

博士論文

臨床データベース解析を通じた、アルツハイマー病の

臨床病態に即したバイオマーカーの再構築

佐藤 謙一郎

臨床データベース解析を通じた、アルツハイマー病の

臨床病態に即したバイオマーカーの再構築

所属 脳神経医学専攻 神経内科学

指導教員 戸田 達史

申請者 佐藤 謙一郎

要旨

早期からのアルツハイマー病（以下 AD）に関するバイオマーカーは、AD 病理に直接的に関係するものはアクセス性が十分ではなく、一方でアクセス性の良いものは AD 病理との関係性が弱いため再現性が十分ではない、といった trade-off の関係があった。この関係を踏まえてさらに検査・バイオマーカーの性能を向上させることを目的として、アクセス性ないし AD 病理との直接性がより大きくなるようにするべく、大規模な臨床観察データの多角的な解析を行い、結果として、既存バイオマーカーの性能改善の可能性が示された。そのうち、早期のアミロイド蓄積に対する web ベース予測が有望であり、今後のデジタルバイオマーカーとしての発展可能性も期待できる。

略語

AD, Alzheimer's disease

A β , amyloid beta

CSF, cerebrospinal fluid

MRI, magnetic resonance imaging

J-TRC, Japanese Trial-Ready Cohort

A4 study, Anti-Amyloid Treatment in Asymptomatic Alzheimer's study

PET, positron emission tomography

SUVr, standardized uptake value ratio

J-ADNI, Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative

MCI, mild cognitive impairment

CN, cognitive normal

WGCNA, weighted gene co-expression network analysis

ADNI, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative

DNAmeAge, DNA methylation clock

AA, aging acceleration

目次

要旨	2
略語	3
第1章：序文	8
1-1. 背景.....	8
1-1-1. アルツハイマー病 (Alzheimer's disease)	8
1-1-2. アミロイドカスケード仮説と臨床区分	10
1-1-3. A/T/N 分類と対応するバイオマーカー	14
1-1-4. AD バイオマーカーとその問題点.....	16
1-2. 研究の目的.....	21
第2章：プレクリニカル AD におけるアミロイドリスク予測	26
2-1.背景	26
2-1-1. AD 治療薬開発のこれまで.....	26
2-1-2. プレクリニカルAD の臨床研究実施に際しての困難さ	28
2-1-3. 治験即応コホート (Trial-Ready Cohort)	30
2-1-4. アミロイドリスク予測アルゴリズム導入の必要性.....	33
2-2. 本検討 (第2章) の目的.....	37
2-3. 方法.....	38
2-3-1. 倫理委員会承認.....	38
2-3-2. J-TRC webstudy データ	38
2-3-3. A4 study データ.....	43
2-3-4. 予測モデルの構築・評価.....	45
2-3-5. 統計処理一般について.....	51
2-4. 結果.....	52
2-4-1. 基本的なプロフィール.....	52
2-4-2. 予測モデルの評価 (A4 アジア人グループ)	55
2-4-3. 予測モデルによる予測 (J-TRC webstudy)	59

2-5. 考察（第2章）	62
第3章: 共萎縮ネットワーク解析による背景病理進展の可視化手法.....	68
3-1. 背景.....	68
3-1-1. 神経変性病の拡がりとしての脳萎縮.....	68
3-1-2. 先行研究：コネクトーム.....	71
3-1-3. 遺伝子発現解析手法 WGCNA の応用.....	72
3-2. 本検討（第3章）の目的.....	74
3-3. 方法.....	76
3-3-1. 倫理委員会承認.....	76
3-3-2. J-ADNI データについて.....	76
3-3-3. データ取得とサンプルの組み入れ基準.....	76
3-3-4. 脳 structural MRI データ前処理.....	78
3-3-5. 統計解析について.....	82
3-3-6. 重み付き共萎縮ネットワーク解析：WCANA	82
3-4. 結果.....	86
3-4-1. 組み入れ症例のプロファイル.....	86
3-4-2. 臨床的な各因子との脳萎縮との関係：単解析.....	88
3-4-3. WCANA による interconnectivity 解析.....	93
3-4. 考察（第3章）	99
第4章: 血液 EPIGENETIC AGING を用いた、A/T/N 分類予測の試み.....	103
4-1. 背景.....	103
4-1-1. Aging acceleration	103
4-1-2. 血液 AD バイオマーカーとしての aging acceleration	104
4-2. 本検討（第4章）の目的.....	106
4-3. 方法.....	107
4-3-1. 倫理委員会承認.....	107
4-3-2. ADNI データについて.....	107
4-3-3. データ取得とサンプルの組み入れ基準.....	108

4-3-4. A/T/N 分類.....	109
4-3-5. DNA メチル化について.....	112
4-3-6. Epigenetic Clock および Aging Acceleration について	114
4-3-7. マイクロアレイデータ前処理.....	116
4-3-8. epigenetic aging、aging acceleration の計算.....	121
4-3-9. 予測モデルの構築と評価.....	124
4-4. 結果.....	129
4-4-1. サンプルのプロファイル.....	129
4-4-2. Aging Acceleration	136
4-4-3. 予測モデルの評価.....	138
4-5. 考察 (第 4 章)	140
第 5 章. 結語と今後の展望.....	145
5-1. まとめ	145
5-2. 早期 A β 陽性検出デジタルバイオマーカーとしての可能性	152
5-3. 結語	155
謝辞	156
参考文献.....	157

第 1 章：序文

1-1. 背景

1-1-1. アルツハイマー病 (Alzheimer's disease)

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: 以下 AD) は、主に初老期以降に発症し、記憶障害を主体とする認知機能低下を緩徐進行性にきたす神経変性疾患である [1-3]。認知症の原因疾患のうち 5 割以上を占め最も頻度が高く [4]、また神経変性疾患としても最も頻度が高い (2 番目に多いのはパーキンソン病)。本症は、1906 年に Aloysius Alzheimer によって初めて報告された。

AD は病理学的にはアミロイド蓄積と神経原線維変化が特徴で [5]、これに伴い神経細胞のシナプス減少と神経細胞死をきたすことで、脳機能障害を引き起こす。この病理学的異常は局所的に、海馬周辺を含めた側頭葉内側部から始まり、病初期から近時記憶低下が目立つ。進行と共に側頭葉内側部から周辺脳領域に徐々に拡大していき、当該領域に対応した認知機能の低下をきたす [1, 2]。具体的には、見当識障害、側頭葉・頭頂葉への波及に伴う失語・失行・構成障害・視空間認知障害、などが見られる。これらの中核症状に加えて、周辺症状として、意欲低下・無関心・幻覚・妄想・徘徊・睡眠障害・抑うつ・不安など精神・行動症状

(BPSD) が早期から出現することが多い [6]。進行につれて徐々に生活機能も障害され、最終的には全介助を要する状態に至る。経過を通して、周囲の介護者に大きな負担を生じる場合が多く、社会資源的な観点からも超高齢社会での問題となっている。

AD のうちの一部 (~1%程度) は常染色体優性遺伝の家族性 AD であり、単一原因遺伝子として *APP*、*PSEN1*、*PSEN2* が知られている [7]。また AD 発症率を高めるリスク遺伝子として、関連遺伝子 *APOE* の遺伝子多型 (特に e4 アレル) が頻度・発症リスクともに高く、重要である [8]。*APOE-e4* アレルの頻度は白人で 14%、本邦では 10%程度とする報告があり、*APOE-e4/e3* アレルを持つ場合の (*APOE-e3/e3* の場合と比べての) AD 発症オッズ比は欧米では 2-3 程度・本邦では 5 程度、また *APOE-e4/e4* の場合の AD 発症オッズ比は欧米では 12 程度・本邦では 30 程度と報告されている [8]。これは、(GWAS などで明らかにされてきた) その他の関連遺伝子でのリスクアレルを持つ場合の AD 発症オッズ比よりも明らかに高い [9, 10]。なお *APOE-e2* アレルは頻度が (他のアレルより) 低いものの、e4 とは逆に AD 発症に対して防御的に働くとされている [11]。

AD に対する治療薬としては、大脳基底部分から投射されるコリン作動性ニ

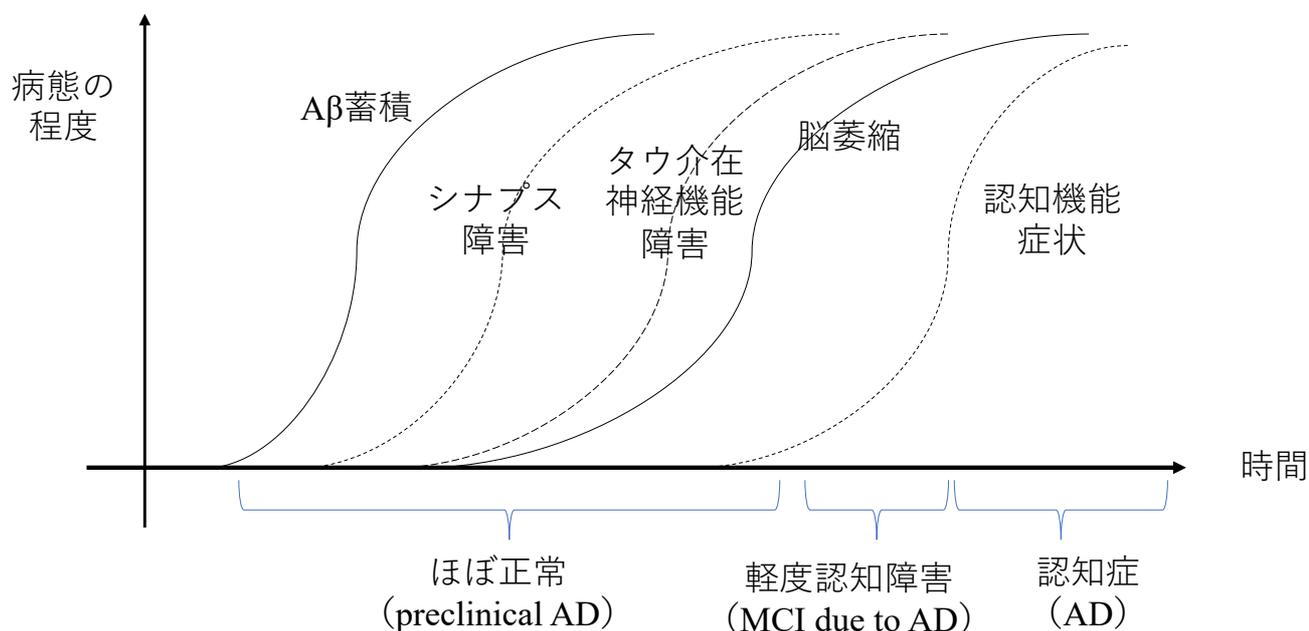
ニューロンが AD で減少している [12] という知見をもとに使用されるようになったコリンエステラーゼ阻害薬であるドネペジル、ガランタミン、リバスチグミンが軽症以上の AD に対して日常的に用いられている。またそれ以外でも、抗 NMDA 受容体拮抗薬であるメマンチンも中等度以上の AD に対して用いられる [13]。これらの薬剤による効果は認知機能を多少改善するが生活機能はほとんど改善しない程度にとどまっており、基本的には対症療法である。次項に述べるアミロイドカスケード仮説における AD 病態プロセスに介入してその進行を防ぐ or 進行速度を遅延させる作用、つまり疾患修飾薬 (disease-modifying therapy: DMT) としての効果はない。

1-1-2. アミロイドカスケード仮説と臨床区分

AD 発症の病態機序は、図 1 のように、現在のところアミロイドカスケード仮説として理解されている [14, 15]：細胞膜上にあるアミロイド前駆蛋白 APP から β セクレターゼおよび γ セクレターゼによる切断を経て細胞外に分泌される $A\beta$ のうち、神経毒性を持つ $A\beta_{42}$ モノマーの産生と蓄積が増加し (*クリアランス低下などの理由による)、凝集して $A\beta$ オリゴマーを形成してシナプス毒性・神経細胞毒性を来す。また $A\beta$ オリゴマーは脳内に大規模に凝集・沈着して老人斑となる。さらに

は、A β 沈着が引き金となってタウ蛋白のリン酸化と凝集が惹起され、神経原線維変化をきたす。タウ蛋白による神経毒性から、シナプス機能障害・シナプス減少・神経機能障害・神経細胞死が徐々に進行し、一定以上の病態の進行と共に臨床症状が出現してくることになる。最初の A β 蓄積から、認知症としての発症に至るまでに、平均的には 15~20 年程度の長期間を要することがわかってきている。

図1：アミロイドカスケード仮説の模式図



A β 蓄積→シナプス毒性・タウ介在性神経機能障害、続いて神経細胞死・脳萎縮、これらがある程度まで進むと認知機能低下が明らかになる、という順序である。認知機能の低下の度合いに応じて、preclinical AD, MCI due to AD, AD dementia と分けられている。

AD の最終的な診断は剖検での病理学的診断 [5] によるが、診療における臨床診断ではそれは無論不可能である。そもそもの AD 臨床診断基準としては 1984 年に策定された NINCDS-ADRDA [1] が長らく用いられてきたが、これらは臨床症状（認知機能低下）と臨床的な除外診断に重きを置いており、AD に関連するバイオマーカーは考慮されていなかった。バイオマーカーを含めた診断基準として、2011 年にバイオマーカー情報も組み込んだ NIA-AA 診断ガイドライン [2]、また International Working Group (IWG)からの IWG-2 診断基準 [3] が出されており、この 2 つが現在標準的に用いられる臨床診断基準である。特に、2011 年に策定された NIA-AA 基準においては、認知機能と生活機能の障害の度合いに応じて、軽度の認知機能障害があるに留まる（=全般性 CDR 0.5）MCI due to AD（あるいは prodromal AD）、また認知症状があって生活機能への支障が明らかになってくる（=全般性 CDR 1 以上）時期（AD dementia）とされ、また臨床研究上の区分としてアミロイド蓄積を認めるが無症状あるいはほぼ症状がない（=全般性 CDR 0）時期（preclinical AD： stage 1~3）も設定されている [14]。ここで AD dementia の部分が以前の NINCDS-ADRDA での AD に相当しており、NIA-AA 基準により、AD 病理を背景に AD として包括される病態（preclinical AD ~ prodromal AD ~ AD dementia）の範囲が拡大したことになる。

1-1-3. A/T/N 分類と対応するバイオマーカー

臨床診断基準として上記の NIA-AA と IWG-2 との間では一定以上の基準の一致をみているものの、細かい区分 staging や用語、バイオマーカー所見の解釈などにおいて相違が見られており、今後もどのように変化していくかは不明である。このため、（アミロイドカスケード仮説の中での）AD 病理を背景とした連続的な神経変性および臨床症状進行の過程を捉えていく上では、この臨床的な定義の相違が（今後の）混乱の元になりうるという懸念があった [16]。

近年、これに対応する方法論として、AD 病理に関連したバイオマーカーを記述的にそのまま（unbiased に）分類する方法である A/T/N 分類が提唱された [16]。これは、アミロイド病理のあるなし（A）、タウ病理のあるなし（T）、また神経変性・神経障害のあるなし（N）で、それぞれ+/-で評価し、合計で $2*2*2=8$ 通りのパターンに機械的に分けるものである（表 1）。これによって、診断基準の定義によらず関連するバイオマーカーの状態で分類ができ、より混乱が少なくなるのではないかと考えられている。

表 1: A/T/N 分類と各項目に対応するバイオマーカー

	(+)
A	lowered CSF A β or A β -PET (+)
T	elevated CSF p-tau or Tau-PET (+)
N	elevated CSF t-tau or brain atrophy (+) or FDG-PET (+)

A/T/N それぞれについて、アミロイド病理のあるなし (A)、タウ病理のあるなし (T)、また神経変性・神経障害のあるなし (N) で2値化する。

先に述べたアミロイドカスケード仮説に従って見ていくと、初めに A β 蓄積が起こるため A(+)となり、タウ蛋白蓄積が始まると CSF p-tau 増加ないしタウ PET 陽性となり T(+)となり、またシナプス機能不全・神経細胞機能障害を来すと FDG-PET で特徴的な異常所見（側頭葉内側部・頭頂葉の糖代謝低下）が現れるため N(+)となる。さらに神経細胞死から側頭葉内側部の脳萎縮をきたしてくるとやはりこれも N(+)となる。このため、カスケード通りの経過の場合、A-/T-/N-（正常状態）→A+/T-/N-（プレクリニカル AD）→A+/T+/N- (or A+/T-/N+)→A+/T+/N+、のような経過を辿ることが多い [17] と想定されるが、AD 以外の病理の混在などの理由でこの通りに推移しないことも多い。なお N(+)自体は他の認知症疾患でもよく見られる所見であるため、特に A(-)かつ N(+)のものは suspected non-AD pathophysiology (SNAP) と呼ばれる [18]。

1-1-4. AD バイオマーカーとその問題点

AD のバイオマーカーは、これまで様々な種類が研究されてきたが、検査の物質・modality によって、信頼性・再現性や実用性・アクセス性のレベルは様々である。大まかには、AD 病理との関係がどこまで直接的か、また検査・マーカーへの

modality 的なアクセス性との兼ね合いで、trade-off の関係になっていると考えることができる (図 2)。

まず前項に述べた A/T/N のうち A や T に関連するマーカーは、AD 病理と関係が深く、再現性も良好である [17, 19]。しかしながら、検査 modality の利便性の観点からは必ずしも十分ではないと考えられる。例えば A β -PET は保険適用ではなく施設も限られており、タウ PET はごく最近実用化されたため行える施設がさらに限られている。また髄液検査 [19] も、安静を保たなければならず局所麻酔に対するアレルギーや穿刺後頭痛のリスクなど侵襲性が小さくはないし、個人間・測定者間・測定ラボ間での結果変動の要素もある [20-23]。また血液中の A β およびタウが AD バイオマーカーとして有用かどうかはこれまで技術的に正確な測定が困難という理由もあり、長らく不明であったが [24]、近年、技術改良によって、採血だけで脳内 A β 値をよく反映して血漿 A β 値を測定することが可能になってきており [25-28]、Elecsys assay などの自動測定機器開発とともに今後普及が進んでくる有力候補と期待されている。血液中の p-tau, t-tau も同様に技術開発が進んで測定可能になってきている [25, 29]。ただし、いずれも 2020 年現在は研究段階に留まっている。

さらに、A/T/NのうちNについては、頭部MRIは日常臨床で頻用されており、ついでFDG-PETも利用されるが、シナプス機能低下・神経細胞死が十分に進んでいない早期段階においてはこれらの検査によるN(+への感度は十分とは言えない：例えば正常群（stage 0）と preclinical AD との比較では、脳MRIで両側海馬体積に有意差がない [30, 31]、脳室体積に有意差がない [32] などが報告されている。

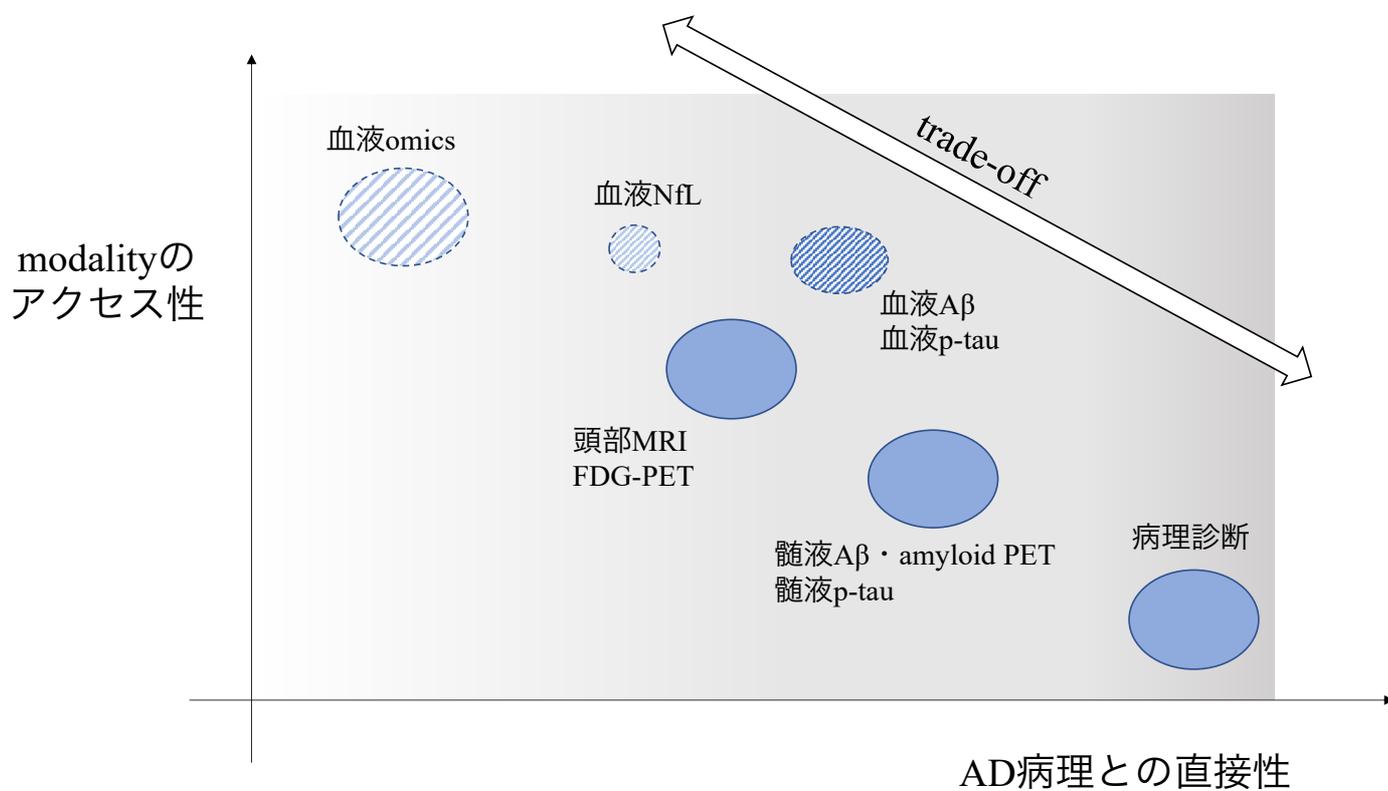
またADではタウ介在性神経損傷（の中の軸索損傷）と関連して上昇する髄液 neurofilament（NfL）および血液 NfL は、認知機能や疾患ステージに応じて上昇すると報告されていて [33-35] AD ステージマーカーとして有用である可能性があるが、軸索損傷が発生する他の前頭側頭認知症（FTLD-tau, FTLD-TDP など）でも増加するためADに特異的ではない [36]。

一方、上記の髄液検査やPETより簡便な血液で診断できる代用の検査 modality として、血中のタンパク [37]・脂質 [38]・miRNA [39] など様々な物質の血液バイオマーカーがこれまで盛んに研究されてきたが、各研究で得られた精度や判別に有用な物質の候補が、必ずしも他の研究で再現性が取れないという問題があった。例えば、ある代表的な研究 [37] では、血液中のシグナル蛋白 120 種を

AD 対非 AD で比較して判別に有用な上位 18 種類を選択したところ、造血、免疫、アポトーシス、神経栄養に関わるタンパク質が同定され、さらにこれらの組み合わせによる MCI から AD への移行を精度 81% で予測できる、という結果であったが、別のコホートで検証されたところ AD 判別能は下がって 61% であったと報告されている [40]。また血液プロテオームを検討した 21 報の研究を解析したシステムティックレビューでは、合計 163 種類の候補タンパク質のうち、3 つ以上のコホートで共通して有用として挙げられたのはわずか 6 種類であった [41]。また AD で変化があったとされたタンパク質のうちほとんどのものが他の神経疾患でも変化しており、AD 特異性は高くないという報告もあった [42]。

この再現性が高くない原因としては、予測因子側の問題として、探索してきた物質が AD 病理との関連性が低いものであったこと、予測指標側の問題として、ターゲットとしての「臨床的に判断された AD」の中に、実際には相当数の非 AD 病理による認知機能低下が紛れ込んでいた可能性があること、このため背景病理の構成が異なる集団においては判別精度が下がりやすい等が大きく関わっているのではないかと考えられる。

図 2：検査・バイオマーカーの種類とそれらの関係



各検査・バイオマーカーの、AD 病理との直接性とアクセス性とは、大まかには trade-off の関係として理解できる。

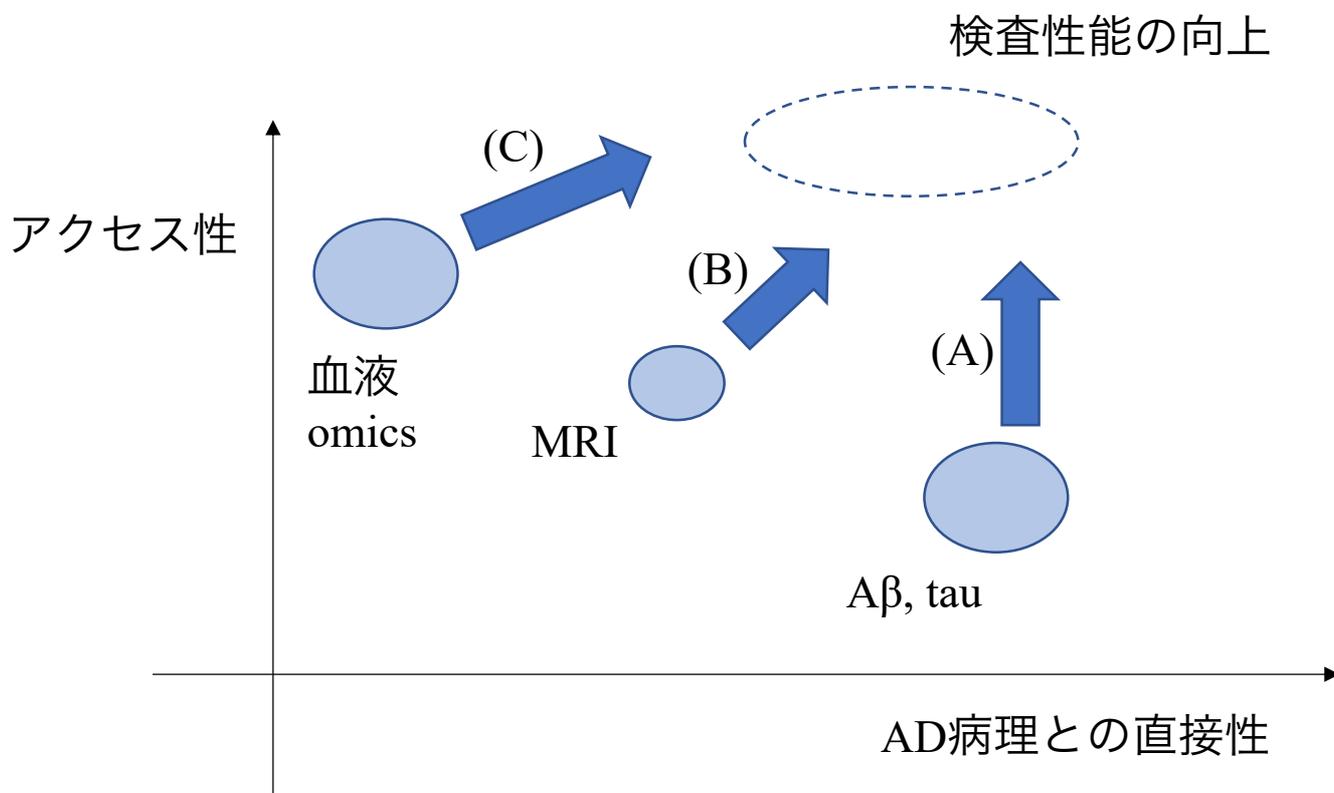
1-2. 研究の目的

さて、AD の治療薬開発のためには、より早期からの疾患修飾薬による予防的介入が有用なのではないかと考えられるようになってきている（詳細は次章で述べる）。これには将来 AD dementia を発症するであろう確率の高い人を早期すなわちほとんど～あまり症状がない時期に同定して、臨床研究・臨床試験の対象とする必要がある。そのためには、（例えばメタボ健診のように）より多くの人を対象に広く浅くスクリーニングを行うことが有用である可能性があり、A/T/N のうち特に（カスケードのはじめに位置する）A と T に対応した病態をより早期から簡便に検出できるようにすることが、特に臨床研究組み入れ段階の入り口部分では重要と思われる。しかしながら、上に述べたようなこれまでのバイオマーカーおよび検査 modality の問題点のように、早期からの AD に関するバイオマーカーは、AD 病理に直接的に関係するものはアクセス性が十分ではなく、一方でアクセス性の良いもの（A β タウ以外の血液検査）は AD 病理との関係性が薄いことから再現性が十分ではない、というようジレンマがあることが問題であった。

そこで、本研究では、既存の研究で行われてきた AD 病態の早期検出バイオマーカー・検査について、これまでの研究におけるものとは異なる多角的な視点・手

法からのデータ解析を通じて、予測目標を AD 病理との関連のより強いものに変更するか（図 3 で X 軸方向に右）、予測因子をスケーラビリティのより高い形式に再構成するか（図 3 で Y 軸方向に上）、これらのいずれかあるいは両方を達成することを目的とする。これによって、既存の trade-off の関係から脱却して、図 3 の右上へと位置付けを改善させ、検査・バイオマーカーの性能をより向上させることができるのではないかと考えられる（図 3）。

図 3：本研究の目標概要図



本研究では、既存の研究で行われてきた AD 病態の早期検出バイオマーカー・検査について、これまでの研究におけるものとは異なる多角的な視点・手法からのデータ解析を通じて、予測目標を AD 病理との関連のより強いものに変更するか (X 軸方向に右)、予測因子をスケーラビリティのより高い形式に再構成するか (Y 軸方向に上)、これらのいずれかあるいは両方を達成することを目的とする。これによって、既存の trade-off の関係から脱却して、図の右上へと位置付けを改善させ、検査・バイオマーカーの性能をより向上させることができるのではないかと考えられる。

概要図でいうと、まず AD 病理に直接関わる A+に対する予測マーカーとしては、現状ではアクセス性が悪いことが最大の課題であるため、スケール性の高い代替指標で構成することが有用ではないかと考えられる (A: Y 軸方向に上に移動させる)。具体的には、これまで対面で行われることが主流であった認知機能検査をデジタルに置き換え、web ベースで行えるようにしたテストの A+に対する検査性能を検討する (第 2 章)。

次に、脳 MRI は現状の臨床でも有用ではあるがカスケードでは (T~) N まで来ないと脳萎縮は明らかになって来ないため、その手前の T+について検出できることが期待される (B: X 軸方向に右へ)。具体的には、構造的 MRI データに対して共変化ネットワーク解析を適用することで、萎縮進行の前段階に位置付けられているタウ病理の拡大を可視化する手法について検討する (第 3 章)。

最後に、(A β 、タウ以外で) 血液バイオマーカーはこれまで **unreliable** であったが、(NINCDS-ADRDA などによる臨床診断) より AD 病理に関係があると考えられる要素について、有用性を見出せないか検討する (C: X 軸方向に右へ移動させる)。具体的には、血液バイオマーカーの一つとしてこれまで検討されてこなかった計算指標である「加齢亢進」(aging acceleration) を導入し、これによって A/T/N 分類への予

測ができないか、検討する（第4章）。

これらの検討によって、A/T/N それぞれに対する現行の直接的なバイオマーカー（CSF, PET）によらず、これまでの conventional なデータ解析手法ではわからなかったような新規の間接的な代用マーカーによる判別が、特に AD 病態の早期から可能になっていくのではないかと期待するものである。

第2章：プレクリニカル AD におけるアミロイドリスク予測

2-1.背景

2-1-1. AD 治療薬開発のこれまで

現在 AD dementia に対して使用される薬剤は認知機能を多少改善する程度で対症療法に限られており [13]、疾患修飾薬 (DMT) の開発が長らく望まれてきた。DMT としては、最初の A β 蓄積がやはり重要なプロセスと考えられることから、A β の産生・蓄積を防ぐ観点からの薬剤開発・臨床試験が直近の 20 年間で行われてきた [43]。例えば、A β 産生を阻害するための γ セクレターゼ阻害剤 (semagacestat, avagacestat)・BACE1 阻害薬 (verubacestat, elenbecestat, CNP520 など)、A β を除去するための抗 A β 抗体 (aducanumab, gantenerumab, bapineuzumab, solanezumab, crenezumab, BAN2401 など)、A β ワクチン (CAD106 など)、などである。ところが、これまでの臨床試験においては AD dementia に対する認知機能改善の効果は限られていて有効性を示せず不成功となったり、中間解析で有意差がつかずに中止となったり、と数多く失敗であった [43, 44]。

各臨床試験が主要評価項目を達成できず失敗となった原因としては、(a) 約~3 割程度の非 AD 病理が紛れ込んでいた可能性があることがまず挙げられる。

これは、1984年に策定されたNINCDS-ADRDAの臨床診断基準[1]ではA β などのAD病理に直接関連したバイオマーカーの規定は何もなく、主に臨床診断に頼るところが大きいため、病理診断(CERAD分類[45]およびBraak分類[46]の併用)をgold standardとした時のこのNINCDS-ADRDA基準による陽性的中率

(PPV)はclinically-probable ADの場合PPV 62-83%、clinically-probable/possible ADの場合PPV 58-79%程度だったとする報告があること[47]からもありうると考えられる。また(b) 治験薬に関連した副反応としての脳症(アミロイド関連画像異常:ARIA-E[48]など)の発症リスクを下げるためには十分な高用量を投与しづらいこと、(c) 特にBACE 1阻害剤などより上流に作用する薬剤の場合、効果をもたらすためには数年以上にわたる薬剤投与継続が必要な可能性があること、またおそらく最も重要なものとして、(d) AD dementiaとしてすでに臨床症状が出てきている時点では神経変性・細胞死はある程度まで進んでしまっているため効果が限定されている可能性[49]、などが原因として考えられた。このため、より早期の、症状が出る前だがA β が蓄積し始まっている段階(=プレクリニカルAD期)での介入がでないか、というところが治療介入対象として注目されるようになってきた[49, 50]。

2-1-2. プレクリニカル AD の臨床研究実施に際しての困難さ

このような、 $A\beta$ 陽性だがほぼ無症状、という一群は、「プレクリニカル AD」として臨床研究目的の診断区分として定義されているが [14]、このプレクリニカル AD 症例を臨床研究にリクルートしていくのは容易でない側面がある。これは、(i)定義通り無症状であるということ、また(ii)無症状高齢者のなかから $A\beta$ 陽性者を見出す困難さ、(iii) $A\beta$ 陽性を判定するためにコストがかかる、という 3 つの主要因がある。

まず(i)については、プレクリニカル AD は定義通りほとんど無症状（全般的 CDR 0 に相当）であるので、（通常の疾患に対する治療のようにそれ自体を主訴として）病院に来院することはないし、また被験者自身の研究への参加のインセンティブも（有症状の場合よりも一般に）低いことが想定される。

また(ii)については、認知機能正常者内の $A\beta$ 陽性率の低さがまず問題となる。認知機能正常者のうち $A\beta$ 陽性である率は、一般に加齢とともに上昇し、例えば欧米コホート（認知機能正常）においては 50 歳では 10%程度、90 歳では 45%程度と推定されているため [51]、早期介入の臨床試験に適格なアミロイド陽性被験者を組み入れようとした場合、（上記(i)の影響もあるため）陽性かどうか完全にラン

ダムであると仮定した場合にはスクリーニングとしてアミロイド PET ないし脳脊髄液検査を目標サンプル数の少なくとも 3~4 倍以上行うことが必要になる。本邦におけるアミロイド陽性率は欧米よりもさらに低く、20%程度とする報告があるので [52] (これは一般人口における APOE-e4 アリル頻度が欧米と比較して本邦ではより低いと推定されていることが一因ではと考えられる [52])、その場合のスクリーニング数は単純計算で目標サンプル数の 4~5 倍程度必要ということになる。

加えて、(iii)のように、アミロイド陽性/陰性をスクリーニングするのは現状では手間とコストがかかる。というのは、アミロイド PET は現在 2020 年時点では保険診療外であり実施可能施設が限られているうえに、1 回約 10 万円程度のコストもかかる。また脳脊髄液 (CSF) 検査は、脳脊髄液採取に際して時間がかかるのと、採取中の安静を保たなければならないため、脊椎の変形がある・腰痛がひどいなど既往によってはうまく採取できない場合がある。また採取手技としての腰椎穿刺自体の侵襲性も小さいとは言えず、合併症として穿刺後頭痛を起こすことや、表面麻酔に対するアレルギー反応を稀に伴うこともあるし、また抗凝固薬を内服している場合には腰椎穿刺による脳脊髄液採取は禁忌のため行えない。さらに髄液中 A β 自体の日内変動による個人内変動 [20]、採取器具への A β 吸着による測定者間変動 (ポリスチレン製のチューブを使った場合ポリプロピレン製のチューブと比べて

30%程度濃度が低下したという報告がある [21])、測定ラボによる検査方法の違いなど結果に影響しうる要素が複数あり、検査として結果が十分に安定しているわけでは必ずしもないという問題もある [22, 23]。

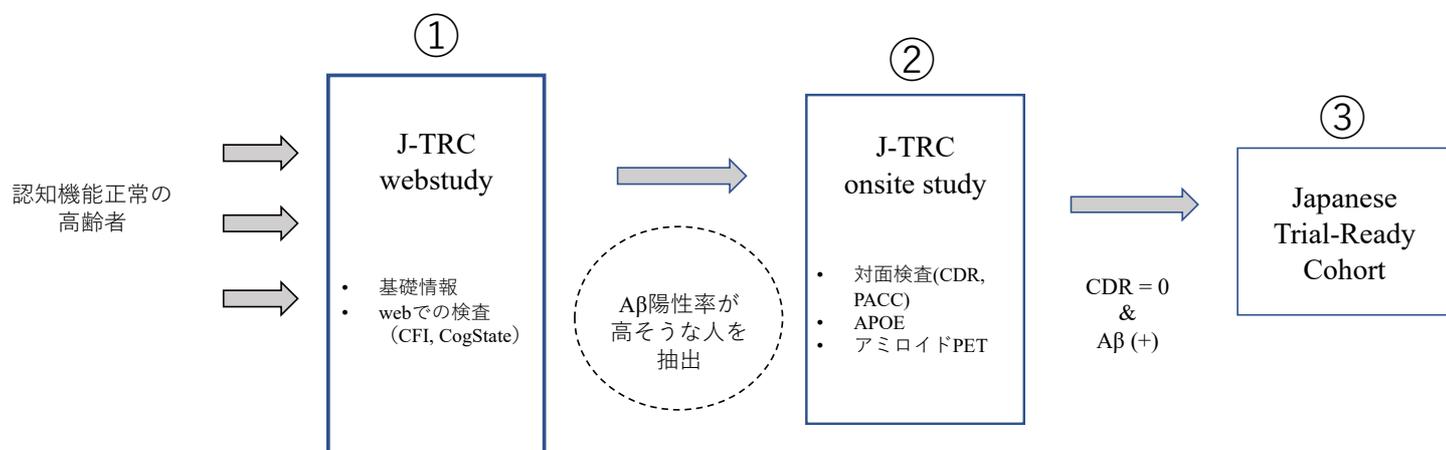
2-1-3. 治験即応コホート (Trial-Ready Cohort)

前述の要因から、臨床試験 (phase 2~3) を実施する上で、その研究実施負担・コストが非常に膨大なものになる事が懸念されていた。このため、A β 陽性になってから認知症状が明らかになるまで少なくとも 10~20 年程度以上の delay があるという点に着目して、あらかじめ A β 陽性で治験候補者となる数百人以上からなる対象者リストを作っておいて、適格な薬剤治験が開始された場合には適宜それに参加してもらい、という治験の待機リストのようなシステムを産学連携して作っていく必要性が論じられるようになってきた [49, 50]。それが「治験即応コホート」(Trial-Ready Cohort) であり、はじめにヨーロッパで EPAD-TRC として開始され (<http://epad.org>)、続いて北米で TRC-PAD として開始 (<https://trcpad.org>)、さらにオーストラリアでも ADNeT (<https://www.australiandementianetwork.org.au/adnet-trials/>) として開始されている。本邦でも、2019 年 10 月末から J-TRC が、北米 APT Webstudy/TRC-

PAD の基本的なフレームワークを踏襲する形で開始された (<https://www.j-trc.org/ja/welcome>)。

J-TRC はそのユニークな特徴として 2 段階構成になっており (図 4)、はじめに①webstudy (米国 APT Webstudy に相当)、続いて②onsite study (米国 TRC-PAD に相当) となっている [53]。まず①webstudy では、web ベースで (新聞記事や新聞広告、web 広告などを介して) 全国から広く参加者を募り、基礎情報を入力してもらった上で、web 上で行える簡単な認知機能スクリーニング検査 (CFI, CogState) を 3 ヶ月おきに定期的にフォローアップしていく事となっている。続いてこのうち条件を満たした被験者を、②onsite study では全国に点在する研究実施施設 (病院) に招いて、(オンラインではなく) 対面での詳細な認知機能検査、血液検査 (血漿 $A\beta$ ・*APOE* ジェノタイプ)、アミロイド PET 検査などを行う、という流れになっている。②でのスクリーニングの結果、PET 陽性かつ全般的 CDR = 0 に該当する被験者を preclinical AD として、治験即応コホート③に組み入れていく。研究終了までの間に最終的に $n = 300$ 程度以上が目標とされている [54]。

図4：J-TRCの段階的構造



上記の通り、①webstudy と、②onsite study の2段階構造になっている [56]。①はwebで完結しているが、②では①の中から適格な人に実際に施設を訪問してもらい、対面検査を含めた詳細なスクリーニングが行われる。

2-1-4. アミロイドリスク予測アルゴリズム導入の必要性

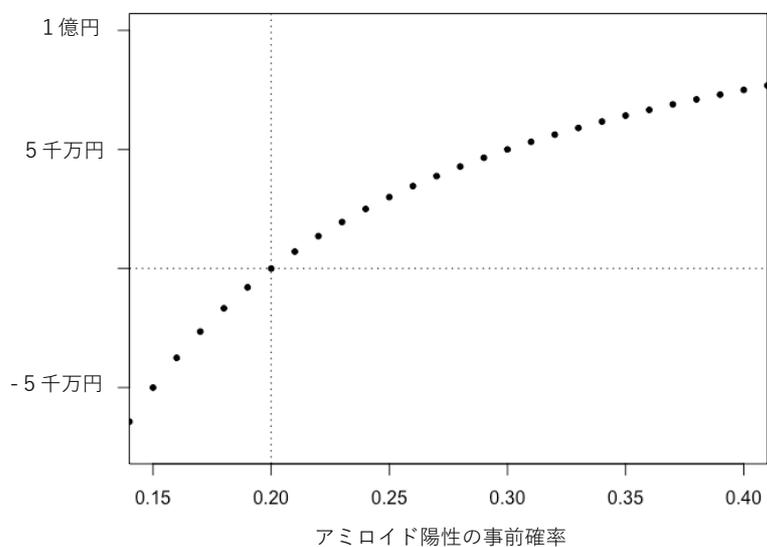
J-TRC 研究においては①webstudy 参加者が ある程度集積してから②onsite study を開始していくことになるが、現実には研究施設側の受け入れ能力の問題もあるところ、A β 陽性の事前確率をより高めて研究効率化を測る目的で、この①webstudy→②onsite study への被験者の招待プロセスで web 登録された情報から A β 陽性確率の高そうな候補者を優先抽出することが必要と考えられる。実際、②onsite study 開始が始まろうとしていた 2020 年 8 月初めの時点では、2019 年 10 月末の webstudy 開始から最初の 9 ヶ月間で有効登録者数 3,000 人を超えていた（*米国 APT Webstudy では最初の 36 ヶ月で登録 30,000 人程度）。

例えば、J-TRC においては最終的にプレクリニカル AD n = 300 程度を組み入れることを目標としているが、認知機能正常の高齢者の中での A β 陽性の事前確率が 20%程度とすると、完全にランダムの場合はおよそ 1,500 人を合計でスクリーニングすることが必要である。これが webstudy から招待する時に予測アルゴリズムによる抽出ステップを挟むことでスクリーニング開始時点での事前確率を例えば 25%程度にでも高めることができれば、必要なスクリーニング人数は約 1,200 人で済

むため、 $1500 - 1200 =$ 約 300 人分のスクリーニングの手間が省かれ、より効率化されることになる。

また実費コストについても、例えば事前確率 20%程度するとき、アミロイド PET 検査には（約 10 万円/1 回とすると）およそ $1500 * 10$ 万円=1.5 億円程度の粗コストがかかる事になるが（その他にスクリーニング作業に要する人件費など）、事前確率 20→25%にできた場合の差分は 300 人であるため、PET 検査代だけでも $300 * 10$ 万円=3,000 万円程度の研究コスト節約になる、という大まかな試算になる（図 5）。

図5： アミロイド陽性の事前確率の変化により節約されるPETコスト試算



ベースラインの認知機能正常高齢者の中でのアミロイド陽性率を20%（垂直のライン）と仮定して、抽出アルゴリズムによって陽性事前確率を操作できた時に、PET検査の総コストがどの程度節約されるか（水平ラインより上は節約コスト分、ラインより下は追加コスト分）、その変化を計算したもの。

ところが、(本邦におけるトライアルレディコホートの試みは初めてであり)日本人の web ベースで参加してきた被験者集団に有効な A β リスク判定アルゴリズムは確立されていない。また一般に先行研究においては *APOE-e4* アリルの有無や複数の認知機能スケールの複合スコアである Preclinical Alzheimer Cognitive Composite (PACC)が認知機能正常者の中からアミロイド陽性を見出すのに有用とされている [55] が、これらのデータは web ベースの研究では取得できず、また webstudy で取得できる情報自体も単純・簡単なものに限定されている。このため、予測アルゴリズムを何らかの方法によって自前で構築する必要があった。

2-2. 本検討（第2章）の目的

そこで本検討では、（認知機能正常の高齢者の中で）一般的な陽性率として本邦では恐らく20数%程度のA β 陽性率から、webベースで登録された少ない情報でいかにPETスクリーニング時のA β 陽性事前確率を高めることができるか、その予測アルゴリズムを構築し評価すること、を目的とする [56]。

本検討実施時点（2020年8月初頭）では、②で実際にPET検査まで行われた症例はおらず、正解ラベルがない状態であるため、次善の策として、他の類似データでモデル構築を行い、そのモデルを外挿することとする。このために、同じプレクリニカルADを対象としているA4 studyのスクリーニングデータを利用する [57]。このA4試験は、抗A β 抗体であるsolanezumabをプレクリニカルAD被験者を対象に投与したphase3の多施設共同RCTであるが、このA4試験に組み入れる際には認知機能が条件に合う参加者全員（n = 約4,000）にアミロイドPETのスクリーニングを行っている。このスクリーニングデータはJ-TRC webstudyで得られるデータ項目をほぼカバーしている。このA4 studyのデータを利用して機械学習アルゴリズムを構築し、それをJ-TRC webstudyデータに適用して、アミロイド蓄積の状態を予測する。

2-3. 方法

2-3-1. 倫理委員会承認

J-TRC 研究のデータ解析については、東京大学大学院医学系研究科 倫理委員会の承認(審査番号: 2019132NI-(3))を得て施行され、また A4 データ解析については東京大学大学院医学系研究科 倫理委員会の承認(審査番号: 11628-(3))を得て施行された。J-TRC webstudy 研究では被験者からの研究同意が web 情報入力（同意する or しないの 2 択式）で既に得られており、また A4 データは公開データであるため各被験者からの再同意は本検討では要しない。

2-3-2. J-TRC webstudy データ

J-TRC 研究 (<https://www.j-trc.org/ja/welcome>) は、プレクリニカル およびプロドローマル AD を対象として、米国 ATRI との研究ライセンス合意に基づいて 2019 年 10 月に本邦で開始された臨床研究であり、基本的には米国 APT Webstudy/TRC-PAD と同様に 2 段階構造となっている。まず第 1 段階の webstudy（図 6）では、認知機能正常な高齢者を対象に、基本的な情報収集の他に、web からの 3 ヶ月おきの定期的な認知機能検査が行われる。さらに第 2 段階の onsite study においては、webstudy で

アミロイドリスクが高そうな被験者を対象に、さらに全国7つの臨床研究実施施設に招いて直接対面で認知機能検査、血液検査（血漿 A β ・APOE ジェノタイプ）、アミロイド PET 検査（薬剤は[^{18}F]フルテメタモール）などを行う、ということになっている。

J-TRC webstudy のはじめのおよそ9ヶ月（2019年10月31日～2020年7月17日）までに登録がなされた計4,429登録についてレビューを行い、このうち、基本情報の入力完了していて、研究への参加同意が得られており、認知症やADと診断された既往がなく（自己申告に基づく）、登録時点で50-85歳、の全てに該当する参加者のデータを解析対象とした。なおweb登録では氏名や住所の登録はせず（都道府県レベルでは居住地も登録するが）、メールアドレスに紐付けられたIDは登録順に数字が割り振られたもので、またメールアドレスも研究者側からは確認できないため、同一人物による意図的な二重登録は仮にあっても除外困難である。

図 6： 基礎情報入力画面の例

J-TRC

ホーム FAQ (よくある質問) ログアウト

生活状況

ご両親、ごきょうだいに、アルツハイマー病または認知症と診断された方はいますか？

はい

いいえ

その他／答えたくありません

変更 取り消す

ホーム · FAQ (よくある質問) · お知らせ · 利用規約 · プライバシー · 関係先 · お問い合わせ

Copyright © USC ATRI and The University of Tokyo 2019. All Rights Reserved

入力画面の一例（2020年9月時点のもの）。

J-TRC webstudy で収集される情報は基本的にかなり限定されているが、さらに A4 study と共通して利用可能な以下の項目を用いた。

- 年齢
- 性別
- 教育年数
- 認知症ないし AD の家族歴の有無
- 就業状況（退職済か否か）
- 初回の Cognitive Function Instrument (CFI) 合計スコア
- 初回の CogState 合計スコア
- 2 回目（初回から 3 ヶ月後）の CogState 合計スコアと 1 回目スコアの差

なお喫煙歴・運動習慣など既存の AD 発症のリスク因子についての情報は J-TRC webstudy, A4study いずれにおいてもある程度の情報は取得されているが、情報の定義および粒度が大きく異なるため統一的にデータ結合が困難と考えられたため、ここでは用いなかった。

CFI とは、自覚症状についてのアンケート形式のスコアであり、得点が高いほど

自覚症状が強いということになる。先行研究においては、最も早期の認知機能低下を検出できると報告されている [58]。本人が申告するものと、ほぼ同じものを本人に関して家族（スタディパートナー）が申告するものがあるが、ここでは本人による自己申告の CFI スコアを用いた。

また CogState [59] とは、PC モニター（or タブレット端末）上にトランプカードが順に表示されるので、被験者本人が指示に従いキーボードのボタンを押すことで回答していく方式の認知機能検査で、精神運動スピードおよび近時記憶を調べることができる。内容としては、表示されているトランプカードがめくられたらなるべく早くボタンを押してもらい反応時間を測る *Detection*、めくられたトランプカードが赤色であれば右のボタン、黒色であれば左のボタンを押してもらい、正答に対する反応時間を測る *Identification*、めくられたトランプカードの種類がその直前にめくられたものと同じであれば右ボタン、異なれば左ボタンを押してもらい、正答率を測る *One Back*、めくられたトランプカードの種類がこれまでに表示されたことがあれば右ボタン、なければ左ボタンを押してもらい、正答率を測る *One Card Learning*、の 4 項目を計測する。それぞれについて、正常対照群でのスコアを元に標準化した Z スコア（= 平均値との差を 1 SD で除したもの）が自動算出されるため、それら 4 つの Z スコアの和分を合計スコアとして用いる。CogState の場合、点

数が高いほど認知機能が良好である、ということになる。

なお J-TRC webstudy では教育歴は高校卒業 or 大学卒業 or 大学院卒業、の 3 択式であるため、(A4 データとの互換性のために) それぞれ 12 年、16 年、18 年と換算して教育年数に数値変換した。最終的に、J-TRC webstudy からは n = 3,081 の症例を解析対象とした。

2-3-3. A4 study データ

Anti-Amyloid Treatment in Asymptomatic Alzheimer's Disease (A4) study [57] のスクリーニングデータは公開されており、データベース web サイトである LONI (<https://ida.loni.usc.edu>)に先方のデータアクセス委員会の承認を得て、2019 年 10 月に csv ファイルからなる臨床・検査情報のデータをダウンロードした。本データは、抗 A β 抗体である solanezumab を用いた phase 3 の多施設共同 RCT (A4 試験) に組み入れる前の、アミロイド PET (薬剤は ^{18}F フロルベタピル) を含めた適格性を判断するスクリーニング段階までの n = 4,000 程度の大規模データである。A4 試験は、J-TRC study とは異なり、組み入れ対象年齢は 65-85 歳となっている。その他の A4 試

験スクリーニングデータのうちからの組み入れ基準は、A4 study 研究チームから発表された先行研究 [55] に倣い、全般的 CDR = 0、WMS-R logical memory delayed recall 6-18、MMSE 25-30 とした。これらを全て満たした被験者が A4 試験では PET を撮像されることになっており、さらにアミロイド PET 結果が standardized uptake value ratio (SUV_r) データとして得られている症例を本検討での解析対象とした。

利用したデータ項目としては、前述の J-TRC webstudy で選択したものと同一項目を用いた。アミロイド蓄積状態は、アミロイド PET (薬剤はフロルベタピル) による SUV_r 連続値で与えられているが、データ要約のための陽性/陰性の 2 値化には、先行文献 [55] を参照しここでは SUV_r ≥ 1.15 のカットオフのみを用い、視覚的評価結果は加味しなかった。

A4 データでの CogState のスコアは J-TRC における結果表示とは異なり各項目の粗点で与えられているため、”Computerized Cognitive Assessment”のうち 4 項目 (*Detection* (log 反応時間)、*Identification* (log 反応時間)、*One Card Learning* (正答率)、*One Back* (正答率)) それぞれのスコアを組み入れ症例全体の中で標準化して Z スコアとして求め、さらに総和をとって得た。また A4 データでの人種 (アジア人か否か) の情報も取得した。最終的に、A4 スクリーニングデータからの症例 n

= 4,446 のデータを検討対象とした。

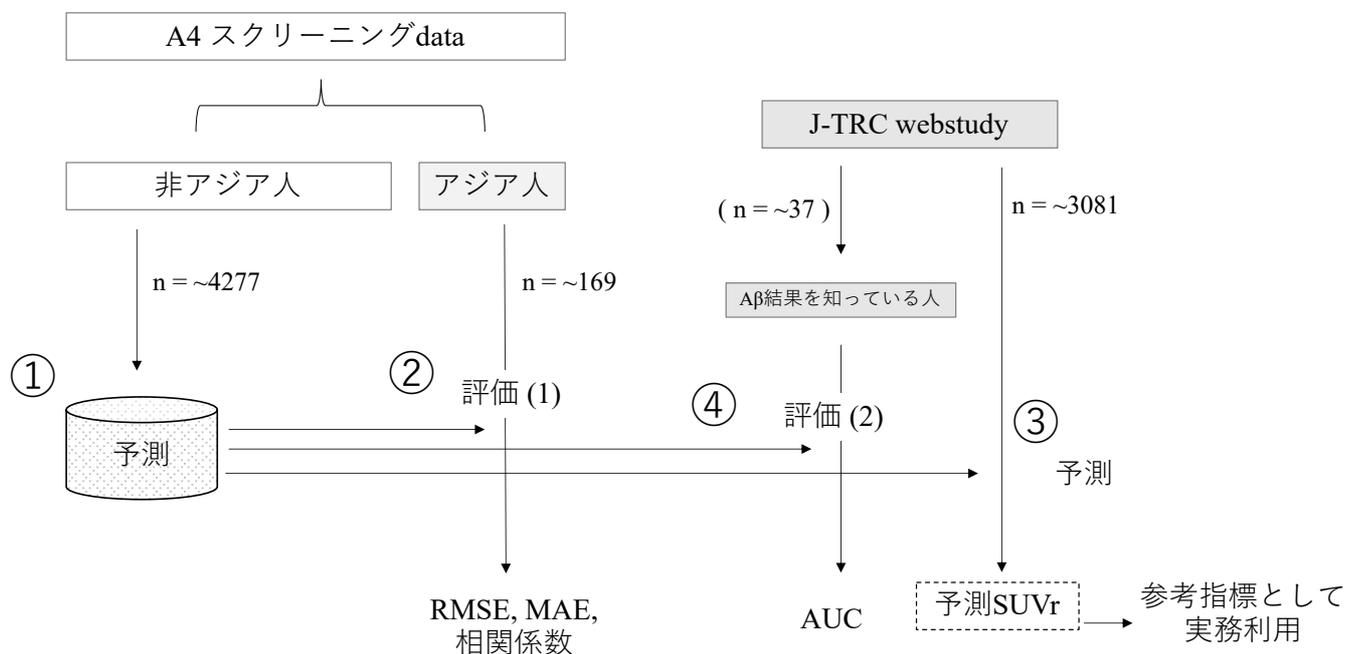
2-3-4. 予測モデルの構築・評価

本研究においては、A4 スクリーニングデータを用いて、アミロイド蓄積の程度を予測するモデルを構築し、それを J-TRC webstudy に適用して、onsite study への招待順位づけを行い、それによってアミロイド陽性確率を高め、研究効率化を図ることを目的としている。

A4 試験のデータはほとんどが非アジア人（白人が多い）である一方、J-TRC webstudy はアジア人（また日本人）がほとんどであるため、人種による影響がどの程度ありうるか参考にする必要がある。そこで本研究では、図7に示すように、①まず A4 データのうち非アジア人サブグループでアミロイド PET SUVr 値を目標として回帰予測モデル構築し、②そのモデルについて A4 データのうちアジア人サブグループで SUVr 値予測の精度評価をしておいた上で、③J-TRC webstudy に適用し、SUVr 値を予測する。これは実際の実務で、onsite 研究への招待順位づけの参考基準の一つとして利用される。加えて、J-TRC onsite study での PET 結果は解析時点では得られていないが、他施設での保険外診療や他の臨床研究で過去に施行

されたアミロイド PET（や髄液 CSF A β ）の自身の結果を知っていて登録している参加者が少数存在するため、④この自己申告の（過去の）アミロイド検査結果と予測 SUVr 値とを照合し、どの程度一致しているか検討する。

図 7: モデル構築・評価フロー



解析フローを示す [56]。A4 非アジア人グループでモデル①を作成し、評価②・④、また予測③を行う。なお A4 アジア人サブグループのうち最大 100 人は日本人（東大病院での治験スクリーニング群）でそれ以外は米国でのアジア系住民であるが、どの症例が本邦でのスクリーニング症例かは公開されているデータの範囲からは不明であった。

SUVr 値に対する回帰予測モデルにおいては、異なるアルゴリズム種と、異なる特徴量の組み合わせを用いて、条件によってどの程度精度が向上するか、あるいは向上しないか、探索的に検討する。まずアルゴリズム種については、一般化線形回帰 (GLM) , 正則付き線形回帰 (ElasticNet) , サポートベクターマシン (SVM) , ランダムフォレスト (RF) , 勾配ブースティング (GBM および XGB) の 6 種類を順に試していく [60]。なお GLM としては linear regression を用い、データの分布として正規分布を仮定している。ハイパーパラメータの設定は、10-fold cross validation において、R パッケージ caret の機能によって自動化している [60]。さらにモデルの特徴量の組み合わせは、次の 5 タイプを用いた。すなわち、

- モデル 1：基礎的データのみ (年齢・性別・家族歴・教育年数・就業状況)
- モデル 2：モデル 1 + 初回 CFI
- モデル 3：モデル 1 + 初回 CogState
- モデル 4：モデル 1 + 初回 CFI + 初回 CogState
- モデル 5：モデル 4 + 2 回目 CogState (1 回目との差分)

このように複数の特徴量の組み合わせを用いたのは、J-TRC webstudy は web ベースの研究であるため各検査の完遂率が対面検査と比べて十分に高くないことがあるためである。例えば CFI は基礎情報登録に続けて、各自覚症状の程度について選択肢から選んでいくだけであるため未完遂のままに放置されてしまう率は極めて低い（基礎情報入力済症例のうち 1%未満が脱落）、CogState は 15-20 分程度と時間がかかりその間の持続的な集中力も要するため、初回 CogState を完了せずそのままになっていることがしばしば見られる（ブラウザのエラーなど実行環境による要素も一部含む）。また 3 ヶ月後に再訪問して 2 回目の CogState を行なってくれる参加者数は 1 回目 CogState を完了した時点の参加者数よりもさらに少なくなる。参加開始の時期が遅めであったためにまだ 2 回目が到来していないだけという場合も一部ある。このような理由により、モデル 1 がもっとも組み入れ対象人数が多く、一方でモデル 5 がもっとも組み入れ対象人数が少ない、という分布になるため、予測可能対象が大きく異なることになる（表 2）。なおモデル自体については、組み入れた変数の予測への寄与度として variable importance を計算し [61]、各変数の重要性を可視化した。

表 2：モデル別の最大組み入れ可能人数

	組み入れ可能な症例数
モデル 1	n = 2,511
モデル 2	n = 2,498
モデル 3	n = 1,692
モデル 4	n = 1,692
モデル 5	n = 849

モデル別の組入可能人数 [56]。各検査の完遂率が対面検査と比べて十分に高くないことがあるため、モデル 1 がもっとも組み入れ対象人数が多く、一方でモデル 5 がもっとも組み入れ対象人数が少ない、という分布になる。

上記②での A4 アジア人サブグループでの各モデル評価においては、予測 SUV_r 値と実際の値との誤差として、root mean squared error (RMSE)、mean absolute error (MAE)を参照し [62]、また Pearson 相関係数 R も利用した。

さらに④上記 J-TRC webstudy のうち他施設で行われたアミロイド検査結果を知っている少数 (n= ~36) について、予測 SUV_r 値との一致度を検討した。この「他施設・他試験でのアミロイド検査結果の自己報告」は、陽性だったか陰性だったかという 2 値であるため、予測値から判別するときの area under the curve (AUC)を計算した。

2-3-5. 統計処理一般について

全てのデータ処理と解析は統計ソフト R (version 3.5.1) を用いた。RMSE、MAE、AUC の計算には R パッケージ *MLmetrics* を利用した [62]。相関係数の計算には Pearson 相関を用いた。p 値は特に言及しない限りは有意レベルを $p < 0.05$ とした。AUC の計算においては 95%信頼区間 (95%CI) も求めた。

2-4. 結果

2-4-1. 基本的なプロフィール

組み入れた2コホートからのサブグループの基本的な情報について表にまとめた。

A4の非アジア人グループ、A4のアジア人グループ、J-TRC webstudy 全体、また対象年齢を合わせたJ-TRC webstudyのうち65-85歳、またアミロイド検査結果を知っている少数グループ、の計5サブグループについてまとめている（表3・表4）。

A4においては、非アジア人グループでは28%がアミロイド陽性、アジア人グループでは17%がアミロイド陽性であった。A4アジア人グループのうちn=98は日本語話者であり、半数以上は日本人症例と考えられる。またアミロイド結果を自己申告したn=37のうちでは、22%がアミロイド陽性で、A4のアジア人グループと似た頻度であった。基本的な特徴として、J-TRC webstudyのうち65歳以上グループと、A4のアジア人グループとは、年齢・性別・教育年数・CFI・CogStateについて似た分布を示していた。

表 3 : J-TRC webstudy の症例プロフィール

	全体 (n = 3081)	J-TRC Webstudy 65 歳以上 (n = 1153)	過去の A β 結果を自己申告 した人(n = 37)
SUVr 値	-	-	-
A β 陽性	-	-	8 / 37 (21.6%) (6 / 37 in PET, 2 / 37 in CSF) (* self-reported previous results)
登録時年齢	61 (55 ~ 69)	71 (68 ~ 76)	64.5 (59.25 ~ 72)
性別 (女性)	1688 / 3081 (54.8%)	444 / 1153 (38.5%)	20 / 37 (54.1%)
アジア人 (yes)	3065 / 3081 (99.5%)	1145 / 1153 (99.3%)	36 / 37 (97.3%)
認知症の家族歴あり (yes)	1241 / 3081 (40.3%)	402 / 1153 (34.9%)	14 / 37 (37.8%)
教育歴 (years)	16 (12 ~ 16)	16 (12 ~ 16)	16 (16 ~ 16)
退職している (yes)	1049 / 3081 (34%)	755 / 1153 (65.5%)	19 / 37 (51.4%)
APOE ϵ 4 アリル (yes)	-	-	-
CFI-self(1st) スコア	3 (1.5 ~ 4.5)	3.5 (2 ~ 5)	2.5 (1.125 ~ 4.875)
CogState (1st) スコア	-0.261 (-1.715 ~ 1.081)	-0.662 (-2.07 ~ 0.736)	0.107 (-1.052 ~ 1.129)
CogState (2nd) スコア	0.41 (-0.961 ~ 1.691)	0.174 (-1.298 ~ 1.527)	0.231 (-0.331 ~ 2.47)

J-TRC webstudy における症例プロフィール [56]。これまでのアミロイド結果を自己申告した n = 37 のうちでは、22%がアミロイド陽性であった。

表 4：A4 スクリーニングデータの症例プロフィール

	A4 スクリーニング	
	非アジア人 (n = 4277)	アジア人 (n = 169)
SUVr 値	1.03 (0.97 ~ 1.17)	1.02 (0.96 ~ 1.08)
Aβ 陽性 (SUVr ≥ 1.15)	1186 / 4277 (27.7%)	29 / 169 (17.2%)
登録時年齢	70.28 (67.49 ~ 74.17)	71.56 (68.29 ~ 74.32)
性別 (女性)	2574 / 4277 (60.2%)	64 / 169 (37.9%)
人種：アジア人 (yes)	0 / 4277 (0%)	169 / 169 (100%)
認知症の家族歴あり (yes)	2942 / 4277 (68.8%)	74 / 169 (43.8%)
教育歴 (years)	16 (15 ~ 18)	16 (16 ~ 18)
退職している (yes)	3236 / 4277 (75.7%)	134 / 169 (79.3%)
APOE ε4 アリルあり (yes)	1506 / 4277 (35.2%)	37 / 169 (21.9%)
CFI-self (1st) スコア	1.5 (0.5 ~ 3)	2.5 (1 ~ 4.5)
CogState (1st) スコア	-0.052 (-1.586 ~ 1.525)	-0.22 (-1.944 ~ 1.218)
CogState (2nd) スコア	-0.053 (-1.564 ~ 1.537)	-0.229 (-1.775 ~ 1.278)

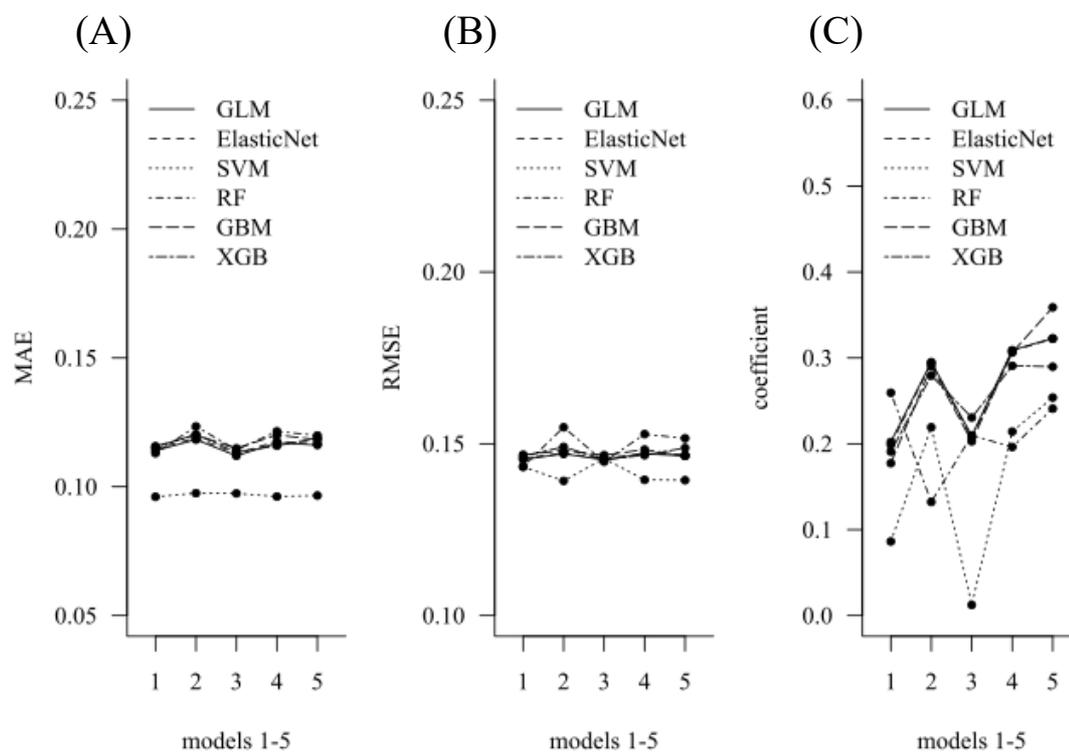
A4 における症例プロフィール [56]。非アジア人グループでは 28%がアミロイド陽性、アジア人グループでは 17%がアミロイド陽性であった [56]。なお A4 アジア人グループのうち半数以上は日本人症例と考えられる。

2-4-2. 予測モデルの評価 (A4 アジア人グループ)

モデルのアルゴリズムのタイプと、特徴量の組み合わせを順に変えていった精度をみた (図 8)。横軸の特徴量組み合わせ (モデル 1-5) を変えていった時に、各アルゴリズム (それぞれの線分に対応) で精度がどう変わるかをプロットしている。メイン指標である RMSE および MAE はモデル 1-5 によらず、またアルゴリズム種にも関係なく、大きな差がないことがわかる。相関係数 R を指標にすると、CFI を特徴量に含むモデル (2・4・5) で当てはまりが多少良くなることがわかる。またアルゴリズム種のうちでは、GLM、ElasticNet、GBM、XGB がモデル 4・5 で同程度に高めの R となっている。このことから、計算がシンプル・簡便でよく頻用されてきている GLM を主なアルゴリズム種として以下の計算では用いることにした。

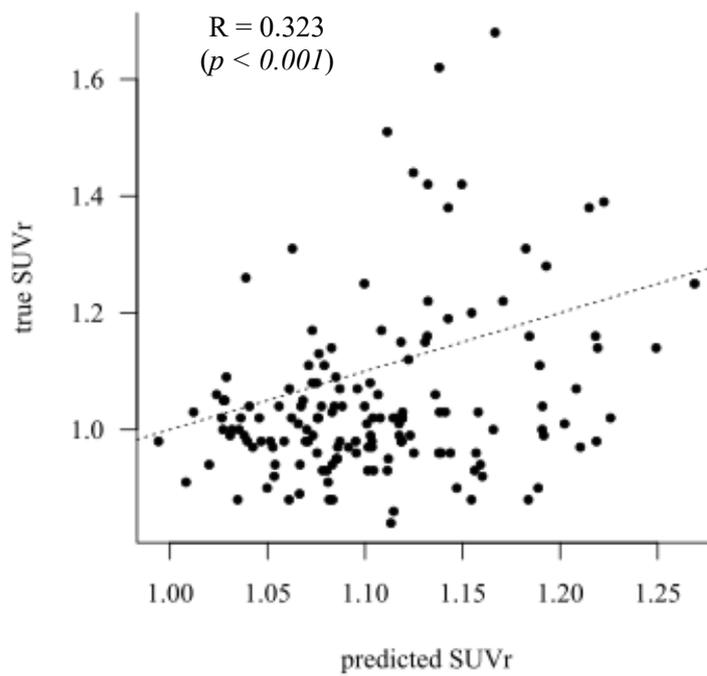
モデル 5 でアルゴリズムが GLM の時に、A4 アジア人サブグループでの予測値と実測値とをプロットすると、弱い相関 ($R = 0.323, p < 0.001$) を示していることがわかる (図 9)。

図 8： 予測モデルの条件別の結果



A4 内でのモデル評価結果 [56]。左から順に、(A) MAE、(B) RMSE、(C) 相関係数 R、についてプロットしている。

図 9： Y-Y plot の一例

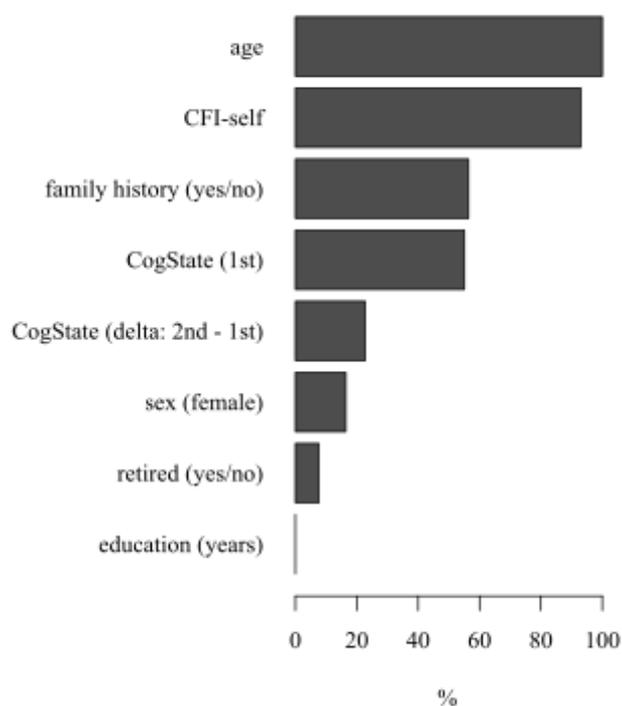


モデル 5 において、アルゴリズムを GLM とした時に、A4 アジア人サブグループでの予測値と実測値とでは弱い相関 ($R = 0.323, p < 0.001$) を示した [56]。

予測モデルの variable importance を計算すると（最大のものを 100%として相対表示）、年齢・CFI・家族歴の3つがもっとも予測に寄与する重要な変数となり、続いて CogState、という順であった。一方で教育年数や就業状況は予測への寄与度が低いという結果であった（図 10）。

図 10： variable importance

重要な順に上から表示（最大 100%）
[56]。

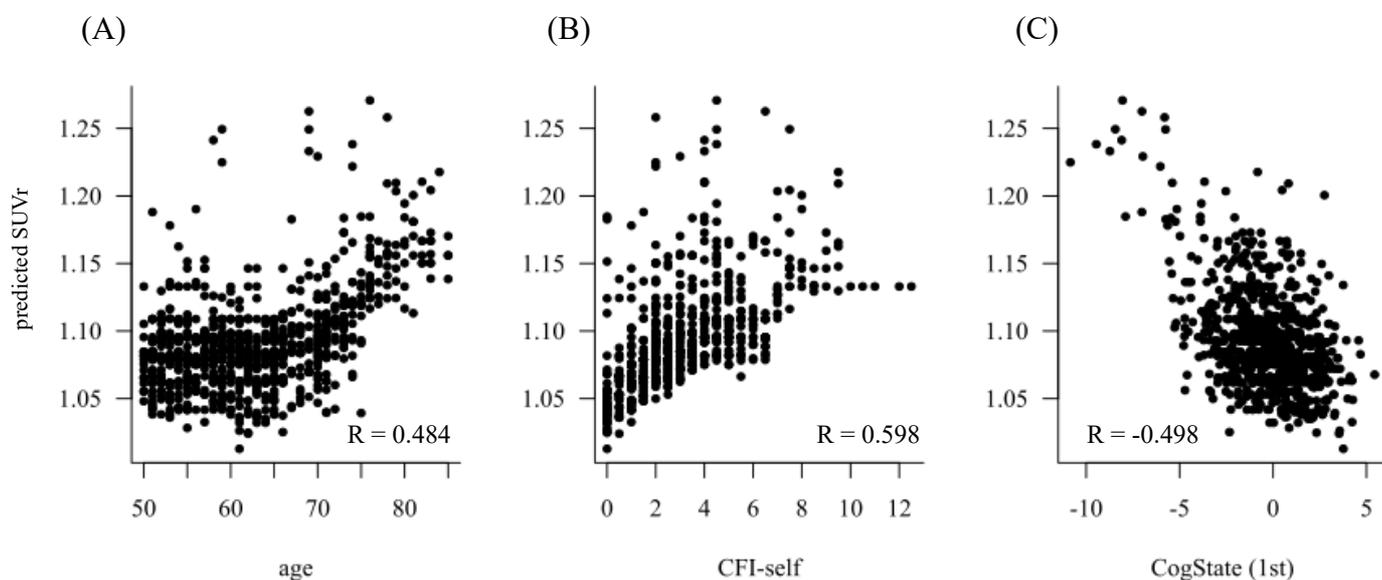


2-4-3. 予測モデルによる予測 (J-TRC webstudy)

続いて、このようにして得られた予測モデルを、実際に J-TRC webstudy に適用してみる。各症例での予測された SUVr 値と、それぞれの特徴量との相関は明瞭であった。それぞれ、年齢が高いほど、CFI が高いほど、また CogState が低いほど、予測 SUVr は高いという結果であった (図 11)。

また過去のアミロイド結果を自己申告した少数グループでの SUVr 予測値は、その自己申告結果と良好な一致が見られていた (図 12) : モデル 2 では AUC 0.727 (95%CI: 0.533-0.922)、モデル 4 では AUC 0.806 (95% CI: 0.691-0.992)、モデル 5 では AUC 0.833 (95%CI: 0.578-1.000)。

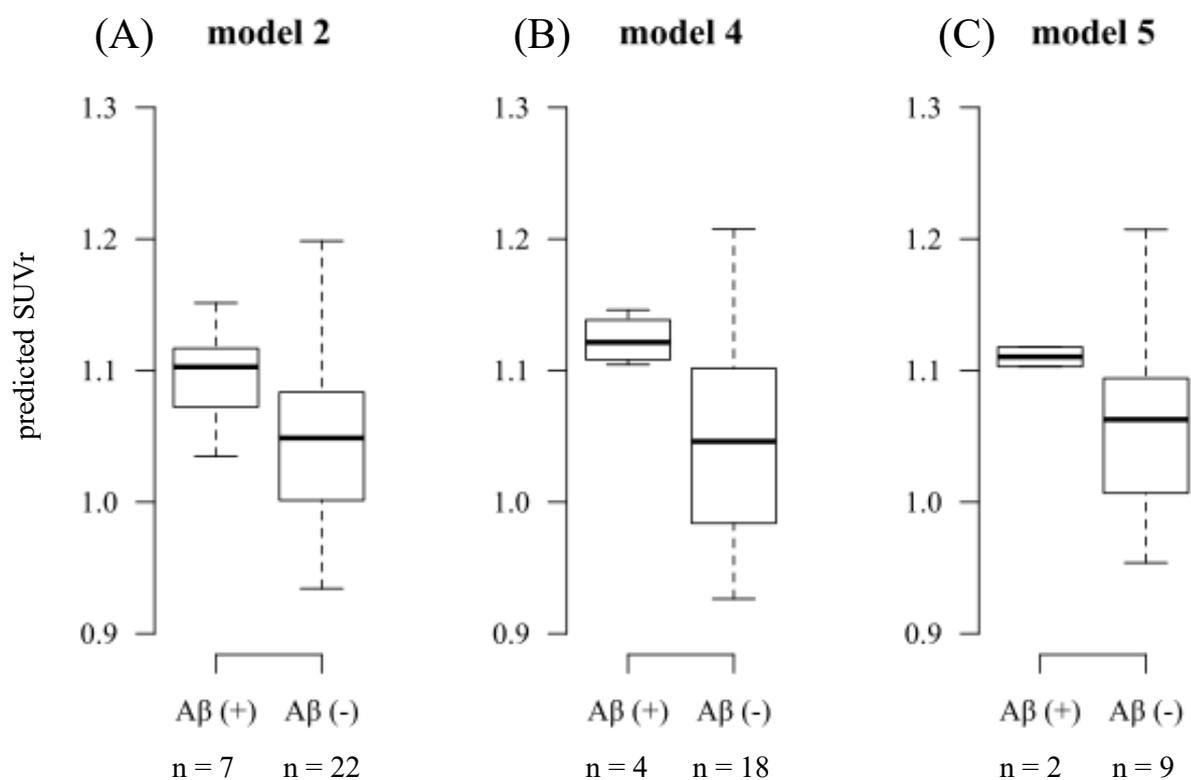
図 11： J-TCR webstudy コホートにおける、予測 SUVr 値と、各特徴量との関係



各症例での予測された SUVr 値と、それぞれの特徴量との相関は明瞭であった

[56] : vs 年齢では $R = 0.484$ ($p < 0.001$), vs CFI では $R = 0.598$ ($p < 0.001$), vs CogState では $R = -0.498$ ($p < 0.001$)。

図 12： J-TRC webstudy の一部被験者における評価



過去のアミロイド結果を自己申告した少数グループでの SUVR 予測値は、その自己申告結果と良好な一致が見られていた [56]：モデル 2 では AUC 0.727 (95%CI: 0.533-0.922)、モデル 4 では AUC 0.806 (95% CI: 0.691-0.992)、モデル 5 では AUC 0.833 (95%CI: 0.578-1.000)。

2-5. 考察（第2章）

本検討では、J-TRC webstudy に適用するためのアミロイドリスク予測を行う予測モデルを構築した。J-TRC study 自体ではアミロイド蓄積の程度に対する正解情報が未だないにも関わらず、このような試みを行なったのは、Introduction でも述べたように、実務上の要請をも含んでいる。すなわち、J-TRC webstudy から onsite study に招待する上では、アミロイド蓄積の可能性が高い人から優先的にスクリーニングを行なっていく方が人的・経済的コスト上で効率が良いし、また登録人数は 3,000 人を超えるのに対して対応可能な研究参加施設は全国で 7 箇所程度と、現実の研究実施キャパシティの問題も無視できない為であった。実際に本検討で導出した、この onsite study 導入期におけるリスク予測モデルが正しく機能していたものだったかは、ある程度 onsite study でのスクリーニングが進んで、実際の PET 結果と照合して初めて評価できるものであり、現段階では評価困難である。今後、onsite 研究でのデータの蓄積とともに、アップデートを繰り返していく必要がある。

とはいえ、一部の被験者で自己申告された他施設でのアミロイド検査結果とは一定以上の良好な一致を見ており（図 12）、一定程度の妥当性はあるものと考えられる。実際、2020 年 12 月末までの時点においては、一部施設での onsite 研究

での実際の PET 結果においては、完全にランダムな場合の事前確率を 20%と仮定しておおよそ 5-10%程度の事前確率の改善が得られており、未だ少数例での検討結果であるという点はあるものの、これは（Intro で述べたように）J-TRC 研究全体を通してみると数百人レベルでの PET スクリーニング必要数の削減を見込める結果である。また本検討での予測モデルを使わなかった場合を考えるに、やはり手作業で年齢や CFI などの（先行研究から有用であることが明らかになっている）事前情報からある程度目星をつけて優先的に招待していくことになると思われるが、これらの特徴量と、予測 SUV_r 値とは明瞭な相関があった（図 11）。つまり、本予測モデルは、manual で onsite study へのリクルートを行なっていることの自動化として、それほど実情から外れた予測運用をしている訳ではないものと考えることが可能である。

本研究のモデルを利用する上で留意しておかなければならないことは複数ある。まず A4 のスクリーニングに至るような被験者と、主に新聞や web から興味を持って webstudy に登録するようになった被験者とでは、その認知機能など含めた患者背景の分布がどの程度異なるのか、不明である（表 3・表 4 にあるように、A4 アジア人グループと代表値は似た分布を示しているものの、これはあまりあてにできない）。特に、女性の比率は A4 訓練グループでは 60%程度であるのに対して J-

TRC webstudy (65 歳以上) では 40%未満であり、性別の variable importance は低いというモデル結果ではあるものの、性別の偏りによって予測能の変化(低下)が潜在的に生じている可能性はある。これについては、訓練データ (A4 study) について、その性別比率を評価データ (J-TRC webstudy) での性別比率にある程度一致させた上で、性別以外の基礎情報でマッチさせた男女ペア群からなる訓練用データを抽出し、これを新規の訓練用データとして用いる、などの対策は考えられる。

また webstudy に参加する上ではパソコンで web サイトにアクセスし ID 作成を含めた登録作業を進めていかなければならないため、認知機能正常でも海馬体積が減少していると (preclinical stage 3 などに相当) 日常のコンピュータ操作時間が低下することから [63]、軽度認知機能低下 (mild cognitive impairment: MCI) 以上の認知機能低下がある人においても webstudy サイトまで到達しづらく、また登録作業が完了しにくい可能性は考えられるものの、webstudy の時点では「認知症ないし AD と診断された既往があるかどうか」のチェック項目以外には認知機能が一定程度低下していても除外する術はないので、MCI を含めたある程度幅広い認知機能状態の被験者が含まれる。また本研究へ参加者を募るにあたっては複数ルート (新聞広告や web での listing 広告/banner 広告) での広報活動が行われており、そのルートの種類によってもどのような参加者背景がリクルートされやすいか等はわかって

いない（web 広告経由の方が若年傾向にあるかもしれない、等）。これらは web ベースの研究レジストリである以上は致し方ない側面であるが、想定される認知機能また参加者背景の分布が不明であるという要素によって、（認知機能については概ね正常範囲の被験者に限定されているという）A4 スクリーニングデータからの予測モデルをそのまま適用する妥当性が損なわれる要因となりうる。例えば、予測モデルでは CFI が高いほど SUVr 予測値が高いと言う結果であるが（図 11）、これも A4 スクリーニングデータでは予め一部の神経・精神疾患の既往を除外した上で認知機能が適切な範囲にある（完全に良すぎず、また MCI に至るほど悪くもない）、と言う基準をクリアした集団をベースとしているが、web サイト経由で登録してきている J-TRC webstudy 参加者に同様に当てはまるとは限らない。また CFI は自己申告制で主訴が多い方がよりスコアが高くなる形式であるため、以前からの既往としてうつ病があるなど主として認知症以外の理由でも同様に CFI が高くなったような場合に、実態に反して予測で陽性判定されてしまうケース（＝偽陽性）も想定される。このように、高すぎる CFI スコアの参加者は実際にはむしろアミロイド予測値が下がる可能性もありうる（一方で逆に上がりすぎる可能性もある）ので、適切な CFI の対象範囲も今後の検討事項である。

また webstudy～onsite study で得られる関連情報の中では A β 蓄積に対する

最大の予測因子は *APOE*-ε4 アリルの存在と想定されるが [64]、A4 データはコーカソイドが大部分を占めるデータであり、*APOE*-ε4 アリル頻度が欧米と本邦で異なっていることなどの点において、A4 データによる予測モデルは、たとえ *APOE* ジェノタイプをモデルに含めていても、本邦コホートにおいてはその予測精度が十分に高まらない可能性はありうる。さらに、A4 study での PET 薬剤は^[18F]フロルベタピルであるのに対して J-TRC onsite study で使用される事になっている PET 薬剤は^[18F]フルメタモールと、同一ではないということも、予測能の一定程度の低下に繋がる可能性はありうる。

本検討では 5 種類の特徴量の組み合わせ（モデル 1～5）で検討したが、CFI を含んでいる方が相関係数 R は良い傾向にあること、また CogState の寄与度は CFI よりも低かったこと、また CogState を含んだモデルはその実施負担が CFI より高いことから完遂人数が少ないことなどを踏まえると、予測モデルとしては基礎的なデータ+初回 CFI、でも概ね良好な精度であって、CogState は必ずしも情報として含めなくても良い可能性がある。CogState については、健常であれば定期的に何回も検査を繰り返した場合に成績が改善する「学習効果」が Aβ+被験者では欠如している可能性 [65] もあるため、特に経時的変化を組み入れることで精度が多少上がる可能性があるのではないかと想定しているものの、その重要性は（特に今回の

検討のように間隔が3ヶ月程度しかなく cross-sectional に近い場合には) CFIよりは低めであり、可能であれば組み入れる、という扱いが現時点では妥当と考えられる。また、データを途中まで入力してそこで離脱してしまったということ自体が preclinical AD における軽微な認知機能低下と関連している可能性もありうるため、この入力完了状況自体も変数化することも考慮される。現在の J-TRC onsite 研究の運用では、入力完了が多い人を優先的に検査している状況であるので中途入力で終了してしまった人のデータは不十分だが、今後のデータの蓄積とともに可能となっていく可能性がある。これらを踏まえると、モデル 1-5 をそれぞれ作って比べるというよりは、すべての変数を含んだモデル（欠損値を許容する変数形式で、欠損については別にフラグを作り）を一つ作る、という対応方法は一案として考えられる。

第3章: 共萎縮ネットワーク解析による背景病理進展の可視化 手法

3-1. 背景

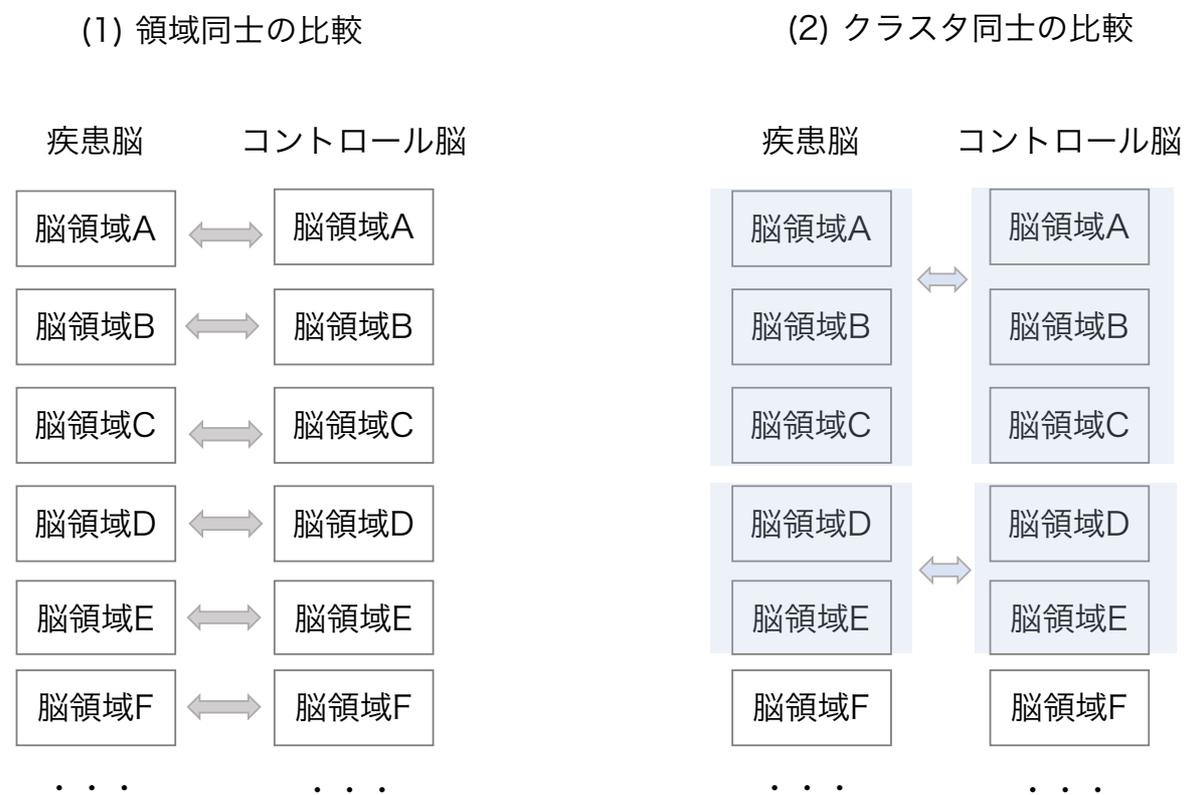
3-1-1. 神経変性病理の拡がりとしての脳萎縮

神経変性疾患の脳萎縮の空間的な拡がりには脳 structural MRI でみることができる。この時、どの部位がどの程度萎縮しているか、その詳細な検討手段としては、例えば Voxel-based morphometry (VBM) におけるように [66]、脳 structural MRI による脳の領域部位ごとに、対照と逐一比較することが一般的である。つまり、脳領域ごとに 1:1 で t-test をしたり (図 13 左)、回帰モデルを利用したりして、疾患・病期に応じてそれぞれの脳領域がどの程度萎縮するか、定量的に検討することになる [67, 68]。

このアプローチの問題点としては、隣接領域同士の時間的・空間的な関連性は考慮されていない、ということがある。神経変性疾患においては、 $A\beta$ 、タウ蛋白、 α シヌクレインなどの異常蛋白は「プリオン様に」中枢神経内で細胞間伝播し、それとともに変性病理への巻き込みが隣接領域に拡がっていく [69-71] ことが近年わかってきている。つまり隣接領域同士はそれぞれ独立して変性していくわけ

ではなく、似たような経時的变化を呈する。このため、部位ごとに単比較を繰り返すよりは、隣接領域同士での同時的な・協調的な・相互作用的な変化を考慮できるような検討を行う方（図 13 右）が、解剖学的・機能的な connection を反映する分だけ、より実態に近い結果を得られる可能性があると考えられる。

図 13：比較検討方法の概念図



左（1）では分割された各脳領域の 1:1 での比較を繰り返す。右（2）では、変化の類似度に応じて脳領域をクラスタ化し、その上で比較する。

3-1-2. 先行研究：コネクトーム

これに対するアプローチとしては、connectome [72] と呼ばれる研究分野で研究されてきた。このグラフ理論をベースとした方法論においては、それぞれの脳領域は node、領域間のつながりは edge として扱われ、疾患 vs 対照間でのグラフ同士の比較として、定量的な解析を行うことができる [73]。例えば AD について脳 structural MRI および functional MRI をベースとした研究では、対照群と比較して AD および MCI では前頭葉・側頭葉・頭頂葉間の interconnectivity が減少している、という結果が得られている [74-78]。また少し異なる手法として、同程度に（疾患 vs 対照で）変化が見られる領域をまとめてクラスタとして見出す、教師なし学習のアプローチも存在する [79-81]。Independent Component Analysis などによるこの手法では、あらかじめ node たる脳領域間の解剖学的・機能的な関係性の前提知識を要せずに、疾患による変化領域群を見出すことができる（図 13 右）。

しかしながら、これらの先行研究では、同程度に萎縮した脳領域をいくつかのモジュール（～塊）として扱い、その経時的変化をみるという手法には乏しかった。というのは、病理学的変化が隣接する脳領域に波及していく途上において

は、同程度に病理学的変化の影響を受けて萎縮している領域が同時的に存在するはずであり、その様な領域分布の経時的变化を見出すことができれば、背景となる病理学的変化の時空間的広がりを経時的に可視化できる方法となるのではないかと考えられるからである。具体的に AD でいうと、アミロイドカスケード仮説 [15] に基づけばタウ病理 (T) の広がり、脳萎縮 (N) 範囲の拡大、認知症状の増悪、とは時間的にも強く関連しているため、症状の進行に合わせて同程度に萎縮している脳領域モジュールがあった時にその経時的拡大は、病理学的背景の一つとして (Braak 神経原線維変化進展ステージ [46] で規定されているように) 例えばタウ病理の同時的な広がりを一定以上反映しているのではないかと仮説を立てることができる。すなわち、structural MRI で見た脳萎縮の広がりから先立つ、タウ病理の時空間的広がり (T) を間接的に可視化するのではないかと考えられる。

3-1-3. 遺伝子発現解析手法 WGCNA の応用

例えば第 4 章で扱うマイクロアレイデータにおいて、疾患 vs 対照で DNA メチル化の程度が異なる CpG サイトを同定する手法として、第 4 章では CpG サイト同士の単比較による手法 (differentially-methylated probe: DMP) [82] を用いている。その

ほかに頻用される解析手法として、共発現解析、特に WGCNA [83, 84] という手法がある。これは、もともとはトランスクリプトームのデータに対して開発された手法で、階層クラスタリングを用いて、発現レベルに基づいて各遺伝子を多数のサブグループにクラスタリングし、そこから、共通して発現している可能性のある遺伝子をひとまとまりとして（前項で述べたように）モジュール化し、疾患状態での遺伝子間の関係や相互作用について明らかにする端緒とすることができる。この手法（WGCNA）の良い点は、トランスクリプトームのみならず DNA メチル化を含む様々な omics データに適用可能で、またデータ形式が正規化された非負行列である限りは数学的には（omics データ以外の）どのような種類のデータにも適用することが原理的には可能であるということにもある。そのため、すでにこの手法を脳 functional MRI データに対して適用した研究 [85] はなされており、その研究においては、小領域の集合からなるクラスタを見出す既存の手法（PCA [79] や ICA [80, 81]）と比較してより妥当なクラスタ結果が導かれた、と結論されており、omics データから離れた脳画像データに適用しても、それら既存の手法よりも良い結果が得られる可能性がある。ただ、脳画像クラスタの経時的な変化を見た研究や脳 structural MRI データに適用された研究は、本検討実施時点までは明らかではなく、また上節の様な仮説形成も行われていなかった [86]。

3-2. 本検討（第3章）の目的

そこで本検討では、この WGCNA 手法を MCI の structural MRI データに適用して、上節の仮説を検証することを目的とする。これによって、疾患に関連して同程度に萎縮している領域モジュールを同定し、さらにその経時的变化を追うことで、疾患の進行（認知症状の進行）に伴う脳萎縮前線を可視化することができ、さらに一定以上はその背景病理の同時的拡がり方の可視化にも繋がるのではないかと期待できる [86]。なお本章で MCI を対象としているのは、カスケードにおいてちょうどタウ病理の拡がり・脳萎縮・認知症状と連続的につながってくる時期の認知機能に最も対応している認知症状区分であることと、髄液 A β /p-tau/t-tau の場合いずれも陽性結果自体に AD dementia に対する疾患マーカーとしての意義はあるものの、数値による病勢・ステージとの相関は明らかではない、つまり CSF ベースの A/T/N は AD 疾患マーカーとしての意義はあるが MCI due to AD 以降の AD ステージマーカーとしては有用ではないと考えられているため [23]、である。

この目的のために利用するデータとしては、ここでは J-ADNI [52] を用いる。これは北米 ADNI 研究とコラボラトリーに開始された本邦における大規模観察研究である。この J-ADNI では、脳 structural MRI データについては *FreeSurfer*

[87] という専用ソフトウェアで解析されて各脳領域の皮質厚や面積・体積などの情報が蓄積されているため、これを利用することができる。

3-3. 方法

3-3-1. 倫理委員会承認

以下の過程は、東京大学大学院医学系研究科 倫理委員会の承認(審査番号: 11628-(3))を得て施行した。

3-3-2. J-ADNI データについて

Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (J-ADNI) 研究 [52] は、北米 ADNI 研究とのコラボレーションとして 2010 年に開始された、MRI・PET その他のバイオマーカーや臨床的・神経学的評価を組み合わせることで、軽度認知障害 (mild cognitive impairment: MCI) や早期 AD の進行を予測できるかを検証するために始められた多施設での前向き観察研究である。

3-3-3. データ取得とサンプルの組み入れ基準

データベース web サイトである NBDC

(<https://humandbs.biosciencedbc.jp/en/hum0043-v1>) から、先方のデータアクセス委員

会の承認を得て、2018年5月に csv ファイルからなる臨床・検査情報のデータをダウンロードした。公開データであるため、利用にあたり参加者からの再度の同意取得は不要であった。

本研究では、J-ADNI 観察開始時点で MCI および認知機能正常 (cognitive normal: CN) と判定された症例を対象とした。この MCI についての J-ADNI における基準は以下の通りである [88]: 自覚的ないし家族からの他覚的な認知機能低下の訴えがあり、J-ADNI ベースライン時の年齢 60-84 歳で、日本語話者で、MMSE 24-30、全般性 CDR 0.5、また CDR-SOB 0.5 以上、に該当していること、である。J-ADNI では MCI (および CN) は 36 ヶ月観察されることになっており、ベースラインデータ、および 36 ヶ月後のデータを利用した。また CN については MRI データ相対化のための対照群として利用することとし、これもベースラインと 36 ヶ月後データを利用した。MCI の臨床的進行度合いを測るマーカーとして、ADAS-cog13, MMSE, また AD への (36 ヶ月以内の) conversion の有無、とした。なおここでの AD は、conventional な基準である NINCDS-ADRDA 基準 [1] で probable AD に該当する症例としている。またここでの CN の認知機能の該当範囲は「MCI に該当しない軽症のもの全て」というやや広い意味合いであり、第 4 章で扱う US-ADNI における CN の対象とする範囲とは完全には一致しない。例えば、US-ADNI では追加さ

れている「わずかな自覚症状を呈する」 subjective memory complaints (SMC) という区分は J-ADNI では相当する区分がなく、CN に含まれる。

3-3-4. 脳 structural MRI データ前処理

データ前処理過程は図 14 に示した様になっている。まず MCI および CN コホートのいずれについても、ベースラインおよび 36 ヶ月時点において 1.5 テスラの MRI で撮像された T1 強調画像のデータが得られている。なお MRI 自体は施行されていても *FreeSurfer* [87] による解析が未処理の症例もあるので、36 ヶ月時点での解析可能な症例数は相対的に減っている（一部、中途ドロップアウトで MRI が撮像されなかった MCI 症例もある）。まずベースラインでの脳構造 MRI データは、*FreeSurfer* [87] という解析用ソフトウェアを用いて、Desikan-Killiany アトラス [89] という脳領域分割方式に基づいて、表 5 に示すように、左右 34 領域の皮質については厚および面積、さらに 28 箇所 of 皮質下領域については体積が得られたものがデータサーバーに既に upload されている。

表 5：脳領域の分割範囲および laterality、またそれらの略語

脳領域	laterality	脳領域	laterality
Bank of superior temporal sulcus	R/L	Lateral ventricle	R/L
Caudal anterior cingulate cortex	R/L	Thalamus proper	R/L
Caudal middle frontal gyrus	R/L	Caudate	R/L
Cuneus cortex	R/L	Putamen	R/L
Entorhinal cortex	R/L	Pallidum	R/L
Fusiform gyrus	R/L	Third ventricle	-
Inferior parietal cortex	R/L	Hippocampus	R/L
Inferior temporal gyrus	R/L	Amygdala	R/L
Isthmus cingulate cortex	R/L	Accumbens area	R/L
Lateral occipital cortex	R/L	Ventral diencephalon	R/L
Lateral orbitofrontal cortex	R/L	White matter hypointensities	-
Lingual gyrus	R/L	Non-white matter hypointensities	-
Medial orbitofrontal cortex	R/L	Corpus callosum: anterior	-
Middle temporal gyrus	R/L	Corpus callosum: mid-anterior	-
Parahippocampal gyrus	R/L	Corpus callosum: central	-
Paracentral lobule	R/L	Corpus callosum: mid-posterior	-
Pars opercularis	R/L	Corpus callosum: posterior	-
Pars orbitalis	R/L	Unsegmented white matter	R/L
Pars triangularis	R/L		
Pericalcarine cortex	R/L		
Postcentral gyrus	R/L		
Posterior cingulate cortex	R/L		
Precentral gyrus	R/L		
Precuneus cortex	R/L		
Rostral anterior cingulate cortex	R/L		
Rostral middle frontal gyrus	R/L		
Superior frontal gyrus	R/L		
Superior parietal gyrus	R/L		
Superior temporal gyrus	R/L		
Supramarginal gyrus	R/L		
Frontal pole	R/L		
Temporal pole	R/L		
Transverse temporal cortex	R/L		
Insular	R/L		

脳領域分割の方式 [86]。基本的には Desikan-Killiany アトラスに基づいている。

その処理済データを取得し、標準化を行う。この標準化においては、皮質については皮質平均厚を [90]、皮質以外の領域・空間については体積を頭蓋内体積で除したものの (= 相対体積) を用いた [91]。これらを、(ベースラインでの) CN でのデータを reference として、次の式に従って robust Z 変換した [92]：

$$\text{robust } Z = \frac{1.3489 \times (\text{raw データ値} - \text{CN での中央値})}{(\text{CN での } Interquartile \text{ Range})}$$

平均値との差を標準偏差 SD で除する通常の Z 変換を用いなかったのは、皮質厚や相対体積は正規分布に従うとは限らずまた実際に厳密には正規分布に従う分布ではなかったためであるのと、また元々の WGCNA において適用されていた遺伝子発現データと (本検討で用いた構造 MRI の計測データと) ではデータの従う分布が異なる可能性があるためである。さらに、36 ヶ月後の時点のデータとしては、MCI コホートのうち 36 ヶ月後にフォローされた MRI データを、CN コホートのうち 36 ヶ月後に得られた MRI データを reference として、上記同様に robust Z 変換した。そして、36 ヶ月後の Z データからベースラインの Z データを引き算して、36 ヶ月間の変化を示すデータとした。この結果、MCI コホートからのベースラインデータ n = 204、また 36 ヶ月間の変化分として n = 100 のデータが得られた (図 14)。

図 14：データ前処理フロー



データ処理フローを示す [86]。まずベースラインのデータセットを作る。これには、CNを参照基準としてZ変換する。さらに、36ヶ月後データセットも、(36ヶ月後の)CNを参照基準としてZ変換する。差分データセットは、36ヶ月後のデータセットからベースラインのデータセットの差分をとったものである(共通してデータがある症例のみ)。

3-3-5. 統計解析について

本検討でのデータ処理および解析は全て R を用いている。多重検定の補正には Benjamini & Hochberg (BH) 法 [93] を用いた。また、脳萎縮と関連させる経時的な臨床指標としては ADAS-cog13 (の変化速度 (=スコア差分/観察月数)) および conversion 有無を用いるが、これら 2 つ (ADAS 変化速度と conversion) に関する脳萎縮の分布の違いを調べるため、これらについて脳領域 Z スコアで回帰させた結果の説明モデルにおける variable importance [61] の分布を比較した。算出においては、通常の一般化線形回帰では (隣接する領域同士の相関は通常強いと想定され) 多重共線性の懸念があるため、support vector machine (SVM) を適用した。importance 算出には R パッケージ *caret* [60] を用いた。

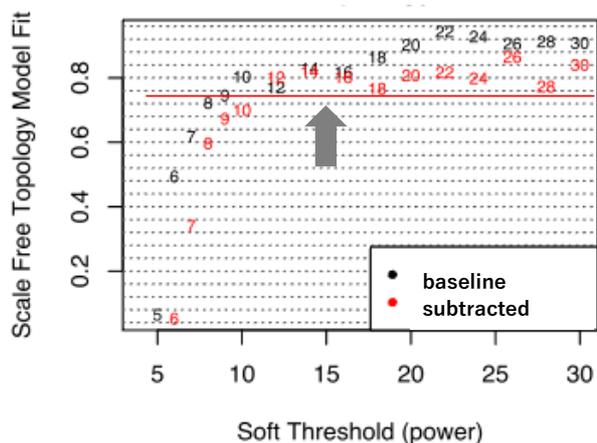
3-3-6. 重み付き共萎縮ネットワーク解析 : WCANA

解析の主要部分は R パッケージ *WGCNA* (weighted gene co-methylation network analysis) [94] を用いた。ここでは共通して萎縮する脳領域のネットワークを見出す目的であるので、便宜的に weighted co-atrophy network analysis (WCANA) と称しておく。MCI コホート (ベースラインデータないし差分データ) の各サンプルについて

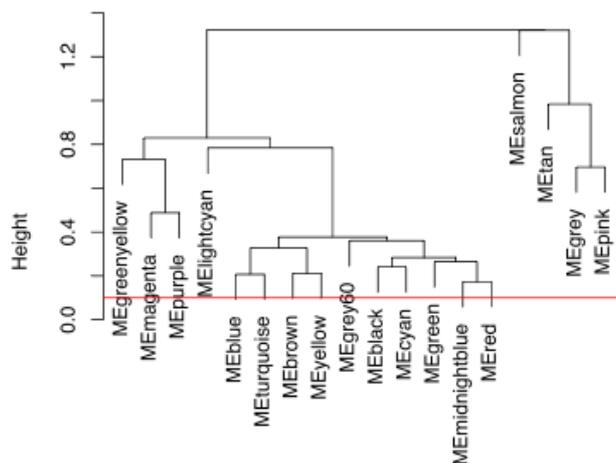
て合計 164 箇所のそれぞれを robust Z 変換した行列をまず得る。ここから、変化方向を加味した (= signed)、Spearman 順位相関を基にした隣接行列を得る。隣接行列においては、0/1 のカットオフを用いる代わりに、「soft-thresholding」という方法で [0-1] の範囲で重み付けを行なった [84]。この「soft-thresholding」では図のように、scale-free topography 基準に基づき、ベースラインデータおよび差分データのいずれでも一定の飽和状態に達する最小の次数を選択した (図 15A)。そこからさらに隣接行列を topological overlap 行列 (TOM) に変換した [84]。本検討においては、ベースラインのみ、あるいは 36 ヶ月のみ、の cross-sectional な解析がメインではなく、36 ヶ月の時間的変化を検討したいため、ベースラインおよび差分のデータセットそれぞれについて上記 TOM を算出し、これら 2 つの TOM の間での行列要素ごとにより小さい方の値を用いた "consensus TOM" を得る [84]。この行列からデンドログラムを描き、各クラスタ (= module) の要素数になるべく少なく、かつクラスタ数になるべく多くなる様に、デンドログラム のカットオフ高を決める。ここでは一般的なカットオフ高として 0.1~0.2 程度の範囲から探索した (図 15B)。

図 15 : Soft-thresholding および cut-tree

(A)



(B)



パラメータ調整の仕方を示す [86] : (A) まず「soft-thresholding」では、scale-free topography 基準に基づき、ベースラインデータおよび差分データのいずれでも一定の飽和状態に達する最小の次数を選択した (A : 矢印)。(B) さらに、TOM 行列からデンドログラムを描き、各クラスタ (=module) の要素数になるべく少なく、かつクラスタ数になるべく多くなる様に、デンドログラム のカットオフ高を決める (B : 赤ライン)。

これによってデンドログラム のツリーがカットされ、module ごとに脳領域がクラスタ化される。module は自動的に色が割り振られる（分類されなかったその他としての”gray module”以外）。表の様になっている。module ごとの PCA 第 1 成分を”module eigengene”とすると、ADAS-cog13 や conversion 有無など特徴量との相関をとる指標として用いることができる。これによって、ある module 内の（複数領域の協調的な）変化が、これら特徴量とどの程度相関してどの方向に変化しているのか（順方向か逆方向か）、見ることができる。上記 WCANA によって得られた module の分布については、R パッケージ ggseg [95] を用いて可視化した。

3-4. 結果

3-4-1. 組み入れ症例のプロファイル

組み入れた MCI n = 204 例、また対象としての CN 群の特徴は表 6 の様になっている。先行研究に矛盾なく、MCI 群はより高齢で、教育年数が短く、認知機能スケールもより悪く、*APOE-e4* アリルを持つ率が高く、またアミロイド陽性率が高かった (PET ないし CSF) [88]。MCI の中で、36 ヶ月以内に AD に convert したのは 108/204 (53%) であった。

表 6：症例プロフィール

	CN (n=136)	CN IQR/%	MCI (n=204)	MCI IQR/%	<i>p</i>
登録時年齢 (y/o)	67	(64-71)	74	(69 - 77.25)	<0.001
性別(女性)	72/136	52.94%	103 / 204	50.49%	0.740
教育歴 (years)	14	(12-16)	12	(12 - 16)	0.008
Baseline ADAS-cog13	7.5	(4.7-10)	20	(15.3-24.7)	<0.001
Baseline MMSE	30	(29-30)	26	(25-28)	<0.001
<i>APOE</i> ε4 allele(s)	1/32/103		16 / 89 / 97		<0.001
アミロイド PET 陽性	9/48	18.75%	35 / 55	63.64%	<0.001
CSF Aβ (pg/ml)	467.9	(347.7-571.8)	297.5	(248.7- 409.2)	<0.001
CSF Aβ <333 pg/ml	8/50	16.00%	48 / 76	63.16%	<0.001
CSF p-tau (pg/ml)	34.85	(32.27-40.21)	58.98	(39.75- 78.72)	<0.001
Baseline CCR (ml/min)	96.3	(78.37-114.0)	79.15	(66.1-94.04)	<0.001
MCI conversion あり (3 年間)	-	-	108/204	52.94%	-
ADAS 進行速度 (3 年間)	-0.0194	(-0.0833- 0.03818)	0.1833	(0.02502- 0.3611)	<0.001

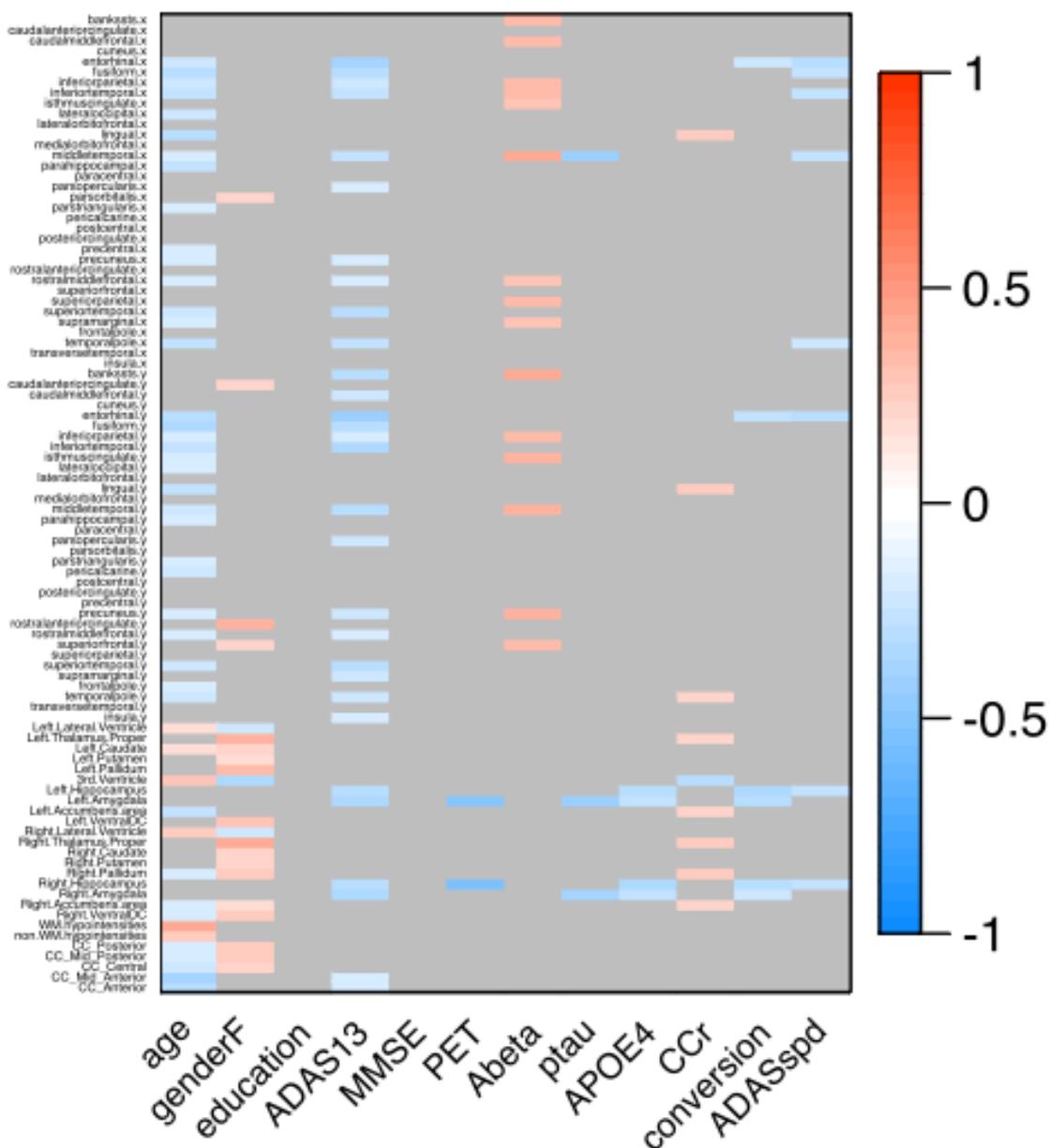
症例プロフィール表 [86]。J-ADNI は第 4 章の ADNI データとは異なり、CSF カットオフは Aβ < 333 と高くなっている（これはおそらく測定機器などを含めたラボ環境による違いが大きく影響しているものと考えられている）。

3-4-2. 臨床的な各因子との脳萎縮との関係：単解析

臨床的な各因子との脳萎縮との関係をまず概観するため、まず単純に Z スコアと conversion 有無、また ADAS-cog13 の変化速度との相関を各領域について算出した。まず conversion 有無との関連では、ベースラインの側頭葉・頭頂葉の萎縮と、年齢・認知機能スコア・アミロイド陽性の有無・APOE-e4 アリル有無・将来の増悪の程度（conversion 有無および ADAS-cog13 進行速度）と有意な相関があった（Spearman's correlation 多重補正後 $p < 0.05$ ）（図 16）。一方で、36 ヶ月間の差分データについては、entorhinal cortex & parahippocampal gyrus の相対的な厚減少、また側脳室・第 3 脳室の相対的な拡大が、臨床的な 36 ヶ月間の増悪と関連していた（図 17）。

これらの結果は、MCI のうち conversion する人はしない人に比べて、嗅内野・海馬・内側側頭葉が萎縮している [68, 96, 97]、また MCI と AD と比べた時に左側頭葉・海馬・頭頂葉・側脳室の体積に有意な差がある [98, 99]、といった他のコホートでの先行研究結果と矛盾しない。

図 16：ベースラインの各領域値と症例データ項目との相関値

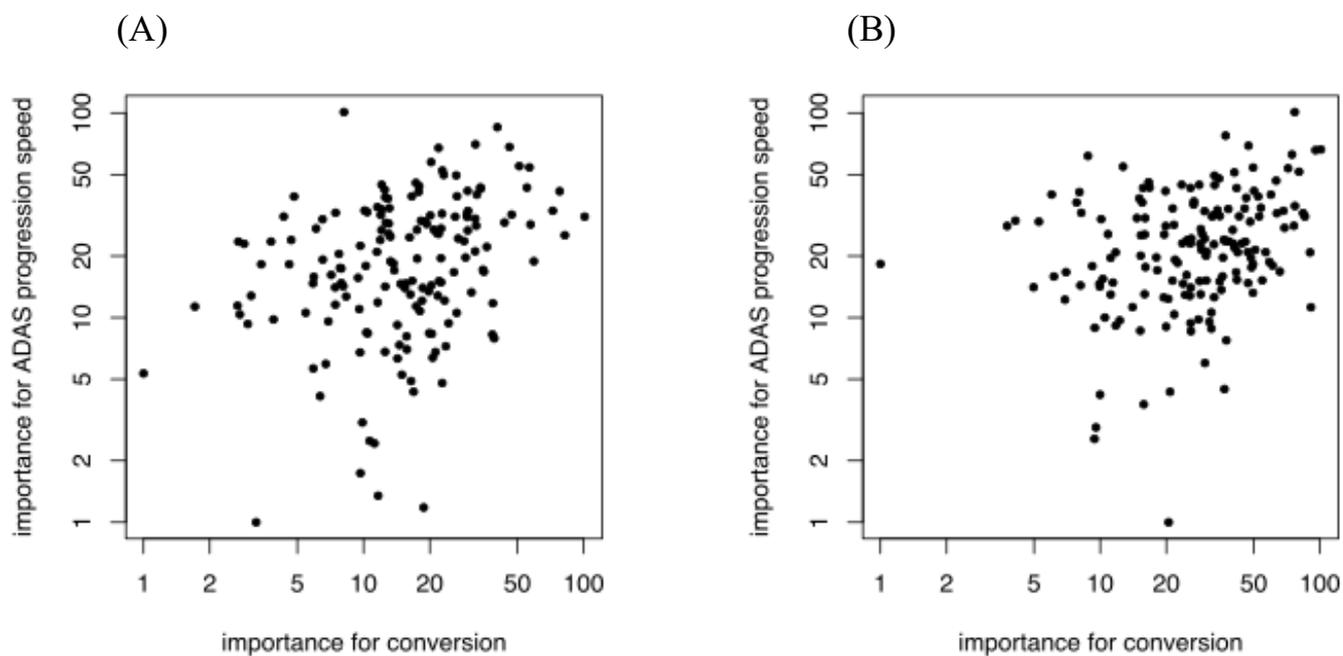


領域値と特徴量との相関表 [86]。有意 ($q < 0.05$) な組み合わせのみ、ヒートマップで相関係数を表示している。conversion 有無との関連では、ベースラインの側頭葉・頭頂葉の萎縮と、年齢・認知機能スコア・アミロイド陽性の有無・*APOE-e4* アリル有無・将来の増悪の程度 (conversion 有無および ADAS-cog13 進行速度) と有意な相関があった (Spearman's correlation 多重補正後 $p < 0.05$)。

続いて、ADAS-cog13 と conversion に関連した萎縮の分布がどの程度異なるか検討するため、それぞれについての variable importance を算出した。ベースラインデータ（図 18A）、および差分データ（図 18B）について、各領域に関して対 conversion 寄与度を X 軸に、対 ADAS 増悪速度寄与度を Y 軸にとって plot した結果が図 18 である。これは conversion および ADA-cog13 変化速度に対する各領域の寄与度の違いを示しているが、A では $\rho = 0.339$ ($p < 0.001$), B では $\rho = 0.289$ ($p < 0.001$)と有意な相関を示しており、これら conversion と ADAS-cog13 変化速度とは一定程度対応した分布を示していることがわかる。

図 18：各領域の variable importance を、conversion に対する寄与度 vs ADAS-cog13

変化速度に対する寄与度として plot したもの



各データセットにおける、variable importance の散布図 [86]。A：ベースラインデータ：rho 0.339 ($p < 0.001$)、B：差分データ：rho = 0.289 ($p < 0.001$)、についての plot である [86]。

3-4-3. WCANA による interconnectivity 解析

続いて、当初の目的通りにネットワーク解析を行った。隣接行列を soft-thresholding するにあたっては双方のデータから次数=14 と定めた。consensus TOM を得て、そこからのデンドログラム でのカットオフ高は 0.2 とした（なお 0.1-0.2 の範囲で変化させても同じ結果が得られていた）。

結果として、164 領域のうち 28%に当たる 46 領域が 17 module に分配された（それ以外はうまくクラスタされなかったもの：gray module）（表 7）。皮質 module は同じ脳葉内に位置する傾向にあり（茶・黄は側頭葉内、シアン・赤・ミッドナイトブルーは頭頂葉内）、一方で皮質下 module は両側でまとめて module 化する傾向にあった（サーモンは両側側脳室、黄緑は両視床、マゼンタ・紫・薄シアンは両基底核）。

表 7： module の色と割り当てられた脳領域

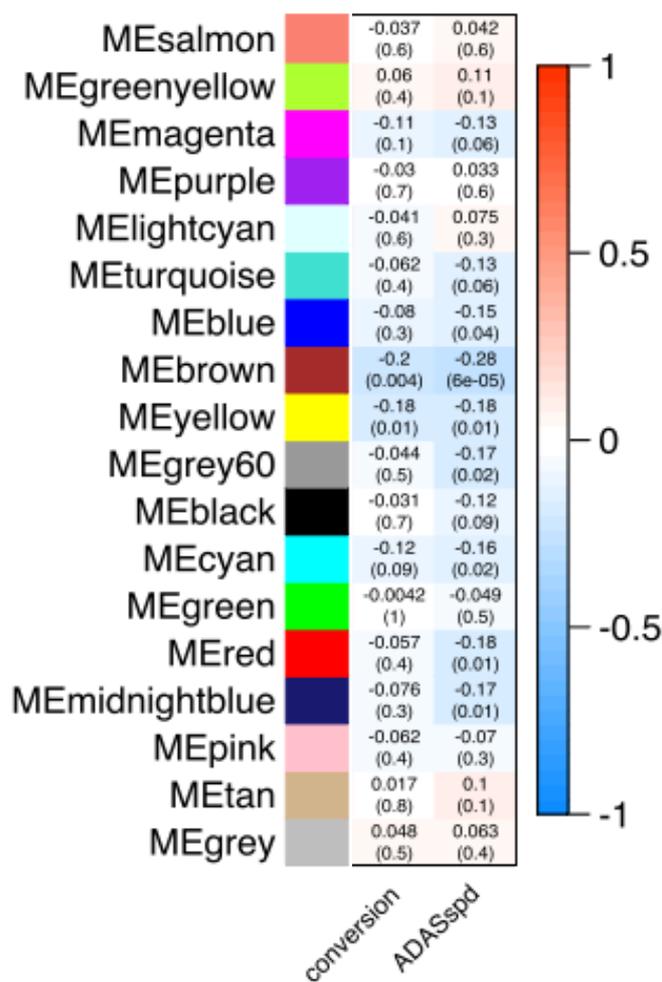
Color	Module name	Regions/structures (laterality)
	salmon	Lateral ventricle (R/L)
	greenyellow	Thalamus proper (R/L)
	magenta	Putamen (R/L)
	purple	Caudate (R/L)
	lightcyan	Pallidum (R/L)
	turquoise	Caudal middle frontal (R/L), superior frontal (R/L)
	blue	Rostral middle frontal (R/L), pars triangularis (R/L)
	brown	Fusiform (R), middle temporal (R), superior temporal (R), inferior temporal (R)
	yellow	Fusiform (L), middle temporal (L), superior temporal (L), inferior temporal (L)
	grey60	Lateral occipital (R/L)
	black	Supramarginal (L), pars opercularis (L), inferior parietal (L)
	cyan	Precuneus (L), superior parietal (L)
	green	Precentral (R/L), paracentral (R), postcentral (L)
	red	Inferior parietal (R), postcentral (R), supramarginal (R)
	midnightblue	Precuneus (R), superior parietal (R)
	pink	Unsegmented white matter (R/L)
	tan	Ventral diencephalon (R/L)
	gray	All other regions/structures not shown above.

クラスタ分けの結果表 [86]。164 領域のうち 28%に当たる 46 領域が 17 module に分配された（これらとは別に、gray module はいずれにも当てはまらなかった「その他」をまとめたものである）。

それぞれの module と、臨床的特徴量との相関を取った結果が図の様になる。図 19 はベースラインデータ、図 20 は差分データで、いずれも、列項目の特徴量と、行項目の module の PCA 第 1 成分との間の相関係数 (Spearman rho) および多重補正後 p 値が各セル内に示されており、p 値によらず $\rho > 0$ の場合は赤色系、 $\rho < 0$ の場合は青色系で色分けしたヒートマップになっている。

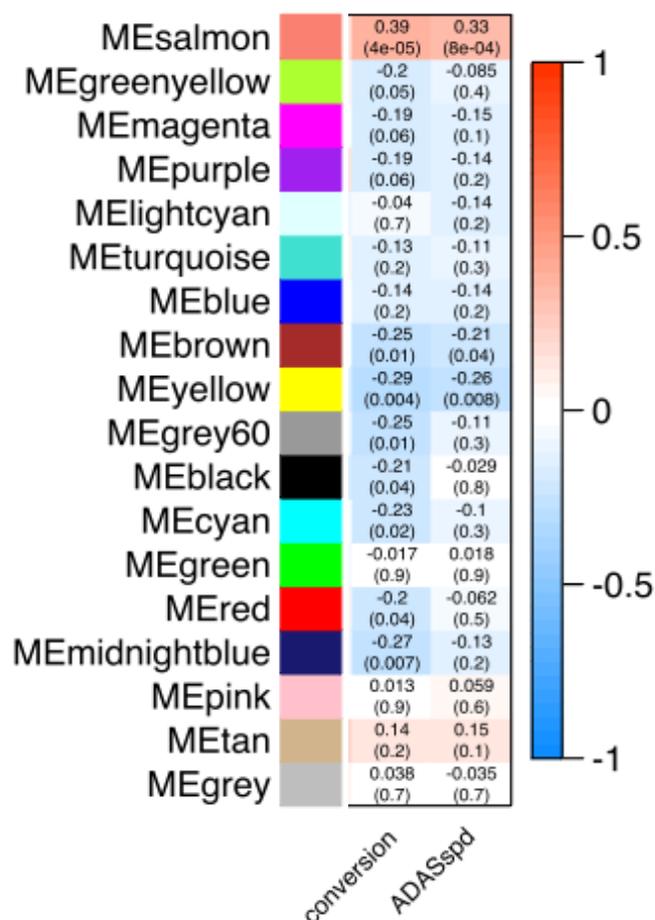
まずベースラインデータを見ると、側頭葉領域のベースラインの萎縮 (茶色：右側頭葉、黄色：左側頭葉) は、将来の MCI conversion および ADAS 増悪と強い相関を示している。また差分データを見ると、36 ヶ月における側頭葉の萎縮進行 (茶・黄 module) ないし側脳室の拡大進行 (サーモン module) は臨床的増悪 (conversion 有無および ADAS) と強い相関を示していた。また、頭頂葉や側頭葉などの皮質の 36 ヶ月間の変化もまた、conversion 有りと有意な相関を示していた (これらの場合は ADAS とは相関なし)。

図 19：各 module と特徴量との相関：ベースラインデータ



各 module と特徴量との相関結果 [86]。列項目の特徴量と、行項目の module の第 1PCA 成分との間の相関係数 (Spearman rho) および多重補正後 p 値が各セル内に示されており、p 値によらず $\rho > 0$ の場合は赤色系、 $\rho < 0$ の場合は青色系で色分けしたヒートマップになっている。

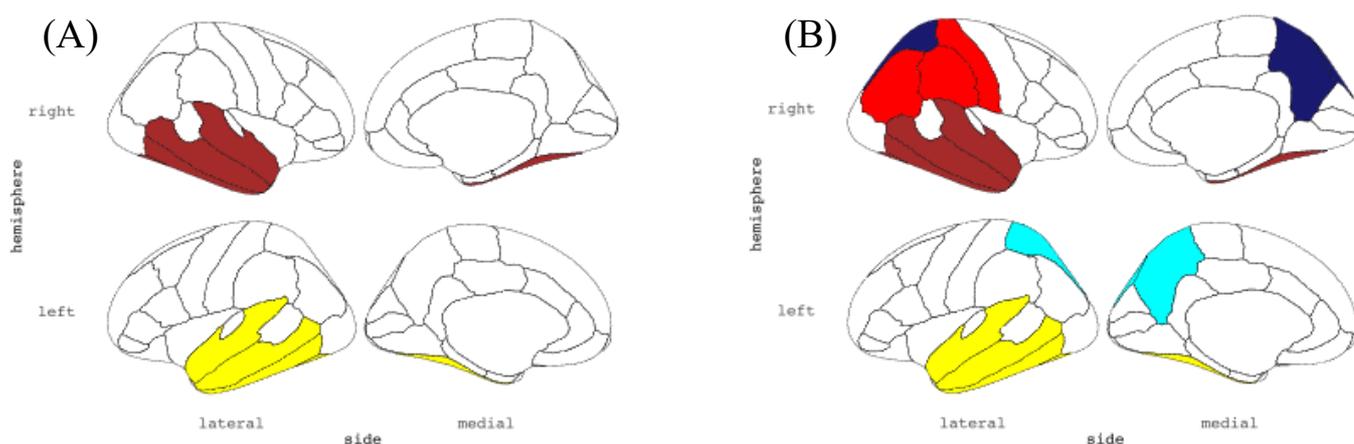
図 20：各 module と特徴量との相関：差分データ



各 module と特徴量との相関結果 [86]。列項目の特徴量と、行項目の module の第 1PCA 成分との間の相関係数 (Spearman rho) および多重補正後 p 値が各セル内に示されており、p 値によらず $\rho > 0$ の場合は赤色系、 $\rho < 0$ の場合は青色系で色分けしたヒートマップになっている。

ベースラインから 36 ヶ月間までの縦断的变化についてまとめると、conversion と相関した同程度の共萎縮領域についてみると、ベースライン当初は側頭葉に局限しているものの（図 21A）、36 ヶ月間の変化においては側頭葉のみならず頭頂葉にも分布している（図 21B）。

図 21：conversion に関連している module の分布の変化



Module 分布の経時的变化 [86]。ベースラインの萎縮そのものについてのクラスタリング分布をまず導出 (A) し、さらには 36 ヶ月後の時点そのものではなくベースラインからみて 36 ヶ月間の「萎縮変化の差分」についてクラスタリング分布を導出した (B)。なおクラスタ分けにおいては、module 範囲を (A) と (B) とで共通するような手法を用いている。また後者 (B) で見ている分布は、36 ヶ月後までの間に脳萎縮進行を同程度に示した脳領域の分布である。ここから、当初は側頭葉に局限しているものの (A)、変化においては側頭葉のみならず頭頂葉にも拡大している (B) ことがわかる。

3-4. 考察（第3章）

本検討における結果をまとめると、クラスタ分けが共通するような手法で module 範囲を（図 21A）と（図 21B）とで対応させた上で、ベースラインの萎縮そのものについてのクラスタリング分布をまず導出（図 21A）し、さらには 36 ヶ月後の時点そのものではなくベースラインからみて 36 ヶ月間の萎縮変化の差分についてクラスタリング分布を導出した（図 21B）。後者（図 21B）で見ている分布は、36 ヶ月後までの間に脳萎縮進行を同程度に示した脳領域の分布である。ここから、（図 21A）と（図 21B）とを対比させて見ると、共通した程度の萎縮の進行は、（MCI conversion に関連して）ベースラインから 36 ヶ月後までの間の経過の中で側頭葉から頭頂葉へ進展していくことが結果として示されたと言える。

一般に神経変性疾患においては、背景病理（異常蛋白の神経細胞間伝播）の拡大・進展の反映としての脳萎縮が拡大・進展していく。このとき、背景病理と脳萎縮との間に一定程度の時間的相関（例えば AD においては仮説としての T→N のカスケード）を仮定すると、背景病理の空間的な拡大は、一定の delay をもって同分布での同程度の脳萎縮として顕在化すると考えられる。ということは逆に、共通する程度の脳萎縮の時系列変化での分布を同定することができれば、背景病理の

拡大していく前線（の少なくとも一部）について推測することができるのではないかと考えられる。このため、本手法は、構造的 MRI データの modality を超えて、より上流の病理学的変化の経時的な拡がり方を捉えることができる手法である可能性がある。実際、結果的に、本検討における共萎縮の時系列変化での分布は AD における既知のタウ病理進展様式 [46] と一定程度一致するものであった。

とはいえ、本手法についての上記解釈の妥当性は今のところ単一コホートデータで結果が既知の病理学的分布と大きく矛盾はない事を示したに過ぎずそれ自体不十分であって、これをより十全に検証するためには、他の AD データで同様に検証することが必要である。また、本検討では AD を検討対象疾患としたが、本手法の特徴の一つとしてデータ駆動性の解析であって領域間の解剖学的 connection についての前提知識が不要であるということが挙げられるため、本手法の有用性は AD に限らず、レビー小体病などの様に病理学的伝播様式がよく知られている疾患の画像データについても同様に解析を行い、検証してみることが重要と考えられる。その上で、未だ病理学的進展について十分にわかっていない比較的稀な神経変性疾患などでの、生前に病理学的な拡大様式を推測・可視化する応用手法の一つとして有用である可能性が期待できる。

本手法と概ね同じ方法論はすでに functional MRI データに WVCNA という名称で適用された研究 [85] があるが、この先行研究と異なる点としては、適用データが functional MRI データではなく structural MRI であって、しかも経時的にデータを解析することで、背景にある病理学的影響への解釈をも可能になるという点にある。本章背景で既に述べたように、同様の unsupervised method としては independent component analysis: ICA を functional MRI データ [80] や FDG-PET データ [81] に適用した研究や、principle component analysis: PCA を functional MR データに用いた研究 [79] など、既存の教師なし学習分類手法である PCA や ICA を脳画像に用いた研究は存在するが、この WVCNA の先行研究は、これらの既存手法よりも空間的に細かい module を検出することができるためにより妥当と考えられると結論している [85]。このため、構造的 MRI データにおいても同様に、本手法を適用することでより空間解像度よく詳細な変化を見ることができるという利点があると考えられる。

本検討の limitation としては、本手法で示された MCI conversion に関連した共萎縮 module がタウ病理の分布と偶然一致しているように見えただけである可能性がある点、そもそも病理学的な影響と脳萎縮とは常に一定の時間的關係が保たれるとは限らない（全ての脳領域で一様であるとは限らない）し、また病理学的変化の

種類によって異なる可能性もあるという点において本手法の有用性が制限される要因になること、などがまず挙げられる。さらには、ネットワーク解析への入力は（脳部位ごとの計測値そのものではなく）データ内で標準化した数値を用いているため、（標準化しているとは言え）解析集団ごとに結果が異なる可能性は残る。このため、ここでは J-ADNI のデータを用いたが、他のコホート（例えば ADNI やオーストラリアのコホートである AIBL）でも同様の結論が導けるかどうか、validation が必要である。さらに、他の神経変性疾患にも有用であろうとは考えられるものの、*FreeSurfer* での解析に供することができる程度に一貫した quality の MRI 検査を少なくとも数十以上の症例から時系列で得なければならないという点では、稀少すぎる疾患には適用しづらい。また *FreeSurfer* による解析自体、1 症例につき少なくとも数時間以上のデータ処理時間を要する点でも、実用性が十分高いとは言い切れない。

第4章: 血液 epigenetic aging を用いた、A/T/N 分類予測の試み

4-1. 背景

4-1-1. Aging acceleration

第2章では、プレクリニカル AD の SUVr 予測モデルにおいては「年齢」が最も強く予測に寄与する因子、という結果であり、これは加齢（生物学的年齢の上昇）と共にアミロイド陽性率が加速的に上昇していく先行研究と一致するものである

[51]。この本質的理由は現在も不明であるが、ここでさらに加齢に関する指標として Aging Acceleration (AA) : 「加齢の亢進」を考えてみる。これは生物学的年齢 (chronological age) を推定する方法から逆算して得られる指標であり、DNA メチル化情報、テロメア長、トランスクリプトーム 情報、プロテオーム情報、メタボローム情報、またこれらの複合、などを用いて算出することができるが、DNA メチル化情報を用いた方法 (= methylation clock) が最も有用であると考えられている [100, 101]。DNA メチル化の程度が (生物学的年齢から逆算される想定メチル化程度よりも) 加齢方向に変化している場合、「加齢の亢進 (aging acceleration : AA) がある」と表現し [101]、高血圧、肥満、喫煙、冠動脈疾患、悪性腫瘍、ダウン症候群、ウエルナー症候群など様々な (病的な) 状態で AA が起こることが報告されてきてい

る [101]。

神経疾患でいうと、AD [102] やハンチントン舞蹈病 [101] などの神経変性疾患の剖検脳組織由来の核 DNA を用いた先行研究で、aging acceleration がすでに報告されている。特に AD では、AD 患者の脳組織（前頭前皮質）からの AA とアミロイド蓄積・neuritic plaque [102, 103]、また脳 AA と認知機能との間の相関が報告されており [102]、脳 AA と AD 病理とは密接に関連している可能性があることは既に報告されている。

4-1-2. 血液 AD バイオマーカーとしての aging acceleration

一方、脳組織ではなく血液からの AA については、中枢の AD 病理との直接的な関係はこれまで示されていない。しかしながら、血液 AA と AD 環境リスク因子（高 BMI、高 T-cho/HDL 比、社会経済的 status、高血圧、喫煙歴など）との関連は報告されており [104]、また血液脳関門の存在にも関わらず、血液 AA と認知機能低下が関連していること [105]、血液 AA と大脳白質の integrity の間に関連があることが報告されていること（MRI-Diffusion-Tensor Imaging において大脳白質線維整合性（white matter integrity）と血液 AA に負の相関があることが報告されていたり

[106]、血液 AA と MRI での大脳白質高信号の程度が相関していることが報告されていたりする [107]) は報告されている。また他の神経疾患例えばパーキンソン病でも血液での AA が報告されている [108]。

第 1 章で既に述べたように、これまでの ($A\beta$ ・タウ以外の) 血液バイオマーカーは再現性が十分ではないものが多いという結果であったが、これは予測する物質・マーカー自体が AD 病理とあまり関係ないものであった可能性があること、予測対象が過去の NINCDS-ADRDA 基準を参照していたこと、などが想定されている。このため、AD 病理と関連がある可能性がある (しかもこれまで検討されていない) 血液 AA を予測マーカーとして用いて、かつ臨床診断としての AD ではなく A/T/N 分類に対して予測を行うことで、これらの問題は解決できるのではないかと考えた。つまり、血液 AA は第 2 章でみた生物学的年齢に加えた、A/T/N (特に A) に対する有用な代用マーカーの可能性があるのでないかと仮説を立てる。

4-2. 本検討（第4章）の目的

すなわち本検討では、血液 methylation clock を基にした AA による、(amyloid: A を含めた) A/T/N それぞれをターゲットとした予測が実用的に可能かどうか検討することを目的とする [109]。このためのデータセットとしては ADNI 研究 [110] のデータを用いる。これは 2003 年に縦断的なバイオマーカーと認知機能の縦断的な変化を調査するために北米で開始された大規模観察研究で、血液 DNA メチル化情報 (マイクロアレイ)、A/T/N 分類のための検査結果を含めた必要なデータが網羅されている。

4-3. 方法

4-3-1. 倫理委員会承認

以下の過程は、東京大学大学院医学系研究科 倫理委員会の承認(審査番号: 11628-(3))を得て施行した。

4-3-2. ADNI データについて

Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI) 研究 [110] は、2003 年に Michael W. Weiner を PI として、MRI・PET その他のバイオマーカーや臨床的・神経学的評価を組み合わせることで、MCI や早期 AD の進行を予測できるかを検証するために北米で開始された前向き観察研究である。

ADNI 研究の組み入れ基準はまず、60-84 歳までの、自宅で生活し、被験者本人の状態を知っていて検査に協力できるスタディパートナーがいる男女で、他の神経疾患の既往（パーキンソン病、多発脳卒中、ハンチントン舞蹈病、正常圧水頭症、てんかん、硬膜下血腫、進行性核上性麻痺、多発性硬化症、後遺症のある頭部外傷歴、など）や認知機能低下の原因となりうる病態（ビタミン B₁₂ 欠乏・葉酸欠乏・甲状腺機能低下・梅毒など）がなく、精神疾患（大うつ病・双極性障害）やア

ルコール等依存歴が直近になく、頭部 MRI が施行可能で、特定の向精神病薬やワーファリンの内服がない、と定められている。ADNI 研究の被験者は、組み入れ時点でその認知機能低下の状態に応じて、CN・MCI・AD と分類され、それぞれ定期的に研究参加施設を訪問し、状態および検査所見のフォローが行われる。ADNI 研究は 2021 年までは継続される予定となっており、逐次データが web 上に公開されてきている。

4-3-3. データ取得とサンプルの組み入れ基準

データベース web サイトである LONI (<https://ida.loni.usc.edu>)に先方のデータアクセス委員会の承認を得て、2019 年 10 月に csv ファイルからなる臨床・検査情報のデータ、また IDAT ファイルからなる血球核 DNA メチル化情報のデータをダウンロードした。公開データであるため、利用にあたり参加者からの再度の同意取得は不要であった。

利用したデータ項目としては、基本的な情報として年齢、性別、人種（コーカシアンか否か）、教育年数、喫煙歴の有無、研究組み入れ時点での臨床診断（CN・MCI・AD のいずれか）、血液サンプル採取時直近の認知機能検査結果

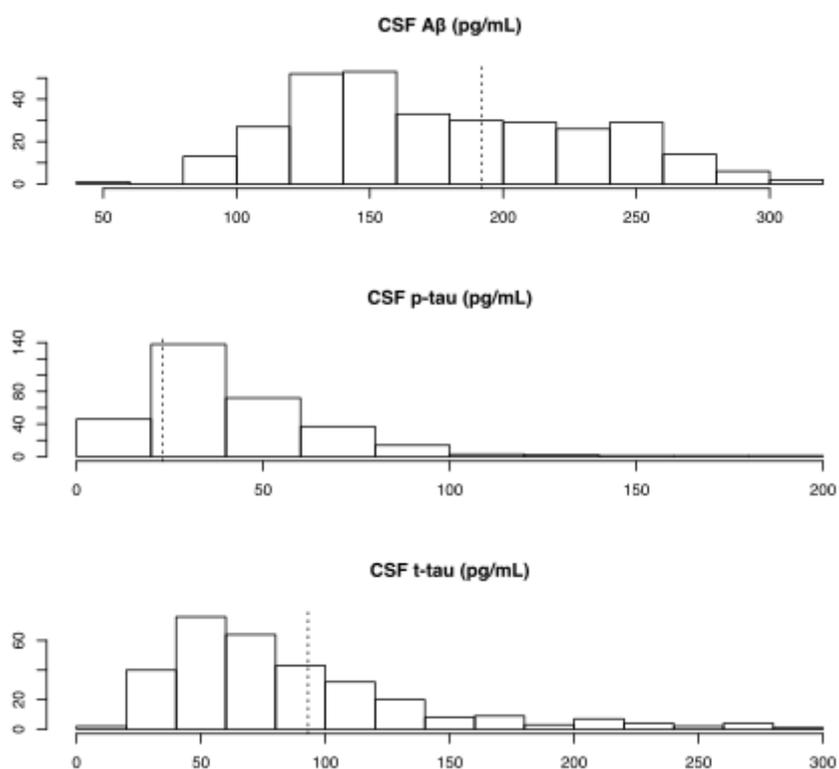
(MMSE および ADAS-cog13)、*APOE* ジェノタイプ (ε4 アリル数)、A/T/N 分類のための指標として髄液 Aβ/p-tau/t-tau 値、また epigenetic clock 計算のための血液 DNA メチル化 microarray データ (プラットフォーム: Illumina HumanMethylation EPIC BeadChip)、である。これらのうち認知機能検査結果以外全ての項目が揃っている n = 317 症例から得られた n = 317 マイクロアレイサンプルを解析対象とした。なお本研究では予測ターゲットとして臨床症状 (認知機能の程度) ではなく A/T/N 分類を設定していること、また今回参照した CSF による A/T/N (次項参照) は AD 疾患マーカーとしての意義はあるが MCI due to AD 以降の AD ステージマーカーとしては有用ではないと考えられている [23] ことから、認知機能検査の結果は組み入れ段階では参照せず、結果として正常~AD まで幅広い症例が解析対象となっている。また認知機能検査の実施日と DNA マイクロアレイサンプル取得のための血液採取日とは同一とは限らず若干のズレがあるが、その差異は中央値 10 日であった。

4-3-4. A/T/N 分類

A/T/N 分類のうち、A は Aβ-PET でも代用できるが Aβ-PET と CSF での結果は必ず

しも一致しないこと（孤発性 AD・優性遺伝性 AD 共に、CSF での A β 変化は A β -PET での変化に少し先行して現れる [111, 112]）、T については ADNI 研究実施時にタウ PET は研究が進んでおらず実用化されていないため CSF データしかないこと、N については CSF に代替可能な（MRI や）FDG-PET のデータが必ずしも十分ではないことと基準をどうするか統一的に決定しづらいこと、また同一 modality であることを重視するという理由から、A/T/N 全てに関して髄液検査のみを参照 modality として、各症例を分類した。ADNI データに関する先行文献 [113] に従い、CSF A β < 192 pg/mL で A(+)（それ以外は A-）、CSF p-tau > 23 pg/mL で T(+)（それ以外は T-）、CSF t-tau > 93 pg/mL で N(+)（それ以外は N-）、と A・T・N それぞれについて 2 値化した。それぞれの分布は図 22 ヒストグラムのようにになっている。

図 22： CSF 各マーカーの分布

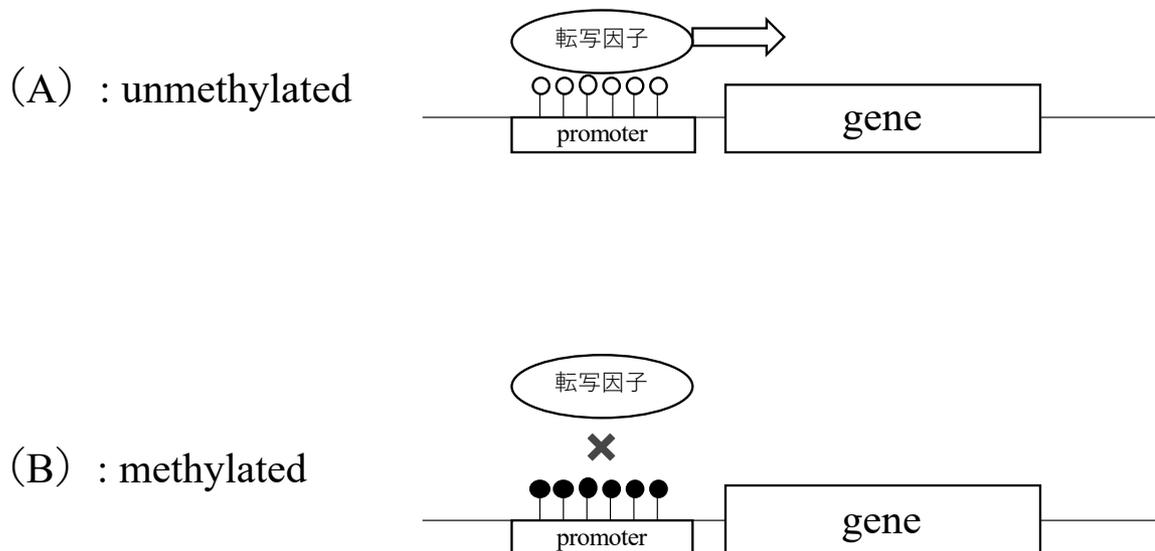


上から、A/T/N それぞれに対応する CSF A β , p-tau, t-tau の分布ヒストグラム [109]。
縦の点線は各々の cut-off 値 (単位：pg/mL)。

4-3-5. DNA メチル化について

まず DNA メチル化について概説する。DNA メチル化とは、塩基配列によらない発現制御機構である epigenome のうち一つである（もう一つはヒストン修飾）[114, 115]。DNA メチル化は、図に示すように、DNA メチル化による発現制御機構においては、遺伝子プロモーター領域の塩基配列の CpG アイランドにおけるシトシンがメチル化されていない場合、転写因子が結合できるため、その下流の遺伝子翻訳が行われる（図 23A）。ところが、プロモーター領域の CpG アイランドが DNA methyltransferase (DNMT) によってメチル化シトシンになる（＝メチル化される）ことで、転写因子が結合できなくなるため、その下流の遺伝子翻訳が抑制され（図 23B）、結果として遺伝子発現も抑制される（*DNA の脱メチル化は TET1、TET2、IDH1 などのタンパク質が関与する）。プロモーター領域ではなく遺伝子本体(gene body)の CpG アイランドの DNA がメチル化された場合は、当該遺伝子の転写の増加を示すこともあるが、プロモーター領域のメチル化の場合ほど定まった傾向があるわけではない。

図 23 : DNA メチル化による発現調整機構の概要図



遺伝子プロモーター領域の塩基配列の CpG アイランドにおけるシトシンがメチル化されていない場合、転写因子が結合できるため、その下流の遺伝子翻訳が行われる (A)。ところが、プロモーター領域の CpG アイランドが DNA methyltransferase (DNMT)によってメチル化シトシンになる (=メチル化される) ことで、転写因子が結合できなくなるため、その下流の遺伝子翻訳が抑制され (B)、結果として遺伝子発現も抑制される。

ADにおけるDNAメチル化異常については、同病剖検脳において *APP*、*MAPT* の遺伝子のプロモーター領域のメチル化異常が報告されたり [116]、またエピゲノム網羅的な解析では、(既にGWASで疾患関連遺伝子として同定されている) *BINI* や *ABCA7*、また *ANK1* や *RHBDF2* の脳組織でのDNAメチル化変化 [117, 118]、*BRCA1* の脳でのDNAメチル化変化 [119]、海馬での神経分化に関わる遺伝子のメチル化 [120]、*BACE1* をターゲットとする *DSCAML1* のエンハンサー領域の調節異常(脱メチル化)から *BACE1* 転写産物の増加に繋がりアミロイド産生亢進に寄与しているという報告 [103]、などADの病態において脳組織でのDNAメチル化変化が関与しているという知見が蓄積されつつある。

4-3-6. Epigenetic Clock および Aging Acceleration について

この上で、epigenetic clock [100, 101] とは、特定のCpGアイランドのメチル化の程度が加齢に伴って徐々に変化する(脱メチル化のことが多い)ことから導入された概念である。健全な状態をベースとして逆算モデルを作っておいて、現在のDNAメチル化の状態に当てはめると、そこから逆に生物学的年齢(chronological age)を

推定することが可能になっている。この推定された年齢は *epigenetic clock* と呼ばれる。同様の年齢予測にはテロメア長、トランスクリプトーム 情報、プロテオーム情報、メタボローム情報、またこれらの複合、などを用いることもできるが、*epigenetic clock* はこれらよりも有用であると考えられている [100]。DNA メチル化情報を使った *epigenetic clock* (= *methylation clock: DNAmAge*) は、はじめに Hanuum らによって成人の血球由来 DNA サンプルから、71 CpG サイトのメチル化情報を用いて導入された (Hanuum's clock: [121])。さらに、DNA サンプル元の対象組織を血液に限らず、様々な組織について個別最適化し、また対象年齢に小児も含めた version が、Horvath らによって導入された。これは 353 CpG サイトの DNA メチル化情報を用いており、Horvath's clock と呼ばれる [122]。また *ELOVL2* 遺伝子上の単一 CpG サイトで予測する報告 [123] もあるが、正確性は十分ではない [101]。いずれも、所与の CpG サイトの DNA メチル化状態を生物学的年齢に回帰させて得られた機械学習モデルといえる。DNA メチル化は死後変化にも (他の modality と比べると) 強いため、法医学の分野で年齢不明の死体の年齢を推定するのに用いるとする報告がある [124]。

すでに述べたように、病的な状態において、DNA メチル化の程度が (生物学的年齢から逆算される想定メチル化程度よりも) 加齢方向に変化している場合、

「加齢の亢進（aging acceleration：AA）がある」と表現する [101]。AD [102] やハンチントン舞踏病 [101] などの神経変性疾患においては、脳組織については aging acceleration がすでに報告されている。

4-3-7. マイクロアレイデータ前処理

さて、血液（のうち白血球の核 DNA のみ）の DNA メチル化情報は、ADNI 研究では Illumina HumanMethylation EPIC BeadChip [125] という規格のマイクロアレイで計測されデータが提供されているため、これを用いて解析する。DNA メチル化情報を調べる手法はマイクロアレイ以外にもパイロシーケンシング、定量 PCR、次世代シーケンサー（NGS）など複数の方法があり、DNAmAge はいずれの手法であっても適用できるが [101]、このマイクロアレイを用いて調べる利点としては、多数の遺伝子について CpG サイトのメチル化状態を網羅的に検討することができて high-throughput であること、分析手法としては既にかなり普及しており標準化も進み、測定結果も安定していること、コストも比較的リーズナブルであること、パイプラインが整備されておりデータ容量も大きくないため解析が比較的容易であること、などが挙げられる。

以下のすべてのデータ操作および解析は解析ソフトである R (version: 3.5.1) (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を用いて行った (図 24)。まず血液 DNA メチル化のマイクロアレイデータは IDAT ファイルというファイル形式で提供されており、これを R パッケージ *minfi* [126] で読み込み、EPIC プラットフォームに合わせて各 CpG サイトのアノテーションを行った。これにより、ゲノム上に分散して設定されている 70 万箇所以上の CpG サイトのメチル化情報を、どの遺伝子上のどのような位置 (promoter, gene body など) にあるのか、また転写開始位置 (TSS) との相対的な位置関係、などについて整理することができる。

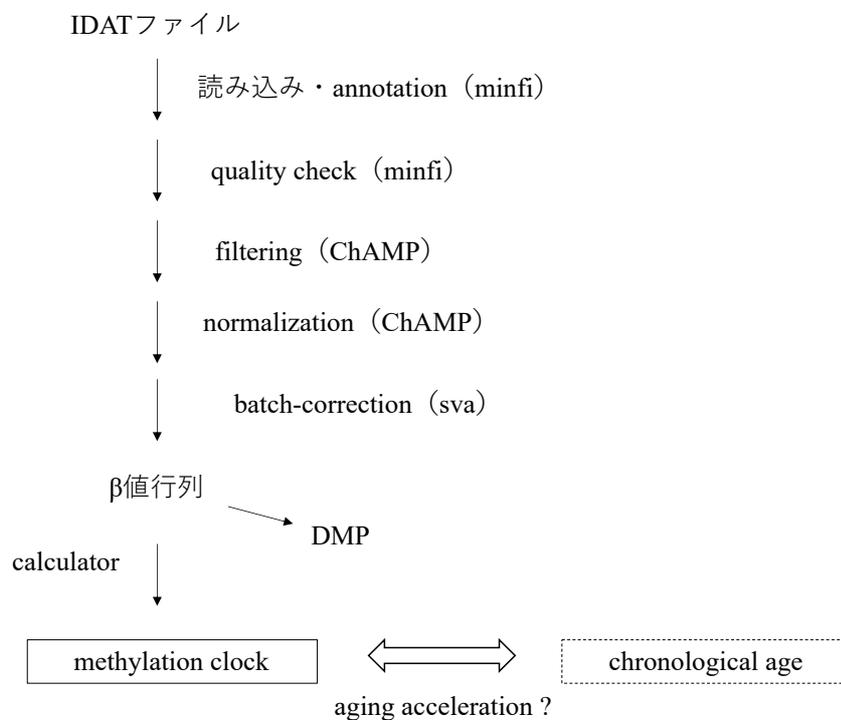
サンプルデータのうち、血液サンプルから核 DNA を調製する際のエラーなどに起因して DNA メチル化のデータ分布が通常の分布から明らかに外れている (=低クオリティサンプル) ことがあり、このようなサンプルは *minfi* の Quality Control (QC) 機能で同定し除外した。さらに、R パッケージである *ChAMP* [82] のフィルタリング機能を用いて、性染色体上の CpG サイトや、SNP 上に位置する CpG サイト、また検出精度が悪い CpG サイト (detection $p \geq 0.01$) を除外した。その上で、全サンプルを標準化した (ここでは PBC 法 [127] を用いた)。なお標準化方法やプラットフォームによって DNAmAge は大きな影響を受けないことが報告されている [128]。

さらに、マイクロアレイの Batch に起因するメチル化レベルの差異 (batch-effect) を補正した ($p < 0.05$ レベルでは計 188 batch が検出されていた)。これには R パッケージ *sva* [129] の機能を利用し、A・T・N のラベリングは共変量には含まなかった。というのは、通常解析における疾患 vs 対照などの群間比較では、batch 補正に際して群間の差異まで意図せずに補正してしまい違いがわからなくなってしまうのを防ぐために疾患情報など重要な因子は共変量として設定するのが一般的であるが、本検討では予測を行うことが目的である (=A/T/N それぞれが+か-かはデフォルトではわからない) ため、この共変量設定は行わないものとした。これにより、最終的に 70 万箇所以上の CpG サイトのそれぞれのメチル化の程度 (β 値) がサンプル数分揃った β 値行列としてデータが得られた。

また、Differentially-methylated probe (DMP) すなわちメチル化の程度 (β 値として 0~1 の範囲の連続値) について群間で差異がある CpG サイトを見出すために、*ChAMP* の機能を用いて、A+ vs A-、T+ vs T-、N+ vs N-、でそれぞれ比較検定した [82]。合計約 70 万箇所以上の CpG サイトについて検定を繰り返している、すなわち全体として膨大な回数の多重検定をしていることになるので、 p 値補正に一般的な補正方法である Benjamini-Hochberg (BH) 法 [93] を用いて、補正後 p 値として false-discovery rate (FDR) 値を得た。DMP については $FDR < 0.05$ を有意水準と

した。

図 24： microarray 前処理フロー



データファイルを R で読み込み、順に前処理を行っている。() 内は利用した R パッケージ名。

4-3-8. epigenetic aging、aging acceleration の計算

既に述べた methylation clock の計算方法のうち、ここでは最も一般的と思われる Horvath らによる方法 [122] を用いる。これは彼らが提供している website での calculator (<https://dnamage.genetics.ucla.edu>) (図 25) を利用することで、オリジナルの方法通りに計算することが可能である。上記の β 値行列データを csv ファイルにして upload し、計算を行った。

得られる情報としては、実際の年齢 (chronological age) と比較して methylation clock から計算される加齢亢進 (aging acceleration) のうちでは、外因性の要素も含めたもの (extrinsic epigenetic aging acceleration: EEAA) と、内因性の要素だけを考慮したもの (intrinsic epigenetic aging acceleration: IEAA)、とに大別される [101]。白血球成分の構成内訳は年齢と共に変化するため、これを差し引く目的で、IEAA は実際の年齢および白血球数の構成割合に対して予測年齢を回帰させた時の残差として得られる。これによって、年齢やその他の全身状態に伴う白血球数構成の変化に影響を受けない、細胞内因性の (いわばより純粋な) 老化について調べることができるとされている。一方で EEAA は、実際の年齢に対して特定の数百の CpG サイトの β 値から計算して推定される年齢を回帰させた残差として定義さ

れ、上述の IEAA に加えて、加齢に伴う免疫関連の白血球数構成の変化も反映するものと説明されている [101]。EEAA はまた生活スタイルや炎症なども IEAA におけるより強く反映されると報告されている。いずれも AA として使用される指標であるため、ここでは各サンプルについて、この IEAA および EEAA の双方を得た。

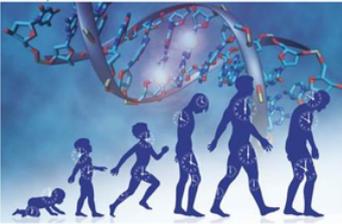
DNA メチル化についてはマイクロアレイや NGS で網羅的に計測されることが現在では一般的であるが、対象となる CpG アイランドの箇所は、要所要所を抽出したマイクロアレイでも全ゲノム上に分散している合計数十万箇所以上を含んでいて膨大であり、先述のタンパク質や脂質研究での数百レベルの要素数とは桁違いである。一方で得られるサンプル数は通常は多くても数百程度に留まる研究がほとんどであり、疾患 vs 対照での検定を多重補正した結果、個々の CpG アイランドでの平均的なメチル化の程度の差異について検出力が大幅に低下する懸念がある。

epigenetic clock は組織ごと or 症例ごとの単一指標であるため、このようないわゆる「large-p, small-N」 [130]、という問題を避けることができ、また解析がより容易という利点もありうるものと期待できる。

図 25 : Horvath らによる Calculator website

DNA methylation age and the epigenetic clock

Steve Horvath (shorvath at mednet.ucla.edu)



Abstract

Using 82 Illumina DNA methylation array data sets (n=7844) involving 51 healthy tissues and cell types, I developed a multi-tissue predictor of age which allows one to estimate the DNA methylation (DNAm) age of most tissues and cell types. DNAm age has the following properties: a) it is close to zero for embryonic and induced pluripotent stem (iPS) cells, b) it correlates with cell passage number, c) it gives rise to a highly heritable measure of age acceleration, and d) it is applicable to chimpanzee tissues.

<http://genomebiology.com/2013/14/10/R115>

Frequently asked questions (FAQs): [faq.htm](#)

[News and recent developments](#)

Updated results:
1) [cancer tissue: Oct 27, 2013](#)
2) Figure 3E [correction2](#)

DNAm age calculator

DNAm age calculator webpage (below) contains information on how to calculate DNA methylation (DNAm) age based on data measured using the Illumina Infinium platform (e.g. 450K or 27K data).
The age calculator automatically outputs the estimated DNAm age. After uploading the data, the function will return an Excel file whose rows report the estimated DNAm age of each subject and additional information.
Access Online Age Calculator: <https://dnamage.genetics.ucla.edu/>

2020年9月にサイトにアクセス (<https://dnamage.genetics.ucla.edu>)。

4-3-9. 予測モデルの構築と評価

当初の予定通り、得られた IEAA ないし EEAA、またその他の demographics 情報をもとに、A/T/N 分類について予測することを考える。まず予測目標の A/T/N は、本来の A/T/N 分類 8 パターンには症例数の偏りが非常に大きく (n=0 の区分もあり) 予測に適しない恐れがあったため、A, T, N それぞれについて +/- の 2 値分類を別個に行うことにした。

さらに、通常、DNA メチル情報は年齢・性別など基本的な情報に追加的に得られる情報であることから、基本的な情報のみ含めたモデルと、それに aging acceleration (AA) を追加したモデルとを比較することで、DNA メチル化情報を元にした AA をあえて用いる有用性があるか、検討することにした。また APOE ジェノタイプは A β 蓄積に大きな影響を与える要素でしかも e4 保有率が高いことから多くの臨床研究ではデータ取得されている項目であるため、APOE を情報としてモデルに含めるか否か、という点でもモデルを分けることにした。またその他の生活習慣や既往など DNA メチル化に影響を与える [101, 131] ものは複数知られているが、中でも血管リスクに影響を与えていてかつ情報が得られやすい、喫煙歴 (有

無)、人種 (白人か否か) についても、基礎情報として加えることにした。結果として、図 26 のように、

- モデル A1 : 年齢・性別・喫煙歴・人種
- モデル A2 : 上記モデル A1 + AA (IEAA ないし EEAA)
- モデル B1 : 上記モデル A1 + *APOE* ジェノタイプ
- モデル B2 : 上記モデル B1 + AA (IEAA ないし EEAA)

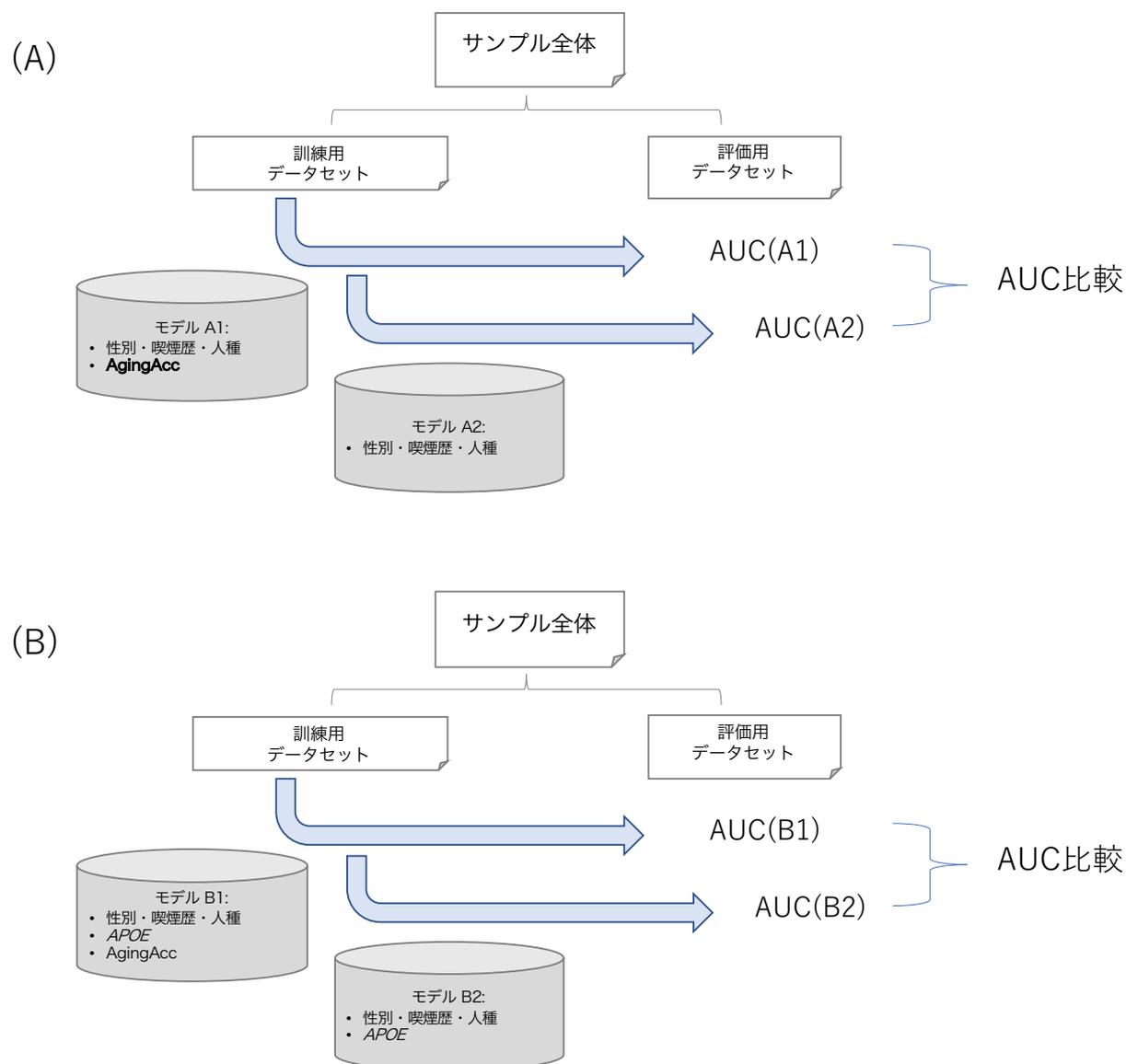
として、*APOE* なしモデル : A1 vs A2、*APOE* ありモデル : B1 vs B2 でそれぞれ比較することにした。

データフローは図のように、まず全サンプルを 1:1 にランダム分割する。

この時、予測ターゲット (すなわち A+/-, T+/-, N+/- のいずれか) の配分割合が概ね同程度になるように配分した。これには R パッケージ *caret* [60] の機能を用いた。そして、まず training 用のサブセットと、上記モデルにおける変数の組み合わせを用いて、予測モデルを構築する。そしてこの精度を、test 用に分けておいたサブセットにおいて検証する。モデル構築でのアルゴリズムは ElasticNet を用いる。なおここで ElasticNet を用いたのは、年齢に相関して変化する CpG サイトを膨大な数から絞り込んでいく際に多用されていたアルゴリズムであったということが理由であ

る。ただし、変数の数が少なく相互の相関性も CpG サイト間の関係と比較すると高くないと推定されるため、実質的にはロジスティック回帰を用いた時とほぼ同等の結果を得ていると考えられる。予測精度の評価には、test データにおいて各サンプルが A/T/N それぞれについて(+)である確率を算出し、それと実際の +/- の結果を照合して、area under the curve (AUC) として精度を算出する。AUC について、モデル A1 vs A2、モデル B1 vs B2 について DeLong's test で検定を行い、IEAA ないし EEAA をモデルに加えることで予測精度が上昇するかみる。AUC の計算、および DeLong's test には R パッケージ *pROC* [132] を用いた。

図 26： モデルの構築・評価フロー



モデルの評価フローを示す [109]。訓練用データセットから 4 種類のモデル (A1,A2,B1,B2) をそれぞれ作成し、APOE なしモデル (A) : A1 vs A2、APOE ありモデル (B) : B1 vs B2 で (評価用データセットにおける予測能 AUC を) それぞれ比較した。

上記の一連の計算は、最初のランダム分割の結果にも影響を受ける、すなわち ADNI データセット内でのサンプルのばらつきにも影響を受けるため、ランダム分割～AUC 比較までを 20 回繰り返して行うことにした。これによって、このデータセット内での平均的な評価を行うことができるのではないかと期待した。1 回のランダム化で、EEAA および IEAA それぞれについて model A1 vs A2、model B1 vs B2 についての DeLong's test の結果としての p 値が 2 つ得られるので、つまり合計 4 つの p 値が得られる。それぞれが有意 $p < 0.05$ (ただし p 値は 4 セット比較の多重補正後) である回数を、20 回のランダム化の繰り返しの中で集計して目安とした。

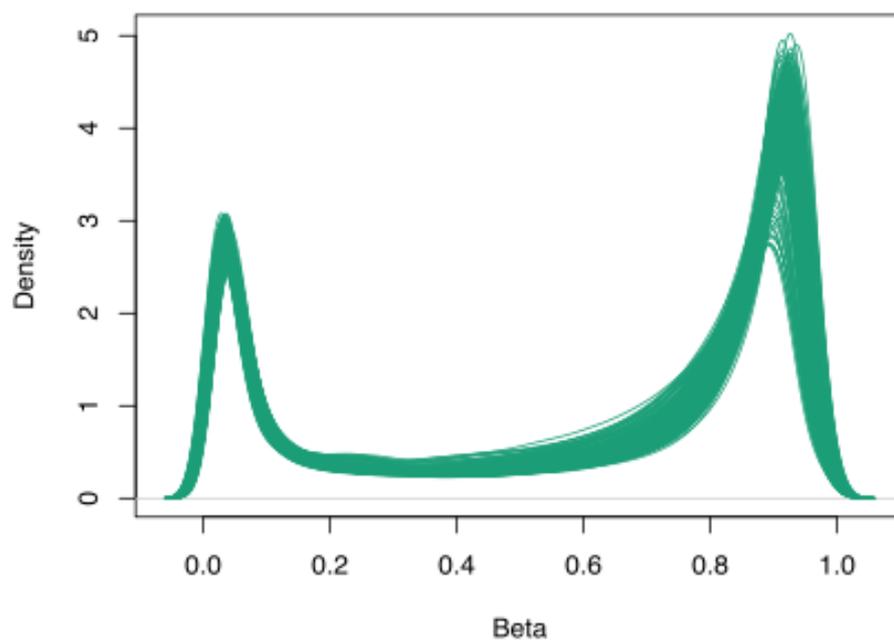
4-4. 結果

4-4-1. サンプルのプロファイル

demographics が揃っている症例 $n = 324$ について DNA メチル化データを読み込んだ。Density plot は図 27 のようになっている。これは（個々の血球の核 DNA におけるそれぞれの CpG サイトのメチル化状態はメチル化されているか否かの binary な状態であるが）多量の核 DNA での全 CpG サイトのメチル化状態の平均的な分布を、サンプルごとにまとめてヒストグラムとしたものである。なお各 CpG サイトのメチル化の状態（0/1）はそれぞれの場所によって大きく偏りがあり、また周囲の CpG サイトのメチル化の状態にも依存するので 2 項分布にはならず、 β 値が 0 (= unmethylated) 付近と 1 (= methylated) 付近の 2 峰性の分布となっていることがわかる。

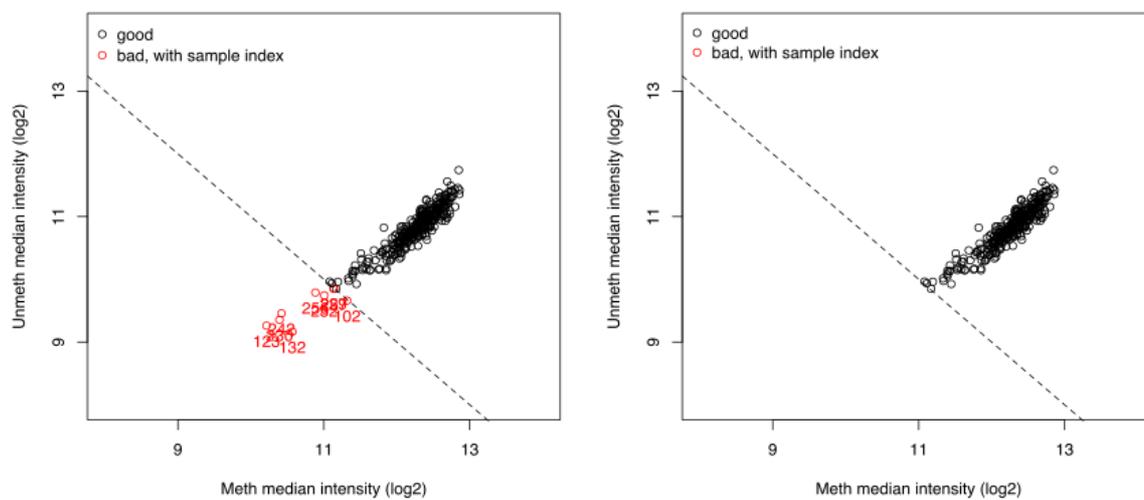
これらのうち、Quality Control [126] によって 9 例が不適當と判断された（図 28 左の左下の赤 plot）。これらを除外し（図 28 右）、問題ないデータセットとなった。そこからさらに normalize・batch 補正を行い、最終的に、 $n = 315$ のサンプルによるデータセットが得られた。

図 27： 全サンプルの density plot



β 値の分布は 0 (= unmethylated) 付近と 1 (= methylated) 付近の 2 峰性の分布となっている。

図 28： QC1 回目と 2 回目の結果



Quality Control (QC) によって 9 例が不適當と判断された (左図・赤 plot)。これらを除外し (右図)、解析を行った。

これらの症例の A/T/N 分類の内訳は表 8 のようになっている。A+T+N+, A+T+N-, A-T+N- の順に多く、A-T+N+ は 1 例しかなく、A-T+N+ は含まれなかった。A・T・N それぞれについて見てみると、61.2% で A+, 77.9% で T+, 32.8% で N+ であった。A+/- についてデータの揃う範囲では、A β -PET との一致度は kappa 係数で 0.706 と「ある程度の一致」を示していた。

さらにこれらの症例のプロファイルとしては、ほとんどが白人 *caucasian* で、年齢中央値は A+T+N+ がもっとも高く、ついで A+T-N-, A+T+N- の順であった。採血時と最も近い時点での臨床診断としては、CN や MCI では A-T+N- や A+T-N- や A+T+N- などに該当するケースが多いのに対して、AD では A+T+N+ が最多であった。APOE-e4 アリルを持つ場合、A+T+N- か A+T+N+ と、A+ であるケースが多かった。

表 8： A/T/N 別の症例プロフィール

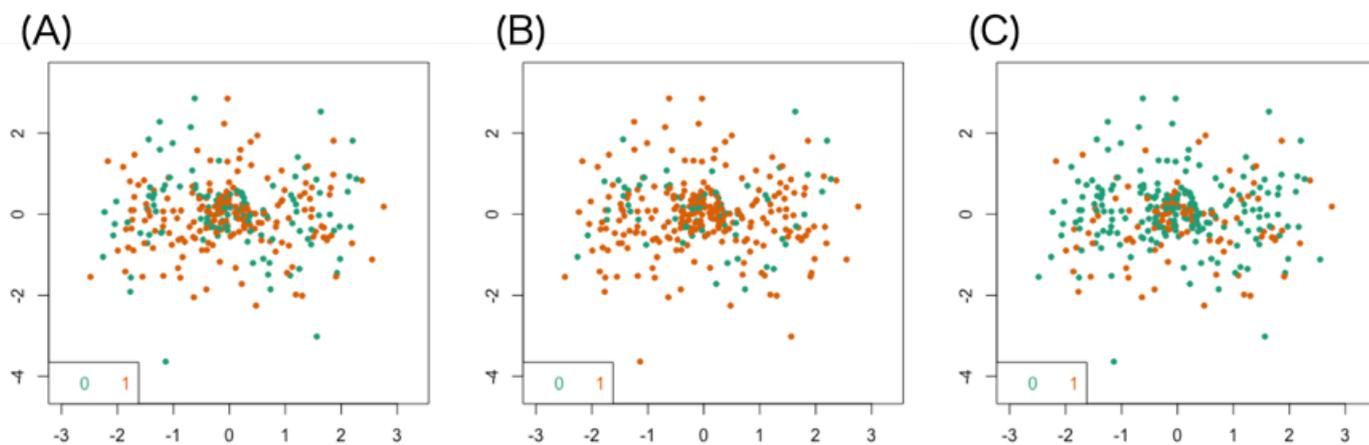
A/T/N	n	actual age	sex	APOE ε4 allele(s) [0:1:2]	ethnicity (white / others)	education
A-T-N-	43	70 (65.75 ~ 76.5)	21 : 22	41 : 2 : 0	42 : 1	16 (14 ~ 18)
A+T-N-	26	74.4 (70.5 ~ 79.9)	18 : 8	17 : 8 : 1	25 : 1	17 (15 ~ 19.75)
A+T+N-	77	72.7 (67.7 ~ 78.4)	37 : 40	33 : 36 : 8	72 : 4	16 (14 ~ 18)
A+T-N+	0	NA	NA	NA	NA	NA
A+T+N+	91	75.6 (71.35 ~ 79.4)	45 : 46	29 : 46 : 16	89 : 2	16 (14 ~ 18)
A-T+N-	67	71.7 (67.8 ~ 76.9)	41 : 26	58 : 9 : 0	66 : 0	18 (14 ~ 19)
A-T-N+	1	71.3 (71.3 ~ 71.3)	1 : 0	1 : 0 : 0	1 : 0	16 (16 ~ 16)
A-T+N+	12	69.5 (65.9 ~ 77.7)	5 : 7	9 : 3 : 0	12 : 0	18 (16 ~ 19)

A/T/N	n	smoking (yes / no)	baseline diagnosis (AD/MCI/CN/uncertain)	MMSE	ADAS-cog13
A-T-N-	43	15 : 28	3 : 25 : 15 : 0	29 (28 ~ 30)	10 (8 ~ 13)
A+T-N-	26	10 : 16	0 : 18 : 8 : 0	29 (28 ~ 29.75)	9 (6 ~ 15)
A+T+N-	77	38 : 39	5 : 52 : 20 : 0	29 (27 ~ 29)	13 (9 ~ 16)
A+T-N+	0	NA	NA	NA	NA
A+T+N+	91	37 : 54	32 : 45 : 13 : 1	26 (24 ~ 28)	23 (14.5 ~ 30.5)
A-T+N-	67	29 : 38	2 : 32 : 31 : 2	29 (28 ~ 30)	9 (7 ~ 12.5)
A-T-N+	1	0 : 1	0 : 1 : 0 : 0	29 (29 ~ 29)	11 (11 ~ 11)
A-T+N+	12	4 : 8	1 : 6 : 5 : 0	29 (28 ~ 29.25)	9.5 (7.75 ~ 12.5)

A/T/N 分類の内訳である [109]。A+T+N+, A+T+N-, A-T+N-の順に多く、A-T-N+は 1 例しかなく、A-T+N+は含まれなかった。A・T・N それぞれについて見てみると、61.2%で A+, 77.9%で T+, 32.8%で N+であった。

続いて、A+ vs A-, T+ vs T-, N+ vs N-のそれぞれで CpG サイトのメチル化レベル (β 値) について比較検定を行ってみると、DMP としては有意な (FDR < 0.05) CpG サイトは A+ vs A-では DMP n = 1 のみと、1 箇所の CpG サイトのみで有意差がみられた。T+ vs T-, N+ vs N-の比較では有意な DMP は存在しなかった。このように、これらの群間ではメチル化の程度の平均的な差異が乏しいことがわかる。これは MDS プロット [82] で DNA メチル化の症例ごとの分布の違いを 2 次元上に可視化した図 29 から推察される。

図 29 : MDS plot



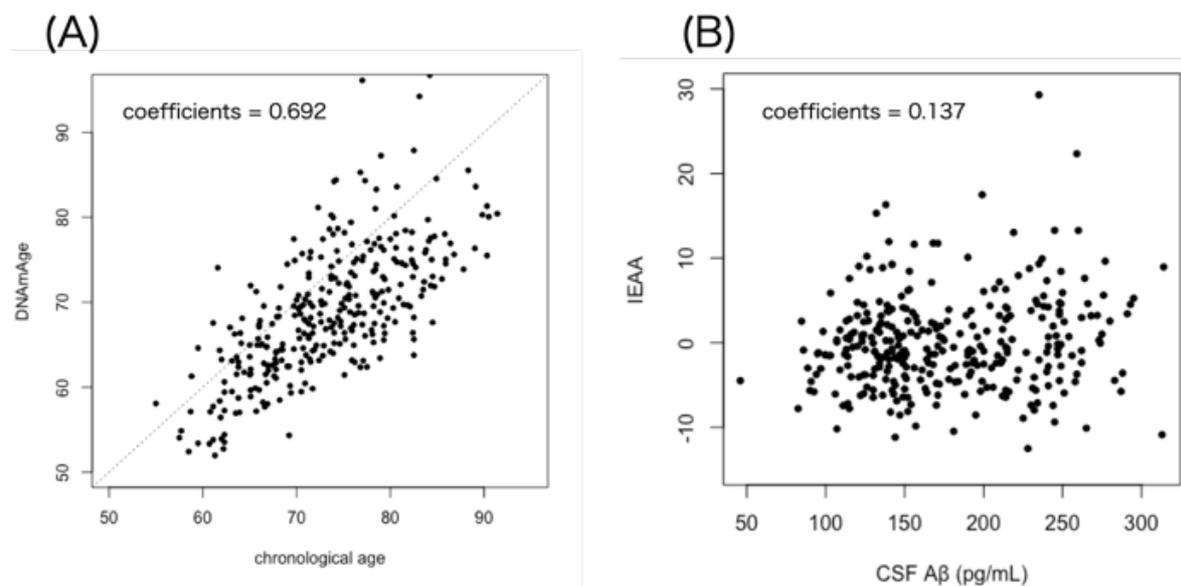
MDS plot [109]。 (A) A +/-、 (B) T +/-、 (C) N +/-別に、DNA メチル化の分布の違いを2次元上にプロットしたものである。凡例は0=(-), 1=(+)である。

4-4-2. Aging Acceleration

得られたサンプルから、方法で示した通りに Horvath らの方法 [122] を用いて推定される methylation clock (DNAmAge)、また AA (EEAA および IEAA) を各サンプルについて得た。CpG サイトのメチル化の程度から推測される methylation と実際の年齢 (= chronological age) は明瞭な中等度の相関があった (図 30A : Cor = 0.692, $p < 0.001$)。

AA 自体と A・T・N との関連について、年齢・性別や *APOE* ジェノタイプなどの影響を補正しつつ一般線形回帰で検討すると、髄液 A β 値と IEAA ($p = 0.025$) (図 30A)、また髄液 A β 値と EEAA ($p = 0.017$) の間には、わずかだが有意な正の相関が見られた。ただし、EEAA ないし IEAA と、髄液 p-tau 値ないし t-tau 値との間には有意な相関は見られなかった。

図 30 : DNAmAge と生物学的年齢の相関、また IEAA と CSF の関連



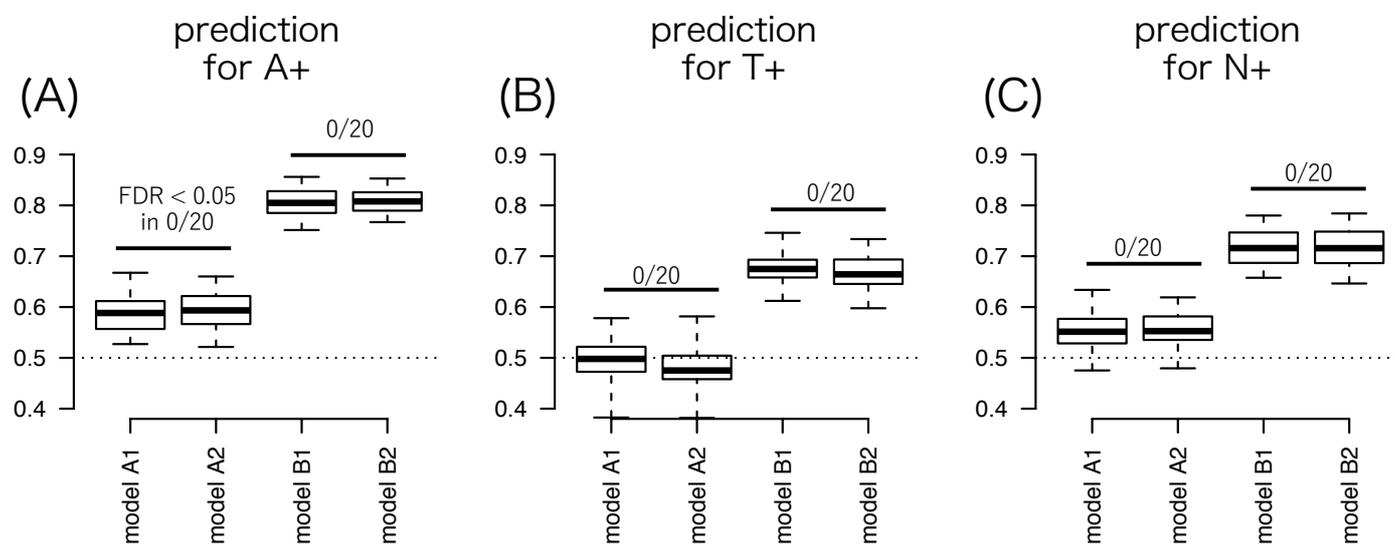
CpG サイトのメチル化の程度から推測される DNAmAge と実際の年齢 (= chronological age) は明瞭な中等度の相関があった (A : Pearson cor = 0.692, $p < 0.001$) [109]。髄液 A β 値と IEAA には、わずかだが有意な正の相関が見られた (B : Pearson cor = 0.137, $p = 0.025$)。(髄液 A β 値と EEAA のプロットは省略)

4-4-3. 予測モデルの評価

AA として EEAA を使った場合のモデル A1~B2、また AA として IEAA を使った場合のモデル A1~B2、すなわち計 8 モデルについて、訓練→評価の比較を行った。1 回のランダム分割で、モデル A1 vs A2、モデル B1 vs B2 での AUC 比較が行われることから、それぞれで有意に差異があった回数をカウントした。

合計 20 回のランダム化の中での AUC の平均的な分布と、差が有意であった回数を示したのが図 31 である。一見して明らかのように、EEAA（図では省略）および IEAA いずれであっても、*APOE* の情報を含むモデル B1 と B2 はモデル A1 と A2 よりも明らかに AUC はよく、また A1 と A2、B1 と B2 では大きな変化はない。実際、有意に AUC に差があったケース（多重補正前でも $p < 0.05$ ）は 0/20 回で、観察されなかった。すなわち、今検討の範囲においては、モデルに AA 情報（EEAA であれ IEAA であれ）を加えても、有意な予測精度向上には繋がらない、という結果であった。

図 31：予測能比較の結果



予測能結果 [109]。IEAA (A~C) および EEAA (省略) いずれであっても、*APOE* の情報を含むモデル B1 と B2 はモデル A1 と A2 よりも明らかに AUC はよく、また A1 と A2、B1 と B2 の間では大きな変化はなかった (全てのペアについて、有意差があるものは 0 個/20)。

4-5. 考察（第4章）

本検討では、探索的な試みとして、加齢に関する情報として Aging Acceleration

[101] が、血液バイオマーカーとして A/T/N 分類の予測に利用できないか、という観点から検討を行った。結果としては、AA を含んだモデルと含まないモデルを比べた時に、A・T・N いずれの予測目標に対しても予測能は向上しなかった。つまり、今回の検討の範囲においては、aging acceleration は血液バイオマーカーとして有用とは言えない [109]。

この原因としては、A+ vs A-, T+ vs T-, N+ vs N- での DMP がほぼ見られなかったことも併せて考えると、やはり第一には、(A・T・N で分類されるそれぞれの) AD 病理に伴う中枢の変化と、血球核 DNA メチル化の状態との相関が乏しかった可能性があると考えられる。これについては AD と正常対照とで血液 DNA メチル化情報を比較した時に差が見られなかったとする同様の先行報告がある [133]。

細かく見ると、①そもそもの血液 DNA メチル化情報と脳 DNA メチル化情報との相関の程度が弱い、②血液 DNA メチル化情報での AD vs control での差異が少ない、などが想定される。

まず①については、AD に関連した血球由来 DNA メチル化変化について

は、一般に（一部をのぞいて）大部分の CpG サイトでそのメチル化の状態は脳組織と血液の間であまり相関が見られないとする報告 [134, 135] や個人差が大きく影響するとする報告 [136]、また AD 患者の血液と新皮質とで DNA メチル化の程度の相関は弱いという報告がある [137]。血液と脳とで多少相関する部分があったとしても、それが AD 病理で変化する CpG サイトに関連するものでなければ、AD 病理に伴って出現する DNA メチル化変化は末梢血ではやはり捕捉し得ないと思われる。

さらに②については、AD (vs 正常対照) で血液 DNA メチル化に変化があったとする報告も散見されるが [138-140]、複数の研究で確かな再現性を持って報告されている AD に関連した特定の CpG サイトのメチル化異常はこれまでのところは明らかにはなっていない [141, 142]：例えば、複数の先行報告で AD (vs control) において血液 DNA メチル化に変化があるかこれまで調べられた遺伝子としては、特に AD 関連遺伝子・AD 発症遺伝子として *APOE*、*APP*、*PSEN1* に加え、そのほかにも *BACE1*、*BDNF*、*SIRT1*、*PIN1*、*DNMT1*、*LINE-1* などの遺伝子について検討されているが、このうち *BDNF* のみ、2つの先行研究においてともに有意に変化があったと報告されている程度である [142]。ある研究報告で仮に AD (vs control) で差異があったとしても、集団や条件によって再現性が見られなくなる程

度の差異であるならば [141, 142]、結局はバイオマーカーとしては有用とは言い難いことになる。

また、メチル化データの前処理の段階における Batch 補正 [129] において、通常の疾患 vs 対照で比較する場合に行うように疾患ラベルを共変量に含めることがなかったため（ここでは予測目的であるため）、これが本来 A+/-, T+/-, N+/-の違いに起因する差異まで過剰に補正してしまった結果である可能性もある。

本検討の Limitation と今後の展望としては、本研究では、既往（肥満・高脂血症など）や内服などその他の DNA メチル化に影響を及ぼしうる因子 [131] についてはモデルの共変量に含めていないため、その点では改善の余地がある。また A/T/N 分類の参照元としては CSF のみで、複数の modality データがある時に陽性条件を変えていった時にどうなるかは、検討の余地がある。例えば A(+)については CSF よりも PET の方が、日内変動や測定操作による影響を受けにくく、検査の再現性という点でより好ましいと考えられる。また本研究で用いた ADNI データにおいて現に有用でないという結論になったため、他コホートでのデータでの検証にさらに発展させる意義は本検討からは積極的には見出せないが、他データでの検討は可能であれば無論参考になるものと考えられる。

なお本研究では A/T/N の元の分類に従って 2 値化判別を行なったが、元の CSF 値は連続値であり、この値に対する回帰予測も検討は可能である（ただし A/T/N 以外のデータの分布は同じであるから、おそらく精度はほぼ同程度と推測される）。

本研究では血球由来の DNA メチル化を元にした AA についてはこのデータセットでは有用ではないという結論であったが、とはいえ血球由来の DNA メチル化情報自体が一般に A/T/N 予測に有用でないと結論するにはまだ尚早と考えられる。脳組織を用いた先行研究に着目すると、脳組織での DNA メチル化変化が報告されている *BINI*, *ABCA7*, *ANK1*, *RHBDF2* [117, 118] , *BRCA1* [119] , *DSCAML1* [120] などのうち、*ABCA7*, *ANK1*, *BRCA1* については血液 DNA メチル化を検討した少数の先行研究でも報告はなされており [142]、特にこれらの遺伝子に着目して、A/T/N 予測（ないしバイオマーカーに即した AD 診断）に用いることができな
いか、検討する意義はあると考えられる。これらの遺伝子における CpG サイトでのメチル化変化は、血液 DNA メチル化の先行研究において AD に関連した変化として共通して多く見出されているわけではないが、その理由としては（Introduction でも述べたように）診断基準の違いやバイオマーカー確認の有無など先行研究ごとに少しずつ異なる集団を検討対象にしているからとも考えることができ、従ってバイ

バイオマーカーに基づいた症例選択基準を踏まえることでむしろよりメチル化の程度の差異が明瞭になる可能性もある。さらには、例えば、そもそもの血球由来 DNA メチル化の疾患 vs 対照でのメチル化の程度の差異（あるいはその分散）について大きい順に CpG サイトを選択してきて、それを予測因子として含める [143]、数が大きければ PCA など次元削減する [144]、などのフィルタリング手法は変数選択方法として検討可能と考えられる。

今後の DNA メチル化情報に関連した展望としては、現在 AD に特異的な血液バイオマーカーとして将来的に最も有望と考えられるものは血漿 A β 低下（および血中リン酸化タウ増加）であるので、血漿 A β が低下するメカニズム（脳内から血中へのクリアランス低下、血管への沈着増加などの説がある） [28] の観点から、候補となる CpG サイトを追加的に探索する、ことは有用かもしれない。

第 5 章. 結語と今後の展望

5-1. まとめ

本研究では、早期からの AD に関するバイオマーカーは、AD 病理に直接的に関係するものはアクセス性が十分ではなく、一方でアクセス性の良いもの ($A\beta$ ・タウ以外の血液検査) は AD 病理との関係性が薄いことからくる再現性が十分ではない、というように trade-off の関係があった。これに対して、マーカーの目標指標を改良する or マーカー自体のスケラビリティを向上させる構成にすることによって位置付けを移動させ、検査・バイオマーカーの性能を向上させることを目的として、大規模な臨床観察データの多角的な解析による検討を行ったものである。

- 第 2 章による検討で、現在の AD 臨床研究で重要な介入対象である、発症前だが $A\beta$ 蓄積が始まっているプレクリニカル AD を web registry データから予測するアルゴリズムを構築した。実際の正当な精度評価は現時点で行えておらずこれからの課題であるが、本モデルは 2020 年 9 月からの onsite 研究への招待における優先順位付において実際に参考活用を開始しており、今後の onsite 研究での PET 結果の蓄積とともに、モデルの評価とアップデートを繰り返していくことで、現在進行中の J-TRC 研究の効率化が期待できる。テス

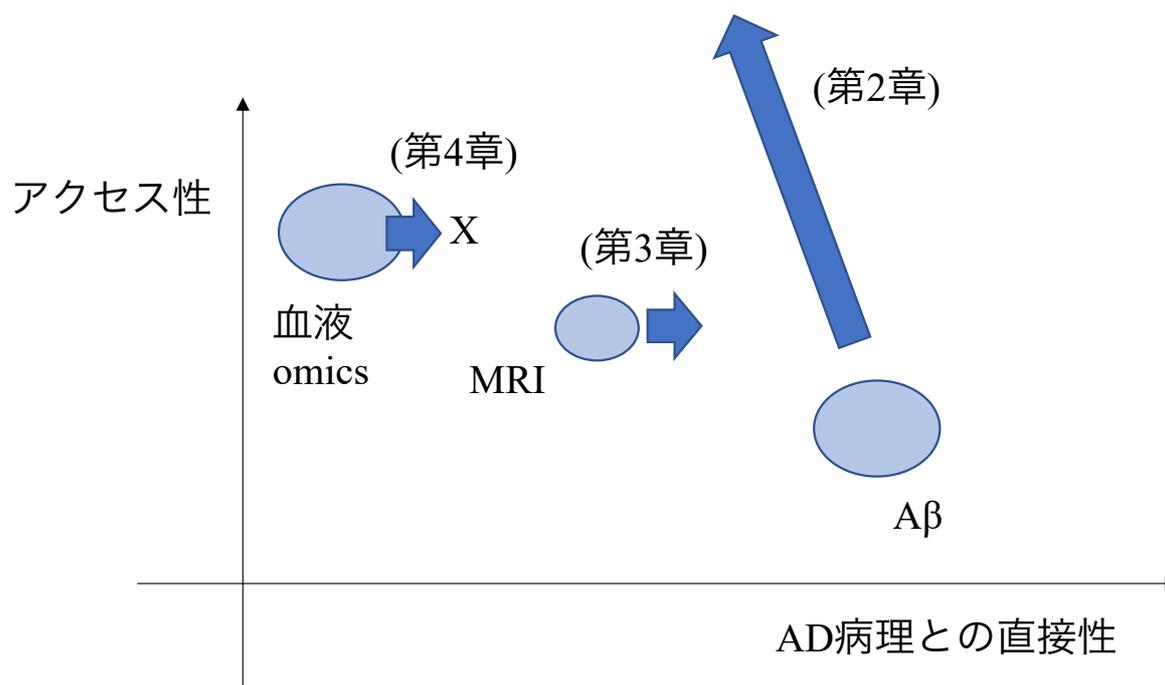
トへのアクセス性という点では既存の研究よりも明らかに汎用性が高いが、一方で *APOE* ジェノタイプや PACCC スコアを含めることができないなどの理由から精度向上に限度があるのが課題である。

- 第3章では、遺伝子発現解析の手法を脳 structural MRI データに転用し、脳萎縮の進展していく前線を可視化する手法を考案した。これによって、AD における脳萎縮の背景にある病理学的変化の拡大様式（の少なくとも一部）を間接的に可視化できる可能性をもつ手法であると考えられた。ただし、他コホートデータでの妥当性検証が必要である事、また脳 structural MRI データを基にしており、脳萎縮がある程度広がった後から後方視的に背景病理の分布を推測する位置付けであるため、実際の前向き観察において病理学的異常の早期検出に使えるわけではない点が問題ではある。
- 第4章ではさらに、加齢に関する指標の一つである Aging Acceleration を用いて、 $A\beta$ のみならず AD 病理に関係したバイオマーカーとして A/T/N 分類そのものの予測を試みたが、有用とはいえない結果であった。このため、加齢指標としての血液 methylation clock は（第2章における生物学的年齢とは異なり）AD 病理予測に有用ではない可能性がある。また血球由来 DNA メ

チル化データ自体も A/T/N 予測に有用ではない可能性も考えられた。加齢自体が AD 発症に寄与する最大の因子であってその根本的理由は不明であるところ、今回検討できなかった要素も含めて、そもそもの AA と A/T/N の関係についてさらなる検討が重要と考えられる。

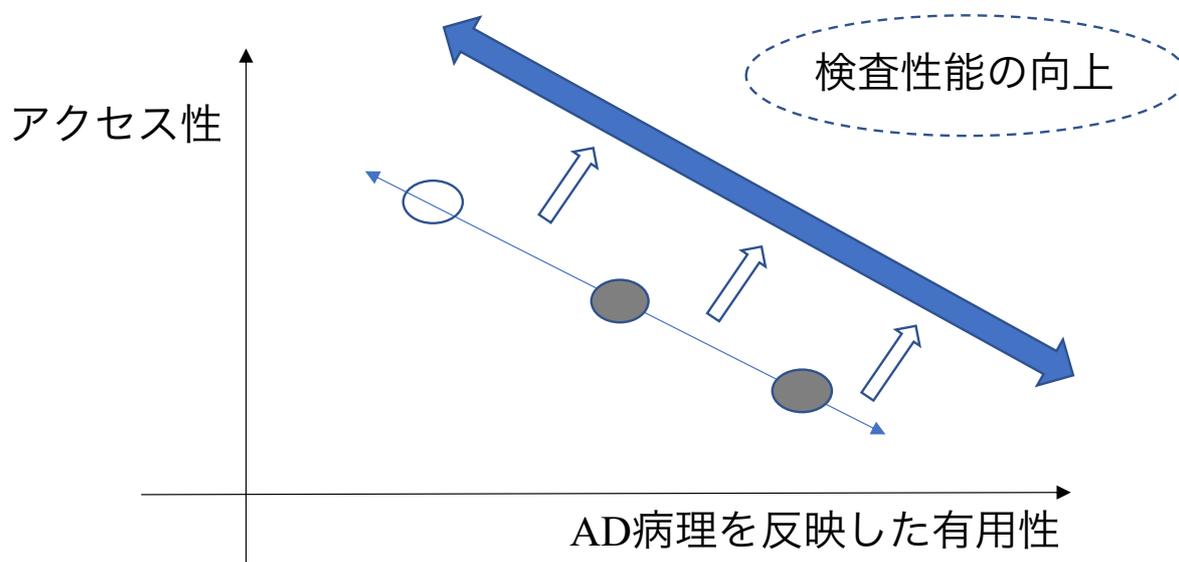
第 1 章・背景で述べた各検査・バイオマーカーの位置付け概要図に再度当てはめてこれらの結果を概観すると（図 32）、第 2 章での検討によって、A+に対する検査として精度は低下すると思われるがアクセス性を大幅に向上させることができた。第 3 章での検討では、より AD 病理の上流に近い状態へ転換させることができたと言えるがアクセス性は（脳 structural MRI データを基にしている点では同じであり）変わらなかった。また第 4 章での検討では、有用性が示せなかったため特に位置付けに変更なし、という事になる。全体的には、バイオマーカーの位置付けはやや右上に移動している。すなわち既存の AD バイオマーカーの性能を、データ解析を通じてわずかに向上させることができる可能性を示したものと、考えられる（図 33）。

図 32：本研究の結果としての位置づけの変化



第2章での検討によって、A+に対する検査として精度は低下すると思われるがアクセス性を大幅に向上させることができた。第3章での検討では、よりAD病理の上流に近い状態へ転換させうると言えるがアクセス性は（脳 structural MRI データを基にしている点では同じであり）変わらなかった。また第4章での検討では、有用性が示せなかったため特に位置付けに変更なし、という事になる。

図 33：本研究の全体的な意義



全体的には、バイオマーカーの位置付けはやや右上に移動しており、既存の AD バイオマーカーの性能を、データ解析を通じてわずかに向上させることができる可能性を示している。

上記のうち第2章と第3章については、ADの臨床ステージの中での phase が異なるものを分析対象としている（第2章では preclinical AD、第3章では MCI）が、それぞれの手法は相互に応用可能である。例えば、preclinical ADの stage 2 以上においては軽微な神経障害を呈するとされ [14]、内側側頭葉周辺の萎縮が preclinical ADの段階でも見られるため [30]、この preclinical AD stage 2-3 を対象とし、症状増悪の指標を preclinical AD から MCI への conversion として定義すれば、第3章におけるよりもさらに極早期の、タウ病理の拡大様式について可視化できる可能性がある。また、MCIの検出を本研究におけるようにオンラインで行う研究としては、簡易ゲームデバイス（Altoida™）を用いる方法 [145] などがすでに開発されており、preclinical AD に対しても同様にオンラインでのアプリ・ゲーム形式でスクリーニングできる方法論が有効である可能性もある。

また、本研究では第2～4章でそれぞれ単一の検査 modality のデータをベースとして検討を行ったが（第2章：web データ、第3章：MRI データ、第4章：血液 DNA メチル化データ）、これらをさらに統合的に組み合わせることができるようにはすることは今後の課題である。例えば、第2章における J-TRC onsite study で血液検査を行う際に血液検査も行うため、血液 omics データ（ないし血漿 amyloid beta, p-tau などの特異的バイオマーカーのパネルデータ）も取得した上で、J-TRC

webstudy の web 入力データと対応させて解析することで、中枢のアミロイド蓄積のみならず、ごく早期のタウ病理検出についても、web ベースに検出するモデルを作成できると期待できる。

第 2~4 章の各検討全体を通じた Limitation は、他の類似のコホートデータでの検証がなされていないということにある。第 2 章については、米国 TRC-PAD とのデータ共有が今後行われる方向性となっており、そこで、米国データにおいて web ベース情報からの予測がどの程度の精度になるのか、また逆に米国データから作成した予測アルゴリズムでどの程度の精度が本邦データで出るのか、確認する必要がある。また第 3 章については、他の AD コホートデータ（北米 ADNI、またオーストラリア AIBL など）でのさらなる検証、また他の神経変性疾患における脳 structural MRI データ（パーキンソン病データベース PPMI など）での評価が重要と考えられる。同様に第 4 章についても、aging acceleration と脳内アミロイド蓄積との関係について、ADNI 以外でのコホートデータでも検証する余地がある。

また、本研究で利用したデータは観察研究データの組み入れ基準・除外基準をパスしていて、明らかな他の神経・精神疾患の合併がなく、臨床像としては複雑ではなく「pure」な症例がほとんどである。実際の臨床においてはそのような症

例はむしろ少数とも言え、本研究で得られたバイオマーカーの精度・知見を、実際の臨床で用いる、ないしリアルワールドデータとして得られた症例データに適用する際に、果たして本検討におけるのと同等の結果が得られるかは不透明なところがある。その意味では、すでにあげた類似の観察研究コホートのデータで validation するのは別に、なるべく実際の臨床に近い状況としてリアルワールドデータでの妥当性検証も（可能であれば）必要と考えられる。

5-2. 早期 A β 陽性検出デジタルバイオマーカーとしての可能性

既に述べているように、第2章の検討で導出した A+ の早期検出アルゴリズムの課題は、*APOE* ジェノタイプや PACC スコアがないため予測精度が必然的に低めになると想定されること [64] だが、逆に血液サンプリングを要せず、また一定の時間と専門家の人手が必要な認知機能検査も要しないため、スケール可能性は高い。つまり、通常の臨床研究とは異なり、webstudy 単独で見れば、参加者数が大幅に増加してもなお対応可能である。このため、多少なりとも陽性尤度比が保たれていれば、アミロイド陽性の事前確率を上げることによる研究効率化に関して十分な費用対効果が見込めることになる。さらに、J-TRC における webstudy は、web を介して広く一般から参加

者を募り A β リスク分類を行うもので、そのスキーム自体は（有病率が AD ほど高くないなどの実際上の課題はあるにしても）取得データ項目を変更すればパーキンソン病など他の緩徐進行性の神経変性疾患へ適用することも可能である。PC・タブレットで完結し実サンプルを取得せず対面検査も行わずに済むという点で、広い意味では、未発症の神経変性疾患に対する早期検出デジタルバイオマーカー [145, 146] と位置付けることも可能である。

デジタルバイオマーカーは新型コロナウイルス感染症 COVID-19 の流行を発端としたオンライン・リモート診療を普及・継続させていく社会的な流れとも符号するもので [147]、例えば運動・健康管理、循環器領域、糖尿病領域、リハビリ分野などで、ウェアラブルデバイス、スマートフォンなど様々な形態での研究が進んでいる [148]。神経疾患領域では一例として、アプリ操作による認知機能低下の検出 [145, 146] や、ウェアラブルセンサーによるパーキンソン病患者の状態判定 [149] などがある。プレクリニカル AD に対する臨床研究としても、臨床試験に耐えうるだけの適切な認知機能検査については（primary endpoint であるため）なお専門家による厳密な評価が必要ではあるものの、緩徐進行性の疾患であって発症までの時間的猶予が十分にあり、有病率が認知症の原因疾患としては最多で、治験対象であれば症状はないか軽微であるためデバイス使用も大きな問題がないと想定さ

れる、などと云った面で、神経領域の中でもデジタルバイオマーカーとしてうまく条件が適合する臨床状況であると考えられる。

デジタルバイオマーカーを含む医療用デジタルデバイス研究の共通の課題は、いかにして参加者をリクルートし、また定着率を高める（&ドロップアウトを減らす）かという点があるが [150]、これは J-TRC においても同様に課題である。J-TRC webstudy への参加者募集においては、近時的なメリット（onsite 研究でアミロイド PET を含めた詳細な認知機能に関する評価を無料で受けられる）が得られるのは webstudy 参加者の一部であり、またそのまま治療割付がなされる訳でもなく、直接的な参加インセンティブが少ない（また参加者背景や自己申告内容が歪む恐れもあるのでインセンティブは強調できない）。このため、参加ボランティアを募っていく方法の工夫が必要と考えられる。これまでの preliminary な検討では、IROOP™ [151] など国内の既存の認知機能レジストリへのメールでの呼びかけによる登録率は最も高く、新聞広告による募集がそれに次いで登録率が良い、また web 広告経由だとサイト訪問数は伸びるが登録率向上にはあまり寄与せず、また全体的に登録者の年齢が少し若年である傾向がある、など流入ルートによって参加者背景が異なる可能性があり（未公表データ）、認知症の研究・治験参加への興味・関心が高い層にいかにリーチできるかが重要であろうと思われる。

5-3. 結語

本検討では、AD バイオマーカーは、AD 病理をより直接的に反映するものはアクセス性が十分ではなく、一方でアクセス性の良いものは AD 病理との関係性が弱いため再現性が十分ではない、といった trade-off の関係があった点を踏まえ、さらに検査・バイオマーカーの性能を向上させることを目的として、アクセス性ないし AD 病理との直接性がより大きくなるようにするべく、大規模な臨床観察データの多角的な解析を行った。3 つの異なるバイオマーカーについて検討を行い、結果として、全体的には、既存バイオマーカーの性能改善の可能性がわずかながら示されたと考える。またこれらのうちでは、早期のアミロイド蓄積に対する web ベース予測が特に有望と考えられ、J-TRC 研究の効率化のみならず、今後のデジタルバイオマーカーとしての発展可能性も期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご指導賜りました東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科学教室 教授 戸田達史先生、准教授 岩田淳先生（現・東京都健康長寿医療研究センター脳神経内科 部長）に深謝申し上げます。

また研究にあたり様々な御助言をいただきました、東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経病理学教室 教授 岩坪威先生、東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科学教室 助教 間野達雄先生、また東京大学医学部附属病院早期・探索開発推進室の先生方に、深謝申し上げます。

参考文献

1. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984;34(7):939-44.
2. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011;7(3):263-9.
3. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Hampel H, Molinuevo JL, Blennow K, DeKosky ST, Gauthier S, Selkoe D, Bateman R, Cappa S, Crutch S, Engelborghs S, Frisoni GB, Fox NC, Galasko D, Habert MO, Jicha GA, Nordberg A, Pasquier F, Rabinovici G, Robert P, Rowe C, Salloway S, Sarazin M, Epelbaum S, de Souza LC, Vellas B, Visser PJ,

- Schneider L, Stern Y, Scheltens P, Cummings JL. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol.* 2014;13(6):614-29.
4. Cao Q, Tan CC, Xu W, Hu H, Cao XP, Dong Q, Tan L, Yu JT. The Prevalence of Dementia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis.* 2020;73(3):1157-1166.
 5. Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, Dickson DW, Duyckaerts C, Frosch MP, Masliah E, Mirra SS, Nelson PT, Schneider JA, Thal DR, Thies B, Trojanowski JQ, Vinters HV, Montine TJ. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2012;8(1):1-13.
 6. Lyketsos CG, Lopez O, Jones B, Fitzpatrick AL, Breitner J, DeKosky S. Prevalence of neuropsychiatric symptoms in dementia and mild cognitive impairment: results from the cardiovascular health study. *JAMA.* 2002;288(12):1475-83.
 7. Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2010;23(4):213-27.

8. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. JAMA. 1997;278(16):1349-56.
9. Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. Nat Genet. 2007;39(1):17-23.
10. Medway C, Morgan K. Review: The genetics of Alzheimer's disease; putting flesh on the bones. Neuropathol Appl Neurobiol. 2014;40(2):97-105.
11. Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC Jr, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE, et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. Nat Genet. 1994;7(2):180-4.

12. Mufson EJ, Counts SE, Perez SE, Ginsberg SD. Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Expert Rev Neurother.* 2008;8(11):1703-18.
13. Raina P, Santaguida P, Ismaila A, Patterson C, Cowan D, Levine M, Booker L, Oremus M. Effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for treating dementia: evidence review for a clinical practice guideline. *Ann Intern Med.* 2008;148(5):379-97.
14. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR Jr, Kaye J, Montine TJ, Park DC, Reiman EM, Rowe CC, Siemers E, Stern Y, Yaffe K, Carrillo MC, Thies B, Morrison-Bogorad M, Wagster MV, Phelps CH. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2011;7(3):280-92.
15. Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, Shaw LM, Vemuri P, Wiste HJ, Weigand SD, Lesnick TG, Pankratz VS, Donohue MC, Trojanowski JQ. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol.* 2013;12(2):207-16.

16. Jack CR Jr, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Feldman HH, Frisoni GB, Hampel H, Jagust WJ, Johnson KA, Knopman DS, Petersen RC, Scheltens P, Sperling RA, Dubois B. A/T/N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. *Neurology*. 2016;87(5):539-47.
17. Cummings J. The National Institute on Aging-Alzheimer's Association Framework on Alzheimer's disease: Application to clinical trials. *Alzheimers Dement*. 2019;15(1):172-178.
18. Jack CR Jr, Knopman DS, Weigand SD, Wiste HJ, Vemuri P, Lowe V, Kantarci K, Gunter JL, Senjem ML, Ivnik RJ, Roberts RO, Rocca WA, Boeve BF, Petersen RC. An operational approach to National Institute on Aging-Alzheimer's Association criteria for preclinical Alzheimer disease. *Ann Neurol*. 2012;71(6):765-75.
19. Olsson B, Lautner R, Andreasson U, Öhrfelt A, Portelius E, Bjerke M, Hölttä M, Rosén C, Olsson C, Strobel G, Wu E, Dakin K, Petzold M, Blennow K, Zetterberg H. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2016;15(7):673-684.

20. Huang Y, Potter R, Sigurdson W, Santacruz A, Shih S, Ju YE, Kasten T, Morris JC, Mintun M, Duntley S, Bateman RJ. Effects of age and amyloid deposition on A β dynamics in the human central nervous system. *Arch Neurol.* 2012;69(1):51-8.
21. Lewczuk P, Beck G, Esselmann H, Bruckmoser R, Zimmermann R, Fiszer M, Bibl M, Maler JM, Kornhuber J, Wiltfang J. Effect of sample collection tubes on cerebrospinal fluid concentrations of tau proteins and amyloid beta peptides. *Clin Chem.* 2006;52(2):332-4.
22. Blennow K. A Review of Fluid Biomarkers for Alzheimer's Disease: Moving from CSF to Blood. *Neurol Ther.* 2017;6(Suppl 1):15-24.
23. Blennow K, Zetterberg H. The Past and the Future of Alzheimer's Disease Fluid Biomarkers. *J Alzheimers Dis.* 2018;62(3):1125-1140.
24. Toledo JB, Shaw LM, Trojanowski JQ. Plasma amyloid beta measurements - a desired but elusive Alzheimer's disease biomarker. *Alzheimers Res Ther.* 2013;5(2):8.
25. Verberk IMW, Slot RE, Verfaillie SCJ, Heijst H, Prins ND, van Berckel BNM, Scheltens P, Teunissen CE, van der Flier WM. Plasma Amyloid as Prescreener for the Earliest Alzheimer Pathological Changes. *Ann Neurol.* 2018;84(5):648-658.

26. Ovod V, Ramsey KN, Mawuenyega KG, Bollinger JG, Hicks T, Schneider T, Sullivan M, Paumier K, Holtzman DM, Morris JC, Benzinger T, Fagan AM, Patterson BW, Bateman RJ. Amyloid β concentrations and stable isotope labeling kinetics of human plasma specific to central nervous system amyloidosis. *Alzheimers Dement*. 2017;13(8):841-849.
27. Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, Kato T, Doecke J, Doré V, Fowler C, Li QX, Martins R, Rowe C, Tomita T, Matsuzaki K, Ishii K, Ishii K, Arahata Y, Iwamoto S, Ito K, Tanaka K, Masters CL, Yanagisawa K. High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*. 2018;554(7691):249-254.
28. Hanon O, Vidal JS, Lehmann S, Bombois S, Allinquant B, Tréluyer JM, Gelé P, Delmaire C, Blanc F, Mangin JF, Buée L, Touchon J, Hugon J, Vellas B, Galbrun E, Benetos A, Berrut G, Paillaud E, Wallon D, Castelnovo G, Volpe-Gillot L, Paccalin M, Robert PH, Godefroy O, Dantoine T, Camus V, Belmin J, Vandell P, Novella JL, Duron E, Rigaud AS, Schraen-Maschke S, Gabelle A; BALTAZAR study group. Plasma amyloid levels within the Alzheimer's process and correlations with central biomarkers. *Alzheimers Dement*. 2018;14(7):858-868.

29. Tatebe H, Kasai T, Ohmichi T, Kishi Y, Takeya T, Waragai M, Kondo M, Allsop D, Tokuda T. Quantification of plasma phosphorylated tau to use as a biomarker for brain Alzheimer pathology: pilot case-control studies including patients with Alzheimer's disease and down syndrome. *Mol Neurodegener.* 2017;12(1):63.
30. Pettigrew C, Soldan A, Sloane K, Cai Q, Wang J, Wang MC, Moghekar A, Miller MI, Albert M; BIOCARD Research Team. Progressive medial temporal lobe atrophy during preclinical Alzheimer's disease. *Neuroimage Clin.* 2017;16:439-446.
31. Dubois B, Epelbaum S, Nyasse F, Bakardjian H, Gagliardi G, Uspenskaya O, Houot M, Lista S, Cacciamani F, Potier MC, Bertrand A, Lamari F, Benali H, Mangin JF, Colliot O, Genthon R, Habert MO, Hampel H; INSIGHT-preAD study group. Cognitive and neuroimaging features and brain β -amyloidosis in individuals at risk of Alzheimer's disease (INSIGHT-preAD): a longitudinal observational study. *Lancet Neurol.* 2018;17(4):335-346.
32. Donohue MC, Sperling RA, Petersen R, Sun CK, Weiner MW, Aisen PS; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Association Between Elevated Brain Amyloid and

Subsequent Cognitive Decline Among Cognitively Normal Persons. *JAMA*.

2017;317(22):2305-2316.

33. Zetterberg H, Skillbäck T, Mattsson N, Trojanowski JQ, Portelius E, Shaw LM, Weiner MW, Blennow K; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Association of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Concentration With Alzheimer Disease Progression. *JAMA Neurol*. 2016;73(1):60-7.
34. Mattsson N, Andreasson U, Zetterberg H, Blennow K; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Association of Plasma Neurofilament Light With Neurodegeneration in Patients With Alzheimer Disease. *JAMA Neurol*. 2017;74(5):557-566.
35. Lewczuk P, Ermann N, Andreasson U, Schultheis C, Podhorna J, Spitzer P, Maler JM, Kornhuber J, Blennow K, Zetterberg H. Plasma neurofilament light as a potential biomarker of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2018;10(1):71.
36. Meeter LHH, Vijverberg EG, Del Campo M, Rozemuller AJM, Donker Kaat L, de Jong FJ, van der Flier WM, Teunissen CE, van Swieten JC, Pijnenburg YAL. Clinical value of

neurofilament and phospho-tau/tau ratio in the frontotemporal dementia spectrum.

Neurology. 2018;90(14):e1231-e1239.

37. Ray S, Britschgi M, Herbert C, Takeda-Uchimura Y, Boxer A, Blennow K, Friedman LF, Galasko DR, Jutel M, Karydas A, Kaye JA, Leszek J, Miller BL, Minthon L, Quinn JF, Rabinovici GD, Robinson WH, Sabbagh MN, So YT, Sparks DL, Tabaton M, Tinklenberg J, Yesavage JA, Tibshirani R, Wyss-Coray T. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med.* 2007;13(11):1359-62.
38. Mapstone M, Cheema AK, Fiandaca MS, Zhong X, Mhyre TR, MacArthur LH, Hall WJ, Fisher SG, Peterson DR, Haley JM, Nazar MD, Rich SA, Berlau DJ, Peltz CB, Tan MT, Kawas CH, Federoff HJ. Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nat Med.* 2014;20(4):415-8.
39. Leidinger P, Backes C, Deutscher S, Schmitt K, Mueller SC, Frese K, Haas J, Ruprecht K, Paul F, Stähler C, Lang CJ, Meder B, Bartfai T, Meese E, Keller A. A blood based 12-miRNA signature of Alzheimer disease patients. *Genome Biol.* 2013;14(7):R78.

40. Soares HD, Chen Y, Sabbagh M, Roher A, Schrijvers E, Breteler M. Identifying early markers of Alzheimer's disease using quantitative multiplex proteomic immunoassay panels. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1180:56-67.
41. Kiddle SJ, Sattlecker M, Proitsi P, Simmons A, Westman E, Bazenet C, Nelson SK, Williams S, Hodges A, Johnston C, Soininen H, Kłoszewska I, Mecocci P, Tsolaki M, Vellas B, Newhouse S, Lovestone S, Dobson RJ. Candidate blood proteome markers of Alzheimer's disease onset and progression: a systematic review and replication study. *J Alzheimers Dis.* 2014;38(3):515-31.
42. Chiam JT, Dobson RJ, Kiddle SJ, Sattlecker M. Are blood-based protein biomarkers for Alzheimer's disease also involved in other brain disorders? A systematic review. *J Alzheimers Dis.* 2015;43(1):303-14.
43. Suzuki K, Iwata A, Iwatsubo T. The past, present, and future of disease-modifying therapies for Alzheimer's disease. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2017;93(10):757-771.
44. Aisen PS. Editorial: Failure After Failure. What Next in AD Drug Development? *J Prev Alzheimers Dis.* 2019;6(3):150.

45. Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, van Belle G, Berg L. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1991;41(4):479-86.
46. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82(4):239-59.
47. Beach TG, Monsell SE, Phillips LE, Kukull W. Accuracy of the clinical diagnosis of Alzheimer disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 2005-2010. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012;71(4):266-73.
48. Sperling RA, Jack CR Jr, Black SE, Frosch MP, Greenberg SM, Hyman BT, Scheltens P, Carrillo MC, Thies W, Bednar MM, Black RS, Brashear HR, Grundman M, Siemers ER, Feldman HH, Schindler RJ. Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials: recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *Alzheimers Dement*. 2011;7(4):367-85.
49. Aisen PS, Sperling RA, Cummings J, Donohue MC, Langford O, Jimenez-Maggiore GA, Rissman RA, Rafii MS, Walter S, Clanton T, Raman R. The Trial-Ready Cohort for

Preclinical/Prodromal Alzheimer's Disease (TRC-PAD) Project: An Overview. *J Prev Alzheimers Dis.* 2020;7(4):208-212.

50. Rafii MS, Aisen PS. Alzheimer's Disease Clinical Trials: Moving Toward Successful Prevention. *CNS Drugs.* 2019;33(2):99-106.
51. Jansen WJ, Ossenkuppele R, Knol DL, Tijms BM, Scheltens P, Verhey FR, Visser PJ; Amyloid Biomarker Study Group, Aalten P, Aarsland D, Alcolea D, Alexander M, Almdahl IS, Arnold SE, Baldeiras I, Barthel H, van Berckel BN, Bibeau K, Blennow K, Brooks DJ, van Buchem MA, Camus V, Cavedo E, Chen K, Chetelat G, Cohen AD, Drzezga A, Engelborghs S, Fagan AM, Fladby T, Fleisher AS, van der Flier WM, Ford L, Förster S, Fortea J, Foskett N, Frederiksen KS, Freund-Levi Y, Frisoni GB, Froelich L, Gabryelewicz T, Gill KD, Gkatzima O, Gómez-Tortosa E, Gordon MF, Grimmer T, Hampel H, Hausner L, Hellwig S, Herukka SK, Hildebrandt H, Ishihara L, Ivanoiu A, Jagust WJ, Johannsen P, Kandimalla R, Kapaki E, Klimkowicz-Mrowiec A, Klunk WE, Köhler S, Koglin N, Kornhuber J, Kramberger MG, Van Laere K, Landau SM, Lee DY, de Leon M, Lisetti V, Lleó A, Madsen K, Maier W, Marcusson J, Mattsson N, de Mendonça A, Meulenbroek O, Meyer PT, Mintun MA, Mok V, Molinuevo JL,

Møllergård HM, Morris JC, Mroczko B, Van der Mussele S, Na DL, Newberg A,
Nordberg A, Nordlund A, Novak GP, Paraskevas GP, Parnetti L, Perera G, Peters O,
Popp J, Prabhakar S, Rabinovici GD, Ramakers IH, Rami L, Resende de Oliveira C,
Rinne JO, Rodrigue KM, Rodríguez-Rodríguez E, Roe CM, Rot U, Rowe CC, Rütter E,
Sabri O, Sanchez-Juan P, Santana I, Sarazin M, Schröder J, Schütte C, Seo SW,
Soetewey F, Soininen H, Spuru L, Struyfs H, Teunissen CE, Tsolaki M, Vandenberghe R,
Verbeek MM, Villemagne VL, Vos SJ, van Waalwijk van Doorn LJ, Waldemar G,
Wallin A, Wallin ÅK, Wiltfang J, Wolk DA, Zboch M, Zetterberg H. Prevalence of
cerebral amyloid pathology in persons without dementia: a meta-analysis. *JAMA*.
2015;313(19):1924-38.

52. Iwatsubo T, Iwata A, Suzuki K, Ihara R, Arai H, Ishii K, Senda M, Ito K, Ikeuchi T,
Kuwano R, Matsuda H; Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Sun CK,
Beckett LA, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, Donohue MC; Alzheimer's Disease
Neuroimaging Initiative. Japanese and North American Alzheimer's Disease
Neuroimaging Initiative studies: Harmonization for international trials. *Alzheimer's
Dement*. 2018;14(8):1077-1087.

53. Jimenez-Maggiore GA, Bruschi S, Raman R, Langford O, Donohue M, Rafii MS, Sperling RA, Cummings JL, Aisen PS. TRC-PAD: Accelerating Recruitment of AD Clinical Trials through Innovative Information Technology. *J Prev Alzheimers Dis.* 2020;7(4):226-233.
54. https://www.amed.go.jp/news/release_20191031.html (2020年10月10日アクセス)
55. Sperling RA, Donohue MC, Raman R, Sun CK, Yaari R, Holdridge K, Siemers E, Johnson KA, Aisen PS; A4 Study Team. Association of Factors With Elevated Amyloid Burden in Clinically Normal Older Individuals. *JAMA Neurol.* 2020;77(6):735-745.
56. Sato K, Ihara R, Suzuki K, Niimi Y, Toda T, Jimenez-Maggiore GA, Langford O, Donohue MC, Raman R, Aisen PS, Sperling RA, Iwata A, Iwatsubo T. Predicting amyloid risk by machine learning algorithms based on the A4 screen data: application to the Japanese Trial-Ready Cohort study. (submitted)
57. Sperling RA, Rentz DM, Johnson KA, Karlawish J, Donohue M, Salmon DP, Aisen P. The A4 study: stopping AD before symptoms begin? *Sci Transl Med.* 2014;6(228):228fs13.

58. Amariglio RE, Donohue MC, Marshall GA, Rentz DM, Salmon DP, Ferris SH, Karantzoulis S, Aisen PS, Sperling RA; Alzheimer's Disease Cooperative Study. Tracking early decline in cognitive function in older individuals at risk for Alzheimer disease dementia: the Alzheimer's Disease Cooperative Study Cognitive Function Instrument. *JAMA Neurol.* 2015;72(4):446-54.
59. Walter S, Langford OG, Clanton TB, Jimenez-Maggiora GA, Raman R, Rafii MS, Shaffer EJ, Sperling RA, Cummings JL, Aisen PS. The Trial-Ready Cohort for Preclinical and Prodromal Alzheimer's Disease (TRC-PAD): Experience from the First 3 Years. *J Prev Alzheimers Dis.* 2020;7(4):234-241.
60. Max Kuhn. Contributions from Jed Wing, Steve Weston, Andre Williams, Chris Keefer, Allan Engelhardt, Tony Cooper, Zachary Mayer, Brenton Kenkel, the R Core Team, Michael Benesty, Reynald Lescarbeau, Andrew Ziem, Luca Scrucca, Yuan Tang, Candan and Tyler Hunt. caret: Classification and Regression Training. R package version 6.0-81. 2018. (<https://CRAN.R-project.org/package=caret>)

61. Klöppel S, Stonnington CM, Chu C, Draganski B, Scahill RI, Rohrer JD, Fox NC, Jack CR Jr, Ashburner J, Frackowiak RS. Automatic classification of MR scans in Alzheimer's disease. *Brain*. 2008;131(Pt 3):681-9.
62. Yachen Yan. MLmetrics: Machine Learning Evaluation Metrics. R package version 1.1.1. 2016. (<https://CRAN.R-project.org/package=MLmetrics>)
63. Silbert LC, Dodge HH, Lahna D, Promjunyakul NO, Austin D, Mattek N, Erten-Lyons D, Kaye JA. Less Daily Computer Use is Related to Smaller Hippocampal Volumes in Cognitively Intact Elderly. *J Alzheimers Dis*. 2016;52(2):713-7.
64. Langford O, Raman R, Sperling RA, Cummings J, Sun CK, Jimenez-Maggiore G, Aisen PS, Donohue MC. Predicting Amyloid Burden to Accelerate Recruitment of Secondary Prevention Clinical Trials. *J Prev Alzheimers Dis*. 2020;7(4):213-218.
65. Ihara R, Iwata A, Suzuki K, Ikeuchi T, Kuwano R, Iwatsubo T; Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Clinical and cognitive characteristics of preclinical Alzheimer's disease in the Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative cohort. *Alzheimers Dement (N Y)*. 2018;4:645-651.

66. Ashburner J, Friston KJ. Voxel-based morphometry--the methods. *Neuroimage*. 2000;11(6 Pt 1):805-21.
67. Frisoni GB, Fox NC, Jack CR Jr, Scheltens P, Thompson PM. The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2010;6(2):67-77.
68. Ferreira LK, Diniz BS, Forlenza OV, Busatto GF, Zanetti MV. Neurostructural predictors of Alzheimer's disease: a meta-analysis of VBM studies. *Neurobiol Aging*. 2011;32(10):1733-41.
69. Frost B, Diamond MI. Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(3):155-9.
70. Brundin P, Melki R, Kopito R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(4):301-7.
71. Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2013;501(7465):45-51.
72. Bullmore E, Sporns O. Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(3):186-98.

73. Stam CJ. Modern network science of neurological disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(10):683-95.
74. Yao Z, Zhang Y, Lin L, Zhou Y, Xu C, Jiang T; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Abnormal cortical networks in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *PLoS Comput Biol*. 2010;6(11):e1001006.
75. Griffa A, Baumann PS, Thiran JP, Hagmann P. Structural connectomics in brain diseases. *Neuroimage*. 2013;80:515-26.
76. Zhu D, Li K, Terry DP, Puente AN, Wang L, Shen D, Miller LS, Liu T. Connectome-scale assessments of structural and functional connectivity in MCI. *Hum Brain Mapp*. 2014;35(7):2911-23.
77. Prescott JW, Guidon A, Doraiswamy PM, Roy Choudhury K, Liu C, Petrella JR; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. The Alzheimer structural connectome: changes in cortical network topology with increased amyloid plaque burden. *Radiology*. 2014;273(1):175-84.

78. Filippi M, Basaia S, Canu E, Imperiale F, Magnani G, Falautano M, Comi G, Falini A, Agosta F. Changes in functional and structural brain connectome along the Alzheimer's disease continuum. *Mol Psychiatry*. 2020;25(1):230-239.
79. Leonardi N, Richiardi J, Gschwind M, Simioni S, Annoni JM, Schlupe M, Vuilleumier P, Van De Ville D. Principal components of functional connectivity: a new approach to study dynamic brain connectivity during rest. *Neuroimage*. 2013;83:937-50.
80. Iraj A, Calhoun VD, Wiseman NM, Davoodi-Bojd E, Avanaki MRN, Haacke EM, Kou Z. The connectivity domain: Analyzing resting state fMRI data using feature-based data-driven and model-based methods. *Neuroimage*. 2016;134:494-507.
81. Pagani M, Giuliani A, Öberg J, De Carli F, Morbelli S, Girtler N, Arnaldi D, Accardo J, Bauckneht M, Bongioanni F, Chincarini A, Sambuceti G, Jonsson C, Nobili F. Progressive Disintegration of Brain Networking from Normal Aging to Alzheimer Disease: Analysis of Independent Components of ¹⁸F-FDG PET Data. *J Nucl Med*. 2017;58(7):1132-1139.

82. Morris TJ, Butcher LM, Feber A, Teschendorff AE, Chakravarthy AR, Wojdacz TK, Beck S. ChAMP: 450k Chip Analysis Methylation Pipeline. *Bioinformatics*. 2014;30(3):428-30.
83. Zhang B, Horvath S. A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2005;4:Article17.
84. Langfelder P, Horvath S. Eigengene networks for studying the relationships between co-expression modules. *BMC Syst Biol*. 2007;1:54.
85. Mumford JA, Horvath S, Oldham MC, Langfelder P, Geschwind DH, Poldrack RA. Detecting network modules in fMRI time series: a weighted network analysis approach. *Neuroimage*. 2010;52(4):1465-76.
86. Sato K, Mano T, Matsuda H, Senda M, Ihara R, Suzuki K, Arai H, Ishii K, Ito K, Ikeuchi T, Kuwano R, Toda T, Iwatsubo T, Iwata A; Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Visualizing modules of coordinated structural brain atrophy during the course of conversion to Alzheimer's disease by applying methodology from gene co-expression analysis. *Neuroimage Clin*. 2019;24:101957.
87. Fischl B. FreeSurfer. *Neuroimage*. 2012;62(2):774-81.

88. Sato K, Mano T, Ihara R, Suzuki K, Tomita N, Arai H, Ishii K, Senda M, Ito K, Ikeuchi T, Kuwano R, Matsuda H, Iwatsubo T, Toda T, Iwata A; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, and Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Lower Serum Calcium as a Potentially Associated Factor for Conversion of Mild Cognitive Impairment to Early Alzheimer's Disease in the Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. *J Alzheimers Dis.* 2019;68(2):777-788.
89. Desikan RS, Ségonne F, Fischl B, Quinn BT, Dickerson BC, Blacker D, Buckner RL, Dale AM, Maguire RP, Hyman BT, Albert MS, Killiany RJ. An automated labeling system for subdividing the human cerebral cortex on MRI scans into gyral based regions of interest. *Neuroimage.* 2006;31(3):968-80.
90. Westman E, Aguilar C, Muehlboeck JS, Simmons A. Regional magnetic resonance imaging measures for multivariate analysis in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Brain Topogr.* 2013;26(1):9-23.
91. Voevodskaya O, Simmons A, Nordenskjöld R, Kullberg J, Ahlström H, Lind L, Wahlund LO, Larsson EM, Westman E; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative.

- The effects of intracranial volume adjustment approaches on multiple regional MRI volumes in healthy aging and Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 2014;6:264.
92. Puwastien P. Issues in the development and use of food composition databases. *Public Health Nutr.* 2002;5(6A):991-9.
93. Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res.* 2001;125(1-2):279-84.
94. Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics.* 2008;9:559.
95. Athanasia Mo Mowinckel and Didac Vidal Pineiro. ggseg: Plotting tool for brain atlases. 2019. R package version 1.5.
96. Tapiola T, Pennanen C, Tapiola M, Tervo S, Kivipelto M, Hänninen T, Pihlajamäki M, Laakso MP, Hallikainen M, Hämäläinen A, Vanhanen M, Helkala EL, Vanninen R, Nissinen A, Rossi R, Frisoni GB, Soininen H. MRI of hippocampus and entorhinal cortex in mild cognitive impairment: a follow-up study. *Neurobiol Aging.* 2008;29(1):31-8.

97. Risacher SL, Saykin AJ, West JD, Shen L, Firpi HA, McDonald BC; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI). Baseline MRI predictors of conversion from MCI to probable AD in the ADNI cohort. *Curr Alzheimer Res.* 2009;6(4):347-61.
98. Yang J, Pan P, Song W, Huang R, Li J, Chen K, Gong Q, Zhong J, Shi H, Shang H. Voxelwise meta-analysis of gray matter anomalies in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment using anatomic likelihood estimation. *J Neurol Sci.* 2012;316(1-2):21-9.
99. Sørensen L, Igel C, Pai A, Balas I, Anker C, Lillholm M, Nielsen M; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative and the Australian Imaging Biomarkers and Lifestyle flagship study of ageing. Differential diagnosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease using structural MRI cortical thickness, hippocampal shape, hippocampal texture, and volumetry. *Neuroimage Clin.* 2016;13:470-482.
100. Jylhävä J, Pedersen NL, Hägg S. Biological Age Predictors. *EBioMedicine.* 2017;21:29-36.
101. Horvath S, Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet.* 2018;19(6):371-384.

102. Levine ME, Lu AT, Bennett DA, Horvath S. Epigenetic age of the pre-frontal cortex is associated with neuritic plaques, amyloid load, and Alzheimer's disease related cognitive functioning. *Aging (Albany NY)*. 2015;7(12):1198-211.
103. Li P, Marshall L, Oh G, Jakubowski JL, Groot D, He Y, Wang T, Petronis A, Labrie V. Epigenetic dysregulation of enhancers in neurons is associated with Alzheimer's disease pathology and cognitive symptoms. *Nat Commun*. 2019;10(1):2246.
104. McCartney DL, Stevenson AJ, Walker RM, Gibson J, Morris SW, Campbell A, Murray AD, Whalley HC, Porteous DJ, McIntosh AM, Evans KL, Deary IJ, Marioni RE. Investigating the relationship between DNA methylation age acceleration and risk factors for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2018;10:429-437.
105. Marioni RE, Shah S, McRae AF, Ritchie SJ, Muniz-Terrera G, Harris SE, Gibson J, Redmond P, Cox SR, Pattie A, Corley J, Taylor A, Murphy L, Starr JM, Horvath S, Visscher PM, Wray NR, Deary IJ. The epigenetic clock is correlated with physical and cognitive fitness in the Lothian Birth Cohort 1936. *Int J Epidemiol*. 2015;44(4):1388-96.
106. Hodgson K, Carless MA, Kulkarni H, Curran JE, Sprooten E, Knowles EE, Mathias S, Göring HHH, Yao N, Olvera RL, Fox PT, Almasy L, Duggirala R, Blangero J, Glahn

- DC. Epigenetic Age Acceleration Assessed with Human White-Matter Images. *J Neurosci.* 2017;37(18):4735-4743.
107. Raina A, Zhao X, Grove ML, Bressler J, Gottesman RF, Guan W, Pankow JS, Boerwinkle E, Mosley TH, Fornage M. Cerebral white matter hyperintensities on MRI and acceleration of epigenetic aging: the atherosclerosis risk in communities study. *Clin Epigenetics.* 2017;9:21.
108. Horvath S, Ritz BR. Increased epigenetic age and granulocyte counts in the blood of Parkinson's disease patients. *Aging (Albany NY).* 2015;7(12):1130-42.
109. Sato K, Mano T, Suzuki K, Toda T, Iwatsubo T, Iwata A; for Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Attempt to Predict A/T/N-Based Alzheimer's Disease Cerebrospinal Fluid Biomarkers Using a Peripheral Blood DNA Methylation Clock. *J Alzheimers Dis Rep.* 2020;4(1):287-296.
110. Petersen RC, Aisen PS, Beckett LA, Donohue MC, Gamst AC, Harvey DJ, Jack CR Jr, Jagust WJ, Shaw LM, Toga AW, Trojanowski JQ, Weiner MW. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI): clinical characterization. *Neurology.* 2010;74(3):201-9.

111. Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL, Fagan AM, Goate A, Fox NC, Marcus DS, Cairns NJ, Xie X, Blazey TM, Holtzman DM, Santacruz A, Buckles V, Oliver A, Moulder K, Aisen PS, Ghetti B, Klunk WE, McDade E, Martins RN, Masters CL, Mayeux R, Ringman JM, Rossor MN, Schofield PR, Sperling RA, Salloway S, Morris JC; Dominantly Inherited Alzheimer Network. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2012;367(9):795-804.

112. Palmqvist S, Mattsson N, Hansson O; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Cerebrospinal fluid analysis detects cerebral amyloid- β accumulation earlier than positron emission tomography. *Brain.* 2016;139(Pt 4):1226-36.

113. Shaw LM, Vanderstichele H, Knapik-Czajka M, Clark CM, Aisen PS, Petersen RC, Blennow K, Soares H, Simon A, Lewczuk P, Dean R, Siemers E, Potter W, Lee VM, Trojanowski JQ; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. *Ann Neurol.* 2009;65(4):403-13.

114. Day JJ, Sweatt JD. Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron.* 2011;70(5):813-29.

115. Ciccarone F, Tagliatesta S, Caiafa P, Zampieri M. DNA methylation dynamics in aging: how far are we from understanding the mechanisms? *Mech Ageing Dev.* 2018;174:3-17.
116. Iwata A, Nagata K, Hatsuta H, Takuma H, Bundo M, Iwamoto K, Tamaoka A, Murayama S, Saido T, Tsuji S. Altered CpG methylation in sporadic Alzheimer's disease is associated with APP and MAPT dysregulation. *Hum Mol Genet.* 2014;23(3):648-56.
117. Lunnon K, Smith R, Hannon E, De Jager PL, Srivastava G, Volta M, Troakes C, Al-Sarraj S, Burrage J, Macdonald R, Condliffe D, Harries LW, Katsel P, Haroutunian V, Kaminsky Z, Joachim C, Powell J, Lovestone S, Bennett DA, Schalkwyk LC, Mill J. Methylomic profiling implicates cortical deregulation of ANK1 in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* 2014;17(9):1164-70.
118. De Jager PL, Srivastava G, Lunnon K, Burgess J, Schalkwyk LC, Yu L, Eaton ML, Keenan BT, Ernst J, McCabe C, Tang A, Raj T, Replogle J, Brodeur W, Gabriel S, Chai HS, Younkin C, Younkin SG, Zou F, Szyf M, Epstein CB, Schneider JA, Bernstein BE, Meissner A, Ertekin-Taner N, Chibnik LB, Kellis M, Mill J, Bennett DA. Alzheimer's disease: early alterations in brain DNA methylation at ANK1, BIN1, RHBDF2 and other loci. *Nat Neurosci.* 2014;17(9):1156-63.

119. Mano T, Nagata K, Nonaka T, Tarutani A, Imamura T, Hashimoto T, Bannai T, Koshi-
Mano K, Tsuchida T, Ohtomo R, Takahashi-Fujigasaki J, Yamashita S, Ohyagi Y,
Yamasaki R, Tsuji S, Tamaoka A, Ikeuchi T, Saido TC, Iwatsubo T, Ushijima T,
Murayama S, Hasegawa M, Iwata A. Neuron-specific methylome analysis reveals
epigenetic regulation and tau-related dysfunction of BRCA1 in Alzheimer's disease. *Proc
Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(45):E9645-E9654.
120. Altuna M, Urdániz-Casado A, Sánchez-Ruiz de Gordo J, Zelaya MV, Labarga A,
Lepesant MJ, Roldán M, Blanco-Luquin I, Perdonés Á, Larumbe R, Jericó I, Echavarrí
C, Méndez-López I, Di Stefano L, Mendioroz M. DNA methylation signature of human
hippocampus in Alzheimer's disease is linked to neurogenesis. *Clin Epigenetics*.
2019;11(1):91.
121. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, Klotzle B, Bibikova M,
Fan JB, Gao Y, Deconde R, Chen M, Rajapakse I, Friend S, Ideker T, Zhang K.
Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol
Cell*. 2013;49(2):359-367.

- 122.Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 2013;14(10):R115.
- 123.Garagnani P, Bacalini MG, Pirazzini C, Gori D, Giuliani C, Mari D, Di Blasio AM, Gentilini D, Vitale G, Collino S, Rezzi S, Castellani G, Capri M, Salvioli S, Franceschi C. Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age. *Aging Cell.* 2012;11(6):1132-4.
- 124.Lee HY, Lee SD, Shin KJ. Forensic DNA methylation profiling from evidence material for investigative leads. *BMB Rep.* 2016;49(7):359-69.
- 125.Fortin JP, Triche TJ Jr, Hansen KD. Preprocessing, normalization and integration of the Illumina HumanMethylationEPIC array with minfi. *Bioinformatics.* 2017;33(4):558-560.
- 126.Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, Irizarry RA. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics.* 2014;30(10):1363-9.
- 127.Wang T, Guan W, Lin J, Boutaoui N, Canino G, Luo J, Celedón JC, Chen W. A systematic study of normalization methods for Infinium 450K methylation data using whole-genome bisulfite sequencing data. *Epigenetics.* 2015;10(7):662-9.

128. McEwen LM, Jones MJ, Lin DTS, Edgar RD, Husquin LT, MacIsaac JL, Ramadori KE, Morin AM, Rider CF, Carlsten C, Quintana-Murci L, Horvath S, Kober MS. Systematic evaluation of DNA methylation age estimation with common preprocessing methods and the Infinium MethylationEPIC BeadChip array. *Clin Epigenetics*. 2018;10(1):123.
129. Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics*. 2012;28(6):882-3.
130. Johnstone IM, Titterton DM. Statistical challenges of high-dimensional data. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2009;367(1906):4237-53.
131. Horvath S, Gurven M, Levine ME, Trumble BC, Kaplan H, Allayee H, Ritz BR, Chen B, Lu AT, Rickabaugh TM, Jamieson BD, Sun D, Li S, Chen W, Quintana-Murci L, Fagny M, Kober MS, Tsao PS, Reiner AP, Edlefsen KL, Absher D, Assimes TL. An epigenetic clock analysis of race/ethnicity, sex, and coronary heart disease. *Genome Biol*. 2016;17(1):171.

132. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez JC, Müller M. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:77.
133. Tannorella P, Stoccoro A, Tognoni G, Petrozzi L, Salluzzo MG, Ragalmuto A, Siciliano G, Haslberger A, Bosco P, Bonuccelli U, Migliore L, Coppedè F. Methylation analysis of multiple genes in blood DNA of Alzheimer's disease and healthy individuals. *Neurosci Lett*. 2015;600:143-7.
134. Walton E, Hass J, Liu J, Roffman JL, Bernardoni F, Roessner V, Kirsch M, Schackert G, Calhoun V, Ehrlich S. Correspondence of DNA Methylation Between Blood and Brain Tissue and Its Application to Schizophrenia Research. *Schizophr Bull*. 2016;42(2):406-14.
135. Braun PR, Han S, Hing B, Nagahama Y, Gaul LN, Heinzman JT, Grossbach AJ, Close L, Dlouhy BJ, Howard MA 3rd, Kawasaki H, Potash JB, Shinozaki G. Genome-wide DNA methylation comparison between live human brain and peripheral tissues within individuals. *Transl Psychiatry*. 2019;9(1):47.

136. Davies MN, Volta M, Pidsley R, Lunnon K, Dixit A, Lovestone S, Coarfa C, Harris RA, Milosavljevic A, Troakes C, Al-Sarraj S, Dobson R, Schalkwyk LC, Mill J. Functional annotation of the human brain methylome identifies tissue-specific epigenetic variation across brain and blood. *Genome Biol.* 2012;13(6):R43.
137. Yu L, Chibnik LB, Yang J, McCabe C, Xu J, Schneider JA, De Jager PL, Bennett DA. Methylation profiles in peripheral blood CD4+ lymphocytes versus brain: The relation to Alzheimer's disease pathology. *Alzheimers Dement.* 2016;12(9):942-951.
138. Hou Y, Chen H, He Q, Jiang W, Luo T, Duan J, Mu N, He Y, Wang H. Changes in methylation patterns of multiple genes from peripheral blood leucocytes of Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropsychiatr.* 2013;25(2):66-76.
139. Kobayashi N, Shinagawa S, Nagata T, Shimada K, Shibata N, Ohnuma T, Kasanuki K, Arai H, Yamada H, Nakayama K, Kondo K. Development of Biomarkers Based on DNA Methylation in the NCAPH2/LMF2 Promoter Region for Diagnosis of Alzheimer's Disease and Amnesic Mild Cognitive Impairment. *PLoS One.* 2016;11(1):e0146449.
140. Di Francesco A, Arosio B, Falconi A, Micioni Di Bonaventura MV, Karimi M, Mari D, Casati M, Maccarrone M, D'Addario C. Global changes in DNA methylation in

- Alzheimer's disease peripheral blood mononuclear cells. *Brain Behav Immun.* 2015;45:139-44.
141. Yokoyama AS, Rutledge JC, Medici V. DNA methylation alterations in Alzheimer's disease. *Environ Epigenet.* 2017;3(2):dvx008.
142. Fransquet PD, Lacaze P, Saffery R, McNeil J, Woods R, Ryan J. Blood DNA methylation as a potential biomarker of dementia: A systematic review. *Alzheimers Dement.* 2018;14(1):81-103.
143. Pirooznia M, Yang JY, Yang MQ, Deng Y. A comparative study of different machine learning methods on microarray gene expression data. *BMC Genomics.* 2008;9 Suppl 1(Suppl 1):S13.
144. Nguyen LH, Holmes S. Ten quick tips for effective dimensionality reduction. *PLoS Comput Biol.* 2019;15(6):e1006907.
145. Buegler M, Harms R, Balasa M, Meier IB, Exarchos T, Rai L, Boyle R, Tort A, Kozori M, Lazarou E, Rampini M, Cavaliere C, Vlamos P, Tsolaki M, Babiloni C, Soricelli A, Frisoni G, Sanchez-Valle R, Whelan R, Merlo-Pich E, Tarnanas I. Digital biomarker-

- based individualized prognosis for people at risk of dementia. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2020;12(1):e12073.
146. Tang F, Uchendu I, Wang F, Dodge HH, Zhou J. Scalable diagnostic screening of mild cognitive impairment using AI dialogue agent. *Sci Rep*. 2020;10(1):5732.
147. Zhao M, Wasfy JH, Singh JP. Sensor-aided continuous care and self-management: implications for the post-COVID era. *Lancet Digit Health*. 2020. (doi: 10.1016/S2589-7500(20)30220-X.)
148. Babrak LM, Menetski J, Rebhan M, Nisato G, Zinggeler M, Brasier N, Baerenfaller K, Brenzikofer T, Baltzer L, Vogler C, Gschwind L, Schneider C, Streiff F, Groenen PMA, Miho E. Traditional and Digital Biomarkers: Two Worlds Apart? *Digit Biomark*. 2019;3(2):92-102.
149. Sato K, Mano T, Iwata A, Toda T. Autocorrelation-based method to identify disordered rhythm in Parkinson's disease tasks: A novel approach applicable to multimodal devices. *PLoS One*. 2020;15(10):e0238486.
150. Lane TS, Armin J, Gordon JS. Online Recruitment Methods for Web-Based and Mobile Health Studies: A Review of the Literature. *J Med Internet Res*. 2015;17(7):e183.

151.Saji N, Sakurai T, Suzuki K, Mizusawa H, Toba K; ORANGE investigators. ORANGE's challenge: developing wide-ranging dementia research in Japan. *Lancet Neurol.* 2016;15(7):661-662.