

## プロテオミクスアプローチによる血漿バイオマーカーの 同定と臨床応用

今井伸一<sup>1)</sup>, 木村成寿<sup>1)</sup>, 松本圭代<sup>1)</sup>, 相馬 仁<sup>1, 2)</sup>, 小海康夫<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 札幌医科大学医学部分子機能解析部門

<sup>2)</sup> 札幌医科大学医療人育成センター教育開発研究部門

Identification by proteomic approach and clinical application of plasma biomarker.

Shin-ichi IMAI<sup>1)</sup>, Michitoshi KIMURA<sup>1)</sup>, Kayo MATSUMOTO<sup>1)</sup>,  
Hitoshi SOHMA<sup>1, 2)</sup>, Yasuo KOKAI<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Biomedical Engineering, Sapporo Medical University School of Medicine

<sup>2)</sup> Department of Educational Development, Sapporo Medical University Center for Medical Education

### ABSTRACT

A biomarker for a disease, which also called “pathologic marker”, is a biological substance for understanding quantitatively and objectively pathologic change of the disease. The pathologic marker is useful for a diagnosis and assessment of therapeutic effect of the disease. We study an identification of a biomarker for some diseases by proteomic approach using pathologic model system, bioprobe and mass spectrometer, and clinical application of its marker. Annexin A5, which was found in culture supernatant of amyloid  $\beta$  peptide-stimulated neuronal cells by proteomic approach, is a potential molecular candidate for the diagnosis of Alzheimer’s disease. Global expression profile of nerve injury also indicated an important protein profile during nerve regeneration. CCL8, which was found in plasma of an acute graft-versus-host disease (aGVHD)-model mouse, is a promising specific marker for aGVHD.

(Accepted August 10, 2009)

**Key words:** Biomarker, Proteomic approach, Alzheimer’s disease, Nerve injury, Acute graft-versus-host disease

### 1 イントロダクション

#### 1.1 バイオマーカーとは

バイオマーカーとは、生体内の生物学的変化を定量的に把握するための指標となるものを指す。血液や尿等に含まれる生体由来の物質で“疾患”に対するバイオマーカー（病態マーカー）は、病態の変化を客観的かつ定量的に捉えるための因子である。

バイオマーカーに求められる事として、1) 発症前に少なく、2) 病勢を反映し、3) 治療に反応することがある（図1）。この変動を測定する事により、病態の変化を客観的に捉えることになる。医学が発達した現在でも診断や治療効果の判定が困難（侵襲性が高い、検査が大変、専門医の不足など）な疾患や、客観的な指標がないために医師の経験や主観に基づいて診断や治療が行われている疾患は少なくない。このような疾患において、バイオマーカーの同定は医師、患者双方にとって有益である。さらに、同定したバイオマーカーを指標として、病態メカニズムの更なる解明や治療

法、治療薬の開発への応用も期待できる。また、バイオマーカーをどの臓器、組織、体液から検出するかも重要な課題である。なかでも血液の採取は容易で低侵襲であり、患者の肉体的、精神的負担も低いと考えられることから、血液からの検出が理想的である。そのようなマーカーは診断や治療のためだけでなく、健康診断等に検査することが容易になることから、社会（環境）の中での、その疾患の有様を把握することも可能になる。

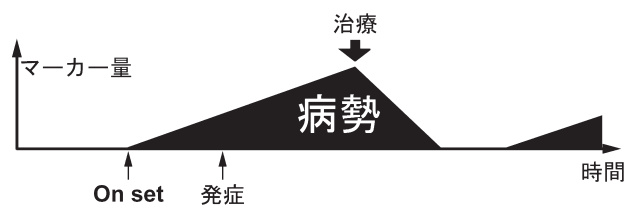


図1 バイオマーカーとは？

## 1・2 プロテオミクスアプローチ

バイオマーカー（疾患に対するもの以外も含む）にはタンパク質やDNA、糖、コレステロールなど様々な生体物質がある。その中でも当研究室ではタンパク質をターゲットとして、質量分析装置を用いた研究を行っている。これは、タンパク質が生体において生理機能をつかさどっている実態だからである。例えば、DNA マイクロアレイ（DNA チップ）は同時に多種類の遺伝子の発現量の比較が可能であることから、健常者と患者との間で発現の異なる遺伝子をバイオマーカーとして検出するためにも用いられる。しかし、ここで検出しているのはそれぞれの遺伝子の mRNA の量の変化であり、この変化は必ずしもその翻訳産物であるタンパク質の量の変化とは一致しないことが報告されている<sup>1)</sup>。また、タンパク質の質的な変化（翻訳後修飾等）を捉えることはDNA マイクロアレイでは当然不可能である。タンパク質の量あるいは質が変化しなければ、その生理機能も変化しないと考えられることから、DNA マイクロアレイによる検出では不十分と考えられる。

プロテオミクスとは翻訳後修飾を含むタンパク質を直接解析・同定することである。質量分析装置はプロテオミクスアプローチに必須の装置であり、近年急速に進化してきた。これは、装置自体の性能(感度や精度)が高くなったことに加えて、コンピュータの能力の進化やタンパク質のデータベースの完成度と密接に関係している。質量分析は得られたデータをもとにタンパク質のデータベースを検索し、そのデータと一致するアミノ酸配列（翻訳後修飾を含む）を同定する。そして同定された複数のアミノ酸配列の組み合わせにより、タンパク質を同定する。この同定には当然コンピュータが使われ、コンピュータの能力が高ければそれだけ早く正確にデータを処理できるのである。また、2001年にヒトのゲノム配列のドラフトが発表されて以来、そこから予想されるタンパク質によりタンパク質データベースが一気に拡充した。こうしてデータベースの完成度が上がったことにより、タンパク質の同定も容易になったのである。このような一連の質量分析技術の進化によりプロテオミクスアプローチによるバイオマーカーの探索が発展したと考えられる。

## 2 バイオマーカーの探索

バイオマーカーの探索は検出感度の高い質量分析装置を用いてタンパク質を検出し、検出したタンパク質の量的な比較検討を行う。通常、臨床サンプルは多くの因子が関与しており、目的とする疾患についてのみを比較解析するのは非常に困難である。そのため、バイオマーカーを探索するに当たって、実験動物や培養細胞を用いた病態モデルの作製は有意義である。バイオマーカーの探索では、疾患の特徴を整理し、その疾患に対するバイオマーカーとして満たすべき条件を設定し、簡潔な病態モデルを用いて条件と一致する候補タンパク質を検出する。例えば、急性移植片対宿主病(aGVHD)に対するバイオマーカーの探索では、マウスモ

デルを用い、満たすべき4つの条件、1) 感度特異度ともに100%の分子である、2) 病気の発症と進行に相関する、3) 治療に反応する、4) 重篤度と相関する、を挙げ、検討を行った結果、CCL8を単離することができた<sup>2)</sup> (後述4.2)。

## 2・1 質量分析装置を用いたバイオマーカー候補の検証

精度の高いバイオマーカーを検出するため、定量解析によりバイオマーカー候補の真正性を検討する。近年、質量分析装置の発展はめざましく、検出感度はわずか数年で $10^{12}$  から  $10^{18}$ mol に達した<sup>3)</sup>。質量分析装置を用いたペプチドの定量性も高まり、とくに最近では、あらかじめ設定 (Precursor ion m/z ならびに Product ion m/z) したペプチドのみを検出定量する Multiple Reaction Monitoring (MRM) が行われるようになり、バイオマーカー候補の定量が容易になった<sup>4,5)</sup>。下記に、当研究室で行っている質量分析装置を用いたバイオマーカー候補の真正性検証のステップを示す。

### Screening

実験動物の血漿や細胞培養上清などの病態モデルサンプルを少数用い、網羅的な定量解析を行う。網羅的な定量解析方法として、プロテオーム比較によるタンパク質発現有無や、検出されたペプチドの数をもとに算出する emPAI (Exponentially Modified Protein Abundance Index) などの半定量<sup>6)</sup>、ペプチドを三次元に (液体クロマトグラフィー溶出時間、質量電荷比、ピーク強度) 展開した Differential Display 比較解析、iTRAQ 試薬などを用いたラベル定量がある<sup>7)</sup>。これらの方法で病態モデルの条件を反映するタンパク質をバイオマーカー候補として抽出する。

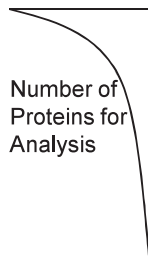
### Validation

Screening により抽出された多数のバイオマーカー候補について MRM 定量などにより真正性を検討する。このステップでは多数の検体について短時間に候補マーカーの取捨選択を行うことが重要であると考えられる。MRM は複数のペプチドを同時に定量でき、また、ダイナミックレンジが $10^6$ と大変広く、Validation に適している<sup>8)</sup>。モデルサンプルを用いて十分に検討が行われたバイオマーカー候補は、多数の臨床サンプルを用いて検証を行い、感度、特異度を調べる。(図2)

## 2・2 血漿微量タンパク質検出へのアプローチ

血液は採取時の侵襲性が低く、疾患の直接の原因であるタンパク質の情報を直接的、あるいは間接的に障害器官を介してもたやすいため、バイオマーカー探索が盛んである。しかし、血漿は数万種類のタンパク質が $10^{-3}$  から  $10^{18}$ mol/l の濃度で存在する非常に複雑な体液であるため、質量分析装置による微量タンパク質の検出は困難である。また、選択的にペプチドを検出定量する MRM モードにおいても、低濃度タンパク質 (ng/ml) の定量には高濃度タンパク質の除去が必須である<sup>9)</sup>。

**Biomarker Discovery: 80% spec**



Plasma: Pool 40 individuals  
 Subproteome: Functional enrichment  
 Screening: 4plex iTRAQ  
 Validation: iMRM

Subproteome	Screening	Validation																				
<b>Functional enrichment</b>  •Biological Subproteome Lipoproteome nanoliposome •Pathological Subproteome onset,treatment(GVHD) time corse(nerve)	<b>4plex iTRAQ</b>  <b>Definition of Markers</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>old</th> <th>CI</th> <th>AD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>young/health</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>old/health</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>DLB</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>AD</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table>		old	CI	AD	young/health	-	-	-	old/health	+	-	-	DLB	-	+	-	AD	-	+	+	<b>Biology and throughput</b>  <b>Pathway analysis</b>  iMRM 1)mAb 2)channel 3)in sol digestion
	old	CI	AD																			
young/health	-	-	-																			
old/health	+	-	-																			
DLB	-	+	-																			
AD	-	+	+																			

図2 バイオマーカー探索のためのストラテジー

バイオマーカーの探索は、複雑な組成の出発材料 (Plasma) から、生物学的、病理学的な性質を利用した機能的な濃縮 (Subproteome) を行い、iTRAQ 等でタンパク質の量を比較することで候補を見つけ出す (Screening)。候補が見つかった場合はその真正性を検討し (Validation)、最終的に臨床の場で応用されることを目標とする。

現在、多くの研究ではアフィニティーカラムによる高濃度タンパク質 (主にアルブミン) 除去を取り入れているが<sup>10)</sup>、アルブミンは両親媒性であるため、アルブミンと親和性を持つようなタンパク質を除去してしまう可能性が指摘されている<sup>11)</sup>。当研究室ではリポソームをバイオプローブとして用い、このリポソームに結合するタンパク質を捕捉することにより、微量成分を濃縮し、その中に病態を反映したタンパク質マーカーを検出することを試みている (特願 2006-193711)。アルツハイマー病を初め、多くの疾患では Ca<sup>2+</sup> ストレスによる細胞障害が認められる<sup>12)</sup>。その機構には細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇が関わっている。細胞障害と関連するバイオマーカーの探索を行うために、Ca<sup>2+</sup> 情報伝達と関わるタンパク質に注目している。特に、Ca<sup>2+</sup> 結合タンパク質は酸性リン脂質と Ca<sup>2+</sup> 依存性の結合を起こすことが報告されていることから<sup>13, 14)</sup>、リポソームを用いてこれらのタンパク質の回収を行った。リポソームをプローブとして用いることにより捕捉されたサンプルのアルブミン量が減少し、また、二次元電気泳動では検出できなかった微量タンパク質を分析可能な量にまで濃縮することができることがわかった<sup>15)</sup>。

このようにプローブとして優れた機能を有するリポソームは、一方で操作中に径の大きさが変わるなど、その形状の

不安定性のため、調製ごとに表面積が変わるなどにより、タンパク質検出系の再現性ならびにスループットに課題を抱える可能性がある。その解決策として、粒径が約 100nm のマグネタイトの表層にポリエチレンイミン (PEI) を固定化し、この PEI 表層に脂肪酸及び熱応答性高分子を固定化し、更にリン脂質を固定化した磁性ナノリポソームを開発した (特願 2008-234579)。この磁性ナノリポソームは、形状が安定であるため一定の表面積を持ち、また、熱応答性高分子により温度の上げ下げで凝集と分散を繰り返すために操作が容易である。従って反応時間や回収量の改善、そして再現性が良好となった。磁性ナノリポソームは任意のリン脂質などの両親媒性分子を表層に結合できるため、プローブにあわせて異なるリガンドの捕捉が可能となる (図3)。磁性ナノリポソームは、新たなアフィニティ担体として、プロテインアレイ様のスクリーニングシステムに使用することが可能であると考えている。

**3 認知症バイオマーカーの探索**

アルツハイマー病は認知症のなかで、60%以上を占めることが報告されている。認知症は加齢とともに増加する傾向がより顕著で、高齢化社会が進行するにつれて、アルツハ



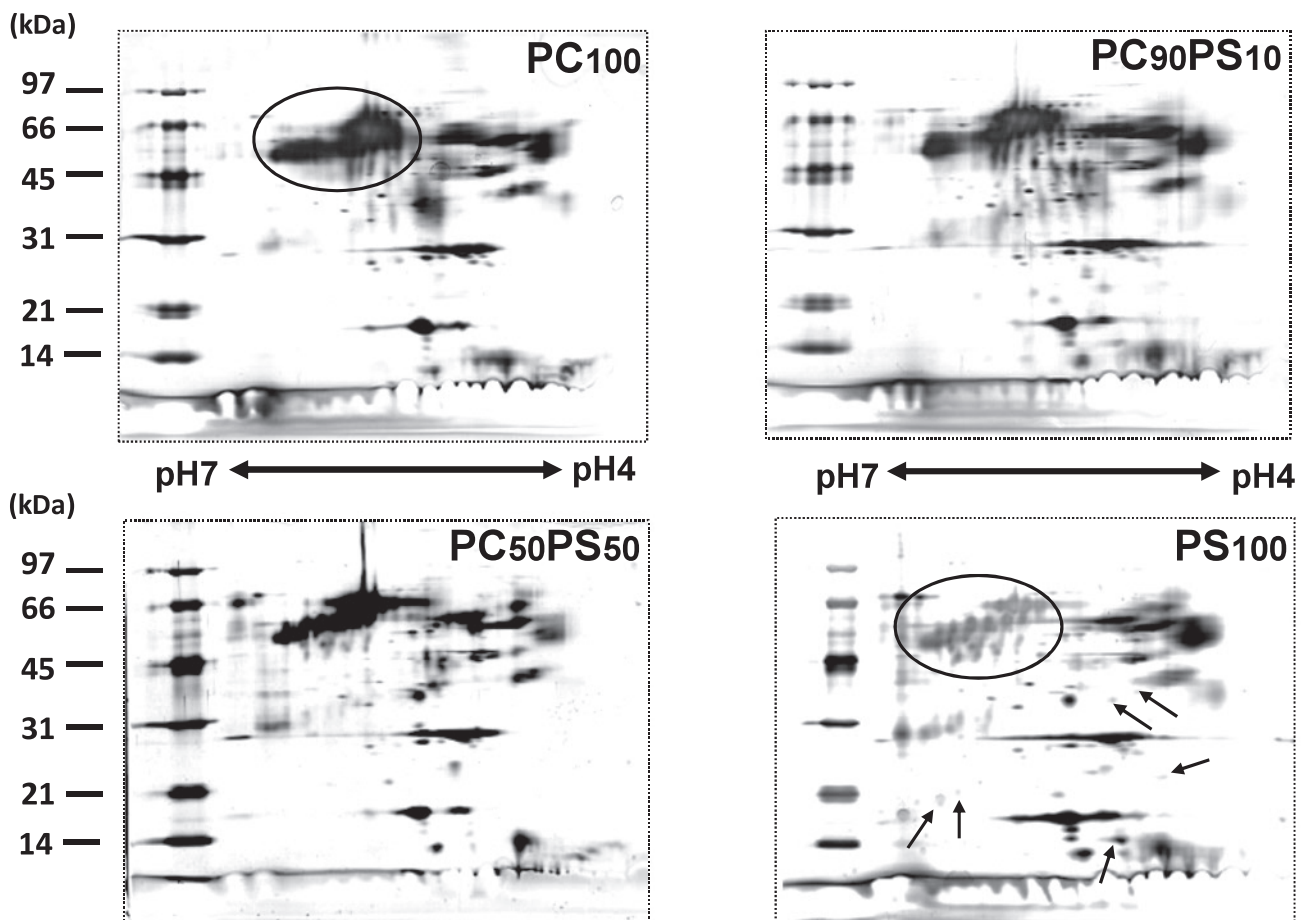


図3 ホスファチジルコリン (PC) とホスファチジルセリン (PS) の割合を変化させたナノリポソーム結合スペクトラム  
 PC 100%ではアルブミン (丸印) など血中高濃度タンパク質の結合がみられる。PS の含有量を増加させるとアルブミンが減少し、PS 100%では、ほとんどアルブミンの結合は見られなくなり、代わって種々の血漿タンパク質 (矢印) が検出される。

イマー病患者の数が激増することが容易に予想される。進行性の神経変性疾患であるアルツハイマー病を早期に発見し、治療やリハビリテーションを施すことが進行を食い止める上で重要であることが叫ばれている。一方、アルツハイマー病患者の介護者への負担も大きく、介護者の種々の健康問題も明らかになっている。従って、アルツハイマー病を早期に簡便に診断する方法の開発は、経済・社会的に大きな貢献をもたらすことになる。

アルツハイマー病の生化学的特徴は、異常代謝産物 (42 残基ペプチド  $A\beta_{42}$ ) の蓄積により、このペプチドが脳内の様々な代謝過程に影響を及ぼし、酸化ストレスや  $Ca^{2+}$  ストレスを引き起こすことである。 $A\beta_{42}$  の蓄積の原因は、その過剰産生やクリアランス能力の減衰が挙げられる。アルツハイマー病の約 10% は遺伝子変異を伴う家族性であるが、残りの約 90% は孤発性である。アルツハイマー病のバイオマーカーとして  $A\beta$  と神経軸索内の微小管の安定性に関わる Tau タンパク質が認められているが、いずれも脳脊髄液での測定が必要であり、侵襲性の高さから一般的に用いられることは困難といえる。それに比して血液採取は侵襲性が低く、広く受け入れやすく、非常に有用である。

我々は、神経培養細胞を用いて、アルツハイマー病が  $Ca^{2+}$  ストレスと関連することに注目し、細胞外に分泌されるタンパク質を検討するために細胞外液 (培養液) を用いて、その中に含まれるタンパク質のプロテオーム解析を行った (SDS-PAGE, ゲル内トリプシン消化, タンパク質同定を目的とした質量分析 (LC-MS/MS), そしてデータベース検索)<sup>16)</sup>。その結果、 $A\beta_{42}$  刺激した細胞培養液中にのみ認められた 26 種の中に、 $Ca^{2+}$  情報伝達と関わるタンパク質、アネキシン A5 ( $Ca^{2+}$ ・リン脂質結合タンパク質) が認められた。アネキシン A5 は血液脳関門を通ることが示されていることから、末梢血に移行することも考えられる。そこでこのタンパク質 (アネキシン A5) に注目し、最初にウェスタンブロット法を用いて、ヒト血漿で検討した。その結果、アルツハイマー病患者の血漿中にアネキシン A5 バンドが検出されたが、一方、健常者には認められなかった<sup>17)</sup>。

次にアネキシン A5 に対する 2 種のモノクローン抗体を用いて、共同研究により定量的解析系を開発した (スフィアライト法)。一方をガラスビーズに固定化し、これにトラップされた血漿アネキシン A5 を、HRP ラベルした他方の抗体、化学発光試薬によって高感度検出できる。この系を用いて

老年精神医学専門医の確定診断を受けたアルツハイマー病患者 110 名, 老人クラブで活躍する健常高齢者 36 名の血漿アネキシン A5 を調べた (図 4)。その結果, カットオフ値 1.5ng/ml で, 感度 81%, 特異度 84% でアルツハイマー病と健常者を識別することができた。図 4B の ROC 曲線からも示されるように, 血漿アネキシン A5 は有用なマーカーとなる可能性が示された。

アルツハイマー病は進行した状態で診断されることが多く, 簡便な早期診断が望まれる。本研究は, そのひとつの方法に結びつくことが期待される。

#### 4 移植・再生医療へ向けたプロテオミクスの応用

移植再生医療において, 臓器の生着などさまざまな臨床状態が想定される。我々は, 移植・再生医療に有効な客観的な診断補助バイオマーカーを単離検討することを進めている。現在取り組んでいる

- (1) 末梢神経損傷に関するバイオマーカーの探索
- (2) 移植片対宿主病に関するバイオマーカーの探索

について, 臨床的な問題点を俯瞰しつつ紹介する。

##### 4・1 末梢神経損傷に関するバイオマーカーの探索

神経損傷は, 種々の原因で発生する頻度の高い状態である。外傷, 糖尿病, 外傷後癱瘓性変化など, その原因は広い。末梢神経損傷における臨床的問題点として, 外科的措置は有効であるか否かの判断は大変重要である。しかしながら, 末梢神経は細胞体が存在せず, mRNA を用いた発現解析を行うことは不可能であり, プロテオミクスアプローチによる解析が切望されている。さらに, ヒト神経のプロテオミクス解析は, 研究サンプルの収集が極めて困難であり, 臨床的に重要であるにも関わらず研究は進んでいない。これらの現状から, 我々は

- 1) ヒト正常神経の収集体制の確立
- 2) 神経保存の方法の確立
- 3) 適切な動物モデルの開発

を通して, 神経損傷におけるタンパク質の発現解析を通じて

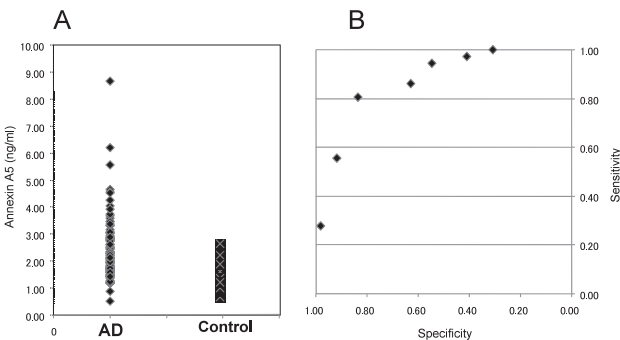


図 4 アルツハイマー病患者の血漿 Annexin A5 量  
A) 血漿アネキシン A5 量, B) ROC 曲線 (感度 81%, 特異度 84%, カットオフ値 1.5ng/ml)

- 1) 外傷性神経損傷における point of no return を反映するバイオマーカーの探索
  - 2) カウザルギー関連タンパク質の同定
  - 3) 新鮮凍結遺体を用いた神経採取・保存体制の確立
  - 4) ラット皮腹神経を用いた神経縫合モデルの確立
- を目指した研究を行っている。現在までに, カウザルギーに出現頻度の高いタンパク質の同定や, 遺体からの神経分離時間の影響, ラット神経切断モデルにおける継時的タンパク質の発現変化などの解析を行ってきた。今後, これらの試みから神経損傷の臨床における有用なバイオマーカーの単離を目指している。

##### 4・2 移植片対宿主病に関するバイオマーカーの探索

aGVHD は, 造血幹細胞移植後に起こる感染症と並んでもっとも重篤な合併症である。一卵性双生児間に行われる移植組織適合抗原一致の移植を除き, 同種造血幹細胞移植は例外なくアロ移植であり, aGVHD の発症の可能性は極めて高い。aGVHD は移植後一定の期間後発症し, 皮膚, 肝臓, 腸, 肺など生命維持に重要な臓器を傷害する。その発症率は, 本邦では非血縁移植では 40% を越える。欧米では, 人種の多様性により, さらに高い発症率を示し実に 80% を越える報告もある。近年の予防的治療の発達により, aGVHD の予後は改善された。しかし, 依然として治療抵抗性の aGVHD など臨床的に重大な問題を投げかけており, 早期診断が望まれている。

aGVHD の臨床診断は, 臨床医の経験と主観に頼る部分が多く, 客観的な診断系が存在しない。この現状は, aGVHD の早期診断・早期治療に大きな課題を提起している。

我々は, aGVHD の血漿バイオマーカーを単離する試みを行うに当たって aGVHD の臨床的な特徴を検討整理し, aGVHD 単離に当たって障害因子となることが予想される因子を抽出・整理した。それらは,

- (1) 造血幹細胞移植を受ける患者の原疾患の多様性
- (2) 原疾患に対する治療の多様性
- (3) 組織適合抗原不一致の多様性
- (4) 年齢など身体的な多様性
- (5) 治療への反応性の多様性

など, 臨床病態はきわめて多様であり, 種々の因子の関連が予想された。そこで, これらの多様性を回避するためにマウスモデルを用いて一次スクリーニングをすることとした。適切な動物モデルの解析は, ヒトの病気のバイオマーカーを単離するうえで極めて有効であることが期待できる。すなわち,

- (1) 疾患の原理 (principle) が同一のモデルを選択できる。
- (2) 疾患の誘導を任意にできる。
- (3) 背景状態を研究者のコントロール下に置くことができる。
- (4) 治療を行える。
- (5) 適切な障害臓器の採取と病態との関連を客観的に観察できる。
- (6) 任意の時点でサンプルを採取できる。

など, バイオマーカー単離に向けて多くの効果が期待できる。特に疾患病理が同一の病態を誘導できる aGVHD は, この観点から際立った病態であると考えられる。さらに, 血漿バイオマーカー単離には, 血漿の有する種々の生化学的不都合を回避する工夫も必要である。以上の方法と質量分析を用いて aGVHD の血漿バイオマーカーを単離した。単離した分子は, ケモカインの一種である CCL8 と呼ばれる分子であった。その後のマウスを用いた詳細な解析により, 本分子は

- (1) 疾患の誘導によって血清中に高濃度で出現する。
- (2) 治療により血清濃度は速やかに減少する。
- (3) 発現メカニズムが抗原認識と緊密な関係がある。
- (4) マウスモデルにおいて, 臨床スコア・病理スコアおよび生命予後と強い相関を示す。
- (5) aGVHD 標的臓器で高い発現が見られ, 治療により減少する。

など, aGVHD のバイオマーカーとして有望な動態を示している。今後は, 臨床試験に進み, 臨床応用を目指した取り組みを進める予定である。

#### 参考文献

1. Gronborg M, Kristiansen TZ, Iwahori A, Chang R, Reddy R, Sato N, Molina H, Jensen ON, Hruban RH, Goggins MG, Maitra A, Pandey A. Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 157-171.
2. Hori T, Naishiro Y, Sohma H, Suzuki N, Hatakeyama N, Yamamoto M, Sonoda T, Mizue Y, Imai K, Tsutsumi H, Kokai Y. CCL8 is a potential molecular candidate for the diagnosis of graft-versus-host disease. *Blood* 2008; 111: 4403-4412.
3. 土屋文彦. タンデム四重極リニアイオントラップを用いた微量タンパク質の検出及び翻訳後修飾研究への戦略 4000Q TRAP (R) システム. *生物物理化学* 2007; 51: 23-35.
4. Martin DB, Holzman T, May D, Peterson A, Eastham A, Eng J, McIntosh M. MRMer, an interactive open source and cross-platform system for data extraction and visualization of multiple reaction monitoring experiments. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 2270-2278.
5. Anderson L, Hunter CL. Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 573-588.
6. Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, Mann M. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 1265-1272.
7. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlet-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin DJ. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 1154-1169.
8. 佐々木浩一, 小笹泰宏, 木村成寿, 相馬仁, 青島理人, 小海康夫. Multiple reaction monitoring をバリデーションに用いた質量分析による血漿バイオマーカー探索システムの検討. *生物物理化学* 2009; 53: 1-7.
9. Keshishian H, Addona T, Burgess M, Kuhn E, Carr SA. Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6: 2212-2229.
10. Echan LA, Tang HY, Ali-Khan N, Lee K, Speicher DW. Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics* 2005; 5: 3292-3303.
11. Granger J, Siddiqui J, Copeland S, Remick D. Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines. *Proteomics* 2005; 5: 4713-4718.
12. Trump BF, Berezsky IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J* 1995; 9: 219-228.
13. Junker M, Creutz CE. Ca(2+)-dependent binding of endonexin (annexin IV) to membranes: analysis of the effects of membrane lipid composition and development of a predictive model for the binding interaction. *Biochemistry* 1994; 33: 8930-8940.
14. Sohma H, Creutz CE, Gasa S, Ohkawa H, Akino T, Kuroki Y. Differential lipid specificities of the repeated domains of annexin IV. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1546: 205-215.
15. 木村成寿, 相馬仁, 苗代康可, 小海康夫. リボ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* 2006; 50: 231-236.
16. Sohma H, Matsumoto K, Honda H, Mizue Y, Momma M, Yamaguchi M, Amano Y, Kikuchi K, Murakami S, Maeda T, Toyomasu S, Saito T, Kokai Y. Elevation of plasma level of annexin A5 in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Disease: New Advances (Proceedings of 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders)*. 2006; pp145-151.
17. 大川浩子, 相馬仁, 村上新治, 土屋文明, 黒木由夫, 齋藤利和. 痴呆の分子マーカー. -血中に出現するカルシウム結合蛋白質アネキシンを指標にして-. *老年精神医学会雑誌* 2003; 14: 227-235.

別刷請求先:

〒060-8556 札幌市中央区南1条西17丁目  
 札幌医科大学医学部分子機能解析部門  
 TEL: 011-611-2111 (内線 2520)  
 FAX: 011-615-2315