることが APP трансジェニックマウスの解析から明らかになっている。また、興味深いことに Aβ オリゴマーは、NMDA 受容体のエンドサイトーシスを促進しその

結果、NMDA 刺激による LTP を抑制している可能性が示されている¹⁴⁾。

シナプス機能維持に焦点をあてた 薬剤開発——塩酸ドネペシル

既述したように、可溶性 Aβ オリゴマーが、シナプスの機能障害を引き起こすことがわかってきた。Alzheimer 病では Meynert 基底核から大脳皮質や海馬へ投射するアセチルコリン系神経細胞の障害が強いとされるが、コリン作動性シナプスを標的に開発されたのが塩酸ドネペシルである。すなわち、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤で神経伝達物質であるアセチルコリンの加水分解を抑えることでシナプス間隙のアセチルコリン濃度を高めシナプス伝達効率を高めることを期待して開発された。

アリセプト[®]はわが国で開発され、また唯一認可されている Alzheimer 病治療薬である。アセチルコリン作動性ニューロンが十分に残っていることが前提となるため、軽症から中程度の Alzheimer 病患者が対象とされている。しかし、高度に進行

した例にも効果があるとする報告もある。残念ながら Alzheimer 病の根本的な治療薬ではなく、また認知機能改善効果というよりも症状の進行を抑制する効果と考えられている。このほかに、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤のタクリン、ガラントミンなどが海外で認可されている。

● $A\beta$ 生・分泌調節による治療法開発

$A\beta$ の産生制御はアミロイドカスケードのもっとも上流に位置する介入点である。この観点からの治療法はまだ確立されていない。しかし、もっとも研究が集中して行われていた分野であり、その知見の集積から治療法確立に向けた試みがなされている。APP から β と γ セクレターゼによって切断されて $A\beta$ が切りだされる。したがって、この切断を調節できれば $A\beta$ の産生を下げ、 $A\beta$ に源を発するアミロイドカスケードの発動を抑制し AD 病理出現を抑止できる¹⁵⁾。問題はこれらの酵素の基質が APP 以外にも複数存在するために、それらの代謝にも影響を及ぼし、さまざまな副作用を惹起してしまうことである。この問題の克服には APP 切断のみを選択的に抑制する薬剤の開発をいかに行うかが課題となっており、それに向けた研究もなされている¹⁶⁾。

● $A\beta$ 分解療法

$A\beta$ を分解する酵素が脳内に複数存在することがわかってきた。代表的なものではインスリン分解酵素¹⁷⁾ やネプリライシン^{18,19)} がある。ネプリライシンはわが国で同定された $A\beta$ 分解酵素であり、加齢で発現量が低下すること、孤発性 Alzheimer 病患者で低値であること、 $A\beta$ 沈着マウスにネプリライシンを過剰発現させると沈着軽減することなどが明らかになり、この酵素の活性賦活化が治療標的となっている。ソマトスタチンがネプリライシンの活性を増強させることが明らかになった。ソマトスタチンは成長ホルモンの分泌抑制因子として知られている神経ペプチドであり、今後ソマトスタチンの受容体に対するアゴニストの開発によって Alzheimer 病の予防・治療法の開発が期待されている。

著者らは毒性の強い $A\beta_{42}$ の C 末端側の 2 つ

のアミノ酸を切断し毒性の弱い $A\beta_{40}$ に変換する酵素の同定を進めるなかで、その酵素がアンジオテンシン転換酵素 (ACE) であることを特定した。ACE は $A\beta$ 分解作用をもつことが知られていたが、Tg2576 マウスに ACE 阻害剤を長期 (10 カ月以上) 投与すると脳内の $A\beta_{42}$ 沈着が増強することを見出した²⁰⁾。現在、ACE 活性を増強することで Alzheimer 病の進行抑制ならびに治療法の開発をめざした研究を進めている。

● $A\beta$ ワクチン療法

いったんできてしまった $A\beta$ を取り除く治療戦略として、いわゆる“ワクチン療法”がある。これには、 $A\beta$ で免疫する能動免疫と、あらかじめ作成した抗 $A\beta$ 抗体を脳内 (あるいは血中) に投与し、脳内 $A\beta$ を除去する受動免疫がある。 $A\beta$ ワクチン療法は $A\beta_{42}$ ペプチドを APP トランスジェニックマウスに免疫し、脳内アミロイド沈着が減少したとする報告からはじまった²¹⁾。その後、Alzheimer 病患者への臨床試験が行われたが、経過中に副作用 (髄膜脳炎が約 6% に出現) を惹起させたため中止となっている²²⁾。その後、ワクチン療法を受けた患者のなかで副作用のなかった症例における認知症の経過を追跡しているが、ワクチン療法を受けたすべての人の解析報告では一般的な認知機能検査では明らかな治療効果は認められなかったが、血中の抗体価の高い群では抗体価に依存して症状の進行が抑えられたとされ²³⁾、ワクチン療法は Alzheimer 病の治療法としてもっとも有効性が期待されるもののひとつと考えられている。

現在、副作用の克服にさまざまな試みがなされている。たとえば、当研究所の田平らは腸管免疫・鼻粘膜免疫法を試みている²⁴⁾。この方法では臨床試験の副作用の本態であると考えられる Th1 タイプの T 細胞性免疫反応が起りにくいいため、脳炎の発症が抑制されるのではないかと期待されている。この方法を用いた実験はマウスならびにサルで行われている。また、副作用の克服のために受動免疫の考え方から $A\beta$ の N 末端を認識するモノクローナル抗体を作成し、それを投与する臨床試験 (第 II 相) が行われている。また、著者らの研究

部の松原らはオリゴマー A β を選択的に認識する抗オリゴマー A β モノクローナル抗体を作成し、それを経静脈的に投与する治療法開発を行っている。当研究所の柳澤らはオリゴマーの起始点メカニズムの研究から GM1 ガングリオシドと結合した A β がオリゴマー形成の“種”になることを明らかにし、“種”を標的にした特異抗体を作成して重合抑制法の開発を行っている。

最近の研究では A β の免疫療法は単に A β のオリゴマー形成や A β 沈着を抑制するばかりではなく、リン酸化タウのクリアランスにも効果があると報告している。この事実は A β オリゴマーがアミロイドカスケードのもっとも上流に位置し、タウの凝集を引き起こすことを示している。抗 A β 抗体療法の治療メカニズムとしてミクログリアによる局所の A β 貪食能によるものか、体循環系の A β の除去によって脳内 A β の体循環系への移行を促進させた結果なのか、あるいは A β のオリゴマー形成阻害と毒性抑制によるのか、などが考えられている。

高コレステロール血症と Alzheimer 病

コレステロールと Alzheimer 病の関連については多くの研究があるが、まだ予防・治療法への応用は確立していない。注目を集めた研究は、血液中のコレステロール高値が Alzheimer 病発症頻度を上げ、スタチン服用者ではその頻度が下がるというものである。これらの研究結果はその後の報告によって否定されることも多く、結論は出ていない。その理由として、自明のことながら Alzheimer 病は中枢神経系の疾患であること、中枢神経系のコレステロール代謝は血液脳関門によって隔絶されているため血液中(体循環)のコレステロール代謝から独立した系を営むこと、そのため両系におけるコレステロール代謝に直接の相関はないこと、したがって、血中のコレステロール代謝の変動によって中枢神経系疾患である Alzheimer 病の発症機構を直接説明するのは不可能であること、などが考えられる。

しかし、注意してデータを解釈しなおすと、つぎのような可能性がみえてくる。すなわち、高コレステロール血症が動脈硬化を招きその結果、脳

循環障害・虚血によって脳内の Alzheimer 病発症に直接かかわる事象に関与する可能性である。実際、動脈硬化ならびにその関連因子と Alzheimer 病発症との相関は多くの研究が指摘しているところでもある。最近、低 HDL 血症を含むメタボリック症候群が Alzheimer 病発症と強く相関することが示されており、Alzheimer 病発症の背景に血管性要因(動脈硬化)が関与することが示唆されている。これについては、加齢ラット脳の慢性的な循環不全によって APP の代謝変動を誘導して脳内 A β レベルが増加すること²⁵⁾、ならびに局所的なラット脳の虚血負荷の後に APP レベルが増加することが確認されている²⁶⁾。これらの研究結果は Alzheimer 病における神経変性過程に、脳虚血が増悪因子として一定の役割を果たしている可能性を示唆している。加えて循環障害や慢性脳虚血が血液脳関門の脆弱性を惹起させ、その結果、脳外への A β のクリアランス能力を障害してしまう可能性などが指摘されている。

脳内コレステロール代謝と Alzheimer 病

血中のコレステロール代謝と Alzheimer 病との関連は、動脈硬化を介する脳循環障害・脳虚血に起因するものとして説明しうる可能性を述べた。では脳内コレステロール代謝(変動)と Alzheimer 病発症(病理発現)には直接の関係はないのか。脳内コレステロールを解析した研究によると、Alzheimer 病患者の脊髄液ではコレステロール濃度が有意に低下している²⁷⁾、あるいは脳のコレステロールレベルが低下していると報告されている。アポ E3 は、アポ E4 に比べて HDL 新生能力が 2 倍以上あるため²⁸⁾、アポ E3 型のヒトでは神経突起の伸長やシナプス形成に有利であると考えられる。また、A β は HDL に結合して除去されることから、HDL 産生増加が治療法開発につながるかもしれない。

近年の研究から、アポリポ蛋白質による HDL 新生には ABCA1 が重要な役割を果たすこと、この ABCA1 発現は酸化ステロールをリガンドとする LXR やレチノイン酸をリガンドとする RXR などの核内受容体によって制御されることが明らかになった。したがって、脳内のコレステロール代

謝調節にはこれら核内受容体のリガンドの投与が戦略のひとつと考えられる。ABCA1 のノックアウトマウスを用いた研究によると、ABCA1 ノックアウトマウスでは脳内 A β の沈着が増強し、アポ E レベルも低下するという²⁹⁾。ABCA1 のノックアウトマウス脳では HDL の産生量が著明に低下することから、HDL に結合して除去されるべき A β が除去されず脳内にとどまったため A β 沈着が増強した可能性、また ABCA1 欠損によって脂質の少ない ApoE-HDL がつくられてしまい、結果としてアポ E の A β 線維化作用が増強された可能性などが考えられる。A β 除去以外にも本来の HDL の作用である神経修復やコレステロール代謝の恒常性維持が重要であると考えられることから、ABCA1 の発現・機能調節は重要である。今後は ABCA1 の発現増強によって A β 沈着を予防し、神経変性を抑制できる可能性を検証し、“HDL 療法”ともいべき予防・治療法の開発ができるかもしれない。

文献

- 1) Glenner, G. G. and Wong, C. W. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120** : 885-890, 1984.
- 2) Levy, E. et al. : *Science*, **248** : 1124-1126, 1990.
- 3) Chartier-Harlin, M. C. et al. : *Nature*, **353** : 844-846, 1991.
- 4) Mullan, M. et al. : *Nat. Genet.*, **1** : 345-347, 1992.
- 5) Hardy, J. A. and Higgins, G. A. : *Science*, **256** : 184-185, 1992.
- 6) Lesne, S. et al. : *Nature*, **440** : 352-357, 2006.
- 7) Walsh, D. M. et al. : *Nature*, **416** : 535-539, 2002.
- 8) McLean, C. A. et al. : *Ann. Neurol.*, **46** : 860-866, 1999.
- 9) Yamamoto, N. et al. : *Neuroreport*, **17** : 1735-1737, 2006.
- 10) Haass, C. : *EMBO J.*, **23** : 483-488, 2004.
- 11) Kimberly, W. T. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** : 6382-6387, 2003.
- 12) Takasugi, N. et al. : *Nature*, **422** : 438-441, 2003.
- 13) Lue, L. F. et al. : *Am. J. Pathol.*, **155** : 853-862, 1999.
- 14) Snyder, E. M. et al. : *Nat. Neurosci.*, **8** : 1051-1058, 2005.
- 15) Selkoe, D. J. : *Arch. Neurol.*, **62** : 192-195, 2005.
- 16) Fraering, P. C. et al. : *J. Biol. Chem.*, **280** : 41987-41996, 2005.
- 17) Qiu, W. Q. et al. : *J. Biol. Chem.*, **273** : 32730-32738, 1998.
- 18) Iwata, N. et al. : *Nat. Med.*, **6** : 143-150, 2000.
- 19) Iwata, N. et al. : *Science*, **292** : 1550-1552, 2001.
- 20) Zou, K. et al. : *J. Neurosci.* (in press.)
- 21) Schenk, D. et al. : *Nature*, **400** : 173-177, 1999.
- 22) Orgogozo, J. M. et al. : *Neurology*, **61** : 46-54, 2003.
- 23) Gilman, S. et al. : *Neurology*, **64** : 1553-1562, 2005.
- 24) Hara, H. et al. : *J. Alzheimers Dis.*, **6** : 483-488, 2004.
- 25) Bennett, S. A. et al. : *Neurobiol. Aging*, **21** : 207-214, 2000.
- 26) Lin, B. et al. : *Acta Neuropathol. (Berl)*, **97** : 359-368, 1999.
- 27) Demeester, N. et al. : *J. Lipid Res.*, **41** : 963-974, 2000.
- 28) Gong, J. S. et al. : *J. Biol. Chem.*, **277** : 29919-29926, 2002.
- 29) Koldamova, R. et al. : *J. Biol. Chem.*, **280** : 43224-43235, 2005.

* * *

Alzheimer病の早期画像診断

——発症前診断をめざして

Early diagnosis of Alzheimer disease by SPECT, PET and MRI

百瀬 敏光

Toshimitsu MOMOSE

東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻放射線医学講座核医学分野

©Alzheimer 病発症機構の分子レベルの解明と治療法の進歩により、早期診断の重要性が強調されている。Alzheimer 病のもっとも初期に現れる病理変化は老人斑と考えられ、その主成分である β -アミロイド凝集体の画像化は、 β シート構造に親和性のある Thioflavin 誘導体などの放射性標識化合物により可能となってきた。このアミロイドイメージングは、発症前の変化をもっとも早期にとらえることのできる検査法として注目を集めている。老人斑の蓄積とその後の神経原線維変化の進展に伴い、シナプス活動性の低下、引き続き神経細胞の脱落による脳萎縮が進行すると考えられ、その時点で、糖代謝を測定する FDG-PET や脳血流 SPECT、さらに MRI を用いた容積測定法が病態の推移を評価するうえで重要性をもつと考えられる。本稿においては Alzheimer 病の早期診断に重要と考えられる画像診断法を紹介し、その位置づけ、今後の展開について述べる。



Alzheimer病, FDG-PET, アミロイドイメージング, SPECT, VBM

Alzheimer 病は記憶力障害・記憶障害を中核とし、失語、失見当識、構成障害、抽象概念の障害、判断力障害、性格変化などを伴い、高次脳機能が進行性に低下する疾患である。病理学的には、老人斑、神経原線維変化、神経細胞脱落を認め、進行とともに脳萎縮を認める。Alzheimer 病の診断は、臨床症状、知能・心理学的検査、家族や周囲の人たちからの詳細な病歴の聴取、さらに画像検査、血液生化学的検査などを参考にして総合的になされる。ある程度経過を観察し、進行した段階での Alzheimer 病の診断は比較的容易ではあるが、発症初期段階での診断はかならずしも容易ではない。Alzheimer 病は記憶力障害やうつ状態などで発症することが多く、こうした症状は Alzheimer 病以外の疾患や、正常な加齢性変化としても現れることがある。現時点で、Alzheimer 病を確実に診断できる検査法はなく、最終的診断は病理像によってなされる。Alzheimer 病に限らず、変性疾患による認知症の早期診断においては、慢性硬膜下血腫、脳腫瘍、脳梗塞、正常圧水頭症など外科手

術や、生活習慣の改善、内科的治療により治癒または症状の改善が可能な器質的病変を、通常の頭部 CT または MRI 検査により除外しておく必要がある。ただし、これらの疾患があっても、その部位や程度に見合わない高次脳機能障害が存在すれば、変性疾患の可能性について考慮し、さらに精査する必要がある。Alzheimer 病の最終診断はあくまで病理診断であるが、より客観的に診断していくために画像診断の果たす役割は大きい。その背景には、コンピュータの進歩による新しい画像診断技術の開発、普及がある。

本稿においては Alzheimer 病の早期診断に重要と考えられる画像診断法を紹介し、その位置づけ、今後の展開について述べる。



脳形態・脳容積変化の画像化：VBM

加齢とともに脳容積は徐々に減少し、萎縮として表現される。MRI の高速三次元収集法の開発により、短時間に灰白質と白質の良好なコントラストを有する脳全体の容積画像を得ることができ

Genetic association of *CTNNA3* with late-onset Alzheimer's disease in females

Akinori Miyashita¹, Hiroyuki Arai², Takashi Asada³, Masaki Imagawa⁴, Etsuro Matsubara⁵, Mikio Shoji⁶, Susumu Higuchi⁷, Katsuya Urakami⁸, Akiyoshi Kakita⁹, Hitoshi Takahashi⁹, Shinichi Toyabe^{10†}, Kohei Akazawa¹⁰, Ichiro Kanazawa¹¹, Yasuo Ihara^{12,‡}, Ryozi Kuwano^{1*};
The Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer's Disease

¹Bioresource Science Branch, Center for Bioresources, Brain Research Institute, Niigata University, Niigata 951-8585, Japan, ²Department of Geriatrics and Gerontology, Center for Asian Traditional Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai 980-8574, Japan, ³Department of Psychiatry, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8575, Japan, ⁴Imagawa Clinic, Fukushima-ku, Osaka 553-0003, Japan, ⁵Department of Alzheimer's Disease Research, National Institute for Longevity Sciences, National Center for Geriatrics and Gerontology, Obu 474-8522, Japan, ⁶Department of Neurology, Neuroscience and Biophysiological Science, Hirosaki University, School of Medicine, Hirosaki 036-8562, Japan, ⁷Division of Clinical Research, Kurihama Alcoholism Center, National Hospital Organization, Yokosuka 239-0841, Japan, ⁸Department of Biological Regulation, Section of Environment and Health Science, Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago 683-8503, Japan, ⁹Departments of Pathology and Pathological Neuroscience, Brain Research Institute, Niigata University, Niigata 951-8585, Japan, ¹⁰Department of Medical Informatics, Niigata University, Niigata 951-8520, Japan, ¹¹National Center for Neurology and Psychiatry, Kodaira 187-8502, Japan and ¹²Department of Neuropathology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

Received July 18, 2007; Revised and Accepted August 22, 2007

Alzheimer's disease (AD), the most common form of dementia in the elderly, was found to exhibit a trend toward a higher risk in females than in males through epidemiological studies. Therefore, we hypothesized that gender-related genetic risks could exist. To reveal the ones for late-onset AD (LOAD), we extended our previous genetic work on chromosome 10q (genomic region, 60–107 Mb), and single nucleotide polymorphism (SNP)-based genetic association analyses were performed on the same chromosomal region, where the existence of genetic risk factors for plasma A β 42 elevation in LOAD was implied on a linkage analysis. Two-step screening of 1140 SNPs was carried out using a total of 1408 subjects with the *APOE- ϵ 3*³ genotype: we first genotyped an exploratory sample set (LOAD, 363; control, 337), and then genotyped some associated SNPs in a validation sample set (LOAD, 336; control, 372). Seven SNPs, spanning about 38 kb, in intron 9 of *CTNNA3* were found to show multiple-hit association with LOAD in females, and exhibited more significant association on Mantel–Haenszel test (allelic P -values_{MH-F} = 0.000005945–0.0007658). Multiple logistic regression analysis of a total of 2762 subjects (LOAD, 1313; controls, 1449) demonstrated that one of the seven SNPs directly interacted with the female gender, but not with the male gender. Furthermore, we found that this SNP exhibited no interaction with the *APOE- ϵ 4* allele. Our data suggest that *CTNNA3* may affect LOAD through a female-specific mechanism independent of the *APOE- ϵ 4* allele.

*To whom correspondence should be addressed at: 1-757 Asahimachi, Chuo-ku, Niigata 951-8585, Japan. Tel: + 81 252272343; Fax: + 81 252270793; Email: ryosun@bri.niigata-u.ac.jp

†Present address: Risk Management Office, Niigata University Medical and Dental Hospital, Niigata 951-8520, Japan.

‡Present address: Planning Office, Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto 619-0225, Japan.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder clinically characterized by progressive cognitive deterioration and is the most common form of dementia in the elderly. Its neuropathological features are amyloid plaques [extracellular deposition of amyloid β -protein ($A\beta$)] and neurofibrillary tangles (intracellular aggregation of highly phosphorylated microtubule-associated protein tau), which finally lead to synaptic loss and/or neuronal death.

Recent epidemiological studies on AD revealed gender-related differences in its prevalence (1–3) and incidence (4–6). Compared with males, females are more likely to develop AD, although results contradicting this gender difference have been reported (7–9). In blood mononuclear cells in AD, there are substantial gender differences in gene expression (10). The plasma level of amyloid beta-protein 42 ($A\beta_{42}$), a major constituent of senile plaques, is significantly increased in females with mild cognitive impairment, a transitional state between normal aging and mild dementia (11). In transgenic animal models of AD, gender-dependent accumulation and deposition of $A\beta_{42}$ and $A\beta_{40}$ have been observed (12–15). Moreover, there has been increasing research on gender-related genetic risk factors in AD: *ACT* (16), *MPO* (17,18), *ACE* (19), *ESR2* (20), *DSC1* (21) and *ABCA1* (22). Therefore, based on these findings, we hypothesized that gender-related genetic risk factors that modify $A\beta$ metabolism in late-onset AD (LOAD); which accounts for 95–99% of AD, could exist.

We have paid a great deal of attention to chromosome 10q, especially because the existence of genetic risk factors for plasma $A\beta_{42}$ elevation in it was implied on linkage analysis of LOAD families (23). Furthermore, through other genetic approaches, including genome-wide linkage screening of affected sib pairs (24) and candidate gene-based analysis of multiplex AD families (25), chromosome 10q was strongly suggested to be the most prominent one for LOAD. Therefore, regarding a genomic region on chromosome 10q (60–107 Mb), we previously performed large-scale single nucleotide polymorphism (SNP)-based screening of a Japanese population to identify additional genetic risk factors to *APOE* (19q13.2), which is universally recognized as a major risk gene for the development of LOAD (OMIM +107741). Consequently, we found that *DNMBP*, which is involved in synaptic vesicle recycling, was associated with LOAD with the *APOE- ϵ 3*3* genotype or lacking the *APOE- ϵ 4* allele in several sample sets (26).

Interestingly, replicated evidence for a parent-of-origin effect of chromosome 10q was recently reported for LOAD (27,28), which suggests that gender-related genes such as imprinting genes could be responsible for the disease development. Here, in order to determine whether or not gender-related loci associated with LOAD are present, our previous genetic work on chromosome 10q (26) was extended. Two sample sets for screening, *Exploratory* and *Validation*, comprising only *APOE- ϵ 3*3* subjects were prepared, which were used for a case-control association study after being stratified as to gender. We first genotyped the Exploratory set, and then genotyped some significantly associated SNPs in the Validation set. Through this stepwise screening, among the

1140 SNPs subjected to the exploratory screening, we finally found seven SNPs located in intron 9 of *CTNNA3* that showed reproducible association with LOAD in females. These replicated SNPs were further examined by means of genotyping of all the subjects with all *APOE* genotypes ($\epsilon 2*2$, $\epsilon 2*3$, $\epsilon 2*4$, $\epsilon 3*3$, $\epsilon 3*4$ and $\epsilon 4*4$), i.e. 1526 LOAD patients (female, 1103; male, 423) and 1666 controls (female, 998; male, 668), some of them exhibiting significance only in a female sub-sample set. In terms of biological functions, *CTNNA3* (29,30), encoding α -T catenin, is thought to be a promising candidate for LOAD because it is a binding partner of β -catenin, which interacts with *PSEN1* (31), and because it was recently shown to be associated with the level of plasma $A\beta_{42}$ in a set of families with LOAD (32). Multiple logistic regression analysis in a total of 2762 subjects (LOAD, 1313; controls, 1449) revealed that one (SNP rs713250) of the seven associated SNPs exhibits a significant interaction with the female gender, but not with the male gender and the *APOE- ϵ 4* allele. Our data suggest that *CTNNA3* could affect LOAD through a female-specific mechanism independent of the *APOE- ϵ 4* allele.

RESULTS

Allelic association

To determine whether gender-related loci associated with LOAD on chromosome 10q (60–107 Mb) exist or not, we stratified the Exploratory sample set (Table 1) by gender, resulting in female and male subsets. An allelic contingency table (2×2)-based χ^2 test was performed using already-obtained genotype data (26) for 1140 SNPs for the Exploratory set. Calculation of allelic *P*-values and odds ratios (ORs) with 95% confidence interval (CI) was carried out to examine the genetic association of these SNPs. In a Japanese population, these SNPs were actually polymorphic and showed a *P*-value >0.05 in exact tests of Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) in both cases and controls of the Exploratory set (details given under Materials and Methods). The results of χ^2 tests for the gender-stratified sets are presented in Fig. 1. In the female group (LOAD, 249; controls, 223), 106 of the 1140 SNPs had significant allelic *P*-values <0.05 , and 34 of these 106 showed more significant values (allelic *P*-values <0.01). In the male group (LOAD, 114; controls, 114), 53 of the 1140 SNPs showed allelic *P*-values <0.05 , and 7 of these 53 showed more significant association with allelic *P*-values <0.01 .

A total of 41 SNPs (34 and 7 SNPs in female and male Exploratory sets, respectively) showing allelic *P*-values <0.01 were further analyzed by means of χ^2 tests to determine whether or not these SNPs actually exhibit reproducible allelic association using another sample set, Validation, sub-grouped as to gender (Table 1). In the male Validation set (LOAD, 94; controls, 159), three of the above-mentioned seven SNPs showed reproducible association (allelic *P*-values = 0.0342 – 0.046). Among these three SNPs, only SNP rs1000280 exhibited a significant value on Mantel–Haenszel test (allelic *P*-value_{MH-M} = 0.0009112). This SNP is located in the intergenic region between *LOXL4* (100.00–100.02 Mb) and *C10orf33* (100.13–100.16 Mb); therefore, we did not

Table 1. Subject information

Sample set ID	Number of subjects	AAO/AAE Mean (SD)	Range	MMSE Mean (SD)	Range	<i>APOE</i>							Allele		
						Genotype							ϵ_2	ϵ_3	ϵ_4
						2*2	2*3	2*4	3*3	3*4	4*4				
Overall set															
<i>All</i>															
	Female														
	LOAD	1103	73.5 (6.6)	60–93	15.7 (7.0)	0–30	0	31	13	491	465	103	44	1478	684
	Control	998	73.0 (7.9)	60–96	28.0 (1.8)	24–30	2	77	9	748	152	10	90	1725	181
	Male														
	LOAD	423	73.3 (6.6)	60–93	18.4 (6.6)	0–30	1	18	4	208	148	44	24	582	240
	Control	668	73.1 (7.7)	60–95	28.1 (1.8)	24–30	1	55	6	495	104	7	63	1149	124
Subsets															
<i>Negative-ϵ_4</i>															
	Female														
	LOAD	522	74.6 (7.0)	60–93	15.1 (7.4)	0–30	0	31	—	491	—	—	31	1013	—
	Control	827	73.1 (7.9)	60–96	28.0 (1.8)	24–30	2	77	—	748	—	—	81	1573	—
	Male														
	LOAD	227	73.6 (7.2)	60–93	17.9 (7.3)	0–30	1	18	—	208	—	—	20	434	—
	Control	551	73.0 (7.8)	60–95	28.1 (1.8)	24–30	1	55	—	495	—	—	57	1045	—
<i>Positive-ϵ_4</i>															
	Female														
	LOAD	581	72.6 (6.0)	60–92	16.3 (6.6)	0–30	—	—	13	—	465	103	13	465	684
	Control	171	72.7 (7.6)	60–90	28.0 (1.9)	24–30	—	—	9	—	152	10	9	152	181
	Male														
	LOAD	196	72.9 (5.8)	60–86	18.9 (5.7)	1–30	—	—	4	—	148	44	4	148	240
	Control	117	73.7 (7.4)	60–91	27.9 (1.9)	24–30	—	—	6	—	104	7	6	104	124
<i>ϵ_3^*</i>															
	Female														
	LOAD	491	74.7 (7.0)	60–93	15.1 (7.3)	0–30	—	—	—	491	—	—	—	982	—
	Control	748	73.1 (7.9)	60–96	28.0 (1.8)	24–30	—	—	—	748	—	—	—	1496	—
	Male														
	LOAD	208	73.7 (7.3)	60–93	18.0 (7.3)	0–30	—	—	—	208	—	—	—	416	—
	Control	495	73.0 (7.8)	60–95	28.1 (1.8)	24–30	—	—	—	495	—	—	—	990	—
Screening sets															
<i>Exploratory</i>															
	Female														
	LOAD	249	74.3 (6.2)	62–90	15.7 (7.2)	0–30	—	—	—	249	—	—	—	498	—
	Control	223	80.2 (4.1)	75–96	28.0 (1.9)	24–30	—	—	—	223	—	—	—	446	—
	Male														
	LOAD	114	74.6 (6.8)	62–93	19.2 (7.6)	0–30	—	—	—	114	—	—	—	228	—
	Control	114	80.6 (4.0)	75–95	28.0 (2.0)	24–30	—	—	—	114	—	—	—	228	—
<i>Validation</i>															
	Female														
	LOAD	242	75.0 (7.7)	60–93	14.7 (7.3)	0–29	—	—	—	242	—	—	—	484	—
	Control	213	75.5 (4.7)	70–94	27.8 (1.9)	24–30	—	—	—	213	—	—	—	426	—
	Male														
	LOAD	94	72.6 (7.6)	60–92	16.8 (6.9)	0–29	—	—	—	94	—	—	—	188	—
	Control	159	75.7 (4.5)	70–92	28.1 (1.8)	24–30	—	—	—	159	—	—	—	318	—

The sample set IDs used in this study, i.e. single SNP case-control study, linkage disequilibrium and case-control haplotype analyses, and multiple logistic regression analysis, are shown in italics.

investigate this SNP further. In the female Validation set (LOAD, 242; controls, 213), 16 of the above-mentioned 34 SNPs exhibited allelic association with P -values < 0.05 . These SNPs exhibited significance on Mantel-Haenszel test of the two female sets (allelic P -values_{MH-F} = 0.00005945 – 0.0008809). These allelic P -values_{MH-F} remained at significant levels even after Bonferroni's correction for 34 tests (allelic P -values_{MH-F(B)} = 0.0002021 – 0.02995). Of the 16 SNPs, 9 (rs911541, rs3740066, rs11190302, rs35715207, rs3758394, rs3740058, rs3740057, rs11190315 and rs6584331) are located in a locus between *ENTPD7* and *DNMBP* recently reported by our group (26). The remaining seven, rs7909676, rs2394287, rs4459178, rs10997307, rs12258078, rs10822890 and rs713250, spanning about 38 kb, are encompassed by intron 9 of *CTNNA3*, which consists of 18 exons (Fig. 2A and C). The allelic P -values of these seven SNPs in the two sample sets, Exploratory and Validation, are

presented in Table 2, and marker information on them is summarized in Table 3. The genotypic and allelic distributions are presented in the Supplementary Material, Table S1.

To examine the gender-specific effects of the seven *CTNNA3* SNPs on LOAD, we additionally performed joint analysis regarding gender (Table 2). For this analysis, female and male allelic contingency tables were combined for the Exploratory and Validation sets, respectively (Supplementary Material, Table S1). χ^2 tests based on the combined 2 × 2 allelic contingency tables and calculation of the ORs with 95% CI were carried out. In the Exploratory set comprising both genders, none of these seven SNPs showed more significant association (allelic P -values = 0.00005431 – 0.0235) in comparison with the Exploratory set only including females (allelic P -values = 0.00004614 – 0.008). The ORs exhibited a tendency to decrease; for example, for SNP rs10822890, from 1.72 to 1.55. A similar trend for both the allelic

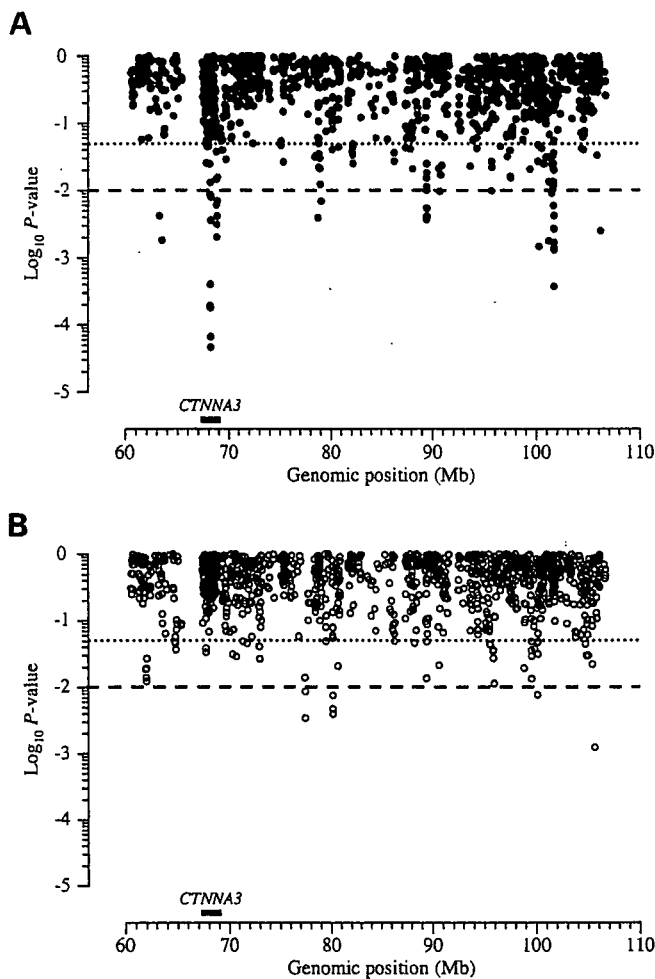


Figure 1. Allelic P -values of 1140 SNPs for the Exploratory set comprising female (A) (LOAD, 249; control, 223) or male (B) (LOAD, 114; control, 114) $APOE$ - $\epsilon 3^*3$ subjects. Dotted and dashed lines indicate allelic P -values at the 0.05 and 0.01 levels, respectively. The significantly associated locus focused on in this study is indicated by the thick line, which is labeled 'CTNNA3'. The genomic position conformed to NCBI build 35.1.

P -values and ORs of these seven SNPs was observed on Mantel-Haenszel test.

The reproducible seven SNPs on *CTNNA3* were further examined by means of stratified analysis, based on the carrier status of the $APOE$ - $\epsilon 4$ allele, with the χ^2 test (Table 4). The genotypic and allelic distributions are presented in the Supplementary Material, Table S2. We used the overall sample set, *All*, including all subjects (LOAD, 1526; controls, 1666) with all $APOE$ genotypes (2^*2 , 2^*3 , 2^*4 , 3^*3 , 3^*4 and 4^*4), and two sub-sample sets, *Negative- $\epsilon 4$* and *Positive- $\epsilon 4$* , which were stratified as to the presence (2^*4 , 3^*4 and 4^*4) or absence (2^*2 , 2^*3 and 3^*3) of the $APOE$ - $\epsilon 4$ allele (Table 1). As shown in Table 4, in the *All* set, five (rs7909676, rs2394287, rs4459178, rs10822890 and rs713250) of the seven SNPs were statistically significant in females (allelic P -values = 0.0009719 – 0.00126). In the *Negative- $\epsilon 4$* set, all seven SNPs exhibited more significant association with LOAD in females (allelic P -values = 0.00001019 – 0.002555). No evidence was found of association with any of the seven SNPs in males in any sample set.

For joint analysis concerning gender, female and male contingency tables (2×2) with the allelic distributions were combined for the *All*, *Negative- $\epsilon 4$* and *Positive- $\epsilon 4$* sample sets, respectively (Supplementary Material, Table S2). Allelic P -values and ORs (95% CI) derived from the combined contingency tables were used to evaluate the gender-specific effects on LOAD (Table 4). This analysis revealed that in the *All* set including both genders, the ORs of significant SNPs (rs7909676, rs10822890 and rs713250) tended to be lower, compared with those in the female *All* set; for example, from 1.23 to 1.11 for SNP rs713250. A similar decreasing tendency for ORs of significant SNPs (rs7909676, rs2394287, rs4459178, rs10997307, rs12258078, rs10822890 and rs713250) in the *Negative- $\epsilon 4$* set including both genders was also observed in comparison with those in the female *Negative- $\epsilon 4$* set; for example, from 1.42 to 1.24 for SNP rs10822890.

Multiple logistic regression analysis, involving $APOE$ - $\epsilon 4$, gender, age, the seven replicated SNPs on *CTNNA3* and their interactions as independent variables, was performed to assess the potential effects of these variables on the association with LOAD, using 2762 subjects [LOAD, 1313 (female, 949; male, 364); controls, 1449 (female, 877; male, 572)] (Table 5). In this analysis, the subjects used were not sub-grouped as to gender and/or carrier status of the $APOE$ - $\epsilon 4$ allele. Initially, we carried out multiple logistic regression analysis with a forward stepwise method without interaction terms to elucidate which variables explained an association with LOAD independently. Model 1 in Table 5 shows significant risk factors selected by this analysis. Expectedly, the $APOE$ - $\epsilon 4$ allele, gender and age, which are well-known risk factors for LOAD, had significant effects on the LOAD risk. Among the seven associated SNPs, SNP rs713250 was chosen as representative and selectively entered in this model [for genotype CC: OR (95% CI), 1.36 (1.08–1.71); P -value = 0.009]. Following this primary analysis, we further assessed second-order interaction terms created by the four significant risk factors including the SNP rs713250 (Model 2 in Table 5). Six interactions were tested by means of a forward stepwise method in addition to $APOE$ - $\epsilon 4$, gender, age and the SNP rs713250. It was demonstrated that the SNP rs713250 exhibited significant interaction with the female gender in a dose-dependent manner as to the allele C [TC_female, OR (95% CI) = 1.68 (1.12–2.54); CC_female, OR (95% CI) = 2.57 (1.59–4.17)].

Linkage disequilibrium and case-control haplotype analyses

To reveal genetic relationship between each significant SNP on *CTNNA3*, linkage disequilibrium (LD) and haplotype estimation analyses were performed. For these analyses, we used four sample sets (*All* as the overall sample set, and *Negative- $\epsilon 4$* , *Positive- $\epsilon 4$* and $\epsilon 3^*3$ as sub-sample sets) after being sub-grouped as to gender (Table 1). From the Japanese HapMap genotype data (JPT), these SNPs were found to be encompassed by a highly structured LD block extending about 80 kb from 68.10 to 68.18 Mb (Fig. 2B). They were in strong LD: the robust LD block structures did not differ between females and males or between LOAD and controls in any sample set (Supplementary Material, Fig. S1).

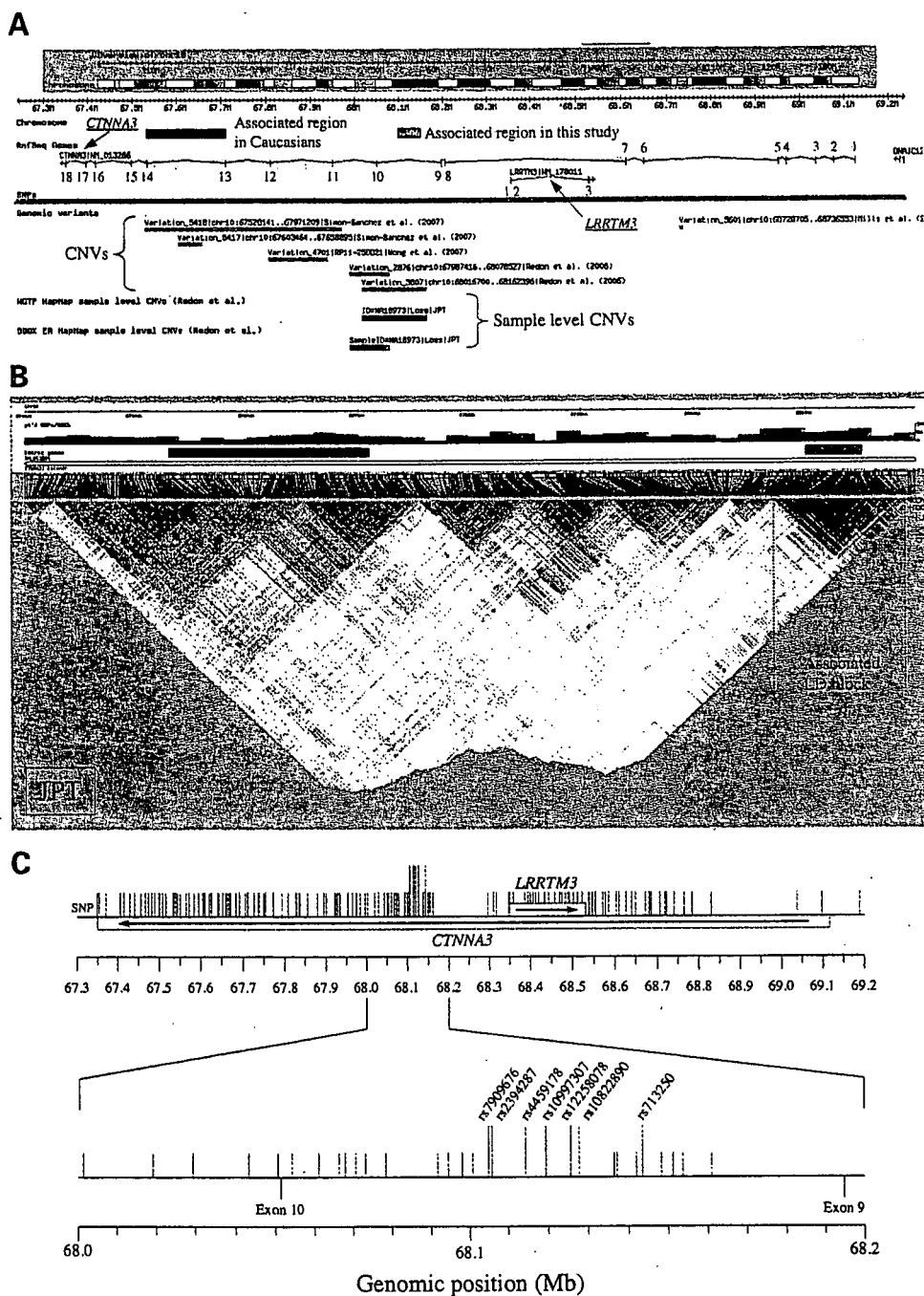


Figure 2. Genomic position and LD block structure of an associated locus within *CTNNA3*. (A) Genomic region including *CTNNA3* from web site Database of Genomic Variation (<http://projects.tcag.ca/variation/>). Boxes filled in green and black, also used in Fig. 2B, represent the associated genomic regions identified here and in studies on Caucasians (32,35,37), respectively. Each exon of *CTNNA3* and *LRRTM3* is numbered; CNV, copy number variation. (B) Overview of the LD pattern between 67.4 and 68.2 Mb in Japanese. HapMap genotype data (1768 SNPs) on 45 unrelated Japanese in Tokyo (JPT) were used as calculation of LD measures, D' . (C) Physical positions of the seven replicated SNPs. Vertical lines indicate the SNPs used in this study: significantly associated SNPs are indicated by the long labeled vertical lines. 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 35.1.

Four haplotypes were estimated in each LD block consisting of the seven SNPs: three major haplotypes (frequency >0.1), [H1]C-A-T-T-T-A-T, [H2]A-G-C-C-G-G-C and [H3]A-G-C-T-T-G-C, and one minor haplotype, [H4]C-A-T-T-T-A-C (Table 6). H1 exhibited the highest

frequency (range 0.4363–0.5356) and H4 the lowest (range 0.0084–0.031). Haplotypes H1, H2 and H3 were always estimated with the expectation-maximization (EM) algorithm in the four sample sets examined. Haplotype H4 was not inferred in either Negative- ϵ_4 or ϵ_3^*3 consisting of male subjects.

Table 2. Statistics for seven reproducible SNPs found on two-step screening involving *APOE-ε3*3*

Sample set	Exploratory		Validation		Exploratory + Validation ^a	
Female						
Number of subjects						
LOAD	249		242		491	
Control	223		213		436	
dbSNP	Allelic <i>P</i> -value	OR (95% CI)	Allelic <i>P</i> -value	OR (95% CI)	Allelic <i>P</i> -value	OR (95% CI)
rs7909676	0.0004042	1.61 (1.23–2.09)	0.0132	1.40 (1.07–1.82)	0.0002087	1.50 (1.24–1.81)
rs2394287	0.0001782	1.64 (1.27–2.13)	0.0427	1.31 (1.01–1.71)	0.00004311	1.47 (1.22–1.77)
rs4459178	0.0001939	1.64 (1.26–2.13)	0.0296	1.34 (1.03–1.75)	0.0002885	1.49 (1.23–1.79)
rs10997307	0.008686	1.45 (1.10–1.91)	0.0372	1.34 (1.02–1.76)	0.0008809	1.39 (1.15–1.69)
rs12258078	0.008	1.44 (1.10–1.89)	0.0352	1.34 (1.02–1.76)	0.0007658	1.39 (1.15–1.68)
rs10822890	0.00004614	1.72 (1.32–2.23)	0.0266	1.35 (1.04–1.75)	0.000008277	1.52 (1.27–1.83)
rs713250	0.00006663	1.69 (1.31–2.20)	0.0162	1.38 (1.06–1.80)	0.000005945	1.53 (1.27–1.84)
Male						
Number of subjects						
LOAD	114		94		208	
Control	114		159		273	
dbSNP	Allelic <i>P</i> -value	OR (95% CI)	Allelic <i>P</i> -value	OR (95% CI)	Allelic <i>P</i> -value	OR (95% CI)
rs7909676	0.2961	1.22 (0.84–1.77)	0.1933	0.78 (0.54–1.13)	0.8507	0.98 (0.75–1.27)
rs2394287	0.3418	1.20 (0.83–1.74)	0.0183	0.64 (0.44–0.93)	0.3125	0.87 (0.67–1.14)
rs4459178	0.3456	1.20 (0.82–1.74)	0.0209	0.65 (0.45–0.94)	0.3231	0.88 (0.67–1.14)
rs10997307	0.9594	1.20 (0.69–1.48)	0.2477	0.79 (0.54–1.17)	0.4350	0.90 (0.68–1.18)
rs12258078	0.8457	1.01 (0.71–1.52)	0.1901	0.77 (0.52–1.14)	0.4308	0.90 (0.68–1.18)
rs10822890	0.2235	1.26 (0.87–1.83)	0.0237	0.65 (0.45–0.95)	0.4534	0.91 (0.70–1.18)
rs713250	0.2588	1.24 (0.85–1.79)	0.0578	0.70 (0.49–1.01)	0.5761	0.93 (0.72–1.20)
Female + male						
Number of subjects						
LOAD	363		336		699	
Control	337		372		709	
dbSNP	Allelic <i>P</i> -value	OR (95% CI)	Allelic <i>P</i> -value	OR (95% CI)	Allelic <i>P</i> -value	OR (95% CI)
rs7909676	0.0004364	1.47 (1.19–1.82)	0.1668	1.16 (0.94–1.44)	0.0005443	1.30 (1.12–1.52)
rs2394287	0.0002861	1.48 (1.20–1.84)	0.6336	1.05 (0.85–1.30)	0.003812	1.25 (1.07–1.45)
rs4459178	0.0003147	1.48 (1.20–1.84)	0.5868	1.06 (0.86–1.31)	0.003417	1.25 (1.08–1.46)
rs10997307	0.0321	1.28 (1.02–1.60)	0.2511	1.14 (0.91–1.42)	0.02028	1.20 (1.03–1.41)
rs12258078	0.0235	1.29 (1.03–1.61)	0.2757	1.13 (0.91–1.40)	0.01778	1.21 (1.03–1.41)
rs10822890	0.00005431	1.55 (1.25–1.92)	0.4934	1.08 (0.87–1.33)	0.0008589	1.29 (1.11–1.50)
rs713250	0.00008381	1.53 (1.24–1.89)	0.2786	1.12 (0.91–1.39)	0.0003985	1.31 (1.13–1.52)

Allelic *P*-values and ORs, with 95% CI in parentheses, are indicated. Boldface indicates statistically significant results (allelic *P*-value <0.05). The genotypic and allelic distributions are shown in the Supplementary Material, Table S1.

^aComputed by the method of Mantel and Haenszel.

Table 3. Summary of seven associated SNPs within intron 9 of *CTNNA3*

dbSNP	Genomic position (bp) ^a	Alleles ^b	Exploratory			Validation				
			GSR	Frequency ^c	HWE ^d	GSR	Frequency ^c	HWE ^e		
						LOAD	Control	LOAD	Control	
rs7909676	68 104 803	C/A	96.43	0.507/0.493	0.3377	0.8206	96.75	0.506/0.494	0.6566	0.9161
rs2394287	68 105 668	A/G	97.57	0.521/0.480	0.5934	0.5760	97.88	0.517/0.483	0.741	1.0000
rs4459178	68 114 303	T/C	96.71	0.512/0.488	0.9137	0.5778	96.47	0.514/0.486	0.5784	0.9159
rs10997307	68 119 438	T/C	95.00	0.633/0.367	0.9107	0.6173	97.74	0.640/0.360	1.0000	0.1316
rs12258078	68 125 734	T/G	99.29	0.641/0.359	0.9116	0.6219	99.01	0.641/0.359	1.0000	0.1686
rs10822890	68 127 819	A/G	97.71	0.516/0.484	0.5208	0.5757	97.60	0.515/0.486	0.5055	1.0000
rs713250	68 143 405	C/T	98.43	0.501/0.499	0.5211	0.6579	98.45	0.503/0.497	0.7415	0.9170

GSR, genotyping success rate.

^aBased on dbSNP build 125 on NCBI build 35.1.

^bNucleotides of the major allele/minor allele.

^cThe major allele/minor allele frequency, calculated using genotype data obtained for 363 LOAD patients and 337 controls with *APOE-ε3*3* in the Exploratory set.

^d*P*-values were calculated with exact tests of HWE using both 363 LOAD patients and 337 controls with *APOE-ε3*3* in the Exploratory set.

^eThe major allele/minor allele frequency, calculated using genotype data obtained for 336 LOAD patients and 372 controls with *APOE-ε3*3* in the Validation set.

^f*P*-values were calculated with exact tests of HWE using both 336 LOAD patients and 372 controls *APOE-ε3*3* in the Validation set.

Table 4. Allelic association of seven associated SNPs, encompassed by intron 9 of *CTNNA3*, in the overall sample set, All, and two sub-sample sets, Negative- $\epsilon 4$ and Positive- $\epsilon 4$, stratified as to the presence or absence of the *APOE- $\epsilon 4$* allele

Gender	Female		Male		Female + male	
Sample set	All ^a					
Number of subjects	1526					
LOAD	1103		423		1526	
Control	998		668		1666	
dbSNP	Allelic <i>P</i> -value	OR (95% CI)	Allelic <i>P</i> -value	OR (95% CI)	Allelic <i>P</i> -value	OR (95% CI)
rs7909676	0.001646	1.22 (1.08–1.38)	0.2558	0.90 (0.76–1.08)	0.0472	1.11 (1.00–1.22)
rs2394287	0.001696	1.22 (1.08–1.38)	0.1906	0.89 (0.75–1.06)	0.0512	1.10 (1.00–1.22)
rs4459178	0.002843	1.21 (1.07–1.37)	0.2085	0.89 (0.75–1.07)	0.0681	1.10 (0.99–1.21)
rs10997307	0.2316	1.08 (0.95–1.23)	0.4329	0.93 (0.77–1.12)	0.517	1.03 (0.93–1.15)
rs12258078	0.2307	1.08 (0.95–1.23)	0.5439	0.94 (0.79–1.13)	0.4422	1.04 (0.94–1.16)
rs10822890	0.00126	1.22 (1.08–1.38)	0.2137	0.89 (0.75–1.07)	0.0402	1.11 (1.00–1.23)
rs713250	0.0009719	1.23 (1.09–1.39)	0.1358	0.88 (0.73–1.04)	0.0439	1.11 (1.00–1.22)
Sample set	Negative- $\epsilon 4$ ^b					
Number of subjects	1378					
LOAD	522		227		749	
Control	827		551		1378	
dbSNP	Allelic <i>P</i> -value	OR (95% CI)	Allelic <i>P</i> -value	OR (95% CI)	Allelic <i>P</i> -value	OR (95% CI)
rs7909676	0.00001471	1.42 (1.21–1.66)	0.6951	0.96 (0.76–1.20)	0.0008525	1.24 (1.09–1.41)
rs2394287	0.00005357	1.38 (1.18–1.62)	0.4346	0.91 (0.73–1.14)	0.003869	1.21 (1.06–1.37)
rs4459178	0.00005308	1.39 (1.18–1.62)	0.4728	0.92 (0.74–1.15)	0.003415	1.21 (1.07–1.38)
rs10997307	0.002555	1.28 (1.09–1.51)	0.8393	0.98 (0.77–1.23)	0.0163	1.18 (1.03–1.34)
rs12258078	0.001978	1.29 (1.10–1.52)	0.8693	0.98 (0.78–1.24)	0.0129	1.18 (1.04–1.35)
rs10822890	0.00001019	1.42 (1.22–1.67)	0.5198	0.93 (0.74–1.16)	0.001046	1.24 (1.09–1.41)
rs713250	0.00001576	1.41 (1.21–1.65)	0.5154	0.93 (0.74–1.16)	0.001162	1.24 (1.09–1.40)
Sample set	Positive- $\epsilon 4$ ^c					
Number of subjects	777					
LOAD	581		196		777	
Control	171		117		288	
dbSNP	Allelic <i>P</i> -value	OR (95% CI)	Allelic <i>P</i> -value	OR (95% CI)	Allelic <i>P</i> -value	OR (95% CI)
rs7909676	0.8115	0.97 (0.76–1.24)	0.1917	0.80 (0.58–1.12)	0.3764	0.92 (0.75–1.11)
rs2394287	0.8995	0.98 (0.77–1.26)	0.4275	0.87 (0.63–1.22)	0.7096	0.96 (0.79–1.17)
rs4459178	0.7375	0.96 (0.75–1.23)	0.2844	0.84 (0.60–1.16)	0.438	0.93 (0.76–1.12)
rs10997307	0.0409	0.77 (0.60–0.99)	0.4491	0.88 (0.62–1.24)	0.0528	0.82 (0.67–1.00)
rs12258078	0.0306	0.76 (0.59–0.97)	0.6752	0.93 (0.66–1.31)	0.0727	0.83 (0.68–1.02)
rs10822890	0.582	0.93 (0.73–1.19)	0.2816	0.84 (0.60–1.16)	0.3617	0.91 (0.75–1.11)
rs713250	0.9234	0.99 (0.77–1.26)	0.0784	0.74 (0.54–1.03)	0.3245	0.91 (0.75–1.10)

Allelic *P*-values and ORs, with 95% CI in parentheses, are indicated. Boldface indicates statistically significant results (allelic *P*-values < 0.05). The genotypic and allelic distributions are shown in the Supplementary Material, Table S2.

^aAll *APOE* genotypes (*APOE- $\epsilon 2$* *, *2***3*, *2***4*, *3***3*, *3***4* and *4***4*) comprising those of 1526 LOAD patients (female, 1103; male, 423) and 1666 controls (female, 998; male, 668).

^bNon-carriers of the *APOE- $\epsilon 4$* allele (*2***2*, *2***3* and *3***3*) comprising 749 LOAD patients (female, 522; control, 227) and 1378 controls (female, 827; male, 551).

^cCarriers of the *APOE- $\epsilon 4$* allele (*2***4*, *3***4* and *4***4*) comprising 777 LOAD patients (female, 581; male, 196) and 288 controls (female, 171; male, 117).

Because multiple SNPs may increase the risk of LOAD in combination, we carried out a case-control haplotype analysis (Table 6). In the All set, haplotypes H1 (permutation *P*-value = 0.0029) and H3 (permutation *P*-value = 0.0043) exhibited significant association in females. In both the Negative- $\epsilon 4$ and $\epsilon 3^*3$ sets, haplotypes H1, H2 and H3 exhibited significance in females (permutation *P*-value H1 < H2 < H3). In the All, Negative- $\epsilon 4$ and $\epsilon 3^*3$ sets, the frequency of haplotype H1 was decreased in LOAD, suggesting it is a protective haplotype for LOAD. On the other hand, haplotypes H2 and H3 were increased in LOAD, implying that they are risk haplotypes for LOAD. In males, each haplotype showed no significant difference in any sample set.

Of the four sample sets of females, three showed significant association in global tests: All (global permutation *P*-value = 0.0006), Negative- $\epsilon 4$ (global permutation

P-value = 0.0008), and $\epsilon 3^*3$ (global permutation *P*-value = 0.001). We did not detect significance in any haplotype in the female sub-sample set Positive- $\epsilon 4$ (global permutation *P*-value = 0.3323).

Relationship between the A β 40/42 ratio and genetic variation on *CTNNA3*

The levels of plasma A β 40 and A β 42 and their ratio (A β 40/42) were compared between LOAD patients (*N* = 456) and control subjects (*N* = 147) within different gender groups (Fig. 3A–C). The Mann-Whitney *U*-test was adopted as a non-parametric method for this analysis. In both the female and male groups, the A β 40 levels (Fig. 3A) and A β 40/42 ratio (Fig. 3C) were significantly higher in LOAD in comparison with those in controls. The A β 42 levels were significantly lower in LOAD compared with those in controls (Fig. 3B).