

アルツハイマー病の大規模遺伝子解析

桑 野 良 三

新潟大学脳研究所附属生命科学リソース研究センター
遺伝子機能解析学分野

Genome-wide Association Study on Alzheimer's disease

Ryozo KUWANO

*Department of Molecular Genetics, Center for Bioresources,
Brain Research Institute, Niigata University*

要 旨

高齢社会を迎えた今日、豊かで健康な日々を楽しむ健康寿命を延ばすことは私たちの願いである。高齢者疾患を克服する医療は国民的な課題となっている。「軽い物忘れ」からやがて「嚙んでも飲み込むことがわからない」状態に進行する認知症は、本人のみならず家族も巻き込む社会的な疾患と考えられる。アルツハイマー病脳の病理は30年をかけて静かに進行し、症状を自覚した時点で、既に手遅れの不可逆的变化となっている。したがって、健康脳の段階から個人個人が遺伝的発症リスクを知り、早期の根本治療あるいは予防に努めることは最も重要となってくる。

キーワード：アルツハイマー病，相関解析

はじめに

我々は長寿と引き換えに、これまで経験したことのない病気と向き合うことになった。その一つがアルツハイマー病（AD）である。ADは加齢に伴って増加し、65歳で7～10%が罹患している。ADも多くの病気と同じく、ゲノム情報をベースに、体内あるいは外部環境要因が加わって生じる

生体反応の破綻と捉えることが出来る。2000年に、高齢者の5大疾患（認知症，がん，高血圧，糖尿病，喘息）を克服し、健康で豊かな社会を目指したミレニアム研究プロジェクトが開始された。新潟大学（旧遺伝子実験施設）は、認知症のゲノム解析を分担することになった。本稿ではADのゲノム解析について、これまでの経緯と取り組みを紹介したい。

Reprint requests to: Ryozo KUWANO
Department of Molecular Genetics
Brain Research Institute Niigata University
1-757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先：〒951-8585 新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学脳研究所附属生命科学リソース研究センター
遺伝子機能解析学分野 桑 野 良 三

遺伝子実験施設の活動

分子生物学の進展に伴って、組み換え DNA 実験を行う“場”を提供する目的で、全国に全学共同利用の遺伝子実験施設が設置された。所轄する部局は大学によって異なり、農学部、理学部、医学部、歯学部、薬学部、工学部に設置された。やがて10年～20年が経過すると、当時最先端であった遺伝子解析機器が古くなり、遺伝子実験施設よりも学部や研究所に組換え DNA 実験室の整備と分析機器など設備が整い、各部局での研究が可能となった。そこで、各大学に特色ある遺伝子実験施設の運営を強く求められてきた。ミレニアムプロジェクト開始と共に、新潟大学は脳疾患遺伝子タイピングセンターに生まれ変わった。ミレニアムプロジェクトが始まるまでは、「分子から固体まで」遺伝子研究が行える環境作りを目標にしてきた。筆者自身も脳の形態形成と機能維持に関する分子に注目して、「神経成長円錐を構成する分子の系統的分離精製と解析」、並びに「発生工学的手法による個体レベルにおける遺伝子発現調節の解明」を2柱として研究を行ってきた。

AD と遺伝子研究

1901年11月26日、フランクフルト市立精神病院でアルツハイマーが51歳のAuguste Dを診察した。1906年4月8日に死亡し、病理解剖が行われた。アルツハイマーは4年間の詳細な診療経過の記述と友人のニッスルの手法を用いた脳病理の所見をまとめて、1906年11月3日、チュービンゲンで開かれた第37回南西ドイツ精神科医学会「大脳皮質の特異な疾患について」で講演し翌年学会誌に発表した¹⁾。これが最初のADの報告である。1910年エミール・クレッペリンが教科書を改訂するとき、ADの名称を記載した。

ADには多発家系が存在することから、遺伝要因の関与が示唆され、1987年に第21番染色体が家族性ADに連鎖することが報告された。その後は、第21番染色体(21q21.2)のAmyloid Precursor Protein (APP)、第14番染色体(14q24.2)の

Presenilin 1 (PSEN1)、第1番染色体(1q42.13)のPresenilin 2 (PSEN2)の3つ原因遺伝子が次々と発見された。1995年に原因遺伝子APPのV717F変異を導入したトランスジェニックマウスで、ADの神経病理像が観察され、遺伝子の関与が証明された²⁾。

AD 関連遺伝子

家系に基づく遺伝子解析から原因遺伝子が同定され、AD発症の研究が飛躍的に進んだ。これまでに報告された家族性ADの原因遺伝子であるAPP, PSEN1, PSEN2の配列変異がAD & FTD mutation Database (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/>)に登録されている。しかし、大多数のADは常染色体優性遺伝形式をとらず、加齢に伴って有病率罹患率ともに増加する晩期発症の孤発性ADである。確実な危険因子は加齢であるが、年をとれば誰でもADになるわけではなく、発症するかしないかはその人の遺伝情報をベースとして、環境要因に左右されると考えられる(図1)。孤発性ADについて、1993年に最も強いリスク遺伝子であるAPOE(第19番染色体)が発見された³⁾。APOEは民族を越えた遺伝的危険因子として唯一認められている。しかし、リスクアレルであるAPOE ϵ 4を有するが発症しないことがあり、APOEで説明できるのは統計的に全体の20%以下と計算されるので $[\lambda S > \lambda gS(APOE)]$ 、そのほかに危険因子の存在が示唆されている。

多施設共同研究

遺伝子解析で最も重要な点は臨床診断に裏付けられた「質」の高い試料を大規模に収集することである。大多数を占める晩期発症の孤発性ADの遺伝的危険因子の探索を目的として、ADと健常高齢者のゲノムを比較する相関解析を行う。そのためには多数の試料が必要となる。ミレニアムプロジェクトの受け皿として、文部科学省特定領域研究「先端脳」に大規模検体収集のために、45施設からなるオールジャパン体制のJGSCAD(The

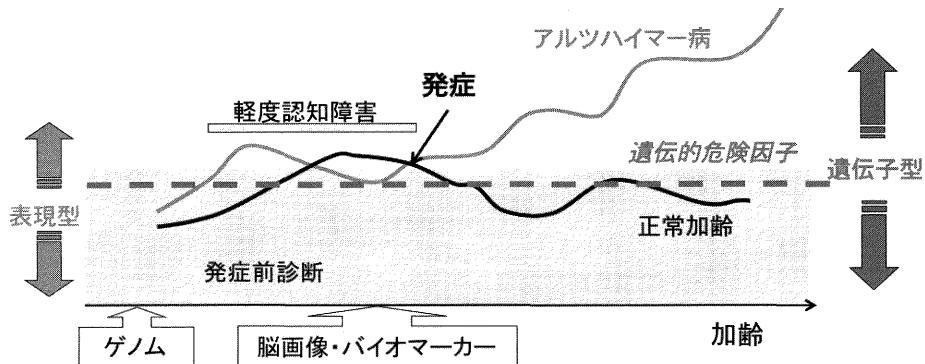


図1 アルツハイマー病発症

病気（表現型）はゲノムをベースとして環境因子が加わった異常な生体反応と捉え、遺伝子型が、表現型の閾値を上下させる。

Japanese Genetic Study Consortium for AD）が組織された（図2）。多施設共同研究であるJGSCADに参加した施設は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の承認を得て試料を収集し、新潟大学タイピングセンターでゲノム解析を一括して行う体制とした。地域や診療機関によらず均一な試料であるかをまずチェックした。おおざっぱに、東日本と西日本に分けて、APOE 遺伝子型を比較した。AD 群と健常高齢者群は同じ頻度であったので、全試料を一括してオールジャパンの日本人試料として以後の解析に使用することにした（図2）。

相関解析と平行して、同胞対解析を行うために、日本神経学会、老年精神医学会の全会員にアンケートを送りAD 同胞発症例の収集に協力を呼びかけた。実際には高齢者のためどちらかが亡くなったり、家族間の行き来が途絶えたりして、なかなか症例が集まらない。約50ペア集まった段階で、常染色体優性遺伝をチェックするため原因遺伝子をシークエンスした。晩期発症を対象としたので、2家系を除いて原因遺伝子に変異はみられなかった。一方、40－50代に発症した家族性では、新規の変異を含め高い頻度で原因遺伝子変異がみつかっている。

またJGSCADを中心として研究支援の一環として、常染色体優性遺伝が疑われる症例について、

原因遺伝子 *APP*、*PSEN1*、*PSEN2* および *MAPT* の全エクソンのシークエンス解析結果を依頼元に報告している。

公開データ

全ゲノム解析に家系内発症例を用いた連鎖解析結果、および高齢発症（late-onset）AD（LOAD）関連遺伝子がALZGene（<http://www.alzforum.org/res/com/gen/alzgene/default.asp>）に公開されている。10年間でその数は531遺伝子に達する。連鎖解析の結果を反映しているのかも知れないが第10番染色体の遺伝子が最も多い。人種差やサンプル数の違いによってADとの相関が見られたり、見られなかったり、結果が必ずしも一致しない。そこでBertramら⁴⁾は、4つ以上の異なるサンプルセットで相関解析が行われた遺伝子を対象にメタ解析を行っている。メタ解析の結果は、相関が強い順番から「Top ALZGene Results」として上記ALZGeneに紹介されている。

候補遺伝子アプローチ

ADをゲノム情報から解析する場合、候補遺伝子アプローチが多く採用されてきた。第19番染色体のAPOE 遺伝子型に関しては、アフリカのヨ

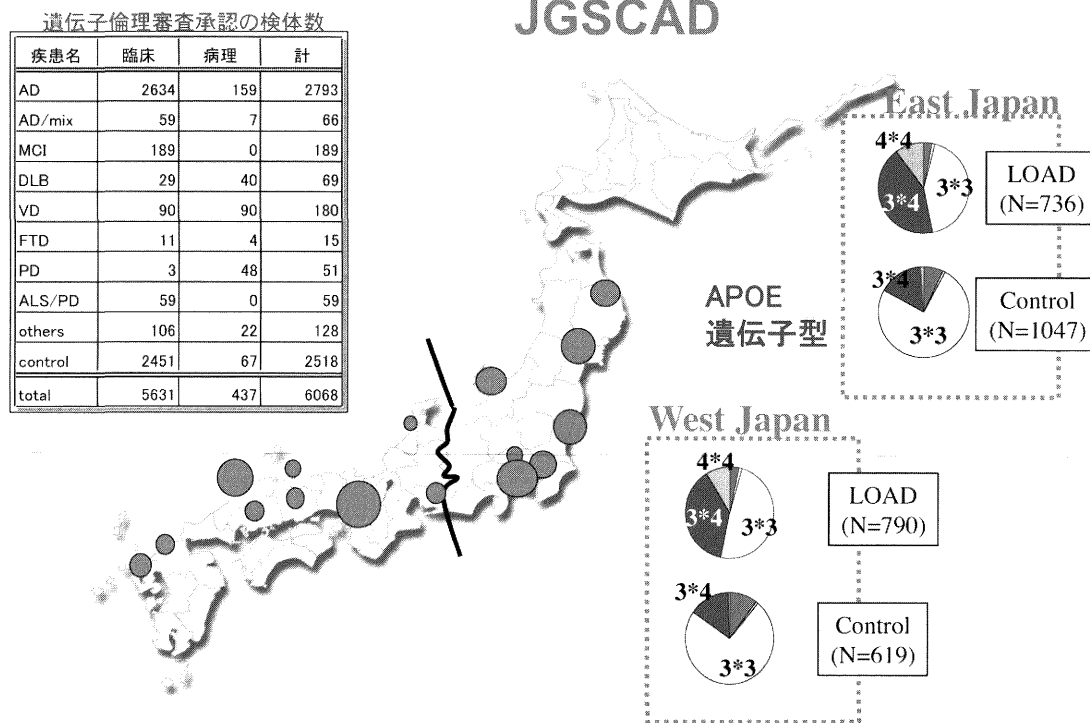


図2 オールジャパン体制のJGSCADによる大規模検体収集
赤丸は主な試料提供施設。APOE 遺伝子型には地域差がない。

ルバ族を除けば民族を越えた最も強力なリスク遺伝子と考えられている。65歳以上のアフリカ系アメリカ人(AD162例—正常318例)では有意にAPOE ϵ 4がリスクとなり、APOE ϵ 2は防護因子であった。ヨルバ族は唯一APOE ϵ 4がリスクとならない種族である。

AD脳で細胞内小器官の輸送に関連するタンパク発現が減少し、またエンドサイトーシスが関与してA β 産生が増加することが知られている。輸送関連遺伝子の相関解析から sortilin-related receptor (SORL1; 11q23.2) が同定された⁵⁾。最近、dynamin1と相同の dynamin2 (DNM2) が、日本人LOAD429例—対照群438例の相関解析でリスク遺伝子として同定され、海馬においてその発現量が低下していた⁶⁾。AD発症に細胞内の輸送系の関与は病態解明の新しい切り口になるか

も知れない。これらの候補遺伝子アプローチは限られた遺伝子ではあるが一定の成果を上げてきた。

染色体ワイドアプローチ

Hamshereら⁷⁾は家系内発症のLOAD723対を対象として連鎖解析を行った。その結果、LODが1以上の領域は、染色体9番(9p21.3, 9q22.33)、10番(10q21.2)、19番(19q13.32)であると報告している。

我々も染色体10番(10qの60Mbから107Mb)のSNP相関解析を集中的に行った。工夫したのはAPOEの遺伝子型で層別化したことである。つまり、APOEは非常に強いリスク遺伝子であるが、ADの約半数はAPOE ϵ 4アリルを持たずに発病しているので、APOE ϵ 4の影響を排除してリスク

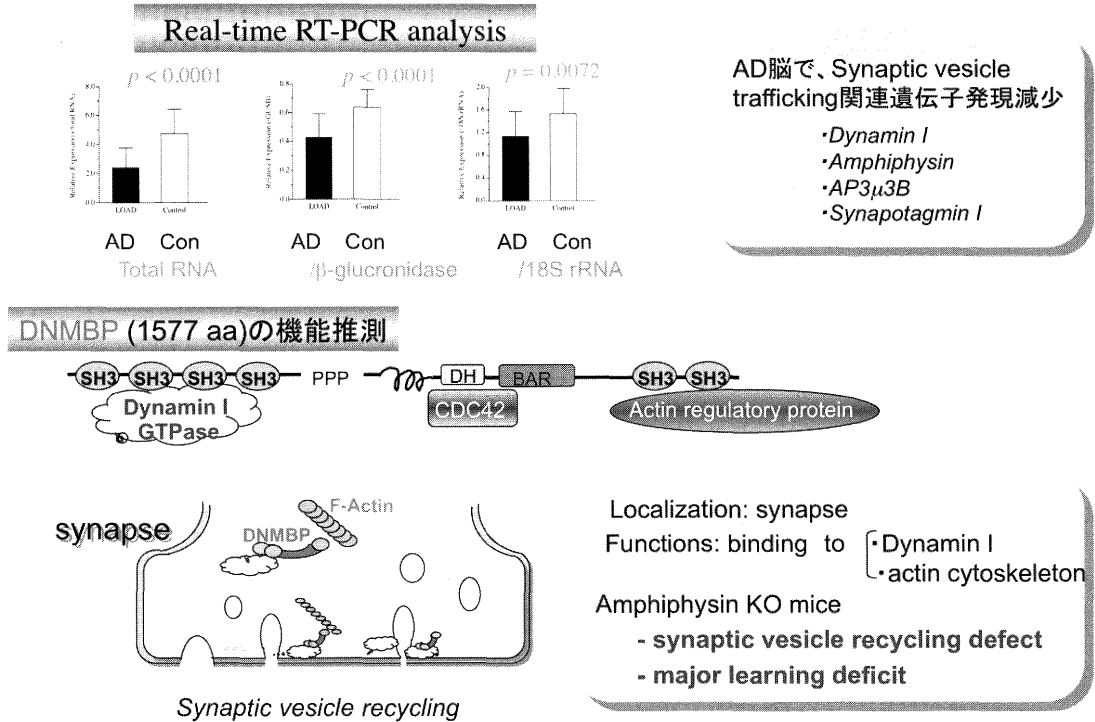


図3 新規ADリスク遺伝子 *DNMBP*の発現解析とDNMBPのタンパク構造

Real-time RT-PCRで有意にAD脳でのDNMBP発現量は減少している。DNMBP機能ドメインとシナプスにおける機能推測。

遺伝子を探索することにした。APOEε3*3遺伝子型だけのサンプルセット(exploratoryとvalidation)を準備し、1206 SNPを用いて2段階相関解析法で解析した⁸⁾。その結果6SNPが有意にLOADと相関した。6SNPはectonucleotide triphosphate diphosphohydrolase 7(*ENPTD7*)からdynamnin binding protein(*DNMBP*)までの5つの遺伝子を含む比較的狭い領域(220kb)にあり、そのうち3SNPは*DNMBP*内にあった。*DNMBP*はシナプスに局在し、DynamninI(GTPase)およびアクチン重合を制御する分子と結合することから、シナプス小胞のリサイクリングに関与すると考えられる(図3)。実際LOAD患者脳で*DNMBP*の発現量が有意に低下し、シナプスにおける輸送系の遺伝子発現が減少する報告⁹⁾とよく一致した。AD初期の状態では*DNMBP*の発現量の低下がシ

ナプスの機能不全をもたらすと予想している。しかし、コーカシアンLOAD1030例—対照群910例では*DNMBP*がリスクとならなかった¹⁰⁾が、ベルギー人LOAD555例—対照群638の解析では有意となった¹¹⁾。

染色体10番に関しては、Grupeら¹²⁾も1412 SNPを用いて、677個の遺伝子を解析し、LOC439999の遺伝子内の1つのSNPがLOADとの相関することを見出した。Morganらは連鎖領域に存在する67遺伝子内に、高密度のSNP(1SNP/10Kb)を設定し、DDK, ANKK3, CTNNA3, CXXC6がLOADと相関することを見出した¹³⁾。

疫学調査からADは女性に多いことから、性差依存性リスク遺伝子の探索を目的として、男女で層別化して解析を行った。CTNNA3のイントロン内の複数のSNPが有意であった。続いて年齢、

性別, *APOE* 遺伝子型, リスク SNP によるロジスティック回帰解析を行った結果, *CTNNA3* は *APOE* $\epsilon 3 \times 3$ 遺伝子型をもつ高齢の日本人女性に強いリスクとなる遺伝子であることが判った¹⁴⁾.

第10番染色体以外では, Li ら¹⁵⁾ は, 第9番染色体で機能的 SNP (アミノ酸置換, 転写因子の結合領域, エクソンのスプライシングなど) に注目して解析を行い, *DAPK1* の2つの SNP が LOAD と相関することを示した. 第12番染色体では, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPD*) と LOAD との相関を見出し, *GAPD* がニューロンのアポトーシスを誘導する作用が AD に関与すると推測している¹⁶⁾. 木村ら (2007)¹⁷⁾ は, 第21番染色体の 33Mb に 417 マーカーを設定し, 日本人 AD 374 例と対照群 375 例の相関解析を行い, ダウン症候群の責任領域に新規のリスク遺伝子 dual-specificity tyrosine-regulated kinase 1A (*DYRK1A*) を同定した. *DYRK1A* mRNA 発現量は病理学的正常脳と比較して AD 海馬で有意に高く, トランスジェニックマウスや培養細胞の実験において, A β 産生が *DYRK1A* 転写およびタウのリン酸化を亢進させることから, *DYRK1A* は A β 産生とリン酸化を仲介する中心的な分子ではないかと推測している.

ゲノムワイドアプローチ

Genome-wide Association Study (GWAS) は, 候補遺伝子アプローチと異なり, 新規のリスク遺伝子を発見する可能性があって, これまでに気づかなかった病因論の展開が期待される.

Grupe ら¹⁹⁾ は, DNA をプールした検体を対象として 17343 カ所の機能的な SNP による GWAS を行った. 同定された遺伝子 8 つが, 上記 ALZGene メタ解析の上位 30 位に含まれていた. 近年, 高密度 SNP を搭載した GeneChip を用いた GWAS が大規模検体を使って行われている. Pearson ら¹⁹⁾ は, 低コストで GWAS を行うために, プールした DNA を用いた解析方法を提案し, *APOE* と AD との相関が検出できたので, プール DNA 法は有効であることを証明した.

Reiman ら (2007)²⁰⁾ は, Affymetrix 社の 500K GeneChip を用いて, ゲノムワイドに 502,627 SNP 解析し, GRB-associated binding protein 2 (*GAB2*) と LOAD と強い相関 (OR; 4.06, 95 % CI; 2.81-14.69) を見出した. この相関は, *APOE* $\epsilon 4$ アリルを持つ場合にはリスクをさらに増強する. また, LOAD 患者の脳で *GAB2* は, 海馬, 後部帯状回皮質での発現が増加していること, タウのリン酸化に影響すること, ニューロンに存在することなどが示された. そこで, 日本人でもリスクとなるかを検討するため JGSCAD で収集した試料で Replication study を行ったところ, AD と優位な相関はみられなかった²¹⁾. 最近, AD とパーキンソンは共に神経変性疾患なので両疾患に共通する遺伝子を探索し, neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated (*NEDD9*) が同定された (AD に対して OR; 1.38, 95 % CI; 1.20-1.59; PD に対して OR; 1.31, 95 % CI; 1.05-1.62)²²⁾.

おわりに

ゲノム解析技術の進歩によって, 大規模検体の超高密度 SNP 解析が可能となり, ゲノム情報と診断名や病型などの表現型のデータベース data-base of Genotype and Phenotype (dbGAP) の構築が推進されている. AD 群-健常者群の集団遺伝統計学による確率に基づいてリスク遺伝子が同定されてきた. これからは, 発症前に個人にとってのリスク遺伝子を知り, 予防と早期治療が重要となる.

文 献

- 1) Alzheimer A.: Über eine eigerartige Erkrankung der Hirnrinde. Allg Z Psychiat Med 64: 146-148, 1907.
- 2) Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagopian S, Johnson-Wood K, Khan K, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg I, Little S, Masliah E, McConlogue L, Montoya-Zavala M, Mucke L, Paganini L,

- Penniman E, Power M, Schenk D, Seubert P, Snyder B, Soriano F, Tan H, Vitale J, Wadsworth S, Wolozin B and Zhao J: Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature* 373: 523 - 527, 1995.
- 3) Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak - Vance M, Enghild J, Salvesen GS and Roses AD: Apolipoprotein E: high - avidity binding to beta - amyloid and increased frequency of type 4 allele in late - onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 1977 - 1981, 1993.
- 4) Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D and Tanzi RE: Systematic meta - analysis of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet* 39: 17 - 23, 2007.
- 5) Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, Zou F, Katayama T, Baldwin CT, Cheng R, Hasegawa H, Chen F, Shibata N, Lunetta KL, Pardossi - Piquard R, Bohm C, Wakutani Y, Cupples LA, Cuenco KT, Green RC, Pinessi L, Rainero I, Sorbi S, Bruni A, Duara R, Friedland RP, Inzelberg R, Hampe W, Bujo H, Song YQ, Andersen OM, Willnow TE, Graff - Radford N, Petersen RC, Dickson D, Der SD, Fraser PE, Schmitt - Ulms G, Younkin S, Mayeux R, Farrer LA and St George - Hyslop P: The neuronal sortilin - related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet*. 39: 168 - 177, 2007.
- 6) Aidaralieva NJ, Kamino K, Kimura R, Yamamoto M, Morihara T, Kazui H, Hashimoto R, Tanaka T, Kudo T, Kida T, Okuda J, Uema T, Yamagata H, Miki T, Akatsu H, Kosaka K and Takeda M: Dynamin 2 gene is a novel susceptibility gene for late - onset Alzheimer disease in non - APOE - epsilon4 carriers. *J Hum Genet*. 53: 296-302, 2008.
- 7) Hamshere ML, Holmans PA, Avramopoulos D, Bassett SS, Blacker D, Bertram L, Wiener H, Rochberg N, Tanzi RE, Myers A, Wavrant - De Vrièze F, Go R, Fallin D, Lovestone S, Hardy J, Goate A, O'Donovan M, Williams J and Owen MJ: Genome - wide linkage analysis of 723 affected relative pairs with late - onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 16: 2703 - 2712, 2007.
- 8) Kuwano R, Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, Tsukie T, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y; Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer's Disease: Dynamin - binding protein gene on chromosome 10q is associated with late - onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 15: 2170 - 2182, 2006.
- 9) Yao PJ, Zhu M, Pyun EI, Brooks AI, Therianos S, Meyers, VE and Coleman PD: Defects in expression of genes related to synaptic vesicle trafficking in frontal cortex of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 12: 97 - 109, 2003.
- 10) Minster RL, Dekosky ST and Kamboh MI: No association of dynamin binding protein (DNMBP) gene SNPs and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 29: 1602 - 1604, 2008.
- 11) Bettens K, Brouwers N, Engelborghs S, De Pooter T, De Deyn PP, Sleegers K and Van Broeckhoven C: DNMBP is genetically associated with Alzheimer dementia in the Belgian population. *Neurobiol Aging* 2008 in press.
- 12) Grupe A, Li Y, Rowland C, Nowotny P, Hinrichs AL, Smemo S, Kauwe JS, Maxwell TJ, Cherny S, Doil L, Tacey K, van Luchene R, Myers A, Wavrant - De Vrièze F, Kaleem M, Hollingworth P, Jehu L, Foy C, Archer N, Hamilton G, Holmans P, Morris CM, Catanese J, Sninsky J, White TJ, Powell J, Hardy J, O'Donovan M, Lovestone S, Jones L, Morris JC, Thal L, Owen M, Williams J and Goate A: A scan of chromosome 10 identifies a novel locus showing strong association with late - onset Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 78: 78 - 88, 2006.
- 13) Morgan AR, Hamilton G, Turic D, Jehu L, Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Moskvina V, Brayne C, Rubinsztein DC, Lynch A, Lawlor B, Gill M, O'Donovan M, Powell J, Lovestone S, Williams J and Owen MJ: Association analysis of 528 intra - genic SNPs in a region of chromosome

- 10 linked to late onset Alzheimer's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 147B: 727-731, 2008.
- 14) Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Matsubara E, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y, Kuwano R; Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer's Disease : Genetic association of CTNNA3 with late-onset Alzheimer's disease in females. *Hum Mol Genet* 16: 2854 - 2869, 2007.
 - 15) Li Y, Grupe A, Rowland C, Nowotny P, Kauwe JS, Smemo S, Hinrichs A, Tacey K, Toombs TA, Kwok S, Catanese J, White TJ, Maxwell TJ, Hollingworth P, Abraham R, Rubinsztein DC, Brayne C, Wavrant-De Vrièze F, Hardy J, O'Donovan M, Lovestone S, Morris JC, Thal LJ, Owen M, Williams J and Goate A: DAPK1 variants are associated with Alzheimer's disease and allele-specific expression. *Hum Mol Genet* 15: 2560 - 2568, 2006.
 - 16) Li Y, Nowotny P, Holmans P, Smemo S, Kauwe JS, Hinrichs AL, Tacey K, Doil L, van Luchene R, Garcia V, Rowland C, Schrodi S, Leong D, Gogic G, Chan J, Cravchik A, Ross D, Lau K, Kwok S, Chang SY, Catanese J, Sninsky J, White TJ, Hardy J, Powell J, Lovestone S, Morris JC, Thal L, Owen M, Williams J, Goate A and Grupe A: Association of late-onset Alzheimer's disease with genetic variation in multiple members of the GAPD gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15688 - 15693, 2004.
 - 17) Kimura R, Yamamoto M, Morihara T, Akatsu H, Kudo T, Kamino K and Takeda M: The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between beta-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. *Hum Mol Genet.* 16: 15 - 23, 2007.
 - 18) Grupe A, Abraham R, Li Y, Rowland C, Hollingworth P, Morgan A, Jehu L, Segurado R, Stone D, Schadt E, Karnoub M, Nowotny P, Tacey K, Catanese J, Sninsky J, Brayne C, Rubinsztein D, Gill M, Lawlor B, Lovestone S, Holmans P, O'Donovan M, Morris JC, Thal L, Goate A, Owen MJ and Williams J : Evidence for novel susceptibility genes for late-onset Alzheimer's disease from a genome-wide association study of putative functional variants. *Hum Mol Genet* 16: 865 - 873, 2007.
 - 19) Pearson JV, Huentelman MJ, Halperin RF, Tembe WD, Melquist S, Homer N, Brun M, Szelinger S, Coon KD, Zismann VL, Webster JA, Beach T, Sando SB, Aasly JO, Heun R, Jessen F, Kolsch H, Tsolaki M, Daniilidou M, Reiman EM, Papassotiropoulos A, Hutton ML, Stephan DA and Craig DW: Identification of the genetic basis for complex disorders by use of pooling-based genomewide single-nucleotide-polymorphism association studies. *Am J Hum Genet* 80: 126 - 139, 2007.
 - 20) Reiman EM, Webster JA, Myers AJ, Hardy J, Dunckley T, Zismann VL, Joshupura KD, Pearson JV, Hu-Lince D, Huentelman MJ, Craig DW, Coon KD, Liang WS, Herbert RH, Beach T, Rohrer KC, Zhao AS, Leung D, Bryden L, Marlowe L, Kaleem M, Mastroeni D, Grover A, Heward CB, Ravid R, Rogers J, Hutton ML, Melquist S, Petersen RC, Alexander GE, Caselli RJ, Kukull W, Papassotiropoulos A and Stephan DA: GAB2 alleles modify Alzheimer's risk in APOE epsilon4 carriers. *Neuron* 54: 713 - 720, 2007.
 - 21) Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y and Kuwano R: Gab2 is not associated with late-onset Alzheimer's disease. *Eur J Human Genetics*, 17: 682. 2009.
 - 22) Li Y, Rowland C, Xiomerisiou G, Lagier RJ, Schrodi SJ, Dradiotis E, Ross D, Bui N, Catanese J, Aggelakis K, Grupe A and Hadjigeorgiou G: Evidence that common variation in NEDD9 is associated with susceptibility to late-onset Alzheimer's and Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 17: 759 - 767, 2008.