

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4509967号  
(P4509967)

(45) 発行日 平成22年7月21日(2010.7.21)

(24) 登録日 平成22年5月14日(2010.5.14)

(51) Int.Cl. F I  
**GO 1 N 33/53 (2006.01)** GO 1 N 33/53 B  
 CO 7 K 16/26 (2006.01) CO 7 K 16/26

請求項の数 1 (全 17 頁)

|              |                               |           |                      |
|--------------|-------------------------------|-----------|----------------------|
| (21) 出願番号    | 特願2006-140350 (P2006-140350)  | (73) 特許権者 | 000001926            |
| (22) 出願日     | 平成18年5月19日(2006.5.19)         |           | 塩野義製薬株式会社            |
| (62) 分割の表示   | 特願平11-502046の分割               |           | 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号  |
| 原出願日         | 平成10年6月2日(1998.6.2)           | (74) 代理人  | 100113789            |
| (65) 公開番号    | 特開2006-267125 (P2006-267125A) |           | 弁理士 杉田 健一            |
| (43) 公開日     | 平成18年10月5日(2006.10.5)         | (74) 代理人  | 100103230            |
| 審査請求日        | 平成18年5月31日(2006.5.31)         |           | 弁理士 高山 裕貢            |
| (31) 優先権主張番号 | 特願平9-143771                   | (72) 発明者  | 中尾 一和                |
| (32) 優先日     | 平成9年6月2日(1997.6.2)            |           | 京都府京都市西京区大枝北沓掛町4-1-2 |
| (33) 優先権主張国  | 日本国(JP)                       |           |                      |
|              |                               | 審査官       | 赤坂 祐樹                |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レプチン測定による疾患のスクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生体試料中の非脂肪組織由来のレプチンを測定することによる胞状奇胎もしくは絨毛膜癌のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は肥満遺伝子産物であるレプチンを測定することによる癌または妊娠疾患の検出方法および妊娠の判定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

レプチンは遺伝性の肥満マウス(o b / o bマウス)が欠失している遺伝子としてポジショナルクローニングされた肥満遺伝子(o b 遺伝子)の産物としてJ. F. Friedmanらにより発見され、マウスo b 遺伝子を用いてヒト組織細胞由来のc D N Aライブラリーからヒトo b 遺伝子のc D N Aをクローン化した(3)。レプチンは脂肪組織で発現していることが知られており、細胞外に分泌シグナルを持ち、血流中に分泌されるホルモンである。分泌されたレプチンは脳の視床下部の食欲中枢に作用し、摂食活動をコントロールして、脂肪摂取を抑えるものと考えられている。

【0003】

最近、マウスおよびヒトレプチン受容体(o b - R)がクローン化され、サイトカイン

受容体スーパーファミリーである *gp130* ファミリーに属する単一の膜1回貫通型受容体タンパク質であることが報告され(11)、組換え *ob-R* がレプチンと特異的に強く結合することも確認された。*ob-R* は腎臓、肺で強く発現しており、脳、その他では心臓、肝臓、平滑筋でも発現が確認されている(1、13、14、15、23)。*ob-R* にはいくつかのイソ型が存在し、生理活性を有する *ob-Rb* イソ型は脳、特に満腹中枢である視床下部で最も豊富に発現されている(12、13、14、15、16、17)。肥満マウス(*db/db* マウス)では遺伝子の点突然変異による *ob-Rb* の欠損が、肥満ラット(*fa/fa* ラットおよび *fa<sup>k</sup>/fa<sup>k</sup>* ラット)では *ob-R* 遺伝子の変異による *ob-R* の変異が報告されており(15、24、25)、これらの動物はいずれもレプチン抵抗性で、肥満を起し、*ob/ob* マウスと同様の肥満関連表現型を示すことが明らかとなった(26)。

10

これらのことは肥満症が *ob* 遺伝子またはその受容体遺伝子の変異、欠失によりレプチンのホルモンとして正常に作用しないことに起因していることを示している。

*ob* 遺伝子の発現およびレプチンの分泌は肥満モデル動物およびヒト肥満においてその重症度に比例して増加することが報告されている(3、5、18、19、20、21、22)。抗肥満効果を調べるために *ob/ob* マウスや正常のレプチンを持つ肥満マウスに組換えマウスレプチンおよびヒトレプチンを投与したところ、体温上昇、エネルギー消費量(基礎代謝量)の増大を引き起こし、体重の減少が観察されたことから体重調節因子(1、2、3)や満腹因子(3、4、5、6、7、8、9、10)であると考えられる。

#### 【0004】

また、レプチンは神経内分泌系および生殖系の重要な調節物質でもある。*ob/ob* マウス、糖尿病モデル動物である *db/db* マウスおよび *fa/fa* ラットがいくつかの内分泌異常を有する不妊であることが知られており(26)、雌の *ob/ob* マウスにレプチンを投与すると、摂食や体重の変化とは無関係に不妊を治療できることが報告されている(27)。正常の絶食マウスにレプチンを投与すると、血漿中の性腺刺激ホルモンとチロキシンのレベルが上昇し、副腎皮質刺激ホルモンとコルチコステロンのレベルが低下することも報告されている(28、29)。

20

#### 【0005】

現在、日常臨床検査における妊娠診断の補助薬として尿中ヒト絨毛性ゴナドトロピン(*hCG*)を検出する方法が妊娠の指標として広く用いられている。*hCG* は受精・着床により、胎盤の絨毛組織から分泌される分子量約38,000の糖タンパクホルモンである。尿中の *hCG* は、妊娠第5週より上昇し、第9から14週で最高値を示した後やや減少するものの分娩までほぼ同様のレベルが維持される。従って、尿中の *hCG* は妊娠診断の指標とされる他、*hCG* の存在が絨毛組織の存在を意味し、絨毛性疾患の診断や管理にも用いられている。しかし、*hCG* はヒト黄体ホルモン(*hLH*)、ヒト濾胞刺激ホルモン(*hFSH*)、ヒト甲状腺刺激ホルモン(*hTSH*)やヒトプロラクチン(*hPRL*)との交叉性が認められ、特異性が問題とされている。妊娠診断において *hCG* が他のホルモン類と交叉性を示すことから、妊娠判定マーカーとして完全なものではなかった。

30

#### 【0006】

さらに、ホルモンには腫瘍診断の指標としての有用性も期待できる。本来ホルモンを産生していない組織が腫瘍化することにより産生されるホルモンを異所性ホルモンと言い、異所性ホルモンを産生する腫瘍を異所性ホルモン産生腫瘍と言う。異所性ホルモン産生腫瘍の診断は(1)ホルモン過剰の症状または検査所見の異常、(2)腫瘍組織の摘出によりホルモン過剰症状の改善、(3)腫瘍組織からの正常組織より高いホルモン活性の証明が基準となる。異所性ホルモンとしては副腎皮質刺激ホルモン(*ACTH*)、抗利尿ホルモン(*ADH*)、副甲状腺ホルモン(*PTH*)、膵分泌性トリプシンインヒビター(*PSI*)、成長ホルモン、バソプレッシンおよびソマスタチンなど多数が知られており、レプチンも同様の有用性が期待できる。腫瘍診断には異所性ホルモン以外に多くの腫瘍マーカーを測定する方法が開発されている。現在有用とされている腫瘍マーカーは特定疾患への特異性が低く、それらの多くは、たとえ癌患者であっても血中濃度は極めて低いために、例えば、*α*-フェトプロテイン(*AFP*)や癌胎児抗原(*CEA*)、膵癌胎児性抗原(*P*

40

50

OA)などの多くの測定は高感度が要求される。放射性免疫測定法(RIA)を用いれば高感度な測定が行えるが、有効期限や廃棄物処理などの様々な規制が問題となっている。最近の科学の進歩により、抗原や単クローン抗体の作成の簡便性や新しい酵素基質、蛍光剤の開発により、酵素免疫法(EIA)や蛍光免疫測定法(FIA)でも高感度が得られるようになった。しかし、経済性や簡便性から十分といえる腫瘍マーカーは報告されていない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

これまでの報告からレプチンは脂肪細胞で産生・分泌される肥満因子であり、体脂肪調節において重要な役割を担っており、神経内分泌系や生殖系においても重要な生理活性調節物質であることが推測される。現在、レプチンが摂食およびエネルギー支出の調節に關与する脂肪細胞由来循環肥満因子であり、肥満症の診断・治療への有用性および臨床への応用が検討されている。しかしながら、非脂肪細胞からのレプチン産生や神経内分泌系や生殖系における生理活性調節機能に関してはまだほとんど解明されていない。

【課題を解決するための手段】

【0008】

妊娠女性の血漿レプチン量が非妊娠女性の体型指数(BMI)から推測される量と比較して有意に上昇し、肥満者の血漿レプチン量(18、20、21)とほぼ同等の値を示すことを見出した。そして、レプチン発現細胞を調べるためにヒト妊娠子宮細胞の免疫組織染色およびノーザンブロット分析を行ったところ、非脂肪細胞である胎盤絨毛膜組織、平滑筋絨毛膜、羊膜、詳細には、栄養膜細胞、合胞体栄養膜細胞層および羊膜細胞でレプチンが産生されていることを見出した。

【0009】

また、ヒト妊娠絨毛膜癌転移巣由来のBeWo細胞でも同様の分析を行ったところ、レプチンが産生されていること、さらに、絨毛性疾患である胎状奇胎や絨毛膜癌などの栄養膜疾患の患者において血漿レプチン量が有意に上昇し、外科的治療または化学療法後には低下することを見出した。このことから、レプチンの異所性ホルモン産生腫瘍マーカーとしての有用性が期待できる。

【0010】

本発明者らは、生体試料中の非脂肪組織由来レプチンを測定することが癌および絨毛性疾患における疾患活動性および/または治療効果を反映する有用な診断指標となること、および妊娠の判定指標に有用であることを見出した。すなわち、本発明は、

(1) 生体試料中の非脂肪組織由来レプチンを測定することによる疾患のスクリーニング方法、

(2) 癌である上記(1)記載の方法、

(3) 癌が絨毛膜癌である上記(2)記載の方法

(4) 子宮関連疾患である上記(1)記載の方法、

(5) 子宮関連疾患が栄養膜疾患である上記(4)記載の方法、

(6) 栄養膜疾患が胎状奇胎または絨毛膜癌である上記(5)記載の方法、

(7) 癌細胞の存在、不存在を判定する方法であって、癌が疑われる患者から生体試料を採取してレプチン量を測定し、該患者と年齢および体型指数が同等の健常人の同試料中レプチン量を比較することを特徴とする方法、

(8) 癌細胞の存在、不存在を判定するためのレプチン測定方法、

(9) 生体試料中の非脂肪組織由来のレプチンを測定することによる妊娠の判定方法、に関する。

【0011】

本発明は生体試料中のレプチン発現の有無およびその量を測定した結果を基礎とする。即ち、本発明は、患者の生体試料中の非脂肪組織での発現の有無および該組織由来のレプチン量を測定することによる疾患検出方法に関する。

脂肪組織は細胞内に脂肪を貯蔵し、糖からの脂質生合成およびその分解機能を持つ細胞で構成されている。よって、「非脂肪組織」とは脂肪組織由来のそのような細胞以外の細胞から構成される組織を意味する。

「生体試料」としては組織、血漿、血清、尿および羊水などが用い得ることができるがこれらに限定されない。

「疾患」としては癌および妊娠関連疾患などが対象となる。ここで、癌とは悪性腫瘍全般、あるいはそれによる疾病状態を指し、腫瘍細胞の形態や配列が種々の点で元の正常細胞とは異なっており、浸潤性・転移性があるが放置すれば致死的である腫瘍であり、胃癌、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、大腸癌および絨毛膜癌などが挙げられるがこれらに限定されない。また、妊娠関連疾患とは妊娠女性または非妊娠女性のいずれであっても良く、詳細には、子宮組織および胎盤、羊膜細胞ならびに漿膜など女性特有の組織を含む器官に見られる疾患を意味する。

10

#### 【0012】

また、本発明は癌細胞の存在、不存在を判定する方法に関する。詳細には、癌が疑われる患者から、生体試料として血液、尿、組織などを採取し、試料中のレプチン量を測定する。その結果を該患者と年齢および体型指数が同等の健常人の同試料中レプチン量を比較することにより癌細胞の存在、不存在を判定することにより癌を診断する。

さらに、本発明は、生体試料中の非脂肪組織由来のレプチンを測定することによる妊娠の判定法に関する。生体試料として血液、尿および羊水などを用いることが可能である。

#### 【発明の効果】

20

#### 【0013】

本発明によって提供されるレプチンの検出方法はレプチンの発現状態を解析するのに有用であり、癌および子宮関連疾患の原因解明や子宮関連疾患の診断および治療方法の新たな開発に有用である。また、本発明によって妊娠診断に新たな手段を提供し、レプチンの非脂肪細胞における機能の解明により、胎盤の機能、栄養細胞の分化と成熟、エネルギー代謝および妊娠の制御などを解明するのに有用であり、それによりレプチンの生理機能を解析する新たな手段を提供するのに有用である。さらに、本発明によって提供されるレプチン測定による癌または子宮関連疾患のスクリーニング方法は疾患活動性および/または治療効果を反映する妊娠栄養膜疾患および癌の有用なマーカーとして利用し得る。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

30

#### 【0014】

次に本発明の工程を順次説明する。本発明において、特に指示のない限り、当該分野で公知である免疫学的手法、組織標本作製技術、細胞培養技術、RNAの分離精製方法および分析法が採用され得る。

#### 【0015】

抗ヒトレプチン抗体の作製

ヒトレプチンに対する抗体は、例えば、Masuzakiら(4)が報告しているレプチンのアミノ酸配列の一部に基づいて通常のペプチド合成機で合成したペプチドや、当該分野で公知である遺伝子組換え技術を採用して作製された組換えレプチンを通常の方法で精製し、これらを免疫原として、マウス、ラット、ハムスター、ウサギなどの動物を免疫して、その血清由来のポリクローナル抗体を作製し得る。または、免疫したマウスやラットの脾臓またはリンパ節から細胞を摘出し、ケーラーとミルシュタインによる細胞融合法(42)によりミエローマと融合させてハイブリドーマを作製した後、該ハイブリドーマを培養し、単クローン抗体を産生させ、その培養液から単クローン抗体を分離・調製する。

40

#### 【0016】

レプチンの免疫学的定量方法

免疫測定方法としては、例えば、放射性同位体、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ルシフェラーゼなどの酵素やアクリジニウムやクリプテートなどの蛍光物質で標識した抗レプチン抗体またはレプチンを用いたサンドイッチ法または競合法などの酵素免

50

疫測定法 ( E I A )、蛍光免疫測定法 ( F I A ) または放射免疫測定法 ( R I A )、などから選ばれる方法で定量することができる。使用する抗体はポリクローナル抗体、単クローン抗体であってもよく、石川の方法 ( 43 ) などに記載されているそれ自体公知の方法を用いることができる。例えば、Hosodaらのレプチン放射性免疫測定方法 ( 21 ) に従ってレプチンの定量が行える。これらの方法により臓器、組織、細胞、血液、尿や羊水などの試料中に微量に含まれるレプチンの測定が可能であるが、試料はこれらに限定されない。

#### 【 0 0 1 7 】

##### 測定試料の調製

血液試料は、例えば、被験者から採血後、血液を 1 m g / m l エチレンジアミン四酢酸 2 ナトリウム ( E D T A ・ 2 N a ) 入りシリコン処理したガラス管に分注し、 4 、 1 0 0 0 × g にて 1 0 分間遠心分離する。遠心分離後、液体窒素で試料を凍結し、 - 2 0 で保存し、使用時に解凍する。羊水は、例えば、被験者から採取後、遠心分離し、上清を - 2 0 で保存する。

10

#### 【 0 0 1 8 】

##### 癌細胞の存在、不存在を判定する方法

癌が疑われる患者から生体試料を採取してレプチン量を測定し、該患者と年齢および体型指数が同等の健常人の同試料中レプチン量を比較することにより癌細胞の存在、不存在を判定する方法である。「体型指数」とは B M I ( B o d y M a s s I n d e x ) と称され、「身長」と「体重の 2 乗の逆数」の積から算出される指数を意味する。よって、「該患者と年齢および体型指数が同等の健常人の同試料中のレプチン量」とは、その患者に癌細胞が存在していない状態の時に期待されるレプチン量を意味する。レプチン量は正常な状態であれば主として年齢および体型指数によって一定の範囲内に規定されるからである。なお、「同等」なる表現は、診断の分野において数値の数学的な一致を求めることが困難なことから、当業者が同一と認めてもよい許容範囲をもった同一性をあらわす。

20

#### 【 0 0 1 9 】

##### 妊娠の判定

妊娠が疑われる女性から生体試料を採取して非脂肪組織由来のレプチンを測定することにより妊娠を判定する方法である。正常な非妊娠者のレプチン量は年齢および体型指数から一定の範囲内に規定される。レプチンは正常者であれば脂肪細胞からしか産生されていないため、体型指数から推測される範囲以上のレプチンは非脂肪細胞から産生されたものであると考えられる。よって、「非脂肪組織由来のレプチンを測定すること」とは妊娠者のレプチン量から年齢および体型指数が同等の正常な非妊娠女性の同試料中のレプチン量を差し引いた量を測定することを意味する。

30

#### 【 0 0 2 0 】

次に実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらにのみ限定されるものではない。

#### 【 実施例 1 】

#### 【 0 0 2 1 】

##### 妊娠女性の血漿レプチン量の測定

( 1 ) 抗レプチン抗体：免疫原として全長レプチンを用いて Hosoda ら ( 21 ) が作製したウサギ抗ヒトレプチン抗血清を使用した。

40

組換えヒトレプチン 2 5 0 μ g を含む溶液 5 0 0 μ l に等量のフロイントの完全アジュバント混合した懸濁液をオス日本ウサギに皮下注射し、免疫を行った。

追加免疫は 3 週間毎に行い、各免疫後 1 0 日から 1 4 日に採取を行って、レプチン抗血清 ( N o . 9 5 - 1 - 4 ) を得た。

#### 【 0 0 2 2 】

( 2 ) <sup>125</sup>I によるヒトレプチンの標識：Hosoda らの方法 ( 21 ) と同様に、ヒトレプチンをクロラミン T 法により <sup>125</sup>I で標識し、S e p h a d e x G - 5 0 カラム 1 × 3 0 c m ( ファルマシア ) を用いて精製した。

ヒトレプチン 5 μ g をクロラミン T 法により <sup>125</sup>I で標識し、標準液を含む反応液を S e

50

phadex G - 50 カラム  $1 \times 30 \text{ cm}$  に供した。 $^{125}\text{I}$  標識ヒトレプチンを  $0.1 \text{ M}$  リン酸緩衝液、 $\text{pH} 7.4$  (含  $0.5\%$  BSA、 $0.1\%$   $\text{NaN}_3$ ) で溶出し、 $^{125}\text{I}$  標識レプチン分画を得た。

#### 【0023】

(3) レプチンRIA: レプチンRIAで使用する試薬はRIA緩衝液;  $0.1 \text{ M}$  リン酸緩衝液、 $\text{pH} 7.4$  (含  $0.5\%$  BSA、 $0.1\%$   $\text{NaN}_3$ ) で調製した。RIA抗体溶液は、実施例1(1)で作製したポリクローナル抗体(No. 95-1-4)をRIA緩衝液で24,000倍希釈して調製したものを用いた。各種標準ヒトレプチンまたは試料  $100 \mu\text{l}$  にRIA抗体溶液  $100 \mu\text{l}$  およびRIA緩衝液  $200 \mu\text{l}$  を添加し、4で24時間放置した。その後、 $^{125}\text{I}$  標識レプチン  $100 \mu\text{l}$  ( $10,000 \text{ cpm}$ ) を添加し、さらに4で24時間放置した。B/F分離は二抗体法により行い、沈殿物の放射活性を - カウンターで測定した。

10

#### 【0024】

(4) 被験者からの試料の採取: 妊娠8週から36週までの正常な妊娠女性73名 ( $30.1 \pm 3.9$  歳) および非妊娠女性87名 ( $31.2 \pm 5.1$  歳) から一晩絶食後、午前6時に横臥位で肘前静脈より採血を行った。妊娠女性は妊娠期および分娩後に継続的に採血を行った。分娩前の帝王切開4名は分娩1時間前および術後1、4、24時間後に採血を行った。採取した血液試料は直ちにEDTA・2Na (最終濃度  $1 \text{ mg/ml}$ ) 入りの冷やしたシリコン処理ガラス管に分注し、4、1,000×gで10分間遠心分離を行った。分離後は、試料を液体窒素で凍結し、使用するまで-20で保存した。

20

#### 【0025】

(5) 血漿中レプチンの定量: 妊娠女性および非妊娠女性から採取した血漿検体中のレプチン量をレプチンRIAで測定し、標準曲線から試料中のレプチン量を算出した。得られた結果を図1に示す。被験者の体型指数(BMI)で比較したところ、 $18 \text{ BMI} < 22$  において非妊娠女性37名(図1A、レーン1)では  $8.9 \pm 1.7 \text{ ng/ml}$  に対し妊娠女性13名(図1A、レーン2)では  $41.4 \pm 5.5 \text{ ng/ml}$  (約4.7倍;  $P < 0.001$ )、 $22 \text{ BMI} < 25$  において非妊娠女性19名(図1A、レーン3)で  $17.2 \pm 4.6 \text{ ng/ml}$  に対し妊娠女性9名(図1A、レーン4)で  $40.6 \pm 6.3 \text{ ng/ml}$  (約2.4倍;  $P < 0.001$ )、 $25 \text{ BMI} < 32$  において非妊娠女性31名(図1A、レーン5)では  $24.2 \pm 2.9 \text{ ng/ml}$  に対し妊娠女性7名(図1A、レーン6)では  $55.1 \pm 11.7 \text{ ng/ml}$  (約2.3倍;  $P < 0.05$ ) といずれも妊娠女性において有意に高い値を示した。

30

また、非妊娠女性(図1B、 )ではConsidineらやHosodaらの報告(20、21)と同様に血漿レプチン量とBMIには正の相関が見られた(相関係数  $r = 0.46$ ;  $P < 0.001$ )。しかし、妊娠女性(図1B、 )では血漿レプチン量とBMIの間に相関は見られなかった。

#### 【0026】

(6) 妊娠女性の血漿レプチン量の経時的測定: 妊娠女性40名 ( $28.2 \pm 4.5$  歳) の血漿レプチン量をレプチンRIAで経時的に測定し、非妊娠女性41名 ( $26.7 \pm 3.3$  歳;  $9.0 \pm 1.9 \text{ ng/ml}$ ) とBMIについて比較した。得られた結果を図2、3に示す。

40

#### 【0027】

妊娠第1三半期(妊娠1週~12週)(図2、レーン1)で  $26.7 \pm 3.2 \text{ ng/ml}$  ( $P < 0.001$ ) と有意に上昇していた。妊娠第2三半期(妊娠13週~26週)(図2、レーン2)で  $42.7 \pm 4.3 \text{ ng/ml}$  ( $P < 0.001$ )、妊娠第3三半期(妊娠27週~40週)(図2、レーン3)でも  $40.6 \pm 4.5 \text{ ng/ml}$  ( $P < 0.001$ ) と有意に高い値を示した。分娩後(図2、レーン4)として胎盤娩出24時間後の血漿レプチン量を測定したところ  $21.4 \pm 2.7 \text{ ng/ml}$  と妊娠第1三半期より低下した。帝王切開4名 ( $29.3 \pm 3.2$  歳)(図3)については分娩1時間前で  $34.8 \pm 5.2 \text{ ng/ml}$  であるのに対し、分娩1時間後で  $19.4 \pm 3.2 \text{ ng/ml}$ 、24時

50

間後で  $10.4 \pm 1.5 \text{ ng/ml}$  と低下する傾向にあり、BMI から推定される値にまで低下していた。

妊娠女性については非妊娠女性との年齢に有意さは見られないにもかかわらず、BMI から推測される血漿レプチン量と比較して有意に上昇しており、肥満者の血漿レプチン量 (18、20、21) とほぼ同等の値を示していた。この事はレプチンが妊娠子宮で産生され、かなりの量が母体循環に入ることを示唆しており、妊娠期には胎盤から母体に作用する液性信号として体重調節とは別の機能的役割を果たしていることが推測できる。

#### 【実施例 2】

##### 【0028】

組織中のレプチン発現

(1) ノーザンブロット解析によるレプチン mRNA の発現解析：腹部皮下脂肪の成熟脂肪細胞、胎盤絨毛膜組織 (妊娠 36 週)、第 1 三半期絨毛膜絨毛 (妊娠 8 週)、第 3 三半期平滑絨毛膜 (妊娠 36 週)、羊膜 (妊娠 16 および 36 週)、真性脱落膜 (妊娠 8 週) および子宮筋層 (妊娠 14 週) から Masuzaki らの方法 (4) に従って総 RNA を抽出した。単離した RNA  $20 \mu\text{g}$  を、アガロースゲル中で電気泳動にかけ、ナイロン膜 Gene Screen Plus (デュボン社) に転写した。これらの膜を Masuzaki らが報告した全ヒト obcDNA (4) を  $^{32}\text{P}$  で標識したものをプローブとして、ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションを行ったメンブレンは強調スクリーンにて X 線フィルムに  $-70^\circ\text{C}$  で 24 時間感光させ、それらを現像してデンシトメーター P-45 (ファルマシア社) で定量を行った。得られた結果を図 4 に示す。

ob mRNA は第 1 三半期絨毛膜絨毛 (図 4、レーン 3、4) で大量に発現し、第 3 三半期平滑絨毛膜 (図 4、レーン 5) および羊膜 (図 4、レーン 6) で少量の発現がみられる。真性脱落膜 (図 4、レーン 9、10) および子宮筋層 (図 4、レーン 11) ではほとんど検出されなかった。

##### 【0029】

(2) 免疫組織染色によるレプチン産生の解析：第 1 三半期 (妊娠 6、8、9 週)、第 2 三半期 (妊娠 14、16、19 週) および第 3 三半期 (妊娠 31、36、38、39 週) に採取した胎盤絨毛膜組織、平滑絨毛膜、真性脱落膜および羊膜ならびに妊娠子宮由来子宮筋腫層組織を O.C.T ティッシュテック (マイルス社) で包埋後、ドライアイス-アセトン中で急速に凍結した。凍結組織をマイクロトーム CRYOCUT 1800 (ライカ社) で  $4 \mu\text{m}$  の凍結切片を作製し、スライドガラス Superfrost-Plus スライド (フィッシャー・サイエンティフィック社) に乗せ、室温で 20 分間乾燥させた。乾燥させた切片試料を PBS 5ml で 15 分間 3 回洗浄し、実施例 1 (1) で作製したウサギ抗ヒトレプチン抗血清 No. 95-1-4 の PBS (含 1% BSA) 100 倍希釈液を添加し、室温で 30 分間反応させた。試料を PBS (含 1% BSA) で 15 分間 3 回洗浄し、フルオレセインイソチオシアネート標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗血清 (シレナストラボラトリーズ社) の PBS (含 1% BSA) 250 倍希釈液を添加し、室温で 30 分間反応させた。試料を PBS (含 1% BSA) で 15 分間 3 回洗浄した後、免疫蛍光顕微鏡 BH2-RFCA (オリンパス社) で蛍光を検出した。特異性を立証するために、近接組織切片を同様の方法で処理した。ただし、ウサギ抗ヒトレプチン抗血清に代わり免疫前ウサギ血清を使用した。得られた結果を図 5 に示す。

レプチンは第 1 三半期絨毛膜絨毛組織の栄養膜 (図 5、1)、第 3 三半期絨毛膜組織の合胞体栄養細胞層 (図 5、2) および羊膜細胞 (図 5、3) でレプチン陽性に染まり、特に、絨毛膜絨毛組織では栄養膜細胞より合胞体栄養細胞層で強く染まった。線維芽細胞およびホープバウアー細胞および免疫前ウサギ血清を用いた染色 (図 5、4、5、6) ではレプチン陰性であった。

##### 【0030】

これらの結果から、レプチンが摂食およびエネルギー支出の調節に関与する脂肪細胞由来循環満腹因子であり (1、2、3、7、8、9、10)、その遺伝子発現ならびにその分泌は成熟脂肪細胞でのみ発現している (3、4、5) と考えられていたが、非脂肪組織であるヒト妊

10

20

30

40

50

娠胎盤および羊膜細胞で発現されていることが明らかとなった。ヒト妊娠子宮由来の胎盤栄養膜および羊膜細胞においてレプチンが産生されていること、ならびに、胎盤が妊娠において重要な役割を果たす様々なホルモンを産生している内分泌臓器であることから(32)、レプチンは胎盤ホルモンの一つであると考えられる。非妊娠女性では体内で循環しているレプチンが脂肪組織で産生されているのに対し、妊娠女性ではその数倍量が胎盤で産生されており、正常マウスにおいてレプチンを投与すると代謝率、体温、運動性が低下するのに対し、*ob/ob*マウスでは代謝率、体温、運動性が上昇する(7)ことから、胎盤から産生されるレプチンが妊娠期に特徴的な高代謝状態に関与していると考えられる。また、レプチン受容体(*ob-R*)がその形態からサイトカイン受容体ファミリーに分類され(1、13、14、15、23)、脳、末梢組織のみならず、栄養膜、脱落膜細胞、羊膜細胞でも発現されていること(データ未発表)、サイトカインであるインターロイキン-6およびその同族体受容体複合体が栄養膜で発現され(34、35)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(*hCG*)およびヒト胎盤ラクトゲン(*hPL*)の分泌を促進し(35、36)、成長ホルモン放出因子の分泌を抑制する局所的信号伝達経路を構成している(37、38)ことから、レプチンが胎盤における自己分泌または/および傍分泌調節物質として作用し、妊娠期の胎盤ホルモン産生を調節していることが示唆される。

#### 【実施例3】

##### 【0031】

*BeWo*細胞におけるレプチンの発現

(1) *BeWo*細胞の培養：胎盤栄養膜が*in vitro*でレプチンを産生するかどうかを明らかにするため、胎盤栄養膜に特徴的な生物学的生化学的特性を多く残しているヒト妊娠絨毛膜癌転移巣由来の*BeWo*細胞(30、31)を用いて*ob*遺伝子の発現およびレプチンの分泌を測定した。

*BeWo*細胞(American Type Culture Collection)を10%ウシ胎仔血清(*FC S*)を添加した*RPMI 1640*培地(ディフコ社)中、37℃、5%二酸化炭素均衡空気のもとで細胞密度が $2 \times 10^5$  cell/mlになるまで培養した後、10cm培養皿に培養細胞10mlを分注し、単層で維持し、実験に供した。増殖*BeWo*細胞の優先表現形は、未分化栄養膜細胞である子宮内栄養膜細胞に類似しており、アデニルシクラーゼ活性化因子であるフォルスコリンを処理することで合胞体栄養細胞層に分化することが知られている(31)。そこで、*BeWo*細胞を細胞が密集状態になるまで培養した後、培地を除去した細胞にフォルスコリン処理区には20μMまたは2μMのフォルスコリン(シグマ社)を含有する*RPMI 1640*培地(含10%*FC S*)を、無処理区にはフォルスコリンを含有しない同培地を添加し、培養した。

##### 【0032】

(2) *RIA*による培地中レプチンの定量：培地中の分泌されたレプチンをレプチン*RIA*により定量した。

細胞培養液100μlに*RIA*抗体溶液100μlおよび*RIA*緩衝液200μlを添加し、4℃で24時間放置した。以下、実施例1(2)と同様の操作により測定し、標準曲線からレプチン量を算出した。

##### 【0033】

(3) 培地中レプチンのゲルろ過クロマトグラフィーによる測定：培地中のレプチンをHosodaらの方法(21)に従って高性能ゲルろ過クロマトグラフィーにより分画し、レプチン*RIA*で定量した。*RIA*緩衝液で平衡化したSephadex G-50カラム(1×30cm)(ファルマシア社)に細胞培養液0.2mlを供し、同緩衝液を用い、流量30ml/mlで溶出し、0.5mlずつ分取した。各分画のレプチン量はレプチン*RIA*で測定し、定量した。流量はブルーデキストラン(*Vo*)および $^{125}\text{I}$ (*Vt*)から算出した。

##### 【0034】

(4) ノーザンプロット解析による培養細胞におけるレプチン*mRNA*の定量：Masuzakiらの方法(4)に従ってフォルスコリン処理後48時間培養した*BeWo*細胞からの総*R*

10

20

30

40

50

NAを抽出し、実施例2(1)と同様にしてノーザンブロット解析を行った。

【0035】

(5) hCG測定: BeWo細胞はフォルスコリン処理による分化のプロセスhCGが増えることが知られている。そこでBeWo細胞が培養できているかを確認するために培養液中のhCGをhCG免疫測定キットAmerlite hCG-60(ジョンソン&ジョンソン・クリニカル・ダイアグノスティック社)を用いて測定した。

【0036】

BeWo細胞での結果を図5、図6、図7および図8に示した。BeWo細胞培地の段階希釈曲線(図5、 )はヒトレプチンの標準曲線(図5、 )と平行であった。細胞培養液のゲルろ過クロマトグラフィー溶出結果(図6)はヒト血漿および一次培養ヒト脂肪細胞培地での報告(21)と同様に、ヒトレプチン様免疫反応物質が組換えヒトレプチンと同一の溶出ピークに検出された。

10

【0037】

フォルスコリン処理後のレプチン産生量を経時的に測定したところ、レプチン産生量はフォルスコリン処理濃度および時間依存的に上昇し、処理後48時間で20 $\mu$ Mフォルスコリン処理区(図7A、 )は無処理区(図7A、 )の約4倍量、2 $\mu$ Mフォルスコリン処理区(図7A、 )では約3倍量に上昇していた。また、無処理区においても時間依存的にレプチンが蓄積された。

【0038】

フォルスコリン処理後のhCG産生量を経時的に測定したところ、Burreら(30)およびWiceら(31)の報告と同様に20 $\mu$ Mフォルスコリン処理区(図7B、 )、2 $\mu$ Mフォルスコリン処理区(図7B、 )、無処理区(図7B、 )でフォルスコリン処理濃度および時間依存的に上昇した。

20

ノーザンブロット解析では、20 $\mu$ Mフォルスコリン処理区(図8、レーン3)、2 $\mu$ Mフォルスコリン処理区(図8、レーン4)でob遺伝子が大量に発現しており、無処理区(図8、レーン1、2)では少量発現されていた。

【0039】

これらの結果から、栄養膜細胞から合胞体栄養膜細胞層へのフォルスコリン誘発性分化の際にob遺伝子およびレプチン分泌が増強されることが明らかになった。胎盤栄養膜は未分化型の細胞である栄養膜細胞とhCGやhPLなどの胎盤由来ホルモンを分泌する合胞体栄養細胞層の2種類の細胞から構成されており、免疫染色において第1三半期絨毛膜組織では栄養細胞よりも合胞体栄養細胞層で強いレプチン反応を示すことと一致する。さらに、Slakerら(39)およびKosakiら(40)によって成熟脂肪細胞においてob遺伝子発現がcAMPによるダウンレギュレーションを受けていることが明らかにされた。これらのことから、栄養膜および脂肪細胞の間にob遺伝子発現とレプチンの分泌の差動調節が存在することが推測される。

30

【実施例4】

【0040】

羊膜細胞におけるレプチンの産生

実施例2においてレプチン免疫組織染色の結果、羊膜細胞が陽性を示した。そこで、羊膜細胞におけるレプチンの分泌を*in vitro*および*in vivo*で測定するため羊膜細胞の培養細胞および羊膜細胞の分泌が含まれる羊水中のレプチン量を測定した。

40

(1) 羊水の採取: 妊娠20から39週までのさまざまな段階にある妊娠女性および帝王切開時に羊水を採取した。採取した試料は4、1、000 $\times$ gで遠心分離し、分析まで上清を-20で保存した。

【0041】

(2) 羊膜細胞の培養: 羊膜細胞は妊娠38週の自然分娩時に採取し、Itohらの方法(41)に従って、10% FCS-DMEM培地中で一次培養ヒト羊膜細胞を調製した。羊膜細胞一次培養したものを分注し、細胞が密集状態になるまでさらに培養し、維持した。

【0042】

50

(3) レプチン量の定量：羊膜細胞培養液および羊水中のレプチン量を定量した。羊膜細胞は密集状態から5日間培養した培養液または羊水100 $\mu$ lにRIA抗体溶液100 $\mu$ lおよびRIA緩衝液200 $\mu$ lを添加し、4で24時間放置した。以下、実施例1(2)と同様に操作し測定し、標準曲線からレプチン量を算出した。培養液の希釈にはDMEM(含0.5% FCS、5mg/ml BSA)を用いた。

【0043】

(4) 培地中レプチンのゲルろ過クロマトグラフィーによる測定：羊膜細胞培養液0.2mlをRIA緩衝液で平衡化したSephadex G-50カラム、1 $\times$ 30cm(ファルマシア社)に供し、実施例3(3)と同様に操作して、溶出・分画し、各画分のレプチン量をRIAで定量した。

10

【0044】

羊膜細胞での結果を図9および図10に示す。羊水の段階希釈曲線(図9、 )はヒトレプチンの標準曲線(図9、 )と平行であった。羊膜細胞培養液のゲルろ過クロマトグラフィーによる測定結果(図10)はBeWo細胞培養液の測定結果(図6)と本質的には同じ溶出パターンが見られ、組換えヒトレプチンと同様の溶出時間にヒトレプチン用免疫反応性物質が一つのピークで溶出した。妊娠第2および第3三半期の羊水中のヒトレプチン量は $5.0 \pm 2.7$  ng/ml ( $n=5$ )であった。-次培養羊膜細胞から分泌されるレプチン量は約5 ng / 106 cell / 5 daysであった。

【実施例5】

【0045】

絨毛性疾患における血漿レプチン量の測定

BeWo細胞がヒト絨毛膜癌転移巣由来の細胞であることから絨毛性疾患においてレプチンが産生され血液中に循環している可能性が示唆される。そこで、胞状奇胎、絨毛膜癌などの栄養膜疾患患者から血漿を採取し、レプチンの分泌の有無を確認する。

(1) 血漿の採取：胞状奇胎患者3名および絨毛膜癌患者1名から治療前および治療後一晚絶食後午前6時に横臥位で肘前静脈より採血を行った。採血した試料は直ちにEDTA $\cdot$ 2Na(1mg/ml)入りの冷やしたシリコン処理ガラス管に分注し、4、1,000 $\times$ gで10分間遠心分離を行い、液体窒素で凍結して使用するまで-20で保存した。

20

【0046】

(2) 血漿レプチン量の測定：患者検体中のレプチン量をRIAで定量した。

凍結した患者血漿を解凍後、血漿100 $\mu$ lにRIA抗体溶液100 $\mu$ lおよびRIA緩衝液200 $\mu$ lを添加し、4で24時間放置した。以下、実施例1(2)と同様に操作して測定し、標準曲線からレプチン量を定量した。得られた結果を表1に示す。

30

【0047】

胞状奇胎患者の治療前の血漿レプチン量は図1bに示した正常者のBMIとレプチン量を統計処理して得られた回帰直線を用いて各患者のBMI(26.7、29.1および19.1 kg/m<sup>2</sup>)から算出されるレプチン量(23.4、28.4および7.4 ng/ml)に比べて顕著に高い値を示した。巨大胞状奇胎患者の血漿レプチン量(47.9 ng/ml)は奇胎組織摘出手術7日後にはレプチン量10.2 ng/mlとBMI(26.7 kg/m<sup>2</sup>)から予測される量にまで低下し、hCG量も同時に低下した。測定期間中に体重に有意な変化は見られなかった(症例1)。

40

【0048】

絨毛膜癌患者の血漿レプチン量(49.0 ng/ml)はBMI(24.2 kg/m<sup>2</sup>)から予測されるレプチン量(18.1 ng/ml)と比較して顕著に上昇していた。メトキシサレート、アクチノマイシンDおよびシクロフォスファミドの複合化学療法により血漿レプチン量は治療後25日後でBMI予測値にまで低下した。また、Sanfilippoらが報告(32)と同様に血漿および尿中のhCG量も低下した。測定期間中の体重および血清クレアチニン量に有意な変化は見られなかった(症例2)。胞状奇胎または絨毛膜癌という妊娠栄養膜疾患患者では血漿レプチン量が顕著に上昇し、肥満者の値に匹敵する(18、20

50

、21) が血液中に循環していることから、妊娠栄養膜疾患において病体生理学的役割を果たしていることが示唆される。

【 0 0 4 9 】

【表 1】

絨毛膜疾患患者の治療後における血漿レプチン量の変化

症例 1 . 外科的治療

| 外科的治療後の日数<br>(日) | 血漿レプチン<br>(ng/ml) | 尿中hCG<br>(mIU/ml) | 体重<br>(kg) |
|------------------|-------------------|-------------------|------------|
| 0                | 47.9              | 700,000           | 58.5       |
| 7                | 10.2              | ND                | 57.5       |

10

症例 2 . 化学治療

| 外科的治療後の日数<br>(日) | 血漿レプチン<br>(ng/ml) | 血漿hCG<br>(mIU/ml) | 尿中hCG<br>(mIU/ml) | 血清クレアチニン<br>(mg/dl) | 体重<br>(kg) |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|------------|
| 0                | 49.0              | 2,700,000         | 700,000           | 0.6                 | 50.5       |
| 7                | 9.8               | 66,000            | 56,000            | 0.6                 | 51.5       |
| 25               | 7.7               | 3,200             | 16,000            | 0.6                 | 49.5       |

20

【 0 0 5 0 】

参考文献

1 . Spiegelman, B. M. & Flier, J. S.; Adipogenesis and obesity: Rounding out the big picture., *Cell* 87, 377-389(1996).

2 . Caro, J.F. et al., Leptin: the tale of an obesity gene., *Diabetes* 45, 1455-1462(1996).

3 . Zhang, Y. et al., Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature* 372, 425-432(1994).

30

4 . Masuzaki, H. et al., Human obese gene expression: Adipose-specific expression and regional differences in the adipose tissue., *Diabetes* 44: 855-858(1995).

5 . Ogawa, Y. et al., Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented expression in genetically Zucker fatty(fa/fa)rats., *J. Clin. Invest.*, 96, 1647-1652(1995).

6 . Considine, R. V. et al., Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity., *Clin. Invest.*, 95, 2986-2988(1995).

7 . Pelleymounter, M. A. et al., Effects of the obese gene products on body weight regulation in ob/ob mice., *Science*, 269, 540-543(1995).

40

8 . Hallas, J.L. et al., Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene., *Science*, 269, 543-546(1995).

9 . Campfield, L. A. et al., Recombinant mouse ob protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks., *Science*, 269, 546-549(1995).

10 . Stephens, T. W. et al., The role of neuropeptide Y in antiobesity action of the obese gene product., *Nature*, 377, 530-532(1995).

【 0 0 5 1 】

11 . Tartaglia, L. A. et al., Identification and expression cloning of a leptin

50

- receptor, OBR., *Cell*, 83, 1263-1271(1995).
- 1 2 .Chen, H. et al., Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: Identification of a mutation in the leptin receptor gene in ab/ab mice., *Cell*, 84, 491-495(1995).
- 1 3 .Lee, G. H. et al., Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice., *Nature*, 379, 632-635(1995).
- 1 4 .Cioffi, J. A. et al., Novel B219.OB receptor isoforms: Possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction., *Nature Med.*, 2, 585-589(1996).
- 1 5 .Takaya, K. et al., Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs-Identification of a missense mutation in Zucker Fatty(fa/fa)rats., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 225, 75-83(1996). 10
- 1 6 .Mercer, J. G. et al., Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant(Ob-Rb)in mouse hypothalamus and adjacent region by in situ hybridization., *FEBS Lett.*, 387, 113-116(1996).
- 1 7 .Baumann, H. et al., The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 8374-8378(1996).
- 1 8 .Maffei, M. et al., Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects., *Nature Med.*, 1, 1155-1161(1995). 20
- 1 9 .Frederich, R. C. et al., Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to leptin action., *Nature Med.*, 1, 1311-1314(1995).
- 2 0 .Considine, R. V. et al., Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.*, 334, 292-295(1996).
- 【 0 0 5 2 】
- 2 1 .Hosoda, K. et al., Development of radioimmunoassay for human leptin., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 221, 234-239(1996).
- 2 2 .Satoh, N. et al., Pathophysiologic significance of the obese gene product, leptin, in ventromedial hypothalamus(VMH)-lesioned rats- Evidence for loss of its satiety effect in VMH-lesioned rats., *Endocrinology*(in the press). 30
- 2 3 .Cohen, B., Novick, D. & Rubinstein, M., Modulation of insulin activities by leptin., *Science*, 274, 1185-1188(1996).
- 2 4 .Phillips, M. S. et al. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat., *Nature Genet.*, 13, 18-19(1996)
- 2 5 .Takaya, K. et al, Nonsense mutation of leptin receptor in the obese spontaneously hypertensive rat(Koletsy rat)., *Nature Genet.*, 14, 130-131(1996).
- 2 6 .Bray, G. A. & York, D. A., Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis., *Physiol. Rev.*, 59, 719-809(1979). 40
- 2 7 .Chehab, F. F., Lim, M. E. & Lu, R., Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin., *Nature Genet.*, 12, 318-320(1996).
- 2 8 .Ahima, R. S. et al., Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting., *Nature*, 382, 250-252(1996).
- 2 9 .Barash, I. A. et al., Leptin is a metabolic signal to the reproductive system., *Endocrinology*, 137, 3144-3147(1996).
- 【 0 0 5 3 】
- 3 0 .Burres, N. S. et al., Inhibition of methotrexate-induced differentiation of cultured human choriocarcinoma(BeWo)cells by thymidine., *Cancer Res.*, 47, 5059- 50

5064(1987).

3 1 .Wice, B. et al., Modulation of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro., *Exp. Cell Res.*, 186, 306-316(1990).

3 2 .Sanfilippo, J. S. & Stoelk, E. M. Endocrinology of the placenta. in *The Human Placenta: Clinical Perspectives.*, (ed. Lavery J. P.) 179-198(Aspen, Rockville, 1987)

3 3 .Burrow, G. N. Thyroid diseases. in *Medical Complications during Pregnancy*, 3rd edn (eds Burrow, G.N. & Ferris, T.F.) 224-253(W.B. Saunders, Philadelphia, 1988).

3 4 .Nishino, E. et al., Trophoblast-derived interleukin-6(IL-6)regulates human chorionic gonadotropin release through IL-6 receptor on human trophoblasts., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 71, 436-441(1990). 10

3 5 .Neki, R. et al., The interleukin-6(IL-6)/IL-6 receptor system induces human chorionic gonadotropin production by activating tyrosine kinase-dependent signal transduction pathway different from pathway triggered by protein kinase activators including gonadotropin releasing hormone., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 704-709(1993).

3 6 .Stephanou, A. et al., Interleukin-6 stimulates placental lactogen expression by human trophoblast cells. *Endocrinology*, 135, 719-723(1994).

3 7 .Yamaguchi, M. et al., Inhibition of growth hormone-releasing factor production in mouse placenta by cytokines using gp130 as a signal transducer., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 136, 1072-1078(1995). 20

3 8 .Yamaguchi, M. et al., Inhibition of mouse placental lactogen-II release from placental cells by interleukin-1 after mid-pregnacy., *J. Endocrinol.*, 147, 423-429(1995)

3 9 .Sliker, L. J. et al., Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP., *J. Biol. Chem.*, 271, 5301-5304(1996).

4 0 .Kosaki, A, Yamada, K & Kuzuya, H., Reduced expression of the leptin gene (ob) by catecholamine through a G<sub>s</sub> protein-coupled pathway in 3T3-L1 adipocytes., *Diabetes*, 45, 1744-1749(1996). 30

【 0 0 5 4 】

4 1 .Itoh, H. et al., Brain natriuretic peptide is present in the human amniotic fluid and is secreted from amonin cells., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 76, 907-911(1993).

4 2 .*Nature*, 256, 495-497(1975).

4 3 .超高度酵素免疫測定方法、学会出版センター(1993).

4 4 .Chomczynski, P. et al., *Biochemistry*, 18, 294-299(1979).

4 5 .*J. Molecular Cloning*, 190, (1982)

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 5 】

【 図 1 】 A は妊娠女性および非妊娠女性における血漿中レプチン量を体型指数別平均値と比較した結果を示すグラフである。 B は妊娠女性および非妊娠女性における血漿中レプチン量と体型指数との関係を示すグラフである。 40

【 図 2 】 は妊娠女性の血漿中レプチン量の妊娠段階的变化を示すグラフである。

【 図 3 】 は帝王切開前後による血漿レプチン量の経時的変化を示すグラフである。

【 図 4 】 は各種ヒト子宮組織における ob mRNA の発現をノーザンプロット解析した結果を示す図面に代わる電気泳動の図面である。

【 図 5 】 はヒトレプチンの標準曲線および BeWo 細胞培養液中のヒトレプチンの R I A 希釈曲線を示すグラフである。

【 図 6 】 は BeWo 細胞培養液の Sephadex G - 50 カラムからの溶出パターンを 50

示すグラフである。

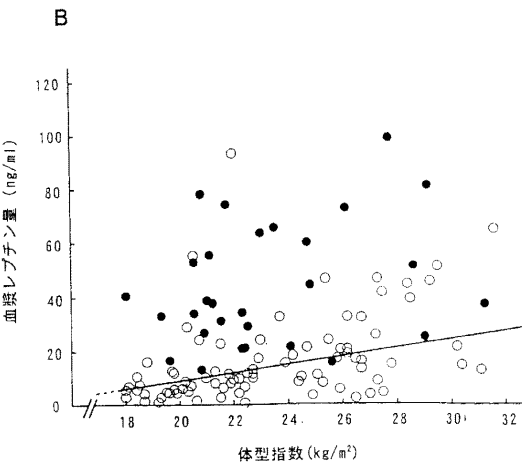
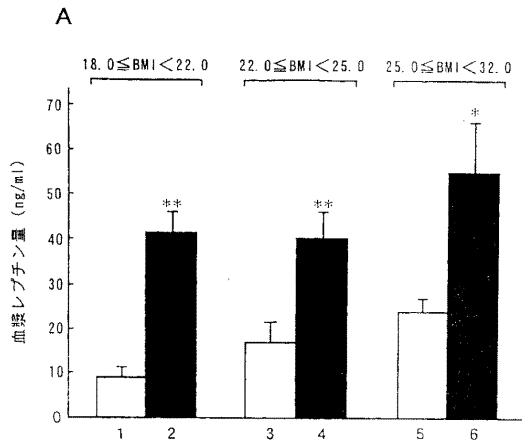
【図7】Aはフォルスコリン処理および無処理後のBeWo細胞培養液中のレプチン量の経時的变化を示すグラフである。Bはフォルスコリン処理および無処理後のBeWo細胞培養液中のhCG量の経時的变化を示すグラフである。

【図8】フォルスコリン処理後48時間後のBeWo細胞におけるobmRNAの発現量をノーザンブロット解析した結果を示す図面に代わる電気泳動の図面である。

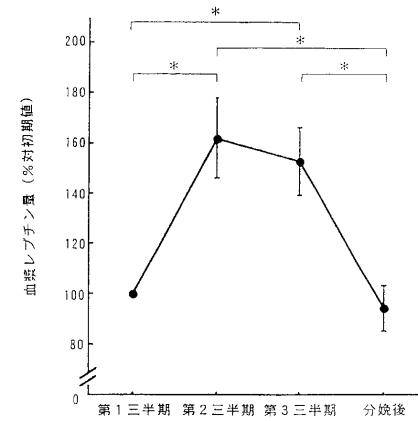
【図9】はヒトレプチンの標準曲線および羊膜細胞培養液におけるヒトレプチンのRIA希釈曲線を示すグラフである。

【図10】は妊娠女性(39週)の羊水のSephadex G-50カラムからの溶出パターンを示すグラフである。

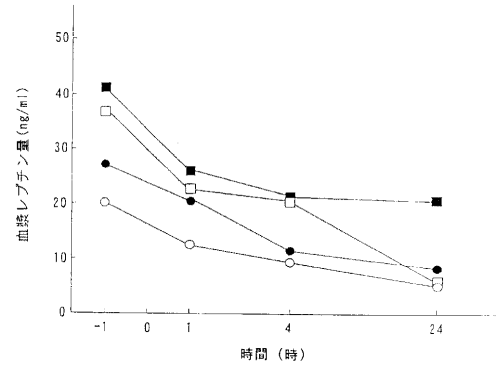
【図1】



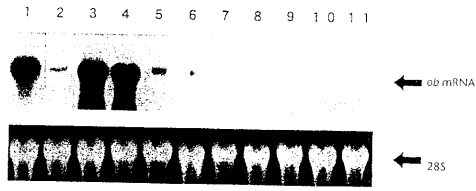
【図2】



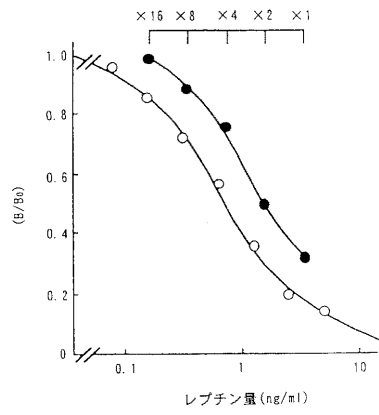
【図3】



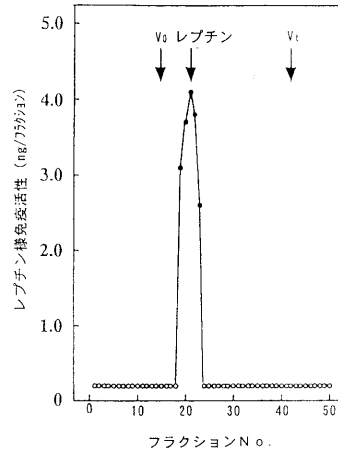
【図4】



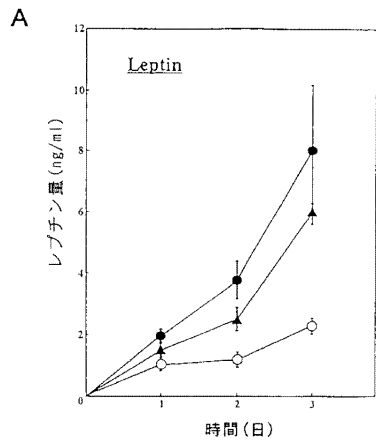
【図5】



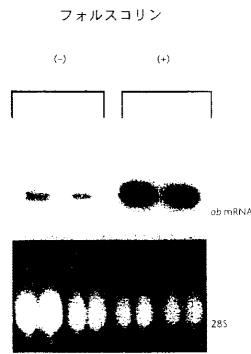
【図6】



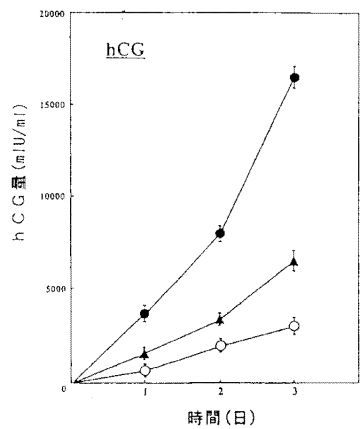
【図7】



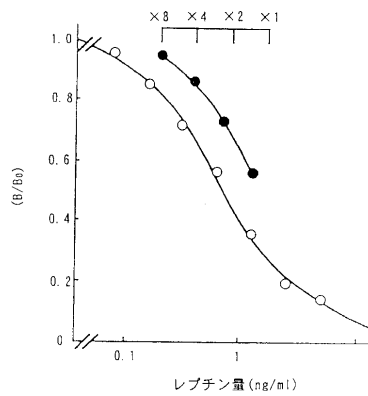
【図8】



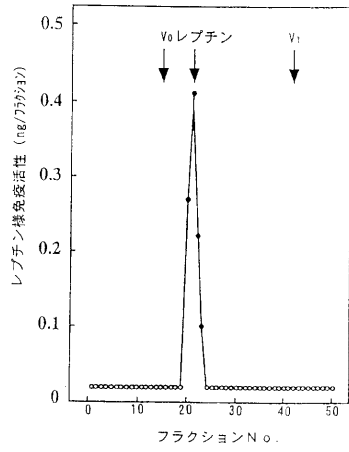
B



【図9】



【 10】



## フロントページの続き

- (56)参考文献 高木 耕一郎 外6名, 肥満遺伝子蛋白, レプチンの妊娠に伴う変動に関する検討, 日本産科婦人科学会雑誌, 1997年 2月20日, 49(Supplement) pp."S-379"
- 中西桂子 外7名, 55 hCG -mRNA発現を指標とした妊婦血中の絨毛細胞の同定, 日本産科婦人科学会雑誌, 1997年 2月20日, 49(Supplement) pp."S-133"
- 田中信一 外2名, 妊娠初期ならびに絨毛性疾患における甲状腺機能の検討, 日本産科婦人科学会雑誌, 1997年 2月20日, 49(Supplement) pp."S-379"
- 横山 志郎 外6名, 正常妊娠と絨毛性疾患におけるc-myc, c-fms, c-sis癌遺伝子の発現に関する研究, 日本産科婦人科学会雑誌, 1998年12月 1日, 40(12), 1867-1874
- 房 正規 外2名, 絨毛性疾患におけるhCG, hPL遺伝子のMethylationと遺伝子制御機構に関する研究, 日本産科婦人科学会雑誌, 1987年12月 1日, 39(12), 2144-2150
- 肥満遺伝子(ob)産物(レプチン)の絨毛性疾患におけるマーカーとしての有用性の検討, 日本内分泌学会雑誌, 日本, 1997年, 第73巻第2号, 第255頁

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

|               |   |         |            |
|---------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)       | 通过瘦素测量筛选疾病的方法   |         |            |
| 公开(公告)号       | <a href="#">JP4509967B2</a>   | 公开(公告)日 | 2010-07-21 |
| 申请号           | JP2006140350  | 申请日     | 2006-05-19 |
| 申请(专利权)人(译)   | 塩野义制薬株式会社   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译) | 塩野义制薬株式会社   |         |            |
| [标]发明人        | 中尾一和  |         |            |
| 发明人           | 中尾 一和   |         |            |
| IPC分类号        | G01N33/53 C07K16/26   |         |            |
| FI分类号         | G01N33/53.B C07K16/26   |         |            |
| F-TERM分类号     | 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/GA26 |         |            |
| 代理人(译)        | 杉田贤一  |         |            |
| 优先权           | 1997143771 1997-06-02 JP  |         |            |
| 其他公开文献        | JP2006267125A   |         |            |
| 外部链接          | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

摘要(译)

要解决的问题：通过测量瘦素来提供怀孕的判断方法，瘦素是一种称为脂肪组织中的表达的激素，在细胞外具有分泌信号，并且从非脂肪细胞分泌到血流中，并且用于确定癌症或子宫相关疾病的瘦素测量方法。解决方案：通过测量生物样品中来自非脂肪组织的瘦蛋白来筛选疾病的这种方法包括免疫测定和使用抗人瘦蛋白抗体的免疫组织测定。Z

症例1. 外科的治療

| 外科的治療後の日数<br>(日) | 血漿レプチン<br>(ng/ml) | 尿中hCG<br>(mIU/ml) | 体重<br>(kg) |
|------------------|-------------------|-------------------|------------|
| 0                | 47.9              | 700,000           | 58.5       |
| 7                | 10.2              | ND                | 57.5       |