

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6205371号
(P6205371)

(45) 発行日 平成29年9月27日 (2017.9.27)

(24) 登録日 平成29年9月8日 (2017.9.8)

(51) Int. Cl.

F 1

GO 1 N 33/53 (2006.01)
 GO 1 N 33/536 (2006.01)
 GO 1 N 33/543 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

GO 1 N 33/53 K
 GO 1 N 33/53 P
 GO 1 N 33/536 D
 GO 1 N 33/543 5 9 7
 C 1 2 Q 1/02

請求項の数 14 (全 30 頁)

(21) 出願番号 特願2014-555249 (P2014-555249)
 (86) (22) 出願日 平成25年2月4日 (2013.2.4)
 (65) 公表番号 特表2015-507197 (P2015-507197A)
 (43) 公表日 平成27年3月5日 (2015.3.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/052181
 (87) 国際公開番号 W02013/113941
 (87) 国際公開日 平成25年8月8日 (2013.8.8)
 審査請求日 平成28年1月5日 (2016.1.5)
 (31) 優先権主張番号 12153850.8
 (32) 優先日 平成24年2月3日 (2012.2.3)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 505351108
 シャリテ-ユニヴェルズィテートメディッ
 ィ-ン ベルリン
 ドイツ国、1 0 1 1 7 ベルリン、シャリ
 テブラッツ 1
 (74) 代理人 100082418
 弁理士 山口 朔生
 (72) 発明者 ドゥ-ダ、ゲオルグ
 ドイツ、1 2 2 0 9 ベルリン、フェアレ
 ンガーテ ゲオルゲンシュトラ-セ 4 1
 (72) 発明者 フォルク、ハンス-ディーター
 ドイツ、1 0 1 1 7 ベルリン、ヘーゲル
 プラッツ 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨折治癒の遅延を予測するマ-カ-としてのCD8+T細胞サブセット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

骨折治癒状態の遅延又は正常を試験する方法であって、被験者から得られた試料の中のCD8+CD57+、CD8+CD28-、及びCD8+CD28-CD57+から成る第1群より選択されるCD8+細胞の亜集団の頻度を決定して、遅延又は正常の所定の基準との大小関係を判定する工程を備えたことを特徴とする骨折治癒状態試験方法。

【請求項 2】

前記試料の中のCD8+CD11a++から成る第2群より選択されるCD8+細胞の亜集団の頻度を決定する工程をさらに備えたことを特徴とする請求項1に記載の骨折治癒状態試験方法。

【請求項 3】

前記試料は血液試料であることを特徴とする請求項1又は2に記載の骨折治癒状態試験方法。

【請求項 4】

前記試料の中のCD3+細胞のCD8+CD4+亜集団の頻度を決定する工程をさらに備えたことを特徴とする請求項1乃至3のいずれか一項に記載の骨折治癒状態試験方法。

【請求項 5】

末梢血の試料の中のIL-6のレベルを決定する工程をさらに備えたことを特徴とする請求項1乃至4のいずれか一項に記載の骨折治癒状態試験方法。

【請求項 6】

前記被験者のカロリースコアを決定する工程をさらに備えたことを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれか一項に記載の骨折治癒状態試験方法。

【請求項 7】

前記 C D 8 + 細胞の亜集団の頻度、前記 I L - 6 のレベル、又はカロリースコアと標準値とを比較する工程をさらに備えたことを特徴とする請求項 1 乃至 6 のいずれか一項に記載の骨折治癒状態試験方法。

【請求項 8】

正常骨折治癒の患者の大規模集団について決定された標準値と比較して 2 倍高い頻度の前記 C D 8 + C D 4 + 細胞を示す試料は、骨折治癒の遅延について上昇した確率を有する群に割り当てられることを特徴とする請求項 1 乃至 7 のいずれか一項に記載の骨折治癒状態試験方法。

10

【請求項 9】

正常骨折治癒の患者の大規模集団について決定された標準値と比較して 10 % 以上高い前記 C D 1 1 a + + 、C D 2 8 - 、又は C D 5 7 + の細胞の頻度を示す試料は、骨折治癒の遅延について上昇した確率を有する群に割り当てられることを特徴とする請求項 1 乃至 7 のいずれか一項に記載の骨折治癒状態試験方法。

【請求項 10】

前記 C D 8 + 細胞における C D 2 8 - 又は C D 5 7 + の細胞について 30 % 以上の頻度を示す試料は、骨折治癒の遅延について上昇した確率を有する群に割り当てられ、

前記 C D 8 + 細胞における C D 1 1 a + + 細胞について 65 % 以上の頻度を示す試料は、骨折治癒の遅延について上昇した確率を有する群に割り当てられ、

20

前記 C D 8 + 細胞における C D 4 + 細胞について 5 % 以上の頻度を示す試料は、骨折治癒の遅延について上昇した確率を有する群に割り当てられる

ことを特徴とする請求項 1 乃至 7 のいずれか一項に記載の骨折治癒状態試験方法。

【請求項 11】

被験者から得られた試料の中の細胞集団の頻度又は I L - 6 のレベルを決定するデバイスと、

請求項 1 乃至 10 のいずれか一項に記載された骨折治癒状態試験方法を実施するべく搭載されるとともに指定された、プログラムされたマイクロプロセッサと、

を備えたことを特徴とする骨折治癒遅延診断装置。

30

【請求項 12】

前記デバイスは、請求項 1 乃至 11 のいずれかに記載の前記亜集団の頻度を決定するべく搭載されるとともに指定されたことを特徴とする請求項 11 に記載の骨折治癒遅延診断装置。

【請求項 13】

蛍光に基づいたフローサイトメトリに適用される、抗 C D 8 抗体と、抗 C D 4 抗体と、抗 C D 1 1 a 抗体と、を備えて、

マーカー分子を対象とする蛍光抗体が付された細胞を計数することによって亜集団の頻度が診断基準として決定される

ことを特徴とする骨折治癒状態診断用部品のキット。

40

【請求項 14】

抗 C D 5 7 抗体及び / 又は抗 C D 2 8 抗体をさらに備えたことを特徴とする請求項 13 に記載の骨折治癒状態診断用部品のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、骨折治癒の遅延を予測及び予防するための方法、システム及びキットに関する。

【背景技術】

【0002】

50

骨折治癒は、連続、重複段階を含む生理学的プロセスであり、骨組織の修復をもたらす。しかしながら、重度の骨折、老齢、ステロイド療法又は糖尿病などの特定のリスク要因下で、このプロセスは遅延し、又はさらには不完全（偽関節治癒）となり、不良な長期転帰及び高い社会経済的影響を与え得る。遅延又は不完全な治癒は、長骨骨折後の患者の約 5 - 10 % において観察され得る。

【0003】

不良治癒の背後にあるメカニズムについて限られた知識のみが利用可能である。損傷後の骨修復プロセス内での炎症及びT細胞応答の重要な役割を示唆する証拠が増えており、T細胞応答は、走化性、血管形成の刺激をもたらすさらなる免疫細胞及び間葉細胞の動員、及び最後に細胞外マトリックス合成の強化などのプロセスに影響を与える（Schmidt-Bleek et al., J Orthop Res.; 27(9):1147-51; Kolar et al., Tissue Eng Part B Rev.; 16(4):427-34; Toben et al., J Bone Miner Res., Jan; 26(1):113-24）。

10

【0004】

最近のデータは、適応免疫を欠損したマウスは、石灰化では対照と比べて効果が低かったが、驚くほどに促進された骨の治癒を表したことを示している（Colburn et al., Arthritis Rheum.; 60(6):1694-703; Schmidt-Bleek et al., Cell Tissue Res; DOI 10.1007/s00441-011-1205-7）。さらに、高い回転不安定性を有する機械的に重要な創外固定器での処置に起因する治癒の遅延/障害を有するヒツジにおいて、強固に固定された動物と比較して、有意に高い割合の細胞傷害性T細胞が血腫内で見出された。

20

【0005】

オステオカルシン及び骨型アルカリホスファターゼは、骨折治癒の遅延に対する予測マーカーとして調査されてきた。しかしながら、オステオカルシンは正常骨折治癒及び遅延骨折治癒の患者の間でわずかな差異のみを示し、それは骨折発生から42日前では示されなかった。さらに、形質転換成長因子ベータ1（TGF-ベータ1）は、別の潜在的バイオマーカーとして検討されている。試験により、骨折から4週間後に、骨折治癒の遅延を有する患者のTGF-ベータ1レベルは、正常な治癒を示す患者のレベルよりも低いことが示された。しかしながら、これらのパラメータは高い患者内間の変動性、サイトカインの短い半減期、及び骨折治癒の間の遅い予測時点により、骨治癒の予測について限られた有効性のみを有している。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Schmidt-Bleek et al., J Orthop Res.; 27(9):1147-51

【非特許文献2】Kolar et al., Tissue Eng Part B Rev.; 16(4):427-34

40

【非特許文献3】Toben et al., J Bone Miner Res., Jan; 26(1):113-24

【非特許文献4】Colburn et al., Arthritis Rheum.; 60(6):1694-703

【非特許文献5】Schmidt-Bleek et al., Cell Tissue Res; DOI 10.1007/s00441-011-1205-7

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

例えば、高価で副作用がないわけではないBMP（骨形成タンパク質）のような成長因

50

子など、可能な限り早期に支持療法を施すために骨折後の転帰を予測するバイオマーカーについて、満たされていない必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の目的は、骨折治癒の遅延を予測するための手段及び方法を提供することである。

【0009】

本発明は、臨床関連の一般的な時点で、治癒プロセスの間の脛骨近位部骨折患者の末梢血における炎症反応及び免疫細胞組成を評価する調査の過程の間に行われた。遅延治癒に関連する骨折治癒プロセスの間の末梢血中の免疫細胞組成において妥当な差異が同定された。

10

【0010】

全T細胞数(CD3+)又は主要なサブセット分布(CD3+4+及びCD3+8+)は、群間(正常治癒vs遅延治癒)で差異を示さなかった。しかしながら、驚くべきことに、遅延治癒は、損傷/手術後の異なる時点(<1週~>18週)で、CD8+TEMRA細胞に対応する表現型CD8+11a++28-及び/又はCD8+11a++57+及び/又はCD8+11a++CD28-57+を発現する最終分化したCD8+エフェクターT細胞の有意に増強された頻度(CD57+8+ 遅延治癒vs正常:1.6-1.8倍、CD28-8+ 遅延治癒vs正常:1.5-1.6倍;CD11++8+ 遅延治癒vs正常:1.2-1.3倍)と強く関連することが見出された。CD8+TEMRA細胞はまた、マーカー表現型CCR7-CD45RA+CD45RO-も発現する。この差異は18週間の追跡期間にわたって安定しており、これは骨折に対する外傷後反応よりもむしろ個人の免疫経験を反映していた。

20

【0011】

CD8+TEMRA細胞は、その(炎症)組織ホーミング特性及び強力なバイスタンダー応答性を特徴とする。CD8+TEMRA細胞はまた、独立して、IL-6、IL-8、IL-12、IL-18、IL-23、又はTNFαなどのサイトカインによって、抗原非依存性物質においてそのT細胞受容体(TCR)を誘因し得る。これらのサイトカインは、トール様受容体分子(TLR)と損傷関連分子パターン(DAMP)との間の相互作用の結果として骨折血腫において誘因される自然免疫系の細胞によって送達される。さらに、マクロファージ及び樹状細胞は、これらのCD8+TEMRA細胞による炎症性サイトカイン(例えばIFN-ガンマ)の放出を誘因し得、それにより圧倒的な炎症及び線維化だけでなく、骨形成の障害を支持する。さらに、これらの細胞は、HIV、結核又はサイトメガロウイルスのような感染症などの慢性免疫活性化状態において上方制御されている。

30

【0012】

驚くべき別の発見は、末梢血中のCD3+T細胞の他の小さなサブセット、いわゆる二重陽性CD4+8+T細胞の頻度もまた、遅延治癒患者において増強されていることであった。

【0013】

本発明の第1の態様によれば、骨折治癒の遅延を予想するための生体外方法が提供され、それは被験者から得られた試料中のCD8+CD57+細胞、CD8+CD28-細胞及び/又はCD8+CD28-CD57+細胞から成る第1群より選択されるCD8+T細胞亜集団の頻度を決定する工程を含む。

40

【0014】

本発明の第1の態様の代替案によれば、骨折治癒の遅延を予想するための生体外方法が提供され、それは被験者から得られた試料中のCD8+CD11a+CD57+細胞、CD8+CD11a+CD28-細胞及び/又はCD8+CD11a+CD28-CD57+細胞から成る第1群より選択されるCD8+T細胞亜集団の頻度を決定する工程を含む。

50

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態では、試料は、特に末梢血から得られた血液試料、又は骨折近傍の領域から、特に炎症性の骨折周囲の血腫から得られた生検試料である。

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、骨折後の転帰を予測するため、又は被験者からの試料を分類するために使用され、試料は骨折後の転帰における確率に割り当てられる。

【 0 0 1 7 】

本発明の意味における頻度は、定義可能な集団全体の細胞数に対する、これらの細胞の表面に提示される特定のマーカー分子により定義される細胞数を指す。例えば、C D 3 + 細胞の C D 8 + C D 4 + 亜集団における 5 % の頻度とは、全 C D 3 + 細胞の 5 % が C D 8 + C D 4 + 亜集団に属することを意味する。

10

【 0 0 1 8 】

いくつかの例では、細胞は短縮形で表面抗原分類、陽性 / 陰性を示すことで本明細書において特徴付けることができ、C D 4 + 8 + は C D 4 + C D 8 + と同義である。

【 0 0 1 9 】

一般に、本明細書に開示の方法において、所与の亜集団の頻度は、試料中の母集団の総数との関係で（各表の C D 3 + 又は C D 8 + 細胞それぞれにおいて示されるように）決定される。

【 0 0 2 0 】

20

任意の細胞集団が、本明細書において特定のマーカー分子に対して「陽性」と指定される場合、この指定は、前記細胞集団が、マーカー分子に対する共通の蛍光色素標識抗体で染色され得、かつ非標識細胞又は同じ抗体で標識されるが前記マーカー分子を発現しないとして一般的に知られている細胞又はアイソタイプ対照抗体で標識された細胞と比較して、少なくとも 1、2 又は 3 対数高い強度の蛍光シグナルを与えることを意味するものとする。逆に、特定のマーカー分子に対して「陰性」と指定された任意の細胞集団は、上述のようにマーカー分子に対する蛍光色素標識抗体で染色され得ない。特定のマーカー分子に対して「二重陽性」又は「++」と指定された細胞は、この特定のマーカー分子の高い発現を示す細胞を意味し、それは電子ゲートにより異なった亜集団として分離可能である。「++」細胞は、単一陽性「+」ゲートの下端で細胞によって与えられる蛍光シグナルよりも有意に強い蛍光シグナルを与える。「++」イベントは、一般的には別個のクラスターとして区別され得る。所与のマーカーに対する細胞の二重陽性「++」は、そのマーカーの陽性「+」集団の一部である。図 1 2 は C D 8 / C D 1 1 の陽性及び二重陽性の細胞のヒストグラムを示している。2 つの例示的ヒストグラムにおいて囲まれている全ての C D 1 1 a 陽性細胞の中で、縦棒の右側にあるものは「++」集団を構成している。

30

【 0 0 2 1 】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、C D 8 + C D 1 1 a ++、C D 8 + C D 1 1 a ++ C D 2 8 -、C D 8 + C D 1 1 a ++ C D 5 7 +、及び C D 8 + C D 1 1 a ++ C D 2 8 - C D 5 7 + T 細胞から成る第 2 群より選択される亜集団の頻度を決定する工程を含む。

40

【 0 0 2 2 】

いくつかの実施形態では、本発明の上記態様及び実施形態による方法は、さらに C D 3 + 細胞の C D 8 + / C D 4 + 亜集団の頻度を決定する工程を含む。

【 0 0 2 3 】

本発明の方法の予測的又は診断的な価値は、上記に記載の通りに追加の亜集団の頻度を決定することによって増大され得る。追加の亜集団の頻度は、連続的又は同時に決定可能である。同時決定が好ましい。

【 0 0 2 4 】

いくつかの実施形態では、本方法はさらに、末梢血中の I L - 6 のレベルを決定する工程を含む。したがって、上記の態様及び実施形態による方法の予測価値は、さらに全身性

50

炎症の免疫学的マーカーとしてIL-6を決定することにより増強され得る。上記の実施形態によれば、レベルは濃度として表され、例えばpg/ml又はmol/lなどの単位で測定され得る。

【0025】

いくつかの実施形態では、本発明による方法は、CD4(Uniprot ID P01730)、CD11a(Uniprot ID P20701)、CD28(Uniprot ID P10747)、CD57及びIL-6(Uniprot ID P05231)から成るマーカー群より選択されるマーカー分子に特異的に反応する第1リガンドを試料と接触させ、かつ第1リガンドの付されたマーカー分子を提示する細胞の頻度を決定するか、又はマーカー分子に結合した第1リガンドの頻度を決定することによって行われる。

10

【0026】

いくつかの実施形態では、第1リガンドは抗体、抗体断片、抗体様分子、6~30個のアミノ酸のオリゴペプチド、及び10~75個のヌクレオチド長の核酸アプタマー分子から成る群より選択され、リガンドは 10^{-8} mol/l以下の解離定数で前段落に記載のマーカー群メンバーに結合可能である。

【0027】

いくつかの実施形態では、抗体断片は、抗体のFabドメイン(抗体の抗原結合領域)又はペプチドリinkerによって連結された抗体の軽鎖及び重鎖の可変領域から成る融合タンパク質である一本鎖抗体(scFv)である。抗体断片又は抗体様分子は、組換えタンパク質発現などの適した方法によって製造され得る。

20

【0028】

第1リガンドはまた、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ又はSELEXなどの発展的方法によって開発され得、ポリペプチド又はオリゴヌクレオチドは、関心標的に対するそれらの結合親和性に応じて選択される。さらに、より高い親和性の阻害剤は、アミノ酸配列又はヌクレオチド配列の進化及び選択の反復ラウンドによって同定され得る。

【0029】

いくつかの実施形態では、上記で言及した6~30個のアミノ酸のオリゴペプチドはリガンドの一部に由来するペプチドであり、それは上記のマーカー群のメンバーによって認識される。

30

【0030】

いくつかの実施形態では、上記のマーカー群のメンバーによって認識されるリガンドは、CD28のリガンドであるCD80(Uniprot ID P33681)又はCD86(Uniprot ID P42081)、又はCD11aのリガンドであるCD54(Uniprot ID P05362)から選択される。

【0031】

いくつかの実施形態では、第1リガンドは、CD4、CD11a、CD28、CD57と反応する抗体であり、さらに光検出のための蛍光部分を含む。前段落に記載のマーカー分子はこのような抗体と結合し、そのマーカー分子を提示する細胞は、蛍光活性化細胞選別などの蛍光に基づくフローサイトメトリ法により計数可能である。

40

【0032】

いくつかの実施形態では、第1リガンドはIL-6と反応する抗体であり、かつ酵素活性を含んでもよく、この酵素活性は分光学的に観察できる触媒作用反応である。

【0033】

いくつかの実施形態では、第1リガンドは第2リガンドによって特異的に結合され、第2リガンドは酵素活性又は蛍光部分を含む。

【0034】

複数の異なるマーカー分子は、複数の異なる第1リガンドを用いることによって決定され得、各リガンドは特定のマーカー分子に特異的に結合する。

50

【0035】

いくつかの実施形態では、複数の第1リガンドの各々は、上記の通りに特定の酵素活性又は蛍光部分を含み、複数の第1リガンドは互いに酵素活性又は蛍光部分について分光学的に区別され得る。

【0036】

いくつかの実施形態では、第1リガンドの各々は、特定の酵素活性又は蛍光部分を有する特定の第2リガンドと結合し、第2リガンドは互いに酵素活性又は蛍光部分について分光学的に区別され得る。

【0037】

いくつかの実施形態では、第1及び第2のリガンド又は複数のこれらは抗体であり、かつ酵素結合免疫吸着測定法に用いられる。

10

【0038】

一実施形態では、本発明の前述の態様による亜集団の頻度は、フローサイトメトリーアッセイにおいて、CD4、CD8、CD11a、CD28及びCD57から成る群より選択されるマーカー分子を対象とする蛍光抗体が付された細胞を計数することによって決定される。

【0039】

一実施形態では、本方法は、さらに本発明の上記態様による被験者のカロリースコア (Calori-Score) を決定する工程を含む。

【0040】

20

本発明での意味におけるカロリースコアは、骨折後の永続的な治癒障害である偽関節についての尺度であり、かつ骨質、骨配列、一次介入の侵襲性又は臨床的な感染状態などの関連する骨折治癒因子を評価する方法によって決定され得る。標準よりも5%以上高いカロリースコアを示す被験者は、骨折治癒の遅延について上昇した確率を有する群に割り当てられる。この方法の詳細な説明は、Calori et al., Injury, 39, Supp 2, S59-63, 2008で閲覧可能である。

【0041】

一実施形態では、本方法はさらに決定された頻度、レベル又はカロリースコアを標準と比較する工程を含む。

【0042】

30

本発明での意味において、標準は正常又は遅延していない骨折治癒を示す被験体の試料を意味する。あるいは、標準は正常骨折治癒を示す被験者であってもよい。特に、以下の基準のいずれにも該当しない場合は、被験者の骨折治癒は正常であると考えられる。

- i) カルス形成に基づく術後12週目での不完全な骨折治癒、
- ii) 1mmより大きな骨折間隙による術後12週目での不完全な骨折治癒、
- iii) 吸収ゾーン又は不完全なカルス形成の存在、
- iv) 不完全な架橋、これは1~3枚の皮質が架橋されていることを意味する、
- v) 非架橋、これは皮質が架橋されていないことを意味する。

【0043】

好ましい実施形態によれば、正常骨折治癒を示す患者の数において(遡及的に)決定された標準と比較して、2倍高いCD8+/CD4+細胞の頻度を示す試料は、骨折治癒の遅延について上昇した確率を有する群に割り当てられる。

40

【0044】

いくつかの実施形態では、正常骨折治癒を示す患者の数において(遡及的に)決定された標準と比較して、10%以上高いCD11a++、CD28-又はCD57+T細胞の頻度を示す試料は、骨折治癒の遅延について上昇した確率を有する群に割り当てられる。

【0045】

いくつかの実施形態では、CD8+T細胞のCD28-又はCD57+細胞について30%以上の頻度を示す試料は、骨折治癒の遅延について上昇した確率を有する群に割り当てられ、CD8+T細胞のCD11a++細胞について65%以上の頻度を示す試料は、

50

骨折治癒の遅延について上昇した確率を有する群に割り当てられ、かつCD8 + T細胞のCD4 + 細胞について5 %以上の頻度を示す試料は、骨折治癒の遅延について上昇した確率を有する群に割り当てられる。

【0046】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、さらにCD4 + T細胞の亜集団の頻度を決定する工程を含み、その亜集団は、CD4 + CD57 + 細胞及びCD4 + CD28 - 細胞から選択される。

【0047】

本発明の別の態様によれば、骨折治癒の遅延を診断するためのシステムが提供され、それは、

- 被験者からの試料中の細胞集団の頻度又はIL - 6を決定するためのデバイス、及び
- プログラムされたマイクロプロセッサ、を備え、

プログラムされたマイクロプロセッサは、本発明の上記の態様及び実施形態による方法を実施するために搭載かつ指定される。

【0048】

いくつかの実施形態では、デバイスは、細胞を運搬かつ整列させるためのフローセル、光又は他の生物物理学的パラメータ、例えばインピーダンスを測定するのに適したレーザ及び検出器などの光源を備えるフローサイトメータである。このようなデバイスは、本発明の上記の態様及び実施形態によるCD8 + 細胞の亜集団の頻度を決定するために使用され得る。

【0049】

いくつかの実施形態では、デバイスは、キュベット又はマイクロタイタープレートなどの試料を保持する区画、吸光度又は蛍光を測定するのに適した光源及びUV / Vis、例えばダイオードアレイを備える、分光光度計又はプレートリーダーであり得る。

【0050】

いくつかの実施形態では、デバイスは、本発明の上記の態様又は実施形態によるIL - 6のレベルを決定するために使用される。

【0051】

いくつかの実施形態では、プログラムされたマイクロプロセッサは、前段落に記載のデバイスに統合されるか、又はデバイスを操作するための制御ユニット又はコンピュータの一部である。

【0052】

いくつかの実施形態では、上記のデバイスは、本発明の上記の態様及び実施形態によるCD8 + T細胞の亜集団の頻度を決定するために搭載かつ指定される。

【0053】

本発明の別の態様によれば、骨折治癒の遅延を診断するための部品のキットが提供され、それは抗CD8抗体、抗CD4抗体、抗CD11a抗体及び抗CD28抗体を含み、上記に記載の抗体は、蛍光に基づくフローサイトメトリに適している。

【0054】

一実施形態では、キットはさらに抗CD57抗体を含む。

【0055】

いくつかの実施形態では、本発明の上記態様による抗体は、マウス由来のモノクローナル抗体であり、かつAPC（アロフィコシアニン）、FITC（フルオレセインイソチオシアネート）又はPE（フィコエリトリン）などのフローサイトメトリでの光検出のための蛍光部分を含む。

【0056】

いくつかの実施形態では、抗体は、PE - Cy7標識マウス抗ヒトCD4 IgG₁、PE - Cy7（シアニン色素）タンデム蛍光体標識マウスモノクローナル抗体、APC - Cy7標識マウス抗ヒトCD8 IgG₁、タンデム蛍光体APC - Cy7標識マウスモノクローナル抗体、FITC標識マウス抗ヒトCD57 IgM、マウスモノクローナル抗体、

10

20

30

40

50

A P C - H 7 マウス抗ヒト C D 2 8 I g G ₁、A P C - C y 7 の類似体であり、かつ同じ分光特性を有するタンデム蛍光体 A P C - H 7 標識マウスモノクローナル抗体、及び F I T C 標識マウス抗ヒト C D 1 1 a (抗 L F A - 1 α、白血球機能関連抗原 - 1、アルファポリペプチド) I g G _{2 a}、マウスモノクローナル抗体から成る群より選択される。

【 0 0 5 7 】

本発明の別の態様によれば、I F N - ガンマ (U n i p r o t P 0 1 5 7 9) 又は T N F - α (U n i p r o t P 0 1 3 7 5) の阻害剤は、骨折治癒の遅延を処置する方法において使用するために提供され、阻害剤は、抗体、抗体断片、抗体様分子、可溶性受容体構築物、6 ~ 3 0 個のアミノ酸のオリゴペプチド、及び 1 0 ~ 7 5 個のヌクレオチド長の核酸アプタマー分子から成る群より選択される I F N - ガンマ又は T N F - α に対するリガンド、I F N - γ 又は T N F - α 分泌の阻害剤 (例えば s i - R N A 又は小分子、例えばカルシニューリン阻害剤など) であり、リガンド (阻害剤) は 10^{-8} m o l / l 以下の解離定数で選択的に I F N - ガンマ又は T N F - α に結合可能であり、かつ I F N - ガンマ又は T N F - α に対するリガンド (阻害剤) は、さらに I F N - ガンマ又は T N F - α の生物学的作用を抑止又は抑制可能である。

10

【 0 0 5 8 】

本発明のこの態様のいくつかの実施形態では、阻害剤は I F N - ガンマ又は T N F - α に対するモノクローナル抗体である。一実施形態では、阻害剤は I F N - ガンマ又は T N F - α に対するキメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒトモノクローナル抗体である。

【 0 0 5 9 】

本発明のこの態様のいくつかの実施形態では、阻害剤が抗体断片である場合、阻害剤は、I F N - ガンマ又は T N F - α に対して産生された抗体の F a b ドメイン (抗体の抗原結合領域)、又は一本鎖抗体 (s c F v)、すなわち、ペプチドリンカーによって連結された抗体の軽鎖及び重鎖の可変領域から成る融合タンパク質である。抗体断片又は抗体様分子は、組換えタンパク質発現などの適した方法によって製造され得る。

20

【 0 0 6 0 】

一実施形態では、阻害剤は I F N - ガンマ又は T N F - α に選択的に結合する抗原結合領域をヒト免疫グロブリンの F c ドメインに連結したキメラ構築物である。このような構築物の一例は、薬物のエタネルセプト (C A S N o . 1 8 5 2 4 3 - 6 9 - 0) である。

30

【 0 0 6 1 】

本発明のこの態様による阻害剤はまた、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ又は S E L E X などの発展的方法によって開発され得、ポリペプチド又はオリゴヌクレオチドは、I F N - ガンマ又は T N F - α に対するそれらの結合親和性に応じて選択される。いくつかの実施形態では、上記で言及した 6 ~ 3 0 個のアミノ酸のオリゴペプチドは、I F N - ガンマ又は T N F - α の生理学的結合パートナーの一部に由来するペプチドであり、それは選択的に I F N - ガンマ又は T N F - α によって認識される。いくつかの実施形態では、I F N - ガンマ又は T N F - α の合成は、s i - R N A 又は小分子の薬物、例えばカルシニューリン阻害剤、ホスホジエステラーゼ阻害剤などによって遮断され得る。

40

【 0 0 6 2 】

本発明の別の態様によれば、C D 8 + 細胞の阻害剤は、骨折治癒の遅延を処置又は治療する方法において使用するために提供される。一代替案では、このような C D 8 + 細胞の阻害剤は、抗体、抗体断片、抗体様分子、6 ~ 3 0 個のアミノ酸のオリゴペプチド、及び 1 0 ~ 7 5 個のヌクレオチド長の核酸アプタマー分子から成る群より選択される C D 8 に対するリガンドであり、リガンド (阻害剤) は 10^{-8} m o l / l 以下の解離定数で選択的に C D 8 に結合可能であり、かつ C D 8 に対するリガンド (阻害剤) は、さらに C D 8 + T 細胞の生物学的作用を抑止又は抑制可能であり、特に、前記 C D 8 + T 細胞からの I F N - ガンマ又は T N F - α の分泌を阻害可能である。

【 0 0 6 3 】

50

本発明のこの態様のいくつかの実施形態では、阻害剤はCD8に対して産生されたモノクローナル抗体である。一実施形態では、阻害剤は抗胸腺細胞グロブリン (globulin) 含む、CD8に対するキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒトモノクローナル抗体である。

【0064】

本発明のこの態様の一実施形態では、阻害剤はCD11a / CD18 (LFA-1) に対して産生された抗体である。本発明のこの態様の一実施形態では、阻害剤はCD49d (VLA-4) に対して産生された抗体である。本発明のこの態様の一実施形態では、阻害剤はCD137 (4-1BB) に対して産生された抗体である。

【0065】

本発明のこの態様の一実施形態では、阻害剤は、非限定的な例として、例えば、CD11a / CD18 (LFA-1)、CD49d (VLA-4) 又はCD137 (4-1BB) などの活性化CD8上の分子に対して産生されたモノクローナル抗体である。一実施形態では、阻害剤はキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒトモノクローナル抗体である。本発明のこの態様の一実施形態では、阻害剤は、CD8又はCD8特異的活性化抗原、例えばCD11a / CD18 (LFA-1)、CD49d (VLA-4) 又はCD137 (4-1BB) などに選択的に結合する抗原結合領域を、ヒト免疫グロブリンのFcドメインに連結したキメラ構築物である。このような構築物の一例は、薬物のアレファセプト (CAS No. 222535-22-0) である。

【0066】

本発明のさらに別の態様によれば、骨折治癒の遅延を処置するための医薬組成物が提供され、それは本発明の上記態様のいずれか1つに記載のIFN-ガンマ又はTNF-α又はCD8の阻害剤 (又はそれに対するリガンド) を含む。

【0067】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は経口投与、例えば、皮下、静脈内、肝臓内、筋肉内、又は局所内骨折の投与用に処方される。

【0068】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は約0.1% ~ 約10%の活性成分を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は約10% ~ 約100%の活性成分を含む (凍結乾燥物)。

【0069】

いくつかの実施形態では、医薬組成物はIFN-ガンマの阻害剤及びTNF-αの阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物はCD8の阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物はIFN-ガンマに対するモノクローナル抗体又は他の中和剤、及びTNF-αに対するモノクローナル抗体又は中和剤 (例えば、TNF-αを対象としたFc-Ig構築物、例えばエタネルセプト) を含む。

【0070】

本発明の別の態様によれば、骨折治癒の遅延を処置するための剤形が提供され、それは本発明の上記態様のいずれか1つに記載のIFN-ガンマ又はTNF-αの阻害剤 (又はそれに対するリガンド) を含む。

【0071】

剤形は、経腸投与、例えば、鼻腔、口腔、直腸、経皮若しくは経口投与、又は吸入形態若しくは坐薬用であってもよい。あるいは、皮下、静脈内、肝臓内又は筋肉内の注射形態など、経口投与が使用されてもよい。必要に応じて、薬学的に許容される担体及び/又は賦形剤が存在してもよい。

【0072】

また、本発明の範囲内には、骨折治癒の遅延に苦しむ患者を処置するための方法があり、それは本発明の上記態様のいずれか1つに記載のIFN-ガンマ若しくはTNF-αの阻害剤 (若しくはそれに対するリガンド)、又は医薬組成物若しくは剤形を前記患者へ投与する工程を含む。同様に、CD8に対する抗体など、前記患者においてCD8+T細胞

10

20

30

40

50

の枯渴をもたらし得る薬剤を投与する工程を含む、骨折治癒の遅延に苦しむ患者を処置するための方法が想到される。

【 0 0 7 3 】

本発明の別の態様によれば、骨折治癒の遅延を処置するための薬剤の製造方法が提供され、それは本発明の上記態様のいずれか1つに記載のIFN - ガンマ又はTNF - α の阻害剤（又はそれに対するリガンド）の使用を含む。

【 0 0 7 4 】

したがって、本明細書に開示の本発明における治療用途に関連する対象は以下の通りである。

【 0 0 7 5 】

1．骨折治癒の遅延を処置又は治療する方法において使用するためのIFN - ガンマ又（Uniprot P01579）又はTNF - α （Uniprot P01375）の阻害剤であって、該阻害剤は、

a． 10^{-8} mol / l以下の解離定数で選択的にIFN - ガンマ又はTNF - α に結合可能であるIFN - ガンマ又はTNF - α に対するリガンドであり、及び阻害剤は、

b．IFN - ガンマ又はTNF - α の生物学的作用を抑止又は抑制可能であることを特徴とする、阻害剤。

【 0 0 7 6 】

2．対象1に記載のIFN - ガンマ又はTNF - α の阻害剤であって、前記阻害剤は抗体、抗体断片、抗体様分子、可溶性受容体構築物、IFN - ガンマ又はTNF - α に対する受容体に由来する6～30個のアミノ酸のオリゴペプチド、及び10～75個のヌクレオチド長の核酸アプタマー分子から成る群より選択されることを特徴とする、阻害剤。

【 0 0 7 7 】

3．対象1又は2に記載のIFN - ガンマ又はTNF - α の阻害剤であって、前記阻害剤はIFN - ガンマ又はTNF - α に対して産生されるモノクローナル抗体であることを特徴とする、阻害剤。

【 0 0 7 8 】

4．対象1～3のいずれか1つに記載のIFN - ガンマ又はTNF - α の阻害剤であって、前記阻害剤はキメラ（部分的にヒト）抗体、ヒト化抗体、又はヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする、阻害剤。

【 0 0 7 9 】

5．対象1～4のいずれか1つに記載のIFN - ガンマ又はTNF - α の阻害剤であって、前記阻害剤はIFN - ガンマ又はTNF - α に選択的に結合する抗原結合領域をヒト免疫グロブリンのFcドメインに連結したキメラ構築物であることを特徴とする、阻害剤。

【 0 0 8 0 】

6．対象5に記載のIFN - ガンマ又はTNF - α の阻害剤であって、該阻害剤はエタネルセプト（CAS No. 185243 - 69 - 0）であることを特徴とする、阻害剤。

【 0 0 8 1 】

7．骨折治癒の遅延を処置する方法において使用するためのIFN - ガンマ又はTNF - α の阻害剤であって、該阻害剤は、IFN - ガンマ又はTNF - α をコードするmRNAを標的とした阻害RNA又はDNA分子（si - RNA、mi - RNA、sh - RNA、アンチセンスDNA）であることを特徴とする、阻害剤。

【 0 0 8 2 】

8．骨折治癒の遅延を処置又は治療する方法において使用するための活性化CD8 + 細胞の阻害剤であって、前記阻害剤は、選択的に活性化CD8 T細胞の細胞表面に結合可能であり、前記阻害剤は、さらに活性化CD8 + T細胞の生物学的作用を抑止又は抑制可能であり、特に、前記CD8 + T細胞からのIFN - ガンマ又はTNF - α の分泌を阻害可能であることを特徴とする、阻害剤。

【 0 0 8 3 】

9．対象8に記載の活性化CD8 + T細胞の阻害剤であって、前記阻害剤はCD8 マーカ

10

20

30

40

50

一群に含まれるメンバーに対するリガンドであり、CD8マーカー群はCD8、CD11a/CD18(LFA-1)、CD49d(VLA-4)、CD137(4-1BB)を含み、前記阻害剤は 10^{-8} mol/l以下の解離定数で選択的に前記マーカー群の前記メンバーに結合可能であることを特徴とする、阻害剤。

【0084】

10．対象8又は9に記載の活性化CD8+T細胞の阻害剤であって、前記阻害剤は抗体、抗体断片、抗体様分子、可溶性受容体構築物、IFN-ガンマ又はTNF- α に対する受容体に由来する6~30個のアミノ酸のオリゴペプチド、及び10~75個のヌクレオチド長の核酸アプタマー分子から成る群より選択されることを特徴とする、阻害剤。

【0085】

11．対象8~10のいずれか1つに記載の活性化CD8+T細胞の阻害剤であって、前記阻害剤はCD8、CD11a/CD18(LFA-1)、CD49d(VLA-4)又はCD137(4-1BB)に対して産生されたモノクローナル抗体であることを特徴とする、阻害剤。

【0086】

12．対象8~10のいずれか1つに記載の活性化CD8+T細胞の阻害剤であって、前記阻害剤はキメラ(部分的にヒト)抗体、ヒト化抗体、又はヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする、阻害剤。

【0087】

13．対象12に記載の活性化CD8+T細胞の阻害剤であって、前記阻害剤はアレファセプト(CAS No. 222535-22-0)であることを特徴とする、阻害剤。

【0088】

14．骨折治癒の遅延を処置する方法において使用するための活性化CD8+T細胞の阻害剤であって、該阻害剤は、CD8、CD11a/CD18(LFA-1)、CD49d(VLA-4)又はCD137(4-1BB)をコードするmRNAを標的とした阻害RNA又はDNA分子(si-RNA、mi-RNA、sh-RNA、アンチセンスDNA)であることを特徴とする、阻害剤。

【0089】

15．骨折治癒の遅延を処置するための医薬組成物であって、上記対象のいずれか1つに記載のIFN-ガンマ若しくはTNF- α の阻害剤、又は活性化CD8+T細胞の阻害剤を含む、医薬組成物。

【0090】

16．対象15に記載の医薬組成物であって、前記組成物はIFN-ガンマの阻害剤及びTNF- α の阻害剤を含むことを特徴とする、医薬組成物。

【0091】

17．対象15に記載の医薬組成物であって、前記組成物は対象8~14のいずれか1つに記載の活性化CD8+T細胞の阻害剤を含むことを特徴とする、医薬組成物。

【0092】

18．骨折治癒の遅延に苦しむ患者を処置するための方法であって、
a．上記対象1~7のいずれか1つに記載のIFN-ガンマ又はTNF- α の阻害剤、
b．対象8~14のいずれか1つに記載の活性化CD8+T細胞の阻害剤、又は
c．上記対象15~17のいずれか1つに記載の医薬組成物又は剤形、
を前記患者に投与する工程を含む、方法。

【0093】

19．骨折治癒の遅延を処置するための薬剤の製造方法であって、上記対象のいずれか1つに記載のIFN-ガンマ若しくはTNF- α の阻害剤、又は活性化T細胞の阻害剤の使用を含む、方法。

【0094】

例えば、マーカー分子又は阻害剤などの単一の分離可能な特徴における選択肢が「実施形態」として本明細書において説明されている限り、このような選択肢は自由に組み合わせ

10

20

30

40

50

されて本明細書に開示の本発明における個別の実施形態を形成し得ることが理解されるべきである。

【 0 0 9 5 】

本発明はさらに、以下の実施例及び図面により説明され、そこからさらなる実施形態及び利点が引き出され得る。これらの実施例は本発明を説明するが、その範囲を限定するものではないことが意図される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 9 6 】

【図 1】正常治癒患者及び遅延治癒患者のカロリースコア（中央値、下位及び上位の四分位数）を示す図である。

10

【図 2】術後 6、12 及び 18 週目の正常治癒患者及び遅延治癒患者の最大床反力（A）及び平均歩行速度（B）（中央値、下位及び上位の四分位数）を示す図である。

【図 3】正常治癒患者及び遅延治癒患者の CD3 + T 細胞集団中の CD8 + CD4 + 細胞の頻度（上位プロット中央値、下位及び上位の四分位数、下位プロット平均値）を示す図である。

【図 4】正常治癒患者及び遅延治癒患者並びに骨折していない健常対照群の CD8 + T 細胞集団中の CD11a + の頻度（中央値、下位及び上位の四分位数）を示す図である。

【図 5】正常治癒患者及び遅延治癒患者並びに骨折していない健常対照群の CD8 + T 細胞集団中の CD57 + の頻度（中央値、下位及び上位の四分位数）を示す図である。

【図 6】正常治癒患者及び遅延治癒患者並びに骨折していない健常対照群の CD8 + T 細胞集団中の CD28 - の頻度（中央値、下位及び上位の四分位数）を示す図である。

20

【図 7】正常治癒患者及び遅延治癒患者の血液試料中でのサイトカイン発現（A IL6；B IL-8）（中央値、下位及び上位の四分位数）を示す図である。

【図 8】CD8 + TEMRA の骨折血腫への移行（比率）を示す図である。

【図 9】末梢血単核細胞（PBMC）及びヒト骨髓間葉系間質細胞（BM-MSC）中の CD4 + 細胞、CD8 + 細胞及び CD8 + CD57 + CD28 - 細胞の IFN-γ 産生細胞の割合（平均値）を示す図である。

【図 10】TNF-α 及び IFN-γ による骨髓間葉系間質細胞の骨形成の阻害を示す図である。

【図 11】マウスモデルにおける CD8 + の枯渇及び骨折治癒の改善を示す図である。

30

【図 12】CD11a + 細胞の決定についての一例を示す図である。

【図 13】骨折患者の手術前後の血液及び骨折血腫（FH）における CD8 + T 細胞集団中の CD57 + 細胞の頻度を示す図である。

【図 14】骨折患者の手術前後の血液及び骨折血腫（FH）における CD8 + T 細胞集団中の CD28 - 細胞の頻度を示す図である。

【図 15】骨折患者の手術前後の血液及び骨折血腫（FH）における CD4 + T 細胞集団中の CD57 + 細胞（上側パネル）及び CD28 - 細胞（下側パネル）の頻度を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 9 7 】

40

材料及び方法

被験者及び研究プロトコル

2008 年 7 月～2010 年 8 月の間、15 人の患者を本研究において孤立性かつ閉鎖性の脛骨近位部骨折で登録した（年齢 23 歳～64 歳、男性 9 人及び女性 8 人）。

【 0 0 9 8 】

生体力学的機能及び免疫学的パラメータを評価するために、あらゆる慢性疾患（例えば骨粗鬆症、糖尿病、関節リウマチ、慢性心不全、腎不全）、特にヒト免疫不全ウイルス感染又は肝炎感染を有する患者を研究から除外した。さらに、いくつかの骨折を有する患者、又は股関節、肩関節若しくは足関節を治療中の患者も研究から除外した。

【 0 0 9 9 】

50

研究は、医薬品の臨床試験の実施の基準及びヘルシンキ宣言についての医薬品規制調和国際会議の指針を遵守して実施した。全ての患者は書面によるインフォームドコンセントを提出し、研究はベルリンのシャリテ - 大学病院 (Charite - Universitaetmedizin) の倫理委員会によって承認された (Nr. EA 1 / 006 / 08)。

【0100】

プロトコル及び評価計画

骨折治癒の間の確立された臨床試験点と調和して骨折治癒における初期段階を評価するために、患者を術後 3 - 5 日目 (以下「1 週目」と称する)、2 週目、4 週目、6 週目、12 週目及び 18 週目に調査した。全ての試験点で全患者は以下の方法を受けた。

10

【0101】

血液試料

各試験日に、仰臥位で 15 分間安静にした後、午前 9 : 00 ~ 12 : 00 の間の午前中に血液試料を採取した。全ての血液試料をすぐに暗い空調室に移動させ、2 時間以内に実験室に送った。さらに、血漿及び血清の試料を一定分量で収集し、- 80 で凍結させた。

【0102】

全血球数及び標準的な臨床変数 (赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、尿酸、オスターゼ (ostease)、CRP) を、実験室の標準作業手順書 (SOP) に従って、血漿及び血清の試料において測定した。オステオカルシン評価のための血清試料を直ちに遠心し (3500 rpm / 15 分)、事前に凍結させた一定分量中で保存し、3 時間以内に実験室に送った。

20

【0103】

半自動システムを使用して、サイトカイン (TNF α 、IL - 6、全 IL - 8、IL - 10) を血漿試料において測定した。細胞内サイトカイン染色のための抗体及び各試薬を BD Pharmingen 社から購入した。

【0104】

宿主防御の適応免疫を評価するために、CD 3、CD 4、CD 8、CD 11a +、CD 57 + 及び CD 28 + を含む、T 細胞関連の表面抗原分類を調べた。細胞選別は BD FACSAria II フローサイトメータを用いて行い、得られた画分の純度は BD LSRII フローサイトメータで決定した。

30

【0105】

MSC 分化のための CD 8 + TEMRA 細胞馴化培地

インフォームドコンセント及び地域の人間学倫理委員会による承認後に、T 細胞受容体活性化 CD 8 + TEMRA 細胞 (CD 62L - CD 45RA +) の馴化培地を 2 人の異なるドナーから得た。CD 62L + 及び CD 45RO + 細胞の枯渇後、CD 62L - CD 45RO - 画分から CD 8 + 細胞の正の選択を行った。CD 8 + T 細胞 (1×10^6 細胞 / ml DMEM + 10% FCS) を CD 3 CD 28 CD 2 でコーティングしたビーズで 24 時間刺激した。

【0106】

40

骨髄間葉系間質細胞 (BM - MSC) の単離及び培養

前述の通り腰の手術を受けた 5 人の患者 (ドナーの年齢 : 39 - 90 歳、平均 = 73 歳 ; 性別 : 女性 2 人、男性 3 人) の大腿骨髄のウォッシュアウトから BM - MSC を単離した。フローサイトメトリ分析を用いて、BM - MSC の均質集団を、細胞表面マーカー発現を分析することにより検証した [Glaeser, J. D., S. Geissler, A. Ode, C. J. Schipp, G. Matziolis, W. R. Taylor, P. Knaus, C. Perka, G. N. Duda, and G. Kasper, Modulation of matrix metalloprotease - 2 levels by mechanical loading of three - dimensional mesenchymal stem cell constructs :

50

impact on in vitro tube formation. Tissue Eng Part A. 16 (10): p. 3139-48 (2010)]. 以下に説明する全ての細胞アッセイは、4人以上の異なるドナーからの3-4継代でのBM-MSCを用いて技術的に3回反復して行った。

【0107】

骨分化アッセイ

異なる濃度のIFN- γ 又はTNF- α それぞれを補充した骨形成培地(OM)を用いて、集密的なBM-MSCの骨分化を誘導した。生体外で刺激かつ選別されたCD8+T E M R AのCMを用いた実験について、CMを2倍濃縮OMで1:2に希釈した。マトリックスの石灰化をアリザリンレッド染色で可視化した。定量は、10%の塩化セチルピリジニウムで抽出した後に、アリザリンレッドの吸光度(ODAR)を測定することにより達成した。得られた値はアラマブルーによって決定された生存細胞の数に対して正規化した。

10

【0108】

BM-MSCの生存及び生存率アッセイ

細胞生存率アッセイについて、実験前日に2400BM-MSC/cm²で96ウェルプレートに播種した。翌日、培地を交換し、細胞を異なる濃度のIFN- γ 又はTNF- α (0、1、10及び100ng/ml)を含有するEM中で3日間培養した。アラマブルー細胞生存率アッセイを用いて細胞生存率を測定した。製造元の使用説明書に従ってCyQuantアッセイを用いて、均等な細胞播種を播種の翌日に確認した。

20

【0109】

BM-MSCアポトーシスアッセイ

細胞アポトーシスアッセイについて、2400BM-MSC/cm²で24ウェルプレートに播種した。IFN- γ 又はTNF- α それぞれの指示された濃度を含有する培地で、BM-MSCを2日間培養した。続いて、培地を除去し、製造元の使用説明書に従ってCaspase-Glo(登録商標)3/7 Assayを用いて、細胞溶解物中のカスパーゼ-3及び-7の活性を測定し、値をCyQuantアッセイによって決定される細胞数に対して正規化した。

【0110】

マウス実験

動物保護法、実験動物の管理と使用に関するNIH指針及び国家動物保護指針によって確立された方針及び原則に従って、12週齢のC57BL/6マウス(n=19)を用いてマウス実験を行った。CD8-T細胞群におけるCD8+免疫細胞の枯渇を、抗体(mCD8(YTS 169.4)、BioXCell社)注射(4日間連続して注射あたり200 μ gのmCD8、最終日は手術の日)により達成した。

30

【0111】

CD8+細胞枯渇は、CD3、CD8a及びCD4に対して特異的な抗体を用いてFACS分析(LSR IIフローサイトメータ)により観測した。CD8+T細胞群では、手術前日に200 μ lの2.5 $\times$ 10⁶CD8+細胞が尾静脈(tail vein)に静脈注射された。骨切り術は、MouseExFixシステムを用いて左大腿骨において実施した。大腿骨は、10.5 μ m、55keVp、145 μ Aのボクセルサイズで μ CT分析(Viva μ CT40)を受け、関心体積(VOI)は中央に2mmの骨切断間隙を含んだ。3人の独立した整形外科医の盲検評価により、骨切り術から21日後の治療結果を架橋又は非架橋のいずれかとして評価した。

40

【0112】

治療分類及びデータ収集

全患者は、試験期間中に何回かのX線分析を受けることで、移植及び骨折間隙の安定性が評価された。X線の検査は、患者の正確な治療の結果及び分類を確実にするために、異なる方面(整形外科、放射線科医)からの3人の独立した盲検医師によって行われた。さらに、機能データ(歩行分析)を術後12週目で実施して、無痛全体重負荷を評価した。

50

遅延治癒プロセスの定義を満たすためには、患者は以下の基準の1つ以上を満たさなければならない。文献において確立され、かつ診療所で使用されているように、遅延治癒プロセスについて時間依存的及び放射線学的な基準がある。

【0113】

骨折治癒の遅延についての時間依存的基準：

カルス形成に基づく術後12週目での不完全な骨折治癒。

【0114】

骨折治癒の遅延についての放射線学的基準：

- 1) 1 mmより大きな骨折間隙による術後12週目での不完全な骨折治癒。
- 2) 吸収ゾーン又は不完全なカルス形成の存在。
- 3) 不完全な架橋、これは1～3枚の皮質が架橋されていることを意味する。
- 4) 非架橋、これは皮質が架橋されていないことを意味する。

10

【0115】

患者の個々の術後状態を数値化するために、C a l o r i による偽関節スコアリングシステムを使用した。

【0116】

さらに、患者の統計データ、A S A 分類、主診断、手術及び移植の種類、合併症及び微生物学的データを図表から導出し、データベースに集めた。全患者の特徴を表1に示す。

【0117】

【表1】

20

患者番号	年齢	体重 (k g)	身長 (c m)	B M I	喫煙	治癒状態
1	47	60	159	23, 733	はい	遅延
2	62	90	183	26, 874	いいえ	正常
4	57	53	153	22, 641	いいえ	遅延
5	39	80	168	28, 345	いいえ	正常
7	59	62	158	24, 836	いいえ	遅延
8	23	75	192	20, 345	はい	正常
9	58	97	168	34, 368	はい	正常
10	24	60	159	23, 733	はい	正常
11	46	80	176	25, 826	はい	正常
12	45	92	188	26, 03	いいえ	遅延
13	46	86	174	28, 405	はい	正常
14	62	66	162	25, 149	いいえ	遅延
16	25	90	185	26, 297	いいえ	正常
17	49	81	172	27, 38	はい	遅延
18	64	70	180	21, 605	いいえ	遅延

30

表1：患者の特徴

【0118】

40

歩行分析

3D運動解析は、120Hzのサンプリングレートの12台の赤外線カメラ、かつ第1及び第5中足骨頭部並びに踵の皮膚に装着する再帰性反射マーカを用いて行った。床反力は960Hzで2つの力台を用いて収集した。

【0119】

各試験日に、患者は自己選択した速度で10mの通路に沿って歩行を実施した。運動学的データから、歩行速度、歩き方及び歩幅、歩調、歩幅の高さ、並びに遊脚期及び立脚期の持続時間などの歩行パラメータの計算が可能であった。さらに、床反力を取得して、患肢及び対側肢についてのピーク水平力及び立脚持続時間を計算した。

【0120】

50

患者はまた、各足を別々の力台の上に置いて椅子からの立ち上がり試験を行い、脚間のピーク力における差異並びに立ち上がり試験の継続時間を決定し、それらは床反力に反映された。

【0121】

統計分析

全てのデータは平均±標準偏差として得る。群間の年齢及び性別の依存性を評価するためにカイ二乗検定を適用し、かつ正規分布しなかったそれらの値を決定するためにコルモゴロフ-スミルノフ検定を適用した。マン-ホイットニーのU検定は群間を比較するために使用した。ボンフェローニ補正によるANOVA-反復測定を適用して、異なる調査時点間の各群の変数を調べた。

10

【0122】

2つの患者群間で異なって発現された全ての遺伝子について、受信者動作特性(ROC曲線)分析を行った。正及び負の予測値を推定するために、ROC曲線分析から得られた各遺伝子の感受性及び特異性を適用した。

【0123】

全統計分析はStatView 4.5 (Abacus Concepts社、米国、バークレー)を用いて行った。統計的有意性は $P < 0.05$ で示される。

【0124】

各箱ひげ図は、中央値、下位及び上位の四分位数を示す。

【0125】

有意水準： $P < 0.05 = *$ / $p < 0.01 = **$ / $p < 0.0001 = ***$

20

実施例

【実施例1】

【0126】

カロリースコア

正常治癒患者及び遅延治癒患者は、年齢、性別、身長及び体重において類似していた。群間で、ASA分類、骨質、骨欠損間隙、手術技術、介入数及び喫煙状態に差異はなかった。

【0127】

カロリースコアを以下の因子によって計算し、因子は合計して2を乗じる。

30

【0128】

a) 骨因子:

骨質 良好(0 Pt)、中程度(例えば、軽度の骨粗鬆症、1 Pt)、不良(例えば、骨量減少、2 Pt)、非常に不良(例えば、壊死、無血管、3 Pt)

一次骨折 閉鎖(0 Pt)、開放1段階(1 Pt)、開放2-3段階 Aグレード(3 Pt)、開放3段階 B-Cグレード(5 Pt)

追加介入 無し(1 Pt)、<2(2 Pt)、<4(3 Pt)、>4(4 Pt)

OP-侵襲性 最小限の侵襲(例えば、スクリュー、0 Pt)、内部の髄内(intramedullary)(例えば、ネイル、1 Pt)、内部の髄外(extramedullary)(2 Pt)、骨接合(例えば、骨移植、3 Pt)

40

OP-適合性 十分な安定性(0 Pt)、不十分な安定性(1 Pt)

Weber & Cech 肥大(hypertrophy)(1 Pt)、貧栄養(oligotrophy)(3 Pt)、萎縮(atrophy)(5 Pt)

骨配向性 解剖学的(0 Pt)、非解剖学的(1 Pt)

骨折間隙 0.5-1 cm(2 Pt)、1-3 cm(3 Pt)、>3 cm(5 Pt)

【0129】

b) 軟組織

状態

無傷(0 Pt)、発症を伴わない最近の処置(2 Pt)、

50

組織欠損の最近の処置（例えば、複数の切開、コンパートメント症候群（c o m p a r t m e n t s y n d r o m）、3 P t）、最近の複雑な処置（4 P t）、不良な血管新生（静脈不全、不良な毛細血管充填、5 P t）、複数の皮膚の病変又は欠損（例えば潰瘍、インプラントプレートの存在、6 P t）

【 0 1 3 0 】

c) 患者

A S A グレード 1 段階又は 2 段階（0 P t）、3 段階又は 4 段階（1 P t）

糖尿病 いいえ（0 P t）、はい - 良好に適応 = H b A 1 c < 1 0（1 P t）

）、はい - 不良な適応 = H b A 1 c > 1 0（2 P t）

血液検査 炎症 W C C > 1 2 又は E S R > 2 0 又は C R P > 2 0（1 P t）

10

感染 なし（0 P t）、最近の感染又は感染の疑い（1 P t）、感染（4 P t）

薬物 ステロイド（1 P t）、非ステロイド（s o n - s t e r o i d s）（1 P t）

喫煙者 いいえ（0 P t）、はい（5 P t）。

【 0 1 3 1 】

遅延治癒患者は、より複雑な処置を伴うより多くの軟組織の欠損、より高い臨床感染状態を有し、かつより多くのステロイド性又は非ステロイド性の抗炎症薬を受けていた（表 2）。

【 0 1 3 2 】

20

【表 2】

パラメータ	遅延治癒患者	正常治癒患者
一次損傷（閉鎖）	100%（7/7）	100%（8/8）
骨折タイプAO-B	57.1%（4/7）	62.5%（5/8）
骨折タイプ ムーア	42.9%（3/7）	37.5%（3/8）
ASA分類1又は2	100%（7/7）	100%（8/8）
Weber & Cech （肥大）	14.3%（1/7）	25%（2/8）
Weber & Cech （貧栄養）	85.7%（6/7）	75%（6/8）
骨欠損間隙 （0.5-1.0cm）	57.1%（4/7）	75%（6/8）
骨欠損間隙 （1.0-3.0cm）	42.9%（3/7）	25%（2/8）
手術法 （経皮）	0%（0/7）	12.5%（1/8）
手術法 （ピン）	0%（0/7）	12.5%（1/8）
手術法 （ORIF）	100%（7/7）	75%（6/8）
介入数（<2）	85.7%（6/7）	100%（8/8）
介入数（2-4）	14.3%（1/7）	0%（0/8）
骨質 （良好）	71.4%（5/7）	87.5%（7/8）
骨質 （中程度）	28.6%（2/7）	12.5%（1/8）
軟組織欠損 （無事な手術）	14.3%（1/7）	87.5%（7/8）
軟組織欠損 （わずかな処置）	28.6%（2/7）	12.5%（1/8）
軟組織欠損 （複雑な処置）	42.9%（3/7）	0%（0/8）
軟組織欠損 （不十分な血管新生）	14.3%（1/7）	0%（0/8）
臨床感染状態（無感染）	85.7%（6/7）	100%（8/8）
臨床感染状態（以前に感染）	14.3%（1/7）	0%（0/8）
ステロイド/NSAID療法	14.3%（1/7）	0%（0/8）
喫煙状態	25%（1/7）	37.5%（3/8）

【0133】

図1は、術後の治癒合併症のリスクを反映する「カロリースコア」は、正常治癒患者と比較して遅延治癒患者において有意に高かったことを示している（スコア 32.6 ± 6.3 vs 25.8 ± 5.1 ; $p = 0.05$ ）。

【実施例2】

【0134】

歩行分析

歩行分析を術後6、12及び18週目実施し、患者の機能状態を評価した（図2）。その結果、遅延治癒患者は著しく遅い歩行速度及び低い最大床反力を示し、2つの異なる群

の放射線学的分類を確認した。さらに、これは遅延治癒群における長期の治癒期間を明確に示している。注目すべきことに、遅延治癒患者は術後 18 週目でやっと正常治癒群の術後 6 週目の歩行速度レベルを満たしている。

【実施例 3】

【0135】

CD3 + T 細胞集団中の CD8 + / CD4 + 細胞の頻度

CD3 + T 細胞中の CD8 + / CD4 + の割合における有意な差異が、2 群間で見出された (図 3)。遅延治癒患者は正常治癒患者と比較して、全時点にわたって持続的でより高い CD3 + T 細胞中の CD8 + / CD4 + の割合を示した。加えて、CD3 + T 細胞の CD8 + / CD4 + の割合における経時的な変化は両群において観察されなかった。各群及び時点における単一細胞値を表 3 に示す。

10

【実施例 4】

【0136】

CD8 + T 細胞集団中の CD11a + 細胞の頻度

治癒遅延群における CD11a + T 細胞の発現は、18 週間の全調査期間にわたって正常治癒患者と比較して有意に高かった (図 4)。さらに、遅延治癒患者は基準範囲 (破線) と比較して病理学的に上昇した CD11a + T 細胞のレベルを示した。さらに、遅延治癒患者は骨折していない健常対照群と比較して有意に高い値を示した。3 人の遅延治癒患者及び 3 人の正常治癒患者の術後 60 週目を評価した。両群は、同一の CD11a + T 細胞濃度を示した。経時的な差異は各群において見つからなかった。各群及び時点における単一細胞値を表 4 に示す。ヒト患者における CD11a + (高陽性) 及び CD11a + (陽性) 画分の 2 つの異なる測定及び分析の例を図 12 に示す。

20

【実施例 5】

【0137】

CD8 + T 細胞集団中の CD57 + 細胞の頻度

遅延治癒患者と正常治癒患者との間で、CD8 + T 細胞中の CD57 + の発現について、有意な差異が観察された (図 5)。注目すべきことに、遅延治癒患者は、正常治癒患者又は健常人の正常値と比較して、55% - 73% 高い CD57 + の割合を示した。加えて、正常治癒患者は十分に基準範囲内であったのに対し、遅延治癒患者は CD8 + CD28 - レベルを示し、結果としてこの基準範囲 (点線) を超えた。さらに、これらの差異は、18 週間の全調査期間にわたって安定していた。術後 1 週目でのわずかな差異から始まり、これらの差異は入院 2 週目の間に著しくなった。調査期間の間、各群内で CD8 + CD57 + の変化は見出されず、これは骨折に対する反応よりもむしろ個人の免疫経験を反映するものであった。各群及び時点における単一細胞値を表 5 に示す。

30

【実施例 6】

【0138】

CD8 + T 細胞集団中の CD28 - 細胞の頻度

同様の配列が CD8 + CD28 - T 細胞によって示される (図 6)。ここでは、遅延治癒患者は、正常治癒患者又は健常人の値それぞれと比較して、29% - 34% 持続的に高い CD8 + CD28 - T 細胞のレベルを示した。CD8 + CD57 + T 細胞の結果と同様に、CD8 + CD28 - T 細胞の割合における差異は入院 2 週目の間に著しくなり、これらの差異はまた、全調査期間及び術後 60 週目にわたって安定していた。さらに、調査中に各群内で有意な差異は観察されなかった。各群及び時点における単一細胞値を表 6 に示す。

40

【実施例 7】

【0139】

サイトカイン発現 IL - 6、IL - 8、TNFα

IL - 6 レベルは、両群において術後 1 週目と 2 週目との間で有意に減少した (遅延患者は $p = 0.03$; 正常患者は $p = 0.003$) (図 7)。しかしながら、術後 2 週目の遅延治癒患者の IL - 6 レベルは、術後 1 週目の正常治癒患者の IL - 6 レベルと比較し

50

て、依然として高かった。各群及び時点における単一細胞値を表7に示す。

【0140】

群間でIL-8レベルにおける有意な差異はなかったが、IL-8レベルは、両群において術後1週目から2週目で有意に減少した（遅延患者は 281.4 ± 162.7 vs 195.4 ± 77.3 pg/mL; $p = 0.04$ 、及び正常治癒患者は 219.3 ± 66.8 vs 182.9 ± 55.9 pg/mL; $p = 0.01$ ）。

【0141】

TNF α レベルについて、調査期間にわたって差異は両群間及び両群内で観察されなかった。

【実施例8】

10

【0142】

CD8+TEMRAの末梢血から血腫への移行

骨折血腫は骨折治癒の初期段階を表すため、治癒結果を導くための重要物質である可能性がある。従って、CD8+TEMRAのサブセットが、その高い接着分子（例えばCD11a）発現のために骨折部位で濃縮され得るかどうかを調査した。脛骨近位部閉鎖骨折の別の4人の患者の末梢血及び骨折血腫の試料対を分析した（図8）。サブセット分析により、全患者からの骨折血腫において、末梢血と比較して1.8-2.5倍（ $p < 0.05$ ）のCD28-CD8+TEMRAの濃縮が明らかとなった。CD57+CD8+TEMRAのサブセットについて、1.4~3.7倍の範囲の濃縮（ $p = 0.07$ ）の同様の結果が見出された。

20

【実施例9】

【0143】

CD8+TEMRA細胞による強力なIFN- γ の産生

CD8+TEMRA細胞は強力なサイトカインプロデューサであると考えられている。実際に、プレートコーティングされた抗CD3/28mAbによるT細胞の生体外刺激の後に、他のT細胞サブセット（CD4+、全CD8+、CD8+57-28+T細胞；18-35%のIFN- γ 産生細胞）と比較して、CD3+8+57+28-サブセット内で最も強いサイトカイン応答（>50%のIFN- γ 産生細胞）を観察した（図9）。興味深いことに、骨再生において重要な役割を果たすことが知られており、かつT細胞の増殖を阻害可能であるヒト骨髄由来MSC（BM-MSC）は、メモリーT細胞によるIFN- γ の分泌を抑制できず、これは組織因子からの負の信号に対するこれらの免疫細胞の抵抗を示している（図9）。

30

【実施例10】

【0144】

TNF- α 及びIFN- γ による骨髄間葉系間質細胞の骨形成の阻害

次に、骨細胞に対するIFN- γ 及びTNF- α の影響を、インビトロでの骨分化及び生存率のアッセイを用いて試験した。

【0145】

図10は、（CD3+8+）CD11a++、CD57+及びCD28-T細胞が、IFN- γ 及びTNF- α を介してBM-MSCの骨形成を阻害することを示している。図10B及び10C）は、指示されたIFN- γ 及びTNF- α の濃度をそれぞれ補充した骨形成培地で処理した後の、BM-MSCの代表的な図（上のパネル）を示している。図表は、細胞数に対して正規化したアリザリンレッドの光学濃度値（OD_{AR}）を示している。図10D及びE）は、指示されたサイトカイン濃度で補充した培地で培養した後に、アラマブルー（登録商標）を用いて決定したBM-MSCの活力を示している。図10F）はCyQuant（登録商標）により決定された全DNA含量に対して正規化したCaspase-Glo（登録商標）3/7Assayの相対的な蛍光値を示している。図10G）は、CMを含まない対応する対照と比較した、生体外で刺激かつ選別されたCD8+TEMRAの馴化培地（CM）で培養した後のBM-MSCのマトリックス石灰化を示している。a-fについて、 $n = 4$ であり、gについて、 $n = 3$ である。CMでの処理

40

50

細胞 vs . 未処理対照のボンフェローニ補正による分散分析、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、# $P < 0.05$ 。破線は、未処理対照の値を示している。

【0146】

両方のサイトカインの添加により、濃度依存的にヒトBM-MSCの骨分化が阻害された(図10A及び10B)。興味深いことに、TNF- α は10-100 ng/mlの濃度でヒトBM-MSCの生存率を有意に減少させたが、IFN- γ は減少させなかった(図10C及び10D)。この観察を確認するために、アポトーシス率(図10E)を決定した。予想されたように、TNF- α は用量依存的にヒトBM-MSCにおいてカスパーゼ3/7の活性を増加させたが、IFN- γ は影響を与えなかった。

【0147】

さらにCD8+TEMRA細胞、その特異的なサイトカイン分泌及びそのマトリックス石灰化に対する悪影響の間の可能性のある関連性を調査するために、生体外で刺激かつ選別したCD8+TEMRAの馴化培地(CM)を使用した。骨分化の間、2倍濃縮骨形成培地で1:2に希釈したCM中でBM-MSCを培養した。あらかじめ、CM中のIFN- γ 及びTNF- α の濃度を決定し(ドナー1: $c_{IFN-\gamma} = 1.6 \text{ ng/ml}$ 、 $c_{TNF-\alpha} = 1.8 \text{ ng/ml}$; ドナー2: $c_{IFN-\gamma} = 2.1 \text{ ng/ml}$ 、 $c_{TNF-\alpha} = 5.1 \text{ ng/ml}$)、それらは非刺激細胞のCM(ドナー2: $c_{IFN-\gamma} = 0.4 \text{ ng/ml}$ 、 $c_{TNF-\alpha} = 0.2 \text{ ng/ml}$)と比較して明らかに増加することが見出された。

【0148】

両方のドナーの生体外刺激CD8+TEMRA細胞からのCMは完全にBM-MSC分化を阻害し、一方で、非刺激CD8+TEMRA細胞からのCMは、標準骨形成培地と比較して有意な効果を示さなかった(図10F-H)。さらに、IFN- γ 又はTNF- α のいずれかに対する中和抗体を刺激CD8+TEMRA細胞のCMへ添加することにより、わずかにマトリックス石灰化を増加させた。しかしながら、両方の抗体の組み合わせは、ほとんど完全にBM-MSCのマトリックス石灰化を逆転させた。

【0149】

要約すると、これらの結果から、IFN- γ 及びTNF- α の両方は骨形成を阻害し、それ故、潜在的に骨治癒の遅延に寄与し得ることが示された。TNF- α の阻害効果は、少なくとも部分的にアポトーシスの誘導に起因するようであり、一方で、IFN- γ は直接骨分化を妨害し得る。

【実施例11】

【0150】

CD8+枯渴はマウスモデルにおいて骨折治癒を改善する

メモリーCD8+T細胞の濃縮と不良な骨折治癒の病因との間の潜在的な因果関係を、さらにマウスモデルにおいて調査した。

【0151】

図11は、CD8+枯渴はマウスにおいて骨折治癒を改善することを示しており、A)は、CD8+T細胞枯渴動物(CD8-、 $n = 6$)、未改変免疫細胞範囲を有する動物(WT、 $n = 6$)、半滅菌条件下で飼育した動物(WTexp、 $n = 4$)及びCD8+T細胞を養子免疫伝達した動物(CD8+、 $n = 3$)の骨髓(BM)におけるCD3+TCR α/β T細胞のCD8+レベルを示しており、B)は示す群のBMにおけるCD3+T細胞のCD62L-CD8+の量を示している。C及びD)はAに記載の群についての定量的な μ CT評価の結果を示しており、E-H)は、示す群についての代表的な μ CT画像を示している。ボンフェローニ補正による分散分析* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。

【0152】

第1動物群では、CD8+細胞は抗体療法によって枯渴しており(CD8-群)、それは改善された骨治癒をもたらすことが期待された。枯渴の成功は、フローサイトメトリ(flow cytometry)により血液中で確認した。ほぼ完全なCD8+T細胞の枯渴は手術日に達成され、21日の治癒期間にわたって部分的に回復した(枯渴前 C

10

20

30

40

50

D 3 + C D 8 + 2 0 . 8 %、手術日 C D 3 + C D 8 + 0 . 0 7 %、2 1 日目 C D 3 + C D 8 + 6 . 1 %)。第 2 群は未改変免疫細胞範囲を有し (W T 群、n = 6)、かつ特定の病原体を含まないバリア状のハウジング条件 (S P F) 下で飼育かつ維持した。この群では、動物の免疫系は、病原体に対して非常に限られた接触を有していたため、低い割合の C D 6 2 L - C D 8 + メモリー T 細胞のみを有していた。第 3 群 (W T) では、マウスを 4 週間以上バリアなしの半無菌条件下で飼育した。これらの動物は大いに病原体に曝露されていたため、強化された C D 6 2 L - C D 8 + メモリー T 細胞のレベルがもたらされた。最後の群 (C D 8 +) はさらに C D 8 + T 細胞数を増加させるために、C D 8 + T 細胞の養子免疫伝達を受けた。

【 0 1 5 3 】

10

術後 2 1 日目に、骨髓中の C D 8 + T 細胞の量を決定した。予想されるように、C D 8 + T 細胞の割合は、他の全ての群と比較して、C D 8 - 群で明らかに低かった (図 1 1 a)。さらに、B M 中の C D 8 + T 細胞は、C D 8 - 群 ($1 3 \pm 6 . 6$)、W T 群 ($3 0 \pm 5 . 8$)、W T e x p 群 ($3 7 \pm 2 . 8$) から、最も高い割合が検出された C D 8 + 群 ($4 0 \pm 3 . 6$) にかけて次第に増加した。同様の結果がメモリー C D 6 2 L - C D 8 + T 細胞亜集団において見出され、それはまた他の全ての群と比較して C D 8 - 群において有意に低かった (図 1 1 b)。

【 0 1 5 4 】

それ故、骨折仮骨の質の μ C T 評価により、C D 8 - 群から C D 8 + 群にかけて、全体積に対する骨体積の比 (B V / T V) 及び骨量密度において段階的な減少が示された (図 1 1 c - h)。これらの結果は、メモリー C D 8 + T 細胞の濃縮と低い骨質との間の因果関係に対する証拠をもたらす。

20

【 実施例 1 2 】

【 0 1 5 5 】

骨折患者の手術前後の血液及び骨折血腫 (F H) における C D 8 + T 細胞集団中の C D 5 7 + 細胞

図 1 3 は、この細胞表現型は、類似する術前及び術後の値によって示されるように手術介入による影響を受けず、それ故、術前の予後マーカーとして適していることを示している。さらに、骨折治癒の遅延を予想するための計算された遡及的なカットオフ値を用いて、遅延治癒プロセスが 3 人の患者において予期できる (矢印で表示)。

30

【 0 1 5 6 】

このため、血液及び骨折血腫中の C D 8 + C D 5 7 + 細胞の頻度は、長骨骨折患者の遅延治癒プロセスに対する適した尺度である。

【 実施例 1 3 】

【 0 1 5 7 】

骨折患者の手術前後の血液及び骨折血腫 (F H) における C D 8 + T 細胞集団中の C D 2 8 - 細胞

同様の結果が C D 4 5 + 3 + 8 + 2 8 - T 細胞において見出された (図 1 4)。再度、この表現型は、上述したように、手術介入による影響を受けず、遅延治癒プロセスが同じ 3 人の患者において予期できる。

40

【 実施例 1 4 】

【 0 1 5 8 】

骨折患者の手術前後の血液及び骨折血腫 (F H) における C D 4 + T 細胞集団中の C D 5 7 + 細胞及び C D 2 8 - 細胞の頻度

C D 8 + T E M R A 細胞は骨折治癒プロセスにおいて重要な負の役割を果たしている。したがって、エフェクター / メモリー及び制御性の T 細胞 (T r e g) t は治癒プロセスを改善し、早期かつ成功した治癒結果をもたらす。図 1 5 は、これらの細胞は、手術介入による影響を受けず、かつ骨折血腫への著しい移行が見られたことを示している。

【 0 1 5 9 】

概念及び証拠

50

長骨の遅延した、さらには不完全な（偽関節治癒）治癒は、約 5 - 10 % の患者に影響を与え、かつ高い社会経済的影響と合わせて不良な長期転帰と関連する。本発明では、登録した患者の 41 % は、一次手術介入後から 18 週にわたって骨折間隙又はカルス形成及び身体機能の低下に反映されるように遅延した治癒を示した。注目すべきことに、遅延治癒患者の術後 18 週目における歩行速度は、正常治癒群における術後 6 週目のレベルに匹敵するものであった。

【0160】

最も重要なことは、治癒の遅延は、表現型 CD3 + 8 + 11a + + 28 - 57 + (CD8 + TEMRA) を発現する最終分化した CD8 + エフェクター T 細胞の有意に増大した頻度 (> 2 倍) を伴う、増幅した、かつ長期の炎症反応と強く関連していた。この差異は長期にわたって安定しており、それは骨折に対する反応よりもむしろ個人の免疫経験を反映するものであった。

【0161】

CD8 + CD57 + を発現するリンパ球は、正常なアポトーシス経路の調節異常による後期慢性（ウイルス）感染症において増大する。臨床介入は患者の治癒プロセスにおいて大きな役割を果たしていると考えられる。ここに提示される本研究では、2 群間で介入数、手術方法又は骨質において差異は見出されなかった。

【0162】

さらに、損傷によって引き起こされる重篤な軟組織欠損は、一般に脛骨骨折において知られており、かつ患者が高リスク患者であり、このリスクを本発明の方法により評価することで利益を有し得るという追加の指示をもたらす可能性がある。

【0163】

わずかな患者数と関係なく、データは、個々の免疫プロファイル（CD8 + TEMRA の頻度）が早期介入を可能とする骨折治癒の転帰を予測するための信頼できるバイオマーカーであることを実証する。

【0164】

【表 3】

患者 番号	CD3+T CのCD4 +CD8+ TC% 1週目	CD3+T CのCD4 +CD8+ TC% 2週目	CD3+T CのCD4 +CD8+ TC% 4週目	CD3+T CのCD4 +CD8+ TC% 6週目	CD3+T CのCD4 +CD8+ TC% 12週目	CD3+T CのCD4 +CD8+ TC% 18週目	CD3+T CのCD4 +CD8+ TC% 15ヶ月目
1	3, 01	2, 32	.	.	.	.	.
2	0, 87	0, 9	0, 57	0, 85	0, 69	3, 62	.
4	0, 52	0, 84	0, 93	1, 14	0, 84	1, 35	1, 22
5	0, 76	0, 53	0, 52	1, 15	1, 36	1, 11	.
7	1, 88	2, 46	3, 26	2, 4	2, 44	4, 27	.
8	0, 45	0, 84	1, 07	0, 47	0, 62	0, 64	.
9	0, 55	0, 48	0, 44	0, 37	0, 84	0, 55	.
10	0, 92	1, 33	2, 13	1, 01	1, 42	0, 86	1, 25
11	4, 11	4, 16	4, 07	4, 38	3, 83	4, 33	.
12	1, 55	1, 66	1, 84	1, 32	1, 35	1, 85	.
13	2, 72	3, 16	3, 47	2, 61	2, 97	3, 17	.
14	11, 6	13, 27	9, 47	7, 65	8, 28	10, 55	11, 67
16	0, 71	1	0, 6	0, 86	0, 83	0, 94	0, 56
17	1, 62	2, 79	2, 24	1, 84	1, 89	1, 78	.
18	28, 96	26, 12	27, 19	23, 77	18, 94	19, 56	21, 26

表 3（全て術後からの時点である、TC：T細胞）

10

20

30

40

50

【 0 1 6 5 】

【表 4】

患者 番号	CD8+ TCのC D11a +% 1週目	CD8+T CのCD1 1a+% 2週目	CD8+T CのCD1 1a+% 4週目	CD8+T CのCD1 1a+% 6週目	CD8+T CのCD1 1a+% 12週目	CD8+T CのCD1 1a+% 18週目	CD8+T CのCD1 1a+% 15ヶ月目
1	66	60	.	.	.	.	.
2	60	69	.	64	67	76	.
4	78	81	84	87	87	91	88
5	63	64	63	69	71	61	.
7	84	85	88	85	91	86	.
8	29	33	38	30	28	28	.
9	43	62	75	48	57	63	.
10	49	40	38	45	36	46	38
11	67	66	67	69	65	67	.
12	66	68	64	72	62	62	.
13	48	46	46	42	44	47	.
14	78	84	79	70	75	79	79
16	58	49	52	47	49	45	52
17	74	76	71	78	77	78	.
18	92	87	90	90	88	88	86

表 4 (全て術後からの時点である、TC : T細胞)

【 0 1 6 6 】

【表 5】

患者番 号	CD8 +TC のCD 57+ % 1週目	CD8 +TC のCD 57+ % 2週目	CD8+ TCのC D57+ % 4週目	CD8+ TCのC D57+ % 6週目	CD8+ TCのC D57+ % 12週目	CD8+ TCのC D57+ % 18週目	CD8+T CのCD5 7+% 15ヶ月目
1	56	48	.	.	.	.	.
2	52	44	.	32	40	42	.
4	20	27	38	31	35	39	29
5	30	30	29	41	30	30	.
7	24	28	33	35	32	33	.
8	7	8	6	4	5	4	.
9	12	13	18	18	17	16	.
10	5	6	6	5	6	6	2
11	23	22	21	16	16	22	.
12	39	38	38	46	32	36	.
13	36	23	20	22	23	27	.
14	52	51	48	40	44	50	43
16	39	28	32	29	32	31	29
17	36	40	36	37	36	37	.
18	74	72	73	68	59	59	45

表 5 (全て術後からの時点である、TC : T細胞)

10

20

30

40

50

【 0 1 6 7 】

【表 6】

患者番号	CD8 +TC のCD 28- % 1週目	CD8 +TC のCD 28- % 2週目	CD8+ TCのC D28- % 4週目	CD8+ TCのC D28- % 6週目	CD8+ TCのC D28- % 12週目	CD8+ TCのC D28- % 18週目	CD8+T CのCD2 8-% 15ヶ月目
1	59	49					
2	60	54		40	49	56	
4	24	34	55	41	46	49	40
5	34	34	32	34	33	35	
7	33	31	35	37	35	40	
8	10	11	12	10	9	10	
9	11	14	14	18	16	16	
10	16	16	16	12	19	14	11
11	17	20	12	12	16	17	
12	39	43	41	46	32	40	
13	29	25	20	20	26	28	
14	59	56	50	46	51	56	56
16	40	29	32	30	32	35	40
17	39	40	36	37	38	37	
18	78	75	77	71	62	63	63

表 6 (全て術後からの時点である、TC : T細胞)

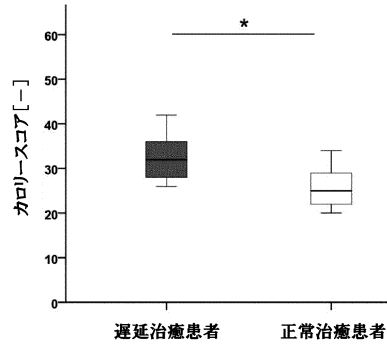
【 0 1 6 8 】

【表 7】

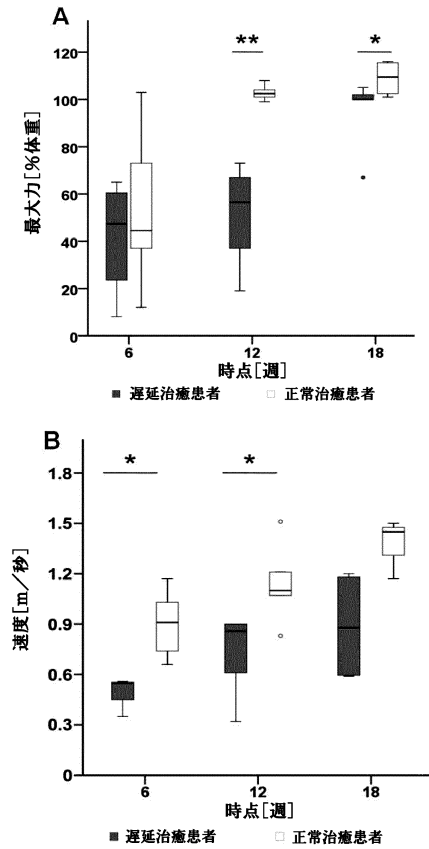
患者番号	IL- 6 p g/ml 1週目	IL- 6 p g/ml 2週目	IL-6 pg/ ml 4週目	IL-6 pg/ ml 6週目	IL-6 pg/ ml 12週目	IL-6 pg/ ml 18週目	IL-6 pg/ml 15ヶ月目
1	31, 2	7, 6					
2	4, 8	3, 9	2	2	2	3, 6	
4	5, 4	2	2	2, 2	2	2	2
5	7, 3	2	2	2	2	2	
7	6, 3	6	6	7, 6	6, 8	4	
8	9, 3	2	2	2	2	2	
9	9, 8	6, 3	2, 7	4, 4	3, 5	6, 5	
10	3, 8	3	2	2	2	2	2
11	3, 8	2	2	2	2	2	
12	27, 5	23, 2	3, 3	2	4	2	
13	2, 7	2	2	2	2	2	
14	2	2	2	2	2	2	2
16	8, 8	2, 8	4, 2	2	2	2	2
17	9, 7	7, 5	4, 5	3, 6	2, 7	2	
18	35, 7	4, 6	2, 5	3, 2	2, 7	2, 7	5, 7

表 7 (全て術後からの時点である、TC : T細胞)

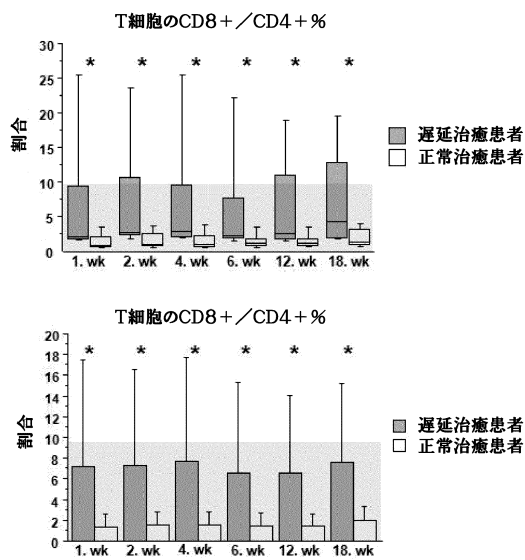
【図 1】



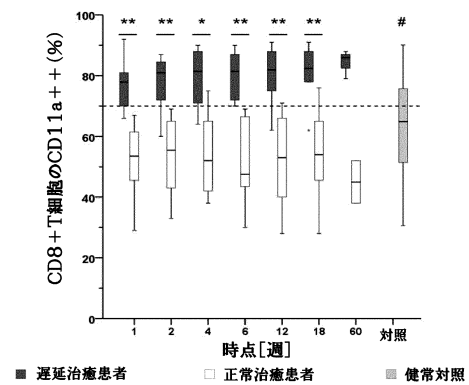
【図 2】



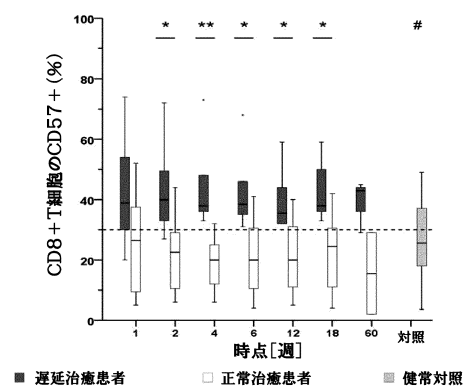
【図 3】



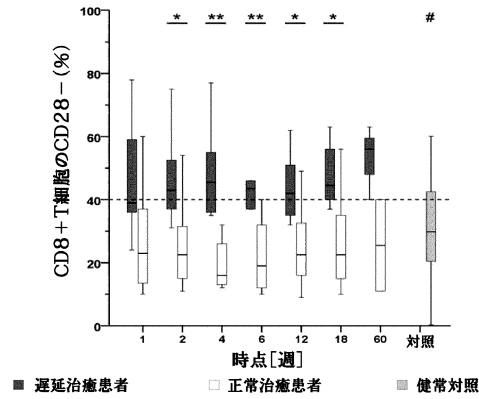
【図 4】



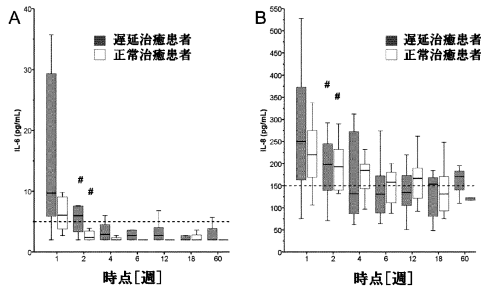
【図 5】



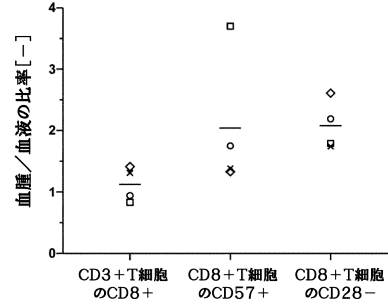
【 図 6 】



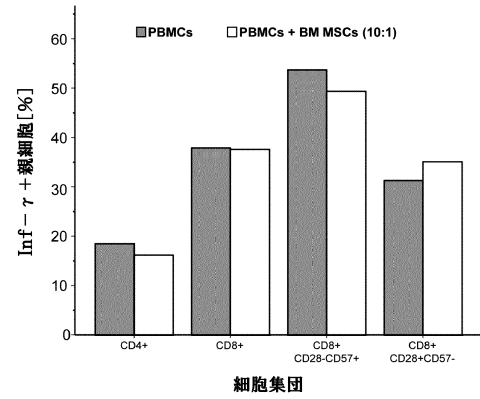
【圖 7】



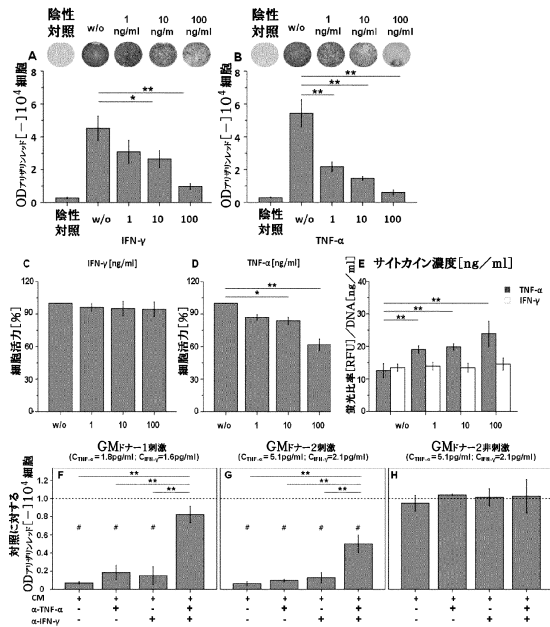
【 図 8 】



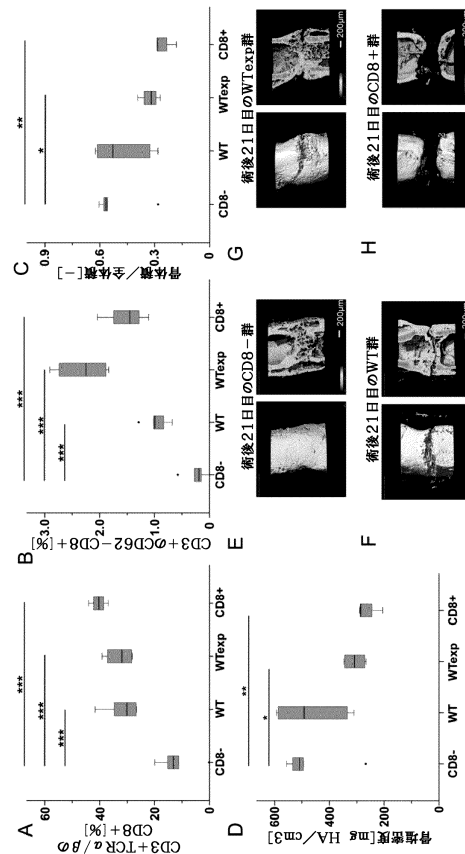
【 図 9 】



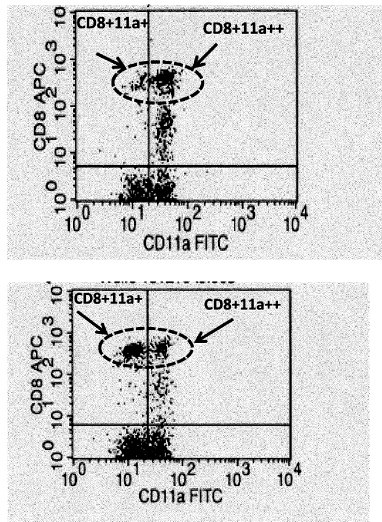
【 ㄨ 1 0 】



【 図 1 1 】

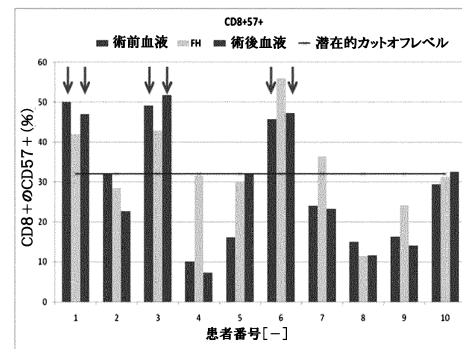


【図 1 2】



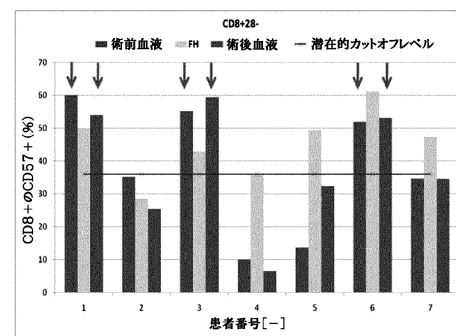
【図 1 3】

CD45+ → CD3+ → CD8+ → CD57+

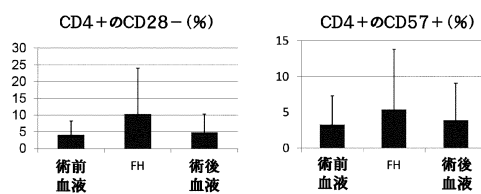


【図 1 4】

CD45+ → CD3+ → CD8+ → CD28-



【図 1 5】



フロントページの続き

- (72)発明者 ラインケ、ジモン
ドイツ、10243 ベルリン、フリードリッヒシュベルガー シュトラーセ 9
- (72)発明者 マイゼル、クリスティアン
ドイツ、12683 ベルリン、ピースドルファー ヴェク 3
- (72)発明者 クレーバー、クリスティアン
ドイツ、10439 ベルリン、パウル - ロベソン - シュトラーセ 16
- (72)発明者 ガイスラー、スヴェン
ドイツ、10551 ベルリン、シュトロームシュトラーセ 49
- (72)発明者 シュミット - ブリーク、カタリナ
ドイツ、12165 ベルリン、グラーネヴァルトシュトラーセ 5

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 特開平11-183481(JP,A)
特表2013-511708(JP,A)
特表2005-517154(JP,A)
特表2006-508973(JP,A)
国際公開第2006/100033(WO,A1)
特表2005-517174(JP,A)
特表2006-509770(JP,A)
SCHMIDT-BLEEK KATHARINA, CELL AND TISSUE RESEARCH, 2012年 3月, V347 N3, P567-573
ANDREWS ROBERT G, EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, 米国, ELSEVIER INC, 2000年, V28 N5, P508-518

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48-33/98
C12Q 1/02