

(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2017-513021
(P2017-513021A)

(43) 公表日 平成29年5月25日(2017.5.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 C 0 8 6
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
A 6 1 K 31/726 (2006.01)	A 6 1 K 31/726	
A 6 1 K 31/727 (2006.01)	A 6 1 K 31/727	
A 6 1 K 31/737 (2006.01)	A 6 1 K 31/737	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-500456 (P2017-500456)
 (86) (22) 出願日 平成27年3月19日 (2015. 3. 19)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年10月28日 (2016. 10. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2015/001404
 (87) 国際公開番号 W02015/166353
 (87) 国際公開日 平成27年11月5日 (2015. 11. 5)
 (31) 優先権主張番号 61/968, 728
 (32) 優先日 平成26年3月21日 (2014. 3. 21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/969, 520
 (32) 優先日 平成26年3月24日 (2014. 3. 24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 516282640
 アイジェノミクス エセ. エレ.
 スペイン国 エー46980 パテルナ,
 セ/カテドラティコ アグスティン エ
 スカルディノ, 9, パーク サイエ
 ティフィック ウニベルシタット デ バ
 レンシア
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

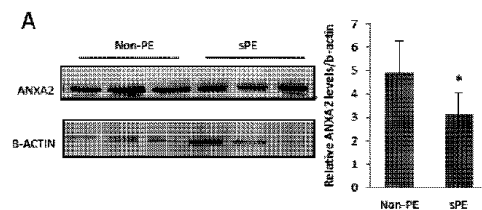
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 子癇前症の早期検出

(57) 【要約】

本発明は、子癇前症 (P E) を有するか、または発症する素因がある女性を確実に同定するための非侵襲性アッセイを提供する。本方法は、被験体から得られた試験試料においてアネキシン A 2 (A N X A 2) のレベルを測定するステップ、および試験試料における A N X A 2 のレベルが対照試料に対して減少している場合、子癇前症を有するか、または子癇前症を発症するリスクが高いと被験体を同定するステップを含む。 P E を有するか、または子癇前症を発症するリスクが高いと同定された被験体を処置するための方法もまた提供される。

FIG. 2



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

子癇前症を処置するための方法であって、

被験体から得られた試験試料においてアネキシン A 2 (A N X A 2) のレベルを測定することにより、前記被験体の子癇前症を発症するリスクが高いかどうかを決定するステップ、

前記試験試料における前記 A N X A 2 のレベルを A N X A 2 の対照レベルと比較して、前記被験体の子癇前症を発症するリスクが高いかどうかを決定するステップ、および子癇前症を発症するリスクが高いと決定された前記被験体に、有効量のグリコサミノグリカンを投与するステップ

10

を含む、方法。

【請求項 2】

前記被験体の子癇前症の病歴をもたない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記試料が、子宮内膜組織、子宮内膜間質細胞、および子宮内膜液の試料からなる群より選択される、請求項 1 ~ 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4】

前記 A N X A 2 の対照レベルが、妊娠に成功したことがあり、かつ子癇前症の病歴をもたない被験体から導かれる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記グリコサミノグリカンが、低分子量ヘパリン、ヘパラン硫酸、化学修飾されたヘパリンまたはヘパラン硫酸、低分子量デルマタン硫酸、およびそれらの混合物からなる群より選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記 A N X A 2 のレベルが、E L I S A、ウェスタンブロット、および免疫組織化学染色からなる群より選択される免疫アッセイを使用して決定される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記被験体が妊娠していることがわかっている、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記被験体が妊娠しようとして試みている、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

子癇前症を診断するか、または子癇前症の診断を補助するための方法であって、

被験体から得られた試験試料においてアネキシン A 2 (A N X A 2) のレベルを測定するステップ、および

前記試験試料における前記 A N X A 2 のレベルを A N X A 2 の対照レベルと比較して、前記被験体の子癇前症を発症するリスクが高いかどうかを決定するステップを含む、方法。

【請求項 10】

前記被験体の子癇前症の病歴をもたない、請求項 9 に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記試料が、子宮内膜組織、子宮内膜間質細胞、および子宮内膜液の試料からなる群より選択される、請求項 9 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

対照試料が、妊娠に成功したことがあり、かつ子癇前症の病歴をもたない被験体から得られる、請求項 9 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記 A N X A 2 のレベルが、E L I S A、ウェスタンブロット、および免疫組織化学染色からなる群より選択される免疫アッセイを使用して決定される、請求項 9 ~ 12 のい

50

れか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記被験体が妊娠していることがわかっている、請求項 9 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記被験体が妊娠しようとして試みている、請求項 9 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

子癇前症を処置するための方法であって、

現在、子癇前症を有していない被験体の子宮内膜液試料を得るステップであって、前記被験体が妊娠しているか、または前記被験体が妊娠する計画を有する、ステップ、

前記子宮内膜液試料において ANXA2 のレベルを決定するアッセイを実施するステップ、

前記子宮内膜液試料中の前記 ANXA2 のレベルを ANXA2 の対照レベルと比較して、前記被験体が子癇前症を発症するリスクが高いかどうかを決定するステップ、および

前記被験体が子癇前症を発症するリスクが高いと決定された場合には、有効量のグリコサミノグリカンを前記被験体に投与するステップ

を含む、方法。

【請求項 17】

前記被験体が子癇前症の病歴をもたない、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記 ANXA2 の対照レベルが、妊娠に成功したことがあり、かつ子癇前症の病歴をもたない被験体から導かれる、請求項 16 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記グリコサミノグリカンが、低分子量ヘパリン、ヘパラン硫酸、化学修飾されたヘパリンまたはヘパラン硫酸、低分子量デルマタン硫酸、およびそれらの混合物からなる群より選択される、請求項 16 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記 ANXA2 のレベルが、ELISA、ウェスタンブロット、および免疫組織化学染色からなる群より選択される免疫アッセイを使用して決定される、請求項 16 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

子癇前症を処置するための方法であって、

ANXA2 の対照レベルと比較して低レベルの ANXA2 を有し、妊娠する計画を有し、かつ子癇前症の病歴をもたない被験体を同定するステップ、および

グリコサミノグリカンを、前記被験体において前記 ANXA2 のレベルを上昇させるのに十分な量で前記被験体に投与するステップ

を含む、方法。

【請求項 22】

前記 ANXA2 の対照レベルが、妊娠に成功したことがあり、かつ子癇前症の病歴をもたない被験体から導かれる、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記グリコサミノグリカンが、低分子量ヘパリン、ヘパラン硫酸、化学修飾されたヘパリンまたはヘパラン硫酸、低分子量デルマタン硫酸、およびそれらの混合物からなる群より選択される、請求項 21 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記 ANXA2 のレベルが、ELISA、ウェスタンブロット、および免疫組織化学染色からなる群より選択される免疫アッセイを使用して決定される、請求項 21 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

子癇前症についてのグリコサミノグリカン治療の効力を評価するための方法であって、

10

20

30

40

50

子癇前症を有するか、または子癇前症を発症するリスクが高い被験体を有効量のグリコサミノグリカンで処置するステップ、

グリコサミノグリカンでの前記処置前および前記処置後、前記被験体から得られた試験試料においてアネキシン A 2 (ANXA2) のレベルを測定するステップであって、処置前の前記レベルに対する処置後の前記 ANXA2 のレベルの増加が、前記グリコサミノグリカン治療が有効であることを示す、ステップを含む、方法。

【請求項 26】

前記グリコサミノグリカンが、低分子量ヘパリン、ヘパラン硫酸、化学修飾されたヘパリンまたはヘパラン硫酸、低分子量デルマトタン硫酸、およびそれらの混合物からなる群より選択される、請求項 25 に記載の方法。

10

【請求項 27】

前記 ANXA2 のレベルが、ELISA、ウェスタンブロット、および免疫組織化学染色からなる群より選択される免疫アッセイを使用して決定される、請求項 25 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

この出願は、米国特許法 § 119 (e) の下、2014 年 3 月 21 日に提出された米国仮出願第 61/968,728 号および 2014 年 3 月 24 日に提出された米国仮出願第 61/969,520 号（これらの内容は、それらの全体が参考として本明細書に援用される）の利益を主張する。

20

【0002】

本発明は、一般的に、子癇前症についてのバイオマーカー、およびこの疾患を処置するための方法に関する。

【背景技術】

【0003】

子癇前症 (PE) は、妊産婦および胎児の罹患および死亡の主な原因であり、妊娠の 4% ~ 8% を冒し、1 年あたり世界中で 8 百万人超の症例を引き起こしている。臨床的には、子癇前症は、高血圧、蛋白尿、浮腫、ならびに一部の患者においては、HELLP 症候群および子癇の存在によって定義される。子癇前症を正確に予測することができるマーカーを開発するために多大な努力がなされてきた。母体の子宮動脈における生化学的マーカーおよび血流のドップラー超音波測定が広範囲に試験されているが、これまで、これらのどれも広汎な臨床的使用の達成に至っていない (Conde - Agudelo ら、Obstet General 2004 年、104 巻、1367 ~ 91 頁)。子癇前症を予測するための信頼でき、かつ臨床的に有用なマーカーを開発するための必要性が依然としてある。子癇前症を発症するリスクがある妊婦を同定し得ることにより、子癇前症発症を防ぐのに有効であることが公知である予防薬の使用が可能になり得る。

30

【先行技術文献】

40

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】Conde - Agudelo ら、Obstet General (2004 年) 104 巻、1367 ~ 91 頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、PE を発症する素因がある女性を確実に同定するための非侵襲性アッセイを提供する。これにより、PE を防ぎ、または軽減する適切な治療での早期介入が可能になる。本発明は、子宮内膜のアネキシン A 2 (ANXA2) レベルが、正常に (健康に) 妊

50

娠した女性におけるレベルと比較して、以前の妊娠において子癇前症（PE）を有した女性において減少しているという発見に、少なくとも部分的に、基づいている。

【0006】

本発明の一部の態様によれば、子癇前症を処置するための方法が提供される。本方法は、被験体から得られた試験試料においてアネキシンA2（ANXA2）のレベルを測定することにより、被験体の子癇前症を発症するリスクが高いかどうかを決定するステップ、試験試料におけるANXA2のレベルをANXA2の対照レベルと比較して、被験体の子癇前症を発症するリスクが高いかどうかを決定するステップ、および子癇前症を発症するリスクが高いと決定された被験体に、有効量のグリコサミノグリカンを投与するステップを含む。

10

【0007】

一部の実施形態では、被験体は子癇前症の病歴をもたない。一部の実施形態では、試料は、子宮内膜組織、子宮内膜間質細胞、および子宮内膜液（endometrial fluid）の試料からなる群より選択される。一部の実施形態では、ANXA2の対照レベルは、妊娠に成功したことがあり、かつ子癇前症の病歴をもたない被験体から導かれる。一部の実施形態では、グリコサミノグリカンは、低分子量ヘパリン、ヘパラン硫酸、化学修飾されたヘパリンまたはヘパラン硫酸、低分子量デルマトン硫酸、およびそれらの混合物からなる群より選択される。一部の実施形態では、ANXA2のレベルは、ELISA、ウェスタンブロット、および免疫組織化学染色からなる群より選択される免疫アッセイを使用して決定される。一部の実施形態では、被験体は、妊娠していることがわかっている。一部の実施形態では、被験体は、妊娠しようと試みている。

20

【0008】

本発明の一部の態様は、子癇前症を診断するか、または子癇前症の診断を補助するための方法を提供する。本方法は、被験体から得られた試験試料においてアネキシンA2（ANXA2）のレベルを測定するステップ、および試験試料におけるANXA2のレベルをANXA2の対照レベルと比較して、被験体の子癇前症を発症するリスクが高いかどうかを決定するステップを含む。

【0009】

一部の実施形態では、被験体は子癇前症の病歴をもたない。一部の実施形態では、試料は、子宮内膜組織、子宮内膜間質細胞、および子宮内膜液の試料からなる群より選択される。一部の実施形態では、対照試料は、妊娠に成功したことがあり、かつ子癇前症の病歴をもたない被験体から得られる。一部の実施形態では、ANXA2のレベルは、ELISA、ウェスタンブロット、および免疫組織化学染色からなる群より選択される免疫アッセイを使用して決定される。一部の実施形態では、被験体は、妊娠していることがわかっている。一部の実施形態では、被験体は、妊娠しようと試みている。

30

【0010】

本発明の一部の態様は、子癇前症を処置するための方法を提供する。本方法は、現在、子癇前症を有していない被験体の子宮内膜液試料を得るステップであって、被験体が妊娠しているか、または被験体が妊娠する計画を有する、ステップ、子宮内膜液試料においてANXA2のレベルを決定するアッセイを実施するステップ、子宮内膜液試料におけるANXA2のレベルをANXA2の対照レベルと比較して、被験体の子癇前症を発症するリスクが高いかどうかを決定するステップ、および被験体の子癇前症を発症するリスクが高いと決定された場合には、有効量のグリコサミノグリカンを被験体に投与するステップを含む。

40

【0011】

一部の実施形態では、被験体は子癇前症の病歴をもたない。一部の実施形態では、ANXA2の対照レベルは、妊娠に成功したことがあり、かつ子癇前症の病歴をもたない被験体から導かれる。一部の実施形態では、グリコサミノグリカンは、低分子量ヘパリン、ヘパラン硫酸、化学修飾されたヘパリンまたはヘパラン硫酸、低分子量デルマトン硫酸、およびそれらの混合物からなる群より選択される。一部の実施形態では、ANXA2のレベ

50

ルは、E L I S A、ウェスタンブロット、および免疫組織化学染色からなる群より選択される免疫アッセイを使用して決定される。

【0012】

本発明の一部の態様は、子癇前症を処置するための方法を提供する。本方法は、A N X A 2の対照レベルと比較して低レベルのA N X A 2を有し、妊娠する計画を有し、かつ子癇前症の病歴をもたない被験体を同定するステップ、およびグリコサミノグリカンを、被験体においてA N X A 2のレベルを上昇させるのに十分な量で被験体に投与するステップを含む。

【0013】

一部の実施形態では、A N X A 2の対照レベルは、妊娠に成功したことがあり、かつ子癇前症の病歴をもたない被験体から導かれる。一部の実施形態では、グリコサミノグリカンは、低分子量ヘパリン、ヘパラン硫酸、化学修飾されたヘパリンまたはヘパラン硫酸、低分子量デルマタン硫酸、およびそれらの混合物からなる群より選択される。一部の実施形態では、A N X A 2のレベルは、E L I S A、ウェスタンブロット、および免疫組織化学染色からなる群より選択される免疫アッセイを使用して決定される。

10

【0014】

本発明の一部の態様は、子癇前症についてのグリコサミノグリカン治療の効力を評価するための方法を提供する。本方法は、子癇前症を有するか、または子癇前症を発症するリスクが高い被験体を有効量のグリコサミノグリカンで処置するステップ、グリコサミノグリカンでの処置前および処置後、被験体から得られた試験試料においてアネキシンA 2 (A N X A 2)のレベルを測定するステップであって、処置前のレベルに対する処置後のA N X A 2のレベルの増加が、グリコサミノグリカン治療が有効であることを示すステップを含む。

20

【0015】

一部の実施形態では、グリコサミノグリカンは、低分子量ヘパリン、ヘパラン硫酸、化学修飾されたヘパリンまたはヘパラン硫酸、低分子量デルマタン硫酸、およびそれらの混合物からなる群より選択される。一部の実施形態では、A N X A 2のレベルは、E L I S A、ウェスタンブロット、および免疫組織化学染色からなる群より選択される免疫アッセイを使用して決定される。

【0016】

本発明の限定のそれぞれは、本発明の様々な実施形態を包含し得る。したがって、任意の1つの要素または要素の組合せを含む本発明の限定のそれぞれが、本発明の各態様に含まれ得ることは予想される。この発明は、その出願において、以下の説明に示され、または図面に図示された構築の詳細および構成要素の配置に限定されない。本発明は、他の実施形態を含むことができ、かつ様々な様式で実施、または実行することができる。また、本明細書で使用される語句および用語は、説明のためであり、限定としてみなされるべきではない。本明細書における「を含むこと (i n c l u d i n g)」、「を含むこと (c o m p r i s i n g)」、または「有すること (h a v i n g)」、「含有すること (c o n t a i n i n g)」、「含むこと (i n v o l v i n g)」、およびその変形の使用は、その後列挙された項目およびその等価物、加えて追加の項目を包含することを意図される。

30

40

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1A】図1は、以前の妊娠においてs P Eを患ったことがある患者におけるi n v i t r oでのh E S C脱落膜化 (d e c i d u a l i z a t i o n)を示す。図1Aおよび1Bは、以前の妊娠において重篤な子癇前症 (s P E)を患ったことがある女性 (n = 1 3)および対照患者 (非 P E) (n = 1 3)由来の、脱落膜対非脱落膜h E S CにおいてE L I S Aによって測定されたプロラクチンおよびI G F B P - 1分泌を示す。プロラクチンおよびI G F B P - 1分泌は、非脱落膜 (黒色バー)および脱落膜化 (灰色バー)におけるn g / m l (平均値 ± s d)として提示され、中央値がグラフ上に図式化された

50

。図1Bは、ELISAによって測定されたIGFBP-1分泌を示す。図1Cは、*in vitro*脱落膜化がsPEおよび非PE由来のhESCに誘導された場合の、非脱落膜hESCと比較した、F-アクチンリモデリングを示す。*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.005$ 。

【図1B】図1は、以前の妊娠においてsPEを患ったことがある患者における*in vitro*でのhESC脱落膜化を示す。図1Aおよび1Bは、以前の妊娠において重篤な子癇前症(sPE)を患ったことがある女性($n = 13$)および対照患者(非PE)($n = 13$)由来の、脱落膜対非脱落膜hESCにおいてELISAによって測定されたプロラクチンおよびIGFBP-1分泌を示す。プロラクチンおよびIGFBP-1分泌は、非脱落膜(黒色バー)および脱落膜化(灰色バー)における ng/ml (平均値 \pm sd)として提示され、中央値がグラフ上に図式化された。図1Bは、ELISAによって測定されたIGFBP-1分泌を示す。図1Cは、*in vitro*脱落膜化がsPEおよび非PE由来のhESCに誘導された場合の、非脱落膜hESCと比較した、F-アクチンリモデリングを示す。*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.005$ 。

10

【図1C】図1は、以前の妊娠においてsPEを患ったことがある患者における*in vitro*でのhESC脱落膜化を示す。図1Aおよび1Bは、以前の妊娠において重篤な子癇前症(sPE)を患ったことがある女性($n = 13$)および対照患者(非PE)($n = 13$)由来の、脱落膜対非脱落膜hESCにおいてELISAによって測定されたプロラクチンおよびIGFBP-1分泌を示す。プロラクチンおよびIGFBP-1分泌は、非脱落膜(黒色バー)および脱落膜化(灰色バー)における ng/ml (平均値 \pm sd)として提示され、中央値がグラフ上に図式化された。図1Bは、ELISAによって測定されたIGFBP-1分泌を示す。図1Cは、*in vitro*脱落膜化がsPEおよび非PE由来のhESCに誘導された場合の、非脱落膜hESCと比較した、F-アクチンリモデリングを示す。*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.005$ 。

20

【図2-1】図2は、sPEにおけるANXA2の免疫組織化学およびウェスタンブロット分析を示す。図2Aは、SDS-PAGEに供され、ANXA2抗体でイムノプロットングされた、重篤な子癇前症(sPE)の子宮内膜の生検材料から抽出された細胞内総タンパク質、およびハウスキーピングタンパク質、 α -アクチンを示す。ANXA2の濃度測定分析を、3つの異なる実験から実施し、GAPDHで正規化した。図2Bは、非PEおよびsPE子宮内膜組織において観察されたANXA2含有量の染色プロフィールを示す。図2Cは、sPEおよび非PE患者のhESC脱落膜化および非脱落膜化子宮内膜から得られた細胞内総タンパク質抽出物のANXA2ウェスタンブロットおよび濃度測定分析を示す。図2Dは、タンパク質抽出物および馴化培地hESC、それぞれの細胞内ANXA2分析および細胞外ANXA2分析を示す。ANXA2タンパク質を、ELISAにより測定し、3つの異なる実験からの ng/mL (平均値 \pm sd)として表した。*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.005$ 。

30

【図2-2】図2は、sPEにおけるANXA2の免疫組織化学およびウェスタンブロット分析を示す。図2Aは、SDS-PAGEに供され、ANXA2抗体でイムノプロットングされた、重篤な子癇前症(sPE)の子宮内膜の生検材料から抽出された細胞内総タンパク質、およびハウスキーピングタンパク質、 α -アクチンを示す。ANXA2の濃度測定分析を、3つの異なる実験から実施し、GAPDHで正規化した。図2Bは、非PEおよびsPE子宮内膜組織において観察されたANXA2含有量の染色プロフィールを示す。図2Cは、sPEおよび非PE患者のhESC脱落膜化および非脱落膜化子宮内膜から得られた細胞内総タンパク質抽出物のANXA2ウェスタンブロットおよび濃度測定分析を示す。図2Dは、タンパク質抽出物および馴化培地hESC、それぞれの細胞内ANXA2分析および細胞外ANXA2分析を示す。ANXA2タンパク質を、ELISAにより測定し、3つの異なる実験からの ng/mL (平均値 \pm sd)として表した。*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.005$ 。

40

【図2-3】図2は、sPEにおけるANXA2の免疫組織化学およびウェスタンブロット分析を示す。図2Aは、SDS-PAGEに供され、ANXA2抗体でイムノプロット

50

ィングされた、重篤な子癇前症 (sPE) の子宮内膜の生検材料から抽出された細胞内総タンパク質、およびハウスキーピングタンパク質、 α -アクチンを示す。ANXA2の濃度測定分析を、3つの異なる実験から実施し、GAPDHで正規化した。図2Bは、非PEおよびsPE子宮内膜組織において観察されたANXA2含有量の染色プロフィールを示す。図2Cは、sPEおよび非PE患者のhESC脱落膜化および非脱落膜化子宮内膜から得られた細胞内総タンパク質抽出物のANXA2ウェスタンブロットおよび濃度測定分析を示す。図2Dは、タンパク質抽出物および馴化培地hESC、それぞれの細胞内ANXA2分析および細胞外ANXA2分析を示す。ANXA2タンパク質を、ELISAにより測定し、3つの異なる実験からのng/mL (平均値 \pm sd)として表した。*、 $P < 0.05$; **、 $P < 0.005$ 。

【図3-1】図3は、ANXA2阻害の*in vitro*脱落膜化への効果を示す。図3Aは、非処理hESCと比較した、2つの系：P4+E2およびcAMP+MPAによる脱落膜hESCのANXA2ウェスタンブロットおよび濃度測定分析を示す。図3Bは、3つの異なる実験における、ELISAにより測定された、脱落膜化し、かつ処理されていないhESCの馴化培地における細胞外ANXA2レベルを示す。対照細胞 (トランスフェクションされていない)、スクランブル配列 (対照siRNA) をトランスフェクションされた細胞、またはANXA2特異的siRNA (ANXA2 siRNA) をトランスフェクションされた細胞のmRNA (図3C) およびタンパク質のANXA2レベル (図3D) を、RT-PCRおよびウェスタンブロット分析により評価した。図3Eおよび3Fは、対照およびANXA2 siRNA阻害hESCの馴化培地におけるELISAにより測定されたPRLおよびIGFBP-1レベルを示す。図3Gは、ローダミンファロイジン染色により可視化された、対照、対照siRNA、およびANXA2阻害hESCにおけるF-アクチン構造を示す。図3Hは、*in vivo*アッセイにより分析されたG-アクチン (可溶性)、F-アクチン (線維状)、および総アクチン画分を示し、その結果は、ANXA2阻害hESCおよび対照hESCにおけるウェスタンブロット分析により観察された。濃度測定分析を、3つの異なる実験から実施し、G/Fアクチン比として表し、総アクチンで正規化した。

【図3-2】図3は、ANXA2阻害の*in vitro*脱落膜化への効果を示す。図3Aは、非処理hESCと比較した、2つの系：P4+E2およびcAMP+MPAによる脱落膜hESCのANXA2ウェスタンブロットおよび濃度測定分析を示す。図3Bは、3つの異なる実験における、ELISAにより測定された、脱落膜化し、かつ処理されていないhESCの馴化培地における細胞外ANXA2レベルを示す。対照細胞 (トランスフェクションされていない)、スクランブル配列 (対照siRNA) をトランスフェクションされた細胞、またはANXA2特異的siRNA (ANXA2 siRNA) をトランスフェクションされた細胞のmRNA (図3C) およびタンパク質のANXA2レベル (図3D) を、RT-PCRおよびウェスタンブロット分析により評価した。図3Eおよび3Fは、対照およびANXA2 siRNA阻害hESCの馴化培地におけるELISAにより測定されたPRLおよびIGFBP-1レベルを示す。図3Gは、ローダミンファロイジン染色により可視化された、対照、対照siRNA、およびANXA2阻害hESCにおけるF-アクチン構造を示す。図3Hは、*in vivo*アッセイにより分析されたG-アクチン (可溶性)、F-アクチン (線維状)、および総アクチン画分を示し、その結果は、ANXA2阻害hESCおよび対照hESCにおけるウェスタンブロット分析により観察された。濃度測定分析を、3つの異なる実験から実施し、G/Fアクチン比として表し、総アクチンで正規化した。

【図3-3】図3は、ANXA2阻害の*in vitro*脱落膜化への効果を示す。図3Aは、非処理hESCと比較した、2つの系：P4+E2およびcAMP+MPAによる脱落膜hESCのANXA2ウェスタンブロットおよび濃度測定分析を示す。図3Bは、3つの異なる実験における、ELISAにより測定された、脱落膜化し、かつ処理されていないhESCの馴化培地における細胞外ANXA2レベルを示す。対照細胞 (トランスフェクションされていない)、スクランブル配列 (対照siRNA) をトランスフェクシ

10

20

30

40

50

オンされた細胞、またはANXA2特異的siRNA (ANXA2 siRNA) をトランスフェクションされた細胞のmRNA (図3C) およびタンパク質のANXA2レベル (図3D) を、RT-PCRおよびウェスタンブロット分析により評価した。図3Eおよび3Fは、対照およびANXA2 siRNA阻害hESCの馴化培地におけるELISAにより測定されたPRLおよびIGFBP-1レベルを示す。図3Gは、ローダミンファロイジン染色により可視化された、対照、対照siRNA、およびANXA2阻害hESCにおけるF-アクチン構造を示す。図3Hは、*in vivo*アッセイにより分析されたG-アクチン(可溶性)、F-アクチン(線維状)、および総アクチン画分を示し、その結果は、ANXA2阻害hESCおよび対照hESCにおけるウェスタンブロット分析により観察された。濃度測定分析を、3つの異なる実験から実施し、G/Fアクチン比として表し、総アクチンで正規化した。

10

【図4A】図4は、ANXA2阻害hESCの運動性、トロホブラスト拡散 (spreading) および浸潤の分析を示す。図4Aは、対照hESCおよびANXA2阻害hESCにおける創傷治癒アッセイを示す。創傷幅を、創傷後0時間目および24時間目に測定した。創傷閉鎖のパーセンテージを、画像分析により決定した。値は、3つの異なる実験からの10個の測定値の平均値である。図4Bは、ANXA2 siRNAをトランスフェクションされ、その後、胚付着が起きるまでマウス胚盤胞と共培養されたhESCを示す。48時間後、hESCをビメンチンに関して免疫染色し、マウストロホブラスト細胞をE-カドヘリンに関して免疫染色した。hESC上のマウス胚盤胞拡散を白線で取り囲み、面積を、ピクセルで測定した。図4Cは、ANXA2阻害hESCにおけるヒトトロホブラストJEG-3細胞浸潤の効果を測定するために使用したコラーゲンtranswell浸潤アッセイの概略図を示す。ヒストグラムは、対照細胞の浸潤を100%と指定した、JEG-3浸潤細胞のパーセンテージを示す。データは、3つの独立した実験の平均値を表す。*、 $P < 0.05$; **、 $P < 0.005$ 。

20

【図4B】図4は、ANXA2阻害hESCの運動性、トロホブラスト拡散 (spreading) および浸潤の分析を示す。図4Aは、対照hESCおよびANXA2阻害hESCにおける創傷治癒アッセイを示す。創傷幅を、創傷後0時間目および24時間目に測定した。創傷閉鎖のパーセンテージを、画像分析により決定した。値は、3つの異なる実験からの10個の測定値の平均値である。図4Bは、ANXA2 siRNAをトランスフェクションされ、その後、胚付着が起きるまでマウス胚盤胞と共培養されたhESCを示す。48時間後、hESCをビメンチンに関して免疫染色し、マウストロホブラスト細胞をE-カドヘリンに関して免疫染色した。hESC上のマウス胚盤胞拡散を白線で取り囲み、面積を、ピクセルで測定した。図4Cは、ANXA2阻害hESCにおけるヒトトロホブラストJEG-3細胞浸潤の効果を測定するために使用したコラーゲンtranswell浸潤アッセイの概略図を示す。ヒストグラムは、対照細胞の浸潤を100%と指定した、JEG-3浸潤細胞のパーセンテージを示す。データは、3つの独立した実験の平均値を表す。*、 $P < 0.05$; **、 $P < 0.005$ 。

30

【図4C】図4は、ANXA2阻害hESCの運動性、トロホブラスト拡散 (spreading) および浸潤の分析を示す。図4Aは、対照hESCおよびANXA2阻害hESCにおける創傷治癒アッセイを示す。創傷幅を、創傷後0時間目および24時間目に測定した。創傷閉鎖のパーセンテージを、画像分析により決定した。値は、3つの異なる実験からの10個の測定値の平均値である。図4Bは、ANXA2 siRNAをトランスフェクションされ、その後、胚付着が起きるまでマウス胚盤胞と共培養されたhESCを示す。48時間後、hESCをビメンチンに関して免疫染色し、マウストロホブラスト細胞をE-カドヘリンに関して免疫染色した。hESC上のマウス胚盤胞拡散を白線で取り囲み、面積を、ピクセルで測定した。図4Cは、ANXA2阻害hESCにおけるヒトトロホブラストJEG-3細胞浸潤の効果を測定するために使用したコラーゲンtranswell浸潤アッセイの概略図を示す。ヒストグラムは、対照細胞の浸潤を100%と指定した、JEG-3浸潤細胞のパーセンテージを示す。データは、3つの独立した実験の平均値を表す。*、 $P < 0.05$; **、 $P < 0.005$ 。

40

50

【図5-1】図5は、ANXA2阻害hESCおよびsPE hESCにおける線維素溶解活性を示す。図5Aは、3つの異なる実験においてELISAにより評価され、かつ中央値pg/mLとして表された、ANXA2阻害hESCおよびsPE患者由来のhESCの馴化培地におけるプラスミノゲンレベルを示す。図5Bは、蛍光定量的機能アッセイにより評価され、かつ活性プラスミンのmM濃度として表された、hESC馴化培地と共に存在するプラスミン活性を示す。3つの異なる実験において、ELISAにより、MMP2(図5C)およびMMP9(図5D)のタンパク質レベルを、ANXA2阻害hESCおよびsPE hESCの馴化培地において評価した。図5Eは、50µg/mLまたは100µg/mLのヘパリンで処理され、かつ0分間、15分間、30分間、および60分間の区間中でのプラスミノゲンレベルについて分析した、対照、対照siRNA、ANXA2 siRNA、およびsPEのhESCを示し、処理なしの場合も示す。図5Eは、100µg/mLのヘパリンで処理され、または処理されていないANXA2阻害hESCおよびsPE hESCの馴化培地において測定されたプラスミン活性を示す。図5Fは、ヘパリン用量で処理されたhESCの馴化培地において分泌されたANXA2タンパク質を示す。MMP2(図5H)およびMMP9(図5G)レベルを、ヘパリン処理hESCの馴化培地においてELISAにより評価した。

【図5-2】図5は、ANXA2阻害hESCおよびsPE hESCにおける線維素溶解活性を示す。図5Aは、3つの異なる実験においてELISAにより評価され、かつ中央値pg/mLとして表された、ANXA2阻害hESCおよびsPE患者由来のhESCの馴化培地におけるプラスミノゲンレベルを示す。図5Bは、蛍光定量的機能アッセイにより評価され、かつ活性プラスミンのmM濃度として表された、hESC馴化培地と共に存在するプラスミン活性を示す。3つの異なる実験において、ELISAにより、MMP2(図5C)およびMMP9(図5D)のタンパク質レベルを、ANXA2阻害hESCおよびsPE hESCの馴化培地において評価した。図5Eは、50µg/mLまたは100µg/mLのヘパリンで処理され、かつ0分間、15分間、30分間、および60分間の区間中でのプラスミノゲンレベルについて分析した、対照、対照siRNA、ANXA2 siRNA、およびsPEのhESCを示し、処理なしの場合も示す。図5Eは、100µg/mLのヘパリンで処理され、または処理されていないANXA2阻害hESCおよびsPE hESCの馴化培地において測定されたプラスミン活性を示す。図5Fは、ヘパリン用量で処理されたhESCの馴化培地において分泌されたANXA2タンパク質を示す。MMP2(図5H)およびMMP9(図5G)レベルを、ヘパリン処理hESCの馴化培地においてELISAにより評価した。

【図5-3】図5は、ANXA2阻害hESCおよびsPE hESCにおける線維素溶解活性を示す。図5Aは、3つの異なる実験においてELISAにより評価され、かつ中央値pg/mLとして表された、ANXA2阻害hESCおよびsPE患者由来のhESCの馴化培地におけるプラスミノゲンレベルを示す。図5Bは、蛍光定量的機能アッセイにより評価され、かつ活性プラスミンのmM濃度として表された、hESC馴化培地と共に存在するプラスミン活性を示す。3つの異なる実験において、ELISAにより、MMP2(図5C)およびMMP9(図5D)のタンパク質レベルを、ANXA2阻害hESCおよびsPE hESCの馴化培地において評価した。図5Eは、50µg/mLまたは100µg/mLのヘパリンで処理され、かつ0分間、15分間、30分間、および60分間の区間中でのプラスミノゲンレベルについて分析した、対照、対照siRNA、ANXA2 siRNA、およびsPEのhESCを示し、処理なしの場合も示す。図5Eは、100µg/mLのヘパリンで処理され、または処理されていないANXA2阻害hESCおよびsPE hESCの馴化培地において測定されたプラスミン活性を示す。図5Fは、ヘパリン用量で処理されたhESCの馴化培地において分泌されたANXA2タンパク質を示す。MMP2(図5H)およびMMP9(図5G)レベルを、ヘパリン処理hESCの馴化培地においてELISAにより評価した。

【図5-4】図5は、ANXA2阻害hESCおよびsPE hESCにおける線維素溶解活性を示す。図5Aは、3つの異なる実験においてELISAにより評価され、かつ中

央値 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として表された、ANXA2 阻害 hESC および sPE 患者由来の hESC の馴化培地におけるプラスミノゲンレベルを示す。図 5 B は、蛍光定量的機能アッセイにより評価され、かつ活性プラスミンの mM 濃度として表された、hESC 馴化培地と共に存在するプラスミン活性を示す。3つの異なる実験において、ELISA により、MMP2 (図 5 C) および MMP9 (図 5 D) のタンパク質レベルを、ANXA2 阻害 hESC および sPE hESC の馴化培地において評価した。図 5 E は、 $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ または $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ のヘパリンで処理され、かつ 0 分間、15 分間、30 分間、および 60 分間の区間中でのプラスミノゲンレベルについて分析した、対照、対照 siRNA、ANXA2 siRNA、および sPE の hESC を示し、処理なしの場合も示す。図 5 E は、 $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ のヘパリンで処理され、または処理されていない ANXA2 阻害 hESC および sPE hESC の馴化培地において測定されたプラスミン活性を示す。図 5 F は、ヘパリン用量で処理された hESC の馴化培地において分泌された ANXA2 タンパク質を示す。MMP2 (図 5 H) および MMP9 (図 5 G) レベルを、ヘパリン処理 hESC の馴化培地において ELISA により評価した。

【図 6】図 6 は、少なくとも部分的に ANXA2 欠乏により媒介される、sPE に存在する hESC 脱落膜化抵抗性を、PE の母体における原因としての浅いトロホプラスト浸潤および線維素溶解の変化と共に組み込んだモデルを示す。

【図 7】図 7 は、子宮内膜液における ANXA2 レベルの研究を示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明は、子宮内膜のアネキシン A2 (ANXA2) レベルが、正常に妊娠した女性におけるレベルと比較して、以前の妊娠において子癇前症 (PE) を有した女性において減少しているという発見に、少なくとも一部、基づいている。本発明の方法は、PE を発症する素因がある女性を確実に同定するための非侵襲性アッセイを提供する。したがって、本発明は、症状が発生する前に PE を発症する素因の早期検出を可能にし、それにより、適切な治療を、時期を逃さずに開始することを可能にする。本発明のもう一つの利点は、子癇前症のリスクが高いと決定されている女性が、子癇前症を防ぎ、または軽減するために ANXA2 レベルを増加させる薬剤で処置することができることである。

【0019】

子癇前症 (PE) は、以前には正常な血圧であった女性において妊娠 20 週間後に起きる高血圧 (収縮期血圧 $140\ \text{mmHg}$ および / または拡張期血圧 $90\ \text{mmHg}$) により特徴付けられる状態である。加えて、正常と比較して、尿中のタンパク質のレベルの増加がある。蛋白尿の増加は、24 時間分の尿の収集において $300\ \text{mg}$ と定義される (The National High Blood Pressure Education Program Working Group Report on High Blood Pressure in Pregnancy, Am J Obstet General 2000 年、183 巻、S1 ~ S22 頁)。血圧の上昇に伴って、頭痛、腹痛、出血問題、痙攣、ならびに胎児成長不良、早産、およびさらに胎児または母親の死亡などの合併症などの関連した徴候および症状があり得る。頻度は、全妊娠の 5 ~ 8 % であるが、ある特定の群、例えば、双生児を身ごもる女性において非常に高くあり得る。

【0020】

本発明の一態様によれば、子癇前症を処置するための方法が提供される。本方法は、被験体から得られた試験試料においてアネキシン A2 (ANXA2) のレベルを測定することにより、被験体が子癇前症を有するか、または子癇前症を発症するリスクが高いかどうかを決定するステップ、試験試料における ANXA2 のレベルを ANXA2 の対照レベルと比較して、被験体が子癇前症を有するか、または子癇前症を発症するリスクが高いかどうかを決定するステップ、および子癇前症を発症するリスクが高いと決定された被験体に、ANXA2 のレベルを上昇させることが公知の有効量の薬剤を投与するステップを含む。

【0021】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、本方法は、被験体から得られた試験試料においてアネキシン A 2 (ANXA2) のレベルを測定することにより、被験体の子癇前症を発症するリスクが高いかどうかを決定するステップ、試験試料における ANXA2 のレベルを ANXA2 の対照レベルと比較して、被験体の子癇前症を発症するリスクが高いかどうかを決定するステップ、および子癇前症を発症するリスクが高いと決定された被験体に、有効量のグリコサミノグリカンを投与するステップを含む。

【0022】

本発明の一態様によれば、子癇前症を診断するか、または子癇前症の診断を補助するための方法が提供される。本方法は、被験体から得られた試験試料においてアネキシン A 2 (ANXA2) のレベルを測定するステップ、および試験試料における ANXA2 のレベルを ANXA2 の対照レベルと比較して、被験体の子癇前症を発症するリスクが高いかどうかを決定するステップを含む。

10

【0023】

本発明の一態様による、子癇前症を処置するための方法。本方法は、現在、子癇前症を有していない被験体の子宮内膜液試料を得るステップであって、被験体が妊娠しているか、または被験体が妊娠する計画を有する、ステップ、子宮内膜液試料において ANXA2 のレベルを決定するアッセイを実施するステップ、子宮内膜液試料における ANXA2 のレベルを ANXA2 の対照レベルと比較して、被験体の子癇前症を発症するリスクが高いかどうかを決定するステップ、および被験体の子癇前症を発症するリスクが高いと決定された場合には、有効量のグリコサミノグリカンを被験体に投与するステップを含む。

20

【0024】

本発明の一態様によれば、子癇前症を処置するための方法が提供される。本方法は、ANXA2 の対照レベルと比較して低レベルの ANXA2 を有し、妊娠の計画があり、かつ子癇前症の病歴をもたない被験体を同定するステップ、およびグリコサミノグリカンを、被験体において ANXA2 のレベルを上昇させるのに十分な量で被験体に投与するステップを含む。

【0025】

本発明の一態様によれば、子癇前症についてのグリコサミノグリカン治療の効力を評価するための方法が提供される。本方法は、子癇前症を有するか、または子癇前症を発症するリスクが高い被験体を有効量のグリコサミノグリカンで処置するステップ、グリコサミノグリカンでの処置前および処置後、被験体から得られた試験試料においてアネキシン A 2 (ANXA2) のレベルを測定するステップであって、処置前のレベルに対する処置後の ANXA2 のレベルの増加が、グリコサミノグリカン治療が有効であることを示すステップを含む。

30

【0026】

本明細書で使用される場合、「被験体」は、全ての哺乳類を含み、それらとしては、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ブタ、ヒト、および非ヒト霊長類が挙げられるが、それらに限定されない。一部の実施形態では、被験体は女性である。本明細書で使用される場合、「子癇前症を発症するリスクが高い」被験体は、その集団を代表する平均と比較した場合、子癇前症を発症する確率がより高い被験体を含む。一部の実施形態では、被験体は妊娠していることがわかっている。一部の実施形態では、被験体は妊娠しようとして試みている。被験体は、以前に妊娠したことがなくてもよいし、以前、1回もしくは複数回、正常に妊娠したことがあってもよいし、または以前の妊娠において PE を患っている。一部の実施形態では、被験体は、子癇前症についての 1 つまたは複数のリスク因子を有する。例えば、被験体は、以下の 1 つまたは任意の組合せを有する可能性がある：被験体は 1 人より多くの赤ん坊を身ごもっている、慢性高血圧、糖尿病、腎臓疾患、もしくは臓器移植の病歴を有する、初めて妊娠している、肥満であり、特に 30 もしくはそれ超のボディマス指数 (BMI) を有する、40 歳超である、もしくは 18 歳未満である、子癇前症の家族歴 (すなわち、母親、姉妹、祖母、または伯母・叔母がその障害を有した) をもつ、多嚢胞性卵巣症候群を有する、ループス、もしくは関節リウマチ、サルコイドーシス、お

40

50

よび多発性硬化症を含む他の自己免疫疾患を有する、体外受精を受けたことがある、または鎌状赤血球症を有する。

【0027】

一部の実施形態では、本明細書に記載された方法は、ANXA2の対照レベルと比較して低レベルのANXA2を有し、妊娠の計画があり、かつ子癇前症の病歴をもたない被験体を同定するステップを含む。本明細書で使用される場合、「ANXA2の対照レベルと比較して低レベルのANXA2を有し、妊娠の計画があり、かつ子癇前症の病歴をもたない被験体を同定すること」とは、ANXA2の対照レベルと比較して低レベルのANXA2を有し、妊娠する計画を有し、かつ子癇前症の病歴をもたない被験体を選択することを意味する。そのように同定または選択された被験体は、グリコサミノグリカンを、被験体においてANXA2のレベルを上昇させるのに十分な量で被験体に投与することによりPEについて処置される。

10

【0028】

用語「試験試料」は、本発明の方法を使用して評価されることになっている被験体、例えば、妊娠しているか、または妊娠しようとして試みている被験体に由来した試料を指す。試料の非限定的例としては、子宮内膜組織、子宮内膜間質細胞、および子宮内膜液が挙げられる。被験体の試料を得ることとは、被験体の試料を入手することを意味する。被験体から試料を得ることとは、被験体から試料を取り出すことを意味する。したがって、被験体の試料を得て、試料においてANXA2のレベルを測定する人は、必ずしも、被験体から試料を得るとは限らない。一部の実施形態では、試料は、医療従事者（例えば、医者、看護師、または臨床検査実施者（clinical laboratory practitioner））によって被験体から取り出され、その後、ANXA2のレベルを測定する人に提供されてもよい。試料は、被験体により、または医療従事者（例えば、医者、看護師、または臨床検査実施者）により、ANXA2のレベルを測定する人に提供されてもよい。一部の実施形態では、ANXA2のレベルを測定する人は、試料を被験体から取り出すことにより被験体から試料を得る。

20

【0029】

アネキシンA2（ANXA2）は、ヒト子宮内膜の分泌期中期および後期中に有意に上方制御されるカルシウム制御性リン脂質結合タンパク質である。このタンパク質は、F-アクチンネットワークの調節により子宮内膜上皮による受容能表現型の獲得に重要である。ANXA2は、ヒト子宮内膜間質細胞（hESC）上に存在し、かつ機能する線維素溶解促進性受容体である。それは、プラスミノゲンおよびそのアクチベーターtPAの細胞表面共受容体として働き、細胞表面プラスミン生成を有意に増強する。本明細書で使用される場合、用語「アネキシンA2」は、アネキシンA2の任意の既知のアイソフォームを指す。非限定的に、アネキシンA2としては、核酸配列NM__001002858.2、NM__001136015.2、NM__004039.2、およびNM__001002857.1、ならびにタンパク質配列NP__001002858.1、NP__001129487.1、NP__004030.1、およびNP__001002857.1が挙げられる。他の既知のアネキシンA2核酸およびコードされたポリペプチドは、（参照により本明細書に組み入れられた）WO2009/143633に記載されている。

30

40

【0030】

本明細書に開示された方法は、典型的には、試料においてANXA2のレベルを測定し、またはANXA2のレベルを決定するアッセイを実施するステップを含む。ANXA2のレベルは、一般的に、細胞からmRNAを検出し、ならびに/またはポリペプチドおよびタンパク質などの発現産物を検出することにより、検出され得る。核酸によってコードされた転写産物および/またはタンパク質の発現は、当技術分野における様々な公知の方法のいずれかにより測定され得る。例えば、ANXA2タンパク質のレベルを測定する方法には、酵素結合免疫ソルベント検定法（ELISA）、ウェスタンブロット、免疫組織化学的分析、ラジオ免疫アッセイ（RIA）、質量分析、マイクロアレイ、および顕微鏡観察が挙げられるが、それらに限定されない。ANXA2核酸配列を検出するための

50

方法には、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写酵素-PCR（RT-PCR）、インサイチュPCR、定量的PCR（q-PCR）、インサイチュハイブリダイゼーション、サザンブロット、ノーザンブロット、配列分析、マイクロアレイ分析、レポーター遺伝子の検出、または他のDNA/RNAハイブリダイゼーションプラットフォームが挙げられるが、それらに限定されない。

【0031】

本明細書に開示された方法は、典型的には、試験試料におけるANXA2のレベルをANXA2の対照レベルと比較して、被験体の子癪前症を発症するリスクが高いかどうかを決定するステップを含む。一部の実施形態では、「ANXA2の対照レベル」は、妊娠に成功したことがあり、かつ子癪前症の病歴をもたない被験体から導かれる。そのような場合、ANXA2の対照レベルが、妊娠に成功したことがあり、かつ子癪前症の病歴をもたない被験体から導かれている時、対照レベルより低い、試験試料におけるANXA2のレベルは、被験体の子癪前症を有するか、または子癪前症を発症するリスクが高いことを示している。一部の実施形態では、対照レベルが、PE発症の予測となることが公知であり、そのような場合、対照レベルに相当する、試験試料におけるANXA2のレベルは、被験体の子癪前症を有するか、または子癪前症を発症するリスクが高いことを示している。したがって、試験レベルが対照レベルより統計的に低いかどうかを決定することよりむしろ、試験レベルが、PE発症の予測となることが公知の範囲内にあるかどうかを決定することができる。対照レベルは、例えば子宮内膜液の1mlあたりのANXA2単位での、定数であり得る。対照レベルは範囲であり得る。対照レベルは、対照試料において測定された比較レベルであり得、そのレベルは、試験レベルのアッセイと同時に測定される。対照レベルは、標準偏差を有する平均として表され得る。本発明は、試験試料が、統計的に、対照より低く、または対照に相当すると決定する特定の方法によって限定されることを意図するものではない。

10

20

【0032】

一部の実施形態では、ANXA2レベルは、月経周期を通して任意の期において測定される。一部の実施形態では、ANXA2のレベルは、月経周期の黄体期中に測定される。一部の実施形態では、ANXA2のレベルは、月経周期の黄体期中期（18～24日目）中に測定される。一部の実施形態では、月経周期の黄体期中期（18～24日目）中に正常な被験体（すなわち、妊娠に成功したことがあり、かつ子癪前症の病歴をもたない被験体）において測定されるANXA2の平均対照子宮内膜液内レベルは、 $32 \mu\text{g}/\text{ml}$ （平均値 ± 4 ）であり、一方、PEの素因がある被験体における黄体期中期のANXA2のレベルは、この対照レベルと比較して、有意に低下している。一部の実施形態では、PEの素因がある被験体におけるANXA2のレベルは、この平均対照ANXA2レベルより2、3、4、または5標準偏差分、低い。一部の実施形態では、PEの素因がある被験体における黄体期中期のANXA2のレベルは、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、 $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、または $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満である。

30

【0033】

一部の実施形態では、対照試料に対する、試験試料におけるANXA2のレベルの減少は、被験体の子癪前症を有するか、または子癪前症を発症するリスクが高いことを示している。「発現の減少」とは、試験試料におけるANXA2の発現が、対照試料におけるその発現から統計的に有意に減少していることを意味する。例えば、試験試料におけるANXA2の発現レベルが、対照試料におけるそれより、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも100%、少なくとも250%、少なくとも500%、または少なくとも1000%、低い場合、有意な減少が検出され得る。同様に、試験試料におけるANXA2の発現レベルが、対照試料のそれの少なくとも2分の1、少なくとも3分の1、少なくとも4分の1、少なくとも5分の1、少なくとも6分の1、少なくとも7分の1、少なくとも8分の1、少なくとも9分の1、少なくとも10分の1、少なくとも20分の1、少なくとも30分の1、少なくとも40分の1、少なくとも50分の1、少なくとも100分の1、またはそれ未満である場

40

50

合、有意な減少が検出され得る。有意差は、適切な統計的検定を使用することにより、同定され得る。統計的有意性についての検定は、当技術分野において周知であり、Petrucelli、ChenおよびNandramによるApplied Statistics for Engineers and Scientists 1999年再版に例示されている。

【0034】

一部の実施形態では、分析の結果、すなわち、被験体がPEを有し、またはPEを有する素因があるかどうか、および分析に関連する任意の他の情報を要約する報告書は、任意選択で、分析の一部として作成すること（本明細書において、報告書を「提供すること」、報告書を「製作すること」、または報告書を「作成すること」と交換可能に呼ばれ得る）ができる。例えば、血圧および/または尿中のタンパク質含量の測定値が決定され得、これらは報告書に含まれ得る。報告書の例には、紙（例えば、試験結果のコンピュータ作成のプリントアウト）または等価の形式での報告書、およびコンピュータ可読媒体（例えば、CD、コンピュータハードドライブ、またはコンピュータネットワークサーバーなど）上に保存された報告書が挙げられ得るが、それらに限定されない。報告書、特に、コンピュータ可読媒体上に保存された報告書は、データベース（例えば、患者および患者の医療従事者だけがその報告書を見ることを許可するように、報告書へのアクセスを制限するセキュリティ特徴を有する「セキュアデータベース」であり得る、患者の記録のデータベースなど）の一部であり得る。有形の報告書を作成することに加えて、またはその代替として、報告書はまた、コンピュータスクリーン（または別の電子デバイスもしくは電子装置のディスプレイ）上に表示することができる。

10

20

【0035】

報告書はさらに、試験された個体、医療従事者（例えば、医者、看護師、または臨床検査実施者、遺伝子カウンセラー等）、ヘルスケア組織、臨床実験室、および/または報告書を見、もしくは保有することを意図された任意の他の団体などへ伝達、通信、または報告され得る（これらの用語は本明細書で交換可能に使用され得る）。報告書を「伝達すること」または「通信すること」は、報告書の型に基づいて、当技術分野において公知の任意の手段によることができ、その手段としては、口頭伝達と非口頭伝達の両方が挙げられる。さらに、報告書を「伝達する」または「通信する」行為は、報告書を配達すること（「プッシュ型（pushing）」）、および/または報告書を引き出すこと（「プル型（pulling）」）を含み得る。例えば、非口頭報告書は、（例えば、紙の形での報告書について）1つの団体から別の団体へ物理的に配達することによるなどの団体間を物理的に移動するような手段により、またはコンピュータネットワークサーバー等上に保存されたデータベースから引き出すことによりなどの電子的に、もしくは信号の形で（例えば、Eメールによって、もしくはインターネットを通じて、ファクシミリにより、および/または当技術分野において公知の任意の有線もしくは無線の通信方法により）伝達されることにより、伝達/通信することができる。

30

【0036】

一部の実施形態では、本明細書に記載された方法は、子癇前症を有し、または子癇前症を発症する素因があると同定される被験体を、ANXA2レベルを増加させることによって子癇前症が防がれ、または軽減されるようにすることが公知である有効量の薬剤で処置するステップを含む。ANXA2レベルを増加させることが公知の薬剤としては、グリコサミノグリカンが挙げられるが、それに限定されない。グリコサミノグリカンの例としては、低分子量ヘパリン、ヘパラン硫酸、化学修飾されたヘパリンまたはヘパラン硫酸、低分子量デルマタン硫酸、およびそれらの混合物が挙げられるが、それらに限定されない。子癇前症についての処置のためのグリコサミノグリカンの追加の例は、参照により本明細書に組み入れられた、EP1016410に記載されている。

40

【0037】

本明細書で使用される場合、用語「処置する」は、被験体のPEを発症するリスクを低下させ、または改善することを意味する。被験体のPEを発症するリスクの低下は、処置

50

前に得られた A N X A 2 レベルと比較した、または対照の正常な A N X A 2 レベル（すなわち、以前、正常に妊娠したことがあり、かつ P E の病歴をもたない被験体の A N X A 2 レベル）と比較した、A N X A 2 のレベルの増加として現れ得る。一部の実施形態では、用語「処置する」は、P E を検出可能な量または程度で、低下させ、または改善することを意味する。本明細書で使用される場合、用語「処置する」は、完全な処置と部分的な処置の両方を指す。例えば、P E の処置は、尿中のタンパク質レベルの低下、および/または処置前に得られた血圧レベルと比較した、もしくは対照の正常な血圧レベルと比較した、血圧レベルの減少として現れ得る。

【0038】

グリコサミノグリカンの「有効量」は、所望の生物学的応答、すなわち、子癇前症を処置することを誘発するのに十分な量を指す。当業者により認識されているように、グリコサミノグリカンの有効量は、所望の生物学的エンドポイント、その化合物の薬物動態、処置されることになっている状態、投与様式、ならびに被験体の年齢および健康のような因子に依存して異なり得る。有効量としては、P E に伴う1つまたは複数の症状を遅らせ、低下させ、阻害し、改善し、または逆転させるのに必要な量が挙げられるが、それらに限定されない。P E の処置において、そのような量は、処置前に得られた血圧レベルと比較して、または対照の正常な血圧レベルと比較して、血圧レベルを減少させるのに十分な量を指し得る。一部の実施形態では、有効量は、尿中のタンパク質レベルの低下を引き起こすのに十分な量を指し得る。一部の実施形態では、有効量は、被験体の P E を発症するリスクを低下させるのに十分な量を指し得る。そのような量は、処置前に得られた A N X A 2 レベルと比較して、または対照の正常な A N X A 2 レベル（すなわち、妊娠に成功したことがあり、かつ子癇前症の病歴をもたない被験体の A N X A 2 レベル）と比較して、A N X A 2 のレベルを増加/上昇させるのに十分な量を指し得る。一部の実施形態では、その量は、処置された被験体において A N X A 2 の対照の正常なレベルを再確立するのに十分である。

【0039】

化合物の有効量は、（投与様式に依存して）1または数日間、1回または複数回の用量投与において、約 0.001 mg/kg から約 1000 mg/kg まで様々であり得る。ある特定の実施形態では、有効量は、約 0.001 mg/kg から約 1000 mg/kg まで、約 0.01 mg/kg から約 750 mg/kg まで、約 0.1 mg/kg から約 500 mg/kg まで、約 1.0 mg/kg から約 250 mg/kg まで、および約 10.0 mg/kg から約 150 mg/kg まで様々である。一部の実施形態では、有効量は、1000 IU、2000 IU、3000 IU、4000 IU、5000 IU、6000 IU、または 7000 IU のグリコサミノグリカンである。一部の実施形態では、有効量は、5000 IU のグリコサミノグリカン（例えば、低分子量ヘパリン）である。グリコサミノグリカンは、任意の適切な投与経路を介して投与することができる。例えば、グリコサミノグリカンは、皮下、静脈内、腹腔内、または筋肉内経路を介して投与することができる。

【0040】

一部の実施形態では、本明細書に記載された方法は、グリコサミノグリカンでの処置前および処置後、被験体から得られた試験試料においてアネキシン A 2（A N X A 2）のレベルを測定するステップを含む。有効な治療は、処置前のレベルに対して処置後の A N X A 2 のレベルを増加させることが予想される。したがって、有効な治療は、処置後の A N X A 2 のレベルの増加によって示される。

【0041】

本発明は、以下の実施例によってさらに例証され、その実施例は、決して、さらなる限定として解釈されるべきではない。この出願を通して引用された（文献参考、発行された特許、公開された特許出願、および同時係属の特許出願を含む）参考文献の全部の全内容は、参照により本明細書に明確に組み入れられている。

【実施例】

【0042】

(実施例1)

ANXA2欠乏を通して媒介される子宮内膜脱落膜化抵抗性が、子癩前症の母体における原因を示す

材料および方法

組織収集、hESC単離、および培養

IRB承認がCEIC Ethics Committee of Hospital La Fe、Valencia Spain(コード2011/0383)によって2011年8月8日に得られ、書面でのインフォームドコンセントは、組織収集の前に各患者からサインされた。重篤な子癩前症(sPE)子宮内膜生検材料(n=13)を、1~5年間の間に生じた最近の妊娠中にsPEを患ったことがある女性から得た。非子癩前症(非PE)子宮内膜生検材料を、18~32歳の正常な妊娠をもつ女性から収集した(n=13)。全ての患者は、規則的な月経周期を有し、潜在する子宮内膜病理はなく、生検材料収集前の3ヶ月間の間、ホルモン処置を受けなかった。平均年齢および平均BMIは、2つの群において類似していた。

10

【0043】

子宮内膜生検材料を、pipelle(Genetics, Belgium)を使用して無菌条件下で得た。前に記載されているように(41)、穏やかなコラゲナーゼ消化により試料を処理し、間質コンパートメントを単離した。ヒト子宮内膜間質細胞(hESC)培養物を、10%活性炭処理済みウシ胎仔血清(FBS)および0.1%抗生物質を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)/F12(Sigma, Madrid, Spain)で構成される培地を使用して増殖させた。異なるアッセイのためのhESCを、2日間または4日間、プレートにおいてコンフルエンスまで培養した。

20

【0044】

in vitro脱落膜化プロトコール

コンフルエントなhESC単層を、2%FBS、0.1%抗生物質、ならびに2つの異なる脱落膜化プロトコール:i)3日ごとに培地を新しくしながら、9日間、プロゲステロン(P4)(1μM)および-エストラジオール(E2)(30nM);ii)3日間、8-プロモ-cAMP(cAMP, Sigma)(0.5mM)および酢酸メドロキシプロゲステロン(MPA, Sigma)(1μM)を含むDMEM/F12で脱落膜化させた。対照hESCを、脱落膜反応の誘導物質を含まずに、並行して培養した。

30

【0045】

特徴的な脱落膜表現型を、生化学的に、馴化培養培地中のPRL(Abnova)およびIGFBP-1(Raybiotech)タンパク質レベルのELISAによる分析により、ならびに形態学的に、F-アクチン染色により確認した。hESCを、プラスチックプレートにおいて、30~40%のコンフルエンスまで培養した。エピトープマスキングの効果を最小限にするために、細胞を、低濃度の固定液(2~3%パラホルムアルデヒド)で固定し、5%BSAでブロックした。細胞を、F-アクチンへの0.1μg/mL Amanita Phalloides由来のファロイジン-テトラメチルローダミンBイソチオシアネート結合体(Sigma Aldrich, USA)と、暗所中、室温で30分間、インキュベートした。共焦点蛍光顕微鏡画像を、100×1.45開口数の対物レンズおよびYokogawa回転盤共焦点ユニット(PerkinElmer)を備えたNikon顕微鏡で得た。各免疫蛍光標識について、少なくとも3つの異なる組織調製物を使用した。

40

【0046】

細胞内および細胞外ANXA2タンパク質アッセイ

hESC細胞を、溶解バッファー(50mM Tris-HCl pH8.0、150mM NaCl、1% IGEPAL CA 360、0.5% Na-DOC、0.1% SDS、および0.5M EDTA)中に溶解した。タンパク質抽出物(25μg/レーン)を、電気泳動により10%SDS-PAGEゲル上で分離し、ポリビニリデンジ

50

フルオリド膜 (Hybond-P (疎水性ポリビニリデンジフルオリド膜) (Amersham Biosciences, NJ, USA) に転写し、5% ミルクおよび 0.1% Tween を含む PBS 緩衝食塩水中でブロッキングした。膜を、1/2500 ウサギポリクローナル抗ヒトアネキシン I I (Abcam, Cambridge, UK) および 1/2000 マウスモノクローナル抗ヒト - アクチン (Santa Cruz, CA, USA) と 4 で終夜、インキュベートし、Santa Cruz (CA, USA) 製の西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体二次ヤギ抗ウサギ抗体およびヤギ抗マウス IgG - HRP 抗体で調べた。抗体 - 抗原複合体を、増強ケミルミネッセンス ECL Plus 試薬 (Amersham Biosciences, CT, USA) を使用して検出した。

【0047】

タンパク質抽出物 (2 μg / ウェル) および馴化培地を、ELISA (R&D Systems, MN, USA) により分析した。固定化捕捉抗体は、アネキシン A 2 を特異的に結合する。結合していない材料を洗い流した後、アネキシン A 2 に特異的なビオチン化検出抗体を使用して、標準ストレプトアビジン - HRP 様式で、結合したアネキシン A 2 を検出した。条件ごとに 3 つの複製で実施し、吸光度値を、標準曲線に外挿して、ヒトアネキシン A 2 濃度 (pg / mL) を確立した。

【0048】

ANXA 2 免疫組織化学

ホルマリン固定されかつパラフィン包埋された子宮内膜生検材料を、切片にし、Vectabond (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) でコーティングされたスライドガラス上にマウントした。脱パラフィンおよび再湿潤化 (rehydration) 後、切片を、PBS で 5 分間、3 回、すすいだ。免疫組織化学を、LSAB ペルオキシダーゼキット (Dako, Carpinteria, CA, USA) を使用して、子宮内膜切片上で実施した。非特異的結合を、PBS 中 5% BSA でブロッキングした。3% BSA を含む PBS 中に希釈した 1:100 ウサギポリクローナル抗ヒトアネキシン I I (Abcam, Cambridge, UK) と、室温で 1 時間、切片をインキュベートした。抗体の非存在下で、陰性対照を、3% BSA を含む PBS とともにインキュベートした。ウサギ起源一次抗体に対して適用される二次抗体は、LSAB ペルオキシダーゼキット (Dako) に含まれていた。3,3'-ジアミノベンジン (DAB) 色素原で、30 秒間から 1 分間の間の時間、染色を達成させた。ヘマトキシリンでの 10 秒間の対比染色および蒸留水での洗浄後、スライドを entellan (Merck, Darmstadt, Germany) でマウントした。

【0049】

ANXA 2 siRNA

ANXA 2 をサイレンスさせるために、ANXA 2 に対する特異性を有する siRNA オリゴヌクレオチド (CGGCCUGAGCGUCCAGAAATT、配列番号 1) および陰性対照 RNA 二重鎖を、どちらも 3' - AlexaFluor 488 (Qiagen, CA, USA) で修飾して、使用した。hESC に ANXA 2 siRNA (100 nM) または siRNA 陰性対照 (100 nM) をトランスフェクションした。全てのトランスフェクション実験を、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) および DMEM / F12 培地を使用して実施した。その処理と共に、細胞を 37 で 6 時間、インキュベートし、その後、培地は、新しく、siRNA を含まない新鮮な培地に交換した。

【0050】

F - アクチン / G - アクチンの in vivo アッセイ

ANXA 2 阻害、続いて脱落膜誘導物質 (AMPc および MPA) に供した ESC 細胞中の遊離単量体アクチン (G - アクチン) 対 線維状アクチン (F - アクチン) の含有量を、G - アクチン / F - アクチン in vivo アッセイキット (Cytoskeleton, CO, USA) を使用して決定した。非脱落膜対照、対照野生型、ANXA 2 siRNA、および脱落膜の ESC 細胞を、F - アクチン安定化バッファー中、37 で

10

20

30

40

50

ホモジナイズした。その後、細胞溶解産物を、低速度遠心分離 (2000 rpm) で非破壊細胞を除去した。除去後の溶解産物を、その後、100000 × g で遠心分離して、可溶性 G - アクチンを不溶性 F - アクチンから分離した。その後、諸画分を、ポリアクリルアミドゲル上に比例させてロードし、電気泳動 SDS - PAGE により分離し、1 / 500 抗アクチン抗体 (Cytoskeleton, CO, USA) でプローブするためにニトロセルロース膜に転写した。ウェスタンブロットの濃度測定定量化により、総アクチンで正規化された、サイトゾル中に見出される G - アクチン 対 細胞骨格に組み入れられた F - アクチンの比が決定された。

【0051】

創傷閉鎖アッセイ

hESC 細胞をカバーガラス上に播種し、コンフルエンスまで増殖させ、脱落膜化させ、続いて、ANXA2 siRNA 処理 (6 時間) を行った。96 時間後、各カバーガラスを滅菌ピペットチップで引っ掻き、PBS で洗浄し、新鮮な培地に置いた。創傷幅を、位相差顕微鏡により、すぐに、および 24 時間後に、測定した。創傷閉鎖を、最初の創傷幅のうちの閉鎖区域のパーセンテージとして計算した。示されたデータは、3 つの独立した実験から取られた 10 個の測定値の平均値 ± SEM を表している。

【0052】

トロホブラスト拡散アッセイ

使用されるプロトコールは、Animal Care and Use Committee of the Valencia University School of Medicine により、実験動物の保護および使用についての U.S. National Institutes of Health ガイドラインに従って、承認された。B6C3F1 マウス系統を、Charles River Laboratories (Barcelona, Spain) から購入した。週齢 6 ~ 8 週間の雌マウスを過排卵させ、繁殖用雄とペアで終夜、収容した。妊娠 2 日目に、卵管から胚を回収し、CCM-30 培地 (Vitrolife, Lubeck, Germany) 中で 3 日間、培養した。正常な形態を有する発達した胚盤胞だけを、研究に含めた (n = 425 マウス胚)。

【0053】

孵化した胚を、対照、対照 siRNA、または ANXA2 siRNA として働くコンフルエントな脱落膜化 hESC 単層上に共培養した。48 時間後、付着した胚盤胞のトロホブラスト拡散面積を評価した。共培養物を、低濃度の固定液 (2 ~ 3 % パラホルムアルデヒド) で固定し、5 % BSA でブロッキングし、3 % BSA 中に希釈された、1 / 500 マウス抗ビメンチン (Sigma Aldrich, USA) および 1 / 1000 ウサギ抗 E - カドヘリン (Abcam, Cambridge, UK) を含む一次抗体と、室温で 2 時間、インキュベートした。細胞を、二次抗体、ビメンチンに対する 1 / 1000 TR ICT 抗マウス (Invitrogen, Barcelona, Spain)、および E - カドヘリンに対する 1 / 1000 Alexa Fluor 488 抗ウサギ (Invitrogen, Barcelona, Spain) と、暗所中、室温で 1 時間、インキュベートした。条件あたり 10 ~ 15 個のマウス胚盤胞を、各実験において評価した。(ピクセルで表される) 成長面積を、3 つの独立した実験から取られた 3 連セットの測定値の平均値 ± SEM として表した。

【0054】

浸潤アッセイ

トロホブラスト由来細胞株 JEG-3 を使用して、トロホブラストの脱落膜 hESC を通って浸潤する能力を評価した (参考文献 Hannan 2010 年)。浸潤アッセイを、コラーゲン Transwell 浸潤キット (Chemicon Int. Billerica, MA) を使用して実施した。対照、対照 siRNA、または ANXA2 siRNA としての 5×10^5 個の脱落膜化 hESC を、8 mm ポアサイズの transwell インサートに入れて、24 時間、コンフルエンスまで増殖させた。インサートの上面において、 10^6 個の JEG-3 細胞を hESC 培地中に再懸濁し、JEG-3 細胞を

10

20

30

40

50

48時間、浸潤させた。浸潤を、標準マイクロプレートリーダーを使用してODにより測定した(図4C)。

【0055】

線維素溶解研究

プラスミノゲンレベルを、馴化培地において、ELISAキット(Cell Biolabs、CA、USA)により、製造業者の使用説明書に従って評価した。2連のウェルにおける平均吸光度(450nm)を、hESCを含まない培地を有するウェル由来のバックグラウンドを引き算することにより計算した。

【0056】

プラスミン活性を、馴化培地において、蛍光定量アッセイキット(Anaspec、CA、USA)により測定した。それは、496nm/520nm(励起/発光)で検出される明るい緑色蛍光を有するローダミン110フルオロフォアを生成する、プラスミン基質のプロテアーゼ切断に基づいている。50マイクロリットルの馴化培地を、室温で10分間、プレインキュベートし、50μLのプラスミン基質溶液を各ウェルに加えた。蛍光シグナルを、動態読み取りのために得た。測定はすぐに開始し、60分間にわたり5分ごとにデータを記録し、読み取り(lecture)は合計13個であった。各条件を2連で評価した。蛍光を、Rh110蛍光参照標準を使用して濃度値に内挿した(interpolation)。

10

【0057】

MMP2およびMMP9のレベル

MMP2およびMMP9のプロタンパク質型および活性タンパク質型を、市販のELISA分析(RayBiotech、GA、USA)により評価した。これらのアッセイは、96ウェルプレート上にコーティングされたヒトMMP-2およびMMP-9に特異的な抗体を利用している。標準および試料を、ピペットによりウェルへ2連にし、試料中に存在するMMP-2およびMMP-9を、固定化抗体によりウェルに結合させる。ピオチン化抗ヒトMMP-2およびMMP-9ならびにHRP結合体化ストレプトアビジンを加えた。TMB基質溶液を加え、450nmでの吸光度を、標準曲線に外挿した。

20

【0058】

定量的PCR

全RNAを、Trizol LS試薬(Invitrogen、Barcelona、Spain)を使用して、製造業者の使用説明書に従い、hESC培養物から抽出した。最初に、1μgの全RNAを、Advantage RT-for-PCRキット(Clontech CA、USA)を使用して、製造業者の使用説明書に従い、cDNAへ逆転写した。定量的リアルタイムPCRを、Light Cycler 480システム(Roche)においてSYBR Green(Roche)を使用して実施した。転写産物を、内部対照としてGAPDHを使用して、対応する標準曲線から定量化した。各実験を、3連で試料ごとに3回、実施した。以下のプライマーを使用した: ANXA2 (Fw: TGTGCAAGCTCAGCTTGA、配列番号2、Rv: AGGTGCTCTTCAATAGGCCCA、配列番号3)およびGAPDH (Fw: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC、配列番号4、Rv: GAAGATGGTGAATGGGATTTTC、配列番号5)。

30

40

【0059】

ヘパリン用量反応

hESCを、用量反応実験を策定するために、50μg/mLおよび100μg/mLのヘパリン(Sigma、Madrid)の存在下、15分間、30分間、および60分間、単層上で培養した。hESC細胞からの馴化培地を収集して、プラスミノゲンレベル、プラスミン活性、およびメタロプロテアーゼ産生を分析した。

【0060】

統計解析

各実験あたり、少なくとも3つの異なる子宮内膜生検材料を使用し、3連で測定値を取

50

った。平均値 ± S E M が提示され、n は実験の数を示す。データは、S P S S ソフトウェアを用い、t 検定を使用して、分析された群間の大域的差について分析した。P 0 . 0 5 の p 値は、有意とみなされた。(* p 0 . 0 5、* * p 0 . 0 1、* * * p 0 . 0 0 1)。

【 0 0 6 1 】

結果

以前の妊娠において s P E を患った患者における i n v i t r o 脱落膜化抵抗性
 正常な妊娠の過去をもつ対照患者 (非 P E) (n = 1 3) と比較した、以前の妊娠において重篤な P E (s P E) を患ったことがある女性 (n = 1 3) 由来の h E S C の i n v i t r o 脱落膜化を評価した。s P E 群において、混合型 H E L L P 症候群、子癇、または子癇に終わった H E L L P 症候群を発症した 2 つの連続した以前の s P E を含む異なる型を患った女性から h E S C を単離した。s P E および非 P E の患者は、同等の B M I および年齢をもつが、s P E の患者は、より高い収縮期 / 拡張期血圧、蛋白尿、G O T、G P T、ならびにより低い血小板数およびフィブリノーゲンレベルを有した。脱落膜刺激物質としての c A M P (0 . 5 μ M) + M P A (1 μ M) で 5 日間か、またはホルモン誘導物質 P 4 (1 μ M) + E 2 (3 0 n M) で 9 日間のいずれかで脱落膜化した h E S C は、類似した結果を示した。したがって、c A M P + M P A プロトコルをこの研究に使用した。興味深いことには、P R L および I G F B P - 1 分泌は、非 P E 対応物と比較して、s P E から得られた h E S C において i n v i t r o 脱落膜化が損なわれていたことを実証している (それぞれ、図 1 A および 1 B)。h E S C における F - アクチン再編成を、i n v i t r o 脱落膜化中に調べ、非 P E において線維芽細胞表現型から膨大した円形細胞形態への移行を示したが、脱落膜表現型への移行は、s P E 患者由来の脱落膜化 h E S C において存在しなかった (図 1 C)。

10

20

【 0 0 6 2 】

s P E における A N X A 2 の下方制御され、かつ制御解除された h E S C 発現

以前の妊娠において s P E を患った女性 対 非 P E 患者に由来した全子宮内膜試料における A N X A 2 タンパク質存在量を分析した (図 2 A)。濃度測定分析により、非 P E 患者 (n = 6) と比較して、s P E (n = 6) 由来の子宮内膜における A N X A 2 存在量の有意な低下が示された (図 2 A)。子宮内膜 A N X A 2 局在化を調べた。非 P E に対して s P E における間質コンパートメントでのより低い染色が観察された (図 2 B)。次に、s P E 患者 対 非 P E 患者に由来した h E S C を単離し、脱落膜化させ、A N X A 2 タンパク質をウェスタンブロットによって評価した (図 2 C)。濃度測定分析により、s P E 女性において、非 P E 患者と比較して、A N X A 2 が、基礎条件下で有意に低下し、脱落膜化した h E S C において制御解除されることが実証された (図 2 C)。この分子をさらに定量化するために、両方の条件において脱落膜化中の細胞内型および分泌型の A N X A 2 を、E L I S A を使用して分析した。この分析により、脱落膜化刺激物質の存在下で s P E 女性由来の h E S C が、対照と比較して、細胞内および細胞外の両方の A N X A 2 において有意な低下および制御解除を受けることが裏付けられる (図 2 D)。さらに、分泌型は細胞内 A N X A 2 を反映し、これにより、P E 患者において脱落膜化抵抗性を予測するために使用することができるバイオマーカーとしての A N X A 2 の使用が確認される。

30

40

【 0 0 6 3 】

i n v i t r o 脱落膜化中の h E S C における A N X A 2 の制御および機能性

以前の研究は、A N X A 2 が、胚着床の受容能獲得および初期段階の間、ヒト子宮内膜において月経周期を通して制御されることを示している。次に、i n v i t r o での h E S C 脱落膜化中の A N X A 2 の制御を調べた。ウェスタンブロット (図 3 A) および濃度測定分析により評価された細胞内 A N X A 2 は、どちらのプロトコルを使用しても、非脱落膜化 h E S C に対する脱落膜化 h E S C における細胞内 A N X A 2 の上方制御が裏付けられる (図 3 A)。その細胞内動力学と並行して、分泌型 A N X A 2 を、h E S C の上清において E L I S A により測定した (図 3 B)。これらの結果は、細胞内および細胞

50

外 ANXA2 が、*in vitro* 脱落膜化中に hESC において上方制御されることを実証している。

【0064】

次に、hESC における ANXA2 の機能性を、siRNA アプローチを使用して ANXA2 分子を阻害することにより、*in vitro* 脱落膜化中に評価した。hESC トランスフェクションから 24 時間後、非脱落膜条件および脱落膜条件の両方で、対照群および対照 siRNA 群と比較して、siRNA 群において、ANXA2 mRNA (図 3C) およびタンパク質 (図 4D) の有意な低下が観察された。その機能的関連性を確認するために、ANXA2 阻害の影響を、PRL および IGFBP-1 などの脱落膜バイオマーカーの分泌、加えて、脱落膜刺激の開始後 72 時間目における形態学的表現型変化において評価した。対照と違って、siRNA 脱落膜化 hESC において PRL および IGFBP-1 は存在しなかった (図 3E および 3F)。また、ローダミン-ファロイジン染色により、ANXA2 干渉は、脱落膜化過程中的 F-アクチン構造の特徴的な表現型改変を抑止し、F-アクチンフィラメントの長手方向の配向を変化しないままにした (図 3G)。ANXA2 阻害後の脱落膜化中のアクチン細胞骨格の再編成もまた、細胞骨格へ組み入れられた F-アクチンと比較した、サイトゾルに見出される遊離単量体 G-アクチンの比を使用して、調べた (図 3H)。平均 G/F-アクチン比は、脱落膜表現型および非脱落膜表現型のどちらも、対照および対照 siRNA の hESC 細胞においておよそ 1:1 であったが、ANXA2 阻害 hESC 細胞は、F-アクチンと比較して単量体 G-アクチンの含有量の有意な増加を示した (ANXA2 siRNA 処理された非脱落膜細胞において 3:1 の比、および ANXA2 siRNA 処理された脱落膜細胞において 4:1 の比) (図 3H)。これらのデータは、ANXA2 阻害が、アクチンフィラメント脱重合および G-アクチン単量体の割合の有意な増加を通して脱落膜化抵抗性を誘導することを実証し、脱落膜化過程中的 F-アクチンファイバーの再編成における ANXA2 の機能的役割を示している。

10

20

【0065】

ANXA2 阻害は、hESC 運動性、トロホブラスト拡散および浸潤を低下させる

ANXA2 阻害により誘導される脱落膜化抵抗性のトロホブラスト拡散および浸潤へのパラクリン作用をさらに理解するために、ANXA2 の hESC 運動性への関与を分析するために、創傷閉鎖アッセイを実施した。hESC の脱落膜化に続いて、ANXA2 siRNA を、6 時間、トランスフェクションし、その後、細胞の単層を引っ掻きによって破壊し、遊走に関しての ANXA2 阻害の効果を、ビデオ顕微鏡観察により 24 時間中、追跡した (図 4A)。ANXA2 siRNA 阻害細胞における創傷閉鎖のパーセンテージは、対照細胞および対照 siRNA 細胞と比較して、有意に低下した (図 4A)。

30

【0066】

マウス胚をコンフルエントな脱落膜化 hESC 単層上に置き、続いて ANXA2 siRNA による阻害を行う異種性 *in vitro* 共培養モデルを使用する、ANXA2 阻害のトロホブラスト拡散への効果を、次に研究した。E-カドヘリンおよびビメンチンの免疫染色により、それぞれ、マウストロホブラストおよび hESC が同定される。トロホブラスト拡散の総面積を、ピクセルの数として評価し、対照および対照 siRNA の hESC 細胞と比較して、ANXA2 siRNA 細胞における有意な減少が観察された (図 4B)。

40

【0067】

JEG-3 ヒトトロホブラスト細胞株の ANXA2 阻害 hESC 細胞への浸潤性もまた、コラーゲン浸潤チャンパーアッセイを使用して分析した。脱落膜化 hESC を、ANXA2 siRNA により阻害し、コラーゲン層上のインサート内で培養した。その後、JEG-3 細胞懸濁物をインサートの上面に置いた。処理された hESC の単層およびコラーゲンバリアを通して浸潤する能力を調べた。ANXA2 阻害細胞における浸潤した JEG-3 細胞のパーセンテージは、対照 hESC と比較して有意に低下した (図 4C)。

【0068】

50

A N X A 2 の阻害による線維素溶解活性の欠乏もまた、s P E 由来の h E S C に存在する

線維素溶解系は、フィブリン沈着を通して P E の病因および子宮内膜機能不全の素因に結びつけられている。P E 女性由来の h E S C と比較した、h E S C A N X A 2 阻害の線維素溶解活性への機能的効果を調べた。この目的のために、脱落膜化対照、A N X A 2 s i R N A、および P E 由来の h E S C からの、馴化培地におけるプラスミノゲンレベルおよびプラスミン活性を分析した。プラスミノゲンレベルおよびプラスミン活性は、対照 s i R N A h E S C および対照脱落膜化 h E S C と比較して、A N X A 2 s i R N A および s P E 由来の h E S C において有意に低下した（プラスミノゲンレベル：それぞれ、 229.1 ± 23.1 および 191.5 ± 36.7 pg/mL 対 305.1 ± 23.2 および 397.1 ± 45.1 pg/mL；プラスミン活性：それぞれ、 12.7 ± 3.6 mM および 4.2 ± 0.75 mM 対 27.5 ± 10.2 mM および 23.1 ± 4.1 mM）（図 5 A および 5 B）。したがって、線維素溶解系は、脱落膜化 h E S C において A N X A 2 が阻害されている場合に欠乏し、s P E 患者由来の h E S C においてより高い程度で欠乏している。

10

【0069】

興味深いことに、プラスミノゲン/プラスミン系は、フィブリンおよびコラーゲンなどの E C M 成分を分解する MMP 2 および MMP 9 タンパク質の産生によりトロホプラスト浸潤を制御する。MMP 2 および MMP 9 タンパク質分泌を、A N X A 2 阻害および s P E の脱落膜化 h E S C の馴化培地において E L I S A により分析した。MMP 2 および MMP 9 分泌のレベルは、A N X A 2 が阻害された場合、および s P E 患者において、有意に低下した（図 5 C および 5 D）。

20

【0070】

ヘパリン処理は、A N X A 2 低下 h E S C において欠損線維素溶解系の活性化を支持する

ヘパリンは、組織プラスミノゲンアクチベーター（t P A）を通して線維素溶解経路に作用し、ヘパリンの A N X A 2 との結合の直接的効果としても記載されている。ヘパリンの線維素溶解への効果を、対照 s i R N A、A N X A 2 s i R N A 阻害、非 P E、および P E の脱落膜化 h E S C においてプラスミノゲン存在量およびプラスミン活性を測定する用量反応および時間依存性実験で分析した。100 μ g/mL でのヘパリンは、A N X A 2 阻害および s P E の脱落膜化 h E S C を含む、調べられた全ての条件において馴化培地へのプラスミノゲンおよびプラスミンの分泌を有意に増加させた（図 5 E）。また、ヘパリンのプラスミンへの効果もまた評価し、同じ用量において、A N X A 2 s i R N A および s P E 由来の h E S C におけるプラスミン活性の有意な増加を生じた（図 5 F）。対照、A N X A 2 s i R N A、および s P E 患者由来の h E S C の馴化培地における分泌された細胞外 A N X A 2 レベルを E L I S A によって測定した。結果により、ヘパリン処理が、培養培地へ分泌された A N X A 2 タンパク質の有意な増加を誘導することが裏付けられた（図 5 G）。

30

【0071】

最後に、全ての条件における、ヘパリンの MMP 2 および MMP 9 メタロプロテアーゼ産生への機能的効果を i n v i t r o で試験した（図 5 H）。ヘパリンでの処理は、トロホプラストの子宮内膜間質細胞を通過する浸潤を促進する重要な要素である、メタロプロテアーゼの有意な増加を誘導した。したがって、s i R N A により誘導されたか、または s P E を有する患者に自然発生した A N X A 2 欠乏脱落膜化 h E S C へのヘパリンの直接的および/または間接的効果は、少なくとも一部、関連した線維素溶解性欠陥を矯正する。

40

【0072】

これらのデータに基づいて、少なくとも部分的に A N X A 2 欠乏によって媒介される、s P E に存在する h E S C 脱落膜化抵抗性を、P E の母体における原因としての浅いトロホプラストの浸潤および線維素溶解の変化と共に組み込んだモデルが提案される（図 7）

50

。s P Eにおける、またはs i R N Aを通して誘導されたA N X A 2欠乏h E S Cが、それらの典型的な形態学的変換を妨害する、アクチンフィラメントの脱重合およびG - アクチン単量体の割合の有意な増加により適切に脱落膜化しないことが見出された。下流における主な帰結は、前酵素プラスミノゲンへの直接的効果を含み、そのことが、プラスミン生成の低下をもたらし、それが、線維素溶解系の欠乏による血栓形成促進性パラクリン効果を生じることを含んだ。同様に、A N X A 2活性化の欠損は、フィブリンおよびコラーゲンなどのE C M成分を分解するM M P 2およびM M P 9の阻害を通して浅いトロポブラスト浸潤をもたらす。A N X A 2を通して作用するヘパリンの添加は、示した下流における効果を克服することができる。

【0073】

10

考察

P Eの考え得る原因として欠損C T B分化は熱心に研究されているが、本研究は、この産科合併症の起源に關与する子宮内膜の母体のパラクリン因子に着目した。疫学研究によって、母系家族における過去のP Eが、近親者の女性においてP Eを患うリスクの24% ~ 163%増加と関連することが明らかになっている。しかしながら、父系家族におけるP Eエピソードは、所定の患者におけるP Eリスクに影響しない。したがって、P Eについての遺伝子感受性は、母系と明らかに関連している。

【0074】

子宮壁におけるC T Bの浸潤を制御する脱落膜からの脱落膜化変換を通してh E S Cを標的にした。非P E対応物と比較した、s P Eから得られるh E S Cにおける脱落膜化抵抗性の同定は本研究を促進した。

20

【0075】

アネキシンA 2 (A N X A 2) は、ヒト子宮内膜の分泌期中期および後期中に有意に上方制御されるカルシウム制御性リン脂質結合タンパク質である。このタンパク質は、F - アクチンネットワークの調節によって、子宮内膜上皮が受容能表現型を獲得するうえで重要である。A N X A 2は、h E S C上に存在し、かつ機能する線維素溶解促進性受容体である。それは、プラスミノゲンおよびそのアクチベーターt P Aの細胞表面共受容体として働き、細胞表面プラスミン生成が有意に増強される。P Eにおいて線維素溶解経路が変化しているので、機構分析をA N X A 2に注力した。なぜなら、この分子の高い力価が、抗リン脂質症候群(A P S) (P Eの発症の素因となることが公知である状態)における血栓性事象と関連づけられているからである。さらに、P Eを有する胎盤におけるA N X A 2自己抗体が、胎盤トロポニン形成の考え得る原因として示唆されている。

30

【0076】

最初に、子宮内膜間質コンパートメント内のA N X A 2は、非P Eに対して、以前の妊娠でs P Eを患った患者において低下した。次に、この分析から、脱落膜化刺激物質の存在下でのs P E女性由来のh E S Cは、対照と比較して、細胞内A N X A 2および細胞外A N X A 2の両方において有意な低下および制御解除を受けることが裏付けられる。もう1つの驚くべき所見は、細胞内および細胞外A N X A 2が、h E S Cにおいてi n v i t r o脱落膜化中、上方制御され、その機能阻害が、アクチンフィラメントの脱重合およびG - アクチン単量体割合の増加を通して脱落膜化抵抗性を誘導することであった。A N X A 2阻害により誘導される脱落膜化抵抗性のオートクリンおよびパラクリン作用のさらなる研究により、h E S C運動性の直接的効果、ならびに、この病理学的状態の顕著な特徴である、トロポブラスト拡散および浸潤の低下が明らかにされた。

40

【0077】

線維素溶解は、フィブリン血栓をリモデリングおよび分解する組織プラスミノゲンアクチベーター(t P A) およびウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター(u P A) の作用を通して、プラスミノゲンがプラスミンへと変換される、非常に組織化された過程である。P E由来の胎盤における共通の病理組織学的所見は、フィブリン沈着と共に様々な程度の血栓症の出現である。線維素溶解機能の欠陥は、血栓症の増加の公知のリスク因子である。線維素溶解の変化がP Eに存在しており、その疾患の発症における、原因

50

かまたは結果のいずれかとしての線維素溶解異常を示唆している。ANXA2は、前酵素プラスミノゲン、および同じ程度で、外因性線維素溶解経路へ直接的効果を生じ、したがって、線維素溶解系は、ANXA2が阻害された場合の脱落膜化hESCにおいて欠乏し、脱落膜化抵抗性をもつsPE患者由来のhESCにおいてより高い程度で欠乏した。プラスミノゲン/プラスミン系の変化は、フィブリンおよびコラーゲンなどのECM成分を分解するMMP2およびMMP9の阻害を通して、トロホブラスト浸潤を妨げた。100μg/mLの用量でのヘパリンが*in vitro*で、調べられた全ての条件において、分泌型ANXA2タンパク質、プラスミノゲン、プラスミン、MMP2、およびMMP9の産生を増加させることも実証された。したがって、この研究は、PEにおけるヘパリン処置の報告された有益な効果を理解するための基礎を固めるものである。

10

【0078】

【化1】

参考文献

1. Steegers EA, von Dadelszen P, duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet* 2010; 376: 631-644.
2. Gifford RW, August PA, Cunningham G, Green LA, Lindheimer MD, McNellis D, AL E. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183, S1-S22.

20

【化 2】

3. Roberts, J.M. & Gammill, H.S. Preeclampsia: recent insights. *Hypertension* 2005; 46, 1243–1249.
4. Pijnenborg, R., Vercruyse, L. & Hanssens, M. Fetal-maternal conflict, trophoblast invasion, preeclampsia, and the red queen. *Hypertens Pregnancy* 2008; 27, 183–196.
5. Roberts DJ, Post MD. The placenta in preeclampsia and intrauterine growth restriction. *J Clin Pathol.* 2008; 61: 1254–60. 10
6. Roberts JM, Taylor RN, Goldfien A. Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia. *Am J Hypertens* 1991; 4, 700–708.
7. Vinnars MT, Nasiell J, Ghazi S, Westgren M, Papadogiannakis N. The severity of clinical manifestations in preeclampsia correlates with the amount of placental infarction. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2011; 90: 19–25. 20
8. Naicker T, Khedun SM, Moodley J, Pijnenborg R. Quantitative analysis of trophoblast invasion in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003; 82: 722–729.
9. Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu.* 1972; 1: 177–191.
10. Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest.* 1993; 91: 950–960. 30
11. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest.* 1997; 99: 2152–2164.
12. Zhou Y, Gormley MJ, Hunkapiller NM, Kapidzic M, Stolyarov Y, Feng V, Nishida M, Drake PM, Bianco K, Wang F, McMaster MT, Fisher SJ. Reversal of gene dysregulation in cultured cytotrophoblasts reveals possible causes of preeclampsia. *J Clin Invest.* 2013; 123: 2862-2872. 40

【化 3】

13. Irwin JC, Utian WH, Eckert RL. Sex steroids and growth factors differentially regulate the growth and differentiation of cultured human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 1991; 129: 2385-2392.

14. Brar AK, Frank GR, Kessler CA, Cedars MI, Handwerger S. Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. *Endocrine* 1997; 6: 301-307.

15. Gellersen B, Reimann K, Samalecos A, Aupers S, Bamberger AM. Invasion of human endometrial stromal cells is promoted by decidualization and by trophoblast-derived signals. *Hum Reprod* 2010; 25: 862-873.

16. Dunn CL, Kelly RW, Critchley HO 2003 Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod Biomed Online* 7: 151-161

17. Giudice LC, Mark SP, Irwin JC. Paracrine actions of insulin-like growth factors and IGF binding protein-1 in non-pregnant human endometrium and at the decidual-trophoblast interface. *J Reprod Immunol.* 1998; 39: 133-48.

18. Jabbour HN, Critchley HO. Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy. *Reproduction.* 2001; 121: 197-205.

19. Ramathal CY, Bagchi IC, Taylor RN, Bagchi MK. Endometrial decidualization of mice and men. *Semen Reprod Med.* 2010; 28: 17-26.

20. Tabanelli S, Tang B, Gurpide E. *In vitro* decidualization of human endometrial stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 42: 337-44

21. Garrido-Gomez T, Dominguez F, Lopez JA, Camafeita E, Quiñonero A, Martinez-Conejero JA, Pellicer A, Conesa A, Simón C. Modeling human endometrial decidualization from the interaction between proteome and secretome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96: 706-716.

22. Garrido-Gómez T, Dominguez F, Quiñonero A, Estella C, Vilella F, Pellicer A, Simon C. Annexin A2 is critical for embryo adhesiveness to the human endometrium by RhoA activation through F-actin regulation. *FASEB J.* 2012; 26: 3715-3727.

10

20

30

40

【化 4】

23. Cesarman-Maus G, Ríos-Luna NP, Deora AB, Huang B, Villa R, Cravioto M del C, et al. Autoantibodies against the fibrinolytic receptor, annexin 2, in antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2006; 107(11): 4375–4382.

24. Chu SC, Yang SF, Lue KH, Hsieh YS, Hsiao TY, Lu KH. Urokinase-type plasminogen activator, receptor, and inhibitor correlating with gelatinase-B (MMP-9) contribute to inflammation in gouty arthritis of the knee. *J Rheumatol*. 2006; 33(2): 311-317. 10

25. Beier JJ, Kaiser JP, Guo L, Martínez-Maldonado M, Arteel GE. Plasminogen activator inhibitor-1 deficient mice are protected from angiotensin II-induced fibrosis. *Arch Biochem Biophys*. 2011; 510(1): 19-26.

26. Kruse-Blinkenberg HO, Gormsen J. The influence of low dose heparin in elective surgery on blood coagulation, fibrinolysis, platelet function, antithrombin III and antiplasmin. *Acta Chir Scand*. 1980; 146: 375-382. 20

27. Pogliani EM, Vigo A, Cofrancesco E, Colombi M, Cristoforetti G, Marchetti G, Vercesi G, Radaelli F. Low-dose heparin in thoracic surgery: effect on blood coagulation and fibrinolysis system. *Thromb Res*. 1982; 27: 211-219.

28. Arnesen H, Engebretsen LF, Ugland OM, Seljeflot I, Kierulf P. Increased fibrinolytic activity after surgery induced by low dose heparin. *Thromb Res*. 1987; 45: 553-559.

29. Shao C, Zhang F, Kemp MM, Linhardt RJ, Waisman DM, Head JF, Seaton BA. *J Biol Chem*. Crystallographic analysis of calcium-dependent heparin binding to annexin A2. 2006; 281: 31689-31695. 30

30. Boyd HA, Tahir H, Wohlfahrt J, Melbye M. Associations of personal and family preeclampsia history with the risk of early-, intermediate- and late-onset preeclampsia. *Am J Epidemiol*. 2013; 178: 1611-1619.

31. Domínguez F, Garrido-Gómez T, López JA, Camafeita E, Quiñonero A, Pellicer A, Simón C. Proteomic analysis of the human receptive versus non-receptive endometrium using differential in-gel electrophoresis and MALDI-MS unveils stathmin 1 and annexin A2 as differentially regulated. *Hum Reprod*. 2009; 24: 2607-2617. 40

【化 5】

32. Bharadwaj A, Bydoun M, Waisman 2013 Annexin A2 Heterotetramer: structure and function. *Int J Mol Sci* 2013
33. Cesarman GM, Guevara CA, Hajjar KA. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator (t-PA). II. Annexin II-mediated enhancement of t-PA-dependent plasminogen activation. *J Biol Chem*. 1994; 269: 21198–21203. 10
34. Ling Q, Jacovina AT, Deora A, Febbraio M, Simantov R, Silverstein RL. Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. *J Clin Invest*. 2004; 113(1): 38–48.
35. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* 2005; 129: 307–321.
36. Crabbe SJ, Cloninger CC. Tissue plasminogen activator: a new thrombolytic agent. *Clin Pharm*. 1987; 6: 373-386. 20
37. Sobel BE. Fibrinolysis and activators of plasminogen. *Heart Lung*. 1987; 16: 775-779.
38. Gohil R, Peck G, Sharma P. The genetics of venous thromboembolism. A metaanalysis involving approximately 120 000 cases and 180 000 controls. *Thromb Haemost*. 2009; 102: 360-370.
39. Sucak GT, Acar K, Sucak A, Kirazli S, Haznedar R. Increased global fibrinolytic capacity as a clue for activated fibrinolysis in pre-eclampsia. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2006; 17: 347-352. 30
40. Conserva V, Muggiasca M, Arrigoni L, Mantegazza V, Rossi E, Ferrazzi E. Recurrence and severity of abnormal pregnancy outcome in patients treated by low-molecular-weight heparin: a prospective pilot study. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012; 25: 1467-1473.
41. Simón C, Mercader A, Garcia-Velasco J, Nikas G, Moreno C, Remohí J, Pellicer A. Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84: 2638–2646. 40
42. Tackels-Horne, D, Goodman, MD, Williams AJ, Wilson DJ, Eskandari T, Vogt LM, Boland JF, Scherf U, Vockley JG. Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma and metastatic liver tumors by oligonucleotide expression profiling. *Cancer* 2001; 92: 395–405.

【化 6】

43. Vaquerizas JM, Conde L, Yankilevich P, Cabezón A, Mínguez P, Díaz-Uriarte R, Al-Shahrour F, Herrero J, Dopazo J. GEPAS, an experiment-oriented pipeline for the analysis of microarray gene expression data. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 616–620.

44. Al-Shahrour F, Mínguez P, Tárraga J, Montaner D, Alloza E, Vaquerizas JM, Conde L, Blaschke C, Vera J, Dopazo J. BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. *Nucleic Acids Res* 2007; 34: 472–476. 10

45. Herrero J, Valencia A, Dopazo J. A hierarchical unsupervised growing neural network for clustering gene expression patterns. *Bioinformatics* 2001; 17:126–136.

46. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Royal Statist Soc B* 1995; 57: 289–300.

47. Al-Shahrour F, Arbiza L, Dopazo H, Huerta J, Mínguez P, Montaner D, Dopazo J. From genes to functional classes in the study of biological systems. *BMC Bioinformatics* 2007; 8:114 20

48. Al-Shahrour F, Diaz-Uriarte R, Dopazo J. FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics* 2004; 20: 578–580.

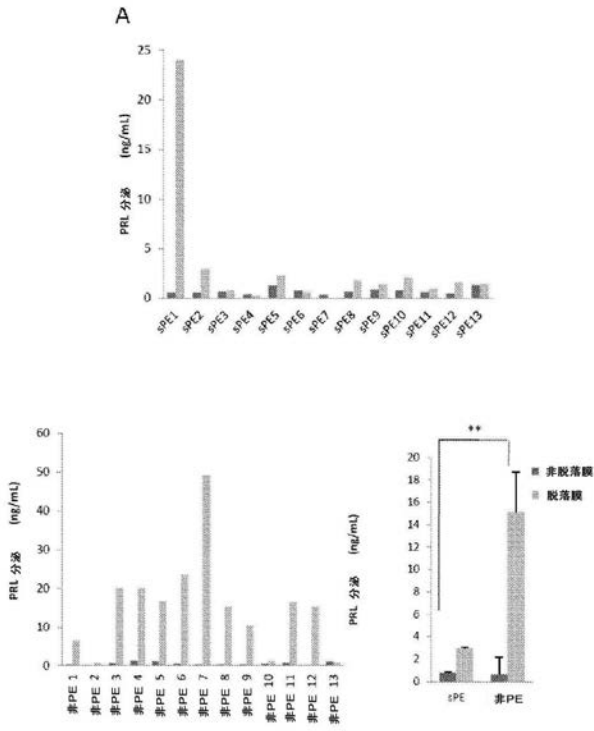
49. Al-Shahrour F, Mínguez P, Tarraga J, Medina I, Alloza E, Montaner D, Dopazo J. FatiGO +: a functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 91–96. 30

【 0 0 7 9 】

本明細書に示され、記載されたものに加えて、本発明の様々な改変が、前述の説明から当業者にとって明らかになるであろうが、それらは、添付の特許請求の範囲の範囲内にある。本発明の利点および目的は、必ずしも、本発明の各実施形態によって包含されるとは限らない。

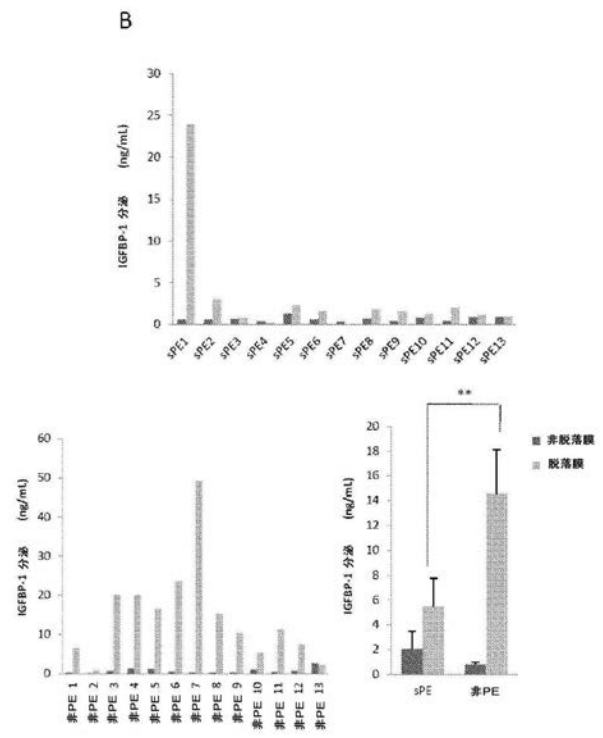
【 図 1 A 】

FIG. 1



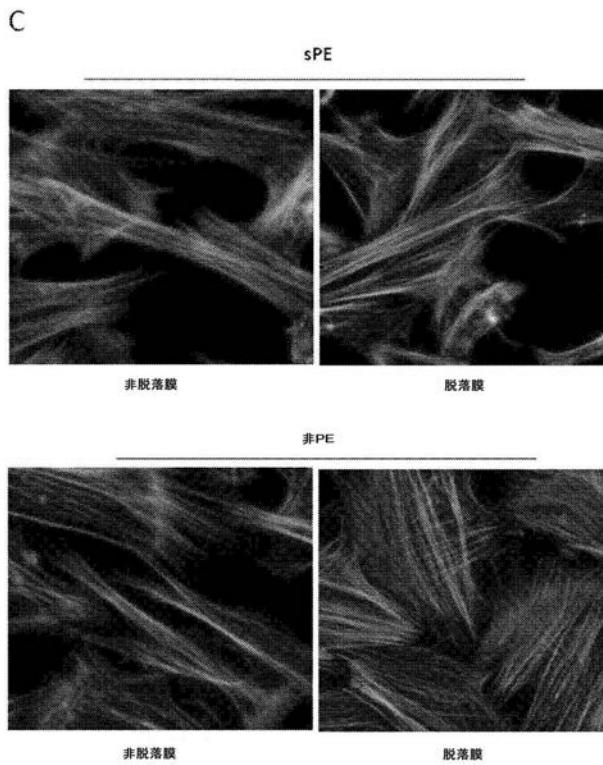
【 図 1 B 】

FIG. 1



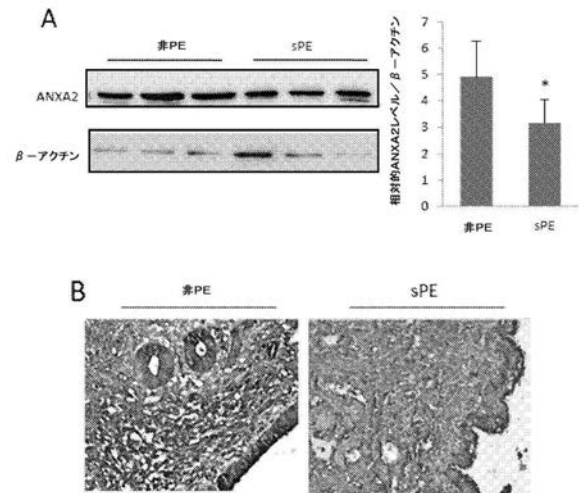
【 図 1 C 】

FIG. 1



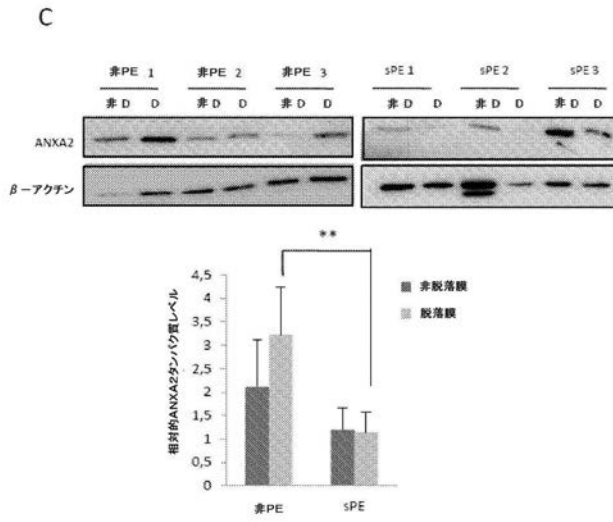
【 図 2 - 1 】

FIG. 2



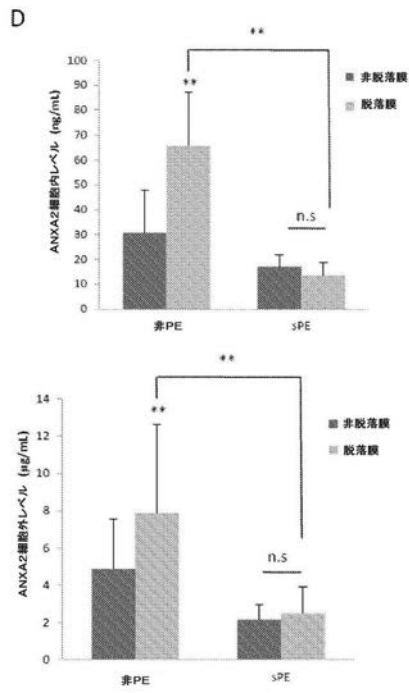
【 図 2 - 2 】

FIG. 2



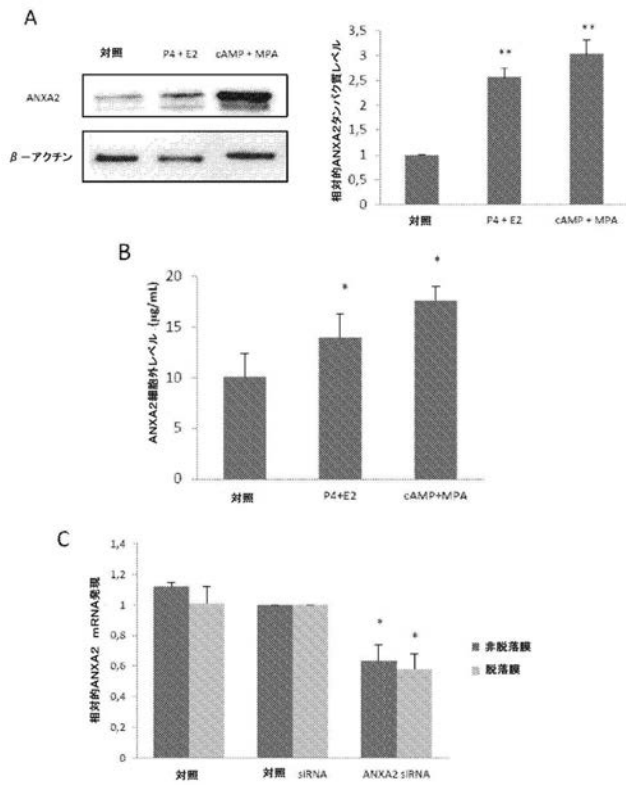
【 図 2 - 3 】

FIG. 2



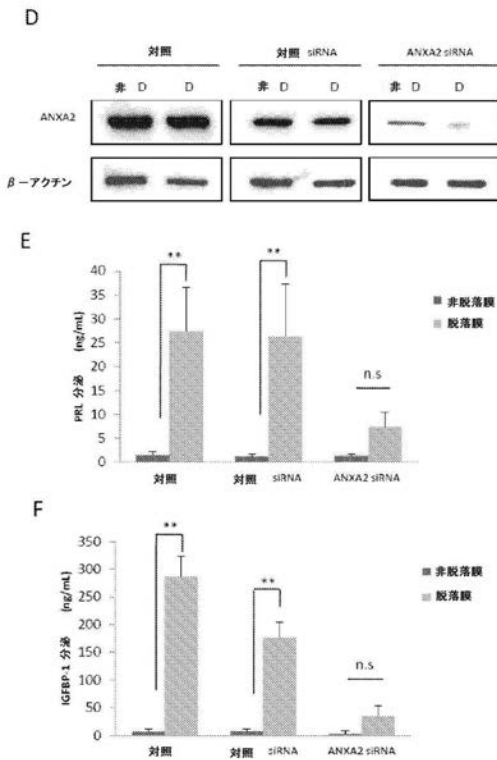
【 図 3 - 1 】

FIG. 3



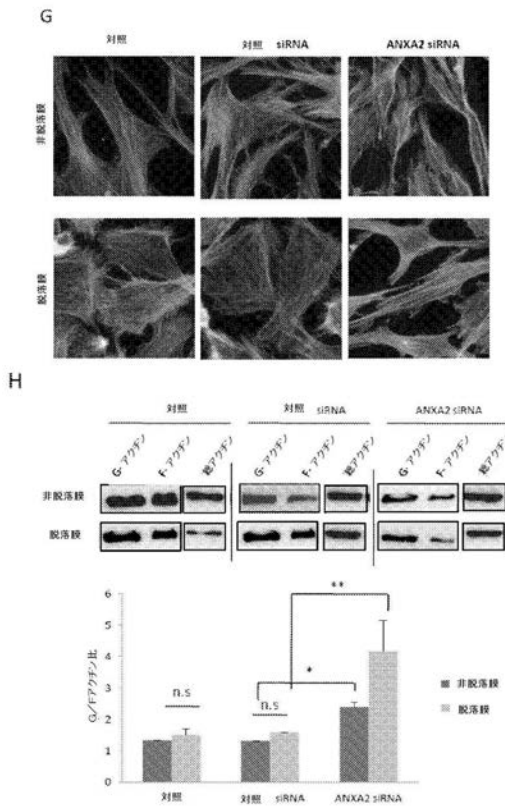
【 図 3 - 2 】

FIG. 3



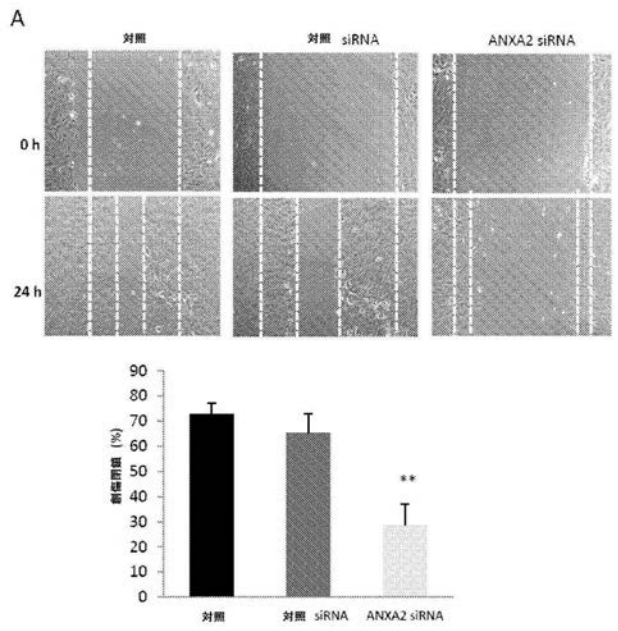
【 図 3 - 3 】

FIG. 3



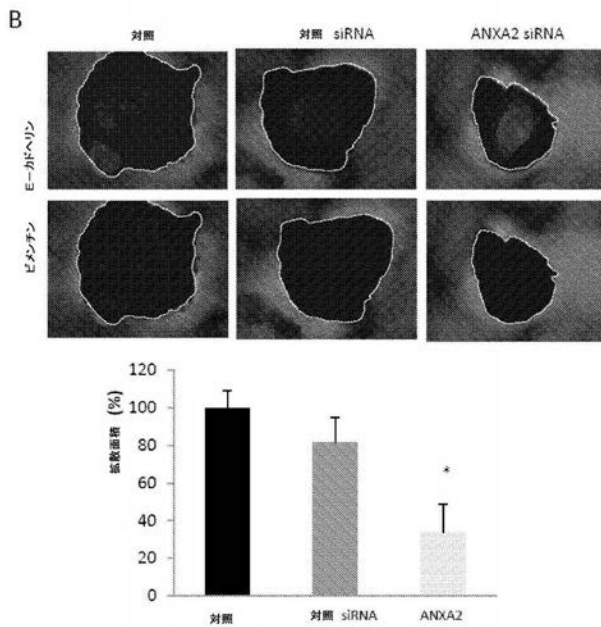
【 図 4 A 】

FIG. 4



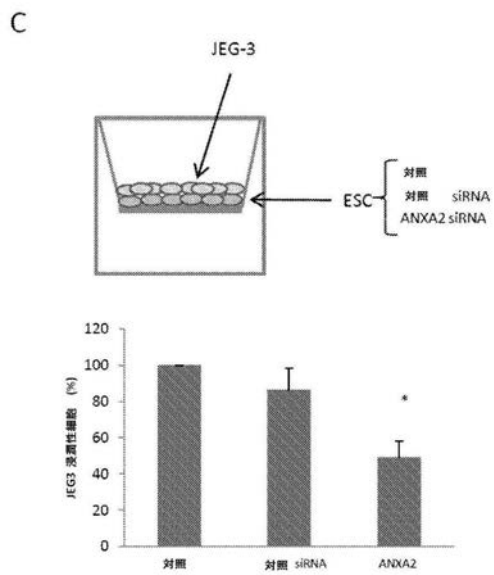
【 図 4 B 】

FIG. 4



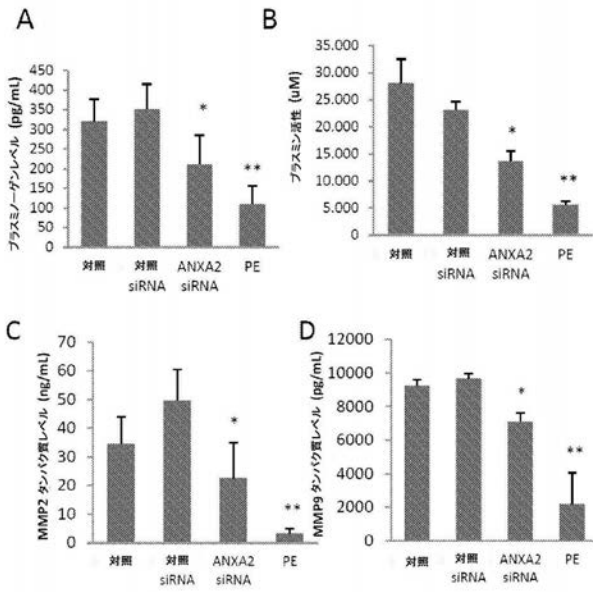
【 図 4 C 】

FIG. 4



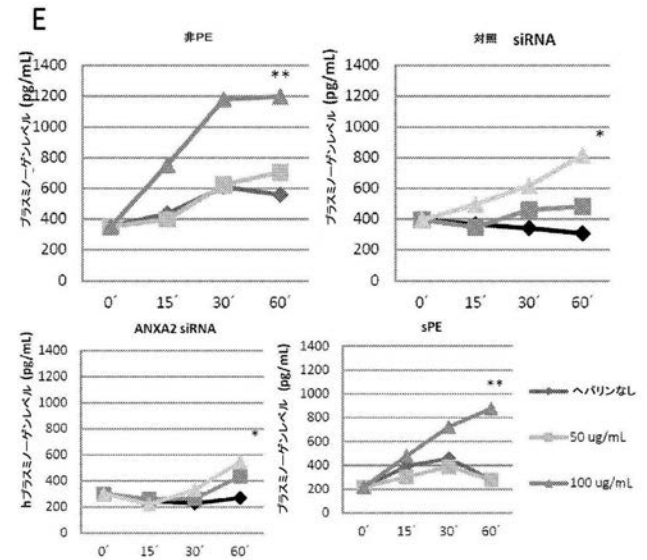
【 図 5 - 1 】

FIG. 5



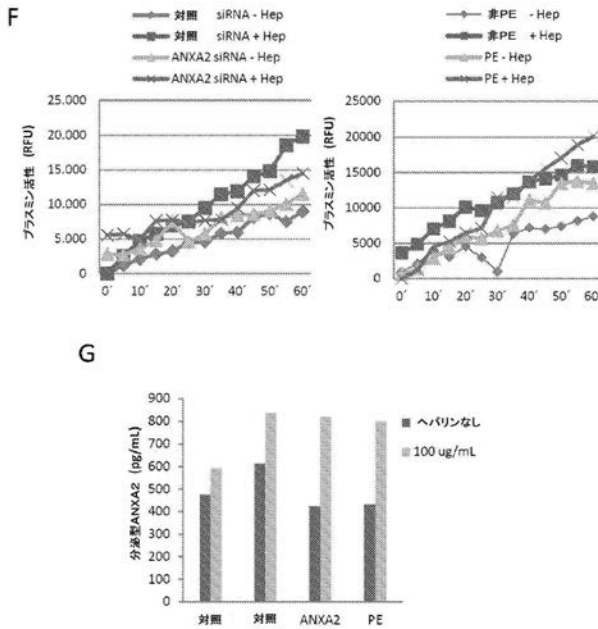
【 図 5 - 2 】

FIG. 5



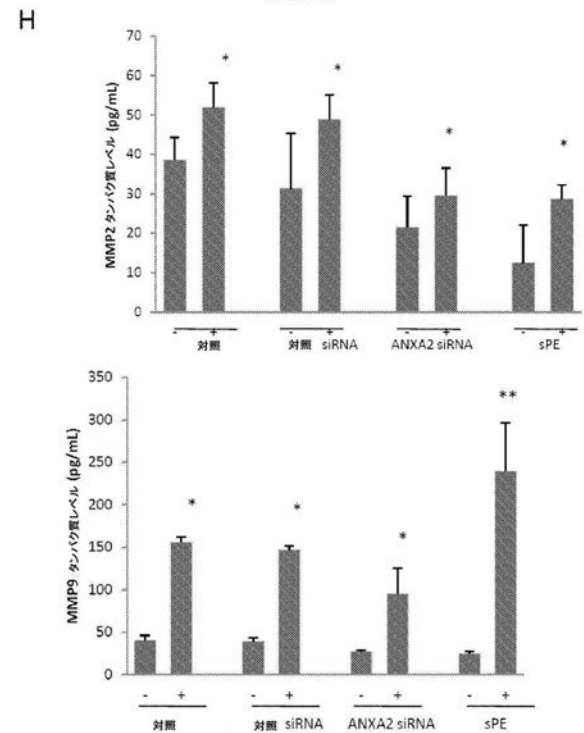
【 図 5 - 3 】

FIG. 5



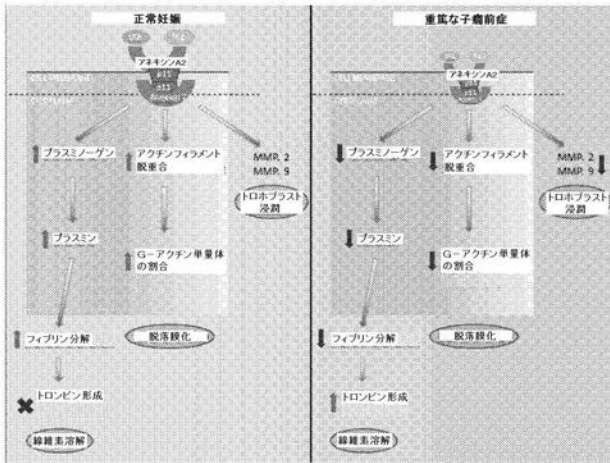
【 図 5 - 4 】

FIG. 5



【 図 6 】

FIG. 6

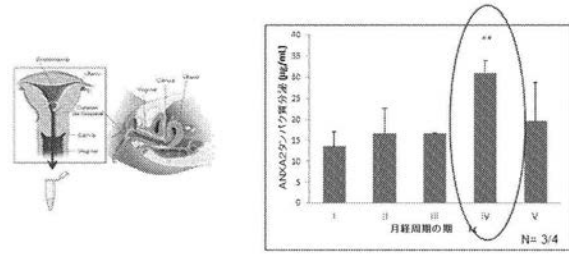


【 図 7 】

FIG. 7

子宮内膜液におけるANXA2の研究

ELISAにより測定された子宮内膜液におけるANXA2のレベル



ANXA2は、子宮内膜液において検出され、非侵襲性マーカーとして使用される。

【 配列表 】

2017513021000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2015/001404

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 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		
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, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	XIN HONG ET AL: "Alterations of profibrinolytic receptor annexin A2 in pre-eclampsia: A possible role in placental thrombin formation", THROMBOSIS RESEARCH, vol. 129, no. 5, 24 August 2011 (2011-08-24), pages 563-567, XP028914427, ISSN: 0049-3848, DOI: 10.1016/J.THROMRES.2011.07.039	9,10, 12-15
Y	abstract, p. 565, col. 1 and 2, the last paragraphs, Discussion	1,2,4-8, 25-27
A	----- -/--	3,11, 16-20
<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 : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
11 November 2015		19/11/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hoesel, Heidi

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2015/001404

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FERRAZZANI SERGIO ET AL: "Prophylaxis of Recurrent Preeclampsia: Low-Molecular-Weight Heparin plus Low-Dose Aspirin versus Low-Dose Aspirin Alone", HYPERTENSION IN PREGNANCY, vol. 25, no. 2, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 115-127, XP055226126, US ISSN: 1064-1955, DOI: 10.1080/10641950600745517	21-24
Y	the whole document	1,2,4-8, 25-27
A	----- WO 2013/081554 A1 (AGENCY SCIENCE TECH & RES [SG]; SINGAPORE HEALTH SERV PTE LTD [SG]) 6 June 2013 (2013-06-06) abstract	1-27
A	----- ELLEN MELALEUCA MENKHORST ET AL: "Decidual-Secreted Factors Alter Invasive Trophoblast Membrane and Secreted Proteins Implying a Role for Decidual Cell Regulation of Placentation", PLOS ONE, vol. 7, no. 2, 16 February 2012 (2012-02-16), page e31418, XP055226071, DOI: 10.1371/journal.pone.0031418 abstract, p. 5, col. 1/2 "Annexin A2", p. 8, col. 1, par. 3 and 4	1-27
A	----- WO 2014/001244 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HUND MARTIN [CH];) 3 January 2014 (2014-01-03) abstract	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2015/001404

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013081554 A1	06-06-2013	AU 2012346594 A1	19-06-2014
		CN 104053668 A	17-09-2014
		EP 2785734 A1	08-10-2014
		JP 2015504310 A	12-02-2015
		KR 20140106550 A	03-09-2014
		US 2014323595 A1	30-10-2014
		WO 2013081554 A1	06-06-2013

WO 2014001244 A1	03-01-2014	AU 2013283540 A1	13-11-2014
		CA 2871878 A1	03-01-2014
		CN 104412107 A	11-03-2015
		EP 2867670 A1	06-05-2015
		JP 2015525870 A	07-09-2015
		KR 20150023063 A	04-03-2015
		WO 2014001244 A1	03-01-2014

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
A 6 1 P 15/00 (2006.01) A 6 1 P 15/00 Z N A

(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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 シモン, カルロス

スペイン国 エ - 4 6 9 8 0 パテルナ (バレンシア), セノカテドラティコ アグスティン
 エスカルディノ 9, パーク サイエントフィック ウニベルシタット デ バレンシア,
 フンダシオン イウベイ

(72)発明者 ガリド, タマラ

スペイン国 エ - 4 6 9 8 0 パテルナ (バレンシア), セノカテドラティコ アグスティン
 エスカルディノ 9, パーク サイエントフィック ウニベルシタット デ バレンシア,
 フンダシオン イウベイ

(72)発明者 ペイセール, アントニオ

スペイン国 エ - 4 6 9 8 0 パテルナ (バレンシア), セノカテドラティコ アグスティン
 エスカルディノ 9, パーク サイエントフィック ウニベルシタット デ バレンシア,
 フンダシオン イウベイ

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 EA25 EA26 EA27 NA20 ZA81

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2017513021A5	公开(公告)日	2018-04-26
申请号	JP2017500456	申请日	2015-03-19
[标]发明人	シモンカルロス ガリドタマラ ペイセールアントニオ		
发明人	シモン, カルロス ガリド, タマラ ペイセール, アントニオ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 A61K31/726 A61K31/727 A61K31/737 A61P15/00		
CPC分类号	G01N33/689 G01N2800/368 A61K31/727 A61P15/00 G01N2333/47		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.545.A A61K31/726 A61K31/727 A61K31/737 A61P15/00.ZNA		
F-TERM分类号	4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA25 4C086/EA26 4C086/EA27 4C086/NA20 4C086/ZA81		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/968728 2014-03-21 US 61/969520 2014-03-24 US		
其他公开文献	JP2017513021A JP6684263B2		

摘要(译)

本发明提供了一种用于可靠地识别患有先兆子痫 (PE) 或易于发展它们的女性的非侵入性测定法。该方法包括测量从受试者获得的测试样品中膜联蛋白A 2 (ANXA 2) 的水平, 并确定测试样品中ANXA 2的水平相对于对照样品是否降低, 或者如果发生先兆子痫的风险很高, 则主题是相同的包括设置步骤。还提供了用于治疗患有PE或被鉴定为处于发展先兆子痫高风险的受试者的方法。