明　細　書

発明の名称 ：

骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療剤

技術分野

[0001] 本発明は、非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体を用いる骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療剤などに関する。本発明はまた、ＰＰＡＲγを誘導発現し、それによってアポトーシスまたは脂肪細胞分化を誘導する物質を骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療剤として選抜するためのスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] 骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍として、骨に発生する骨巨細胞腫、軟部に発生する腱鞘巨細胞腫、色素性絨毛結節性滑膜炎などが知られている。

骨巨細胞腫は、若年～中高年の膝関節周囲に好発する良性腫瘍で、男女比は１：１．３～１．５で女性の罹患率が高い。また、全骨腫瘍のうちの約５％、良性骨腫瘍のうちの約２０％を占めており、良性腫瘍ではあるが、再発率が１０～３０％と高く、また時に肺転移や悪性転化により治療に難渋する場合がある。病理所見では多核巨細胞と単球細胞の増生が主体で、間に紡錘型細胞をみとめる。腫瘍の本体は、この多核巨細胞ではなく、間質に存在する線維芽細胞様の紡錘形細胞と考えられている。さらに膝関節、肩関節、手関節などの関節近傍に発生するため、いかに再発を予防しかつ関節機能を温存する治療を行うかが重要である。

腱鞘巨細胞腫は、腱鞘、関節、滑液包の滑膜から発生する腫瘍性疾患である。病変の増殖型に基づいて限局型とびまん型に分類され、一般的に限局型の病変は腱鞘巨細胞腫、びまん型の腱鞘巨細胞腫は色素性絨毛結節性滑膜炎と同義とされている。腱鞘巨細胞腫は、３０～５０歳代の女性に好発し、手指の関節近傍や屈筋腱上に約８５％が発生し、次いで足趾に発生する。骨内

に浸潤することもある。病理所見では、卵円形～紡錘形の組織球様単核細胞が主体で、多核巨細胞と泡沫細胞にヘモジデリン沈着を伴う。治療は、良性腫瘍に準じて腫瘍切除術（単純摘出術）を行うが、再発率は４～３０％と報告されている。

色素性絨毛結節性滑膜炎は、４０歳以下の比較的若年成人でやや女性に多く、膝関節が最も多く、股・足・肘・肩関節などにも発生する。関節内に滑膜の絨毛像や結節様の増殖をきたし、関節血症をしばしば認め、また骨内にも浸潤するため二次変形性関節症を生じる。病理所見では、滑膜細胞様の単核細胞と多核巨細胞、泡沫細胞、ヘモジデリン貪食細胞、炎症性細胞などが混在する。治療は、手術で腫瘍を切除するが全切除が困難で、再発率は４０～５０％と高い。

骨巨細胞腫、腱鞘巨細胞腫、色素性絨毛結節性滑膜炎はいずれも、現時点では手術以外の有効な治療法は開発されていない。

軟骨肉腫は原発性悪性骨腫瘍の約２０％を占め、骨肉腫に次いで頻度が高い。組織学的に通常型軟骨肉腫、骨膜性軟骨肉腫、間葉性軟骨肉腫、脱分化型軟骨肉腫、淡明細胞型軟骨肉腫、骨外性粘液型軟骨肉腫などに分類される。通常型は、３０～５０歳代に好発しやや男性に多い。骨盤骨に最も多く発生し、次いで肋骨・大腿骨近位・上腕骨近位・大腿骨遠位に多い。間葉性軟骨肉腫は通常型軟骨肉腫よりも若い１０～３０歳代に好発し、顎骨・脊椎・腸骨・肋骨・大腿骨遠位部などに好発する。脱分化型軟骨肉腫は、低悪性通常型軟骨肉腫から非軟骨性高悪性腫瘍が生じるもので、両者は明瞭な境界をもって隣接している。５０～６０歳代に好発し、大腿骨が最も多く、次いで骨盤・上腕骨に多い。淡明細胞型軟骨肉腫は、２０～５０歳代に好発し、約２／３は上腕骨骨頭・大腿骨骨頭に発生する。その他、頭蓋骨・脊椎・手足の骨に発生する。骨外性粘液型軟骨肉腫は、４０～５０歳代に好発し、大腿などの四肢の近位部や体幹の深部軟部組織や四肢末端部や縦隔、後腹膜などの軟部組織に生じることがある。これらは、現在のところ手術以外の有効な治療は開発されていない。

[0003] ところで、Ｐｅｒｏｘｉｓｏｍｅ Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｏｒ－Ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ γ（ＰＰＡＲγ：ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体γ）は、核内受容体スーパーファミリーに属するタンパク質であり、転写因子としても機能する。ＰＰＡＲγは主に脂肪組織に分布して脂肪細胞分化などに関与する他、マクロファージや血管内皮細胞などにも発現が見られるが、その他の作用として、抗糖尿病作用、抗動脈硬化作用、骨代謝、抗腫瘍作用、抗炎症作用を有することが報告されている。例えば、ＰＰＡＲγの活性化は種々の腫瘍に対してアポトーシスを引き起こすことが報告され（非特許文献１、２）、乳癌（非特許文献３）や大腸癌（非特許文献４）、肺癌（非特許文献５）など様々な癌細胞においてＰＰＡＲγが発現していることが確認されている。また、ＰＰＡＲγの活性化は、ＰＰＡＲγリガンドの他にも非ステロイド性抗炎症剤によっても誘導され、細胞死を誘導することが報告されている（非特許文献６）。

[0004] しかしながら、これまでに骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍のＰＰＡＲγの発現およびＰＰＡＲγを標的とした治療に関する報告はなく、腱鞘巨細胞腫または骨巨細胞腫の類似疾患である色素性絨毛結節性滑膜炎に対して、ＩＬ－６産生抑制による細胞増殖抑制、抗炎症作用を有するミゾリビンが開示されているのみである（特許文献１）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：ＷＯ２００８／０２６７２９

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Ｊｐｎ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１９９９；９０：７５－８０

非特許文献2：ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．１９９９；４５５：１３５－１３９

非特許文献3：Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．２０１１；８２：４６４－４７５

非特許文献4：Ｃａｎｃｅｒ Ｌｅｔｔ．２０１０；２９７：６５－７４

非特許文献5：Ｍｏｌ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．２００７；７２：６７４－６８５

非特許文献6：Ｊ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ　Ｅｘｐ　Ｔｈｅｒ．２００２；３０２：１８－２５

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の目的は、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫にＰＰＡＲγの発現を誘導し、かつＰＰＡＲγを介したアポトーシスまたは脂肪細胞分化を誘導する物質を骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療剤として提供することである。本発明のさらなる目的は、ＰＰＡＲγを誘導発現し、それによってアポトーシスまたは脂肪細胞分化を誘導する物質を骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療剤として選抜するためのスクリーニング方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫においては通常、ＰＰＡＲγが発現していないことを確認した。またその一方で、非ステロイド性抗炎症剤の一つであり、ＰＰＡＲγ作動活性を有するザルトプロフェンを投与した骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍である骨巨細胞腫においてはＰＰＡＲγが発現しており、アポトーシスや脂肪細胞への分化が誘導されていることを確認した。

本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本発明は、

［１］非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体を有効成分として含有する、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療剤；

［２］非ステロイド性抗炎症剤がザルトプロフェン、ジクロフェナク、インドメタシン、オキサプロジン、アセトアミノフェンおよびケトプロフェンか

らなる群から選択される、前記［１］に記載の予防または治療剤；

［３］チアゾリジン誘導体がトログリタゾン、ロシグリタゾン、ピオグリタゾン、バラグリタゾンおよびリボグリタゾンからなる群から選択される、前記［１］に記載の予防または治療剤；

［４］骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍が、骨巨細胞腫、腱鞘巨細胞腫および色素性絨毛結節性滑膜炎からなる群から選択される、前記［１］から［３］のいずれか１つに記載の予防または治療剤；

［５］以下の工程を含む、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療剤のスクリーニング方法

（１）骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫由来細胞を被検物質の存在下または非存在下で培養する工程、

（２）両条件下、ＰＰＡＲγ遺伝子の発現、および

（ｉ）アポトーシス関連遺伝子の発現、または

（ｉｉ）脂肪細胞分化関連遺伝子の発現もしくは脂質の発現

をそれぞれ測定する工程、

（３）被検物質非存在下と比較して、ＰＰＡＲγ遺伝子の発現、および

（ｉ）アポトーシス関連遺伝子の発現、または

（ｉｉ）脂肪細胞分化関連遺伝子の発現もしくは脂質の発現

を有意に変動させる被検物質を選択する工程；

［６］骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍が、骨巨細胞腫、腱鞘巨細胞腫および色素性絨毛結節性滑膜炎からなる群から選択される、前記［５］に記載のスクリーニング方法；

［７］非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体の有効量を対象に投与することを含む、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療方法；

［８］非ステロイド性抗炎症剤がザルトプロフェン、ジクロフェナク、インドメタシン、オキサプロジン、アセトアミノフェンおよびケトプロフェンからなる群から選択される、前記［７］に記載の予防または治療方法；

［９］チアゾリジン誘導体がトログリタゾン、ロシグリタゾン、ピオグリタゾン、バラグリタゾンおよびリボグリタゾンからなる群から選択される、前記［７］に記載の予防または治療方法；

［１０］骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍が、骨巨細胞腫、腱鞘巨細胞腫および色素性絨毛結節性滑膜炎からなる群から選択される、前記［７］から［９］のいずれか１つに記載の予防または治療方法；

［１１］骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療に使用するための、非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体；

［１２］非ステロイド性抗炎症剤がザルトプロフェン、ジクロフェナク、インドメタシン、オキサプロジン、アセトアミノフェンおよびケトプロフェンからなる群から選択される、前記［１１］に記載の非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体；

［１３］チアゾリジン誘導体がトログリタゾン、ロシグリタゾン、ピオグリタゾン、バラグリタゾンおよびリボグリタゾンからなる群から選択される、前記［１１］に記載の非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体；

［１４］骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍が、骨巨細胞腫、腱鞘巨細胞腫および色素性絨毛結節性滑膜炎からなる群から選択される、前記［１１］から［１３］のいずれか１つに記載の非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体；

などを提供する。

発明の効果

[0010] 本発明の予防または治療剤を用いることによって、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫患者に対しては外科手術前または後の化学療法剤として、あるいは骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫を発症するおそれがある者に対しては予防剤として投与することができる。また、本発明によれば、ＰＰＡＲγおよびアポトーシスまたは脂肪細胞分化を制御する被検物質を選択することにより、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫に対する新規予防または治療剤の探索が可能となる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]ザルトプロフェン含有培地で培養したＧＣＴ培養細胞の増殖抑制の結果を示す図である。

[図2]ザルトプロフェン含有培地で培養したＧＣＴ培養細胞における、Ｔｕｎｅｌ　ａｓｓａｙの結果を示す図である。

[図3]ザルトプロフェン含有培地で培養したＧＣＴ培養細胞における、Ｔｕｎｅｌ陽性細胞の割合を示すグラフである。

[図4]ザルトプロフェン含有培地で培養したＧＣＴ培養細胞における、Ｃａｓｐａｓｅ３染色の結果を示す図である。

[図5]ザルトプロフェン含有培地で培養したＧＣＴ培養細胞における、Ｃａｓｐａｓｅ３陽性細胞の割合を示すグラフである。

[図6]ザルトプロフェン含有培地で培養したＧＣＴ培養細胞における、ＰＰＡＲγ染色の結果を示す図である。

[図7]ザルトプロフェン含有培地で培養したＧＣＴ培養細胞における、ＰＰＡＲγ陽性細胞の割合を示すグラフである。

[図8]ザルトプロフェン含有培地で培養したＧＣＴ培養細胞における、脂質染色の結果を示す図である。

[図9]ザルトプロフェン含有培地で培養したＧＣＴ培養細胞における、脂質陽性細胞の割合を示すグラフである。

[図10]ザルトプロフェン投与されたＧＣＴ患者由来のＧＣＴ標本における、Ｔｕｎｅｌ　ａｓｓａｙおよびＣａｓｐａｓｅ３染色の結果を示す図である。

[図11]ザルトプロフェン投与されたＧＣＴ患者由来のＧＣＴ標本における、ＰＰＡＲγ染色の結果を示す図である。

[図12]アセトアミノフェン、インドメタシン、ジクロフェナクまたはトログリタゾン含有培地で培養したＧＣＴ培養細胞の増殖抑制の結果を示す図である。

[図13]アセトアミノフェン、インドメタシン、ジクロフェナクまたはトログ

リタゾン含有培地で培養したＧＣＴ培養細胞の増殖抑制の結果を示す図である。

[図14]ザルトプロフェンまたはトログリタゾン含有培地で培養したＧＣＴ培養細胞に対するＰＰＡＲγ　ｓｉＲＮＡの効果を示す図である。

[図15]ザルトプロフェンまたはトログリタゾン含有培地で培養したＧＣＴ培養細胞に対するＰＰＡＲγ　ｓｉＲＮＡの効果を示す図である。

[図16]ザルトプロフェン含有培地で培養した腱鞘巨細胞腫由来の培養細胞または色素性絨毛結節性滑膜炎由来の培養細胞の増殖抑制の結果を示す図である。

[図17]トログリタゾン含有培地で培養した腱鞘巨細胞腫由来の培養細胞または色素性絨毛結節性滑膜炎由来の培養細胞の増殖抑制の結果を示す図である。

[図18]ザルトプロフェンまたはトログリタゾン含有培地で培養した腱鞘巨細胞腫由来の培養細胞における、Ｔｕｎｅｌ　ａｓｓａｙの結果を示す図である。

[図19]ザルトプロフェンまたはトログリタゾン含有培地で培養した腱鞘巨細胞腫由来の培養細胞における、Ｔｕｎｅｌ陽性細胞の割合を示すグラフである。

[図20]ザルトプロフェンまたはトログリタゾン含有培地で培養した色素性絨毛結節性滑膜炎由来の培養細胞における、Ｔｕｎｅｌ　ａｓｓａｙの結果を示す図である。

[図21]ザルトプロフェンまたはトログリタゾン含有培地で培養した色素性絨毛結節性滑膜炎由来の培養細胞における、Ｔｕｎｅｌ陽性細胞の割合を示すグラフである。

[図22]ザルトプロフェンまたはトログリタゾン含有培地で培養した腱鞘巨細胞腫由来の培養細胞における、Ｃａｓｐａｓｅ３染色の結果を示す図である。

[図23]ザルトプロフェンまたはトログリタゾン含有培地で培養した腱鞘巨細

胞腫由来の培養細胞における、Ｃａｓｐａｓｅ３陽性細胞の割合を示すグラフである。

[図24]ザルトプロフェンまたはトログリタゾン含有培地で培養した色素性絨毛結節性滑膜炎由来の培養細胞における、Ｃａｓｐａｓｅ３染色の結果を示す図である。

[図25]ザルトプロフェンまたはトログリタゾン含有培地で培養した色素性絨毛結節性滑膜炎由来の培養細胞における、Ｃａｓｐａｓｅ３陽性細胞の割合を示すグラフである。

[図26]ザルトプロフェンまたはトログリタゾン含有培地で培養した腱鞘巨細胞腫由来の培養細胞における、ＰＰＡＲγ染色の結果を示す図である。

[図27]ザルトプロフェンまたはトログリタゾン含有培地で培養した腱鞘巨細胞腫由来の培養細胞における、ＰＰＡＲγ陽性細胞の割合を示すグラフである。

[図28]ザルトプロフェンまたはトログリタゾン含有培地で培養した色素性絨毛結節性滑膜炎由来の培養細胞における、ＰＰＡＲγ染色の結果を示す図である。

[図29]ザルトプロフェンまたはトログリタゾン含有培地で培養した色素性絨毛結節性滑膜炎由来の培養細胞における、ＰＰＡＲγ陽性細胞の割合を示すグラフである。

[図30]ザルトプロフェン含有培地で培養した腱鞘巨細胞腫由来の培養細胞または色素性絨毛結節性滑膜炎由来の培養細胞における、脂質染色の結果を示す図である。

[図31]ザルトプロフェン含有培地で培養した腱鞘巨細胞腫由来の培養細胞または色素性絨毛結節性滑膜炎由来の培養細胞における、脂質陽性細胞の割合を示すグラフである。

[図32]ピオグリタゾン含有培地で培養したＧＣＴ培養細胞、腱鞘巨細胞腫由来の培養細胞、色素性絨毛結節性滑膜炎由来の培養細胞の増殖抑制の結果を示す図である。

[図33]ザルトプロフェン服用前の骨盤部骨巨細胞腫再発患者の骨盤部のレントゲン像を示す図である。

[図34]ザルトプロフェン服用前の骨盤部骨巨細胞腫再発患者の骨盤部のＭＲＩ像を示す図である。

[図35]ザルトプロフェン服用後２ヶ月経過後の骨盤部骨巨細胞腫再発患者の骨盤部のＭＲＩ像を示す図である。矢印は腫瘍の壊死領域を示す。

[図36]ザルトプロフェン服用後４ヶ月経過後の骨盤部骨巨細胞腫再発患者の骨盤部のＭＲＩ像を示す図である。矢印は腫瘍の壊死領域を示す。

[図37]ザルトプロフェン投与前の右膝部色素性絨毛結節性滑膜炎再発患者の右膝部矢状面のＭＲＩ像を示す図である。

[図38]ザルトプロフェン投与前の右膝部色素性絨毛結節性滑膜炎再発患者の右膝部横断面のＭＲＩ像を示す図である。

[図39]ザルトプロフェン投与後３ヶ月経過後の右膝部色素性絨毛結節性滑膜炎再発患者の右膝部矢状面のＭＲＩ像を示す図である。矢印はＭＲＩ造影効果の減弱を示す。

[図40]ザルトプロフェン投与後３ヶ月経過後の右膝部色素性絨毛結節性滑膜炎再発患者の右膝部横断面）のＭＲＩ像を示す図である。矢印はＭＲＩ造影効果の減弱を示す。

[図41]ザルトプロフェン投与前の右膝部色素性絨毛結節性滑膜炎再発患者の右膝部冠状面のＭＲＩ像を示す図である。

[図42]ザルトプロフェン投与前の右膝部色素性絨毛結節性滑膜炎再発患者の右膝部横断面のＭＲＩ像を示す図である。

[図43]ザルトプロフェン投与後２ヶ月経過後の右膝部色素性絨毛結節性滑膜炎再発患者の右膝部冠状面のＭＲＩ像を示す図である。矢印は腫瘤の縮小を示す。

[図44]ザルトプロフェン投与後２ヶ月経過後の右膝部色素性絨毛結節性滑膜炎再発患者の右膝部横断面のＭＲＩ像を示す図である。矢印は腫瘤の縮小を示す。

[図45]ザルトプロフェン、トログリタゾンまたはピオグリタゾン含有培地で培養した軟骨肉腫由来細胞株の増殖抑制の結果を示す図である。

[図46]ザルトプロフェン、トログリタゾンまたはピオグリタゾン含有培地で培養した軟骨肉腫由来細胞株における、Ｃａｓｐａｓｅ３染色の結果を示す図である。

[図47]ザルトプロフェン、トログリタゾンまたはピオグリタゾン含有培地で培養した軟骨肉腫由来細胞株における、Ｃａｓｐａｓｅ３陽性細胞の割合を示すグラフである。

[図48]ザルトプロフェン、トログリタゾンまたはピオグリタゾン含有培地で培養した軟骨肉腫由来細胞株における、ＰＰＡＲγ染色の結果を示す図である。

[図49]ザルトプロフェン、トログリタゾンまたはピオグリタゾン含有培地で培養した軟骨肉腫由来細胞株における、ＰＰＡＲγ陽性細胞の割合を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] 発明者らは、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍患者由来の細胞にＰＰＡＲγが発現していないことを見出し、併せてＰＰＡＲγ作動活性を有する特定の物質が骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍にＰＰＡＲγを発現誘導し、同時にアポトーシスまたは脂肪細胞分化を誘導したことを発見した。従って、本発明はＰＰＡＲγ発現誘導活性およびＰＰＡＲγ作動活性によって、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍にＰＰＡＲγを介したアポトーシスまたは脂肪細胞分化を誘導できる、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍の予防または治療剤を提供する。また、本発明は、ＰＰＡＲγ発現誘導活性およびＰＰＡＲγ作動活性によって、ＰＰＡＲγを介したアポトーシスまたは脂肪細胞分化を誘導できる、軟骨肉腫の予防または治療剤も提供する。

[0013] 本発明の予防または治療剤が適用できる骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍としては、骨・軟部に発生する巨細胞が観察される腫瘍であれば特に制限はない。特に、骨、関節や腱鞘周辺に巨細胞を生じる腫瘍に好ましく適用する

ことができる。また、骨・軟部に発生する巨細胞が観察される腫瘍としては、良性腫瘍であることが好ましい。そのような腫瘍としては、例えば、骨巨細胞腫、腱鞘巨細胞腫、色素性絨毛結節性滑膜炎などが挙げられる。また、その他の骨・軟部に発生する良性の巨細胞性腫瘍としては、軟骨芽細胞腫、非骨化性線維腫、骨芽細胞腫、動脈瘤様骨嚢腫なども挙げられる。

また、本発明の予防または治療剤が適用できる軟骨肉腫としては、通常型軟骨肉腫、骨膜性軟骨肉腫、間葉性軟骨肉腫、脱分化型軟骨肉腫、淡明細胞型軟骨肉腫、骨外性粘液型軟骨肉腫などが挙げられる。

あるいは、本発明の予防または治療剤は、ＰＰＡＲγの発現を認める腫瘍に用いることもできる。ＰＰＡＲγの発現を認める腫瘍としては、乳癌、大腸癌、肺癌、甲状腺癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、肝臓癌、腎臓癌、膀胱癌、卵巣癌、子宮頸癌、前立腺癌、悪性黒色腫、白血病、悪性リンパ腫、脂肪肉腫、平滑筋肉腫、骨肉腫などが挙げられる。

[0014] ＰＰＡＲγとは、核内受容体スーパーファミリーに属するタンパク質であり、核内受容体の１つであるレチノイドＸ受容体（ＲＸＲ）とヘテロ二量体を形成することでＰＰＡＲ応答領域（ＰＰＲＥ）を認識し、下流遺伝子の転写を活性化する。

[0015] 本発明において、ＰＰＡＲγの発現誘導活性を有し、かつＰＰＡＲγ作動活性を有する物質としては、非ステロイド性抗炎症剤を挙げることができる。従って、ＰＰＡＲγ発現誘導活性およびＰＰＡＲγ作動活性によって、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫にＰＰＡＲγを介したアポトーシスまたは脂肪細胞分化を誘導できる、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療剤とは、一実施態様においては、非ステロイド性抗炎症剤を有効成分として含有する、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療剤である。ここで、非ステロイド性抗炎症剤とは、シクロオキシゲナーゼ阻害により、プロスタグランジンおよびトロンボキサンの合成を阻害し、抗炎症作用を発揮する化合物であれば特に制限されないが、例えば、ザルトプロフェン、ジクロフェナク、インドメタシ

ン、オキサプロジン、アセトアミノフェン、ケトプロフェンなどが挙げられ、好ましくは、ザルトプロフェン、ジクロフェナク、インドメタシンが挙げられる。また、非ステロイド性抗炎症剤以外では、例えば、チアゾリジン誘導体が挙げられる。従って、ＰＰＡＲγ発現誘導活性およびＰＰＡＲγ作動活性によって、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫にＰＰＡＲγを介したアポトーシスまたは脂肪細胞分化を誘導できる、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療剤とは、チアゾリジン誘導体を有効成分として含有する、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療剤である。チアゾリジン誘導体は、ＰＰＡＲγを活性化することが知られ、アディポネクチン遺伝子の転写を促進するＰＰＡＲγアゴニストである。チアゾリジン誘導体としては、例えば、トログリタゾン、ロシグリタゾン、ピオグリタゾン、バラグリタゾン、リボグリタゾンなどが挙げられる。

[0016] 本発明において、非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体を含む、ＰＰＡＲγの発現誘導活性を有し、かつＰＰＡＲγ作動活性を有する物質のＰＰＡＲγ発現誘導活性は、後述する公知の方法で確認することができ、例えば、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫から通常の方法でｍＲＮＡを抽出し、ＰＰＡＲγ転写産物を増幅できるようなプライマーを用いて、逆転写反応およびＰＣＲを行う方法や、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫を固定または細胞破砕物を抽出し、ＰＰＡＲγ翻訳産物に対する抗体を用いて抗原抗体反応を用いた手法で、その発現を確認することができる。ＰＰＡＲγの転写産物、翻訳産物は公知であり、例えば、転写産物としてＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＢＣ００６８１１に塩基配列情報が開示されており、翻訳産物として、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＡＡＨ０６８１１にアミノ酸配列情報が開示されている。また、ＰＰＡＲγ作動活性は、例えば、下流遺伝子の発現レベルまたは脂質の発現レベルを測定することで確認することができる。ＰＰＡＲγの下流遺伝子としては、例えば、アポトーシス関連遺伝子、脂肪細胞分化関

連遺伝子、動脈硬化関連遺伝子、抗炎症関連遺伝子などが挙げられる。ここで、アポトーシス関連遺伝子としては、アポトーシスシグナルを担う遺伝子であってよいし、アポトーシスのマーカー遺伝子であってもよい。アポトーシス関連遺伝子としては、例えば、Ｃａｓｐａｓｅ３、ｐ５３などが挙げられる。Ｃａｓｐａｓｅ３の転写産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＢＣ０１６９２６に塩基配列情報が開示されており、またその翻訳産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＡＡＨ１６９２６にアミノ酸配列情報が開示されている。ｐ５３の転写産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＮＭ＿０００５４６に塩基配列情報が開示されており、またその翻訳産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＮＰ＿０００５３７にアミノ酸配列情報が開示されている。また、脂肪細胞分化関連遺伝子としては、脂肪細胞への分化を誘発する遺伝子であってよいし、脂肪細胞分化のマーカー遺伝子であってもよい。脂肪細胞分化関連遺伝子としては、例えば、Ｓｅｔｄ８（ＳＥＴ　ｄｏｍａｉｎ　ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ（ｌｙｓｉｎｅ　ｍｅｔｈｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ）８）、Ｓｅｔｄｂ１（ＳＥＴ　ｄｏｍａｉｎ，　ｂｉｆｕｒｃａｔｅｄ　１）、ＬＰＬ（Ｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ　Ｌｉｐａｓｅ）、Ｌｅｐｔｉｎ、ＦＡＢＰ４／ａＰ２（ｆａｔｔｙ　ａｃｉｄ－ｂｉｎｄｉｎｇ　ｐｒｏｔｅｉｎ－４）、Ａｄｉｐｏｎｅｃｔｉｎ、ａ２Ｃｏｌ６（α　ｃｈａｉｎ　２　ｏｆ　ｔｙｐｅ　６　ｃｏｌｌａｇｅｎ）などが挙げられる。Ｓｅｔｄ８の転写産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＮＭ＿０２０３８２に塩基配列情報が開示されており、またその翻訳産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＮＰ＿０６５１１５にアミノ酸配列情報が開示されている。Ｓｅｔｄｂ１の転写産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＢＣ０２８６７１に塩基配列情報が開示されており、またその翻訳産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＡＡＨ２８６７１にアミノ酸配列情報が開示されている。ＬＰＬの転写産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅ

ｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＢＣ０１１３５３に塩基配列情報が開示されており、またその翻訳産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＡＡＨ１１３５３にアミノ酸配列情報が開示されている。Ｌｅｐｔｉｎの転写産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＢＣ０６９４５２に塩基配列情報が開示されており、またその翻訳産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＡＡＨ６９４５２にアミノ酸配列情報が開示されている。ＦＡＢＰ４／ａＰ２の転写産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＢＣ００３６７２に塩基配列情報が開示されており、またその翻訳産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＡＡＨ０３６７２にアミノ酸配列情報が開示されている。Ａｄｉｐｏｎｅｃｔｉｎの転写産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＢＣ０９６３０８に塩基配列情報が開示されており、またその翻訳産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＡＡＨ９６３０８にアミノ酸配列情報が開示されている。ａ２Ｃｏｌ６の転写産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＢＣ００２４８３に塩基配列情報が開示されており、またその翻訳産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＡＡＨ００２４８３にアミノ酸配列情報が開示されている。動脈硬化関連遺伝子としては、例えば、ＡＴ１Ｒ（ａｎｇｉｏｔｅｎｓｉｎ　ＩＩ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ　Ｉ）などが挙げられる。ＡＴ１Ｒの転写産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＢＣ０６８４９４に塩基配列情報が開示されており、またその翻訳産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＡＡＨ６８４９４にアミノ酸配列情報が開示されている。抗炎症関連遺伝子としては、例えば、ＮＦ－κＢ（ｎｕｃｌｅａｒ　ｆａｃｔｏｒ　ｋａｐｐａ－ｌｉｇｈｔ－ｃｈａｉｎ－ｅｎｈａｎｃｅｒ　ｏｆ　ａｃｔｉｖａｔｅｄ　Ｂ　ｃｅｌｌｓ）などが挙げられる。ＮＦ－κＢの転写産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＮＭ＿００３９９８に塩基配列情報が開示されており、またその翻訳産物としては、ＧｅｎＢａｎｋのａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ

．ＮＰ＿００３９８９にアミノ酸配列情報が開示されている。また、脂質としては、脂肪細胞または組織中に含まれる脂質であれば特に制限されないが、リン脂質、糖脂質、リポタンパク質、中性脂肪、セラミドなどが挙げられる。

[0017] 具体的には、ＰＰＡＲγ発現誘導活性の測定は、細胞からＲＮＡ（例：全ＲＮＡ、ｍＲＮＡ）画分を調製し、該画分中に含まれるＰＰＡＲγ遺伝子の転写産物を検出することにより調べることができる。ＲＮＡ画分の調製は、グアニジンーＣｓＣｌ超遠心法、ＡＧＰＣ法など公知の手法を用いて行うことができるが、市販のＲＮＡ抽出用キット（例：ＲＮｅａｓｙ Ｍｉｎｉ Ｋｉｔ；ＱＩＡＧＥＮ製等）を用いて、少ない細胞から迅速且つ簡便に高純度の全ＲＮＡを調製することができる。ＲＮＡ画分中の該遺伝子の転写産物を検出する手段としては、例えば、ハイブリダイゼーション（ノーザンブロット、ドットブロット、ＤＮＡチップ解析等）を用いる方法、あるいはＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ、競合ＰＣＲ、リアルタイムＰＣＲ等）を用いる方法などが挙げられる。微量試料から迅速且つ簡便に定量性よく該遺伝子の発現変動を検出できる点で競合ＰＣＲやリアルタイムＰＣＲなどの定量的ＰＣＲ法が好ましい。

[0018] ノーザンブロットまたはドットブロットハイブリダイゼーションによる場合、ＰＰＡＲγ遺伝子の検出は、例えば、該遺伝子の転写産物を特異的に検出し得る核酸プローブを用いて行うことができる。ＰＰＡＲγ発現誘導活性の測定に用いられる核酸プローブは、約１５塩基以上、好ましくは約１８～約５００塩基、より好ましくは約１８～約２００塩基、いっそう好ましくは約１８～約５０塩基の連続した該遺伝子の一部または全部を含むポリヌクレオチドまたはその相補配列をふくむポリヌクレオチドである。ＰＰＡＲγ遺伝子の一部または全部としては、前述した公知のＰＰＡＲγの塩基配列の一部または全部が挙げられる。該ポリヌクレオチドはＤＮＡであってもＲＮＡであってもよく、あるいはＤＮＡ／ＲＮＡキメラであってもよい。好ましくはＤＮＡが挙げられる。また、プローブとして用いられるポリヌクレオチド

は、二本鎖であっても一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖ＤＮＡ、二本鎖ＲＮＡまたはＤＮＡ：ＲＮＡのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、アンチセンス鎖を用いることができる。

[0019] また、ＰＰＡＲγ発現誘導活性の測定に用いられる核酸プローブは、ＰＰＡＲγ遺伝子の転写産物にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドである。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ）第２版（Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂ．Ｐｒｅｓｓ，１９８９）に記載の方法などに従って行なうことができる。ストリンジェントな条件としては、例えば、６×ＳＳＣ（ｓｏｄｉｕｍ ｃｈｌｏｒｉｄｅ／ｓｏｄｉｕｍ ｃｉｔｒａｔｅ）中４５℃でのハイブリダイゼーション反応の後、０．２×ＳＳＣ／０．１％ ＳＤＳ中６５℃での一回以上の洗浄などが挙げられる。当業者は、ハイブリダイゼーション溶液の塩濃度、ハイブリダイゼーション反応の温度、プローブ濃度、プローブの長さ、ミスマッチの数、ハイブリダイゼーション反応の時間、洗浄液の塩濃度、洗浄の温度等を適宜変更することにより、所望のストリンジェンシーに容易に調節することができる。

[0020] ＰＰＡＲγ遺伝子の発現を検出し得るプローブとして機能する核酸は、該遺伝子の転写産物の一部もしくは全部を増幅し得る後述するプライマーセットを用い、個体（例：ヒト、サル、マウス、ラット、イヌ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、ウサギ、ハムスター、モルモット等、好ましくはヒト）のあらゆる細胞［例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、線維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞もしくは間質細

胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など］もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織［例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆嚢、骨髄、副腎、皮膚、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、脂肪組織、骨格筋など］由来のｃＤＮＡもしくはゲノムＤＮＡを鋳型としてＰＣＲ法によって所望の長さの核酸を増幅するか、前記した細胞・組織由来のｃＤＮＡもしくはゲノムＤＮＡライブラリーから、コロニーもしくはプラークハイブリダイゼーション等により上記遺伝子もしくはｃＤＮＡをクローニングし、必要に応じて制限酵素等を用いて適当な長さの断片とすることにより取得することができる。ハイブリダイゼーションは、例えば、モレキュラー・クローニング（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ）第２版（前述）に記載の方法などに従って行なうことができる。あるいは、該核酸は、前記のＰＰＡＲγ遺伝子の塩基配列情報に基づいて、該塩基配列および／またはその相補鎖配列の一部もしくは全部を市販のＤＮＡ／ＲＮＡ自動合成機等を用いて化学的に合成することによっても得ることができる。また、シリコンやガラス等の固相上で該核酸を直接ｉｎ　ｓｉｔｕ（ｏｎ　ｃｈｉｐ）合成することにより、該核酸が固相化されたチップを作成することもできる。

［0021］　また、ＰＰＡＲγ遺伝子の転写産物の一部もしくは全部を増幅し得るプライマーとして機能する核酸は、前述のＰＰＡＲγ遺伝子の塩基配列情報に基づいて、該塩基配列およびその相補鎖配列の一部を市販のＤＮＡ／ＲＮＡ自動合成機等を用いて化学的に合成することによって得ることができる。

［0022］　該核酸は、標的核酸の検出・定量を可能とするために、標識剤により標識されていることが好ましい。標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、〔^{32}Ｐ〕、〔^{3}Ｈ〕、〔^{14}Ｃ〕などが用いられる。酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、βーガラクトシダーゼ、βーグル

コシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、プローブと標識剤との結合にビオチンー（ストレプト）アビジンを用いることもできる。

[0023] ノーザンハイブリダイゼーションによる場合は、上記のようにして調製したＲＮＡ画分をゲル電気泳動にて分離した後、ニトロセルロース、ナイロン、ポリビニリデンジフロリド等のメンブレンに転写し、上記のようにして調製された標識プローブを含むハイブリダイゼーション緩衝液中、特異的にハイブリダイゼーションさせた後、適当な方法でメンブレンに結合した標識量をバンド毎に測定することにより、ＰＰＡＲγ遺伝子の発現量を測定することができる。ドットブロットの場合も、ＲＮＡ画分をスポットしたメンブレンを同様にハイブリダイゼーション反応に付し、スポットの標識量を測定することにより、該遺伝子の発現量を測定することができる。

[0024] ＤＮＡチップ解析による場合、例えば、上記のようにして調製したＲＮＡ画分から、逆転写反応によりＴ７プロモーター等の適当なプロモーターを導入したｃＤＮＡを合成し、さらにＲＮＡポリメラーゼを用いてｃＲＮＡを合成する（この時ビオチンなどで標識したモノヌクレオチドを基質として用いることにより、標識されたｃＲＮＡが得られる）。この標識ｃＲＮＡを、上記したプローブを固相化したチップと接触させてハイブリダイゼーション反応させ、固相上の各プローブに結合した標識量を測定することにより、ＰＰＡＲγ遺伝子の発現量を測定することができる。

[0025] 別の好ましい実施態様によれば、ＰＰＡＲγ遺伝子の発現を測定する方法として定量的ＰＣＲ法が用いられる。定量的ＰＣＲとしては、例えば、競合ＰＣＲやリアルタイムＰＣＲなどがある。

ＰＣＲにおいてプライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドのセットとしては、例えば、前述のＰＰＡＲγ遺伝子の転写産物を特異的に検出し得

る核酸プライマーを挙げることができる。１つの好ましい態様においては、本発明の検査方法に用いられる核酸プライマーとしては、約１５塩基以上、好ましくは約１５～約５０塩基、より好ましくは約１５～約３０塩基、いっそう好ましくは約１５～約２５塩基の連続したヌクレオチド配列の長さを有し、約１００ｂｐ～数ｋｂｐのＤＮＡ断片を増幅するようにデザインされたポリヌクレオチド（センス鎖）配列に相補的なポリヌクレオチド、及び前記のポリヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド（アンチセンス鎖）にハイブリダイズし得るポリヌクレオチドのオリゴヌクレオチドのセットが挙げられる。

[0026] 競合ＲＴ－ＰＣＲとは、目的のＤＮＡを増幅し得るプライマーのセットにより増幅され得る既知量の他の鋳型核酸をｃｏｍｐｅｔｉｔｏｒとして反応液中に共存させて競合的に増幅反応を起こさせ、増幅産物の量を比較することにより、目的ＤＮＡの量を算出する方法をいう。したがって、競合ＲＴ－ＰＣＲによる場合、上記したプライマーセットに加えて、該プライマーセットで増幅でき、増幅後に標的核酸（すなわち、ＰＰＡＲγ遺伝子の塩基配列情報の転写産物）の増幅産物と区別することができる（例えば、増幅サイズが異なる、制限酵素処理断片の泳動パターンが異なるなど）既知量のｃｏｍｐｅｔｉｔｏｒ核酸が用いられる。標的核酸とｃｏｍｐｅｔｉｔｏｒ核酸とはプライマーを奪い合って増幅が競合的に起こるので、増幅産物の量比が元の鋳型の量比を反映することになる。ｃｏｍｐｅｔｉｔｏｒ核酸はＤＮＡでもＲＮＡでもよい。ＤＮＡの場合、上記のようにして調製されるＲＮＡ画分から逆転写反応によりｃＤＮＡを合成した後に、上記プライマーセットおよびｃｏｍｐｅｔｉｔｏｒの共存下でＰＣＲを行えばよく、ＲＮＡの場合は、ＲＮＡ画分にｃｏｍｐｅｔｉｔｏｒを添加して逆転写反応を行い、さらに上記プライマーセットを添加してＰＣＲを実施すればよい。後者の場合、逆転写反応の効率も考慮に入れているので、元のｍＲＮＡの絶対量を推定することができる。

[0027] 一方、リアルタイムＰＣＲは、蛍光試薬を用いて増幅量をリアルタイムで

モニタリングする方法であり、サーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化した装置を必要とする。このような装置は市販されている。用いる蛍光試薬によりいくつかの方法があり、例えば、インターカレンター法、ＴａｑＭａｎ™プローブ法、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｅａｃｏｎ法等が挙げられる。いずれも、上記のようにして調製されるＲＮＡ画分から逆転写反応によりｃＤＮＡを合成した後に、上記プライマーセットとＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　Ｉ、エチジウムブロマイド等の二本鎖ＤＮＡに結合することにより蛍光を発する試薬（インターカレーター）、上記プローブとして用いることができる核酸（但し、該核酸は増幅領域内で標的核酸にハイブリダイズする）の両端をそれぞれ蛍光物質（例：ＦＡＭ、ＨＥＸ、ＴＥＴ、ＦＩＴＣ等）および消光物質（例：ＴＡＭＲＡ、ＤＡＢＣＹＬ等）で修飾したもの（ＴａｑＭａｎ™プローブまたはＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｅａｃｏｎプローブ）などの蛍光試薬（プローブ）とを、それぞれＰＣＲ反応系に添加するというものである。インターカレーターは合成された二本鎖ＤＮＡに結合して励起光の照射により蛍光を発するので、蛍光強度を測定することにより増幅産物の生成量をモニタリングすることができ、それによって元の鋳型ｃＤＮＡ量を推定することができる。ＴａｑＭａｎ™プローブは両端を蛍光物質と消光物質のそれぞれで修飾した、標的核酸の増幅領域にハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドであり、アニーリング時に標的核酸にハイブリダイズするが消光物質の存在により蛍光を発せず、伸長反応時にＤＮＡポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性により分解されて蛍光物質が遊離することにより蛍光を発する。従って、蛍光強度を測定することにより増幅産物の生成量をモニタリングすることができ、それによって元の鋳型ｃＤＮＡ量を推定することができる。Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｅａｃｏｎプローブは両端を蛍光物質と消光物質のそれぞれで修飾した、標的核酸の増幅領域にハイブリダイズし得るとともにヘアピン型二次構造をとり得るオリゴヌクレオチドであり、ヘアピン構造をとっている時は消光物質の存在により蛍光を発せず、アニーリング時に標的核酸にハイブリダイズして蛍光物質と消光物質との距離が広がることにより

蛍光を発する。従って、蛍光強度を測定することにより増幅産物の生成量をモニタリングすることができ、それによって元の鋳型ｃＤＮＡ量を推定することができる。リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、ＰＣＲの増幅量をリアルタイムでモニタリングできるので、電気泳動が不要で、より迅速にＰＰＡＲγ遺伝子の発現を解析可能である。

[0028] あるいは、細胞におけるＰＰＡＲγ遺伝子の発現は、該細胞からタンパク質画分を調製し、該画分中に含まれる該遺伝子の翻訳産物（即ち、ＰＰＡＲγ）を検出することにより調べることができる。ＰＰＡＲγの検出は、該タンパク質を特異的に認識する抗体を用いて、免疫学的測定法（例：ＥＬＩＳＡ、ＦＩＡ、ＲＩＡ、ウェスタンブロット等）によって行うこともできるし、該タンパク質の有する活性を、公知の手法を用いて測定することによっても行い得る。あるいはまた、該タンパク質の検出は、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳ等の質量分析法を用いても行うことができる。

[0029] ＰＰＡＲγを特異的に認識する抗体は、該タンパク質に含まれるポリペプチドやその抗原性を有する部分ペプチドの全部またはエピトープに当たる部分を有する部分ペプチドを免疫原として用い、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。本明細書において、抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（ｍＡｂ）等の天然型抗体、遺伝子組換技術を用いて製造され得るキメラ抗体、ヒト化抗体や一本鎖抗体、およびこれらの結合性断片が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体又はこれらの結合性断片である。結合性断片とは、特異的結合活性を有する前述の抗体の一部分の領域を意味し、具体的には例えばＦ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ’、Ｆａｂ、Ｆｖ、ｓＦｖ、ｄｓＦｖ、ｓｄＡｂ等が挙げられる（Ｅｘｐ．Ｏｐｉｎ．Ｔｈｅｒ．Ｐａｔｅｎｔｓ，Ｖｏｌ．６，Ｎｏ．５，ｐ．４４１－４５６，１９９６）。抗体のクラスは、特に限定されず、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤあるいはＩｇＥ等のいずれのアイソタイプを有する抗体をも包含する。好ましくは、ＩｇＧ又はＩｇＭであり、精製の容易性等を考慮するとより好ましくはＩｇＧである。

[0030] 個々の免疫学的測定法をＰＰＡＲγ発現誘導活性の測定に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えてＰＰＡＲγの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。例えば、入江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和４９年発行）、入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和５４年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和５３年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第２版）（医学書院、昭和５７年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第３版）（医学書院、昭和６２年発行）、「Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ」Ｖｏｌ．７０（Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（ＰａｒｔＡ））、同書Ｖｏｌ．７３（Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（ＰａｒｔＢ））、同書Ｖｏｌ．７４（Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（ＰａｒｔＣ））、同書Ｖｏｌ．８４（Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（ＰａｒｔＤ：Ｓｅｌｅｃｔｅｄ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙｓ））、同書Ｖｏｌ．９２（Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（ＰａｒｔＥ：Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｇｅｎｅｒａｌ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ Ｍｅｔｈｏｄｓ））、同書Ｖｏｌ．１２１（Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（ＰａｒｔＩ：Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ））（以上、アカデミックプレス社発行）などを参照することができる。

[0031] また、ＰＰＡＲγ作動活性の測定は、前述したＰＰＡＲγ発現誘導活性の測定と同様に、細胞からＲＮＡ画分、タンパク質画分または脂質画分を調製し、該画分中に含まれるＰＰＡＲγの下流遺伝子（例えば、アポトーシス関連遺伝子、脂肪細胞分化関連遺伝子、動脈硬化関連遺伝子、抗炎症関連遺伝子など）の転写産物、翻訳産物または脂質を検出することにより調べること

ができる。ＲＮＡ画分、タンパク質画分の調製方法およびその検出方法は、前述したＰＰＡＲγ発現誘導活性の測定方法に従ってよい。脂質の調製方法としては、公知の方法を用いて調製してよく、例えば、脂質を含有する試料中からクロロホルムーメタノール混合物等の溶媒を試料の数倍容加えて抽出するフォルヒ（Ｆｏｌｃｈ）法や、クロロホルムーメタノールー水混合物等の溶媒を数倍容加えて抽出するブライーダイアー（Ｂｌｉｇｈ－Ｄｙｅｒ）法等が用いられうる。また、分離された脂質の検出方法としては、液体クロマトグラフィー（ＬＣ）、ガスクロマトグラフィー（ＧＣ）、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）などの公知の手法を用いて検出することができる。あるいは、脂肪細胞、組織に含有される脂質を直接検出する方法も用いられうる。そのような方法に用いることができる試薬等は市販されており、たとえば、ＨＣＳ　ＬｉｐｉｄＴＯＸリン脂質症／脂質症検出キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）などを用いることができる。

[0032] 本発明のＰＰＡＲγの発現誘導活性を有し、かつＰＰＡＲγ作動活性を有する物質、好ましくは、非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体を有効成分として含有する、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防／治療剤が適用できる者は、例えば、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫であることが臨床的に診断された者、その疑いがある者、または将来的な発症が予測される者が挙げられる。また、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫を原発病変とする転移癌も本発明の治療剤が好ましく適用できる。そのような転移癌としては、肺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍などが挙げられる。

[0033] 本発明の骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療剤は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口

的に使用できる。該治療または予防剤は、生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することができる。これら製剤における有効成分量は後述する投与量を考慮して適宜選択される。

[0034] 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

[0035] 注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、Ｄ－ソルビトール、Ｄ－マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート８０™、ＨＣＯ－５０など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

[0036] このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

[0037] 本発明の骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の治療または予防剤の投与量は、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の重篤度、投与対象、投与ルートなどにより異なるが、例えば、経口投与する場合、一般的に成人（体重６０ｋｇ）においては、一日につき約０．１ｍｇ～約１００ｍｇ、好ましくは約１．０～約５０ｍｇ、より好ましくは約１．０～約２０ｍｇである。非経口投与の場合、当該治療／予防剤の投与量は投与対象、重篤度などによっても異なるが、例えば、注射剤として成人（体重６０ｋｇ）に投与する場合、一日につき約０．０１～約３０ｍｇ程度、好ましくは約０．１～約２０ｍｇ程度、より好ましくは約０．１～約１０ｍｇ程度である。投与対象がヒト以外の動物の場合も、体重６０ｋｇ当たりに換算した量を投与することができる。

[0038] また、現在に至るまで骨巨細胞腫の治療方法としては、外科的手術による患部の除去が主流となっており、患部の腫瘍を掻爬し、骨欠損部を同種骨、自家骨、人工骨で充填することによって治療を行う。しかしながら、かかる方法は腫瘍の再発率が高く、再発を繰り返す過程において転移や悪性転化の危険性を孕む。本発明のＰＰＡＲγの発現誘導活性を有し、かつＰＰＡＲγ作動活性を有する物質、好ましくは、非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体は、骨欠損部の充填に用いる人工骨に含有させることで、骨巨細胞腫の再発の予防効果を期待することができる。従って、本発明は、ＰＰＡＲγの発現誘導活性を有し、かつＰＰＡＲγ作動活性を有する物質、好ましくは、非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体を含む、人工骨を提供する。

[0039] 本発明の人工骨に含まれる、ＰＰＡＲγの発現誘導活性を有し、かつＰＰＡＲγ作動活性を有する物質、好ましくは、非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体は前記の通りのものを用いることができる。

本発明の人工骨に用いる材料としては、公知の整形外科用生体材料、例えば、金属材料、セラミックス材料、高分子材料、タンパク質材料またはこれらの複合材料が挙げられる。

上記金属材料としては、例えば、チタン、チタン合金、ステンレス、コバルトークロム合金等が挙げられる。

上記セラミックス材料としては、例えば、アルミナセラミック、単結晶アルミナセラミック、ジルコニアセラミック等のバイオイナート・セラミックス、バイオグラス（Ｈｅｎｃｈ等、Ｂｉｏｍｅｄ．Ｍａｓｔｅｒ．Ｓｙｍｐ．，２，１１７（１９７２））、ヒドロキシアパタイト（青木ら、セラミックス，１０，４６９（１９７５））、アパタイトーウオラストナイト（ＡＷ）ーガラス（Ｂｕｌｌ．Ｉｎｓｔ．Ｃｈｅｍ．Ｒｅｓ．ＫｙｏｔｏＵｎｉ．，６０，２６０（１９８２））、ＴＣＰセラミックス（$Ca_3(PO_4)_2$）等のバイオアクティブ・セラミックスが挙げられる。

上記高分子材料としては、例えば、ポリメチルメタクリレート（ＰＭＭＡ）、高密度ポリエチレン（ＨＤＰ）、シリコンラバー、テフロン、ポリエステル、ポリ乳酸、ＰＶＡハイドロゲル等が挙げられる。

上記タンパク質材料としては、例えば、コラーゲン、フィブリン、キチン、キトサン等が挙げられる。

[0040] ＰＰＡＲγの発現誘導活性を有し、かつＰＰＡＲγ作動活性を有する物質、好ましくは、非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体と人工骨材料とを混和または被覆してなる本発明の人工骨における、ＰＰＡＲγの発現誘導活性を有し、かつＰＰＡＲγ作動活性を有する物質、好ましくは、非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体の含有量は約１％～約２０％、好ましくは約１５％～約２０％である。

[0041] 前述の通り、発明者らは、ＰＰＡＲγ作動活性を有する特定の化合物が骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫にＰＰＡＲγを発現誘導し、同時にアポトーシスまたは脂肪細胞分化を誘導したことを見出した。従って、本発明はまた、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防ま

たは治療剤のスクリーニング方法を提供する。

[0042] 本発明の骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療剤のスクリーニング方法は以下の工程を含む。

（１）骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫由来細胞を被検物質の存在下または非存在下で培養する工程、

（２）両条件下、ＰＰＡＲγ遺伝子の発現、および

（ｉ）アポトーシス関連遺伝子の発現、または

（ｉｉ）脂肪細胞分化関連遺伝子の発現もしくは脂質の発現

をそれぞれ測定する工程、

（３）被検物質非存在下と比較して、ＰＰＡＲγ遺伝子の発現、および

（ｉ）アポトーシス関連遺伝子の発現、または

（ｉｉ）脂肪細胞分化関連遺伝子の発現もしくは脂質の発現を有意に変動させる被検物質を選択する工程。

[0043] 本発明のスクリーニング方法において用いられる骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫由来細胞とは、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫であることが臨床的に診断された患者由来の初代培養細胞であってもよいし、既に株化された細胞であってもよい。細胞の株化は当該分野で通常実施されている方法や、公知文献に従って調製することができる。また、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫由来細胞は、該細胞を含む任意の組織（例、滑膜、関節、軟骨等）であってもよく、組織、臓器等は、それらを生体から単離して培養してもよいし、あるいは生体自体に被験物質を投与し、一定時間経過後にそれら生体試料を単離してもよい。

[0044] 本発明のスクリーニング方法では、前記骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫由来細胞が培養細胞である場合、該細胞を被検物質の存在下または非存在下で培養する。

本発明において、被検物質は、特に制限があるわけではなく、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規

な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。そのなかでも、ＰＰＡＲγの発現誘導活性を有し、かつＰＰＡＲγの作動活性を有する物質であることが好ましく期待される。そのような被検物質としては、非ステロイド性抗炎症剤が挙げられる。非ステロイド性抗炎症剤としては、上記と同様に、ザルトプロフェン、ジクロフェナク、インドメタシンなどが挙げられる。また、非ステロイド性抗炎症剤以外では、例えば、上記と同様にチアゾリジン誘導体が挙げられる。チアゾリジン誘導体としては、例えば、ロシグリタゾン、ピオグリタゾン、トログリタゾン、バラグリタゾン、リボグリタゾンなどが挙げられる。

[0045] 培養は、適当な細胞培養基材上で行えばよく、例えば、フラスコ、組織培養用フラスコ、デッシュ、ペトリデッシュ、組織培養用デッシュ、マルチデッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マルチプレート、マルチウェルプレート、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、ローラーボトルが挙げられる。

[0046] 前記骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫由来細胞は、モノセルとして懸濁した該細胞を培地中に懸濁し、前記の細胞培養基材上に播種すればよい。培養は、通常、５％CO_2／９５％ａｉｒ、３７℃のインキュベーター内でコンフレントになるまで培養する。

[0047] 被験物質の前記細胞との接触は、ＰＰＡＲγ遺伝子およびアポトーシス関連遺伝子の発現を測定する場合は、例えば、該細胞のアポトーシスに適した培地（例えば、約５～２０％の胎仔ウシ血清（ＦＢＳ）を含む最小必須培地（ＭＥＭ）、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、ＲＰＭＩ１６４０培地、１９９培地、Ｆ１２培地など）と各種緩衝液（例えば、ＨＥＰＥＳ緩衝液、リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、トリス塩酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酢酸緩衝液など）の中に被験物質を添加して、細胞と一定時間接触することにより実施することができる。添加される被験物質の濃度は化合物の種類（溶解度、毒性等）により異なるが、例えば、約１μＭ～約１０００μＭ、好ましくは約５μＭ～約５００μＭ、より好ましくは約５０μＭ～約２

００μＭの範囲で適宜選択される。接触時間としては、例えば、約１時間～約４８時間、好ましくは約５時間～３６時間、より好ましくは約１０時間～２４時間が挙げられる。また、ＰＰＡＲγ遺伝子および脂肪細胞分化関連遺伝子または脂質の発現を測定する場合は、例えば、該細胞の脂肪細胞分化に適した無血清培地（最小必須培地（ＭＥＭ）、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、ＲＰＭＩ１６４０培地、１９９培地、Ｆ１２培地など）と各種緩衝液（例えば、ＨＥＰＥＳ緩衝液、リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、トリス塩酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酢酸緩衝液など）の中に被験物質を添加して、細胞と一定時間接触することにより実施することができる。また、上記の培地には適宜、血清（例えば、約５～２０％の胎仔ウシ血清（ＦＢＳ））、脂肪細胞の誘導補助剤（例えば、ｉｓｏｂｕｔｙｌ－ｍｅｔｈｙｌｘａｎｔｈｉｎｅ（ＩＢＭＸ）、ｄｅｘａｍｅｔｈａｓｏｎｅ、ｉｎｓｕｌｉｎなど）を必要に応じて加えてもよい。さらに、その他の添加剤として、Ｔｒａｎｓｆｅｒｒｉｎ、Ｔ３、ｃｏｒｔｉｓｏｌ、ａｓｃ、ｃａｌｃｉｕｍ　ｐａｎｔｏｔｈｅｎａｔｅ、ｂｉｏｔｉｎなどが挙げられる。また、公知の市販の脂肪細胞分化用キットを用いてもよい。添加される被験物質の濃度は化合物の種類（溶解度、毒性等）により異なるが、例えば、約１μＭ～約１０００μＭ、好ましくは約５μＭ～約５００μＭ、より好ましくは約５０μＭ～約２００μＭの範囲で適宜選択される。接触時間としては、例えば、約１時間～約４８時間、好ましくは約５時間～３６時間、より好ましくは約１０時間～２４時間が挙げられる。脂肪細胞分化誘導の際は、被検物質の接触と平行して脂肪分化誘導培地で培養してもよいし、被検物質に一定時間接触後、脂肪分化誘導培地で培養してもよい。

[0048] 本発明のスクリーニング方法では、被検物質の存在下または非存在下、ＰＰＡＲγ遺伝子の発現と共に、（ｉ）アポトーシス関連遺伝子の発現、または（ｉｉ）脂肪細胞分化関連遺伝子の発現もしくは脂質の発現をそれぞれ測定する。ＰＰＡＲγ遺伝子の発現は、前述のＰＰＡＲγ発現誘導活性の測定の方法に従って測定することができる。また、アポトーシス関連遺伝子、脂

肪細胞分化関連遺伝子、脂質の発現についても、前述のＰＰＡＲγ作動活性の測定の方法に従って測定することができる。

[0049] 後述の実施例に示すように、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫ではＰＰＡＲγの発現が見られない。また、ＰＰＡＲγ作動効果を有する非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体の投与または接触によって、ＰＰＡＲγの誘導発現が確認できた。さらに、該誘導発現に伴い、Ｃａｓｐａｓｅ３または脂質の発現を確認することができた。従って、上記スクリーニングでは、ＰＰＡＲγを介して骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫にアポトーシスまたは脂肪細胞分化を誘導できる、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療剤を選抜できる。

[0050] ＰＰＡＲγ遺伝子、およびアポトーシス関連遺伝子、脂肪細胞分化関連遺伝子、脂質の発現レベルの比較結果より、被検物質を投与された細胞における該遺伝子または脂質の発現レベルが非投与の細胞より相対的に高い（または低い）場合には、該被検物質をＰＰＡＲγを介した骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療剤として選抜することができる。例えば、被験物質の非存在下の場合と比較して、統計的に有意であればよいが、ＰＰＡＲγ遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、脂肪細胞分化関連遺伝子、脂質の発現量の量が約２０％以上、好ましくは約３０％以上、より好ましくは約５０％以上増加（または減少）させる被験物質を骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療剤として、選択することができる。

実施例

[0051] 以下において、実施例および参考例により本発明をより具体的にするが、この発明はこれらに限定されるものではない。

[0052] 実施例１　骨巨細胞腫（ＧＣＴ）培養細胞にザルトプロフェン添加後の細胞増殖抑制およびアポトーシスの解析

ＧＣＴ培養細胞（ｃａｓｅ１：右大腿骨遠位部骨巨細胞腫患者、２０歳代；ｃａｓｅ２：右大腿骨遠位部骨巨細胞腫患者、２０歳代）を、９６ｗｅｌ

Ｉの培養プレートで培養し、ザルトプロフェンを各濃度（５、１０、５０、１００、２００μＭ）で添加し、２４時間後にＣｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｉｎｇ　Ｋｉｔ－８（ＣＣＫ－８）（Ｄｏｊｉｎｄｏ社）で発色し、３時間後に４５０ｎｍの吸光度を測定した（図１）。その結果、ザルトプロフェン濃度依存的に、細胞増殖が抑制されていることが確認できた。

また、上記ｃａｓｅ１のＧＣＴ培養細胞を、チャンバーカバースライドガラス上に培養し、２４時間後にザルトプロフェンを、各濃度（１００、２００μＭ）で添加した。８時間後と２４時間後に、４％パラホルムアルデヒドで固定し、Ｃａｓｐａｓｅ３の染色と、Ｔｕｎｅｌ　ａｓｓａｙを行いアポトーシスの有無について解析した。観察は、Ｋｅｙｅｎｃｅ社の蛍光顕微鏡（ＢＺ－９０００）で行い、各濃度における陽性像を定量的に観察した（図２－５）。その結果、ザルトプロフェン濃度および投与時間依存的に、ＴｕｎｅＬ陽性率およびＣａｓｐａｓｅ３陽性率が上昇されていることが確認できた。

[0053] 実施例２　骨巨細胞腫（ＧＣＴ）培養細胞にザルトプロフェン添加後のＰＰＡＲγ免疫染色

上記ｃａｓｅ１のＧＣＴ培養細胞を、チャンバーカバースライドガラス上に培養し、２４時間後に、ザルトプロフェンを、各濃度（１０、５０、１００、２００μＭ）で添加した。２４時間後に、４％パラホルムアルデヒドで固定し、ＰＰＡＲγの染色を行った。観察は、Ｋｅｙｅｎｃｅ社の蛍光顕微鏡（ＢＺ－９０００）で行い、各濃度における陽性像を定量的に観察した（図６、７）。その結果、ＣｏｎｔｒｏｌではＰＰＡＲγの発現は約１５％であったが、ザルトプロフェン濃度依存的に、ＰＰＡＲγの発現が亢進していることが確認できた。

[0054] 実施例３　骨巨細胞腫（ＧＣＴ）培養細胞にザルトプロフェン添加後のＧＣＴ培養細胞の脂肪細胞分化の解析

ＰＰＡＲγは、脂肪細胞分化に必須の転写因子であることが報告されている。そこで、上記ｃａｓｅ１のＧＣＴ培養細胞を、チャンバーカバースライ

ドガラス上に培養し、コンフレントとなったところで、ザルトプロフェンを、各濃度（１０、５０、１００μM）で添加した。２４時間後より脂肪分化誘導培地（ＳＴＲＥＭＰＲＯ Ａｄｉｐｏｇｅｎｅｓｉｓ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ Ｋｉｔ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で７～１４日培養し、脂肪細胞への分化をＨＣＳ ＬｉｐｉｄＴＯＸ Ｇｒｅｅｎ ｎｅｕｔｒａｌ ｌｉｐｉｄ ｓｔａｉｎ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で解析した（図８、９）。その結果、ＣｏｎｔｒｏｌではＨＣＳ ＬｉｐｉｄＴＯＸ Ｇｒｅｅｎの陽性像がわずかであったが、ザルトプロフェン濃度依存的に、ＨＣＳ ＬｉｐｉｄＴＯＸ Ｇｒｅｅｎの陽性像が亢進していることが確認できた。

[0055] 実施例４　ザルトプロフェン投与された骨巨細胞腫（ＧＣＴ）患者由来細胞のアポトーシスの解析

腫瘍による疼痛に対して、ザルトプロフェン錠であるソレトン錠８０（一般名：ザルトプロフェン８０ｍｇ、日本ケミファ株式会社）を３錠／日で約２８日間投与された後に手術を施行した３０代の男性の手術切除標本と、対象としてザルトプロフェン未投与の骨巨細胞腫の手術切除標本をＣａｓｐａｓｅ３の染色と、Ｔｕｎｅｌ ａｓｓａｙを行いアポトーシスの有無について解析した。観察は、Ｋｅｙｅｎｃｅ社の蛍光顕微鏡（ＢＺ－９０００）で行った（図１０）。その結果、ザルトプロフェン未投与のＧＣＴ患者由来の細胞ではＴｕｎｅｌ陽性細胞およびＣａｓｐａｓｅ３陽性細胞がほとんど確認できなかったが、ザルトプロフェン投与された患者由来の細胞では、Ｔｕｎｅｌ陽性細胞およびＣａｓｐａｓｅ３陽性細胞が確認できた。

[0056] 実施例５　ザルトプロフェン投与された骨巨細胞腫（ＧＣＴ）患者由来細胞のＰＰＡＲγ免疫染色

腫瘍による疼痛に対して、ザルトプロフェン錠であるソレトン錠８０（一般名：ザルトプロフェン８０ｍｇ、日本ケミファ株式会社）を３錠／日で約２８日間投与された後に手術を施行した３０代の男性の手術切除標本と、対象としてザルトプロフェン未投与の骨巨細胞腫の手術切除標本をＰＰＡＲγの染色を行い、ＰＰＡＲγの発現を解析した。観察は、Ｋｅｙｅｎｃｅ社の

蛍光顕微鏡（ＢＺ－９０００）で行った（図１１）。その結果、ザルトプロフェン未投与のＧＣＴ患者由来の細胞ではＰＰＡＲγ発現細胞がほとんど確認できなかったが、ザルトプロフェン投与された患者由来の細胞では、ＰＰＡＲγ発現細胞が確認でき、さらに脂肪分化が確認された。

[0057] 実施例６　骨巨細胞腫（ＧＣＴ）培養細胞に非ステロイド性抗炎症剤添加後の細胞増殖抑制の解析

実施例１と同様の方法で、ＧＣＴ培養細胞（ｃａｓｅ１、ｃａｓｅ２）を培養し、非ステロイド性抗炎症剤（アセトアミノフェン、インドメタシンまたはジクロフェナク）またはトログリタゾンを各濃度で添加して４５０ｎｍの吸光度を測定した（図１２、１３）。その結果、非ステロイド性抗炎症剤濃度依存的に、細胞増殖が抑制されていることが確認できた。

[0058] 実施例７　非ステロイド性抗炎症剤添加後の骨巨細胞腫（ＧＣＴ）培養細胞に対するＰＰＡＲγ　ｓｉＲＮＡの効果

９６ｗｅｌｌの培養プレートで細胞（ｃａｓｅ１、ｃａｓｅ２）を培養し、ＰＰＡＲγｓｉＲＮＡ、ネガティブコントロールｓｉＲＮＡおよびトランスフェクション試薬のみ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　ＤｈａｒｍａＦＥＣＴ：Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を４８時間反応させたのちに通常の培養液で４８時間培養し、その後ザルトプロフェンを２００μＭまたはトログリタゾンを６０μＭで添加し、７２時間後にＣｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｉｎｇ　Ｋｉｔ－８（ＣＣＫ－８）（Ｄｏｊｉｎｄｏ社）で発色し、３時間後に４５０ｎｍの吸光度を測定した（図１４、１５）。その結果、ＰＰＡＲγ　ｓｉＲＮＡ添加群では、ザルトプロフェンの効果が有意に抑制されたことが確認できた。

[0059] 実施例８　腱鞘巨細胞腫（ＧＣＴ　ｏｆ　ｔｅｎｄｏｎ　ｓｈｅａｔｈ）由来細胞または色素性絨毛結節性滑膜炎（ｄｉｆｆｕｓｅ－ｔｙｐｅ　ＧＣＴ）由来細胞に非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体添加後の細胞増殖抑制およびアポトーシスの解析

実施例１と同様に、腱鞘巨細胞腫培養細胞（右膝腱鞘巨細胞腫患者、３０

歳代）および色素性絨毛結節性滑膜炎培養細胞（左膝色素性絨毛結節性滑膜炎患者、３０歳代）を培養し、ザルトプロフェンまたはトログリタゾンを各濃度で添加し、吸光度を測定した（図１６、１７）。その結果、ザルトプロフェンまたはトログリタゾン濃度依存的に、細胞増殖が抑制されていることが確認できた。

また実施例１と同様に、腱鞘巨細胞腫培養細胞および色素性絨毛結節性滑膜炎培養細胞について、Ｃａｓｐａｓｅ３の染色およびＴｕｎｅｌ　ａｓｓａｙを行いアポトーシスの有無を解析した（図１８－２５）。その結果、ザルトプロフェンを濃度４００μＭまたはトログリタゾンを濃度２００μＭで添加された細胞は、Ｃｏｎｔｒｏｌに比べて、Ｔｕｎｅｌ陽性率およびＣａｓｐａｓｅ３陽性率が上昇していることが確認できた。

[0060] 実施例９　腱鞘巨細胞腫（ＧＣＴ　ｏｆ　ｔｅｎｄｏｎ　ｓｈｅａｔｈ）由来細胞または色素性絨毛結節性滑膜炎（ｄｉｆｆｕｓｅ－ｔｙｐｅ　ＧＣＴ）由来細胞に非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体添加後のＰＰＡＲγ免疫染色

実施例２と同様に、腱鞘巨細胞腫由来細胞または色素性絨毛結節性滑膜炎由来細胞に、ザルトプロフェンを濃度４００μＭまたはトログリタゾンを濃度２００μＭで添加し、ＰＰＡＲγ陽性像を観察した（図２６－２９）。その結果、ザルトプロフェンまたはトログリタゾン添加細胞ではＰＰＡＲγの発現が確認できた。

[0061] 実施例１０　非ステロイド性抗炎症剤添加後の腱鞘巨細胞腫（ＧＣＴ　ｏｆ　ｔｅｎｄｏｎ　ｓｈｅａｔｈ）由来細胞または色素性絨毛結節性滑膜炎（ｄｉｆｆｕｓｅ－ｔｙｐｅ　ＧＣＴ）由来細胞の脂肪細胞分化の解析

実施例３と同様に、ＰＰＡＲγは、脂肪細胞分化に必須の転写因子であることが報告されている。そこで、腱鞘巨細胞腫由来細胞または色素性絨毛結節性滑膜炎由来細胞に、ザルトプロフェンを濃度４００μＭで添加し、脂肪細胞への分化を解析した（図３０、３１）。その結果、ザルトプロフェン添加細胞ではＨＣＳ　ＬｉｐｉｄＴＯＸ　Ｇｒｅｅｎの陽性像がＣｏｎｔｒｏ

Ｉに比べて亢進していることが確認できた。

[0062] 実施例１１　骨巨細胞腫（ＧＣＴ）培養細胞にピオグリタゾン添加後の細胞増殖抑制の解析

実施例１と同様の方法で、ＧＣＴ培養細胞（ｃａｓｅ１、ｃａｓｅ２）、腱鞘巨細胞腫（ＧＣＴ　ｏｆ　ｔｅｎｄｏｎ　ｓｈｅａｔｈ）由来細胞または色素性絨毛結節性滑膜炎（ｄｉｆｆｕｓｅ－ｔｙｐｅ　ＧＣＴ）由来細胞を培養し、チアゾリジン誘導体であるピオグリタゾンを各濃度で添加して４５０ｎｍの吸光度を測定した（図３２）。その結果、ピオグリタゾン濃度依存的に、細胞増殖が抑制されていることが確認できた。

[0063] 実施例１２　ザルトプロフェン投与された骨巨細胞腫（ＧＣＴ）患者、腱鞘巨細胞腫患者または色素性絨毛結節性滑膜炎患者のＭＲＩ像の解析

骨巨細胞腫患者、腱鞘巨細胞腫患者または色素性絨毛結節性滑膜炎患者に対して、ソレトン錠８０（一般名：ザルトプロフェン８０ｍｇ、日本ケミファ株式会社）を３錠／日（朝・昼・夕に１錠ずつ服用）で服用させ、数か月ごとにＭＲＩで腫瘍のサイズを評価した。代表症例として、骨巨細胞腫の骨盤部再発例（３４歳、女性：図３３、３４）において、２ヶ月後（図３５）、４ヵ月後（図３６）において次第に腫瘍の縮退が確認できた。また、右膝の色素性絨毛結節性滑膜炎の再発例（２６歳、女性：図３７、３８）において、３ヵ月後（図３９、４０）にＭＲＩ造影効果の減弱が確認でき、疼痛・膝関節可動域に改善が見られた。さらに、別の右膝の色素性絨毛結節性滑膜炎の再発例（３８歳、女性：図４１、４２）において２ヵ月後（図４３、４４）に腫瘤の縮小が確認でき、疼痛改善が見られた。

[0064] 実施例１３　軟骨肉腫由来細胞株（Ｈ－ＥＭＣ－ＳＳ）に非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体添加後の細胞増殖抑制およびアポトーシスの解析

実施例１と同様に、軟骨肉腫由来細胞株を培養し、トログリタゾン、ピオグリタゾンまたはザルトプロフェンを各濃度で添加し、吸光度を測定した（図４５）。その結果、トログリタゾン、ピオグリタゾンまたはザルトプロフ

ェン濃度依存的に、細胞増殖が抑制されていることが確認できた。

また実施例１と同様に、軟骨肉腫由来細胞株について、Ｃａｓｐａｓｅ３の染色を行いアポトーシスの有無を解析した（図４６、４７）。その結果、ザルトプロフェンを濃度２００μM、トログリタゾンを濃度１００μMまたはピオグリタゾンを濃度２００μMで添加された細胞は、Ｃｏｎｔｒｏｌに比べて、Ｃａｓｐａｓｅ３陽性率が上昇していることが確認できた。

[0065] 実施例１４　軟骨肉腫由来細胞株（Ｈ－ＥＭＣ－ＳＳ）に非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体添加後のＰＰＡＲγ免疫染色

実施例２と同様に、軟骨肉腫由来細胞株に、ザルトプロフェンを濃度２００μM、トログリタゾンを濃度１００μMまたはピオグリタゾンを濃度２００μMで添加し、ＰＰＡＲγ陽性像を観察した（図４８、４９）。その結果、ザルトプロフェン、トログリタゾンまたはピオグリタゾン添加細胞ではＰＰＡＲγの発現が確認できた。

産業上の利用可能性

[0066] 本発明の予防または治療剤は、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫患者あるいは骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫を発症するおそれがある者に対して有効である。また、本発明によれば、ＰＰＡＲγ遺伝子およびアポトーシスまたは脂肪細胞分化を制御する被検物質を選択することにより、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫に対する新規治療薬の探索が可能となる。

本出願は、日本で出願された特願２０１２－０７０３５１（出願日：平成２４年３月２６日）および特願２０１２－２３５７８４（出願日：平成２４年１０月２５日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

請求の範囲

[請求項1] 非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体を有効成分として含有する、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療剤。

[請求項2] 非ステロイド性抗炎症剤がザルトプロフェン、ジクロフェナク、インドメタシン、オキサプロジン、アセトアミノフェンおよびケトプロフェンからなる群から選択される、請求項１に記載の予防または治療剤。

[請求項3] チアゾリジン誘導体がトログリタゾン、ロシグリタゾン、ピオグリタゾン、バラグリタゾンおよびリボグリタゾンからなる群から選択される、請求項１に記載の予防または治療剤。

[請求項4] 骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍が、骨巨細胞腫、腱鞘巨細胞腫および色素性絨毛結節性滑膜炎からなる群から選択される、請求項１から３のいずれか１項に記載の予防または治療剤。

[請求項5] 以下の工程を含む、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療剤のスクリーニング方法

（１）骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫由来細胞を被検物質の存在下または非存在下で培養する工程、

（２）両条件下、ＰＰＡＲγ遺伝子の発現、および

（ｉ）アポトーシス関連遺伝子、または

（ｉｉ）脂肪細胞分化関連遺伝子の発現もしくは脂質の発現

をそれぞれ測定する工程、

（３）被検物質非存在下と比較して、ＰＰＡＲγ遺伝子の発現、および

（ｉ）アポトーシス関連遺伝子、または

（ｉｉ）脂肪細胞分化関連遺伝子の発現もしくは脂質の発現

を有意に変動させる被検物質を選択する工程。

[請求項6] 骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍が、骨巨細胞腫、腱鞘巨細胞腫お

よび色素性絨毛結節性滑膜炎からなる群から選択される、請求項５に記載のスクリーニング方法。

[請求項7] 非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体の有効量を対象に投与することを含む、骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療方法。

[請求項8] 非ステロイド性抗炎症剤がザルトプロフェン、ジクロフェナク、インドメタシン、オキサプロジン、アセトアミノフェンおよびケトプロフェンからなる群から選択される、請求項７に記載の予防または治療方法。

[請求項9] チアゾリジン誘導体がトログリタゾン、ロシグリタゾン、ピオグリタゾン、バラグリタゾンおよびリボグリタゾンからなる群から選択される、請求項７に記載の予防または治療方法。

[請求項10] 骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍が、骨巨細胞腫、腱鞘巨細胞腫および色素性絨毛結節性滑膜炎からなる群から選択される、請求項７から９のいずれか１項に記載の予防または治療方法。

[請求項11] 骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療に使用するための、非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体。

[請求項12] 非ステロイド性抗炎症剤がザルトプロフェン、ジクロフェナク、インドメタシン、オキサプロジン、アセトアミノフェンおよびケトプロフェンからなる群から選択される、請求項１１に記載の非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体。

[請求項13] チアゾリジン誘導体がトログリタゾン、ロシグリタゾン、ピオグリタゾン、バラグリタゾンおよびリボグリタゾンからなる群から選択される、請求項１１に記載の非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体。

[請求項14] 骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍が、骨巨細胞腫、腱鞘巨細胞腫および色素性絨毛結節性滑膜炎からなる群から選択される、請求項１１

から１３のいずれか１項に記載の非ステロイド性抗炎症剤またはチアゾリジン誘導体。