

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-511708

(P2013-511708A)

(43) 公表日 平成25年4月4日(2013.4.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2GO45
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	4BO24
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	4BO63
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 K	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-539468 (P2012-539468)
 (86) (22) 出願日 平成22年11月23日 (2010.11.23)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年7月19日 (2012.7.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2010/055380
 (87) 国際公開番号 W02011/061726
 (87) 国際公開日 平成23年5月26日 (2011.5.26)
 (31) 優先権主張番号 0905624
 (32) 優先日 平成21年11月23日 (2009.11.23)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(71) 出願人 500539103
 コミッサリア ア レネルジ アトミック
 エ オー エネルジ アルターネイティ
 ブス
 COMMISSARIAT A L' EN
 ERGIE ATOMIQUE ET A
 UX ENERGIES ALTERNA
 TIVES
 フランス、75015 パリ、リュ レブ
 ラン バティメント <レ ポナント デ
 イー>、25
 25, rue Leblanc Bati
 ment (Le Ponant D),
 75015 PARIS, France

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨発生マーカーとしてのHLA-Gのアイソフォームの使用

(57) 【要約】

本発明は、哺乳動物における骨発生を評価するためのマーカーとしての、少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程：

a) 骨折と診断された対象からの生物学的液体の検体における少なくとも 1 種の HLA-G のアイソフォームの濃度を測定する工程と、

b) 工程 a) で測定した HLA-G のアイソフォームの濃度を、健常対象の生物学的液体における該アイソフォームの基準濃度と比較する工程と

を含むことを特徴とし、

前記対象からの前記生物学的液体の検体において、前記基準濃度よりも高い、少なくとも 1 種の HLA-G のアイソフォームの濃度が、前記対象の骨再形成を示す、

骨折と診断された対象の骨再形成のインピトロでのモニタリング方法。

10

【請求項 2】

前記対象がヒトであることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記生物学的液体の検体が血液検体であり、且つ、少なくとも 1 種の HLA-G のアイソフォームの血漿濃度または血清濃度を測定することを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

少なくとも 1 種の HLA-G のアイソフォームの血漿濃度または血清濃度を、適切な免疫学的方法により測定することを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

HLA-G1 および HLA-G5 の濃度、または HLA-G5 および HLA-G6 の濃度を測定することを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記対象がヒトであり、且つ、前記対象からの血液検体を用いて適切な免疫学的方法により測定された、20 ng/ml よりも大きい HLA-G1 および HLA-G5 アイソフォームの血漿濃度が、前記対象の骨再形成を示すことを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記対象がヒトであり、且つ、前記対象からの血液検体を用いて適切な免疫学的方法により測定された、10 ng/ml よりも大きい HLA-G5 および HLA-G6 アイソフォームの血漿濃度が、前記対象の骨再形成を示すことを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記対象がヒトであり、且つ、前記対象からの血液検体を用いて適切な免疫学的方法により測定された、25 ng/ml よりも大きい HLA-G1 および HLA-G5 アイソフォームの血清濃度が、前記対象の骨再形成を示すことを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

時刻 t0 および時刻 t1 にて得た対象からの生物学的検体を用いて、前記生物学的検体における少なくとも 1 種の HLA-G のアイソフォームの濃度を測定するか、または発現を定量的に測定する工程を含むことを特徴とし、

- 時刻 t0 および t1 の間における少なくとも 1 種の HLA-G のアイソフォームの濃度または発現レベルの増加が、前記対象における骨腫瘍の進行を示し、

- 時刻 t0 および t1 の間における少なくとも 1 種の HLA-G のアイソフォームの濃度または発現レベルの減少が、前記対象における骨腫瘍の寛解を示す、

対象の骨腫瘍の変化のインピトロでのモニタリング方法。

40

【請求項 10】

前記対象がヒトであることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

少なくとも 1 種の HLA-G のアイソフォームの血漿濃度または血清濃度を、前記対象からの血液検体を用いて測定することを特徴とする請求項 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 12】

50

骨芽細胞による少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの発現を、骨芽細胞を含む生物学的検体を用いて定量的に測定することを特徴とし、該生物学的検体が前記腫瘍の骨生検により得られたものである請求項9または10に記載の方法。

【請求項13】

前記生物学的検体における前記少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの濃度または発現を、適切な免疫学的方法により測定することを特徴とする請求項9～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

骨芽細胞による少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの発現を、少なくとも1種のHLA-GのアイソフォームをコードするmRNAを測定することによって定量的に測定することを特徴とする請求項12に記載の方法。

10

【請求項15】

前記骨腫瘍が、骨肉腫、骨芽細胞腫、ユーイング肉腫および巨細胞腫から選択されることを特徴とする請求項9～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

HLA-G1およびHLA-G5の濃度もしくは発現、またはHLA-G5およびHLA-G6の濃度もしくは発現を測定することを特徴とする請求項9～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

以下の工程：

a) 骨芽細胞による少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの発現を定量的に測定する工程、

20

b) 前記骨芽細胞を被験剤と接触させる工程、および

c) 前記骨芽細胞による前記少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの発現を定量的に測定する工程

を含むことを特徴とし、

工程a)およびc)との間における前記骨芽細胞による少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの発現レベルの差違が、前記剤が骨発生を調節することを示す、骨発生の調節剤のインビトロでのスクリーニング方法。

【請求項18】

HLA-G1およびHLA-G5の発現、またはHLA-G5およびHLA-G6の発現を測定することを特徴とする請求項17に記載の方法。

30

【請求項19】

対象から単離され、前記対象における骨発生マーカーとして使用するためのHLA-GのアイソフォームまたはHLA-Gのアイソフォームをコードする核酸分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な骨発生（osteogenesis）マーカー、および、哺乳動物の骨発生の評価方法におけるその使用に関する。

【背景技術】

40

【0002】

骨発生は、骨組織が形成し発達することによるプロセスである。骨は以下のものから形成されている：

- 骨細胞外マトリックス（約22%～25%）。これは実質的にI型コラーゲンと、さらにオステオネクチンおよびオステオカルシンなどのその他のタンパク質から構成されている有機マトリックスである、
- カルシウムに非常に富むミネラルマトリックス（約70%）、
- 2種類の骨の細胞：骨芽細胞性細胞（骨芽細胞、骨細胞およびライニング細胞。これらは間葉系幹細胞に由来する）および破骨細胞（造血幹細胞に由来する細胞）、ならびに
- 水（5%～8%）。

50

【 0 0 0 3 】

骨芽細胞は立方形状または円柱形状の単核の類上皮細胞であり、増殖している骨組織に存在する。それらは、特徴として、I型コラーゲン、アルカリフォスファターゼ（ALPまたはALPL）、上皮小体ホルモン受容体1（PTHr1）、オステオネクチン（SPARC）、オステオカルシン、オステリック転写因子（OSX）および α -アクチン（ASMA）を発現している（Cohen, 2006）。

【 0 0 0 4 】

骨細胞は分化した骨芽細胞であり、高度に分岐しており分裂することができる。これらは骨細胞外マトリックスを維持している。

ライニング細胞は、扁平で細長い形状を有する休止細胞であり、骨形成（bone formation）も骨吸収もなされていない不活性な区画における骨の表面に存在している。該細胞が刺激されると、それらは骨芽細胞に分化することができる。

破骨細胞は直径20~100 μ mの多核細胞である。これらは骨吸収を担っている。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 5 】

骨発生マーカーを有することは、骨格変性（例えば骨粗鬆症）に罹患している個体における骨折のリスクを評価することと、骨折後の骨格の再形成をモニタリングすること、および骨腫瘍の進行をモニタリングすることの両方にとって重要である。このリスク評価とこのモニタリングは、それらが早期であれば、有効な治療を計画するのに極めて重要である。

【 0 0 0 6 】

一例として、脛骨骨折している成人の10~30%は、例えば、骨折後に生じた二つの骨断片の連結の欠損のような偽関節を呈する。フランスでは、これは、年間およそ3000症例が現れている。偽関節の治療（自家移植、骨髄の注射、増殖因子の注射など）は非常に大変で高価であり、そして患者の自立を急速に取り戻すことはない。フランスでは、脛骨の不完全な連結にかかる年間コストは、300万ユーロから3000万ユーロの間と見積もることができる。それゆえ、偽関節の早期発見は、この状態にある患者をより効果的に治療することを可能にする。

【 0 0 0 7 】

現在は、上市されている骨形成（骨発生）のマーカーはわずかである。これらのマーカーは、本質的には、骨アルカリフォスファターゼ、オステオカルシンおよびプロコラーゲン拡張ペプチドである（Srivastava, 2005およびVesper, 2005）：

- アルカリフォスファターゼ（ALPまたはALPL）は偏在酵素である。ヒトでは、6種のアイソエンザイム：肝臓、腸、骨、腎臓、胎盤および腫瘍のアイソエンザイムに分類することができる。正常な肝機能を有する成人では、ALPの血清活性のおよそ60~70%は肝臓に由来し、30~40%は骨に由来し、5%未満は腸に由来する。骨ALPの血中レベル（circulating level）は、骨芽細胞の活性のみならず、その肝臓での除去にも依存している；したがって、肝臓の状態により、血中の骨ALPのレベルが変化する；

【 0 0 0 8 】

- オステオカルシン（OC）は、骨芽細胞により分泌される5.7 kDaのタンパク質である。血流中では、オステオカルシンは急速に分解されて除去される（血中のオステオカルシンの1/3は全タンパク質として存在し、2/3は様々な大きさのフラグメントとして存在している）。これにより、骨形成マーカーとしてのその臨床的応用が制限されている；

【 0 0 0 9 】

- I型コラーゲンは骨芽細胞によりプロコラーゲンの形態で合成される。この前駆体は、N末端およびC末端に2つのペプチド、PINP（N末端伸長ペプチド）およびPICP（C末端伸長ペプチド）をそれぞれ含み、これらは、プロコラーゲンの集まりから三重らせんへの間にプロテアーゼにより切断されて血流に放出される。それゆえ、血清中のこれらのペプチドの分析は、I型コラーゲンの形成を評価することを可能にする。しかしながら、この分

10

20

30

40

50

析は、骨中のI型コラーゲンの合成だけではなく、他の組織のものも反映する。

【0010】

このように、現在用いられている骨発生マーカーはまったく満足できるものではない。このことにより、新たな骨発生マーカーを同定する必要が生じる。

【0011】

主要組織適合遺伝子複合体(MHC)抗原は、いくつかのクラスに分類されている：3つの球状領域(1、2および3)を有し、該3領域は2-ミクログロブリンと会合するクラスI抗原(HLA-A、HLA-BおよびHLA-C)、クラスII抗原(HLA-DP、HLA-DQおよびHLA-DR)およびクラスIII抗原(補体)である。クラスI抗原は、上記の抗原に加えて、非通常(unconventional)クラスI抗原(クラスIb)と称される他の抗原、特にHLA-E、HLA-FおよびHLA-G抗原を含む。

10

【0012】

HLA-G遺伝子(HLA-6.0遺伝子)のヌクレオチド配列は、Geraghtyら(1987)により記述されている：これは4396塩基対を含み、HLA-A、-Bおよび-C遺伝子のもものと相同なイントロン/エキソン構成を有している。この遺伝子は、8つのエキソン、7つのイントロンおよび非翻訳3'末端を含んでいる。HLA-G遺伝子は、インフレーム翻訳ストップコドンがエキソン6の第2コドンに位置する点で他のMHCクラスI遺伝子と異なっている。したがって、このHLA-6.0遺伝子によりコードされているタンパク質の細胞質領域は、HLA-A、-Bおよび-Cタンパク質の細胞質領域のそれよりも短い。

【0013】

IshitaniおよびGeraghty(1992)は、HLA-G遺伝子の一次転写産物がいくつかの方法でスプライシングされて、少なくとも3つの別個の成熟mRNAが産生されることを示した：HLA-Gの一次転写産物は、1200 bpの全長コピー(G1)、900 bpの断片(G2)および600 bpの断片(G3)を与える。G1転写産物はエキソン7を含まず、Ellisら(1990)により記述された配列に相当する。すなわち、これは、シグナル配列、3つの細胞外球状領域(1、2および3)、膜貫通領域および細胞質内領域を含むタンパク質をコードしている。G2 mRNAはエキソン3(2領域をコードしている)を含まず、1および3領域が直接連結されているアイソフォームをコードしている。G3 mRNAはエキソン3もエキソン4(3領域をコードしている)も含まず、それゆえ、この転写産物は、1領域および膜貫通領域が直接連結されているアイソフォームをコードしている。HLA-G2を得るために優勢であるスプライシングにより、アデニン(A)(1コーディングドメインに由来する)がアデニン-シトシン(AC)配列(3コーディングドメインに由来する)と連結されて、AAC(アスパラギン)コドンが、HLA-G1の3領域をコードする配列の5'位に存在するGAC(アスパラギン酸)コドンの位置に創出される。HLA-G3を得るために生じるスプライシングでは、スプライシング領域における新たなコドンの形成に至ることはない。

20

30

【0014】

本発明者らの幾人かは、HLA-G mRNAの他のスプライシングされた形態の存在を示した：HLA-G4転写産物。これはエキソン4を含まない；HLA-G5転写産物。これはエキソン4と5との間にイントロン4を含み、これによりこの転写産物の翻訳の間にリーディングフレームの変化が生じ、特にイントロン4のアミノ酸21の後にストップコドンが出現する；HLA-G6転写産物。これはイントロン4を含むが、エキソン3を消失している；HLA-G7転写産物。これはイントロン2を含み、これによりこの転写産物の翻訳の間にリーディングフレームの変化が生じ、イントロン2のアミノ酸2の後にストップコドンが出現する(Kirszenbaumら、1994および1995；Moreauら、1995；欧州出願EP 0 677 582)。

40

【0015】

それゆえ、HLA-Gの7種のアイソフォームをコードする少なくとも7種の異なるHLA-G mRNAが存在する。該アイソフォームのうち4種は膜アイソフォーム(HLA-G1、-G2、-G3および-G4)であり、3種は膜貫通領域を含まない可溶性アイソフォーム(HLA-G5、-G6および-G7)である(検討のためにCarosellaら、2008aを参照されたい)。

【0016】

50

HLA-G遺伝子 (HLA-6.0遺伝子) のヌクレオチド配列およびそのエキソン/イントロン構成、並びにHLA-Gの種々のアイソフォームのアミノ酸配列は、当業者に公知である。それらは特に上記のGeraghtyら (1987) およびCarosellaら (2008a) により記述されている。

【0017】

HLA-Gタンパク質発現は、通常、(母体-胎児間の境界での)トロホプラスト、胸腺、角膜、内皮前駆体および赤芽球前駆体、並びに間葉系幹細胞に限定されている (Carosellaら、2008a)。しかしながら、HLA-G mRNAは、実質的には全ての体の細胞において、増幅できる基底レベルにて検出されており、タンパク質への翻訳は、DNA脱メチル化剤、インターフェロン(IFN)のようなサイトカイン、ストレス因子または低酸素の影響の下に誘導される (Carosellaら、2008b)。よって、組織の移植、所定の腫瘍の進行または炎症反応のような特定の条件下で、HLA-Gタンパク質が、通常の条件下ではそれを発現しない組織において発現されうる。

10

【0018】

血液中では、可溶性アイソフォームと膜アイソフォームの両方が膜から分離して、例えば、HLA-G1 (「HLA-G1放出」というHLA-G1sとしても知られている) が見出される。

【0019】

HLA-Gのいくつかの生物学的特性：NK細胞性およびCTL性細胞溶解の阻害、アロ増殖性T応答の阻害、CD8⁺ NK細胞およびT細胞でのアポトーシスの誘導、並びに免疫系のB細胞に対する抗増殖作用が同定された (Carosellaら、2008aおよび2008b)。

近年、本発明者らの幾人かは、培養中の間葉系幹細胞 (MSC) がHLA-G5を分泌し、それにより、TおよびNK (ナチュラルキラー) 免疫反応について免疫抑制活性を発揮することを示した (Selmaniら、2008)。

20

成人骨髄に由来する間葉系幹細胞は、骨芽細胞の前駆体、軟骨芽細胞の前駆体および脂肪細胞の前駆体である多能性細胞である (Friedensteinら、1976; Pittengerら、1999)。

【課題を解決するための手段】

【0020】

これらの研究の関係において、本発明者らは、MSCからの培養物において得られた骨芽細胞、軟骨芽細胞および脂肪細胞が、またMSC自体も、HLA-Gを発現しているかどうかを調査した。驚くべきことに、本発明者らは、骨芽細胞のみが可溶性HLA-Gフォームを発現していることをELISA法により示した。彼らはまた、骨芽細胞がHLA-G1、-G2、-G3、-G4および-G5のmRNAを発現していることをRT-PCR技術により示した。また、本発明者らは、骨形成 (骨発生) の間のみ、正常または病態 (特に腫瘍) にある骨芽細胞によりHLA-Gが発現されていることをヒトにおいてインビボで観察した。

30

【0021】

よって、骨形成の間における骨芽細胞によるHLA-G発現を示すこれらの結果に基づいて、個体における骨発生の評価は、骨折後の骨再形成の間であろうと、あるいは骨腫瘍の進行のモニタリングの関連であろうと、骨芽細胞による少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの発現を分析するかまたは測定することによって、実施されうる：少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの濃度または発現の増加は骨発生を示す。

40

【0022】

したがって、本発明の主題は、以下の工程：

a) 骨折と診断された対象からの生物学的液体の検体における少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの濃度を測定する工程と、

b) 工程a) で測定したHLA-Gのアイソフォームの濃度を、健常対象の生物学的液体における該HLA-Gのアイソフォームの基準濃度と比較する工程と

を含み、上記対象からの上記生物学的液体の検体において、該基準濃度よりも高い、少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの濃度が、上記対象の骨再形成 (骨発生) を示す、骨折と診断された対象の骨再形成のインビトロでのモニタリング方法である。

【発明を実施するための形態】

50

【0023】

用語「骨折」とは、ひと続きの骨における破断を意味することを意図している。これは特に骨の亀裂（骨のずれを伴わない骨折）または粉碎骨折（いくつかの骨断片を含む；複細片骨折(multisplintered fracture)）であってもよい。骨折は、例えば放射線撮影、シンチグラフィまたは断層濃度測定（tomodensitometry）により診断することができる。

【0024】

本発明の目的のために、用語「対象」とは、哺乳動物を意味することを意図しており、好ましくはヒトである。

本発明の目的のために、用語「健常対象」とは、骨の損傷のない、すなわち骨折していない対象を意味することを意図している。

本発明の目的のために、用語「生物学的液体」とは、血液およびその派生物（例えば血漿および血清）、並びに滑液も意味することを意図しており、好ましくは血液である。

【0025】

本発明の目的のために、用語「HLA-Gのアイソフォーム」とは、HLA-Gの膜アイソフォーム（HLA-G1、-G2、-G3および-G4）および可溶性アイソフォーム（HLA-G5、-G6および-G7）から選択されるHLA-Gのアイソフォームを意味することを意図している。

当然に、生物学的液体におけるHLA-Gの膜アイソフォームの濃度を測定する場合、これは、このアイソフォームが（例えばタンパク質分解により）細胞膜から分離し、且つ上記の生物学的液体に含まれていることを意味する。

【0026】

上記の骨再形成のモニタリング方法の好ましい実施形態によれば、HLA-G1、HLA-G5、HLA-G6およびHLA-G7から選択される少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの濃度を測定する。

上記の骨再形成のモニタリング方法の別の好ましい実施形態によれば、2種の異なるHLA-Gのアイソフォーム、好ましくはHLA-G1およびHLA-G5、またはHLA-G5およびHLA-G6の濃度を測定する。

【0027】

上記の骨再形成のモニタリング方法の別の好ましい実施形態によれば、上記で定義された少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォーム、好ましくはHLA-G1、HLA-G5、HLA-G6およびHLA-G7から選択されるか、または、より好ましくは2種の異なるHLA-Gのアイソフォーム、例えばHLA-G1およびHLA-G5、並びにHLA-G5およびHLA-G6の血漿濃度または血清濃度を、血液検体を用いて測定する。

血液検体を用いるHLA-Gのアイソフォームの血漿濃度の測定は当業者に公知である。これは、該HLA-Gのアイソフォームに特異的な少なくとも1種の抗体を用いた適切な免疫学的方法（例えばELISA、RIA、免疫蛍光法、免疫組織化学法）を実施することにより行うことができる。

【0028】

本発明の目的のために、用語「抗体」とは、ヒトまたは非ヒトのポリクローナルまたはモノクローナル抗体、例えばマウスのヒト化キメラのもの、組換え型または合成のもの、あるいは、元の抗体の標的抗原を認識するその元の抗体のドメインを含む抗体フラグメント（例えば、Fab'2またはFabフラグメント）を意味することを意図している。

【0029】

1種以上のHLA-Gのアイソフォームに特異的なモノクローナルまたはポリクローナル抗体の多くは当業者に公知である。市販の抗ヒトHLA-Gモノクローナル抗体の一例として、4H84クローン（McMasterら、1998）から得られた抗HLA-G抗体（全てのHLA-Gのアイソフォームを認識する）、MEM-G/4クローン（MEM-G/04とも呼ばれる；Menierら、2003）から得られた抗HLA-G1、-G2、-G5およびG6抗体（すなわち、アイソフォームHLA-G1、-G2、-G5およびG6を認識する）、MEM-G/9クローン（MEM-G/09とも呼ばれる；Menierら、2003）または87Gクローン（Rebmannら、1999；Hackmonら、2004）から得られた抗HLA-G1および抗HLA-G5抗体（すなわち、アイソフォームHLA-G1および-G5を認識する）、5A6G7クローン（Le Ron

10

20

30

40

50

dら、2004) から得られた抗HLA-G5および抗HLA-G6抗体(すなわち、アイソフォームHLA-G5および-G6を認識する)を挙げることができる。

【0030】

上記で定義された生物学的液体におけるHLA-Gのアイソフォームの基準濃度は、所定のHLA-Gのアイソフォームのみならず、濃度測定に用いた方法にも依存する。

【0031】

MEM-G/9クローンから得られたモノクローナル抗体を用いたELISAにより測定された、骨折していない個体である健常個体におけるアイソフォームHLA-G1(HLA-G1s)およびHLA-G5の基準血漿濃度は、20 ng/ml未満である(Ugurelら、2001; Le Rondら、2006; Najiraら、2007)。

10

したがって、この実施形態における特定の規定によれば、骨折であると診断された上記のヒト対象からの血液検体を用いて、抗HLA-G1および抗HLA-G5の両方である抗体(例えば、MEM-G/9クローンから得られたモノクローナル抗体)を用いた適切な免疫学的方法により、好ましくはELISAにより測定された20 ng/mlより大きい、好ましくは50 ng/mlより大きい、より好ましくは100 ng/mlより大きいアイソフォームHLA-G1(HLA-G1s)およびHLA-G5の血漿濃度は、該対象の骨再形成を示す。

【0032】

5A6G7クローンから得られたモノクローナル抗体を用いたELISAにより測定された、上記の健常個体におけるアイソフォームHLA-G5およびHLA-G6の基準血漿濃度は、10 ng/ml未満である(Le Rondら、2006; Najiraら、2007)。

20

したがって、この実施形態における別の特定の規定によれば、骨折であると診断された上記のヒト対象からの血液検体を用いて、抗HLA-G5および抗HLA-G6の両方である抗体(例えば、5A6G7クローンから得られたモノクローナル抗体)を用いた適切な免疫学的方法により、好ましくはELISAにより測定された10 ng/mlより大きい、好ましくは50 ng/mlより大きい、より好ましくは100 ng/mlより大きいアイソフォームHLA-G5およびHLA-G6の血漿濃度は、該対象の骨再形成を示す。

【0033】

MEM-G/9クローンから得られたモノクローナル抗体を用いたELISAにより測定された、上記の健常個体におけるアイソフォームHLA-G1(HLA-G1s)およびHLA-G5の基準血清濃度は、約20 ng/mlである(Rouas-Freissら、2005)。

30

したがって、この実施形態における別の特定の規定によれば、骨折であると診断された上記のヒト対象からの血液検体を用いて、抗HLA-G1および抗HLA-G5の両方である抗体(例えば、MEM-G/9クローンから得られたモノクローナル抗体)を用いた適切な免疫学的方法により、好ましくはELISAにより測定された25 ng/mlより大きい、好ましくは50 ng/mlより大きい、より好ましくは100 ng/mlより大きいアイソフォームHLA-G1(HLA-G1s)およびHLA-G5の血漿濃度は、該対象の骨再形成を示す。

【0034】

本発明は、時刻t0および時刻t1にて得た(骨折と診断された)対象からの生物学的検体を用いる、該対象の骨腫瘍の変化(進行または寛解)のインピトロでのモニタリング方法にも関連し、この方法は、上記の生物学的検体における少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの濃度を測定するか、または発現を定量的に測定する工程を含み、

40

- 時刻t0およびt1の間における少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの濃度または発現レベルの増加が、上記の対象における骨腫瘍の進行を示し、

- 時刻t0およびt1の間における少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの濃度または発現レベルの減少が、上記の対象における骨腫瘍の寛解(または軽減)を示す。

【0035】

本発明の目的のために、用語「生物学的検体」とは、上記で定義された生物学的液体の検体、または、腫瘍の骨生検により得られた、骨芽細胞を含む生物学的検体を意味することを意図している。

生検材料は、例えば脊椎、骨盤、大腿骨、脛骨、上腕骨、肩甲骨、頭蓋骨などの骨格の

50

いずれの部位から得られた検体であってもよい。

骨腫瘍は、骨肉腫、骨芽細胞腫、ユーイング肉腫および巨細胞腫からなる群より選択される。

【0036】

このインビトロでの骨腫瘍の評価方法の好ましい実施形態によれば、上記で定義された少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの血漿濃度または血清濃度を、例えば、上記のヒト対象からの血液検体を用いて、上記で定義された適切な免疫学的方法により測定する。

この実施形態の有利な規定によれば、2種の異なるHLA-Gのアイソフォーム、好ましくはHLA-G1およびHLA-G5、またはHLA-G5およびHLA-G6の濃度を測定する。

10

【0037】

このインビトロでの骨腫瘍の評価方法の別の好ましい実施形態によれば、上記で定義された少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの骨芽細胞による発現を、骨芽細胞を含む生物学的検体であって上記の腫瘍の骨生検により得られた該検体を用いて定量的に測定する。

この実施形態の有利な規定によれば、骨芽細胞による少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの発現を、上記で定義された免疫学的方法、好ましくは、上記で定義された該HLA-Gのアイソフォームに特異的な少なくとも1種の抗体を用いた適切な免疫組織化学的方法によりインビトロで測定する。

20

【0038】

この実施形態の別の有利な規定によれば、骨芽細胞による少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの発現を、少なくとも1種のHLA-GのアイソフォームをコードするmRNAを測定することによって、インビトロで測定する。mRNAの検出は、該mRNAに特異的な（例えばバイオチップに設置されている）ヌクレオチドプローブを用いたハイブリダイゼーションにより、または該mRNAに特異的なヌクレオチドプライマーを用いた増幅により（例えばRT-PCRにより）実施することができる。HLA-G mRNAの増幅に適するプライマーの一例としては、配列番号15および16のヌクレオチド配列からなるプライマー対、およびLe Disco rdeら、2005により記載されたものが挙げられる。

【0039】

本発明の主題は、骨発生を調節する（増強させるか、または減弱させる）剤のインビトロでのスクリーニング方法でもあり、この方法は、以下の工程：

30

a) 骨芽細胞による少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの発現を定量的に測定する工程、

b) 該骨芽細胞を被験剤と接触させる工程、および

c) 該骨芽細胞による上記少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの発現を定量的に測定する工程

を含み、工程a)およびc)との間における該骨芽細胞による少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの発現レベルの差違が、上記の剤が骨発生を調節することを示す。

【0040】

上記の工程a)およびc)との間における上記の骨芽細胞による少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォーム発現レベルの増大は、上記の剤が骨発生の進行を誘導することを示す。

40

上記の工程a)およびc)との間における上記の骨芽細胞による少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォーム発現レベルの減少は、上記の剤が骨発生の進行を抑制することを示す。

【0041】

骨芽細胞による少なくとも1種のHLA-Gのアイソフォームの発現の定量的測定は、上述した方法、すなわち免疫学的方法またはHLA-GのアイソフォームをコードするmRNAの測定により実施することができる。

【0042】

上記のスクリーニング方法の好ましい実施形態によれば、骨芽細胞はヒト起源のものである。

50

上記のスクリーニング方法の別の好ましい実施形態によれば、HLA-G1およびHLA-G5の発現、またはHLA-G5およびHLA-G6の発現を測定する。

【0043】

本発明の主題は、対象から、好ましくはヒトから単離され、該対象における骨発生のためのマーカー、好ましくは血液マーカーとして使用するためのHLA-GのアイソフォームまたはHLA-Gのアイソフォームをコードする核酸分子（例えばmRNA）でもある。

本発明の好ましい実施形態によれば、上記のHLA-Gのアイソフォームは、HLA-G1、HLA-G5およびHLA-G6から選択される。

【0044】

上記の規定に加えて、本発明は、本発明の主題である方法の実施例および添付の図面を参照する以下の記載から明らかとなる他の規定も含む。添付の図面では：

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】図1は、新生児の骨増殖区画（A）および成人の骨折後の仮骨（B）の骨芽細胞によるHLA-Gの発現を示す。過剰指の薄切片、ならびに初期および後期の仮骨の薄切片を、抗HLA-G5および抗HLA-G6抗体（クローン5A6G7）と、次いでペルオキシダーゼ結合抗マウス二次抗体とインキュベートした。そして、スライドを光学顕微鏡で観察した。骨増殖区画においては、骨芽細胞は骨梁に沿って位置しており、骨膜が抗HLA-G5/-G6抗体で標識された（黒矢印を参照されたい）。骨の仮骨では、新たに形成された骨梁において凝集した骨芽細胞も抗HLA-G5/-G6抗体で標識された。（C）：非病態の成人骨髄では、HLA-G+細胞は観察されなかった。

【図2】図2は、骨腫瘍におけるHLA-Gの検出を示す。骨肉腫（A）、骨芽細胞腫（B）、ユーイング肉腫および巨細胞腫（C）を原因とする骨腫瘍の生検材料の薄切片を、抗HLA-G5/-G6抗体（クローン5A6G7）とインキュベートした。骨肉腫および骨芽細胞腫の腫瘍骨芽細胞は標識されたが（AおよびB）、一方で、ユーイング肉腫または巨細胞腫の腫瘍微環境の正常骨芽細胞のみがHLA-G5/-G6発現陽性であった（C）。

【図3】図3は、インサイチュ免疫蛍光法によるSaOs2株におけるHLA-Gの検出を示す。SaOs2骨肉腫株の細胞を、ウェルを有する培養チャンバ内で培養し、そして固定して、FITCと結合した抗HLA-G1および抗HLA-G5抗体（クローン87G）とインキュベートした。細胞核をDAPIで標識した。倍率はX400。

【図4】図4は、MSCから得られた骨芽細胞によるHLA-G mRNAの発現を示す。骨芽細胞を溶解して、mRNAを回収した。逆転写の後、cDNAをPCRにより増幅した。（A）：骨芽細胞に特徴的な転写産物（BSP、ALP、PTHr1、SPARC、オステリックスおよびASMA mRNA）を、骨発培地中で培養した細胞について探索した。GAPDH（グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ；構成遺伝子）mRNAを対照として用いた。（B）：MSC（MSC1、MSC2、MSC3）から得られた3種の異なる骨芽細胞培養物における種々のフォームのHLA-G（G1、G2、G3、G4およびG5）の発現を調べた。

【図5】図5は、インサイチュ免疫蛍光法を介した、MSCから得られた骨芽細胞によるHLA-Gの発現を示す。MSCを、ウェルを有する培養チャンバ内で培養し、コンフルエントにおいて、骨芽細胞に分化するように誘導した。用いた誘導剤はBMP-2、BMP-4およびBMP-7である。非誘導培地（拡張用培地）中で培養したMSCを陰性対照（WOBMP）として用いた。培養の10日後、骨芽細胞を固定し透過処理をして、抗コラーゲン1（C01）抗体、抗オステオポンチン（OPN）抗体、抗オステオカルシン（OSC）抗体および抗HLA-G1/-G5抗体（クローン87G）とインキュベートした。反応培地にDAPIを添加することで細胞核を標識した。そして、エピ蛍光顕微鏡で蛍光を検出した。ウェル内に存在する細胞の数に相関する探索分子の発現レベルを考慮するべく、抗体の存在により放出される蛍光を、DAPIにより放射される蛍光と対応させた（「観察蛍光の相対値」）。

【図6】図6は、骨発生の間における、フローサイトメータによるHLA-Gの発現を示す。MSCを骨発培地で培養し、フローサイトメータにより、培養の2週目（A）および4週目（B）でのHLA-G5/-G6およびアルカリフォスファターゼ（ALP）の二変数の発現をモニター

10

20

30

40

50

した。HLA-G+細胞の数は66% (第2週) から10% (第4週) に減少した。この図は4回の独立実験の代表物であり、与えられた値は全ての実験で観察された平均値である。

【図7】図7は、MCSから得られた骨芽細胞の培養上清中の可溶性HLA-Gの分析を示す。MSCを、骨発生分化 (BPM4、デキサメタゾン)、軟骨発生分化 (Chondro、TGF-)、脂肪生成分化 (Adipo) および血管形成分化 (VEGF) を誘導する培地中で、または、いずれの誘導もなし (対照) で培養した。インキュベーションの4日後、上清の一部を取り、その中のHLA-G5および-G6をELISAにより分析した。結果をng/mlで報告する。

【図8】図8は、小塊培養 (micromass culture) 後の軟骨細胞におけるHLA-Gの発現の探索を示す。MSCを小塊条件下で軟骨発生培地中に培養した。培養の4週間後、小塊を回収し、固定してパラフィン包埋した。再水和した薄切片を、抗HLA-G抗体 (クローン5A6G7) または対照抗体 (アイソタイプコントロール) のいずれかとインキュベートした。洗浄後、切片をヘマトキシリン/エオシン染色し、そして光学顕微鏡で観察した。

【図9】図9は、骨肉腫 (OS) に由来するヒト骨芽細胞株CAL72、MG-63、HOSおよびU2OSによるHLA-G1およびHLA-G5の発現を示す。WB =ウェスタンブロット。

【図10】図10は、骨芽細胞に分化するように誘導されたヒト骨髄間葉系幹細胞におけるGAPDH、ALPL、SPARC、COL1 1、HLA-G1およびHLA-G5の発現に対するDLX5遺伝子またはRUNX遺伝子の阻害効果を示す。この解析はRT-PCRにより行われた。

【図11】図11は、RUNX2を過剰発現しているヒト起源の骨芽細胞株 4A5および 6A2によるHLA-G1および-G5、COL1 1ならびにALPLの発現を示す。A: qPCRによる解析。B: ウェスタンブロットによる解析; アイソフォームHLA-G1およびHLA-G5を検出し、アクチンのアイソフォームを内部陽性対照として用いた。C: フローサイトメータによる解析; HLA-G1および-G5の発現を太線のヒストグラムにより示し、陰性閾値をアイソタイプコントロールのヒストグラムにより (灰色で) 示した。

【実施例】

【0046】

実施例1: 骨芽細胞によるHLA-Gの発現の証明

1) 材料および方法

細胞および細胞培養:

成人ヒト骨髄 (BM) 検体を、整形外科手術を受けている健常ボランティアから収集した。フランス、トゥールのトルソーCHU [大学付属教育病院] の倫理委員会の提言にしたがって、これらの検体を取り扱った。10%ウシ胎仔血清 (FCS) (Perbio Hyclone社; ローガン) および1%ペニシリン/ストレプトマイシン (Invitrogen Ltd社; ペーズリー、UK) を添加したアルファ-MEM培地 (MEM) に単核細胞 (MNC) を播種した。14日目において、80%コンフルエントで、間葉系幹細胞 (MSC) を二つに分けて増殖させた。全ての実験は、少なくとも3人の異なる提供者について行った。

SaOs2骨肉腫株 (ECECC社、ソールズベリー、UK) をMSCの拡張と同じ条件下で培養した。

【0047】

骨芽細胞および軟骨芽細胞への誘導:

Pittengerら、1999に記載のプロトコールにしたがって、MSCを骨芽細胞および軟骨芽細胞へ誘導した。

簡潔には、骨発生の誘導のために、培地は、DMEM 4.5 g/lグルコース、3 mM NaH₂PO₄ (Invitrogen社)、25 mg/lアスコルビン酸 (Sigma社) および10⁻⁷ Mデキサメタゾン (Invitrogen社) からなる。この培地により、培養14日後に細胞を骨芽細胞へと分化させることができる。

【0048】

軟骨発生の誘導のために、細胞を遠心分離して小塊培養した。すなわち、細胞をペレットの状態に再懸濁せずに培養した。用いた分化培地は、DMEM 3 Mグルコース (Invitrogen社)、2 mMピルビン酸ナトリウム (Sigma社、サン・カンタン・ファラヴィエ、フランス)、0.17 mMアスコルビン酸 2リン酸塩 (Sigma社)、10⁻⁷ Mデキサメタゾン (Invitrogen

社)、0.35 mMプロリン (Sigma社) および 1 × インスリン・トランスフェリン・セレン (ITS) サプリメント (Sigma社) からなる。形質転換増殖因子ベータ 1 型 (TGF 1) (AbCys社) を、培地交換の際に 10 ng/ml の濃度で添加した。この培地により、培養 21 日後に軟骨芽細胞への分化が可能となる。

【0049】

フローサイトメトリによる解析：

膜および細胞質内の抗原の検出のために、200,000個の細胞を、蛍光色素と連結した特異的抗体で標識した。膜の標識は、暗闇において 4℃ で 30 分のインキュベーションでなされた。次いで、細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) ですすぎ、そして CellFIX (登録商標) (Becton Dickinson社、エーレムボーデゲム、ベルギー) で固定した。細胞質内の標識のために、CytoFix/CytoPermキットを用いて細胞を固定し透過処理した。次いで、488 nm の波長を射出するアルゴンレーザを搭載したフローサイトメータ (FACS Calibur (登録商標)、Becton Dickinson社) に細胞をかけた。データを CellQuest 3.1 (登録商標) ソフトウェア (Becton Dickinson社) を用いて解析した。その結果を、検出シグナルの平均蛍光強度 (RMFI) のバックグラウンドノイズのそれに対する比として示した。以下のモノクローナル抗体 (mAb) を用いた：Alexa 488 結合抗 HLA-G1/-G5 mAb (クローン 87G) (Exbio社、ベステツ、チェコ共和国)、抗 HLA-G5/-G6 mAb (クローン 5A6G7、Exbio社) およびフィコエリスリン (PE) 結合抗アルカリフォスファターゼ (ALP)。

【0050】

ELISA (酵素結合免疫吸着法) による解析：

骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞および血管への誘導後の MSC 培養物の濾過上清における可溶性 HLA-G の濃度を測定した。M8-HLA-G5 株の細胞の培養上清を陽性対照として用いた (Le Rondら、2006)。用いた ELISA 法は、吸着抗体として抗 HLA-G5/-G6 抗体 (クローン 5A6G7、Exbio社) および HLA クラス I a 分子の検出用抗体としての全 HLA クラス I W6/32 (Bettsら、2003) (Rebmannら、2005) の使用を含む。

【0051】

インサイチュ免疫蛍光法による解析：

3 つの新鮮腫瘍から選択された細胞を、1 cm² の表面積のウェルを有する培養チャンバ (Labteks (登録商標)、Nunc International社、ロチェスター、ニューヨーク、USA) に 10000 個 / ウェルで播種した。増殖培地での培養の 48 時間後、それらを 3.7% ホルムアルデヒド (Sigma社) または純メタノール (Invitrogen社) で 10 分間固定した。PBS、0.5% FCS および 0.2% Tween 20 (BioRad社、ハーキュリーズ、カリフォルニア、US) の溶液による周囲温度での 30 分間の透過処理工程が、細胞内タンパク質の同定のために必要であった。次いで、細胞を 4℃ で 1 時間、モノクローナル一次抗体、および、一次抗体を認識し、Alexa 488 または 594 型の蛍光色素 (Invitrogen社) が結合した二次抗体と連続的にインキュベートした。すすいだ後、4,6-ジ-アミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) (Vector Cloniscience社、モンルージュ、フランス) を含む封入剤を添加して、細胞核を視覚化した。抗体溶液のないウェルを陰性対照とした。カメラ (DMX 1200、Nikon Europe社、バトヒューフェドルプ、オランダ) を搭載したエビ蛍光顕微鏡 (Leica (登録商標) 社、ゾルムス、ドイツ) の下でスライドを読み取った。画像処理は Lucia ソフトウェアを用いて行った。以下の抗体を用いた：抗 HLA-G1/-G5 モノクローナル抗体 (クローン 87G、Exbio社)、抗オステオカルシン (Santa Cruz社、Tebu、ル・ペレ・アン・イヴリン、フランス)、抗オステオポンチン (RnD) および抗コラーゲン 1a1 (Santa Cruz社) ポリクローナル抗体。

【0052】

免疫組織化学的解析：

生検検体を 10% ホルムアルデヒド (Sigma社) で固定した。次いで、それらを、連続した 75%、90% および 100% のエタノールバス (Merck and Carbo Erba社、サン・テルブラン、フランス) を用いて脱水した。最後に、それらをキシレンバス中に 4℃ で 30 分間置いた後、パラフィン包埋 (Invitrogen社) して、マイクロトーム上で切片を切った。そして、切片をヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。抗原検出のための免疫標識化は、抗 HLA-G5

10

20

30

40

50

/-G6抗体（クローン5A6G7）およびペルオキシダーゼ結合抗マウスポリクローナル抗体を用いて行った。

【0053】

RT-PCRによる解析：

Trizol（登録商標）（Invitrogen社）での細胞溶解の後、200 μ lのクロロホルム（Sigma社）を添加して、細胞およびタンパク質デブリス、上清中に含まれているデオキシリボ核酸（DNA）並びにリボ核酸（RNA）を分離した。次いで、回収したRNAを500 μ lのイソプロパノール（Sigma社）で沈殿させ、そして75 $^{\circ}$ Cで1mlのエタノール（Merck and Carbo Erba社）ですすぎ、外気下で30分間乾燥させて、DNアーゼおよびRNアーゼフリー-DEPC水50 mlに再溶解させた。

10

Takara PrimeScript（商標）1stストランドcDNA合成キット（Takara Bio Inc.社）を用いて、RNAからの逆転写により相補DNA（cDNA）合成を行った。

【0054】

1 μ gのRNAの溶液を、1 μ lのオリゴdTプライマー、1 μ lのdNTP混合物およびRNアーゼフリー水からなる第1反応混合物に添加して、合計10 μ lの混合物量とした。65 $^{\circ}$ Cで5分間の変性後、新しい反応混合物を添加した。これは、4 μ lのバッファー、1 μ lのPrime Script（商標）逆転写酵素、0.5 μ lのRNアーゼ酵素阻害剤および4.5 μ lのDEPC水からなる。

そして、20 μ lの最終混合物をサーモサイクラー（Applied Biosystems社、フォスターシティ、CA、USA）に置いた。用いた条件は、30 $^{\circ}$ Cで10分間のプライマー/RNAハイブリダイゼーション、42 $^{\circ}$ Cで60分間のcDNA合成、および95 $^{\circ}$ Cで5分間の酵素変性である。

20

【0055】

TaKaRa Ex Taq（商標）キット（Takara Bio Inc.社）を用いて所望のDNA配列の増幅を行った。

50 ng/ μ lのcDNA溶液を、2.5 μ lのバッファー、2 μ lのdNTP混合物、2 μ lの検討されるDNAに対するプライマー、0.125 μ lのTaqポリメラーゼ酵素、およびDEPC水からなる反応混合物に添加して、合計25 μ lの混合物量とした。RT-PCRを、次のプログラムにしたがって行った：94 $^{\circ}$ Cで5分、（94 $^{\circ}$ Cで45秒、55 $^{\circ}$ Cで45秒、72 $^{\circ}$ Cで1分）を35サイクル、70 $^{\circ}$ Cで7分。

骨発生分化、未分化および細胞腫瘍形成性に特徴的な種々の遺伝子の増幅用プライマーを、以下の表Iに示した。

30

【0056】

【表1】

表I:

遺伝子	プライマー: センス アンチセンス
<i>GAPDH</i>	AATCCCATCACCATCTTCCAGG (配列番号1) AGAGGCAGGGATGATGTTCTGG (配列番号2)
<i>BSP</i>	TTTCCAGTTCAGGGCAGTAGTGAC (配列番号3) CTTCCCCTTCTTCTCCATTGTCTC (配列番号4)
<i>PA</i>	CTGGACCTCGTTGACACCTG (配列番号5) GACATTCTCTCGTTCACCGC (配列番号6)
<i>α-SM アクチン</i>	TCATGATGCTGTGTAGGTGGT (配列番号7) CTGTTCCAGCCATCCTTCAT (配列番号8)
<i>PTHRI</i>	ACATCTGCGTCCACATCAGGG (配列番号9) CCGTTACGAGTCTCATTGGTG (配列番号10)
<i>SPARC</i>	ATCCCTGCCAGAACCACCACT (配列番号11) GCGCTTCTCATTCTCATGGATCT (配列番号12)
<i>オステリックス</i>	ATGGCGTCCCTCCCTGCTTGAG (配列番号13) AGGGGTGTGTCATGTCCAGAGAGG (配列番号14)
<i>HLA-G</i>	CCTTTTCAATCTGAGCTCTTCTTT (配列番号15) GGAAGAGGAGACACGGAACA (配列番号16)

10

20

【0057】

2) 結果

a) 骨形成時の骨芽細胞によるHLA-Gのインビボ発現

抗HLA-G5/-G6抗体(クローン5A6G7)で得られた骨芽細胞染色によって立証されているように(図1A参照)、新生児において、海綿質骨(または骨髄)の骨梁の内側を覆う骨芽細胞は、HLA-G5および-G6を発現している。反対に、増殖性肥大性軟骨細胞は、HLA-G5/-G6を発現しない。さらに、(抗HLA-G5/-G6抗体で標識された)HLA-G+骨芽細胞に近接した特定の血管周囲の細胞もこのタンパク質を発現していることに留意すべきである。

【0058】

健常成人においては、骨折後の骨再形成時のような活発な骨発生の間にHLA-G5および-G6が検出された。骨折後の骨再形成時では、骨の連結の初期段階の間に、間葉細胞が凝集して、骨を形成できる骨芽細胞が生じるようになる。この骨折後の初期段階において、骨芽細胞はHLA-G5および-G6を弱く発現しているが、一方で、骨再形成の後期段階では、骨の仮骨内の骨の新合成(neosynthesis)を担う骨芽細胞は、抗HLA-G5/-G6抗体で非常に強く標識されている(図1B参照)。また、HLA-G5および-G6は、対象の非病態正常骨髄では検出されなかった(図1C参照)。

30

【0059】

これらの結果は、骨芽細胞がHLA-Gを発現できることを示している。しかしながら、HLA-G+細胞は非病態の成人骨髄では見られなかった。したがって、これらの結果から、ヒトにおいてインビボでは、骨形成(骨発生)の間に骨芽細胞はHLA-Gを発現していることがわかる。さらに、骨芽細胞に密接に関連した血管周囲の細胞もそれら自体でHLA-Gを発現している。

40

【0060】

b) 正常および病態の骨芽細胞はHLA-Gを発現している

骨肉腫、骨芽細胞腫、ユーイング肉腫または巨細胞腫(GCT)から生じたヒト病態の骨髄の切片に基づいてHLA-G5および-G6発現プロファイルを検討した。

図2に表された結果は、検討した病態の骨髄に関係なく、骨芽細胞が抗HLA-G5/-G6抗体で標識されていること(HLA-G+)を示している。しかしながら、HLA-G5および-G6の発現は病態の状態に依存して増減する。

より詳細には、骨肉腫および骨芽細胞腫から生じた異常骨芽細胞、また、正常であるが

50

腫瘍の周辺にある骨芽細胞は、HLA-G+である（図2Aおよび2B参照）。

巨細胞腫（GCT）またはユーイング肉腫から生じた骨髄の切片では、腫瘍環境の骨芽細胞においてのみHLA-G5および-G6が検出された（図2C参照）。

【0061】

HLA-Gの発現を、骨芽細胞の骨肉腫に由来するSaOs2腫瘍株を検討することにより確認した。図3に表されているこの結果は、該細胞が、HLA-G5（HLA-Gの可溶性フォーム）およびHLA-G1（HLA-Gの膜フォーム）を認識する87G抗体で標識されることを示している。

これらの結果から、正常骨芽細胞、および病態の、特に腫瘍の骨芽細胞はHLA-Gを発現していることがわかる。

【0062】

c) 間葉系幹細胞からの培養で生じた正常骨芽細胞はHLA-Gを発現している

間葉系幹細胞からの培養で生じた正常骨芽細胞によるHLA-Gの発現を検討した。間葉系幹細胞（MSC）の培養物を、デキサメタゾンおよび骨形成タンパク質（BMP）のような種々の骨芽細胞の誘導剤とともにインキュベートした。

アルカリフォスファターゼ（ALP）、骨サイアロタンパク質（BSP）、上皮小体ホルモン受容体1（PTHR1）、オステオネクチン（SPARC）、オステリックス転写因子（OSX）、平滑筋アクチン（ASMA）のmRNAの発現を、間葉系起源の培養細胞中で検出した（図4A参照）。これらの種々の転写産物の組み合わせが骨芽細胞に特徴的であることが知られている（Cohen、2006）。

得られた骨芽細胞も、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4およびHLA-G5のmRNAを発現していた（図4B参照）。

【0063】

図5に、抗HLA-G1/-G5抗体（クローン87G）でのインサイチュ免疫蛍光技術を用いて得られた結果を示した。骨芽細胞マーカーを発現している細胞はまた、HLA-G1/-G5陽性であった。しかしながら、HLA-Gの発現は、他のBMP（BMP-2およびBMP-7）に比べて、BMP-4で骨芽細胞を誘導したときに顕著に高いことに留意すべきである。

図6に、フローサイトメトリ技術を用いて得られた結果を示した。HLA-Gおよびアルカリフォスファターゼ（ALP）の共同表示によって表されているように、骨芽細胞の大多数はHLA-G1/-G5を発現している。しかし、この発現は時間経過により減少する：誘導の2週間後には66%のHLA-G+骨芽細胞が検出されたが、誘導の4週間後では10%のHLA-G+骨芽細胞が検出された。

【0064】

MSCは、骨芽細胞および軟骨芽細胞、ならびに脂肪細胞を生み出すことができるので、HLA-Gがこれら他の細胞種により発現されうるかを調べた。可溶性フォームHLA-G5および-G6をELISAにより、骨芽細胞培養物（BMP-4およびデキサメタゾンで誘導された細胞）の上清においてのみ検出した。軟骨芽細胞形成性、脂肪細胞形成性および血管形成性の培養物では、可溶性HLA-Gは、ほとんど検出されなかったか、または全く検出されなかった（図7）。

さらに、小塊技術による培養で生じた軟骨芽細胞はHLA-Gを発現していなかった（図8）。また、脂肪細胞ではHLA-Gは検出されなかった。

【0065】

実施例2：骨肉腫由来の骨芽細胞によるHLA-Gの発現の証明

1) 材料および方法

細胞：

骨肉腫株：HOS-154732（McAllisterら、1971）、U2OS（Pontenら、1967）、MG-63（Billiauら、1977）、SaOS2（Foghら、1975）、CAL72（Rochetら、1999）およびSaOS2 RUNX2 DNN（Ghaliら、2010）。

検討した種々の生検材料は、トゥールのトルソー中央病院大学（Centre Hospitalier Universitaire：CHU）[大学付属病院教育センター]の病理解剖学科（フランス）から入手した。

10

20

30

40

50

【0066】

間葉系幹細胞 (MSC) :

用いたMSCは、トゥールのCHUの整形・災害外科部門(フランス)にて処置され、股関節全置換移植のため入院している健常ドナーから入手した。患者のインフォームド・コンセントは書面で得た。処置の際に後部腸骨稜から骨髄を20 ml取得した。これらの細胞を、この研究で実施された全ての試験の対照として用いた。

【0067】

細胞培養 :

- 標準培養：種々の株の細胞を、5000個/cm²の密度で、培養フラスコ(Falcon(登録商標)、BD Biosciences社、VWR、ストラスブール、フランス)中で培養した。培養培地は、10% (v/v)ウシ胎仔血清(FCS)(Perbio Hyclone社、ローガン、USA)、1% (v/v) L-グルタミン、1%ペニシリンおよびストレプトマイシン(InVitrogen社)ならびに100 μM ファンギゾン(Bristol Myers Squibb社、リュエーユマルメゾン、フランス)を添加したアルファ-MEM最小必須培地からなる。培養培地は2~3日ごとに交換した。
- MSCを、FGF2(AbCys社、パリ、フランス)を1 ng/mlでさらに含む同じ培地を用いた同一方法で培養した。
- 分化培地：骨細胞分化のために、培地は、2% (v/v) FCSおよび50 ng/mlのBMP4(Pepro tech社、ロンドン、UK)を添加したアルファMEMからなる。この培地の持続期間は8~10日である。

【0068】

フローサイトメトリ :

蛍光色素フィコエリスリン(PE)またはフルオロセイン・イソシアネート(FITC)が結合した抗体を用いて200000個の細胞を標識した。単離された生細胞を、これらの抗原を認識する抗体とともに45分間インキュベートして洗浄し、そしてCell Fix(商標)(Becton Dickinson社、エーレムボーデゲム、フランス)で固定して、細胞の表面に発現している抗原を明らかにした。細胞内抗原を明らかにするために、免疫標識の前に細胞透過処理の前工程が必要であった。非特異的免疫グロブリンを用いて陰性対照を得た。

【0069】

そして、細胞を、488 nmの波長を射出するアルゴンレーザを有するサイトメータ(FACS Calibur(商標)、Becton Dickinson社)にかけた。結果をCellQuest 3.1(商標)ソフトウェアを用いて分析した。

alexa 488結合抗HLA-G1および-G5抗体87G、およびAPC結合MEM/G9、または4H84(Exbio社; プラハ、チェコ共和国)、および抗ALPL抗体(R&D Systems社)を用いた。

【0070】

RT-PCRによる解析 :

・Trizol(登録商標)抽出 :

Trizol(登録商標)(InVitrogen社)を用いて細胞を溶解した後、200 μlのクロロホルム(Sigma社)を添加して遠心分離し、タンパク質を含んでいる下層、デオキシリボ核酸(DNA)を含んでいる中間層、およびリボ核酸(RNA)を含んでいる上層の三層を得た。該上層を抽出し、次いで500 μlのイソプロパノール(Sigma社)で沈殿させ、1 mlの75%エタノール(Merck and Carbo Erba社)ですすぎ、完全に透明になるまで外気中に放置して乾燥させた。最終的に、RNAをジエチルピロカーボネート(DEPC-RNアーゼ阻害用)水50 mlに再溶解させた。

【0071】

・RNA分析 :

2 μlのRNAを98 μlのDEPC水に希釈し、これを、ブランク(水のみ)の用意をした後、Gene Quant II線量計(Amersham Pharmacia社、Sarclay、オルセー、フランス)の石英キュベットに入れた。この分析は、260 nmで照射するレーザを用いて光学密度を測定することにより行った。

【0072】

10

20

30

40

50

・逆転写：

1 µgのRNAをDEPC水で8 µlとなるまで希釈した。ランダムヘキサマーおよびdNTP (Takara PrimeScript (商標) 1stストランドcDNA合成キット (Takara Bio Inc.社)) を添加した。サーモサイクラー (Applied Biosystems社、フォスターシティ、CA、USA) での変性 (65 °Cで5分) の後、Prime Script (商標) 逆転写酵素を添加した。この溶液を、次のプログラムにしたがってサーモサイクラーでインキュベートした：30 °Cで10分間の第1ステップ、42 °Cで60分間の第2ステップ、そして95 °Cで5分間の第3ステップ。得られた相補DNA (cDNA) を -20 °Cで保存した。

【0073】

・ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)：

25 ngのcDNAを、dNTP、興味対象の配列を標的とするプライマー (下記の表II参照) およびTaqポリメラーゼ酵素 (TaKaRa (商標) Ex Taqキット) と混合した。そして、全混合物を、35サイクルからなる次のプログラムにしたがってサーモサイクラーでインキュベートした。各サイクルは、98 °Cで1分、続いて55 °Cで30秒、続いて72 °Cで1分からなる。

【0074】

【表2】

表 II：

遺伝子	プライマー: センス アンチセンス
<i>GAPDH</i>	ATCCCATCACCATCTTCCAGG (配列番号17) GAGGCAGGGATGATGTTCTGG (配列番号18)
<i>ALPA</i> (または <i>ALP</i>)	CTGGACCTCGTTGACACCTG (配列番号5) GACATTCTCTCGTTCACCGC (配列番号6)
<i>Runx2</i>	GGCCACAAATCTCAGATCGTT (配列番号19) CACTGGCGCTGCAACAAGAC (配列番号20)
<i>Dlx5</i>	GCCACCAACCAGCCAGAGAA (配列番号21) GCGAGGTACTIONGAGTCTTCTGAAACC (配列番号22)
オステオネクチン (<i>SPARC</i>)	ATCCCTGCCAGAACCACCACT (配列番号11) GCGCTTCTCATTCTCATGGATCT (配列番号12)
<i>Colla1</i>	ACATGGACCAGCAGACTGGCA (配列番号23) TCACTGTCCTTGCCCCAGGCT (配列番号24)

【0075】

・アガロースゲルでの移動：

PCR産物を、0.01%のエチジウムブロマイド (Sigma社) を含む1%アガロース (Sigma社) ゲルに載せた。次いで、紫外線ランプ (Vilbert Lourmat社、エバーハルツェル、ドイツ) を用いて、ゲルを視覚化した。そして、Chemicapt (商標) ソフトウェア (BioRad社、CA、USA) を用いて、バンドを解析した。

【0076】

・定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR)：

50 ngのcDNAを、蛍光分子 (Syber Green、Invitrogen社) を含む溶液と混合した。次いで、この溶液を、あらかじめプライマーを入れたウェル (96ウェルプレート) に入れた。プレートをサーモサイクラー (BioRad社) に置いた。次のプログラムを用いた：95 °Cで30秒、56 °Cで30秒、72 °Cで30秒を39サイクル。融解曲線をプロットして、増幅DNAの質を確認した。

以下の式を用いて、DNAの量を求めた。

$$2^{-\Delta C_t} \text{ (遺伝子の } C(t) - C(t)_{GAPDH} \text{) または } 2^{-\Delta C_t}$$

10

20

30

40

50

【 0 0 7 7 】

・ウェスタンブロット：

細胞をはがして円心分離し、そして0.1% (v/v) Triton X-100 (Sigma社) からなる500 μ lの溶解バッファー中に回収した。円心分離後、上清を取り出して、そしてタンパク質抽出物をレムリ (Laemmli) バッファーで希釈して2分間煮沸した。

サンプルを、ブラッドフォード技術にしたがって、MRX II (Dyner technologies社、シヤンティイ、USA)を用いて光学密度により分析した。

興味対象のタンパク質に応じた様々な濃度のポリアクリルアミドゲル (アルカリフォスファターゼおよびHLA-Gには10%) で、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS - Biorad社) バッファー中で電気泳動を行った。タンパク質をポリフッ化ビニリデン膜上にプロットし、そしてミルクタンパク質で飽和させ、興味対象の抗体とともに一晚インキュベートした。二次抗体を用いた後、化学発光 (ECLキット、Amersham社) により視覚化を行った。

10

【 0 0 7 8 】

・トランスフェクション

RUNX2を標的とするsiRNA (Select RNAi (商標)、siRNA、カタログNo. 1299003) またはDLX5標的とするsiRNA (Stealth Select RNAi (商標)、siRNA、カタログNo. 1299003) の3種の異なるsiRNA (Invitrogen社) を細胞にトランスフェクションした。非特異的siRNAを対照として用いた (Invitrogen社)。20 nMのsiRNAをトランスフェクションに用い、これはAmaxa Nucleofactorキット (Lonza社、フランス) を供給元の説明書に従って用いて行った。24時間後、細胞を骨発生分化培地中で誘導して分化させた。2、4および6日後、細胞を回収し、それらについて、骨芽細胞に特徴的である遺伝子またはHLA-Gをコードする遺伝子の発現を分析した。

20

【 0 0 7 9 】

2) 結果

ヒト起源の種々の骨芽細胞株CAL72、MG-63、HOSおよびU2OSにおけるアイソフォームHLA-G1 (膜HLA-G) およびHLA-G5 (細胞内HLA-G) の発現を、フローサイトメトリおよび免疫標識化 (ウェスタンブロット法) により検討した。結果を図9に示した。全ての株においてアイソフォームHLA-G1およびHLA-G5が検出されたが、発現の程度には違いがあった。HLA-G5は常に強く発現していたが、一方で、HLA-G1についてはCAL72およびMG-63株においてのみであり、それを発現しているHOSおよびU2OSは非常に少なかったことが観察された。

30

【 0 0 8 0 】

以下の表IIIに、ヒト (成人) 起源の (骨増殖区画の) 正常骨組織および病態の骨組織における免疫組織化学法によるHLA-G (HLA-G1およびHLA-G5) 発現の調査の結果を示した。この表から、正常または腫瘍骨芽細胞、および特定の肥大軟骨細胞がHLA-G1および-G5を発現していることがわかる。

【 0 0 8 1 】

【表 3】

表 III : 正常または病態のヒト骨組織における HLA-G1 および-G5 の発現。

組織	HLA-G 発現
正常組織	
骨髄内皮	—
破骨細胞	—
骨梁骨芽細胞	+
皮質骨芽細胞	+
休止区画軟骨細胞	—
増殖区画軟骨細胞	—
肥大区画軟骨細胞	± ^a
骨髄脂肪細胞	—
血管平滑筋細胞および血管周囲細胞	+ ^b
骨膜の間葉細胞	+
軟骨膜の間葉細胞	+
腫瘍組織	
骨芽細胞性骨肉腫	+
繊維芽細胞性骨肉腫	±
骨芽細胞腫	+
軟骨肉腫	±
軟骨芽細胞腫	—
ユーイング腫細胞	—
巨細胞腫 (GCT)	—
腫瘍により誘導された正常骨芽細胞	+ ^c

a : 特定の軟骨細胞は HLA-G を発現している

b : 活発な骨形成部位における HLA-G-陽性血管周囲細胞

c : 骨腫瘍により誘導された正常骨芽細胞は全 HLA-G 陽性である。

【 0 0 8 2 】

骨発生誘導に關与する DLX5 遺伝子および RUNX2 遺伝子の発現を RNA 干渉により阻害して、骨芽細胞による HLA-G 発現の特異性を確認した。ヒト起源の骨髄間葉系幹細胞への DLX5 または RUNX2 を標的とする siRNA のトランスフェクションの後、細胞を骨発生培地 (BMP4 添加) で培養した。6 日間、骨芽細胞に特徴的な遺伝子 (アルカリフォスファターゼまたは ALPL、オステオネクチンまたは SPARC、コラーゲン 1 1 または COL1 1) および HLA-G の発現を検討した。DLX5 および RUNX2 の発現の減少により、ALPL、SPARC、および COL1 1 遺伝子の発現のみならず HLA-G の発現も減少することが観察された (図 1 0 参照)。

【 0 0 8 3 】

これらの結果を確認するために、RUNX2 の不活性型 (RUNX2 ドミナントネガティブまたは DNN) を発現している SaOS2 株である 6A2 株および 4A5 株を用いた。RUNX2 DNN を含まない形質転換株を対照株 (C-) として用いた。4A5 では DNN RUNX2 が強く発現しているが、一方で 6A2 ではその発現はより緩やかである。結果を図 1 1 に示す。

【 0 0 8 4 】

10

20

30

40

50

COL1 1の発現はRUNX2により誘導されるので、まずCOL1 1の発現を定量的PCR (qRT-PCR) およびウェスタンブロットにより検討した。そして、RNAレベルおよびタンパク質レベルでのCOL1 1発現の減少が、RUNX2 DNN株において検出された。これらの減少は、6A2よりも4A5株において非常に大きかった。

次いで、HLA-G (アイソフォームHLA-G1およびHLA-G5) の発現を、フローサイトメトリおよびウェスタンブロットにより検討した。HLA-Gの発現は、4A5において実質的に失われ、6A2では対照株C-よりもさらに弱い発現となることがわかった。

【 0 0 8 5 】

【表 4 - 1】

文献

- Betts MR *et al.*, *J Immunol. Methods*, 281:65-78 (2003).
- Billiau A *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother.*, 12:11-15 (1977).
- Carosella ED *et al.*, *Blood*, 111:4862-4870 (2008a).
- Carosella ED *et al.*, *Trends Immunol.*, 29:125-132 (2008b)
- Cohen MM, *Am J Med Genetics Part A*, 140A:2646-2706 (2006).
- Ellis SA *et al.*, *J. Immunol.*, 144:731-735 (1990).
- Fogh J *et al.*, *New York: Plenum Press*, 115-159 (1975).
- Friedenstein AJ *et al.*, *Exp Hematol.*, 4:267-274 (1976).
- Geraghty DE *et al.*, *Proc Natl Acad Sci. USA*, 84:9145-9149 (1987).
- Ghali O *et al.*, *Bone*, 46:901-910 (2010).
- Hackmon R *et al.*, *Fetal Diagn Ther.*, 19:404-409 (2004).

10

20

30

【 0 0 8 6 】

【表 4 - 2】

- Ishitani A and Geraghty DE., *Proc Natl Acad. Sci. USA*, 89:3947-3951 (1992).
- Kirszenbaum M *et al.*, *Proc Natl Acad Sci. USA*, 91:4209-4213 (1994).
- Kirszenbaum M *et al.*, *Human Immunol.*, 43:237-241 (1995).
- Le Discorde M *et al.* *Biol Reprod.*, 73:280-288 (2005).
- Le Rond S *et al.*, *Eur J Immunol.*, 34:649-660 (2004).
- Le Rond S *et al.*, *J. Immunol.*, 176:3266-3276 (2006). 10
- McAllister RM *et al.*, *Cancer*, 27:397-402 (1971).
- McMaster M *et al.*, *J Immunol.*, 160:5922-5928 (1998).
- Menier C *et al.*, *Hum Immunol.*, 64:315-26 (2003).
- Moreau P *et al.*, *Human Immunol.*, 43:231-236 (1995).
- Naji A, *et al.*, *Blood*, 110:3936-3948 (2007).
- Pittenger MF *et al.*, *Science*, 284:143-147 (1999).
- Ponten J *et al.*, *Int J Cancer*, 2:434-447 (1967). 20
- Rebmann V *et al.*, *Tissue Antigens*, 53:14-22 (1999).
- Rebmann V *et al.*, *Human Immunology*, 66: 853-863 (2005).
- Rochet N *et al.*, *Int J Cancer*, 82:282-285 (1999).
- Rouas-Freiss N *et al.*, *Cancer Res.*, 65:10139-10144 (2005).
- Selmani Z *et al.*, *Stem Cells*, 26:212-222 (2008).
- Srivastava A, *Medscape from Curr Med Res Opin.*, 21:1015-1026 (2005). 30
- Ugurel S *et al.*, *Cancer*, 92:369-376 (2001).
- Vesper H, *Medscape from Lab Med.*, 36:424-429 (2005).

【 図 3 】

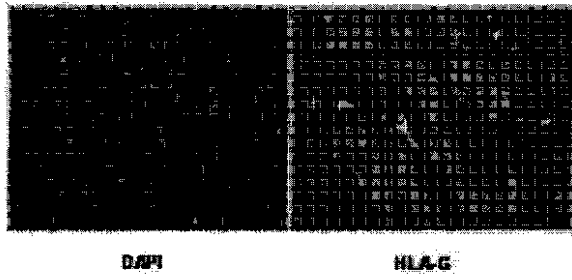


Figure 3

【 図 8 】

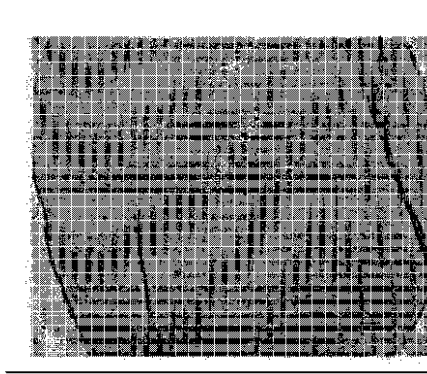


Figure 8

【 図 6 】

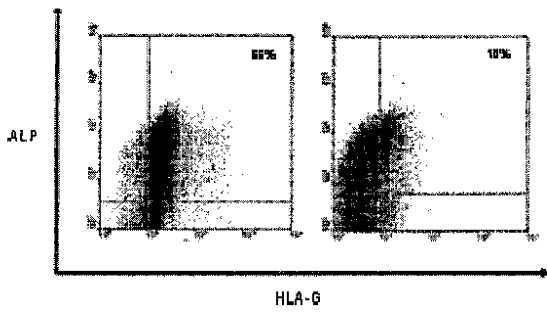


Figure 6

【 図 9 】

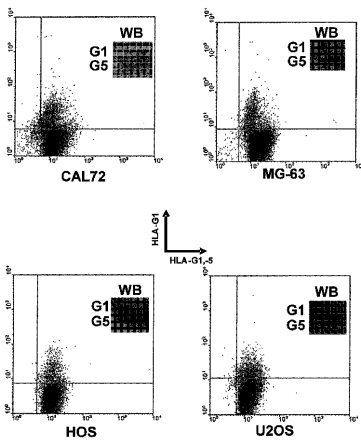
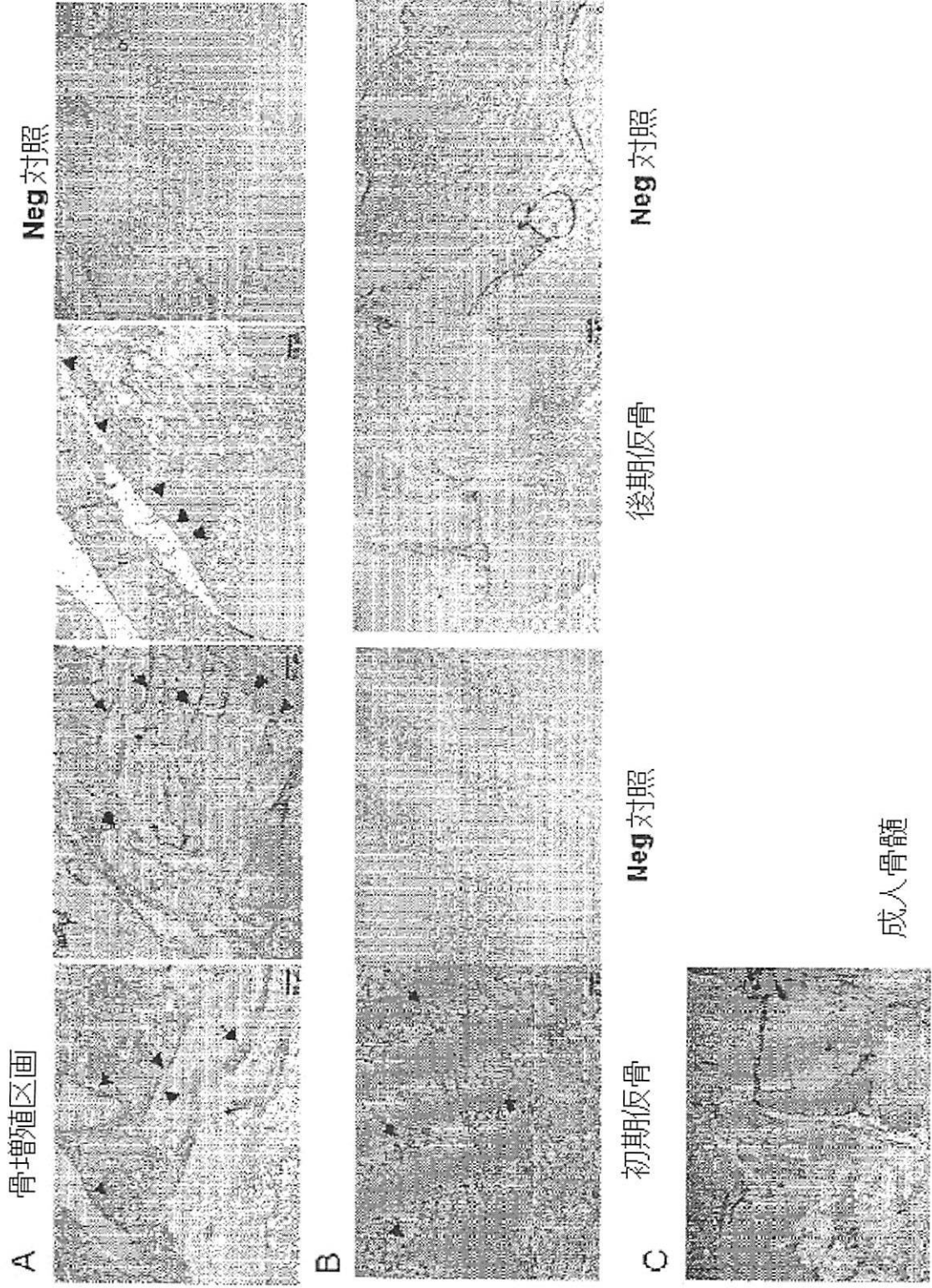
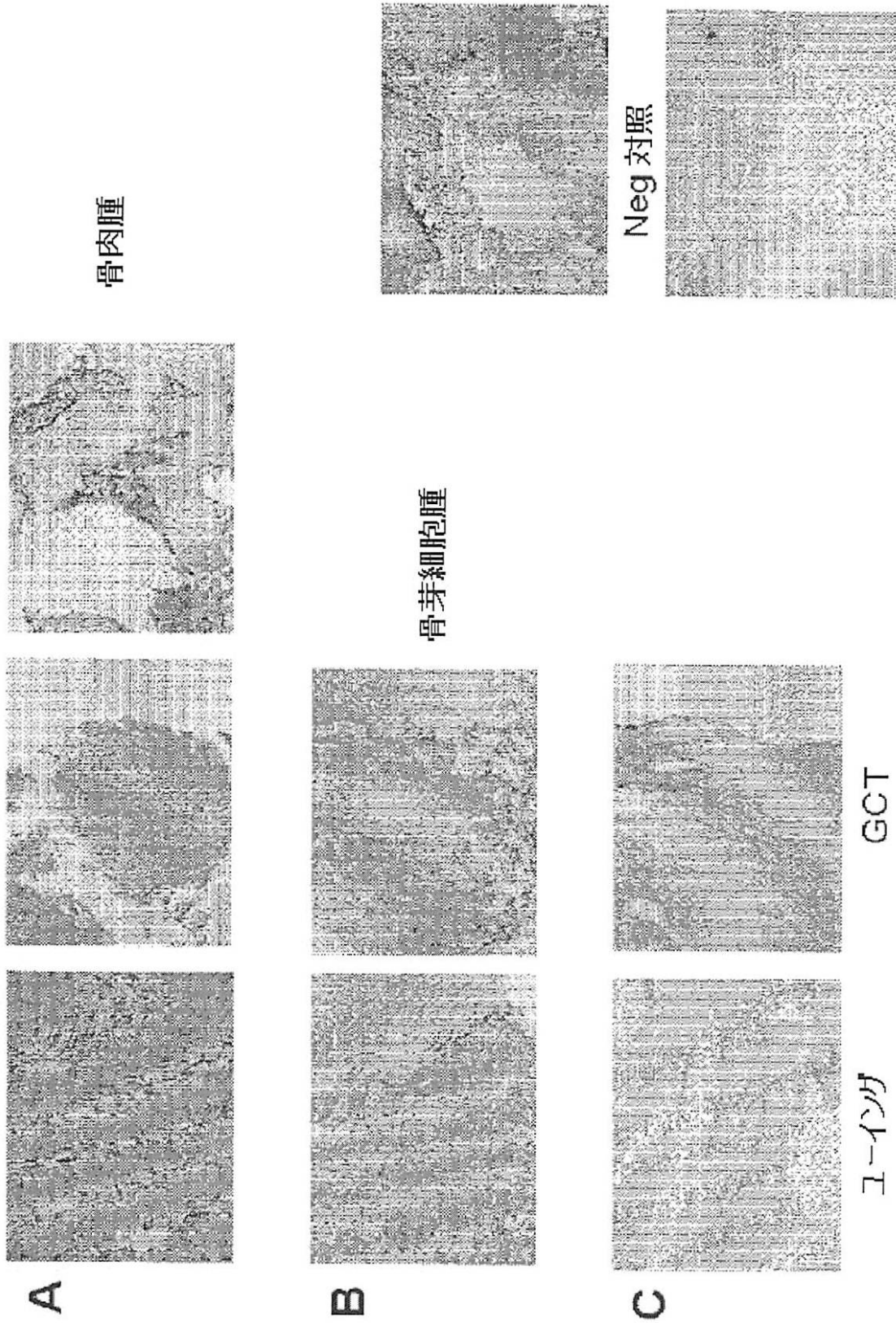


Figure 9

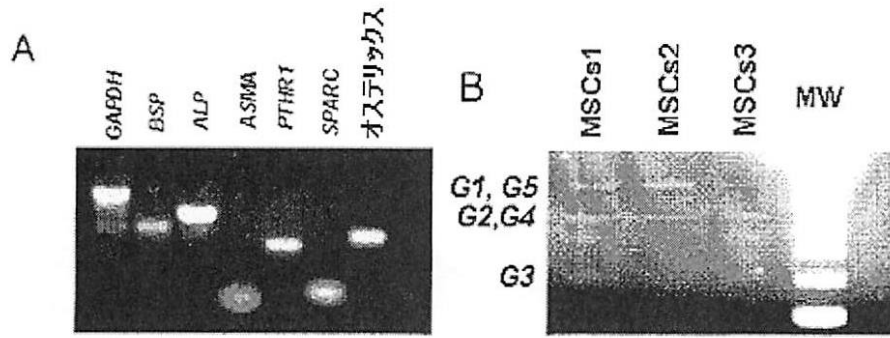
【 図 1 】



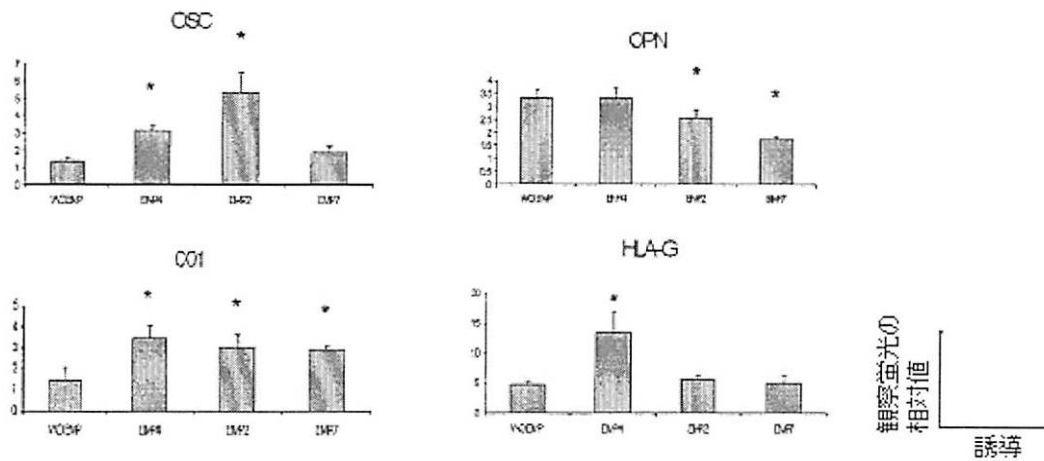
【 図 2 】



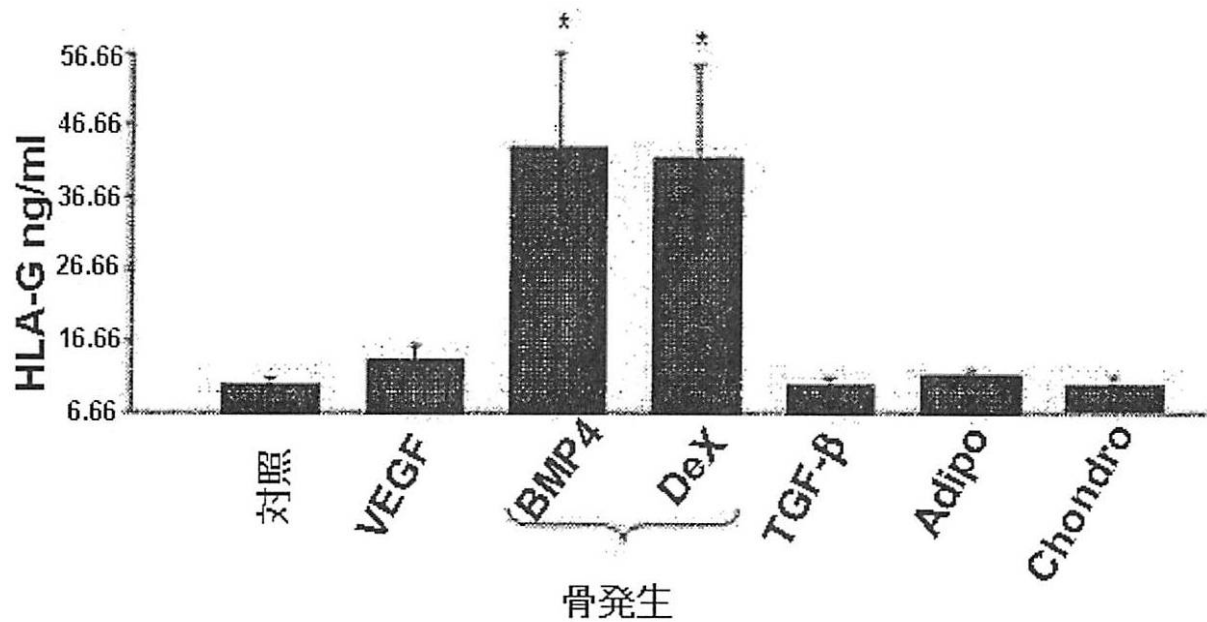
【 図 4 】



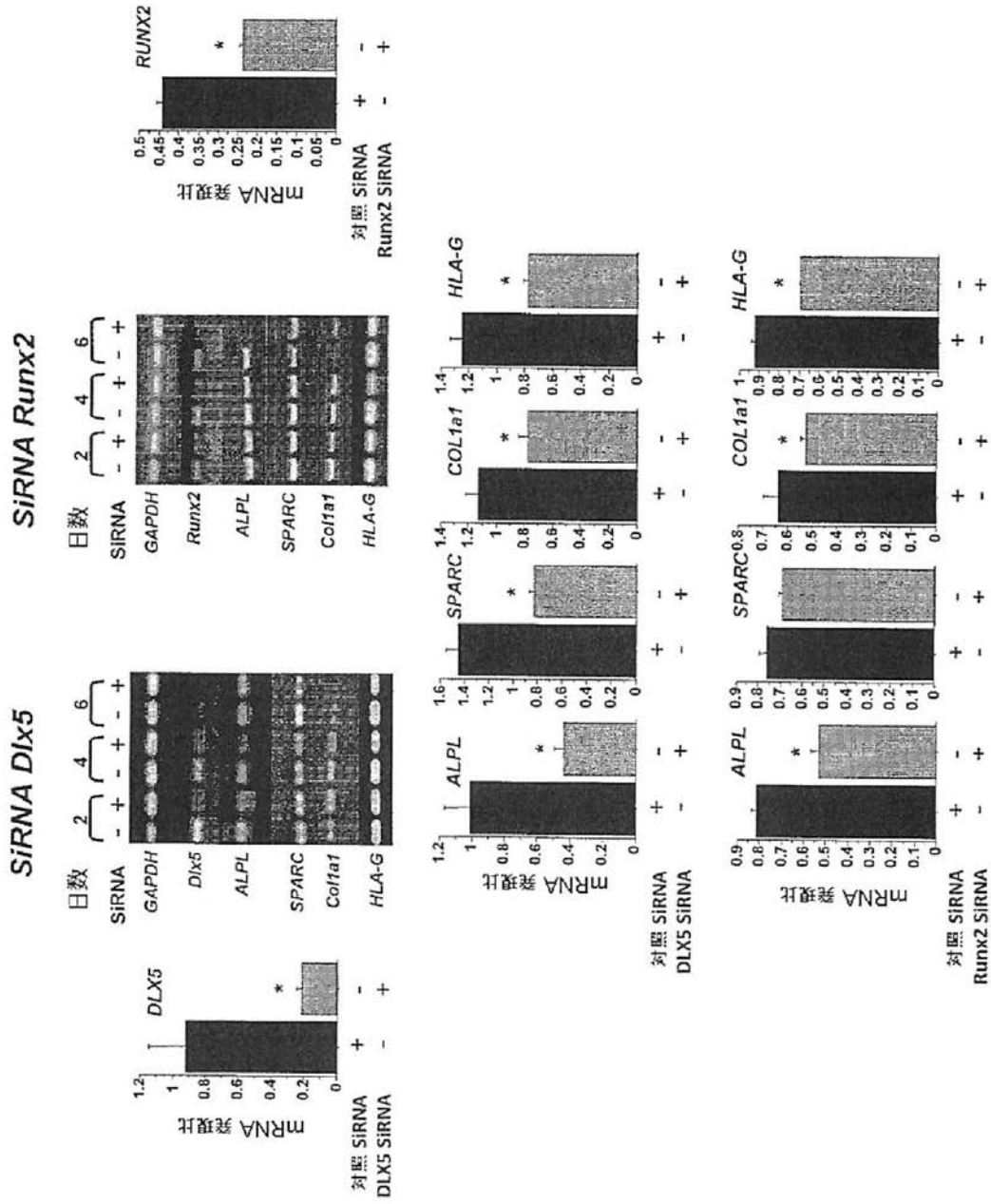
【 図 5 】



【 図 7 】



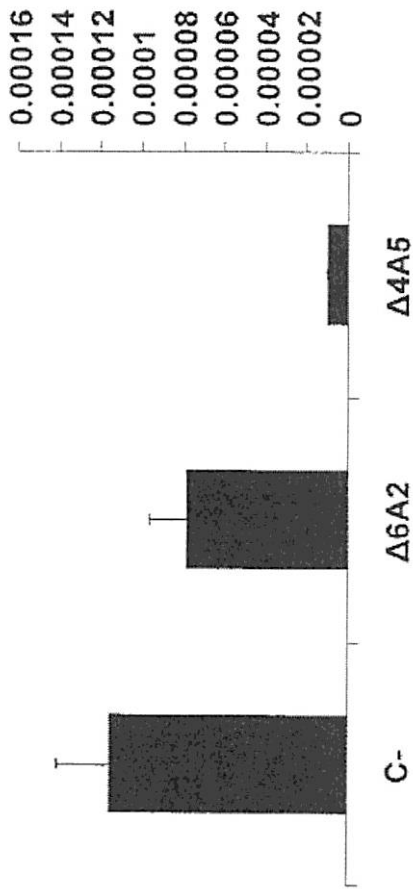
【 図 1 0 】



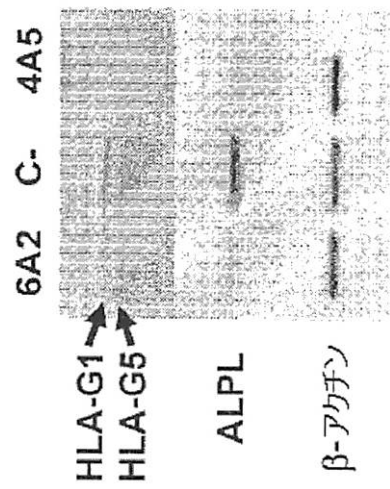
【 図 1 1 】

COL1a1

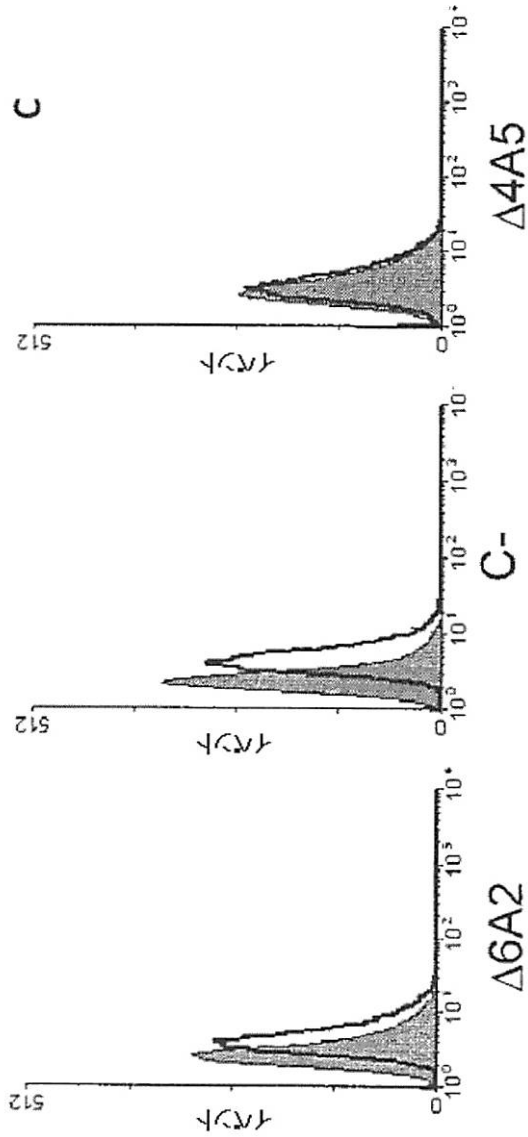
A



B



C



【 配列表 】

2013511708000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2010/055380

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 G01N33/74 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008/110578 A2 (NAT UNIV IRELAND [IE]; BOWES TYRONE VILLALARD [IE]; GREISER UDO [IE];) 18 September 2008 (2008-09-18) the whole document -----	1-19
A	WO 2004/090161 A1 (NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS PHARMA GMBH [AT]; SUSA SPRING MIRA [CH]; ZA) 21 October 2004 (2004-10-21) the whole document -----	1-19
A	WO 2007/104724 A2 (UNIV SIENA [IT]; SANTUCCI ANNALISA [IT]; SPREAFICO ADRIANO [IT]; FREDI) 20 September 2007 (2007-09-20) the whole document -----	1-19
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 February 2011		Date of mailing of the international search report 21/02/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hoff, Céline

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2010/055380

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ROMAN ANGELA ET AL: "Heterogeneous expression of HLA-G1,-G2,-G5,-G6, and-G7 in myeloid and plasmacytoid dendritic cells isolated from umbilical cord blood", HUMAN IMMUNOLOGY, vol. 70, no. 2, February 2009 (2009-02), pages 104-109, XP002585319, ISSN: 0198-8859 the whole document -----	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2010/055380

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008110578 A2	18-09-2008	AU 2008225828 A1	18-09-2008
		CA 2688121 A1	18-09-2008
		EP 2118272 A2	18-11-2009
		JP 2010520761 T	17-06-2010
		US 2010062038 A1	11-03-2010
WO 2004090161 A1	21-10-2004	EP 1616026 A1	18-01-2006
		EP 2065395 A1	03-06-2009
		JP 2006523444 T	19-10-2006
		US 2008118521 A1	22-05-2008
WO 2007104724 A2	20-09-2007	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/IB2010/055380

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE		
INV. G01N33/68 G01N33/74 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	
	no. des revendications visées	
A	WO 2008/110578 A2 (NAT UNIV IRELAND [IE]; BOWES TYRONE VILLALARD [IE]; GREISER UDO [IE];) 18 septembre 2008 (2008-09-18) le document en entier -----	1-19
A	WO 2004/090161 A1 (NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS PHARMA GMBH [AT]; SUSA SPRING MIRA [CH]; ZA) 21 octobre 2004 (2004-10-21) le document en entier -----	1-19
A	WO 2007/104724 A2 (UNIV SIENA [IT]; SANTUCCI ANNALISA [IT]; SPREAFICO ADRIANO [IT]; FREDI) 20 septembre 2007 (2007-09-20) le document en entier -----	1-19
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent	*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention	
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date	*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément	
L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)	*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier	
O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens	*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets	
P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
8 février 2011	21/02/2011	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé	
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Hoff, Céline	

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/IB2010/055380

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>ROMAN ANGELA ET AL: "Heterogeneous expression of HLA-G1,-G2,-G5,-G6, and-G7 in myeloid and plasmacytoid dendritic cells isolated from umbilical cord blood", HUMAN IMMUNOLOGY, vol. 70, no. 2, février 2009 (2009-02), pages 104-109, XP002585319, ISSN: 0198-8859 le document en entier -----</p>	1-19

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/IB2010/055380

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2008110578 A2	18-09-2008	AU 2008225828 A1	18-09-2008
		CA 2688121 A1	18-09-2008
		EP 2118272 A2	18-11-2009
		JP 2010520761 T	17-06-2010
		US 2010062038 A1	11-03-2010

WO 2004090161 A1	21-10-2004	EP 1616026 A1	18-01-2006
		EP 2065395 A1	03-06-2009
		JP 2006523444 T	19-10-2006
		US 2008118521 A1	22-05-2008

WO 2007104724 A2	20-09-2007	AUCUN	

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
 C 1 2 Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 A

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

(71) 出願人 512132491
 エタブリスモン フランセ ドュ サン
 ETABLISSEMENT FRANCAIS DU SANG
 フランス、エフ - 9 3 2 1 8 ラ プレンヌ サン デニス、アベニュー ドュ スタデ ド フラ
 ンス 2 0
 2 0 avenue du Stade de France, F - 9 3 2 1 8 La Pla
 ine Saint Denis, FRANCE

(74) 代理人 100065248
 弁理士 野河 信太郎

(74) 代理人 100159385
 弁理士 甲斐 伸二

(74) 代理人 100163407
 弁理士 金子 裕輔

(74) 代理人 100166936
 弁理士 稲本 潔

(74) 代理人 100174883
 弁理士 富田 雅己

(72) 発明者 デシャソー, フレデリック
 フランス、エフ - 3 7 0 0 0 トゥール、リュ ダントレーグ 2 8 3

(72) 発明者 センセベ, ルク
 フランス、エフ - 3 7 3 0 0 ジュエ レ トゥール、プティ ボワ ボヌヴィ (番地なし)

(72) 発明者 ルアス - フレイス, ナタリー
 フランス、エフ - 7 5 0 1 0 パリ、リュ ヴィック ダズール 1 9

(72) 発明者 ナジ, アブダラヒム
 アメリカ合衆国、カリフォルニア 9 2 0 0 8、カールスバッド、# 2、ジェファソン ストリー
 ト 2 7 3 0

(72) 発明者 カロセツラ, エドガルド デルフィノ
 フランス、エフ - 7 5 1 1 6 パリ、リュ ド ラ フザンドリー、1 1 6

F ターム (参考) 2G045 AA25 CA25 DA36 FB01 FB03
 4B024 AA11 BA31 CA20 HA12
 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ53 QR32 QR62 QS25 QX01

专利名称(译)	使用HLA-G同种型作为骨发育标志物		
公开(公告)号	JP2013511708A	公开(公告)日	2013-04-04
申请号	JP2012539468	申请日	2010-11-23
[标]申请(专利权)人(译)	提交SARRIA阵列内尔双原子等金迪Enel公司阿尔特本地扫描 原子能委员会 法国血液机构		
申请(专利权)人(译)	Komissaria一个Reneruji原子等太子港Eneruji阿尔特本地扫描 Etaburisumon法语社圣		
[标]发明人	デシャソーフレデリック センセベルク ルアスフレイスナタリー ナジアブダラヒム カロセツラエドガルドデルフィノ		
发明人	デシャソー,フレデリック センセベ,ルク ルアス-フレイス,ナタリー ナジ,アブダラヒム カロセツラ,エドガルド デルフィノ		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/68		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/68 G01N33/74		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.K C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA20 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QX01		
代理人(译)	清稻本润一 富田雅美		
优先权	2009005624 2009-11-23 FR		
其他公开文献	JP5695073B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及至少一种HLA-G同种型作为评估哺乳动物成骨的标志物的用途。

遺伝子	プライマー: センス アンチセンス
<i>GAPDH</i>	AATCCCATCACCATCTCCAGG (配列番号1) AGAGGCAGGGATGATGTTCTGG (配列番号2)
<i>BSP</i>	TTCCAGTTCAGGGCAGTAGTGAC (配列番号3) CTTCCCTTCTTCTCCATTGTCTC (配列番号4)
<i>PA</i>	CTGGACCTCGTTGACACCTG (配列番号5) GACATTCCTCGTTCACCGC (配列番号6)
<i>α-SM アクチン</i>	TCATGATGCTGTGTAGGTGGT (配列番号7) CTGTTCCAGCCATCCTTCAT (配列番号8)
<i>PTHRI</i>	ACATCTGCGTCCACATCAGGG (配列番号9) CCGTTACAGAGTCTCATTGGTG (配列番号10)
<i>SPARC</i>	ATCCCTGCCAGAACCACCACT (配列番号11) GCGCTTCTCAITTCATGGATCT (配列番号12)
<i>オステリックス</i>	ATGGCGTCCCTGCTTGAG (配列番号13) AGGGGTGTGTCATGTCCAGAGAGG (配列番号14)
<i>HLA-G</i>	CCTTTTCAATCTGAGCTCTTCTTT (配列番号15) GGAAGAGGAGACACGGAACA (配列番号16)