

デノスマブ

目次

1. デノスマブの構造と薬理学的特性.....	2
2. 効能・効果（案）.....	2
3. 用法・用量（案）.....	2

2.6.1 緒言

デノスマブ

1. デノスマブの構造と薬理学的特性

デノスマブは、RANKLを標的とする完全ヒト型モノクローナル抗体であり、ヒトIgG2/κを備えたXenoMouseTMマウスにRANKLを免疫し作製した。デノスマブの分子量は約150 kDであり、たん白質部分は、448個のアミノ酸残基からなる重鎖2本と215個のアミノ酸残基からなる軽鎖2本の計4つのサブユニットから構成され、重鎖サブユニットはN結合型糖鎖を有する。1分子当たり36個のシステイン残基を有し、6個のサブユニット間ジスルフィド結合と12個のサブユニット内ジスルフィド結合を形成している。

RANK/RANKLシステムは破骨細胞の形成、機能、及び生存の重要な調節因子であることが知られている。RANKLは破骨細胞前駆細胞上のRANKと結合して分化を促進し、さらに成熟破骨細胞を活性化して骨吸収を促進する。このため、RANKLは骨吸収の亢進に伴う局所的骨溶解（骨転移及び関節リウマチに関連する）、又は全身性骨粗鬆症（エストロゲン欠乏及び加齢に起因する）などの骨疾患の治療ターゲットになりうる。

デノスマブは、RANKLに高い親和性で特異的に結合する（ $K_d 3 \times 10^{-12}$ M）。デノスマブがRANKLに結合すると、RANKの活性化が阻止され、破骨細胞の形成、活性化、及び生存が抑制される。その結果、骨吸収が抑制され、腫瘍によって誘発される骨病変が抑制されることが示された。なお、デノスマブは溶骨性及び造骨性のいずれの骨病変に対しても抑制効果を有することが示唆された。

デノスマブの特異性は高く、RANKLのみに結合し、他の腫瘍壊死因子（TNF）ファミリーであるTNFα、TNFβ、TNF関連アポトーシス誘導リガンド、又はCD40リガンドなどの分子種には結合しない。

2. 効能・効果（案）

多発性骨髄腫による骨病変及び固形癌骨転移による骨病変

3. 用法・用量（案）

通常、成人にはデノスマブ（遺伝子組換え）として120 mgを4週間に1回、皮下投与する。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

目次

1. まとめ	6
2. 効力を裏付ける試験	12
2.1 In vitro試験	12
2.2 In vivo試験 – 骨疾患モデルにおけるデノスマブの活性	13
2.2.1 デノスマブによるヒトRANKL誘発性高カルシウム血症の阻害試験（試験報告書 R-351）	13
2.2.2 若齢huRANKLノックインマウスにおけるデノスマブの薬理試験（試験報告書 R-430）	13
2.2.3 老齢huRANKLノックインマウスにおけるデノスマブの薬理試験（試験報告書 R-321）	16
2.2.4 若齢無去勢カニクイザルを用いた 12 ヶ月投与による薬理的パラメータ（サル 12 ヶ月非臨床安全性試験、試験報告書 102090）	18
2.2.5 成熟卵巣摘出カニクイザルにおけるデノスマブの薬理試験（試験報告書 103981）	22
2.2.6 アレンドロネートを前投与した成熟卵巣摘出カニクイザルにおけるデノスマブの薬理試験（試験報告書 106564）	30
2.3 In vivo試験 – がん誘発性骨疾患マウスモデルにおけるRANKL阻害の薬理	41
2.3.1 緒言及び背景	41
2.3.1.1 悪性腫瘍の骨合併症における破骨細胞の機能的役割	41
2.3.1.2 病変の種類を問わず骨転移で起きる活発な骨吸収	42
2.3.1.3 骨転移の定着及び進行において活発に機能する破骨細胞	42
2.3.1.4 がん誘発性骨疾患におけるRANKLの調節	43
2.3.2 乳癌骨転移マウスモデルにおけるRANKL阻害（OPG-Fcによる）の薬理	44
2.3.2.1 MDA-MB-231 異種移植マウスモデルにおける溶骨性乳癌骨転移の進行に対するRANKL阻害（OPG-Fcによる）の薬理（試験報告書R2006160 及び R2006161）	45
2.3.2.2 MCF-7 異種移植マウスモデルにおける溶骨性と造骨性の混合型乳癌骨転移の進行に対するOPG-Fc単独及びタモキシフェンとの併用によるRANKL阻害の薬理（試験報告書R20080161 及びR20080162）	47
2.3.2.3 MDA-MB-231F11Luc異種移植マウスモデルにおける乳癌骨転移の新規定着に対するRANKL阻害（OPG-Fcによる）の薬理（試験報告書R20070953）	50
2.3.3 PC-3 異種移植マウスモデルにおける前立腺癌骨転移の進行に対するOPG-Fc単独及びドセタキセルとの併用によるRANKL阻害の薬理（試験報告書R20080083）	50

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

2.3.4	肺癌骨転移マウスモデルにおけるRANKL阻害（OPG-Fcによる）の薬理.....	53
2.3.4.1	H1975 非小細胞肺癌異種移植マウスモデルにおける骨転移の進行に対するRANKL阻害（OPG-Fcによる）の薬理（試験報告書R20070963）	53
2.3.4.2	H1299 非小細胞肺癌異種移植マウスモデルにおける骨転移の進行に対するOPG-Fc単独及びドセタキセルとの併用によるRANKL阻害の薬理（試験報告書R20080310、R20080331、及びR20080332）	55
2.3.5	がん誘発性骨疾患のげっ歯類モデルにおけるRANKL阻害の非臨床評価に関連する文献の概説	58
2.3.5.1	げっ歯類乳癌骨転移モデルにおけるRANKL阻害の概説	58
2.3.5.2	マウス前立腺癌骨転移モデルにおけるRANKL阻害の概説	58
2.3.5.3	その他の固形癌（乳癌、前立腺癌以外）の骨転移又は悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症のマウスモデルにおけるRANKL阻害の概説	59
2.3.5.4	げっ歯類多発性骨髄腫モデルにおける薬理的RANKL阻害の概説	60
2.4	作用機序	60
3.	副次的薬理試験	63
3.1	免疫細胞でのRANK及びRANKLの発現とノックアウトマウスの観察結果	63
3.1.1	ノックアウトマウスで観察されるリンパ節形成不全並びにB及びT細胞発達の不全	64
3.1.2	薬理的RANKL阻害剤を投与した成熟マウスにおけるリンパ節発生、基礎免疫パラメータ、抗原応答の解析	65
3.2	げっ歯類宿主抵抗性モデルにおける薬理的RANKL阻害	65
3.3	げっ歯類実験的自己免疫モデルにおける薬理的RANKL阻害	66
3.4	正常免疫げっ歯類がんモデルにおける薬理的RANKL阻害	67
3.5	血管新生	70
3.6	腫瘍血管新生	71
3.7	血管石灰化とアテローム性動脈硬化	72
3.8	RANKL及びRANKノックアウトマウスで観察された授乳不全	73
3.9	新生仔への影響	74
3.10	体温調節	78
3.11	骨折治癒	78
4.	安全性薬理試験	81
5.	薬力的薬物相互作用	81
6.	考察及び結論	82
7.	参考文献	84

2.6.2 薬理試験の概要文

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 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)
ANOVA	analysis of variance	分散分析
ApoE	apolipo proteinE	アポリポたん白 E
AUC	area under the curve	曲線下面積
BCG	Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin	カルメットگران桿菌 (ウシ型弱毒結核菌)
bFGF	baisc fibroblast growth factor	塩基性線維芽細胞増殖因子
BFR/BV	bone formation rate/bone volume	骨形成速度/骨量
Biacore	equipment for surface plasmon resonance	表面プラズモン共鳴検出装置
BLI	bioluminescence imaing	生物発光イメージング
BMC	bone mineral content	骨塩量
BMD	bone mineral density	骨密度
BSAP	bone-specific alkaline phosphatase	骨型アルカリホスファターゼ
CAM	chick choriallantoic membrane	ニワトリ漿尿膜
CD40L	CD40 ligand	CD40 リガンド
Cr	creatinine	クレアチニン
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
CTL	cytotoxic T lymphocyte	細胞傷害性 T 細胞
CTLA4	cytotoxic T lymphocyte associated 4	細胞傷害性 T リンパ球抗原 4
CTX	C-telopeptide	C-テロペプチド
DMBA	dimethylbenzanthracene	ジメチルベンズアントラセン
DTH	delayed-type hypersensitivity	遅延型過敏症
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
eNOS	endothelial nitric oxide synthase	内皮一酸化窒素合成酵素
ER	estrogen receptor	エストロゲン受容体
ERK	extracellular signal-regulated kinase	細胞外シグナル制御キナーゼ
ES	embryonic stem	胚性幹
Fc	crystallizable fragment of immunoglobulins	免疫グロブリン結晶化フラグメント
Fc-OPG	recombinant construct consisting of an immunoglobulin crystallizable fragment attached to OPG	免疫グロブリン結晶化フラグメントに結合させたヒト OPG (OPG-Fc とタグの位置が異なる)

2.6.2 薬理試験の概要文

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)
HCM	hypercalcemia of malignancy	悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症
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
HuDMEC	human dermal derived endothelial cell	ヒト皮膚由来内皮細胞
huRANKL	humanized RANK ligand	ヒトとマウスのキメラ RANK リガンド
HMVEC	human microvascular endothelial cell	ヒト微小血管内皮細胞
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell	ヒト臍帯静脈内皮細胞
IC ₅₀	median inhibitory concentration	50%阻害濃度
IL	interleukin	インターロイキン
K _d	binding dissociation constant	解離平衡定数
KI	knock-in	ノックイン
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
LPS	lipopolysaccharaide	リポ多糖
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
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
NK	natural killer	ナチュラルキラー
NTX	N-telopeptide	N-テロペプチド
one way ANOVA	one way analysis of variance	一元配置分散分析
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ヒト OPG
OVX	ovariectomized	卵巣摘出
PBS	phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩液
PG	prostagrandin	プロスタグランジン
pQCT	peripheral quantitative computed tomography	末梢骨定量的コンピュータ断層撮影法
PSA	prostate-specific antigen	前立腺特異抗原
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)
sham	sham-operated	偽手術

2.6.2 薬理試験の概要文

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)
SRE	skeletal related event	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
vBMC	volumetric BMC	体積 BMC
vBMD	volumetric BMD	体積 BMD
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮増殖因子

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

1. まとめ

- デノスマブ（開発コード AMG 162）は、ヒト RANK リガンド（RANKL）に対する完全ヒト型 IgG2 モノクローナル抗体である。
- ノックアウトマウスを用いた試験において、RANKL が破骨細胞の存在に必須であることが明らかとなり、RANKL が、破骨細胞の形成、骨吸収活性、及び生存に関与することが薬理的に示された。
- デノスマブは、RANKL がその唯一の受容体 RANK を活性化するのを抑え、それゆえに破骨細胞形成が抑制され、骨吸収が抑制された。
- デノスマブは、ヒト RANKL と結合してヒト RANKL を阻害したが、マウス RANKL に対して結合や阻害を示さず、他のヒト腫瘍壊死因子（TNF）ファミリー（TNF- α 、TNF- β ）、TNF 関連アポトーシス誘導リガンド（TRAIL）、及び CD40 リガンド（CD40L）とも結合しなかった。
- デノスマブは、ヒト及びヒト以外の（非ヒト）霊長類では薬力学的活性を示したが、ラット及びマウスでは示さなかった。
- ヒトとマウスのキメラ RANKL（huRANKL）のみを発現する遺伝子組換えマウスを作製したところ、デノスマブにより阻害を受ける骨吸収促進作用が維持されており、このマウスを用いてデノスマブの非臨床薬力学評価を実施した。
 - これらの「huRANKL ノックイン」マウスの試験では、デノスマブ及び組換え型 OPG-Fc（免疫グロブリン結晶化フラグメント [Fc] に結合させたヒトオステオプロテグリン [OPG]）が骨吸収及び骨量に関して同様の作用を有することが示された。これは、デノスマブ及び OPG が同様の作用機序を有することを示唆している。
- 骨折治癒試験では、huRANKL ノックインマウスに閉鎖性片側性の大腿骨横骨折を施し、その 2 日後に、高用量（10 mg/kg）のデノスマブ投与を開始した。
 - huRANKL ノックインマウスの骨折試験において、溶媒コントロール投与群の骨折仮骨と比較し、デノスマブ投与群では、仮骨内の破骨細胞数の有意な減少、仮骨体積及び骨塩量の増加、及び骨強度の維持又は改善が認められた。
- 若齢無去勢カニクイザルの 12 ヶ月投与試験において、デノスマブ投与によって、骨吸収及び骨形成マーカーが有意に低下した。
 - これらの反応は、海綿骨及び皮質骨の骨量及び骨密度の有意な増加に関連するものであった。
 - デノスマブによって、腰椎及び大腿骨骨幹部における骨強度パラメータも上昇した。
 - デノスマブ投与休止 3 ヶ月後に、骨代謝パラメータ及び骨密度は、溶媒コントロール群と有意差のつかないレベルにまで回復した。
- 卵巣を摘出した（OVX）成熟カニクイザルの 16 ヶ月試験において、デノスマブ投与によって骨吸収及び骨形成を表す骨代謝及び骨形態計測パラメータの有意な低下が認められた。
 - これらの反応は、海綿骨及び皮質骨の骨量及び骨密度の有意な増加に関連するもの

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

であった。

- デノスマブはまた、腰椎並びに大腿骨頸部及び骨幹部を含む複数の骨格部位の骨強度パラメータを上昇させた。
- 骨強度パラメータは、デノスマブ投与の有無にかかわらず、解析したすべての部位において骨量パラメータと高い相関を維持し、骨基質の材質特性はデノスマブによって変化しないことが示唆された。
- この霊長類の試験では、完全ヒト型モノクローナル抗体に対する免疫反応の影響を軽減するために高用量（25 又は 50 mg/kg、4 週間に 1 回）を選定したため、デノスマブの作用は用量依存的ではなかった。
- 抗デノスマブ中和抗体は、3～6 ヶ月の投与期間中でも投与動物の 20%で認められ、その結果、観察されたすべての薬力学作用が消失したため、これらの動物を最終解析から除外した。
- 80%の動物において、16 ヶ月試験期間中の薬物曝露量は薬理学的活性レベルを維持した。
- 代表的なビスフォスフォネートであるアレンドロネートからデノスマブへ投与を切り替えた場合の影響を評価した 12 ヶ月試験では、前半 6 ヶ月間、成熟 OVX カニクイザルにアレンドロネート又はデノスマブを投与すると、血清カルシウム及び骨代謝マーカーの有意な低下が認められ、いずれの投与によっても複数の骨格部位において BMD の有意な上昇がもたらされた。
 - 6 ヶ月時点でアレンドロネートからデノスマブに切り替えた動物における血清カルシウムの低下は、アレンドロネート未投与の動物においてデノスマブの初回投与後に惹起される血清カルシウムの低下に比べてより軽度であった。
 - 6 ヶ月時点でアレンドロネートからデノスマブに切り替えた動物の骨代謝マーカーは、6 ヶ月以降もアレンドロネートを継続投与した動物の値よりもさらに低下していた。
 - 6 ヶ月時点でアレンドロネートからデノスマブに切り替えた動物の BMD は、複数の骨格部位においてさらに増加し、12 ヶ月時点では、アレンドロネートを継続投与した動物の値と同等、又はそれを上回った。
 - 6 ヶ月時点でアレンドロネートからデノスマブに切り替えた動物の 12 ヶ月時点の骨強度値は、12 ヶ月までアレンドロネートを継続投与した動物の値と同等、又はそれを上回った。
 - 溶媒コントロール、切り替え、及び単剤継続投与群を含むすべての群において、骨強度パラメータ及び骨塩量パラメータ間に有意な正の相関が認められた。
 - 抗デノスマブ中和抗体が、デノスマブを投与した 32 例中 7 例で認められ、その結果、観察されたすべての薬力学作用が消失したため、これらの動物（各群 2 又は 3 例）を最終解析から除外した。
- 乳癌骨転移げっ歯類モデルにおいては、組換え型 OPG (OPG-Fc) を使用することで、

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

RANKL 阻害の非臨床評価を進めることが可能となり、RANKL 阻害による腫瘍誘発性骨病変の抑制及び骨腫瘍の増加抑制が確認された。

- ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 のマウス骨転移モデルにおいて、OPG-Fc を投与したところ、用量に依存して溶骨性病変が抑制され、腫瘍移植前に OPG-Fc を投与すると新規の骨転移形成が有意に遅延した。
- OPG-Fc 投与によって MDA-MB-231 骨腫瘍の進行の抑制も認められ、担癌マウスの生存期間が有意に延長した。
- エストロゲン受容体 (ER) 陽性 (ER+)、溶骨性と造骨性の混合型を示すヒト乳癌細胞株 MCF-7 のマウス骨転移モデルにおいて OPG-Fc を投与したところ、骨病変が抑制され、骨腫瘍の進行が抑制された。
- MCF-7 骨腫瘍を有するマウスにおいて、OPG-Fc とタモキシフェンを併用したところ、いずれかの単独投与に比べて骨腫瘍増殖の抑制が有意に増強された。
- 前立腺癌のマウス骨転移モデルにおいて、OPG-Fc を用いた RANKL 阻害によって溶骨性病変が抑制されるとともに、骨腫瘍の進行が抑制された。
- 肺癌のマウス骨転移モデルにて、OPG-Fc を用いた RANKL 阻害によって溶骨性病変が抑制されるとともに、骨腫瘍の進行が抑制された。
- 現在得られているがんモデルにおける RANKL 阻害に関する論文の調査から示唆されているのは、様々ながん種による多様な骨病変において RANKL が機能しており、溶骨性、造骨性、及び溶骨性と造骨性の混合型の骨転移モデルにおいて RANKL 阻害の有効性が示された。
- ホルモン及び発がん物質による乳房腫瘍誘発マウスモデルにおいて、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 阻害をすることで、乳房腫瘍の形成が遅延した。
- 野生型マウス及び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) において、RANK-Fc の投与によってホルモン及び発がん物質による乳房腫瘍形成が有意に減少した。
- RANKL 阻害による乳房腫瘍減少に先立って、新生物の減少が認められた。また、RANKL 阻害による乳房腫瘍減少と相関して、ホルモン及び発がん物質にて誘導される上皮細胞の増殖及びサイクリン D1 発現上昇は急速かつ持続的に抑制された。
- 新生仔ラットでは RANKL 阻害が、骨量及び骨強度を増加させ、大腿骨靱性を低下させ、歯牙萌出を抑制し、長軸方向の骨成長を抑制した。また RANKL 阻害の中止によって、部分的な回復が認められた。
- 非臨床薬理試験の一覧を (表 1-1) に示す。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

表 1-1 非臨床薬理試験の一覧表 (1/3)

試験名	試験報告書番号	状況
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]351	最終報告書
Effects of Denosumab (AMG 162) on Bone Mass and Bone 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	R[REDACTED]430	最終報告書
Effects of Denosumab (AMG 162) on Bone Mass and Bone Resorption in Aged Human RANK Ligand Knock-in Mice 老齢ヒト 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]621	最終報告書
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)	102090	最終報告書
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	103981	最終報告書
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	106564	最終報告書
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 の腫瘍組織量及び骨溶解への影響、転移予防設定	R2006160	最終報告書
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 の腫瘍組織量、骨溶解、生存への影響、治療設定	R2006161	最終報告書
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-Fc) の MCF-7 細胞の増殖への影響	R20080161	最終報告書

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

表 1-1 非臨床薬理試験の一覧表 (2/3)

試験名	試験 報告書 番号	状況
<p>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</p>	R20080162	最終報告書
<p>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</p>	R20070953	最終報告書
<p>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 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又は併用の腫瘍組織量及び骨溶解への影響</p>	R20080083	最終報告書
<p>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 投与の腫瘍組織量及び骨溶解への影響</p>	R20070963	最終報告書
<p>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 の腫瘍組織量及び骨溶解への影響</p>	R20080310	最終報告書
<p>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) の腫瘍組織量及び破骨細胞リモデリングへの影響</p>	R20080331	最終報告書
<p>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) の腫瘍組織量及び骨溶解への影響</p>	R20080332	最終報告書

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

表 1-1 非臨床薬理試験の一覧表 (3/3)

試験名	試験 報告書 番号	状況
Effect of the RANKL Inhibitor RANK-Fc versus Vehicle on Tumor Development in a Hormone and Carcinogen Induced Model of Mammary Tumorigenesis ホルモンと発がん物質によって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	R20090211	最終報告書
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	R2002266	最終報告書
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	最終報告書
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	最終報告書
The Effects of OPG-Fc, RANK-Fc, or Alendronate on Tooth Eruption and on Bone Density, Geometry, and Strength in Neonatal Rats 新生仔ラットにおける OPG-Fc、RANK-Fc、又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	R██████0340	最終報告書
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 カ月及び 2 カ月齢における長骨形状	R20090069	最終報告書
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、又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	R20090070	最終報告書
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	R20090282	最終報告書
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	R██████458	最終報告書
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	101606	最終報告書

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

2. 効力を裏付ける試験

2.1 In vitro 試験

ヒト RANKL、マウス RANKL、並びにヒト RANKL 以外の TNF ファミリー分子に対するデノスマブの結合を酵素免疫吸着測定 (ELISA) 法によって評価した。たん白質を固相化して測定すると、ヒト RANKL のみにデノスマブが結合した。一方、ヒト OPG (陽性コントロール) は、ヒト RANKL、マウス RANKL、並びにヒト TRAIL と結合可能であった (試験報告書 R-351)。競合的 ELISA 結合試験においては、デノスマブの固相化ヒト RANKL に対する結合は可溶性ヒト RANKL によって濃度依存的に阻害されるが、可溶性 TNF- α 、TNF- β 、TRAIL、又は CD40L によっては阻害されないことが示された。フローサイトメトリを用いて実施した別の競合的結合試験においては、チャイニーズハムスター卵巣細胞株 CHO 細胞に発現させた膜結合型ヒト RANKL に対するデノスマブの結合は、可溶性ヒト RANKL によって濃度依存的に阻害されるが、TNF- α 、TNF- β 、TRAIL、又は CD40L によっては阻害されなかった (試験報告書 R-351)。RANKL におけるデノスマブの結合部位はカニクイザルとヒトとで完全に相同であり、またこれら 2 つの種におけるデノスマブの薬物動態/薬力学的特性 (モジュール 2.6.4 参照) は極めて類似していることから、カニクイザルはデノスマブの薬理学的及び毒性学的特性の評価に適した動物種である。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、デノスマブに関連した生物学的活性はげっ歯類では証明できない (試験報告書 R-430)。

デノスマブのヒト RANKL に対する結合親和性を表面プラズモン共鳴検出装置 (Biacore) 解析及び結合平衡除外法によって評価した。デノスマブのヒト RANKL に対する親和性は、Biacore 解析の検出限界を明らかに超えていた。より感受性の高い結合平衡除外法によって、ヒト RANKL に対するデノスマブの結合解離平衡定数 (K_d) は 3×10^{-12} M であることが明らかになった (試験報告書 R-351)。

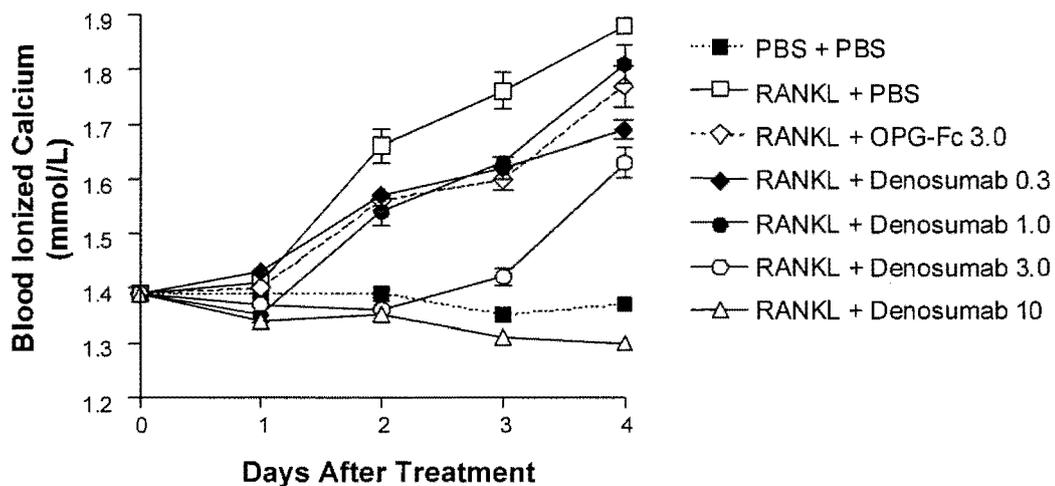
デノスマブは、ヒト RANKL に依存した培養細胞系で酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 陽性多核破骨細胞の形成を抑制したが、マウス RANKL に依存した系では抑制しなかった。組換え型ヒト RANKL にてマウス白血病性単球マクロファージ細胞株 RAW 細胞を刺激して破骨細胞を形成させた試験では、デノスマブは破骨細胞形成を 50% 阻害濃度 (IC_{50}) 値 1.64 ng/mL で阻害した。さらに、マウス RANKL を産生するマウスストローマ ST2 と非付着性のマウス骨髄細胞の共培養系で、破骨細胞の形成を検討した (Atkins et al, 2000)。デノスマブは、 10^{-5} M の高用量でもこの試験系にて破骨細胞形成を抑制しなかった。さらに別の試験では、組換え型ヒト RANKL にて形成される非付着性のマウス骨髄細胞からの破骨細胞形成をデノスマブが IC_{50} 値 10^{-14} M で阻害した (試験報告書 R-351)。

デノスマブ

2.2 In vivo 試験 – 骨疾患モデルにおけるデノスマブの活性

2.2.1 デノスマブによるヒト RANKL 誘発性高カルシウム血症の阻害試験（試験報告書 R-1351）

正常マウスにおいてヒト RANKL が高カルシウム血症を惹起したことから、ヒト RANKL はマウス RANK を活性化して骨吸収を促進することが示唆された。またデノスマブはヒト RANKL によって誘発された高カルシウム血症を、低用量の 0.3 mg/kg 単回皮下投与から用量依存的に是正した（図 2-1、試験報告書 R-1351）。



若齢インタクト雄 BDF1 マウスに、ヒト RANKL (0.5 mg/kg) 又はリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) を 1 日 2 回投与した。RANKL 投与後、速やかに huOPG-Fc 又はデノスマブをマウスに単回皮下投与し、RANKL 誘発性高カルシウム血症に対する作用をモニターした。

データは平均 ± 標準誤差を示す (5 例/群)。

出典: 試験報告書 R-1351

図 2-1 RANKL 誘発性高カルシウム血症に対するデノスマブの単回皮下投与の作用

2.2.2 若齢 huRANKL ノックインマウスにおけるデノスマブの薬理試験（試験報告書 R-1430）

デノスマブはマウス RANKL には結合せず、正常マウス又はラットにデノスマブを高用量投与しても明らかな薬理作用を示さなかった（試験報告書 R-1351）。そこで非臨床試験においてデノスマブの作用を検討するため、「ノックイン (KI)」技術を用いてデノスマブが認識する RANKL のキメラ型のみを発現する遺伝子組換えマウスを作製した。具体的には、キメラ遺伝子コンストラクトを作製し、マウス RANKL 遺伝子をコードする第 5 エクソンを対応するヒト RANKL 遺伝子と置き換えた。このコンストラクトを、標的相同組換えによってマウスゲノムに挿入した。この操作により、内因性マウス RANKL 第 5 エクソンは除去されている。胚性幹 (ES) 細胞を C57BL/6 胚盤胞に注入し、結果として生じたキメラと Black

2.6.2 薬理試験の概要文

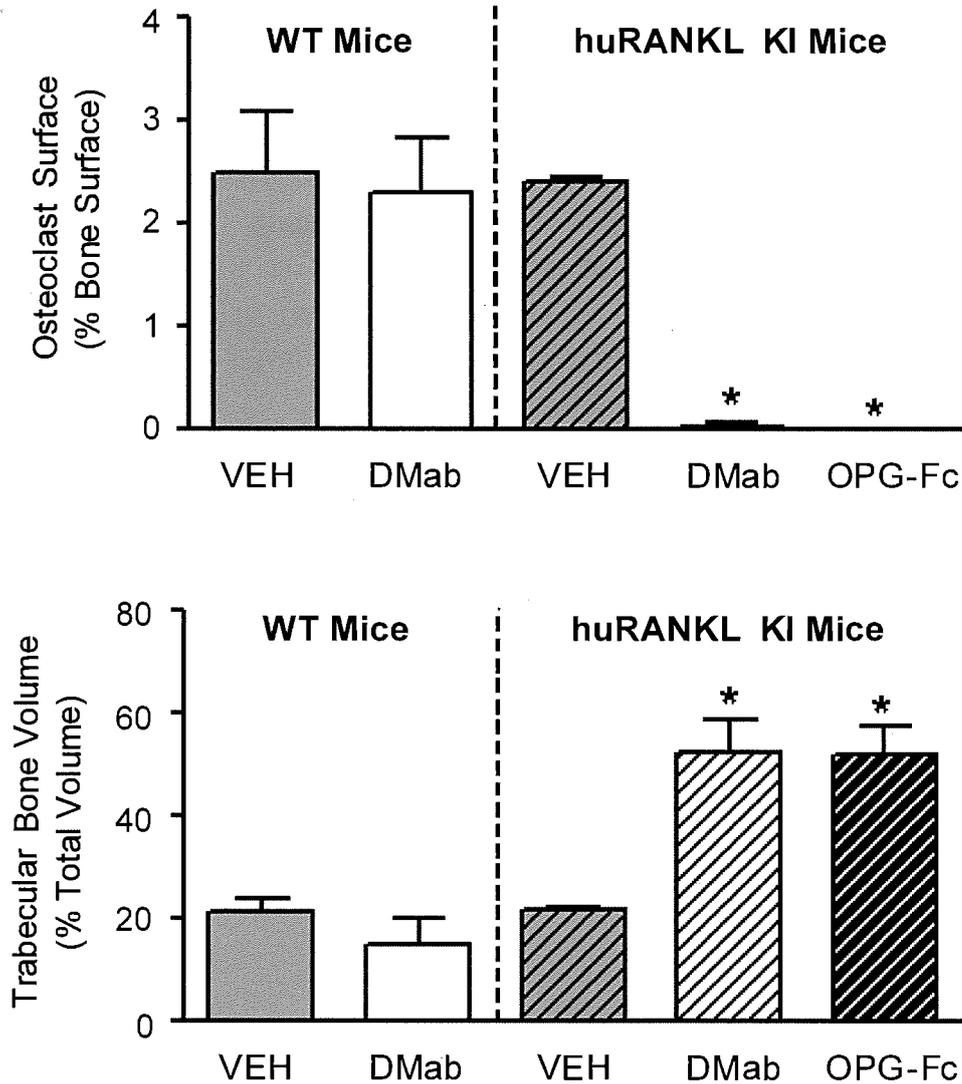
デノスマブ

Swiss/129 マウスを交配させて動物系統を展開した。これらのマウスに関する詳細な説明は試験報告書 R-430 に記載した。

これまでげっ歯類における RANKL 阻害に関する試験の大部分は、デノスマブよりも OPG を用いて実施されてきた。そこでまず、huRANKL KI マウスを用いて OPG とデノスマブが同様の薬力学作用を示すかどうかを検討した。若齢 huRANKL KI マウスに、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、デノスマブ (5 mg/kg)、又は OPG-Fc (5 mg/kg) のいずれかを週 2 回、3 週間皮下投与した (試験報告書 R-430)。デノスマブ及び OPG-Fc は、破骨細胞面 (%骨面; 図 2-2) 及び破骨細胞のバイオマーカーである血清中 TRAP アイソフォーム 5b (TRAP5b) 値を有意にかつ同程度低下させた。デノスマブ及び OPG-Fc はまた、海綿骨量 (図 2-2) 及び体積 BMD (vBMD) を有意にかつ同程度増加させた (試験報告書 R-430)。これらの結果から、げっ歯類の骨疾患モデルにおいて広く研究されてきた OPG-Fc は、デノスマブの薬力学作用の適切なサロゲートであることが示唆される。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ



DMab = デノスマブ、KI = ノックイン、VEH = 溶媒、WT = 野生型
 若齢 huRANKL KI マウスの骨形態計測パラメータに対するデノスマブの作用。若齢 huRANKL KI マウス (3 ~4 例/群) に、溶媒 (PBS)、デノスマブ又は OPG-Fc (5 mg/kg、週 2 回、皮下投与) を 3 週間投与した。対照の WT 同腹仔には、溶媒又はデノスマブを投与した。脛骨近位骨幹端の脱灰切片について骨形態計測を実施した。破骨細胞面は、デノスマブ又は OPG-Fc を投与した huRANKL KI マウスで有意に低値であったが、WT マウスではデノスマブにより低下しなかった。海綿骨量は、huRANKL KI マウスのデノスマブ又は OPG-Fc 投与群で有意に高値を示したが、WT マウスではデノスマブにより増加しなかった。分散分析 (ANOVA) 及び Dunnett 検定を実施した。* huRANKL KI マウス溶媒コントロール群に対し、 $p < 0.05$ 。
 出典: 試験報告書 R-430 から改変

図 2-2 デノスマブ及び OPG-Fc の薬力学作用の比較

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

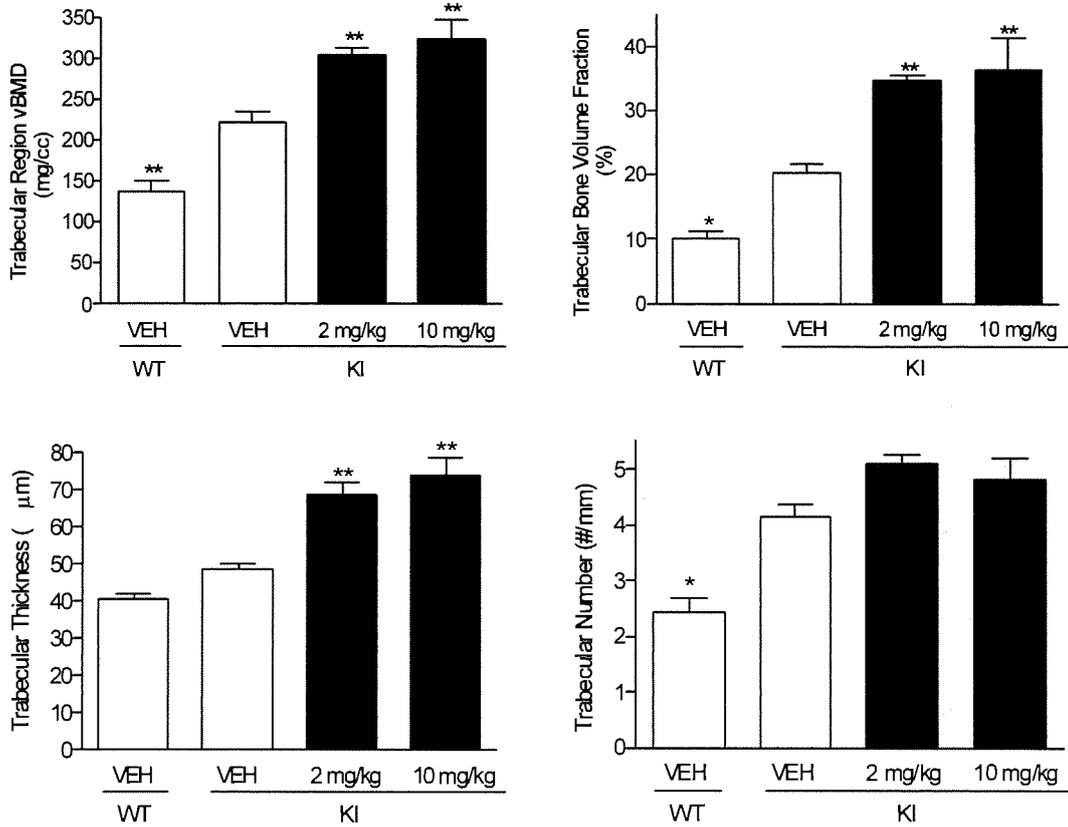
2.2.3 老齢 huRANKL ノックインマウスにおけるデノスマブの薬理試験（試験報告書 R-321）

若齢マウスと比較して骨の長軸方向の成長速度が著しく低下する老齢の huRANKL KI マウスを用いて、デノスマブの骨に対する薬力学作用の用量反応性を検討した。10 ヶ月齢の huRANKL KI マウスに溶媒（PBS）又はデノスマブ 2 又は 10 mg/kg を週 1 回、3 週間皮下投与した。また、正常の野生型同腹仔には溶媒を投与し、huRANKL KI マウスの骨格表現型の変化をマイクロコンピューター断層撮影法（マイクロ CT）により解析した。溶媒を投与した huRANKL KI マウスでは、特定の骨のいくつかの海綿骨微細構造パラメータ（例：第 6 腰椎の海綿骨 vBMD 及び海綿骨体積率）が、野生型同腹仔の溶媒コントロール群と比較して有意に高値を示すことが明らかになった。この結果から、huRANKL KI マウスで生成されたキメラ RANKL はおそらくマウス RANKL よりもマウス RANK の活性化作用が弱く、そのため huRANKL KI マウスの方が高い骨量を有することが示唆される。

デノスマブは、破骨細胞マーカーである血清中 TRAP5b 値を用量依存的に抑制し、高用量群では投与 7、14、及び 21 日目、低用量群では投与 7 日目に有意な TRAP5b 値の低下が認められた（溶媒コントロール群に対し $p < 0.05$; 表 2-1）。また、デノスマブは骨形成マーカーである血清中オステオカルシンを有意に抑制した。デノスマブによってもたらされたこの反応は、骨形成と骨吸収が生理的に正常に共役している際に予期される反応である。脛骨近位部の骨形態学計測では、デノスマブは海綿骨量を増加させ、破骨細胞面及び骨芽細胞面を減少させることが示された。また、第 6 腰椎のマイクロ CT では、デノスマブ投与により海綿骨 vBMD が有意に増加し、また海綿骨の構造が有意に改善（海綿骨体積率及び骨梁幅の増加; 図 2-3）することが示された。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ



KI=ノックイン (この図では huRANKL KI を示す)、vBMD = 体積骨密度、VEH = 溶媒、WT = 野生型
 10 ヶ月齢の雌 WT 及び KI マウスに、溶媒 (PBS) 並びにデノスマブ 2 又は 10 mg/kg を週 1 回、3 週間皮下投与し、第 6 腰椎の海綿骨をマイクロ CT 解析に供した。結果は、KI マウスのデノスマブ 2 mg/kg 投与群 (n = 5) を除き、各群 6 例の平均 + 標準誤差を表す。一元配置分散分析 (One way ANOVA) 及び Dunnett 検定を用いて、KI マウス溶媒コントロール群との比較によってデノスマブの作用を検討した。KI マウス溶媒コントロール群と比較し、*p < 0.05 及び **p < 0.01。
 出典: 試験報告書 R-160321

図 2-3 huRANKL ノックインマウスの第 6 腰椎のマイクロ CT 解析

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

表 2-1 huRANKL ノックインマウスの血清中 TRAP5b に対するデノスマブの作用

Group-Treatment	Dose (mg/kg)	Serum TRAP5b (U/L)			
		Baseline	Day 7	Day 14	Day 21
WT-Vehicle	N/A	10.663	7.926	13.038	14.720
		± 0.736	± 1.686	± 2.093	± 2.354
KI-Vehicle	N/A	11.331	8.888	9.113	16.648
		± 2.649	± 1.725	± 1.822	± 4.382
KI-Denosumab	2	15.663	0.845 ^c	4.182	16.535
		± 3.827	± 0.165	± 2.548	± 4.323
KI-Denosumab	10	17.655	0.330 ^c	0.322 ^a	0.3700 ^b
		± 1.396	± 0.023	± 0.057	± 0.047

KI=ノックイン（この表では huRANKL KI を示す）、U= 単位、WT= 野生型

10 ヶ月齢の雌WT及びKIマウスに、溶媒（PBS）並びにデノスマブ 2 又は 10 mg/kgを週 1 回、3 週間皮下投与し、血清中TRAP5b値を測定した。結果は、平均 ± 標準誤差として表す（6 例/群）。One way ANOVA 及びDunnnett検定を用いて、KIマウス溶媒コントロール群との比較によって投与の影響を検討した。KIマウス溶媒コントロール群と比較し、^ap<0.05、^bp<0.01、及び^cp<0.001。

出典：試験報告書 R-1321

2.2.4 若齢無去勢カニクイザルを用いた 12 ヶ月投与による薬理学的パラメータ（サル 12 ヶ月非臨床安全性試験、試験報告書 102090）

12 ヶ月毒性試験では、若齢雌雄無去勢カニクイザル（2.5~4 歳）に溶媒又はデノスマブ（1、10、又は 50 mg/kg）を月 1 回、最大 12 ヶ月間投与した。各群雌雄各 3 例を 6 ヶ月（6 ヶ月時点より前に死亡した第 4 群の雄サル 1 例を除く）及び 12 ヶ月時点で解剖した。さらに各群雌雄各 2 例は、12 ヶ月投与後 3 ヶ月間休薬した（15 ヶ月時点より前に瀕死期解剖した第 4 群の雄サル 1 例を除く）（表 2-2）。試験期間中は血清及び尿を一定間隔で採取し、骨吸収及び骨形成マーカーを評価した。また右大腿骨及び腰椎（L3 及び L4）は末梢骨定量的コンピュータ断層撮影法（pQCT）及び二重エネルギー X 線吸収測定法（DXA）により解析した。剖検時に大腿骨、腰椎及び脛骨を採取し、三点曲げ（大腿骨幹部）及び圧縮（L3 及び L4）試験によって骨強度パラメータを測定した。脛骨についても pQCT を実施し、高用量のデノスマブ（10 及び 50 mg/kg）によって BMD 又は BMC が有意に増加することが示されたが、骨強度試験は実施しなかったため、本概要中では脛骨のデータについては明記しない。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

表 2-2 無去勢カニクイザルにおける 12 ヶ月間投与毒性試験の試験計画

Group	Number of Animals		Dose Level (mg/kg/month)	Time of Necropsy (Weeks)		
	Males	Females		25	53	66
1	8	8	0	3M/3F	3M/3F	2M/2F
2	8	8	1	3M/3F	3M/3F	2M/2F
3	8	8	10	3M/3F	3M/3F	2M/2F
4	8	8	50	3M/3F	3M/3F	2M/2F

第 4 群の雄 2 例が試験期間中に死亡、あるいは瀕死期解剖された（6 ヶ月時点より前に 1 例、15 ヶ月時点より前に 1 例）。

出典: 試験報告書 102090

抗デノスマブ結合抗体は、薬剤投与動物の 55.3%（1 mg/kg 群で 16 例中 16 例、10 mg/kg 群で 16 例中 8 例、50 mg/kg 群で 15 例中 2 例）で発現した。デノスマブに対する結合抗体が発現し、かつ中和抗体が認められた動物数は、1 mg/kg 群、10 mg/kg 群、及び 50 mg/kg 群でそれぞれ 13 例、7 例、及び 2 例であった（モジュール 2.6.6、3.2 項も参照）。

抗デノスマブ中和抗体の発現に依存して、有意に薬力学反応が鈍化し、薬物曝露は低下あるいは消失した。

骨代謝マーカー

デノスマブ 10 及び 50 mg/kg を月 1 回投与した結果、雄雌いずれのサルにおいても、血清中及び尿中骨代謝マーカーが用量依存的に、また有意に低下した（ $p \leq 0.05$ ）。10 mg/kg 群において、骨吸収マーカーである血清中 C-テロペプチド（CTX）は投与 13 週で、また尿中クレアチニン（Cr）補正した尿中 N-テロペプチド（uNTX/Cr）は投与 13、25、及び 37 週で有意に低下した（ $p \leq 0.05$ ）。50 mg/kg 群では 52 週間の投与期間を通じて血清中 CTX 及び uNTX/Cr が有意に低下した（ $p \leq 0.05$ ）。骨形成マーカーである血清中オステオカルシンは、10 mg/kg 投与群では投与 13 及び 25 週で有意に低下し、50 mg/kg 投与群では投与 13 週から 53 週まで有意に低値を示した（ $p \leq 0.05$ ）。1 mg/kg 群における骨代謝マーカーの値は、溶媒コントロール群とほぼ同様であり、これはおそらくこの群の全動物で認められたデノスマブに対する免疫反応によるものであると考えられた。12 ヶ月間投与後の 3 ヶ月の休薬期間終了時、いずれの投与群においても溶媒コントロール群との間に有意な変化はみられなかった（試験報告書 102090）。

骨密度及び骨形状

1 及び 10 mg/kg 群においては多くの動物に抗デノスマブ中和抗体が認められたため、ex vivo の骨密度測定及び骨強度試験は溶媒コントロール群及び 50 mg/kg 群についてのみ実

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

施した。第3及び第4腰椎（平均値）のpQCT及びDXA解析では、12ヵ月間のデノスマブ投与（50 mg/kg）によって、雄ではBMD（平均値）が有意に上昇したが、雌における変化はわずかであり、溶媒コントロール群とほとんど差はなかったことが示された（表2-3）。また大腿骨骨幹部のpQCT解析によって、12ヵ月間デノスマブ投与（50 mg/kg）した雄では、溶媒コントロール群と比較して皮質面積、皮質骨厚、及びBMCが有意に高値を示した（表2-4）。一方12ヵ月間デノスマブを投与した雌においては、これらのパラメータに有意な変化は認められなかった（表2-4）。デノスマブの投与に関連したDXA及びpQCTパラメータの変化は、3ヵ月の休薬期間後、部分的に可逆性を示した。

骨強度

大腿骨骨幹部（表2-4）及び腰椎（L3及びL4）（表2-3）について、骨強度試験を実施した。雄及び雌の50 mg/kg投与群におけるL3及びL4の骨強度パラメータ（平均値）は、12ヵ月時点において、溶媒コントロール群と比較して同様又は高値を示した。雄では大腿骨骨幹部においても、骨強度パラメータが溶媒コントロール群と同様か又は高値を示した。雌の大腿骨強度パラメータにおいては一貫した変化は認められなかった。3ヵ月の休薬期間後、雄及び雌の高用量群の骨強度パラメータはそれぞれの溶媒コントロール群とほぼ同等であったが、骨強度パラメータの中には休薬期間後も高値が持続しているものもあった。全群の値を合算した最大荷重値対BMC値の線形回帰分析によって、大腿骨骨幹部（雌で $r = 0.91$ 、雄で $r = 0.97$ ）及びL3/L4（雌で $r = 0.82$ 、雄で $r = 0.83$ ）のいずれについても強い正の相関が示された。正常なBMC/骨強度比が維持されたことから、デノスマブによって骨の基本的な材質特性は変化しなかったことが示唆された。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

表 2-3 腰椎の骨強度データ

	Males			Females		
	Month 6	Month 12	End of Recovery	Month 6	Month 12	End of Recovery
pQCT Total Area	-9.3	2.3	-10.8	-3.9	10.1	3.8
pQCT Total BMC	16.6	26.7	5.2	17.0	14.3	22.5
pQCT TotalBMD	28.5	24.3 *	18.1	20.7*	4.2	17.6
pQCT Trabecular BMC	10.0	32.2	16.3	24.5	4.7	19.5
pQCT Trabecular BMD	21.6	30.7	30.4	28.8*	-4.6	14.8
DXA Area	-3.3	4.4	-9.6	-2.3	10.0	4.8
DXA BMC	39.3	45.5*	14.6	14.4	23.5	14.5
DXA BMD	45.6	40.5*	27.0	16.8	13.0	8.9
Peak Load	38.4	101.1*	61.2	52.3*	30.8	18.9
Apparent Strength	46.2	97.3*	79.8	54.4*	19.9	13.6
Yield Load	33.9	120.8*	86.0	58.2*	33.8	15.4
Yield Stress	40.6	117.9*	107.1	58.1*	22.6	10.3
Stiffness	106.7*	41.1	-42.7	38.1	60.6*	-28.4
Modulus	132.4*	36.5	-35.9	37.3	46.0*	-32.2
AUC	19.4	79.3*	130.7	64.9	-0.3	98.4
Toughness	24.7	78.1*	155.8	71.6*	-7.6	91.9
Maximum Displacement	-15.5	0.7	60.8	-2.2	-22.0	58.4
Ultimate Strain	-16.7	0.3	59.6	0.5	-22.0	61.6

AUC = 曲線下面積

AMG 162 50 mg/kg を月 1 回投与した雌雄サルにおける、溶媒コントロール群と比較した骨強度（圧縮試験）、DXA 及び pQCT パラメータの変化率（%）。第 3 及び第 4 腰椎で得られた値を平均して腰椎の値とした。結果は、各群 1~3 例の平均値で表す。

群の分散が統計学的に同様であった場合（F 検定、 $p > 0.05$ ）はパラメトリック両側 t 検定を実施し、同様でない場合は Satterthwaite の近似による両側 t 検定を実施した。*太字は溶媒コントロール群に対し $p \leq 0.05$ 。

出典: 試験報告書 102090

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

表 2-4 大腿骨幹部の生体力学的強度データ

	Males			Females		
	Month 6	Month 12	End of Recovery	Month 6	Month 12	End of Recovery
Cortical Area	10.4	26.4*	5.2	9.1	2.3	8.9
Cortical BMC	8.6	29.8*	2.5	8.4	3.5	11.0
Cortical BMD	-2.1	2.7	-2.7	-0.8	1.3	1.9
CSMI	14.4	30.9	-5.3	19.4	-0.4	-4.1
Periosteal circumference	0.0	3.1	-2.7	3.3	1.6	-4.4
Endsteal circumference	-5.7	-7.9	-9.3	1.8	2	-12.2
Cortical thickness	12.3	28.6*	10.8	6.5	0.7	17.9
Peak Load	21.7	39.5*	4.4	10.5	7.4	20.9
Ultimate Stress	7.9	9.3	7.8	-2.7	7.5	24.3
Stiffness	25.8	37.6*	-11.5	25.6	0.0	7.3
Modulus	10.7	4.8	-6.1	7.7	-1.7	12.6
AUC	22.0	18.4	-19.6	18.9	12.9	45.7
Toughness	10.9	-2.1	-18.5	9.7	11.3	48.7
Maximum Displacement	5.2	-14.5	-15.0	7.9	5.3	25.0
Ultimate Strain	5.1	-12.5	-17.1	10.5	8.1	19.3

AUC = 曲線下面積、CSMI = 断面二次モーメント (cross sectional moment of inertia)

AMG 162 50 mg/kg を月 1 回投与した雌雄サルにおける、溶媒コントロール群と比較した骨強度 (三点曲げ試験) 及び pQCT パラメータの変化率 (%)。結果は、各群 1~3 例の平均値で表す。群の分散が統計学的に同様であった場合 (F 検定、 $p > 0.05$) はパラメトリック両側 t 検定を実施し、同様でない場合は Satterthwaite の近似による両側 t 検定を実施した。*太字は、溶媒コントロール群に対し $p \leq 0.05$ 。

出典: 試験報告書 102090

2.2.5 成熟卵巣摘出カニクイザルにおけるデノスマブの薬理試験 (試験報告書 103981)

卵巣を摘出した非ヒト霊長類は、皮質骨リモデリング及びエストロゲン除去に対する反応がヒトと類似していることから、閉経後骨粗鬆症の最も妥当な非臨床モデルであると考えられる。そこで、デノスマブの長期投与による海綿骨及び皮質骨量、骨密度、骨形状、及び骨代謝回転に対する作用を成熟 (9~16 歳) OVX カニクイザルを用いて検討した。

動物には OVX 又は偽手術 (sham) を施し、その 1 ヶ月後から投与を開始した。OVX 動物 60 例には、溶媒又はデノスマブの 25 あるいは 50 mg/kg を月 1 回、16 ヶ月間皮下投与した。Sham 動物 20 例には溶媒を投与した。薬物動態解析と一致させるため、1 ヶ月は 28 日と設定した。血清を採取して骨代謝マーカーを測定し、ベースライン、並びに投与 3、6、12、及び

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

16 ヶ月後に DXA 及び pQCT を行った。骨形態計測は、投与 6 及び 12 ヶ月後の腸骨及び肋骨生検組織、並びに投与 16 ヶ月後に摘出した脛骨骨幹部、L2 腰椎、及び大腿骨近位部について実施した。骨強度試験は、大腿骨骨幹部、大腿骨頸部、上腕骨コルチカルビーム (cortical beams)、及び腰椎について実施した。

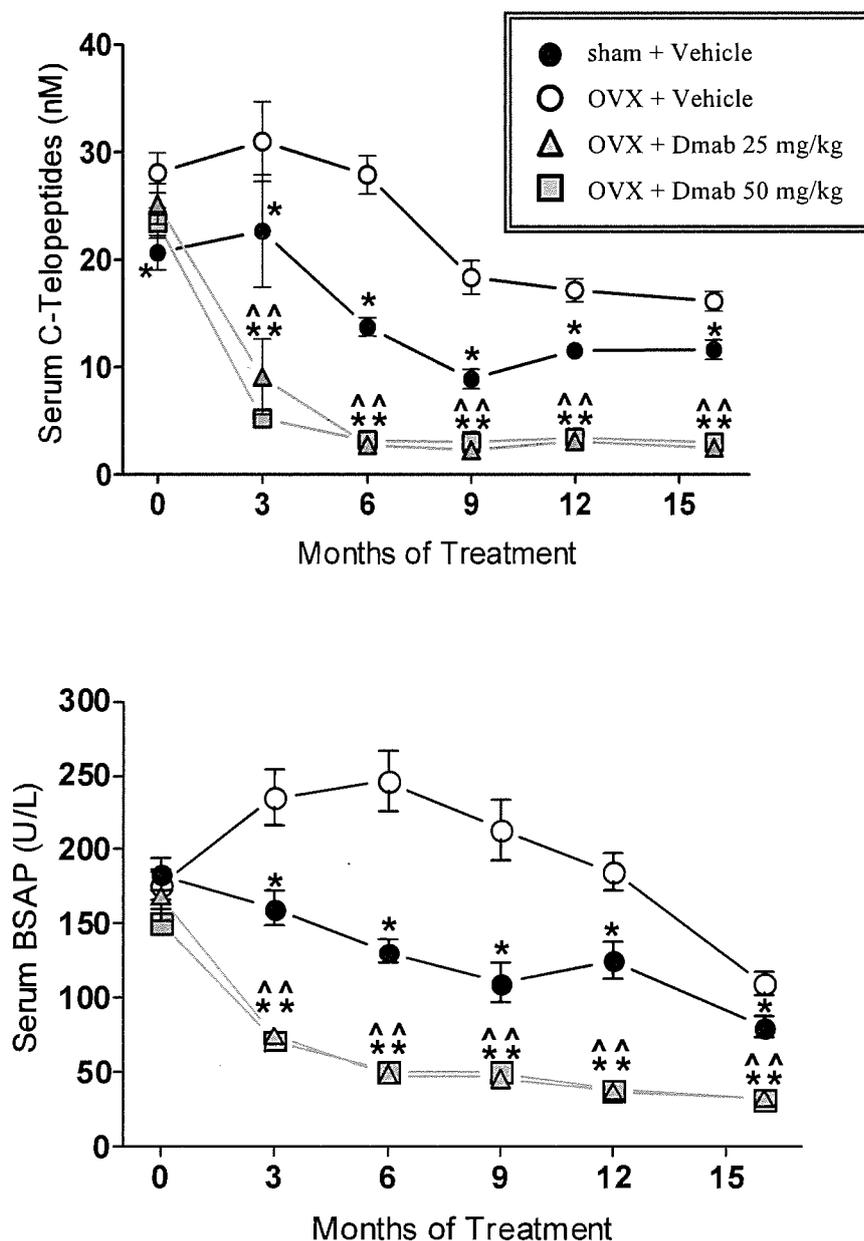
抗デノスマブ中和抗体は、投与 3 及び 6 ヶ月の間でも投与動物の 20% で認められ、その結果、観察されたすべての薬力学作用が消失したため、これらの動物を最終解析から除外した。

骨代謝マーカー

OVX+デノスマブ群では、OVX+溶媒コントロール群と比較し、骨吸収マーカーである血清中 CTX 及び uNTX/Cr は有意に最大 80%~90% 減少し、また骨形成マーカーである骨型アルカリホスファターゼ (BSAP) は最大 70%~80% 減少した (図 2-4)。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ



BSAP = 骨型アルカリホスファターゼ、Dmab = デノスマブ、U = 単位
 データは平均 ± 標準誤差を用いて示す (14~20 例/群)。
 ANOVA を実施し、 $p < 0.05$ の場合、4 対比較検定 (Bonferroni の補正付き) を実施して、各 OVX+デノスマブ群と sham+溶媒コントロール群、及び OVX+溶媒コントロール群を比較した。さらに t 検定を実施し、OVX+溶媒コントロール群と sham+溶媒コントロール群を比較した。Levene 検定を用いて群間の等分散性を評価した。 $p \leq 0.05$ の場合、等分散にするためにランク変換を用いた。その結果、依然として分散が等しくない場合は、不等分散のための ANOVA モデルを使用した。* OVX+溶媒コントロール群に対し $p \leq 0.05$ 、^ sham+溶媒コントロール群に対し $p \leq 0.05$ 。

出典: 試験報告書 103981

図 2-4 デノスマブを投与した卵巣摘出カニクイザルにおける骨吸収及び骨形成マーカーの推移

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

In vivo 骨密度測定

DXA では、16 ヶ月間の OVX+デノスマブ投与群の腰椎、大腿骨近位部、大腿骨頸部並びに脛骨骨幹部の BMD が sham+溶媒コントロール群及び OVX+溶媒コントロール群と比較して有意に高値を示した (表 2-5)。また OVX+デノスマブ投与群の橈骨遠位部の BMD は、OVX+溶媒コントロール群と比較して有意に増加した。pQCT では、OVX+デノスマブ投与群の橈骨遠位部及び脛骨近位部骨幹部における全 vBMD が、OVX+溶媒コントロール群及び sham+溶媒コントロール両群と比較して有意に増加した (表 2-5)。OVX+溶媒コントロール群ではこれらの部位の海綿骨 vBMD が有意に減少したが、デノスマブはこの海綿骨量の減少を完全に抑制した。橈骨及び脛骨骨幹部の皮質骨面積及び vBMD も、OVX+デノスマブ投与群では OVX+溶媒コントロール群と比較して有意に高値を示した (表 2-5)。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。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

表 2-5 デノスマブを 16 カ月間投与した卵巣摘出カニクイザルにおける骨密度パラメータの変化率 (%)

DXA aBMD Site	sham +	OVX +	OVX + Dmab	OVX + Dmab
	Vehicle	Vehicle	25 mg/kg	50 mg/kg
Lumbar Spine	0.84* (1.49)	-4.95 (1.16)	10.58*^ (1.64)	12.01*^ (1.25)
Total Hip	-0.60* (1.61)	-7.40 (1.41)	10.33*^ (1.00)	7.35*^ (1.52)
Femur Neck	-1.98 (2.78)	-5.60 (1.95)	11.29*^ (2.68)	8.64*^ (2.75)
Central Tibia	-4.98* (0.98)	-10.86 (1.40)	0.59*^ (0.92)	1.39*^ (0.75)
1/3 Distal Radius	-0.25 (1.45)	-4.33 (1.64)	2.75* (0.87)	3.12* (0.77)
Ultra-Distal Radius	-0.97* (1.17)	-5.36 (1.38)	2.56* (0.74)	2.83* (0.64)

pQCT Variable	sham +	OVX +	OVX + Dmab	OVX + Dmab
	Vehicle	Vehicle	25 mg/kg	50 mg/kg
Radial Meta. Total vBMD	-4.99* (1.67)	-7.95 (1.58)	2.04*^ (0.97)	2.00*^ (0.91)
Tibial Meta. Total vBMD	-4.97* (1.73)	-11.28 (1.24)	3.14*^ (1.23)	0.73*^ (1.06)
Radial Dia. Cortical Area	-2.07 (0.81)	-2.58 (1.05)	0.58 (0.67)	0.59*^ (0.33)
Tibial Dia. Cortical Area	-2.85* (1.17)	-7.81 (1.18)	1.37*^ (0.71)	0.71* (0.70)
Radial Dia. Cortical vBMD	-0.09 (0.31)	-3.11 (0.66)	0.92*^ (0.17)	0.68* (0.23)
Tibial Dia. Cortical vBMD	-0.76* (0.50)	-3.86 (0.65)	1.66*^ (0.32)	1.66*^ (0.34)

aBMD = 面積骨密度、Dmab = デノスマブ、Dia = 骨幹部、Meta = 骨幹端、vBMD = 体積骨密度
データはベースラインからの変化率とし、平均 ± (標準誤差) として示す (14~20 例/群)。

ANOVA を実施し、 $p < 0.05$ の場合、4 対比較検定 (Bonferroni の補正付き) を実施して、各 OVX+デノスマブ群と sham+溶媒コントロール群及び OVX+溶媒コントロール群を比較した。さらに t 検定を実施し、OVX+溶媒コントロール群と sham+溶媒コントロール群を比較した。Levene 検定を用いて群間の等分散性を評価した。 $p \leq 0.05$ の場合、等分散にするためにランク変換を用いた。その結果、依然として分散が等しくない場合は、不等分散のための ANOVA モデルを使用した。* OVX+溶媒コントロール群に対し $p \leq 0.05$ 、^ sham+溶媒コントロール群に対し $p \leq 0.05$ 。

出典: 試験報告書 103981

骨強度

OVX+デノスマブ投与群ではいずれの用量においても、OVX+溶媒コントロール群と比較

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

して大腿骨頸部 (19%~34%)、L3-L4 腰椎 (54%~55%)、及びL5-L6 腰椎中心部 (69%~82%) の平均最大荷重が有意に高値を示した (表 2-6)。また、大腿骨頸部 (21%~26%)、L3-L4 腰椎 (39%~46%)、L5-L6 腰椎中心部 (60%~61%)、大腿骨幹部 (15%~16%) の平均剛性が有意に高値を示した。皮質骨のイントリンジック (intrinsic) な材質特性は、骨形状データ及びエクストリンジック (extrinsic) な骨全体としての強度パラメータに由来した。大腿骨骨幹部及び上腕骨のコルチカルビームのイントリンジックな強度パラメータは、OVX+溶媒コントロール群及びOVX+デノスマブ投与群で類似しており、大腿骨骨幹部における体積BMC (vBMC) と最大荷重の間の相関性は高く、またすべての群間で同様であった (全体で $r^2 = 0.85$)。BMC/骨強度比が正常に維持されたことから、デノスマブによって骨の基本的な材質特性が変化しなかったことが示された。デノスマブによる骨強度の増加は材質特性の変化よりも、骨量の増加によりもたらされた可能性が高かった。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

表 2-6 デノスマブを 16 ヶ月間投与した卵巣摘出カニクイザルにおける骨強度パラメータ

Peak Load (N)	sham + Vehicle	OVX + Vehicle	OVX + Dmab 25 mg/kg	OVX + Dmab 50 mg/kg
L3-L4Vert. Bodies	2704 (197)	2283 (135)	3516* [^] (182)	3549* [^] (206)
L5-L6Vert. Cores	189 (15)	151 (15)	275* [^] (17)	255* [^] (18)
Femur Neck	1640 (74)	1480 (46)	1759* (72)	1976* [^] (78)
Femur Diaphysis	1431 (53)	1299 (47)	1484 (64)	1479 (53)

Stiffness (N/mm)	sham + Vehicle	OVX + Vehicle	OVX + Dmab 25 mg/kg	OVX + Dmab 50 mg/kg
L3-L4Vert. Bodies	14040* (907)	11897 (716)	17417* [^] (902)	16590* (500)
L5-L6Vert. Cores	1511 (110)	1381 (126)	2225* [^] (145)	2215* [^] (135)
Femur Neck	1433 (71)	1276 (66)	1550 (73)	1611* (88)
Femur Diaphysis	1196 (43)	1085 (42)	1258* (52)	1252* (47)

Dmab = デノスマブ、N = ニュートン、Vert. Bodies = 椎骨、Vert. Cores = 腰椎中心部
データは平均 ± (標準偏差) として示す (14~20 例/群)。

ANOVA を実施し、 $p < 0.05$ の場合、4 対比較検定 (Bonferroni の補正付き) を実施して、各 OVX+デノスマブ群と sham+溶媒コントロール群及び OVX+溶媒コントロール群を比較した。さらに t 検定を実施し、OVX+溶媒コントロール群と sham+溶媒コントロール群を比較した。Levene 検定を用いて群間の等分散性を評価した。 $p \leq 0.05$ の場合、等分散にするためにランク変換を用いた。その結果、依然として分散が等しくない場合は、不等分散のための ANOVA モデルを使用した。* OVX+溶媒コントロール群に対し $p \leq 0.05$ 、[^] sham+溶媒コントロール群に対し $p \leq 0.05$ 。

出典: 試験報告書 103981

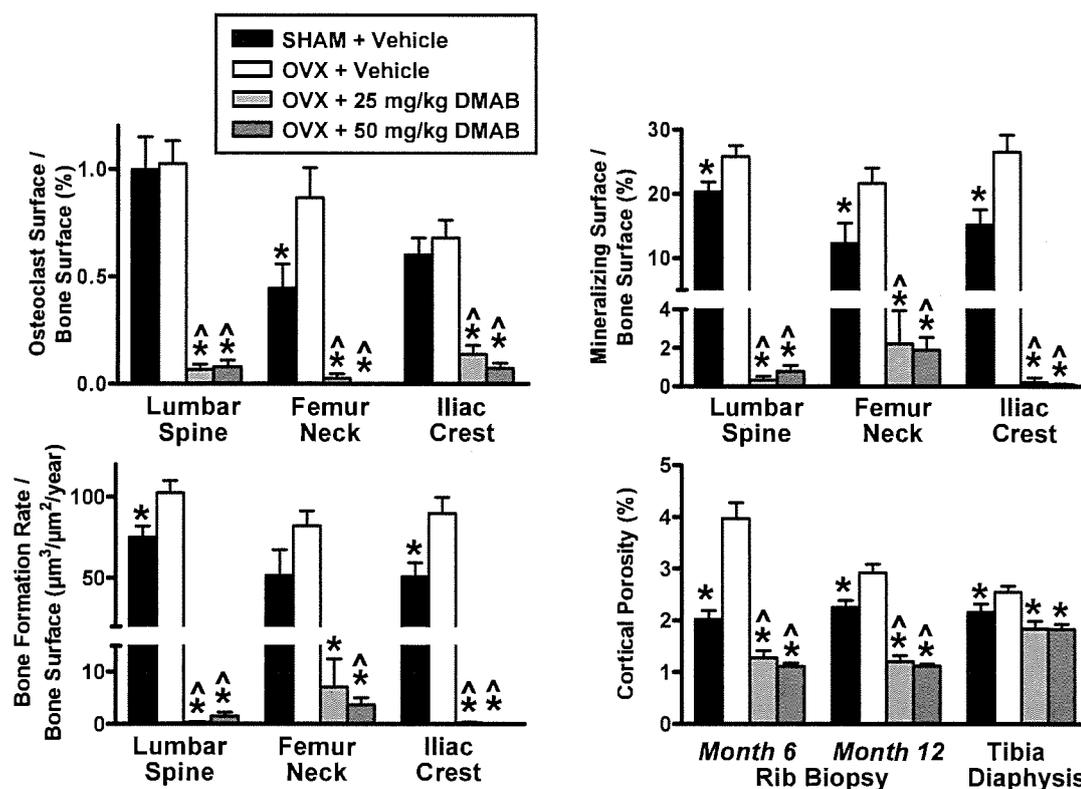
骨形態計測

OVX+溶媒コントロール群の腰椎、腸骨稜、及び大腿骨頸部の海綿骨における骨石灰化面、骨形成速度、及び活性化頻度は、sham+溶媒コントロール群と比較して有意に増加し、骨代謝回転が亢進したことが示された。デノスマブはいずれの用量でも OVX によって引き起こされるこれらの変化を完全に抑制し、sham+溶媒コントロール群と比較しても有意に低下させた (図 2-5)。OVX+デノスマブ投与群の腰椎、腸骨稜、及び大腿骨頸部において、破骨細胞面及び骨芽細胞面は 78%~100%減少し、骨吸収面は 45%~93%減少した。OVX+溶媒コントロール群では sham+溶媒コントロール群と比較して、脛骨骨幹部及び肋骨の皮質骨内膜面

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

及びハバース管面における骨形成速度、骨石灰化面が有意に高値を示し、また皮質骨多孔化が有意に亢進する（図 2-5）など、皮質骨においても骨代謝回転が亢進した。デノスマブはいずれの用量でも OVX によって引き起こされるこれらの変化を完全に抑制し、骨石灰化面及び骨形成速度を sham+溶媒コントロール群と比較して有意に低下させた。



DMAB = デノスマブ。データは平均 + 標準誤差を示す (14~20 例/群)。
 海綿骨領域は第 2 腰椎、大腿骨頸部、及び 6 ヶ月時点で実施した腸骨稜生検組織において、皮質骨領域は脛骨骨幹部及び 6 及び 12 ヶ月時点で採取した肋骨生検について解析した。ANOVA は各パラメータ及び部位について別々に実施し、 $p \leq 0.05$ の場合、4 対比較検定 (Bonferroni の補正付き) を実施して、各 OVX + デノスマブ群と sham + 溶媒コントロール群及び OVX + 溶媒コントロール群を比較した。さらに t 検定を実施し、OVX + 溶媒コントロール群と sham + 溶媒コントロール群を比較した。Levene 検定を用いて群間の等分散性を評価した。 $p \leq 0.05$ の場合、等分散にするためにランク変換を用いた。その結果、依然として分散が等しくない場合は、不等分散のための ANOVA モデルを使用した。* OVX + 溶媒コントロール群に対し $p \leq 0.05$ 、^ sham + 溶媒コントロール群に対し $p \leq 0.05$ 。
 出典: 試験報告書 103981

図 2-5 デノスマブを投与した卵巣摘出カニクイザルにおける骨吸収及び骨形成の骨形態計測パラメータ

以上を要約すると、OVX カニクイザルに月 1 回、16 ヶ月にわたりデノスマブ 25 又は 50 mg/kg を投与した結果、in vivo における骨密度測定で示されたように、皮質骨及び海綿骨

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

量に改善効果が認められた。これらの変化によって、臨床的に重要な腰椎、大腿骨頸部、並びに大腿骨骨幹部の骨強度の有意な増強がもたらされた。また、骨代謝マーカー測定及び海綿骨及び皮質骨において実施した骨形態計測の結果から、デノスマブによる骨量及び骨強度の増強は、OVXにより亢進した骨代謝回転がデノスマブによって著しく抑制されることによりもたらされたことが明らかになった。

2.2.6 アレンドロネートを前投与した成熟卵巣摘出カニクイザルにおけるデノスマブの薬理試験（試験報告書 106564）

ビスフォスフォネートからデノスマブへ切り替えた場合の薬理作用を、成熟 OVX カニクイザル (>9 歳) を用いて検討した。OVX 後、溶媒 (Veh; 20 例)、アレンドロネート (ALN; 21 例; 50 µg/kg、週 2 回静脈内投与)、又はデノスマブ (Dmab; 11 例、25 mg/kg、月 1 回皮下投与) を 6 ヶ月間投与し、溶媒及びアレンドロネートを投与した動物の半数については 6 ヶ月の時点で投与をデノスマブに切り替えた (Veh → Dmab; 10 例、ALN → Dmab; 11 例)。各群の残りの動物には、6 ヶ月以降も溶媒 (Veh → Veh) 又はアレンドロネート (ALN → ALN) の投与を継続した。試験期間を通じて血清カルシウム、骨代謝マーカー、及び BMD をモニターした。骨形態計測は、6 及び 12 ヶ月時点の腸骨及び肋骨生検組織、並びに 12 ヶ月間の投与終了時に摘出した脛骨骨幹部、L2 腰椎、及び脛骨近位部について実施した。骨強度試験は、大腿骨骨幹部、大腿骨頸部、及び腰椎において実施した。薬物動態解析と一致させるため、1 ヶ月は 28 日と設定した。設定したアレンドロネートの用量 (50 µg/kg、週 2 回静脈内投与) は、ヒヒにおいて有効であることが既に示されている (Balena et al, 1993)。この投与方法では、アレンドロネートの 1 週間の既承認臨床用量 (患者の体重を 60 kg とし、Fosamax の添付文書より 70 mg/週、経口投与のバイオアベイラビリティ 0.64% として算出) より 3.3 倍高い曝露が予測された。抗デノスマブ中和抗体が、デノスマブを投与した 32 例中 7 例で認められ、その結果、観察されたすべての薬力学作用が消失したため、これらの動物 (各群 2 又は 3 例) を最終解析から除外した。

血清カルシウム

Dmab → Dmab 群において、平均血清カルシウムはデノスマブの初回投与 1 日後に 9.2 mg/dL と最低値 (投与前値であるベースラインより 6.7% 低値) を示し、投与 2 週間後には Veh 群と比較して最大の低下率 (-8.6%) を示した (図 2-6)。Veh → Dmab 群においてはデノスマブの初回投与 7 日後に、平均血清カルシウムが 8.8 mg/dL と最低値 (ベースラインより 10.4% 低値) を示し、この値は Veh → Veh 群と比較した場合 -15.2% と最大の低下率であった (図 2-6)。この結果は、カニクイザルにデノスマブを投与した以前の試験 (試験報告書 103948) で認められた変化と同程度であった。デノスマブの初回投与後の血清カルシウム低下反応は Dmab → Dmab 群のデノスマブ初回投与時 (-8.6%) に比べて Veh → Dmab 群におけるデノスマブ初回投与時 (-15.2%) の方が明らかに大きかった。これは Veh → Dmab 群におけるデノスマブの初回投与時の骨代謝回転が、Dmab → Dmab 群よりも亢進していた

2.6.2 薬理試験の概要文

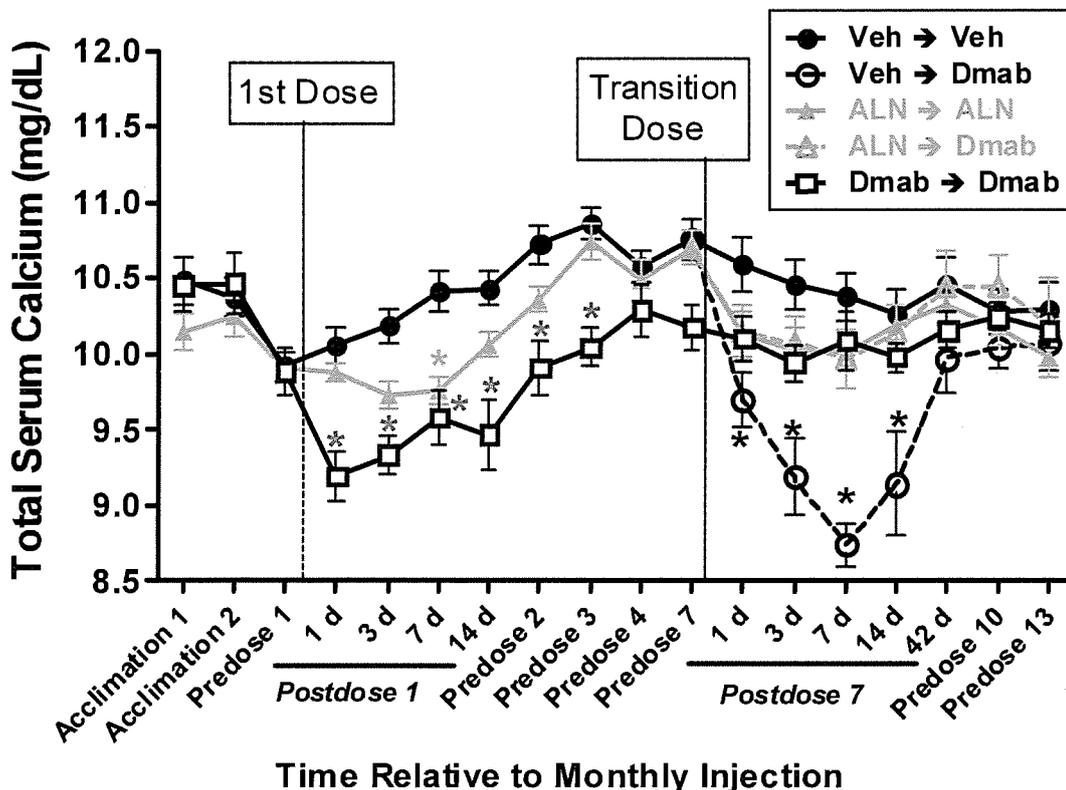
デノスマブ

ことに起因していると思われる (図 2-6)。

ALN → ALN 群において、血清カルシウムはアレンドロネートの初回投与 7 日後に Veh 群に対して最大の低下率を示した (Veh 群より 5.1% 低値)。ALN → Dmab 群においては、6 ヶ月間のアレンドロネート投与後にデノスマブを初めて投与した際、投与 1~3 日後に血清カルシウムが Veh → Veh 群と比較して 4.5%低下した。これは、ALN →ALN 群において 6 ヶ月後に引き続きアレンドロネートを投与した際に認められたのと同程度の変化であった。これらの結果から、溶媒を前投与した動物と比較して、アレンドロネートを 6 ヶ月間前投与した動物では、デノスマブの初回投与による一過性の血清カルシウム低下作用が幾分弱かったことが示された。いずれの動物においても、試験期間を通じて、低カルシウム血症を示唆する臨床症状は認められなかった。10 ヶ月時点及び試験終了時の血清カルシウムは、Veh → Dmab 群と Veh → Veh 群との間に差はみられなかった。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ



ALN = アレンドロネート、Dmab = デノスマブ、Veh = 溶媒
 溶媒又はアレンドロネートを投与している動物に、6ヵ月を経過した時点で投与をデノスマブに切り替えた。デノスマブは月1回投与した。横軸は採血し、血清カルシウムを測定したポイントを示す。Predose XはデノスマブのX回目の投与前の測定を示す。Postdose YはデノスマブのY回目の投与後の測定を示す。ただし、Predose 1をベースラインとした。Postdose 1及び7では詳細な検討を実施した(dは日を示す)。切り替え投与前に、各投与群(溶媒、アレンドロネート、及びデノスマブ)間のベースライン補正血清カルシウムの群間差について、ANOVA及び対比を用いた対比較検定を実施した。投与切り替えから試験終了時までについて、全5投与群の切り替え前補正血清カルシウムにおける群間差を評価し、Tukey対比較検定を実施した。アレンドロネート継続投与群(ALN → ALN)及びアレンドロネートからデノスマブ切り替え群(ALN → Dmab)間で有意差が認められなかった。Veh → Dmab及び、ALN → Dmab又はDmab → Dmab群間では有意差が認められたが、図には表示していない。Levene検定を用いて群間の等分散性を評価した。p ≤ 0.05の場合、等分散にするためにランク変換を用いた。その結果、依然として分散が等しくない場合は、不等分散のためのANOVAモデルを使用した。データは平均 ± 標準誤差を示す(7~10例/群)。* Veh → Veh群に対し p ≤ 0.05

出典: 試験報告書 106564

図 2-6 卵巣摘出カニクイザルの血清カルシウムに対するアレンドロネートからデノスマブへの切り替えの影響

骨代謝マーカー

骨吸収マーカーである血清中 CTX 及び骨形成マーカーである血清中オステオカルシンは、

2.6.2 薬理試験の概要文

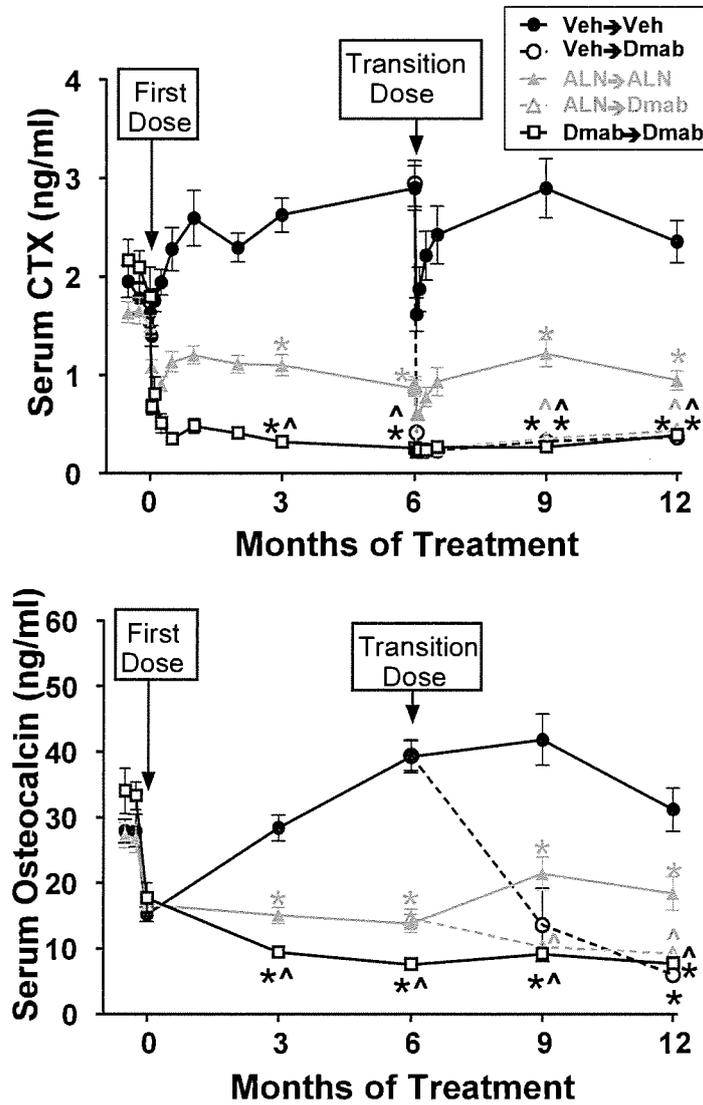
デノスマブ

溶媒投与動物において OVX 後にベースラインより上昇した。これらのマーカーは、アレンドロネート及びデノスマブの投与により 12 ヶ月の投与期間中、有意に低下した (図 2-7)。ほとんどの時点において Dmab → Dmab 群の血清中 CTX 及びオステオカルシンは ALN → ALN 群と比較して有意に低値を示した。溶媒コントロール群の平均血清 CTX 及びオステオカルシンは、OVX 6 ヶ月後にはベースラインと比較してそれぞれ 54%及び 131%増加した。

アレンドロネートを投与した動物に、6 ヶ月を経過した時点で投与をデノスマブに切り替えると (ALN → Dmab 群)、骨吸収及び骨形成のすべての骨代謝マーカーは、アレンドロネートの継続投与群 (ALN → ALN 群) と比較して有意に低下した。前半 6 ヶ月間に何を投与していたかにかかわらず、後半 6 ヶ月間にデノスマブを投与するとすべての骨代謝マーカーは同様に、また著しく抑制された (図 2-7)。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ



ALN = アレンドロネート、Dmab = デノスマブ、Veh = 溶媒

血清 CTX (骨吸収マーカー、上段) 及び血清オステオカルシン (骨形成マーカー、下段)。溶媒及びアレンドロネートからデノスマブへの切り替えは、Veh → Dmab 群及び ALN → Dmab 群のそれぞれ 6 ヶ月時点で実施した。データは平均 ± 標準誤差を示す (7~10 例/群)。

CTX については、統計解析は 3、6、9、及び 12 ヶ月時点のみについて示す。

One way ANOVA を全群間で実施し、溶媒、アレンドロネート、及びデノスマブの 12 ヶ月投与群におけるベースラインからの変化について Tukey 検定を行った。6 ヶ月後切り替え群では Tukey 検定 (Veh → Veh 群対 Veh → Dmab 群及び ALN → ALN 群対 ALN → Dmab 群) を実施し、切り替え前時点からのバイオマーカーの変化を検討した。Levene 検定を用いて群間の等分散性を評価した。p ≤ 0.05 の場合、等分散にするためにランク変換を用いた。その結果、依然として分散が等しくない場合は、不等分散のための ANOVA モデルを使用した。* Veh → Veh 群に対し p ≤ 0.05、^ ALN → ALN 群に対し p ≤ 0.05。

出典: 試験報告書 106564

図 2-7 卵巣摘出カニクイザルの骨代謝マーカーに対するアレンドロネートからデノスマブへの切り替えの影響

2.6.2 薬理試験の概要文

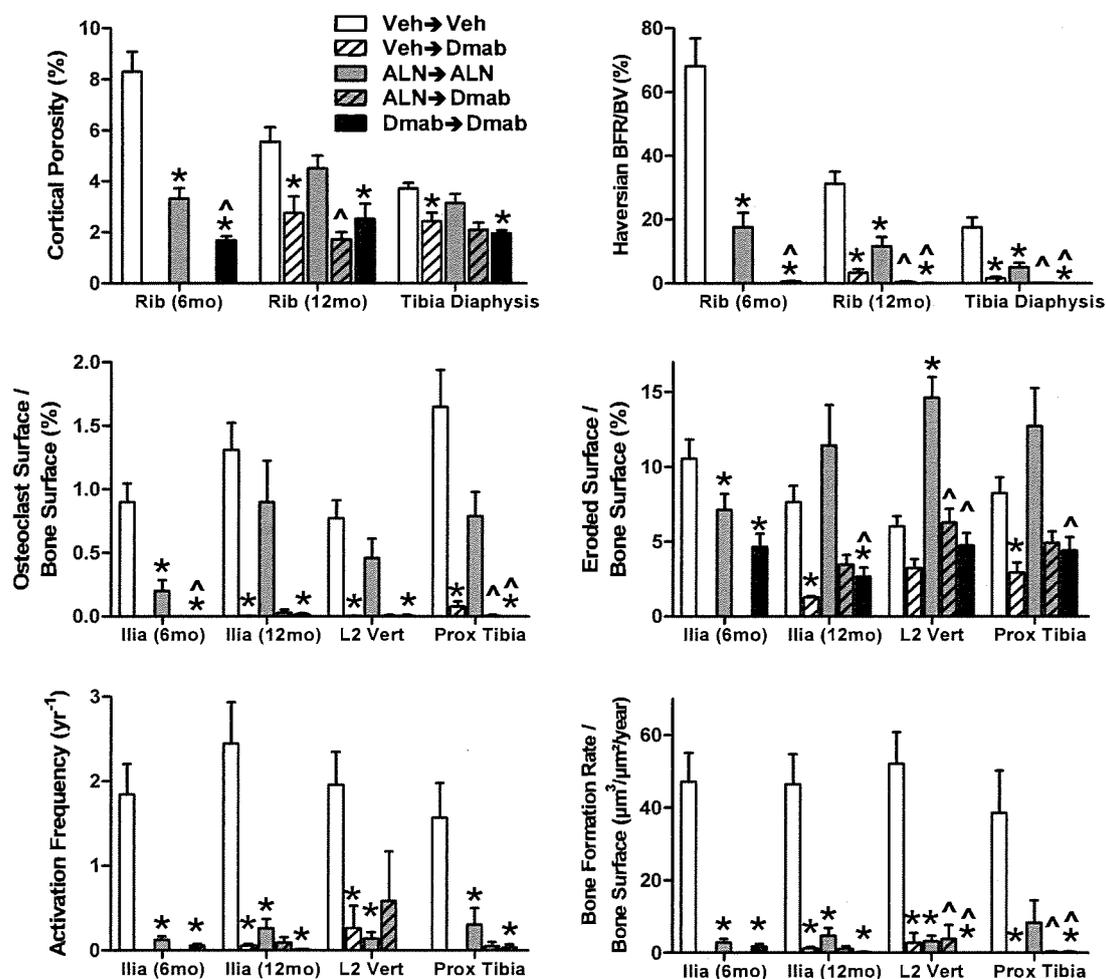
デノスマブ

骨形態計測

皮質骨及び海綿骨における組織レベルの骨吸収及び骨形成パラメータは、アレンドロネート及びデノスマブ投与によって、有意に低下した。12 ヶ月間のアレンドロネート又はデノスマブ投与によって肋骨及び脛骨骨幹部における骨内膜面及び皮質骨内の骨形成速度は、溶媒コントロール群と比較して、有意に低下した（図 2-8）。アレンドロネート又はデノスマブ投与によって皮質骨内の骨代謝回転が低下したことに関連して、6 ヶ月時点で実施した肋骨生検では皮質骨多孔化が有意に抑制された。12 ヶ月時点でのデノスマブ投与動物の肋骨及び脛骨骨幹部においても、皮質骨多孔性の有意な低下が明らかであった（図 2-8）。海綿骨に関しては、検査したすべての部位（腸骨稜、L2 腰椎、及び脛骨近位部）において、アレンドロネート及びデノスマブ投与群の骨石灰化面、骨石灰化速度、骨形成速度、及び活性化頻度は溶媒コントロール群と比較して有意な低下を示した。破骨細胞面は、6 ヶ月時点の腸骨稜生検において、アレンドロネート及びデノスマブの投与によって有意に減少した。デノスマブ投与群では、12 ヶ月時点におけるすべての海綿骨部位の破骨細胞面がさらに有意に減少した（図 2-8）。骨吸収面は、6 ヶ月時点の生検においてアレンドロネート及びデノスマブ投与群で有意に低値を示したが、アレンドロネートの 12 ヶ月間継続投与群では高値を示した（L2 腰椎で溶媒コントロール群に対して $p \leq 0.05$ ）。ALN → ALN 群に比べ、ALN → Dmab 群では 12 ヶ月時点の破骨細胞面及び骨吸収面が有意に低値であったことから、アレンドロネートからデノスマブへの切り替えによって、これらの骨吸収パラメータがアレンドロネートを継続して投与する場合に比べてさらに低下したことが示された（図 2-8）。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ



ALN = アレンドロネート、BFR/BV = 骨形成速度/骨量、Dmab = デノスマブ、L2 Vert = 第2腰椎、Prox Tibia = 脛骨近位骨幹部、Veh = 溶媒、6 mo = 6 ヶ月時点、12 mo = 12 ヶ月時点

Veh → Dmab 群及び ALN → Dmab 群において、それぞれ溶媒あるいはアレンドロネートからデノスマブへの切り替えは6 ヶ月時点で実施した。皮質骨領域は6 及び12 ヶ月時点の肋骨生検組織及び脛骨骨幹部において解析した。海綿骨領域は第2腰椎、脛骨近位骨幹部、並びに6 及び12 ヶ月時点の腸骨稜生検組織において解析した。データは平均 + 標準誤差を示す (7~10 例/群)。

Bonferroni 補正済み one way ANOVA を実施し、データは6 ヶ月時点で切り替え前生検データとしてプールした。Veh 群対 ALN → Dmab 群の検定は規定の統計解析には含まれなかった。

6 ヶ月生検データについては、3 投与群 (溶媒、アレンドロネート、及びデノスマブ) 間の群間差を、ANOVA と対比による対比較検定を用いて評価した。最終データについては、全5 投与群について ANOVA によって群間差を評価し、Tukey 対比較検定を実施した。これには Veh → Veh 群と ALN → Dmab 群との比較は含まれなかった。Levene 検定を用いて群間の等分散を評価した。p ≤ 0.05 の場合、ランク変換を用いて等分散にした。分散が不等分散であった場合、不等分散を明らかにする ANOVA モデルを使用した。* OVX + 溶媒コントロール群に対し p ≤ 0.05、^ ALN に対し p ≤ 0.05。

出典: 試験報告書 106564

図 2-8 卵巣摘出カニクイザルの骨形態計測パラメータに対するアレンドロネートからデノスマブへの切り替えの影響

2.6.2 薬理試験の概要文

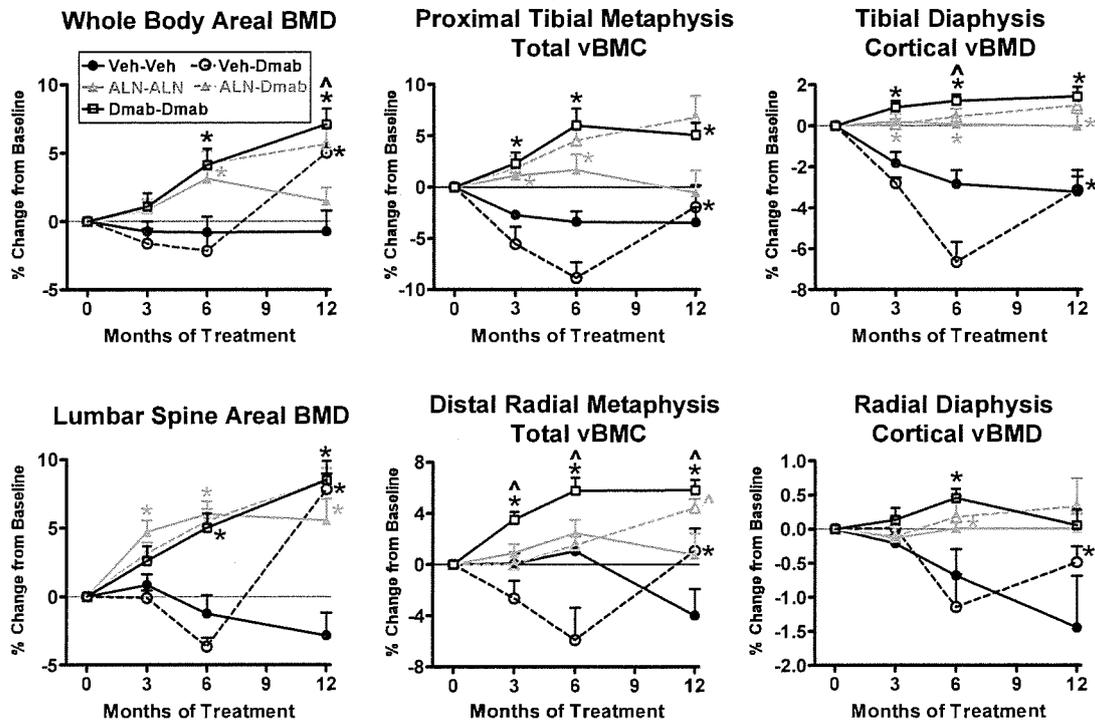
デノスマブ

In vivo 骨密度測定

溶媒コントロール群と比較して、アレンドロネート及びデノスマブの6ヵ月間投与により全身、腰椎、及び橈骨遠位部のBMDが有意に増加した。しかし、6~12ヵ月間の投与では、デノスマブ投与群のみこれらの部位のBMDが持続的に増加し、一方でアレンドロネート投与群ではBMDが不変ないしは減少した。これらの変化によりデノスマブ12ヵ月間投与後の全身BMDは、アレンドロネート群と比較し有意に高値を示した。アレンドロネートを6ヵ月間投与した後、投与をデノスマブに切り替えると上記3部位のすべてにおいてBMDがさらに増加した(図2-9)。

脛骨及び橈骨骨幹端のpQCT解析において、溶媒コントロール群と比較してデノスマブ12ヵ月間投与群では全vBMCが有意に増加した。6ヵ月時点でアレンドロネートからデノスマブに切り替えた結果、12ヵ月時点までに脛骨及び橈骨骨幹端において全vBMCのわずかな増加が認められた。一方、アレンドロネートを12ヵ月間継続投与すると、有意ではないが軽度の減少が認められた。デノスマブへの切り替え後の骨幹端における全vBMCの改善は、皮質コンパートメントにおける骨量の増加によるものであった。皮質骨のみで構成される橈骨及び脛骨骨幹部において、デノスマブ及びアレンドロネートはいずれもOVXによるvBMDの減少を抑制した。

デノスマブ



ALN = アレンドロネート、Dmab = デノスマブ、vBMD = 体積骨密度、vBMC = 体積骨塩量、Veh = 溶媒
データは平均+標準誤差を示す (7~10 例/群)。

Veh → Veh、ALN → ALN、及び Dmab → Dmab 群における 3、6、及び 12 ヶ月時点におけるベースラインからの変化率の群間差を、one way ANOVA 及び Tukey 対比較検定により評価した。溶媒及びアレンドロネート投与群では、3 及び 6 ヶ月時点の統計結果は 6 ヶ月以後デノスマブに切り替えた群も合わせて示すが、図中ではデノスマブに切り替えた群と 6 ヶ月以前と同じ投与を継続した群を別々に示す。切り替え群では、12 ヶ月時点で Tukey 検定 (Veh → Veh 群対 Veh → Dmab 群及び ALN → ALN 群対 ALN → Dmab 群) を実施し、切り替え前からの変化を検討した。* OVX+溶媒コントロール群に対し $p \leq 0.05$ 、^ ALN に対し $p \leq 0.05$ 。

出典: 試験報告書 106564

図 2-9 卵巣摘出カニクイザルの in vivo 骨塩量及び骨密度の推移に対するアレンドロネートからデノスマブへの切り替えの影響

骨強度

骨強度は 12 ヶ月時点のみで評価した。Dmab → Dmab 群では Veh → Veh 群と比較して、L3-L4 腰椎の降伏荷重が有意に増加した (+38%; 図 2-10)。また、Dmab → Dmab 群の椎骨では、Veh → Veh 群及び ALN → ALN 群と比較して剛性の有意な上昇が認められた。本試験では、デノスマブ投与により大腿骨頸部又は大腿骨幹部の骨強度パラメータ及び摘出骨の骨量に有意な変化は認められなかった。ALN → ALN 群では、いずれの部位においても骨強度パラメータの有意な変化はみられなかった。ALN → Dmab 群では、ALN → ALN 群に比べて、L3-L4 腰椎、L5-L6 腰椎海綿骨中心、及び大腿骨頸部におけるすべての骨強度パラメ

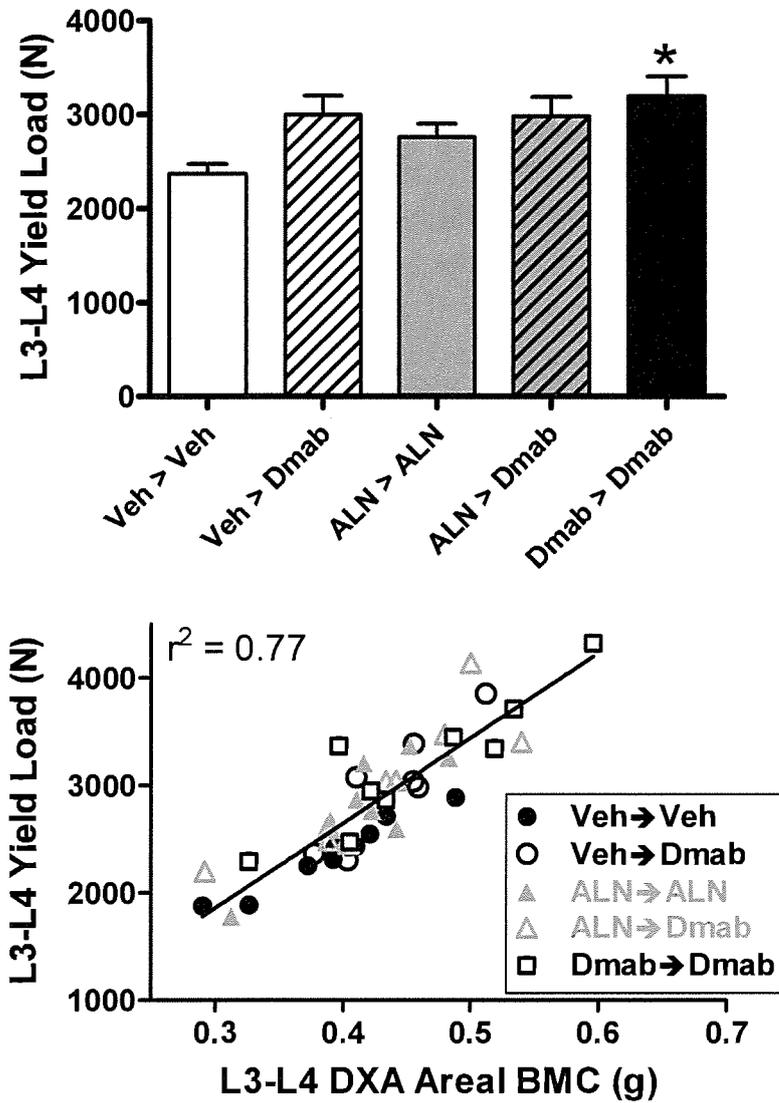
2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

ータが高値を示した（図 2-10）。

pQCT パラメータと併せて十分な精度で材質特性を評価できる皮質骨のみの部位（大腿骨幹部）を含むどの骨格部位においても、投与によって骨のイントリンジックな材質特性が変化した証拠は認められなかった。腰椎のように皮質骨と海綿骨が含まれる部位では、何を投与したかに係わりなく、骨塩量及び骨強度（最大荷重）の間に強い正の相関が認められた（図 2-10）。これらの結果から、アレンドロネートからデノスマブへ投与を切り替えても、アレンドロネートを継続投与した場合と比較して骨強度が減少しなかったことが示された。むしろ、アレンドロネートからデノスマブへの切り替え後に起こる骨量増加に比例して、骨強度が増加することが示唆された。

デノスマブ



ALN = アレンドロネート、Dmab = デノスマブ、L3 = 第3腰椎、L4 = 第4腰椎、Veh = 溶媒
 結果は平均 + 標準誤差を示す (7~10 例/群)。
 全投与群について、群間差をANOVAによって評価し、Veh → Veh対ALN → Dmab以外についてTukey対比較
 検定を実施した。* OVX+溶媒コントロール群に対し $p \leq 0.05$ 。降伏荷重対第3及び第4摘出腰椎面積BMC
 の線形回帰分析によって、各群で同様の強い相関性が認められた。全投与群のデータをプールし、図に全投
 与群の回帰直線を示す ($r^2 = 0.77$)。
 出典: 試験報告書 106564

図 2-10 卵巣摘出カニクイザルの骨強度に対するアレンドロネートからデノスマブへの切り替えの影響

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

以上の結果から、OVX カニクイザルにおいて投与をアレンドロネートからデノスマブに切り替えても良好な安全性／有効性プロファイルが得られたことが示唆される。デノスマブの投与による血清カルシウムの低下は、溶媒を前投与した動物よりもアレンドロネートを前投与した動物の方がより軽度であった。重要なことは、低カルシウム血症に関連した有害事象が認められなかった点である。アレンドロネート及びデノスマブの投与により骨代謝パラメータの低下及び BMD の増加が認められ、アレンドロネートからデノスマブへの投与切り替えにより、アレンドロネート継続投与と比較して骨代謝回転がさらに低下し、また BMD が不変ないしは改善した。12 ヶ月間溶媒を投与した群と比較して 12 ヶ月間アレンドロネートを投与した群では骨強度に有意な変化はみられなかったが、12 ヶ月間デノスマブを投与した群では腰椎の骨強度パラメータは有意に上昇した。

2.3 In vivo 試験—がん誘発性骨疾患マウスモデルにおける RANKL 阻害の薬理

2.3.1 緒言及び背景

RANK/RANKL 系は、破骨細胞の形成、機能、及び生存に必須のメディエーターである (Teitelbaum and Ross, 2003)。RANKL は、破骨細胞前駆細胞上の RANK に結合して破骨細胞への分化を促進し、さらに成熟破骨細胞上の RANK に結合して骨吸収を促進させる。また、RANKL は破骨細胞の生存に不可欠である (Lacey et al, 1998, Lacey et al, 2000)。OPG は RANKL と結合してその作用を阻害し、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)。以下に述べるように、腫瘍と骨微小環境との相互作用によって骨吸収と骨形成との不均衡が生じ、がん誘発性のがん骨転移による骨病変及び多発性骨髄腫による骨病変をきたす。したがって、がん誘発性骨疾患を含む骨吸収増加を伴う病態において、RANKL を阻害することは生物学的に妥当な方法である。

2.3.1.1 悪性腫瘍の骨合併症における破骨細胞の機能的役割

破骨細胞の活性上昇は骨転移の組織学的解析 (Taube et al, 1994, Roudier et al, 2008, Charhon et al, 1983, Urwin et al, 1985) 及び血清骨吸収マーカーの増加 (Demers et al, 2003, Coleman et al, 2005) によって確認が可能である。腫瘍によって骨溶解が生じる骨破壊は骨量又は構造の喪失をきたし、骨転移患者での重篤な骨格の罹病 (すなわち骨関連事象 [SRE]) に至る (Hofbauer et al, 2001, Coleman, 2006)。分子レベルでは、RANK/RANKL 経路の刺激が破骨細胞活性上昇の主要因とされている (Teitelbaum and Ross, 2003)。

破骨細胞による骨吸収は骨転移、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症 (HCM)、及び多発性骨髄腫において観察され、骨折、骨痛、高カルシウム血症、及び骨髄圧迫などの悪性腫瘍による骨合併症と密接に関わっている。造骨性・溶骨性のような X 線像とはかかわりなく、骨転移の特徴は破骨細胞の活性上昇である (Body, 2003, Roodman, 2004, Yonou et al, 2004)。また、HCM における副甲状腺ホルモン関連ペプチド (PTHrP) の役割は十分に証明されており (Grill et al, 1991)、その一部は PTHrP 値の上昇を介した破骨細胞による骨吸収の活性化で

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

ある。多発性骨髄腫の病態生理における骨髄微小環境の役割も詳細に示されており、腫瘍が骨の調節機序を取り込んで利用する能力をもち、結果として溶骨性病変を引き起こす (Mitsiades et al, 2004)。

2.3.1.2 病変の種類を問わず骨転移で起きる活発な骨吸収

骨形成と骨吸収は動的に連動しており、一定の骨量を維持するためには両者が厳密に調節される必要がある。多発性骨髄腫に起因する骨病変はほぼすべて溶骨性であり、過剰な破骨細胞の活性及び骨芽細胞機能の低下によるものとされている (Roodman, 2004)。一方で、従来、固形癌の骨転移はX線像によって識別され、通常、乳癌の病変は溶骨性を呈する。これに対して前立腺癌の骨転移は、通常は造骨性の特徴が強い。しかし最近のデータによると、乳癌骨転移の最大20%には硬化性の要素が含まれ (Taube et al, 1994, Charhon et al, 1983)、主として「造骨性」である前立腺腫瘍でも一部には溶骨性の要素が含まれている (Guisse, 2000, Roudier et al, 2008, Charhon et al, 1983)。したがって、がん誘発性骨疾患は、臨床的には静止性の骨病変として診断されるものの、骨リモデリングは常に溶骨と造骨の動的過程を経ながら変化していると考えられる。骨転移は造骨性又は溶骨性として特徴付けられるが、実際には、通常の骨リモデリング制御が崩れ、それが連続して蓄積された結果として、極端にどちらか (造骨性又は溶骨性) に偏った状態を示している (Coleman, 2001, Charhon et al, 1983, Stewart et al, 1982, Urwin et al, 1985)。

すべての骨転移に破骨細胞の活性化が随伴するという概念は、骨転移患者の溶骨性、造骨性、溶骨性と造骨性の混合型の病変の種類を問わず、骨吸収の生化学的マーカー、特に NTX が増加している知見によって裏付けられている (Demers, 2003)。最近、前立腺癌、乳癌、その他の固形癌 (例: 非小細胞肺癌、腎癌、小細胞肺癌、甲状腺癌)、及び多発性骨髄腫の患者において NTX と臨床的転帰 (SRE、生存期間を含む) との相関が確認された (Brown et al, 2005, Coleman et al, 2005)。したがって、これらの知見から、転移性骨疾患における骨合併症のリスク及び臨床的転帰不良は、破骨細胞の活性化レベルとそれに続く骨溶解をいかに制御できるかに一部依存していることが示唆される。また、骨吸収と臨床的転帰との関係は原発腫瘍の種類を問わず普遍である。

2.3.1.3 骨転移の定着及び進行において活発に機能する破骨細胞

骨合併症や SRE といった骨転移の後期だけでなく、骨転移の最も初期である臨床的に検知不能な微小転移の時期にも、病的に増加した破骨細胞による骨吸収が役割を果たしていることが明らかとなりつつある。骨転移進行の病態生理は腫瘍細胞と骨との相互関係に依存すると考えられており、がん細胞と骨から放出される増殖因子及びサイトカイン類が破骨細胞を活性化し、骨吸収を誘発する (Mundy, 2002, Yoneda et al, 2003)。次いで、破骨細胞を介した骨吸収によって骨から増殖因子が放出され、骨腫瘍細胞のホーミング、生存、増殖、最終的には既存の転移の進行を支援する環境が作られる。また、種々の実験モデル系による検討で、

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

骨代謝の増強によって骨腫瘍の増殖又は骨転移が促進されるとの仮説が提唱されている (Kalikin et al, 2003、Schneider et al, 2005、Zheng et al, 2007b)。局所的な破骨細胞の活性上昇と腫瘍細胞の増殖との互いに支援的な相互作用 (Guise, 2002) によって、既に定着した骨転移の進行が促進されるだけでなく、骨転移の初期段階も促進されて、転移を定着しやすくさせる (Roodman, 2004) と考えられる。該当する現象として、骨に転移しやすい傾向がみとめられている乳癌及び前立腺癌での骨転移の進展が挙げられる (Yonou et al, 2004、Chung et al, 2005)。上記の観察結果に基づき、破骨細胞活性を阻害する物質 (例: RANKL 阻害剤) によって骨吸収を抑制すると、骨腫瘍の定着及び進行が遅延するとの仮説が提唱されている。

骨転移及び多発性骨髄腫のげっ歯類モデルにおいて、RANKL 阻害によって (デコイ受容体 OPG-Fc 又は可溶性受容体 RANK-Fc による) 破骨細胞を抑制すると、がん誘発性の骨溶解が抑制され、定着した骨腫瘍の進行が抑制されるばかりでなく、新規の骨転移形成も有意に遅延する (Roodman and Dougall, 2008 に総説)。これらのデータを以下の第 2.3.1.4 項にまとめた。

2.3.1.4 がん誘発性骨疾患における RANKL の調節

上に概説した破骨細胞の役割を前提とすると、破骨細胞の機能は転移の初期において骨腫瘍の骨髄への定着を促進し、その後のステップにおいて腫瘍の骨合併症及び進行に影響すると予測される。腫瘍細胞は種々のメカニズムによって RANKL と OPG との比の調節異常をきたし、骨腫瘍のストローマ内で破骨細胞形成に好ましい状態を形成していることが腫瘍/骨モデル及び臨床検体の分析によって明らかになっている (Roodman and Dougall, 2008)。例えば、インターロイキン (IL) -1、IL-6、IL-8、IL-11、TNF- α 、PTHrP、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、形質転換増殖因子 β (TGF- β) 及びプロスタグランジン (PG) 類などの腫瘍由来因子 (Virk and Lieberman, 2007) が、骨芽細胞及び骨ストローマで RANKL を増加させることが示されている。一部では、腫瘍由来因子 (すなわち PTHrP、PGE2) が局所の RANKL を増加させるだけでなく、ストローマ内の OPG 産生の減少を引き起こし (Horwood et al, 1998、Brandstrom et al, 1998)、破骨細胞の形成及び機能を促進するシグナルが増強される。

骨転移の臨床検体内における RANKL の上昇を示す証拠として、乳癌、肺癌、前立腺癌、及び甲状腺癌の患者から得られた骨転移部位のストローマ細胞の RANKL 発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法及び免疫組織化学法を用いて調べた報告がある (Huang et al, 2002)。この研究では腫瘍組織の 85%以上が RANKL 陽性であり、腫瘍細胞に加えて腫瘍周囲組織の骨芽細胞及び線維芽細胞のすべてから RANKL シグナルが検出された (Huang et al, 2002)。Good らは、免疫組織化学法を用いて RANKL 発現が骨転移サンプル (例: 肺、腎) で高く、健康な骨組織での水準よりも高いことを示している (Good et al, 2002)。免疫組織化学法を用いたヒト前立腺癌の臨床検体の分析においても、前立腺腫瘍細胞と腫瘍周辺のストローマ細胞の両者

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

にてRANKL 発現が示されている (Brown et al, 2001、Roudier et al, 2006)。多発性骨髄腫患者においては、ストローマ細胞でのRANKL 発現の増加 (Pearse et al, 2001、Roux et al, 2002) とOPG 発現の減少 (Pearse et al, 2001) が、破骨細胞活性化及び骨疾患と関係することが確認されている。

要約すると、RANKL はHCM、及び多発性骨髄腫に関連する骨合併症に加えて、乳癌、前立腺癌、神経芽細胞腫、甲状腺癌、腎癌、黒色腫、及び肺癌を含む広範囲の腫瘍の骨転移に関与している (Roodman, 2004)。がんの自然発生げっ歯類モデルは存在するが、これらのモデルの中で再現性をもって骨転移を発症するものはほとんどない。そのため、移植を用いたげっ歯類の骨転移実験モデルが開発されており、腫瘍細胞を骨に直接注射するモデル (脛骨内移植モデル) と左心室経由で移植 (左心室内投与) するモデルがある。両モデルにおいて、動物の骨内に腫瘍が形成される (Rosol et al, 2003)。多発性骨髄腫及び他の固形癌 (例: 肺癌、結腸癌、腎癌、黒色腫) もげっ歯類にて骨病変を生じることが示されているが、初期の研究では乳癌及び前立腺癌の細胞株のみが使用されてきた。これらのモデルでは溶骨性、造骨性、溶骨性と造骨性の混合型など異なる型の骨病変が発現することから、多様ながん種での骨合併症の治療及び予防に向けた薬剤の評価に役立つ。これらの実験モデルは骨転移を自然発生しないが、転移の様々な段階での腫瘍-骨相互作用の病態生理を解明するには大いに価値のある系である (Rosol et al, 2003)。

OPG はRANKL と結合し、その作用を阻害することから、デノスマブとほぼ同様の作用機序を有する。組換え型 OPG-Fc 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の抑制によって骨吸収の減少が認められた (Simonet et al, 1997、Ominsky et al, 2008)。第2.2.2 項に引用した huRANKL KI マウスでの薬力学比較試験 (試験報告書 R-430) の結果から、デノスマブの薬力学作用を示す上で、OPG が有益なサロゲートであることが示唆される。デノスマブはげっ歯類 RANKL を認識せず、huRANKL KI マウスはがんのモデルとして扱いにくいいため、組換え型 OPG-Fc を用いてげっ歯類で実施した試験は、効力を裏付ける薬力学作用、並びに骨転移及び多発性骨髄腫などのがん誘発性骨疾患での RANKL の作用機序について理解を深めるのに適切であると考えられた。

2.3.2 乳癌骨転移マウスモデルにおける RANKL 阻害 (OPG-Fc による) の薬理

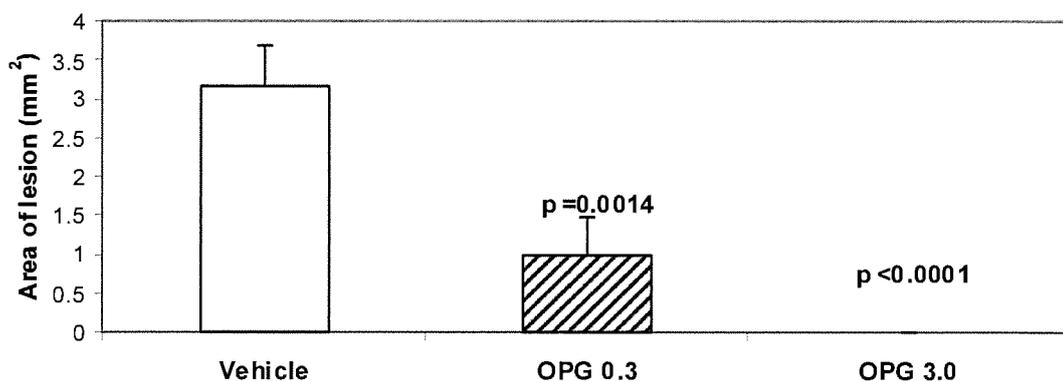
本試験の目的は RANKL 阻害 (組換え型 OPG-Fc を用いて) による乳癌骨転移の進行及び定着への影響を試験することであり、2 種の異なる異種移植の骨転移実験モデルとして、ER 陰性 (ER-) ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 及び ER+ ヒト乳癌細胞株 MCF-7 を用いた。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

2.3.2.1 MDA-MB-231 異種移植マウスモデルにおける溶骨性乳癌骨転移の進行に対する RANKL 阻害 (OPG-Fc による) の薬理 (試験報告書 R2006160 及び R2006161)

MDA-MB-231 をヌードマウスに左心室内投与すると骨格に限局性溶骨性病変を生じることが知られている (Yoneda et al, 1997)。当該試験ではルシフェラーゼ (Luc) を発現する MDA-MB-231 (F11) 細胞 (MDA-MB-231F11Luc) を左心室内投与法によって無胸腺ヌードマウスに注入した。ただし、腫瘍細胞の移植日を 0 日目とする (以下同様)。MDA-MB-231 腫瘍が骨内に定着すると、未処置マウス群では破骨細胞数が増加し、海綿骨の損失が認められた (Morony et al, 2001)。そこで、X 線検査によって溶骨性病変の進行を測定し、後肢の生物発光イメージング (BLI) 及び腫瘍面積の組織学的評価によって骨の腫瘍組織量の進行を測定した。転移初期への作用を評価する目的で、0 日目から 21 日目まで OPG-Fc 0.3 及び 3.0 mg/kg を週 2 回皮下投与した (試験報告書 R2006160)。OPG-Fc によって、25 日目の X 線検査で検出される溶骨性病変の出現が用量依存的に抑制され (図 2-11)、破骨細胞数の減少を随伴していた (Canon et al, 2008)。OPG-Fc 3.0 mg/kg を投与したとき、後肢 BLI にて測定した骨の腫瘍組織量が有意に減少した (溶媒コントロール [PBS] に比べて 78%減少、Bonferroni 検定、 $p = 0.0002$)。同様に、OPG-Fc (3.0 mg/kg) 投与によって組織学的解析上の骨の腫瘍面積が溶媒コントロール群に比べて 72%減少した (t 検定 $p < 0.05$)。OPG-Fc 0.3 mg/kg においては組織学的検査上の腫瘍面積及び BLI 値が溶媒コントロール群と比較して統計的有意差を示さなかった。



腫瘍移植後 25 日目における後肢の溶骨性病変を X 線にて解析した。各群の後肢における MDA-MB-231F11Luc 腫瘍を有する溶骨性病変の平均面積を求めた (ただし腫瘍移植日を 0 日目とする [以下同様])。病変部位はイメージ解析ソフトウェアで解析した。0.3 又は 3.0 mg/kg の OPG-Fc (図中 OPG と記載) を腫瘍移植日から 21 日目まで週 2 回、皮下投与 (以下同様) した。3.0 mg/kg の OPG-Fc 群では病変は検出されなかった。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。

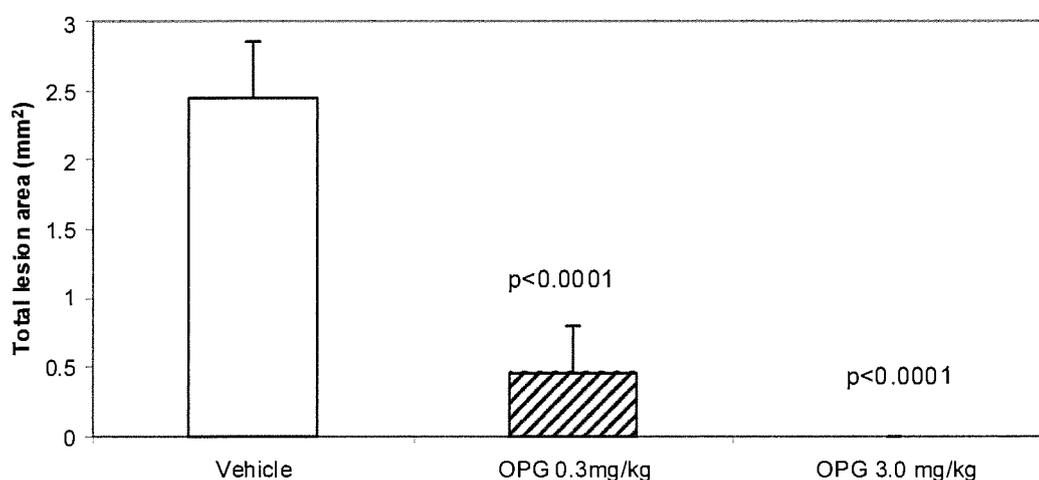
出典: 試験報告書 R2006160

図 2-11 ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231F11Luc 骨転移モデルにおける溶骨性骨病変に対する OPG-Fc の効果 (腫瘍移植日から OPG-Fc 投与)

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

定着した乳癌誘発性骨転移病変の進行を OPG-Fc がどの程度阻害できるかを MDA-MB-231F11Luc 骨転移モデルで評価した。試験報告書 R2006160 の方法に従って無胸腺ヌードマウスに MDA-MB-231F11Luc 細胞を左心室内投与し OPG-Fc 0.3 及び 3.0 mg/kg の週 2 回皮下投与を腫瘍移植後 7 日目から開始して試験終了まで継続した (試験報告書 R2006161)。OPG-Fc 0.3 及び 3.0 mg/kg の投与によって溶骨性病変が用量依存的に有意に抑制された (図 2-12)。



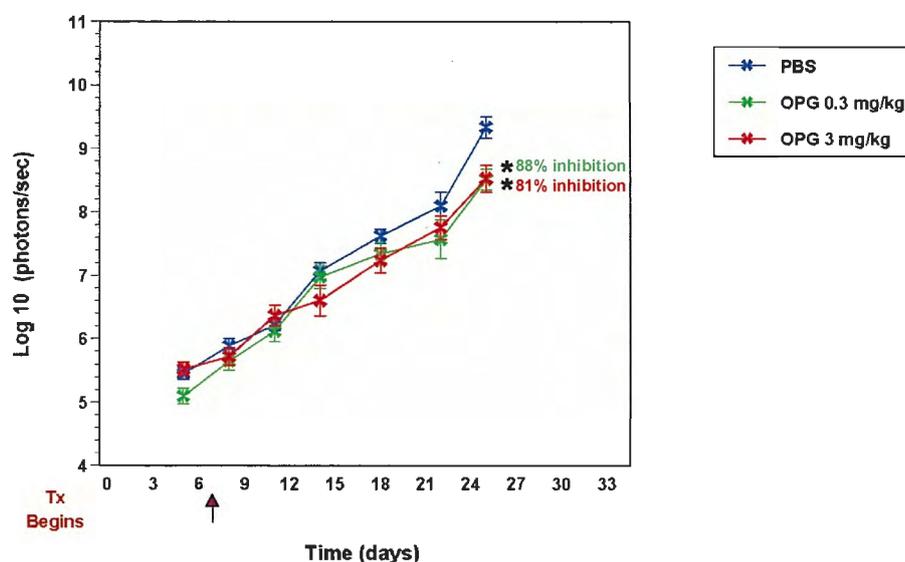
腫瘍移植後 25 日目における骨病変面積を X 線にて解析した。OPG-Fc (図中 OPG と記載、0.3 又は 3.0 mg/kg、週 2 回、皮下投与) を腫瘍移植後 7 日目から試験終了まで投与した。データは溶骨性病変部位の平均値 + 標準誤差である (10 例/群)。Bonferroni/Dunn 検定による統計解析を実施した。
出典: 試験報告書 R2006161

図 2-12 ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231F11Luc 骨転移モデルにおける溶骨性骨病変に対する OPG-Fc の効果 (腫瘍移植後 7 日目から OPG-Fc を投与)

さらに、MDA-MB-231F11Luc 左心室内投与骨転移試験 (試験報告書 R2006161) では、溶媒コントロールの担癌マウスの骨腫瘍は 7 日目から 25 日目の間に顕著に進行した。これに対して、7 日目から OPG-Fc 投与を開始したマウスの骨腫瘍の増殖は 25 日目まで有意に阻害された。後肢 BLI の測定では、OPG-Fc 0.3 mg/kg を投与したマウスの骨腫瘍は溶媒コントロール群に比べて 88% 阻害され (Bonferroni 検定、 $p < 0.03$)、OPG-Fc 3.0 mg/kg 群では溶媒コントロール群に比べて 81% 阻害された (Bonferroni 検定、 $p < 0.03$) (図 2-13)。この試験では OPG-Fc 3.0 mg/kg によって担癌マウスの生存期間が有意に延長することも立証された。溶媒コントロール群の生存期間中央値 27 日に対して OPG-Fc 3.0 mg/kg 群の生存期間中央値は 32.5 日であり、生存期間は溶媒コントロール群に比べて 20% 延長した ($p = 0.004$ 、SAS lifetest プロシジャ)。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ



腫瘍移植後、経時的に後肢部位の着目領域 (ROI) におけるBLI値 [photons/sec]を測定し、 \log_{10} 値を計算した。抑制率 (%) は未変換結果を基に計算している。0.3 及び 3.0 mg/kgのOPG-Fc (図中OPGと記載) を週 2 回、皮下投与、腫瘍移植後 7 日目から試験終了まで継続した (図中に投与開始日を矢印で示す [Tx Begins])。データは平均病変面積 \pm 標準誤差を示す (10 例/群)。* $p < 0.03$ (スロープ、Bonferroni検定)、 $p \leq 0.009$ (25 日目Dunnett's検定)。

出典: 試験報告書 R2006161

図 2-13 ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231F11Luc 骨転移モデルにおける骨腫瘍進行に対する OPG-Fc の効果 (後肢の生物発光による検討)

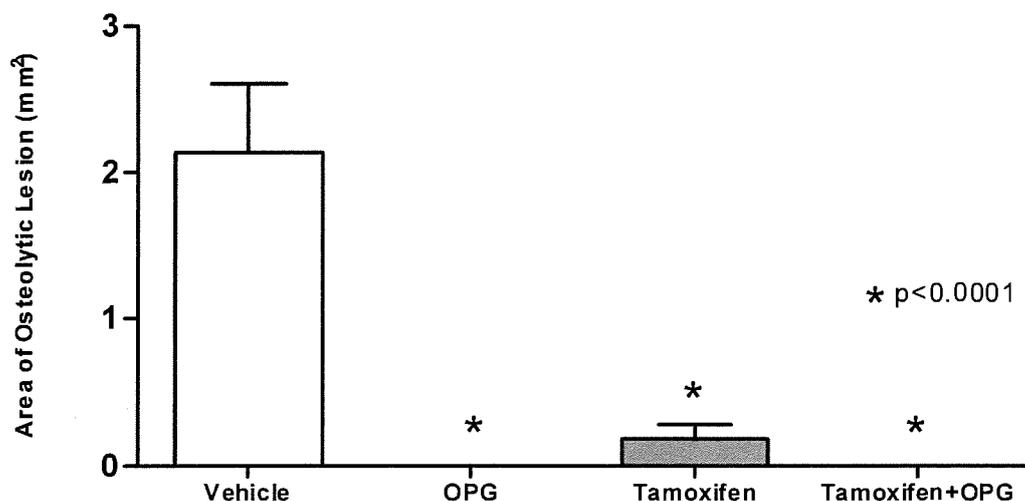
2.3.2.2 MCF-7 異種移植マウスモデルにおける溶骨性と造骨性の混合型乳癌骨転移の進行に対する OPG-Fc 単独及びタモキシフェンとの併用による RANKL 阻害の薬理 (試験報告書 R20080161 及び R20080162)

試験の目的として ER+ MCF-7 骨転移モデルにおける溶骨性と造骨性の混合型骨転移の進行に対する OPG-Fc の影響を検討した。試験 (試験報告書 R20080161 及び R20080162) では雌無胸腺ヌードマウスに 17β エストラジオール 90 日間放出ペレット (0.25 mg/ペレット) を投与し、Luc 発現 MCF-7 細胞 (MCF-7Luc) を 0 日目に左心室内投与方法によって注入し、溶骨性と造骨性の混合型病変 (試験報告書 R20080161) を得た。定着した溶骨性と造骨性の混合型骨転移に対する RANKL 阻害の影響を評価するため、腫瘍移植後 7 日目から 41 日目まで OPG-Fc 3.0 mg/kg を週 3 回皮下投与した (試験報告書 R20080162)。X 線検査によって骨病変の進行を測定し、後肢の BLI 及び腫瘍面積の組織学的評価によって骨の腫瘍組織量の進行を測定した。併用実験では、OPG-Fc (3 mg/kg、週 3 回) 及びタモキシフェン (0.1 mg、週 5 回) の単独投与及び併用投与を腫瘍移植後の 7 日目から開始し、41 日目の試験終了時まで継続した (試験報告書 R20080162)。OPG-Fc 単独投与によって、36 日目の X 線検査にて検出される腫瘍誘発性の溶骨性病変が有意に抑制されることが明らかとなった (図 2-14)。OPG-Fc の効果に関しては、X 線検査にて確認された骨病変の抑制と、全身の骨吸収及び破骨細胞の

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

活性（血清 TRAP5b 値によって測定）の有意な減少とが相関していたが、タモキシフェンに関しては、血清 TRAP5b 値に対する効果が認められなかった。このため、タモキシフェンの場合はその抗腫瘍活性によって転移性骨病変が抑制されたことが示唆される。X 線検査上の病変（図 2-14）及び血清 TRAP5b 値の両者の減少は、OPG-Fc とタモキシフェンとの併用時にも認められた。



腫瘍移植後 36 日目における骨病変面積を X 線にて解析した。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 + 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。

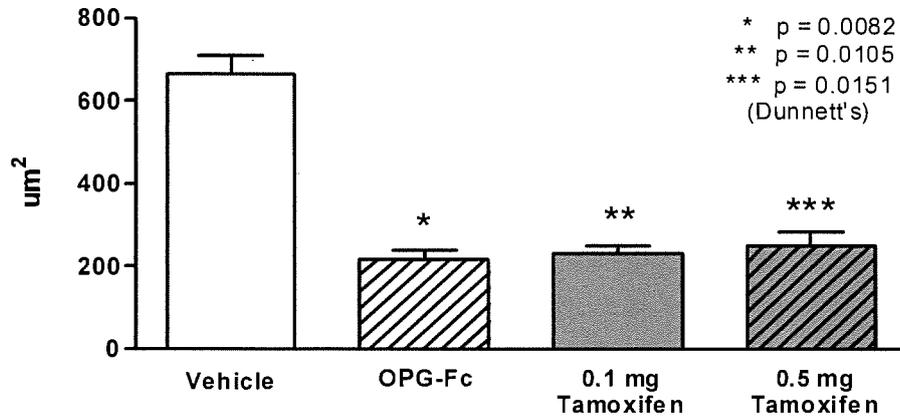
出典: 試験報告書 R20080162

図 2-14 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

OPG-Fc 又はタモキシフェン単独で骨腫瘍の増殖が抑制されるかを確認したところ、各々によって、試験終了時に (34 日目、試験報告書 R20080161)、骨腫瘍面積の増加が有意に減少した (図 2-15; OPG-Fc 群と溶媒コントロール群との比較: $p = 0.0082$ 、タモキシフェン 0.1 mg 群と溶媒コントロール群との比較: $p = 0.0105$)。MCF-7Luc 骨腫瘍の進行に対して両者の併用時に上乘せ効果が得られるかどうかを確認するため、別の実験を実施し、6 日目から 41 日目までの後肢 BLI に基づき、腫瘍増殖の変化量の比を算出した。OPG-Fc とタモキシフェン 0.1 mg を併用したところ、経時的な腫瘍増殖阻害がいずれかの単独に比べて有意に増強した。41 日目の試験終了時、併用投与での腫瘍増殖は OPG-Fc 単独及びタモキシフェン単独に比べて約 60% 低下した (OPG-Fc 単独との比較 $p < 0.0001$ 、タモキシフェン単独との比較の $p = 0.0132$) (図 2-16)。

2.6.2 薬理試験の概要文

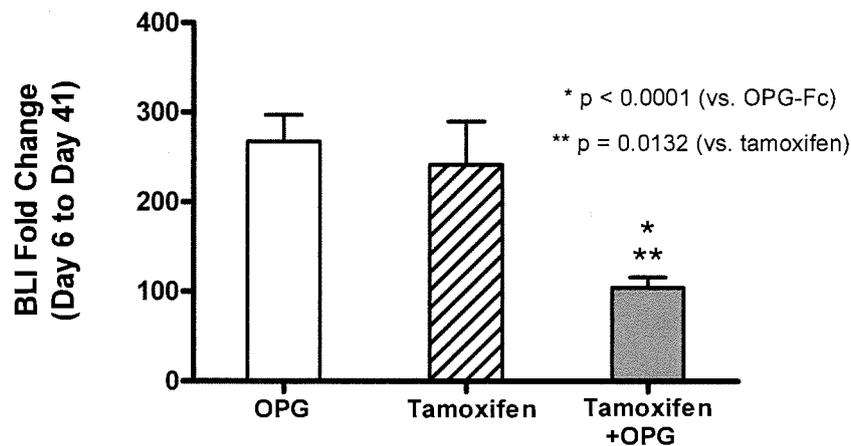
デノスマブ



腫瘍移植後 34 日目における腫瘍組織面積を組織学的に解析した。大腿骨と脛骨を回収、固定、脱灰、切片作製、H&E 染色し、後肢（大腿骨、脛骨）の腫瘍面積の定量を BioQuant ソフトウェアを用いて盲検法にて実施した。OPG-Fc (3 mg/kg、腫瘍移植後 5 日目から、週 3 回、皮下投与) 又はタモキシフェン (図中、Tamoxifen と記載、0.1 又は 0.5 mg、腫瘍移植後 7 日目から週 5 回、腹腔内投与) をそれぞれ単独投与した。データは平均腫瘍面積 + 標準偏差を示す (10 例/群)。Dunnett 検定による統計解析を実施した。

出典: 試験報告書 R20080161

図 2-15 ヒト乳癌細胞株 MCF-7Luc 骨転移モデルにおける骨腫瘍量に対する OPG-Fc あるいはタモキシフェンの効果



BLI を用いて腫瘍組織量を計測し、各処置群の腫瘍移植後 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、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

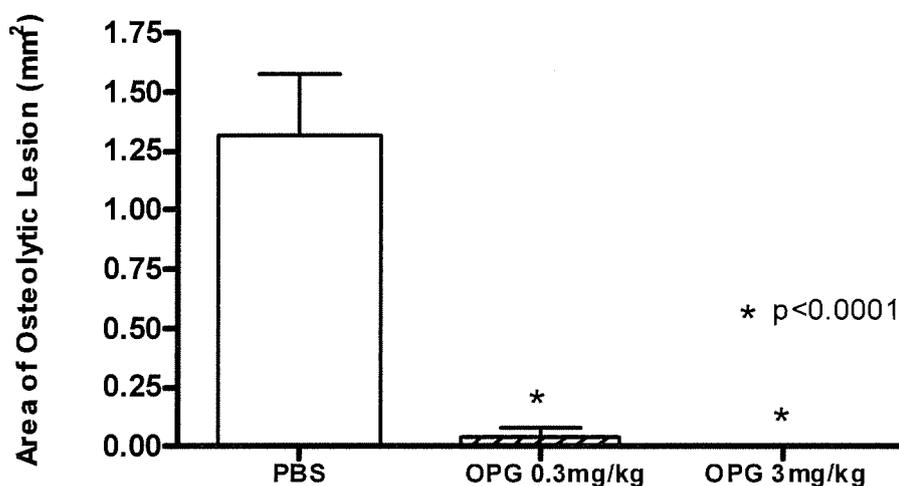
図 2-16 ヒト乳癌細胞株 MCF-7Luc 骨転移モデルにおける後肢の骨腫瘍組織量に対する OPG-Fc 単独あるいはタモキシフェンとの併用効果の比較 (6 日目に対する 41 日目の比)

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

2.3.2.3 MDA-MB-231F11Luc 異種移植マウスモデルにおける乳癌骨転移の新規定着に対する RANKL 阻害 (OPG-Fc による) の薬理 (試験報告書 R20070953)

新規骨転移の形成を RANKL 阻害にてどの程度遅延させることができるかを MDA-MB-231 乳癌骨転移実験モデルで試験した (試験報告書 R20070953)。転移の遅延に対する RANKL 阻害の効果を評価するため、OPG-Fc 0.3 又は 3 mg/kg を週 3 回、皮下投与にて腫瘍移植の 7 日前から投与開始した。OPG-Fc の前投与によって破骨細胞を介した全身骨吸収 (血清 TRAP5b 値によって測定) が用量依存的に抑制され、OPG-Fc 3 mg/kg 投与群にて腫瘍移植の時点で TRAP5b 値がベースライン溶媒コントロール群と比較して顕著に低下した。腫瘍移植後 24 日目の試験終了時、血清 TRAP5b 値は OPG-Fc 0.3 mg/kg 及び 3 mg/kg 投与によって有意に低下した (各々のベースライン溶媒コントロール群との比較: Dunnett 検定、 $p = 0.0034, < 0.0001$)。OPG-Fc の両用量は腫瘍移植後 26 日目の腫瘍誘発溶骨性病変を有意に抑制し、3 mg/kg 投与群では X 線画像における転移性病変が完全に抑制された (図 2-17)。OPG-Fc 投与マウス群と溶媒投与マウス群との間で、溶骨性病変面積の差は統計的に有意であった (Bonferroni/Dunn 検定、 $p < 0.0001$)。



腫瘍移植後 26 日目における骨病変面積を X 線にて解析した。OPG-Fc (図中 OPG と記載、0.3 又は 3 mg/kg、週 3 回、皮下投与) は腫瘍移植 (0 日目) の 7 日前から投与を開始した。データは平均病変面積+標準誤差を示す (20 例/群)。Bonferroni/Dunn 検定による統計解析を実施した。両処置群は溶媒コントロール群と比較して統計的有意差を示した。

出典: 試験報告書. R20070953

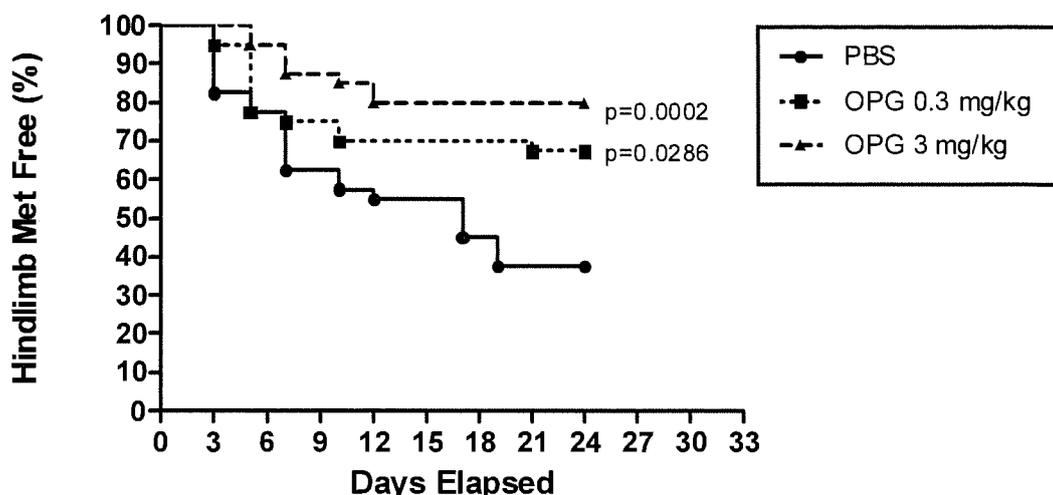
図 2-17 ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231F11Luc 骨転移モデルにおける溶骨性病変面積に対する OPG-Fc の前処置の効果

マウスへの MDA-MB-231F11Luc 腫瘍移植 7 日前から OPG-Fc 0.3 又は 3 mg/kg を前投与することで、BLI で検出される骨転移出現時期が有意に遅延した (図 2-18)。一方で、BLI の全身解析により、OPG-Fc が骨格外の腫瘍組織量に対する効果を示さないことが示唆された。それゆえに、OPG-Fc による新規骨転移出現の遅延は破骨細胞抑制の程度と相関した。以上

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

の試験より、当マウスモデルにおいては、RANKL 阻害によって骨吸収を抑制することで、乳癌骨転移の新規形成が有意に遅延することが示唆された。



腫瘍移植後、後肢の BLI スキャンを経時的に実施し、骨転移を解析した。データを盲検的に解析した。一度 BLI が検出された後肢は以後、骨転移陽性とした。OPG-Fc (図中 OPG と記載、0.3 及び 3 mg/kg、皮下投与) の投与は腫瘍移植 (0 日目) の 7 日前から開始し、21 日目まで継続した。データは後肢の BLI が検出されない割合 (%) を示す (20 例/群)。Breslow-Gehan-Wilcoxon 検定を実施した。溶媒コントロール群と比較して、OPG-Fc 両群では統計学的有意差が認められた。

出典: 試験報告書 R20070953

図 2-18 ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231F11Luc 骨転移モデルにおける新規に形成される骨転移に対する OPG-Fc 前処置による遅延効果

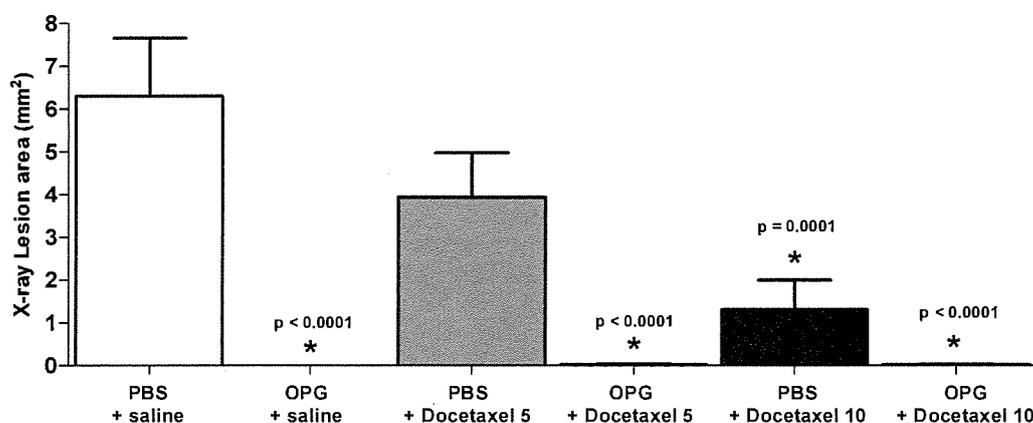
2.3.3 PC-3 異種移植マウスモデルにおける前立腺癌骨転移の進行に対する OPG-Fc 単独及びドセタキセルとの併用による RANKL 阻害の薬理 (試験報告書 R20080083)

PC-3 骨転移モデルを用い、前立腺癌骨転移の進行に対する OPG-Fc の影響を検討する目的で試験を実施した (試験報告書 R20080083)。ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 をヌードマウスの左心室内に投与すると、溶骨性を主体として造骨反応を一部含む限局性骨病変を生じることが示されている (Jenkins et al, 2003)。当該試験では Luc を発現する PC-3 細胞 (PC-3Luc) を左心室内投与法によって無胸腺ヌードマウスに 0 日目に注入した。前立腺癌転移の進行に対する効果を評価するため、OPG-Fc (11 日目から 28 日目に 3.0 mg/kg の週 3 回皮下投与) とドセタキセル (11 及び 18 日目に 5 又は 10 mg/kg 投与) を単独あるいは併用にて評価した。上述の乳癌骨転移試験 (第 2.3.2 項参照) と同様に、X 線検査によって前立腺腫瘍溶骨性病変の進行を測定し、後肢の BLI 及び腫瘍面積の組織学的評価によって骨の腫瘍組織量の進行を測定した。OPG-Fc を投与したところ、27 日目の X 線検査で検出される腫瘍誘発溶骨性病変が

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

有意に抑制された (図 2-19)。PC-3Luc 腫瘍に誘発される溶骨性病変の減少は、OPG-Fc 単独投与時とドセタキセル 5 又は 10 mg/kg との併用時に認められた。OPG-Fc に関しては、X 線検査にて検出される骨病変の抑制と、全身の骨吸収及び破骨細胞活性 (血清 TRAP5b 値によって評価) の有意な低下とが相関を示したのに対し、ドセタキセルに関しては、血清 TRAP5b 値に対する効果は認められなかった。このため、ドセタキセルの場合はその抗腫瘍活性によって転移性骨病変が軽減したと示唆される。



腫瘍移植後 27 日目における大腿骨と脛骨の骨病変面積を X 線にて解析した。OPG-Fc (図中 OPG と記載、3.0 mg/kg、週 3 回、皮下投与、腫瘍移植後 11 日目から 28 日目) とドセタキセル (図中 Docetaxel と記載、5 又は 10 mg/kg、腹腔内投与、腫瘍移植後 11 日目と 18 日目に投与) を単独あるいは併用にて投与した。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)。溶媒コントロール群を対照として Dunnett 検定による統計解析を実施した。

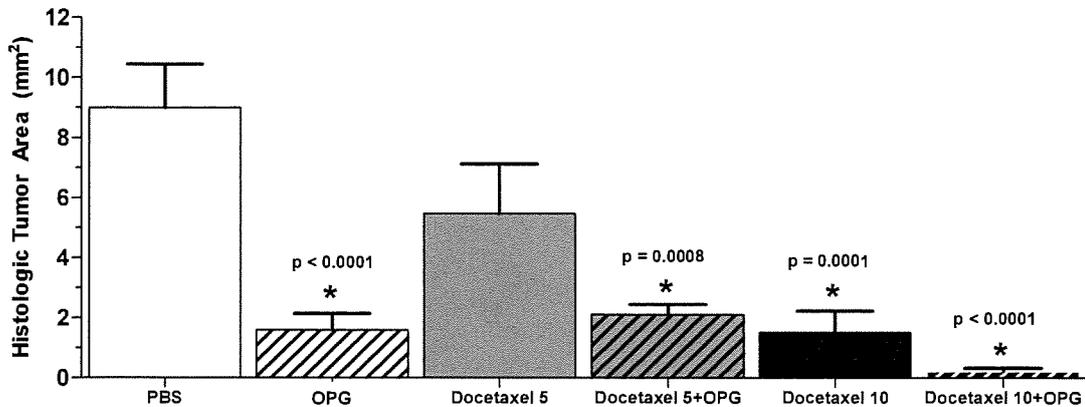
出典: 試験報告書 R20080083

図 2-19 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

OPG-Fc を投与したところ、PC-3Luc 骨腫瘍面積 (組織学的検査によって測定) の増加が溶媒コントロールに比べて有意に阻害された ($p < 0.0001$)。OPG-Fc とドセタキセル 5 mg/kg 又は 10 mg/kg との併用でも骨腫瘍面積の増加が有意に抑制された (それぞれ $p = 0.0008$ 、 $p < 0.0001$ 、図 2-20)。また、OPG-Fc をドセタキセル 5 又は 10 mg/kg と併用するとドセタキセル単独投与マウス群に比べて、27 日目までの後肢の BLI を指標とした腫瘍組織量が有意に抑制されることが示された (OPG-Fc+ドセタキセル 10 mg/kg 併用とドセタキセル 10 mg/kg 単独との比較: $p = 0.0008$) (OPG-Fc+ドセタキセル 5 mg/kg 併用とドセタキセル 5 mg/kg 単独との比較: $p = 0.0083$)。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ



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、腫瘍移植後 11 日目から 28 日目）とドセタキセル（図中 Docetaxel と記載、5 又は 10 mg/kg、腹腔内投与、腫瘍移植後 11 日目と 18 日目に投与）を単独あるいは併用にて投与した。データは平均腫瘍面積 + 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群を対照とした 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 2-20 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

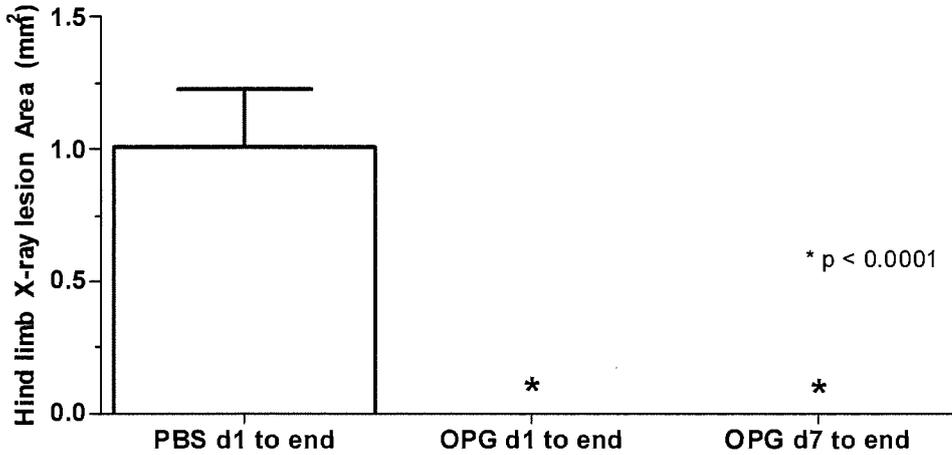
2.3.4 肺癌骨転移マウスモデルにおける RANKL 阻害（OPG-Fc による）の薬理

2.3.4.1 H1975 非小細胞肺癌異種移植マウスモデルにおける骨転移の進行に対する RANKL 阻害（OPG-Fc による）の薬理（試験報告書 R20070963）

H1975 非小細胞肺癌骨転移モデルを用い、溶骨性骨転移の進行に対する OPG-Fc の効果を検討することを目的とした試験を実施した（試験報告書 R20070963）。ヒト非小細胞肺癌細胞株 H1975 を 0 日目にヌードマウスに左心室内投与すると骨格に限局性溶骨性病変を生じた。そこで、非小細胞肺癌骨転移の進行に対する効果を評価するため、OPG-Fc を腫瘍移植後 7 日目から 27 日目まで、又は腫瘍移植後 1 日目から 27 日目まで 3.0 mg/kg、週 3 回、皮下投与した。X 線検査によって溶骨性の肺癌骨病変の進行を測定し、後肢の BLI 及び腫瘍面積の組織学的評価によって骨の腫瘍組織量の進行を測定した。両投与スケジュールにおける OPG-Fc を用いた RANKL 阻害によって、X 線画像上の H1975 細胞で誘発される溶骨性病変が有意に抑制され、OPG-Fc 投与後に骨病変が完全に抑制された（図 2-21）。OPG-Fc 投与後の肺癌誘発溶骨性病変の減少は破骨細胞を介した全身の骨吸収及び破骨細胞活性（血清 TRAP5b 値によって評価）の減少とも相関した。OPG-Fc の投与開始が 1 日目又は 7 日目のいずれにおいても、H1975 骨腫瘍増殖の進行が溶媒コントロール群に比べて有意に抑制され、骨腫瘍面積（27 日目の組織学的検査によって評価）の有意な減少として確認された（図 2-22）。

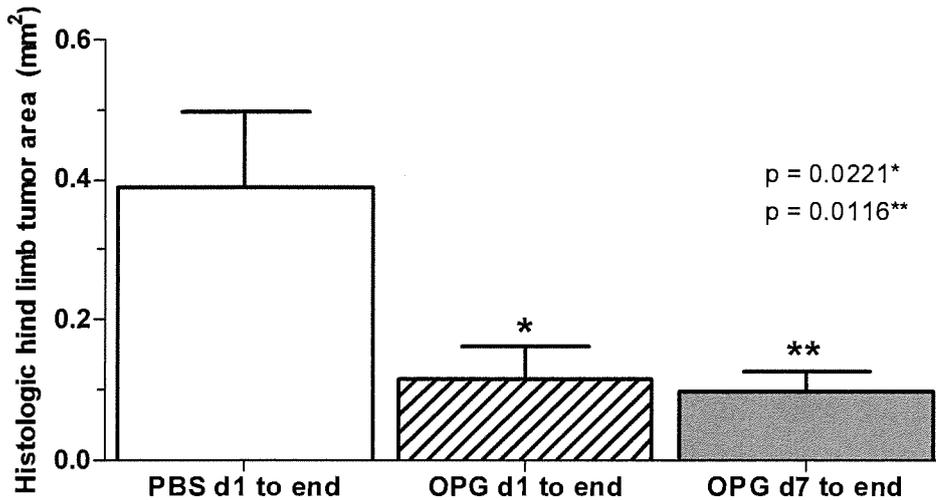
2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ



腫瘍移植後 27 日目における大腿骨と脛骨の骨病変面積を X 線にて解析した。OPG-Fc (図中 OPG と記載、3 mg/kg、週 3 回、皮下投与) の投与を腫瘍移植後 1 日目あるいは 7 日目から開始し、試験終了まで実施した。溶媒として PBS を週 3 回、腫瘍移植後 1 日目から試験終了まで投与した。データは平均病変面積 + 標準誤差を示す (9 又は 10 例/群)。Dunnett 検定による統計解析を実施した。
出典: 試験報告書 R20070963

図 2-21 非小細胞肺癌H1975 骨転移モデルにおける溶骨性病変に対するOPG-Fcの効果



腫瘍移植後 27 日目における後肢の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 mg/kg、週 3 回、皮下投与) の投与を腫瘍移植後 1 日目あるいは 7 日目から開始し、試験終了まで実施した。溶媒として PBS を週 3 回、腫瘍移植後 1 日目から試験終了まで投与した。データは平均腫瘍面積 + 標準誤差を示す (9 又は 10 例/群)。Dunnett 検定による統計解析を実施した。
出典: 試験報告書 R20070963

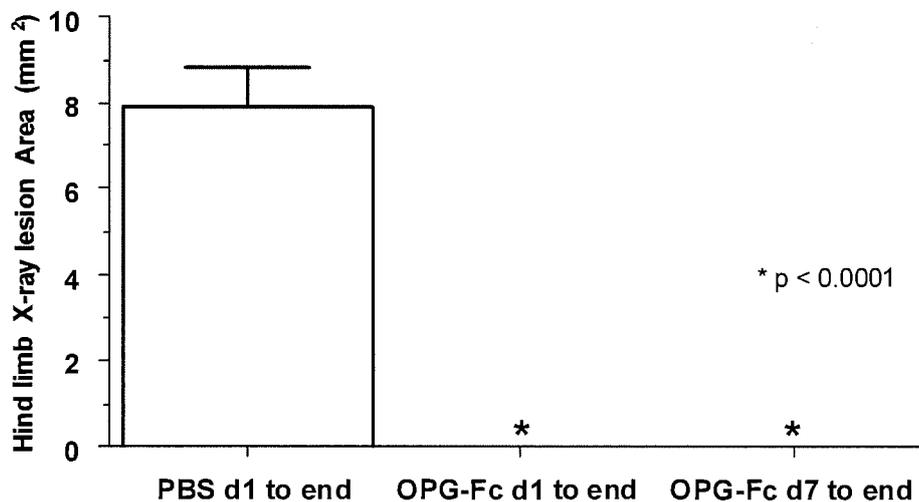
図 2-22 非小細胞肺癌細胞株 H1975 骨転移モデルにおける骨腫瘍組織量に対する OPG-Fc の効果

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

2.3.4.2 H1299 非小細胞肺癌異種移植マウスモデルにおける骨転移の進行に対する OPG-Fc 単独及びドセタキセルとの併用による RANKL 阻害の薬理 (試験報告書 R20080310、R20080331、及び R20080332)

H1299 非小細胞肺癌骨転移モデルを用い、溶骨性骨転移の進行に対する OPG-Fc の影響を検討することを目的とした試験を実施した。H1299 細胞をヌードマウスに左心室投与すると (試験報告書 R20080310)、骨格に限局性溶骨性病変が発現した。H1299 骨転移の進行に対する RANKL 阻害の影響を評価するため、OPG-Fc 3.0 mg/kg の週 3 回皮下投与を腫瘍移植後 1 日目から 19 日目まで、又は腫瘍移植後 7 日目から 19 日目まで実施した。両投与スケジュールにおいて、OPG-Fc によって腫瘍移植後 19 日目の腫瘍誘発溶骨性病変は有意に抑制され、転移性骨病変の X 線検査によって検出される骨病変が完全に抑制された (図 2-23)。同様に、19 日目の組織学的検査によって骨腫瘍面積を測定すると、投与開始が 1 日目又は 7 日目のいずれにおいても、OPG-Fc 投与によって H1299 骨腫瘍増殖の進行が溶媒コントロール群に比べて有意に抑制されていた (図 2-24)。



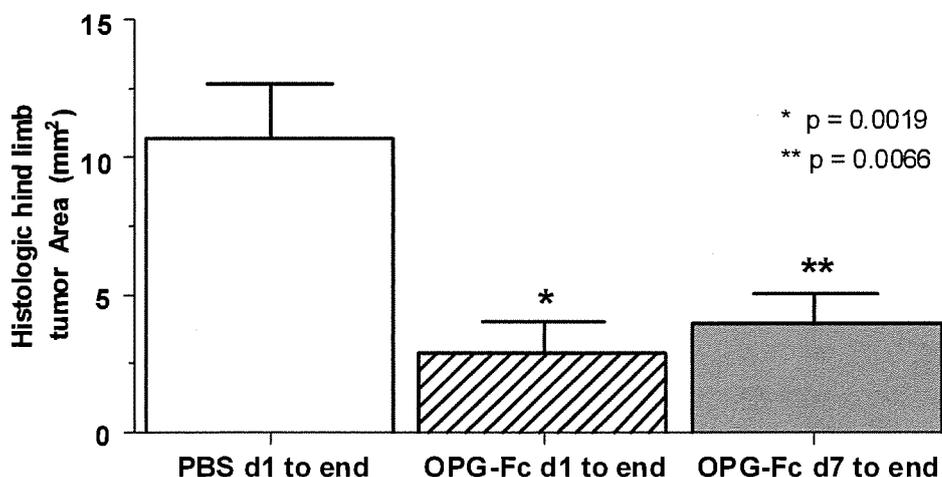
腫瘍移植後 19 日目における大腿骨と脛骨の骨病変面積を X 線にて解析した。OPG-Fc (3 mg/kg、週 3 回、皮下投与) の投与を腫瘍移植後 1 日目あるいは 7 日目から開始し、試験終了まで継続した。データは平均病変面積 + 標準誤差を示す (9 例/群)。Dunnett 検定による統計解析を実施した。後肢の病変面積が溶媒コントロール群と比べて有意に低下した。

出典: 試験報告書 R20080310

図 2-23 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 の 効果

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ



腫瘍移植後 19 日目における後肢の腫瘍面積を組織学的に解析した。OPG-Fc (3 mg/kg、週 3 回、皮下投与) の投与を腫瘍移植後 1 日目あるいは 7 日目から開始し、試験終了まで継続した。データは平均腫瘍面積 + 標準誤差を示す (9 例/群)。Dunnnett 検定による統計解析を実施した。すべての処置群において後肢の腫瘍面積が溶媒コントロール群と比べて有意に低下した。

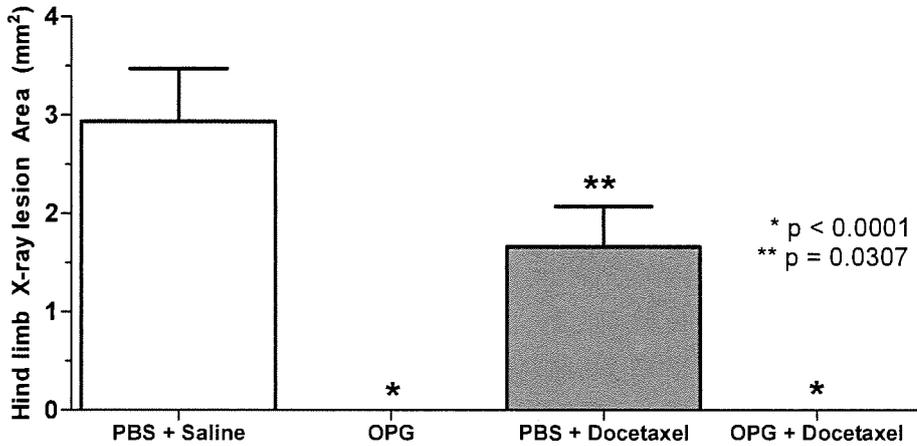
出典: 試験報告書 R20080310

図 2-24 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 の効果

化学療法と併用したときの肺癌骨転移の進行に対する RANKL 阻害の影響を評価するために、7 日目から 23 日目に OPG-Fc 3.0 mg/kg、週 3 回の単独、又はドセタキセルとの併用を実施した (試験報告書 R20080332 及び R20080331)。ドセタキセルの投与法は 2 試験間で異なり、7 日目及び 14 日目に 15 mg/kg 投与 (試験報告書 R20080332)、又は 5 日目及び 12 日目に 35 又は 50 mg/kg 投与 (試験報告書 R20080331) にて行った。H1299 担癌マウスに OPG-Fc を単独で投与、又はドセタキセル 15 mg/kg と併用投与したところ、腫瘍移植後 23 日目の腫瘍誘発溶骨性病変は有意に抑制され、X 線検査における転移性骨病変は完全に抑制された (図 2-25、試験報告書 R20080332)。OPG-Fc の単独又はドセタキセルとの併用によって血清 TRAP5b 値が有意に低下したことから、破骨細胞を介した全身の骨吸収の抑制が示唆された。ドセタキセル単独投与においては血清 TRAP5b 値に対する影響は認められなかったことから、ドセタキセルによる腫瘍誘発性の骨溶解の抑制はその抗腫瘍作用の結果と考えられる。H1299 骨腫瘍増殖の進行も、OPG-Fc 単独及びドセタキセル 15 mg/kg との併用において、溶媒コントロール群と比較して有意に阻害された (図 2-26、試験報告書 R20080332)。また、OPG-Fc を高用量のドセタキセル (35 又は 50 mg/kg) と併用した際にも H1299 腫瘍誘発溶骨性病変及び骨腫瘍増殖が溶媒コントロール群に比べての有意に抑制された (試験報告書 R20080331)。

2.6.2 薬理試験の概要文

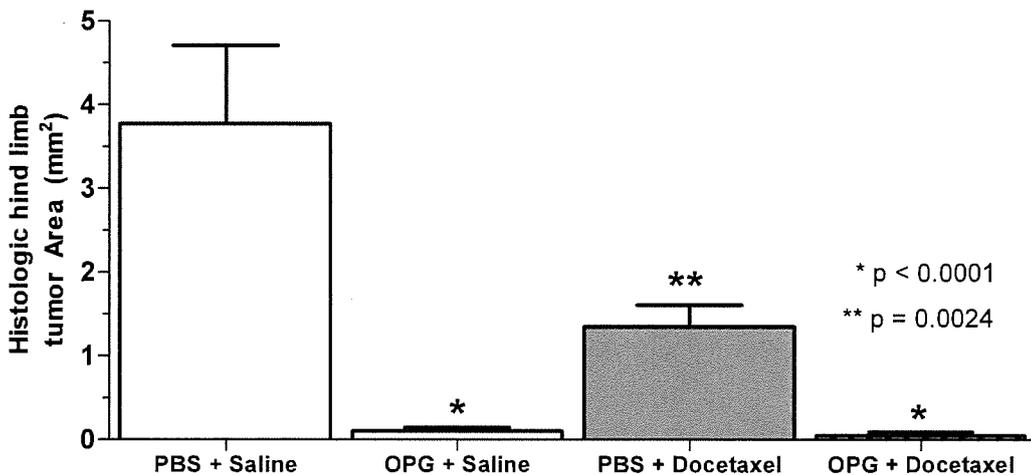
デノスマブ



腫瘍移植後 23 日目における大腿骨と脛骨の骨病変面積を X 線にて解析した。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。データは平均病変面積 + 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。

出典: 試験報告書 R20080332

図 2-25 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



骨内の腫瘍面積を組織学的に解析した。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 2-26 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

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

2.3.5 がん誘発性骨疾患のげっ歯類モデルにおける RANKL 阻害の非臨床評価に関連する文献の概説

がん誘発性骨疾患のげっ歯類モデルにおける RANKL 阻害に関連する文献をアムジェン社内試験（第 2.3.2 項～第 2.3.4 項参照）と比較して簡潔に論ずる。また、他のがん（すなわち多発性骨髄腫）又は他の骨病変（すなわち造骨性）における RANKL 阻害の妥当性を示す。文献の総合的な評価、アムジェン社内試験の結果から、RANKL 阻害には多様ながん種に起因する骨溶解及び骨病変を抑制する広範な効用があると示唆される。これらの非臨床試験をまとめて評価したとき、RANKL 阻害によって溶骨性病変、造骨性病変、溶骨性と造骨性の混合型病変として表される骨での腫瘍の定着及び進行が抑制されることが示唆される。さらに、文献中に報告された研究からは、RANKL 阻害によるがん誘発性骨病変に対する有益な作用は破骨細胞の阻害を介して発現していると示唆され、上述のアムジェン社内の癌薬理試験に記載されている機序と一致する。げっ歯類におけるがん誘発性骨病変の非臨床モデル実験を実施するにあたり、組換え型 OPG（例えば OPG-Fc あるいは Fc-OPG）あるいは RANK-Fc が用いられている。これらは RANKL に対して類似した様式でそれぞれ結合し、破骨細胞形成、機能、生存を抑制する。

2.3.5.1 げっ歯類乳癌骨転移モデルにおける RANKL 阻害の概説

乳癌骨転移に関連する論文を精査したところ、RANKL 阻害は第 2.3.2 項に示した試験に加え、ヒト腫瘍を異種移植した乳癌骨転移実験モデルを用いた独立した 4 試験（MDA-MB-231 又は MCF-7 細胞のいずれかを使用）（Sangai et al, 2008、Buijs et al, 2009、Zheng et al, 2007a、Zheng et al, 2007b）、並びに MDA-MB-231 異種移植（Morony et al, 2001）あるいは同系モデル（Roudier et al, 2006）を用いたアムジェン社支援の 2 試験が実施されている。精査したそれぞれの試験において RANKL 阻害によって腫瘍誘発性の骨溶解及び破骨細胞が抑制された。また、乳癌骨転移モデルにおける OPG-Fc を用いたアムジェン社内 4 試験の観察結果から類似した薬力学反応が示唆されるとともに、同一の機序が示された（試験報告書 R2006160、R2006161、R20070953、R20080161、Canon et al, 2008）。

また、文献中に記載された乳癌骨転移異種移植試験のそれぞれにおいて、RANKL 阻害後の骨腫瘍増殖の抑制も示されており、先に述べた各試験での観察結果と同様であった（試験報告書 R2006160、R2006161、R20070953、及び R20080161）。文献報告された 3 試験では、さらに拡大した検討が行われており、RANKL 阻害後の骨組織での有意な腫瘍細胞アポトーシスの増強又は腫瘍細胞増殖の低下が示された（Zheng et al, 2007a、Zheng et al, 2007b、Canon et al, 2008）。

2.3.5.2 マウス前立腺癌骨転移モデルにおける RANKL 阻害の概説

前立腺癌骨転移のげっ歯類モデルとして、左心室内投与又は脛骨内移植後に溶骨性病変、造骨性病変、溶骨性と造骨性の混合型病変を発現する異種移植モデルが使用されている

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

(Rosol et al, 2003)。文献を精査したところ、RANKL 阻害は前立腺癌骨転移の 8 試験で検討されている。例えば、PC-3 の脛骨内移植後に溶骨性病変を発現したマウスに RANK-Fc を投与すると溶骨性病変の発現が抑制されるとともに骨の腫瘍組織量が減少しており (Whang et al, 2005)、先に概説したアムジェン社内の試験の結果に類似する (試験報告書 R20080083 及び第 2.3.3 項参照)。さらに前立腺癌の溶骨性と造骨性の混合型病変の進行に対する RANKL 阻害の効果は、C4-2B 異種移植モデルにて確認されている。OPG-Fc 又は Fc-OPG を用いて RANK を阻害すると、C4-2B にて誘発される破骨細胞形成が抑制され、脛骨にて C4-2B の溶骨性と造骨性の混合型腫瘍の定着が抑制された (Zhang et al, 2001, Quinn et al, 2005)。同様に、Fc-OPG (Quinn et al, 2005) 又は RANK-Fc (Woods Ignatoski et al, 2008) を用いた RANKL 阻害実験においても、定着した C4-2B 骨腫瘍の進行が抑制された。さらに、前立腺癌にて誘発される造骨性病変の特徴が強い 4 種類のマウスモデルにおいて、RANKL 阻害によって、腫瘍にて誘導される破骨細胞の数が抑制され、次いで造骨性病変の進行が抑えられたと報告されている。例を挙げると、Yonou らは OPG による RANKL 阻害によって、骨内の前立腺癌細胞株 LnCaP の腫瘍組織量が選択的に減少し、定着した骨腫瘍の増殖を抑制するのみでなく、骨転移の新規形成も抑制されたと報告している (Yonou et al, 2003)。別の造骨性前立腺腫瘍である LuCAP 35 の担癌動物に RANK-Fc 投与した場合にも (Zhang et al, 2003)、骨格の腫瘍組織量が減少し、血清中の前立腺特異抗原 (PSA) 値 (前立腺腫瘍組織量のサロゲートマーカー) が減少した。また、造骨性の前立腺癌異種移植モデル (LuCaP 23.1) にて Fc-OPG を用いて RANKL を阻害したところ、骨内部の腫瘍細胞増殖 (組織学的検査による測定) が抑制され、血清 PSA 値が減少した (Kiefer et al, 2004)。さらに、造骨性の前立腺骨腫瘍 LAPC-9 が定着したマウス骨転移モデルに RANK-Fc を投与したところ、造骨性病変の進行が抑制された (Whang et al, 2005)。これら文献中で検討されたいずれの場合においても、RANKL 阻害の効力は前立腺腫瘍の骨格への定着及び進行を抑制することにより、腫瘍によって誘導される破骨細胞が抑制されることと相関していた。この機序は、先に論じた前立腺癌骨転移試験 (試験報告書 R20080083) の機序と類似することが示唆される。また、C4-2B モデルにおいて、ドセタキセルによる骨腫瘍の増殖抑制は、RANK-Fc を用いた RANKL 阻害の併用によって増強されることが確認されている (Woods Ignatoski et al, 2008)。この結果は OPG-Fc とドセタキセルを併用投与した PC-3 骨転移モデルで確認された結果に類似する (試験 R20080083)。

2.3.5.3 その他の固形癌 (乳癌、前立腺癌以外) の骨転移又は悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症のマウスモデルにおける RANKL 阻害の概説

RANKL 阻害により肺腫瘍の骨病変を抑制可能であることが 2 試験で報告されている。A549 非小細胞肺癌脛骨内移植モデルにおいて、RANK-Fc 投与によって溶骨性病変が抑制され、破骨細胞が減少し、さらに骨の腫瘍組織量が減少した (Feeley et al, 2006)。一方で、ヒト肺扁平上皮癌 HARA (PTHrP を高水準で発現) の担癌マウスへの Fc-OPG 投与を解析した結果、腫瘍によって誘導される破骨細胞数又は腫瘍体積の有意な減少は示されなかった

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

(Tannehill-Gregg et al, 2006)。HARA 細胞を用いた研究にて、腫瘍に誘導される破骨細胞形成に対する影響が認められなかった結果については、使用された OPG-Fc の投与量及びスケジュール (2.5 mg/kg、週 2 回投与) が、既に論じた非小細胞肺癌の H1299 試験 (試験報告書 R20080310 及び第 2.3.4.2 項参照) 及び H1975 試験 (試験報告書 R20070963 及び第 2.3.4.1 項参照) での OPG-Fc 3 mg/kg、週 3 回投与と比較して至適用量以下であったとの解釈も考えられる。

骨転移を生じる他の固形癌モデル及び HCM のモデルで RANKL 阻害が試験されている。第 2.3.1.1 項に述べたとおり、HCM には PTHrP 値の増加に起因する破骨細胞による骨吸収活性化が介在すると考えられる。肺扁平上皮癌 RWGT2 の皮下移植担癌動物に RANK-Fc を投与したところ、PTHrP を介する HCM が抑制された (Oyajobi et al, 2001)。結腸由来腫瘍細胞 Colon26 (C26) 同系移植マウスモデルにおいて、HCM 発現時又は HCM が確立した後に OPG-Fc を投与した場合、腫瘍誘発性骨吸収を抑制することができ、血中カルシウムイオンは正常値に戻った (Capparelli et al, 2000)。いずれの例においても、RANKL 阻害による HCM の軽減は腫瘍に誘導される破骨細胞の減少と相関した。

2.3.5.4 げっ歯類多発性骨髄腫モデルにおける薬理的 RANKL 阻害の概説

多発性骨髄腫細胞は複数の機序によって破骨細胞活性に影響する可能性があり、多発性骨髄腫の波及した骨のストローマにおいては RANKL が増加し、OPG が減少する (Giuliani et al, 2001、Pearse et al, 2001)。文献調査によれば、マウス多発性骨髄腫細胞を用いた同系マウスモデル、又はヒト多発性骨髄腫の臨床サンプルを用いた Hu/SCID モデルにおいて、多発性骨髄腫誘発性骨疾患に対する薬理的 RANKL 阻害の影響が検討されている。同系腫瘍 5T2 又は 5T33 による進行性多発性骨髄腫が定着した C57BL/KalwRij マウスへの組換え型 OPG (Fc-OPG) の投与によって、多発性骨髄腫誘発性の骨量減少及び溶骨性病変が抑制された (Croucher et al, 2001)。Fc-OPG によって多発性骨髄腫誘発性骨病変が抑制される機序はマウスの固形癌骨転移モデルについて先に述べた機序と同じ、すなわち腫瘍に誘導される破骨細胞形成の抑制であると推定された。多発性骨髄腫増殖の進行を遅延させる RANKL 阻害の効力は、血清パラプロテイン及び骨髄内多発性骨髄腫細胞の両者の減少、さらには多発性骨髄腫の担がん動物の生存期間の有意な改善にて示された (Vanderkerken et al, 2003)。加えて、Hu/SCID 多発性骨髄腫モデルを用いた 2 試験は、RANKL 阻害 (RANK-Fc による) によって腫瘍誘発性の骨溶解と腫瘍組織量の両者 (血清パラプロテイン値及び組織学的検査によって測定) が軽減された (Pearse et al, 2001、Yaccoby et al, 2002)。

2.4 作用機序

RANKL は、骨芽細胞によって生成され、破骨細胞の最終分化、活性化、及び生存において主要な役割を果たす TNF スーパーファミリーたん白質である (Lacey et al, 2000、Lacey et al, 1998)。RANKL 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

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

周囲に放出される可能性がある (Ikeda et al, 2001)。マウスにおいて、組換え型 RANKL は高カルシウム血症、骨吸収の促進、及び骨粗鬆症を引き起こす (Lacey et al, 1998)。RANKL はまた、単離成熟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)。

前述の通り、OPG は可溶性の内因性 RANKL 阻害剤である。組換え型 OPG は、霊長類、ラット、及びマウスなどの種々の動物種において RANKL 阻害に有効である。デノスマブも RANKL を認識するため、その作用機序は OPG と類似している。したがって、組換え型 OPG (例えば OPG-Fc 又は Fc-OPG) は、骨疾患の各種非臨床モデルにおいて RANKL 阻害の薬力学的メカニズムを検討するためのサロゲート分子として使用されてきた (図 2-2)。

OPG は、110 kD、内因性、分泌型の糖たん白質の二量体である (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 欠損マウスは重度の骨粗鬆症を呈する (Bucay et al, 1998)。組換え型 OPG を動物に投与することでも、破骨細胞の抑制による骨吸収抑制が見られ (Simonet et al, 1997)、これはデノスマブと一致した作用機序である。

骨吸収は、破骨細胞の動員又は活性化の抑制、あるいはその寿命を短縮させることによって阻害できる。OPG は破骨細胞の最終分化を阻害し (それによって成熟破骨細胞プールに影響を及ぼし)、また成熟破骨細胞の活性を阻害する (Simonet et al, 1997)。さらに、OPG は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)。

種々の骨疾患の非臨床モデルにおいて、組換え型 OPG は想定された薬理学作用を示した (Kearns et al, 2008)。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)、様々ながんのモデルにおける腫瘍誘発性の破骨細胞形成並びにそれに引き続く骨溶解を抑制し、さらには、骨転移の定着を抑制し、定着した骨腫瘍進行も抑制した (Roodman and Dougall, 2008)。多発性骨髄腫を定着させたげっ歯類に RANKL 阻害剤である Fc-OPG を投与したところ、腫瘍による破骨細胞形成及び溶骨性病変が抑制され、また多発性骨髄腫の進行が抑制された (Vanderkerken et al, 2003)。OPG-Fc 又は RANK-Fc による RANKL 阻害は結腸 C26 腫瘍 (Morony et al, 2005) 又は肺腫瘍 (Oyajobi et al, 2001) の担癌マウスにおける HCM を抑制することも示されている。骨転移によって生じる病変の様式に関して、RANKL 阻害は溶骨性 (Zheng et al, 2007a, Feeley et al, 2006)、造骨性 (Whang et al, 2005, Zhang et al, 2003)、溶骨性と造骨性の混合型 (Sangai et al, 2008, Zhang et al, 2001) の腫瘍の進行を抑制した。これら各々の実験において、骨腫瘍の進行の減少は破骨細胞の数又は活性の減少と関連していた。また、OPG は PTHrP 及び IL-1 β (Morony et al, 1999) などの各種骨吸収促進物質によって誘発される高カルシウム血症を減少させ、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 (Kong et al, 1999a) を防ぐ上で有効であった。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

デノスマブはげっ歯類の RANKL を認識しないこと、huRANKL KI マウスはがんモデルには適していないことから、骨転移や多発性骨髄腫といったがん誘発性の骨病変における RANKL 経路の主薬力学及び RANKL の作用機作をさらに理解するうえで、げっ歯類にて組換え型 OPG-Fc を用いた検討は妥当である。

以上より、RANKL の阻害とそれに伴う破骨細胞形成の抑制は、多種の転移性腫瘍によって生じる様々な骨病変に対して有用である可能性がある。

デノスマブ

3. 副次的薬理試験

RANK/RANKL 経路は主に破骨細胞の形成、機能、及び生存を制御する。しかしながら、RANK/RANKL は免疫細胞にも発現しており、血管の生物学に影響を及ぼすとの仮説が立てられている。本項では得られた実験データ、文献について考察する。さらに、泌乳時の乳腺発達、体温調節、新生仔歯牙萌出、骨成長に対する RANKL 阻害の影響について考察する。

非臨床モデルに基づいた考えを以下に要約する。

- RANK/RANKL 経路はマウスの初期胚形成中の免疫系の発生の特定の局面において不可欠であった。
- RANKL は成獣の免疫系の一部の細胞に発現しており、*in vitro* 活性を示したが、多岐に渡る *in vivo* 免疫モデルにおいては、RANKL による免疫抑制は認められなかった。
- マウス皮膚の UV 光誘発免疫抑制が RANKL 阻害によって抑制されることが示されているが、種々のモデルにて皮膚免疫に対する影響を及ぼさなかった。
- ホルモン及び発がん物質によって惹起される乳房腫瘍のマウスモデルにおいて、RANKL 阻害は乳房腫瘍の形成を遅延させた。
- 血管新生の刺激又は抑制への RANK/RANKL の影響に関しては一貫したデータが得られていない。
 - ただし、血管新生が関与することが明らかになっている同系及び異種移植モデルにおいて、RANKL の薬理的阻害によって腫瘍増殖が抑制された。
- RANKL 阻害により血管疾患に対する有害な影響はないことが示された。
- RANK/RANKL シグナリングによって授乳のための乳腺の発達が刺激され、RANKL 阻害によってホルモンにより誘発される乳腺上皮の増殖が抑制された。
- RANK/RANKL 阻害に伴い、新生仔ラットの長骨成長が抑制され、臼歯萌出が抑制された。

3.1 免疫細胞での RANK 及び RANKL の発現とノックアウトマウスの観察結果

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共通系統の骨髄由来の成熟樹状細胞に限定して発現している (Anderson et al, 1997、Choi et al, 2001、Wong et al, 1997a)。遺伝子欠損げっ歯類を用いた研究において、RANK/RANKL 経路の阻害効果が評価されている。RANK 及び RANKL は胚形成中の末梢リンパ節の形成に不可欠である。RANK 又は RANKL の欠損したマウスは正常な樹状細胞を有し、パイエル板を含む正常な粘膜関連リンパ組織が保たれていたが、他のすべての末梢リンパ節を欠き、骨髄由来の破骨細胞も欠損していた (Kong et al, 1999b、Dougall et al, 1999)。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、RANK 又は RANKL 欠損動物と同様に末梢リンパ節の形成不全が認められた。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 (試験報告書 112197)。In vitro

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

混合リンパ球反応では RANKL によって樹状細胞の寿命が延長し、樹状細胞刺激による T 細胞増殖が増強したと報告されている (Anderson et al, 1997)。また、OPG ノックアウトマウスでは、おそらく、樹状細胞上の RANK/RANKL の相互作用が増強されたことにより、樹状細胞の機能が亢進していた (Chino et al, 2009)。In vivo では、RANKL ノックアウトマウスは表皮ランゲルハンス細胞密度の低下を示した (Barbaroux et al, 2008)。これらの知見にもかかわらず、RANK 又は RANKL が完全に欠如した条件でも、樹状細胞及びマクロファージは骨髄性前駆細胞からの正常な系列コミットメント、分化、機能的成熟が可能であった (Kong et al, 1999a, Dougall et al, 1999)。RANKL 欠損マウスに T 細胞依存性抗原であるキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) を免疫接種したところ、胚中心の正常な形成がおきた (Kim et al, 2000)。さらに、後に詳述するように、薬理的 RANKL 阻害後、宿主抵抗性モデルにおいて正常な応答が開始され (Stolina et al, 2003, Miller et al, 2007, Bachmann et al, 1999)、成熟げっ歯類 (Stolina et al, 2003, Stolina et al, 2007) 及び非ヒト霊長類の両者において新生抗原曝露に対して応答し、免疫系の能力がインタクトであることが様々な免疫応答惹起モデルのデータにて示されている。これらデータと、その他の後述するモデルにおけるデータは、デノスマブ、あるいはデノスマブのサロゲートである OPG-Fc 又は RANK-Fc などを用いて得られた。デノスマブとは異なり、これらサロゲート RANKL 阻害剤は、マウス及びラットの両方で効果を示し、骨吸収を阻害する機序はデノスマブと類似している (Kostenuik et al, 2009)。

3.1.1 ノックアウトマウスで観察されるリンパ節形成不全並びに B 及び T 細胞発達の不全

妊娠約 14 日目のリンパ節の胚発生期において、RANK 及び RANKL がリンパ節 $CD3^-CD4^+CD45^+$ 「インデューサー」細胞の分化に必須のメディエーターであることがノックアウトマウス解析によって示唆されている (Mebius, 2003)。これらの動物では、リンパ球の発生及び分化における変化も認められる (Kong et al, 1999b)。例えば、RANKL 欠損マウスでは初期 B 細胞発生の変化 ($B220^+CD43^+CD25^-$ プロ B 細胞から $B220^+CD43^-CD25^+$ プレ B 細胞への分化の異常) 及び T 細胞発生の変化 ($CD44^-CD25^+$ 前駆細胞から $CD44^-CD25^-$ 胸腺細胞への初期 T 細胞分化の減少を伴う胸腺細胞充実性の低下)、脾臓の細胞充実性の変化を伴わない脾臓サイズの増大、及び歯牙萌出の阻害が確認されている (Kong et al, 1999b)。RANK ノックアウトマウスでも、B 細胞発生の変化がみられ、脾臓内の成熟 B 細胞が 50% 減少する。しかし、胸腺サイズ (体重補正值) 又は胸腺細胞の成熟に差はなかった。RANK 又は RANKL 欠損動物におけるリンパ球欠損について検討するため、Jacquin らは RANK 欠損脾臓細胞を致死量放射線照射した同系マウスに移入し、B 細胞、T 細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、又は樹状細胞集団に有意な変化はないことを造血器官由来の RANK 欠損細胞のフローサイトメトリ分析によって示した (Jacquin et al, 2005)。これらのデータから、RANK ノックアウトマウスで認められたリンパ球発生変化は、造血細胞の内因性の異常よりも、高度の大理石骨病動物においては適切な骨髄微小環境が存在しないことが原因である可能性がある。

デノスマブ

3.1.2 薬理的 RANKL 阻害剤を投与した成熟マウスにおけるリンパ節発生、基礎免疫パラメータ、抗原応答の解析

RANK又はRANKL欠損マウスの観察結果からは、主な免疫異常（末梢リンパ節形成不全及びリンパ球不全）は初期胚発生の期間中に発現することが示唆される。成熟げっ歯類の免疫パラメータに対するRANKL阻害の影響を、OPG過剰発現トランスジェニック動物を用いて、あるいは組換え型OPGもしくはRANK-Fcをマウスへ投与してRANKLを薬理的に阻害して評価している。RANK又はRANKL欠損動物とは異なり、リンパ節形成前である妊娠 11 日目（Mebius, 2003）から子宮内でOPGを高発現し、RANKLが阻害されているトランスジェニックラットにおいては、妊娠 19 日及び成熟後のリンパ節、脾臓、胸腺は正常であり、歯牙萌出も可能であった。しかし、骨量が上昇しており、胎仔期にRANKLが阻害されていることが確認された（Stolina et al, 2007）。このレベルのOPG過剰発現は骨量を増加させるが、正常なリンパ節の発達を妨げることは無かった（Capparelli et al, 2003）。成熟OPGトランスジェニックラット及びマウスにおいて、自然免疫応答及び液性免疫応答の変化を試験するための免疫応答惹起（例：オキサゾロンに対する接触過敏症、T細胞非依存性抗原ニューモバックス [Pneumovax] に対するIgM反応、T細胞依存性抗原KLHに対するIgG反応、又はリポ多糖 [LPS] に対するサイトカイン反応）を実施しても、野生型対照動物と比較して有意な機能的変化は認められなかった。また、抗原特異的記憶T細胞の産生及び機能を、免疫処置の 21 日後にCD4⁺及びCD8⁺ T細胞数並びにKLH存在下での増殖を指標に測定したとき、OPGトランスジェニックマウスにて異常は見られなかった（Stolina et al, 2007）。マウス又はラットのOPG過剰発現トランスジェニックによってRANK/RANKLシグナリングを阻害した結果、野生型の同腹仔と比較し、リンパ節形成又はリンパ球機能、全身免疫グロブリン値、あるいはex vivoリンパ球増殖の異常はみられなかった（Simonet et al, 1997、Stolina et al, 2007）。

OPG トランスジェニック動物での観察結果と同様、成熟マウスへの組換え型 OPG-Fc 投与による薬理的 RANKL 阻害にて免疫抑制作用は認められなかった（Stolina et al, 2003）。その理由として、ハプテン、オキサゾロンに対する接触過敏症などの細胞性反応に対して影響が無かったこと、肉芽腫形成及び微生物感染後の感染量（後述）に対して影響が無かったこと挙げられる。OPG-Fc を投与したマウスは抗原曝露に反応し、対照たん白である Fc を投与したマウスと比較したところ、T 細胞依存性抗原 KLH に対する IgM 及び IgG 応答の増強を含むいくらか亢進した抗 KLH 抗体反応を示した。T 細胞非依存性抗原 Pneumovax に対する IgM 産生も、OPG-Fc 投与動物では対照たん白である Fc と同等あるいはそれ以上であった（Stolina et al, 2003）。以上の成熟マウスでのデータによると、細胞性及び液性免疫応答は RANKL 阻害によって抑制されないことを示唆している。

3.2 げっ歯類宿主抵抗性モデルにおける薬理的 RANKL 阻害

組換え型RANKL阻害剤であるRANK-Fc又はOPG-Fcの薬理的用量をマウスに投与すると、げっ歯類宿主抵抗性モデルにおける免疫応答はRANKL阻害によって攪乱されないことが示

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

されている (Stolina et al, 2003、 Miller et al, 2007)。例えば、インフルエンザウイルス感染に対する応答へのRANKL阻害の影響がマウスで評価されている。マウスにプラセボ、デキサメタゾン、又はRANKL阻害剤のRANK-Fcを投与した後、インフルエンザウイルスを感染させた (Miller et al, 2007)。組換え型RANK-Fc (RANK細胞外領域とFc領域との融合たん白質) はOPGと類似した様式でRANKLを阻害するため、破骨細胞の形成、機能、生存を抑制する (Miller et al, 2007)。プラセボ又はRANK-Fc投与動物は同程度のウイルス排除、細胞傷害性T細胞活性化、抗インフルエンザ抗体形成を示したのに対し、既知の免疫抑制剤であるデキサメタゾンを投与した動物ではウイルス排除が減弱するとともに、抗インフルエンザ特異的抗体の出現が低下した。この結果は、ウイルス感染に対する自然免疫及び獲得免疫の機能が正常であることを示す。カルメットゲラン桿菌 (ウシ型弱毒結核菌、BCG) 感染応答に対するRANKL阻害の影響を評価するために、RANKL阻害剤であるOPG-Fcを感染7日後から14日後までマウスに投与した (Stolina et al, 2003)。この投与方法では、肝損傷、肉芽腫形成、BCG感染量を指標としたBCG感染に対する宿主反応に変化はなかった。リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) を感染させた正常及びCD40欠損マウスでのRANKL阻害の影響が評価されている (Bachmann et al, 1999)。RANK-Fcを投与した正常マウスは対照マウスと同等のLCMV特異的IgG反応を示し、同程度の数の正常構造の胚中心を形成し、それゆえにRANK/RANKL相互作用はT細胞とB細胞の共役において重要な役割を果たすものではないことが示唆された。さらに、RANKLを阻害してもLCMV特異的急性細胞傷害性T細胞 (CTL) 反応に影響はなく、正常CD4⁺T細胞反応は変化しなかった。これに対してCD40欠損マウスでは正常な胚中心反応を開始することができず、LCMV特異的IgG反応の低下にみられるように、免疫グロブリンのクラススイッチが不全であった。このため上記の感染性病原体による免疫系応答惹起のモデルにおいて、免疫系の正常な反応の開始はRANKLに依存していない。

3.3 げっ歯類実験的自己免疫モデルにおける薬理的 RANKL 阻害

RANKL 阻害の免疫及び炎症パラメータに対する影響は様々な実験的自己免疫モデルにおいても評価されている。重度の関節炎症、骨及び軟骨破壊、並びに運動障害を特徴とする T細胞依存性のラットアジュバント関節炎モデルにてOPG投与によるRANKL阻害が評価された (Kong et al, 1999a)。疾患の開始時にOPGを投与したとき、骨及び軟骨破壊は抑制されたが、免疫学的反応に変化はなく、対照動物と同じ広範囲の単核細胞浸潤及びパンヌス形成が確認された。このことから、T細胞が介在する関節内の炎症に対する影響はないと考えられた。同様に、RANKL阻害による骨及び関節の保護作用は容易に明らかであるが、炎症性関節炎のラットにおいて、関節腫脹又は免疫メディエーターに変化は認められなかった (Kong et al, 1999a、Stolina et al, 2005、Romas et al, 2002)。実験的関節炎モデルにおける上記のデータから、RANKL阻害が予測通りに薬学的効果として破骨細胞抑制を示し、炎症にて誘発される骨びらんの抑制を示したが、免疫又は炎症反応に対する影響はなかった。

免疫不全のC.B.17マウスにCD4⁺CD45RB^{high} T細胞を移植して得られるマウス炎症性腸疾患

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

モデルにてRANKL阻害の影響が評価された (Byrne et al, 2005)。CD4⁺CD45RB^{high} T細胞を投与したマウスは骨減少症及び大腸炎を発現した。Fc-OPGの予防的投与によってRANKLを阻害したところ、このモデルの骨密度は増加したが、消化管炎症又は骨髄へのTNF- α を発現する炎症性細胞の浸潤に対する影響はなかった。別の免疫不全動物での大腸炎モデルにおいて、*in vitro*ではCD4⁺CD25⁺制御性T細胞によるCD4⁺T細胞の抑制は抗RANKL抗体投与によって阻害されなかったが、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞によるCD4⁺CD45RB^{high} T細胞介在大腸炎の抑制は、抗RANKL抗体投与によって阻害された (Totsuka et al, 2009)。さらに別の免疫不全マウス大腸炎モデル (IL-2 欠損マウスにおける自然発生性大腸炎) では、Fc-OPGを投与したところ大腸炎の発現が抑制された (Ashcroft et al, 2003)。上記の研究において、腸管炎症の惹起因子は細胞移植 (CD4⁺CD45RB^{high} T細胞)、あるいは主要な免疫活性分子 (すなわちIL-2) の完全な欠損であり、これらの異なるモデル間で一見矛盾する結果が得られている。したがって、消化管免疫におけるRANK/RANKL経路の役割を最も反映する解釈が依然として明確でない。

皮膚炎症中に角化細胞にてRANKL発現が増加することが1件報告されている (Loser et al, 2006)。角化細胞特異的プロモーターでRANKLを発現するRANKLトランスジェニック動物において、RANKLの過剰発現によって皮膚接触過敏症反応が低下し、同時に皮膚のCD4⁺CD25⁺制御性T細胞が増加した (Loser et al, 2006)。この研究では、UV光によってマウス角化細胞中のRANKLが誘導され、その反応はCD4⁺CD25⁺制御性T細胞の増加及び皮膚免疫 (DTH: delayed-type hypersensitivity, 遅延型過敏症) 反応の低下と相関していた。マウスのUV光に誘発される接触過敏症の低下はRANKL阻害によって抑制された (Loser et al, 2006)。これに対して、OPGトランスジェニックマウスと野生型同腹仔にてオキサゾロンで惹起された耳介の厚さの増加量に差が無く (Stolina et al, 2007)、OPGトランスジェニックマウスのDTH反応が影響されないことが示されている。同様に、マウスにOPG-Fcを短期間投与してもハプテンに対するDTH反応への抑制又は増強は確認されなかった。一方、細胞傷害性Tリンパ球抗原 4 (CTLA4) とFcとの融合たん白質 (CTLA4-Fc) でDTH反応が明らかに抑制された (Stolina et al, 2003)。

同種異系脾島細胞移植マウスモデルにおいてRANKLの役割が検討されている (Wojtuszczyzn et al, 2009)。*In vitro*にてCD3/CD28 刺激によってCD4⁺T細胞上のRANKLの発現が増加するが、RANKLを阻害しても混合リンパ球の増殖を有意に変化させることはなく、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、長期間投与では同種異系移植での生存が延長した。

3.4 正常免疫げっ歯類がんモデルにおける薬理的 RANKL 阻害

骨腫瘍及び骨転移の薬理的モデル (第 2.3 項参照) にて骨における腫瘍の生着及び増殖に適した環境を確立する際の RANKL の役割が論議されている。得られている実験データは、

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

RANKL による破骨細胞の活性化によって骨吸収が増強し、腫瘍の生存を支援する増殖因子の放出に至るというモデルの裏付けとなっている。これらのデータは免疫不全マウスにヒト腫瘍を異種移植しているため、腫瘍増殖に対する免疫系の潜在的寄与が明らかにされていない。免疫不全マウスに異種移植したヒト腫瘍の抗腫瘍免疫の評価における有用性は限定的であるため、免疫系及びがんを研究するために同系マウスを用いる意義は十分に立証されている。したがって、正常免疫マウスモデルにて、多発性骨髄腫、ホルモン及び発がん物質に誘発された乳腺腫瘍形成、及び黒色腫の骨転移のモデルに対する RANKL 阻害の効果が評価された。Jones らは、C57BL/6 同系マウスに移植した B16F10 黒色腫細胞が、骨、卵巣、副腎、及び脳に転移することを示した (Jones et al, 2006)。黒色腫の担癌マウスに OPG-Fc (1 mg/kg/日) を投与したところ、腫瘍移植 17 日後の骨における黒色腫の腫瘍組織量が有意に減少した。黒色腫細胞の卵巣、副腎、脳への転移は、溶媒コントロール群と OPG-Fc 投与動物とで違いがなかった。また、マウスに OPG-Fc を投与したところ脊椎の腫瘍組織量が減少し、17 日目の時点で溶媒投与マウスにて 100% 観察される麻痺症状の発現率が低下した。多発性骨髄腫の同系マウスモデル (C57BLK/LwRij) においても、RANKL 阻害によって腫瘍組織量が減少し、それに伴って生存率も増加した (Vanderkerken et al, 2003)。Fc-OPG 投与 (25 mg/kg、週 3 回) によって多発性骨髄腫の腫瘍組織量 (フローサイトメトリによって測定) が減少し、腫瘍移植後 28 日目において、腫瘍組織量のサロゲートである血清パラプロテインの減少と関連していた。また、Fc-OPG 投与によって病的状態の開始も 25% 遅延した。

乳腺上皮細胞における RANK と RANKL の発現は妊娠期間中、厳密に制御されており、RANKL は乳腺組織にてプロゲステロン、プロラクチン、PTHrP によって制御されている (Fata et al, 2000)。RANKL や RANK ノックアウトマウスにおいては乳腺の発達は妊娠まで正常であり、妊娠すると、母乳の分泌に必要な小葉胞巣状構造の形成不全となる。MMTV プロモーターを用いた乳腺にて RANK を過剰発現す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、その結果、乳分泌小葉腺胞の分化異常を生じた (Gonzalez-Suarez et al, 2007)。次にホルモン及び発がん物質によって惹起されるマウス癌モデルにおいて、RANK の過剰発現が乳腺の増殖、乳腺腫瘍形成へ与える影響を調べることを目的として実験を実施した。加えて、MMTV-RANK と野生型マウスにおいて、乳腺の前癌病変又は腫瘍性病変の形成、乳腺上皮細胞の増殖、サイクリン D1 の発現に対する RANKL 阻害の効果を評価した。免疫系の正常な MMTV-RANK マウス及び野生型 C57BL/6 マウスにて、マウス RANK-Fc (Miller et al, 2007) を用いて RANKL を薬理的に阻害した。組換え型 RANK-Fc は OPG と類似した様式で RANKL を阻害し、それゆえに破骨細胞形成、機能、生存を抑制した。

腫瘍形成に対する乳腺での RANK 過剰発現の影響を調べるために、プロゲステロンホルモン誘導体 (酢酸メドロキシプロゲステロン [MPA]) と発がん物質 (ジメチルベンズアントラセン [DMBA]) の併用処置によって未交尾マウスにて腫瘍を形成させる、確立された乳房

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

発がんモデルを用いた。野生型マウスは MPA と DMBA 処置によって、DMBA 最終処置後、中央値 129 日で乳房腫瘍を形成した。MMTV-RANK トランスジェニックマウスでは野性型と比較して明らかに乳房腫瘍の形成が亢進しており中央値が 85 日に短縮していた(試験報告書 R20090211)。MMTV-RANK マウスの乳房腫瘍形成亢進は乳房前癌病変、乳腺上皮細胞の増殖、乳腺上皮のサイクリン D1 の上昇と相関していた(試験報告書 R20090211)。

RANKL 阻害の乳腺腫瘍形成への影響を調べるために、MPA と DMBA で処置したマウスに 10 mg/kg の RANK-Fc を投与した(皮下投与、DMBA 処置開始時から試験終了まで継続的に週 3 回)。MMTV-RANK マウスに RANK-Fc を投与すると触知可能な乳腺腫瘍が形成されるまでの中央値が有意に遅延した(DMBA 最終投与後から RANK-Fc で 207 日、PBS で 85 日)。RANKL 阻害による乳腺腫瘍形成の遅延は腺癌の発現頻度の減少と相関していた。RANK-Fc による RANKL 阻害によって、DMBA 最終投与後から 4 週又は 7 週間で MMTV-RANK マウスの前癌病巣の数が減少し、初期の段階においても MMTV-RANK マウスの乳腺上皮細胞の増殖、サイクリン D1 の発現が低下していた(試験報告書 R20090211)。前癌病変の数の減少、乳腺上皮細胞と前癌病変の増殖低下(BrdU 標識による解析)が触知可能な腫瘍を有するマウスの剖検にて観察された。RANK-Fc 処置後には新生物の増殖低下の傾向がみられたが、結果は有意でなかった。しかし、考慮すべき点として、様々な腫瘍の組織像が存在し、その比率は投与群間でばらついており、得られた腫瘍増殖比の平均値がばらついていることに関係している可能性がある。以上の結果は、発がん過程において RANKL 阻害が乳腺上皮細胞の増殖を低下させ、乳腺における腫瘍の誘導と進展を減少させることを示唆している。

トランスジェニックでないマウスにおいて、乳房腫瘍形成に対する RANKL 阻害の効果を調べるために、上記のスケジュールで MPA と DMBA とで処置した野生型のマウスに 10 mg/kg の RANK-Fc を投与した。野生型 C57BL/6 に RANK-Fc を投与すると乳房腫瘍の頻度が有意に減少した。溶媒を投与した野生型マウスの 100% (51 例中 51 例) が乳房腫瘍を形成する時点では、RANK-Fc 処置した野生型マウスの 12% (33 例中 4 例) のみに腫瘍が検出された。さらに、野生型のマウスにおいても RANK-Fc 投与開始から早期のうちに乳腺上皮細胞の増殖とサイクリン D1 を高発現している細胞の比率が減少していた(試験報告書 R20090211)。触知可能な腫瘍を有するマウスの剖検にて、RANK-Fc 処置群では乳腺上皮細胞と前癌病変の増殖抑制の傾向がみられたが、RANK-Fc 処置群のサンプル数が限られ、癌組織の型が変化していたことが交絡因子となっている可能性がある。これらのデータから、MMTV-RANK マウスの知見と同様に、野生型マウスの乳腺においても、発がん過程の RANKL 阻害が乳腺上皮細胞の増殖を低下させ、腫瘍形成を顕著に抑制し、進行を遅延させることが示唆された。

以上の結果より、ホルモン及び発がん物質依存的なマウスモデルにおいて、乳腺上皮細胞の RANKL 依存的なシグナルが増加すると乳腺上皮細胞の増殖が高まり、前癌病変と腺腫の数が増加することが示された。ホルモン及び発がん物質処置後に、薬理的に RANKL を

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

(RANK-Fc を用て) 阻害すると、MMTV-RANK だけでなく野生型の C57BL/6 マウスにおいても乳房腫瘍の進展が減少した。RANKL 阻害による腫瘍形成の減少に先立って前癌病変の減少がみられ、ホルモン及び発がん物質によって誘発される乳腺上皮の増殖やサイクリン D1 の発現の即時かつ継続的な低下との関連性が認められた。

要約すると、RANKL 阻害剤(OPG-Fc 又は RANK-Fc)を免疫系が正常な成熟マウス(C57BL/6 又は C57BLKaLwRij バックグラウンド) に投与すると腫瘍形成、腫瘍増殖、及び転移が抑制された。

3.5 血管新生

OPG 及び RANKL の血管新生に対する直接的な影響も、*in vitro* 及び *ex vivo* モデルを用いて報告されている。結果は研究間で矛盾しており、OPG によって血管新生が抑制されるとの報告もあれば増強されるとの報告もある。一方、RANKL についても血管新生の阻害と促進の両者が報告されている。McGonigle らによる論文 2 報では、RANKL 又は OPG の血管新生機能に対する影響が研究された (McGonigle et al, 2008, 2009)。ラット大動脈リング標本又はヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた *in vitro* 研究から、RANKL が微小血管の形成数を減少させ、HUVEC のアポトーシスを誘導することが示唆された。基礎微小血管形成 (基礎培地中の培養ラット大動脈リング標本) 及び血管内皮増殖因子 (VEGF) 誘発微小血管形成の両者に対し、RANKL による抑制作用が観察された。逆に、OPG を添加したところラット大動脈リングアッセイでの微小血管形成が増強し、HUVEC 内の生化学的シグナリング経路 (pERK, pAKT) が刺激された。別の研究では、OPG 投与によって増殖因子除去後の HUVEC 又はヒト皮膚由来内皮細胞 (HuDMEC) の数が増加した (Cross et al, 2006)。この論文では HuDMEC の内皮管腔形成を刺激する OPG の効力も報告されている。またヒト微小血管内皮細胞 (HMVEC) に OPG を添加したところ細胞の増殖及び遊走が約 2 倍に増加した (Kobayashi-Sakamoto et al, 2008)。Cross ら (Cross et al, 2006) 及び McGonigle ら (McGonigle et al, 2008, 2009) とは異なり、Cackowski ら (Cackowski et al, 2010) の最近の研究によると、OPG は *ex vivo* マウス中足血管新生アッセイで血管新生抑制作用を示すことを示している。このアッセイでは OPG の添加によって基礎血管新生分岐が用量依存的に阻害された。血管新生を阻害する OPG 濃度にて、RANKL が阻害され、期待された薬力学効果が見られるかを示すために、内部対照 (骨吸収阻害) 実験として、破骨細胞活性の指標である TRAP 値をみたところ、有意に低下した。

他の公表文献では、*in vitro* と *in vivo* の両者で RANKL が血管新生を阻害するよりもむしろ刺激すると報告している。例えば、*ex vivo*、*in vitro*、*in vivo* アッセイ系で RANKL による血管新生刺激が示されている (Min et al, 2007)。マウス大動脈リングアッセイでは RANKL によって 6 日目に微小血管萌出が有意に誘導された。同様の RANKL による刺激作用は *in vivo* マウスマトリゲル血管新生アッセイにて CD31⁺ 内皮細胞の計測によって観察されており、マウス角膜

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

ポケット法にてもin vivoで確認されている（5倍の増加）。同じグループによるニワトリ漿尿膜（CAM）法を用いた研究では、RANKLによって新生血管形成が顕著に刺激された（Kim et al, 2002）。この研究においては、ヒトRANKLのニワトリRANKへの結合能が明確でないという問題点がある。ヒトRANKLは成熟ニワトリ破骨細胞を活性化すると報告されているが、ニワトリマクロファージからの破骨細胞形成作用を示さなかった（Boissy et al, 2001）。このため、ヒトRANKLのニワトリRANKへの結合は最適でない可能性が示唆される。ただし、ヒトRANKLはマウスRANKに対しヒトRANKと同等の親和性で結合し、マウスマトリゲルブラグアッセイでもヒトRANKLによるin vivo血管新生誘導能が確認されている（Kim et al, 2002）。

RANKLの刺激作用に関連して、細胞を用いたin vitro実験の記述がなされている。Minら及びKimらは、in vitroにて内皮細胞に対する刺激作用を検討した（Min et al, 2007、Kim et al, 2002）。RANKLによってHUVECの内皮一酸化窒素合成酵素（eNOS）活性が増加した。HUVECにおいて、用量依存的にRANKLが生化学的シグナリング（細胞外シグナル制御キナーゼ〔ERK〕リン酸化を含む）、細胞遊走、及び増殖を刺激し、単回皮下投与で毛細血管管腔ネットワーク形成を誘発した。Minらの論文では、HUVECをVEGFで前処置するとERK活性化及び管腔形成に対するRANKLの効果が増強するとも報告している（Min et al, 2003）。

血管新生に対するOPGの影響をin vivoで検討した報告としては、全長OPGをヘパリン含有ハイドロゲル中にいれたもの（McGonigle et al, 2008）がある。また、げっ歯類において、VEGFと塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）によって誘導される血管新生への組換え型OPG-Fcの影響を調べた3試験がアムジェン社にて実施されている（試験報告書R2002266、R2002204、R2002267）。OPGをヘパリンハイドロゲルに混入させてマウスに移植すると、CD31陽性血管染色で評価したところ、移植周囲の新生血管形成が2倍に増強した（McGonigle et al, 2008）。観察された影響は、VEGFのみで見られるものより有意に低かった。別の3試験として、ラット角膜ディスク移植モデルにおけるVEGF又はbFGF誘発新生血管形成が実施された（試験報告書R2002266、R2002204、及びR2002267）。このうちVEGF誘発角膜血管新生の最初の研究では、OPG-Fc（4 mg/kg/日、皮下投与）をマウスに全身投与したところ、溶媒コントロール群と比較して7日後の血管数において、統計的に有意な増加（ $p < 0.007$ 、2.2倍）が誘発された（試験報告書R2002266）。反復実験では、同じ投与量及びスケジュールでOPG-Fcを全身投与したところ、溶媒コントロール群と比較して、VEGF誘発血管新生反応に有意差はなかった（1.1倍増加）（試験報告書R2002204）。同様に、OPG-Fcを全身投与したところ（4 mg/kg/日、7日間）、溶媒コントロール群と比較してbFGF誘発血管新生反応に対する影響（0.8倍増加、有意ではない）はなかった（試験報告書R2002267）。

3.6 腫瘍血管新生

腫瘍増殖における血管新生に対するRANKL阻害の影響に関し、RANKL阻害剤（例：OPG-Fc、RANK-Fc）を用いて複数の非臨床試験が実施されており、各試験においてRANKL

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

阻害による腫瘍増殖抑制、腫瘍進行抑制、あるいはモデルによっては腫瘍への無影響が確認されている。OPG-Fc 処置による骨の腫瘍組織量減少の結果は、効力を裏付ける試験の項（第 2.3 項参照）に記載されており、試験報告書 R2006160、R2006161、R20070953、R20080161、R20080162、R20080083、R20070963、R20080310、R20080331、及び R20080332 がそれに該当する。これらの試験で使用したマウス癌モデルの多くは組織学的観察又は血管新生の薬理的阻害によって確認されているように、骨腫瘍の進行に腫瘍誘発性の血管新生が随伴するモデルである。例えば、乳癌 MDA-MB-231 骨転移モデルでは、マウスの骨への腫瘍細胞の侵入によって局所 VEGF が増加し、血管新生形成が増強される（Shimamura et al, 2005）。MDA-MB-231 細胞はラットの骨の新生血管形成を誘発し、MDA-MB-231 担癌動物にベバシズマブを投与すると腫瘍誘発性の血管新生が有意に抑制された（Bauerle et al, 2008）。効力を裏付ける試験の項（第 2.3.2.1 項参照）にて述べたように、OPG-Fc 投与によって MDA-MB-231 骨腫瘍の進行抑制が確認された（試験報告書 R2006161）。PC-3 前立腺癌骨転移モデルでは、他の転移部位と比較して骨での VEGF 及び bFGF 値の増加が確認されており、イマチニブを投与した担癌動物では骨腫瘍の発現率が低下し大きさが縮小した（Uehara et al, 2003）。同様に、PC-3 骨腫瘍の増殖は抗 VEGFR2 抗体の投与によって抑制された（Sweeney et al, 2002）。RANKL 阻害（OPG-Fc による）によって溶骨性骨病変が抑制されるとともに、骨腫瘍の進行が抑制された（試験報告書 R20080083 及び第 2.3.3 項参照）。C4-2B 造骨性前立腺癌骨転移モデルでは、PTK787（VEGFR チロシンキナーゼインヒビター）の投与によって前立腺癌の骨病変の進行が抑制され（Kitagawa et al, 2005）、RANKL 阻害は定着した C4-2B 骨腫瘍の進行を抑制することが示されている（Quinn et al, 2005、Woods Ignatoski et al, 2008）。多発性骨髄腫の 5T マウスモデルで血管新生を解析したところ、5T の多発性骨髄腫の進行に伴い骨の微小血管密度が増加することが示されており（Asosingh et al, 2004）、5T33MM モデルにて Fc-OPG 投与後に多発性骨髄腫の腫瘍増殖の進行が抑制された（Vanderkerken et al, 2003）。このように、骨腫瘍の進行の際に、腫瘍によって血管新生が随伴する、血管新生阻害処置に応答性を示すげっ歯類モデルにおいて、RANKL 阻害によって、骨腫瘍の進行抑制が観察された。したがって、これらのモデルは RANKL 阻害、血管新生、及び腫瘍進行の間の関係を調べるうえで適切であると考えられる。

3.7 血管石灰化とアテローム性動脈硬化

OPG ノックアウトマウスにおいては RANKL 活性が拮抗されていないため、中等度から重度の血管石灰化を示すことが報告されている（Bucay et al, 1998、Min et al, 2000）。逆に、デノスマブを含む組換え型 RANKL 阻害剤を投与すると血管石灰化が顕著に軽減することが複数の血管疾患動物モデルにて示されている（Price et al, 2001a、Morony et al, 2008、Finger et al, 2009、Helas et al, 2009）。また、RANKL の投与によって 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。一方で、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

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

られなかった（試験報告書 102090）。

これらの所見に基づく解釈は、破骨細胞を介する骨基質からのカルシウム及びリン酸塩放出によって血管石灰化が促進され、ビスフォスフォネートを含む骨吸収抑制薬によってこの放出を阻害すると血管石灰化が抑制される（Price et al, 2001b）ということである。この概念の更なる裏付けとして、OPG ノックアウト動物においては血管石灰化が増悪することが示されており、おそらくこれらの動物においては、RANKL 活性が拮抗されないために高水準の骨代謝がおきていることに起因している。OPG が欠損したアポリポたん白 E (ApoE) ノックアウトマウスではアテローム性動脈硬化症病変が増加した（Bennett et al, 2006）。マウスのアテローム性動脈硬化症モデルにおいて RANKL を阻害すると、血管石灰化が抑制され、プラークの安定性が向上したが、アテローム性動脈硬化症の病変進行、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、又は血漿コレステロール値に対する影響は伴わないことが示された（Morony et al, 2008、Ovchinnikova et al, 2009）。また、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）。さらに、デノスマブを 12 ヶ月間投与したサルに血管に病理組織学的異常は認められず（試験報告書 102090）、最大 16 ヶ月間投与したサルにおいても循環血中コレステロール値の変化は認められなかった（試験報告書 102090 及び 103981）。

したがって、血管疾患モデルによる実験データにて示されるように、デノスマブ又は RANKL 阻害一般によって血管疾患が促進又は増悪することを示唆する証拠は得られていない。

要約すると、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症に対する作用を示さないことが非臨床データから示唆される。

3.8 RANKL 及び RANK ノックアウトマウスで観察された授乳不全

RANK 又は 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 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の増殖が亢進し、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

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

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。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。以上、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。デノスマブのヒト乳汁中への移行は不明であるが、乳児において副作用が発現する可能性は否定できないため、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。

3.9 新生仔への影響

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 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 R[]0340 及び R20090282）。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

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たりす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。歯牙萌出に関しては、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 CSMI 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 を投与したときにのみ認められた。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

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

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）。当該試験では、前述の新生仔ラット試験（試験報告書 R 0340 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 CSMI 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 R 0340）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。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

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、あるいはカン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（CSMI 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 R██████0340）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。

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、骨髄内の骨梁増加に

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

より造血が影響を受ける可能性もある。なお、予想どおり、薬理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。

3.10 体温調節

RANK/RANKL 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、LPS 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、104105、及びモジュール 2.6.6) 。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。

3.11 骨折治癒

huRANKL KI マウスに大腿骨閉鎖性骨折を施し、その 2 日後からデノスマブ (10 mg/kg、週 2 回、皮下投与) 又はアレンドロネート (0.1 mg/kg、週 2 回、皮下投与) を投与して、骨折治癒を評価した (試験報告書 R-458)。各群のマウスを、骨折後 21 又は 42 日目のいずれかに屠殺した (15 例/群)。その後、骨折及び反対側の (骨折していない) 大腿骨をマイクロ CT 解析及びねじり試験に供した。21 日目に得られた骨折大腿骨の一部を用いて、破骨細胞に対する TRAP 染色などの組織学的評価も行った。

骨強度試験により、アレンドロネート及びデノスマブ両投与群の骨折大腿骨では、42 日目には、溶媒コントロール群と比較して骨強度の改善が認められた。溶媒コントロール群の骨折骨と比較しアレンドロネート投与マウスの骨折骨は、最大トルクの有意な増強を示した一方

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

で、デノスマブ投与マウスの骨折骨はねじり剛性の有意な増強を示した（表 2-7）。マイクロ CT 解析では、デノスマブ投与マウスの骨折骨の骨量比率及び BMC は、21 及び 42 日目のいずれにおいても、溶媒コントロール群の骨折骨と比較して有意に高値であり、また、42 日目における海綿骨骨梁幅はアレンドロネート及び溶媒コントロール群の骨折骨に比べて有意に高値であった。21 日目の骨折仮骨のマイクロ CT の再構成画像から、アレンドロネート及びデノスマブ投与群では、溶媒コントロール群と比較して仮骨がより大きいにもかかわらず、仮骨中の低石灰化領域は溶媒コントロール群よりも大きかったことが明らかになった（図 2-27）。また 21 日目に実施した定性的な組織学的解析によってこれらの低石灰化部位は未吸収の軟骨領域と一致することが示された。マイクロ CT の 3-D 再構成画像から、骨折後 42 日目までに、両投与群の仮骨組織は高度に石灰化した骨梁組織で占められ、また仮骨量はデノスマブ群で最も多く、続いてアレンドロネート投与群、溶媒コントロール群の順に少ないことが示された。TRAP 染色によって、デノスマブ群の仮骨中の破骨細胞はほぼ完全に消失し、一方でアレンドロネート投与群では、溶媒コントロール群と比較して破骨細胞数の減少が認められた。この所見は、OPG ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べて、骨折修復部位における軟骨組織の消失がより速やかであったという報告と合致するものである（Ota et al, 2009）。

表 2-7 骨折骨の骨強度データ

	Alendronate	Denosumab	Control
Post-fracture Day 21			
Max Torque (N·m)	0.0461 ± 0.0188*	0.0544 ± 0.0166	0.0502 ± 0.0121
Torsional Stiffness (N·mm ² /rad)	4515.34 ± 1918.15	6184.77 ± 1332.02 ^C	5133.41 ± 1892.51 ^C
Post-fracture Day 42			
Max Torque (N·m)	0.0752 ± 0.0343 * ^C	0.0661 ± 0.0227 ^C	0.0513 ± 0.0138
Torsional Stiffness (N·mm ² /rad)	8578.15 ± 3227.85 ^C	9249.96 ± 2957.62* ^C	6590.09 ± 2089.07 ^C

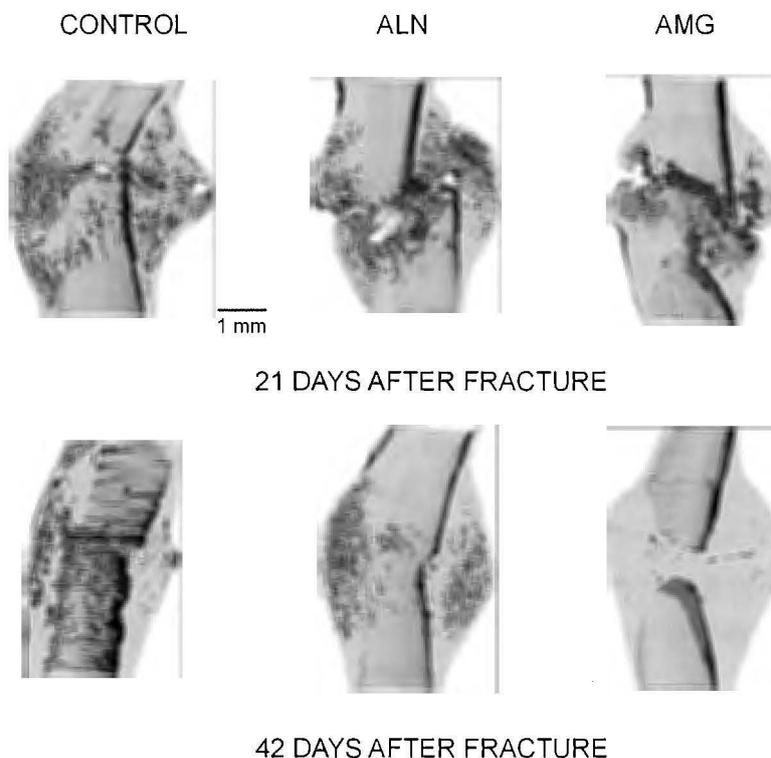
N = ニュートン、rad = ねじれ角

データは平均 ± 標準偏差を示す。同時点におけるアレンドロネート、デノスマブと溶媒コントロール群間の有意差は*で示す。C は骨折骨と反対側の非骨折骨間の有意差を示す。群間の有意差は、有意水準を p < 0.05 として二元配置分散分析及び Tukey HSD 法に基づき算定した。

出典: 試験報告書 R-158

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ



ALN=アレンドロネート、AMG= デノスマブ、CONTROL = 溶媒コントロール
マウスには骨折の2日後から溶媒、アレンドロネート又はデノスマブを投与した。骨折後21及び42日目にマイクロCTによって骨折の仮骨の3-D再構成画像を得た（前頭面断面図）。
出典：試験報告書 R-158

図 2-27 huRANKL ノックインマウスの骨折治癒の代表的マイクロCT画像

要約すると、アレンドロネート及びデノスマブによって軟骨の吸収及び骨折仮骨のリモデリングが遅延した。しかし、この作用によって骨折骨の骨強度が低下することはなかった。むしろ最大トルク及びねじり剛性などの骨強度は、溶媒コントロール群と比較して、いずれの投与群でも増強された。このことから、デノスマブ及びアレンドロネート投与動物において、骨折治癒中の投与によって、組織リモデリング及び軟骨吸収過程や形態に変化があるにもかかわらず、強度の回復に障害はみられなかったことが示唆される。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

4. 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的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、又は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、投与に起因した影響はみられなかった（試験報告書101606及びモジュール2.6.3、表4）。さらに、サル12ヵ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なかった（試験報告書102090及びモジュール2.6.7、表7B）。

ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャンネル遺伝子（hERG）によってコードされるK⁺チャン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ン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、カリウムチャンネルの受容体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、これらの分子は、hERGチャンネルを通過して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の原因が示唆されるような影響はみられなかった。

5. 薬力学的薬物相互作用

デノスマブの消失において、肝ミクロソーム代謝の関与がほとんど無視できる程度であることから、薬力学的薬物相互作用を評価する非臨床試験は実施しなかった。また、デノスマブのRANKLに対する特異性を考慮すると、化学療法及びホルモン療法などの進行がん治療に一般的に用いられる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。この裏付けとして、サルを用いたアレンドロネートからデノスマブへの治療切り替え試験において、それぞれの薬剤の薬力学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）。OPG-Fcについての非臨床的薬力学的薬物相互作用試験は実施されていないが、in vitroげっ歯類モデルにて抗腫瘍効果を調査するために実施された効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験において、OPG-Fcと化学療法剤（ドセタキセル）又はホルモン療法（タモキシフェン）との併用投与が実施されている（第2項及び第3項参照）。OPG-Fcとの併用投与において、薬物の抗腫瘍作用を打ち消すような相互作用は認められていない。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

6. 考察及び結論

以上、デノスマブは、RANKL に対する完全ヒト型 IgG2 モノクローナル抗体であり、RANKL がその唯一の受容体 (RANK) を活性化するのを抑え、それゆえに破骨細胞形成及び骨吸収が抑制された。

デノスマブはヒト RANKL と結合してヒト RANKL を阻害したが、マウス RANKL に対して結合や阻害を示さず、他のヒト TNF ファミリー (TNF- α 、TNF- β 、TRAIL、又は CD40L) とも結合しなかった。デノスマブは、ヒト及びヒト以外の霊長類では薬力学活性を示したが、ラット及びマウスでは示さなかった。

成熟 OVX カニクイザルの 16 ヶ月試験において、デノスマブ投与によって骨吸収及び骨形成を表す骨代謝マーカーの有意な低下が認められた。これらの反応は、海綿骨及び皮質骨の骨量及び骨密度の有意な増加、腰椎並びに大腿骨頸部及び骨幹部を含む複数の骨格部位における骨強度パラメータの増加に関連するものであった。骨強度パラメータは、デノスマブ投与の有無にかかわらず、解析したすべての部位で骨量パラメータ (BMC、BMD、骨面積) と高い相関を示し、骨基質の材質特性はデノスマブによって変化しなかったという解釈と一致した。

骨折治癒試験では、huRANKL KI マウスに閉鎖性片側性の大腿骨横骨折を施し、その 2 日後に、高用量のデノスマブ投与を開始した。デノスマブ投与マウスでは溶媒投与マウスに比べて、骨折仮骨内の破骨細胞数の有意な減少、仮骨体積及び骨塩量の増加、及び骨強度の維持又は改善が認められた。

代表的なビスフォスフォネートであるアレンドロネートからデノスマブへ投与を切り替えた場合の影響を検討した 12 ヶ月試験では、成熟 OVX カニクイザルに前半 6 ヶ月間アレンドロネート又はデノスマブを投与すると、血清カルシウム及び骨代謝マーカーの有意な低下が認められ、いずれの投与によっても複数の骨格部位において有意な BMD の上昇がもたらされた。アレンドロネートを前半 6 ヶ月間投与し、その後投与をデノスマブに切り替えた結果、1) デノスマブの初回投与後の血清カルシウムの低下は、薬剤未投与の動物における血清カルシウムの低下よりも軽度、2) 骨代謝マーカーは、6 ヶ月以降もアレンドロネートを継続投与した動物に比べて持続的に減少、3) BMD は、複数の骨格部位においてさらに増加し、12 ヶ月時点の BMD 値及び骨強度はアレンドロネートを継続投与した動物の値と同等かそれを上回った。

がんの試験に関して、RANKL が腫瘍誘発性の破骨細胞活性化に寄与しており、それゆえに腫瘍誘発性骨病変、骨転移の定着、及び進行を RANKL が促進するという仮説は、げっ歯類実験モデルにおける RANKL 阻害 (OPG-Fc 又は RANK-Fc を使用) によって裏付けられた。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

本文書に詳述した 2 種類の乳癌骨転移マウスモデルの薬理試験において、OPG-Fc は腫瘍誘発性の骨溶解を効果的に抑制し、定着した骨腫瘍の進行を遅らせた。腫瘍移植前に RANKL 阻害によって破骨細胞活性を抑制した場合においても、乳癌骨転移の新規形成が有意に遅延した。ER+ MCF-7 乳癌骨転移の増殖に対する OPG-Fc 及びホルモン療法の単独又は併用の効果を検討した結果、いずれかの単独よりも OPG-Fc とタモキシフェンとの併用にて強い骨腫瘍増殖抑制が認められた。また、骨腫瘍増殖抑制と破骨細胞の有意な減少とが相関しており、公表されている結果と一致する。

前立腺癌骨転移マウスモデルでは、OPG-Fc 投与によって腫瘍誘発性の骨溶解が抑制され、定着した骨腫瘍の進行が抑制された。PC-3 異種移植の前立腺癌骨転移モデルにおいて、OPG-Fc をドセタキセルと併用したところ、骨の腫瘍組織量がドセタキセル単独と比較して強く抑制された。これらの結果も公表文献に一致する。

2 種類の肺癌骨転移マウスモデルにおいて、OPG-Fc によって骨溶解が抑制され、定着した骨腫瘍の進行が抑制された。また、OPG-Fc をドセタキセルと併用すると骨病変が有意に抑制され、さらに骨腫瘍の進行も抑制された。

さらに、RANKL の薬理的阻害剤を利用した関連文献を評価したところ、多様な骨病変（溶骨性、造骨性、及び溶骨性と造骨性の混合型）を反映する様々な動物モデルの骨転移に対して、RANKL と破骨細胞が関与していることが示されている。これらの公表された研究によると、乳癌、前立腺癌、肺癌、結腸癌、黒色腫、及び多発性骨髄腫のマウスモデルにおいて、RANKL 阻害剤によって腫瘍誘発性の骨溶解が抑制され、定着した骨腫瘍の進行が抑制されることが示されている。したがって、RANKL 阻害は広範囲のがん種によって誘発される骨病変を効果的に抑制できると考えられる。

新生仔ラットにて RANKL 阻害の歯牙萌出、骨密度、骨形態、あるいは骨強度に対する影響を検討したところ、RANKL 阻害によって骨量と骨強度の増加、大腿骨の強度低下、歯牙萌出抑制、長軸方向の骨成長の抑制が認められた。また、RANKL 阻害の中止後には一部回復が見られた。

様々な非臨床薬理試験データより、個体発生時への曝露による末梢リンパ節の形成不全を除き、デノスマブの使用は免疫系や血管系に対して悪影響を及ぼさないことが示唆された。

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

7. 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.

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.

Ashcroft AJ, Cruickshank SM, Croucher PJ, Perry MJ, Rollinson S, Lippitt JM, et al. Colonic Dendritic Cells, Intestinal Inflammation, and T Cell-Mediated Bone Destruction Are Modulated by Recombinant Osteoprotegerin. *Immunity.* 2003;19:849-861.

Asosingh K, De Raeve H, Menu E, Van Riet I, Van Marck E, et al. Angiogenic switch during 5T2MM murine myeloma tumorigenesis: role of CD45 heterogeneity. *Blood.* 2004;103:3131-3137.

Atkins GJ, Haynes DR, Geary SM, Loric M, Crotti TN, Findlay DM. Coordinated cytokine expression by stromal and hematopoietic cells during human osteoclast formation. *Bone.* 2000;26:653-661.

Bachmann MF, Wong B, Josien R, Steinman RM, Oxenius A, Choi Y. TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation. *J Exp Med.* 1999;189:1025-1031.

Balena R, Toolan BC, Shea M, et al. The effects of 2-year treatment with the aminobisphosphonate alendronate on bone metabolism, bone histomorphometry, and bone strength in ovariectomized nonhuman primates. *J.Clin. Invest.* 1993; 92:2577-2586.

Barbaroux JB, Beleut M, Brisken C, Mueller CG, Groves RW. Epidermal Receptor Activator of NF-kB 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.

Bauerle T, Hilbig H, Bartling S, Kiessling F, Kersten A, et al. Bevacizumab Inhibits Breast Cancer-Induced Osteolysis, Surrounding Soft Tissue Metastasis, and Angiogenesis in Rats as Visualized by VCT and MRI. *Neoplasia.* 2008;10:511- 520.

Bennett BJ, Scatena M, Kirk EA, Rattazzi M, Varon RM, Averill M, et al. Osteoprotegerin Inactivation Accelerates Advanced Atherosclerotic Lesion Progression and Calcification in Older

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

ApoE ^{-/-} Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:2117-2124.

Body JJ. Rationale for the use of bisphosphonates in osteoblastic and osteolytic bone lesions. *Breast.* 2003;12 (Suppl 2):S37-44.

Boissy P, Destaing O, Jurdic P. RANKL induces formation of avian osteoclasts from macrophages but not from macrophage polykaryons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;288(2):340-6.

Brandstrom H, Jonsson KB, Ohlsson C, Vidal O, Ljunghall S, and Ljunggren O. Regulation of Osteoprotegerin mRNA Levels by Prostaglandin E2 in Human Bone Marrow Stroma Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;247:338-341.

Branstetter D, Jacob A, Gonzalez-Suarez E, Jones J, Erwert R, Chaisson-Blake M, Dougall WC, et al. RANKL inhibition decreases the incidence of mammary adenocarcinomas in wild-type (WT) and MMTV-RANK transgenic mice. 31st Annual San Antonio Breast Cancer Symposium. 2008;Late Breaking Abstracts. Abstract 4167.

Brown JE, Cook RJ, Major P, Lipton A, Saad F, Smith M, Lee KA, Zheng M, Hei YJ, Coleman RE. Bone turnover markers as predictors of skeletal complications in prostate cancer, lung cancer, and other solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:59-69.

Brown JM, Corey E, Lee ZD, True LD, Yun TJ, Tondravi M, and Vessella RL. Osteoprotegerin and rank ligand expression in prostate cancer. *Urology.* 2001;57:611-6.

Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998;12:1260-1268.

Buijs J, Que I, Löwik C, et al. Inhibition of bone resorption and growth of breast cancer in the bone microenvironment. *Bone.* 2009;44(2):380-386.

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

Byrne FR, Morony S, Warmington K, Geng Z, Brown HL, Flores SA, Fiorino M, 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.

Cackowski FC, Anderson JL, Patrene KD, Choksi RJ, Shapiro SD, Windle JJ, Blair HC, and Roodman GD. Osteoclasts are important for bone angiogenesis. *Blood.* 2010;115:140-149.

Canon J, Roudier M, Bryant R, et al. Inhibition of RANKL blocks skeletal tumor progression and

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

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, Kostenuik PJ, Morony S, Starnes C, Weimann B, Van G, Scully S, Qi M, Lacey DL, and Dunstan CR. Osteoprotegerin Prevents and Reverses Hypercalcemia in a Murine Model of Humoral Hypercalcemia of Malignancy. *Cancer Res.* 2000;60:783-87.

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.

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 Leuko Bio.* 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.

Chung LWK, Baseman A, Assikis V, and Zhau HE. Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor microenvironment. *J Urology.* 2005;173(1):10-20.

Coleman RE. Clinical Features of Metastatic Bone Disease and Risk of Skeletal Morbidity. *Clin Cancer Res.* 2006;12:6243s-6249s.

Coleman RE, Major P, Lipton A, Brown JE, Lee KA, Smith M, Saad F, Zheng M, Hei YJ, Seaman J, Cook R. Predictive value of bone resorption and formation markers in cancer patients with bone metastases receiving the bisphosphonate zoledronic Acid. *J Clin Oncol.* 2005;23(22):4925-35.

Coleman RE. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treat Rev.* 2001;27(3):165-176.

Cross SS, Yang Z, Brown NJ, Balasubramanian SP, Evans CA, et al. Osteoprotegerin (OPG)—a potential new role in the regulation of endothelial cell phenotype and tumour angiogenesis? *Int. J. Cancer.* 2006;118:1901-1908.

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

Croucher PI, Shipman CM, Lippitt J, et al. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood*. 2001;98(13):3534-3540.

Demers L, Costa L, Lipton A. Biochemical markers and skeletal metastases. *Clin Orthop Relat Res*. 2003;(415 Suppl):S138-47.

Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Gene and Dev*. 1999;13:2412-2424.

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.

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.

Feeley BT, Liu NQ, Conduah AH, et al. Mixed Metastatic Lung Cancer Lesions in Bone Are Inhibited by Noggin Overexpression and Rank:Fc Administration. *J Bone and Mineral Research*. 2006;21:1571-1580.

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;44:P504.

Giuliani N, Bataille R, Mancini C, Lazzaretti M, Barille S. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood*. 2001;98(13):3527-3533.

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.

Good CR, O'Keefe RJ, Puzas JE, Schwarz EM, and Rosier RN. Immunohistochemical study of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANK-L) in human Osteolytic bone tumors. *J Surg Oncol*. 2002;79:174-79.

Grier RL, Wise GE. Inhibition of tooth eruption in the rat by a bisphosphonate. *J Dent Res*. 1998;77:8-15.

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

Grill V, Ho P, Body JJ, Johanson N, Lee SC, Kukreja SC, Moseley JM, and Martin TJ. Parathyroid hormone-related protein: elevated levels in both humoral hypercalcemia of malignancy and hypercalcemia complicating metastatic breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;73:1309-15.

Guise TA. Molecular mechanisms of osteolytic bone metastases. *Cancer.* 2000;88 (12 Suppl):2892-98.

Guise TA. The vicious cycle of bone metastases. *J Musculoskel Neuron Interact.* 2002;2(6):570-572.

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, Schoppet M, Zeitz U, Hempel U, Morawetz 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 Path.* 2009;175(2):473-478.

Hofbauer L, Neubauer A, Heufelder A. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin: potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. *Cancer.* 2001;92:460-70.

Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ, and Gillespie MT. Osteotropic Agents Regulate the Expression of Osteoclast Differentiation Factor and Osteoprotegerin in Osteoblastic Stromal Cells. *Endocrinology.* 1998;139:4743-46.

Huang L, Cheng YY, Chow LTC, Zheng MH, Kumta SM. Tumour cells produce receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) in skeletal metastases. *Journal of Clinical Pathology.* 2002;55:877-878.

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, Aguila HL. RANK Deficiency in the Hematopoietic Compartment Alters the Development of Osteoclasts but not Other Hematopoietic Lineages. *ASBMR 2005; Abstract SA256.*

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.

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

Jenkins DE, Yu SF, Hornig YS, et al. In vivo monitoring of tumor relapse and metastasis using bioluminescent PC-3M-luc-C6 cells in murine models of human prostate cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20(8):745-56.

Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Kozieradzki I, Komarova SV. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature*. 2006;440:692-696.

Kalikin LM, Schneider A, Thakur MA, et al. In vivo visualization of metastatic prostate cancer and quantitation of disease progression in immunocompromised mice. *Cancer Biol Ther*. 2003;2(6):17-21.

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.

Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand and Osteoprotegerin Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease. *Endo Rev*. 2008;29(2):155-92.

Kiechl S, Schett G, Schwaiger J, Seppi K, Eder P, Egger G, Santer P, Mayr A, Xu Q, Willeit J. Soluble receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and risk for cardiovascular disease. *Circulation*. 2007;116(4):385-91.

Kiefer JA, Vessella RL, Quinn JE, et al. The effect of osteoprotegerin administration on the intra-tibial growth of the osteoblastic LuCaP 23.1 prostate cancer xenograft. *Clin Exp Metastasis*. 2004;21:381-7.

Kim D, Mebius RE, MacMicking JK, Jung S, Cupedo T, Castellanos Y, et al. Regulation of Peripheral Lymph Node Genesis by the Tumor Necrosis Factor Family Member TRANCE. *J Exp Med*. 2000;192(10):1467-1478.

Kim YM, Kim YM, Lee YM, Kim HS, Kim JD, et al. TNF-related Activation-induced Cytokine (TRANCE) Induces Angiogenesis through the Activation of Src and Phospholipase C (PLC) in Human Endothelial Cells. *J Bio Chem*. 2002;277(9):6799-6805.

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.

Kitagawa Y, Dai J, Zhang J, Keller JM, Nor J, Yao Z, Keller ET. Vascular Endothelial Growth Factor Contributes to Prostate Cancer-Mediated Osteoblastic Activity. *Cancer Res*. 2005;65(23):10921-10929.

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

Kobayashi-Sakamoto M, Isogai E, Hirose K, Chiba I. Role of α_v integrin in osteoprotegerin-induced endothelial cell migration and proliferation. *Micro Res.* 2008;76:139-144.

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.

Li J, Sarosi I, Yan XQ, et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis, and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:1566-1571.

Loser K, Mehling A, Loeser S, Apelt J, Kuhn A, Grabbe S, et al. Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. *Nat Med.* 2006;12(12):1372-1379.

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

Martin TJ and Gillespie MT. Receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL): another link between breast and bone. *TRENDS in Endo & Met.* 2001;12(1):2-4.

McGonigle JS, Tae G, Stayton PS, Hoffman AS, Scatena M. Heparin-regulated delivery of osteoprotegerin promotes vascularization of implanted hydrogels. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 2008;19(8): 1021-1034.

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

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

Miller RE, Branstetter D, Armstrong A, et al. Receptor Activator of NF- κ B Ligand Inhibition

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

Suppresses Bone Resorption and Hypercalcemia but Does Not Affect Host Immune Responses to Influenza Infection. *J Immunol.* 2007;179:266-274.

Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, et al. 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.

Min JK, Cho YL, Choi JH, Kim Y, Kim JH, Yu YS, et al. Receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand (RANKL) increases vascular permeability: impaired permeability and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Blood.* 2007;109:1495-1502.

Min JK, Kim YM, Kim YM, Kim EC, Gho YS, Kang IJ, Lee SY, Kong YY, Kwon YG. Vascular Endothelial Growth Factor Up-regulates Expression of Receptor Activator of NF- κ B (RANK) in Endothelial Cells. *J Bio Chem.* 2003;278(41): 39548-39557.

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 the methanesulfonanilide by closure of the HERG potassium channel activation gate. *J Gen Physiol.* 2000b;115:229-240.

Mitsiades CS, Mitsiades N, Munshi NC, Anderson KC. Focus on multiple myeloma. *Cancer Cell.* 2004;6:439-444.

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 Miner Res.* 1999, 14: 1478-1485.

Morony S, Tintut Y, Zhang Z, Cattley RC, Van G, et al. Osteoprotegerin Inhibits Vascular Calcification Without Affecting Atherosclerosis in *ldlr*(-/-) Mice. *Circulation.* 2008;117;411-420.

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

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.

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

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

(17):9744-9749.

Mundy GR. Metastasis to Bone: Causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nature Rev Canc.* 2002;2:584-593.

Ominsky MS, Kostenuik PJ, Cranmer P, Smith SY, Atkinson JE. The RANKL inhibitor OPG-Fc increases cortical and trabecular bone mass in young gonad-intact cynomolgus monkeys. *Osteoporos Int.* 2007;18:1073-1082.

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;24:1234-1246.

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.

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.

Oyajobi BO, Anderson DM, Traianedes K, Williams PJ, Yoneda T, and Mundy GR. Therapeutic Efficacy of a Soluble Receptor Activator of Nuclear Factor κ B-IgG Fc Fusion Protein in Suppressing Bone Resorption and Hypercalcemia in a Model of Humoral Hypercalcemia of Malignancy. *Cancer Res.* 2001;61:2572-78.

Panizo S, Cardus A, 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.

Pearse RN, Sordillo EM, Yaccoby S, et al. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(20):11581-11586.

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001a;21:1610-6.

Price PA, Faus SA, Williamson MK. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001b;21:817-24.

Quinn J, Brown L, Zhang J, et al. Comparison of Fc-osteoprotegerin and zoledronic acid activities suggests that zoledronic acid inhibits prostate cancer in bone by indirect mechanisms. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases.* 2005; 8(3):253-259.

Romas E, Sims NA, Hards DK, et al. Osteoprotegerin reduces osteoclast numbers and prevents bone erosion in collagen-induced arthritis. *Am J Pathol.* 2002;161:1419-1427.

Roodman GD, Dougall WC. RANK ligand as a therapeutic target for bone metastases and multiple myeloma. *Cancer Treat Rev.* 2008;34:92-101.

Roodman GD. Mechanisms of Bone Metastasis. *N Engl J Med.* 2004;350:1655-1664.

Rosol TJ, Tannehill-Gregg SH, LeRoy BE, Mandl S, Contag CH. Animal Models of Bone Metastasis. *Cancer.* 2003;97(Suppl 3):748-757.

Ross AB, Bateman TA, Kostenuik PJ, Ferguson VL, Lacey DL, et al. The effects of osteoprotegerin on the mechanical properties of rat bone. *J Mat Sci Mat Med.* 2001;12:583-588.

Roudier MP, Morrissey C, True LD, Higano CS, Vessella RL, Ott SM. Histopathological Assessment of Prostate Cancer Bone Osteoblastic Metastases. *J Urol.* 2008;180(3):1154-60.

Roudier, MP, Bain, SD, Dougall, WC. Effects of the RANKL inhibitor, osteoprotegerin, on the pain and histopathology of bone cancer in rats. *Clin Exp Met.* 2006; 23(3-4):167-175.

Roux S, Meignin V, Quillard J, Meduri G, Guiochon-Mantel A, Fermand JP, et al. RANK (receptor activator of nuclear factor- κ B) and RANKL expression in multiple myeloma. *British J Haematol.* 2002;117(1):86-92.

Sangai T, Fujimoto H, Miyamoto S, et al. Roles of osteoclasts and bone-derived IGFs in the survival and growth of human breast cancer cells in human adult bone implanted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Clin Exp Metastasis.* 2008;25:401-410.

Schneider A, Kalikin LM, Mattos AC, et al. Bone turnover mediates preferential localization of prostate cancer in the skeleton. *Endocrinology.* 2005;146:1727-1736.

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

Seifert MF. Abnormalities in bone cell function and endochondral ossification in the osteopetrotic toothless rat. *Bone*. 1996;19:329-338.

Shimamura T, Amizuka N, Li M, Freitas PHL, White JH, et al. Histological observations in the microenvironment of osteolytic bone metastasis by breast carcinoma cell line. *Biomed Res*. 2005;26(4):159-172.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan C, 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 Stat5a in mammary epithelial cells. *J Biol Chem*. 2003;278(46):46171-46178.

Stewart AF, Vignery A, Silverglate A, Ravin ND, LiVolsi V, Broadus AE, et al. Quantitative bone histomorphometry in humoral hypercalcemia of malignancy: uncoupling of bone cell activity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1982;55(2):219-227.

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, Adamu S, Ominsky MS, et al. RANKL is a marker and mediator of local and systemic bone loss in two rat models of inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res*. 2005;20:1756-1765

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.

Sweeney P, Karashima T, Kim SJ, Kedar D, Mian B, Huang S, et al. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Antibody Reduces Tumorigenicity and Metastasis in Orthotopic Prostate Cancer Xenografts via Induction of Endothelial Cell Apoptosis and Reduction of Endothelial Cell Matrix Metalloproteinase Type 9 Production. *Clin Can Res*. 2002;8:2714-2724.

Tannehill-Gregg SH, Levine AL, Nadella MVP, Iguchi H and Rosol TJ. The effect of zoledronic acid and osteoprotegerin on growth of human lung cancer in the tibias of nude mice. *Clin Exp Metastasis*. 2006;23(1):19-31.

Taube T, Elomaa I, Blomqvist C, Beneton MN, Kanis JA. Histomorphometric evidence for osteoclast-mediated bone resorption in metastatic breast cancer. *Bone*. 1994;15(2):161-6.

Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev*

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

Genet. 2003;4:638-649.

Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Okamoto, R, Tsuchiya, et al. RANK-RANKL Signaling Pathway Is Critically Involved in the Function of CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells in Chronic Colitis. J Immuno. 2009;182:6079-6087.

Uehara H, Kim SJ, Karashima T, Shepherd DL, Fan D, Tsan R, et al. Effects of Blocking Platelet-Derived Growth Factor-Receptor Signaling in a Mouse Model of Experimental Prostate Cancer Bone Metastases. J Nat Can Inst. 2003;95(6):458-470.

Urwin GH, Percival RC, Harris S, Beneton MN, Williams JL, Kanis JA. Generalised increase in bone resorption in carcinoma of the prostate. Br J Urol. 1985;57(6):721-723.

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 mutation in the rat *Csf1* gene: Evidence of a crucial role for CSF-1 in osteoclastogenesis and endochondral ossification. PNAS 2002;99:14303-14308.

Vanderkerken K, De Leenheer E, Shipman C, et al. Recombinant osteoprotegerin decreases tumor burden and increases survival in a murine model of multiple myeloma. Cancer Res. 2003;63(2):287-289.

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 cardiovascular safety evaluations of biologics. J Pharmacol Toxicol Methods 2008;58:72-76.

Virk MS and Lieberman JR. Tumor metastasis to bone. Arthritis Research & Therapy. 2007;9 (Suppl 1):S5.

Whang P, Schwarz E, Gamradt S, et al. The effects of RANK blockade and osteoclast depletion in a model of pure osteoblastic prostate cancer metastasis in bone. J Orthopaedic Research. 2005; 23(6):1475-1483.

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

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.

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

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

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.

Woods Ignatoski KM, Escara-Wilke JF, Dai JL, et al. RANKL Inhibition is an Effective Adjuvant for Docetaxel in a Prostate Cancer Bone Metastases Model. *Prostate*. 2008; 68(8):820-829.

Yaccoby S, Pearse RN, Johnson CL, Barlogie B, Choi Y, Epstein J. Myeloma interacts with the bone marrow microenvironment to induce osteoclastogenesis and is dependent on osteoclast activity. *Br J Haematol*. 2002;116(2):278-290.

Yoneda T, Hashimoto N, Hiraga T. Bisphosphonate Actions on Cancer. *Calcif Tissue Int*. 2003;73:315-318.

Yoneda T, Sasaki A, Dunstan C, Williams PJ, Bauss F, De Clerck YA, Mundy GR. Inhibition of osteolytic bone metastasis of breast cancer by combined treatment with the bisphosphonate ibandronate and tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-2. *J Clin Invest*. 1997;99(10):2509-2517.

Yonou H, Kanomata N, Goya M, et al. Osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor decreases human prostate cancer burden in human adult bone implanted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res*. 2003;63:2096-102.

Yonou H, Ochiai A, Goya M, et al. Intraosseous growth of human prostate cancer in implanted adult human bone: relationship of prostate cancer cells to osteoclasts in osteoblastic metastatic lesions. *Prostate*. 2004;58:406-413.

Zhang J, Dai J, Qi Y, et al. Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. *J Clin Invest*. 2001;107:1235-44.

Zhang J, Dai J, Yao Z, Lu Y, Dougall W, Keller ET. Soluble receptor activator of nuclear factor κ B Fc diminishes prostate cancer progression in bone. *Cancer Res*. 2003;63:7883-90.

Zheng Y, Zhou H, Brennan K, et al. Inhibition of bone resorption, rather than direct cytotoxicity, mediates the anti-tumour actions of ibandronate and osteoprotegerin in a murine model of breast cancer bone metastasis. *Bone*. 2007a;40(2):471-478.

Zheng Y, Zhou H, Modzelewski JR, et al. Accelerated Bone Resorption, Due to Dietary Calcium Deficiency, Promotes Breast Cancer Tumor Growth in Bone. *Cancer Res*. 2007b;67:9542-9548.

2.6.2 薬理試験の概要文

デノスマブ

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.

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

目次

1. 薬理試験：一覧表	2
2. 効力を裏付ける試験	6
3. 副次的薬理試験	26
4. 安全性薬理試験	35
5. 薬力学的薬物相互作用試験	36

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

1. 薬理試験：一覧表

Type of Study	Test system	Method of Administration	Testing Facility	Study No.	Location in CTD	
Primary Pharmacodynamics	Basic characterization of denosumab (binding specificity, affinity, effects on osteoclastogenesis, and hypercalcemia)	RAW, ST-2, CHO, MC3T3-E1 cell lines, and primary bone marrow cells BDF1 mice and Sprague Dawley rats	In vitro In vivo SC	Amgen Inc., [REDACTED] USA	R [REDACTED] 351	4.2.1.1.1
	Effects on bone mass and bone resorption in human RANK ligand KI mice	huRANKL KI mice (RANKL possesses a critical binding or neutralizing epitope for denosumab) and WT mice	SC	Amgen Inc., [REDACTED] USA	R [REDACTED] 430	4.2.1.1.2
	Effects on bone mass and bone resorption in aged human RANK ligand KI mice	Aged huRANKL KI mice and WT mice	SC	Amgen Inc., [REDACTED] USA	R [REDACTED] 321	4.2.1.1.3
	A 6/12-month toxicity study with an interim kill after 6 months and a 3 month recovery period	Cynomolgus monkeys	SC	[REDACTED] [REDACTED] Germany	102090*	4.2.1.1.4 (4.2.3.2.2)
	A monthly injection osteoporosis prevention study for 16 months	Cynomolgus monkeys	SC	[REDACTED] [REDACTED] Canada	103981*	4.2.1.1.5

*GLP = good laboratory practice
KI = knock-in; SC = subcutaneous injection

Page 1 of 4

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

1. 薬理試験：一覧表（続き）

Type of Study	Test system	Method of Administration	Testing Facility	Study No.	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics	Non-small-cell lung cancer xenograft tumor (combination)	Nude mice	SC	Amgen Inc., [REDACTED] USA	R20080331 4.2.1.1.15
	Non-small-cell lung cancer xenograft tumor (combination)	Nude mice	SC	Amgen Inc., [REDACTED] USA	R20080332 4.2.1.1.16
Secondary Pharmacodynamics	Immune response, vascular calcification, histopathology, and cholesterol	Cynomolgus monkey	SC	[REDACTED] Germany	102090* 4.2.1.2.1 (4.2.3.2.2)
	Hormone and carcinogen induced tumor development	MMTV-RANK (transgenic mice overexpressing RANK via MMTV promoter) and WT mice	SC	Amgen Inc., [REDACTED] USA	R20090211 4.2.1.2.2
	Angiogenesis	Sprague Dawley rats	SC	Amgen Inc., [REDACTED] USA	R2002266 4.2.1.2.3
	Angiogenesis	Sprague Dawley rats	SC	Amgen Inc., [REDACTED] USA	R2002204 4.2.1.2.4
	Angiogenesis	Sprague Dawley rats	SC	Amgen Inc., [REDACTED] USA	R2002267 4.2.1.2.5
	Immune response and cholesterol	Cynomolgus monkey	SC	[REDACTED] Canada	103981* 4.2.1.2.6 (4.2.1.1.5)

*GLP = good laboratory practice

MMTV = mouse mammary tumor virus; SC = subcutaneous injection; WT = wild type

Page 3 of 4

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

1. 薬理試験：一覧表（続き）

Type of Study	Test system	Method of Administration	Testing Facility	Study No.	Location in CTD	
Secondary Pharmacodynamics	Tooth eruption, skeletal growth and bone strength in neonates	Sprague Dawley rats	SC	Amgen Inc., [REDACTED] USA	R[REDACTED]0340	4.2.1.2.7
	Tooth eruption, skeletal growth and bone strength in neonates (recovery)	Sprague Dawley rats	SC	Amgen Inc., [REDACTED] USA	R20090070	4.2.1.2.8
	Long bone geometry and strength during growth and development	OPG-Tg Sprague Dawley rats	NA	Amgen Inc., [REDACTED] USA	R20090069	4.2.1.2.9
	Tooth eruption, skeletal growth and bone strength in neonates	Sprague Dawley rats	SC	Amgen Inc., [REDACTED] USA	R20090282	4.2.1.2.10
	Comparison of two anti-resorptive therapies (alendronate vs. denosumab) on murine fracture healing	huRANKL KI mice	SC	[REDACTED] USA	R[REDACTED]458	4.2.1.2.11
Safety Pharmacology	Cardiovascular, respiratory, and toxicokinetics evaluation	Cynomolgus monkeys	SC	[REDACTED] USA	101606*	4.2.1.3.1
Pharmacodynamic Drug Interactions			NA			

*GLP = good laboratory practice; NA = not applicable
OPG-Tg = OPG-transgenic; SC = subcutaneous injection

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

2. 効力を裏付ける試験

Study Title (Study Number)	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
Denosumab, a Fully Human Monoclonal Antibody, has Selective Effects on Human RANK Ligand and Human Osteoclasts (Study R-351)	Non-GLP Final	[REDACTED]	Murine RAW macrophage cells Mouse C3H/HEN bone marrow Mouse ST-2 stromal cells CHO cells Mouse MC3T3-E1 osteoblasts Mouse ST-2 bone marrow stromal cells Sprague Dawley rats, Male n = 4/group BDF1 mice, Male n = 5/group	The objectives were to establish whether denosumab is a primate-specific inhibitor of RANKL with no apparent effects on the activity of murine RANKL by providing comparisons between huOPG-Fc and denosumab in both human and murine osteoclastogenesis models, to determine the binding potency and selectivity of denosumab for human RANKL, to describe the proliferation and survival of murine osteoblast and bone marrow stromal cell	The effects of denosumab versus recombinant huOPG-Fc on osteoclastogenesis were measured in murine RAW cells cultured with murine M-CSF and human RANKL, as well as with murine bone marrow cells cocultured with ST-2 stromal cells that provide murine M-CSF and murine RANKL. The effects of denosumab on osteoclastogenesis were also compared to the effect of bisphosphonates and raloxifene in murine bone marrow cells cultured with murine M-CSF and human RANKL. The binding of denosumab and huOPG-Fc to murine and human RANKL was tested using an enzyme immunoassay.	Denosumab binds to human RANKL with high affinity and specificity. There was no evidence for interactions between denosumab and other members of the TNF family. Denosumab effectively suppressed osteoclastogenesis driven by human RANKL but not murine RANKL. Denosumab had no effect on the proliferation and survival of osteoblast-like cell lines. Denosumab does not appear to recognize murine or rat RANKL, and has no obvious effects on the normal mouse or rat skeleton.

GLP = good laboratory practice; M-CSF = macrophage-colony stimulating factor

Page 1 of 20

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

2. 効力を裏付ける試験（続き）

Study Title (Study Number)	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
Study R-351 (continued)				cultures exposed to denosumab, huOPG-Fc, and to determine if denosumab exerts any obvious effects on the skeletons of normal mice or rats.	<p>Binding affinities of denosumab and huOPG-Fc for human RANKL were also assessed using BIAcore and KinExA assays. The relative affinity of denosumab for RANKL versus other TNF family members was assessed in competitive binding assays using both cells expressing RANKL and immobilized RANKL.</p> <p>Denosumab and huOPG-Fc were tested for cell proliferation and survival effects on murine ST-2 stromal cells and murine MC3T3-E1 osteoblast-like cells.</p> <p>Radiographic bioassays evaluated potential effects of denosumab or huOPG-Fc in normal mice and rats. Lastly, the effects of denosumab and huOPG-Fc on hypercalcemia in mice treated with human RANKL were examined.</p>	

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

2. 効力を裏付ける試験 (続き)

Study Title (Study Number)	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
Effects of Denosumab (AMG 162) on Bone Mass and Bone Resorption in Human RANK Ligand Knock-in Mice (Study R-430)	Non-GLP Final	██████████	WT and huRANKL KI mice Males and Females Study 03-20: n = 2-4/group Study 04-15: n = 8/group	The objectives were to confirm that the 5 th exon of human RANKL possesses a critical binding or neutralizing epitope for denosumab, and to determine whether huOPG-Fc was a reasonable surrogate for the pharmacologic effects of denosumab. The study contains two experiments (Studies 03-20 and 04-15).	In study 03-20, denosumab or huOPG-Fc was administered SC to young WT, heterozygous, or huRANKL KI mice at 5 mg/kg twice/week for 3 weeks. Proximal tibia was subjected to pQCT or histomorphometry analyses. Serum was collected at necropsy for TRAP-5b measurements. In study 04-15, young male WT or huRANKL KI mice and female WT mice were treated SC with vehicle, denosumab, or huOPG-Fc at 5 mg/kg twice/week for 3 weeks. The spine BMD was measured predose and 1, 2, and 3 weeks postdose by DXA. Blood was collected at 24 hours and 3 weeks postdose for TRAP-5b assays. Bone samples were collected for micro-CT and histomorphometry.	Study 03-20: denosumab and huOPG-Fc significantly decreased serum TRAP-5b and increased total BMC, total BMD, trabecular BMC, and trabecular BMD in huRANKL KI mice. Denosumab and huOPG-Fc significantly reduced Oc.S/BS and increased BV/TV at the proximal tibia in huRANKL KI mice. Denosumab had no significant effects on serum TRAP-5b, Oc.S/BS, bone densitometry parameters, or BV/TV in WT mice. Study 04-15: denosumab significantly increased BMD after one week of treatment in huRANKL KI mice and this increase was sustained for the duration of the study.

BMC = bone mineral content; BMD = bone mineral density; BV/TV = bone volume/tissue volume; DXA = dual energy X-ray absorptiometry; GLP = good laboratory practice; KI = knock-in; micro-CT = micro-computed tomography; Oc.S/BS = osteoclast surface/bone surface; pQCT = peripheral quantitative computed tomography; SC = subcutaneous injection; TRAP = tartrate-resistant acid phosphatase; WT = wild type

Page 3 of 20

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

2. 効力を裏付ける試験（続き）

Study Title (Study Number)	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
Study R [REDACTED] 430 (continued)						Denosumab also significantly reduced serum TRAP-5b levels in huRANKL KI mice. Denosumab had no effects on spine BMD and serum TRAP-5b in WT mice. HuOPG-Fc significantly reduced serum TRAP-5b levels and increased spine BMD in both huRANKL KI and WT mice.
Effects of Denosumab (AMG 162) on Bone Mass and Bone Resorption in Aged Human RANK Ligand Knock-in Mice (Study R [REDACTED] 321)	Non-GLP Final	[REDACTED]	WT and huRANKL KI mice Female n = 6/group	The objective was to observe the effects of denosumab on bone mass and bone resorption in aged huRANKL KI mice.	Ten-month-old WT and huRANKL KI mice were administered or denosumab SC at 2 or 10 mg/kg once/week for 3 weeks. BMD was measured at baseline and 1, 2, and 3 weeks after treatment by DXA. Blood was collected for serum TRAP-5b and osteocalcin measurements before treatment initiation and weekly thereafter.	Denosumab (10 mg/kg) significantly reduced serum TRAP-5b, in huRANKL KI mice compared with vehicle controls. Denosumab treatment had no significant effect on area BMD at lumbar vertebrae or whole leg in huRANKL KI mice compared with baseline controls.

BMD = bone mineral density; DXA = dual energy X-ray absorptiometry; GLP = good laboratory practice; KI = knock-in; SC = subcutaneous injection; TRAP = tartrate-resistant acid phosphatase; WT = wild type

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

2. 効力を裏付ける試験 (続き)

Study Title (Study Number)	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
Study R-1321 (continued)					The right tibia was collected for static histomorphometry analysis and lumbar vertebrae, left femur, and left tibia were excised for micro-CT analysis.	Trabecular bone histomorphometry of the proximal tibia indicated that huRANKL KI mice administered 10 mg/kg denosumab had significantly greater BV/TV compared with vehicle-treated KI mice. In addition, denosumab treatment was associated with significant reductions in Oc.S/BS and Ob.S/BS compared with vehicle controls.
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 (Study 102090) For additional information, see Module 2.6.7, Table 7B.	GLP Final		Cynomolgus monkey Male and Female n = 8/sex/group	The objectives were to evaluate the toxicity of AMG 162 (denosumab) following SC administration to the Cynomolgus monkey for 6 or 12 months and to assess the reversibility of effects observed, if any, during a 3-month treatment-free period.	In a 12-month toxicology study, young (2.5- to 4-year-old) gonad-intact male and female Cynomolgus monkeys were treated once/month with vehicle or denosumab (1, 10, or 50 mg/kg) for up to 12 months. Monkeys (3/sex/group) were sacrificed at 6 (with the exception of 1 male monkey in Group 4 that died before the 6 month timepoint) and 12 months.	Anti-denosumab antibodies developed in 55.3% of drug-treated animals (16/16 animals in the 1 mg/kg group, 7/16 in the 10 mg/kg group, and 2/15 in the 50 mg/kg group). The numbers of animals with evidence for neutralizing antibodies against denosumab were 13, 8, and 2 in groups treated with 1, 10, and 50 mg/kg, respectively.

BV/TV = bone volume/tissue volume; GLP = good laboratory practice; KI = knock-in; micro-CT = micro-computed tomography; Ob.S/BS = osteoblast surface/bone surface; Oc.S/BS = osteoclast surface/bone surface ; SC = subcutaneous injection

Page 5 of 20

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

2. 効力を裏付ける試験（続き）

Study Title (Study Number)	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
Study 102090 (continued)					Two additional animals per sex per group were allowed to recover untreated for an additional 3 months (with the exception of 1 male monkey in group 4 that died before the 15 month timepoint). Biochemical markers of bone resorption and bone formation were assessed from serum and urine at regular intervals during the treatment and recovery periods. Right femurs and lumbar vertebrae were analyzed by pQCT and DXA. Biomechanical parameters were determined after necropsy by destructive testing in 3-point bending (femur diaphysis) or compression (L3 and L4). A tibia was also assessed by pQCT.	The presence of anti-denosumab neutralizing antibodies was associated with significant blunting of the pharmacodynamic responses and reduced or absent drug exposure. Once-monthly treatment with denosumab (10 and 50 mg/kg) caused significant reductions in serum and urine markers of bone turnover in male and female monkeys. At the end of the 3-month recovery period, all treatment group data were not significantly different from vehicle controls. Due to the neutralizing anti-denosumab antibody response in the 1 and 10 mg/kg groups, ex-vivo scanning and strength testing was limited to the 0 and 50 mg/kg groups.

DXA = dual energy X-ray absorptiometry; pQCT = peripheral quantitative computed tomography

Page 6 of 20

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

2. 効力を裏付ける試験 (続き)

Study Title (Study Number)	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
Study 102090 (continued)						pQCT and DXA analyses of lumbar vertebrae 3 and 4 showed that 12 months of denosumab treatment (50 mg/kg/dose) resulted in significantly greater BMD in male animals, with smaller and generally insignificant changes in female animals. In males, pQCT analysis of the femur diaphysis showed that 12 months of denosumab treatment (50 mg/kg) was associated with significantly greater cortical area, thickness, and BMC compared to vehicle controls. Females treated for 12 months with denosumab showed no significant differences in pQCT-derived measures of the femur diaphysis. The denosumab treatment-related effects on DXA and pQCT parameters were partially reversible after the 3-month recovery period.

BMC = bone mineral content; BMD = bone mineral density; DXA = dual energy X-ray absorptiometry; pQCT = peripheral quantitative computed tomography

Page 7 of 20

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

2. 効力を裏付ける試験（続き）

Study Title (Study Number)	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
Study 102090 (continued)						Male and female monkeys in the 50 mg/kg group had similar or improved bone strength parameters for L3 and L4 compared to vehicle controls at 12 months. The males also had similar or improved bone strength parameters for the femur diaphysis. There were no consistent changes in femur bone strength parameters in females. After the 3-month recovery period, bone strength parameters in the 50 mg/kg group were similar to values from males and females treated with vehicle. Some apparent residual improvements in bone strength parameters were also noted relative to vehicle controls. Linear regression analysis of PLV versus BMC values for combined groups showed strong positive correlations for both the femur diaphysis and for L3/L4.

BMC = bone mineral content; PLV = peak load values

Page 8 of 20

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

2. 効力を裏付ける試験（続き）

Study Title (Study Number)	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
AMG 162: A Monthly Subcutaneous Injection Osteoporosis Prevention Study for 16 Months in the Cynomolgus Monkey (Study 103981) For additional information, see Module 2.6.6, Section 3.2.	GLP Final		Cynomolgus monkey Female n = 20/group	The objective was to examine the effects of long-term AMG 162 (denosumab) therapy on cancellous and cortical bone mass, density, geometry, and turnover in adult (9- to 16-year-old) OVX Cynomolgus monkeys.	One month after OVX or sham surgery, 60 OVX animals began treatment with either vehicle (OVX-vehicle) or denosumab at 25 or 50 mg/kg (SC, monthly) for 16 months. Twenty sham-operated controls were treated with vehicle. Each month was set to 28 days to allow for consistent intervals for pharmacokinetic analysis. Serum was collected for measurement of bone turnover markers, and DXA and pQCT scans were taken at baseline and after 3, 6, 12, and 16 months of treatment. Dynamic histomorphometry was performed on iliac and rib biopsies after months 6 and 12, and on terminal samples from the tibial diaphysis, L2 vertebra, and the proximal femur. Strength testing was performed at the femur diaphysis, femur neck, humeral cortical beams, and lumbar vertebral specimens.	Treatment of OVX Cynomolgus monkeys with denosumab by monthly SC for 16 doses at dose levels of 25 and 50 mg/kg/dose was well tolerated and showed an increased dose proportionality response based on mean C_{max} and $AUC_{0-\tau}$ with no significant accumulation over a 15-month period. Anti-denosumab antibodies developed in 25 and 15% of animals receiving 25 and 50 mg/kg/dose, respectively, and coincided with a profound decrease in serum concentrations and exposure. Treatment of OVX Cynomolgus monkeys with 16 monthly doses of denosumab was not associated with any adverse effects on bone.

$AUC_{0-\tau}$ = AUC over the dosing interval; C_{max} = maximum serum concentration; DXA = dual energy X-ray absorptiometry; GLP = good laboratory practice; OVX = ovariectomized; pQCT = peripheral quantitative computed tomography; SC = subcutaneous injection

Page 9 of 20

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

2. 効力を裏付ける試験（続き）

Study Title (Study Number)	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
Study 103981 (continued)						Denosumab treatment resulted in positive effects on cortical and cancellous bone mass as determined in vivo by BMD measurements and ex vivo by histomorphometric architectural parameters, and significantly increased bone strength at clinically relevant sites, the lumbar spine and femoral neck, and at the femur diaphysis. Linear regression analysis of PLV versus BMC values showed strong positive correlations for both the femur diaphysis and for L3/L4. Increases in bone mass and strength were achieved by profound reductions in the OVX-induced increases in bone turnover, evaluated by biochemical markers of bone turnover and histomorphometric indices measured in cancellous and cortical bone. Overall, both doses of denosumab resulted in comparable bone responses.

BMC = bone mineral content; BMD = bone mineral density; OVX = ovariectomized; PLV = peak load values

Page 10 of 20

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

2. 効力を裏付ける試験 (続き)

Study Title (Study Number)	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
A 12-Month Osteoporosis "Switch" Study in the Cynomolgus Monkey (Study 106564)	GLP Final	██████████	Cynomolgus monkey Female n = 10-11/group	The objective was to investigate the effects of biweekly IV doses of ALN for 6 months followed by once monthly SC doses of denosumab for 6 months on BMD, serum calcium and phosphorous levels and bone markers.	Adult OVX Cynomolgus monkeys were treated with vehicle, ALN (50 µg/kg IV biweekly), or denosumab (25 mg/kg SC monthly) for 6 months. After 6 months, animals from each of the vehicle (n = 10) and ALN (n = 11) groups switched from their previous treatment to denosumab. The remaining 10 animals receiving vehicle or ALN continued with the original treatment (vehicle or ALN). Serum calcium, bone turnover markers, and BMD were monitored throughout the study. Dynamic histomorphometry was performed on iliac and rib biopsies at month 6 and 12, and on terminal samples from the tibial diaphysis, L2 vertebra and the proximal femur. Strength testing was performed at the femur diaphysis, femur neck, and lumbar vertebral specimens.	Treatment with denosumab resulted in positive effects on cortical and cancellous bone mass as determined in vivo by BMD measurements and significantly increased bone strength at the lumbar spine, with trends for increases at the femoral neck and at the femur diaphysis. Increases in bone mass and strength were achieved by marked reductions in bone turnover evaluated by biochemical markers of bone turnover and histomorphometric indices measured in cancellous and cortical bone. In general, positive correlations were noted between bone densitometry and bone strength parameters, indicating that the treatment with denosumab did not alter the relationships between bone mass and bone strength.

ALN = alendronate; BMD = bone mineral density; GLP = good laboratory practice; IV = intravenous injection; OVX = ovariectomized; SC = subcutaneous injection

Page 11 of 20

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

2. 効力を裏付ける試験（続き）

Study Title (Study Number)	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
Study 106564 (continued)						Treatment with denosumab resulted in slight decreases in calcium levels (following the first dose); however, these changes were within the physiologically normal ranges. Prior treatment with ALN did not modify the activity of denosumab.
Effect of OPG-Fc on Tumor Burden and Osteolysis in MDA231-F11Luc Bone Metastasis Model in Female Athymic Nude Mice, Prevention Setting (Study R2006160)	Non-GLP Final	██████████	Athymic nude mice Female n = 10/group	The objective was to test the effect of OPG-Fc on tumor burden and osteolysis in MDA231-F11Luc bone metastasis model in the prevention setting.	Mice were injected intracardiac into the left ventricle with MDA-MB- 231(F11) cells expressing luciferase. Therapy (twice/week SC) with OPG-Fc (0.3 or 3.0 mg/kg) and the vehicle started on Day 0 and continued until Day 21. BLI and body weights were measured twice/week. Degree of osteolysis was determined by X-ray histomorphometry.	Administration of OPG-Fc at 3.0 mg/kg led to a significant reduction in tumor burden BLI of bone metastasis. OPG-Fc at both 0.3 and 3.0 mg/kg led to a significant reduction in osteolysis in a dose dependent manner.

ALN = alendronate; GLP = good laboratory practice; KI = knock-in; micro-CT = micro-computed tomography; SC = subcutaneous injection; TRAP = tartrate-resistant acid phosphatase

Page 12 of 20

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

2. 効力を裏付ける試験 (続き)

Study Title (Study Number)	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
Effect of OPG-Fc on Tumor Burden, Osteolysis, and Survival in MDA231-F11Luc Bone Metastasis Model in Therapeutic Setting (Study R2006161)	Non-GLP Final	██████████	Athymic nude mice Female n = 10/group	The objective was to test the effect of OPG-Fc on tumor burden, osteolysis, and survival in MDA231-F11Luc bone metastasis model in a therapeutic setting.	Mice were injected intra-cardiac into the left ventricle with MDA-MB-231(F11) cells expressing luciferase. Therapy (twice/week SC) with OPG-Fc (0.3 or 3.0 mg/kg) and vehicle started on Day 7. BLI and body weights were measured twice/week from Day 5 to 21. Degree of osteolysis was determined by X-ray histomorphometry. For the survival analysis, starting on Day 25, animals were euthanized when they became moribund.	Administration of OPG-Fc at 0.3 and 3.0 mg/kg led to a significant reduction in tumor burden BLI of bone metastasis. OPG-Fc at both 0.3 and 3.0 mg/kg led to a significant reduction in osteolysis in a dose dependent manner. OPG-Fc at 3.0 mg/kg caused a significant prolongation of survival.

ALN = alendronate; BLI = bioluminescence imaging; GLP = good laboratory practice; SC = subcutaneous injection

Page 13 of 20

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

2. 効力を裏付ける試験（続き）

Study Title (Study Number)	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
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 (Study R20080161)	Non-GLP Final	██████████	Athymic nude mice Female n = 10/group	The objective was to test the effect of tamoxifen and OPG-Fc on the growth of MCF-7-Luc cells in an established bone metastasis model.	Mice were injected intra-cardiac into the left ventricle with MCF-7 cells expressing luciferase. Therapy with OPG-Fc (3 mg/kg three times/week SC) started on Day 5 and continued until Day 31. Therapy (5 times/week IP) with tamoxifen (0.1 or 0.5 mg) or vehicle started on Day 7 and continued until Day 32. IVIS was used to measure tumor burden BLI. BLI and body weights were measured twice/week. Degree of osteolysis was determined by X-ray histomorphometry.	Administration of tamoxifen at 0.1 and 0.5 mg significantly reduced hind limb tumor burden in an MCF-7-Luc intracardiac model. OPG-Fc significantly reduced histologic skeletal tumor burden and delayed hind limb tumor growth measured by BLI, but the latter reduction was not statistically significant. Treatment with OPG-Fc alone significantly reduced osteolytic lesions.

BLI = bioluminescence imaging; GLP = good laboratory practice; IP = intraperitoneal injection; IVIS = In Vivo Imaging System; SC = subcutaneous injection

Page 14 of 20

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

2. 効力を裏付ける試験（続き）

Study Title (Study Number)	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
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 (Study R20080162)	Non-GLP Final	██████████	Athymic nude mice Female n = 10/group	The objective was to test the combination of tamoxifen and OPG-Fc on the growth of MCF-7-Luc cells in an established bone metastasis model.	Mice were injected intra-cardiac into the left ventricle with MCF-7 cells expressing luciferase. Therapy with OPG-Fc (3 mg/kg three times/week SC), tamoxifen (0.1 mg five times/week IP), a combination of OPG-Fc and tamoxifen, or vehicle (five times/week IP) started on Day 7 and continued until Day 39. IVIS was used to measure tumor burden BLI. BLI and body weights were measured twice/week (except for weeks 1, 2, 3, and 5 where BLI was measured once/week). On Day 41, serum was obtained for osteoclast marker TRAP-5b to determine level of osteoclastogenesis. Degree of osteolysis was determined by X-ray histomorphometry.	Administration of tamoxifen at 0.1 mg and OPG-Fc at 3 mg/kg in combination showed an additive effect which resulted in significantly reduced hind limb tumor burden in an MCF-7-Luc intracardiac model. Treatment with OPG-Fc alone significantly reduced osteolytic lesions.

BLI = bioluminescence imaging; GLP = good laboratory practice; IP = intraperitoneal injection; IVIS = In Vivo Imaging System; SC = subcutaneous injection; TRAP = tartrate-resistant acid phosphatase

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

2. 効力を裏付ける試験（続き）

Study Title (Study Number)	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
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 (Study R20070953)	Non-GLP Final	██████████	Athymic nude mice Female n = 20/group	The objective was to test the effect of pretreatment of OPG-Fc on the prevention of bone mets in the MDA-MB-231(F11) Luc bone metastasis model.	Mice were injected intra-cardiac into the left ventricle with MDA-MB-231(F11) cells expressing luciferase. Therapy (three times/week SC) with OPG-Fc (0.3 or 3.0 mg/kg) and vehicle started on Day -7 and continued until Day 21. Determination of hind limb bone metastases was conducted on blinded BLI images. BLI was measured three times/week. Degree of osteolysis in hind limbs was determined by X-ray histomorphometry. On Day 0 and Day 24, serum was collected for TRAP-5b to determine levels of osteoclastogenesis.	Pretreatment of OPG-Fc at 3.0 mg/kg had a significant effect on delaying the onset of bone mets as measured by BLI. OPG-Fc at both 0.3 and 3.0 mg/kg significantly prevented tumor-induced osteolysis in a dose dependent manner.
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	Non-GLP Final	██████████	Athymic nude mice Male n = 8/group	The objective was to test the effect of RANKL antagonism with OPG-Fc, alone and in combination with docetaxel, on tumor burden and osteolysis in the PC-3 Luc prostate	Mice were challenged with PC-3 cells expressing luciferase (PC-3 Luc) into the left cardiac ventricle on Day 0. Therapy with OPG-Fc (3 mg/kg three times/week SC), docetaxel (5 or 10 mg/kg twice of once/week	Treatment with docetaxel at 10 mg/kg, but not at 5 mg/kg, resulted in a significant decrease in hind limb BLI and histologic tumor burden. OPG-Fc as a single agent

BLI = bioluminescence imaging; GLP = good laboratory practice; IP = intraperitoneal injection; SC = subcutaneous injection; TRAP = tartrate-resistant acid phosphatase

Page 16 of 20

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

2. 効力を裏付ける試験（続き）

Study Title (Study Number)	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
Model in Male Athymic Nude Mice (Study R20080083)				cancer bone metastasis model.	treatments IP), a combination of OPG-Fc and docetaxel, or vehicle (twice of once/week treatments SC) started on Day 11 post tumor implantation. BLI was measured twice/week beginning on Day 7 through Day 27. Animals were sacrificed at Day 28 for histologic evaluation of tumor burden. Osteolytic lesions were measured from X-ray radiographic images on Days 13, 20, and 27.	reduced skeletal tumor area and progression of lytic lesions. OPG-Fc plus docetaxel significantly reduced skeletal tumor burden compared to either OPG-Fc or docetaxel treatments alone.
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 (Study R20070963)	Non-GLP Final	██████████	Athymic nude mice Female n = 9-10/group	The objective was to test the effect of RANKL antagonism with OPG-Fc, either early (Day 1) or late (Day 7) on tumor burden and osteolysis in the H1975 Luc non-small-cell lung cancer bone metastasis model.	Mice were challenged with H1975 cells expressing luciferase into the left cardiac ventricle on Day 0. Mice were pretreated with enoxaparin IV to prevent tumor induced thrombosis prior to intra-cardiac injection. Mice were treated with either vehicle (three times/week SC starting on Day 1) or OPG-Fc (3 mg/kg three times/week SC). OPG-Fc treatment was initiated at an early time	Administration of OPG-Fc at 3 mg/kg initiated either early (Day 1) or late (Day 7) significantly reduced skeletal tumor burden by histology and prevented development of osteolytic lesion formation. Early treatment with OPG-Fc significantly reduced skeletal tumor burden in bone as measured by BLI.

BLI = bioluminescence imaging; GLP = good laboratory practice; IV = intravenous injection; SC = subcutaneous injection

Page 17 of 20

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

2. 効力を裏付ける試験（続き）

Study Title (Study Number)	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
Study R20070963 (continued)					point (Day 1 after tumor cell inoculation) or a late time point (Day 7 post-tumor cell inoculation). Tumor progression was monitored by BLI and histological measures. The effect of OPG-Fc on osteolytic bone disease was analyzed by radiographic progression. BLI was measured twice/week and animals were sacrificed at Day 27 for histologic evaluation of tumor burden. Osteolytic lesions were measured by X-ray radiography on Day 27.	
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 (Study R20080310)	Non-GLP Final	██████████	Athymic nude mice Female n = 9-10/group	The objective was to test the effect of RANKL antagonism with OPG-Fc, either early (Day 1) or late (Day 7 or 8) on tumor burden and osteolysis in the H1299 Luc non-small-cell lung cancer bone metastasis model.	Mice were challenged with H1299 cells expressing luciferase into the left cardiac ventricle on Day 0. Mice were treated with either vehicle (three times/week SC starting on Day 1) or OPG-Fc (3 mg/kg three times/week SC).	Administration of OPG-Fc at 3 mg/kg initiated either early (Day 1) or late (Day 7 or 8) significantly reduced tumor burden in bone, as measured by BLI and histologically. Both treatment strategies significantly reduced osteolysis.

BLI = bioluminescence imaging; GLP = good laboratory practice; SC = subcutaneous injection

Page 18 of 20

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

2. 効力を裏付ける試験 (続き)

Study Title (Study Number)	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
Study R20080310 (continued)					OPG-Fc treatment was initiated at an early timepoint (Day 1 after tumor cell inoculation) or a late timepoint (Day 7 or 8 post-tumor cell inoculation). Tumor progression was then monitored by BLI and radiographic progression.	
Effect of OPG-Fc (in Combination with docetaxel) Treatment on Tumor Burden and Osteoclast Remodelling in a Murine Model of Bone Metastasis of Human Non-Small-Cell Lung Cell Line H1299 in Female Athymic Nude Mice (Study R20080331)	Non-GLP Final	██████████	Athymic nude mice Female n = 10/group	The objective was to test the effect of RANKL antagonism with OPG-Fc, alone and in combination with docetaxel, on tumor burden and osteolysis in the H1299 Luc non-small-cell lung cancer bone metastasis model.	Mice were challenged with H1299 cells expressing luciferase (H1299 Luc) into the left cardiac ventricle on Day 0. Therapy with OPG-Fc (3 mg/kg three times/week SC), docetaxel (35 or 50 mg/kg twice of once/week treatments IP), vehicle (three times/week SC), or combinations of OPG-Fc and docetaxel or vehicle and docetaxel started on Day 5 post tumor implantation. BLI was measured twice/week beginning on Day 2. Animals were sacrificed at Day 22 for histologic evaluation of tumor burden. X-ray radiography of hind limbs (femurs and tibiae) occurred on Days 8, 15, 18 and 21 and osteolytic lesions were calculated from Day 21 images.	OPG-Fc and docetaxel alone or in combination significantly decreased hind limb BLI versus vehicle control. OPG-Fc plus docetaxel significantly decreased hind limb BLI over docetaxel alone at either 35 or 50 mg/kg. OPG-Fc and docetaxel alone or in combination significant decreased histologic skeletal tumor area. All treatments including OPG-Fc as a single agent reduced histologic tumor area in the hind limbs and the progression of lytic lesions.

BLI = bioluminescence imaging; GLP = good laboratory practice; IP = intraperitoneal injection; SC = subcutaneous injection

Page 19 of 20

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

2. 効力を裏付ける試験（続き）

Study Title (Study Number)	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
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 (Study R20080332)	Non-GLP Final	██████████	Athymic nude mice Female n = 7-8/group	The objective was to test the effect of RANKL antagonism with OPG-Fc, alone and in combination with docetaxel, on skeletal tumor burden and osteolysis in the H1299 Luc non-small-cell lung cancer bone metastasis model.	Mice were challenged with H1299 cells expressing luciferase (H1299 Luc) into the left cardiac ventricle. Therapy with OPG-Fc (3 mg/kg three times/week SC), docetaxel (15 mg/kg twice of once/week treatments IP), vehicle (three times/week SC), or combinations of OPG-Fc and docetaxel or vehicle and docetaxel started on Day 7 post tumor implantation. BLI was measured twice/week and animals were sacrificed at Day 23 for histologic evaluation of tumor burden. Osteolytic lesions were measured by X-ray radiography on Day 23.	OPG-Fc and docetaxel alone or in combination significantly decreased hind limb BLI versus vehicle control. OPG-Fc plus docetaxel significantly decreased hind limb bioluminescence over docetaxel alone at 15 mg/kg. OPG-Fc and docetaxel alone or in combination significant decreased histologic skeletal tumor area. OPG-Fc as a single agent reduced progression of lytic lesions.

BLI = bioluminescence imaging; GLP = good laboratory practice; IP = intraperitoneal injection; SC = subcutaneous injection

Page 20 of 20

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

3. 副次的薬理試験

Study Title/Number	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
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 (Study 102090)	GLP Final	[REDACTED]	Cynomolgus monkey Male and Female n = 8/sex/group	See text in Section 2, Primary Pharmacodynamics.	See text in Section 2, Primary Pharmacodynamics.	See text in Section 2, Primary Pharmacodynamics.
Effect of the RANKL Inhibitor RANK-Fc versus Vehicle on Tumor Development in a Hormone and Carcinogen Induced Model of Mammary Tumorigenesis (Study R20090211)	Non-GLP Final	[REDACTED]	C57BL6 and MMTV-RANK mice Female n = 5-51/group	The objective was to assess the effect of RANK overexpression on mammary epithelia proliferation and tumor development using a hormone and carcinogen induced tumorigenesis model. Additionally, the effect of RANKL inhibition on preneoplastic and neoplastic lesions,	Tg mice overexpressing RANK via the MMTV long terminal repeat were engineered and are called MMTV-RANK mice. To address the contribution of RANK overexpression in mammary epithelial cells to tumorigenesis, a combination of MPA and DMBA were used to induce mammary tumors and the susceptibility of MMTV-RANK mice relative to WT mice was determined. To further define the contribution of RANKL to tumorigenesis,	RANKL is a mediator of mammary tumorigenesis in a progesterone- and carcinogen- dependent model. Pharmacologic inhibition of RANKL (using RANK-Fc) attenuated mammary tumor development after hormone and carcinogen treatment not only in MMTV-RANK, but also WT mice. The reduction in mammary tumorigenesis upon RANKL inhibition was preceded by a reduction in preneoplasias and correlated with rapid and sustained reductions

DMBA = dimethylbenzanthracene; GLP = good laboratory practice; MMTV = mouse mammary tumor virus ; MPA = medroxyprogesterone acetate; Tg = transgenic; WT = wild type

Page 1 of 9

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

3. 副次的薬理試験（続き）

Study Title/Number	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
Study R20090211 (continued)				proliferation of mammary epithelia, and cyclin D1 expression in MMTV-RANK and WT mice were determined.	MMTV-RANK and WT mice were treated with 10 mg/kg muRANK-muFc or vehicle simultaneous with the first DMBA treatment at 9 weeks of age and monitored for development of preneoplastic lesions and tumors.	in hormone- and carcinogen-induced mammary epithelial proliferation and cyclin D1 expression.
The Effect of OPG-Fc on Neovascularization in the Rat Corneal Disk Implant Model of Angiogenesis (Study R2002266)	Non-GLP Final	██████████	Sprague Dawley rats Female n = 8/group	The objective was to evaluate the effect of systemic treatment of OPG-Fc on VEGF-induced angiogenesis using the rat corneal disk implant model.	Angiogenesis was induced by implanting a VEGF (or BSA control) –soaked nylon disc into the corneal stroma. OPG-Fc (4 mg/kg/day SC) was administered for 7 days. Three endpoints were determined from each digital image of the rat cornea: disk placement distance from the limbus, number of vessels intersecting a 2 mm perpendicular line at the midpoint of the disk placement distance, and blood vessel area.	Treatment with OPG-Fc induced a statistically significant increase in the angiogenic response when compared to the vehicle treated group. There was no evidence of overt toxicity based on the body weights of the treated animals.

BSA = bovine serum albumin; GLP = good laboratory practice; MMTV = mouse mammary tumor virus; SC = subcutaneous injection; VEGF = vascular endothelial growth factor; WT = wild type

Page 2 of 9

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

3. 副次的薬理試験（続き）

Study Title/Number	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
The Effect of OPG-Fc on Neovascularization in the Rat Corneal Disk Implant Model of Angiogenesis (Study R2002204)	Non-GLP Final	██████████	Sprague Dawley rats Female n = 8/group	The objective was to evaluate the effect of systemic treatment of OPG-Fc on VEGF-induced angiogenesis using the rat corneal disk implant model.	Angiogenesis was induced by implanting a VEGF (or BSA control) –soaked nylon disc into the corneal stroma. OPG-Fc (4 mg/kg/day SC) was administered for 7 days. Three endpoints were determined from each digital image of the rat cornea: disk placement distance from the limbus, number of vessels intersecting a 2 mm perpendicular line at the midpoint of the disk placement distance, and blood vessel area.	Treatment with OPG-Fc had no significant effect on the VEGF-induced angiogenic response when compared to the vehicle treated group. There was no evidence of overt toxicity based on the body weights of the treated animals.
The Effect of OPG-Fc on Neovascularization in the Rat Corneal Disk Implant Model of Angiogenesis (Study R2002267)	Non-GLP Final	██████████	Sprague Dawley rats Female n = 8/group	The objective was to evaluate the effect of systemic treatment of OPG-Fc on bFGF-induced angiogenesis using the rat corneal disk implant model.	Angiogenesis was induced by implanting a rHu-bFGF (or BSA control) –soaked nylon disc into the corneal stroma. OPG-Fc (4 mg/kg/day SC) was administered for 7 days.	Treatment with OPG-Fc had no effect on the bFGF-induced angiogenic response when compared to the vehicle treated group. There was no evidence of overt toxicity based on the body weights of the treated animals.

bFGF = basic fibroblast growth factor; BSA = bovine serum albumin; GLP = good laboratory practice; SC = subcutaneous injection; VEGF = vascular endothelial growth factor

Page 3 of 9

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

3. 副次的薬理試験 (続き)

Study Title/Number	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
Study R2002267 (continued)					Three endpoints were determined from each digital image of the rat cornea: disk placement distance from the limbus, number of vessels intersecting a 2 mm perpendicular line at the midpoint of the disk placement distance, and blood vessel area.	
AMG 162: A Monthly Subcutaneous Injection Osteoporosis Prevention Study for 16 Months in the Cynomolgus Monkey (Study 103981)	GLP Final	██████████	Cynomolgus monkey Female n = 20/group	See text in Section 2, Primary Pharmacodynamics.	See text in Section 2, Primary Pharmacodynamics.	See text in Section 2, Primary Pharmacodynamics.
The Effects of OPG-Fc, RANK-Fc, or Alendronate on Tooth Eruption and on Bone Density, Geometry, and Strength in Neonatal Rats (Study R██████████0340)	Non-GLP Final	██████████	Sprague Dawley rats Male and Female n = 8-16/ sex/group	The objective was to observe the effects the RANKL inhibitors OPG-Fc or RANK-Fc, versus the bisphosphonate ALN, on tooth eruption and on bone density, geometry, and strength in neonatal rats.	Neonatal (2-week-old) rats were treated SC with vehicle, rat OPG-Fc (1 or 10 mg/kg per week), murine RANK-Fc (10 mg/kg per week), or ALN (0.1 or 1.0 mg/kg per week) for 6 weeks. Tooth eruption and incisor length were assessed ex vivo.	Treatment with OPG-Fc, RANK-Fc or ALN was associated with significant increases in BMC and overall strength of femurs and lumbar vertebrae and was associated with inhibition of bone growth.

ALN = alendronate; BMC = bone mineral content; GLP = good laboratory practice; micro-CT = micro-computed tomography;
SC = subcutaneous injection

Page 4 of 9

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

3. 副次的薬理試験 (続き)

Study Title/Number	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
Study F-0340 (continued)					Femurs and 5 th lumbar vertebrae were harvested and scanned by micro-CT to assess BMC, bone length, and bone geometry. Destructive strength testing was performed for femurs in 3-point bending and for vertebra in compression.	The 10 mg/kg OPG-Fc group exhibited greater reductions in skeletal growth than other groups and also significantly inhibited incisor growth and prevented the eruption of all 3 rd molars and 84% of 2 nd molars. Treatment with 1.0 mg/kg ALN caused modest inhibition of incisor growth, and prevented the eruption of all 3 rd molars and 13% of 2 nd molars. Body weight gain was significantly reduced in males and females treated with 10 mg/kg OPG-Fc or 1.0 mg/kg ALN. Treatment with 10 mg/kg OPG-Fc caused the greatest deficit in weight gain, which was more evident after rats were weaned at 4 weeks of age (ie, after 2 weeks of treatment).

ALN = alendronate; BMC = bone mineral content; micro-CT = micro-computed tomography

Page 5 of 9

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

3. 副次的薬理試験 (続き)

Study Title/Number	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
The Effects of OPG-Fc or Alendronate on Tooth Eruption and on Bone Density, Geometry and Strength in Neonatal Rats: A Recovery Study (Study R20090070)	Non-GLP Final	██████████	Sprague Dawley rats Male and Female n = 9-11/sex/group	The objective was to examine the extent to which the changes in tooth eruption and on bone density, geometry, and strength observed in Study R██████████0340 were recoverable upon discontinuation of OPG-Fc or ALN.	Neonatal (2-week-old) rats were treated SC once weekly with vehicle, rat OPG-Fc (1, 3, or 10 mg/kg), or ALN (1 mg/kg) for 6 weeks, after which treatment was discontinued and all animals were sacrificed 10 weeks later. To examine the potential contribution of impaired tooth eruption on weight gain and bone growth, males were provided both standard pelleted chow and powdered chow, while females were fed only pelleted chow. Tooth eruption and incisor length were assessed ex vivo. Femurs and 5 th lumbar vertebrae were harvested and scanned by micro-CT to assess BMC, bone length, and bone geometry. Destructive strength testing was performed for femurs in 3-point bending and for vertebra in compression.	Ten weeks after the discontinuation of a 6-week course of OPG-Fc administration, neonatal rats exhibited evidence of restored bone resorption and partial normalization of bone density, size, and strength. Molar eruption, which had been substantially delayed during the administration of OPG-Fc (Study R██████████0340), exhibited partial recovery in some animals within 10 weeks of its discontinuation. The relative increases in bone volume, density, and strength that occurred during 6 weeks of ALN administration were generally preserved 10 weeks after its discontinuation, whereas molar eruption did not recover within this timeframe. Modest epiphyseal growth plate changes persisted 10 weeks

ALN = alendronate; BMC = bone mineral content; GLP = good laboratory practice; micro-CT = micro-computed tomography;
SC = subcutaneous injection

Page 6 of 9

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

3. 副次的薬理試験 (続き)

Study Title/Number	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
						after discontinuing high-dose OPG-Fc. Bone size, body weight, and molar root development remained significantly reduced 10 weeks after discontinuation of OPG-Fc or ALN when compared to the vehicle control group.
Long Bone Geometry in 1- and 2-month-old Transgenic Sprague-Dawley Rats Overexpressing the Soluble RANKL Inhibitor OPG During Growth and Development (Study R20090069)	Non-GLP Final	██████████	OPG-Tg Sprague Dawley rats Male and Female n = 3-9/sex/group	The objective was to examine long bone geometry and strength in young (1- and 2-month old) OPG-Tg Sprague Dawley rats, in an attempt to determine the age at which suboptimal long bone phenotype become apparent.	For 1-month-old rats, 7 male and 3 female OPG-Tg rats were compared to 7 male and 7 female WT controls. For 2-month-old rats, 5 male and 3 female OPG-Tg rats were compared to 8 male and 9 female WT controls. Femurs were harvested and scanned using micro-CT methods to analyze density and geometry. The femurs were then subjected to destructive 3-point bending to assess biomechanical parameters of bone strength. Blood was collected to measure serum OPG levels, and to assess the osteoclast marker, serum TRAP-5b and	The overexpression of OPG from a prenatal stage and throughout the first 2 months of life resulted in changes in bone density, geometry, and femur bending strength that were neutral or favorable, with no consistent changes in material properties. Short-term exposure (up to 2 months) to OPG-Tg had neutral or positive effects on femur bending strength, without consistent deficits in femur length.

ALN = alendronate; GLP = good laboratory practice; micro-CT = micro-computed tomography; Tg = transgenic; WT = wild type

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

3. 副次的薬理試験 (続き)

Study Title/Number	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
Study R20090069 (Continued)					serum TRAP-5b and osteoblast marker, serum osteocalcin.	
Dose-Dependent Effects of OPG-Fc on Tooth Eruption, Bone Growth and Bone Strength in Neonatal Rats (Study R20090282)	Non-GLP Final	██████████	Sprague Dawley rats Male and Female n = 3-10/sex/group	The objective was to determine the dose-dependent effects of OPG-Fc on bone growth, bone strength and dentition in neonatal rats.	Neonatal (2-week-old) male and female Sprague Dawley rats were treated with vehicle, or rat OPG-Fc at 3 or 10 mg/kg. All treatments were administered by weekly SC for 6 weeks. Males were provided both standard hard chow and powdered chow, while females were fed only hard chow.	RANKL inhibition via weekly administration of OPG-Fc to neonatal rats resulted in dose-dependent reductions in bone resorption that resulted in osteopetrosis-like changes at the 10 mg/kg dose level. These changes included marked increases in bone density, reduced bone growth and weight gain, and impaired tooth eruption. Structural parameters of femur and vertebral bone strength were generally unchanged or improved with OPG-Fc administration, whereas the intrinsic (material) strength parameter toughness was significantly reduced in femurs. Histopathology assessment of the proximal tibia indicated that OPG-Fc administration resulted in thickened and disorganized growth plate morphology.

GLP = good laboratory practice; SC = subcutaneous injection; TRAP = tartrate-resistant acid phosphatase

Page 8 of 9

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

3. 副次的薬理試験（続き）

Study Title/Number	Status	Test Article Lot No.	Test System or Species	Objective	Methods	Summary of Results
Comparison of Two Anti-Resorptive Therapies (Alendronate vs. AMG 162 Monoclonal Anti-RANKL Antibody) on Murine Fracture Healing (Study R [REDACTED] 458)	Non-GLP Final	[REDACTED]	C57/B6/RANK human RANKL KI mice Male n = 30/group	The objective was to assess the impact of ALN and AMG 162 (denosumab) on fracture repair in human RANKL KI mice.	C57/B6/RANK human RANKL KI mice received unilateral transverse femur fractures. Mice were then treated biweekly SC with ALN (0.1 mg/kg), denosumab (10 mg/kg), or vehicle (0.1 mL) until harvest at either 21 or 42 days post-fracture. Both fractured and contralateral femora were subjected to micro-CT analysis and torsional testing. A subset of fractured femora from Day 21 also underwent histological evaluation, including TRAP staining for the presence of osteoclasts.	Although ALN and denosumab delayed the removal of cartilage and remodelling of the fracture callus, this did not reduce the mechanical integrity of fractured bones in mice receiving these treatments. In contrast, mechanical properties, such as strength and stiffness, were enhanced in these treatment groups when compared to control bones. This suggests that despite changes in morphology and the time course of biological progression of cartilage resorption and tissue remodelling in the denosumab and ALN treated animals, no impairment of regain of strength and stiffness was seen as a consequence of these treatments during fracture healing.

GLP = good laboratory practice; SC = subcutaneous injection; TRAP = tartrate-resistant acid phosphatase

Page 9 of 9

2.6.3 薬理試験概要表

デノスマブ

4. 安全性薬理試験

Study Title	Species/ Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Sex and No. per Group	Evaluation	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
A Single-Dose Subcutaneous Administration of AMG 162 for Cardiovascular and Respiratory Evaluation in Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus Monkeys	SC (single dose)	0 (vehicle), 0.3, 3.0, 30	Male n = 3	Cardiovascular	No treatment-related effects on evaluated cardiovascular parameters (heart rate, systolic pressure, diastolic pressure, mean arterial pressure, body temperature, or ECG recordings). NOAEL: 30 mg/kg	Yes	101606 (1129-01)
					Respiratory	No treatment-related effects on evaluated respiratory parameter (respiratory rate) NOAEL: 30 mg/kg		
					Toxicokinetics	Concentration (ng/mL) ^{a)}		
					Dose (mg/kg)	Mean		
					0 (vehicle)	0	(0)	
					0.3	2890	(350)	
					3.0	29200	(1190)	
					30	291000	(94100)	

a: Serum concentration measured at 96 hours postdose; n = 3/group

ECG = electrocardiogram; GLP = good laboratory practice; NOAEL = no-observed-adverse-effect-level; SC = subcutaneous injection; SD = standard deviation

デノスマブ

5. 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験は実施していない。