

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4 非臨床試験の概括評価の目次

2.4.1	非臨床試験計画概略	2.4-1
2.4.2	薬理試験	2.4-2
2.4.2.1	骨リモデリングとアレンドロネート	2.4-2
2.4.2.2	作用機序	2.4-3
2.4.2.3	投与頻度と骨量減少に対する作用	2.4-5
2.4.2.4	結論	2.4-6
2.4.3	薬物動態試験	2.4-7
2.4.3.1	吸収	2.4-7
2.4.3.2	分布	2.4-7
2.4.3.3	代謝	2.4-8
2.4.3.4	排泄	2.4-8
2.4.4	毒性試験	2.4-9
2.4.5	総括及び結論	2.4-10
2.4.6	参考文献	2.4-11

2.4 非臨床試験の概括評価の項の略語表

略号	名称
FPP	Farnesyl diphosphate (ファルネシル 2 リン酸)
GGOH	Geranylgeraniol (ゲラニルゲラニオール)
GGPP	Geranylgeranyl diphosphate (ゲラニルゲラニル 2 リン酸)
GTP	Guanosine 5'-triphosphate (グアノシン 5'-3 リン酸)
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A (ヒドロキシメチルグルタリル-コエンザイム A)
Mst	Mammalian sterile 20-like kinase
Z-VAD-FMK	Z-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone (Z-Val-Ala-Asp-フルオロメチルケトン)

2.4. 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

アレンドロン酸ナトリウム水和物（以下、アレンドロネート）は、骨粗鬆症治療薬として米国メルク社により海外で先行して開発された。本邦では、悪性腫瘍による高カルシウム血症治療薬として静注剤（テイロック注／オンクラスト注射液 5mg、10mg）及び骨粗鬆症治療薬として経口剤（フォサマック錠 5／ボナロン錠 5mg：5mg 1日1回投与製剤）の製造承認を既に取得している。

今回、骨粗鬆症治療薬としての 35mg 週 1 回投与製剤の開発にあたり、非臨床薬理、薬物動態及び毒性の面から検討した。

非臨床薬理に関しては、5mg 1日1回投与製剤の承認申請時に提出した薬理試験成績を用いて本薬の投与頻度と骨量増加の関係について評価した。また、本薬の作用機序をより明確にするための薬理試験を新たに実施した。

非臨床薬物動態に関しては、上述した承認申請時の提出資料で既に評価されている。これら既提出の資料概要及び公表文献から本薬の薬物動態について検討した結果、今回の開発にあたり、新たな非臨床薬物動態試験を実施する必要はないと判断した。

アレンドロネートの非臨床毒性試験成績についても同様に、上述した承認申請時の提出資料で既に評価されているが、今回の 35mg 週 1 回投与製剤の開発にあたり、毒性試験としてイヌを用いた間歇投与による食道刺激性試験を新たに実施した。

2.4.2 薬理試験

アレンドロネートは、窒素原子含有のビスホスホネート系骨粗鬆症治療薬であり、本邦においてはアレンドロネート 5mg 1日1回投与製剤（フォサマック錠 5/ボナロン錠 5mg）が既に承認されている。一般に、慢性疾患の薬物療法においては服薬の利便性は服薬コンプライアンスを改善する上で重要な因子である。そこで、アレンドロネート 35mg 週1回投与製剤の開発が進められた。アレンドロネートの骨粗鬆症に対する効力を裏付ける試験及び一般薬理試験は、既承認のアレンドロネート静注剤及び1日1回投与製剤（5mg 錠）の資料概要中で報告した [4.3.1、4.3.2]。本項ではアレンドロネート 35mg 錠週1回投与に関する薬理試験結果についての総括的なまとめとして、既承認資料を用いて本薬の投与頻度と骨量増加の関係を要約するとともに、1日1回投与製剤の申請以降に新たに行われた、作用機序に関する薬理試験結果の要旨を述べる。

2.4.2.1 骨リモデリングとアレンドロネート

骨は、コラーゲンが主体のマトリックスにハイドロキシアパタイトが沈着したものであり、軟組織を機械的に支持する機能に加えて、カルシウムや他の陽イオンを細胞外液に放出する機能を合わせ持っている。これらの機能を維持するために、骨吸収能を有する破骨細胞と骨形成能を有する骨芽細胞により、骨の微小単位が常に新しいものと置換されている。この過程は、骨リモデリング（骨代謝回転）と呼ばれ、骨吸収期及び骨形成期から成る。現時点では、骨の特定の場所においてリモデリングが始まる原因については明らかではない。何らかの刺激により骨の表面を覆うライニング細胞から分泌されるコラゲナーゼが、骨石灰化面の表面を覆うコラーゲンの薄層を分解し、骨石灰化面を露出させる。露出した骨石灰化面に破骨細胞が遊走・付着し、骨表面の吸収が行われ、骨吸収窩が形成される。この骨吸収期は約 2~4 週間と推定されている [4.3.3]。吸収過程が終了すると、破骨細胞は恐らくアポトーシスにより消失し、骨吸収窩には骨芽細胞が集合し、新たな骨を形成する。この骨形成期は 3~4 ヶ月間持続する。骨吸収と骨形成のバランスが保たれている状態では、吸収された部分はすべて新たに形成された骨に置き換わる。

ビスホスホネートの薬物動態学的性質 [4.3.1、4.3.2] は、アレンドロネートの作用機序に大きく関連している。ビスホスホネート分子は非常に極性が高く、吸収やそれに続く蛋白や脂質への結合率及び体内の細胞への取り込み率は低い。全身循環からは、骨のハイドロキシアパタイトへの吸着及び尿中排泄により急速に消失する。アレンドロネートは骨にランダムに分布するのではなく、リモデリングが活発に行われる部位により選択的に分布する。このことは、アレンドロネートの骨への選択的な作用に非常に重要である。すなわち骨吸収面には、骨形成面に比して約 8 倍高濃度のアレンドロネートが存在した [4.3.4]。これらのアレンドロネートが高濃度に存在する部位は、破骨細胞により活発に骨吸収が行われている部位と骨吸収刺激に反応したライニング細胞によりコラーゲンの薄層の消化が行われた部位である。これらの露出した骨石灰化面は破骨細胞による骨吸収に適するだけでなく、ビスホスホネートの結合も起こりやすい。アレンドロネートは破骨細胞からの酸放出により骨から遊離し [4.3.5、4.3.6]、破骨細胞内に取り込まれ破骨細胞の骨吸収活性を抑制する [4.3.5、4.3.7、4.3.8]。骨吸収過程が終了すると、骨吸収

面に存在するアレンドロネートは新たに形成された骨のなかに取り込まれ、次に発生するリモデリング過程のなかで再び放出されるまで、薬理的な活性を失う [4.3.4]。

2.4.2.2 作用機序

破骨細胞に取り込まれたアレンドロネートの最も有力な分子作用点は、他の窒素原子含有ビスホスホネートと同様に、メバロン酸/コレステロール生合成経路上のファルネシル 2 リン酸 (FPP) シンターゼと考えられる (図 2.4.2.2 #1)。

アレンドロネートは *in vitro* 培養系におけるウサギ破骨細胞による骨吸収を抑制するが [4.2.1.1.1]、この骨吸収抑制作用は細胞内で再利用経路によりゲラニルゲラニル 2 リン酸 (GGPP) に変換されるゲラニルゲラニオール (GGOH) 処置 [4.3.9] により拮抗された。また、アレンドロネートはヒト遺伝子組換え FPP シンターゼを濃度に依存して阻害した [4.2.1.1.2]。GGPP は、FPP とイソペンテニル 2 リン酸がメバロン酸経路の酵素 GGPP シンターゼにより縮合して合成され、細胞骨格の再構成や細胞内小胞移動を制御する Rho、Rac、Cdc42、Rab 等の GTP 結合蛋白のプレニル化 (ゲラニルゲラニル化) のための基質である。アレンドロネートは FPP の合成を抑制することにより、間接的に GGPP の合成を抑制し、蛋白のゲラニルゲラニル化を抑制するものと考えられた。ゆえに、アレンドロネートによる FPP シンターゼの阻害は、GGPP と蛋白のゲラニルゲラニル化を減少させることにより、破骨細胞の骨格機能や細胞内小胞移動を抑制し、その結果、骨吸収を抑制することが考えられた。実際に、アレンドロネート処置により破骨細胞の波状縁の消失が認められていることも [4.3.5]、アレンドロネートによる骨吸収抑制には破骨細胞の骨格機能や細胞内小胞移動の抑制が関与していることを示唆している。一方、窒素原子を含まないビスホスホネートであるエチドロネートやクロドロネートでは、FPP シンターゼに対する阻害活性は非常に弱いかあるいは認められず、アレンドロネートとは異なった機序で骨吸収抑制作用を示すものと考えられた。

マウスの破骨細胞をアレンドロネートで処置することにより、アポトーシスの制御に関連したシグナル伝達キナーゼの Mst1 (Mammalian sterile 20-like kinase 1) の活性化が観察された [4.2.1.1.3]。アポトーシスの過程において、Mst1 はカスパーゼにより切断されて活性化されるが、アレンドロネート処置により誘発される Mst1 の切断も GGOH 及びカスパーゼ阻害剤の Z-VAD-FMK (Z-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone) により抑制された。したがって、アレンドロネートは、破骨細胞にアポトーシスを直接的に引き起こすことが示された。Mst1 の切断は、窒素原子を含まないビスホスホネートであるクロドロネートやエチドロネートによっても観察されたが、アレンドロネートとは異なり、GGOH では阻害されなかった。逆に、アレンドロネートの骨吸収抑制作用は、Z-VAD-FMK で抑制されなかった [4.2.1.1.4]。また、アレンドロネートの骨吸収抑制作用は、破骨細胞数を減少させる濃度の 10 分の 1 以下の濃度で認められた。

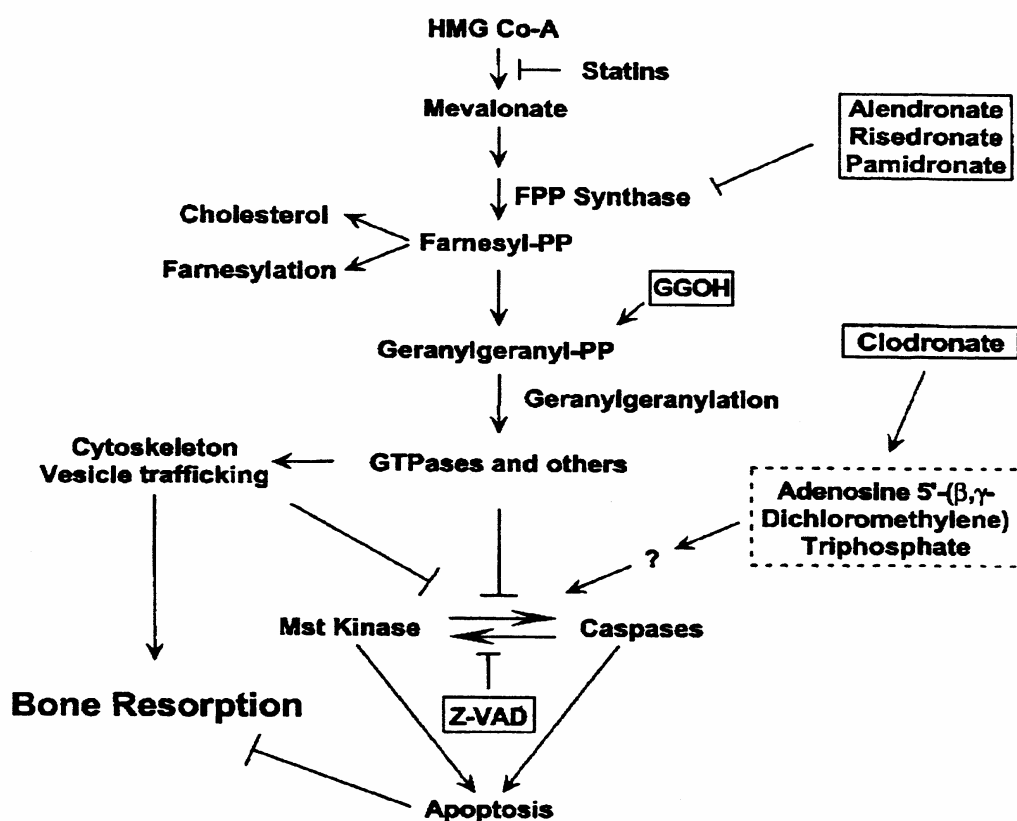


図 2.4.2.2 #1 ビスホスホネートの破骨細胞における想定される作用部位 [4.2.1.1.3]

アレンドロネートを含む窒素原子含有ビスホスホネートは、以下の過程で破骨細胞の骨吸収活性を抑制すると考えられる。

- 1) 破骨細胞内に取り込まれたアレンドロネートは、ゲラニルゲラニル 2 リン酸 (GGPP: Geranylgeranyl-PP) シンターゼにより GGPP に変換されるファルネシル 2 リン酸 (FPP: Farnesyl-PP) の合成酵素、FPP シンターゼを阻害する。
- 2) 破骨細胞内の GGPP の濃度が減少する。
- 3) GTP 結合蛋白のプレニル化が抑制される。
- 4) 破骨細胞骨格の再構成や細胞内小胞移動が抑制される。
- 5) 破骨細胞の骨吸収活性が抑制される。

クロドロネート等の窒素原子を含まないビスホスホネートは、細胞内でアデノシン誘導体に代謝され、破骨細胞のアポトーシスを誘導することにより骨吸収抑制作用を示すものと考えられている。

これらの結果より、すべてのビスホスホネートは破骨細胞のアポトーシスを誘発するが、アレンドロネートのような窒素原子含有ビスホスホネートでは、アポトーシスに依存せず、主に破骨細胞の機能を抑制することにより骨吸収を抑制することが示唆された。

更に、*in vivo* においてもアレンドロネートがメバロン酸経路を阻害することが示唆されている。アレンドロネートを投与したラットでは、脛骨の破骨細胞のヒドロキシメチルグルタリル-コエ

ンザイム A (HMG-CoA) 還元酵素の発現の抑制がみられたが、エチドロネートやクロドロネートではこのような抑制はみられなかった [4. 2. 1. 1. 5]。本酵素は、HMG-CoA をメバロン酸に還元する酵素であり、メバロン酸経路のより下流の代謝物のフィードバック抑制によりその発現が制御されている。これらの結果は、*in vivo* においても窒素原子含有ビスホスホネートが破骨細胞のメバロン酸経路に対して作用していることを示しており、これが窒素原子含有ビスホスホネートの作用機序であることを示唆している。

2. 4. 2. 3 投与頻度と骨量減少に対する作用

骨表面に存在するアレンドロネートは、破骨細胞により作り出された微小な酸性環境下に遊離し、破骨細胞に取り込まれることにより作用する [4. 3. 1、4. 3. 2]。骨吸収面に存在するアレンドロネートは、骨リモデリング過程の骨吸収期において、破骨細胞を抑制することにより、骨代謝回転を抑制し、ひいては骨バランスを増加方向に向ける。したがって、治療効果の観点からは、吸収が起こっているときの骨吸収面に十分な薬剤量が適切な頻度で適用されるべきである。前述のようにリモデリング部位における骨吸収過程は、約 2~4 週間続くことから、アレンドロネートの適用頻度については、それぞれのリモデリング部位における骨吸収を抑制するために 2 週間より高頻度（例えば週 1 回）であることが望ましいと推測される。アレンドロネートにおいては、5mg 1 日 1 回投与製剤が本邦では最初に開発され、実際に治療効果が認められている。週 1 回投与においても、週当たりの総投与量が同じになるように増量（1 日 1 回投与量の 7 倍）して投与した場合、1 日 1 回投与と同程度の用量の薬剤が骨石灰化面に吸着すれば、同様の効力を示すことが期待される。

既に実施されている非臨床薬効薬理試験の結果は、この仮説を十分支持するものである。卵巣摘出ラットにアレンドロネートの同一用量を週 2 回、週 1 回、2 週に 1 回に分割して 3 ヶ月間皮下投与した場合、骨量への最大効果が認められない用量において、週 2 回分割投与の脛骨海綿骨量に対する増加効果は、2 週に 1 回の投与に比して優れていたが、より高用量域においては同程度であり、また大腿骨の骨塩量の増加についても同様であった [4. 3. 10]。すなわち本試験により、少なくとも卵巣摘出ラットでは、総投与量が同じであれば週 2 回から 2 週に 1 回までの投与頻度で有意な骨吸収抑制が示された。言い換えると、アレンドロネートの骨吸収抑制作用は投与頻度に比較して総投与量により依存していた。また、ラット卵巣摘出モデルを用いた異なる投与経路及び頻度による 2 試験（2 ヶ月間 1 日 1 回経口投与試験 [4. 3. 11] 及び上記 3 ヶ月間週 2 回から 2 週に 1 回の皮下投与試験 [4. 3. 10]）において、1 日あたりのアレンドロネート経口投与量として換算したアレンドロネートの最小有効量は 1 及び 0.84mg/kg/day と近似していたことから、アレンドロネートの 1 日あたりの有効量を投与間隔の日数分まとめて投与しても、卵巣摘出ラットにおける骨量減少に対して、1 日 1 回投与と同様に有効であると考えられた。

卵巣摘出ラットにおける 3 ヶ月間皮下投与の試験結果をもとに、卵巣摘出ヒヒでの実験が実施された [4. 3. 12]。卵巣摘出ヒヒには、0.05 又は 0.25mg/kg のアレンドロネートを 2 週に 1 回静脈内投与し、3 ヶ月ごとに生化学的指標を調べた。2 年間の投与終了後の解剖時には、多くの脊

椎骨の骨組織形態計測及び骨強度測定を実施した。その結果、2週に1回の投与でもヒトのエストロゲン欠乏症の女性にみられるものと類似した骨量減少と骨構造の変化を十分防止できることが示された。更に、椎骨骨量と骨強度の間に正の相関が認められた。卵巣摘出ラットにアレンドロネートを1日1回2ヵ月間経口投与した試験 [4.3.11] においても、同様に大腿骨頸部の骨量と骨強度の間に正の相関が認められた。ゆえに、週1回の投与を行った場合も、骨量と骨強度の間に正の相関があるものと予想された。

加えて、卵巣摘出モデルと同様に骨代謝回転が増加して骨量が減少する、カルシウム欠乏食による二次性副甲状腺機能亢進症ラットを用いた場合でも、アレンドロネートの総投与量が同じ1日1回投与と週1回投与の比較では、同程度の骨量減少抑制作用がみられた [4.3.13]。

これらの非臨床試験結果から、ヒトにおいても1日1回投与量の7倍量を週1回投与することは1日1回投与と同様に有効である可能性が示唆された。そこで、海外において既承認のアレンドロネート10mg 1日1回投与製剤の7倍量相当である70mg錠を週1回投与製剤として、第Ⅲ相二重盲検比較試験（#118試験）を実施したところ、70mg錠の週1回投与が10mg錠の1日1回投与と同等の有効性及び同様の安全性を有することが示された。本邦においては、既承認のアレンドロネート5mg 1日1回投与製剤の7倍量相当である35mg錠を週1回投与製剤とし、2002年3月より腰椎骨密度を評価項目とした第Ⅲ相二重盲検比較試験（C301試験）を実施した。その結果、アレンドロネート35mg錠の週1回投与に、5mg錠の1日1回投与と同様の有効性及び安全性が認められた。

2.4.2.4 結論

破骨細胞による骨吸収期は約2~4週間持続することから、これより短い期間でアレンドロネートが骨に適用されるのであれば、破骨細胞による骨吸収が活発に起こっている期間に少なくとも1回以上アレンドロネートが作用することになり、破骨細胞の骨吸収を投与量に依存して抑制するものと考えられた。ラット及びヒヒを用いた非臨床試験結果から、ヒトにおいても1日1回投与量の7倍量を週1回投与することは1日1回投与と同様に有効である可能性が示唆された。また、アレンドロネートは、破骨細胞が付着する骨石灰化面に選択的に分布し、破骨細胞の作り出す酸性環境で遊離し、破骨細胞に取り込まれる。破骨細胞内でのアレンドロネートの作用はメバロン酸経路の阻害であり、その作用点はFPPシンターゼであることが*in vitro*及び*in vivo*の実験から示唆された。