

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.3 薬理試験の概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

ここでは、既承認のアレンドロネート 1 日 1 回投与製剤（フォサマック錠 5/ボナロン錠 5mg）申請時以降に新たに行った本薬の作用機序に関する薬理試験結果、並びにアレンドロネート静注剤（テイロック注/オンクラスト注射液 5mg、10mg）及び 1 日 1 回投与製剤申請時に提出した投与頻度が骨量減少に及ぼす影響について記載する。

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骨吸収活性を抑制する [4.3.1、4.3.2]。アレンドロネートの破骨細胞における有力な分子作用点は後述する結果より、他の窒素原子含有ビスホスホネートと同様に、メバロン酸経路のファルネシル 2 リン酸（FPP）シンターゼと考えられた（図 2.6.2.1 #1）。

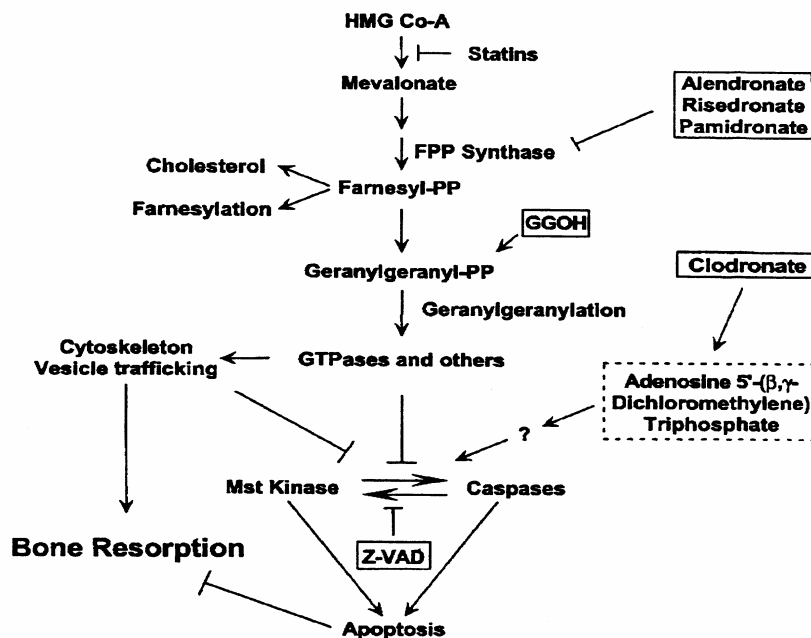


図 2.6.2.1 #1 ビスホスホネートの破骨細胞における想定される作用部位 [4.2.1.1.3]

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。

2.6.2 薬理試験の概要文

In vitro 培養ウサギ破骨細胞において、アレンドロネートとヒドロキシメチルグルタリル-コエンザイム A (HMG-CoA) 還元酵素阻害剤のロバスタチンは共に骨吸収を抑制したが、両薬剤の作用はゲラニルゲラニオール(GGOH: 10 μ mol/L)の処置により拮抗された[4.2.1.1.1]。GGOHは細胞内に入ると、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 [4.3.9]、その細胞内濃度を上昇させる。またアレンドロネートは、ヒト遺伝子組換え型 FPP シンターゼを阻害し、その IC₅₀は 340nmol/L であった [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メバロン酸経路の酵素である 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、破骨細胞による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するものである。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 はキャスパーゼ (Caspase) により切断されて活性化されるが、この切断も GGOH 及びキャスパーゼ阻害剤の 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しうることが示された。Mst1 の切断は、クロドロネートやエチドロネートのような窒素原子を含まないビスホスホネートにおいても観察されたが、窒素原子含有ビスホスホネートとは異なり、エチドロネートやクロドロネートでは GGOH で阻害されなかった。また、逆に、エチドロネートやクロドロネートによる骨吸収抑制作用は Z-VAD-FMK により抑制されたが、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。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、窒素原子含有ビスホスホネートの破骨細胞に対する骨吸収抑制作用は、アポトーシスに依存したものではなく、主に破骨細胞の機能の抑制によ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の阻害により破骨細胞の骨吸収を抑制していることが示唆された。HMG-CoA からメバロン酸への還元を行う HMG-CoA 還元酵素の発現は、メバロン酸経路において、より下流の代謝物のフィードバック抑制により制御されているため、本酵素の発現を調べることによりメバロン酸経路の抑制作用を検討することができ

る。そこで、アレンドロネートを皮下投与したラットの脛骨の破骨細胞の HMG-CoA 還元酵素を免疫染色法により観察し、*in vivo* においてもアレンドロネートがメバロン酸経路の抑制により破骨細胞の骨吸収抑制を引き起こす可能性について検討した [4. 2. 1. 1. 5]。その結果、アレンドロネートの投与により、HMG-CoA 還元酵素の発現には、76%の抑制がみられた。しかしながら、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このような抑制はみられなかった。また、HMG-CoA 還元酵素の阻害剤であるシンバスタチンは、アレンドロネートの抑制作用に拮抗した。これらの結果は、*in vivo* においてもアレンドロ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、実際に生体内においてもメバロン酸経路の酵素阻害がアレンドロネートの分子作用点である可能性を示唆している。

以上の結果から、アレンドロネートの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、メバロン酸経路の FPP シンターゼと考えられた。アレンドロネートが本酵素を阻害することにより、GGPP の生成抑制を介し、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を抑制し、これが破骨細胞の骨吸収機能を抑制するものと考えられた。

また、投与頻度が骨量減少に及ぼす影響に関するまとめは以下のとおりである。アレンドロネートの特徴として、骨に結合したアレンドロネートが破骨細胞に取り込まれること、及び薬理的有効量（成長過程のラットにおける骨吸収抑制作用発現投与量）のアレンドロネートを投与すると、アレンドロネートは骨芽細胞面に比して破骨細胞面に 8 倍多く分布することが示されている [4. 3. 4]。また、骨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、アレンドロネートを毎日投与しなくても、間隔をおいた周期的投与により同程度の薬理的作用が得られると考えられた。そこで、ラットとヒヒを用いて 1 日を超える間隔でアレンドロネートを投与した場合の *in vivo* での効果を検討した。

卵巣摘出ラットに月あたり同一用量のアレンドロネートを、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の骨量増加効果は、脛骨海綿骨では骨量への最大効果が認められない用量において週 2 回分割投与の方が 2 週に 1 回の投与に比べて優れていたが、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]。この結果から、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 回までの投与頻度の範囲では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。このことから、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 ヶ月皮下投与の試験結果をもとに、卵巣摘出ヒヒでの実験を行った [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 ヶ月ごとに骨代謝回転の生化学的指標を調べた。2 年間のアレンドロネート投与終了後、

被験個体を解剖し、脊椎骨の骨組織形態計測及び骨強度測定を実施した。その結果アレンドロネートは、卵巣摘出が海綿骨の代謝回転に与える影響を回復し、骨量と骨強度を増加させ、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、2週に1回の投与で十分防止できることが示された。更に2週に1回投与の本試験では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。

卵巣摘出による骨量減少は、エストロゲン欠乏による骨代謝回転の増加により起こる。一方、カルシウム欠乏食をラットに与えると、過剰に分泌される副甲状腺ホルモンにより、同様に骨代謝回転の増加による骨量の減少がおきる。この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に、同一の総投与量を1日1回、2日に1回、週2回、週1回に分割して皮下投与し、骨量減少に対するアレンドロネートの抑制効果を検討した。その結果、総投与量が同じであれば、1日1回から週1回の分割投与による骨量減少抑制作用は投与頻度にかかわらず同程度であった [4.3.13]。

これらのことから、ヒトの骨粗鬆症患者においても1日1回投与量の7倍量の週1回投与は、連日投与と同様に、骨代謝回転増加、骨量減少並びに骨強度減少を抑制する効果を示すものと期待された。

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。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 アレンドロネートの *in vitro*での破骨細胞の形成抑制、骨吸収抑制及びキナーゼ活性化に対するメバロン酸経路の中間体ゲラニルゲラニオールの阻止作用 [4.2.1.1.1]

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メバロン酸 (MVA) からコレステロールを生成する経路 (MVA 経路) 上の酵素を抑制することによりマクロファージのアポトーシスを引き起こすことが報告された [4.3.16]。そこで本試験では、破骨細胞においても同様の機序によりアレンドロネートが作用しているかどうか検討した。

マウスの破骨細胞形成は、HMG-CoA 還元酵素阻害剤のロバスタチン (図 2.6.2.2.1 #1) とアレンドロネート (図 2.6.2.2.1 #2) により抑制された。ロバスタチンによる抑制作用は、MVA により完全に、また細胞内で GGPP に変換される GGOH により部分的に拮抗されたが、アレンドロネートによる抑制作用に対しては MVA の拮抗作用は部分的であり、GGOH はより拮抗作用が強かった。また、メバロン酸経路の他の代謝物である FPP に細胞内で変換されるファルネソール (FOH) や、同じくメバロン酸経路の代謝物であるスクワレンには拮抗作用を認めなかった。

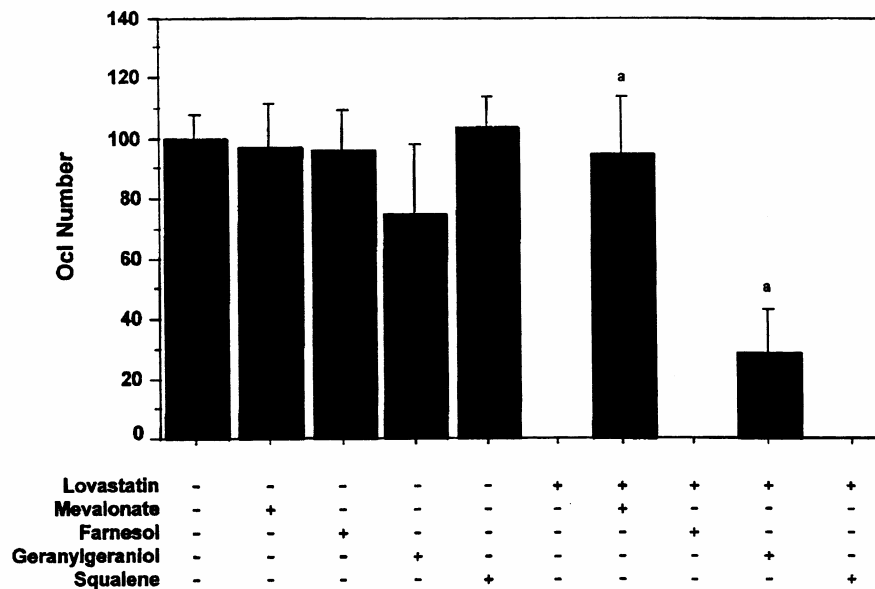


図 2.6.2.2.1 #1 *In vitro*におけるロバスタチンによる破骨細胞形成の抑制と、MVA 及び GGOH による拮抗作用 [4.2.1.1.1]

破骨細胞形成はマウス骨髄細胞と MB1.8 骨芽細胞を同時に培養することにより調べた。培養 5 日目と 6 日目に、MVA (1mmol/L)、FOH (10 μ mol/L)、GGOH (10 μ mol/L) 又はスクワレン (10 μ mol/L) の存在下 (+) あるいは非存在下 (-) で、ロバスタチン (10 μ mol/L) を添加した。培養 7 日目に、直径 250 μ m 以上の TRAP 陽性多核細胞を顕微鏡下にて計数し、破骨細胞数 (平均値 \pm 標準偏差: n \geq 3) を求めた。

a: ロバスタチン (10 μ mol/L) に比較して統計学的に有意 ($p < 0.0001$)。

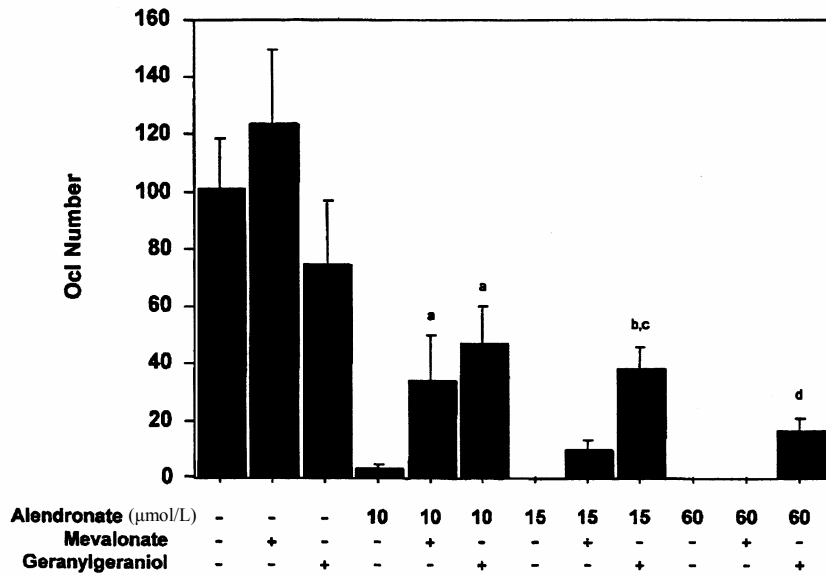


図 2.6.2.2.1 #2 *In vitro* におけるアレンドロネートによる破骨細胞形成の抑制と、MVA 及び GGOH による拮抗作用 [4.2.1.1.1]

破骨細胞形成はマウス骨髄細胞と MB1.8 骨芽細胞を同時に培養することにより調べた。培養 5 日目と 6 日目に、MVA (1mmol/L) 又は GGOH (10μmol/L) の存在下 (+) あるいは非存在下 (-) で、アレンドロネート (10, 15, 60μmol/L) を添加した。培養 7 日目に、直径 250μm 以上の TRAP 陽性多核細胞を顕微鏡下にて計数し、破骨細胞数 (平均値±標準偏差) を求めた。

- a: アレンドロネート (10μmol/L) に比較して統計学的に有意 ($p<0.0001$)。
- b: アレンドロネート (15μmol/L) に比較して統計学的に有意 ($p<0.0001$)。
- c: アレンドロネート (15μmol/L) +MVA (1mmol/L) に比較して統計学的に有意 ($p<0.0001$)。
- d: アレンドロネート (60μmol/L) に比較して統計学的に有意 ($p<0.02$)。

マウス頭蓋骨でのアレンドロネートによる骨吸収抑制作用は MVA により拮抗されたが、クロドロネートによる抑制作用は MVA により拮抗されなかった (図 2.6.2.2.1 #3)。

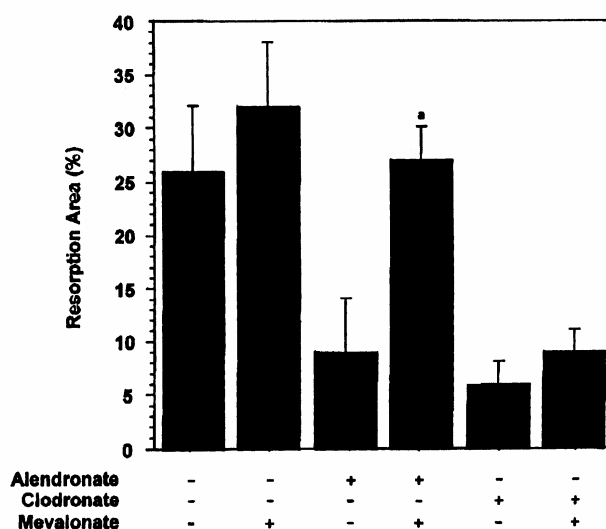


図 2.6.2.2.1 #3 アレンドロネートとクロドロネートによるマウス頭蓋骨での骨吸収抑制作用と MVA による拮抗作用 [4.2.1.1.1]

1日齢のマウスから取り出した頭蓋骨を2分割し、アレンドロネート (10 μ mol/L) あるいはクロドロネート (100 μ mol/L) 存在下で副甲状腺ホルモンを含む培養液中で24時間培養した。実験は、それぞれ MVA (1mmol/L) 存在下 (+) あるいは非存在下 (-) で実施した。骨吸収は、頭頂骨の中央部の透明度の増加した部位を測定することにより評価した (平均値 \pm 標準偏差、n \geq 3)。

a: アレンドロネート処置群と比較して統計学的に有意 ($p < 0.01$)。

更にウサギ破骨細胞の骨吸収活性は、ロバスタチンとアレンドロネートにより抑制された (図 2.6.2.2.1 #4)。ロバスタチンの作用は、MVA と GGOH により拮抗され、アレンドロネートの作用は GGOH により拮抗された。マウスの破骨細胞形成の場合と同様に、FOH にはそのような拮抗作用は認められなかった。

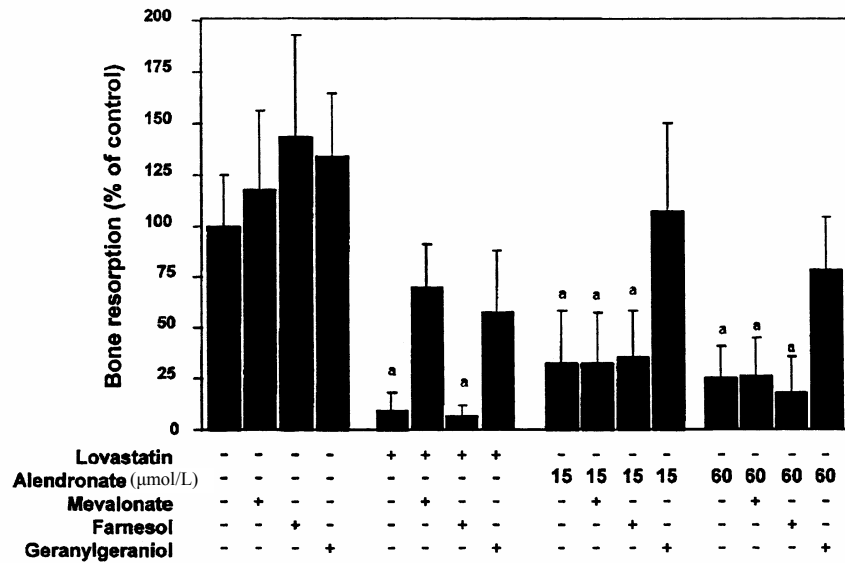


図 2.6.2.2.1 #4 アレンドロネートとロバスタチンの *in vitro* ウサギ破骨細胞における骨吸収抑制作用に対する MVA 経路代謝物の影響 [4.2.1.1.1]

ウサギ破骨細胞は、10 日齢のニュージーランドホワイトウサギの脛骨と大腿骨から調製し、ウシ骨スライス上（直径 6mm、厚さ 200 μ m）に播いた。ロバスタチン（10 μ mol/L）又はアレンドロネート（15 又は 60 μ mol/L）の存在下（+）あるいは非存在下（-）で、MVA（1mmol/L）、FOH（10 μ mol/L）又は GGOH（10 μ mol/L）を添加した。3 日間のインキュベーション後、培養液中のコラーゲン断片を ELISA を用いて測定した（平均値 \pm 標準偏差、n=3）。

a: 無処置群と比較して統計学的に有意 ($p < 0.0001$)。

アレンドロネートの破骨細胞内シグナル伝達系に及ぼす影響を検討するために、破骨細胞のキナーゼ活性に対する影響を検討した。ロバスタチンとアレンドロネートは、精製した破骨細胞の 34kDa のキナーゼを活性化した。骨吸収活性抑制の場合と同様に、ロバスタチンの作用は MVA と GGOH により、アレンドロネートの作用は GGOH により拮抗された（図 2.6.2.2.1 #5）。

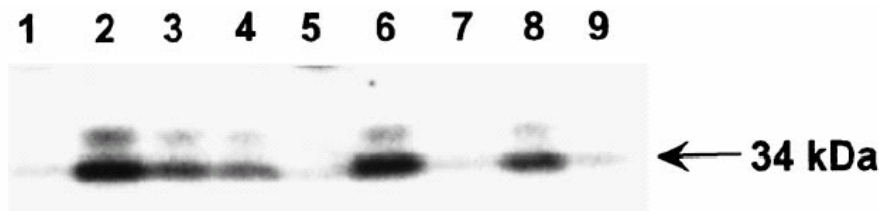


図 2.6.2.2.1 #5 アレンドロネートとロバスタチンによる 34kDa のキナーゼの活性化と、GGOH 及び MVA による抑制 [4.2.1.1.1]

破骨細胞はマウス骨髄細胞と MB1.8 骨芽細胞を同時に培養したものをコラゲナーゼと EDTA で処理することにより単離した。破骨細胞には MVA (1mM; 第 3 列と 7 列)、FOH (10 μ mol/L; 第 4 列と 8 列) 又は GGOH (10 μ mol/L; 第 5 列と 9 列) の存在下あるいは非存在下 (第 2 列と 6 列) に、アレンドロネート (30 μ mol/L; 第 2~5 列) 又はロバスタチン (10 μ mol/L; 第 6~9 列) を加え、17 時間インキュベートした。細胞融解液を、ミエリン塩基性蛋白を基質としてゲル内キナーゼアッセイを用いて解析した。第 1 列は、無処置である。34kDa (矢印) と 36kDa キナーゼの活性が、オートラジオグラフィーで認められた。本結果は、3 回の個別の実験結果の代表例である。

これらの結果から、アレンドロネートは、破骨細胞においてその機能に必須の MVA 経路を阻害することが示唆された。この阻害作用は GTP 結合性蛋白のプレニル化のための基質である GGPP に変換される GGOH により拮抗されたことから、アレンドロネートの骨吸収抑制作用は、GGPP を合成する酵素の阻害作用によることが示唆され、また破骨細胞の活性化と維持には、細胞骨格の再構成や、小胞融合、アポトーシス等を制御する GTP 結合性蛋白のプレニル化が必要と考えられた。本実験においては、アレンドロネートにより抑制された破骨細胞形成や破骨細胞による骨吸収が FOH によっては拮抗されなかった。放射標識されたメバロノラクトン (MVL)、FOH 及び GGOH を用いて、蛋白への取り込みを比較すると、FOH と GGOH は MVL が取り込まれる蛋白に取り込まれるが、それぞれ異なった分画に取り込まれることが明らかとなっている [4.3.17]。MVL は、MVA 経路における最初の基質となり、イソプレニル化されたすべての蛋白に取り込まれる。FOH と GGOH は、MVL が取り込まれる蛋白のうちそれぞれ異なった分画に取り込まれたことから、FOH はファルネシル化蛋白に、GGOH はゲラニルゲラニル化蛋白に選択的に取り込まれることが示唆された。FOH の再利用経路についてはまだ完全に解明されていないが、FOH は細胞内において FPP に転換され、蛋白のファルネシル化を増加させるものの、蛋白のゲラニルゲラニル化は増加させない。ゆえに、FOH は蛋白のゲラニルゲラニル化を増加せず、アレンドロネートにより抑制された破骨細胞形成や破骨細胞による骨吸収を抑制しなかったと考えられた。

2.6.2.2.2 ファルネシル 2 リン酸シンターゼに対するアレンドロネートの作用 [4.2.1.1.2]

2.6.2.2.1 の結果から、アレンドロネートが MVA 経路を抑制し、GGPP 濃度を減少させて、蛋白のプレニル化を阻害することが示唆された。そこで本試験では、アレンドロネートが MVA 経路のどの酵素を抑制するか検討した。

アレンドロネートの存在又は非存在下で、放射性 MVA をラット肝臓サイトゾルとインキュ

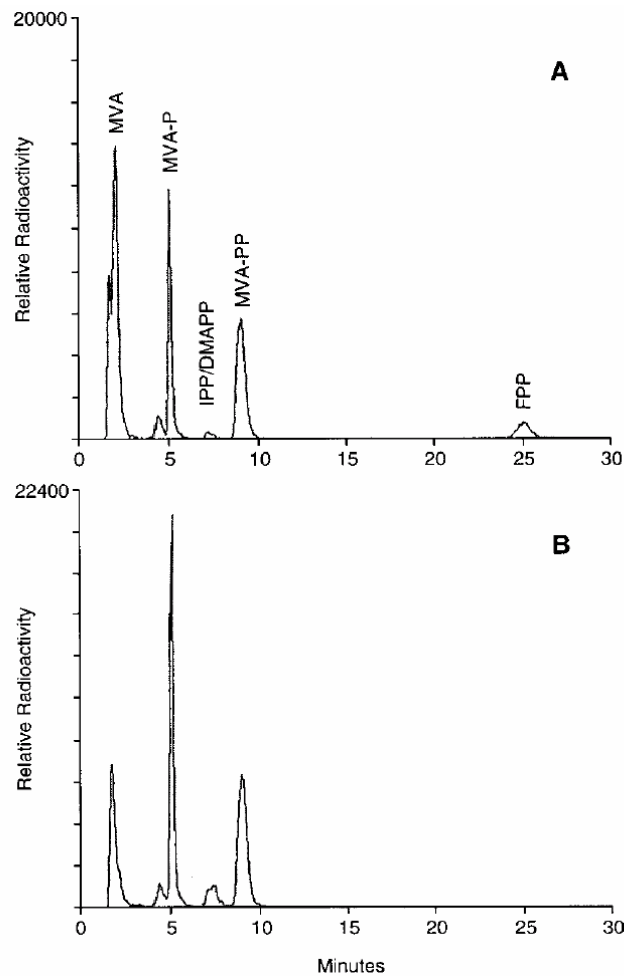


図 2.6.2.2.2 #1 MVA から FPP への生合成経路における HPLC プロファイル [4.2.1.1.2]

MVA、FPP 及びその中間体の放射活性の HPLC プロファイルを示した。[5-³H]MVA を ATP と Mg²⁺存在下で、ラット肝サイトゾルとインキュベートした反応液を放射活性検出器を用いて HPLC 解析を行った。各ピークは、放射性の MVA、5-リン酸化メバロン酸 (MVA-P)、5-2 リン酸化メバロン酸 (MVA-PP)、IPP 及び FPP、並びに非放射性 DMAPP 及びゲラニル 2 リン酸 (GPP) の保持時間から同定した。MVA-P の直前の 4.7 分にあるピークは、未同定の [5-³H]MVA の不純物である。A はアレンドロネート非存在下、B は存在下 (10µg/mL) でのインキュベーションの結果である。

べートしたときの MVA 経路の中間体を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて分析した。アレンドロネート処置により、MVA の減少、イソペンテニル 2 リン酸 (IPP) /ジメチルアリル 2 リン酸 (DMAPP) の増加と FPP の減少が認められたことから (図 2.6.2.2.2 #1)、IPP から FPP への生合成酵素である IPP イソメラーゼあるいは FPP シンターゼが、アレンドロネートによる阻害の標的酵素であると考えられた。

アレンドロネートは、ヒト遺伝子組換え型の FPP シンターゼを濃度依存的に阻害したが (図 2.6.2.2.2 #2)、肝サイトゾルから部分精製した IPP イソメラーゼ及び GGPP シンターゼを阻害しなかった。