

## 2. Proteomic analysis

ヒトゲノムプロジェクトの終結により、すべてのヒト遺伝子が明らかになり、次の目標はすべての体内のタンパク質を明らかにすることに移った。mRNA 発現量の変化がそのままタンパク質の発現量の変化と相関しない場合も多く、その機能の多くは、リン酸化、糖付加、アセチル化などの翻訳後修飾によって司られており、実際に生体内で機能しているのはこれらのタンパク質であるため、タンパク質発現解析についてはプロテオミクス解析の重要性が改めて認識されてきており、近年、目覚しく発展を遂げている<sup>1,2)</sup>。ゲノミクスの成功により作成された莫大な遺伝子のデータベースと近年の MS spectrometric technology の進歩により、格段に早くタンパク質を同定できるようになりプロテオミクス研究の発展に拍車をかけている。しかしゲノミクスの成功を導いた核酸を増幅する技術、すなわち PCR に相当する技術がプロテオミクスに存在しない。その結果、プロテオミクスの発展が試料のタンパク質濃度と測定器の感度に限定されているといっても過言ではない。プロテオミクスによる解析技術はいまだ発展の途中であるが、試料中に存在する異常なタンパク質や、修飾されたタンパク質を直接解析する方法として非常に優れている。また、核酸の解析とは異なり、発現レベルの変化の解析以外にも翻訳後修飾の変化を解析することが可能であり、さまざまな視点からタンパク質を解析することができるため、細胞溶解液、血液、涙液、唾液、尿、髄液、関節液、乳汁といったさまざまな試料中タンパク質から種々のバイオマーカーの検索が行われている。

## 3. plasma analysis

プロテオミクスの技術により、血漿には 3000 種類を超えるタンパク質の存在が明らかになっている<sup>3)</sup>。血漿は、血液還流により全身諸臓器および病巣からのタンパク質を運搬している。血漿中には、各組織からのタンパク質の放出があり、そのタンパク質のプロファイリングから健常人と疾患群間での差異を捕らえることができる。サンプルとしての血漿は、比較的少ない侵襲で、治療の経過に応じて繰り返し入手できる長所もあり、バイオマーカーを探索するためにきわめてリーズナブルであると考えられる。しかし核酸と異なり、タンパク質は親水性や疎水性などの化学的な性質が多様であり、含まれて

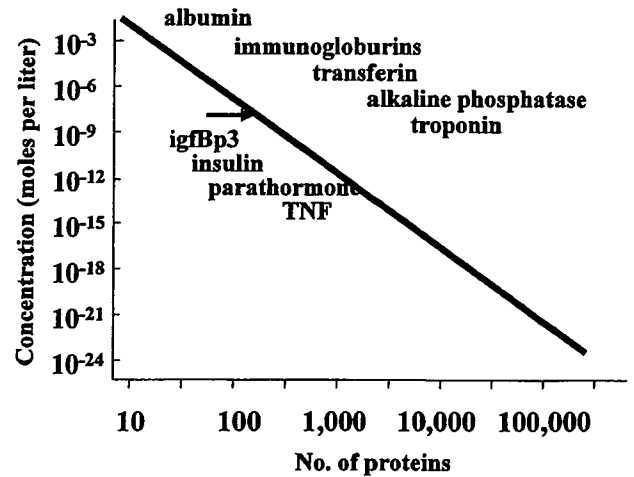


Fig. 1 血漿中に存在するタンパク質の濃度と種類  
→ SELDI-TOF MS による解析の検出限界を示す。

いるタンパク質のサイズも数千ダルトンから数百万ダルトンのものまで多種多様である。さらに  $10^{-10}$  M 未満の濃度が低いタンパク質から  $10^{-6}$  M 以上の濃度で血漿の大部分を占めるものまで含まれており解析を困難なものにしている ( $40 \text{ mg/ml}$  の濃度で存在しているアルブミンからわずかに  $1 \text{ ng/ml}$  で存在しているサイトカインまでさまざまである) (Fig. 1)。さらにこの低濃度領域には多くの種類のタンパク質が存在し、 $10^{-3} \sim 10^{-4}$  M には数十種類のタンパク質が存在するが、さらに低濃度になればなるほど存在するタンパク質の種類は増える (Fig. 1)。以下に説明する SELDI-TOF MS の測定感度は非常に良いとされながらも検出限界は  $10^{-8}$  M 程度であり、そのままでは血漿中の 10-20% 程度のタンパク質しか解析できず、アルブミンのような多量に存在するタンパク質の除去、等電点に応じた分画などの前処理が血漿のタンパク質解析には必要になる。

## 4. Plasma analysis of rheumatoid arthritis by SELDI

われわれは surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (以下 SELDI-TOF MS) を利用し RA 患者のインフリキシマブ投与前後の血漿を解析した。SELDI-TOF MS は表面化学を利用し、チップ上のタンパク質をイオン化し、質量分析器により分子量を測定する。測定した結果を Fig. 2 に示す。二つのピークが治療前後および健常人との比較により変化していた。

ProteinChip はタンパク質解析に適した様々な化学的性質 (陰イオン交換基、陽イオン交換基、逆相

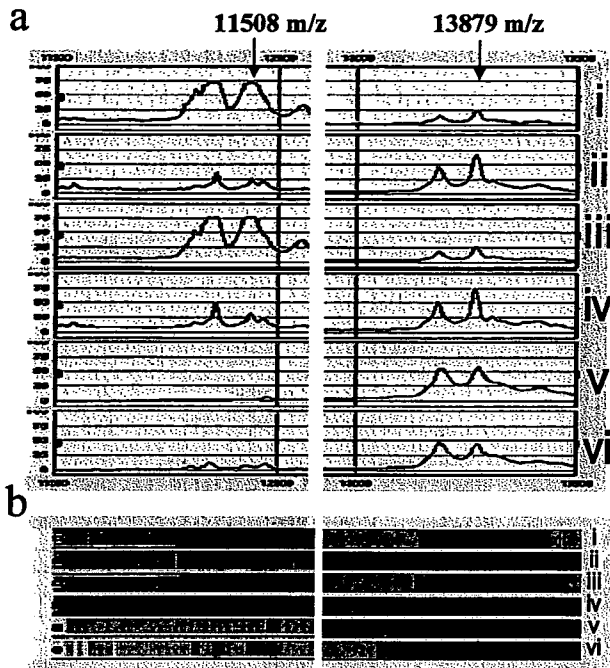


Fig. 2 SELDI-TOF MSによる関節リウマチ患者および健康人血漿の解析結果  
 a: trace image b: gel image  
 →で示す 11508 m/z および 13879 m/z に変化が見られた。  
 i: リウマチ患者 A 血漿治療前, ii: リウマチ患者 A 血漿治療後, iii: リウマチ患者 B 血漿治療前, iv: リウマチ患者 B 血漿治療後, v: 健康人 A, vi: 健康人 B

基, 順相基, 金属イオン固定基, 抗体, 受容体タンパク, DNA) を chip 表面上に持たせてあり, その化学的性質に親和性を持つタンパク質を特異的に補足, 濃縮することができる (Fig. 3a). chip 表面上に補足されたタンパク質は UV パルスレーザーを受け, イオン化し, 真空中を検知器に向かい飛行する. 分子量の大きいものほど飛行時間は長くなり, 飛行時間から分子量が算出される (飛行時間型質量分析) (Fig. 3b). 一度の解析で protein chip に捕捉された複数のタンパク質の質量電荷比を同時に測定することが可能であり, 多数のタンパク質の発現量および質量電荷比が, ピークとして検出され, さらにゲルのイメージに変換することもできる (Fig. 2b). 必要な検体はごく少量であり (p mol レベル), 血液, 尿, 髄液, 関節液, 涙液, 唾液, 乳汁といった臨床検体を直接利用でき, 解析に要する時間も短く臨床への応用がしやすい利点がある.

RA 患者血漿を対象とした我々の解析の結果, それらのピークは serum amyloid A (SAA) と Trans-thyretin (TTR) であることが, アミノ酸シーケンサーによる解析にて明らかになった. SAA の SELDI における測定値は, 生化学的検査における

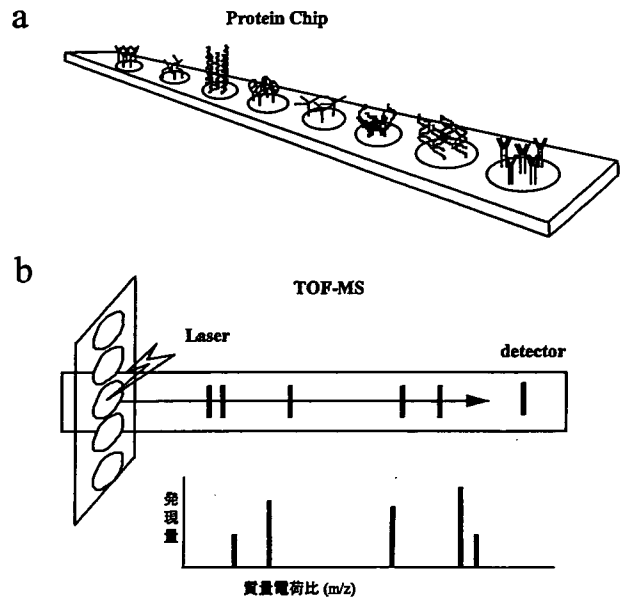


Fig. 3 protein chip および TOF MS の原理  
 a: イオン交換基, 逆, 順相基, 金属イオン固定基, 抗体, DNA 受容体タンパク, などが直径 2 mm のスポットに固定され, 親和性を持つタンパク質が濃縮, 捕捉される.  
 b: chip 表面上に補足されたタンパク質は UV パルスレーザーを受け, イオン化し, 真空中を検知器に向かい飛行する. 小さい分子ほど detector に早く到達する.

測定値と相関し (data not shown), CRP の生化学的検査における測定値とも相関した (Fig. 4). TTR においては, SELDI による測定のみが CRP に相関し (Fig. 3), TTR の生化学的検査における測定値は, 治療前後で一定の傾向を示さなかった (data not shown). 今回, われわれが行った proteomics による RA の血漿解析において見つかったバイオマーカー候補は, 既知のタンパク質ではあるが RA の状態を適切に反映しているものと考えられ, これらのマーカーもあわせて臨床診断することでより迅速かつ適切な疾患活動性の評価が行えるものとする.

SELDI-TOF MS によるバイオマーカー検索は非常に有効と考えられ, がんなど, 他の疾患領域においても, さかんに行われている. SELDI-TOF MS によって RA 患者血清を解析した報告としては, de Seny D らによる報告がある. 彼らは, RA の biomarker 候補として 5 つの peak を見出し, そのひとつが MRP-8 であったと報告している<sup>4)</sup>.

5. 二次元電気泳動 (TWO-DIMENSIONAL POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS: 2D-PAGE)

血漿のプロテオミクス解析に有効な手段として以

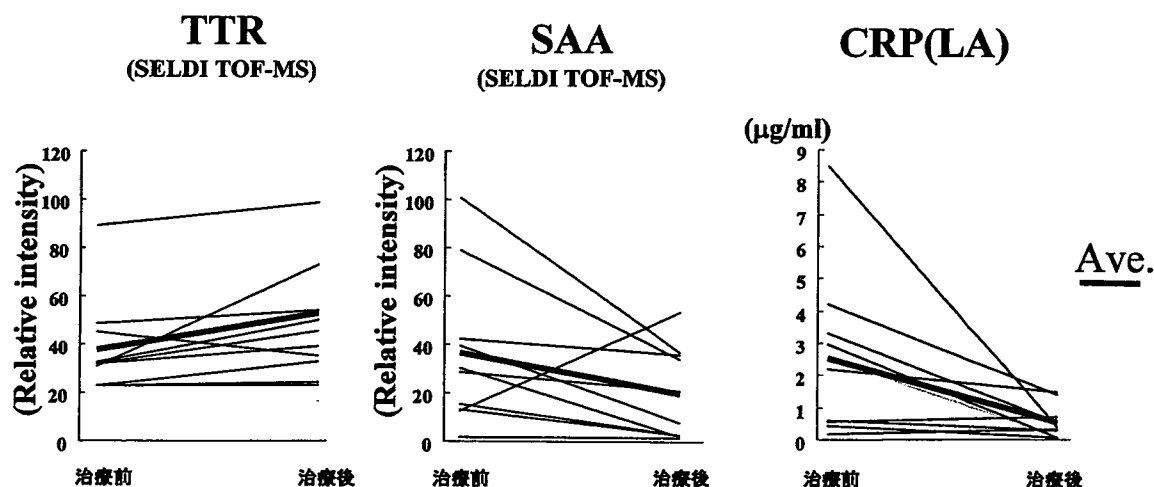


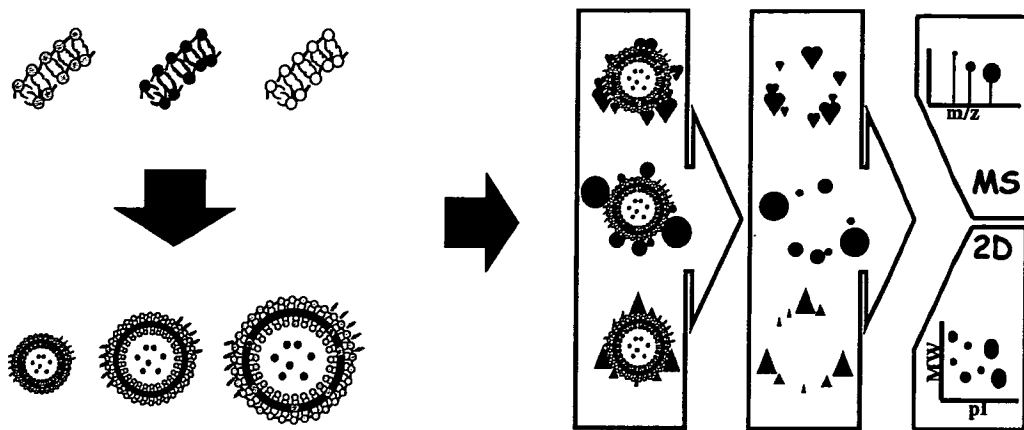
Fig. 4 関節リウマチ患者 10 名の治療前後の TTR および SAA の SELDI-TOF MS による測定値および Latex Agglutination 法による CRP 測定値の変化  
太線は平均値を示す。

前よりある技術である。原理は、タンパク質の等電点と分子量の違いにより二次元に分離する方法である。この二つのパラメーターは、相関しないため翻訳後修飾を受けたタンパク質を含め複雑な多くの種類のタンパク質混合物も効率的に分離できる。分離されたタンパク質は、銀染色やクマシーブルー染色などによって描出され、サンプル間で比較される。複数のゲル間における比較の際、データのばらつきや再現性に乏しいという問題を抱え、定量的なタンパク質発現解析手段としては実用的ではないとされていたが、現在では同一ゲル中に多重蛍光標識した複数のタンパク質サンプルを流すことが可能となり、これらの問題は解決されている。二次元電気泳動では、一度に数百ものタンパク質を描出することができ、切り出したスポットをゲル内消化し得られたペプチド混合物を質量分析することでタンパク質の同定が可能である。二次元電気泳動法により、RA のバイオマーカーを検索した報告としては、Takeuchi らによる報告がある。彼らは、二次元電気泳動法により、リウマチ患者血清中から、infiximab 投与前後で発現が変化する 50 もの spot を見出し、同定の結果、それらの中に、CRP, C3, Apo J, Apo A-I, RBP, transthyretin が含まれていたことを報告している<sup>5)</sup>。RA においては自己抗原の検索も盛んに行われており、Matsuo らは滑膜組織を抗原にし二次元電気泳動法をもちいて、患者血清中から自己抗体の対応抗原の検索を行っている。その結果、シトルリン化 F-actin capping protein alpha-1 subunit (CapZ $\alpha$ -1 などの自己抗原の同定に成功し

ている<sup>6)</sup>。

## 6. Liposome

われわれは、今後血漿中のタンパク質群からバイオマーカーを検索するにあたり、いかに機能的に重要な分子を濃縮収集してることが重要と考え、リポソームをバイオプローブとして使用する方法を考案した。リポソームは生体膜上で起こる種々の現象をモデル的に引き起こすために作成された人工生体膜である<sup>7)</sup>。われわれは、リポソームが提供する膜構造のタンパク質への親和性をもちいた網羅的なタンパク質の解析の可能性を検討し、血漿タンパク質の解析を通じてバイオマーカー探索への応用の可能性を検討した<sup>8)</sup> (Fig. 5)。本法では  $Ca^{2+}$  依存的にリポソームに結合するタンパク質群を濃縮収集する方法である。 $Ca^{2+}$  は神経伝達物質の分泌に大きく関わり細胞の分化、増殖などの重要な因子である。しかし種々の病態で認められる持続的な  $Ca^{2+}$  濃度の上昇は酵素等の異常活性化により細胞障害を引き起こしうる。関節リウマチで特異的に出現する抗 CCP 抗体の対応抗原にシトルリン化タンパク質があるが、このシトルリン化を引き起こすペプチジルアルギニン・デイミナーゼ (PAD) は  $Ca^{2+}$  による活性化機構が明らかになっている<sup>9)</sup>。障害された細胞が何らかのタンパク質分泌を起こす可能性があり、そのタンパク質の中に血液中にまで運ばれるものが存在すれば、病態マーカーとなりうる<sup>10)</sup>。血液中には約 2 mM の高い  $Ca^{2+}$  が存在しているため、リポタンパク質や細胞膜と結合している可能性があ



リポソームの作製

リポソーム結合タンパク質の定量分析

Fig. 5 リポソームによるバイオマーカー検索の strategy 模式図

リポソームの作製：リン脂質 (egg PC ; Phosphatidyl Choline, PS ; Phosphatidyl Serine) はクロロホルム/メタノール (2 : 1) に溶解し (10 mg/ml), 必要量の PC と PS を 9 : 1 に混ぜ, N<sub>2</sub> (gas) で乾固. 細胞膜に存在する酸性リン脂質 (PS) の含量が約 10% であり, リポソームの組成は 10% PS と残りは主要な中性脂質である PC とした.

リポソーム結合タンパク質の定量分析：定量分析の手段として SELDI-TOF MS のほか二次元電気泳動等の解析方法が利用できる

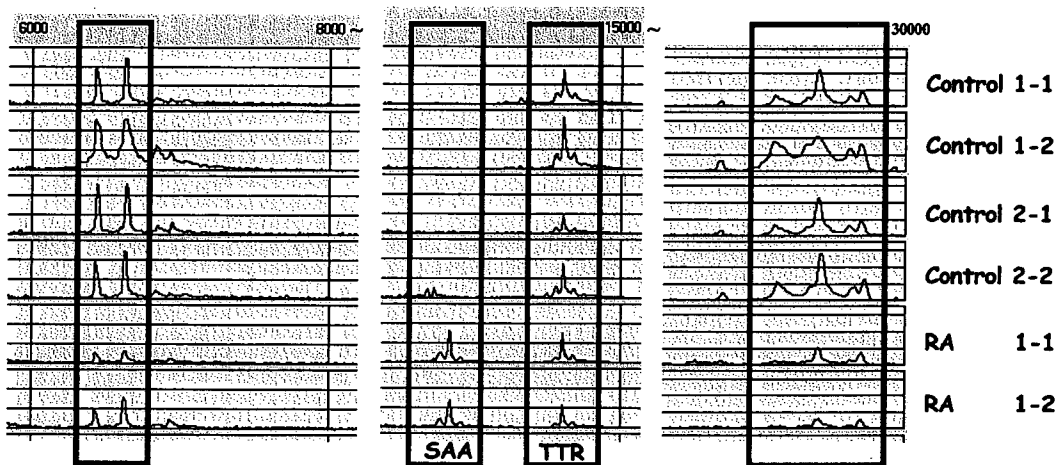


Fig. 6 リポソーム結合タンパク質の SELDI-TOF MS による解析

健康人二名とリウマチ患者治療前一名の血漿からリポソーム結合タンパク質を分離し, SELDI-TOF MS により解析した. (duplicate)

る。われわれは, Ca<sup>2+</sup> 依存的にリン脂質と相互作用する血漿タンパク質に注目し, 実際に RA 患者血漿中の Ca<sup>2+</sup> 依存的 Liposome 結合タンパク質を SELDI-TOF MS により解析した結果 (Fig. 6), 上記の SAA, TTR のほかにも, 健康人と比して発現が増加している peak の存在が明らかになり, 現在同定中である。

7. おわりに

血漿のプロテオミクス解析についてわれわれの研究結果も交え述べた。血漿中にはいまだ解析されていない未知の低濃度領域が存在し, 質量分析技術の

発展は道の領域の解析を可能にしようとしている。今後プロテオミクスがさらに発展し新たな診断マーカーや治療標的分子の同定がなされることが期待される。

文 献

- 1) Griffin, T. J., et al. : Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics*, 1 : 323-333, 2002.
- 2) Chen, G., et al. : Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas.

- Mol Cell Proteomics*, 1 : 304–313, 2002.
- 3) Omenn GS, et al. : Overview of the HUPO Plasma Proteome Project : results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics*. 5(13) : 3226–3245, 2005.
  - 4) de Seny D, et al. : Discovery of new rheumatoid arthritis biomarkers using the surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ProteinChip approach. *Arthritis Rheum*. 52(12) : 3801–3812, 2005.
  - 5) Takeuchi T, et al. : Serum protein profile of rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy (infliximab). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. Feb 24, 2007.
  - 6) Matsuo K, et al. : Identification of novel citrullinated autoantigens of synovium in rheumatoid arthritis using a proteomic approach. *Arthritis Res Ther*. 8(6) : R175, 2006.
  - 7) Torchilin, V.P, et al. : , Oxford University Press, Preparation of liposomes in Liposomes, second edition, A practical approach, pp3–29, 2003.
  - 8) 木村成寿, ほか : リポソームをリガンドとして用いた血漿蛋白質のプロテオミクス解析. *生物物理化学* 50 : 231–236, 2006.
  - 9) Arita K, et al. : Structural basis for Ca(2+)-induced activation of human PAD4. *Nat Struct Mol Biol*. 11(8) : 777–783, 2004.
  - 10) Trump BF, Berezsky IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J*. 9(2) : 219–228, 1995.

# Elevation of Plasma Level of Annexin A5 in Alzheimer's Disease

H. Sohma<sup>1</sup>, K. Matsumoto<sup>2</sup>, H. Honda<sup>3</sup>, Y. Mizue<sup>4</sup>, M. Momma<sup>5</sup>,  
M. Yamaguchi<sup>1</sup>, Y. Amano<sup>3</sup>, K. Kikuchi<sup>4</sup>, S. Murakami<sup>6</sup>, T. Maeda<sup>7</sup>,  
S. Toyomasu<sup>7</sup>, T. Saito<sup>8</sup> and Y. Kokai<sup>1</sup>

*Departments of <sup>1</sup>Biomedical Engineering and <sup>8</sup>Neuropsychiatry, Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo, Japan; <sup>2</sup>Japan Clinical Laboratories, Inc., Kyoto, Japan, <sup>3</sup>Sanyo Chemical Industries, Ltd., Kyoto JAPAN, <sup>4</sup>Sapporo Immuno Diagnostic Laboratory, Inc., Sapporo JAPAN, <sup>5</sup>Kushiro Kita Hospital, Kushiro JAPAN; <sup>6</sup>Departments of <sup>6</sup>Nursing and <sup>7</sup>Occupational Therapy, Sapporo Medical University, School of Health Sciences Sapporo, Japan*

## Abstract

In this study we aimed to investigate plasma molecular markers for Alzheimer's disease (AD). Secreted proteins from culture cells (rat glioma C6 cells) induced by Ca<sup>2+</sup>-damage with A23187 was fractionated as the lipid liposome (PC:PS=9:1) binding fraction. After 2D-gel, tryptic digestion and LC-MS/MS analysis, it was found that the fraction involved annexin A2, fetuin, annexin A5, and SLUG. As annexin A2 is highly expressed in blood cells, we focused on annexin A5 in human plasma. The level of plasma annexin A5 was  $3.92 \pm 2.08$  ng/ml (N=47) and  $2.92 \pm 1.29$  ng/ml (N=19) in AD and vascular dementia patients, respectively, which is significantly higher than that in control was  $0.87 \pm 0.21$  ng/ml (N=35). As the blood-brain barrier strictly limits transport into the brain through both physical (tight junctions) and metabolic (enzymes) barriers and relatively hydrophobic materials tends to go through the barrier to vasculature, annexin A5 may be a novel plasma molecular marker for dementia and especially AD. *Keywords:* Ca<sup>2+</sup>-stress, cytotoxicity, annexin A5, dementia, Alzheimer's disease, sandwich ELISA

## Introduction

Alzheimer's disease (AD) is characterized by a progressive decrease in cognitive functions. The morphological change of the brain in AD is due to neuronal cell apoptosis caused by functional disorder of mitochondria and

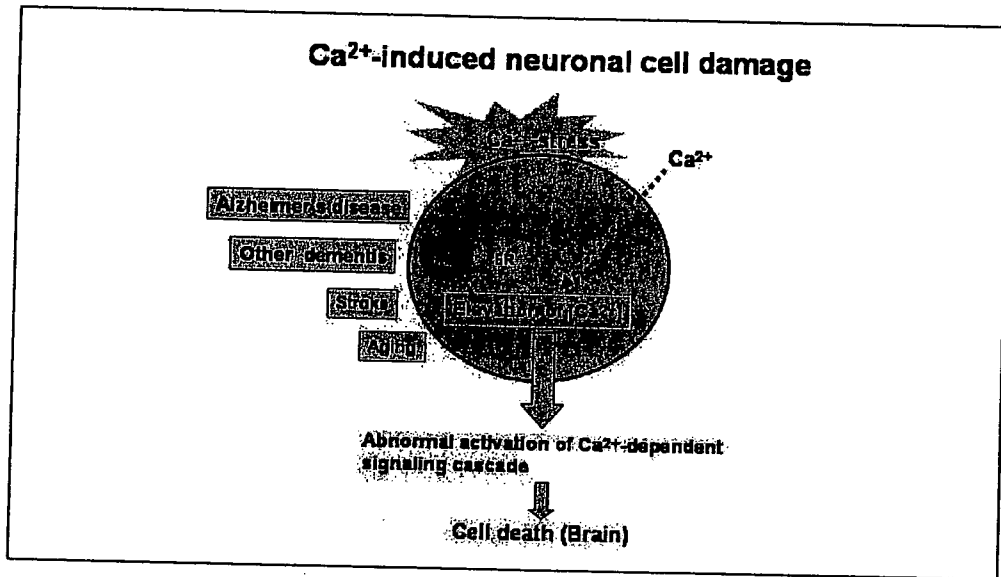


Fig. 1. Schematic illustration of Ca<sup>2+</sup>-induced cell damage in AD.

microsomes. Stress-induced cell damage is a crucial problem in the brain in AD (Mattson, 2004). Amyloid- $\beta$ -protein ( $A\beta$ ), which is an unexpected proteolytic product of amyloid precursor protein (APP), accumulates in the brains of AD patients. This is thought to be the toxic principle of the neural cell death (Mattson, 2004). It has been demonstrated that the amyloid-dependent neurotoxicity involves perturbation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis in neuronal cells (LaFerla, 2002) (Fig. 1).  $A\beta$  may impair membrane Ca<sup>2+</sup> pumps and enhance Ca<sup>2+</sup> influx through voltage-dependent channels and ionotropic glutamate receptors. In addition, Tau, which is thought to have a role in filament stabilization, has been shown to aggregate to form filaments in neurons. These cells were shown to have high Ca<sup>2+</sup> content, leading to the hyperactivation of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases and protein kinases in the postmortem brains from AD patients (Dickson, 2004; Saito et al., 1993). Thus,  $A\beta$  and Tau in CSF have been focused on as molecular markers for AD. In this study, we examined specific molecular markers in patients' blood plasma which might represent neuronal cell damage. For that purpose, we first performed in vitro study using culture cells: we analyzed proteins secreted as a result of Ca<sup>2+</sup>-stress, and then explored plasma marker for AD.

## Materials and Methods

**Materials** Reagents were purchased from the following sources: ampholyte, molecular weight standards and Protein A-Sepharose 4B, Amersham Bioscience co. (Buckinghamshire, UK); cell proliferation kit II (LDH assay) from Roche Molecular Biochemicals (Indianapolis, IN, USA); EzStain Silver (silver staining

kit), ATTO corporation (Tokyo, Japan).

**Cell Culture** Rat glioma C6 cells (JCRB9096) and human neuroblastoma SH-SY5Y cells (CRL-2266) were obtained from the Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan) and American Type Culture Collection (Manassas, VA, U.S.A.), respectively. Cells were maintained in continuous log phase growth in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), containing 10% fetal calf serum at 37°C in a humidified incubator containing 95 % air-5 % CO<sub>2</sub> atmosphere.

**Cytotoxicity assay** To evaluate the degree of cytotoxicity, the LDH activity of the medium was measured using a commercially available kit (Cytotoxicity Detection kit (LDH), Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA). Briefly, 1x10<sup>5</sup> cells were plated in a 24-well culture dish and cultured for 24h and the culture medium was replaced with serum-free DMEM and incubated for 0.5-1h at 37°C. Then, Ca<sup>2+</sup> ionophore (A23187) was added to the culture media and incubated for the indicated times at 37°C. After treatment, the culture medium (0.4 ml) was withdrawn and mixed with 0.2ml of substrate for LDH assay. After incubation for 30min, the reaction was stopped with 0.08ml of 2M HCl, and A<sub>492</sub> was measured. The percent cytotoxicity was calculated using the maximum amount of releasable LDH activity by 1% Triton X-100 treatment according to the instruction manual.

**Identification of secreted proteins from culture cells** C6 cells were cultured in a 10cm-culture dish. After incubation with A23187 (0.19µM) for 24h, 5mM EGTA was added to culture sup and the sup (10ml) was collected. It was then mixed with lipid liposome (PC:PS=9:1) (100µg) and CaCl<sub>2</sub> (15mM) was added. The liposome was washed three times with 20mM Hepes (pH7.5), 0.1M NaCl and 2mM CaCl<sub>2</sub> by suspension and sedimentation with 20,000xg for 15min. Finally binding proteins were eluted with 10mM EGTA and subjected to 2D-gel. Each protein spot was hollowed and digested with porcine trypsin, and the trypsin-induced peptide fragments were extracted with formic acid and acetonitrile. The peptide mixture was analyzed with nanoscale LC-MS/MS (LCQ) and data base searching was done with Mascot Search.

**Human blood plasma** Human blood samples were obtained from 66 patients with dementia (47 with Alzheimer's disease (86.2±2.5 y.o.) and 19 (79.6±8.7 y.o.) with vascular dementia) and 35 controls (74.0 ± 5.8 y.o.). All patients met ICD-10 criteria for either Alzheimer's disease or vascular dementia. The patient's clinical symptoms were evaluated using the revised Hasegawa Dementia scale (HDS-R) (Hasegawa, 1983). Blood was drawn with Venoject II vacuum tubes containing EDTA (final 4mM) (Terumo, Tokyo, Japan) and plasma fraction was isolated by centrifugation at 3,000 g for 20 min. Blood was centrifuged within 3 h after sampling. Plasma fraction was centrifuged again at 3,000 g for 15 min and stored at -80°C until use.

**Western blot to detect plasma annexin A5** In order to detect plasma annexin A5, lipid binding proteins were first isolated according to the procedures for recombinant annexin purification (Sohma et al., 2001a). Briefly, 1 ml of plasma was diluted with 9 ml of 10 mM phosphate buffered saline (PBS) and mixed with 100µg of multi-lamellar lipid liposome (phosphatidylcholine : phosphatidylserine=9:1). One mM CaCl<sub>2</sub> was added to the mixture and centrifuged



at 25,000xg for 30 min. The pellet was suspended with 5 ml of 20mM HEPES (pH7.0), 0.1M NaCl<sub>2</sub> and 1mM CaCl<sub>2</sub>, and centrifuged again at 25,000xg for 15 min. The pellet was dissolved with SDS sample buffer (3% SDS and 50mM Tris-HCl (pH6.8)) and 10µl was subjected to polyacrylamide SDS-PAGE. The following procedures were the same as those for Western blotting described above.

*Quantification of plasma level of annexin A5 using sandwich ELISA* For quantification of the plasma level of annexin A5, sandwich ELISA was performed with monoclonal antibodies (MAbs) to native annexin A5 from human placenta (Romisch and Heimburger, 1990). Microtiter plates (Maxisorp, NUNC) were coated with 100µl of MAb clone No. 23 (5µg/ml), blocked with 0.1% BSA and then 50µl of 5µg/ml biotinylated-MAb clone No. 49 and 50µl of sample or standard (recombinant human annexin A5) was added to each well. After incubation and washing, 50µl of HRP-conjugated anti-annexin A5 antibody was added to each well. After incubation and washing, avidin-conjugated horseradish peroxidase (#438323 1: 2000; Zymed) was added to each well. After washing, 100µl of 3,3',5,5'-Tetramethyl Benzidine (TMB+) (DAKO, Japan) was added and incubated. The reaction was terminated with 100µl of 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0.5M HCl. Both A<sub>450</sub> and A<sub>630</sub> were measured (A<sub>630</sub> was subtracted). The detection range with this system was 0.32ng/ml - 20ng/ml.

*Antibodies* Polyclonal antibody against recombinant rat annexin A5 was prepared from rabbits. A specific antibody was prepared with a rat annexin A5-conjugated Sepharose 4B column.

## Results

We examined Ca<sup>2+</sup>-induced cytotoxicity by measuring LDH activity in culture media using rat glioma C6 cells and human neuroblastoma SH-SY5Y. Cells were incubated with various concentration of Ca<sup>2+</sup>-ionophore (A23187) for 24h. Cell viability was comparable with control with 0.19µM or less of A23187 in both SH-SY5Y and C6 cells, but decreased with 0.38µM or higher concentration of A23187 (Fig 2). To exclude leakage of intracellular ingredients from dead cells, we conducted 24h incubation with 0.19µM of A23187. We next examined the proteins secreted from culture cells following Ca<sup>2+</sup>-stress, which might involve a molecular marker for dementia. As the blood-brain barrier strictly limits transport into the brain through both physical (tight junctions) and metabolic (enzymes) barriers and relatively hydrophobic materials tends to go through the barrier, we isolated the lipid liposome binding proteins from the culture media. SDS-PAGE patterns of the fractions revealed that more protein bands were observed on the SDS-gel in the fraction after A23187-treatment compared with untreated control (Fig. 3A). The sample of A23187-treatment was next subjected to 2D gel ((Fig. 3B). Each protein spot was next incubated with trypsin and identification of each protein was done with LC-MS/MS. From the Mascot search they were shown to be annexin A2, fetuin, annexin A5 and SLUG (Fig. 3C). Several lines of evidence showed that annexin A5 can be secreted in spite of the fact that it has no signal sequence (Christmas et al., 1991; Pfäffle et al., 1988; Sohma et al., 2001b).

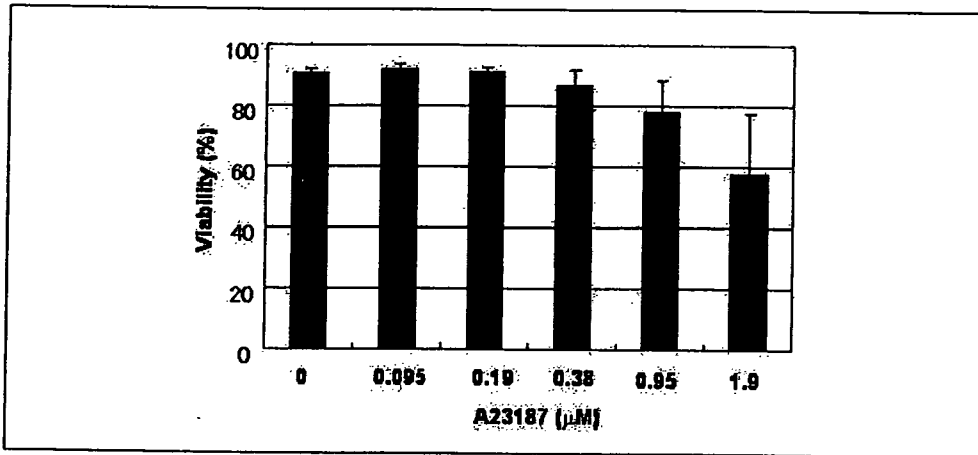


Fig. 2.  $Ca^{2+}$ -induced cell damage in culture cells. Cell viability (rat glioma C6 cells) was measured by LDH assay (see "Materials and Methods") after incubation with various concentration of A23187 for 24h. Data represent mean  $\pm$  S.D. of three experiments. \*, significant difference when compared with untreated control ( $P < 0.05$ ).

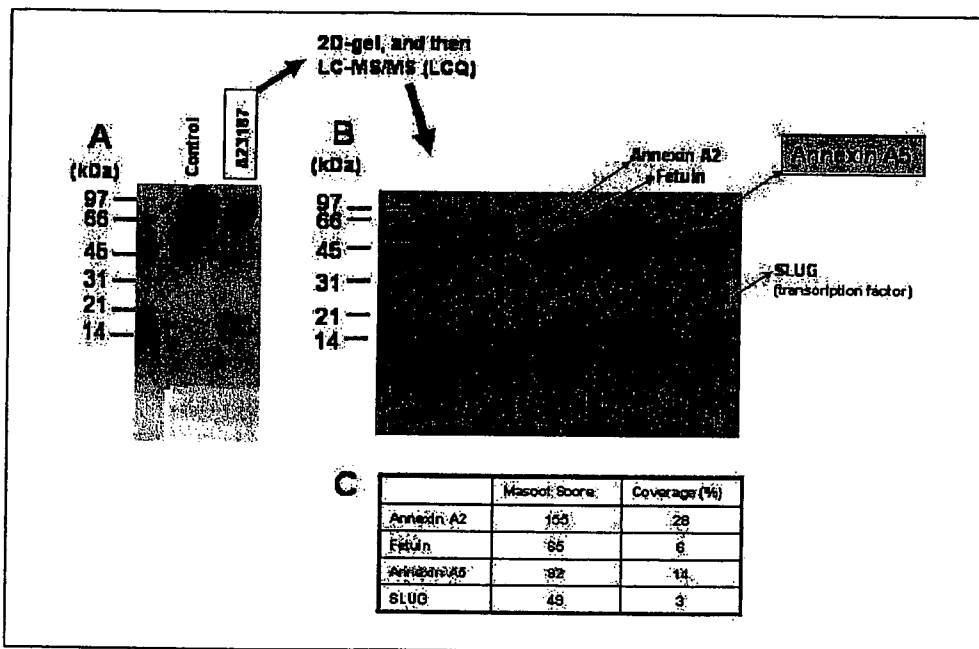


Fig. 3. Identification of proteins secreted from C6 cells by  $Ca^{2+}$ -stress. Culture medium of C6 cells after incubation with or with A23187 was collected and after incubation with 0.19  $\mu$ M of A23187 for 24h, culture media were collected. Phospholipid binding fractions (see "Materials and Methods") were subjected to SDS-PAGE (15% gel) (A). The A23187-treatment sample was subjected to 2D-gel and stained with silver nitrate (B). Protein identification of each spot was done as described in "Materials and Methods". Mascot scores are shown (C).

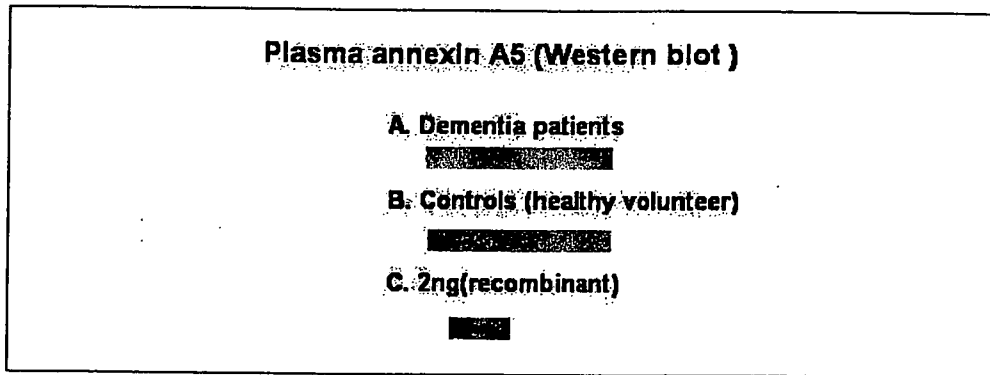


Fig. 4. Plasma annexin A5 in Alzheimer's disease patients (Western blot). Lipid liposome binding fraction of blood plasma from either dementia patients (A) or healthy volunteers (B) was subjected to SDS-PAGE and Western blot was performed with polyclonal specific antibodies to annexins A5. Blot with 2ng recombinant annexin A5 is shown in (C).

These results led us to speculate that annexin A5 might be secreted in pathological states of suffering from  $Ca^{2+}$ -stress such as in dementia.

We next performed Western blot analysis to identify annexin A5 in blood plasma. As a good deal of plasma proteins such as albumin and globulin interfere with separation of smaller amount of protein contents on SDS-PAGE, to concentrate annexin proteins in the blood we isolated  $Ca^{2+}$ -dependent lipid liposome binding fraction. With this fraction an immunostained band with anti-annexin A5 IgG with a molecular mass of 33kDa was detected in the samples from AD patients but not in control (Fig. 4), suggesting that AD patients possess a high level of annexin A5 in the blood. To quantify the plasma level of annexin A5, we established sandwich ELISA with two different clones of monoclonal antibodies. The plasma level of annexin A5 was significantly

Table 1. Plasma level of annexin A5 in Alzheimer's disease patients (sandwich ELISA). Plasma level of annexin A5 was measured with sandwich ELISA with two clones of monoclonal antibodies to human annexin A5 (see "Materials and Methods"). Data represent mean  $\pm$  SD. B, Plasma level of human samples. AD, Alzheimer's disease patients; VD, vascular dementia patients; C, control (healthy volunteers). \*, significant difference when compared with control ( $P < 0.01$ ).

Subject	No. of subject	Age (y.o. $\pm$ SD)	Plasma annexin A5 (ng/ml $\pm$ SD)
Control	35	74.0 $\pm$ 5.8	0.87 $\pm$ 0.21
AD	47	88.2 $\pm$ 2.5	3.57 $\pm$ 2.49
VD	19	78.6 $\pm$ 8.7	2.69 $\pm$ 2.27

higher in the AD patients compared with controls (Table 1). The level was also higher in the vascular dementia patients compared with controls (Table 1). The level was higher in the AD patients compared with in the vascular dementia patients, but not significantly. Further study with a great number of samples is needed to clarify whether the difference is significant or not. Next, to examine if there is any relation between plasma level of annexin A5 and the pathological stage of dementia, we examined the relation between plasma annexin A5 concentrations and HDS-R scores. There was a tendency toward an increasing plasma level of annexin A5 with a decreasing score of HDS-R (data not shown). Further study is needed to clarify this matter.

## Conclusions

In this study we demonstrated that annexin A5 is elevated due to  $Ca^{2+}$ -stress in culture cells and is secreted and that the plasma level of annexin A5 in dementia patients was significantly higher than in controls.

## References

- Christmas, P., Callaway, J., Fallon, J., Jones, J. and Haigler, H. T. Selective secretion of annexin I, a protein without a signal sequence, by the human prostate gland. *J. Biol. Chem.* 266, 2499-2507 (1991).
- Dickson, D. W. Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? *J. Clin. Invest.* 114, 23-27 (2004).
- Hasegawa, K. The clinical assessment of dementia in the aged: a dementia screening scale for grading the cognitive state of patients for clinician. In *Aging in the Eighties and Beyond*, (ed. M. e. a. Bergener), pp. 207-218. New York: Springer (1983).
- LaFerla, F. M. Calcium Dyshomeostasis and Intracellular Signalling in Alzheimer's Disease. *Nature rev. Neurosci.* 3, 862-872 (2002).
- Mattson, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430, 631-639 (2004).
- Pfäffle, M., Ruggiero, F., Hofmann, H., Fernández, M. P., Selmin, O., Yamada, Y., Garrone, R. and von der Mark, K. Biosynthesis, secretion and extracellular localization of anchorin CII, a collagen-binding protein of the calpactin family. *EMBO J.* 7, 2335-2342 (1988).
- Romisch, J. and Heimburger, N. Purification and characterization of six annexins from human placenta. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371, 383-388 (1990).
- Saito, K., Elce, J. S., Hamos, J. E. and Nixon, R. A. Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: A potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2628-2632 (1993).
- Sohma, H., Creutz, C. E., Gasa, S., Ohkawa, H., Akino, T. and Kuroki, Y. Differential lipid specificities of the repeated domains of annexin IV. *Biochim. Biophys. Acta* 1546, 205-215 (2001a).
- Sohma, H., Ohkawa, H., Akino, T. and Kuroki, Y. Binding of annexins to lung lamellar bodies and the PMA-stimulated secretion of annexin V from alveolar type II cells. *J. Biochem.* 130, 449-455 (2001b).