

200718031A

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手法に関する研究

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 浦上 克哉

平成20年(2008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手法に関する研究	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手法に関する研究.....	4
浦上 克哉	
2. 軽度認知機能障害の簡易スクリーニング手法に関する研究.....	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手法に関する研究

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
	山崎學	サンピエール病院・病院長
	井上仁	鳥取大学総合メディア基盤センター・准教授
	谷口美也子	鳥取大学医学部保健学科生体制御学・助教
分担研究協力者	宮永和夫	ゆきぐに大和病院・病院長
	大谷るみ子	福岡県高齢者グループホーム協議会・会長

研究要旨

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検査を1次検診に、Alzheimer's disease assessment scale(ADAS)を同コンピューターに導入したもの(TDAS)を2次検診に用いる検診システムの簡便性と有効性を多施設で確認した。さらに、認知症予防教室の効果判定にTDASを用いることで、客観的に信頼性の高い評価ができることを確認することができた。

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¹⁾。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Alzheimer's disease assessment scale(ADAS)を導入したもの(TDAS)である²⁾。本研究では、タッチパネル式コンピューターを用いた認知症検

診システムを多施設共同研究で有用性を確認する。次にこの方法で発見した軽度認知機能障害(MCI)に予防教室への参加を進め、認知症への進展予防効果を検証する。

B. 研究方法

青森県では五所川原市、平内町、新郷村の3地区、群馬県高崎市、鳥取県琴浦町、福岡県大牟田市で実施した。青森県五所川原市、平内町と新郷村 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、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。

鳥取県琴浦町と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、平内町、新郷村

五所川原市では、1次検診受診者94名、2次検診受診者18名、予防教室対象者9名であった。平内町では1次検診受診者139名、2次検診受診者22名、予防教室対象者16名であった。新郷村では、1次検診受診者69名、2次検診受診者25名、予防教室対象者16名であった。五所川原市の検診後の精密検査受診者の結果は、アルツハイマー型認知症5名、MCI6名、正常範囲1名であった。

2) 群馬県高崎市榛名町

群馬方式(アンケート、MMSE)では1次検診受診者116名、2次検診受診者42名、2次検診異常者12名(10.3%)であった。鳥取方式(タッチパネル式スクリーニング、タッチパネル式ADAS)では1次検診受診者124名、2次検診受診者41名、2次検診異常者20名(16.1%)であった。

3) 鳥取県琴浦町

1次検診受診者347名、2次検診受診者101名、予防教室参加者44名であった。認知症予防教室はスクリーニング検査では0.6ポイントの上昇、

TDASでは1.2ポイントの上昇であった。

4) 福岡県大牟田市

7月22日(日)中央公民館と手鎌公民館で実施した検診は、1次検診受診者77名、2次検診受診者19名、予防教室参加者13名(22.9%)であった。11月18日(日)に大牟田市文化会館で実施した検診は、1次検診受診者52名、2次検診受診者31名、予防教室参加者19名であった。認知症予防教室は現在実施中である。

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式コンピューターを用いた認知症スクリーニング検査を1次検査に、2次検査としてTDASを用いる検診システムの有用性を多施設で確認することができたと考える。この方式が評価され、検診の実施地区が青森県では平成18年度五所川原市のみであったものが、平成19年度には五所川原市に加えて平内町、新郷村にも広がり、平成20年度はさらに希望地区が増えている。鳥取県でも、斑研究对象地区に入っていないが、琴浦町以外に米子市、境港市日吉津村でも認知症検診と予防教室を行っている。

また、認知症予防教室の効果判定にTDASを用いることの有用性も併せて確認することができた。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り地域の認知症検診や予防教室の評価に用いるには良い方法と考えられる²⁾。琴浦町で実施した認知症予防教室の今年度は有意な改善効果を得ることができなかったが、昨年度は有意な改善を認めており、課題を明らかにして次年度の教室へ結び付けたい。

次年度は認知症予防教室への参加によりMCIから認知症への進展が防止できたことによる経済効果を検証したい。

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

研究題名：軽度認知機能障害の簡易スクリーニング手法に関する研究

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
山崎學 サンピエール病院・病院長
分担研究協力者 宮永和夫 ゆきぐに大和病院・病院長
大谷るみ子 福岡県高齢者グループホーム協議会・会長

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簡易スクリーニング検査法を1次検診に、Alzheimer's disease assessment scale (ADAS)を同コンピューターに導入したものの(TDAS)を2次検診に用いる検診システムの簡便性と有効性を多施設で確認することができた。さらに、認知症予防教室の効果判定に TDAS を用いることで、客観的に信頼性の高い評価ができることを確認することができた。

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¹⁾。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 Alzheimer's disease assessment scale (ADAS) を導入したものの (TDAS) である²⁾。

本研究では、タッチパネル式コンピューターを用いた認知症検診システムを多施設共同研究で有用性を確認する。

次にこの方法で発見した軽度認知障害 (MCI) に予防教室への参加を進め、認知症への進展予防効果を検証する。

B. 研究方法

青森県では五所川原市、平内町、新郷村の3地区、群馬県高崎市、福岡県大牟田市で実施した。

青森県五所川原市、平内町と新郷村 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、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。

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.

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り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、平内町、新郷村

五所川原市では、1次検診受診者 94 名、2次検診受診者 18 名、予防教室対象者 9 名であった。平内町では1次検診受診者 139 名、2次検診受診者 22 名、予防教室対象者 16 名 (39.0%) であった。新郷村では、1次検診受診者 69 名、2次検診受診者 25 名、予防教室対象者 16 名であった。五所川原市の検診後の精密検査受診者の結果は、アルツハイマー型認知症 5 名、MCI 6 名、正常範囲 1 名であった。

2) 群馬県高崎市榛名町

群馬方式 (アンケート、MMSE) では1次検診受診者 116 名、2次検診受診者 42 名、2次検診異常者 12 名 (10.3%) であった。鳥取方式 (タッチパネル式スクリーニング、タッチパネル式 ADAS) では1次検診受診者 124 名、2次検診受診者 41 名、2次検診異常者 20 名 (16.1%) であった。

3) 福岡県大牟田市

7月22日(日)中央公民館と手鎌公民館で実施した検診は、1次検診受診者 77 名、2次検診受診者 19 名、予防教室参加者 13 名 (22.9%) であった。11月18日(日)に大牟田市文化会館で実施した検

診は、1次検診受診者 52 名、2次検診受診者 31 名、予防教室参加者 19 名であった。予防教室は現在実施中である。

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1次スクリーニング法ならびに2次検査として TDAS を用いる検診システムの有用性を多施設で確認することができたと考える。また、予防教室の効果判定に TDAS を用いることの有用性も併せて確認することができた。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り地域の予防検診に用いるには良い方法と考えられる²⁾。次年度は認知症予防教室への参加により MCI から認知症への進展が防止できたことによる経済効果を検証したい。

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.

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ハイリスク者の調査を行い、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た。さらに、我々が開発したコンピュータ式治療効果判定システムを用いて介入プログラムの効果について評価を行った。

A. 研究目的

高齢者人口の増加に伴い、認知症患者が増加している。認知症は、介護する家族に大きな負担をしいるだけでなく、介護保険や医療費といった社会的コストの増加をももたらしており、認知症の予防は極めて重要な社会的課題となっている。もし、認知症患者の症状の進行を抑制できれば、あるいは発症を遅らせることができれば、個人にとっても社会にとってもその恩恵は大きい。認知症を引き起こす疾患はいくつかあるが、いずれにしても早期に発見して早期に適正な対応を行うことで症状の改善や進行の抑制が期待できる。認知症対策の要は早期発見であるという由縁はそこにある。しかしながら、物忘れは年のせいではかたがたないとして、初期症状が見過ごされる場合が多い。認知症が進行して徘徊や暴力などの問題行動が起きて初めて医療機関に訪れていたのでは進行予防という点からは遅きに失している。そこで、認知症を早期に発見するためには、地域住民への認知症の正しい知識の啓発活動と地域における早期発見プログラム

の重要性が指摘されている。我々は、地域住民を対象とした認知症スクリーニングの効率化を企図して認知症のスクリーニング（タッチパネル検査）及び認知症に対する効果判定の為のコンピュータシステム（

TDAS検査）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TDAS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、地域住民の認知症ハイリスク者の実態を調査すること、3）認知症予防の為の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

鳥取県琴浦町において、地域住民を対象とした認知症ハイリスク者のスクリーニングを目的としたタッチパネル検査を実施して、スクリーニング検査におけるタッチパネルの有用性についての評価を行った。被験者は男性107名、女性240名の合計347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77.6歳、76.6歳と78.1歳である。タッチパネル検査では、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ヶ月間行った。予防教室の前後でタッチパネル検査とTDAS検査を行った。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

タッチパネル検査は、被験者がコンピュータと対話しながら検査を行う。質問は画面に文字として表示されるだけでなく音声でも提供される。ほとんどの被験者は補助者の助けを借りずに約4分程度で検査を終了することができたが、聴力に衰えがある一部の被験者に対しては、補助者が質問を口頭で伝える必要があった。一次スクリーニングの得点分布は15点が93名、14点が153名、13点が41名、12点が24名、11点が15名、10点が7名で9点以下が14名であった。13点以下のハイリスク者は101名で全被験者の29%であった。ハイリスク者の内訳は、男性が30名で全男性被験者の28%、女性が71名で全女性被験者の30%であった。

13点以下のハイリスク者101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44名であった。その44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12.1点と12.7点で0.6点の向上があり、有意水準10%で有意差が認められた。一方、TDAS検査の予防教室前後の平均点はそれぞれ11.4点と12.6点であり、1.2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。

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し、多数の参加者を対象とするには多くの検査者が必要となる。コンピュータを用いた検査では、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補助者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4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られる。

認知症予防教室の効果について考察する。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、TDAS検査の平均点では変化が認められなかった。予防教室にはアルツハイマー型認知症と診断されており治療中の人々が15名参加していた。その中で、会の後で得点が5点以上悪化した人は7名おられた。さらに、会の参加者に3名の介護保険申請者がおられたが、このうちの2名は得点がそれぞれ15点と16点と大きく得点が悪化している。これらのことが、予防教室後のADAS全体の平均点悪化に影響したものと考えられる。一方、軽度認知機能障害の段階の参加者25名では、予防教室後で得点が5点以上悪化した人はわずか5名であり、ほとんどが改善または悪化の程度が少ない。このことから、早期発見による軽度認知機能障害の段階での介入活動の必要性和有効性が示唆される。

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
Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Matsubara E, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, Toyobe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y, Kuwana R	Genetic association of CTNNA3 with late-onset Alzheimer's disease in females	Human Molecular Genetics	Vol.16	2854-2869	2007
Wakutani Y, Kusumi M, Wada K, Kawashima M, Iahizaki K, Mori M, Mori N, Ijiri T, Adachi Y, Kuno N, Urakami K, Takeshima T, Nakajima K	Longitudinal changes in the prevalence of dementia in a Japanese rural area	Psychogeriatrics	Vol.7	150-154	2007
浦上克哉	口腔内崩壊錠の意義	CLINICIAN	Vol.54	95-98	2007
浦上克哉	認知症の薬物治療	軽度認知障害(MCI)		102-109	2007
浦上克哉、谷口美也子	アルツハイマー病の臨床診断－バイオマーカー	Medicina	Vol.44	1078-1081	2007
浦上克哉、谷口美也子	認知症の早期発見とバイオマーカー	日本老年医学雑誌	Vol.44	312-314	2007
神保太樹、浦上克哉	香り提示による感覚刺激と認知症の治療効果	AROMARESEARCH	Vol.8	17-23	2007
浦上克哉、谷口美也子	アルツハイマー病の診断と治療	Medico	Vol.38	5-11	2007
浦上克哉	アルツハイマー型認知症の予防医学	ANTI-AGING MEDICINE	Vol.3	40-44	2007
浦上克哉	アルツハイマー型認知症への薬物療法	Medical Practice	Vol.24	1379-1384	2007
浦上克哉	認知症予防検診と予防教室の必要性－課題と今後の展望	実践！脳リハビリ		112-113	2007
Urakami K	Prevention of dementia	Psychogeriatrics	Vol.7	93-97	2007
浦上克哉	認知症(アルツハイマー病)は生活習慣病？	「病氣予防」百科		216-217	2007
浦上克哉	治療薬の評価－認知症の薬物治療評価をどのようにすべきですか－	CLINICIAN	Vol.54	68-75	2007
浦上克哉	認知症診療に期待されるかかりつけ医の役割	鳥取医学雑誌	Vol.35	46-52	2007

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	アルツハイマー型認知症の 実地診療にかかわる課題を 考える この症例をどうみ るか	メディカル朝日	Vol.36	2-3	2007
浦上克哉、鳥羽研二、 荒井啓行、遠藤英俊	「座談会」認知症をめぐって ー早期発見から治療、予防に 向けて	Medico	Vol.38	28-39	2007
浦上克哉	早期発見はここまですすん だータッチパネルを用いた 認知症スクリーニング	ぽーればーれ		13	2007
浦上克哉	アルツハイマー病 II.基礎 編・アルツハイマー病の病 理・病態 危険因子としての 非遺伝的要因・教育、職業	日本臨床	Vol.66 増刊号	175-176	2008
浦上克哉	アルツハイマー病 III.臨床 編・MCI・簡易スクリーニン グ法	日本臨床	Vol.66 増刊号	573-576	2008
繁田雅弘、浦上克哉、 松本光央、木之下徹、 坂田増弘、望月秀樹	アルツハイマー型認知症の 実地診療にかかわる課題を 考えるーこの症例をどうみ るか	老年精神医学雑誌	Vol.19 増刊号	7-20	2008
浦上克哉	成功のカギは地域に住む人 自身、医師、行政 三つのパ ワーの集結 ー鳥取県境港市 の認知症予防教室ー	Dementia Care S upport	Winter	4-7	2008

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,‡}, Ryozo 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 β)] 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 β 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 β 42 and A β 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 β 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 β 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 (ϵ 2*2, ϵ 2*3, ϵ 2*4, ϵ 3*3, ϵ 3*4 and ϵ 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 β 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 \times 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	APOE						Allele			
						Genotype					$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$		
						2*2	2*3	2*4	3*3	3*4	4*4				
<i>Overall set</i>															
<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
<i>Subsets</i>															
<i>Negative-$\epsilon 4$</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-$\epsilon 4$</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>$\epsilon 3^*3$</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	—
<i>Screening sets</i>															
<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} = 0.000005945 – 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

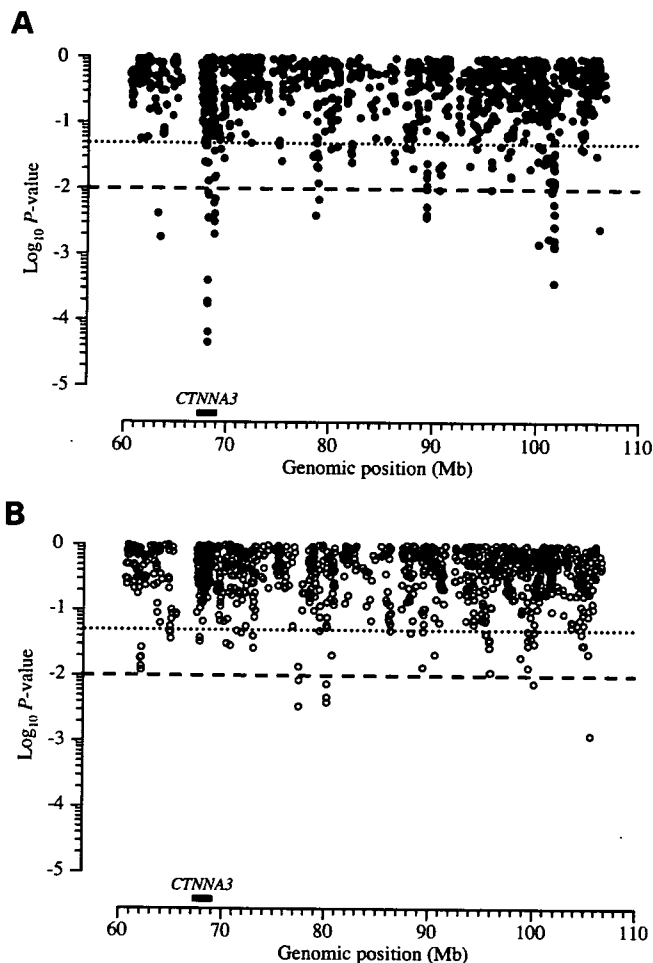


Figure 1. Allelic P -values of 1140 SNPs for the Exploratory set comprising female (A) (LOAD, 249; control, 223) or male (B) (LOAD, 114; control, 114) $APOE-\epsilon 3^*3$ subjects. Dotted and dashed lines indicate allelic P -values at the 0.05 and 0.01 levels, respectively. The significantly associated 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).

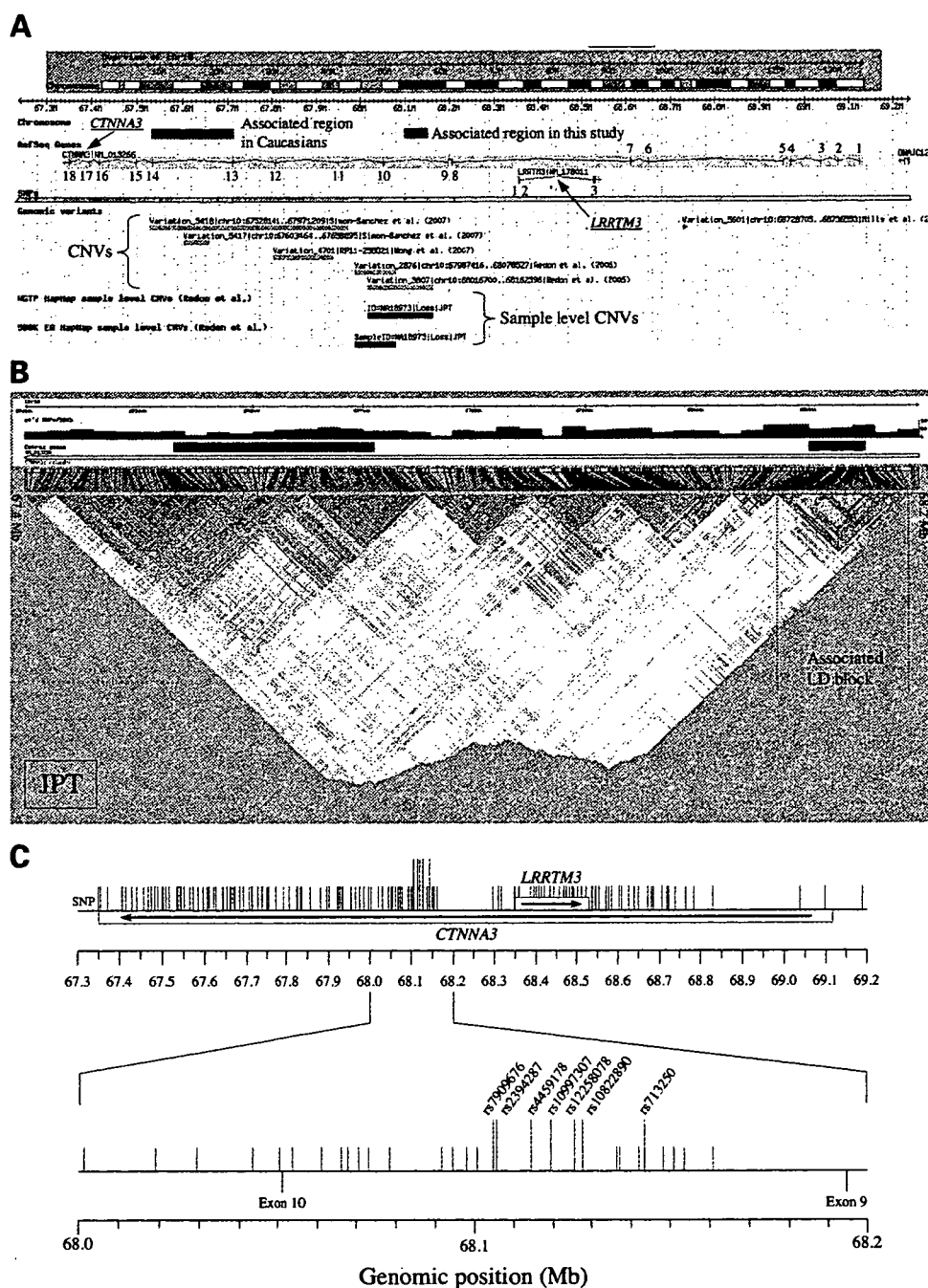


Figure 2. Genomic position and LD block structure of an associated locus within *CTNNA3*. (A) Genomic region including *CTNNA3* from web site Database of Genomic Variation (<http://projects.tcag.ca/variation/>). Boxes filled in green and black, also used in Fig. 2B, represent the associated genomic regions 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)	0.00002087	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)	0.00002885	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 ^e	HWE ^f		
					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						
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						
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						
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*, *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).

Table 5. Multiple logistic regression analysis

Variables ^a	Category	OR (95% CI)
Model 1		
<i>APOE</i>	$\epsilon 4$ (-) (Ref)	1.00
	$\epsilon 4$ (+)	5.00 (4.20–5.96)*
Gender	Male (Ref)	1.00
	Female	1.64 (1.38–1.94)*
SNP rs713250 ^b	TT (Ref)	1.00
	TC	1.13 (0.92–1.37)
	CC	1.36 (1.08–1.71)**
Age	—	1.01 (1.00–1.02)***
Model 2		
<i>APOE</i>	$\epsilon 4$ (-) (Ref)	1.00
	$\epsilon 4$ (+)	5.74 (3.62–9.10)*
Gender	Male (Ref)	1.00
	Female	0.88 (0.62–1.26)
SNP rs713250 ^b	TT (Ref)	1.00
	TC	0.81 (0.58–1.12)
	CC	0.75 (0.51–1.10)
Age	—	1.02 (1.01–1.03)**
SNP rs713250_gender ^b	Others (Ref)	1.00
	TC_Female	1.68 (1.12–2.54)**
	CC_Female	2.57 (1.59–4.17)*
Age_ <i>APOE</i>	Age_ $\epsilon 4$ (-) (Ref)	1.00
	Age_ $\epsilon 4$ (+)	0.97 (0.95–1.00)***
Gender_ <i>APOE</i>	Others (Ref)	1.00
	Female_ $\epsilon 4$ (+)	1.49 (1.03–2.15)**

Ref, reference.

P*-value <0.001; *P*-value <0.01; ****P*-value <0.05.^a— signifies the interaction between variables.^bGlobal *P*-value <0.05.

To determine whether or not the difference in the A β 40/42 ratio between LOAD and the controls is due to the SNPs identified here, two-way ANOVA was performed across diagnosis (LOAD and control) and three genotypic groups (major homozygotes, heterozygotes and minor homozygotes) within different gender and their combined groups (Fig. 3D–F). SNP rs713250 was used as a representative of the seven associated SNPs because it showed the most significant association with LOAD on Mantel–Haenszel test (allelic *P*-value_{MH-F} = 0.000005945), as shown in Table 2. The log-transformed A β 40/42 ratio values [$\log_2(\text{A}\beta 40/42 \text{ ratio} + 1)$] were used in this analysis. Before two-way ANOVA, the Kolmogorov–Smirnov (KS) normality test and Bartlett's test for equal variances were performed for the each dataset as to gender. Almost every sub-group examined passed the KS normality test. Both the female–male (Fig. 3D) and female (Fig. 3E) groups passed the Bartlett's test, but not the male group (Fig. 3F, *P* = 0.01178). Through two-way ANOVA, a significant effect of diagnosis was observed for every group (*P*-values <0.0001). However, we did not detect any genotype-dependent effect of this SNP on the A β 40/42 ratio, and no interaction between the SNP, A β 40/42 ratio and diagnosis.

DISCUSSION

In this study, we extended our previous work on chromosome 10q (26), and thoroughly reanalyzed the genotype data for 1140 SNPs in order to discover gender-related genetic loci

for LOAD. In a single SNP-based case–control study, we found seven SNPs on *CTNNA3* showing genetic association with LOAD in females with the *APOE*- $\epsilon 3^*3$ genotype or without the *APOE*- $\epsilon 4$ allele. Furthermore, multiple logistic regression analysis revealed that one (SNP rs713250) of these seven SNPs directly interacted with the female gender, but not with the male gender, and did not show any interaction with the *APOE*- $\epsilon 4$ allele at all. These are the first findings constituting evidence that *CTNNA3* may affect the development of sporadic LOAD through a novel female-specific mechanism independent of the *APOE*- $\epsilon 4$ allele. We consider the genetic association identified here to reflect one single signal. The reasons are: (1) the seven significant SNPs span only ~38 kb and are clustered in intron 9 of *CTNNA3* (Fig. 2A and C), which suggests a multiple-hit genomic region of SNPs associated with LOAD; (2) solid linkage disequilibrium was observed between all of these seven SNPs (*D'* > 0.9) (Supplementary Material, Fig. S1); and (3) the associated region was encompassed by a tight structured LD block extending ~80 kb (Fig. 2B).

Janssens *et al.* (29,30) cloned full-length *CTNNA3* cDNA as a novel member of the α -catenin gene family and determined its genomic structure. *CTNNA3* contains 18 exons and spans ~1.78 Mb (67.35–69.13 Mb), being the longest of all genes located on chromosome 10. The chromosomal location of *CTNNA3* is 10q21 (30), which includes the suggestive linkage region between microsatellite markers D10S1227 (57.20 Mb) and D10S1211 (66.39 Mb) in LOAD (24). Ertekin-Taner *et al.* (23) found a linkage with a maximum LOD score of 3.93 at 81 cM close to D10S1225 (64.43 Mb) using the plasma A β 42 level as a surrogate trait in a set of LOAD families, and the same chromosomal region was identified by Myers *et al.* (24) by means of genome-wide screening of sibling pairs with LOAD. To date, there have been six papers on the genetic association of *CTNNA3* with LOAD (32–37). In the first report (32), it was demonstrated that two SNPs located in intron 13 of *CTNNA3* are associated with familial LOAD with high levels of plasma A β 42, which was used as an intermediate phenotype related to AD. These intronic SNPs, spanning 423 bp, are rs12357560 and rs7070570: the former lies 1174 bp upstream, and the latter 1597 bp downstream from exon 14, respectively. They are in strong LD: *D'* = 1 in all four populations, CEU, CHB, JPT and YRI, used in the HapMap project (38). A genotype-dependent correlation between SNP rs7070570 and the plasma A β 42 level has also been detected: the major homozygote (TT) is associated with the highest level of A β 42, the heterozygote (TC) with an intermediate level and the minor homozygote (CC) with the lowest level (32). Martin *et al.* (34) found that SNP rs7074454 located in intron 13 of *CTNNA3*, lying 355 bp upstream from SNP rs7070570, was significantly associated with both familial and sporadic cases of LOAD. Non-synonymous SNP rs4548513 (AGC → AAC, Ser596Asn) located in exon 13 of *CTNNA3*, lying 175 721 bp upstream from SNP rs7070570, has been shown to be associated with familial AD (37). All of these four SNPs, rs7070570, rs12357560, rs7074454 and rs4548513, lie in a genomic region extending from exons 13 to 14 (Fig. 2A), which has been shown to be located within a large LD block spanning around 310 kb (67.43–67.74 Mb)

Table 6. Case-control haplotype analysis

Sample set	Gender	Number of subjects		Haplotype ^a	Frequency		Number of estimated alleles		Permutation P-value (10 000)	OR (95% CI)
		LOAD	Control		LOAD	Control	LOAD	Control		
All	Female	1103	998	[H1]C-A-T-T-T-A-T	0.4717	0.5174	1041	1033	0.0029	0.83 (0.74–0.94)
				[H2]A-G-C-C-G-G-C	0.3592	0.3375	792	674	0.1538	1.10 (0.97–1.25)
				[H3]A-G-C-T-T-G-C	0.1406	0.1110	310	222	0.0043	1.31 (1.09–1.57)
				[H4]C-A-T-T-T-A-C	0.0196	0.0169	43	34	0.5632	1.15 (0.73–1.81)
				Others ^b	0.0089	0.0172	20	33	—	—
				Sum	1.0000	1.0000	2206	1996	—	—
				Global	—	—	—	—	0.0006	—
	Male	423	668	[H1]C-A-T-T-T-A-T	0.5293	0.4973	448	664	0.145	1.14 (0.96–1.35)
				[H2]A-G-C-C-G-G-C	0.3344	0.3415	283	456	0.7739	0.97 (0.81–1.16)
				[H3]A-G-C-T-T-G-C	0.1179	0.1314	100	176	0.3927	0.88 (0.68–1.15)
				[H4]C-A-T-T-T-A-C	0.0084	0.0131	7	18	0.3117	0.61 (0.25–1.47)
				Others ^b	0.01	0.0167	8	22	—	—
				Sum	1.0000	1.0000	846	1336	—	—
				Global	—	—	—	—	0.2273	—
Negative-ε4	Female	522	827	[H1]C-A-T-T-T-A-T	0.4430	0.5228	462	865	< 0.0001	0.72 (0.62–0.85)
				[H2]A-G-C-C-G-G-C	0.3888	0.3273	406	541	0.0008	1.31 (1.11–1.54)
				[H3]A-G-C-T-T-G-C	0.1418	0.1132	148	187	0.0323	1.30 (1.02–1.63)
				[H4]C-A-T-T-T-A-C	0.0206	0.0185	22	31	0.6661	1.13 (0.65–1.96)
				Others ^b	0.0058	0.0182	6	30	—	—
				Sum	1.0000	1.0000	1044	1654	—	—
				Global	—	—	—	—	0.0008	—
	Male	227	551	[H1]C-A-T-T-T-A-T	0.5240	0.5039	238	556	0.5078	1.08 (0.87–1.35)
				[H2]A-G-C-C-G-G-C	0.3479	0.3456	158	381	0.9532	1.01 (0.80–1.27)
				[H3]A-G-C-T-T-G-C	0.1167	0.1289	53	142	0.5618	0.89 (0.64–1.25)
				Others ^b	0.0114	0.0216	5	23	—	—
				Sum	1.0000	1.0000	454	1102	—	—
				Global	—	—	—	—	0.7917	—
				ε3*3	Female	491	748	[H1]C-A-T-T-T-A-T	0.4363	0.5179
[H2]A-G-C-C-G-G-C	0.3919	0.3305	385					494	0.0019	1.31 (1.11–1.55)
[H3]A-G-C-T-T-G-C	0.1436	0.1151	141					172	0.0405	1.29 (1.02–1.64)
[H4]C-A-T-T-T-A-C	0.0219	0.0178	22					27	0.4617	1.25 (0.71–2.20)
Others ^b	0.0063	0.0187	6					28	—	—
Sum	1.0000	1.0000	982					1496	—	—
Global	—	—	—					—	0.001	—
Male	208	495	[H1]C-A-T-T-T-A-T		0.5214	0.4995	217	491	0.383	1.11 (0.88–1.39)
			[H2]A-G-C-C-G-G-C		0.3459	0.3525	144	349	0.8585	0.97 (0.76–1.24)
			[H3]A-G-C-T-T-G-C		0.1202	0.1300	50	129	0.6659	0.91 (0.64–1.29)
			Others ^b		0.0125	0.0220	5	21	—	—
			Sum		1.0000	1.0000	416	990	—	—
			Global		—	—	—	—	0.8879	—
			Positive-ε4		Female	581	171	[H1]C-A-T-T-T-A-T	0.4976	0.4907
[H2]A-G-C-C-G-G-C	0.3327	0.3870		387				132	0.0799	0.79 (0.62–1.02)
[H3]A-G-C-T-T-G-C	0.1396	0.1009		162				35	0.0797	1.42 (0.96–2.09)
[H4]C-A-T-T-T-A-C	0.0187	0.09		22				3	0.2313	2.18 (0.65–7.33)
Others ^b	0.0114	0.0124		14				4	—	—
Sum	1.0000	1.0000		1162				342	—	—
Global	—	—		—				—	0.3323	—
Male	196	117		[H1]C-A-T-T-T-A-T	0.5356	0.4638	210	109	0.0961	1.32 (0.96–1.83)
				[H2]A-G-C-C-G-G-C	0.3188	0.3238	125	76	0.934	0.97 (0.69–1.38)
				[H3]A-G-C-T-T-G-C	0.1193	0.1459	47	34	0.3988	0.80 (0.50–1.29)
				[H4]C-A-T-T-T-A-C	0.0129	0.0310	5	7	0.1429	0.42 (0.13–1.34)
				Others ^b	0.0134	0.0355	5	8	—	—
				Sum	1.0000	1.0000	392	234	—	—
				Global	—	—	—	—	0.0728	—

Statistically significant haplotypes and permutation P-values are highlighted in bold.

^aThe SNP order, from left to right, is as follows: rs7909676, rs2394287, rs4459178, rs10997307, rs12258078, rs10822890 and rs713250.

^bHaplotypes with frequencies <0.01 in both LOAD and control subjects.

in CEU subjects (37) (Supplementary Material, Fig. S2). They have a tendency to exhibit selective association with familial rather than sporadic LOAD (32,35,37). Therefore, it is likely that the large LD block region contributes to a specific form

of familial LOAD in Caucasians. We also assessed these four SNPs and SNPs neighboring them in our Japanese sporadic LOAD subjects, however, none of these SNPs exhibited significant association (data not shown). In the genomic