

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-519819

(P2018-519819A)

(43) 公表日 平成30年7月26日(2018.7.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Y	
G O 1 N 37/00 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	
C 1 2 Q 1/6813 (2018.01)	G O 1 N 33/543 5 8 5	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-566398 (P2017-566398)	(71) 出願人	511256912
(86) (22) 出願日	平成28年6月22日 (2016. 6. 22)		セントレ オスピタリエ ユニヴェルシテ
(85) 翻訳文提出日	平成30年2月20日 (2018. 2. 20)		ール ド ルーアン
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/064480		フランス共和国、F-76000 ルーア
(87) 国際公開番号	W02016/207253		ン、リュ ド ジェルモン 1
(87) 国際公開日	平成28年12月29日 (2016. 12. 29)	(71) 出願人	509017435
(31) 優先権主張番号	1555727		ユニベルシテ、ド、ルーアン、ノルマンデ
(32) 優先日	平成27年6月22日 (2015. 6. 22)		イー
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		UNIVERSITE DE ROUEN
			NORMANDIE
			フランス・F-76821・モン-サン-
			テニャン・セデックス・リュ・トマ・ベケ
			ット・1
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 胎児性アルコール症候群により引き起こされる障害の診断方法

(57) 【要約】

本発明は、胎児性アルコール症候群により引き起こされる障害の診断方法を提供し、前記方法は P L G F (胎盤成長因子) をアッセイすることを含んでなる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象における胎児性アルコールスペクトラム障害（FASD）のインビトロ診断方法であって、以下の工程：

- a) 前記対象由来の生体サンプル中の胎盤成長因子（PLGF）の量を測定する工程、
- b) 前記対象においてFASDを確定する工程、および
- c) 工程a)からのPLGFの量を参照と比較する工程

を含んでなる、方法。

【請求項 2】

前記参照が健常個体におけるPLGFの量の測定値であることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

工程a)からのPLGFの量が前記参照よりも低いことが、前記対象がFASDに罹患していることを示すことを特徴とする、請求項1または2のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4】

工程a)からのPLGFの量が前記参照よりも低いことが、対象における脳血管の無秩序化を示すことを特徴とする、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記生体サンプルが胎盤、特に、臍帯血に由来することを特徴とする、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6】

PLGFの量がPLGF核酸の量を測定することにより決定されることを特徴とする、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

PLGFの量が、ノーザンブロット、サザンブロット、PCR、RT-PCR、定量的RT-PCR、SAGEおよびその派生法、核酸アレイ、特に、cDNAアレイ、オリゴヌクレオチドアレイおよびmRNAアレイ、組織アレイならびにRNA-Seqから選択される方法により測定されることを特徴とする、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

PLGFの量がポリペプチドの量を測定することにより決定されることを特徴とする、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9】

PLGFの量が、免疫組織学、免疫沈降、ウェスタンブロット、ドットブロット、ELISAまたはELISPOT、ECLIA、タンパク質アレイ、抗体アレイまたは免疫組織化学と組み合わせた組織アレイ、FRETまたはBRET技術、顕微鏡または組織化学法（特に、共焦点顕微鏡および電子顕微鏡法を含む）、1以上の励起波長と好適な光学法の使用に基づく方法、例えば、電気化学法（ボルタンメトリーおよびアンペロメトリー技術）、原子間力顕微鏡、および無線周波数的方法、例えば、多極共鳴分光法、共焦点および非共焦点、蛍光、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、および複屈折または屈折率の検出（特に、表面プラズモン共鳴、偏光解析法または共振ミラー法による）、フローサイトメトリー、放射性同位元素または磁気共鳴画像法、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）による分析、HPLC-質量分析および液体クロマトグラフィー-質量分析/質量分析（LC-MS/MS）から選択される方法により測定されることを特徴とする、請求項8に記載の方法。

40

【請求項 10】

PLGFの量が、免疫沈降、免疫組織学、ウェスタンブロット、ドットブロット、ELISAまたはELISPOT、ECLIA、タンパク質アレイ、抗体アレイまたは免疫組織化学と組み合わせた組織アレイから選択される方法により決定されることを特徴とする、請求項8または9のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 1 1】

P L G F の量がウェスタンブロットまたは E L I S A により決定されることを特徴とする、請求項 8 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

P L G F の量が対照マーカーに対して正規化されることを特徴とする、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記対照マーカーが、B 2 M、T F R C、Y W H A Z、R P L O、1 8 S、G U S B、U B C、T B P、G A P D H、P P I A、P O L R 2 A、A C T B、P G K 1、H P R T 1、I P O 8 および H M B S からなる群から選択される遺伝子、または前記遺伝子の産物から選択されるポリペプチドであることを特徴とする、請求項 1 2 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

緒論

アルコールは、身体的および行動的催奇形物質である。ヒトでは、出生前のアルコール暴露は脳の発達に変化を来すことがある。従って、妊娠中のアルコール摂取（胎児性アルコール暴露）は、フランスおよび世界で、非遺伝的起源のハンディキャップ、特に、精神遅滞の主要な原因である。

【0 0 0 2】

この障害は、胎児が暴露した期間、血中アルコールレベル、遺伝因子および環境因子、ならびに摂取パターン（慢性、暴飲）によって異なる。

20

【0 0 0 3】

胎児性アルコール症候群 (Foetal alcohol syndrome) (F A S) は、胎児性アルコールスペクトラム障害 (foetal alcohol spectrum disorders) (F A S D s) の最も極端な不能病態である。これは発育不全（成長遅滞）、頭蓋顔面異形症、および認知機能障害（注意、運動、学習または記憶障害）として表れる神経行動学的異常などの身体的異常を合わせたものである。F A S 児の診断は比較的容易である。それは形態異常に基づき、子宮内または出生時に確定することができる。

【0 0 0 4】

他方で、多くの F A S D 児は、F A S 児の形態異常を呈さず、このことが早期診断の機会を減らしている。しかしながらやはり、これらの小児は欠陥がないわけではない。これらの無能力 / ハンディキャップ（多動性、注意障害）が 1 歳で検出されれば、同時に極めて貴重なケア期間が 1 歳から提供されていたかもしれない。これらの欠陥は、長期間、社会的、職業的および家族的不能に関連する。従って、これらの小児の将来および彼らの就労の見通しには深刻なリスクがある。出生時診断は、これらの小児が胎児期アルコール暴露に関連する不能を可能な限り最大限に減らすために不可欠な早期介入を受けることを可能とするであろう。

30

【0 0 0 5】

これまでに、胎児期アルコール暴露のバイオマーカー、すなわち、その小児が胎児期にアルコールに暴露されたかという問題に答えることを可能とするマーカーを同定するために多大な努力がなされてきた。

40

【0 0 0 6】

しかしながら、この情報は、重要ではあるが、いくつかの理由で、それ自体が乳児に提供されるケアを改善できるわけではない。第 1 に、アルコール毒性閾値が存在しない。言い換えれば、記録された暴露が小児の発達障害に必ずしも関連しない。しかしながらやはり、神経発達の重要な時期の暴露エピソードは影響が無いわけではなく、今や脆弱性という枠組みの概念が広く受け入れられている。さらに、摂取パターンには劇的な違いがある。例えば、青年期では、週末に暴飲するなどの摂取エピソードが男女とも急激に増える。最後に、従って、開発された暴露バイオマーカーはほとんどの場合、慢性暴露を標的とし

50

たものであるので、偽陰性の典型的リスクがある。

【 0 0 0 7 】

よって、子宮内アルコール暴露の影響を監視することを可能とするバイオマーカーを開発する必要がある。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 8 】

説明

本発明は、胎児期アルコール暴露からの脳障害の胎盤バイオマーカーを開発する機会を与える。従って、この種のバイオマーカーは、これまでには全く開発されてない。実際に、現行の胎児期アルコールのバイオマーカーは、母親が妊娠中にアルコールを摂取したかどうかまたは小児が子宮内で暴露されたかどうかを決定することを可能とする、いわゆる「暴露」バイオマーカーである。しかしながら、最も重篤な症例（胎児性アルコール症候群、FAS）を除き、暴露バイオマーカーは、脳に対する子宮内アルコール暴露の影響を確定することを可能とするものではない。これまでには、ほとんどのFASD児が早期診断から漏れている。さらに、明白な経済的理由で、母親が妊娠中にアルコールを摂取した総ての小児に介入を提供することは不可能である。

10

【 0 0 0 9 】

本発明は、従来技術のバイオマーカーとは異なり、胎児期アルコールの影響を監視することを可能とする。実際に、本発明者らは、P1GFのアッセイが、子宮内でアルコールに暴露された小児において、脳障害を受けている小児を特定することを可能とすることを示した。特に、P1GFレベルは、小児が脳の血管新生の変化から生じる無秩序化された脳血管を有するかどうかを示す。しかしながら、これまでには、これらの小児は早期診断から漏れている。よって、本発明は、フランスでは出生1000件当たり9例に相当し、その臨床徴候（多動性、注意障害など）が遅れて（例えば、就学中の4～5歳の間に）初めて検出されるFASD児に見られる早期診断の欠落を軽減する。よって、本発明は、これらの小児に対する適当な介入を早期に提供することを可能とする。このケアは特に、脳の可塑性が最大となる時期（幼児）に子供の運動、感覚および認知機能を刺激することからなる。

20

【 0 0 1 0 】

従前の研究(Piia Vuorela et al., Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 2002)では、P1GFレベルは、アルコール摂取妊婦の末梢血で測定され、禁酒妊婦のそれと比較された。この研究によれば、血清P1GF濃度は、妊娠第二期および第三期の間にアルコールを摂取した妊婦では、禁酒妊婦に比べて増加する。

30

【 0 0 1 1 】

Piia Vuorelaらにより記載されたものとは対照的に、本発明の発明者らは、妊娠中のアルコール摂取が胎児のP1GF発現に低下を引き起こすことを示した。このP1GFレベルの低下は、胎児の脳血管新生誘導受容体の発現の低下および胎児の脳血管新生の低下に関連する。胎児のアルコールの影響を模擬するP1GFレベルの低下の分子的影響は、本発明の生理学的妥当性を示す。

40

【 0 0 1 2 】

第1の態様によれば、本発明は、対象における胎児性アルコールスペクトラム障害（FASD）のインビトロ（in vitro）診断方法であって、以下の工程：

a) 生体サンプル中のP1GFの量を測定する工程、および

b) 胎児性アルコールスペクトラム障害を確定する工程

を含んでなる方法を目的とする。

【 0 0 1 3 】

用語「P1GF」または「胎盤成長因子」（これらの用語は同義である）は、血管内皮成長因子（VEGF）ファミリーのタンパク質を意味する。より詳しくは、P1GFは、本発明の意味の範囲内で、VEGF-A（後にVEGF-R1と同じ受容体として認識される）と類似性の高い149アミノ酸のタンパク質である。P1GFは、胎盤により強く

50

発現されるが、胎児の脳では発現されない。N末端グリコシル化P1GFは二量体の形態で分泌され、血管新生を刺激する働きをする。用語「P1GF」は、特に、4つのアイソフォームP1GF1~4の総てを意味し、P1GF-1とP1GF-3はヘパリンと結合しないアイソフォームであり、P1GF-2とP1GF-4はヘパリンと結合するための付加的ドメインを含む。いっそうより優先的には、「P1GF」は、配列が受託番号NP__001258634として入手可能なマウスタンパク質または配列が受託番号NP__001193941.1として入手可能なヒトタンパク質を意味する。

【0014】

用語「胎児性アルコール症候群障害(foetal alcohol syndrome disorders)(FASDs)」は、妊娠中のアルコール暴露から起こる小児の総ての障害を意味する。この用語は、とりわけ、年齢とともに段階的に見られる総ての行動障害を含む。これらの障害を有する小児は「FASD児」と呼ばれる。それらの最も重篤な型において、FASDは胎児性アルコール症候群(FAS)に相当する。後者は頭蓋顔面異形症(短いアイスリット、平滑で細長く平坦な鼻唇溝、および薄い上唇を含む)；出生前または出生直後またはその両方であり得る非特異性成長遅滞(サイズまたは体重または頭囲)；および時として精神遅滞、より頻繁には学習障害により発現される神経発達障害として現れる。FASに罹患している小児は、「FAS児」と呼ばれる。

【0015】

本発明者らは、アルコール暴露が脳血管の欠陥を引き起こすことを示した。用語「脳血管の欠陥」は、本明細書で使用する場合、脳血管系の任意の変化、特に、前記血管系の機能の変化または欠陥をもたらす変化を意味する。脳血管の欠陥は、本発明の意味の範囲内で、特に脳血管系の無秩序化であり得る。より詳しくは、胎児期アルコールは、脳血管のランダム配向を誘導する。特定の実施形態によれば、胎児性アルコールスペクトラム障害は、脳血管の欠陥に関連する。いっそうより詳しくは、前記胎児性アルコールスペクトラム障害は、脳血管系の無秩序化に関連する。

【0016】

本発明によれば、用語「対象」は、ヒト、好ましくは、胚、胎児または小児を意味する。用語「胚」は、本明細書で使用する場合、3か月齢未満の受精した卵母細胞を意味する。用語「胎児」は、本明細書で使用する場合、出生前に採取された妊娠月齢が3~9か月の間の個体を意味する。分娩後、対象は小児となる。本発明によれば、用語「小児」は、3歳未満の個体を意味する。よって、本発明による小児を含んでなるカテゴリーは、0~1か月齢の間の新生児；1か月齢~2歳間の乳児；および2歳以上の小児自体を含む。「新生児」は、本明細書で使用する場合、正期産児または未熟児であり得る。

【0017】

「胎児性アルコールスペクトラム障害を有する対象」または「FASD対象」という表現は、本明細書で使用する場合、子宮内でアルコールに暴露され、かつ、胎児性アルコールスペクトラム障害に罹患しているか、または母親のアルコール摂取のために上記の影響を含む胎児性アルコールスペクトラム障害に関連する病態の1つを発症する危険性のある胚、胎児または対象、特に、ヒトを意味する。特に、FASD対象は無秩序化された脳血管を有し、前記の無秩序化は特に脳血管のランダム配向に関連する。

【0018】

本発明の方法は、脳血管を非侵襲的に予測することを可能にすることから特に有用である。実際に、本発明の方法は、生体サンプル、特に、胎盤サンプルから、FASDリスクのある対象を検出することを可能とし、これにより前記対象にケアを提供することが可能となる。

【0019】

本発明によれば、用語「生体サンプル」は、対象から採取され得るいずれのサンプルも意味する。あるいは、生体サンプルは、胎盤、特に、臍帯のサンプルである。実際に、P1GFは、妊娠期間中、胎盤細胞により発現される。これにより、特に、対象が胚または胎児である場合には、対象の完全性を侵害することなくP1GFをアッセイすることが可

10

20

30

40

50

能となる。一般に、生体サンプルは、本発明の生物学的マーカーの発現レベルを決定することを可能とするものでなければならない。被験サンプルは、生物学的供給源から直接、またはそのサンプルの性質を改質するための前処理の後に得たものを使用してよい。例えば、このような前処理は、血液からの血漿の調製、および粘稠な流体の希釈などを含み得る。前処理法はまた、濾過、沈降、希釈、蒸留、混合、濃縮、破壊的成分の不活性化、試薬の添加、溶解なども含み得る。加えて、液体媒体を形成するためまたは分析物を放出させるために固体試験サンプルを改質することも有益であり得る。

【0020】

P1GFタンパク質は、分泌タンパク質である(DeFalco, Exp Mol Med. 44(1): 1-9, 2012)。前記バイオマーカーの発現レベルを決定するために好ましい生体サンプルは、特に、血液、血漿またはリンパ液のサンプルを含んでなる。好ましくは、生体サンプルは血液サンプルである。より好ましくは、生体サンプルは、胎盤血または臍帯血のサンプルである。実際に、前記サンプルは、通常、分娩児に採取される。次に、血中のP1GFレベルを測定するために胎盤血管の血液を得ることができる。これは胎児性アルコールスペクトラム障害、特に、脳障害の非侵襲的診断を可能とする。実際に、血中のP1GFの簡単なアッセイにより、子宮内アルコール暴露が特に、脳血管の無秩序化のためにFASDを引き起こしたどうかを決定することが可能となる。

10

【0021】

よって、本発明者らは、胎児のアルコール暴露を検出するにすぎない従来技術のバイオマーカーとは異なり、P1GFは脳障害が起こったかどうかを決定することを可能とすることを示した。よって、P1GFは、FASDの信頼性のあるバイオマーカーである。用語「バイオマーカー」は、本出願の意味の範囲内で、通常、生物学的プロセス、病原論的プロセスまたは治療的介入に対する薬理学的応答の指標として客観的に測定および評価される特徴的なものを意味する。よって、「バイオマーカー」は、様々な物質およびパラメーターの全範囲を意味する。例えば、バイオマーカーは、その検出が特定の病的状態（例えば、感染のマーカーとしての活性化されたCタンパク質の存在）を示す物質、または逆に、その検出が特定の生理状態を示す物質であり得る。本発明によるバイオマーカーは、優先的には、遺伝子、前記遺伝子の転写産物および前記遺伝子の転写産物に由来するペプチドなどの遺伝子産物、脂質、糖または代謝産物である。

20

【0022】

本発明のある実施形態によれば、バイオマーカーは、その発現、特に、発現レベルの変化が、子宮内アルコール暴露から起こる小児の生理状態と相関する、遺伝子、転写産物もしくはペプチドなどの遺伝子産物、脂質、糖または代謝産物である。特定の実施形態によれば、バイオマーカーは、成長因子活性を有するペプチドである。

30

【0023】

本発明による候補バイオマーカーは、好ましくは、遺伝子マーカー、タンパク質マーカー、脂質マーカーまたは代謝マーカーである。これらの種のマーカーのそれぞれについて、前記バイオマーカーの発現を測定するため、従って、子宮内でアルコールに暴露された小児と健康な小児、すなわち、アルコールに暴露されなかった小児の間の発現の差を特定するために当業者が自由に使える方法がいくつかある。

40

【0024】

第1の実施形態では、前記マーカーは、遺伝子マーカーまたはタンパク質マーカーである。

【0025】

この場合、本発明の方法は、皮膚細胞のサンプル採取とP1GF発現の測定の間、1以上の中間工程を含んでなり得、前記工程は、前記胎盤サンプルからのmRNA（または対応するcDNA）サンプルまたはタンパク質サンプルの抽出に相当する。次に、これをP1GF発現の測定に直接使用することができる。細胞サンプルからのmRNA（およびそのcDNAへの逆転写）またはタンパク質の沈降および抽出は当業者に周知の常法である。

50

【0026】

mRNA（または対応するcDNA）またはタンパク質のサンプルが得られれば、PLGF発現を、mRNA（すなわち、そのサンプル中に存在する全mRNAまたはcDNA）に関して、またはタンパク質（すなわち、そのサンプル中に存在する全タンパク質）に関して測定することができる。これを達成するために使用される方法は、変換の種類（mRNA、cDNAまたはタンパク質）および得られるサンプルの種類によって異なる。

【0027】

PLGF発現がmRNA（または対応するcDNA）に関して測定される場合、当業者により慣用されるいずれの技術を用いてもよい。遺伝子発現レベルを分析するためのこれらの技術、例えば、トランスクリプトーム分析には、ポリメラーゼ連鎖反応（DNAで出発する場合にはPCR）、逆転写PCR（RNAで出発する場合にはRT-PCR）および定量的RT-PCR、またはさらなるハイスループットのための核酸アレイ（DNAアレイおよびオリゴヌクレオチドアレイを含む）などの周知の方法が含まれる。

【0028】

用語「核酸アレイ」は、本明細書で使用する場合、マイクロアレイ、スライドガラス、またはマイクロスケールのピースであり得る基質に結合されたいくつかの異なる核酸プローブを意味する。マイクロアレイは、ポリマー、プラスチック、樹脂、多糖類、シリカもしくはシリカ含有材料、炭素、金属、無機ガラスまたはニトロセルロースから構成され得る。

【0029】

プローブは、cDNA（cDNAアレイ）、mRNA（mRNAアレイ）またはオリゴヌクレオチド（オリゴヌクレオチドアレイ）などの核酸であり得、前記オリゴヌクレオチドは一般に、おおよそ25～60のヌクレオチド長を有する。

【0030】

特定の遺伝子の発現プロフィールを決定するためには、前記遺伝子の全部または一部に対応する核酸を標識した後、ハイブリダイゼーション条件下で前記アレイと接触させると、前記標識標的核酸と、そのアレイの表面に結合されたこの核酸と相補的なプローブとの間の複合体の形成に至る。その後、標識されたハイブリッド複合体の存在を検出する。

【0031】

これらの技術は、生体サンプル（細胞、組織など）中の特に一遺伝子、または数遺伝子、さらにはゲノムの全遺伝子（全ゲノムまたは全トランスクリプトーム）の発現レベルを監視することを可能とする。これらの技術は当業者により慣例的に使用されているので、本明細書ではそれらを詳説する必要はない。遺伝子発現分析（cDNAアレイ）および定量的PCRに基づく本発明の実装形態の例は、実験の節に記載する。

【0032】

あるいは、サンプル中のmRNAの量に基づいて遺伝子発現を決定することを可能とするいずれの現行のまたは今後の技術も使用可能である。例えば、当業者ならば、例えば、ノーザンブロット（mRNAの場合）またはサザンブロット（cDNAの場合）を用いた標識核酸プローブとのハイブリダイゼーションによるだけでなく、シリアル・アナリシス・オブ・ジーン・エクスプレッション(serial analysis of gene expression) (SAGE) およびその派生法、例えば、Long SAGE、Super SAGE、Deep SAGEなどの技術により遺伝子発現を測定することができる。また、組織マイクロアレイ(TMA)を使用することも可能である。一般に組織アレイとともに使用される検査には、免疫組織化学および蛍光in situハイブリダイゼーションが含まれる。mRNAレベルの分析のために、組織アレイを蛍光in situハイブリダイゼーションと組み合わせてもよい。最後に、サンプル中のmRNAの量を決定するためにマッシュプリー・パラレル・シーケンシング(massively parallel sequencing) (RNA-Seq、または全トランスクリプトームショットガンシーケンシング)を使用することが可能である。このために、マッシュプリー・パラレル・シーケンシングのいくつかの方法が利用できる。このような方法は、例えば、米国特許第4,882,127号；同第4,849,077号；

10

20

30

40

50

同第7, 556, 922号; 同第6, 723, 513号; WO 03/066896; WO 2007/111924; US 2008/0020392; WO 2006/084132; US 2009/0186349; US 2009/0181860; US 2009/0181385; US 2006/0275782; EP-B1-1141399; Shendure and Ji, Nat Biotechnol., 26(10): 1135-45, 2008; Pihlak et al., Nat Biotechnol., 26(6): 676-684, 2008; Fuller et al., Natural Biotechnol., 27(11): 1013-1023, 2009; Mardis, Genome Med., 1(4): 40, 2009; Metzker, Natural Rev. Genet., 11(1): 31-46, 2010に記載されている。

【0033】

マーカーの発現がタンパク質に関して測定される場合、特に、免疫沈降、免疫組織学、ウェスタンブロット、ドットブロット、ELISAまたはELISPOT、電気化学発光(ELICA)を用いた免疫検査、タンパク質アレイ、抗体アレイまたは免疫組織化学と組み合わせた組織アレイなどの周知の技術で、特異的抗体を使用することが可能である。使用可能な他の技術には、FRETまたはBRET技術、顕微鏡または組織化学法(特に、共焦点顕微鏡および電子顕微鏡法を含む)、1以上の励起波長と好適な光学法の使用に基づく方法、例えば、電気化学法(ボルタンメトリーおよびアンペロメトリー技術)、原子間力顕微鏡、および無線周波数的方法、例えば、多極共鳴分光法、共焦点および非共焦点、蛍光、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、および複屈折または屈折率の検出(例えば、表面プラズモン共鳴、偏光解析法または共振ミラー法など)、フローサイトメトリー、放射性同位元素または磁気共鳴画像法、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)による分析、HPLC-質量分析および液体クロマトグラフィー-質量分析(LC-MS/MS)が含まれる。これらの技術は総て当業者に周知であり、本明細書でそれらを詳説する必要はない。

【0034】

好ましくは、PIGF発現は、タンパク質に関して測定される。より好ましくは、PIGF発現は、特に、免疫沈降、免疫組織学、電気化学発光(ELICA)、ウェスタンブロット、ドットブロット、ELISAまたはELISPOT、アレイ、抗体アレイまたは免疫組織化学と組み合わせたタンパク質組織アレイなどの周知の技術で、前記バイオマーカーを認識する特異的抗体を使用する検査を用いて測定される。PIGFに対する抗体は市販されており(例えば、R&D Systems、Santa Cruz、Abcamなどを参照)、本発明の方法で使用可能である。いっそうより好ましくは、PIGF発現は、ウェスタンブロットまたはELISAにより測定される。

【0035】

本発明の優先的実施形態では、本方法の工程a)で得られたPIGFレベルを参照レベルと比較することが有用であり得る。

【0036】

「生物学的マーカーの参照発現レベル」は、本出願の意味の範囲内で、参照として使用される、前記マーカーのいずれの発現レベルも意味する。例えば、参照発現レベルは、健常対象由来の生体サンプル、例えば、健常対象、すなわち、子宮内でアルコールに暴露されていない対象由来の胎盤における、対象とするマーカーの発現レベルを測定することにより得ることができる。この場合、工程a)からのPIGFレベルが参照レベルよりも低いことがFASDを示す。特に、本発明者らは、健常対象よりも低いPIGFレベルが脳血管組織の欠陥を示すことを示した。

【0037】

本発明の有利な実施形態によれば、候補マーカーの発現は、対照マーカーの発現に対して正規化される。本発明による「対照マーカー」は、その発現が関係する細胞種およびドナーの齢に関わらず同一であるマーカーである。特定の実施形態によれば、候補バイオマーカーは遺伝子マーカーまたはタンパク質マーカーであり、対照マーカーは、対象の齢に依存せずに総ての細胞種で発現される遺伝子、またはそのタンパク質産物である。より詳しい実施形態では、前記対照マーカーは、ハウスキーピング遺伝子または前記ハウスキー

ピング遺伝子のタンパク質産物である。ハウスキーピング遺伝子は、総ての細胞種で発現され、細胞の生存に必要な基本的機能を提供する遺伝子である。ヒトハウスキーピング遺伝子の一覧は、例えば、Eisenberg et al., (Trends in Genetics 19:362-365, 2003)に見出せる。好ましいハウスキーピング遺伝子は、本発明によれば、B2M、TFRC、YWHAZ、RPL0、18S、GUSB、UBC、TBP、GAPDH、PPIA、POLR2A、ACTB、PGK1、HPRT1、IPO8およびHMBSからなる群から選択される遺伝子である。

【0038】

本発明の方法は、早期齢からの非侵襲的診断を行うことを可能とするので特に有用である。よって、子宮アルコール暴露後に脳障害を受けたと診断された小児に、早期かつ迅速なケアを提供することができる。早期ケアはより良好な機能のおよび認知的回復につながることを示されている(Toutain et al., Psychotropes, 13: 49-68, 2007)。

10

【0039】

別の態様によれば、本発明は、対象において胎児性アルコールスペクトラム障害を治療する方法を目的とする。前記方法は、以下の工程：

a) 前記対象において上記の方法のいずれか1つによりFASDを診断する工程；および

b) 工程a)が、前記対象がFASDを有するという結論を出せば、前記対象を治療する工程

を含んでなる。

20

【0040】

用語「治療」は、本明細書で使用する場合、FASDの症状または原因を軽減または根絶することを可能とするいずれの行為も意味する。治療は、本発明の意味の範囲内で、薬理的物質および/または精神治療的処置を投じることを含んでなり得る。

【0041】

以下、例により本発明をより厳密に説明する。これらの例は、特に断りのない限り、限定を意図するものではなく例として本明細書に示される。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】E20マウス胚における皮質血管新生に及ぼす子宮内アルコール暴露の影響。A、B：対照動物(A)およびアルコール暴露動物(B)における皮質微小血管組織に及ぼすGD15からGD20までの胎児期アルコール暴露の影響。脳微小血管を、抗CD31免疫組織化学を用いて可視化した。矢印は、「対照」群における放射状配向を有する脳微小血管を示す。「アルコール」群には放射状組織が無いことに注意。I-VI：皮質層；CC：脳梁。C：GD20胎児の未熟皮質における皮質微小血管の配向(角度クラス)の分布。統計分析は χ^2 検定を用いて行った。D：GD20におけるCD31の皮質発現に及ぼす妊娠最終週中の胎児期アルコール暴露の影響のウェスタンプロットによる定量。ns 対応のないt検定を用いて「対照」群と比較。

30

【図2】E20マウス胚におけるVEGF/PLGFファミリーメンバーの発現に及ぼす子宮内アルコール暴露の影響。A~E：「対照」および「アルコール」群の皮質におけるVEGF-A(A)、PLGF(B)、sVEGF-R1(C)、mVEGF-R1(D)およびVEGF-R2タンパク質レベルのウェスタンプロットによる定量。F：「対照」群のE20胚の皮質および胎盤におけるPLGFタンパク質レベルのウェスタンプロットによる比較。*** $p < 0.001$ 対応のないt検定を用いて「対照」群と比較。

40

【図3】GD20マウスにおける胎盤の超微細構造の特徴に及ぼす子宮内アルコール暴露の影響。A：胎盤の層構造に及ぼすアルコール暴露の影響のクレシルバイオレット染色による観察。胎盤の母体側が上である。アルコールは接合層および迷路層の分離に影響を及ぼす(点線)。B：ライヘルト膜厚に及ぼすアルコールの影響の画像解析による定量。C、D：「対照」群(C)および「アルコール」群(D)における巨大栄養膜層の低倍率での観察。巨大栄養膜を矢印で示す。それらは「対照」群の胎盤では典型的な長方形である

50

が、「アルコール」群では円形である。E～H：「対照」群（E、G）および「アルコール」群（F、H）における巨大栄養膜の細胞形態および密着結合の存在（矢印）を示す、中倍率（E、F）および高倍率（G、H）での電子顕微鏡により得られた画像。密着結合（星印）は、アルコール処置動物ではもはや見られない。EおよびFの挿入は、それぞれGおよびHにおいてより高倍率で観察した区域を示す。D：母体の脱落膜；J：接合層；L：迷路層；Tg：巨大栄養膜層。*** $p < 0.001$ 対応のないt検定を用いて「対照」群と比較。

【図4】胎盤関門および胎盤エネルギー代謝に関与するタンパク質の発現に及ぼす子宮内アルコール暴露の影響。A、B：「対照」群（A）および「アルコール」群（B）のマウスの胎盤迷路層におけるZO-1タンパク質の免疫組織化学的観察。ZO-1タンパク質は、「対照」群ではドット群を形成しているように見える（矢印）が、「アルコール」群では染色は散在している。栄養膜層は、グルコース輸送体Glut-1との免疫反応性により可視化した。核はヘキストで染色した。C：「対照」胎盤の迷路層におけるモノカルボン酸MCT-1およびグルコース輸送体に対する抗体による二重染色。Glut-1とは対照的に、MCT-1の発現は、合胞体性栄養膜の母体層に関連している。核はヘキストで染色した。D：「対照」群および「アルコール」群の胎盤におけるZO-1およびMCT-1タンパク質発現レベルのウェスタンブロットによる定量。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 対応のないt検定を用いて「対照」群と比較。

【図5】マウス胎盤におけるVEGF/PLGFファミリーメンバーの発現に及ぼす子宮内アルコール暴露の影響。A～F：GD20におけるVEGF-A（A）、PLGF（B）、sVEGF-R1（C）、mVEGF-R1（D）、VEGF-R2（E）およびCD31（F）の胎盤発現に及ぼす妊娠最終週中のアルコール暴露の影響のウェスタンブロットによる定量。G、H：Glut-1で標識された胎盤合胞体性栄養膜層（H）におけるVEGF-R2（G）分布を示す免疫組織化学的染色。核をヘキストで染色した。* $p < 0.05$ 対応のないt検定を使用して「対照」群と比較。

【図6】胎盤から胎児脳へ子宮内注入したエバンスブルーの拡散。A、B：GD15における妊娠マウスの胎盤にマイクロインジェクションにより投与されたエバンスブルーの可視化の経時的推移。蛍光はUV照射（A）により検出し、偽カラースケール（B）を用いて表す。C、D：GD15における胎盤マイクロインジェクション後の胎児脳におけるエバンスブルー蛍光の可視化の経時的推移。蛍光はUV照射（C）により検出し、偽カラースケール（D）を用いて表す。E、F：胎盤（E）、次いで、対応する胎児の脳（F）における、注入したエバンスブルーのシグナルの595nmでの吸光度の分光光度測定による定量の経時的推移。G：GD15の妊娠マウスの胎盤にヒトPLGFを注入した30分後のマウス胎児脳におけるhPLGFのELISA定量。* $p < 0.05$ 対応のないt検定を用いて「対照」群と比較。

【図7】脳VEGF-R1レベルに及ぼす子宮内トランスフェクションによる胎盤PLGFの抑制の影響。A：GD15の妊娠マウスの胎盤におけるeGFPコードプラスミドの子宮内トランスフェクション48時間後のeGFP発現を示す顕微鏡写真。B、C：eGFP蛍光（B）がGlut-1で標識された胎児栄養膜層に主要に関連していることを示す三重染色eGFP/Glut-1/ヘキスト（C；矢印の先）。母体栄養膜層（これもまたGlut-1で標識される）はトランスフェクトされない。胎児栄養膜層は、胎児循環に特徴的な有核赤血球の存在により識別される（矢印）。D：非トランスフェクト（Sh⁻/GFP⁻）、GFPトランスフェクト（Sh⁻/GFP⁺）およびshPLGF/GFPトランスフェクト（Sh⁺/GFP⁺）動物の胎盤におけるPLGF、GFPおよびアクチンタンパク質のウェスタンブロットによる可視化。E、F：非トランスフェクト（Sh⁻/GFP⁻）、GFPトランスフェクト（Sh⁻/GFP⁺）およびshPLGF/GFPトランスフェクト（Sh⁺/GFP⁺）動物の胎盤におけるPLGF（E）およびGFP（F）発現レベルのウェスタンブロットによる定量。G：非トランスフェクト（Sh⁻/GFP⁻）、GFPトランスフェクト（Sh⁻/GFP⁺）およびshPLGF/GFPトランスフェクト（Sh⁺/GFP⁺）胎盤からの胎児脳におけるVEGF-

10

20

30

40

50

R1 発現レベルのウェスタンブロットによる定量。* $p < 0.05$ ANOVA とその後のテューキーHSD多重比較検定を用いて「Sh⁻/GFP⁻」群と比較。

【図8】妊娠第20週～第25週のヒト胎盤に及ぼす子宮内アルコール暴露の影響の形態計測的特徴。A、B：妊娠第20週から第25週（WG）未満の「対照」群（A）および「FAS/pFAS」群（B）の胎盤絨毛（青）に存在する微小血管（褐色）を可視化するための抗CD31免疫組織化学染色およびトルイジンブルー対比染色。C：20から25WG未満の「対照」群および「FAS/pFAS」群の胎盤における、サイズにより分類された絨毛のパーセンテージ。D：20から25WG未満の「対照」群および「FAS/pFAS」群の胎盤における絨毛サイズによる血管分布。E：20から25WG未満の「対照」群および「FAS/pFAS」群の胎盤における絨毛サイズによる血管表面積。

* $p < 0.05$ 対応のないt検定を用いて「対照」群と比較。

【図9】妊娠第25週～第35週のヒト胎盤に及ぼす子宮内アルコール暴露の影響の形態計測的特徴。A、B：25から35WG未満の「対照」群（A）および「FAS/pFAS」群（B）の胎盤絨毛（青）に存在する微小血管（褐色）を可視化するための抗CD31免疫組織化学染色およびトルイジンブルー染色。C：25から35WG未満の「対照」群および「FAS/pFAS」群の胎盤における、サイズにより分類された絨毛のパーセンテージ。D：25から35WG未満の「対照」群および「FAS/pFAS」群の胎盤における絨毛サイズによる血管分布。E：25から35WG未満の「対照」群および「FAS/pFAS」群の胎盤における絨毛サイズによる血管表面積。* $p < 0.05$ 対応のないt検定を用いて「対照」群と比較。

【図10】妊娠第35週～第42週のヒト胎盤に及ぼす子宮内アルコール暴露の影響の形態計測的特徴。A、B：35から42WG未満の「対照」群（A）および「FAS/pFAS」群（B）の胎盤絨毛（青）に存在する微小血管（褐色）を可視化するための抗CD31免疫組織化学染色およびトルイジンブルー染色。抗CD31免疫組織化学染色およびトルイジンブルー染色。「FAS/pFAS」群では、微小血管の管腔面積が大幅に減少している。C：35から42WG未満の「対照」群および「FAS/pFAS」群の胎盤における、サイズにより分類された絨毛のパーセンテージ。D：35から42WG未満の「対照」群および「FAS/pFAS」群の胎盤における絨毛サイズによる血管分布。E：35から42WG未満の「対照」群および「FAS/pFAS」群の胎盤における絨毛サイズによる血管表面積。* $p < 0.05$ 対応のないt検定を用いて「対照」群と比較。

【図11】ヒト胎盤における絨毛および血管密度に及ぼす子宮内アルコール暴露の影響の経時的推移ならびに血管新生誘導タンパク質およびエネルギー代謝のウェスタンブロットの特徴。A：20から25WG未満、25～35WG未満、および35から42WG未満の「対照」群（A）および「FAS/pFAS」群（B）の胎盤における絨毛密度の変化。B：20から25WG未満、25～35WG未満、および35から42WG未満の「対照」群（A）および「FAS/pFAS」群（B）の胎盤における血管密度の変化。# $p < 0.05$ 、## $p < 0.01$ グラフに示されるように「対照」群との比較。* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ 所与の妊娠年齢の群に関する「対照」群と「アルコール」群の比較。C～H：「対照」群および「FAS/pFAS」群の胎盤におけるZO-1（C）、MCT-1（D）、PLGF（E）、VEGF-A（F）、VEGF-R1（G）およびVEGF-R2（H）タンパク質レベルのウェスタンブロットによる定量。* $p < 0.05$ 対応のないt検定を用いて「対照」群と比較。

【図12】ヒト胎児に見られる子宮内アルコール暴露により誘発された脳および胎盤障害の比較および統計学的相関。A～H：22WG（A、E）および31WG（C、G）の「対照」群患者の脳（A、D）および胎盤（E、H）における血管組織、ならびに21WG（B、F）および33WG（D、H）の「FAS/pFAS」群の患者の脳（B、D）および胎盤（F、H）における血管組織。I、J：「対照」群（I）およびFAS/pFAS群（J）の患者における無秩序な皮質血管と胎盤血管密度の間の統計学的相関。

【実施例】

【0043】

子宮内アルコール暴露後の脳血管新生異常

脳血管系発達に及ぼす子宮内アルコール暴露の影響

本発明者らは、従前に、出生前のアルコール暴露が脳血管の無秩序化を誘発することを示した。特に、アルコールの影響は、放射状配向を有する皮質血管の数の有意な減少およびランダム配向を有する微小血管の数の増加に関連している（図1）。マウスで行った研究と並行して、ヒトでの脳微小血管系の分析は、マウスと同様に、「対照」群で放射状配向を有する皮質微小血管が、「FAS/pFAS」群では完全に無秩序化されていることを示した（図12およびJegou et al., 2012）。

【0044】

マウスにおける血管系に典型的な遺伝子の発現に及ぼす子宮内アルコール暴露の影響

定量的RT-PCR(mRNA)およびウェスタンブロット(タンパク質)試験から、VEGF-AまたはPLGFなどの因子の血管新生誘導効果の中継ぎをするVEGF-R1およびVEGF-R2受容体のレベルの顕著な調節不全が明らかになった。よって、脳血管系異常は脳血管新生誘導受容体の調節不全に関連している（図2およびJegou et al., 2012）。

【0045】

子宮内アルコール暴露後の胎盤血管新生の異常

マウス（図3～5）およびヒト（図8～10）で、免疫組織化学的アプローチを、特に、胎盤絨毛の密度およびサイズ、血管の密度および表面積、ならびに絨毛当たりの血管の割合を含んでなる形態計測的分析と組み合わせ、種々の胎盤パラメーターを試験した。これらのパラメーターを測定し、対照個体からの34胎盤と子宮内アルコール暴露個体からの36胎盤とで比較した。胎盤を、脳研究に相当する3つの月齢群に分けた（Jegou et al., 2012）。月齢群20から25WG未満、25から35WG未満、および35から42WG未満に関する結果を本明細書に示す。

【0046】

特に、形態計測的分析は、絨毛サイズおよび血管表面積による胎盤血管の分布がアルコール暴露により有意に影響を受けることを示す（図11）。さらに、「月齢」因子を考慮した血管密度の縦断的解析は、「対照」群で、胎盤血管新生が月齢群20から25WG未満と25から35WG未満の間で著しく増加することを示す。この高い胎盤血管新生は、多量の酸素および栄養素を要する妊娠第3期の著しい脳発達により説明される。他方、胎児期アルコールは、胎盤血管密度の停滞または低下を誘発する（図11）。

【0047】

結論として、本結果は、アルコール暴露対象では大脳皮質と同様にヒト胎盤にも血管異常が存在することを示す。よって、これらの結果は、脳障害と胎盤血管新生障害の間に相関があるという仮説を裏付ける。

【0048】

胎盤血管異常と脳血管異常の間の相関の証明

子宮内アルコール暴露後のヒトに見られる胎盤血管異常および脳血管異常は、因果関係のない完全に独立したプロセスの結果であるかもしれないし、あるいは逆に密接に関連しているかもしれない。PLGFの供給源はユニークであり、胎盤起源であるという事実は、第2の仮説を支持するものである。しかしながら、脳血管の欠陥と胎盤血管の欠陥の関連を示すために、本発明者らは、「対照」群の対照と「FAS/pFAS」群の個体のべつの対象で相関試験を行った（図12）。

【0049】

これらの結果は、「対照」群では、胎盤の血管新生の増加は皮質血管の放射状組織（ $R^2 = 0.4719$ ）に影響を及ぼさないことを示す。他方、「FAS/pFAS」群に見られる胎盤の血管新生の欠如は、皮質血管のランダム配向（ $R^2 = 0.9995$ ）と密接に関連している。よって、胎盤の血管変化と脳の血管変化の間には有意性の高い相互作用が存在する。

10

20

30

40

50

【0050】

胎盤 P L G F とその脳受容体の間の機能的関連の証明

妊娠 (G D 1 5) マウスの胎盤に子宮内投与された蛍光分子は、20 ~ 30 分後に胎児の脳に見られる (図 6) 。加えて、マウスの胎盤に注入された組換えヒト P L G F は、30 分後に胎児の脳において E L I S A により検出される (図 6) 。これらのデータは、胎盤分子、特に、P L G F が胎児の脳に到達し得ることを示す。

【0051】

マウス P L G F に関する子宮内胎盤トランスフェクションを s h R N A により無効化すると、48 時間に胎盤 P L G F タンパク質レベルの抑制がもたらされる (図 7) 。この影響は、脳レベルで V E G F - R 1 受容体タンパク質レベルの低下に関連している (図 7) 。これらの結果は、i) 胎盤 P L G F の特異的抑制が脳受容体の発現に直接影響を及ぼすこと、i i) 胎盤 P L G F の特異的抑制が脳 V E G F - R 1 発現に及ぼすアルコールの影響を模倣すること (図 2 および 7) を示す。

10

【0052】

脳障害のバイオマーカーである胎盤因子の同定

上記の相関試験は、胎児期アルコール暴露により誘発される胎盤血管の欠陥が脳血管の欠陥に直接関連していることを初めて示す。結局のところ、血管新生における役割が証明される胎盤因子が脳血管の欠陥の候補バイオマーカーとなる。

【0053】

血管新生の因子または血管系の特異的タンパク質のいずれかであることが知られているタンパク質の発現レベルを、ウェスタンブロットにより定量した。この研究は動物 (マウス ; 胎盤 / 脳) およびヒト (胎盤) で行った。

20

【0054】

マウスでは、胎盤 V E G F - A および P L G F の発現レベルの定量は、(生物においては胎盤が唯一の供給源である ; 図 5) 単独の有意な低下を示す。並行して、V E G F - A および P L G F 受容体の定量は、V E G F - R 1 (ユニークな P L G F 受容体) の発現は胎盤および脳の両方で低下することを示す (図 2 および 5) 。この極めて顕著な低下は 50 % 程度である。次に脳における V E G F - R 2 の発現は影響を受けない。さらに、胎盤および血液脳関門の確立に関与する血管 Z O - 1 タンパク質を定量したところ、胎盤において著しく低下していた (図 4) 。

30

【0055】

マウスで行った試験と並行して、母体アルコール暴露が証明され、子供が生存していたヒト胎盤でタンパク質発現の分析を行った。本発明者らは、7 つの「対照」胎盤および 6 つの「アルコール」胎盤を回収し、マウスにおいて同定された候補マーカーをウェスタンブロットにより定量した。これらの結果は、「アルコール」群では、マウスの場合の同様に、P L G F 発現および Z O - 1 発現が極めて著しく低下していることを示す (図 1 1) 。これらのデータは、胎盤および脳において見られた胎児期アルコールの影響はマウスおよびヒトの 2 つの異なる種で見られることを示す。

【0056】

2 群の患者 (対照と子宮内アルコール暴露) からの臍帯血、胎盤および母体血液における P L G F 濃度の評価

40

この臨床試験の主要な目的は、臍帯および胎盤の P L G F 濃度を 2 群の患者間で比較すること、ならびに両群の患者の 2 歳および 6 歳時の神経発達の追跡調査を行うことである。第 1 の群では、患者は子宮内でアルコールに暴露された。第 2 の群は、子宮内でアルコール暴露されなかった患者の対照群である。

【0057】

本臨床試験は以下の目的を持つ :

- ・母体血液の P L G F 濃度の比較 ;
- ・小児の出生時の神経学的臨床検査 ;
- ・2 歳時の、神経発達を評価するための、特に年齢ステージ質問紙 (Ages and Stages Que

50

stionnaire) (A S Q) による、小児科診察における追跡調査、および

・ 6 歳時の、親向け質問紙および神経心理学的評価による、神経発達を評価するための小児科診察における追跡調査。

【 0 0 5 8 】

本臨床試験では、妊娠中にアルコールを摂取した 3 0 名の女性および 3 0 名の禁酒女性 (対照群) を調査した。調査した女性は総て少なくとも 1 8 歳であり、同意プロトコルに署名した。

【 0 0 5 9 】

記録した妊娠中のアルコール摂取は、妊娠中、週に少なくとも 3 0 g のアルコールの慢性摂取または急性の暴飲型摂取 (2 5 c L の 4 . 5 ° ビール、 1 0 c L の 1 2 ° ワイン、 3 c L のウイスキー、 7 c L のシェリーなどに相当する 1 0 g 単位の純水アルコールによる) である。

10

【 0 0 6 0 】

対照群では、妊娠中、アルコール摂取無しと記録される。

【 0 0 6 1 】

各群 3 0 名の患者は、検定力 8 0 % では、 P 1 G F レベルに 4 . 7 p g / d L の違いを示す必要がある。

【 0 0 6 2 】

臍帯血および胎盤における P 1 G F のアッセイは、臍帯血および胎盤のサンプル (対照群とアルコール暴露群) に対する電気化学発光イムノアッセイ (R o c h e D i a g n o s t i c s により入手可能な P 1 G F の自動 E C L I A 分析 (C o b a s e 4 1 1 A n a l y z e r)) により行われる。

20

【 0 0 6 3 】

臍帯血および胎盤の組織サンプルを採取し、次いで、冷凍し、 - 8 0 ° C で保存する。その後、組織抽出物に対する血液および胎盤 P 1 G F の定量を行う。

【 0 0 6 4 】

出産からの排出体に対する臨床検査 (体重、身長、頭囲、体軸および末梢の緊張、反応性、原始反射、姿勢適応、 F A S を示唆する顔面異形、潜在的奇形) を行う。

【 0 0 6 5 】

2 歳および 6 歳時の小児の追跡調査は、認知発達および行動障害を対象として行う。

30

【 0 0 6 6 】

2 歳時の診察では、体重、身長および頭囲 (H C) が測定される。 A S Q が記入され、神経学的検査 (脳奇形を検査するための脳 M R I) および顔面異形の徴候の評価が行われる。眼科医による網膜血管の血管剛性の検査も行われる。

【 0 0 6 7 】

6 歳時の診察では、体重、身長および H C が測定され、神経発達スケール (W I S C I V および N E P S Y) を用いた神経学的および神経心理学的検査が行われる。この診察の際に、コナーズの親および教師質問紙 (Conners parent and teacher questionnaires) (多動性スクリーニングのため) および親向けの社会的コミュニケーション質問紙 (social communication questionnaires) (S C Q) (行動に関する) も記入される。

40

【 0 0 6 8 】

両群とも、出生時、2 歳時および 6 歳時に、臨床検査 (行動、眼の追跡 - 注視、体軸および末梢の緊張、神経運動評価、伸長反射、奇形を調べるための精密身体検査) および臨床関連領域の検査 (眼底、脳 M R I 、親向け A S Q 、 W I S C I V および N E P S Y 発達尺度、親および教師向けのコナーズおよび S C Q 質問紙) が行われる。

【 0 0 6 9 】

これら 2 群の患者を、マン・ホイットニー・ノンパラメトリック検定を用いて比較する。5 % の有意閾値を設定する。

【 0 0 7 0 】

得られた結果は予想されたものに一致する。

50

【 0 0 7 1 】

結論

本発明者らによりマウスおよびヒトで得られた種々の結果に照らせば、以下のことが明らかである。

i) 胎児期アルコール暴露は、脳の血管新生および脳血管系の組織化に影響を及ぼす。

i i) これらの脳の変化は、胎盤血管の異常と相関している。

i i i) 胎盤血管新生誘導因子は、胎児の脳に到達し得る。

i v) F A S D 児の脳の血管新生の神経発達の異常は、胎盤 P L G F / 脳 V E G F - R 1 系の調節不全に関連している。

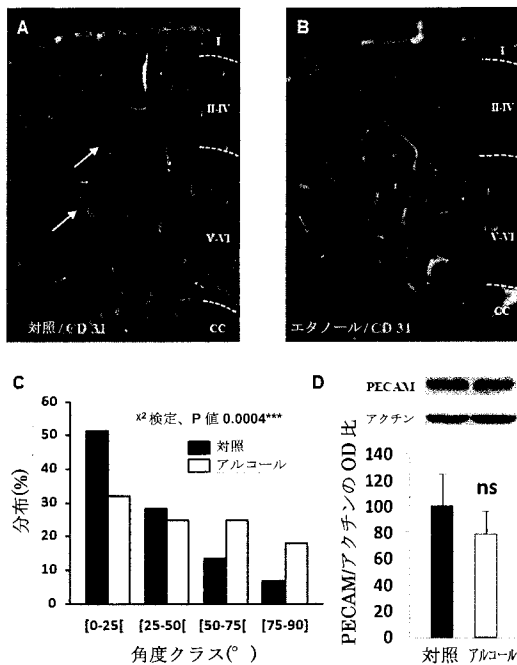
v) 胎盤での P L G F の無効化は、脳 V E G F - R 1 に及ぼす胎児期アルコール暴露の影響を再現する。

v i) 胎児期アルコール暴露後の胎盤 P L G F レベルの調節不全は、脳障害を予測することを可能とする。

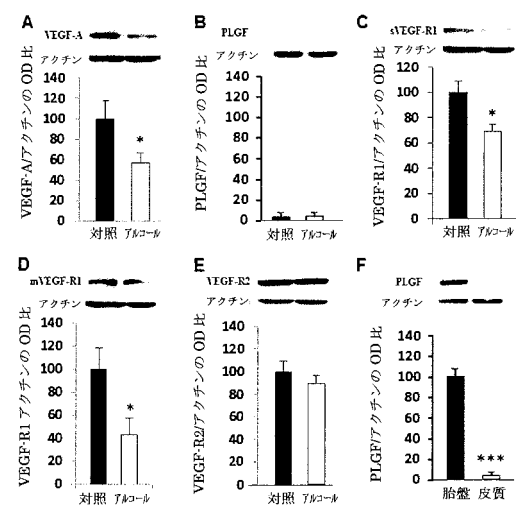
v i i) 胎盤タンパク質因子 P L G F は、子宮内アルコール暴露により誘発される脳障害のバイオマーカーとして同定された。

10

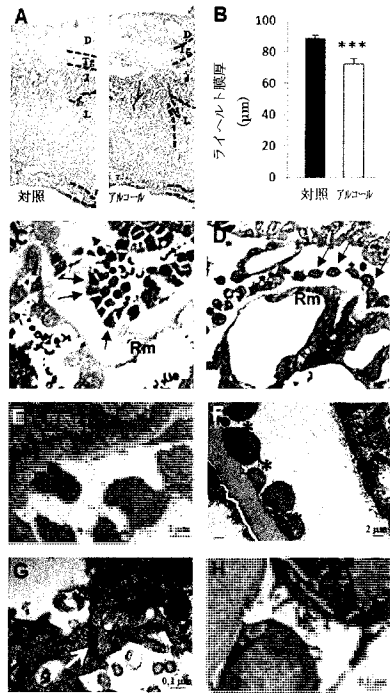
【 図 1 】



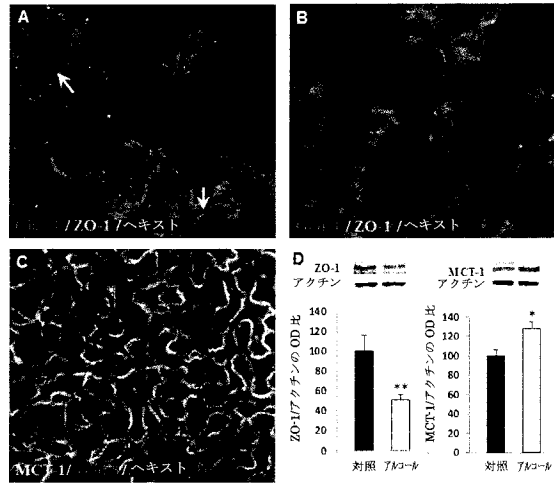
【 図 2 】



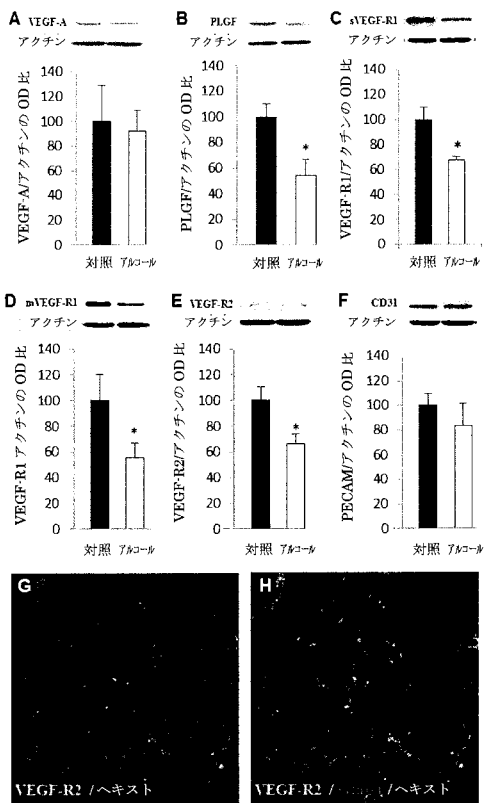
【 図 3 】



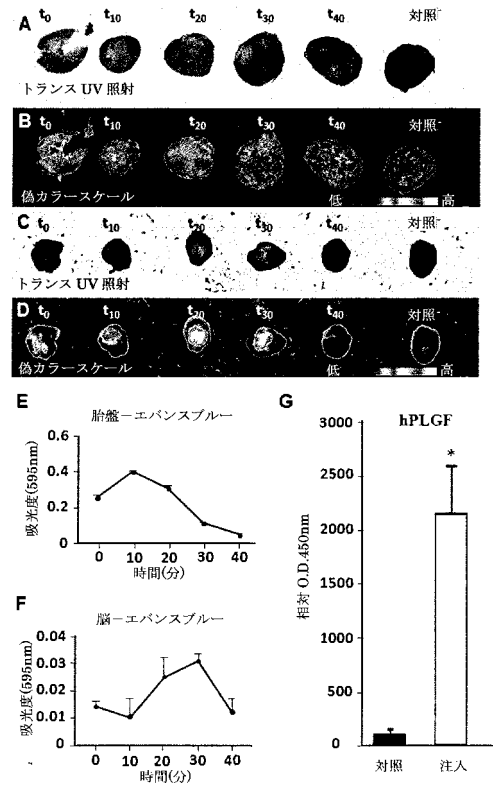
【 図 4 】



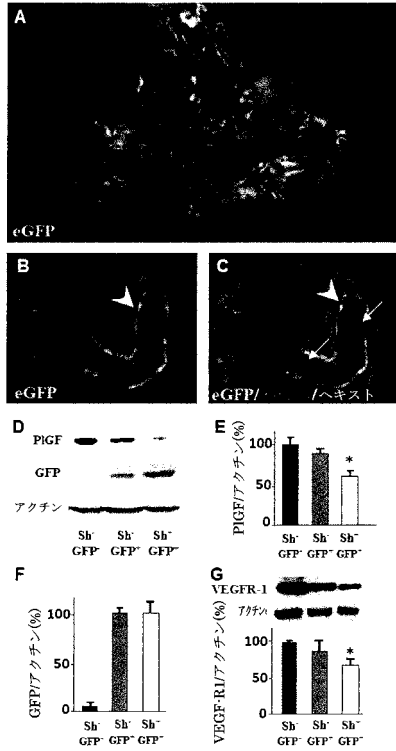
【 図 5 】



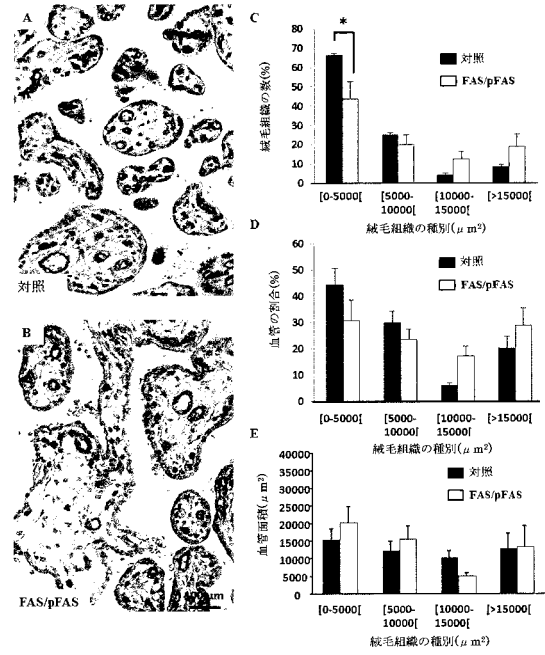
【 図 6 】



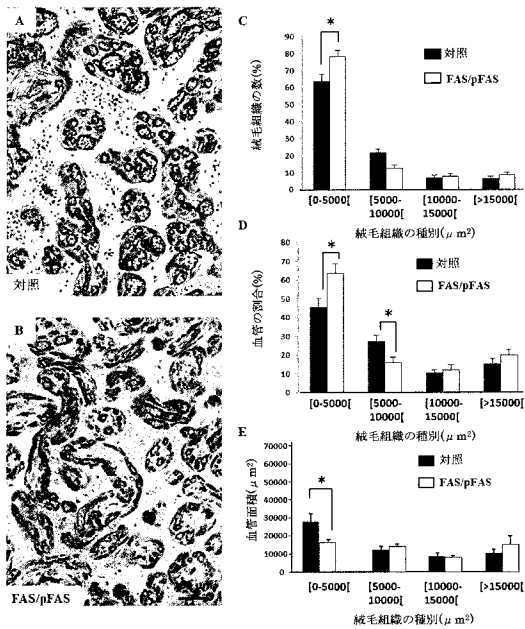
【 図 7 】



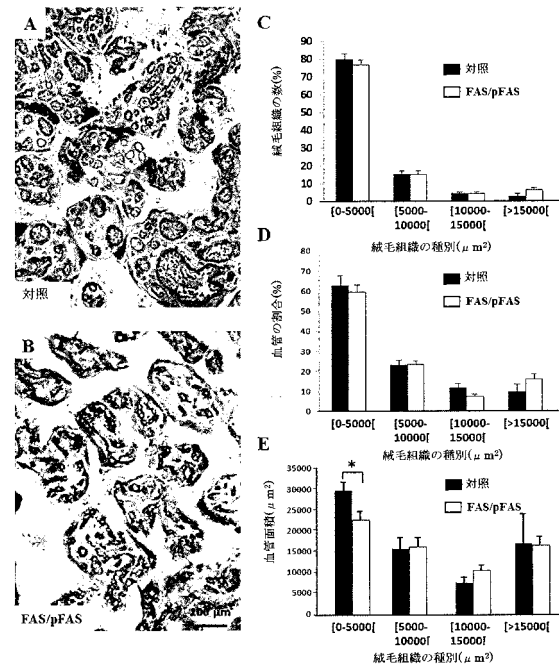
【 図 8 】



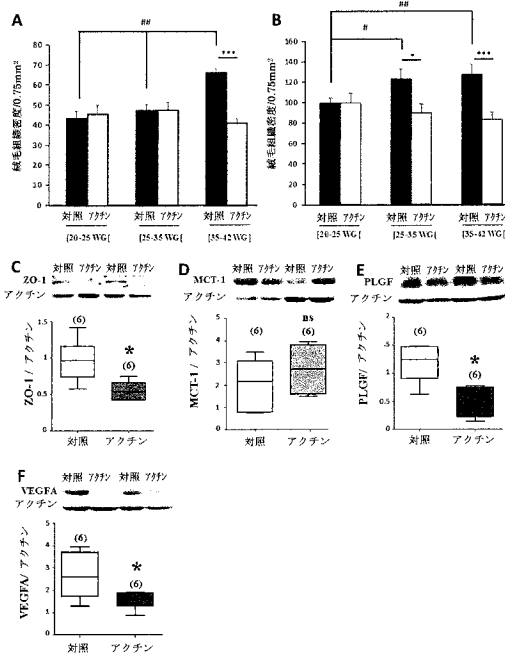
【 図 9 】



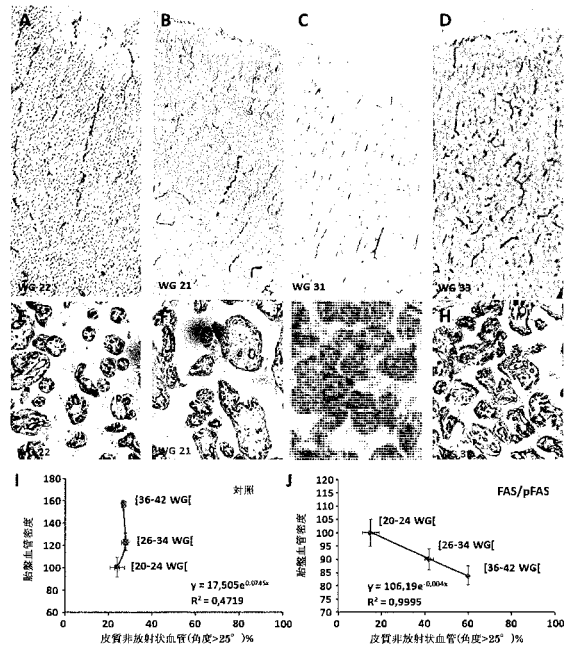
【 図 10 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/064480

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 C12Q1/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, INSPEC, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010/311067 A1 (REDEI EVA E [US] ET AL) 9 December 2010 (2010-12-09) paragraphs [0022] - [0024], [0027], [0028]; example 1	1-13
A	ROSENBERG M J ET AL: "Effects of moderate drinking during pregnancy on placental gene expression", ALCOHOL, PERGAMON PRESS, LONDON, GB, vol. 44, no. 7-8, 1 November 2010 (2010-11-01), pages 673-690, XP027527154, ISSN: 0741-8329 [retrieved on 2010-01-06] abstract tables 2,4 paragraph [Discussion]	1-13
		-/--
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
8 September 2016	19/09/2016	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Adida, Anne	

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/064480

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAGHIGHI POODEH S ET AL: "Alcohol-induced premature permeability in mouse placenta-yolk sac barriers in vivo", PLACENTA, vol. 33, no. 10, 2012, pages 866-873, XP028936965, ISSN: 0143-4004, DOI: 10.1016/J.PLACENTA.2012.07.008 abstract paragraph [03.1]; figure 1 -----	1-13
A	PIIA VUORELA ET AL: "Hepatocyte Growth Factor, Epidermal Growth Factor, and Placenta Growth Factor Concentrations in Peripheral Blood of Pregnant Women With Alcohol Abuse", ALCOHOLISM: CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESEARCH., vol. 26, no. 5, 1 May 2002 (2002-05-01), pages 682-687, XP055261678, US ISSN: 0145-6008, DOI: 10.1111/j.1530-0277.2002.tb02591.x cited in the application the whole document -----	1-13
A	HELSKE S ET AL: "Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors 1, 2 and 3 in Placentas From Normal and Complicated Pregnancies", MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB - BE, vol. 7, no. 2, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 205-210, XP002995374, ISSN: 1360-9947, DOI: 10.1093/MOLEHR/7.2.205 the whole document -----	1-13
A	SYLVIE JÉGOU ET AL: "Prenatal Alcohol Exposure Affects Vasculature Development in the Neonatal Brain", ANNALS OF NEUROLOGY., vol. 72, no. 6, 2012, pages 952-960, XP055261686, BOSTON, US ISSN: 0364-5134, DOI: 10.1002/ana.23699 cited in the application the whole document -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2016/064480

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010311067	A1	09-12-2010	NONE

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2016/064480

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. G01N33/68 C12Q1/68 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) G01N C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, INSPEC, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 2010/311067 A1 (REDEI EVA E [US] ET AL) 9 décembre 2010 (2010-12-09) alinéas [0022] - [0024], [0027], [0028]; exemple 1	1-13
A	----- ROSENBERG M J ET AL: "Effects of moderate drinking during pregnancy on placental gene expression", ALCOHOL, PERGAMON PRESS, LONDON, GB, vol. 44, no. 7-8, 1 novembre 2010 (2010-11-01), pages 673-690, XP027527154, ISSN: 0741-8329 [extrait le 2010-01-06] abrégé tableaux 2,4 alinéa [Discussion] -----	1-13
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
8 septembre 2016		19/09/2016
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Adida, Anne

2

Formulaire PCT/SA210 (deuxième feuille) (avril 2005)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2016/064480

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	HAGHIGHI POODEH S ET AL: "Alcohol-induced premature permeability in mouse placenta-yolk sac barriers in vivo", PLACENTA, vol. 33, no. 10, 2012, pages 866-873, XP028936965, ISSN: 0143-4004, DOI: 10.1016/J.PLACENTA.2012.07.008 abrégé alinéa [03.1]; figure 1 -----	1-13
A	PIIA VUORELA ET AL: "Hepatocyte Growth Factor, Epidermal Growth Factor, and Placenta Growth Factor Concentrations in Peripheral Blood of Pregnant Women With Alcohol Abuse", ALCOHOLISM: CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESEARCH., vol. 26, no. 5, 1 mai 2002 (2002-05-01), pages 682-687, XP055261678, US ISSN: 0145-6008, DOI: 10.1111/j.1530-0277.2002.tb02591.x cité dans la demande le document en entier -----	1-13
A	HELSKE S ET AL: "Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors 1, 2 and 3 in Placentas From Normal and Complicated Pregnancies", MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB - BE, vol. 7, no. 2, 1 janvier 2001 (2001-01-01), pages 205-210, XP002995374, ISSN: 1360-9947, DOI: 10.1093/MOLEHR/7.2.205 le document en entier -----	1-13
A	SYLVIE JÉGOU ET AL: "Prenatal Alcohol Exposure Affects Vasculature Development in the Neonatal Brain", ANNALS OF NEUROLOGY., vol. 72, no. 6, 2012, pages 952-960, XP055261686, BOSTON, US ISSN: 0364-5134, DOI: 10.1002/ana.23699 cité dans la demande le document en entier -----	1-13

2

Formulaire PCT/SA/210 (suite de la deuxième feuille) (avril 2005)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2016/064480

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2010311067	A1	AUCUN	

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/6837 (2018.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 2
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/6813	Z
	C 1 2 Q 1/6837	Z
	C 1 2 N 15/00	1 0 0 Z

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(71) 出願人 505386960
 アンスティテュト ナショナル ド ラ サンテ エ ド ラ ルシエルシュ メディカル (アンセルム)
 フランス国, 7 5 0 1 3 パリ, リュ ド トルビアック 10 1

(74) 代理人 100107342
 弁理士 横田 修孝

(74) 代理人 100155631
 弁理士 榎 保孝

(74) 代理人 100137497
 弁理士 大森 未知子

(74) 代理人 100207907
 弁理士 赤羽 桃子

(72) 発明者 ブルーノ、ホセ、ゴンザレス
 フランス国ラ、ボパリエール、ル、クロ、デ、ティヤール、2 5

(72) 発明者 ステファヌ、マレ
 フランス国ルーアン、リュ、ド、ピオレル、1 2 1

(72) 発明者 マチュー、ジャン、アレクサンドル、ルクイエ
 フランス国ルーアン、ブルバール、オルレアン、8 8、アパルトマン、0 6 0 6

(72) 発明者 アニー、ラケリエール
 フランス国ボンスクール、リュ、ド、ラ、ピエイユ、コト、デュ、カルベール、1 4

(72) 発明者 スメヤ、ベクリ
 フランス国サン、レジェール、デュ、ブル、ドニ、テル、リュ、デュ、カントニー、1 3

(72) 発明者 セリーヌ、ルスウール
 フランス国モン、サンテニャン、パルク、デュ、カイイ、1 5

(72) 発明者 シルビー、マルグリット、アルベルテ、ジェゴ
 フランス国ルーアン、アンパッス、タブレ、4

(72) 発明者 パスカル、イボンヌ、ジョセフィーヌ、マルコレール
 フランス国プレスト、ランプ、デュ、メル、ブラン、2 4

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA19 QQ02 QQ03 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35
 QS25 QS33 QS34 QX02

专利名称(译)	诊断胎儿酒精综合征引起的疾病的方法		
公开(公告)号	JP2018519819A	公开(公告)日	2018-07-26
申请号	JP2017566398	申请日	2016-06-22
[标]申请(专利权)人(译)	鲁昂大学医学中心 法国国家健康医学研究院		
申请(专利权)人(译)	中心Osupitarie统一威赛牛油果尾鲁昂 学院为了国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 (安瑟伦)		
[标]发明人	ブルーノホセゴンザレス ステファヌマレ マチュージャンアレクサンドルルクイエ アニーラケリエール スメヤベクリ セリーヌルスウール シルビーマルグリットアルベルテジェゴ パスカルイボンヌジョセフィーヌマルコレール		
发明人	ブルーノ、ホセ、ゴンザレス ステファヌ、マレ マチュー、ジャン、アレクサンドル、ルクイエ アニー、ラケリエール スメヤ、ベクリ セリーヌ、ルスウール シルビー、マルグリット、アルベルテ、ジェゴ パスカル、イボンヌ、ジョセフィーヌ、マルコレール		
IPC分类号	C12Q1/06 G01N33/53 G01N33/543 G01N37/00 C12Q1/6813 C12Q1/6837 C12N15/00		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/6893 G01N2333/515 G01N2800/38		
FI分类号	C12Q1/06 G01N33/53.M G01N33/53.Y G01N33/53.D G01N33/543.585 G01N37/00.102 C12Q1/6813.Z C12Q1/6837.Z C12N15/00.100.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063 /QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02		
优先权	2015055727 2015-06-22 FR		
其他公开文献	JP6663936B2 JP2018519819A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种诊断由胎儿酒精综合症引起的疾病的方法，所述方法包括测定PLGF（胎盘生长因子）。

(5) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	M
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/53	Y
G O 1 N 37/00 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
C 1 2 Q 1/0813 (2018.01)	G O 1 N 33/543 5 8 5	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-566398 (P2017-566398)	(71) 出願人	511256912
(86) (22) 出願日	平成28年6月22日 (2016. 6. 22)	セントレ	オスピタリエ ユニヴェルシテ
(85) 翻訳文提出日	平成30年2月20日 (2018. 2. 20)	ールド	ルーアン
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/064480	フランス共和国、F-76000	ルーア
(87) 国際公開番号	W02016/207253	ン、リュ	ド ジェルモン 1
(87) 国際公開日	平成28年12月29日 (2016. 12. 29)	(71) 出願人	509017435
(31) 優先権主張番号	1555727	ユニベルシテ、ド、ルーアン、ノルマンテ	
(32) 優先日	平成27年6月22日 (2015. 6. 22)	イー	
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	UNIVERSITE DE ROUEN	
		NORMANDIE	
		フランス・F-76821・モンサン	
		テニャン・セザックス・リュ・トマ・ペケ	
		ット・1	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 胎児性アルコール症候群により引き起こされる障害の診断方法