

高グルコース状態がアルツハイマー病関連アミロイドβ産生に及ぼす影響

手塚敏之

新潟大学大学院医歯学総合研究科

分子細胞医学専攻神経内科学分野

(主任：西澤正豊教授)

Facilitated production of amyloid-β in neuronal cells under high glucose condition

Toshiyuki TEZUKA

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science

Course for Molecular and Cellular Medicine

Molecular Neuroscience and Brain Disease/Neurology

(Director: Prof. Masatoyo NISHIZAWA)

要旨

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD) は認知症の最大の原因疾患である。AD の主要な病理変化の 1 つはアミロイド β (Amyloid- β : A β) の蓄積である。後天的環境因子が AD 発症のリスクになることが数多くの疫学研究により報告されている。住民コホート研究である久山町研究によると、糖尿病による AD 発症のリスクは約 2 倍である。本研究は、糖尿病が AD 発症のリスクになる分子機序を明らかにすることを目的に、高グルコース状態が A β およびアミロイド前駆体タンパク (Amyloid precursor protein : APP) に及ぼす影響について、神経系培養細胞を用いて検討した。マウス神経芽腫細胞である N2a 細胞と、Sweden 型変異を導入した APP を安定発現する N2a 細胞 (N2a APP-swe 細胞) を用い、グルコース濃度 50~400 mg/dL を含む培養液で 24 時間培養し、細胞ライセイトと培養上清を回収した。それぞれをポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後、ウェスタンブロット解析により APP-FL (full length : 全長型)、APP-CTF (C-terminal fragment : C 末端断片)、および分泌 A β を検出した。N2a APP-swe 細胞では、グルコース 50 mg/dL 条件下と比較して、APP-FL/actin は 200, 400 mg/dL 条件下で有意に増加した。一方、APP-CTF/FL は 200, 400 mg/dL 条件下で有意に減少した。A β /APP-FL は 100, 200, 400 mg/dL 条件下で有意に増加した。内在性 APP を発現する N2a 細胞においてもほぼ同様の結果が得られた。これらの結果より、高グルコース状態において神経細胞では A β の産生亢進が生じることが示された。高グルコース状態で A β が増加する機序として、

APP 切断酵素活性がグルコースにより調整され、A β 産生を誘導しているのかもしれない。それ以外にも、APP-FL の産生増加や A β 分解遅延が A β 増加の一因になっている可能性もある。高グルコース状態が A β 蓄積を促進させるのであれば、高グルコース状態を抑制することで AD 病態を改善させる可能性がある。したがって、高血糖を抑制する糖尿病治療薬は、AD 治療薬として応用できる可能性がある。PPAR- γ 作動薬やインクレチン関連薬は AD モデルマウスにおいて A β 蓄積を軽減する効果が報告されており、本研究で示されたグルコースを介した A β の産生抑制がその分子基盤となっている可能性がある。

キーワード：アルツハイマー病，糖尿病， β アミロイド，グルコース，アミロイド前駆体蛋白

Reprint requests to : Toshiyuki TEZUKA

Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University

1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku, Niigata 951-8585, Japan

別刷請求先：〒951-8585 新潟市中央区旭町通 1-757

新潟大学脳研究所神経内科学教室 手塚 敏之

はじめに

日本では高齢化が進み、認知症の患者数は増加の一途をたどっている。厚生労働省研究班（代表者・朝田隆筑波大教授）の調査によると、日本全国における 65 歳以上の高齢者のうち、認知症患者は推計 15%で、2012 年時点で約 462 万人に上ると推計される¹⁾。認知症の最大の原因疾患はアルツハイマー病（Alzheimer disease : AD）である。AD の主要な病理変化の 1 つはアミロイド β （Amyloid- β : A β ）の蓄積である。アミロイド前駆体蛋白（Amyloid precursor protein : APP）は、 β -secretase 活性により sAPP β （soluble APP β ）と β -CTF（C terminal fragment）に切断される。 β -CTF は γ -secretase 活性により A β と AICD（APP intracellular domain）に切断され、このプロセスで A β が産生される（A β 産生経路）。一方、APP が α -secretase 活性により sAPP α （soluble APP α ）と α -CTF に切断される A β 非産生経路では、A β が産生されない²⁾³⁾。脳内 A β 蓄積を決める要因の一つに、A β 産生経路と A β 非産生経路のバランスがある。

AD に対する根本的な治療戦略として、A β に対するワクチン療法⁴⁾や γ -secretase 阻害剤⁵⁾、 β -secretase 阻害剤⁶⁾による治験が試みられたが、いずれの治験も臨床的な有効性は示されていない。最近、後天的因子が認知症発症のリスクに關与するという疫学研究が注目されている。Barnes らは、重要な後天的因子として、糖尿病、中年期の高血圧、中年期の肥満、うつ、低教育歴、喫煙、低運動量を挙げている⁷⁾。国内の代表的な住民コホート研究である久山町研究においては、糖尿病による AD 発症のリスクは約 2 倍で

あると報告している⁸⁹⁾。また、糖尿病と診断されない方でも空腹時血糖が比較的高いと認知症発症のリスクが増加したとの報告もある¹⁰⁾。糖尿病とAD発症の関連については近年さまざまな研究報告がある。例えば、徳武らは、初代神経培養細胞を用いた研究により、過剰なA β がインスリンシグナル障害を介してタウのリン酸化を誘導することを報告している¹¹⁾。

本研究では、糖尿病がAD発症のリスクとなる分子機序を明らかにするために、高グルコース状態がAPP代謝およびA β 産生を変化させる可能性について、神経系培養細胞を用いて検討した。

材料と方法

細胞培養と遺伝子導入

Neuro2a マウス神経芽腫細胞 (N2a 細胞) と、APP Sweden 型変異 (K670N, M671L) を安定発現する N2a 細胞 (N2a APP-swe 細胞) を使用した。N2a 細胞は、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) および Opti-MEM (Invitrogen) を等量混合し、ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum : FBS, ICN biomedical) 5%、非必須アミノ酸 (Non-essential amino acids : NEAA, Gibco) 1% を添加した培養液で培養した。N2a APP-swe 細胞は、G-418 (Calbiochem) 200 μ g/ml を添加した培養液を用いた。培養細胞への遺伝子導入は Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いた。

ウェスタンブロット

細胞培養液に 0.5 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF, Sigma-Aldrich) を加えて回収した後、遠心を行い、培養上清として回収した。培養細胞を phosphate buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich) で 1 回洗い、0.5% Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) を添加した lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5% NP-40, 0.5% Sodium deoxycholate, 5 mM EDTA) を用いて溶解し、遠心後の上清を細胞ライセイトとして回収した。細胞ライセイトおよび培養上清に sample buffer (0.15M Tris-HCL (pH 6.8), 6% SDS (Sodium dodecyl sulfate), 30% Glycerol, 0.1% BPB (bromophenol blue), 15% 2-Mercaptoethanol) を加え、96°C で 3 分間熱変性を行った。サンプルを SDS ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動で分離し、PVDF (Polyvinylidene difluoride) 膜 (Millipore) に転写した。APP-FL (full length), APP-CTF (α -CTF/ β -CTF), A β , actin の検出には、それぞれ anti-rabbit polyclonal anti APP C-terminal 抗体 (Sigma-Aldrich), anti-mouse monoclonal 82E1 抗体 (IBL), anti-gout polyclonal anti-actin 抗体 (1-19) (Santa Cruz Biotechnology) を一次抗体として用いた。HRP (horseradish peroxidase) を標識した二次抗体を Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) により可視化し、densitometry による半定量化を行った。

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

N2a 細胞の培養上清中の内在性 A β の定量はサンドイッチ ELISA (Human/Rat

β -Amyloid (40), 同じく(42) ELISA kit, WAKO) を用いた.

統計解析

解析データは平均±標準誤差で示した. グルコース濃度による影響はグルコース 50 mg/dL を基準として, 100, 200, 400 mg/dL 条件下の値を相対的に算出した. 統計解析は分散分析 (ANOVA) を行い, post hoc test として Tukey-Kramer 法を用いた (SPSS 12.0 J). 有意差判定 $p < 0.05$ を*, $p < 0.01$ を**と記載した.

結果

1. N2a APP-swe 細胞における高グルコース状態での APP 代謝および $A\beta$ 産生

N2a APP-swe 細胞をグルコース濃度 50, 100, 200, 400 mg/dL を含む培養液で 24 時間 37°C にて培養した. 細胞ライセイトを APP C-terminal 抗体で免疫ブロット解析したところ, ~110 kDa の APP-FL がグルコース濃度依存性に増加した. 一方, ~15 kDa の APP-CTF はグルコース濃度依存性に減少した. 培養上清を抗 $A\beta$ 抗体 (82E1) で免疫ブロット解析したところ, ~4 kDa の $A\beta$ はグルコース濃度依存性に増加した (図 1A). 各々のバンドを densitometry により半定量化し, 解析を行った. マウス脳内におけるグルコース濃度が 43 mg/dL との報告¹²⁾に基づき, グルコース 50 mg/dL の培養条件を基準として各グルコース濃度における値を算出した. APP-FL/actin はグルコース 50 mg/dL 条件下と比べて, 200, 400 mg/dL 条件下で有意に増加し, APP-CTF/FL は 200, 400 mg/dL 条件下

で有意に減少した(図 1B). $A\beta$ の絶対量は 200, 400 mg/dL 条件下に有意に増加し, APP-FL で補正した $A\beta$ /APP-FL は 100, 200, 400 mg/dL 条件下で有意に増加した (図 1C).

2. N2a 細胞における高グルコース状態での内在性 APP 代謝および $A\beta$ 産生

次に内在性 APP を発現する N2a 細胞を用いて同様の実験を行った. N2a APP-swe 細胞と同様に, ~110 kDa の内在性 APP-FL はグルコース濃度依存性に増加した. ~15 kDa の APP-CTF はグルコース濃度依存性に減少した (図 2A). 半定量化解析を行うと, APP-FL/actin はグルコース 50 mg/dL 条件下に比べて, 400 mg/dL 条件下で有意に増加し, APP-CTF/FL は 100, 200, 400 mg/dL 条件下で有意に減少した (図 2B). N2a 細胞由来の内在性 $A\beta$ は ELISA を用いて定量した. $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$ いずれも, 200, 400 mg/dL 条件下で有意に増加した. $A\beta_{42}/40$ の比率については, グルコース濃度による有意な変化は見られなかった (図 2C).

考察

AD 病態は, 脳内 $A\beta$ の蓄積が初期イベントとして生じ, タウの異常リン酸化を介した神経細胞死が誘発され, 認知機能障害にいたると考えられている. 多くの疫学研究により糖尿病が認知症発症のリスク因子となることが報告されていることを背景に, 本研究では, 糖尿病により生じる高グルコース状態が APP 代謝および $A\beta$ 産生に及ぼす影響について検討した. 本研究により, 高グルコース状態は神経細胞において $A\beta$ 産生を増

加させることが明らかになった。糖尿病が AD 発症のリスクとなる分子機序の一つに、本研究で示された高グルコース状態による神経細胞における A β の産生亢進が関与している可能性がある。

高グルコース条件で神経細胞において A β が産生亢進するメカニズムは不明であるが、幾つかの可能性を考察する。第一に、高グルコース条件が APP 切断酵素の活性に影響した可能性が考えられる。本研究では、高グルコース条件で APP-FL は増加し、APP-CTF は減少した。APP-FL を主に切断するのが α -secretase であることを考慮すれば、高グルコース状態では α -secretase 活性が低下している可能性が考えられる。AD 患者由来の脳脊髄液において、 α -secretase 分解により生じる sAPP α が減少することが報告されている¹³⁾。さらに、高グルコース条件で β -CTF が増加するという報告があり¹⁴⁾、高グルコース状態では A β 非産生経路から A β 産生経路へシフトしている可能性がある。また、高グルコース条件により分泌 A β が増加したことからは、 γ -secretase 活性が亢進している可能性も考えられる。(図 3)。家族性アルツハイマー病の原因となる *PSEN1* 変異を培養細胞に発現させると、 γ -secretase の活性変調により A β 42/40 の比率が増加することが知られているが¹⁵⁾¹⁶⁾、本研究結果では、高グルコース条件で A β 42/40 の比率は変化しておらず、*PSEN1* 変異でみられるような γ -secretase の機能異常は起きていないと考えられる。

第二の可能性として、A β の前駆体である APP-FL の増加が A β の産生亢進に影響した可能性が考えられる。本研究では、高グルコース条件で APP-FL は実際に増加していた

が (図 1B, 2B), $A\beta$ 量を APP-FL で補正しても高グルコース条件で有意に増加しており, $A\beta$ の産生亢進を APP-FL の増加のみで説明することは困難であろう. 高グルコース条件で APP-FL が増加する理由は明らかではないが, 高グルコース条件において APP-FL の mRNA は不変であるという報告がある¹⁴⁾.

第3の可能性として, 高グルコース条件で $A\beta$ の分解が遅延する可能性が考えられる. Yang らは, シクロヘキシミドでタンパク合成を阻害した実験を行い, 高グルコース条件で APP-FL の分解が抑制されたと報告している¹⁴⁾. また, 高グルコース状態では蛋白分解に関わるプロテアゾームやライソゾームの働きが低下するという報告があり¹⁷⁾¹⁸⁾, それらの要因により $A\beta$ の分解が遅延しているのかもしれない.

高グルコース状態が APP 代謝および $A\beta$ 産生に影響を及ぼし, $A\beta$ 蓄積を促進させるのであれば, 高グルコース状態を抑制することが AD 病態を改善させる可能性が考えられる. 臨床面での意義としては, 血糖値を正常に保つことが認知症予防に寄与するかもしれない. さらに, 糖尿病治療薬が AD 治療薬として応用できる可能性が考えられる. 糖尿病治療薬の中でも PPAR- γ 作動薬¹⁹⁾²⁰⁾やインクレチン関連製剤²¹⁾²²⁾が $A\beta$ 蓄積の抑制に働くことが AD モデル動物において報告されている. これらの報告で示された糖尿病治療薬の AD 病態への効果の分子機序は明らかにされていないが, 本研究で示されたグルコースを介した $A\beta$ への影響がその薬効の機序となっているのかもしれない.

結論

本研究により、高グルコース状態により神経細胞では $A\beta$ は産生亢進することが明らかになった。また、高グルコース状態で APP-FL は増加し、APP-CTF は減少することが示された。糖尿病が AD 発症のリスクとなる機序の一つとして、高グルコース状態における神経細胞の $A\beta$ 産生亢進が寄与している可能性が考えられた。

謝辞

本研究の御指導をいただきました新潟大学脳研究所神経内科学分野教授西澤正豊先生、新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学分野教授池内健先生、助教春日健作先生に深謝いたします。また、実験のご助言をいただきました新潟大学脳研究所超域大学院特任助教小山哲秀先生、新潟大学脳研究所神経内科学分野徳武孝允先生、矢島隆二先生に深謝いたします。

文献

- 1) Ikejima C, Hisanaga A, Meguro K, Yamada T, Ouma S, Kawamuro Y, Hyouki K, Nakashima K, Wada K, Yamada S, Watanabe I, Kakuma T, Aoyama Y, Mizukami K and Asada T: Multicentre population-based dementia prevalence survey in Japan: a preliminary report. *Psychogeriatrics* 12: 120-3, 2012.
- 2) Haass C, Kaether C, Thinakaran G and Sisodia S: Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a006270, 2012.
- 3) Selkoe DJ: Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annu Rev Neurosci* 17: 489-517, 1994.
- 4) Rinne JO, Brooks DJ, Rossor MN, Fox NC, Bullock R, Klunk WE, Mathis CA, Blennow K, Barakos J, Okello AA, Rodriguez Martinez de Liano S, Liu E, Koller M, Gregg KM, Schenk D, Black R and Grundman M: 11C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid- β load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study. *Lancet Neurol* 9: 363–72, 2010.
- 5) Coric V, van Dyck CH, Salloway S, Andreasen N, Brody M, Richter RW, Soininen H, Thein S, Shiovitz T, Pilcher G, Colby S, Rollin L, Dockens R, Pachai C, Portelius E, Andreasson U, Blennow K, Soares H, Albright C, Feldman HH and Berman RM: Safety and tolerability of the γ -secretase inhibitor avagacestat in a phase 2 study of mild to moderate Alzheimer

- disease. *Arch Neurol* 69: 1430–40, 2012.
- 6) Forman M, Palcza J, Tseng J, Leempoels J, Ramael S, Han D, Jhee S, Ereshefsky L, Tanen M, Laterza O, Dockendorf M, Krishna G, MA L, Wagner J and Troyer M: The novel BACE inhibitor MK-8931 dramatically lowers cerebrospinal fluid A β peptides in healthy subjects following single- and multipledose administration. *Alzheimer's Dement* 8: P704, 2012.
- 7) Barnes DE and Yaffe K: The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol* 10: 819-28, 2011.
- 8) Matsuzaki T, Sasaki K, Tanizaki Y, Hata J, Fujimi K, Matsui Y, Sekita A, Suzuki SO, Kanba S, Kiyohara Y and Iwaki T: Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease: The Hisayama Study. *Neurology* 75: 764-70, 2010.
- 9) Ohara T, Doi Y, Ninomiya T, Hirakawa Y, Hata J, Iwaki T, Kanba S and Kiyohara Y: Glucose tolerance status and risk of dementia in the community The Hisayama Study. *Neurology* 77: 1126–34, 2011.
- 10) Crane PK, Walker R, Hubbard RA, Li G, Nathan DM, Zheng H, Haneuse S, Craft S, Montine TJ, Kahn SE, McCormick W, McCurry SM, Bowen JD and Larson EB: Glucose Levels and Risk of Dementia. *N Engl J Med* 369: 540-8, 2013.
- 11) Tokutake T, Kasuga K, Yajima R, Sekine Y, Tezuka T, Nishizawa M and Ikeuchi T: Hyperphosphorylation of Tau induced by naturally secreted amyloid- β at nanomolar

- concentrations is modulated by insulin-dependent Akt-GSK3 β signaling pathway. *J Biol Chem* 287: 35222-33, 2012.
- 12) Silver IA and Erecinska M: Extracellular Glucose Concentration in Mammalian Brain: Continuous Monitoring of Changes during Increased Neuronal Activity and upon Limitation in Oxygen Supply in Normo-, Hypo-, and Hyperglycemic Animals. *The Journal of Neuroscience* 14: 5068-76, 1994.
- 13) Sennvik K, Fastbom J, Blomberg M, Wahlund LO, Winblad B and Benedikz E: Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* 278: 169–72, 2000.
- 14) Yang Y, Wu Y, Zhang S and Song W: High Glucose Promotes A β Production by Inhibiting APP Degradation. *PLOS ONE* 8: e69824, 2013.
- 15) Tagami S, Okochi M, Yanagida K, Kodama T, Arai T, Kuwano R, Ikeuchi T and Takeda M: Relative ratio and level of amyloid- β 42 surrogate in cerebrospinal fluid of familial Alzheimer disease patients with presenilin 1 mutations. *Neurodegener Dis* 13: 166-70, 2014.
- 16) Mucke L and Selkoe DJ: Neurotoxicity of amyloid β -protein: synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a006338, 2012.
- 17) Queisser MA, Yao D, Geisler S, Hammes HP, Lochnit G, Schleicher ED, Brownlee M and Preissner KT: Hyperglycemia impairs proteasome function by methylglyoxal. *Diabetes* 59:

670-8, 2010.

18) Peres GB, Juliano MA, Simões MJ and Michelacci YM: Lysosomal enzymes are decreased in the kidney of diabetic rats. *Biochim Biophys Acta* 1832: 85-95, 2013.

19) Papadopoulos P, Rosa-Neto P, Rochford J and Hamel E: Pioglitazone Improves Reversal Learning and Exerts Mixed Cerebrovascular Effects in a Mouse Model of Alzheimer's Disease with Combined Amyloid- β and Cerebrovascular Pathology. *PLOS ONE* 8: e68612, 2013.

20) O'Reilly JA and Lynch M: Rosiglitazone Improves Spatial Memory and Decreases Insoluble A β 1-42 in APP/PS1 Mice. *J Neuroimmune Pharmacol* 7: 140-4, 2012.

21) Chen S, Liu AR, An FM, Yao WB and Gao XD: Amelioration of neurodegenerative changes in cellular and rat models of diabetes-related Alzheimer's disease by exendin-4. *Age (Dordr)* 34: 1211-24, 2012.

22) McClean PL, Parthasarathy V, Faivre E and Hölscher C: The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31:6587-94, 2011.

図の説明

図1 N2a APP-swe 細胞における高グルコース状態での APP 代謝および A β 産生

A) N2a APP-swe 細胞をグルコース濃度 50, 100, 200, 400 mg/dL を含む培養液で 24 時間 37°C にて培養し、細胞ライセイトと培養上清を回収した。細胞ライセイトを APP C-terminal 抗体および actin 抗体で免疫ブロット解析を行った。培養上清を 82E1 抗体で免疫ブロット解析を行い、分泌 A β を検出した。

B) 目的のバンドを densitometry により半定量化し、グルコース 50 mg/dL 条件下の値を基準として各グルコース濃度における値を算出した (n=4)。APP-FL/actin はグルコース 50 mg/dL 条件下に比べて、200, 400 mg/dL 条件下で有意に増加し、APP-CTF/FL は 200, 400 mg/dL 条件下で有意に減少した。

C) A β 由来のバンドを半定量化し、グルコース 50 mg/dL 条件下の値を基準として各グルコース濃度における値を算出した (n=4)。A β は 200, 400 mg/dL 条件下で有意に増加し、A β /APP-FL は 100, 200, 400 mg/dL 条件下で有意に増加した。

図2 N2a 細胞における高グルコース状態での内在性 APP 代謝および A β 産生

A) N2a 細胞をグルコース濃度 50, 100, 200, 400 mg/dL を含む培養液で 24 時間 37°C にて培養し、細胞ライセイトと培養上清を回収した。細胞ライセイトを APP C-terminal 抗体および actin 抗体で免疫ブロット解析を行った。

B) 目的のバンドを半定量化し、グルコース 50 mg/dL 条件下の値を基準として各グル

コース濃度における値を算出した(n=4). APP-FL/actin はグルコース 50 mg/dL 条件下に比べて, 400 mg/dL 条件下で有意に増加し, APP-CTF/FL は 100, 200, 400 mg/dL 条件下で有意に減少した.

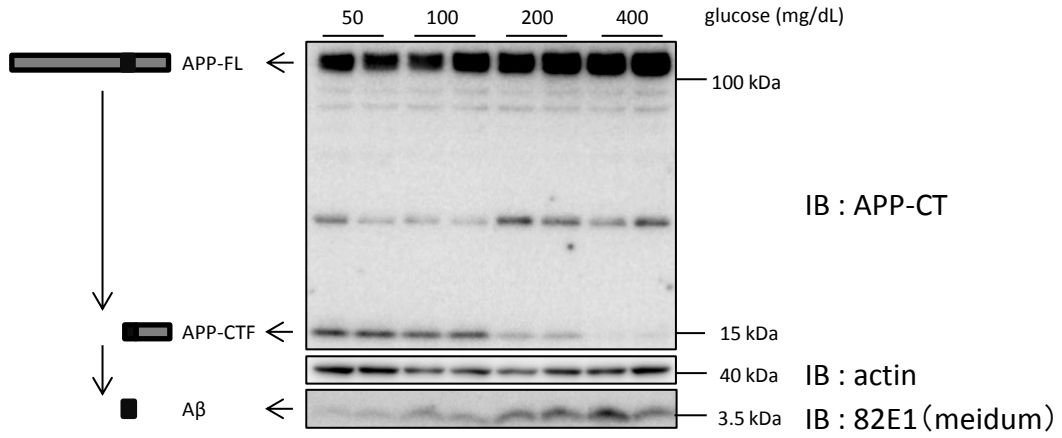
C) サンドイッチ ELISA を用いて培養上清中の内在性 A β を測定した. A β 40, A β 42 いずれも, グルコース濃度 200, 400 mg/dL 条件下で有意に増加した. A β 42/40 の比率は, グルコース濃度による変化は見られなかった.

図3 APPの代謝経路と高グルコースの関係の模式図

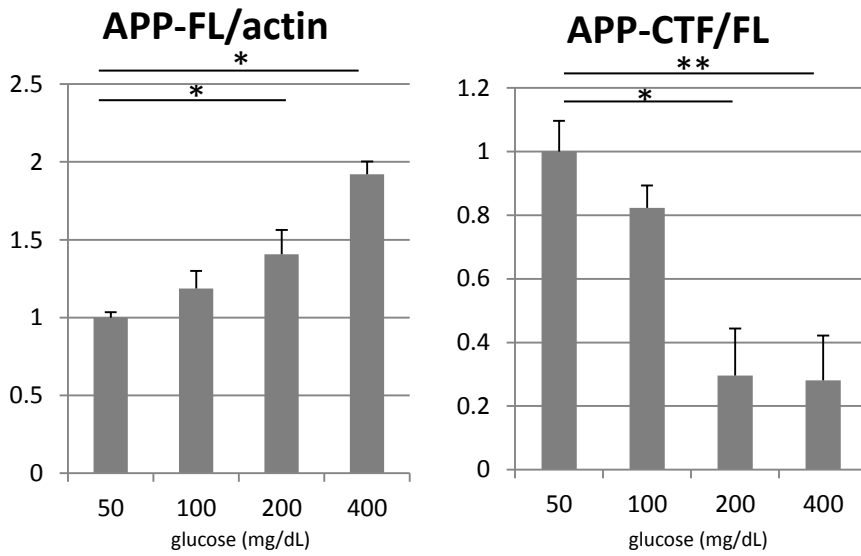
アミロイド前駆体蛋白 (Amyloid precursor protein : APP) は, β -secretase の働きで sAPP β (soluble APP β) と β -CTF (C terminal fragment) に切断される. β -CTF は γ -secretase の作用により A β と AICD (APP intracellular domain) に切断され, このプロセスで A β が産生される (A β 産生経路). 一方, APP が α -secretase により sAPP α (soluble APP α) と α -CTF に切断される場合は A β が産生されない (A β 非産生経路)²³⁾. 本研究結果では, 高グルコース条件において APP-FL は増加し, APP-CTF は減少し, A β は増加することが示された.

1

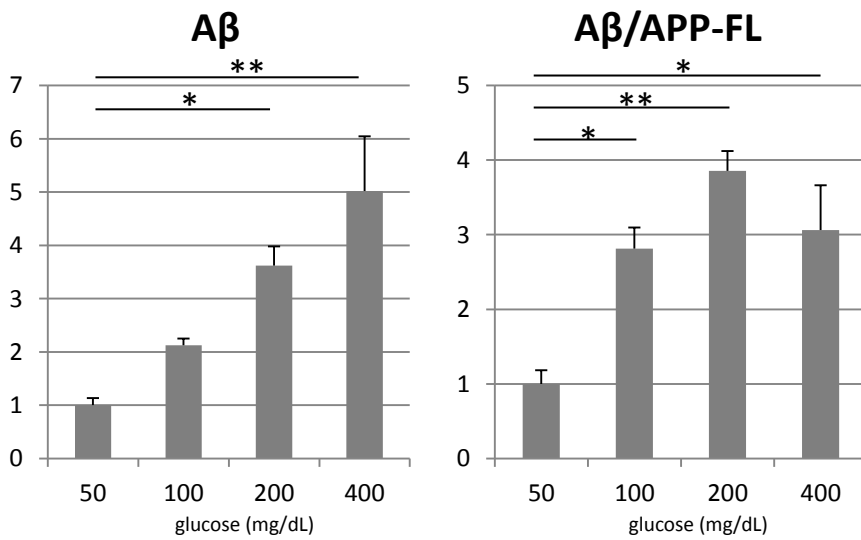
A)



B)

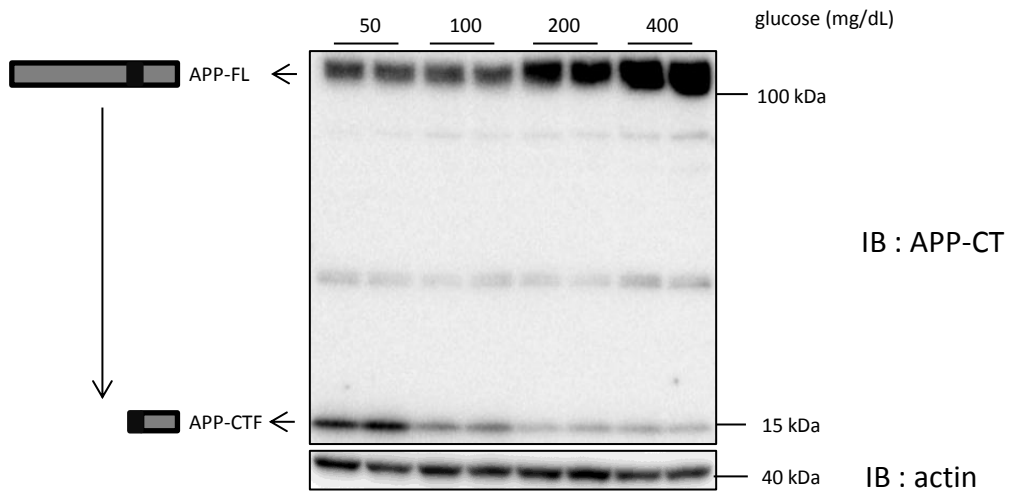


C)

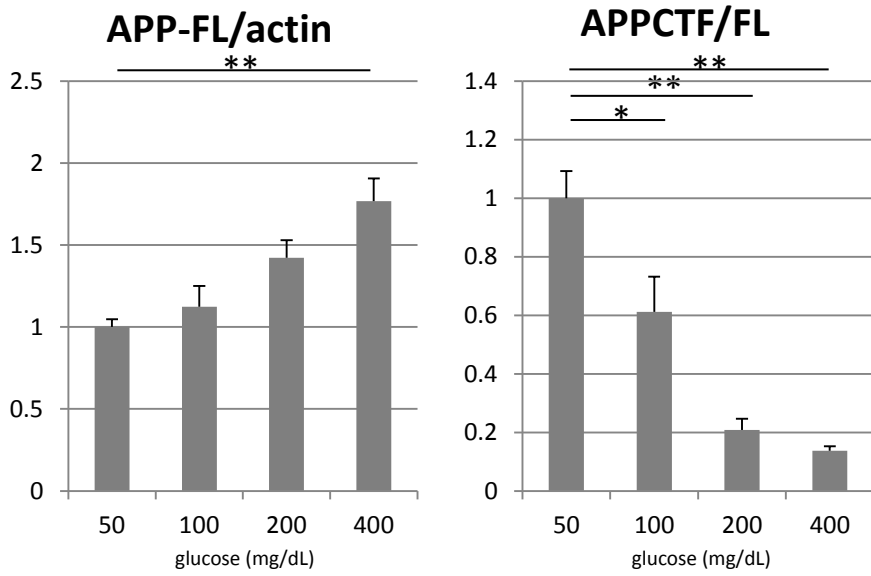


2

A)



B)



C)

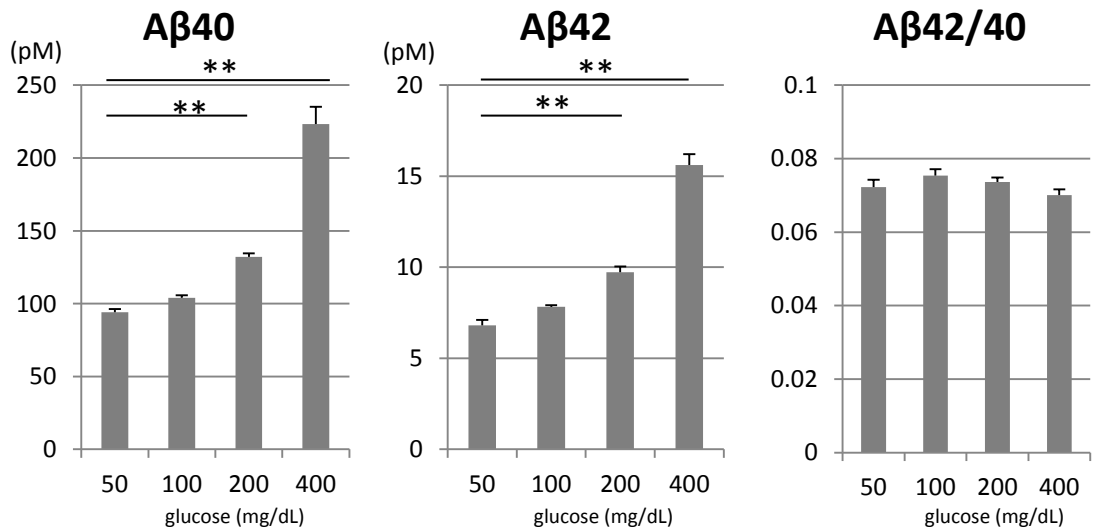


図3

