

目次

1.	非臨床試験計画概略	8
1.1	非臨床における問題点	9
1.2	非臨床試験の主な結論	9
1.3	理化学的考察	10
2.	薬理試験	12
2.1	効力を裏付ける試験	13
2.1.1	In vitro試験	13
2.1.2	In vivo試験	13
2.1.2.1	種々の癌骨転移モデルにおけるRANK阻害の効果	14
2.1.2.2	骨質に対するRANKL阻害の作用	20
2.1.3	薬力学的メカニズム	21
2.2	副次的薬理試験	23
2.2.1	免疫系	23
2.2.1.1	RANK/RANKLノックアウト及びOPG過剰発現トランスジェニック動物の表現型	24
2.2.1.2	基礎免疫系	25
2.2.1.3	免疫応答惹起に対する反応	25
2.2.1.4	感染症に対する免疫応答	26
2.2.1.5	免疫介在性疾患に対する影響	26
2.2.1.6	免疫系の要約	27
2.2.2	乳腺及び授乳	27
2.2.3	新生仔に対する影響	28
2.2.4	心血管系	32
2.2.4.1	血管新生	32
2.2.4.2	血管石灰化及びアテローム性動脈硬化症	33
2.2.5	体温調節	34
2.2.6	骨折治癒	34
2.3	安全性薬理試験	36
2.4	薬力学的薬物相互作用試験	36
3.	薬物動態試験	37
3.1	分析法	37
3.2	吸収	37
3.3	分布	38
3.4	代謝	39
3.5	排泄	39

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

3.6	薬物動態学的薬物相互作用	39
4.	毒性試験	41
4.1	単回投与毒性試験	41
4.2	反復投与毒性試験	41
4.2.1	サル反復投与毒性試験	41
4.3	遺伝毒性試験	44
4.4	がん原性試験	44
4.5	生殖発生毒性試験	45
4.5.1	受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	46
4.5.2	胚・胎児発生に関する試験	46
4.5.3	出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験	47
4.5.4	新生児（幼若動物）を用いた試験	48
4.6	局所刺激性試験	48
4.7	その他の毒性試験	48
4.7.1	抗原性試験	48
4.7.2	免疫毒性試験	49
4.7.3	毒性発現の機序に関する試験	49
4.7.4	依存性試験	49
4.7.5	代謝物の毒性試験	49
4.7.6	不純物の毒性試験	49
4.7.7	その他の試験	49
4.7.8	環境への配慮	50
5.	総括及び結論	51
6.	参考文献	55
7.	文書中の報告書一覧	66

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

略号一覧

略号	略していない表現 (英)	略していない表現 (日)
AMGN-0007 (AMG0007)	recombinant construct consisting of human osteoprotegerin attached to an immunoglobulin crystallisable fragment; OPG-Fc	免疫グロブリン結晶化フラグメントに結合させたヒトオステオプロテゲリンから成る組換え型、OPG-Fc (本文では AMGN-0007、AMG0007 という記述は無いが、モジュール 4 にて使用されている場合がある)
Ang-1	angiotensin-1	アンジオテンシン - 1
AUC	area under the concentration-time curve	濃度-時間曲線下面積
AUC _{0-t}	AUC from time 0 to the last quantifiable concentration	0 時間から最終の定量可能時点までの AUC
AUC _{0-tau}	AUC over the dosing interval	0 時間から投与間隔時間までの AUC
BLI	bioluminescence imaging	生物発光イメージング
BMC	bone mineral content	骨塩量
BMD	bone mineral density	骨密度
BMP	bone morphogenetic proteins	骨形成たん白質
BSAP	bone-specific alkaline phosphatase	骨型アルカリホスファターゼ
CD40L	CD40 ligand	CD40 リガンド
CFU-M	macrophage colony-forming unit	マクロファージコロニー形成ユニット
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use	ヒト用医薬品委員会
C _{max}	maximum serum concentration	最高血清中濃度
CPMP	Committee for Proprietary Medicinal Products	欧州医薬品委員会
Cr	creatinine	クレアチニン
CSF-1	colony stimulating factor-1	コロニー刺激因子 - 1
CSMI	cross sectional moment of inertia	断面二次モーメント
CT	computed tomography	コンピュータ断層撮影法
CTX	C-telopeptide	C-テロペプチド
CYP	cytochrome P450	チトクロム P450
DMBA	dimethylbenzanthracene	ジメチルベンズアントラセン
DR	death receptor	細胞死受容体
DXA	dual energy X-ray absorptiometry or dual X-ray absorptiometry	二重エネルギー X 線吸収測定法
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫吸着測定
EMA	European Medicines Evaluation Agency	欧州医薬品審査庁
ER	estrogen receptor	エストロゲン受容体
ET-1	endothelin-1	エンドセリン - 1
Fc	crystallizable fragment of immunoglobulins	免疫グロブリン結晶化フラグメント
FcRn	neonatal Fc receptor	新生仔 Fc 受容体

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

略号	略していない表現 (英)	略していない表現 (日)
FDA	Food and Drug Administration (United States)	食品医薬品局 (米国)
FGF	fibroblast growth factor	線維芽細胞増殖因子
GLP	good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HCM	Hypercalcemia of malignancy	悪性腫瘍による高カルシウム血症
hERG	human ether-a-go-go related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャンネル遺伝子
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
HRP	horseradish peroxidase	西洋ワサビペルオキシダーゼ
huRANKL	humanized RANK ligand	ヒトとマウスのキメラ RANK リガンド
ICH	International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IGF	insulin-like growth factor	インスリン様増殖因子
IKK	I-kappa-B kinase	アイカッパ B キナーゼ
IL	interleukin	インターロイキン
K_d	binding dissociation constant	解離平衡定数
KLH	keyhole limpet hemocyanin	キーホールリンペットヘモシアニン
LCMV	lymphocytic choriomeningitis virus	リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス
Luc	luciferase	ルシフェラーゼ
M-CSF	macrophage-colony stimulating factor	マクロファージコロニー刺激因子
MHLW	Ministry of Health, Labour, and Welfare (Japan)	厚生労働省 (日本)
MMTV	mouse mammary tumor virus	マウス乳腺腫瘍ウイルス
MPA	medroxyprogesterone acetate	酢酸メドロキシプロゲステロン
NIH	National Institute of Health	米国国立衛生研究所
NK	natural killer	ナチュラルキラー
NOAEL	no-observed-adverse-effect level	無毒性量
NOEL	no-observed-effect level	無影響量
NTX	N-telopeptide	N-テロペプチド
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development	経済協力開発機構
ONJ	osteonecrosis of the jaw	顎骨壊死
OPG	osteoprotegerin	オステオプロテゲリン
OPG-Fc	recombinant construct consisting of OPG attached to an immunoglobulin crystallizable fragment	免疫グロブリン結晶化フラグメントに結合させた OPG
OVX	ovariectomized	卵巣摘出
PBS	phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩液
PDGF	platelet-derived growth factor	血小板由来増殖因子
PGE-2	prostaglandin E2	プロスタグランジン E-2

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

略号	略していない表現 (英)	略していない表現 (日)
PK/PD	pharmacokinetics/pharmacodynamics	薬物動態/薬力学
pQCT	peripheral quantitative computed tomography	末梢骨定量的コンピュータ断層撮影法
PTHrP	parathyroid hormone-related peptide	副甲状腺ホルモン関連ペプチド
QCT	quantitative computed tomography	定量的コンピュータ断層撮影法
QTc	corrected QT	補正 QT
RANK-Fc	extracellular domain of RANK linked to Fc	RANK 細胞外領域と Fc 領域との融合たん白質
RANKL	RANK ligand (referred to as OPG ligand or TRANCE in older literature citations).	RANK リガンド (古い引用文献では、OPG リガンド又は TRANCE と称される)
RANKL-HRP	HRP-labeled RANKL	HRP 標識 RANKL
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動
<i>sp.</i>	species	菌種
SRE	skeletal related event(s)	骨関連事象
TGF- β	transforming growth factor β	形質転換増殖因子 β
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand	TNF 関連アポトーシス誘導リガンド
TRAP	tartrate-resistant acid phosphatase	酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ
uNTX/Cr	urine NTX corrected for urine creatinine	尿中クレアチニン補正した尿中 NTX
vBMD	volumetric BMD	体積 BMD
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮増殖因子
V_{ss}	volume of distribution	分布容積
WNT	wingless-type protein	ウイングレスタイプたん白質
WHO	World Health Organization	世界保健機構

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ（開発コード AMG 162）は、RANK リガンド（RANKL）と結合し、RANKL と RANK の相互作用を阻害する完全ヒト型 IgG2 モノクローナル抗体である。RANKL は、腫瘍壊死因子（TNF）スーパーファミリーのメンバーの一つであり、骨を吸収する細胞（破骨細胞）の形成、機能、及び生存に必要な経路における必須のメディエーターである。デノスマブは高い親和性及び特異性で RANKL と結合することで、その活性を中和し、破骨細胞を介する骨代謝を抑制する。

デノスマブは、欧米をはじめとする世界各国で、閉経後骨粗鬆症及びがん患者のホルモン抑制療法による骨量減少症の治療、関節リウマチ患者の骨破壊の抑制、前立腺癌の骨転移リスクの高い患者での骨転移の予防、骨転移を有する進行がん患者における骨関連事象（SRE）の予防、多発性骨髄腫の治療、巨細胞腫瘍の治療を対象に、アムジェン社によって開発が進行中である。閉経後骨粗鬆症及び前立腺癌患者におけるホルモン抑制療法に伴う骨量減少を適応症として欧州で 2010 年 5 月に、閉経後骨粗鬆症を適応症として米国で 2010 年 6 月に、乳癌及び前立腺癌におけるホルモン抑制療法に伴う骨量減少を適応症として米国で 2011 年 9 月に、デノスマブの製造販売が承認された。また、骨転移を有する固形癌患者の骨関連事象の予防を適応症として米国で 2010 年 11 月に、欧州で 2011 年 7 月に承認を取得した。

日本国内では SRE の予防、骨粗鬆症、リウマチの治療を対象に第一三共株式会社が開発を進めている。今回の提出資料では、デノスマブ 70 mg/mL を液量 1.7 mL として皮下投与する液剤の販売承認を申請する。骨に進行性悪性腫瘍を有する患者に対する治療法として、デノスマブ 120 mg を 4 週間に 1 回皮下投与する予定である。疾患経過の性質を考慮し、デノスマブは長期使用を意図している。

骨は前立腺癌において最も転移頻度が高い部位であり（Carlin and Andriole, 2000）、女性の乳癌においても 2 番目に多い転移部位である（Viadana et al, 1973）。また、他の固形癌の患者でも頻度の高い転移部位である（Coleman, 1997）。進行した多発性骨髄腫では骨病変の頻度が非常に高い（95%～100%）（Coleman, 1997）。骨の転移病巣の X 線検査上の様相としては溶骨性、造骨性、又は溶骨性と造骨性の混合型があり、いずれの場合でも骨代謝回転は上昇する。がん細胞は副甲状腺ホルモン関連ペプチド（PTHrP）、インターロイキン（IL）-1、及び TNF- α などの液性因子を産生し（Roodman, 2001）、これらの因子が骨芽細胞や骨髄ストローマ細胞上の各々の受容体に結合して RANKL の産生を刺激する。骨微小環境中で RANKL の濃度が上昇すると破骨細胞の成熟と活性化に至る。転移性骨疾患では、これら RANKL 産生刺激因子、RANKL 並びに破骨細胞活性化の上昇によって骨吸収が上昇した状態となっている。

骨転移に伴う破骨細胞の活性増強により、結果として臨床の観点からは、骨折、痛み緩和

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

あるいは切迫骨折の防止のための放射線治療、骨に対する外科的処置、脊髄圧迫、悪性腫瘍による高カルシウム血症（HCM）が認められる。このうち、局所的な事象はSREと定義され、一方でHCMは全身性事象であり、SREとはみなされない。ビスフォスフォネート系骨吸収抑制薬に属する薬物は、非臨床モデル及び臨床試験でSREを減少させることが示されている（Santini et al, 2009）。デノスマブは破骨細胞抑制作用を有するため、固形癌又は多発性骨髄腫による骨病変を有する患者でSRE及びHCMの発生を減少させる効果が期待される。

破骨細胞の動員、活性化、又は活性の増加による骨吸収の増加は骨粗鬆症においても認められる現象であり、癌骨転移の生理学を理解するうえで、骨粗鬆症の観点からの解析は重要である。骨粗鬆症は、骨折リスク増加の要因になる骨強度の低下（骨粗鬆症の予防、診断、及び治療に関するNational Institutes of Health [NIH] コンセンサス開発会議、2001）、及び二重エネルギーX線吸収測定法（DXA）により測定する骨密度（BMD）の減少を特徴とする骨格疾患である（World Health Organization [WHO] 研究グループ、1994）。また、骨粗鬆症は、閉経後女性では加齢によるエストロゲンレベルの低下した結果としてよくみられる疾患である。骨量減少は、主として破骨細胞の動員、活性化、又は活性の増加による骨吸収の増加により引き起こされる。

非転移性乳癌又は前立腺癌のホルモン抑制療法により、疾患再発及び総死亡率が減少する（Goss et al, 2003、Messing et al, 1999、Bolla et al, 1997、Walsh, 1997）。しかし、前立腺癌のアンドロゲン除去療法、又は乳癌のアロマターゼ阻害剤治療は、骨粗鬆症や骨折を引き起こす（Mincey et al, 2006、Diamond et al, 2004、Lester and Coleman, 2005、Shahinian et al, 2005）。

原疾患の状態を問わず、骨吸収が増加し、それに伴い骨リモデリングの単位である基本細胞単位レベルで骨吸収優位となると、その結果として骨密度の減少、並びに骨形状及び微小構造の劣化がもたらされる。この骨吸収の増加により、骨梁が崩壊し、海綿骨及び皮質骨の菲薄化、並びに皮質骨多孔化の可能性が高まる（Seeman and Delmas, 2006）。

非臨床試験の概括はモジュール4に記載した薬理、薬物動態、毒性試験成績をまとめたものであり、さらに臨床における安全性について考察を加えた。モジュール4に添付した報告書の一覧を第7項に示す。なお、本非臨床概括評価中では、各項に記載した試験報告書及び該当する概要表への相互参照を表示した。

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

1. 非臨床試験計画概略

デノスマブの非臨床試験は、バイオ医薬品の標準的な開発手法 (Olejniczak et al, 2001) に従い、規制ガイダンスを遵守して計画された。本申請資料に含まれる薬理及び薬物動態試験のほとんどをアムジェン社にて実施し、毒性試験を外部受託機関で実施した。デノスマブは原疾患を問わず、骨吸収が上昇する病的疾患に対して効果を示すことが期待されていることから、非臨床試験においては、今回の承認申請の対象である癌骨転移に加え、骨粗鬆症の試験結果も示されている。デノスマブの生物学的活性は霊長類に特異的であるため、骨粗鬆症治療薬の開発で通常使用するげっ歯類モデル (米国食品医薬品局 [US FDA] 1994; 欧州医薬品委員会 [CPMP] /EWP/552/95 rev 2) を用いた試験は実施しなかった。代替としてオステオプロテゲリン (OPG) トランスジェニックあるいはヒトとマウスのキメラ RANKL (huRANKL) を発現するノックインマウスを用いた試験を実施した。OPG は内因性 RANKL 阻害剤であり、組換え型 OPG は、霊長類、ラット、及びマウスなどの様々な動物種において RANKL を効果的に阻害する。各種骨疾患の非臨床モデルでの RANKL 阻害作用を検討する際、デノスマブが霊長類の RANKL のみを認識する理由から、サロゲートとして組換え型 OPG を使用した。また、huRANKL ノックインマウスにデノスマブ投与することで、デノスマブの薬力学的特性に関する新たな知見が得られている。毒性試験は、本非臨床の文書の該当項に示すとおり、『ICH S6「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」(平成 12 年 2 月 22 日付医薬審第 326 号)、以下 ICH S6』で示されている指針に準拠して実施した。通常個別の試験として実施するいくつかの毒性評価については反復投与毒性試験の中に組み入れて評価した。また、デノスマブの安全性プロファイル評価に適切ではないと判断したいくつかの毒性試験については実施していない。

非臨床薬力学試験では、用量反応性を評価できる用量を設定した。各毒性試験では、十分な曝露が得られ、全身作用が生じる用量を設定した。毒性試験の投与スケジュールは、試験系における有害作用が最大限検出可能となるようにする一方、デノスマブの血中半減期及び、用いた動物種での免疫原性を考慮して設定した。また、長期投与試験では、デノスマブの適切な曝露を維持するため、薬剤に対する免疫反応に合わせて、投与量を高くする必要が生じた。各試験の低用量は、無影響量 (NOEL) 又は無毒性量 (NOAEL) となるよう設定した (Dorato and Engelhardt, 2005)。

毒性試験、トキシコキネティクス試験、及び 2 つの薬力学試験 (試験報告書 103981 及び 106564)、並びに薬物動態/薬力学 (PK/PD) 試験 (試験報告書 101398) は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準 (GLP) に準拠して実施しており、経済協力開発機構 (OECD) 及び日本の厚生労働省 (MHLW) の基準に適合している。その他の薬理及び薬物動態試験は上記の法的規制下で実施しなかった。また試験実施に際しては、その他該当する ICH 及び欧州医薬品審査庁のヒト用医薬品委員会 (CHMP) ガイダンス文書を参照した。

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

1.1 非臨床における問題点

デノスマブの開発中に確認された非臨床安全性で問題となりうる事項は数及び範囲が限られていた。こうした問題点としては、血清カルシウムの一過性の減少、霊長類で認められた中和抗体の生成による薬物曝露の減少と生物学的活性の減弱、慢性毒性試験における死亡、骨折治癒への影響の可能性、免疫系への影響の可能性、及び血管系への影響の可能性などが挙げられる。デノスマブの安全性評価に対するこれらの問題の関連性及び患者への影響を以下に考察する。

1.2 非臨床試験の主な結論

- TNF スーパーファミリーのメンバーの一つである RANK/RANKL 系は、破骨細胞の形成、機能、及び生存における必須のメディエーターである。
- デノスマブは、完全ヒト型 IgG2 モノクローナル抗体であり、ヒトの RANKL 及び非ヒト霊長類の RANKL と結合し、その活性を中和するが、げっ歯類の RANKL とは結合しなかった。
- OPG は内因性の RANKL 阻害剤であり、デノスマブと同様の作用機序を有する。組換え型ヒト OPG はげっ歯類の RANKL を阻害することから、種々の非臨床モデルにおいて RANKL 阻害の薬理作用を検討するために用いられた。免疫グロブリン結晶化フラグメント (Fc) を OPG に結合させ (OPG-Fc)、動物モデルでの薬理活性の発現を向上させた。
- In vitro で RANKL を阻害してもヒト乳癌、黒色腫、及び前立腺癌の細胞増殖に対する影響は認められなかったが、RANKL 誘導性細胞遊走は抑制された。
- OPG-Fc をマウスに投与したところ、様々なモデルにてヒト乳癌細胞の骨転移の定着及び進行が有意に抑制されるとともに、溶骨性及び溶骨性と造骨性の混合型病変が抑制された。また、エストロゲン受容体アンタゴニストであるタモキシフェンとの併用により、骨腫瘍組織量抑制の相加効果が認められた。
- OPG-Fc をマウスに投与したところ、ヒト前立腺癌の骨転移における定着及び進行が有意に抑制されるとともに、溶骨性病変が抑制された。また、有糸分裂阻害剤であるドセタキセルとの併用により、骨腫瘍組織量抑制の相加効果が認められた。
- OPG-Fc をマウスに投与したところ、様々なモデルにてヒト肺癌の骨転移の定着及び進行が有意に抑制されるとともに、溶骨性病変が抑制された。また、有糸分裂阻害剤であるドセタキセルとの併用により、骨腫瘍組織量抑制の相加効果が認められた。
- 溶骨性、溶骨性と造骨性の混合型、及び造骨性の骨転移モデルにおいて RANKL 阻害の有効性が示された。
- RANK/RANKL 系は乳腺上皮細胞の増殖に重要な役割をしており、マウス乳房発癌モデルにおいて、RANKL 阻害による腫瘍形成の顕著な減少が確認された。
- 成熟卵巣摘出 (OVX) サルにデノスマブを投与したところ、海綿骨及び皮質骨の骨

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

量、骨密度、及び骨強度の急速で有意な増加が認められた。この作用は骨吸収抑制剤としての薬力学作用によるものである。

- 大腿骨閉鎖性骨折を施した huRANKL ノックインマウスにデノスマブを投与すると、仮骨部位及び仮骨体積の増加が認められ、仮骨における破骨細胞数が減少し、骨折部位の仮骨のリモデリングが遅延したが、骨折部位の骨強度は低下しなかった。
- 組織交差反応性試験の結果、デノスマブは、他の TNF スーパーファミリー、特に TNF 関連アポトーシス誘導リガンド (TRAIL) の発現が知られている組織には結合しなかった。
- デノスマブが動物に心血管リスクを惹起したことを示す徴候はみられなかった。
- デノスマブが用量に対して非線形の薬物動態を示す理由は、2つの消失経路が関与している可能性が考えられ、一つは RANKL 結合が関連する飽和性の経路、もう一つは新生仔型 Fc 受容体 (FcRn) が関与する細網内皮系の細胞による非特異的異化経路である。
- 骨中へのデノスマブの分布あるいは残留の痕跡はみられなかった。
- 非臨床のデータを総合すると、デノスマブ投与による成獣の免疫系への有害作用はないことが示唆された。デノスマブを器官形成期から分娩までの期間皮下投与した場合、RANK/RANKL ノックアウト動物と同様に末梢リンパ節の形成不全が引き起こされた。
- デノスマブはサルにおいて高い免疫原性を示し、結合抗体及び中和抗体の生成が認められたことから、長期投与試験ではより高用量投与が必要となった。
- 一般毒性試験で認められたデノスマブ投与に関連した所見は、デノスマブの薬理作用に起因すると考えられる若齢サルでの骨端成長板の肥大のみであった。
- デノスマブは雌雄の受胎能への作用に対する危険性を示さなかったが、器官形成期から分娩までの期間、サルに皮下投与した結果、胎児死亡・死産の増加、出生児の死亡の増加、骨の形態異常、末梢リンパ節の形成不全などの発生異常が認められた。新生仔ラットにおいて RANKL 阻害による骨量及び骨強度の増加、大腿骨靭性の低下、歯牙萌出の阻害、及び長軸方向の骨成長の抑制が認められた。RANKL 阻害を中止した後には、部分的に回復が認められた。

1.3 理化学的考察

デノスマブは、完全ヒト型 IgG2 モノクローナル抗体であり、ヒト RANKL と結合し、その活性を中和する。デノスマブを一定の管理条件下で、チャイニーズハムスター卵巣細胞株 CHO に発現させている (全体的な品質に関する詳細についてはモジュール 2.3 参照)。デノスマブの同一性及び純度は、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC; サイズ排除、陽イオン交換)、及びデノスマブに特異的な抗原を用いた免疫アッセイにより確認する。精製デノスマブの力価は *in vitro* アッセイ系を用いて測定する。デノスマブは、ガラス製バイアルに充填し、たん白

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

質濃度 70 mg/mL の防腐剤を含まない無菌・無色～淡黄色の澄明又はわずかに乳白光を呈する注射剤として調製される。製剤は酢酸、水酸化ナトリウム及び D-ソルビトールを含み、pH を 5.2 に調整される。製剤に含まれる添加物に毒性学的懸念を示すものはない。

デノスマブは、CP1 と呼ばれる実生産向けに開発した製法を用いて初期製造されたが、その後、生産量を上げ、かつ安定な工程となるよう、より実生産向けに改善され、最適な製法 (CP2) が開発されている。臨床開発をサポートするために実施した主要な毒性試験では CP1 工程により製造した被験物質を使用した (モジュール 3.2.S.2.6、製造工程の開発経緯参照)。CP2 への工程改善により、デノスマブの生化学的特性解析において、何ら問題となる差異はみられなかった (モジュール 3.2.S.3、特性解析参照)。したがって、CP1 を用いて実施した毒性試験は十分なものであり、改良工程にて製造した被験物質を臨床試験プログラムへ導入するための動物を用いた追加毒性試験は必要ないと判断した。一方で、サルのパラメータ比較試験 (試験報告書 103948) を実施して、CP2 における細胞培養培地及び精製工程の変更が生物学的活性に及ぼす影響を検討した (モジュール 3.2.S.2.6、製造工程の開発経緯、及びモジュール 2.6.4 第 8.3 項参照)。すなわち、0.1 mg/kg の CP1 又は CP2 デノスマブを雌カニクイザルに単回皮下投与し、デノスマブの血清中濃度及び骨代謝マーカーの血清又は尿中濃度を、間隔を置いて投与後 672 時間まで評価した。多くの個体 (16 例中 13 例) で、抗デノスマブ抗体の発現による、急速なデノスマブの消失が確認された。このことは、反復投与毒性試験での所見と一致していた。336 時間までに抗デノスマブ抗体を発現しなかった動物において、CP1 及び CP2 を投与した動物の最高血清中濃度 (C_{max}) の平均値の差及び濃度-時間曲線下面積 (AUC) の 0~336 時間の値 ($AUC_{0-336 \text{ hr}}$) の平均値の差は、それぞれ 23%未満及び 16%未満であった。さらに、CP1 又は CP2 のいずれを投与した動物においても、骨代謝マーカーの全体的な変化は同様であった。以上のデータから、製造工程 CP2 への改善は、サルのパラメータに対して有意な影響を及ぼさないことが示された。生化学データ及び非臨床 PK/PD データと、デノスマブの臨床生物薬理学試験の結果 (モジュール 2.5 第 2 項及びモジュール 2.7.1 参照) を総合すると、市販用に供する予定である原薬及び製剤は、主要な非臨床試験で使用した被験物質と同等/同質であることが示された。

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

2. 薬理試験

これまでに得られた幅広い情報から、デノスマブの生物学的活性の性質が明らかになり、その細胞レベルでの作用メカニズムを考察することが可能となった(モジュール 2.6.2 参照)。

破骨細胞による骨吸収及び骨芽細胞による骨形成により骨のリモデリングが行われる。この過程では、破骨細胞及び骨芽細胞が時間的、空間的に共役して基本細胞単位を構成し、骨の除去及び置換が連携して生じる。骨のリモデリングは、骨代謝回転の速度により評価することができ、それは破骨細胞と骨芽細胞の活性化の頻度及び活性の度合い、並びに基本細胞単位の終結速度に依存している。骨表面で破骨細胞による骨吸収が始まることにより、新たな基本細胞単位が形成される (Burr and Martin, 1989)。骨芽細胞は、カルシウム調節ホルモン及びサイトカインの受容体を有し、破骨細胞の局所的な動員及び活性を調節しており、骨リモデリングの制御に主要な役割を果たしていると考えられる (Rodan and Martin, 1981)。また、骨は血清カルシウムの恒常性を維持する上で重要な役割を果たしていることから、RANKL 阻害が、カルシウムの制御に影響を及ぼす可能性が考えられる。加えて、加齢やエストロゲン欠乏により、骨形成 (骨芽細胞性) と骨吸収 (破骨細胞性) のバランスが崩れ、ひいては、全身性の骨粗鬆症が引き起こされる。

RANK/RANKL 系は、破骨細胞の形成、機能、及び生存における必須のメディエーターである (Teitelbaum and Ross, 2003)。RANKL は、破骨細胞前駆細胞及び成熟破骨細胞上で RANK と結合して前駆細胞の破骨細胞への分化を促進し、また成熟破骨細胞を刺激して骨吸収を促進する。また、OPG は、RANKL と結合してその作用を遮断することにより骨量を増加させる内因性の可溶性デコイ受容体である (Lacey et al, 1998)。したがって骨吸収の亢進を伴う疾患に対しては、RANKL の阻害は生物学的に妥当な治療標的である。

破骨細胞による骨吸収は、悪性腫瘍に伴って生じる SRE に不可欠の要素であり (Roodman, 2004, Roodman and Dougall, 2008)、破骨細胞による骨吸収の阻害剤であるビスフォスフォネート類は、SRE を減少させる臨床効果を示す (Santini et al, 2009)。また、骨転移の定着においても破骨細胞による骨吸収の役割が示唆されており、破骨細胞の阻害によって骨転移の定着及び進行が遅延するとの仮説も立てられている。破骨細胞の分化、機能、及び生存において RANKL 経路が極めて重要な役割を担うことを前提にすると、デノスマブが SRE の抑制に対して臨床的有効性を示すことが予測されるとともに、骨転移の定着及び進行の抑制に対する潜在的効果も期待される。

OPG は、RANKL と結合しその作用を阻害するという、デノスマブと同じ作用機序を有しており、組換え型 OPG をマウス及びラットに投与すると、破骨細胞の分化及び活性化が抑制され、骨吸収が抑制される (Lacey et al, 1998, Ominsky et al, 2008)。デノスマブはげっ歯類の RANKL を認識しないが、デノスマブの薬力学作用機序が OPG と同様であることから、げ

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

げっ歯類を用いて実施した試験では組換え型 OPG を使用した。これらの試験は、効力を裏づける薬力学作用、RANKL の骨質に対する作用、並びに骨転移の定着及び進行について考察する上で、適切と考えられた。OPG とデノスマブの活性における唯一の相違点は、OPG が TRAIL に対して低いながらも結合親和性を有することである (Johnstone et al, 2008)。TRAIL はサイトカインである TNF スーパーファミリーのメンバーの一つであり、細胞死受容体 4 及び 5 (DR4 及び DR5) に結合した後に細胞にアポトーシスを誘導する (Mahalingham et al, 2009)。TRAIL はがん細胞に対するアポトーシスを誘導するが、in vivo 試験で使用したモデル動物では、OPG が TRAIL に結合してしまうことで、腫瘍の進行、及び転移に対する抑制作用が減弱されることも想定される。このため、骨転移の治療におけるデノスマブの臨床的有効性は OPG では過小評価される可能性がある。

2.1 効力を裏付ける試験

2.1.1 In vitro 試験

デノスマブは解離平衡定数 (K_d) 3×10^{-12} M でヒト RANKL と結合し、その結合は可溶型及び膜結合型のヒト RANKL に特異的である。デノスマブは TRAIL (DR4 及び DR5 のリガンド)、TNF- α 、TNF- β 、又は CD40 リガンド (CD40L) とは結合しなかった (試験報告書 R-1351)。一方で、OPG は RANKL だけでなく、TRAIL とも結合することが報告されている (Truneh et al, 2000)。デノスマブの RANKL 結合部位はカニクイザルとヒトとの間で完全に相同であり、この 2 つの種間におけるデノスマブの薬力学及び薬物動態 (モジュール 2.6.4 参照) の特性は非常に類似していたことから、カニクイザルはデノスマブの薬理及び毒性の検討に適した種であると考えられる。一方で、デノスマブは、マウス又はラットの内因性 RANKL に対して活性を示さないため、デノスマブの生物学的活性をげっ歯類で示すことはできない (試験報告書 R-1430)。そこで、トランスジェニック、ノックイン、ノックアウト、及びサロゲート分子を用いた種々のげっ歯類モデルにて、デノスマブの薬学的メカニズムを検討した (第 2.1.3 項参照)。以上より、デノスマブは RANKL 特異的でありげっ歯類の RANKL に活性を示さず、デノスマブを研究するのに適した動物種は非ヒト霊長類のみであることが示されている。

2.1.2 In vivo 試験

デノスマブはヒトの RANKL 及び非ヒト霊長類の RANKL のみを認識して阻害するため、カニクイザルを毒性及び薬力学試験の最適な動物モデルとして選定した (Kimmel, 1996)。非げっ歯類の選定は、閉経後骨粗鬆症の治療に使用する薬剤の評価に関する既存の規制ガイダンスに準拠している (US FDA 1994; CPMP/EWP/552/95 rev 2)。一方で、デノスマブには種特異性があることから、骨粗鬆症にて一般的に用いられるげっ歯類モデルを評価することは不可能であった。

RANKL の結合部位における相同性はイヌでも類似していたが、イヌを用いた試験では、

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

免疫学的評価項目を解析するための細胞化学試薬が入手できないこと、骨粗鬆症治療薬の作用に関連した背景データがないこと、OVX 後の非ヒト霊長類とは骨生物学的に差異がみられたこと、また非ヒト霊長類よりも強い抗薬物抗体反応を示す傾向が認められたなどの理由により、イヌをデノスマブの薬効評価試験の第二の非げっ歯類動物種として選定しなかった。

デノスマブを用いた評価は霊長類モデルに限定されるものの、骨疾患と癌転移のげっ歯類モデルにおける薬力学データから、OPG がデノスマブの適切なサロゲートであることが示された。前述のように、骨において OPG 及びデノスマブは RANKL を阻害するという同様の作用機序を示す。OPG が *in vivo* においてデノスマブの適切なサロゲートであることを確認するために、OPG 及びデノスマブのいずれもが結合反応を示す遺伝子組換えマウスを作成し、両者の骨に対する作用を比較した。ノックイン技術により、マウス RANKL 遺伝子の第 5 エクソンをヒト RANKL 遺伝子の第 5 エクソンに置き換え、デノスマブ反応性を検討した。このノックインマウスに発現するヒトとマウスのキメラ RANKL (huRANKL) はヒト RANKL に対する酵素免疫吸着測定 (ELISA) 法により認識され、またデノスマブにより阻害された。組織学的解析による破骨細胞面の割合の減少、また、生化学的解析による破骨細胞活性のマーカである血清中酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼアイソフォーム 5b (TRAP5b) の低下の結果から、組換え型 OPG 及びデノスマブ (5 mg/kg、皮下投与、週 2 回) が類似した骨吸収の低下作用を示すことが明らかとなった。末梢骨定量的コンピュータ断層撮影法 (pQCT) による評価では、これらの作用は体積 BMD (vBMD) の増加と一致していた。さらに、これらのマウスの応答性は、投与期間中の週齢の影響を受けなかった (試験報告書 R-13021 及び R-130430、Kostenuik et al, 2009)。

がんの増殖及び転移の非臨床モデルの大多数がげっ歯類に限定されることから (大きな理由として、ヒトの培養がん細胞株が生着可能な免疫不全の動物系統が限られていることが挙げられる)、公表されているデータセットの大多数はげっ歯類モデルである。したがって、げっ歯類モデルを用いて SRE の抑制を裏付ける非臨床データを得た。ただし、デノスマブはげっ歯類において薬理活性を示さないため、この類の実験においては RANKL 阻害剤である組換え型 OPG をデノスマブのサロゲートとして使用した。また、huRANKL のノックインマウスは免疫が正常であり外来細胞を拒絶することから、典型的なヒトのがんの異種移植片移植を実施することはできなかった。

2.1.2.1 種々の癌骨転移モデルにおける RANK 阻害の効果

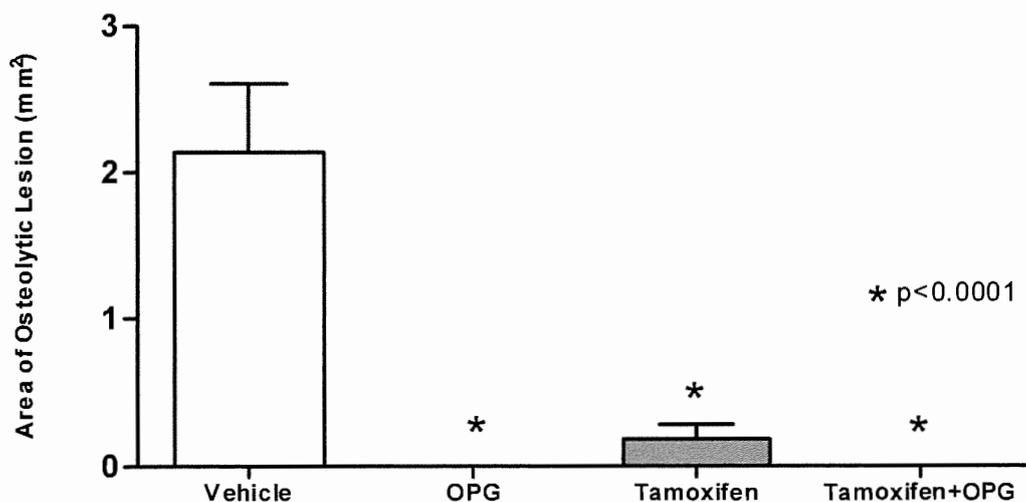
乳癌、前立腺癌、及び肺癌のヒト腫瘍細胞株のマウス骨転移モデルを使用し、悪性腫瘍による SRE に対する RANKL 阻害の有効性を非臨床試験にて評価した。

エストロゲン受容体陰性 (ER-) ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 のルシフェラーゼ (Luc) 発現株 (MDA-MB-231F11Luc) のマウス骨転移モデルにおいて、骨髄に腫瘍が定着すると溶

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

媒コントロール群ではマウスの破骨細胞数が増加し、海綿骨が顕著に消失した (Morony et al, 2001)。このモデルに OPG-Fc を投与 (以下 OPG-Fc は皮下投与) した場合、骨の腫瘍組織量の増加及び溶骨性病変の進行が用量依存的に有意に減少し、生存期間が延長した (試験報告書 R2006160 及び R2006161)。また、それに伴って破骨細胞数も減少した (Canon et al, 2008)。エストロゲン受容体陽性 (ER+) ヒト乳癌細胞株 MCF-7 の Luc 発現株 (MCF-7Luc) を用いたマウス骨転移モデルにおいても、OPG-Fc を投与したところ、骨の腫瘍組織量増加が有意に抑制され、溶骨性病変の進行が抑制され、循環血中の骨吸収マーカー値の上昇が抑制された (試験報告書 R20080161 及び R20080162)。ER+ 癌細胞に対し阻害作用を有するエストロゲン受容体アンタゴニスト (タモキシフェン) 投与後にも、同様に骨の腫瘍組織量の増加の抑制及び溶骨性病変の進行の抑制が認められ (図 2-1、図 2-2、試験報告書 R20080162)、OPG-Fc とタモキシフェンとを併用したときに腫瘍組織量に対する相加作用が確認された (図 2-2、試験報告書 R20080162)。



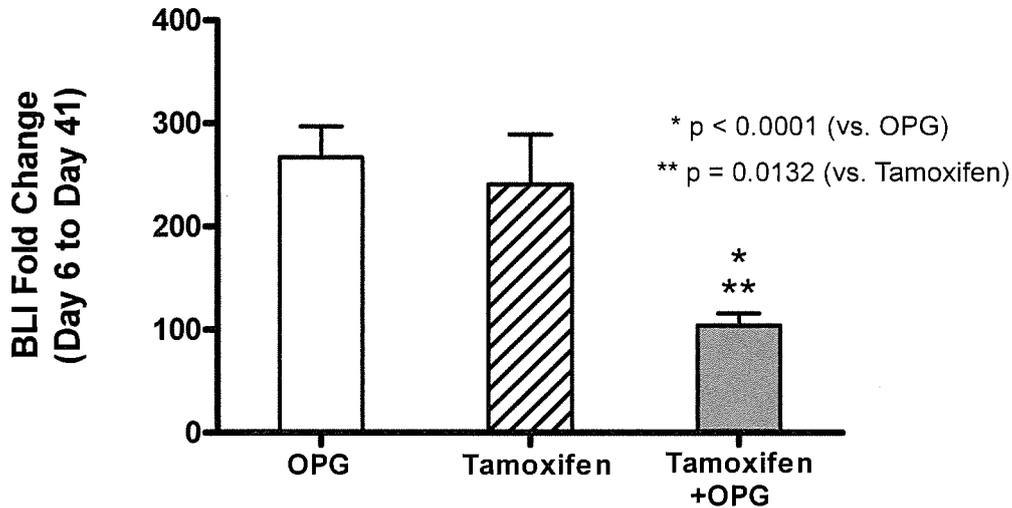
腫瘍移植後 36 日目に X 線解析を実施した。ただし、腫瘍移植を 0 日目 (以下同様) に実施した。各群における溶骨性病変面積の平均を盲検化したイメージ画像から MetaMorph イメージ解析ソフトウェアを用いて測定した。OPG-Fc (図中 OPG と記載、3 mg/kg、週 3 回、皮下投与) とタモキシフェン (図中 Tamoxifen と記載、0.1 mg、週 5 回、腹腔内投与) を単独あるいは併用で腫瘍移植後 7 日目から投与開始した。データは平均病変面積 + 標準誤差を示す (10 例/群)。Bonferroni/Dunn 検定による統計解析を実施した。溶媒コントロール群と比較してすべての群が統計的有意差を示した。

出典: 試験報告書 R20080162

図 2-1 ヒト乳癌細胞株 MCF-7Luc 骨転移モデルにおける溶骨性病変の面積に対する OPG-Fc 単独あるいはタモキシフェンとの併用効果 (36 日目)

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ



生物発光イメージング (BLI) を用いて腫瘍組織量を計測し、各処置群の6日目に対する41日目の腫瘍量の比を算出した。溶媒コントロール群においては、この時点 (41日目) のBLI測定を実施しなかった。腫瘍移植後7日目から41日目の試験終了後までOPG-Fc (図中OPGと記載、3 mg/kg、週3回、皮下投与) とタモキシフェン (図中Tamoxifenと記載、0.1 mg、週5回、腹腔内投与) を単独あるいは併用にて投与した。データは平均BLI比 + 標準誤差を示す (10例/群)。Bonferroni/Dunn検定による統計解析を実施した。併用群は各々の単独群に対して統計的有意差を示した。
出典: 試験報告書 R20080162

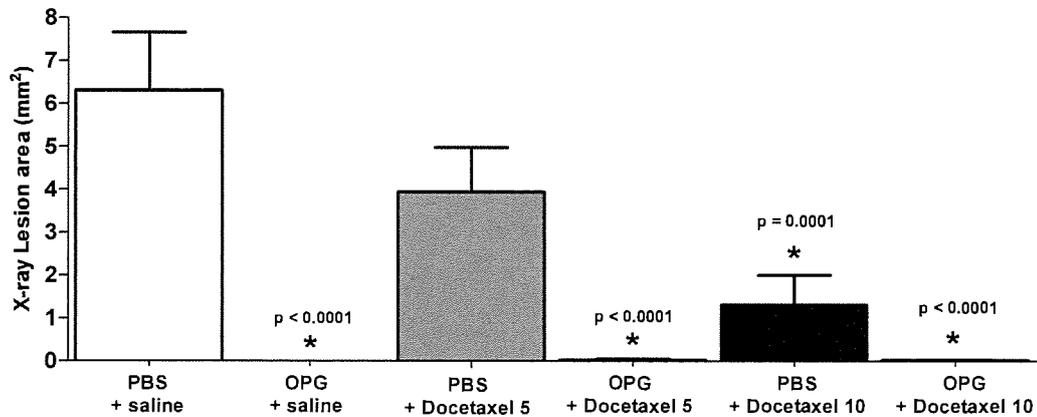
図 2-2 ヒト乳癌細胞株 MCF-7Luc 骨転移モデルにおける後肢の骨腫瘍組織量に対する OPG-Fc 単独あるいはタモキシフェンとの併用効果の比較 (6日目に対する41日目の比)

また、マウスの OPG-Fc 前投与により、新規の骨転移形成及び溶骨性病変の進行が遅延あるいは抑制され、循環血中の骨吸収マーカー値が抑制された (試験報告書 R20070953)。

同様に、ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 の Luc 発現株 (PC-3Luc) のマウス骨転移モデルに OPG-Fc を投与したところ、骨の腫瘍組織量の増加及び溶骨性病変の進行が有意に抑制され (図 2-3、図 2-4)、循環血中の骨吸収マーカー値が有意に減少した (試験報告書 R20080083)。この効果は高用量の有糸分裂阻害剤 (ドセタキセル) と類似していた。さらに、OPG-Fc をドセタキセルと併用したとき、骨腫瘍組織量に対する効果は相加的であった (図 2-4)。

2.4 非臨床試験の概括評価

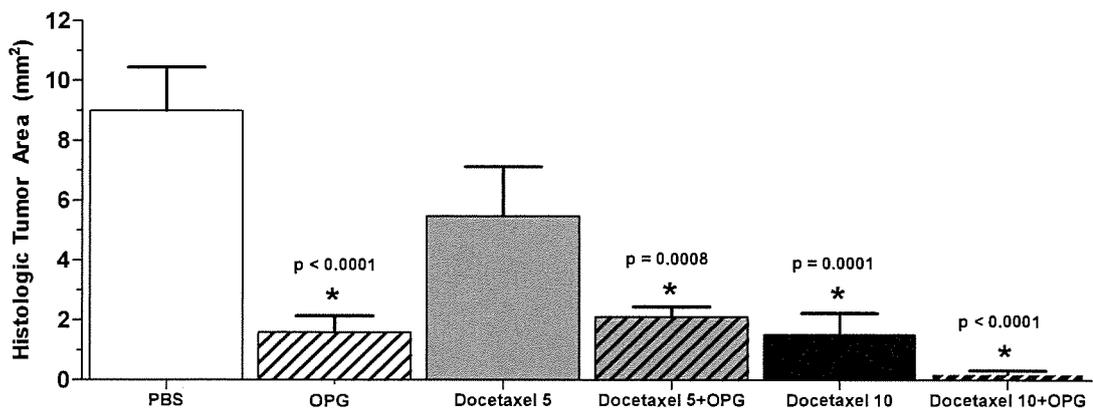
デノスマブ



腫瘍移植後 27 日目に大腿骨と脛骨の X 線による病変面積の解析を行った。OPG-Fc (図中 OPG と記載、3.0 mg/kg、週 3 回、皮下投与、11 日目から 28 日目) 単独、あるいはドセタキセル (図中 Docetaxel と記載、5 又は 10 mg/kg、腹腔内投与、11 日目と 18 日目に投与) との併用にて投与した。リン酸緩衝生理食塩液 (PBS)、生理食塩水 (saline) をそれぞれ溶媒コントロールとして用いた。データは平均病変面積 + 標準誤差を示す (8 例/群)。溶媒コントロールを対照とした Dunnett 検定による統計解析を実施した。

出典: 試験報告書 R20080083

図 2-3 ヒト前立腺癌細胞株 PC-3Luc 骨転移モデルにおける溶骨性病変の面積に対する OPG-Fc 単独あるいはドセタキセルとの併用効果



腫瘍移植後 28 日目に骨腫瘍組織量を組織学的に解析した。OPG-Fc (図中 OPG と記載、3.0 mg/kg、週 3 回、皮下投与、11 日目から 28 日目) 単独、ドセタキセル (図中 Docetaxel と記載、5 又は 10 mg/kg、腹腔内投与、11 日目と 18 日目に投与) 単独、あるいは両者の併用にて投与した。データは平均骨腫瘍面積 + 標準誤差を示す (8 例/群)。統計解析は SAS ソフトウェアを用いて溶媒コントロールに対する Tukey 多重比較検定を実施した。OPG-Fc 単独あるいはドセタキセルとの併用により組織学的に見られる骨内の腫瘍面積が有意に低下した。

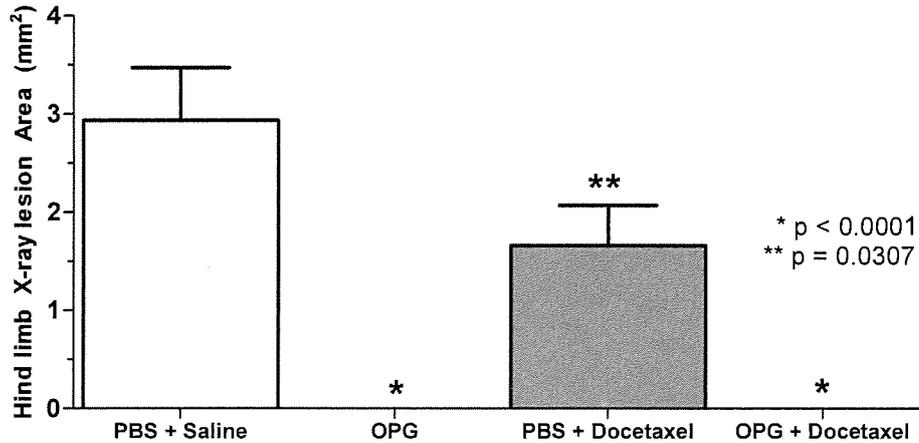
出典: 試験報告書 R20080083

図 2-4 ヒト前立腺癌細胞株 PC-3Luc 骨転移モデルにおける骨腫瘍組織量に対する OPG-Fc 単独あるいはドセタキセルとの併用効果

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

ヒト非小細胞肺癌のマウス骨転移モデルでは、OPG-Fcを投与したところ骨の腫瘍組織量の増加が有意に抑制され、溶骨性病変の拡大が有意に抑制され（図 2-5、図 2-6）、循環血中の骨吸収マーカー値の上昇が有意に抑制された（試験報告書 R20070963、R20080310、R20080331、及び R20080332）。この効果はドセタキセル投与よりも高かった（図 2-5、図 2-6）。

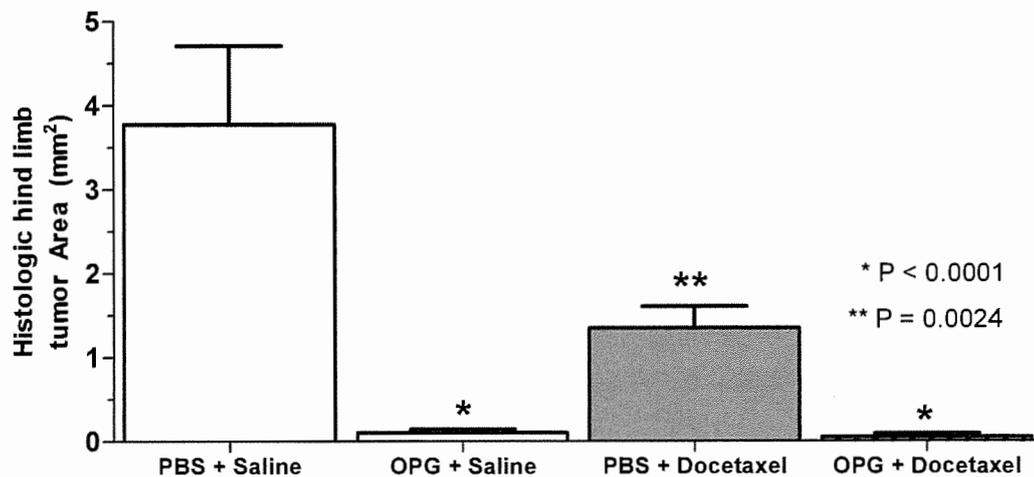


腫瘍移植後 23 日目に大腿骨と脛骨の X 線による病変面積の解析を行った。PBS あるいは OPG-Fc（図中 OPG と記載、3 mg/kg、皮下投与）を週 3 回投与した。生理食塩水あるいはドセタキセル（図中 Docetaxel と記載、15 mg/kg、腹腔内投与）を週 1 回投与した。データは平均病変面積 + 標準誤差を示す（7 又は 8 例/群）。Dunnett 検定による統計解析を実施した。
出典：試験報告書 R20080332

図 2-5 ヒト非小細胞肺癌細胞株 H1299 骨転移モデルにおける溶骨性病変面積に対する OPG-Fc 単独あるいはドセタキセルとの併用効果

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ



腫瘍移植後 23 日目の骨内に腫瘍面積を組織学的に測定した。PBS あるいは OPG-Fc (図中 OPG と記載、3 mg/kg、皮下投与) を週 3 回投与した。生理食塩水あるいはドセタキセル (図中 Docetaxel と記載、15 mg/kg、腹腔内投与) を週 1 回投与した。データは平均腫瘍面積 + 標準誤差を示す (7 又は 8 例/群)。Dunnnett 検定による統計解析を実施した。OPG-Fc 単独あるいはドセタキセルとの併用は組織学的にみた骨内の腫瘍面積を有意に減少させた。

出典: 試験報告書 R20080332

図 2-6 ヒト非小細胞肺癌細胞株 H1299 骨転移モデルにおける骨腫瘍組織量に対する OPG-Fc 単独あるいはドセタキセルとの併用効果

以上より、OPG-Fc による RANKL 阻害にて、溶骨性病変の進展、骨転移の定着及び進行が強く抑制され、循環血中の骨吸収マーカー値の上昇抑制と相関していた。これらの結果は、RANKL 阻害により予想された薬理活性と一致する。

RANKL はマウスの乳腺の発達にも寄与している。RANK/RANKL ノックアウトマウスにおいて妊娠時の乳房組織の発達は正常であるが、妊娠後期に至ると小葉腺胞の発達と乳汁の分泌が起こらなくなる (Fata et al, 2000、第 2.2.2 項参照)。一方で、乳腺にて RANK を過剰発現しているトランスジェニックマウスでは妊娠時に恒常的な乳腺上皮細胞の増殖が見られる (Gonzalez-Suarez et al, 2007)。そこで、野生型マウスあるいはマウス乳腺腫瘍ウイルス (MMTV) プロモーターを用いた RANK を乳腺にて過剰発現する遺伝子組換えマウス (MMTV-RANK トランスジェニックマウス) を用い、乳房腫瘍の誘発/促進モデルにて、乳腺の増殖及び腫瘍形成への RANKL の役割を検討した。マウスを発がん物質ジメチルベンズアントラセン (DMBA) に曝露させ、酢酸メドロキシプロゲステロン (MPA) にて誘発促進すると、野生型と比較して RANK を過剰発現しているマウスでは乳房の腫瘍形成時期が早まり、乳腺上皮細胞の増殖が亢進した (試験報告書 R20090211)。RANK 細胞外領域と Fc 領域との融合たん白質である組換え型 RANK-Fc にて RANKL を阻害すると、野生型、MMTV-RANK トランスジェニックマウス双方において、腫瘍増殖の低下、腫瘍発生時期の遅

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

延、腫瘍形成と進行の低下がみられた。これらの結果は乳腺上皮細胞の増殖低下並びにサイクリン D1 の発現低下と相関していた（試験報告書 R20090211）。

2.1.2.2 骨質に対する RANKL 阻害の作用

毒性試験からはデノスマブの有効性を示す評価項目に関しても多くの知見が得られ、その知見をもとにその後の骨質試験を計画した。若齢無去勢カニクイザルにデノスマブ 1 mg/kg を単回皮下投与すると、血清中 N-テロペプチド（血清中 NTX）をサロゲートマーカーとした場合、速やかかつ有意な骨吸収抑制が示された（試験報告書 101447）。また、デノスマブを月 1 回、12 ヶ月間投与した若齢無去勢カニクイザルにおいては、大腿骨骨幹部の骨塩量（BMC）と、同部位で実施した三点曲げ試験における骨強度の間に相関性が認められた（試験報告書 102090）。

代表的な骨粗鬆症の動物モデルとして、成熟（9～16 歳）OVX カニクイザルを用いて、デノスマブ 25 又は 50 mg/kg を月 1 回、長期間（16 ヶ月間）皮下投与した場合の海綿骨及び皮質骨量、骨密度、骨形状、さらに骨代謝回転に対する効果を検討した（試験報告書 103981）。本試験においては、それ以前に実施した試験結果から想定されたとおりの結果が得られた。具体的には、OVX 溶媒コントロール群又は偽手術溶媒コントロール群と比較して、OVX デノスマブ投与群では骨形成マーカーである血清中骨型アルカリホスファターゼ（BSAP）、骨吸収マーカーである血清中 C-テロペプチド（CTX）及び尿中 N-テロペプチド（尿中 NTX）を尿中クレアチニン（Cr）で補正した尿中 NTX（uNTX/Cr）が急速かつ有意に低下した。腰椎、大腿骨近位部、大腿骨頸部、及び脛骨骨幹部の BMD が増加した。特に、OVX 溶媒コントロール群では偽手術溶媒コントロール群と比較して橈骨遠位部及び脛骨近位部骨幹部の海綿骨 vBMD が有意に減少したが、デノスマブはこの OVX による海綿骨量の減少を完全に防止した。また、脛骨骨幹部においてはデノスマブ投与により皮質骨外膜周囲長が増加傾向を、また骨内膜周囲長が減少傾向を示したことから、断面二次モーメント（CSMI）が有意に高値を示した。これらの結果から、デノスマブにより骨質を表す血中マーカーの改善、骨吸収の抑制、及び骨密度の増加が認められ、それにより骨強度が改善されることが示された。

成熟 OVX カニクイザルを用いて、アレンドロネート（ビスフォスフォネート系骨吸収抑制薬）を 6 ヶ月間投与した後デノスマブ（25 mg/kg、皮下投与、月 1 回）に切り替えた場合の骨密度、骨強度、及び血清カルシウムに対する影響についても評価した（試験報告書 106564）。アレンドロネートからデノスマブに切り替えると、アレンドロネートの投与を継続した場合と比較して、骨吸収はさらに抑制され、その結果、全身、腰椎、及び橈骨遠位部の BMD はアレンドロネート投与時よりも増加した。なお、骨強度や他の骨質パラメータに対して悪影響は認められなかった。アレンドロネート又はデノスマブを投与したサルでは、投与後一過性に血清カルシウムが低下した。しかし、平均血清カルシウム値は、同年齢の薬剤非投与 OVX 群の正常範囲内にとどまっていた。溶媒を 6 ヶ月間前投与した後、デノスマブ投与に切り替え

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

ると、平均血清カルシウム値は一過性に最大15.2%低下した。対照的に、アレンドロネートからデノスマブに切り替えた場合は、平均血清カルシウム値の一過性の低下はわずか4.5%であった。これらの知見から、ビスフォスフォネートからデノスマブへ投与を切り替えても、血清カルシウム、骨強度、又は骨質に明らかな有害作用がないことが示された。

2.1.3 薬力学的メカニズム

RANKLは、TNFスーパーファミリーに属し、膜結合型又は可溶性たん白質として存在する。RANKLは骨芽細胞により生成され、破骨細胞の最終分化、活性化、及び生存において中心的役割を果たす (Lacey et al, 1998, Lacey et al, 2000)。RANKLには分泌型、膜結合型、又は膜結合型からの切断型があり、可溶性分子として周囲の媒質に放出される可能性がある (Ikeda et al, 2001)。マウスでは、組換え型 RANKL が血清カルシウムの上昇、骨吸収の増加を引き起こし、結果として骨粗鬆症を導く (Lacey et al, 1998)。また、RANKL は単離した成獣ラット破骨細胞を活性化し、骨吸収能を増加させる (Burgess et al, 1999)。

がんの骨転移においては、破骨細胞の形成及び活性を促進する多数の因子が産生されると考えられている。その由来として、転移したがん細胞による骨での局所産生、転移したがん細胞に反応した局所のストローマ細胞からの産生、骨基質からの産生、がん細胞そのものからの産生、あるいはがん細胞に反応した全身からの産生が仮説として考えられている

(Roodman, 2004, Roodman and Dougall, 2008)。破骨細胞の形成及び活性化に至る最も重要なシグナル伝達分子は原因となる事象を問わず、RANKL である (Roodman and Dougall, 2008)。破骨細胞の活性上昇は溶骨性、造骨性、及び溶骨性と造骨性の混合型病変の形成に重要であり、転移腫瘍の増殖を促進する局所因子の放出を促す可能性が考えられている (Roodman, 2004, Roodman and Dougall, 2008) (図 2-7)。

溶骨性、造骨性、及び溶骨性と造骨性の混合型という骨転移の分類は X 線所見によって定義され、骨リモデリング過程における細胞の関与が反映されていない。この X 線像上の表現型にかかわらず、破骨細胞の活性亢進は転移性骨病変の進行機序の重要な構成要素の 1 つである (Roodman, 2004)。溶骨性、造骨性、及び溶骨性と造骨性の混合型のいずれであるかにかかわらず、骨転移を有する患者において溶骨性成分が確認され、骨吸収の生化学的マーカーが上昇することが証明されている (Charhon et al, 1983, Demers, 2003)。

溶骨性、造骨性、又は溶骨性と造骨性の混合型が主体となる様々な骨転移モデルを用いた非臨床試験では、例外なく RANKL 阻害の有益な作用が示されている (モジュール 2.6.2 参照)。したがって、デノスマブは、溶骨性、造骨性、及び溶骨性と造骨性の混合型の骨転移に対して臨床的に有益であると予測される。

前述のとおり、OPG は可溶性であり、内因性の RANKL 阻害剤である。組換え型 OPG は、

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

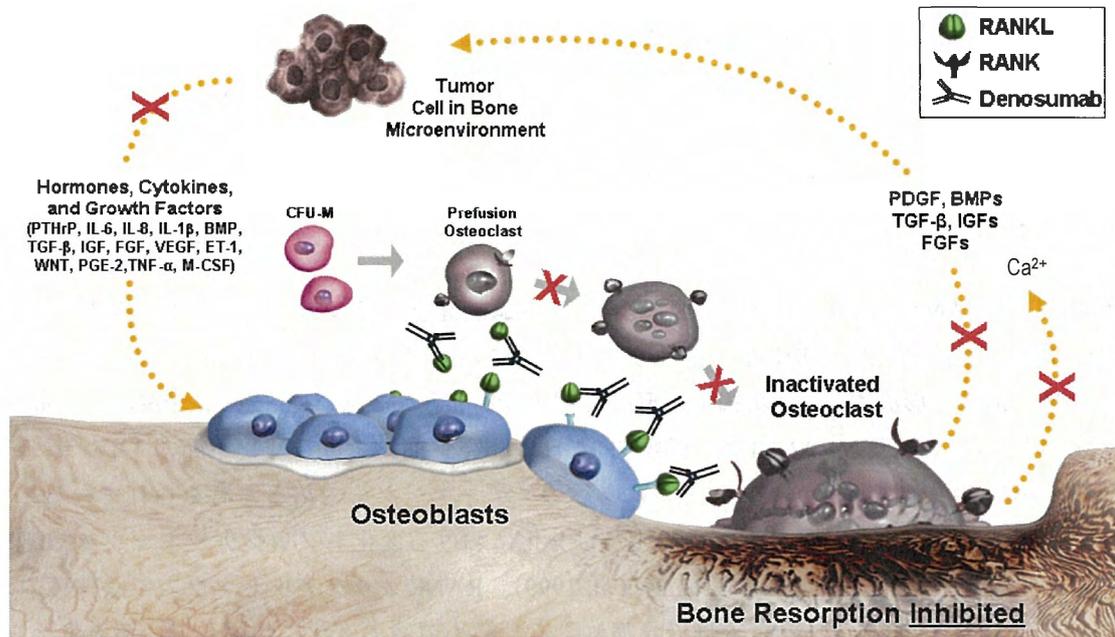
非ヒト霊長類、ラット、及びマウス等の数種の動物種において RANKL 阻害効果を示す。デノスマブは非ヒト霊長類以外で活性を示さないが、RANKL を認識することから、骨に対する作用機序は OPG と同様である。したがって、骨疾患並びにがん転移のげっ歯類モデルにおいて、RANKL 阻害の薬力学的メカニズムを検討するために、組換え型 OPG をサロゲート分子として使用した。

内因性の OPG は、110 kD、内因性、分泌型の糖たん白二量体である (Simonet et al, 1997)。OPG を過剰発現しているトランスジェニックマウスは大理石骨病を呈する (Simonet et al, 1997)。対照的に、OPG 欠損マウスは、表現型として重度の骨粗鬆症を示す (Bucay et al, 1998)。また、組換え型 OPG を動物に投与すると、デノスマブと同様の作用機序で破骨細胞を阻害し、骨吸収が減少する (Simonet et al, 1997)。骨吸収は、破骨細胞の動員及び活性化の抑制、又はその寿命を短縮させることにより阻害できると考えられている。したがって、OPG は破骨細胞の最終分化を阻害し (それにより成熟破骨細胞プールに影響を及ぼし)、成熟破骨細胞の活性を阻害し (Simonet et al, 1997)、マウス骨髄培養系において破骨細胞のアポトーシスを誘発する (Akatsu et al, 1998) ことで、骨吸収を抑制すると考えられる。

種々の非臨床骨疾患モデルにおいて、組換え型 OPG を用いた実験では、予想された薬力学効果が認められた (Dunstan et al, 1997、Simonet et al, 1997)。組換え型 OPG は、ラットの OVX に伴う骨量減少を防ぎ (Ominsky et al, 2008)、結腸由来癌細胞 Colon26 (C26) 担癌マウスにおける HCM を是正した (Morony et al, 2005)。また、PTHrP 及び IL-1 β (Morony et al, 1999) 等の各種骨吸収刺激物質により誘発される高カルシウム血症も是正し、アジュバント関節炎ラットにおける骨びらん及び BMD の低下を防止することにも有効であった (Kong et al, 1999a)。以上の実験データ及び作用機序の同等性に関する知見から、骨疾患及び腫瘍転移動物モデルにおいてデノスマブは OPG と同様に作用する可能性が示された。第 2.1.1 項で述べたように、OPG は RANKL への結合に加えて TRAIL に対して低い結合親和性を示す。OPG が TRAIL へ結合することにより、TRAIL による腫瘍抑制効果を OPG が減少させることが想定されたため、場合によってはデノスマブの SRE 抑制における有効性を過小評価している可能性がある。

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ



BMP, 骨形成たん白質; Ca^{2+} , カルシウムイオン; CFU-M, マクロファージコロニー形成ユニット; ET-1, エンドセリン-1; FGF, 線維芽細胞増殖因子; IGF, インスリン様増殖因子; M-CSF, マクロファージコロニー刺激因子; PDGF, 血小板由来増殖因子; PGE-2, プロスタグランジンE-2; TGF- β , 形質転換増殖因子 β ; VEGF, 血管内皮増殖因子; WNT, ウィングレスタイプたん白質
出展: Clezardin and Teti, 2007 から改変

図 2-7 デノスマブの作用機序

2.2 副次的薬理試験

RANK/RANKL 系の役割は主として破骨細胞の形成、機能、及び生存の制御である。しかしながら、RANK/RANKL 系は免疫系の細胞にも発現しており、また、血管生物学にも関与する仮説が立てられている。そこで、第 2.2 項では関連する実験データ及び文献にもとづいて考察する。また、乳腺の発達、体温調節、新生仔歯牙萌出、骨成長、並びに骨折治癒に対する RANKL 阻害の影響についても考察する。

2.2.1 免疫系

RANK/RANKL ノックアウトマウスではリンパ節が発生しない (Kong et al, 1999b, Dougall et al, 1999)。成獣の免疫系において、RANKL は活性化 T 及び B 細胞に発現し、RANK は主として、破骨細胞及びマクロファージと系統を同じくする成熟した樹状細胞に局限して発現している (Anderson et al, 1997, Choi et al, 2001, Wong et al, 1997a, 1997b)。そこで、RANKL の免疫調節への関与が推測されたことから、RANKL 阻害に伴う免疫系の変化についての様々な研究がげっ歯類にて実施されており、詳細をモジュール 2.6.2 にて考察した。ただし、

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

デノスマブはげっ歯類 RANKL と交差反応しないことから、種々のげっ歯類モデル実験では OPG-Fc、RANK-Fc などの RANKL 阻害剤を使用した。また、デノスマブを高曝露で最大 16 ヶ月間サルに投与し、免疫系機能を測定した。

得られたデータからは、RANKL 阻害は成獣の免疫系に対して有害な影響を及ぼさないことが示唆されている。

2.2.1.1 RANK/RANKL ノックアウト及び OPG 過剰発現トランスジェニック動物の表現型

RANK 又は RANKL の欠損により、マウスの発生においてリンパ節が欠如するが、パイエル板は腸で正常に形成され、樹状細胞の形成及び機能も正常である (Kong et al, 1999b、Dougall et al, 1999)。RANK 及び RANKL は、妊娠約 14 日の胚発生期におけるリンパ節の「インデュースー」細胞 ($CD3^-CD4^+CD45^+$) の分化に必須のメディエーターであると考えられている

(Mebius, 2003)。また、リンパ球の発生及び分化における変化もノックアウトマウスで認められている (Kong et al, 1999b、Dougall et al, 1999)。RANK ノックアウトマウスでは脾臓中の B 細胞が減少しており、これは大理石骨病による骨微小環境の変化に起因していると考えられる (Jacquin et al, 2005)。RANKL ノックアウトマウスでは初期 B 細胞発達に不全がみられ、胸腺の細胞充実度が低い (Kong et al, 1999b)。また、RANKL ノックアウトマウスには表皮ランゲルハンス細胞が少ないことが報告されている (Barbaroux et al, 2008)。

これに対して、OPG を過剰発現するトランスジェニックマウス又はラットにおいては RANK/RANKL シグナリングが阻害されているが、リンパ節形成の異常はみられなかった (Simonet et al, 1997)。この観察所見から、RANK/RANKL シグナリングを部分的に阻害してもリンパ節及び正常に機能する免疫系の発生が可能と考えられるが、遺伝子の破壊による RANK/RANKL シグナリングの完全除去ではこれらの発生が不可能であることが示された。胎仔におけるリンパ節発生に必要な RANKL の量は不明であるが、OPG トランスジェニックラット胚における OPG 濃度は、リンパ節形成前の妊娠 11 日 (Mebius, 2003) で正常ラットよりも約 100 倍高かった (Stolina et al, 2007)。このレベルの OPG 過剰発現により、骨量は増加したが、リンパ節の発生は妨げられなかった (Capparelli et al, 2003)。妊娠カニクイザルにデノスマブを 50 mg/kg で月 1 回、器官形成期から分娩までの期間皮下投与した結果、末梢リンパ節の形成不全が認められた (試験報告書 112197)。したがって、デノスマブの高曝露により RANK/RANKL シグナリングを阻害した場合には、リンパ節の形成に影響することが明らかとなった。

以上のことから、RANK/RANKL 系が胎仔期のリンパ節の形成に何らかの役割を果たしていることが示唆される。

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

2.2.1.2 基礎免疫系

RANK/RANKL ノックアウト動物から得られたデータを踏まえ、広範囲の基礎免疫系に対する RANKL 阻害の影響について検討した。

OPG-Fc を投与したマウスの循環血液中の免疫グロブリン値は正常であり、*in vitro* の T 及び B 細胞の細胞増殖反応も正常であった (Stolina et al, 2003)。OPG 過剰発現ラット及びマウスでは、リンパ節における免疫細胞数の低下、リンパ組織欠損の表現型は認められず、血液及び脾臓の免疫細胞成分 (免疫表現型分類を含む) の低下、体循環中サイトカイン値の増加及び低下、体循環中免疫グロブリン値の増加及び低下、*in vitro* での T 及び B 細胞の細胞増殖反応の低下はみられなかった (Stolina et al, 2007)。デノスマブを最大 16 ヶ月間投与したサル
のリンパ節は病理組織学的に正常であり、循環血液中の免疫細胞のレベルも免疫表現型分類を含めて正常であった (試験報告書 102090 及び 103981)。

結論として、RANKL 阻害によって成獣の基礎免疫系が変化することを示唆するデータは示されていない。上記データより、免疫系の構造に対する RANK/RANKL 系の影響は胚発生時に限定されると考えられる。

2.2.1.3 免疫応答惹起に対する反応

In vitro で RANKL により樹状細胞の生存が延長し、樹状細胞刺激による T 細胞増殖が亢進することが報告されている (Anderson et al, 1997)。OPG ノックアウトマウスにおける樹状細胞の機能の亢進は、恐らく樹状細胞上の RANK/RANKL 系の相互作用を介する可能性がある (Chino et al, 2009)。これに対し一部のモデルでは、RANKL が抗原特異的制御性 T 細胞をアップレギュレーションすることで、皮膚の免疫応答を抑制し、RANKL 阻害によってこの免疫抑制が解除されることが示されている (Loser et al, 2006)。

特定の抗原に対する統合免疫応答への RANKL 阻害の影響が各種実験にて検討されている。OPG-Fc を投与したマウスにおいて、皮膚の遅発性過敏症に対する影響は認められなかった。また、抗原特異的リンパ節 T 細胞の増殖又はサイトカイン産生に対する影響を伴わずに T 細胞依存性抗体反応がわずかに増強し、T 細胞非依存性抗体反応もわずかに増強した (Stolina et al, 2003)。OPG 過剰発現トランスジェニックマウス及びラットでは、皮膚の遅発性過敏症に対する影響は認められず、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) に対する抗原特異的リンパ節 T 細胞増殖への影響や T 細胞依存性抗体反応への影響も認められず、ニューモバックス (pneumovax) に対する T 細胞非依存性抗体反応はわずかに増強し、リポ多糖エンドトキシン投与に対するサイトカイン応答に対する影響はなかった (Stolina et al, 2007)。さらに、デノスマブを最大 16 ヶ月間投与したサルにおいて、KLH に対する T 細胞依存性抗体反応又は皮膚の一般状態への影響は認められなかった (試験報告書 102090 及び 103981)。これらのモデルではランゲルハンス細胞、樹状細胞、T 細胞、及び B 細胞の統合した機能が検討され

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

ており、すべてのデータからは免疫抑制がないことが示されている。Loser らの研究では (Loser et al, 2006)、UV 誘発性の皮膚免疫抑制が RANKL 阻害により解除される可能性が示唆される一方で、種々のモデルにおいて RANKL 阻害により皮膚免疫応答が増悪されるという報告はない。RANKL 阻害による免疫抑制への影響も示唆されていない。

2.2.1.4 感染症に対する免疫応答

RANKL阻害の影響を細菌及びウイルス感染症のモデルにて検討した。マウスにOPG-Fcを投与しても細菌誘発肝損傷、細菌性肉芽腫形成、細菌感染量に対する影響は認められなかった (Stolina et al, 2003)。マウスにRANK-Fcを投与した場合も、インフルエンザウイルス誘発肺重量変化、インフルエンザウイルス排除、抗原特異的IgG反応、及び循環血中サイトカイン値に対する影響はなかった (Miller et al, 2007)。リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) を感染させ、RANK-Fcを投与したマウスの抗体反応、胚中心形成、細胞傷害性T細胞応答、及びCD4⁺応答は正常であった (Bachmann et al, 1999)。この実験では、CD40L又はCD40 ノックアウトマウスを用いた場合、RANK-Fc投与によりLCMV及びインフルエンザウイルスに対する免疫応答は低下した。また、用いている動物は一般的に広範囲の病原体に曝露されているにもかかわらず (Sasseville and Diters, 2008)、デノスマブを最大 16 ヶ月間投与したサルでは感染症に対する感受性の増強は認められなかった (試験報告書 102090 又は 103981)。

以上より、RANK/RANKL 系は、CD40/CD40L と重複した機能を持つ共刺激分子として作用する可能性があるものの、感染因子への免疫応答を開始する能力に対して RANKL 阻害が影響を及ぼさないことが示唆される。

2.2.1.5 免疫介在性疾患に対する影響

免疫が介在する種々の疾患モデルにて RANKL 阻害の影響が検討されている。

T 細胞依存性のラットアジュバント誘発関節炎において、OPG-Fc を投与したところ骨及び軟骨破壊が抑制されたが、単核細胞浸潤及びパンヌス形成に対する影響はなかった (Kong et al, 1999a)。同様に、アジュバント及びコラーゲン誘発関節炎のいずれにおいても、OPG-Fc によって骨量減少は抑制されたが、局所炎症又は血清中の炎症マーカー値に対する影響はなかった (Stolina et al, 2009)。

炎症性腸疾患に対する RANKL 阻害の影響が CD4⁺CD45RB^{high} T 細胞導入免疫不全マウスモデルにて検討されている (Byrne et al, 2005)。このモデルに Fc-OPG を投与したところ骨密度は増加したが、消化管炎症又は骨髄の炎症性細胞浸潤に対する影響はなかった。一方で、CD4⁺CD45RB^{high} T 細胞介在大腸炎様のモデルにおいては、抗 RANKL 抗体によって外因性 CD4⁺CD25⁺ 制御性 T 細胞の免疫抑制能が阻害された (Totsuka et al, 2009)。また、IL2^{-/-} マウスに Fc-OPG を投与したところ自然発生大腸炎の発症が抑制された (Ashcroft et al, 2003)。

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

RANKLの役割は同種異系膵島細胞移植モデルにおいても検討されている (Wojtuszczyzn et al, 2009)。In vitroにてCD3/CD28 刺激を行うとCD4⁺T細胞上のRANKLの発現が増加するが、RANKL阻害により混合リンパ球の増殖が有意に変化することはなく、CD154 阻害によって引き起こされる増殖抑制を促進した。In vivoにてRANKL阻害剤を短期間投与しても同種異系移植での生存に影響は無く、長期投与では同種異系移植での生存が延長した。

上記のように高度に免疫系が制御されているモデルでは、消化管炎症に対して無影響、増強、あるいは減弱など、ばらつきがあり、明らかにモデル間で結果が一致していない。デノスマブを最大 16 ヶ月間投与したサルにおいても、消化管免疫応答の変化を示すようなデータは確認されなかった (試験報告書 102090 及び 103981)。これらの知見から、免疫系が正常な成獣に対しては、RANKL 阻害の影響はない可能性が示唆される。

2.2.1.6 免疫系の要約

RANK 及び RANKL ノックアウトマウスにて末梢リンパ節が欠損すること、並びに免疫系細胞にて RANK 及び RANKL が発現していることから、RANKL 阻害により免疫が抑制される可能性が示唆された。しかし、成獣にて RANKL を阻害しても、げっ歯類及びカニクイザルでは免疫系の形態的又は機能的変化は認められなかった。RANKL によって樹状細胞の生存期間の延長が報告されているが、樹状細胞の機能を評価する種々のモデルにおいて、RANKL 阻害は影響を及ぼさなかった。また、RANKL 阻害によって、制御性 T 細胞が減少し、UV による皮膚の免疫抑制が解除されることが示されている。したがって、皮膚の制御性 T 細胞の減少により、皮膚免疫反応の悪化又は持続が予想されたが、げっ歯類及びサルの試験にてそのような現象は観察されなかった。

インタクトの成獣の細菌又はウイルス感染に対して RANKL 阻害の影響は認められず、RANK/RANKL 系は CD40/CD40L などの他の共刺激分子と重複した機能を有している。

以上より、現在までに得られているデータ及び文献に基づくと、RANKL 阻害は成熟した個体の免疫系において決定的な役割を果たしていない。この見解は免疫系での RANK 及び RANKL に関する最新の総説に示されており、「しかしながら、RANKL、RANK、及び OPG に関して報告されたすべての遺伝学的及び機能的研究の最終解析において、これらの分子はリンパ球及び樹状細胞機能のある側面に影響を与えるかもしれないが、T 細胞、B 細胞、又は樹状細胞において CD40L/CD40 などの他の分子によって代償されない不可欠な役割を果たしている分子ではない」と述べられている (Leibbrandt and Penninger, 2008)。

2.2.2 乳腺及び授乳

RANK/RANKL ノックアウトマウスにおけるその他の観察所見として、乳腺の成熟阻害による授乳不全がみとめられた (Fata et al, 2000, Martin and Gillespie, 2001)。妊娠中の小葉腺胞腺の発達不全により、母動物は新生仔に十分に授乳できなかった。妊娠中の乳腺内で RANK

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

及びRANKL 発現は空間的にも時間的にも厳密に調節されており、乳腺の発達を制御している (Gonzalez-Suarez et al, 2007)。ウイルスプロモータにて制御された RANK 乳腺発現モデルでは、RANK によって乳腺内の細胞増殖が亢進され、腺胞の分化が損なわれていた。また、RANKL 阻害によって乳腺内の細胞増殖が抑制された (Branstetter et al, 2008)。さらに、RANK/RANKL はプロゲステロンとプロラクチンとの間のシグナル経路を司り、IKK α によるサイクリン D1 の誘導を介した増殖誘導を司ることが示されている (Cao et al, 2001、Mulac-Jericevic et al, 2003、Srivastava et al, 2003)。妊娠カニクイザルにデノスマブを 50 mg/kg で月 1 回、器官形成期から分娩までの期間皮下投与した結果、乳腺組織及び乳汁分泌は対照群と差はなく、投与に起因した悪影響は認められなかった。また、分娩後 14 日及び 28 日におけるデノスマブの血清中濃度に対する乳汁中濃度の割合の平均はそれぞれ 0.48%及び 0.17%であり、血清中濃度に対して乳汁中濃度は低かった。分娩後 91 日では乳汁中のデノスマブは検出限界以下の濃度であった。なお、デノスマブの乳汁産生に対する影響はげっ歯類とヒト以外の霊長類で異なっていたことから、添付文書には「授乳婦に投与する場合は授乳を中止させること」として適切な注意喚起を行うこととする。

2.2.3 新生仔に対する影響

2 週齢の新生仔ラットに骨吸収を強く抑制する用量の OPG-Fc あるいはアレンドロネートを 6 週間投与すると、臼歯の萌出が抑制された (試験報告書 R-0340)。OPG-Fc を 6 週間投与した新生仔ラットでは 10 週間の休薬後、臼歯の萌出が部分的に回復したが、後期に萌出する歯では歯根形成に異常が認められた (試験報告書 R20090070)。一方、アレンドロネートを投与した新生仔ラットでは、骨組織中のビスフォスフォネートの半減期が長いために、休薬期間中を通して骨吸収抑制が持続し、その結果として、歯牙萌出の遅延が認められた (試験報告書 R20090070)。なお、低用量の OPG-Fc や RANK-Fc を投与した場合、骨吸収抑制は軽度であり、臼歯萌出は抑制されなかった (試験報告書 R-0340 及び R20090282)。

正常な歯牙萌出には破骨細胞による骨吸収が必須であり、この骨吸収の周期は歯小囊における時間的、空間的に制御された遺伝子の発現パターンにより規定されている。(Wise, 2009、Marks, 1981)。したがって、これらの時間的制御を受けている骨吸収の周期を抑制すると、歯の萌出や形成に必要な一連の事象に障害をきたすことになる。歯牙萌出に対する影響は、骨吸収抑制の程度に応じて異なる。破骨細胞を完全に欠損している RANK/RANKL ノックアウトマウスでは、歯牙萌出不全が認められるが (Kong et al, 1999b、Li et al, 2000)、ラットにビスフォスフォネートを投与して骨吸収が部分的に抑制されると歯牙萌出は遅延した (Grier and Wise, 1998)。新生仔ラットに骨吸収を中程度抑制する用量の OPG-Fc や RANK-Fc を投与しても臼歯萌出の抑制や遅延は認められなかった (試験報告書 R-0340 及び R20090282) が、骨吸収を強く抑制する用量の OPG-Fc を投与すると歯牙萌出は抑制された (試験報告書 R20090070)。なお、投与を中止すると骨吸収が再開し、それに伴い歯牙萌出は部分的に回復したが、遅れて萌出する歯では歯根の形成に異常が認められた (試験報告書

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

R20090070)。この結果から、ラットでは臼歯萌出に必要な時間枠が存在すると考えられ、萌出が遅延すると歯の発達に悪影響を及ぼす可能性がある。歯牙萌出と比較して臼歯根及び歯槽堤の発達は骨吸収抑制の影響を受けやすいと考えられる。ラット新生仔に低用量のOPG-Fcを投与して骨吸収を中程度抑制した場合、歯牙萌出に異常が認められなかったが臼歯根の長さや歯槽堤の高さは減少した（試験報告書 R20090282）。しかし、上記試験が6週間の処置のみであることを考慮すると、中程度の効果を示す用量のOPG-Fcを投与した動物においても歯牙萌出が遅延する可能性は完全には排除できないことに留意する必要がある（試験報告書 R0340 及び R20090282）。

ラットとヒトの臼歯萌出のメカニズムは類似していると考えられている（Wise and Fan 1989）。破骨細胞の活性が低下している大理石骨病の患者において臼歯萌出がしばしば障害を受け（Droz-Desprez et al, 1992、Gomes et al, 2006、Jalevik et al, 2002）、ビスフォスフォネート治療を受けた骨形成不全症の小児においても歯牙萌出遅延が認められている

（Kamoun-Goldrat et al, 2008）。これらの非臨床及び臨床の知見から、歯が活発に発達しているか又は萌出段階にある小児患者にデノスマブを投与すると、乳歯及び永久歯の萌出が抑制されたり、形成異常を伴った萌出遅延が惹起される可能性があることが示唆される。これらの結果はデノスマブの薬理学作用と一致していると考えられる。歯牙萌出に関していえば、投与を中断したときに、RANKL 阻害に可逆性があり、ビスフォスフォネートよりは何らかの利点があるかもしれない。

OPG-Fc、RANK-Fc、アレンドロネートを新生仔（2週齢）ラットに6週間投与すると体重の減少、体軸骨格長の減少、骨長の低下、及び骨量の増加が認められた（試験報告書 R0340）。骨端、骨幹端、骨幹における骨量増加は、組織学的には骨梁中に軟骨が残存している海綿骨の増加と一致していた。なお、この形態的な変化は、閉鎖していない活発な成長板が存在しているときに骨吸収を抑制した際に予測される変化である。骨量増加は骨モデリング障害により生じた長管骨の形状変化（大腿骨の横断面積と断面二次モーメントの増加）を伴っていたため、エクストリンジックな強度（骨全体の強度）が増加した。また、椎骨における骨量とエクストリンジックな骨強度が増加した。RANK-Fcあるいはアレンドロネート投与により大腿骨並びに腰椎においてイントリンジックな強度（たとえば靱性などの、骨の材質強度）が低下した。臼歯萌出の抑制や異常は、ラットにアレンドロネート及び骨吸収を著しく抑制する用量のOPG-Fcを投与したときのみ認められた。新生仔ラットの骨量、骨強度、歯牙萌出に対する作用は、OPG-Fcとアレンドロネートで概ね同等であったが、骨成長、体重に対してはアレンドロネートの方がOPG-Fcよりも影響が少なかった。また、OPG-FcやRANK-Fcを投与したラットでは、成長板の肥厚や乱れがみられた。一般的に、体の大きさ、歯牙萌出、骨の長さ、重量、強度、形状、組織に対する影響は、RANK-Fc、OPG-Fc、あるいはアレンドロネート投与による骨吸収抑制の強さと相関していた（試験報告書 R0340）。新生仔ラットにアレンドロネートあるいはOPG-Fcを6週間投与後、10週間休

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

薬すると、大腿骨の長さ、椎体の高さ、体重は減少したままであるが、OPG-Fc 投与ラットでは破骨細胞による骨吸収が回復し、部分的あるいは完全に骨量と成長板の形態が正常化した。ビスフォスフォネートは骨組織中での半減期が長いため、アレンドロネート処置群では骨量が増加したままであった（試験報告書 R20090070）。OPG-Fc やアレンドロネート投与ラットにおいて、大腿骨の形状変化や靱性の低下は 10 週の休薬期間後も持続し、OPG-Fc 投与ラットでは、投与直後と比較して休薬期間後の長管骨のエクストリンジックな骨強度が低下した。この強度低下には、遠位部の皮質骨の厚さの減少が関与している可能性が考えられる。高用量の OPG-Fc 投与ラットでは休薬期間後、椎体におけるエクストリンジック及びイントリンジックな骨強度が有意に低下した（試験報告書 R20090070）。

2 週齢の新生仔ラットに 2 用量の OPG-Fc を週 1 回、6 週間投与し、新生仔の体の大きさ、骨成長、骨密度、形状、及び骨強度への OPG-Fc の用量依存性をさらに検討した（試験報告書 R20090282）。本試験では、前述の新生仔ラット試験（試験報告書 R0340 及び R20090070）で骨吸収を著しく抑制しなかった低用量及び著しく抑制した高用量を設定した。体重の増加抑制と臼歯萌出の遅延が認められたのは高用量の OPG-Fc を投与したラットにおいてのみであった。ただし、体重の増加抑制は粉末飼料給餌によって軽減された。粉末飼料給餌は、OPG-Fc 投与に伴う歯牙萌出や成長への影響が原因と考えられる摂餌量の減少を補うために用いた。軸骨格の長さ並びに骨の長さや高さは OPG-Fc の用量依存的に減少した。また、高用量及び低用量のいずれの用量においても骨量は増加し、長管骨の形状に変化が認められた（大腿骨の横断面積や断面二次モーメントの増加）。長管骨の骨強度試験は、得られた長管骨の長さに適したプロトコールで実施した。長管骨並びに椎体のエクストリンジック及びイントリンジックな強度の指標は両用量の OPG-Fc において不変あるいは増加した。しかしながら、大腿骨の靱性は OPG-Fc のいずれの用量においても低下し、これは他の新生仔ラットで得られた結果（試験報告書 R0340）と一致した。組織学的には、OPG-Fc を投与したラットの長管骨において、骨端、骨幹端、骨幹では軟骨核が残存した海綿骨が増加しており、成長板の肥厚や乱れがみられた。

OPG-Fc を投与した新生仔ラットの体の大きさの減少は、歯牙萌出障害による摂餌量低下や長軸方向の骨成長抑制の結果と考えられる。OPG-Fc 投与新生仔ラットにおいて、骨長減少は軟骨内骨化の障害を伴う成長板の変化に続いて生じている可能性がある。アレンドロネート投与ラットと比較して、OPG-Fc 投与ラットでは体の大きさや骨長に著しい減少が認められるが、これは OPG-Fc が成長板に影響を及ぼした結果、もたらされた可能性がある。成長板の形態異常は RANK/RANKL ノックアウトマウスでも観察されている (Kong et al, 1999b, Li et al, 2000)。また、類似した成長板変化はコロニー刺激因子 - 1 (CSF-1) に機能欠損変異があり、重篤な破骨細胞形成異常がみられる *toothless* ラットにおいても認められている (Seifert, 1996, Van Wesenbeeck et al, 2002)。RANKL 阻害が成長板の形態に影響を与えるメカニズムは明らかではないが、ビスフォスフォネートであるアレンドロネートを投与したラ

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

ットには影響がないことから、デノスマブと CSF-1 阻害では破骨細胞分化が障害されるのに対し、ビスフォスフォネートでは破骨細胞が形成されるが骨吸収機能が障害されているという薬理活性の違いが影響している可能性が示唆される。薬理活性を示す用量のデノスマブを投与した未成熟カニクイザルにおいては（試験報告書 102090）、正常な骨成長が認められ、重篤な成長板の変化は最小限であった。これらの結果から、成長板が閉鎖しておらず骨成長が活発な患者へのデノスマブの投与は、成長板の形態異常及び骨の長軸方向の成長異常を引き起こす可能性が示唆される。

OPG-Fc を 6 週間投与して 10 週の休薬期間をおいた新生仔ラットにおける体重増加と成長板の変化は可逆的である可能性が示された。休薬期間の終了時では体重は有意に減少していたが骨長は部分的に回復していた（試験報告書 R20090070）。休薬期間をさらに延長することにより、骨長が完全に回復するかどうかは不明である。また骨成長と軟骨内骨化に対する影響に加え、一次及び二次骨化中心に関連した成長板（骨端軟骨板と関節軟骨）に肥厚や乱れがみられるなど、臨床整形外科的な影響を生じる可能性がある。10 週の休薬期間後に観察された大腿骨のエクストリンジックな骨強度の低下は、大腿骨遠位部の皮質骨の厚さの減少を伴っていることから、急速に成長する骨格においては、デノスマブの治療後に休薬すると骨折の危険性が増加する可能性が示唆される。OPG-Fc あるいはデノスマブを、投与開始時に離乳時期を過ぎている若齢マウス、ラット、ブタ、あるいはカニクイザルに投与しても、骨の長さ、形状、あるいは強度に有害な作用は認められなかった (Bateman et al, 2000, Ross et al, 2001, Kim et al, 2006, Ominsky et al, 2007, Ominsky et al, 2008)。これらの知見から、デノスマブの成長板の形態、長軸方向の成長、長骨強度に対する影響は、投与時の骨成長の度合いに依存していると考えられる。成長板の変化は、OPG-Fc や RANK-Fc 投与により RANK/RANKL 経路が阻害されているときの新生仔ラットに限定されていることから、成長時のラットにおける RANK/RANKL 経路の阻害は、ビスフォスフォネートであるアレンドロネートと比較してリスクが高いことが示唆される。

胎仔期中期から成獣に至るまで OPG を過剰発現している OPG トランスジェニックラットの成獣においては、中等度の骨吸収抑制が認められ椎体や大腿骨の骨量が増加した。腰椎の骨強度は野生型ラットと比較して有意に増加していたが、大腿骨は形状変化（断面二次モーメント減少を伴う骨幹部の狭小化）を示し、エクストリンジックな強度（骨全体の強度）、イントリンジックな強度（靱性）が減少した (Ominsky et al, 2009)。これは OPG-Fc を投与した新生仔ラットにおける大腿骨の強度の増加（試験報告書 R0340）とは相反する結果である。1 及び 2 ヶ月齢の OPG トランスジェニックラットにおいて、靱性が減少した以外には、大腿骨の形状、長さに変化は観察されなかった（試験報告書 R20090069）。成獣 OPG トランスジェニックラットにおいては、長骨の不完全な表現型が一過的に観察されたが未解明のままである。

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

成獣 OPG トランスジェニックラットで見られた大腿骨の形状変化、骨強度低下の臨床的意義は明らかでない。これらの変化は出生前から骨格の成熟まで OPG を過剰発現した結果であり、想定される臨床での状況は、例えば胎生期から生後生涯にわたり投与を継続するような場合であり、申請するデノスマブの用途には該当しないと考えられる。

上記の新生仔ラットを用いた複数の RANKL 阻害試験において、好中球及びグロブリンの上昇、赤血球パラメータ及びアルブミンの低下など、臨床検査値に変化が認められたが、それらは概して軽微な変化であった。これらの値は副作用によるものではなく、歯牙萌出異常に続く口腔内の軽度の炎症により生じた可能性が考えられる。さらに、骨髓内の骨梁増加により造血に影響を受ける可能性もある。なお、予想どおり、薬理学的な骨吸収抑制により血清中のアルカリホスファターゼやリンは低下した。

結論として、新生仔ラットに OPG-Fc や RANK-Fc を投与して RANKL を阻害した結果、成長板の異常、骨長の減少、骨量の増加、構造的骨強度パラメータの増加が認められた。材質的な骨強度パラメータは概ね変化がなかったが、大腿骨の靱性が一貫して低下していた。骨吸収を著しく抑制する OPG-Fc の用量を投与した場合、歯牙萌出抑制と歯根の発達異常も観察された。これらの効果は OPG-Fc の投与中止により部分的に回復したが、エクストリンジックな骨強度は低下し、骨長及び大腿骨の靱性の減少、歯根発達異常は持続した。出生前から骨が成熟するまで OPG を過剰発現している OPG トランスジェニックラットでは、長骨の表現型は不完全であった。これらの結果は、骨格が急速に成長する時期にデノスマブを使用する際には、成長板の拡大、骨成長の遅延、骨の靱性の低下、歯牙発生異常がもたらされる可能性があることを示唆している。

2.2.4 心血管系

2.2.4.1 血管新生

血管新生における OPG 及び RANKL の役割は多くの *in vitro* モデルにて検討されている。データについてはモジュール 2.6.2 で詳細に論じる。これらの実験系間でのデータは矛盾しており、実際、ある報告では RANKL の血管新生抑制作用が示されたが、同じ著者らが他の培地を用いた場合、逆の結果が得られたとコメントしている (McGonigle et al, 2009)。*In vivo* 試験では、VEGF あるいは塩基性 FGF (bFGF) 誘発角膜血管新生モデルにおいて、ラットに OPG-Fc を投与したときの反応は一定しなかった。ある実験では血管新生が増強され (試験報告書 R2002266)、他の 2 件の試験では血管新生に変化がなかった (試験報告書 R2002204 及び R2002267)。また、ヘパリンハイドロゲル移植モデルでの血管新生は OPG により増強されることが示された (McGonigle et al, 2008)。これらの実験モデル間での矛盾するデータに対して一貫した解釈をすることが困難であることから、霊長類あるいは血管新生に依存したげっ歯類がんモデルの両者において、RANKL 阻害剤投与による *in vivo* における影響を評価した。デノスマブを長期投与した霊長類において血管の異常や前がん病変あるいは腫瘍性病

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

変は認められず、血管新生に対する影響（増強あるいは減弱）はないことが示唆された。また、OPG-Fcは血管新生に依存する腫瘍増殖に影響しないか、あるいは抑制する一貫した結果が得られた（モジュール 2.6.2 第 3.6 項参照）。RANK 及び RANKL ノックアウトマウスの表現型、並びに OPG 過剰発現トランスジェニックラット及びマウスの表現型及び様々な免疫応答惹起に対する反応にもとづく、胎仔期の、あるいは免疫に刺激された血管構造の発達に対する影響はないと考えられる。これに対して、VEGF、アンジオテンシン-1 (Ang-1) などの血管形成因子の遺伝子欠損動物では、血管に顕著な表現型変化を示す (Yancopoulos et al, 2000)。また、臨床データからは、RANKL 抑制による血管新生への影響を裏付けるデータは得られていない。

結論として、in vitro 及び一部の in vivo モデルにおける RANKL 阻害の血管新生への影響は一貫した結果ではなく、がん誘発血管新生を含む全般の動物モデル系において血管新生に対する変化は示唆されていない。

2.2.4.2 血管石灰化及びアテローム性動脈硬化症

RANK/RANKL/OPG 系と血管疾患との関連が示唆されており、RANKL 阻害が血管疾患の重症度に関して役割を担っている可能性が示唆されている (Morony et al, 2008)。

OPG ノックアウトマウスでは中等度から重度の血管石灰化 (Bucay et al, 1998) が認められており、その表現型は OPG 過剰発現によって回復した (Min et al, 2000)。また、血管疾患の動物モデルにおいて、RANKL 阻害 (デノスマブ投与を含む) によって血管石灰化が抑制された (Price et al, 2001, Morony et al, 2008, Finger et al, 2009, Helas et al, 2009)。一方で、RANKL の投与により IKK α 依存的な経路で血管平滑筋細胞の石灰化が増加した (Panizo et al, 2009)。この研究から、血流にある RANKL/OPG の比率ではなく、血管壁に局在して発現している RANKL が血管の石灰化進展に重要であることが示唆された。また、デノスマブを最大 12 ヶ月間投与したサルにおいては血管石灰化は認められなかった (試験報告書 102090)。

マウスのアテローム性動脈硬化症モデルにおいて、RANKL 阻害により血管石灰化が抑制され、プラークの安定性が向上するが、アテローム性動脈硬化症の病変の進行、炎症性細胞のプラークへの浸潤、循環血中サイトカイン値、あるいは血漿コレステロール値に対する影響は認められないことが示されている (Morony et al, 2008, Ovchinnikova et al, 2009)。RANKL はヒトにおいてプラークの不安定化や破壊を促進することが示唆されている (Kiechl et al, 2007)。また、デノスマブを 12 ヶ月間投与したカニクイザルの血管にて投与に関連した病理組織学的所見は認められず (試験報告書 102090)、最大 16 ヶ月間投与したカニクイザルにおいて循環血中コレステロール値の変化も認められなかった (試験報告書 102090 及び 103981)。

以上より、RANKL 阻害には血管石灰化に対する保護作用があり、アテローム性動脈硬化

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

に対しては影響を及ぼさないことが非臨床データから示唆される。この結果は臨床データと一致する。

2.2.5 体温調節

RANK/RANKL系は体温調節に関係していることが示されている (Hanada et al, 2009)。RANKLをマウス脳内に直接投与すると、プロスタグランジン依存的な経路を介して発熱した。また、リポ多糖による発熱にRANK/RANKL経路が必要であった。さらに、雌のみにおいて基礎体温の維持にRANK/RANKL経路が重要であった。この効果はアストロサイトを介した中枢での現象であり、末梢にRANKLを投与しても体温は変化しなかった。デノスマブはモノクローナル抗体であり、血液脳関門を通過して中枢へ効果を及ぼすことは予想され難い。デノスマブが中枢神経系に移行しないことがカニクイザルの研究で示されている (試験報告書 104192 及び 104105)。したがって、デノスマブは体温調節に対して影響をもたらすことはないと推測される。

2.2.6 骨折治癒

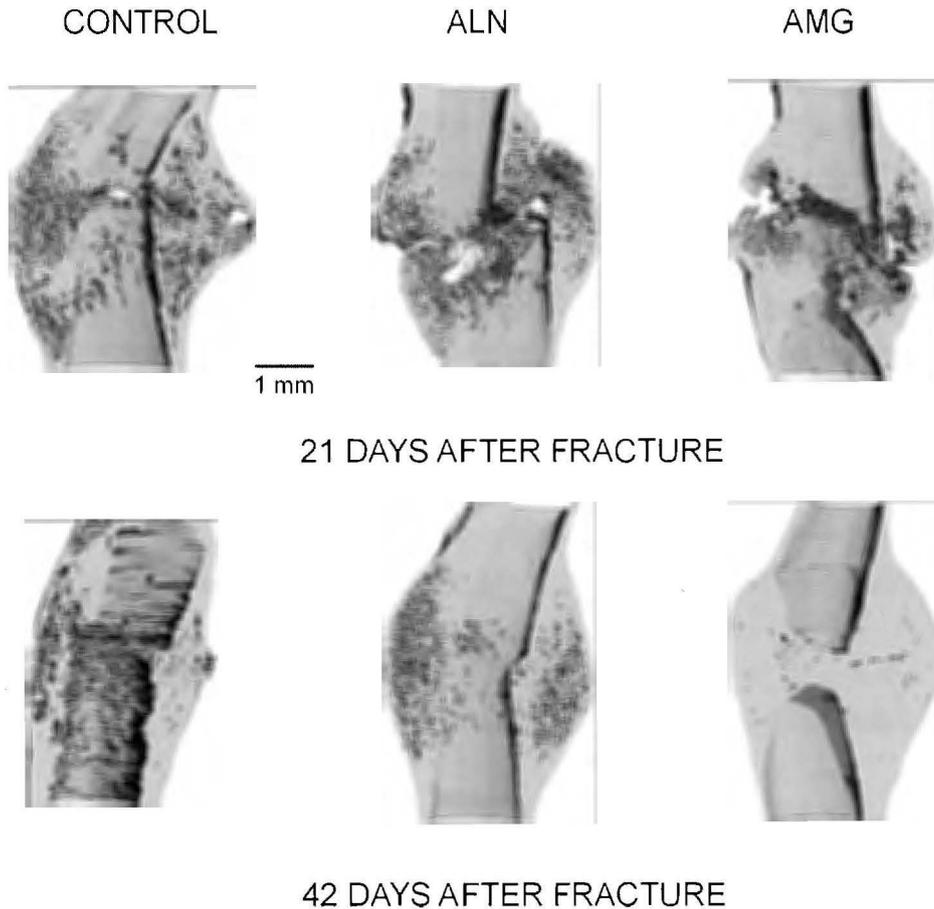
デノスマブは骨吸収過程において破骨細胞の機能を阻害することから、骨折治癒及び骨性仮骨のリモデリングに対してデノスマブがどのような作用を及ぼすのかを検討した。デノスマブが結合する huRANKL ノックインマウスに大腿骨閉鎖性骨折を施し、骨折後 2 日目から溶媒、デノスマブ又はアレンドロネートを投与して骨折後 21 及び 42 日目に骨折部位を評価した。デノスマブ及びアレンドロネート投与群の骨折骨は、溶媒コントロール群の骨折骨と比較し、いずれの時点においてもねじり試験による剛性又は最大トルクが増強した。マイクロコンピュータ断層撮影法 (マイクロ CT) 解析では、デノスマブ投与群の骨折仮骨では、溶媒コントロール群に比べて、いずれの時点においても骨塩量、骨面積、及び骨量比率に有意な増加が認められた。骨折後 42 日目では、デノスマブ投与群の仮骨全体のサイズは溶媒コントロール群と比較して有意に大きく、これは恐らく吸収されていない軟骨が仮骨中に多く残存していたためと推察された。なおこの未吸収の軟骨はアレンドロネート投与群でも同様に認められた。逆に骨吸収が亢進している OPG ノックアウトマウスでは、骨折治癒部位において軟骨が早期に消失することから、未吸収の軟骨の残存は骨吸収の抑制によるものと考えられる (Ota et al, 2009)。また、デノスマブ投与群では仮骨のリモデリングが遅延していたにも関わらず、骨折後 42 日目には仮骨の大部分は高度に石灰化した骨梁組織で占められており、仮骨中にはごくわずかの破骨細胞しか認められなかった。骨折仮骨のマイクロ CT 画像を図 2-8 に示す。

本試験においてデノスマブの投与により骨折部位の骨強度が低下しなかった点は注目すべきである。このことはデノスマブによる仮骨リモデリングの遅延が、骨折治癒に対して重大な懸念要因とならないことを示唆している。重要な点は、骨折部位の骨強度及び剛性は、溶媒コントロール群と比較して増強していることである。デノスマブの投与により大きな仮骨

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

が形成されたが、デノスマブは骨折の治癒には有害作用を示さず、また骨折部位の骨強度に対して明らかな悪影響を及ぼさず、骨折部位の不安定性をもたらさなかった（試験報告書 R-458）。



CONTROL, 溶媒投与群; ALN, アレンドロネート投与群; AMG, デノスマブ投与群

図 2-8 デノスマブ又はアレンドロネートを投与した huRANKL ノックインマウスの骨折部位の代表的マイクロ CT 画像

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

2.3 安全性薬理試験

デノスマブの心血管系における安全性は、テレメトリー送信器を埋め込んだカニクイザルを用い、テレメトリーシステムにより血行力学及び電気生理学的データを測定して評価した。デノスマブを 0.3, 3, 30 mg/kg で単回皮下投与したところ、心拍数、平均血圧、心臓の活動電位、あるいは呼吸数に対して、30 mg/kg まで投与に起因した影響はみられなかった（試験報告書 101606、モジュール 2.6.3、第 4 項）。さらに、サル の 12 ヶ月間反復投与毒性試験では、補正 QT (QTc) あるいは他の伝導パラメータに実質的な影響は認められず、また心臓、大動脈、あるいは各器官の脈管構造にデノスマブ投与に関連した形態学的変化も認められなかった（試験報告書 102090、モジュール 2.6.7、表 7B）。

ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子 (hERG) によってコードされる K⁺チャネル阻害を示す分子は、細胞内の膜表面にある結合部位へ到達できることを示しており、この結合部位は選択性フィルター及び活性化ゲート間に存在するチャネルキャビティにあることが知られている (Mitcheson et al, 2000a, Mitcheson et al, 2000b, Zou et al, 1997)。hERG試験のような *in vitro* アッセイ系は、メンブランフィルターを通過し、hERG K⁺チャネルの上記キャビティ内にある結合部位と結合可能な低分子の評価には適している。一方で、治療抗体やその他の巨大たん白質は、その分子サイズにより細胞内への浸透が制限される (Vargas et al, 2008) ため、当該分子は細胞内に浸透して上述の結合部位と結合することができないと考えられる。したがって、デノスマブ (分子量約 150 kD のモノクローナル抗体) を hERG 試験で評価するのは適切ではないと判断した。

以上より、*in vivo* 試験において、心血管リスクへの懸念が示唆されるような影響はみられなかった (モジュール 2.7.4 も参照)。

2.4 薬力学的薬物相互作用試験

デノスマブの RANKL に対する特異性を考慮すると、他の薬剤との薬力学的相互作用の可能性は低いことが示唆される。サルを用いたアレンドロネートからの切り替え試験において、デノスマブの薬力学的活性に対する有害作用は認められていない (試験報告書 106564)。また、RANKL 阻害条件下で、化学療法薬、ホルモン薬、あるいは分子標的抗腫瘍薬を投与した場合でも、その薬力学的特性の予想外の変化を示すデータは得られていない (モジュール 2.6.2 参照)。

さらに、第 3.6 項に記載した薬物動態学的薬物相互作用に関する考察からも、デノスマブの薬力学的薬物相互作用試験を実施しないことは妥当であると考えられる。

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

3. 薬物動態試験

デノスマブの静脈内あるいは皮下単回投与時の薬物動態パラメータをマウス、ラット及びカニクイザルで評価し、反復投与時の薬物動態パラメータについてはカニクイザルでのみ評価した（モジュール2.6.4及び2.6.5参照）。デノスマブの血清中濃度は、標準的なサンドイッチELISA法を用いて測定した。デノスマブの薬物動態評価は、薬理学的に妥当な唯一の動物種であるカニクイザルを中心に実施し、一部の項目についてはマウス及びラットで評価した。デノスマブの組織分布については、カニクイザルに¹²⁵I-デノスマブを単回皮下投与後、固体シンチレーション計測、又は定量的全身オートラジオグラフィーの手法を用いて評価した。

3.1 分析法

上述のとおり、血清試料のデノスマブ濃度をELISA法により測定した。この測定法では、RANKLをプレコートした96ウェルマイクロタイタープレートを用い、標準試料及び精度管理用試料（QC試料）の調製にはデノスマブを使用した。標準試料、QC試料あるいは血清試料をウェルに添加し、非結合画分を洗浄除去後、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識RANKL（RANKL-HRP）をウェルに添加した。非結合のRANKL-HRPを洗浄除去後、基質溶液の混合物（テトラメチルベンジジン及び過酸化水素）をウェルに添加し、呈色反応はウェルに結合したデノスマブの量に比例して進行した。硫酸を添加することにより呈色反応を停止させ、450～650 nmの波長で吸光度を測定した。血清試料中のデノスマブ濃度は検量線を作成して算出した。

分析法の詳細及びバリデーション結果については、該当する非臨床試験報告書及びモジュール2.6.5第2項に示した。各分析法は動物試験に適した定量限界を有しており、デノスマブの薬物動態及びトキシコキネティクスの十分な評価が可能であった。

3.2 吸収

デノスマブがRANKLと結合しない動物種であるマウス及びラットにおいて、デノスマブの静脈内投与時の薬物動態は約0.1～10 mg/kgの用量範囲で線形であった。またクリアランスは低く、定常状態における分布容積（ V_{ss} ）から血管外へはほとんど分布しないことが示された（試験報告書101002及び101494）。単回皮下投与（1 mg/kg）後、両動物種ともに投与後72時間に血清中デノスマブ濃度は最高濃度（ C_{max} ）に到達し、生物学的利用率はマウスで86%、ラットで56%であった。huRANKLを発現したノックインマウス及びFcRnが欠損したノックアウトマウスでクリアランスはそれぞれ約6及び15倍増大し、デノスマブの薬物動態におけるRANKL及びFcRnの役割の重要性が示唆された（試験報告書106892及び106893）。

デノスマブがRANKLと結合する動物種であるカニクイザルにおいて、デノスマブの静脈内投与時の薬物動態は0.0016～1 mg/kgの用量範囲で用量に対して非線形であったが（最低

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

投与量でのクリアランスが最高投与量でのクリアランスより約16倍高かった)、1~3 mg/kgの間ではほぼ線形であった(試験報告書 101398)。デノスマブをカニクイザルに皮下投与後の薬物動態も0.0016~1 mg/kgの用量範囲で非線形となったが、1~3 mg/kgの間ではほぼ用量に対し線形であった(図3-1)。

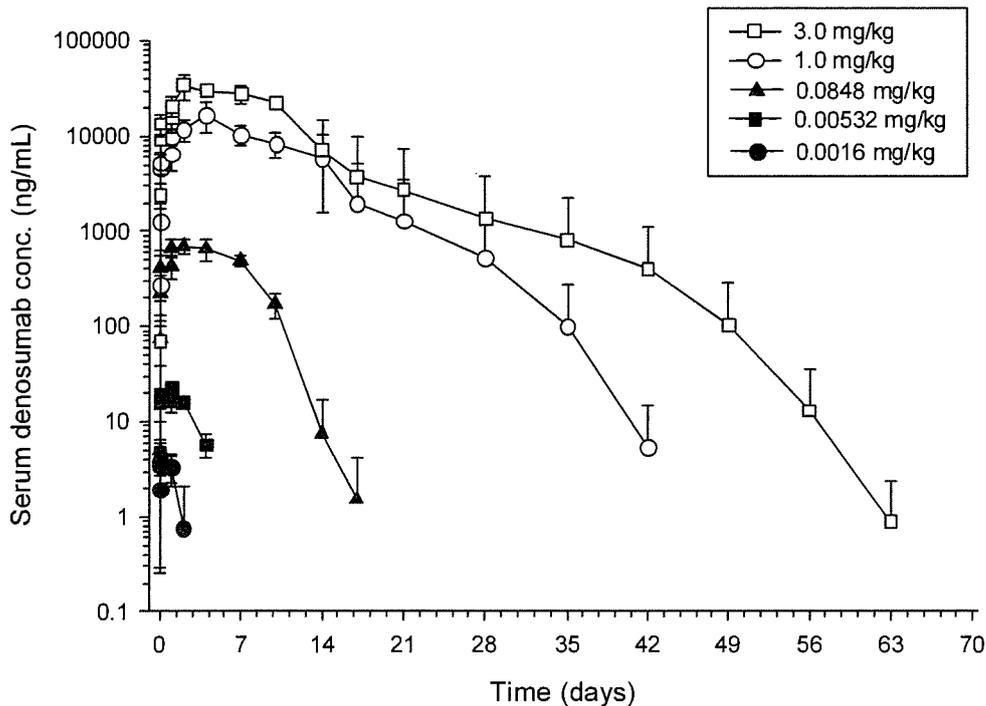


図3-1 カニクイザルに単回皮下投与後の血清中デノスマブ濃度推移

図中のシンボルは n = 3 の平均値+標準偏差、あるいは平均値-標準偏差。
出典: 試験報告書 101398

3.3 分布

カニクイザルの組織分布試験及び定量的全身オートラジオグラフィ試験において、¹²⁵I-標識デノスマブを皮下投与後、放射能は広範に分布した。測定を実施したすべての組織で放射能は測定可能であったが、血中あるいは血清中濃度と比較しほとんどの組織で顕著に低値であった(試験報告書 104192 及び 104105)。ほとんどの循環血(血清)試料で、放射能の大部分(>85%)は酸不溶性であったことから、血中での放射能の大部分はインタクトな抗体に由来する可能性が高いことが示された。骨(大腿骨あるいは腰椎等)及び骨髓中放射能は、血清中と比較して非常に低く(概して<10%)、血清中濃度と並行して低下したことから、骨における特異的な取り込みあるいは骨組織への組込みのないことが示された。リンパ節及び脾臓でごく低濃度の放射能が血清中放射能よりも長く持続したが、この現象は、これらの組織でRANKLが発現していること、あるいはこれら動物個体で抗デノスマブ抗体が発現した(抗デノスマブ抗体により血清からの薬物消失速度が増大した)ことが関連すると考えられ

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

る。

3.4 代謝

デノスマブがモノクローナル抗体であるということ、さらに、既存のガイダンス『ICH S3A、「トキシコキネティクス（毒性試験における全身的暴露の評価）に関するガイダンスについて」（平成8年7月2日付 薬審第443号）』が低分子医薬品の評価を目的としたものであることを考慮した結果、デノスマブの代謝を検討する試験は実施しなかった。なお、デノスマブ等の免疫グロブリンは、生体内での分解により消失するものと考察されている（Waldman and Strober, 1969）。カニクイザルでは非線形の薬物動態が認められ、マウス及びラットでは線形の薬物動態が認められたことから、RANKL結合が関与すると思われる飽和性の消失過程がカニクイザルに存在することが示唆された。飽和性で抗原依存的なクリアランスによる非線形の薬物動態は、オマリズマブ（Xolair[®] US添付文書, 2010、Xolair[®] 欧州公開審査報告書, 2007）及びエファリズマブ（Coffey et al, 2005）等、他のモノクローナル抗体でも認められている。

3.5 排泄

カニクイザルに¹²⁵I-デノスマブを単回皮下投与後、投与した放射能の約76%~95%及び1%~3%がそれぞれ尿中及び糞中から回収された。投与した放射能の総回収率は、83%~106%であった。尿中放射能の大部分（75%~97%）は酸不溶性ではなかった。したがって、投与された放射能の大部分は、遊離ヨウ素あるいはヨウ素化ペプチド断片として腎臓を介して排泄されたと考えられる（試験報告書 104192）。

デノスマブの乳汁への移行を評価するための試験は実施しなかった。デノスマブは免疫グロブリンであるため、循環血清中に存在する一部が乳汁中に分泌される可能性がある。一方で精製IgGを多量に（1日100~800 mg/kgで5日間）経口投与してもヒト乳児の血清中IgG濃度は増加しないことがこれまでに示されており（Lobo et al, 2004）、IgGはヒト消化管から吸収されないこと、これはヒトに特有の事象であることが報告されている（Van de Perre, 2003、Lobo et al, 2004）。したがって、デノスマブについても新生児の腸管から吸収される可能性は低いと考えられるが、添付文書（案）では授乳に対する注意事項を記載することとした。さらに、動物での乳汁移行試験結果からヒトの乳汁中デノスマブ含量を予測すること、その結果を元に信頼性の高いリスク評価をすることも困難と考えられたため、デノスマブの乳汁移行性は動物で評価しなかった。

3.6 薬物動態学的薬物相互作用

RANKLはサイトカインとみなされ、一部のサイトカイン（IL-1やIL-6など）は薬物を代謝するチトクロムP450（CYP）の活性を調節することが明らかになっているが、RANKLがCYP発現調節に関与することを示すデータはない。RANK及びRANKLはいずれもヒト肝細

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

胞に恒常的に発現しているわけではないため (Su et al, 2004)、全身性 RANKL でも肝細胞膜上の RANK との結合によって肝 CYP 発現を調節することはできないと考えられる。さらに、デノスマブは免疫系、特に炎症性サイトカインの濃度又は活性に影響を及ぼさないことが示されている (Stolina et al, 2007 及び第 2.2.1 項)。以上より、デノスマブが直接的に、又は RANKL 阻害を介して間接的に CYP の発現又は活性に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

また、第 2.4 項に記載した理由によっても、デノスマブの薬物動態学的薬物相互作用試験を実施しないことは妥当であると考えられる。

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

4. 毒性試験

デノスマブの非臨床安全性は、デノスマブの種特異性の制限内で、一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験により評価した（モジュール 2.6.6 及び 2.6.7 参照）。各毒性試験では、十分な曝露が得られ、全身作用が生じる用量を設定した。また、低用量が NOEL あるいは NOAEL となるよう設定した。中和抗体の血中薬物濃度への影響を相殺するため、長期試験ではより高い用量を使用した。非臨床毒性試験プログラムは、臨床試験プログラムを支持する目的で、デノスマブの毒性プロファイルを適切に評価するために実施した。本文書で後述するように、抗デノスマブ抗体は存在したが、動物試験では臨床薬物濃度に対し十分な曝露マージンが得られた。

4.1 単回投与毒性試験

別に実施した試験に適切なパラメータが含まれていたため、ICH S6 に準拠し、デノスマブを用いた通常の単回投与毒性試験は実施しなかった。ICH S6 に従い、サルの心血管系に関するデノスマブの安全性薬理試験で 0 mg/kg、0.3 mg/kg、3.0 mg/kg、及び 30 mg/kg の単回皮下投与を評価した。この試験（試験報告書 101606）あるいは反復投与試験（試験報告書 102090）での 50 mg/kg の初回投与後に毒性症状はみられなかった。

4.2 反復投与毒性試験

デノスマブの種特異性のため、げっ歯類の反復投与試験は実施しなかった。したがって、デノスマブの毒性プロファイルは、一連のカニクイザルの試験において評価した。デノスマブの薬力学に関連する、あらかじめ予測される作用が認められたが、デノスマブに起因する可能性のある毒性学的に意義のある変化は特に認められなかった。

4.2.1 サルの反復投与毒性試験

カニクイザルを用いた反復投与試験、2 試験を実施し、デノスマブの安全性プロファイルを検討した。1 ヶ月間反復投与試験において、週 1 回の 0 mg/kg、0.1 mg/kg、1 mg/kg、及び 10 mg/kg の皮下注射、あるいは 10 mg/kg の静脈内投与を実施したところ、全用量で明確な生物学的活性が認められた。血清中 NTX 濃度は、雌雄ともに急速に減少し、血中デノスマブ濃度の低下に伴い休薬後に回復傾向を示した。pQCT による測定では、脛骨近位端及び橈骨遠位端の総 BMD が雄で増加した。投与期間あるいは 3 ヶ月の休薬期間中、毒性学的に重要な事象はみられなかった。血清アルカリホスファターゼ及び血清カルシウムの変動が認められたが、デノスマブの薬理学的特性に起因するものと判断した（試験報告書 101447、モジュール 2.6.7、表 7A 参照）。

抗デノスマブ抗体は、1 ヶ月試験で、抗体陽性の頻度は用量に逆相関して認められ、抗体陽性は低用量群で 100%、高用量静脈内投与群で 25%であった。この結果は、高用量群では血中に高濃度に薬物が存在することで抗デノスマブ抗体がマスクングされた可能性が高かつ

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

たことによると考えられる。この結果に基づき、抗デノスマブ抗体の存在下でも薬物曝露及び薬力学的活性を維持するため、次の12ヵ月試験では用量を増加した。

12ヵ月試験では、サルに0 mg/kg、1 mg/kg、10 mg/kg、及び50 mg/kgの用量で、デノスマブを月1回皮下投与した。薬物投与に関連した臨床徴候はみられず、体重、摂餌量、眼科、心血管、あるいは臨床病理学的パラメータに投与に関連した明らかな影響も認められなかった。特に、この試験の投与群では血中白血球数に有害な影響はみられなかった。血中免疫グロブリン値(IgG、IgM、及びIgA)及びリンパ球分画数(T細胞、B細胞、及びナチュラルキラー[NK]細胞)は個体によって異なった。しかし重要な点は、高用量と対照群との間で、デノスマブの免疫系に対する意味のある作用を示唆する明らかな差異はみられなかったことである。

1ヵ月試験の結果から想定されたとおり、抗デノスマブ抗体はすべてのデノスマブ投与群で認められた。結合抗体及び中和抗体を有するサルの多くで、抗体陰性動物と比較し、薬物クリアランスの増大及び薬理活性の減少が認められた。重要な点は、抗体陽性動物において、毒性の増強を示す肉眼的あるいは病理組織学的所見は認められず、免疫複合体の沈着の徴候もみられなかったことである。さらに、1ヵ月試験で予測されたとおり、すべての所見は、骨におけるデノスマブの薬理学的特性に起因するものであった。具体的には、顕著な病理組織学的所見は、脛骨、胸骨、及び大腿骨における軟骨内骨化の減少、及び骨芽細胞及び破骨細胞の減少のみであった。

初回投与後のデノスマブ曝露量(C_{max} 及びAUCに基づく)は、すべての動物において、1~50 mg/kgの範囲で用量比例的に増加した。抗デノスマブ抗体陰性動物では、12ヵ月間にわたりデノスマブの著しい蓄積はみられなかった。抗デノスマブ抗体の発生は、血清中薬物濃度及びデノスマブの全身曝露の顕著な減少と同時に認められた。それにもかかわらず、試験動物が投与期間全体を通じてデノスマブに曝露されたことを示す十分な薬力学的反応が認められた。以上の所見に基づき、この試験のNOAELは、最高用量である50 mg/kgと考えられた(試験報告書102090、モジュール2.6.7、表7B)。重要な点は、この用量では、12ヵ月間でデノスマブに対する結合抗体が認められたのは、16例中2例のみであったことである。抗体陰性動物において、4週間にわたる推定曝露(AUCに基づく)は、骨転移を有する進行乳癌患者における120 mgを4週間に1回の投与(20040113試験)で認められた曝露(4週間のAUC)の約15倍高値であった。また、16ヵ月の骨粗鬆症予防試験(試験報告書103981)の曝露は、20040113試験で認められた曝露の約9.5倍高値であった。

投与期間中に高用量群のサル雄1例が試験76日に死亡し、雄1例を一般状態の著しい悪化により試験289日に動物倫理的な観点から安楽死させた。これらの各例の死因はデノスマブに起因しないものと判断した。いずれの動物においても、死亡前の長期間にわたり、下痢及び摂餌量減少に伴う体重減少の持続性の臨床徴候が認められた。重要と考えられる点は、こ

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

これらの臨床徴候は、対照群を含む他の動物でも頻繁に認められるものであるが、これらの2例ではより重度であったことである。下痢の原因は明確に特定されなかったが、糞便検査において *Giardia sp.* 及び *Cryptosporidium sp.* がデノスマブ投与及び対照群の試験動物 64 例中 47 例で特定されたことから、これらの原虫寄生虫のいずれかあるいはその両方に関連する可能性が高かった。いずれの寄生虫も、一般的に片利共生微生物とされているが、疾患（下痢）を誘発する場合もある。なお、投与群間の相対的抗体価を考慮すると、抗デノスマブ抗体の存在がこれら2例の動物の病的状態及び死亡において役割を果たした可能性は低く、免疫複合体の沈着を示す病理組織学的所見も認められていない。また、いずれの動物でも血液学的検査パラメータに、免疫抑制を示唆する影響はみられなかった。

試験 76 日に死亡が認められた雄サル（動物番号 407）の死因は、得られた臨床観察、剖検所見、あるいは病理組織学的検査からは特定できなかった。このサルの病理組織学的所見として、心臓の炎症、消化管の炎症及び軽微な病変、脾臓におけるリンパ系の萎縮、及び副腎皮質の肥大等が認められた。脾臓及び副腎皮質における変化は、このサルにおける全身性のストレス反応と一致する。軽微で急性限局性の心外膜炎及び乳頭筋の軽微な多巣性心筋炎を特徴とする心臓の炎症も認められた。心臓の炎症は、ヒト以外の霊長類を含む実験動物種において自然発症性の変化として認められることが多い（Greaves, 2000）。また、カニクイザルにおける背景所見の最近のレビューにおいて、対照動物の約 50% の心筋で炎症性病巣がみられる可能性があることが示されたこと（Drevon-Gaillet et al, 2006）も、重視すべきと考える。さらに、心臓での壊死病巣は、血清中カリウム濃度の減少に伴って、通常下痢と共に認められるという報告もある（Takeuchi et al, 2008）。同程度の心臓の病理所見は対照群の1例にも認められたが、投与期間終了時の高用量デノスマブ群の他の動物を含め、他の動物では認められなかった。さらに、薬物誘発性の病変は限定された領域に分布するというよりは散在性であると想定されるため、このサルの心臓の変性の特徴は、直接的筋毒性の特徴と一致しないと考えられた（Greaves, 2000）。したがって、心臓の炎症はデノスマブ投与に関連しないと解釈した。

試験 289 日に瀕死状態により安楽死させたサル（動物番号 403）では、事前に消化管疾患を示唆する臨床徴候も認められた。病理組織学的検査では、陰窩微小膿瘍及び絨毛萎縮に加え、原虫性の急性腸炎が認められた。これらの病変のスペクトルから、薬物誘発性の消化管毒性ではなく既に存在していた腸内寄生虫感染症の急性増悪が示された。腸内原虫はヒト以外の霊長類ではまれなものではなく、様々な身体的あるいは環境（ストレス）要因に関連して発症する疾患の臨床症状とともに認められる。さらに、重症度は低いものの、炎症及び陰窩微小膿瘍が対照群を含む各投与群の複数のサルで認められている。試験 170 日時点で、免疫グロブリン値あるいはリンパ球分画（フローサイトメトリーにより測定）への影響はみられなかった。

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

長期投与毒性試験のデータを総合的に判断すると、同程度の同様の病変が対照群のサルでも認められたため、いずれの死亡もデノスマブ投与に直接起因したとは考えられないと判断した。また、明らかな全身性の毒性作用もみられなかった。さらに、同用量をより長期間投与した骨粗鬆症予防試験（試験報告書 103981）では、より広範な免疫モニタリングにおいても、感染、あるいは免疫系への影響が認められなかったことも重要と考える。以上のことから、当該毒性試験におけるサル2例の死亡は、デノスマブ投与に起因する可能性は低いと考えられる。

4.3 遺伝毒性試験

デノスマブは、すべて天然アミノ酸で構成される遺伝子組換えたん白質であり、無機あるいは合成有機リンカー、あるいはその他、遺伝毒性を誘発すると考えられる非たん白質成分は含まれていない。したがって、デノスマブあるいは由来フラグメントが直接 DNA あるいは他の染色体要素と反応する可能性は低い。そのため、ICH S6 ガイドラインに従い、遺伝毒性試験は実施しなかった。

4.4 がん原性試験

デノスマブはげっ歯類で薬理活性を有さないことから、ICH S6 の基準に従い、従来型のげっ歯類を用いたがん原性試験は実施しなかった。

第 4.3 項に示したとおり、デノスマブに遺伝毒性はないと判断されるため、デノスマブが腫瘍誘発性を示すとすれば、直接的な DNA 損傷以外の機序が関与すると考えられる。よく知られた非遺伝毒性発がん機序には、細胞生存や増殖の攪乱、あるいは免疫監視機構の抑制などが考えられる。デノスマブの主薬理作用は RANKL 誘導性の破骨細胞の生存抑制であり、デノスマブをサル及びヒトに投与すると破骨細胞数の著しい減少が認められている。また、RANK/RANKL 相互作用は、げっ歯類でのホルモン誘発性の乳腺上皮増殖に重要な役割を果たすことが示されている。乳腺上皮増殖に対しては、RANKL 阻害が乳腺上皮内の細胞増殖を著明に抑制することが示されている (Branstetter et al, 2008)。以上のことから、RANK/RANKL 系ががん細胞の生存シグナルとして機能する場合には、デノスマブの作用によってこのシグナルが減弱することで、がん細胞の生存率が低下することが考えられる。

別の発がん機序仮説として、血管新生の増強が挙げられる。RANK/RANKL/OPG システムの血管新生に対する影響は第 2.2.4.1 項に示すとおり、様々な血管新生モデルで検討されている。これらのデータを総合的に解釈によると、*in vivo* モデルでの顕著な血管新生に対する活性はないと判断できる。

RANK 及び RANKL のがん細胞に対する直接的な活性はいくつかの *in vitro* 試験でも検討されている (Jones et al, 2006、Mori et al, 2007、Armstrong et al, 2008)。これらの試験で、RANKL

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

は、ヒト乳癌、前立腺癌、あるいは黒色腫の細胞に対して増殖を誘導しなかったが、細胞遊走を誘導し、この細胞遊走は RANKL 阻害によって阻害された。

RANKL 阻害は単独、あるいは細胞傷害性薬物、分子標的薬、及びホルモン薬との併用で、多くの *in vivo* げっ歯類がんモデルにおいて評価が行われている。その結果、RANKL 阻害はすべての骨関連モデルで有益な作用が認められている。乳腺腫瘍モデルでは RANKL 阻害により発がん抑制と生存期間の著明な延長が認められた。また、各種ヒト腫瘍皮下移植モデルでは RANKL 阻害による有害作用は認められていない。他の治療薬と併用した場合、RANKL 阻害による相加的な腫瘍増殖抑制作用が認められるか、あるいは腫瘍反応に変化がないことが示されている。これらの様々なヒトのがん種を用いた検討から、RANKL 阻害に伴う発がんリスクはないことが示唆されている。

RANK/RANKL 系は、免疫系の調節因子であり、一部の免疫細胞に発現しているとの仮説もある (Anderson et al, 1997、 Choi et al, 2001、 Wong et al, 1997b)。蓄積された免疫学的、薬理的、疫学的データによると、免疫を介在した、がん細胞及び腫瘍形成ウイルスの検出と排除には、NK 細胞、マクロファージ、あるいは細胞傷害性 T 細胞の関与が示されている。たとえば、通常免疫抑制剤を長期にわたって投与される臓器移植患者における、がん発生率に関する疫学研究から、このような患者ではある種のがんのリスクが増大することが明らかにされている。非臨床での広範囲な検討から、成熟動物の複数の免疫系モデルで RANKL 阻害による免疫の不全は認められていない (第 2.2.1 項参照)。特に、ヒトでの曝露の数倍の用量のデノスマブを最大 16 ヶ月間サルに投与した試験で、NK 細胞あるいは細胞傷害性 T 細胞への影響を含めて免疫系に対してのいかなる影響も認められなかった (試験報告書 102090 及び 103981)。一方で、樹状細胞/T 細胞相互作用を抑制する免疫抑制薬アレファセプトをサルに 6 ヶ月投与した場合、潜伏性リンフォクリプトウイルス感染再燃に起因する B 細胞過形成及びリンパ腫の発現が認められている (Clarke et al, 2008)。リンフォクリプトウイルスは典型的なマカクサルのコロニーに広く蔓延しており、デノスマブを投与したサルも潜伏感染していた可能性が非常に高い (Moghaddam et al, 1997) が、投与期間 12 ヶ月までのデノスマブの試験ではサルの B 細胞過形成は認められていない。

なお、非がん被験者及びがん患者を対象としたデノスマブの臨床試験が実施されており、いずれの試験でも発がん性の徴候は示されていない。

以上のことから、現在得られているデータに基づき、デノスマブに発がんのリスクはないと判断され、デノスマブには、腫瘍の増殖及び転移を抑制する可能性があると考えられる。

4.5 生殖発生毒性試験

デノスマブの雌受胎能、胚・胎児発生、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能への影

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

響をカニクイザルを用いて評価した。これらの試験の用量及び投与回数は、投与期間を通じて適切な薬物曝露量を維持するよう設定した。雌受胎能試験及び、胚・胎児発生に関する試験における高用量（12.5 mg/kg、週 1 回）は、サルの 12 ヶ月試験の累積 1 ヶ月投与量と同等とした。低用量（2.5 mg/kg、週 1 回）は、投与期間中の適切な曝露量を維持するために必要な最低用量として設定した。

4.5.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

性成熟し、月経周期が規則的な雌カニクイザルを用いて、デノスマブの受胎能への影響を評価した。0 mg/kg、2.5 mg/kg、5.0 mg/kg、及び 12.5 mg/kg の用量で、交配前の月経周期 2 サイクルから交配後約 4 週間まで、週 1 回皮下投与した。月経周期は溶媒コントロール群及びデノスマブ投与群で概ね同程度であった。全体的に月経周期は、エストラジオール濃度のピークと同時か、エストラジオール濃度のピークにわずかに先行（通常 1 日）される黄体化ホルモン濃度のピークを特徴とする動きを示した。プロゲステロン濃度は、エストラジオール及び黄体化ホルモンが最高濃度に到達すると上昇を始め、通常 5～10 日後にプラトーに達し、その後低下した。血清中プロゲステロン、17 β -エストラジオール及び黄体化ホルモン濃度の程度及び経時パターンは、予測されたとおり、溶媒コントロール群及びデノスマブ投与群で同程度であった。全群の雌で交配が成立したことから（試験報告書 102843、モジュール 2.6.7、表 12 参照）、デノスマブは雌の受胎能に有害な影響を及ぼさないと考えられた。

雄受胎能評価のみに特化した試験は実施しなかった。しかし、フローサイトメトリーによる精巣細胞の評価と併せて、精巣の詳細な病理組織学的評価を 12 ヶ月毒性試験（試験報告書 102090）の一部として実施した。精子の形態あるいは成熟への有害な影響はみられず、精巣障害の病理組織学的徴候も認められなかった。

4.5.2 胚・胎児発生に関する試験

デノスマブの胚・胎児毒性及び催奇形性を、器官形成期を通じてデノスマブを投与した妊娠カニクイザルにおいて評価した。0 mg/kg、2.5 mg/kg、5.0 mg/kg、及び 12.5 mg/kg を、妊娠 20～50 日の間、週 1 回皮下投与した。各投与群で胎児体重あるいは器官重量、身体測定値、あるいは胎盤重量に投与に関連した影響はみられなかった。胎児の外表及び内臓検査の結果、群間で意味のある差異はみられず、異常は確認されなかった。一方で、頭蓋骨、胸骨分節、椎骨、肋骨、及び足根骨の骨化における変異等の軽微な骨格異常が、対照群を含む全群の胎児で認められた。異常の発生率が投与群間で同程度であったため、これらの異常は薬物投与に起因したものとは考えられなかった。デノスマブの骨吸収抑制作用に関連した骨の奇形はなく、小腸のパイエル板等の胎児のリンパ組織に有害な影響がみられなかったことは重要と考える。しかし、この試験ではリンパ節の評価は行っていないため、胎児におけるリンパ節の発生に対する検討はできなかった。

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

4.5.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

“Enhanced Pre-Postnatal Toxicity Study of AMG 162 Administered by Subcutaneous Injection to Pregnant Cynomolgus Monkeys With up to 6-Months Postnatal Evaluation (試験報告書 112197)” を妊娠期間中に投与した場合のデノスマブの作用を評価するために実施した。本試験の目的は器官形成期(妊娠 20~22 日)から分娩まで 1 ヶ月に 1 回妊娠カニクイザルに皮下投与したときのデノスマブの母体毒性の評価、出生児の生後 1 ヶ月までの外表・骨格・行動及び解剖時の外表、内臓の評価、生後 6 ヶ月での出生児の成長と発達の評価であった。

デノスマブを妊娠カニクイザルに器官形成期(妊娠 20~22 日)から分娩まで皮下投与(0 mg/kg 及び 50 mg/kg、最大 6 回)した結果、母動物及び出生児に投薬起因性の作用が認められた。各群 29 例の妊娠動物を割り付け、対照群及びデノスマブ投与群でそれぞれ 22 例及び 16 例の出生児を得た。各群母動物と出生児の 6 ペアを分娩後/生後 1 日(あるいはごく近い日)に剖検し、残りの生存動物(対照群 11 ペア、デノスマブ投与群 4 ペア)を分娩後/生後 180±2 日に剖検した。

母動物において、骨吸収及び形成のバイオマーカーの低下(骨代謝回転の低下を反映)、死産(分娩の予定時期における胎児死亡)の増加、分娩異常に起因した死亡(1 例)、低 Ca 血症と一致した臨床症状を示した後の死産(1 例)が認められた。母動物の乳腺の発達は正常であった。

妊娠期間中デノスマブに曝露された出生児では、出生後死亡の増加、体重増加の抑制、成長/発達の遅延、骨吸収及び形成のバイオマーカーの低下が認められた。生後 1 日解剖群あるいは出生後死亡/瀕死期解剖例では、(X 線不透過の増加を伴う)骨密度及び骨量の増加、骨の形状と顎骨長の変化、(一部の出生児で造血抑制を惹起する、骨髓腔減少を伴う)非増殖性骨化過剰、長骨における二次骨化中心拡大の遅延、(組織学的に認められた骨幹端の肥大と一致する)成長板の肥厚、及び(骨折を伴う)骨強度の低下が認められた。これらの出生児ではデノスマブ投与に起因した組織学的変化が骨(破骨細胞低形成、非増殖性骨化過剰、及び髓腔の減少)、歯(歯牙異形成、歯列不正、ただし、歯牙萌出には異常なし)、末梢リンパ節(大部分が欠損、検査対象リンパ節:腋窩、鼠径、顎下、及び腸間膜)、及び髓外造血(複数組織)に認められた。複数組織の感染が途中解剖例の出生児 3 例で検出された。出生児の筋緊張、及び神経行動評価に投薬関連の影響はみられなかった。

デノスマブ投与群の母動物及び出生児の骨バイオマーカーは分娩後/出生 91 日で回復した。デノスマブの薬理作用からの回復は分娩後の薬物動態で確認された曝露の減少と直接関連していた。

生後 1 日目で認められていた大部分の骨関連の変化は生後 180±2 日目では完全に回復した。しかし、いくつかの投与起因性の変化(末梢リンパ節の欠損・減少、髓外造血、歯牙異形成)は持続した。大腿骨の骨幹形状の変化及び骨力学特性の低下が認められたが、骨バイオマーカーは時間とともに回復したであろうことを示している。歯牙萌出には影響はなかった。生後 180 日群において軽度から中等度の鈣質沈着がデノスマブ投与群の出生児 1 例の複数の組織で認められた。

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

投与1回目（妊娠20～22日）と投与5回目（妊娠132日）後の母動物のAUC_{26day}はそれぞれ7400 µg·day/mLと8620 µg·day/mLであった。半数の出生児の血清中濃度は母動物より高く、半数では低かった。出生児では測定可能な濃度のデノスマブが生後91日で1例のみ検出されたが、生後180日では検出される個体はなかった。デノスマブの血清中濃度に対して乳汁中濃度は低かった。

初回投与後、抗薬物抗体が母動物29例中21例で検出された。デノスマブ投与群の出生児14例中7例でデノスマブに対する結合抗体が陽性であった（全例が抗薬物抗体陽性の母動物から出生）。中和抗体は母動物3例、出生児1例で検出された。母動物3例及び出生児1例のみで抗体産生が曝露並びに薬理作用に影響した。抗体産生が低かったこと、一貫した投薬起因性の作用から抗薬物抗体の産生が試験の完全性と解釈に影響しないことが示された。

以上の結果より、デノスマブは出生前及び出生後の骨及び末梢リンパ節の発生に影響を与えるため、添付文書には「妊婦又は妊娠している可能性のある婦人には投与しないこと」として適切な注意喚起を行うこととする。

4.5.4 新生児（幼若動物）を用いた試験

デノスマブの適応には小児患者が含まれないため、今回、幼若動物の試験は実施しなかった。なお、新生児期RANKL阻害の骨発生及び歯牙萌出に対する影響を評価した試験を副次的薬理試験として実施している（第2.2.3項参照）。

4.6 局所刺激性試験

デノスマブの局所刺激性の評価を目的として特別にデザインされた試験は実施しなかった。代わりに、『ICH M3「医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドライン」（平成10年11月13日付医薬審第1019号）』に従い、一般毒性試験プログラムの一環として局所刺激性を評価した。反復投与毒性試験では、注射部位に実質的な刺激性の徴候は認められなかった。したがって、デノスマブ製剤が注射部位の反応に意義のあるリスクを引き起こす可能性は低いと考えられた。さらに、臨床試験において注射部位反応に関する事象はわずかに認められたのみであり、それらのほとんどは、注射時の軽度の疼痛、発赤、あるいは刺激などであった（モジュール2.7.4参照）。

4.7 その他の毒性試験

4.7.1 抗原性試験

抗原性の評価を目的として特別にデザインされた試験は実施しなかった。その代替として、一般毒性試験プログラムの一部として抗原性を評価した。デノスマブはサルにおいて高い免疫原性を示した。モジュール2.6.6第3項に記載するとおり、全用量において、結合抗体及び中和抗体が高い発生率で認められた。結合抗体及び中和抗体の作用により、デノスマブの血清中濃度の減少及び薬力学的反応（骨代謝マーカー）の減弱が数例で認められた。しかし、抗体の存在は、安全性プロファイル評価あるいは全体的な試験の解釈に影響を及ぼさなかつ

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

た。さらに、抗体陽性動物でもある程度の薬力学的反応が認められた。デノスマブの免疫原性は、臨床試験では特に問題とはならなかった（モジュール 2.7.4 参照）。

4.7.2 免疫毒性試験

免疫毒性の評価を目的として特別にデザインされた毒性試験は実施しなかった。その代替として、反復投与毒性試験（試験報告書 102090）及び長期投与による骨粗鬆症予防試験（試験報告書 103981）の一環として、免疫毒性評価項目を評価した。これらのいずれの試験においても、免疫系のインテグリティあるいは機能に対し有害な影響はみられなかった。また、免疫系のインテグリティを評価した試験を実施しており、副次的薬理試験の項に記載した（第 2.2.1 項、モジュール 2.6.2 第 3 項、モジュール 2.6.6 第 8.2 項参照）。これらのモデルで免疫抑制を示す所見は認められなかった。

4.7.3 毒性発現の機序に関する試験

該当なし。

4.7.4 依存性試験

デノスマブは単一のリガンド（RANKL）に特異性を有するため、依存性試験での評価は適切ではないと考えられる。さらに、受容体結合試験において、デノスマブが薬物依存性あるいは神経親和活性との関連が知られる受容体と相互作用したことを示す徴候はみられなかった。

4.7.5 代謝物の毒性試験

デノスマブの薬物動態試験において代謝物の検討は実施していない（モジュール 2.6.4 第 5 項参照）。デノスマブが RANKL を標的とした完全ヒト型抗体であること及び実施した試験結果から懸念事項が認められていないことから、代謝物の試験は必要ないと判断した。

4.7.6 不純物の毒性試験

デノスマブはバイオテクノロジー応用医薬品であるため、不純物の試験は該当しない。

4.7.7 その他の試験

組織交差反応性試験を実施し、RANKL を発現することが知られている組織以外でのデノスマブの結合能を検討した。ヒト組織の標準組織パネルにおいて、デノスマブは想定外の組織とは結合しなかった。免疫反応は、ヒト及びカニクイザルのリンパ節のリンパ球細胞膜上に認められた。これは、リンパ組織において RANKL の発現レベルが高いことが知られていることから想定される所見であった（Lacey et al, 1998）。ラット、ウサギ、及びサル各組織を用いて追加試験を実施した。その結果、ウサギのリンパ節細胞質内に陽性反応が認められたが、反応の局在性から生物学的に重要でないと判断した（試験報告書 102700、101758、

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

及び 101348)。したがって、これらの試験結果から、薬力学データに基づき、カニクイザルを非臨床安全性評価の適切な動物種と判断したことは妥当であると考えられた。

4.7.8 環境への配慮

第 3.4 項に記載するとおり、デノスマブ等のモノクローナル抗体は、内因性プロテアーゼにより個々のアミノ酸及び小ペプチドに分解される可能性が高い。そのため、有効成分の排泄は想定されていない。これらの理由から、環境へのデノスマブの曝露濃度は無視できる程度であると考えられる。

デノスマブ

5. 総括及び結論

- TNF スーパーファミリーのメンバーの一つである RANK/RANKL 系は、破骨細胞の形成、機能、及び生存における必須のメディエーターである。
- デノスマブは、完全ヒト型 IgG2 モノクローナル抗体であり、ヒトの RANKL 及び非ヒト霊長類の RANKL と結合し、その活性を中和するが、げっ歯類の RANKL とは結合しない。
- 溶骨性、溶骨性と造骨性の混合型、及び造骨性の骨転移モデルにおいて RANKL 阻害の有効性が示された。
- 種々のモデルにおいて、RANKL 阻害は腫瘍転移に伴う SRE の予防に有益であることが示された。
- 成熟 OVX サルにデノスマブを投与したところ、骨吸収抑制薬として期待される薬力学作用と一致して、海綿骨及び皮質骨の骨量、骨密度、及び骨強度の急速で有意な増加が認められた。
- 大腿骨閉鎖性骨折させた huRANKL ノックインマウスにデノスマブを投与すると、仮骨部位及び仮骨体積の増加が認められ、それに伴い仮骨における破骨細胞数が減少し、仮骨のリモデリングが遅延したが、骨折部位の骨強度は低下しなかった。
- 組織交差反応性試験の結果、デノスマブは、他の TNF スーパーファミリー、特に TRAIL の発現が知られている組織には結合しなかった。
- デノスマブが動物に心血管リスクを惹起したことを示す徴候はみられなかった。
- デノスマブが用量に対して非線形の薬物動態を示す理由は、2つの消失経路が関与している可能性が考えられ、一つは RANKL 結合が関連する飽和性の経路、一方は FcRn が関与する細網内皮系の細胞による非特異的異化経路である。
- 骨中へのデノスマブの分布あるいは残留の痕跡はみられなかった。
- 非臨床のデータを総合すると、デノスマブ投与による成獣の免疫系への有害作用はないことが示唆された。デノスマブを器官形成期から分娩までの期間皮下投与した場合、RANK/RANKL ノックアウト動物と同様に末梢リンパ節の形成不全が引き起こされた。
- デノスマブはサルにおいて高い免疫原性を示し、結合抗体及び中和抗体の生成が認められたことから、長期投与試験ではより高用量投与が必要となった。
- 一般毒性試験で認められたデノスマブ投与に関連した所見は、デノスマブの薬理作用に起因すると考えられる若齢サルでの骨端成長板の肥大のみであった。
- デノスマブは雌雄の受胎能への作用に対する危険性を示さなかったが、器官形成期から分娩までの期間、サルに皮下投与した結果、胎児死亡・死産の増加、出生児の死亡の増加、骨の形態異常、末梢リンパ節の形成不全などの発生異常が認められた。新生仔ラットにおいて RANKL 阻害による骨量及び骨強度の増加、大腿骨における韌性の低下、歯牙萌出の阻害、及び長軸方向の骨成長の抑制が認められた。RANKL 阻害を中止した後には、一部回復が認められた。

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

デノスマブの薬力学、薬物動態、及び毒性は、デノスマブの種特異性の制限内で、一連の非臨床 in vitro 及び in vivo 試験により評価した。動物種を選択、使用動物数、及び試験デザインは、各試験において適切と考えられた。主要な毒性試験で使用した動物種は、毒性学的感受性の観点から適切であり、主要な試験の計画は、現行の ICH ガイドラインに適合したものである。また、データの形式及び提示方法は適切なものであり、主要な毒性試験及び安全性薬理試験は GLP 試験として実施した。

ヒトにおけるデノスマブの予定投与経路は皮下注射であることから、サルにおけるすべての主要な試験は、皮下投与により実施した。SRE の治療において使用される主な骨吸収抑制剤であるゾレドロン酸とデノスマブの非臨床プロファイルの比較を表 5-1 に示す。両薬剤で認められた類似性及び差異は、市販薬（ゾレドロン酸）の非臨床安全性プロファイルと、デノスマブについて本項に記載した内容との関係を比較したものである。

表 5-1 主要な非臨床試験項目におけるデノスマブとゾレドロン酸の比較

特性	デノスマブ	ゾレドロン酸
腎障害	-	+
消化管障害	-	+
注射部位刺激感	-	+
骨吸収抑制による骨の安定化	+	+
破骨細胞の作用阻害	+	+
骨基質への取り込み	-	+
母体毒性	-	+
発生毒性	+	+
着床後生存率の低下	+	+

進行性悪性腫瘍における骨転移を伴う患者の治療において SRE の発現を遅延又は抑制するデノスマブの薬理活性が非臨床モデルから予測されたが、この薬理活性は主要な第 III 相臨床試験で明確に実証されている（モジュール 2.7.3 参照）。臨床的安全性のプロファイルも非臨床安全性データから概ね予測されている。

ゾレドロン酸群に比べてデノスマブ群で発現率が高かった有害事象に関して、以下の関連する非臨床情報を考察する。

顎骨壊死（ONJ）が認められた被験者は、デノスマブ群 52 名（1.8%）、及びゾレドロン酸群 37 名（1.3%）であった（モジュール 2.7.4 第 2.1.4.2 項参照）。ONJ はビスフォスフォネート製剤の使用と関連があり（EMA/CHMP/291125/2009）、顎における骨代謝の抑制などが病因であるという仮説が立てられている。デノスマブの非臨床試験では、ONJ を示す徴候は認められなかった。動物に高用量のビスフォスフォネート製剤を投与する特定の試験はあるが、

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

ONJの非臨床モデルは確立されていない (Allen et al, 2010)。

安全性併合解析において、デノスマブ投与を受けた患者は呼吸困難の有害事象の発現頻度が高かった (モジュール 2.7.4 参照)。非臨床試験では、デノスマブと呼吸困難又は呼吸困難の根本原因との関連性を示す所見は得られなかった。特に、デノスマブに関連する臨床的呼吸異常、胸水、心血管機能異常、又は病理組織学的変化は認められず、腎異常も認められなかった。

過敏症と関連している可能性のある有害事象の総発現率は、デノスマブ群 5.4%、ゾレドロン酸群 3.8%であった。これらの事象は、多くの場合、併用薬が原因と考えられており、概してデノスマブ投与との因果関係又は時間的關係はないと考えられた。非臨床試験では、デノスマブは忍容性が良好であり、顕著な全身性反応又は局所反応は認められなかった。

試験 20050244 の多発性骨髄腫コホート (被験者集団の 10%) ではゾレドロン酸群で良好な全生存期間を示した (ハザード比 [95% CI] : 2.26 [1.13, 4.50], n = 180)。このがん種別の結果は追加解析によるものであり、生存予後因子や抗悪性腫瘍治療に関して特別な無作為化コントロールを行っていないため、全生存期間についてがん種別に論じることはできない。一方、非臨床データからは多発性骨髄腫モデルでの RANKL 阻害による有益な効果が一貫して示されている (モジュール 2.6.2 第 2.3.5.4 項参照)。

毒性試験プログラムは、デノスマブの種特異性から 1 動物種に限定して実施したが、毒性プロファイルは十分に評価された。動物試験において薬物に関連して認められた影響は、予測される薬力学的活性に起因するもののみであった。これは特に、12 ヶ月間反復投与試験で明らかで、無去勢の動物においても骨密度及び強度の著明で持続的な増加が認められた。他の組織・器官、特に成獣の免疫系への影響はみられなかった。サルを用いた出生前及び出生後の発生毒性試験 (試験報告書 112197) とげっ歯類で実施された試験の間でいくつかの類似性が骨 (成長への影響) 及び末梢リンパ節 (形成不全) に対する作用で認められた。デノスマブは雌雄の受胎能の生殖に対する危険性は想定されなかったが、器官形成期から分娩まで投与した場合に発生毒性を示し、ごくまれに分娩異常が認められた。

12 ヶ月試験で認められた死亡例は、自然発生した感染による偶発的な死亡の可能性が高いと考えている。同一用量群内の他のサルでは同様な臨床徴候は認められず、毒性学的に意味のある免疫毒性データの変化も確認できなかったため、これらの事象が免疫抑制に関連していた可能性は低いと判断した。

全体として、この毒性試験プログラムにより、デノスマブ投与による毒性学的影響の特性は十分に検討できたと考えられる。抗デノスマブ抗体の発現による影響を補うため、高用量を用いる必要があったが、抗体が陰性であった動物において NOAEL と申請用量での薬物濃

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

度の間で適切な曝露マージンが得られた (表 5-2)。NOAEL における抗デノスマブ抗体の発現頻度が低かったこと、相応の薬物曝露が認められたこと、及び持続的な薬力学的反応が認められたことから、試験に用いた動物が、投与期間中に適切に曝露されていたことが示された。

表 5-2 主要な毒性を評価した試験におけるNOAELとデノスマブ申請用量^{a)}での曝露倍数算定値

試験の種類	NOAEL (mg/kg)	C _{max} ^{b)} (µg/mL) 平均(SD)	AUC _{0-1au} ^{b)} (µg·hr/mL) 平均(SD)	AUCに 基づく 曝露倍数 ^{c)}
カニクイザルの 12 ヶ月反復投与 毒性試験 (試験報告書 102090)	50	666 (156)	268000 (90300)	15
	10	157 (37.1)	48200 (21100)	2.7
カニクイザルの 16 ヶ月反復投与 試験 (試験報告書 103981)	50	413 (160)	171000 (72400)	9.5
カニクイザルの胚・胎児毒性試験 (試験報告書 102842)	12.5	282 (89.6)	41000 (10600)	9.1 ^{d)}

a: 120 mg、皮下注射、4 週に 1 回。

b: 投与終了時。反復投与のトキシコキネティクスの詳細はモジュール 2.6.4 第 8.2.2 項で考察する。

c: ヒトの AUC_{0-4weeks} 値 (18000 µg·hr/mL) は 20040113 試験から引用した。

d: NOAEL での曝露は、週 1 回投与の AUC_{0-1au} 値 (試験報告書 102842) を 4 倍して、4 週間の AUC (近似値) とした。

AUC = 血清中薬物濃度一時間曲線下面積；C_{max} = 最高血清濃度；NOAEL = 無毒性量

なお、添付文書 (案) には、受胎能、妊娠、授乳、及び小児患者に関連した注意喚起を含め、デノスマブの薬理学的、毒性学的特性を的確に反映した記載を含めた。

以上、本申請資料、並びにモジュール 4 に含めた薬理試験及び毒性試験結果は、骨転移を有する進行がん患者に対するデノスマブの申請用法・用量 (120 mg、皮下注射、4 週に 1 回) に関する妥当性を裏付けるものと判断する。

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

6. 参考文献

- Akatsu T, Murakami T, Nishikawa M, et al. Osteoclastogenesis inhibitory factor suppresses osteoclast survival by interfering in the interaction of stromal cells with osteoclast. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;250:229-234.
- Allen MR, Kubek DJ, Burr DB. Cancer treatment dosing regimens of Zoledronic acid result in near-complete suppression of mandible intracortical bone remodeling in beagle dogs. *J Bone Min Research.* 2010;25(1):98-105.
- Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature.* 1997;390:175-179.
- Armstrong AP, Miller RE, Jones JC, Zhang J, Keller ET, Dougall WC. RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. *The Prostate.* 2008;68:92-104.
- Ashcroft AJ, Cruickshank SM, Croucher PJ, Perry MJ, Rolinson S, Lippitt JM, Child JA, Dunstan C, Felsburg PJ, Morgan GJ, Carding SR. Colonic dendritic cells, intestinal inflammation, and T cell-mediated bone destruction are modulated by recombinant osteoprotegerin. *Immunity.* 2003;19:849-861.
- Bachmann MF, Wong BR, Josien R, Steinman RM, Oxenius A, Choi Y. TRANCE, a tumor necrosis family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation. *J Exp Med.* 1999;189:1025-1031.
- Barbaroux J-B O, Beleut M, Brisken C, Mueller CG, Groves RW. Epidermal receptor activator of NF- κ B ligand controls Langerhans cells numbers and proliferation. *J Immunol.* 2008;181:1103-1108.
- Bateman TA, Dunstan CR, Ferguson VL, Lacey DL, Ayers RA, Simske SJ. Osteoprotegerin Mitigates Tail Suspension-Induced Osteopenia. *Bone.* 2000;26(5):443-449.
- Bolla M, Gonzalez D, Warde P, et al. Improved survival in patients with locally advanced prostate cancer treated with radiotherapy and goserelin. *N Engl J Med.* 1997;337:295-300.
- Branstetter D, Jacob A, Gonzalez-Suarez E, Jones J, Erwert R, Chaisson-Blake M, Dougall WC. RANKL inhibition decreases the incidence of mammary adenocarcinomas in wild type (WT) and MMTV-RANK transgenic mice. *San Antonio Breast Cancer Symposium, 2008, San Antonio, Texas.*
- Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998;12:1260-1268.

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

Burgess TL, Qian Y, Kaufman S. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol.* 1999;527-538.

Burr D, Martin RB. Errors in bone remodeling: towards a unified theory of metabolic bone disease. *Am J Anat.* 1989;186:186-216.

Byrne FR, Morony S, Warmington K, et al. CD4+CD45RB^{Hi} T cell transfer induced colitis in mice is accompanied by osteopenia which is treatable with recombinant human osteoprotegerin. *Gut.* 2005;54:78-86.

Canon J, Roudier M, Bryant R, et al. Inhibition of RANKL blocks skeletal tumor progression and improves survival in a mouse model of breast cancer bone metastasis. *Clin Exp Met.* 2008;25(2):119-129.

Cao Y, Bonizzi G, Seagroves TN, Greten FR, Johnson R, Schmidt EV, Karin M. IKK α provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell.* 2001;107:763-775.

Capparelli C, Morony S, Warmington K, et al. Sustained antiresorptive effects after a single treatment with human recombinant osteoprotegerin (OPG): A pharmacodynamic and pharmacokinetic analysis in rats. *J Bone Miner Res.* 2003;18:852-858.

Carlin BI and Andriole GL. The Natural History, Skeletal Complications, and Management of Bone Metastases in Patients with Prostate Carcinoma. *Cancer Suppl.* 2000;88(12):2989-2994.

Charhon SA, Chapuy MC, Delvin EE, Valentin-Opran A, Edouard CM, Meunier PJ. Histomorphometric analysis of sclerotic bone metastases from prostatic carcinoma special reference to osteomalacia. *Cancer.* 1983;51(5):918-924.

Chino T, Draves KE, Clark EA. Regulation of dendritic cell survival and cytokine production by osteoprotegerin. *J Leukoc Biol.* 2009;86:933-940.

Choi Y, Woo KM, Ko SH, et al. Osteoclastogenesis is enhanced by activated B cells but suppressed by activated CD8⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* 2001;31:2179-2188.

Clarke J, Hurst C, Martin P, Vahle J, Ponce R, Mouhno B, Heidel S, Andrews L, Reynolds T, Cavagnaro J. Duration of chronic toxicity studies of biotechnology-derived pharmaceuticals: Is 6 months still appropriate? *Regul Toxicol Pharm.* 2008;50:2-22.

Clezardin P, Teti A. Bone metastasis: pathogenesis and therapeutic implications. *Clin Exp Metastasis.* 2007;24:599-608.

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

- Coffey GP, Fox JA, Pippig S, et al. Tissue distribution and receptor-mediated clearance of anti-CD11a antibody in mice. *Drug Metab Dispos.* 2005;33(5):623-629.
- Coleman R. Management of bone metastases. *Can Treat Rev.* 1997;23(S1):S69-S75.
- Demers L, Costa L, Lipton A. Biochemical markers and skeletal metastases. *Clin Orthop Relat. Res.* 2003;(415 Suppl):S138-47.
- Diamond TH, Higano CS, Smith MR, Guise TA, Singer FR. Osteoporosis in men with prostate carcinoma receiving androgen deprivation therapy: recommendations for diagnosis and therapies. *Cancer.* 2004;100: 892-899.
- Dorato MA, Engelhardt JA. The no-observed-adverse-effect-level in drug safety evaluations: use, issues and definition(s). *Regul Toxicol Pharmacol.* 2005;42:265-274.
- Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, DeSmedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.* 1999;13:2412-2424.
- Drevon-Gaillot E, Perron-Lepage MF, Clement C, Burnett R. A review of background findings in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) from three different geographical regions. *Exp Toxicol Pathol.* 2006;58:77-88.
- Droz-Desprez D, Azou C, Bordigoni P, Bonnaure-Mallet M. Infantile osteoporosis : a case report on dental findings. *J Oral Pathol Med.* 1992;21:422-425.
- Dunstan CR, Capparelli C, Kelley M, et al. Osteoprotegerin (OPG), a novel TNF-receptor family member profoundly inhibits endosteal bone resorption due to growth, humoral hypercalcemia of malignancy, and interleukin 1. *J Bone Min Res.* 1997;12:S134.
- European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). CHMP Assessment Report on Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaw, CHMP/291125/2009, 24 September 2009.
- European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guidelines for the Evaluation of Medicinal Products in the Treatment of Primary Osteoporosis, CPMP/EWP/552/95 rev 2, November 2006.
- Fata JE, Kong YY, Li J, et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell.* 2000;103:41-50.

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

- Finger S, Goettsch C, Schoppert M, Hempel U, Morawietz H, Kostenuik P, Erben R, Hofbauer L. Inhibition of RANK ligand prevents bone loss and vascular calcium deposition in a murine model of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone*. 2009; S447.
- Gomes MF, Rangel DC, Starling C, Goulart M. Familial malignant osteopetrosis in children: a case report. *Spec Care Dentist*. 2006;26:106-110.
- Gonzalez-Suarez E, Branstetter D, Armstrong A, Dinh H, Blumberg H, Dougall WC. RANK overexpression in transgenic mice with mouse mammary tumor virus promoter-controlled RANK increases proliferation and impairs alveolar differentiation in the mammary epithelia and disrupts lumen formation in cultured epithelial acini. *Mol Cell Biol*. 2007;27(4):1442-1454.
- Goss PE, Ingle JN, Martino S, et al. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med*. 2003;349:1793-1802.
- Greaves P. *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies: Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation*. 2nd ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier;2000:254-268, 372-380.
- Grier RL, Wise GE. Inhibition of tooth eruption in the rat by a bisphosphonate. *J Dent Res*. 1998;77:8-15.
- Hanada R, Leibbrandt A, Hanada T, Kitaoka S, Furuyashiki T, Fujihara H, Trichereau J, Paolino M, Qadri F, Plehm R, Klaere S, Komnenovic V, Mimata H, Yoshimatsu H, Takahashi N, von Haeseler A, Bader M, Sebnem Kilic S, Ueta Y, Pifl C, Narumiya S, Penninger JM. Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. *Nature*. 2009;462:505-509.
- Helas S, Goettsch C, Schoppert M, Zeitz U, Hempel U, Morawietz H, Kostenuik PJ, Erben RG, Hofbauer LC. Inhibition of receptor activator of NF- κ B ligand by denosumab attenuates vascular calcium deposition in mice. *Am J Pathol*. 2009;175(2):473-478.
- Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology*. 2001;142:1419-1426.
- Jacquin C, Lee SK, Lorenzo JA, Aguilla HL. RANK deficiency in the hematopoietic compartment alters the development of osteoclasts but not other hematopoietic lineages. *J Bone Miner Res*. 2005;20:Suppl 1;S145.
- Jalevik B, Fasth A, Dahllof G. Dental development after successful treatment of infantile osteopetrosis with bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2002;29:537-540.

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:782-798.

Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Kozieradzki I, Komarova SV, Sarosi I, Morony S, Rubin E, Sarao R, Hojilla CV, Komnenovic V, Kong Y-Y, Schreiber M, Dixon SJ, Sims SM, Khokha R, Wada T, Penninger JM. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature*. 2006;440:692-696.

Kamoun-Goldrat A, Ginisty D, LeMerrer M. Effects of bisphosphonates on tooth eruption in children with osteogenesis imperfecta. *Eur J Oral Sci*. 2008;116:195-198.

Kiechl S, Schett G, Schwaiger J, Seppi K, Eder P, Egger G, Santer P, Mayr A, Qingbo X, Willet J. Soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand and risk for cardiovascular disease. *Circulation*. 2007;116:385-391.

Kim H, Morgan-Bagley S, Kostenuik PJ. RANKL inhibition: a novel strategy to decrease femoral head deformity after ischemic necrosis. *J Bone Miner Res*. 2006;21:1946-1954.

Kimmel DB. Animal models for in vivo experimentation in osteoporosis research. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, editors. *Osteoporosis*. San Diego: Academic Press. 1996.p 671-690.

Kong Y-Y, Feige U, Sarosi I, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*. 1999a;402:304-309.

Kong Y-Y, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph node organogenesis. *Nature*. 1999b;397:315-323.

Kostenuik PJ, Nguyen HQ, McCabe J, Warmington KS, Kurahara C, Sun N, et al. Denosumab, a Fully Human Monoclonal Antibody to RANKL, Inhibits Bone Resorption and Increases BMD in Knock-In Mice That Express Chimeric (Murine/Human) RANKL. *JBMR*. 2009;24(2):182-195

Lacey DL, Tan HL, Lu J, et al. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. *Am J Pathol*. 2000;157:435-448.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93:165-176.

Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune response and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1143:123-50.

Lester J, Coleman R. Bone loss and the aromatase inhibitors. *Br J Cancer*. 2005;93(suppl

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

1):S16-22.

Li J, Sarosi I, Yan Q-X, Morniny S, Capparelli C, Tan H-L, McCabe S, Elliot R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan S-C, Sun Y, Tarpley J, Martin L, Christensen K, McCabe J, Kostenuik P, Hsu H, Fletcher F, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *PNAS*. 2000;97(4):1566-1571.

Lobo ED, Hansen RJ, Balthasar JP. Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Pharm Sci*. 2004;93:2645-2668.

Loser K, Mehling A, Loeser S, Apelt J, Kuhn A, Grabbe S, Schwarz T, Peninger JM, Beissert S. Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. *Nature Med*. 2006;12:1372-1379.

Mahalingham D, Szegezdi E, Keane M, de Jong S, Samali A. TRAIL receptor signaling and modulation: Are we on the right TRAIL? *Cancer Treat Rev*. 2009;35:280-288.

Marks SC. Tooth eruption depends on bone resorption: experimental evidence from osteopetrotic (Ia) rats. *Metab Bone Dis Related Res*. 1981;3:107-115.

Martin TJ, Gillespie MT. Receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL): another link between breast and bone. *Trends Endocrinol Metabol*. 2001;12:2-4.

McGonigle J, Tae, G, Stayton P, Hoffman A, Scatena M. Heparin-regulated delivery of osteoprotegerin promotes vascularization of implanted hydrogels. *J Biomat Sci*. 2008; 19(8):1021-1034.

McGonigle J, Giachelli CM, Scatena M. Osteoprotegerin and RANKL differentially regulate angiogenesis and endothelial cell function. *Angiogenesis*. 2009;12:35-46.

Mebius, RE. Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:292-303.

Messing EM, Manola J, Sarosdy M, Wilding G, Crawford ED, Trump D. Immediate hormonal therapy compared with observation after radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy in men with node-positive prostate cancer. *N Engl J Med*. 1999;341:1781-1788.

Miller RE, Branstetter D, Armstrong A, Kennedy B, Jones J, Cowan L, Bussiere J, Dougall WC. Receptor activator of NF- κ B ligand inhibition suppresses bone resorption and hypercalcaemia but does not affect host immune responses to influenza infection. *J Immunol*. 2007;179:266-274.

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, Van G, Kaufman S, Kostenuik PJ, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med.* 2000;192(4):463-474.

Mincey BA, Duh MS, Thomas SK, et al. Risk of cancer treatment-associated bone loss and fractures among women with breast cancer receiving aromatase inhibitors. *Clin Breast Cancer.* 2006;7(2):127-132.

Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C, Sanguinetti MC. A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000a;97:12329-12333.

Mitcheson JS, Chen J, Sanguinetti MC. Trapping of a methanesulfonamide by closure of the HERG potassium channel activation gate. *J Gen Physiol.* 2000b;115:229-240.

Moghaddam A, Rosenzweig M, Lee-Parritz D, Annis B, Johnson RP, Wang F. An animal model for acute and persistent Epstein-Barr virus infection. *Science.* 1997;276:2030-2033.

Mori K, Le Goff B, Charrier C, Battaglia S, Heymann D, Redini F. DU145 human prostate cancer cells express functional receptor activator of NF κ B: new insights in the prostate cancer bone metastasis process. *Bone.* 2007;40:981-990.

Morony S, Capparelli C, Lee R, et al. A chimeric form of osteoprotegerin inhibits hypercalcemia and bone resorption induced by IL-1 β , TNF- α , PTH, PTHrP, and 1,25(OH) $_2$ D $_3$. *J Bone Min Res.* 1999;14:1478-1485.

Morony S, Capparelli C, Sarosi I, et al. Osteoprotegerin Inhibits Osteolysis and Decreases Skeletal Tumor Burden in Syngeneic and Nude Mouse Models of Experimental Bone Metastasis. *Cancer Research.* 2001;61:4432-4436.

Morony S, Warmington K, Adamu S, et al. The inhibition of RANKL causes greater suppression of bone resorption and hypercalcemia compared with bisphosphonates in two models of humoral hypercalcemia of malignancy. *Endocrinology.* 2005;146:3235-3243.

Morony S, Tintut Y, Zhang Z, Cattley RC, Van G, Dwyer D, Stolina M, Kostenuik P, Demer LL. Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in *ldlr*($-/-$) mice. *Circulation* 2008;117:411-420.

Mulac-Jericevic B, Lydon JP, DeMayo FJ, Conneely OM. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *PNAS.* 2003;100 (17):9744-9749.

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy.

Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA*. 2001;285:785-795.

Olejniczak K, Gunzel P, Bass R. Preclinical testing strategies. *Drug Information Journal*.

2001;35:321-336.

Ominsky MS, Kostenuik PJ, Cranmer P, Smith SY, Atkinson JE. The RANKL inhibitor OPG-Fc increases cortical and trabecular bone mass in intact cynomolgus monkeys. *Osteoporos Int*.

2007;18:1073-1082.

Ominsky MS, Li X, Asuncion F, et al. RANKL inhibition with osteoprotegerin increases bone strength by improving cortical and trabecular bone architecture in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 2008; 23:672-682.

Ominsky MS, Stolina M, Li X, Corbin TJ, Asuncion FJ, Barrero M, Niu Q-T, Dwyer D, Adamu S, Warmington KS, Grisanti M, Tan HL, Ke HZ, Simonat WS, Kostenuik PJ. One year of transgenic overexpression of osteoprotegerin in rats suppressed bone resorption and increased vertebral bone volume, density and strength. *J Bone Miner Res*. 2009;24(7):1234-1246.

Ota N, Takaishi H, Kosaki N, Takito J, Yoda M, Tohmonda T, Kimura T, Okada Y, Yasuda H, Kawaguchi H, Matsumoto M, Chiba K, Ikegami H, Toyama Y. Accelerated cartilage resorption by chondroclasts during bone fracture healing in osteoprotegerin-deficient mice. *Endocrinology*. 2009;150(11):4823-4834.

Ovchinnikova O, Gylfe A, Bailey L, Nordstrom A, Rudling M, Jung C, Bergstrom S, Waldenstrom A, Hansson GK, Nordstrom P. Osteoprotegerin promotes fibrous cap formation in atherosclerotic lesions of ApoE-deficient mice – brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:1478-1480.

Panizo AC, Encinas M, Parisi E, Valcheva P, Lopez-Ongil S, Coll B, Fernandez E, Valdivielso JM. RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circ Res*. 2009;104:1041-1048.

Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscl Throm Vas Biol*. 2001;21:1610-1616.

Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption -- a hypothesis. *Calcif Tissue Int*. 1981;33:349-351.

Roodman GD. Biology of Osteoclast Activation in Cancer. *J Clin Onc*. 2001;19(15):3562-3571.

Roodman GD. Mechanisms of Bone Metastasis. *N Engl J Med*. 2004; 350; 1655-64.

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

- Roodman GD, Dougall WC. RANK ligand as a therapeutic target for bone metastases and multiple myeloma. *Cancer Treat Rev.* (2008); 34 (1); 92-101.
- Ross Ab, Bateman TA, Kostenuik PJ, Ferguson VL, Lacey DL, Dunstan CR, Simske SJ. The effects of osteoprotegerin on the mechanical properties of rat bone. *J Mater Sci Mater Med.* 2001;12:583-588.
- Santini D, Fratto ME, Galluzzo S, Vincenzi B, Tonini G. Are bisphosphonates the suitable anticancer drugs for the elderly? *Crit Rev Onc/Hem.* 2009;69:83-94.
- Sasseville VG, Diters RW. Impact of infections and normal flora in nonhuman primates on drug development. *ILAR J.* 2008;49(2):179-190.
- Seeman E, Delmas PD. Bone quality-the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med.* 2006;354(21):2250-2261.
- Seifert MF. Abnormalities in bone cell function and endochondral ossification in the osteopetrotic toothless rat. *Bone.* 1996;19:329-338.
- Shahinian VB, Kuo YF, Freeman JL, Goodwin JS. Risk of fracture after androgen deprivation for prostate cancer. *N Engl J Med.* 2005;352:154-164.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997;89:309-319.
- Srivastava S, Matsuda M, Hou Z, Bailey JP, Kitazawa R, Herbst MP, Horseman ND. Receptor activator of NF- κ B ligand induction via Jak2 and Stat5 in mammary epithelial cells. *J Biol Chem.* 2003;278(46):46171-46178.
- Stolina M, Schett G, Dwyer D, Vonderfecht S, Middleton S, Duryea D, Pacheco E, Van G, Bolon B, Feige U, Zack D, Kostenuik P. RANKL inhibition by osteoprotegerin prevents bone loss without affecting local or systemic inflammation parameters in two rat arthritis models: comparison with anti-TNF α or anti-IL-1 therapies. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R187
- Stolina M, Dwyer D, Ominsky MS, et al. Continuous RANKL inhibition in osteoprotegerin transgenic mice and rats suppresses bone resorption without impairing lymphorganogenesis or functional immune responses. *J Immunol.* 2007;179:7497-7505.
- Stolina M, Guo J, Faggioni R, Brown H, Senaldi G. Regulatory effects of osteoprotegerin on cellular and humoral immune responses. *Clin Immunol.* 2003;109:347-354.

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

Su AI, Wilyshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakawa M, Kreiman G, Cooke MP, Walker JR, Hogenesch JB. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. PNAS. 2004;101(16):6062-6067.

Takeuchi A, Shirakawa T, Toyoda Y, Tabata H, et al. Myocardial necrosis related to hydrochlorothiazide-induced hypokalemia in cynomolgus monkeys. J Toxicol Sci. 2008;33:657-66.

Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. Nat Rev Genet. 2003;4:638-649.

Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sakamoto N, Akiba H, Okumura K, Yagita H, Watanabe M. RANK-RANKL signaling pathway is critically involved in the function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in chronic colitis. J Immunol. 2009;182:6079-6087.

Truneh A, Sharma S, Silverman C, et al. Temperature-sensitive Differential Affinity of TRAIL for Its Receptors. DR5 IS THE HIGHEST AFFINITY RECEPTOR. J Biol Chem. 2000;275:23319-23325.

US FDA. Guidelines for Preclinical and Clinical Evaluation of Agents Used in the Prevention and Treatment of Postmenopausal Osteoporosis, April 1994.

Van de Perre P. Transfer of antibody via mother's milk. Vaccine. 2003;21:3374-3376.

Van Wesenbeck L, Odgren PR, Mackay CA, D'Angelo M, Safadi FF, Popoff SN, Van Hul W, Marks Jr SC. The osteopetrotic mutation toothless (tl) is a loss-of function frameshift in the rat Csf1 gene: evidence of a crucial role for CSF-1 in osteoclastogenesis and endochondral ossification. PNAS. 2002;99:14303-14308.

Vargas HM, Bass AS, Breidenbach A, Feldman HS, Gintant GA, Harmer AR, Heath B, Hoffman P, Lagrutta A, Leishman D, McMahon N, Mittelstadt S, Polonchuk L, Pugsly MK, Salata JJ, Valentin J-P. Scientific review and recommendations on preclinical safety evaluations of biologics. J Pharmacol Toxicol Methods. 2008;58:72-76.

Viadana E, Cotter R, Pickren JW, Bros IDJ. An Autopsy Study of Metastatic Sites of Breast Cancer. Can Res. 1973;33:179-181.

Waldmann TA, Strober W. Metabolism of immunoglobulins. Prog Allergy. 1969;13:1-110.

Walsh PC. Immediate versus deferred treatment for advanced prostatic cancer: initial results of the Medical Research Council Prostate Trial. The Medical Research Council Prostate Cancer Working Party Investigators Group. J Urol. 1997;158:1623-1624.

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

WHO Study Group. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: Report of a WHO Study Group. WHO Technical Report Series 843. 1994.

Wise GE, Fan W. Changes in tartrate-resistant acid phosphatase cell population in dental follicles and bony crypts of rat molars during tooth eruption. *J Dent Res.* 1989;68:150-156.

Wise GE. Cellular and molecular basis of tooth eruption. *Orthod Craniofac Res.* 2009;12:67-73.

Wojtuszczyzn A, Andres A, Morel P, Charvier S, Armanet M, Toso C, Choi Y, Bosco D, Berney T. Immunomodulation by blockade of the TRANCE co-stimulatory pathway in murine allogenic islet transplantation. *Transplant International.* 2009;22:931-939.

Wong BR, Josien R, Lee SY, et al. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med.* 1997a;186:2075-2080.

Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS 3rd, Frankel WN, Lee SY, Choi Y. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem.* 1997b;272(40):25190-25194.

Xolair® (omalizumab) US Prescribing Information. Genentech Inc, South San Francisco, CA, 20052010.

Xolair® (omalizumab) European Public Assessment Report. 2007.
<http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/xolair/xolair.htm>

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 2000;407:242-248.

Zou, A, Curran, ME, Keating, MT, Sanguinetti, MC. Single HERG delayed rectifier K⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J. Physiol.* 1997;272:H1309-H1314.

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

7. 文書中の報告書一覧

非臨床薬理試験報告書番号一覧

R[REDACTED]351	Denosumab, a fully human monoclonal antibody, has selective effects on human rank ligand and human osteoclasts 完全ヒト型モノクローナル抗体であるデノスマブは、ヒト RANK リガンド及びヒト破骨細胞に対し、選択的作用を示す
R[REDACTED]321	Effects of denosumab (AMG 162) on bone mass and bone resorption in aged human rank ligand knock-in mice 高齢ヒト RANK リガンドノックインマウスにおけるデノスマブ (AMG 162) の骨量及び骨吸収への影響
R[REDACTED]430	Effect of denosumab (AMG 162) on bone mass and resorption in human rank ligand knock-in mice ヒト RANK リガンドノックインマウスにおけるデノスマブ (AMG 162) の骨量及び骨吸収への影響
103981	AMG 162: A monthly subcutaneous injection osteoporosis prevention study for 16 months in the cynomolgus monkey AMG 162: カニクイザルにおける月 1 回の皮下注射による 16 ヶ月骨粗鬆症予防試験
106564	A 12-month osteoporosis "switch" study in the cynomolgus monkey カニクイザルの 12 ヶ月骨粗鬆症"切り替え"試験
R[REDACTED]340	The effects of OPG-Fc, RANK-Fc, or alendronate on tooth eruption and bone density, geometry, and strength in neonatal rats 新生仔ラットにおける OPG-Fc、RANK-Fc、あるいはアレンドロネートの歯牙萌出、骨密度、骨形状、及び骨強度への影響
R2006160	Effect of OPG-Fc on Tumor Burden and Osteolysis in MDA231-F11Luc Bone Metastasis Model in Female Athymic Nude Mice, Prevention Setting 雌無胸腺ヌードマウスの MDA231-F11Luc 骨転移モデルにおける OPG-Fc の全身腫瘍組織量及び骨溶解への影響、転移予防設定
R2006161	Effect of OPG-Fc on Tumor Burden, Osteolysis, and Survival in MDA231-F11Luc Bone Metastasis Model in Therapeutic Setting MDA231-F11Luc 骨転移モデルにおける OPG-Fc の全身腫瘍組織量、骨溶解、生存への影響、治療設定
R20080161	The Effect of Tamoxifen and the RANKL Inhibitor Osteoprotegerin (OPG-Fc) on the Growth of MCF-7 Cells in an Established Bone Metastasis Model in Female Athymic Nude Mice 雌無胸腺ヌードマウスの骨転移定着モデルにおけるタモキシフェン及び RANKL 阻害剤オステオプロテゲリン (OPG) の MCF-7 細胞の増殖への影響
R20080162	The Effect of Tamoxifen and the RANKL Inhibitor Osteoprotegerin (OPG-Fc), Alone and in Combination, on the Growth of MCF-7 Cells in an Established Bone Metastasis Model in Female Athymic Nude Mice 雌無胸腺ヌードマウスの骨転移定着モデルにおけるタモキシフェン及び RANKL 阻害剤オステオプロテゲリン (OPG-Fc) 単独及び併用の MCF-7 細胞の増殖への影響
R20070953	The Effect of Pretreatment of OPG-Fc on Prevention of Bone Mets in MDA-MB-231(F11)Luc Bone Metastasis Model in Female Athymic Nude Mice 雌無胸腺ヌードマウスの MDA-MB-231(F11)Luc 骨転移モデルにおける OPG-Fc 前投与の骨転移予防への影響
R20080083	The Effect of the RANK Ligand Inhibitor OPG-Fc and Docetaxel, Alone or in Combination, on Tumor Burden and Osteolysis in a PC-3 Prostate Cancer Bone Metastasis Model in Male Athymic Nude Mice

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

	雄無胸腺ヌードマウスの PC-3 前立腺癌骨転移モデルにおける RANK リガンド阻害剤 OPG-Fc 及びドセタキセル単独あるいは併用の全身腫瘍組織量及び骨溶解への影響
R20070963	The Effect of Human OPG-Fc Treatment on Tumor Burden and Osteolysis in a Murine Model of Bone Metastasis of Human Non-Small Cell Lung Cell Line H1975 Luc in Athymic Nude Female Mice 雌無胸腺ヌードマウスのヒト非小細胞肺癌細胞株 H1975 Luc 骨転移モデルにおけるヒト OPG-Fc 投与の全身腫瘍組織量及び骨溶解への影響
R20080310	The Effect of the RANK Ligand Inhibitor OPG-Fc on Tumor Burden and Osteolysis in a Murine Model of Bone Metastasis of Human Non-Small-Cell Lung Cell Line H1299 in Female Athymic Nude Mice 雌無胸腺ヌードマウスのヒト非小細胞肺癌細胞株 H1299 骨転移モデルにおける RANK リガンド阻害剤 OPG-Fc の全身腫瘍組織量及び骨溶解への影響
R20080331	Effect of OPG-Fc (in Combination with Docetaxel) Treatment on Tumor Burden and Osteoclast Remodeling in a Murine Model of Bone Metastasis of Human Non-Small-Cell Lung Cell Line H1299 in Female Athymic Nude Mice 雌無胸腺ヌードマウスのヒト非小細胞肺癌細胞株 H1299 骨転移モデルにおける OPG-Fc 投与 (ドセタキセル併用) の全身腫瘍組織量及び破骨細胞リモデリングへの影響
R20080332	Effect of OPG-Fc (Alone and in Combination with Docetaxel) Treatment on Tumor Burden and Osteolysis in a Murine Model of Bone Metastasis of Human Non-Small-Cell Lung Cell Line H1299 in Athymic Nude Female Mice 雌無胸腺ヌードマウスのヒト非小細胞肺癌細胞株 H1299 骨転移モデルにおける OPG-Fc 投与 (単独及びドセタキセル併用) の全身腫瘍組織量及び骨溶解への影響
R2002266	The Effect of OPG-Fc on Neovascularization in the Rat Corneal Disk Implant Model of Angiogenesis 新生血管形成のラット角膜ディスク移植モデルにおける OPG-Fc の血管新生への影響
R2002204	The Effect of OPG-Fc on Neovascularization in the Rat Corneal Disk Implant Model of Angiogenesis 新生血管形成のラット角膜ディスク移植モデルにおける OPG-Fc の血管新生への影響
R2002267	The Effect of OPG-Fc on Neovascularization in the Rat Corneal Disk Implant Model of Angiogenesis 新生血管形成のラット角膜ディスク移植モデルにおける OPG-Fc の血管新生への影響
R20090069	Long Bone Geometry in 1- and 2-month-old Transgenic Sprague-Dawley Rats Overexpressing the Soluble RANKL Inhibitor OPG During Growth and Development 発育期間中可溶性 RANKL 阻害剤 OPG を過剰発現しているトランスジェニック Sprague-Dawley ラットの 1 ヶ月及び 2 ヶ月齢における長骨形状
R20090070	The Effects of OPG-Fc or Alendronate on Tooth Eruption and on Bone Density, Geometry and Strength in Neonatal Rats: A Recovery Study 新生仔ラットにおける OPG-Fc、あるいはアレンドロネートの歯牙萌出、骨密度、骨形状、及び骨強度への影響：回復試験
R20090282	Dose-Dependent Effects of OPG-Fc on Tooth Eruption, Bone Growth and Bone Strength in Neonatal Rats 新生仔ラットにおける歯牙萌出、骨増殖、骨強度への OPG-Fc の用量依存的な影響

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

R20090211	Effect of the RANKL Inhibitor RANK-Fc versus Vehicle on Tumor Development in a Hormone and Carcinogen Induced Model of Mammary Tumorigenesis ホルモンと発癌物質により誘発される乳房腫瘍モデルにおける腫瘍増殖への基剤に対する RANKL 阻害剤 RANK-Fc の効果
R-458	Comparison of two anti-resorptive therapies (alendronate vs AMG 162 monoclonal anti-RANKL antibody) on murine fracture healing マウス骨折治癒における2つの骨吸収抑制治療（アレンドロネート対 AMG 162 モノクローナル抗 RANKL 抗体）の比較

安全性薬理試験報告書番号一覧

101606	A single -dose subcutaneous administration of AMG 162 for cardiovascular and respiratory evaluation in cynomolgus monkeys カニクイザルにおける AMG 162 の単回皮下投与による心血管及び呼吸器系評価
--------	---

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

薬物動態(PKDM)試験報告書番号一覧

106892	A single dose pharmacokinetic study of denosumab (AMG 162) following intravenous administration to male or female huRANKL knock-in and wild type mice 雌雄 huRANKL ノックイン及び野生型マウスへの静脈内投与によるデノスマブ (AMG 162) の単回投与薬物動態試験
101494	Pharmacokinetic study of AMG 162 in male mouse following intravenous or subcutaneous administration 雄マウスへの静脈内あるいは皮下投与による AMG 162 の薬物動態試験
106893	A single dose pharmacokinetic study of denosumab (AMG 162) following intravenous administration to male or female FcRn knockout and wild type mice 雌雄 FcRn ノックアウト及び野生型マウスへの静脈内投与によるデノスマブ (AMG 162) の単回投与薬物動態試験
101002	Pilot pharmacokinetic study of AMG 162 administered subcutaneously or intravenously in male and female Sprague-Dawley rats 雌雄 Sprague-Dawley ラットへの皮下あるいは静脈内投与による AMG 162 の予備薬物動態試験
104192	Absorption, distribution, and excretion in cynomolgus monkeys following a single subcutaneous administration of ¹²⁵ I-AMG 162 ¹²⁵ I-AMG 162 を単回皮下投与したカニクイザルにおける吸収、分布、及び排泄
101398	A single-dose intravenous and subcutaneous pharmacokinetic and pharmacodynamic study of AMG 162 in cynomolgus monkeys カニクイザルにおける AMG 162 の単回静脈内及び皮下投与による薬物動態及び薬力学試験
104105	Quantitative whole body autoradiography of cynomolgus monkeys following a single subcutaneous administration of ¹²⁵ I-AMG 162 カニクイザルにおける ¹²⁵ I-AMG 162 単回皮下投与による定量的全身オートラジオグラフィー
103948	Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparability study for two manufacturing processes of AMG 162 in female cynomolgus monkeys 雌カニクイザルにおける AMG 162 の2つの製造工程に関する薬物動態及び薬力学的比較試験

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

毒性試験報告書番号一覧

101447	A 1-month study evaluating the effect on bone of AMG162 administered subcutaneously or intravenously in cynomolgus monkeys with a 3-month recovery period 3 ヶ月間の回復期間を設けた、AMG 162 の皮下あるいは静脈内投与によるカニクイザルの骨への影響を評価する 1 ヶ月試験
102090	A 6/12-month subcutaneous toxicity study of AMG 162 in the cynomolgus monkey with an interim kill after 6 months and a 3-month recovery period カニクイザルにおける AMG 162 の 6/12 ヶ月皮下投与毒性試験 (6 ヶ月後に中間屠殺、3 ヶ月間の回復期間)
102843	Subcutaneous fertility evaluation of AMG 162 in the female cynomolgus monkey 雌カニクイザルにおける AMG 162 の皮下投与による受胎能評価
102842	Subcutaneous embryo-fetal development study of AMG 162 in the cynomolgus monkey カニクイザルにおける AMG 162 の皮下投与による胚・胎児発生に関する試験
112197	Enhanced Pre-Postnatal Toxicity Study of AMG 162 Administered by Subcutaneous Injection to Pregnant Cynomolgus Monkeys with up to 6-Months Postnatal Evaluation 妊娠カニクイザルにおける拡充型出生前及び出生後の発生毒性試験
102700	Cross reactivity of AMG 162 with cynomolgus monkey, rat, and rabbit tissue <i>ex vivo</i> AMG 162 のカニクイザル、ラット、及びウサギ組織との <i>ex vivo</i> 交差反応性
101758	Cross reactivity of AMG 162 with normal cynomolgus monkey and human tissues AMG 162 の正常カニクイザル及びヒト組織との交差反応性
101348	Cross reactivity of AMG 162 with normal human tissues AMG 162 の正常ヒト組織との交差反応性