

目次

1.	非臨床試験計画概略	8
1.1	非臨床における問題点	9
1.2	非臨床試験の主な結論	9
1.3	理化学的考察	10
2.	薬理試験	12
2.1	効力を裏付ける試験	12
2.1.1	In vitro 試験	12
2.1.2	In vivo 試験	13
2.1.3	薬力学的メカニズム	16
2.2	副次的薬理試験	18
2.2.1	免疫系	18
2.2.1.1	RANK/RANKL ノックアウト及びOPG 過剰発現トランスジェニック動物の表現型	19
2.2.1.2	基礎免疫系	19
2.2.1.3	免疫応答惹起に対する反応	20
2.2.1.4	感染症に対する免疫応答	20
2.2.1.5	免疫介在性疾患に対する影響	21
2.2.1.6	免疫系の要約	22
2.2.2	乳腺及び授乳	22
2.2.3	新生仔に対する影響	23
2.2.4	心血管系	27
2.2.4.1	血管新生	27
2.2.4.2	血管石灰化及びアテローム性動脈硬化症	27
2.2.5	体温調節	28
2.3	安全性薬理試験	29
2.4	薬力学的薬物相互作用試験	29
3.	薬物動態試験	30
3.1	分析法	30
3.2	吸収	30
3.3	分布	31
3.4	代謝	32
3.5	排泄	32
3.6	薬物動態学的薬物相互作用	32
4.	毒性試験	34
4.1	単回投与毒性試験	34

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

4.2	反復投与毒性試験	34
4.2.1	サル反復投与毒性試験	34
4.3	遺伝毒性試験	37
4.4	がん原性試験	37
4.5	生殖発生毒性試験	38
4.5.1	受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	38
4.5.2	胚・胎児発生に関する試験	39
4.5.3	出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験	39
4.5.4	新生児（幼若動物）を用いた試験	41
4.6	局所刺激性試験	41
4.7	その他の毒性試験	41
4.7.1	抗原性試験	41
4.7.2	免疫毒性試験	41
4.7.3	毒性発現の機序に関する試験	42
4.7.4	依存性試験	42
4.7.5	代謝物の毒性試験	42
4.7.6	不純物の毒性試験	42
4.7.7	その他の試験	42
4.7.8	環境への配慮	42
5.	総括及び結論	43
6.	参考文献	47
7.	文書中の報告書一覧	59

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

略号一覧

略号	略していない表現 (英)	略していない表現 (日)
AMGN-0007 (AMG0007)	recombinant construct consisting of human osteoprotegerin attached to an immunoglobulin crystallisable fragment; OPG-Fc	免疫グロブリン結晶化フラグメントに結合させたヒトオステオプロテゲリンから成る組換え型、OPG-Fc (本文では AMGN-0007、AMG0007 という記述は無いが、モジュール 4 にて使用されている場合がある)
Ang-1	angiotensin-1	アンジオテンシン - 1
AUC	area under the concentration-time curve	濃度-時間曲線下面積
AUC _{0-tau}	AUC over the dosing interval	0 時間から投与間隔時間までの AUC
bFGF	basic fibroblast growth factor	塩基性線維芽細胞増殖因子
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
CD40L	CD40 ligand	CD40 リガンド
CFU-M	macrophage colony-forming unit	マクロファージコロニー形成ユニット
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use	ヒト用医薬品委員会
C _{max}	maximum serum concentration	最高血清中濃度
CPMP	Committee for Proprietary Medicinal Products	欧州医薬品委員会
Cr	creatinine	クレアチニン
CSF-1	colony stimulating factor-1	コロニー刺激因子 - 1
CSMI	cross sectional moment of inertia	断面二次モーメント
CT	computed tomography	コンピュータ断層撮影法
CTX	C-telopeptide	C-テロペプチド
CYP	cytochrome P450	チトクロム P450
DR	death receptor	細胞死受容体
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫吸着測定
EMA	European Medicines Evaluation Agency	欧州医薬品審査庁
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 OPG attached to an immunoglobulin crystallizable fragment	免疫グロブリン結晶化フラグメントに結合させた OPG (OPG-Fc とタグの位置が異なる)
FcRn	neonatal Fc receptor	新生仔 Fc 受容体
FDA	Food and Drug Administration (United States)	食品医薬品局 (米国)
GLP	good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HCM	Hypercalcemia of malignancy	悪性腫瘍による高カルシウム血症

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

略号	略していない表現 (英)	略していない表現 (日)
hERG	human ether-a-go-go related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャンネル遺伝子
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
HRP	horseradish peroxidase	西洋ワサビペルオキシダーゼ
huRANKL	humanized RANK ligand	ヒトとマウスのキメラ RANK リガンド
ICH	International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IKK α	Ikappa B kinase α	I κ B キナーゼ α
IL	interleukin	インターロイキン
K $_d$	binding dissociation constant	解離平衡定数
KLH	keyhole limpet hemocyanin	キーホールリンペットヘモシアニン
LCMV	lymphocytic choriomeningitis virus	リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス
MHLW	Ministry of Health, Labour, and Welfare (Japan)	厚生労働省 (日本)
NIH	National Institute of Health	米国国立衛生研究所
NK	natural killer	ナチュラルキラー
NOAEL	no-observed-adverse-effect level	無毒性量
NOEL	no-observed-effect level	無影響量
NTX	N-telopeptide	N-テロペプチド
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development	経済協力開発機構
OPG	osteoprotegerin	オステオプロテゲリン
OPG-Fc	recombinant construct consisting of OPG attached to an immunoglobulin crystallizable fragment	免疫グロブリン結晶化フラグメントに結合させた OPG (Fc- OPG とタグの位置が異なる)
OVX	ovariectomized	卵巣摘出
PK/PD	pharmacokinetics/pharmacodynamics	薬物動態/薬力学
pQCT	peripheral quantitative computed tomography	末梢骨定量的コンピュータ断層撮影法
PTHrP	parathyroid hormone-related peptide	副甲状腺ホルモン関連ペプチド
QTc	corrected QT	補正 QT
RANK-Fc	extracellular domain of RANK linked to Fc	RANK 細胞外領域と Fc 領域との融合たん白質
RANKL	RANK ligand (referred to as OPG ligand or TRANCE in older literature citations).	RANK リガンド (古い引用文献では、OPG リガンド又は TRANCE と称される)
RANKL-HRP	HRP-labeled RANKL	HRP 標識 RANKL
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
TRAP5b	tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b	酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼアイソフォーム 5b

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

略号	略していない表現（英）	略していない表現（日）
uNTX/Cr	urine NTX corrected for urine creatinine	尿中クレアチニン補正した尿中NTX
vBMD	volumetric BMD	体積 BMD
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮増殖因子
V_{ss}	volume of distribution	分布容積
WHO	World Health Organization	世界保健機構

デノスマブ

2.4 非臨床試験の概括評価

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

デノスマブは、海外では閉経後骨粗鬆症、並びに前立腺癌及び乳癌患者におけるホルモン抑制療法に伴う骨量減少を適応症とした開発が先行して行われ、米国では2010年6月と2011年9月に、それぞれ「閉経後骨粗鬆症」と「前立腺癌及び乳癌患者のホルモン抑制療法に伴う骨量減少」の適応症を、欧州では2010年5月に「閉経後骨粗鬆症及び前立腺癌患者におけるホルモン抑制療法に伴う骨量減少」の適応症を取得した。その後、米国では、男性骨粗鬆症についても2012年9月に追加承認された。デノスマブは2012年10月現在、60カ国以上で承認され、骨粗鬆症の治療に広く使われている。さらに、骨病変を有する固形癌患者の骨関連事象の発現抑制に関する適応症についても「1回120 mg、4週間に1回、皮下投与」の用法・用量で2010年11月に米国及びその他で承認され、販売されている。

国内では、新有効成分含有医薬品として「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」を効能・効果案とし、海外と同じ用法・用量にて、第一三共株式会社が2011年2月に製造販売承認申請を行い、2012年1月に承認された。また、関節リウマチ、再発リスクの高い早期乳癌患者、及び骨巨細胞腫を対象とした国内臨床試験を実施中である。今回の提出資料では、骨粗鬆症患者に対する治療法としてデノスマブ 60 mg/mL を 1.0 mL、6カ月に1回皮下投与する液剤の販売承認を申請する。骨粗鬆症の疾患経過の性質を考慮し、デノスマブは長期使用を意図している。

骨粗鬆症は、骨強度の低下を特徴とし、骨折リスクが増大しやすくなる骨格疾患である（世界保健機構 [WHO] 研究グループ、1994）。骨強度は、骨密度と骨質の2つの要因からなり、骨密度は、骨強度のほぼ70%を説明するとされた（骨粗鬆症の予防、診断、及び治療に関する米国国立衛生研究所 [NIH] コンセンサス開発会議、2001）。また、骨粗鬆症は男女問わず、加齢により発症する。特に女性では、閉経後のエストロゲン欠乏に伴う骨量減少による閉経後骨粗鬆症も加わり、男性より骨粗鬆症の発症頻度が高い。骨量減少は、主として破骨細胞の動員、活性化、又は活性の増強による骨吸収の亢進により引き起こされる。骨吸収が亢進し、それに伴い骨リモデリングの単位である基本細胞単位レベルで骨吸収が優位になると、その結果、骨密度の減少、並びに骨形状及び微小構造の劣化がもたらされる。この骨吸収の亢進により、骨梁構造の崩壊、海綿骨及び皮質骨の菲薄化、並びに皮質骨多孔化の可能性が高まる（Seeman and Delmas, 2006）。

非転移性乳癌又は前立腺癌はホルモン抑制療法により疾患再発及び総死亡率が減少する（Goss et al, 2003、Messing et al, 1999、Bolla et al, 1997、Walsh, 1997）。しかし、前立腺癌のア

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

ンドロゲン除去療法、又は乳癌のアロマターゼ阻害剤治療により、骨粗鬆症や骨折が引き起こされる (Mincey et al, 2006、Diamond et al, 2004、Lester and Coleman, 2005、Shahinian et al, 2005)。

非臨床試験の概括はモジュール 4 に示した薬理、薬物動態、毒性試験成績をまとめたものであり、さらに臨床における安全性について考察を加えた。モジュール 4 に添付した報告書の一覧を第 7 項に示す。本非臨床概括評価中では、各項に記載した試験報告書及び該当する概要表への相互参照を表示した。なお、これらの非臨床試験はすべて、本邦で 2012 年 1 月に製造販売承認を取得したランマーク皮下注 120 mg (デノスマブ[遺伝子組換え]) の承認申請資料として提出し、審査済みである。

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

1. 非臨床試験計画概略

デノスマブの非臨床試験は、バイオ医薬品の標準的な開発手法 (Olejniczak et al, 2001) に従い、規制ガイダンスを遵守して計画された。本申請資料に含まれる薬理及び薬物動態試験のほとんどをアムジェン社にて実施し、毒性試験を外部受託機関で実施した。

骨粗鬆症治療薬の開発においては、通常げっ歯類モデル (米国食品医薬品局 [US FDA] 1994; 欧州医薬品委員会 [CPMP] /EWP/552/95 rev 2) を用いて薬効評価が行われる。また、本邦の「骨粗鬆症用薬の臨床評価方法に関するガイドラインについて(平成11年4月15日 医薬審第742号)」においても、治験薬の効果を動物で評価する際には、少なくとも二種類の動物で検討する必要があるとされている。しかし、デノスマブの生物学的活性は霊長類に特異的であるため、ラットを用いた試験は実施せず、代替としてオステオプロテゲリン (OPG) トランスジェニックあるいはヒトとマウスのキメラ RANKL (huRANKL) を発現するノックインマウスを用いた試験を実施した。OPG はデノスマブと同様の作用を有する内因性 RANKL 阻害剤であり (Kostenuik et al, 2009)、組換え型 OPG は、霊長類、ラット、及びマウスなどの様々な動物種において RANKL を効果的に阻害する。デノスマブは霊長類の RANKL のみを認識するため、各種骨疾患の非臨床モデルにおいて RANKL 阻害作用を検討する際は、サロゲートとして組換え型 OPG を使用した。また、huRANKL ノックインマウスにデノスマブ投与することで、デノスマブの薬力学的特性に関する新たな知見が得られた。毒性試験は、本非臨床の文書の該当項に示すとおり、『日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) S6「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」(平成12年2月22日付医薬審第326号)、以下 ICH S6』で示されている指針に準拠して実施した。通常個別の試験として実施するいくつかの毒性評価については反復投与毒性試験の中に組み入れて評価した。また、デノスマブの安全性プロファイル評価に適切ではないと判断したいくつかの毒性試験については実施していない。

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

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

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

1.1 非臨床における問題点

デノスマブの開発中に確認された非臨床安全性で問題となり得る事項は、血清カルシウムの一過性の減少、霊長類で認められた中和抗体の生成による薬物曝露の減少と生物学的活性の減弱、慢性毒性試験における死亡、骨折治癒への影響の可能性、免疫系への影響の可能性、血管系への影響の可能性、及び器官形成期から分娩までの期間における胎児への影響などが挙げられる。デノスマブの安全性評価に対するこれらの問題の関連性及び患者への影響を以下に考察する。

1.2 非臨床試験の主な結論

- TNF スーパーファミリーのメンバーの一つである RANK/RANKL 系は、破骨細胞の形成、機能、及び生存における必須のメディエーターである。
- デノスマブは、ヒト型 IgG2 モノクローナル抗体であり、ヒトの RANKL 及び非ヒト霊長類の RANKL と結合し、その活性を中和するが、げっ歯類の RANKL とは結合しなかった。
- OPG は内因性の RANKL 阻害剤であり、デノスマブと同様の作用機序を有する。組換え型ヒト OPG はげっ歯類の RANKL を阻害することから、種々の非臨床モデルにおいて RANKL 阻害の薬理作用を検討するために用いた。免疫グロブリン結晶化フラグメント (Fc) を OPG に結合させ (OPG-Fc)、動物モデルでの薬理活性の発現を向上させた。
- 成熟卵巣摘出 (OVX) サルにデノスマブを投与したところ、海綿骨及び皮質骨の骨量、骨密度 (BMD)、及び骨強度が急速に、また有意に増加した。この作用は骨吸収抑制剤としての薬力学作用によるものである。
- 大腿骨閉鎖性骨折を施した huRANKL ノックインマウスにデノスマブを投与すると、仮骨部位及び仮骨体積の増加が認められた。また、仮骨における破骨細胞数が減少し、骨折部位の仮骨のリモデリングが遅延したが、骨折部位の骨強度は低下しなかった。
- 組織交差反応性試験の結果、デノスマブは、他の TNF スーパーファミリー、特に TNF 関連アポトーシス誘導リガンド (TRAIL) の発現が知られている組織には結合しなかった。
- デノスマブが動物に心血管リスクを惹起したことを示す徴候はみられなかった。
- デノスマブが用量に対して非線形の薬物動態を示す理由は、2つの消失経路が関与している可能性が考えられ、一つは RANKL 結合が関連する飽和性の経路、もう一つは新生仔 Fc 受容体 (FcRn) が関与する細網内皮系の細胞による非特異的異化経路である。
- 骨中へのデノスマブの分布あるいは残留の痕跡はみられなかった。
- 非臨床のデータを総合すると、デノスマブ投与による成獣の免疫系への有害作用は

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

ないことが示唆された。サルにデノスマブを器官形成期から分娩までの期間皮下投与した場合、RANK/RANKL ノックアウト動物と同様に末梢リンパ節の形成不全が引き起こされた。

- デノスマブはサルにおいて高い免疫原性を示し、結合抗体及び中和抗体の生成が認められたことから、長期投与試験ではより高用量投与が必要となった。
- 一般毒性試験で認められたデノスマブ投与に関連した所見は、デノスマブの薬理作用に起因すると考えられる若齢サルでの骨端成長板の肥大のみであった。
- デノスマブは雌雄の受胎能への作用に対する危険性を示さなかったが、器官形成期から分娩までの期間、サルに皮下投与した結果、死産の増加、出生児の死亡の増加、骨の形態異常、末梢リンパ節の形成不全などの発生異常が認められた。新生仔ラットにおいて RANKL 阻害による骨量及び骨強度の増加、大腿骨靭性の低下、歯牙萌出の阻害、及び長軸方向の骨成長の抑制が認められた。RANKL 阻害を中止した後には、部分的に回復が認められた。

1.3 理化学的考察

デノスマブは、ヒト型 IgG2 モノクローナル抗体であり、ヒト RANKL と結合し、その活性を中和する。デノスマブを一定の管理条件下で、チャイニーズハムスター卵巣細胞株 (CHO) に発現させている。デノスマブの同一性の確認はデノスマブに特異的な抗原を用いたイムノアッセイにより、純度の確認は還元キャピラリーゲル電気泳動 (rCE-SDS)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC ; サイズ排除、陽イオン交換) により実施する。デノスマブの生物活性は *in vitro* アッセイ系を用いて、含量は紫外可視吸光度測定法を用いて測定する。本品は、針付きガラスシリンジに充てんし、たん白質濃度 60 mg/mL の無色～淡黄色で澄明又はわずかに乳白光を呈する水性注射剤として調製される。製剤は酢酸、水酸化ナトリウム、D-ソルビトール及びポリソルベート 20 を含み、pH は 5.0～5.5 に調整される (全体的な品質に関する詳細についてはモジュール 2.3 参照)。

デノスマブは、CP1と呼ばれる実生産向けに開発した製法を用いて初期製造されたが、その後、生産量を上げ、かつ安定な工程となるよう、より実生産向けに改善され、最適な製法 (CP2) が開発されている。臨床開発をサポートするために実施した主要な毒性試験ではCP1工程により製造した被験物質を使用した (モジュール3.2.S.2.6項参照)。CP2への工程改善により、デノスマブの生化学的特性解析において、何ら問題となる差異はみられなかった (モジュール3.2.S.2.6項参照)。したがって、CP1を用いて実施した毒性試験は十分なものであり、改良工程にて製造した被験物質を臨床試験プログラムへ導入するために動物を用いた追加毒性試験は必要ないと判断した。一方で、サルのPK/PD比較試験 (試験報告書103948) を実施して、CP2における細胞培養培地及び精製工程の変更が生物学的活性に及ぼす影響を検討した (モジュール3.2.S.2.6項及びモジュール2.6.4第8.3項参照)。

すなわち、0.1 mg/kg の CP1 又は CP2 デノスマブを雌カニクイザルに単回皮下投与し、血清中デノスマブ濃度及び血清又は尿中骨代謝マーカー濃度を、投与後 672 時間まで経時的に

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

評価した。多くの個体（16例中13例）で、抗デノスマブ抗体の発現による、急速なデノスマブの消失が確認された。このことは、反復投与毒性試験での所見と一致していた。336時間までに抗デノスマブ抗体を発現しなかった動物において、CP1及びCP2を投与した動物の最高血清中濃度（ C_{max} ）の平均値の差及び濃度-時間曲線下面積（AUC）の0～336時間の値（ $AUC_{0-336\text{hr}}$ ）の平均値の差は、それぞれ23%未満及び16%未満であった。さらに、CP1又はCP2のいずれを投与した動物においても、骨代謝マーカーの変化は概ね同様であった。以上のデータから、製造工程CP2への改善は、サルのパラメータに対して有意な影響を及ぼさないことが示された。生化学データ及び非臨床PK/PDデータと、デノスマブの臨床生物薬剤学試験の結果（[モジュール2.5第2項](#)及び[モジュール2.7.1](#)参照）を総合すると、市販用に供する予定である原薬及び製剤は、主要な非臨床試験で使用した被験物質と同等/同質であることが示された。

デノスマブ

2. 薬理試験

これまでに得られた幅広い情報から、デノスマブの生物学的活性の性質が明らかになり、その細胞レベルでの作用メカニズムを考察することが可能となった(モジュール 2.6.2 参照)。骨では、破骨細胞により骨が吸収され、吸収された部位に骨芽細胞が新しい骨を形成するリモデリングが行われている。この過程では、破骨細胞及び骨芽細胞が時間的、空間的に共役して基本細胞単位を構成し、骨の除去及び置換が連携して生じる。骨のリモデリングは、骨代謝回転の速度により評価することができ、それは破骨細胞と骨芽細胞の活性化の頻度及び活性の度合い、並びに基本細胞単位の終結速度に依存している。骨表面で破骨細胞による骨吸収が始まることにより、新たな基本細胞単位が形成される (Burr and Martin, 1989)。骨芽細胞は、カルシウム調節ホルモン及びサイトカインの受容体を有し、破骨細胞の局所的な動員及び活性を調節しており、骨リモデリングの制御に主要な役割を果たしていると考えられる (Rodan and Martin, 1981)。また、骨は血清カルシウムの恒常性を維持する上で重要な役割を果たしていることから、RANKL 阻害が、カルシウムの制御に影響を及ぼす可能性が考えられる。加えて、加齢やエストロゲン欠乏により、骨形成(骨芽細胞性)と骨吸収(破骨細胞性)のバランスが崩れ、ひいては、全身性の骨粗鬆症が引き起こされる。

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

OPG は、RANKL と結合しその作用を阻害するという、デノスマブと同じ作用機序を有しており、組換え型 OPG をマウス及びラットに投与すると、破骨細胞の分化及び活性化が抑制され、骨吸収が抑制される (Lacey et al, 1998, Ominsky et al, 2008)。デノスマブはげっ歯類の RANKL を認識しないが、デノスマブの薬力学作用機序が OPG と同様であることから、げっ歯類を用いて実施した試験では組換え型 OPG を使用した。これらの試験は、効力を裏づける薬力学作用及び RANKL の骨質に対する作用について考察する上で適切と考えられた。

2.1 効力を裏付ける試験

2.1.1 In vitro 試験

デノスマブは解離平衡定数 (K_d) 3×10^{-12} M でヒト RANKL と結合し、その結合は可溶性及び膜結合型のヒト RANKL に特異的である。デノスマブは TRAIL (DR4 及び DR5 のリガンド)、TNF- α 、TNF- β 、又は CD40 リガンド (CD40L) とは結合しなかった (試験報告書 R-351)。一方で、OPG は RANKL だけでなく、TRAIL とも結合することが報告されている (Truneh et al, 2000)。デノスマブの RANKL 結合部位はカニクイザルとヒトとの間で完全に相同であり、この2つの種間におけるデノスマブの薬力学及び薬物動態(モジュール 2.6.4 参照)の特性は非常に類似していたことから、カニクイザルはデノスマブの薬理及び毒性の

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

検討に適した種であると考えられる。一方で、デノスマブは、マウス又はラットの内因性 RANKL に対して活性を示さないため、デノスマブの生物学的活性をげっ歯類で示すことはできない（試験報告書 R■■■■430）。そこで、トランスジェニック、ノックイン、ノックアウト、及びサロゲート分子を用いた種々のげっ歯類モデルを用いて、デノスマブの薬力学的メカニズムを検討した（第 2.1.3 項参照）。以上の結果から、デノスマブは RANKL 特異的であり、げっ歯類の RANKL に活性を示さず、デノスマブを研究するのに適した動物種は非ヒト霊長類のみであることが示された。

2.1.2 In vivo 試験

デノスマブはヒトの RANKL 及び非ヒト霊長類の RANKL のみを認識して阻害するため、カニクイザルを薬力学及び毒性試験の最適な動物モデルとして選定した（Kimmel, 1996）。非げっ歯類の選定は、閉経後骨粗鬆症の治療に使用する薬剤の評価に関する既存の規制ガイドダンスに準拠している（「骨粗鬆症用薬の臨床評価方法に関するガイドラインについて（平成 11 年 4 月 15 日 医薬審第 742 号）」;US FDA 1994; CPMP/EWP/552/95 rev 2）。一方で、デノスマブには種特異性があることから、骨粗鬆症にて一般的に用いられるげっ歯類モデルを用いて評価することは不可能であった。

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

デノスマブを用いた評価は霊長類モデルに限定されるものの、げっ歯類の骨疾患モデルにおける薬力学データから、OPG がデノスマブの適切なサロゲートであることが示された。前述のように、骨において OPG 及びデノスマブは RANKL を阻害するという同様の作用機序を示す。OPG が in vivo においてデノスマブの適切なサロゲートであることを確認するために、OPG 及びデノスマブのいずれもが結合反応を示す遺伝子組換えマウスを作出し、両者の骨に対する作用を比較した。遺伝子組換えマウスでは、ノックイン技術によりマウス RANKL 遺伝子の第 5 エクソンをヒト RANKL 遺伝子の第 5 エクソンに置き換え、デノスマブに対する反応性を検討した。このノックインマウスに発現する huRANKL はヒト RANKL に対する酵素免疫吸着測定 (ELISA) 法により認識され、またデノスマブにより阻害された。組換え OPG 及びデノスマブ (5 mg/kg、皮下投与、週 2 回) により、組織学的には破骨細胞面の割合が低下し、また、生化学的には破骨細胞活性のマーカーである血清中酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼアイソフォーム 5b (TRAP5b) が低下するなど、類似した骨吸収抑制作用を示すことが明らかとなった。末梢骨定量的コンピュータ断層撮影法 (pQCT) による評価では、これらの作用は体積 BMD (vBMD) の増加と一致していた。さらに、これらのマウスの応答性は、投与期間中の週齢の影響を受けなかった（試験報告書 R■■■■321 及び R■■■■430、Kostenuik et

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

al, 2009)。

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

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

成熟OVXカニクイザルを用いて、アレンドロネート（ビスフォスフォネート系骨吸収抑制薬）を6ヵ月間投与した後デノスマブ（25 mg/kg、皮下投与、月1回）に切り替えた場合の骨密度、骨強度、及び血清カルシウムに対する影響についても評価した（試験報告書106564）。投与をアレンドロネートからデノスマブに切り替えると、アレンドロネートの投与を継続した場合と比較して、骨吸収はさらに抑制され、その結果、全身、腰椎、及び橈骨遠位部のBMDはアレンドロネート投与時よりも増加した。なお、骨強度や他の骨質パラメータに対して悪影響は認められなかった。アレンドロネート又はデノスマブを投与したサルでは、投与後一過性に血清カルシウムが低下した。しかし、平均血清カルシウム値は、同年齢の薬剤非投与OVX群の正常範囲内にとどまっていた。溶媒を6ヵ月間前投与した後、デノスマブ投与に切り替えると、平均血清カルシウム値は一過性に最大15.2%低下した。対照的に、アレンドロネートからデノスマブに切り替えた場合は、一過性の平均血清カルシウム値の低下は4.5%であった。これらの知見から、ビスフォスフォネートからデノスマブへ投与を切り替えても、血清カルシウム、骨強度、又は骨質に明らかな有害作用がないことが示された。

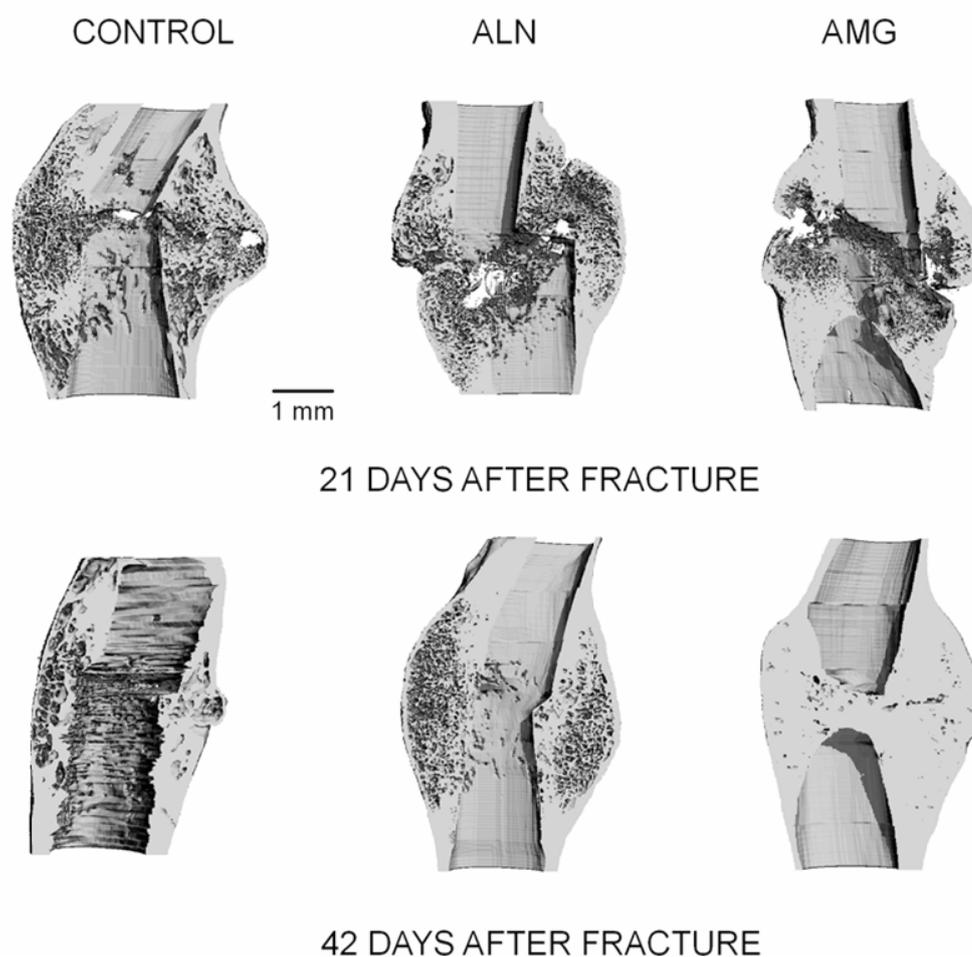
デノスマブは骨吸収過程において破骨細胞の機能を阻害することから、骨折治癒及び骨性

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

仮骨のリモデリングに対する作用について検討した。デノスマブが結合する huRANKL ノックインマウスに大腿骨閉鎖性骨折を施し、骨折後 2 日目から溶媒、デノスマブ又はアレンドロネートを投与して骨折後 21 及び 42 日目に骨折部位を評価した。デノスマブ及びアレンドロネート投与群の骨折骨は、溶媒コントロール群の骨折骨と比較し、いずれの時点においてもねじり試験による剛性又は最大トルクが増強した。マイクロコンピュータ断層撮影法（マイクロ CT）解析では、デノスマブ投与群の骨折仮骨の骨塩量、骨面積、及び骨量比率は、溶媒コントロール群に比べて、いずれの時点においても有意に増加した。骨折後 42 日目では、デノスマブ投与群の仮骨は溶媒コントロール群と比較して有意に大きかったが、これは恐らく吸収されていない軟骨が仮骨中に多く残存していたためと推察された。なお、この軟骨の残存はアレンドロネート投与群でも同様に認められた。逆に骨吸収が亢進している OPG ノックアウトマウスでは、骨折治癒部位において軟骨が早期に消失することから、軟骨の残存は骨吸収の抑制によるものと考えられる（Ota et al, 2009）。また、デノスマブ投与群では仮骨のリモデリングが遅延していたにも関わらず、骨折後 42 日目には仮骨の大部分が高度に石灰化した骨梁組織で占められており、仮骨中にはごくわずかの破骨細胞しか認められなかった。骨折仮骨のマイクロ CT 画像を図 2-1 に示す。

本試験において注目すべき点は、デノスマブの投与により骨折部位の骨強度が低下しなかったことであり、このことはデノスマブによる仮骨リモデリングの遅延が、骨折治癒に対して重大な懸念要因とならないことを示唆している。また、骨折部位の骨強度及び剛性が、溶媒コントロール群と比較して増強しているのは重要な点である。デノスマブの投与により大きな仮骨が形成されたが、デノスマブは骨折の治癒には有害作用を示さず、また骨折部位の骨強度に対して明らかな悪影響を及ぼさず、骨折部位の不安定性をもたらさなかった（試験報告書 R-458）。



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

図 2-1 デノスマブ又はアレンドロネートを投与した huRANKL ノックインマウスの骨折部位の代表的マイクロ CT 画像

2.1.3 薬力学的メカニズム

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

前述のとおり、OPG は可溶性であり、内因性の RANKL 阻害剤である。組換え型 OPG は、非ヒト霊長類、ラット、及びマウス等の数種の動物種において RANKL 阻害効果を示す。デノスマブは非ヒト霊長類以外で活性を示さないが、RANKL を認識することから、骨に対す

2.4 非臨床試験の概括評価

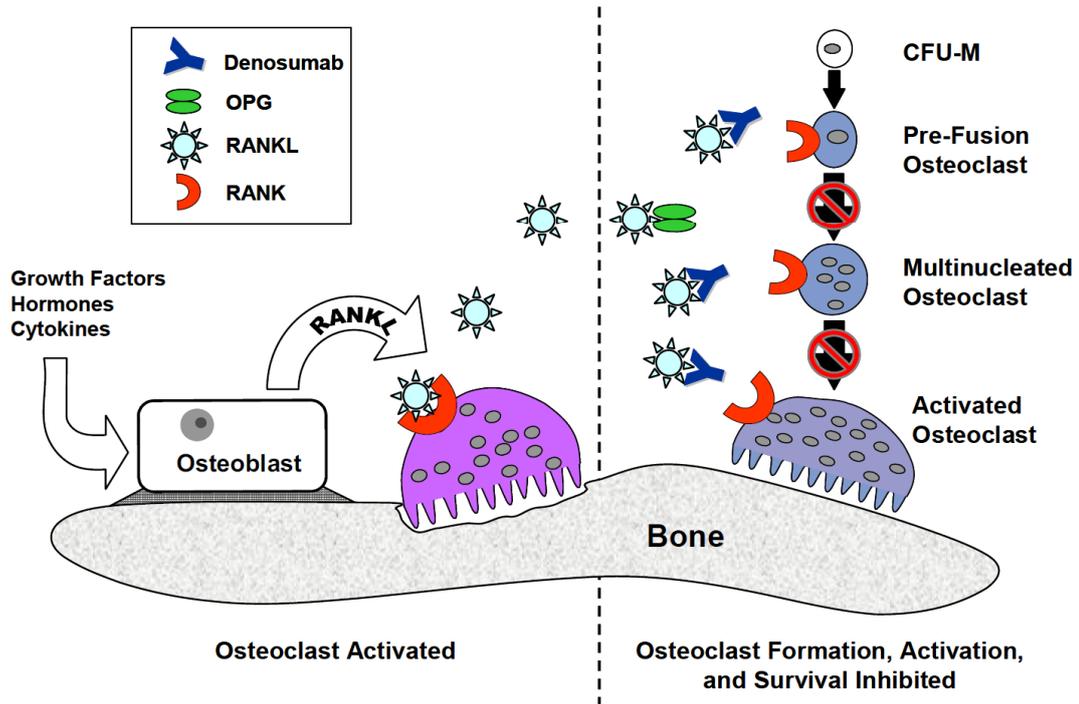
デノスマブ

る作用機序は OPG と同様である。したがって、骨疾患モデルにおいて、RANKL 阻害の薬力学的メカニズムを検討するために、組換え型 OPG をサロゲート分子として使用した(図 2-2)。

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

種々の非臨床骨疾患モデルにおいて、組換え型 OPG を用いた実験では、予想された薬力学効果が認められた (Dunstan et al, 1997、Simonet et al, 1997)。組換え型 OPG は、ラットの OVX に伴う骨量減少を防ぎ (Ominsky et al, 2008)、結腸由来癌細胞 Colon26 担癌マウスにおける高カルシウム血症 (HCM) を是正した (Morony et al, 2005)。また、副甲状腺ホルモン関連ペプチド (PTHrP) 及びインターロイキン (IL) -1 β 等の各種骨吸収刺激物質により誘発される血中カルシウム値の上昇も是正し (Morony et al, 1999)、アジュバント関節炎ラットにおける骨びらん及び BMD の低下を防止することにも有効であった (Kong et al, 1999a)。以上の実験データ及び作用機序の同等性に関する知見から、骨疾患モデルにおいてデノスマブは OPG と同様に作用する可能性が示された。

デノスマブ



CFU-M: マクロファージコロニー形成ユニット

出典: Boyle et al. 2003 から改変

図 2-2 デノスマブの作用機序

2.2 副次的薬理試験

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

2.2.1 免疫系

RANK/RANKL ノックアウトマウスではリンパ節が発生しない (Kong et al, 1999b、Dougall et al, 1999)。成獣の免疫系において、RANKL は活性化 T 及び B 細胞に発現し、RANK は主として、破骨細胞及びマクロファージと系統を同じくする成熟樹状細胞に局限して発現しており (Anderson et al, 1997、Choi et al, 2001、Wong et al, 1997a、Wong et al, 1997b)、RANKL の免疫調節への関与が推測された。RANKL 阻害に伴う免疫系の変化についてはげっ歯類を用いて様々な研究が実施されており、モジュール 2.6.2 に詳述した。なお、デノスマブはげっ

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

歯類 RANKL と交差反応しないことから、種々のげっ歯類モデル実験では RANK 細胞外領域と Fc 領域との融合たん白質 (RANK-Fc) 及び OPG-Fc などの RANKL 阻害剤を使用した。また、サルにはデノスマブを高曝露で最大 16 ヶ月間投与し、免疫系機能を測定した。

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

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

RANK 又は RANKL の欠損により、マウスの発生においてリンパ節が欠如するが、パイエル板は腸で正常に形成され、樹状細胞の形成及び機能も正常である (Kong et al, 1999b、Dougall et al, 1999)。RANK 及び RANKL は、妊娠約 14 日の胚発生期におけるリンパ節の「インデューサー」細胞 (CD3⁺CD4⁺CD45⁺) の分化に必須のメディエーターであると考えられている (Mebius, 2003)。また、リンパ球の発生及び分化における変化もノックアウトマウスで認められている (Kong et al, 1999b、Dougall et al, 1999)。RANK ノックアウトマウスでは脾臓中の B 細胞が減少しており、これは大理石骨病による骨微小環境の変化に起因していると考えられる (Jacquin et al, 2005)。RANKL ノックアウトマウスでは初期 B 細胞発達に不全がみられ、胸腺の細胞充実度が低い (Kong et al, 1999b)。また、RANKL ノックアウトマウスには表皮ランゲルハンス細胞が少ないことが報告されている (Barbaroux et al, 2008)。

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

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

2.2.1.2 基礎免疫系

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

OPG-Fc を投与したマウスの循環血液中の免疫グロブリン値は正常であり、in vitro の T 及

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

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

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

2.2.1.3 免疫応答惹起に対する反応

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

特定の抗原に対する統合免疫応答への RANKL 阻害の影響が各種実験にて検討されている。OPG-Fc を投与したマウスにおいて、皮膚の遅発性過敏症に対する影響は認められなかった。また、抗原特異的リンパ節 T 細胞の増殖又はサイトカイン産生に対する影響を伴わずに T 細胞依存性抗体反応がわずかに増強し、T 細胞非依存性抗体反応もわずかに増強した (Stolina et al, 2003)。OPG 過剰発現トランスジェニックマウス及びラットでは、皮膚の遅発性過敏症に対する影響は認められず、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) に対する抗原特異的リンパ節 T 細胞増殖への影響や T 細胞依存性抗体反応への影響も認められず、ニューモバックス (pneumovax) に対する T 細胞非依存性抗体反応はわずかに増強し、リポ多糖エンドトキシン投与に対するサイトカイン応答に対する影響はなかった (Stolina et al, 2007)。さらに、デノスマブを最大 16 ヶ月間投与したサルにおいて、KLH に対する T 細胞依存性抗体反応又は皮膚の一般状態への影響は認められなかった (試験報告書 102090 及び 103981)。これらのモデルではランゲルハンス細胞、樹状細胞、T 細胞、及び B 細胞の統合した機能が検討されており、すべてのデータからは免疫抑制がないことが示されている。Loser らの研究では (Loser et al, 2006)、UV 誘発性の皮膚免疫抑制が RANKL 阻害により解除される可能性が示唆される一方で、種々のモデルにおいて RANKL 阻害により皮膚免疫応答が増悪されるという報告はない。RANKL 阻害による免疫抑制への影響も示唆されていない。

2.2.1.4 感染症に対する免疫応答

RANKL 阻害の影響を細菌及びウイルス感染症のモデルにて検討した。マウスに OPG-Fc

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

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

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

2.2.1.5 免疫介在性疾患に対する影響

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

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

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

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

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

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

しては、RANKL 阻害の影響はない可能性が示唆される。

2.2.1.6 免疫系の要約

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

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

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

2.2.2 乳腺及び授乳

RANK/RANKL ノックアウトマウスにおけるその他の観察所見として、乳腺の成熟阻害による授乳不全が認められた (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増殖が亢進され、腺胞の分化が損なわれていた。また、RANKL 阻害によって乳腺内の細胞増殖が抑制された (Branstetter et al, 2008)。さらに、RANK/RANKL はプロゲステロンとプロラクチンとの間のシグナル経路を司り、I κ B キナーゼ α (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-Jericovic et al, 2003, Srivastava et al, 2003)。妊娠カン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 (試験報告書 112197)、乳腺組織及び乳汁分泌は対照群と差はなく、投与に起因した悪影響は認められなかった。また、分娩後 14 日及び 28 日におけるデノスマブの血清中濃度に対する乳汁中濃度の割合の平均はそれぞれ 0.48% 及び 0.17% であり、血清中濃度に対して乳汁中濃度は低かった。分娩後

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

91 日では乳汁中のデノスマブは検出限界以下の濃度であった。なお、デノスマブの乳汁産生に対する影響はげっ歯類とヒト以外の霊長類で異なっていたことから、添付文書には「授乳婦に投与する場合は授乳を中止させること」として適切な注意喚起を行うこととする。

2.2.3 新生仔に対する影響

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

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

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

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

(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。歯牙萌出に関していえば、投与を中断したときに、RANKL 阻害に可逆性があり、ビスフォスフォネートよりは何らかの利点があるかもしれない。

OPG-Fc、RANK-Fc、アレンドロネートを新生仔（2 週齢）ラットに 6 週間投与すると体重の減少、体軸骨格長の減少、骨長の低下、及び骨量の増加が認められた（試験報告書 R0340）。骨端、骨幹端、骨幹における骨量増加は、組織学的には骨梁中に軟骨が残存している海綿骨の増加と一致していた。なお、この形態的な変化は、閉鎖していない活発な成長板が存在しているときに骨吸収を抑制した際に予測される変化である。骨量増加は骨モデリング障害により生じた長管骨の形状変化（大腿骨の横断面積と断面二次モーメントの増加）を伴っていたため、エクストリンジックな強度（骨全体の強度）が増加した。また、椎骨の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（例えば靱性などの、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為、アレンドロネート投与ラットでは骨量が増加したままであった（試験報告書 R20090070）。OPG-Fc やアレンドロネート投与ラットにおいて、大腿骨の形状変化や靱性の低下は 10 週の休薬期間後も持続し、OPG-Fc 投与ラットでは、投与直後と比較して休薬期間後の長管骨のエクストリンジックな骨強度が低下した。この強度低下には、遠位部の皮質骨の厚さの減少が関与している可能性が考えられる。高用量の OPG-Fc 投与ラットでは休薬期間後、椎体におけるエクストリンジック及びイントリンジックな骨強度が有意に低下した（試験報告書 R20090070）。

2 週齢の新生仔ラットに 2 用量の OPG-Fc を週 1 回、6 週間投与し、新生仔の体の大きさ、骨成長、骨密度、形状、及び骨強度への OPG-Fc の影響をさらに検討した（試験報告書 R20090282）。本試験では、前述の新生仔ラット試験（試験報告書 R0340 及び R20090070）で骨吸収を著しく抑制しなかった低用量及び著しく抑制した高用量を設定した。体重の増加抑制と臼歯萌出の遅延が認められたのは高用量の OPG-Fc を投与したラットにおいてのみで

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

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 の低用量で減少し、高用量ではさらなる減少が認められた。また、高用量及び低用量のいずれの用量においても骨量は増加し、長管骨の形状に変化が認められた（大腿骨の横断面積や断面二次モーメントの増加）。長管骨の骨強度試験は、得られた長管骨の長さに適したプロトコールで実施した。長管骨並びに椎体のエクストリンジック及びイントリンジックな強度の指標は両用量の OPG-Fc において不変あるいは増加した。しかしながら、大腿骨の靱性は OPG-Fc のいずれの用量においても低下し、これは他の新生仔ラットで得られた結果（試験報告書 R0340）と一致した。組織学的には、OPG-Fc を投与したラットの長管骨において、骨端、骨幹端、骨幹では軟骨核が残存した海綿骨が増加しており、成長板の肥厚や乱れがみられた。

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

(Seifert, 1996, Van Wesenbeeck et al, 2002)。RANKL 阻害が成長板の形態に影響を与えるメカニズムは明らかではないが、ビスフォスフォネートであるアレンドロネートを投与したラットには影響がないことから、デノスマブと CSF-1 阻害では破骨細胞分化が障害されるのに対し、ビスフォスフォネートでは破骨細胞が形成されるが骨吸収機能が障害されているという薬理活性の違いが影響している可能性が示唆される。薬理活性を示す用量のデノスマブを投与した未成熟カニクイザルにおいては（試験報告書 102090）、正常な骨成長が認められ、重篤な成長板の変化は最小限であった。

これらの結果から、成長板が閉鎖しておらず骨成長が活発な患者へのデノスマブの投与は、成長板の形態異常及び骨の長軸方向の成長異常を引き起こす可能性が示唆される。

OPG-Fc を 6 週間投与して 10 週の休薬期間をおいた新生仔ラットでは、体重が増加し、成長板の形態が正常化したことから、OPG-Fc 投与によるこれら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

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

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（断面二次モーメント減少を伴う骨幹部の狭小化）を示し、エクストリンジックな強度（骨全体の強度）、イントリンジックな強度（靱性）が減少した (Ominsky et al, 2009)。これは OPG-Fc を投与した新生仔ラットにおける大腿骨の強度の増加（試験報告書 R0340）とは相反する結果である。1 及び 2 ヶ月齢の OPG トランスジェニックラットにおいて、靱性が減少した以外には、大腿骨の形状、長さに変化は観察されなかった（試験報告書 R20090069）。成獣 OPG トランスジェニックラットにおいては、長骨の不完全な表現型が一過的に観察されたが未解明のままである。

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

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

する際には、成長板の拡大、骨成長の遅延、骨の靱性の低下、歯牙発生異常がもたらされる可能性があることを示唆している。

2.2.4 心血管系

2.2.4.1 血管新生

血管新生における OPG 及び RANKL の役割は多くの *in vitro* モデルにて検討されている。データについてはモジュール 2.6.2 で詳細に論じる。これらの実験系間でのデータは矛盾しており、実際、ある報告では RANKL の血管新生抑制作用が示されたが、同じ著者らが他の培地を用いた場合、逆の結果が得られたとコメントしている (McGonigle et al, 2009)。*In vivo* 試験では、血管内皮増殖因子 (VEGF) あるいは塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 誘発角膜血管新生モデルにおいて、ラットに OPG-Fc を投与したときの反応は一定ではなかった。ある実験では血管新生が増強され (試験報告書 R2002266)、他の 2 つの試験では血管新生に変化が認められなかった (試験報告書 R2002204 及び R2002267)。また、ヘパリン含有ハイドロゲル移植モデルでの血管新生は OPG により増強されることが示された (McGonigle et al, 2008)。これらの実験モデル間での矛盾するデータに対して一貫した解釈をすることが困難であることから、霊長類を用いて RANKL 阻害剤投与による *in vivo* における影響を評価した。デノスマブを長期投与した霊長類において血管の異常は認められず、血管新生に対する影響 (増強あるいは減弱) はないことが示唆された。RANK 及び RANKL ノックアウトマウスの表現型、並びに OPG 過剰発現トランスジェニックラット及びマウスの表現型及び様々な免疫応答惹起に対する反応に基づくと、胎仔期の、あるいは免疫に刺激された血管構造の発達に対する影響はないと考えられる。これに対して VEGF、アンジオテンシン-1 (Ang-1) などの血管形成因子の遺伝子欠損動物では、血管に顕著な表現型変化を示す (Yancopoulos et al, 2000)。また、臨床データからは、RANKL 抑制による血管新生への影響を裏付けるデータは得られていない。

結論として、*in vitro* 及び一部の *in vivo* モデルにおいて血管新生に対する RANKL 阻害の影響は一貫していないが、動物系全体においては血管新生に変化がないことが示唆されている。

2.2.4.2 血管石灰化及びアテローム性動脈硬化症

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

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

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

月間投与したサルにおいては血管石灰化は認められなかった（試験報告書 102090）。

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

以上より、非臨床データからは RANKL 阻害には血管石灰化に対する保護作用があることが示唆された。また、RANKL 阻害はアテローム性動脈硬化に対しては影響を及ぼさないことが示唆されたが、この結果は臨床データと一致する。

2.2.5 体温調節

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

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

2.3 安全性薬理試験

デノスマブの心血管系における安全性は、テレメトリー送信器を埋め込んだカニクイザルを用い、テレメトリーシステムにより血行力学及び電気生理学的データを測定して評価した。デノスマブを0.3、3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、30 mg/kgまで投与に起因した影響はみられなかった（試験報告書 101606、モジュール 2.6.3、第4項）。さらに、サル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ず、また心臓、大動脈、あるいは各器官の脈管構造にデノスマブ投与に関連した形態学的変化も認められなかった（試験報告書 102090、モジュール 2.6.7、表7B）。

ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャンネル遺伝子(hERG)によってコードされるK⁺チャンネルの阻害を示す分子は、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、hERG K⁺チャンネルの上記キャビティ内にある結合部位と結合可能な低分子の評価には適している。一方で、治療抗体やその他の巨大たん白質は、その分子サイズにより細胞内への浸透が制限される (Vargas et al, 2008) ため、当該分子は細胞内に浸透して上述の結合部位と結合することができないと考えられる。したがって、デノスマブ (分子量約150 kDのモノクローナル抗体) をhERG試験で評価するのは適切ではないと判断した。

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

2.4 薬力学的薬物相互作用試験

デノスマブのRANKLに対する特異性を考慮すると、他の薬剤との薬力学的相互作用の可能性は低いことが示唆される。サルを用いたアレンドロネートからの切り替え試験において、デノスマブの薬力学的活性に対する有害作用は認められていない (試験報告書 106564)。

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

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

3. 薬物動態試験

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

3.1 分析法

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

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

3.2 吸収

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

デノスマブが RANKL と結合する動物種であるカニクイザルにおいて、デノスマブの静脈内投与時の薬物動態は 0.0016～1 mg/kg の用量範囲で用量に対して非線形であったが（最低投与量でのクリアランスが最高投与量でのクリアランスより約 16 倍高かった）、1～3 mg/kg の間ではほぼ線形であった（試験報告書 101398）。デノスマブをカニクイザルに皮下投与後

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

の薬物動態も 0.0016~1 mg/kg の用量範囲で非線形となったが、1~3 mg/kgの間ではほぼ用量に対し線形であった (図 3-1)。

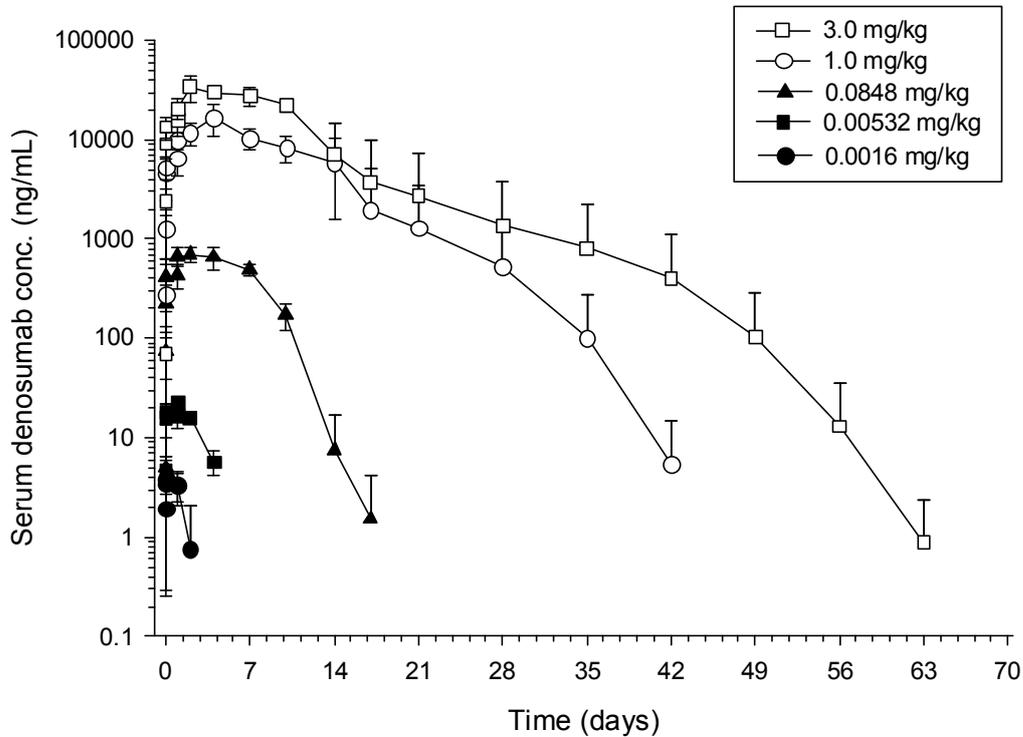


図 3-1 カニクイザルに単回皮下投与後の血清中デノスマブ濃度推移

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

3.3 分布

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

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

3.4 代謝

デノスマブがモノクローナル抗体であるということ、さらに、既存のガイダンス『ICH S3A、「トキシコキネティクス（毒性試験における全身的暴露の評価）に関するガイダンスについて」（平成8年7月2日付 薬審第443号）』が低分子医薬品の評価を目的としたものであることを考慮した結果、デノスマブの代謝を検討する試験は実施しなかった。なお、デノスマブ等の免疫グロブリンは、生体内での分解により消失するものと考察されている

（Waldmann and Strober, 1969）。カニクイザルでは非線形の薬物動態が認められ、マウス及びラットでは線形の薬物動態が認められたことから、RANKL結合が関与すると思われる飽和性の消失過程がカニクイザルに存在することが示唆された。飽和性で抗原依存的なクリアランスによる非線形の薬物動態は、オマリズマブ（Xolair[®] US 添付文書, 2010、Xolair[®] 欧州公開審査報告書, 2007）及びエファリズマブ（Coffey et al, 2005）等、他のモノクローナル抗体でも認められている。

3.5 排泄

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

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

3.6 薬物動態学的薬物相互作用

RANKLはサイトカインとみなされ、一部のサイトカイン（IL-1やIL-6など）は薬物を代謝するチトクロムP450（CYP）の活性を調節することが明らかになっているが、RANKLがCYP発現調節に関与することを示すデータはない。RANK及びRANKLはいずれもヒト肝細胞に恒常的に発現しているわけではないため（Su et al, 2004）、全身性RANKLでも肝細胞膜上のRANKとの結合によって肝CYP発現を調節することはできないと考えられる。さらに、デノスマブは免疫系、特に炎症性サイトカインの濃度又は活性に影響を及ぼさないことが示

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

されている (Stolina et al, 2007 及び第 2.2.1 項)。以上より、デノスマブが直接的に、又は RANKL 阻害を介して間接的に CYP の発現又は活性に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

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

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

4. 毒性試験

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

4.1 単回投与毒性試験

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

4.2 反復投与毒性試験

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

4.2.1 サルの反復投与毒性試験

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

抗デノスマブ抗体は、1 ヶ月試験で、抗体陽性の頻度は用量に逆相関して認められ、抗体陽性は低用量群で 100%、高用量静脈内投与群で 25%であった。この結果は、高用量群では血中に高濃度に薬物が存在することで抗デノスマブ抗体がマスクングされた可能性が高かったことによると考えられる。この結果に基づき、抗デノスマブ抗体の存在下でも薬物曝露及

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

び薬力学的活性を維持するため、次の12ヵ月試験では用量を増加した。

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

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

初回投与後のデノスマブ曝露量（ C_{max} 及び AUC に基づく）は、すべての動物において、1～50 mg/kg の範囲で用量比例的に増加した。抗デノスマブ抗体陰性動物では、12ヵ月間にわたりデノスマブの著しい蓄積はみられなかった。抗デノスマブ抗体の発生は、血清中薬物濃度及びデノスマブの全身曝露の顕著な減少と同時に認められた。それにもかかわらず、試験動物が投与期間全体を通じてデノスマブに曝露されたことを示す十分な薬力学的反応が認められた。以上の所見に基づき、この試験のNOAELは、最高用量である50 mg/kgと考えられた（試験報告書 102090、モジュール 2.6.7、表 7B）。重要な点は、この用量では、12ヵ月間でデノスマブに対する結合抗体が認められたのは、16例中2例のみであったことである。抗体陰性動物において、6ヵ月間にわたる推定曝露（AUC に基づく）は、閉経後骨粗鬆症患者者に60 mgを6ヵ月に1回の投与した国内臨床試験（試験 20050172）で認められた曝露（6ヵ月間のAUC）の約210倍高値、また海外臨床試験（試験 20010223）で認められた曝露の約150倍高値であった。また、16ヵ月の骨粗鬆症予防試験（試験報告書 103981）の曝露は、試験 20050172 試験で認められた曝露の約135倍高値、また試験 20010223 で認められた曝露の約95倍高値であった。

投与期間中に高用量群のサル雄1例が試験76日に死亡し、雄1例を一般状態の著しい悪化により試験289日に動物倫理的な観点から安楽死させた。これらの各例の死因はデノスマブに起因しないものと判断した。いずれの動物においても、死亡前の長期間にわたり、下痢及び摂餌量減少に伴う体重減少の持続性の臨床徴候が認められた。重要と考えられる点は、これらの臨床徴候は、対照群を含む他の動物でも頻繁に認められるものであるが、これらの2例ではより重度であったことである。下痢の原因は明確に特定されなかったが、糞便検査において *Giardia sp.* 及び *Cryptosporidium sp.* がデノスマブ投与及び対照群の試験動物64例中47

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

例で特定されたことから、これらの原虫寄生虫のいずれかあるいはその両方に関連する可能性が高かった。いずれの寄生虫も、一般的に片利共生微生物とされているが、疾患（下痢）を誘発する場合もある。なお、投与群間の相対的抗体価を考慮すると、抗デノスマブ抗体の存在がこれら2例の動物の病的状態及び死亡において役割を果たした可能性は低く、免疫複合体の沈着を示す病理組織学的所見も認められていない。また、いずれの動物でも血液学的検査パラメータに、免疫抑制を示唆する影響はみられなかった。

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

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

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

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

えられる。

4.3 遺伝毒性試験

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

4.4 がん原性試験

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

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

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

RANK 及び RANKL のがん細胞に対する直接的な活性はいくつかの in vitro 試験でも検討されている (Jones et al, 2006、Mori et al, 2007、Armstrong et al, 2008)。これらの試験で、RANKL は、ヒト乳癌、前立腺癌、あるいは黒色腫の細胞に対して増殖を誘導しなかったが、細胞遊走を誘導し、この細胞遊走は RANKL 阻害によって阻害された。

RANKL 阻害は単独、あるいは細胞傷害性薬物、分子標的薬、及びホルモン薬との併用で、多くの in vivo げっ歯類担がんモデルにおいて評価が行われている (試験報告書 R2006160、R2006161、R20080161、R20080162、R20070953、R20080083、R20070963、R20080310、R20080331、及び R20080332)。その結果、RANKL 阻害はすべての骨関連モデルで有益な作用が認められている。乳腺腫瘍モデルでは RANKL 阻害により発がん抑制と生存期間の著明な延長が認められた (試験報告書 R20090211、Gonzalez-Suarez et al, 2010、Schramek et al, 2010)。各種ヒト腫瘍皮下移植モデルでは RANKL 阻害による有害作用は認められていない。他の治療薬

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

と併用した場合、RANKL 阻害による相加的な腫瘍増殖抑制作用が認められるか、あるいは腫瘍反応に変化がないことが示されている。これらの様々な動物モデルを用いた検討から、RANKL 阻害に伴う発がんリスクは示唆されていない。

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

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

以上のことから、現在得られているデータに基づき、デノスマブに発がんのリスクはないと判断される。

4.5 生殖発生毒性試験

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

4.5.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

性成熟し、月経周期が規則的な雌カニクイザルを用いて、デノスマブの受胎能への影響を評価した。0、2.5、5.0、及び 12.5 mg/kg の用量で、交配前の月経周期 2 サイクルから交配後約 4 週間まで、週 1 回皮下投与した。月経周期は溶媒コントロール群及びデノスマブ投与群で概ね同程度であった。全体的に月経周期は、エストラジオール濃度のピークと同時か、エ

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

ストラジオール濃度のピークにわずかに先行（通常1日）される黄体化ホルモン濃度のピークを特徴とする動きを示した。プロゲステロン濃度は、エストラジオール及び黄体化ホルモンが最高濃度に到達すると上昇を始め、通常5～10日後にプラトーに達し、その後低下した。血清中プロゲステロン、17β-エストラジオール及び黄体化ホルモン濃度の程度及び経時パターンは、予測されたとおり、溶媒コントロール群及びデノスマブ投与群で同程度であった。全群の雌で交配が成立したことから（試験報告書 102843、モジュール 2.6.7、表 12 参照）、デノスマブは雌の受胎能に有害な影響を及ぼさないと考えられた。

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

4.5.2 胚・胎児発生に関する試験

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

4.5.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

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

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

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

日に剖検した。

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

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

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

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

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

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

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

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

して適切な注意喚起を行うこととする。

4.5.4 新生児（幼若動物）を用いた試験

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

4.6 局所刺激性試験

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

4.7 その他の毒性試験

4.7.1 抗原性試験

抗原性の評価を目的として特別にデザインされた試験は実施しなかった。その代替として、一般毒性試験プログラムの一部として抗原性を評価した。デノスマブはサルにおいて高い免疫原性を示した。モジュール 2.6.6 第 3 項に記載するとおり、全用量において、結合抗体及び中和抗体が高い発生率で認められた。結合抗体及び中和抗体の作用により、デノスマブの血清中濃度の減少及び薬力学的反応（骨代謝マーカー）の減弱が数例で認められた。しかし、抗体の存在は、安全性プロファイル評価あるいは全体的な試験の解釈に影響を及ぼさなかった。さらに、抗体陽性動物でもある程度の薬力学的反応が認められた。デノスマブの免疫原性は、臨床試験では特に問題とはならなかった（モジュール 2.7.4 参照）。

4.7.2 免疫毒性試験

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

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

4.7.3 毒性発現の機序に関する試験

該当なし。

4.7.4 依存性試験

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

4.7.5 代謝物の毒性試験

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

4.7.6 不純物の毒性試験

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

4.7.7 その他の試験

組織交差反応性試験を実施し、RANKL を発現することが知られている組織以外でのデノスマブの結合能を検討した。ヒト組織の標準組織パネルにおいて、デノスマブは想定外の組織とは結合しなかった。免疫反応は、ヒト及びカニクイザルのリンパ節のリンパ球細胞膜上に認められた。これは、リンパ組織において RANKL の発現レベルが高いことが知られていることから想定される所見であった (Lacey et al, 1998)。ラット、ウサギ、及びサル各組織を用いて追加試験を実施した。その結果、ウサギのリンパ節細胞質内に陽性反応が認められたが、反応の局在性から生物学的に重要でないと判断した (試験報告書 102700、101758、及び 101348)。したがって、これらの試験結果から、薬力学データに基づき、カニクイザルを非臨床安全性評価の適切な動物種と判断したことは妥当であると考えられた。

4.7.8 環境への配慮

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

デノスマブ

5. 総括及び結論

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

デノスマブの薬力学、薬物動態、及び毒性は、デノスマブの種特異性の制限内で、一連の非臨床 *in vitro* 及び *in vivo* 試験により評価した。動物種の選択、使用動物数、及び試験デザインは、各試験において適切と考えられた。主要な毒性試験で使用した動物種は、毒性的

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

感受性の観点から適切であり、主要な試験の計画は、現行の ICH ガイドラインに適合したものである。また、データの形式及び提示方法は適切なものであり、主要な毒性試験及び安全性薬理試験は GLP 試験として実施した。

ヒトにおけるデノスマブの予定投与経路は皮下注射であることから、サルにおけるすべての主要な試験は、皮下投与により実施した。デノスマブと閉経後骨粗鬆症の治療において使用される代表的市販薬（アレンドロネート及びテリパラチド）の主要な非臨床試験項目の比較を表 5-1 に示した。

表 5-1 主要な非臨床試験項目におけるデノスマブ、アレンドロネート及びテリパラチドの比較

特性	デノスマブ	アレンドロネート	テリパラチド
骨形成促進による骨同化作用	-	-	+
骨吸収抑制による骨の安定化	+	+	-
破骨細胞の作用阻害	+	+	-
骨基質への取り込み	-	+	-
低カルシウム血症	+	+	-
高カルシウム血症	-	-	+
母体毒性	+	+	+
着床後生存率の低下	+	+	+

国内臨床試験においてデノスマブの投与期間中に認められた有害事象は、毒性試験から概ね予測可能であった（モジュール 2.7.4 参照）。また、デノスマブによる骨吸収マーカーの低下作用（試験 20050172、及び AMG162-A-J301）、大腿骨近位部、大腿骨頸部、腰椎における骨密度増加作用（海綿骨及び皮質骨）、骨質に対して悪影響を及ぼさないことなどは、薬理試験の結果から十分に予測できた（モジュール 2.7.3 参照）。臨床試験において骨折治癒遷延は認められておらず（モジュール 2.7.4 参照）、ノックインマウスを用いて実施した骨折治癒試験の結果からも、デノスマブ投与が骨折遷延治癒又は骨癒合不全を引き起こす可能性は低いことが示された。このように、非臨床試験によりデノスマブの薬力学及び安全性プロファイルは十分に評価され、臨床試験における有効性及び安全性の結果は概ね予測可能であった。したがって、承認申請資料に含まれる非臨床試験の数及び種類は、本分子の臨床成績を予測する上で適切であると考えられる。

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

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

から分娩まで投与した場合に発生毒性を示し、ごくまれに分娩異常が認められた。

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

全体として、この毒性試験プログラムにより、デノスマブ投与による毒性学的影響の特性は十分に検討できたと考えられる。抗デノスマブ抗体の発現による影響を補うため、高用量を用いる必要があったが、抗体が陰性であった動物において NOAEL と申請用量での薬物濃度の間で適切な曝露マージンが得られた(表 5-2)。NOAEL における抗デノスマブ抗体の発現頻度が低かったこと、相応の薬物曝露が認められたこと、及び持続的な薬力学的反応が認められたことから、試験に用いた動物が、投与期間中に適切に曝露されていたことが示された。

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

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

試験の種類	NOAEL (mg/kg)	C _{max} ^{b)} (µg/mL) 平均(SD)	AUC _{0-tau} ^{b)} (µg·hr/mL) 平均(SD)	AUC に基づく 曝露倍数 ^{c),d)} (試験名)
カニクイザルの 12 ヶ月反復投与 毒性試験 (試験報告書 102090)	50	666 (156)	268000 (90300)	150 (試験 20010223) 211 (試験 20050172)
	10	157 (37.1)	48200 (21100)	27 (試験 20010223) 38 (試験 20050172)
カニクイザルの 16 ヶ月反復投与 試験 (試験報告書 103981)	50	413 (160)	171000 (72400)	95 (試験 20010223) 135 (試験 20050172)
カニクイザルの胚・胎児毒性試験 (試験報告書 102842)	12.5	282 (89.6)	41000 (10600)	99 (試験 20010223) 140 (試験 20050172)

a: 60 mg、皮下注射、6 ヶ月に 1 回。

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

c: ヒトの AUC_{0-6 month} 値は試験 20010223 (10752 µg·hr/mL) 及び試験 20050172 (310-317 µg·day/mL) から引用した。

d: NOAEL での曝露は、週 1 回投与の AUC_{0-tau} 値を 26 倍 (試験報告書 102842)、月 1 回投与の AUC_{0-tau} 値を 6 倍 (試験報告書 102090 及び 103981) して、6 ヶ月間の AUC (近似値) とした。

AUC = 血清中薬物濃度—時間曲線下面積 ; AUC_{0-tau} = 0 時間から投与間隔時間までの AUC

C_{max} = 最高血清濃度 ; NOAEL = 無毒性量

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

以上、本申請資料、並びにモジュール 4 に含めた薬理試験及び毒性試験結果は、骨粗鬆症患者に対するデノスマブの申請用法・用量 (60 mg、皮下注射、6 ヶ月に 1 回) に関する妥当性を裏付けるものと判断する。

デノスマブ

6. 参考文献

Akatsu T, Murakami T, Nishikawa M, et al. Osteoclastogenesis inhibitory factor suppresses osteoclast survival by interfering in the interaction of stromal cells with osteoclast. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;250:229-234.

Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature.* 1997;390:175-179.

Armstrong AP, Miller RE, Jones JC, Zhang J, Keller ET, Dougall WC. RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. *The Prostate.* 2008;68:92-104.

Ashcroft AJ, Cruickshank SM, Croucher PJ, Perry MJ, Rolinson S, Lippitt JM, Child JA, Dunstan C, Felsburg PJ, Morgan GJ, Carding SR. Colonic dendritic cells, intestinal inflammation, and T cell-mediated bone destruction are modulated by recombinant osteoprotegerin. *Immunity.* 2003;19:849-861.

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

Barbaroux J-B O, Beleut M, Brisken C, Mueller CG, Groves RW. Epidermal receptor activator of NF- κ B ligand controls Langerhans cells numbers and proliferation. *J Immunol.* 2008;181:1103-1108.

Bateman TA, Dunstan CR, Ferguson VL, Lacey DL, Ayers RA, Simske SJ. Osteoprotegerin Mitigates Tail Suspension-Induced Osteopenia. *Bone.* 2000;26(5):443-449.

Bolla M, Gonzalez D, Warde P, et al. Improved survival in patients with locally advanced prostate cancer treated with radiotherapy and goserelin. *N Engl J Med.* 1997;337:295-300.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423(6937):337-342.

Branstetter D, Jacob A, Gonzalez-Suarez E, Jones J, Erwert R, Chaisson-Blake M, Dougall WC. RANKL inhibition decreases the incidence of mammary adenocarcinomas in wild type (WT) and

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

MMTV-RANK transgenic mice. 31st San Antonio Breast Cancer Symposium, 2008, San Antonio, Texas.

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

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

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

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

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.

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

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

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

Coffey GP, Fox JA, Pippig S, et al. Tissue distribution and receptor-mediated clearance of anti-CD11a antibody in mice. *Drug Metab Dispos.* 2005;33(5):623-629.

Diamond TH, Higano CS, Smith MR, Guise TA, Singer FR. Osteoporosis in men with prostate carcinoma receiving androgen deprivation therapy: recommendations for diagnosis and therapies.

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

Cancer. 2004;100: 892-899.

Dorato MA, Engelhardt JA. The no-observed-adverse-effect-level in drug safety evaluations: use, issues and definition(s). Regul Toxicol Pharmacol. 2005;42:265-274.

Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, DeSmedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. Genes Dev. 1999;13:2412-2424.

Drevon-Gaillot E, Perron-Lepage MF, Clement C, Burnett R. A review of background findings in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) from three different geographical regions. Exp Toxicol Pathol. 2006;58:77-88.

Droz-Desprez D, Azou C, Bordigoni P, Bonnaure-Mallet M. Infantile osteoporosis : a case report on dental findings. J Oral Pathol Med. 1992;21:422-425.

Dunstan CR, Capparelli C, Kelley M, et al. Osteoprotegerin (OPG), a novel TNF-receptor family member profoundly inhibits endosteal bone resorption due to growth, humoral hypercalcemia of malignancy, and interleukin 1. J Bone Miner Res. 1997;12:S136.

European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guidelines for the Evaluation of Medicinal Products in the Treatment of Primary Osteoporosis, CPMP/EWP/552/95 rev 2, November 2006.

Fata JE, Kong YY, Li J, et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. Cell. 2000;103:41-50.

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: S447.

Gomes MF, Rangel DC, Starling C, Goulart M. Familial malignant osteopetrosis in children: a case report. Spec Care Dentist. 2006;26:106-110.

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

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.

Gonzalez-Suarez E, Jacob AP, Jones J, et al.. RANK ligand mediates progesterin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. *Nature.* 2010;468(7320):103-107

Goss PE, Ingle JN, Martino S, et al. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med.* 2003;349:1793-1802.

Greaves P. *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies: Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation.* 2nd ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier;2000:254-268, 372-380.

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

Hanada R, Leibbrandt A, Hanada T, Kitaoka S, Furuyashiki T, Fujihara H, Trichereau J, Paolino M, Qadri F, Plehm R, Klaere S, Komnenovic V, Mimata H, Yoshimatsu H, Takahashi N, von Haeseler A, Bader M, Sebnem Kilic S, Ueta Y, Pifl C, Narumiya S, Penninger JM. Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. *Nature.* 2009;462:505-509.

Helas S, Goettsch C, 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.

Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology.* 2001;142:1419-1426.

Jacquin C, Lee SK, Lorenzo JA, Aguilla HL. RANK deficiency in the hematopoietic compartment alters the development of osteoclasts but not other hematopoietic lineages. *J Bone Miner Res.* 2005;20:Suppl 1;S145.

Jalevik B, Fasth A, Dahllof G. Dental development after successful treatment of infantile

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

osteopetrosis with bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002;29:537-540.

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

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

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

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

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

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

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

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

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

differentiation and activation. *Cell*. 1998;93:165-176.

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

Lester J, Coleman R. Bone loss and the aromatase inhibitors. *Br J Cancer*. 2005;93(suppl 1):S16-22.

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

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

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

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

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

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

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

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

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

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

Miller RE, Branstetter D, Armstrong A, Kennedy B, Jones J, Cowan L, Bussiere J, Dougall WC. Receptor activator of NF- κ B ligand inhibition suppresses bone resorption and 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, Van G, Kaufman S, Kostenuik PJ, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis *J Exp Med.* 2000;192(4):463-474.

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

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

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

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

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

Morony S, Caparelli 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, Warmington K, Adamu S, et al. The inhibition of RANKL causes greater suppression of bone resorption and hypercalcemia compared with bisphosphonates in two models of humoral

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

hypercalcemia of malignancy. *Endocrinology*. 2005;146:3235-3243.

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

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

NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA*. 2001;285:785-795.

Olejniczak K, Gunzel P, Bass R. Preclinical testing strategies. *Drug Information Journal*. 2001;35:321-336.

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

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

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

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

Ovchinnikova O, Gylfe A, Bailey L, Nordstrom A, Rudling M, Jung C, Bergstrom S, Waldenstrom A, Hansson GK, Nordstrom P. Osteoprotegerin promotes fibrous cap formation in atherosclerotic lesions

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

of ApoE-deficient mice – brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:1478-1480.

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

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

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

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

Sasseville VG, Diters RW. Impact of infections and normal flora in nonhuman primates on drug development. *ILAR J.* 2008;49(2):179-190.

Schramek D, Leibbrandt A, et al. Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progesterin-driven mammary cancer. *Nature.* 2010;468:98-102.

Seeman E, Delmas PD. Bone quality-the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med.* 2006;354(21):2250-2261.

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

Shahinian VB, Kuo YF, Freeman JL, Goodwin JS. Risk of fracture after androgen deprivation for prostate cancer. *N Engl J Med.* 2005;352:154-164.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997;89:309-319.

Srivastava S, Matsuda M, Hou Z, Bailey JP, Kitazawa R, Herbst MP, Horseman ND. Receptor

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

activator of NF- κ B ligand induction via Jak2 and Stat5 in mammary epithelial cells. *J Biol Chem.* 2003;278(46):46171-46178.

Stolina M, Schett G, Dwyer D, Vonderfecht S, Middleton S, Duryea D, Pacheco E, Van G, Bolon B, Feige U, Zack D, Kostenuik P. RANKL inhibition by osteoprotegerin prevents bone loss without affecting local or systemic inflammation parameters in two rat arthritis models: comparison with anti-TNF α or anti-IL-1 therapies. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R187

Stolina M, Dwyer D, Ominsky MS, et al. Continuous RANKL inhibition in osteoprotegerin transgenic mice and rats suppresses bone resorption without impairing lymphorganogenesis or functional immune responses. *J Immunol.* 2007;179:7497-7505.

Stolina M, Guo J, Faggioni R, Brown H, Senaldi G. Regulatory effects of osteoprotegerin on cellular and humoral immune responses. *Clin Immunol.* 2003;109:347-354.

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

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

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

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

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

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

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS 3rd,

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

Frankel WN, Lee SY, Choi Y. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem.* 1997b;272(40):25190-25194.

Xolair® (omalizumab) US Prescribing Information. Genentech Inc, South San Francisco, CA, 2010.

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

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

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

デノスマブ

7. 文書中の報告書一覧

非臨床薬理試験報告書番号一覧

R-351	Denosumab, a fully human monoclonal antibody, has selective effects on human rank ligand and human osteoclasts 完全ヒト型モノクローナル抗体であるデノスマブは、ヒト RANK リガンド及びヒト破骨細胞に対し、選択的作用を示す
R-321	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-430	Effect of denosumab (AMG 162) on bone mass and resorption in human rank ligand knock-in mice ヒト RANK リガンドノックインマウスにおけるデノスマブ (AMG 162) の骨量及び骨吸収への影響
103981	AMG 162: A monthly subcutaneous injection osteoporosis prevention study for 16 months in the cynomolgus monkey AMG 162 : カニクイザルにおける月 1 回の皮下注射による 16 ヶ月骨粗鬆症予防試験
106564	A 12-month osteoporosis "switch" study in the cynomolgus monkey カニクイザルの 12 ヶ月骨粗鬆症"切り替え"試験
R-458	Comparison of two anti-resorptive therapies (alendronate vs AMG 162 monoclonal anti-RANKL antibody) on murine fracture healing マウス骨折治癒における 2 つの骨吸収抑制治療 (アレンドロネート対 AMG 162 モノクローナル抗 RANKL 抗体) の比較
R-0340	The effects of OPG-Fc, RANK-Fc, or alendronate on tooth eruption and bone density, geometry, and strength in neonatal rats 新生仔ラットにおける OPG-Fc、RANK-Fc、あるいはアレンドロネートの歯牙萌出、骨密度、骨形状、及び骨強度への影響
R2002266	The Effect of OPG-Fc on Neovascularization in the Rat Corneal Disk Implant Model of Angiogenesis 新生血管形成のラット角膜ディスク移植モデルにおける OPG-Fc の血管新生への影響
R2002204	The Effect of OPG-Fc on Neovascularization in the Rat Corneal Disk Implant Model of Angiogenesis 新生血管形成のラット角膜ディスク移植モデルにおける OPG-Fc の血管新生への影響
R2002267	The Effect of OPG-Fc on Neovascularization in the Rat Corneal Disk Implant Model of Angiogenesis 新生血管形成のラット角膜ディスク移植モデルにおける OPG-Fc の血管新生への影響
R20090069	Long Bone Geometry in 1- and 2-month-old Transgenic Sprague-Dawley Rats Overexpressing the Soluble RANKL Inhibitor OPG During Growth and Development 発育期間中可溶性 RANKL 阻害剤 OPG を過剰発現しているトランスジェニック Sprague-Dawley ラットの 1 ヶ月及び 2 ヶ月齢における長骨形状
R20090070	The Effects of OPG-Fc or Alendronate on Tooth Eruption and on Bone Density, Geometry and Strength in Neonatal Rats: A Recovery Study 新生仔ラットにおける OPG-Fc、あるいはアレンドロネートの歯牙萌出、骨密度、骨形状、及び骨強度への影響 : 回復試験

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

R20090282	Dose-Dependent Effects of OPG-Fc on Tooth Eruption, Bone Growth and Bone Strength in Neonatal Rats 新生仔ラットにおける歯牙萌出、骨増殖、骨強度への OPG-Fc の用量依存的な影響
R2006160	Effect of OPG-Fc on Tumor Burden and Osteolysis in MDA231-F11Luc Bone Metastasis Model in Female Athymic Nude Mice, Prevention Setting 雌無胸腺ヌードマウスの MDA231-F11Luc 骨転移モデルにおける OPG-Fc の全身腫瘍組織量及び骨溶解への影響、転移予防設定
R2006161	Effect of OPG-Fc on Tumor Burden, Osteolysis, and Survival in MDA231-F11Luc Bone Metastasis Model in Therapeutic Setting MDA231-F11Luc 骨転移モデルにおける OPG-Fc の全身腫瘍組織量、骨溶解、生存への影響、治療設定
R20080161	The Effect of Tamoxifen and the RANKL Inhibitor Osteoprotegerin (OPG-Fc) on the Growth of MCF-7 Cells in an Established Bone Metastasis Model in Female Athymic Nude Mice 雌無胸腺ヌードマウスの骨転移定着モデルにおけるタモキシフェン及び RANKL 阻害剤オステオプロテゲリン (OPG) の MCF-7 細胞の増殖への影響
R20080162	The Effect of Tamoxifen and the RANKL Inhibitor Osteoprotegerin (OPG-Fc), Alone and in Combination, on the Growth of MCF-7 Cells in an Established Bone Metastasis Model in Female Athymic Nude Mice 雌無胸腺ヌードマウスの骨転移定着モデルにおけるタモキシフェン及び RANKL 阻害剤オステオプロテゲリン (OPG-Fc) 単独及び併用の MCF-7 細胞の増殖への影響
R20070953	The Effect of Pretreatment of OPG-Fc on Prevention of Bone Mets in MDA-MB-231(F11)Luc Bone Metastasis Model in Female Athymic Nude Mice 雌無胸腺ヌードマウスの MDA-MB-231(F11)Luc 骨転移モデルにおける OPG-Fc 前投与の骨転移予防への影響
R20080083	The Effect of the RANK Ligand Inhibitor OPG-Fc and Docetaxel, Alone or in Combination, on Tumor Burden and Osteolysis in a PC-3 Prostate Cancer Bone Metastasis Model in Male Athymic Nude Mice 雄無胸腺ヌードマウスの PC-3 前立腺癌骨転移モデルにおける RANK リガンド阻害剤 OPG-Fc 及びドセタキセル単独あるいは併用の全身腫瘍組織量及び骨溶解への影響
R20070963	The Effect of Human OPG-Fc Treatment on Tumor Burden and Osteolysis in a Murine Model of Bone Metastasis of Human Non-Small Cell Lung Cell Line H1975 Luc in Athymic Nude Female Mice 雌無胸腺ヌードマウスのヒト非小細胞肺癌細胞株 H1975 Luc 骨転移モデルにおけるヒト OPG-Fc 投与の全身腫瘍組織量及び骨溶解への影響
R20080310	The Effect of the RANK Ligand Inhibitor OPG-Fc on Tumor Burden and Osteolysis in a Murine Model of Bone Metastasis of Human Non-Small-Cell Lung Cell Line H1299 in Female Athymic Nude Mice 雌無胸腺ヌードマウスのヒト非小細胞肺癌細胞株 H1299 骨転移モデルにおける RANK リガンド阻害剤 OPG-Fc の全身腫瘍組織量及び骨溶解への影響
R20080331	Effect of OPG-Fc (in Combination with Docetaxel) Treatment on Tumor Burden and Osteoclast Remodeling in a Murine Model of Bone Metastasis of Human Non-Small-Cell Lung Cell Line H1299 in Female Athymic Nude Mice 雌無胸腺ヌードマウスのヒト非小細胞肺癌細胞株 H1299 骨転移モデルにおける OPG-Fc 投与 (ドセタキセル併用) の全身腫瘍組織量及び破骨細胞リモデリングへの影響

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

R20080332	Effect of OPG-Fc (Alone and in Combination with Docetaxel) Treatment on Tumor Burden and Osteolysis in a Murine Model of Bone Metastasis of Human Non-Small-Cell Lung Cell Line H1299 in Athymic Nude Female Mice 雌無胸腺ヌードマウスのヒト非小細胞肺癌細胞株 H1299 骨転移モデルにおける OPG-Fc 投与 (単独及びドセタキセル併用) の全身腫瘍組織量及び骨溶解への影響
R20090211	Effect of the RANKL Inhibitor RANK-Fc versus Vehicle on Tumor Development in a Hormone and Carcinogen Induced Model of Mammary Tumorigenesis ホルモンと発癌物質により誘発される乳房腫瘍モデルにおける腫瘍増殖への基剤に対する RANKL 阻害剤 RANK-Fc の効果

安全性薬理試験報告書番号一覧

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

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

薬物動態試験報告書番号一覧

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

2.4 非臨床試験の概括評価

デノスマブ

毒性試験報告書番号一覧

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