

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6684263号  
(P6684263)

(45) 発行日 令和2年4月22日(2020.4.22)

(24) 登録日 令和2年3月31日(2020.3.31)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 31/726 (2006.01)	A 6 1 K 31/726	Z N A
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	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
請求項の数 25 (全 38 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-500456 (P2017-500456)	(73) 特許権者	516282640
(86) (22) 出願日	平成27年3月19日 (2015. 3. 19)		アイジェノミクス エセ. エレ.
(65) 公表番号	特表2017-513021 (P2017-513021A)		スペイン国 46980 バレンシア,
(43) 公表日	平成29年5月25日 (2017. 5. 25)		パルケ テクソロヒコ パテルナ, ロン
(86) 国際出願番号	PCT/IB2015/001404		ダ ナルシス モントゥリオル, 11ベ
(87) 国際公開番号	W02015/166353	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成27年11月5日 (2015. 11. 5)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成30年3月16日 (2018. 3. 16)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	61/968, 728		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成26年3月21日 (2014. 3. 21)	(74) 代理人	100181674
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 飯田 貴敏
(31) 優先権主張番号	61/969, 520	(74) 代理人	100181641
(32) 優先日	平成26年3月24日 (2014. 3. 24)		弁理士 石川 大輔
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	230113332
			弁護士 山本 健策
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 子癇前症の早期検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

有効量のグリコサミノグリカンを含む、子癇前症を処置するための組成物であって、前記組成物は、

(1) 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、および

(2) 前記試験試料における前記 ANXA2 のレベルを ANXA2 の対照レベルと比較すること

により、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投与されることを特徴とし、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、組成物。

【請求項 2】

前記被験体が子癇前症の病歴をもたない、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

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 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

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 ~ 3 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 5】

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 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 6】

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 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 7】

前記被験体が妊娠しようと試みている、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 8】

10  
 アネキシン A 2 ( A N X A 2 ) のレベルを、被験体の子癩前症を発症するリスクが高いかどうかの指標とする方法であって、前記方法が、  
 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するステップ  
を含み、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、方法。

## 【請求項 9】

前記被験体の子癩前症の病歴をもたない、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

20  
 対照試料が、妊娠に成功したことがあり、かつ子癩前症の病歴をもたない被験体から得られる試料であることを特徴とする、請求項 8 または 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

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 8 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記被験体が妊娠していることがわかっている、請求項 8 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記被験体が妊娠しようと試みている、請求項 8 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 14】

有効量のグリコサミノグリカンを含む、子癩前症を処置するための組成物であって、前記組成物は、

( 1 ) 現在、子癩前症を有していない被験体であって、妊娠しているか、または妊娠する計画を有する被験体から得られた子宮内膜液試料において A N X A 2 のレベルを決定するアッセイを実施すること、および

( 2 ) 前記子宮内膜液試料中の前記 A N X A 2 のレベルを A N X A 2 の対照レベルと比較すること

により、子癩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投与されることを特徴とする、組成物。

## 【請求項 15】

前記被験体の子癩前症の病歴をもたない、請求項 14 に記載の組成物。

## 【請求項 16】

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、かつ子癩前症の病歴をもたない被験体から導かれる、請求項 14 または 15 に記載の組成物。

## 【請求項 17】

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

10

20

30

40

50

り選択される、請求項 1 4 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 8】

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 4 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 9】

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グリコサミノグリカンを含む、子癇前症を処置するための組成物であって、前記被験体が、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ず、

前記被験体における A N X A 2 のレベルが、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試料から決定される、組成物。

【請求項 2 0】

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 9 に記載の組成物。

【請求項 2 1】

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 9 または 2 0 に記載の組成物。

【請求項 2 2】

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 9 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 3】

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、前記方法は、

有効量のグリコサミノグリカンでの処置前および処置後、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、処置前の前記レベルに対する処置後の前記 A N X A 2 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

を含み、

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、方法。

【請求項 2 4】

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 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

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 2 3 または 2 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

この出願は、米国特許法 § 1 1 9 ( e ) の下、2 0 1 4 年 3 月 2 1 日に出願された米国仮出願第 6 1 / 9 6 8 , 7 2 8 号および 2 0 1 4 年 3 月 2 4 日に出願された米国仮出願第 6 1 / 9 6 9 , 5 2 0 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。

10

20

30

40

50

## 【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。

10

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0004】

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

20

## 【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A2（ANXA2）レベルが、正常に（健康に）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、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投与するステップを含む。

30

## 【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、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。

40

## 【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

50

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、被験体の子癩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、被験体は子癩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、かつ子癩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。

10

【0010】

本発明の一部の態様は、子癩前症を処置するための方法を提供する。本方法は、現在、子癩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、被験体の子癩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、および被験体の子癩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被験体に投与するステップを含む。

20

【0011】

一部の実施形態では、被験体は子癩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、かつ子癩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、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。

30

【0012】

本発明の一部の態様は、子癩前症を処置するための方法を提供する。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、妊娠する計画を有し、かつ子癩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。

【0013】

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、かつ子癩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、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。

40

【0014】

本発明の一部の態様は、子癩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、子癩前症を有するか、または子癩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A2 (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。

50

## 【 0 0 1 5 】

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。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目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A2 (ANXA2) 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ANXA2のレベルをANXA2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を含む、方法。

(項目2)

前記被験体の子癇前症の病歴をもたない、項目1に記載の方法。

(項目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、項目1～2のいずれか一項に記載の方法。

(項目4)

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、項目1～3のいずれか一項に記載の方法。

(項目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、項目1～4のいずれか一項に記載の方法。

(項目6)

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、項目1～5のいずれか一項に記載の方法。

(項目7)

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

(項目8)

前記被験体が妊娠しようと試みている、項目1～6のいずれか一項に記載の方法。

(項目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A2 (ANXA2) 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ANXA2のレベルをANXA2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。

(項目10)

前記被験体の子癇前症の病歴をもたない、項目9に記載の方法。

(項目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、項目9～10のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目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、項目9～11のいずれか一項に記載の方法。

(項目13)

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、項目9～12のいずれか一項に記載の方法。

(項目14)

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

10

(項目15)

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

(項目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

20

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。

(項目17)

前記被験体が子癇前症の病歴をもたない、項目16に記載の方法。

(項目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、項目16～17のいずれか一項に記載の方法。

(項目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、項目16～18のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目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、項目16～19のいずれか一項に記載の方法。

(項目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

40

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。

(項目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、項目21に記載の方法。

(項目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、項目21～22のいずれか一項に記載の方法。

50

(項目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、項目21~23のいずれか一項に記載の方法。

(項目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、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A2(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。

10

(項目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、項目25に記載の方法。

(項目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、項目25~26のいずれか一項に記載の方法。

20

【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(including)」、「を含むこと(comprising)」、「または「有すること(having)」、「含有すること(containing)」、「含むこと(involving)」、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

【図面の簡単な説明】【0017】

【図1A】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(decidualization)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±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。

40

【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

50

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±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。\*、 $P < 0.05$ ；\*\*、 $P < 0.005$ 。

【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癩前症（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±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。\*、 $P < 0.05$ ；\*\*、 $P < 0.005$ 。

【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ティングされた、重篤な子癩前症（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、 $\alpha$ -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±sd）として表した。\*、 $P < 0.05$ ；\*\*、 $P < 0.005$ 。

【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ティングされた、重篤な子癩前症（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、 $\alpha$ -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±sd）として表した。\*、 $P < 0.05$ ；\*\*、 $P < 0.005$ 。

【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ティングされた、重篤な子癩前症（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、 $\alpha$ -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

10

20

30

40

50

により測定し、3つの異なる実験からの  $\text{ng/mL}$  (平均値  $\pm$   $\text{sd}$ ) 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。

10

【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。

20

30

【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、

40

50

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4A】図4は、ANXA2阻害hESCの運動性、トロホブラスト拡散(sprea  
ding)および浸潤の分析を示す。図4Aは、対照hESCおよびANXA2阻害hE  
SC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trans  
well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。\*、 $P < 0.05$ ; \*\*、 $P < 0.005$ 。

10

【図4B】図4は、ANXA2阻害hESCの運動性、トロホブラスト拡散(sprea  
ding)および浸潤の分析を示す。図4Aは、対照hESCおよびANXA2阻害hE  
SC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trans  
well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4C】図4は、ANXA2阻害hESCの運動性、トロホブラスト拡散(sprea  
ding)および浸潤の分析を示す。図4Aは、対照hESCおよびANXA2阻害hE  
SC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trans  
well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

40

【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、M  
MP2(図5C)およびMMP9(図5D)のタンパク質レベルを、ANXA2阻害hE  
SCおよびsPE hESCの馴化培地において評価した。図5Eは、50µg/mLま

50

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5 A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  $\text{pg}/\text{mL}$  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  $\text{mM}$  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5 A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  $\text{pg}/\text{mL}$  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  $\text{mM}$  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5 A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  $\text{pg}/\text{mL}$  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  $\text{mM}$  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*

10

20

30

40

50

、ANXA2 siRNA、およびsPEのhESCを示し、処理なしの場合も示す。図5Eは、100 µg/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ポ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1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 mmHgおよび/または拡張期血圧 90 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 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、被験体の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、被験体の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】

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

10

20

30

40

50

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を含む。

【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被験体に投与するステップを含む。

10

【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。

20

【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場合がある：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。

30

40

【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 ANXA

50

2を有し、妊娠する計画を有し、かつ子癩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。

【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。

10

【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。

20

30

【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、酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）、ウェスタンブロット、免疫組織化学的分析、ラジオイムノアッセイ（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。

40

【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、被験体の子癩前症を発症するリスクが高いかどうかを

50

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、かつ子癇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、かつ子癇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

## 【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、かつ子癇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 $\pm 4$ )であり、一方、PEの素因がある被験体における黄体期中期中の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中の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。

20

## 【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、Petruccielli、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。

30

40

## 【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

50

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

**【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。

20

**【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、低分子量デルマトン硫酸、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。

30

**【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、処置前に得られたANXA2レベルと比較した、または対照の正常なANXA2レベル（すなわち、以前、正常に妊娠したことがあり、かつPEの病歴をもたない被験体のANXA2レベル）と比較した、ANXA2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、PE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、PE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。

40

50

## 【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、PE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。PE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PE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ANXA2レベルと比較して、または対照の正常なANXA2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ANXA2レベル）と比較して、ANXA2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ANXA2の対照の正常なレベルを再確立するのに十分である。

10

## 【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0.001mg/kgから約1000mg/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0.001mg/kgから約1000mg/kgまで、約0.01mg/kgから約750mg/kgまで、約0.1mg/kgから約500mg/kgまで、約1.0mg/kgから約250mg/kgまで、および約10.0mg/kgから約150mg/kgまで様々である。一部の実施形態では、有効量は、1000IU、2000IU、3000IU、4000IU、5000IU、6000IU、または7000IU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、5000IU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。

20

30

## 【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A2（ANXA2）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ANXA2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ANXA2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。

40

## 【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、子癇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

50

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、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。

#### 【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%抗生物質を含有する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。

#### 【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17β-エストラジオール(E2)(30nM);ii)3日間、8-ブロモ-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)を含有する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。

#### 【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でブロッキングした。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。

#### 【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II(Abcam, Cambridge, UK)および1/2000マウスモノクローナル抗ヒトF-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

10

20

30

40

50

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 A2 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 A2 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 A2 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 A2 濃度 (pg / mL) を確立した。

【0048】

ANXA2 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 II (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】

ANXA2 siRNA

ANXA2 をサイレンスさせるために、ANXA2 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' - AlexaFluor488 (Qiagen, CA, USA) で修飾して、使用した。hESC に ANXA2 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 °C 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

ANXA2 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、ANXA2 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 °C でホモジナイズした。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。ウェスタンプ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。

10

20

30

40

50

## 【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 $\pm$ SEMを表している。

## 【0052】

## トロホプ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プ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、1/50マウス抗ビメンチン(Sigma Aldrich, USA)および1/100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 TRICT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 $\pm$ SEMとして表した。

## 【0054】

## 浸潤アッセイ

トロホプラスト由来細胞株JEG-3を使用して、トロホプラストの脱落膜hESCを通過し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 $5 \times 10^5$ 個の脱落膜化hESCを、8mm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

プラスミノーゲンレベルを、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( $450\text{nm}$ )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。

10

20

30

40

50

## 【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、50 $\mu$ L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。ビオチン化抗ヒト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、1 $\mu$ g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 : TGTGCAAGCTCAGCTTGGA、配列番号2、Rv : AGGTGTCCTCAATAGGCCCAA、配列番号3) およびGAPDH (Fw : GAAGGTGAAGGTCGGAGTTC、配列番号4、Rv : GAAGATGGTGAATGGGATTTTC、配列番号5)。

30

## 【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、50 $\mu$ g/mLおよび100 $\mu$ g/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。

40

## 【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連で測定値を取った。平均値 $\pm$ SEMが提示され、nは実験の数を示す。データは、SPSS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 0.05のp値は、有意とみなされた。(\* p 0.05、\*\* p 0.01、\*\*\* p 0.001)。

## 【0061】

## 結果

以前の妊娠においてsPEを患った患者におけるin vitro脱落膜化抵抗性  
正常な妊娠の過去をもつ対照患者 (非PE) (n = 13) と比較した、以前の妊娠にお

50

いて重篤なPE (sPE) を患ったことがある女性 (n = 13) 由来のhESCのin vitro脱落膜化を評価した。sPE群において、混合型HELLP症候群、子癇、または子癇に終わったHELLP症候群を発症した2つの連続した以前のsPEを含む異なる型を患った女性からhESCを単離した。sPEおよび非PEの患者は、同等のBMIおよび年齢をもつが、sPEの患者は、より高い収縮期/拡張期血圧、蛋白尿、GOT、GPT、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cAMP (0.5 μM) + MPA (1 μM) で5日間か、またはホルモン誘導物質P4 (1 μM) + E2 (30 nM) で9日間のいずれかで脱落膜化したhESCは、類似した結果を示した。したがって、cAMP + MPAプロトコルをこの研究に使用した。興味深いことには、PRLおよびIGFBP-1分泌は、非PE対応物と比較して、sPEから得られたhESCにおいてin vitro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1Aおよび1B)。hESCにおけるF-アクチン再編成を、in vitro脱落膜化中に調べ、非PE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、sPE患者由来の脱落膜化hESCにおいて存在しなかった (図1C)。

#### 【0062】

sPEにおけるANXA2の下方制御され、かつ制御解除されたhESC発現

以前の妊娠においてsPEを患った女性 対 非PE患者に由来した全子宮内膜試料におけるANXA2タンパク質存在量を分析した (図2A)。濃度測定分析により、非PE患者 (n = 6) と比較して、sPE (n = 6) 由来の子宮内膜におけるANXA2存在量の有意な低下が示された (図2A)。子宮内膜ANXA2局在化を調べた。非PEに対してsPE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2B)。次に、sPE患者 対 非PE患者に由来したhESCを単離し、脱落膜化させ、ANXA2タンパク質をウェスタンブロットによって評価した (図2C)。濃度測定分析により、sPE女性において、非PE患者と比較して、ANXA2が、基礎条件下で有意に低下し、脱落膜化したhESCにおいて制御解除されることが実証された (図2C)。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ANXA2を、ELISA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sPE女性由来のhESCが、対照と比較して、細胞内および細胞外の両方のANXA2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2D)。さらに、分泌型は細胞内ANXA2を反映し、これにより、PE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ANXA2の使用が確認される。

#### 【0063】

in vitro脱落膜化中のhESCにおけるANXA2の制御および機能性

以前の研究は、ANXA2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、in vitroでのhESC脱落膜化中のANXA2の制御を調べた。ウェスタンブロット (図3A) および濃度測定分析により評価された細胞内ANXA2は、どちらのプロトコルを使用しても、非脱落膜化hESCに対する脱落膜化hESCにおける細胞内ANXA2の上方制御が裏付けられる (図3A)。その細胞内動力学と並行して、分泌型ANXA2を、hESCの上清においてELISAにより測定した (図3B)。これらの結果は、細胞内および細胞外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

10

20

30

40

50

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。

#### 【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)。

#### 【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)。

#### 【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】

ANXA2の阻害による線維素溶解活性の欠乏もまた、sPE由来のhESCに存在する

線維素溶解系は、フィブリン沈着を通してPE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。PE女性由来のhESCと比較した、hESC ANXA2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、ANXA2 siRNA、およびPE由来のhESC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siRNA hESCおよび対照脱落膜化hESCと比較して、ANXA2 si

10

20

30

40

50

RNAおよびsPE由来のhESC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、 $229.1 \pm 23.1$ および $191.5 \pm 36.7$  pg/mL 対  $305.1 \pm 23.2$ および $397.1 \pm 45.1$  pg/mL; プラスミン活性:それぞれ、 $12.7 \pm 3.6$  mMおよび $4.2 \pm 0.75$  mM 対  $27.5 \pm 10.2$  mMおよび $23.1 \pm 4.1$  mM)(図5Aおよび5B)。したがって、線維素溶解系は、脱落膜化hESCにおいてANXA2が阻害されている場合に欠乏し、sPE患者由来のhESCにおいてより高い程度で欠乏している。

#### 【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ECM成分を分解するMMP2およびMMP9タンパク質の産生によりトロホラスト浸潤を制御する。MMP2およびMMP9タンパク質分泌を、ANXA2阻害およびsPEの脱落膜化hESCの馴化培地においてELISAにより分析した。MMP2およびMMP9分泌のレベルは、ANXA2が阻害された場合、およびsPE患者において、有意に低下した(図5Cおよび5D)。

#### 【0070】

ヘパリン処理は、ANXA2低下hESC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(tPA)を通して線維素溶解経路に作用し、ヘパリンのANXA2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siRNA、ANXA2 siRNA阻害、非PE、およびPEの脱落膜化hESC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 μg/mLでのヘパリンは、ANXA2阻害およびsPEの脱落膜化hESC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5E)。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、ANXA2 siRNAおよびsPE由来のhESCにおけるプラスミン活性の有意な増加を生じた(図5F)。対照、ANXA2 siRNA、およびsPE患者由来のhESCの馴化培地における分泌された細胞外ANXA2レベルをELISA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ANXA2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5G)。

#### 【0071】

最後に、全ての条件における、ヘパリンのMMP2およびMMP9メタロプロテアーゼ産生への機能的効果を*in vitro*で試験した(図5H)。ヘパリンでの処理は、トロホラストの子宮内膜間質細胞を通過しての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、siRNAにより誘導されたか、またはsPEを有する患者に自然発生したANXA2欠乏脱落膜化hESC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。

#### 【0072】

これらのデータに基づいて、少なくとも部分的にANXA2欠乏によって媒介される、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)。sPEにおける、またはsiRNAを通して誘導されたANXA2欠乏hESC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、ANXA2活性化の欠損は、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の阻害を通して浅いトロホラスト浸潤をもたらす。ANXA2を通して作用するヘパリンの添加は、示した下流にお

10

20

30

40

50

ける効果を克服することができる。

【0073】

考察

PEの考え得る原因として欠損CTB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関与する子宮内膜の母体のバ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PEが、近親者の女性においてPE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PEエピソードは、所定の患者におけるPEリスクに影響しない。したがって、PE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CTBの浸潤を制御する脱落膜からの脱落膜化変換を通してhESCを標的にした。非PE対応物と比較した、sPEから得られるhESCにおける脱落膜化抵抗性の同定は本研究を促進した。

【0075】

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。ANXA2は、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が有意に増強される。PE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ANXA2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(APS)(PE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、PEを有する胎盤におけるANXA2自己抗体が、胎盤トロンプ形成の考え得る原因として示唆されている。

【0076】

最初に、子宮内膜間質コンパートメント内のANXA2は、非PEに対して、以前の妊娠でsPE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sPE女性由来のhESCは、対照と比較して、細胞内ANXA2および細胞外ANXA2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ANXA2が、hESCにおいてin vitro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。ANXA2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バラクリン作用のさらなる研究により、hESC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、トロホプラスト拡散および浸潤の低下が明らかにされた。

【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(tPA)およびウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター(uPA)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。PE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PEに存在しており、その疾患の発症における、原因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、トロホプ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M

10

20

30

40

50

M P 9 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、P E 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。

【 0 0 7 8 】

【 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.

## 【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. 10
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. 20
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, Gurside E. *In vitro* decidualization of human endometrial stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 42: 337-44 30
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. 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: 21198–211203.
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. 10
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.
37. Sobel BE. Fibrinolysis and activators of plasminogen. *Heart Lung.* 1987; 16: 775-779. 20
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.
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. 30
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.
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. 40

## 【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.

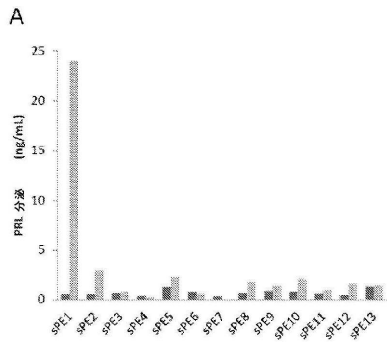
49. Al-Shahrour F, Mínguez P, Tarraga J, Medina I, Alloza E, Montaner D, Dopazo J. FatiGO+: a functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 91–96.

## 【0079】

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。 30

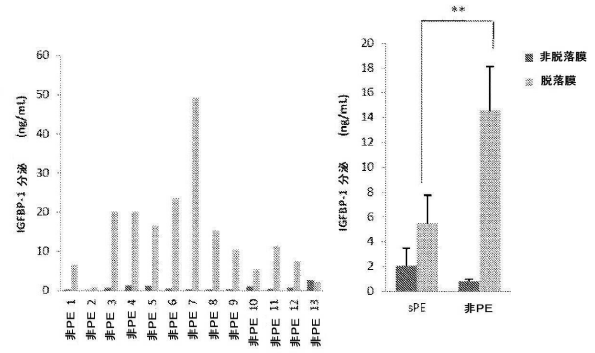
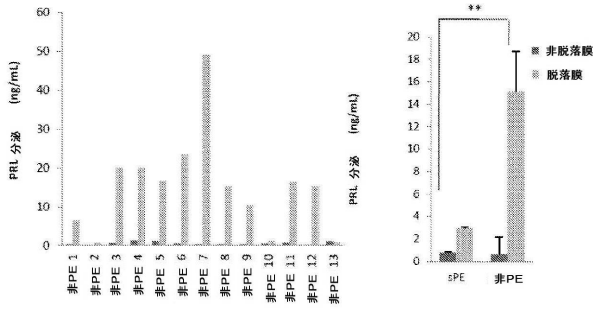
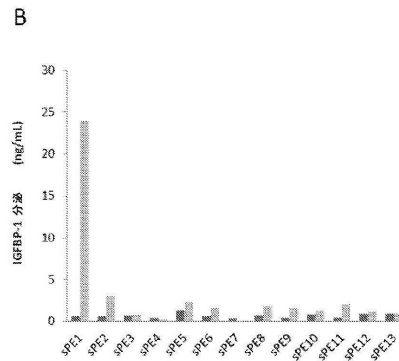
【 図 1 A 】

FIG. 1



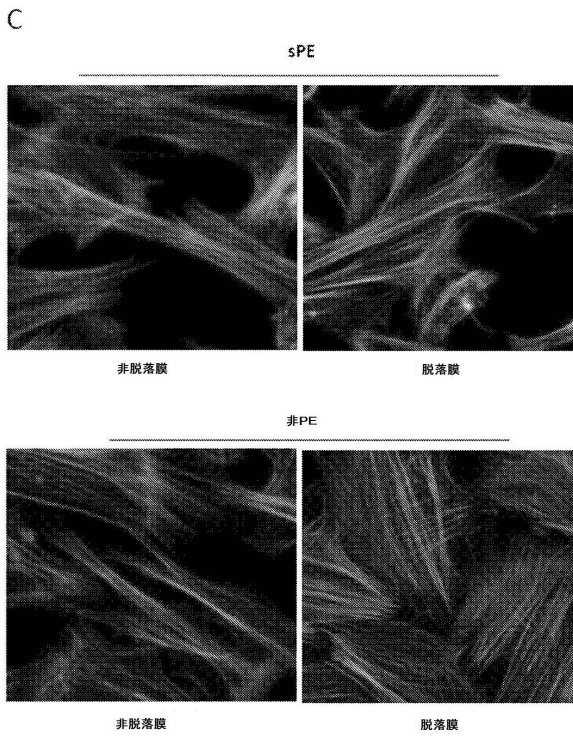
【 図 1 B 】

FIG. 1



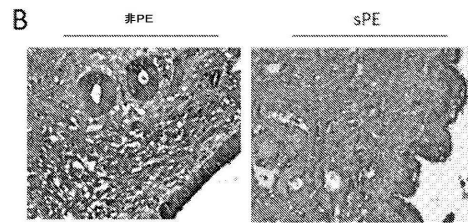
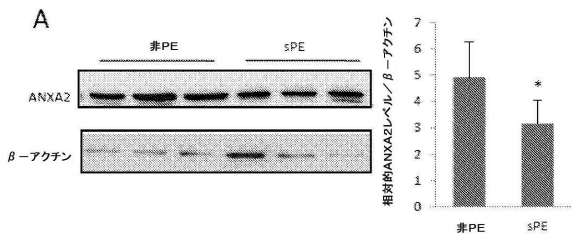
【 図 1 C 】

FIG. 1



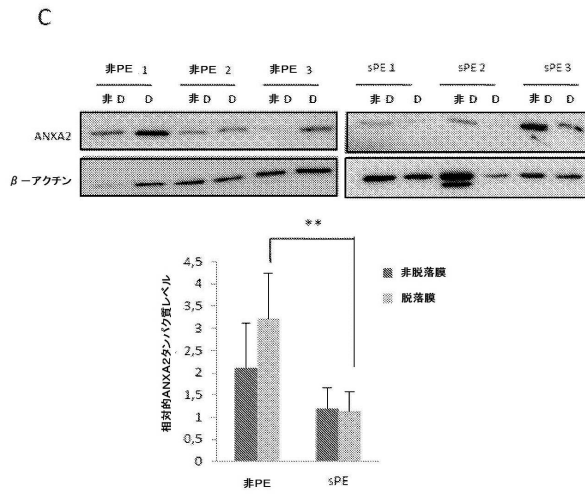
【 図 2 - 1 】

FIG. 2



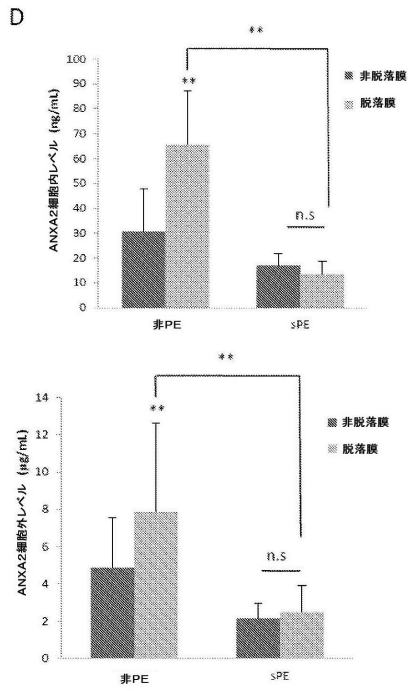
【 図 2 - 2 】

FIG. 2



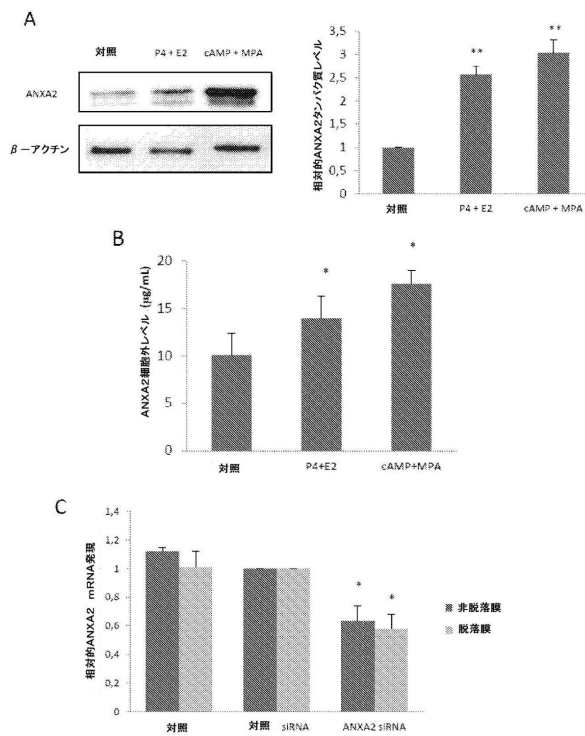
【 図 2 - 3 】

FIG. 2



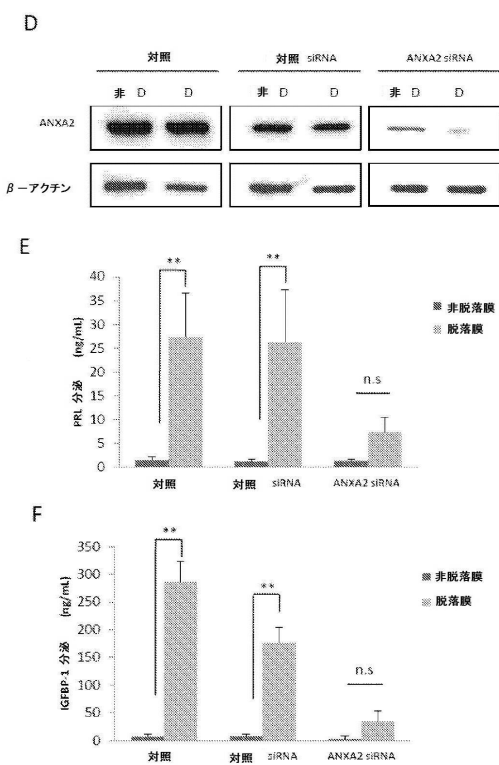
【 図 3 - 1 】

FIG. 3



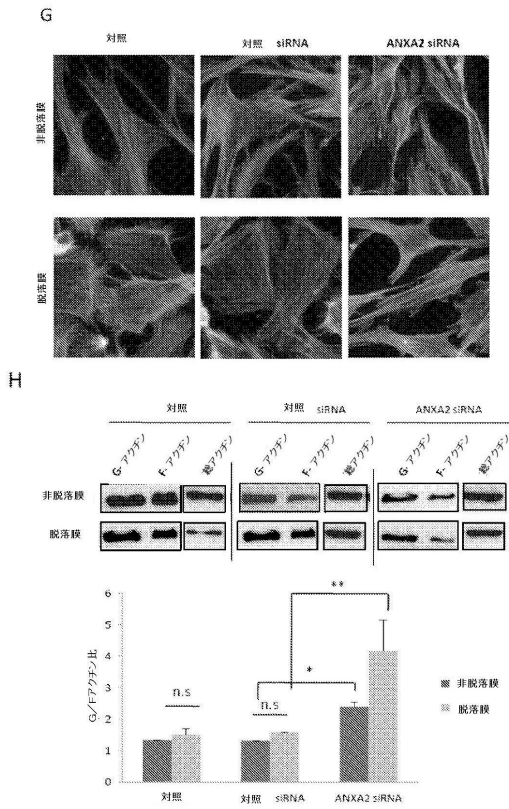
【 図 3 - 2 】

FIG. 3



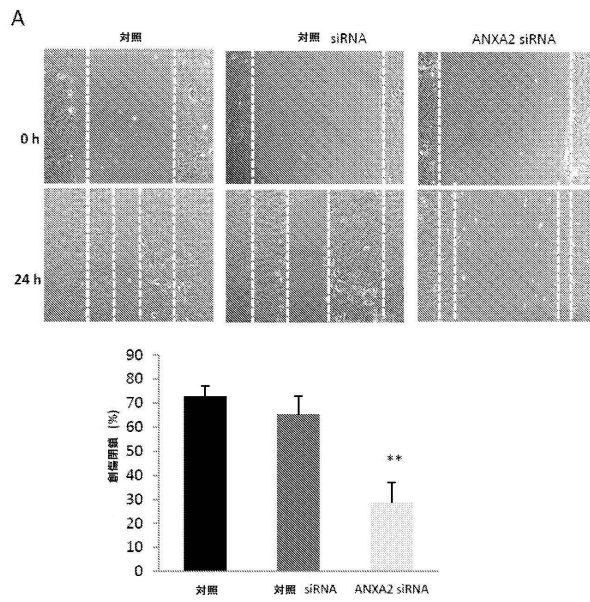
【 図 3 - 3 】

FIG. 3



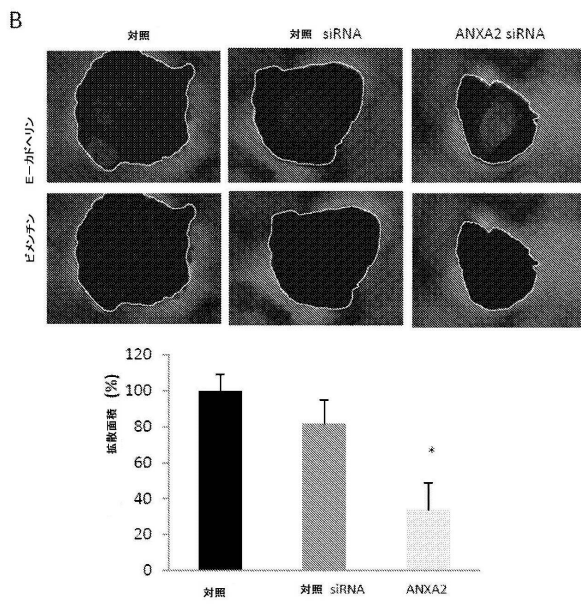
【 図 4 A 】

FIG. 4



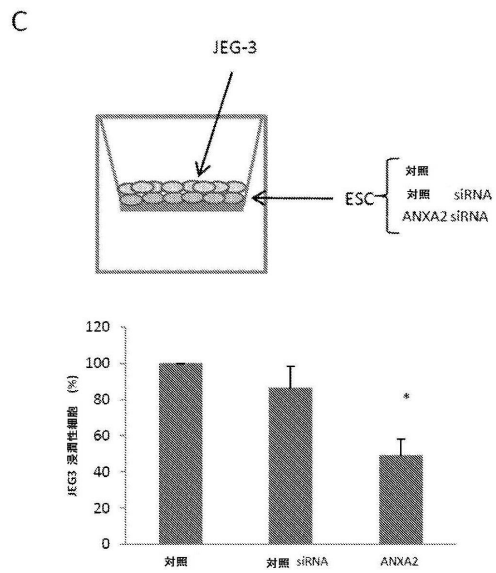
【 図 4 B 】

FIG. 4



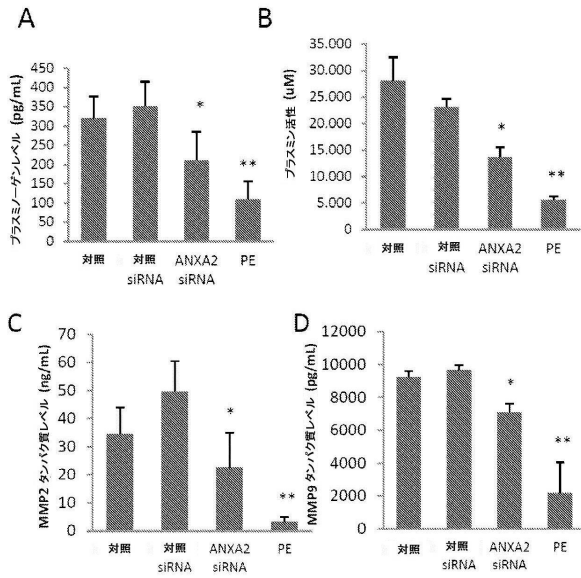
【 図 4 C 】

FIG. 4



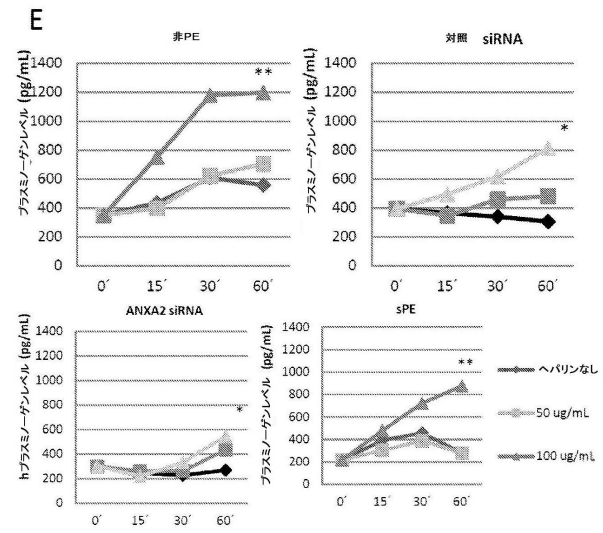
【 図 5 - 1 】

FIG. 5



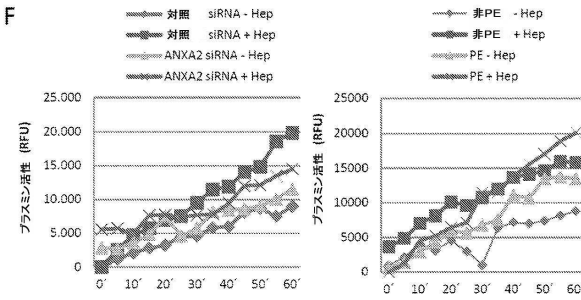
【 図 5 - 2 】

FIG. 5



【 図 5 - 3 】

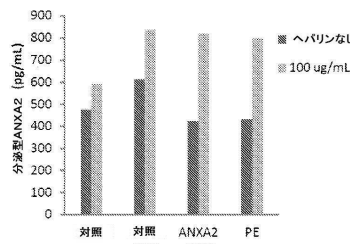
FIG. 5



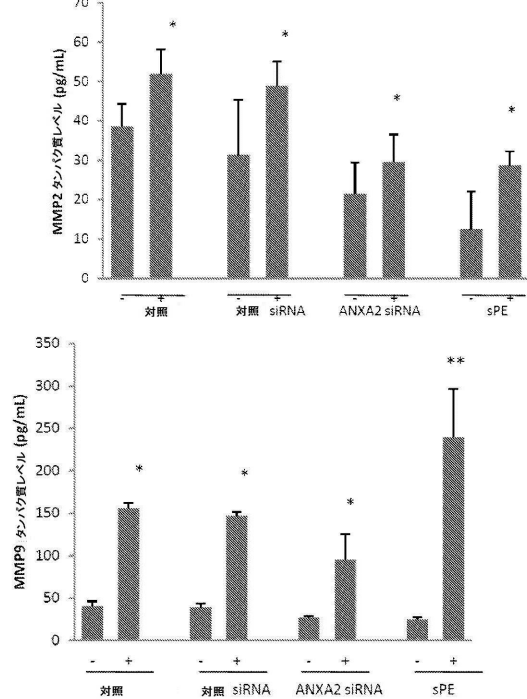
【 図 5 - 4 】

FIG. 5

G

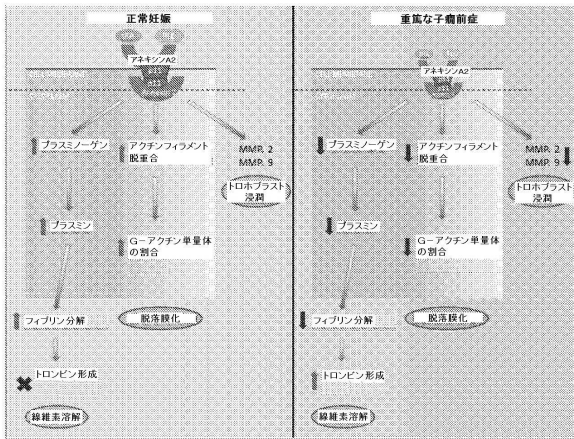


H



【 図 6 】

FIG. 6

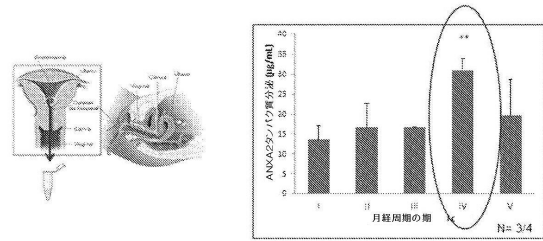


【 図 7 】

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 】

0006684263000001 . app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
**G 0 1 N 33/543 (2006.01) G 0 1 N 33/543 5 4 5 A**

(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/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нти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/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нти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/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нти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

審査官 磯部 洋一郎

(56)参考文献 特開2000-309538(JP,A)  
 Thrombosis Research, 2012, Vol.129, p.563-567  
 Hypertension in Pregnancy, 2006, Vol.25, p.115-127

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 A 6 1 K 3 1 / 7 2 6  
 A 6 1 K 3 1 / 7 2 7  
 A 6 1 K 3 1 / 7 3 7  
 A 6 1 P 1 5 / 0 0  
 G 0 1 N 3 3 / 5 3  
 G 0 1 N 3 3 / 5 4 3  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )