目次

1.　構造式及び主薬理作用 3
2.　申請効能又は効果、用法及び用量 3

略語一覧

略語	略していない表現（英）	略していない表現（日）
RANK	receptor activator of nuclear factor kappa B	－
RANKL	RANK ligand	RANK リガンド
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子

－：該当する表記なし

1. 構造及び主薬理作用

デノスマブは、receptor activator of nuclear factor kappa B（RANK）リガンド（RANK ligand: RANKL）を標的とするヒトモノクローナル抗体であり、ヒト免疫グロブリン G2/κ を備えた XenoMouse™ 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、及び生育に関して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得る。

デノスマブは、RANKL に高い親和性で特異的に結合する（Kd 3×10^{-12} M）。デノスマブが RANKL に結合すると、RANK と RANKL の結合が阻止され、破骨細胞の形成、活性化、及び生存が抑制される。その結果、骨吸収を抑制し、骨量を増加させる。

デノスマブは RANKL のみに結合し、他の腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor : 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. 申請効能又は効果、用法及び用量

追加する効能・効果（案）

関節リウマチに伴う骨びらんの進行抑制

追加する用法・用量（案）

通常、成人にはデノスマブ（遺伝子組換え）として 60mg を 6 ヵ月に 1 回、皮下投与する。なお、6 ヵ月に 1 回の投与においても、骨びらんの進行が認められる場合には、3 ヵ月に 1 回、皮下投与することができる。

目次

1. まとめ....3
1.1 効力を裏付ける試験....4
1.1.1 ラット CIA 及び AIA モデルの病態推移（参考資料）....4
1.1.2 ラット CIA モデルでの OPG-Fc の作用（評価資料）....4
1.1.3 ラット CIA 及び AIA モデルでの OPG-Fc の作用（参考資料）....4
1.1.4 ラット CIA 及び AIA モデルでの OPG-Fc と抗 TNF-α 剤あるいは抗 IL-1 剤との比較（参考資料）....4
2. 効力を裏付ける試験....5
2.1 ラットコラーゲン誘発関節炎及びアジュバント誘発関節炎モデルの病態推移（参考資料）....5
2.2 ラットコラーゲン誘発関節炎モデルでのオステオプロテゲリン－免疫グロブリン結晶化フラグメントの作用（評価資料）....14
2.3 ラットコラーゲン誘発関節炎及びアジュバント誘発関節炎モデルに対するオステオプロテゲリン－免疫グロブリン結晶化フラグメントによる RANKL 阻害の作用（参考資料）....16
2.4 ラットコラーゲン誘発関節炎及びアジュバント誘発関節炎モデルでの RANKL、TNFα、及び IL-1 の阻害作用の影響（参考資料）....19
3. 副次的薬理試験....23
4. 安全性薬理試験....23
5. 薬力学的薬物相互作用....23
6. 考察及び結論....24
7. 図表....25
8. 参考文献一覧....25

略語一覧

略語	略していない表現（英）	略していない表現（日）
AIA	adjuvant-induced arthritis	アジュバント誘発関節炎
α1AGP	alpha-1-acid glycoprotein	α1 酸性糖蛋白質
BMD	bone mineral density	骨密度
CCL2	chemokine CC-motif ligand 2	－
CIA	collagen-induced arthritis	コラーゲン誘発関節炎
DXA	dual X-ray absorptiometry	二重エネルギーX 線吸収
IgG2	immunoglobulin G2	免疫グロブリン G2
IL	interleukin	インターロイキン
IL-1 Ra	interleukin-1 receptor antagonist	インターロイキン 1 受容体アンタゴニスト
μCT	micro-computed tomography	マイクロ CT
OPG	osteoprotegerin	オステオプロテゲリン
OPG-Fc	osteoprotegerin Fc segment complex	OPG 免疫グロブリン結晶化フラグメント
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩液
RANK	receptor activator of nuclear factor kappa B	－
RANKL	RANK ligand	RANK リガンド
sTNFR1	soluble TNF receptor 1	可溶性 TNF 受容体 1
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
TRACP-5b	tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b	－

－：該当する表記なし

1. まとめ

デノスマブ（開発コード AMG 162）はヒト receptor activator of nuclear factor kappa B（RANK）リガンド（RANK ligand: RANKL）と結合し、RANK と RANKL 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。デノスマブは高い親和性及び特異性で RANKL と結合し、その活性を中和し、破骨細胞を介する骨吸収を抑制する。

RANKL は、腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor: TNF）スーパーファミリーに属し、膜結合型の可溶性蛋白質である。RANKL は骨芽細胞で生成され、破骨細胞の最終分化、活性化、及び生育の中で中心的役割を果たす[1,2]。

本申請の非臨床薬理試験は、抗リウマチ薬の臨床評価方法に関するガイドライン[3]を参考に選択した。効力を裏付ける動物モデルを用いた試験は、関節炎発症時の骨破壊抑制効果を評価可能なコラーゲン誘発関節炎（collagen-induced arthritis: CIA）モデルを選択した。また、参考資料として、CIA とアジュバント誘発関節炎（adjuvant-induced arthritis: AIA）での骨破壊抑制効果を評価した試験を含めた。

デノスマブはげっ歯類の RANKL に結合しないため[4]、CIA 及び AIA で効果を評価できない。そこで既申請と同様に、本申請の薬理試験でもオステオプロテゲリン（osteoprotegerin: OPG）の C 末端に免疫グロブリン Fc 領域を融合させた OPG 免疫グロブリン結晶化フラグメント（osteoprotegerin Fc segment complex: OPG-Fc）をサロゲートとして使用した。薬理試験での OPG-Fc の用量及び投与経路は、文献[5,6]を参考に、ラットで薬理作用が認められている用量及び皮下投与を選択した。

本申請では副次的薬理試験、安全性薬理試験、及び薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。薬理試験の一覧表を（表 2.6.2.1-1）に示す。

表 2.6.2.1-1　薬理試験一覧表

試験の種類	試験系	投与方法	被験物質	資料番号
効力を裏付ける試験				
ラット CIA 及び AIA モデルの病態推移[a,b]	ラット	該当なし	該当なし	4.2.1.1-1
ラット CIA モデルでの OPG-Fc の作用[a]	ラット	皮下投与	OPG-Fc	4.2.1.1-2
ラット CIA 及び AIA モデルでの OPG-Fc の作用[a,b]	ラット	皮下投与	OPG-Fc	4.2.1.1-3
ラット CIA 及び AIA モデルでの OPG-Fc と抗 TNF-α 剤あるいは抗 IL-1 剤との比較[a,b]	ラット	皮下投与	OPG-Fc sTNFR1 IL-1 Ra	4.2.1.1-4
副次的薬理試験	該当なし			
安全性薬理試験	該当なし			
薬力学的薬物相互作用試験	該当なし			

CIA＝コラーゲン誘発関節炎、AIA＝アジュバント誘発関節炎、OPG-Fc＝OPG 免疫グロブリン結晶化フラグメント、sTNFR1＝可溶性 TNF 受容体 1, IL-1 Ra＝インターロイキン 1 受容体アンタゴニスト
a: 非 GLP、b: 参考資料

1.1 効力を裏付ける試験

1.1.1 ラット CIA 及び AIA モデルの病態推移（参考資料）

ラット関節炎モデルで OPG-Fc の治療効果を確認する予備検討として、CIA 及び AIA モデルでの関節炎、RANKL 濃度、及び骨びらんを経時的に検討した。その結果、CIA 及び AIA の発症に伴って後肢の *Rankl* mRNA 量及び RANKL 蛋白質が増加し、RANKL が骨びらんを引き起こしていることが示唆された。

1.1.2 ラット CIA モデルでの OPG-Fc の作用（評価資料）

ラット CIA モデルでのラット OPG-Fc の関節及び全身性の骨減少に対する影響を評価した。Day 1 及び 7 にコラーゲンを感作して関節炎を発症させた動物に、後肢の腫脹が最大値になる Day 16（発症 2 日後）から Day 24 に 1 日おきに 3 mg/kg のラット OPG-Fc を投与した。その結果、OPG-Fc は CIA の後肢の炎症及び病理組織学的関節炎スコアに対しては無効であったが、骨密度（bone mineral density: BMD）低下抑制作用や破骨細胞及び tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b（TRACP-5b）活性減少を伴う骨吸収抑制作用を示した。

1.1.3 ラット CIA 及び AIA モデルでの OPG-Fc の作用（参考資料）

ラット CIA 及び AIA モデルでの OPG-Fc の関節炎局所及び全身性の骨減少に対する影響を検討した。関節炎モデル動物には発症 4 日後から 13 日後まで 1 日おきに、3 mg/kg の OPG-Fc を皮下投与した。その結果、OPG-Fc は CIA モデルだけでなく、AIA モデルでも同様に関節炎局所の骨吸収抑制作用を示した。

1.1.4 ラット CIA 及び AIA モデルでの OPG-Fc と抗 TNF-α 剤あるいは抗 IL-1 剤との比較（参考資料）

ラット CIA 及び AIA モデルでの関節炎局所及び全身性の BMD 並びに骨吸収及び炎症の血清マーカーに対する RANKL、TNFα、及び IL-1 の阻害の影響を、それぞれの阻害薬 OPG-Fc、soluble TNF receptor 1（sTNFR1: pegsunercept）、及び interleukin-1 receptor antagonist（IL-1 Ra: anakinra）を用いて検討した。その結果、sTNFR1 及び IL-1 Ra は関節炎局所及び血清の炎症パラメータを低下させ、関節局所の骨減少を部分的に抑制した。一方、OPG-Fc は炎症パラメータには影響しなかったが、関節炎局所の骨減少が抑制された。

2. 効力を裏付ける試験

デノスマブのヒト関節リウマチへの有効性を確認するために、ラット CIA 及び AIA モデルでのデノスマブのサロゲートである OPG-Fc の影響を検討した。なお、[redacted] 社で実施された 2.1 項、2.3 項、及び 2.4 項の試験（いずれも参考資料）では、関節炎の発症日（CIA ではコラーゲン感作 11 日後、AIA ではアジュバント感作 9 日後）を Day 0 として、翌日を Day 1 と表示している。一方、[redacted] 社で実施された 2.2 項の試験では、コラーゲン感作日を Day 1 として、翌日を Day 2 と表示している。日数表示は試験評価に大きな影響はないと判断して、本 CTD では報告書の日数通りに表示した。

2.1 ラットコラーゲン誘発関節炎及びアジュバント誘発関節炎モデルの病態推移（参考資料）

添付資料番号 4.2.1.1-1

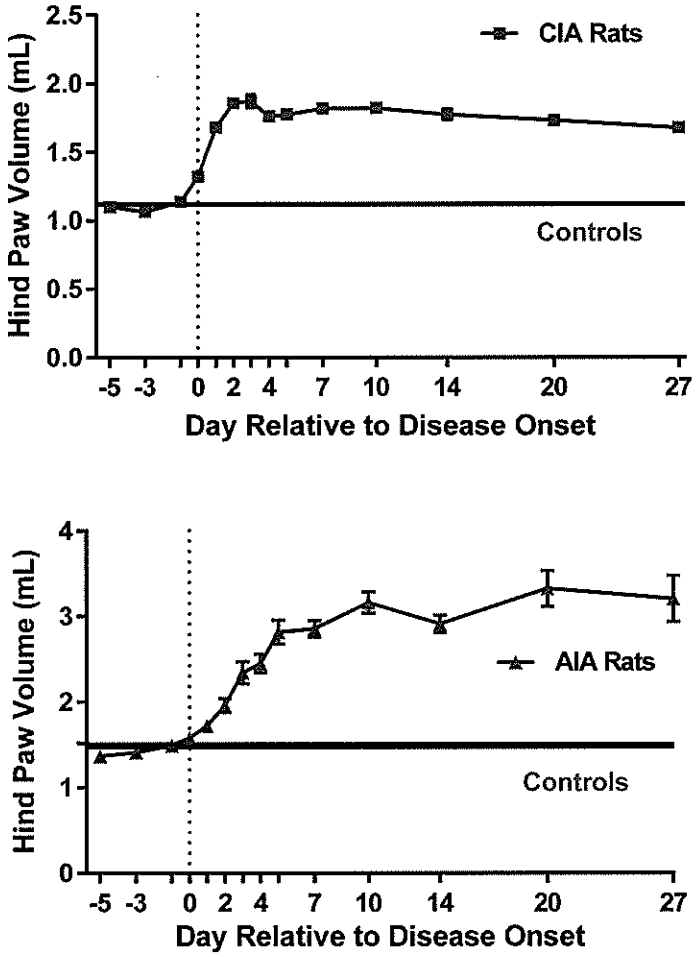
【方法】ラット関節炎モデルで OPG-Fc の治療効果を確認する予備検討として、CIA 及び AIA モデルでの関節炎、RANKL 濃度、及び骨びらんの経時的推移を検討した。CIA モデルには Lewis 系雌ラット（8～9 週齢、体重 150 g～175 g、n = 8/time point）、AIA モデルには Lewis 系雄ラット（8～9 週齢、体重 200 g～225 g、n = 8/time point）を用いた。CIA は、0.1N 酢酸に溶解したブタ II 型コラーゲンとフロイント不完全アジュバントを 1:1 に乳化させ（最終濃度 1 mg/mL）、この乳剤をラット背部皮内の 10 ヵ所（0.1 mL/site）に単回投与して作製した。AIA は、heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra（0.5 mg）をパラフィン油 0.5 mL に懸濁し、この懸濁液をラット尾根部皮下に単回投与して作製した。CIA は感作後 39 日まで、AIA は感作後 37 日まで、14 時点で剖検した。それぞれのモデルの発症時期が異なるため、発症した日を 0 日として、発症 27 日後までの 11 時点で剖検した。無処置対照動物（n = 2/time point）も同様に剖検した。各時点で、後肢体積、病理組織学的スコア（骨びらん及び破骨細胞）、並びに血清中 RANKL 蛋白質及び TRACP-5b 活性を経時的に測定した。採取した脛骨足根骨関節を凍結粉砕で得た抽出液中の総蛋白質量、RANKL 蛋白質濃度、及び TRACP-5b 活性を経時的に測定した。また、後肢組織標本に *Rankl* mRNA の in situ ハイブリダイゼーションを行った。

【結果】CIA では感作 11 日後、AIA では感作 9 日後に後肢の紅斑あるいは浮腫が発症した。関節炎発症から、後肢体積（図 2.6.2.2.1-1）及び後肢抽出液中総蛋白質量（図 2.6.2.2.1-2）は増加し、試験終了時まで無処置対照動物より高値を示した。病理組織学的に、両関節炎モデルで骨びらん（図 2.6.2.2.1-3）及び破骨細胞（図 2.6.2.2.1-4）の増加が発症 2～3 日後に観察され、後肢抽出液中 RANKL 蛋白質濃度も同時期に増加した（図 2.6.2.2.1-6）。破骨細胞マーカーの血清中 TRACP-5b 活性では有意な上昇はなかったが（図 2.6.2.2.1-7）、TRACP-5b の後肢抽出液中活性は、CIA 及び AIA でそれぞれ発症 1 及び 5 日後から上昇した（図 2.6.2.2.1-8）。In situ ハイブリダイゼーションによる *Rankl* mRNA 検出では、両関節炎モデルで関節炎発症初期から *Rankl* mRNA が発現し、その後白血球浸潤、パンヌス組織形成、及び骨びらん増加に伴ってその発現が増加した（図 2.6.2.2.1-9）。血清中 RANKL 濃度は両関節炎とも発症 2 日

後から増加し、その後高値を維持した（図 2.6.2.2.1-5）。

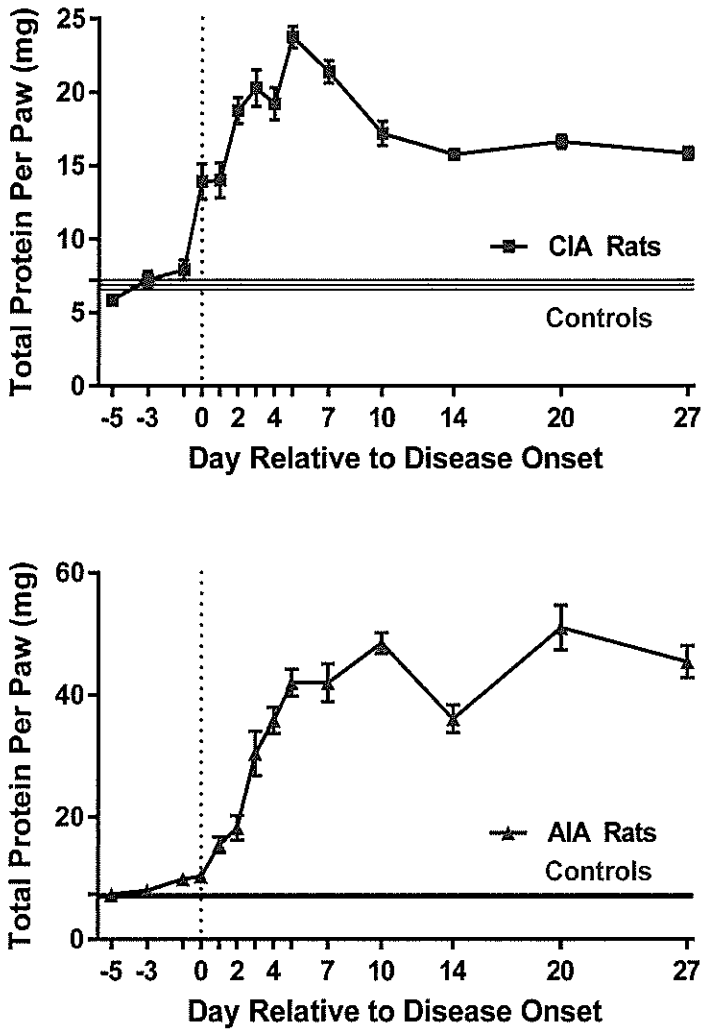
以上の結果から、CIA 及び AIA の発症に伴って後肢の *Rankl* mRNA 量及び RANKL 蛋白質が増加し、RANKL の発現が骨びらん形成に重要であることが示唆された。両モデルとも発症 4 日後から 14 日後に関節炎が進行していることから、この時期が治療効果の評価に適していると考えられた。

図 2.6.2.2.1-1　Hind Paw Volume in CIA and AIA Models



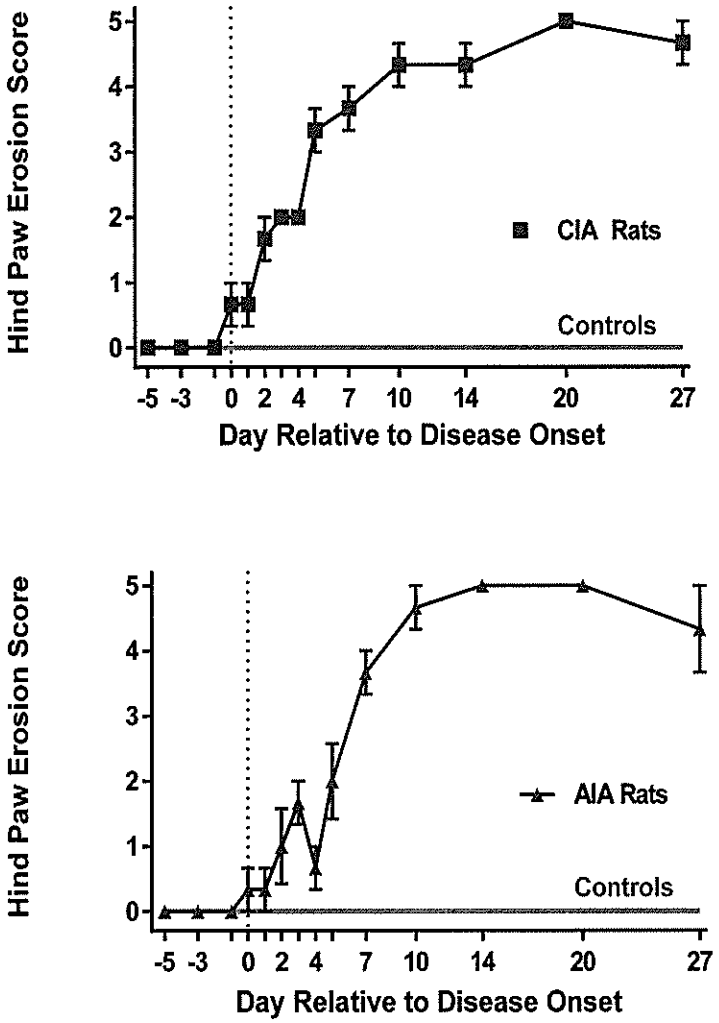
Hind paw volume was assessed by water plethysmography in 8 arthritic rats (CIA, upper panel; AIA, lower panel) and 2 healthy untreated normal controls at 5, 3, and 1 days before disease onset, day 0 (day of onset), 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14, 20, and 27 days after onset. Data for CIA and AIA groups represent mean ± standard error of the mean. Healthy untreated control animal data across time points were combined into single sex-matched control groups (28 females for CIA, 28 males for AIA) and are represented as mean ± standard error by horizontal grey bars.

図 2.6.2.2.1-2　Hind Paw Total Protein Content in CIA and AIA Models



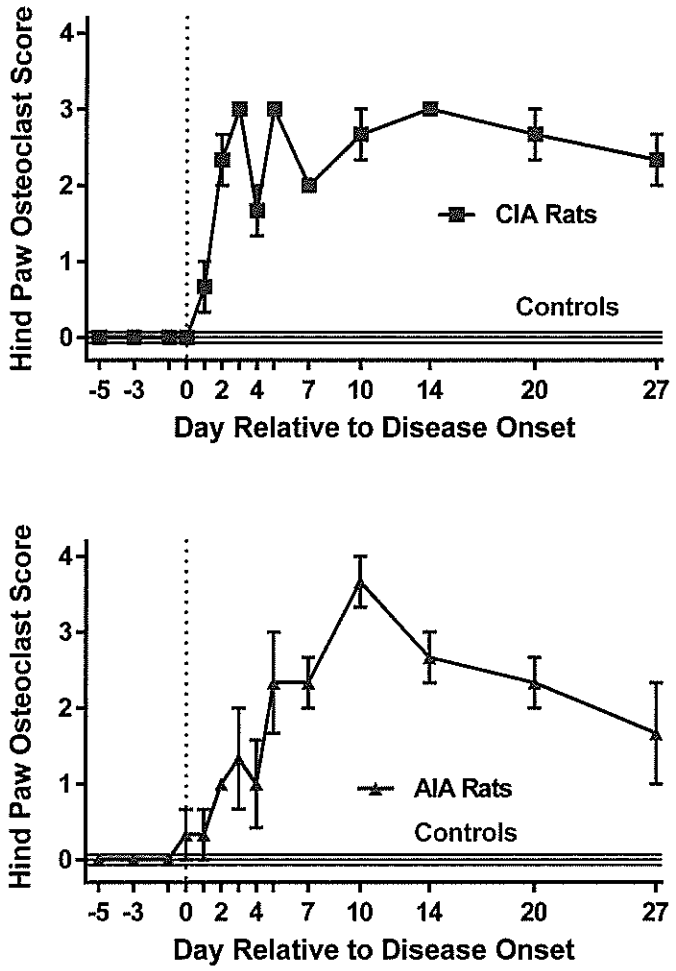
Total protein in hind paw protein extracts was determined by BCA protein assay for 5 arthritic rats (CIA, upper panel; AIA, lower panel) and 1 healthy untreated normal control at each time point. Data for CIA and AIA groups represent mean ± standard error of the mean. Healthy untreated control animal data across time points were combined into single sex-matched controls (14 females for CIA, 14 males for AIA) and are represented as mean ± standard error by horizontal grey bars.

図 2.6.2.2.1-3　Hind Paw Bone Erosion Score in CIA and AIA Models



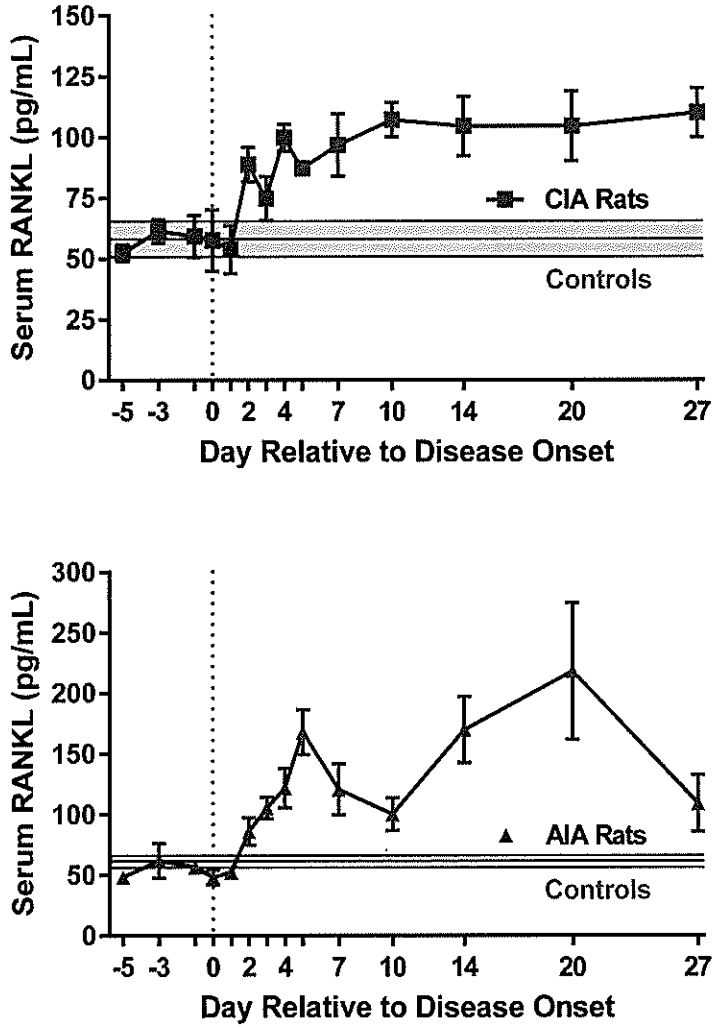
Hind paw erosion scores were determined by semi-quantitative histopathology in 3 arthritic rats (CIA, upper panel; AIA, lower panel) and 1 healthy untreated normal control at each time point. Data for CIA and AIA groups represent mean ± standard error of the mean. Healthy untreated control animal data across time points were combined into single sex-matched controls (14 females for CIA, 14 males for AIA) and are represented as mean ± standard error by horizontal grey bars.
Erosion score: 0, normal; 1, minimal loss of cortical or trabecular bone at a few sites; 2, mild loss of cortical or trabecular bone at modest numbers of sites (generally tarsals); 3, moderate loss of bone at many sites (usually the trabeculae of the tarsals, but sometimes the cortex of the distal tibia); 4, marked loss of bone at many sites (usually as extensive destruction of trabeculae in the tarsals, but sometimes with partial loss of cortical bone in the distal tibia); 5, marked loss of bone at many sites (with fragmenting of tarsal trabeculae and full thickness penetration of cortical bone in the distal tibia)

図 2.6.2.2.1-4　Hind Paw Osteoclast Score in CIA and AIA Models



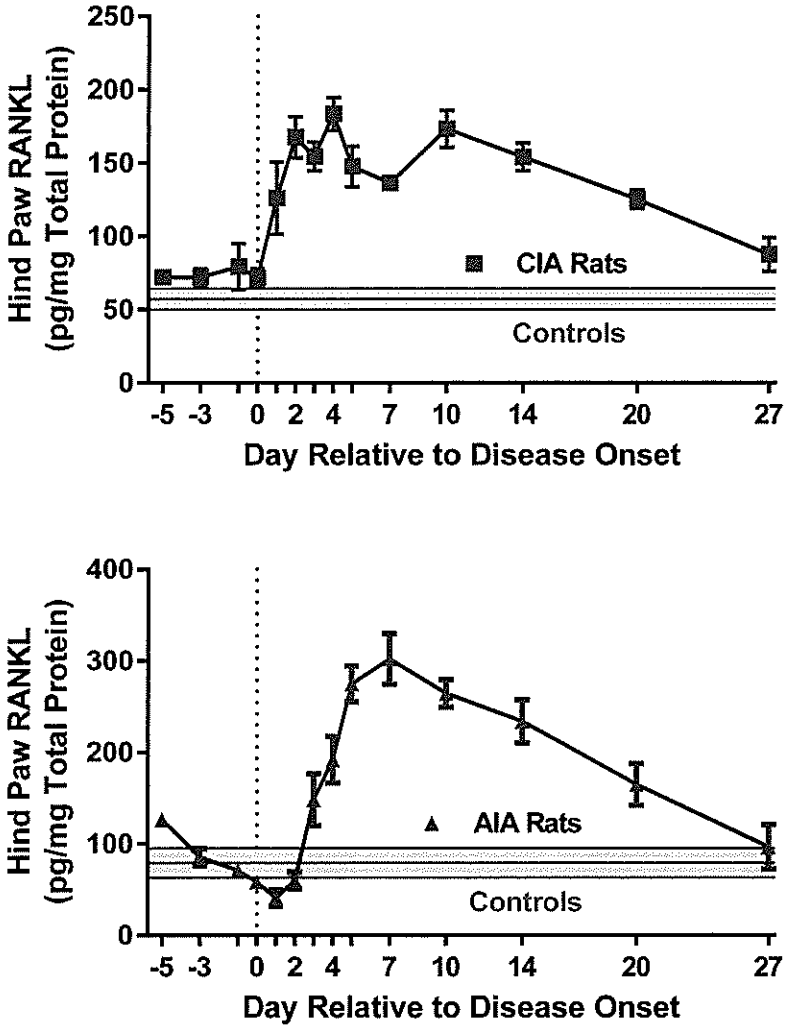
Hind paw osteoclast scores were determined by semi-quantitative histopathology in 3 arthritic rats (CIA, upper panel; AIA, lower panel) and 1 healthy untreated normal control at each time point. Data for CIA and AIA groups represent mean ± standard error of the mean. Healthy untreated control animal data across time points were combined into single sex-matched controls (14 females for CIA, 14 males for AIA) and are represented as mean ± standard error by horizontal grey bars.
Osteoclast score: 0, normal (essentially no osteoclasts); 1, few osteoclasts (lining < 5% of most affected bone surfaces); 2, some osteoclasts (lining 5% to 25% of most affected bone surfaces); 3, many osteoclasts (lining 25% to 50% of most affected bone surfaces); 4, myriad osteoclasts (lining > 50% of most affected bone surfaces)

図 2.6.2.2.1-5　Serum RANKL Concentration in CIA and AIA Models



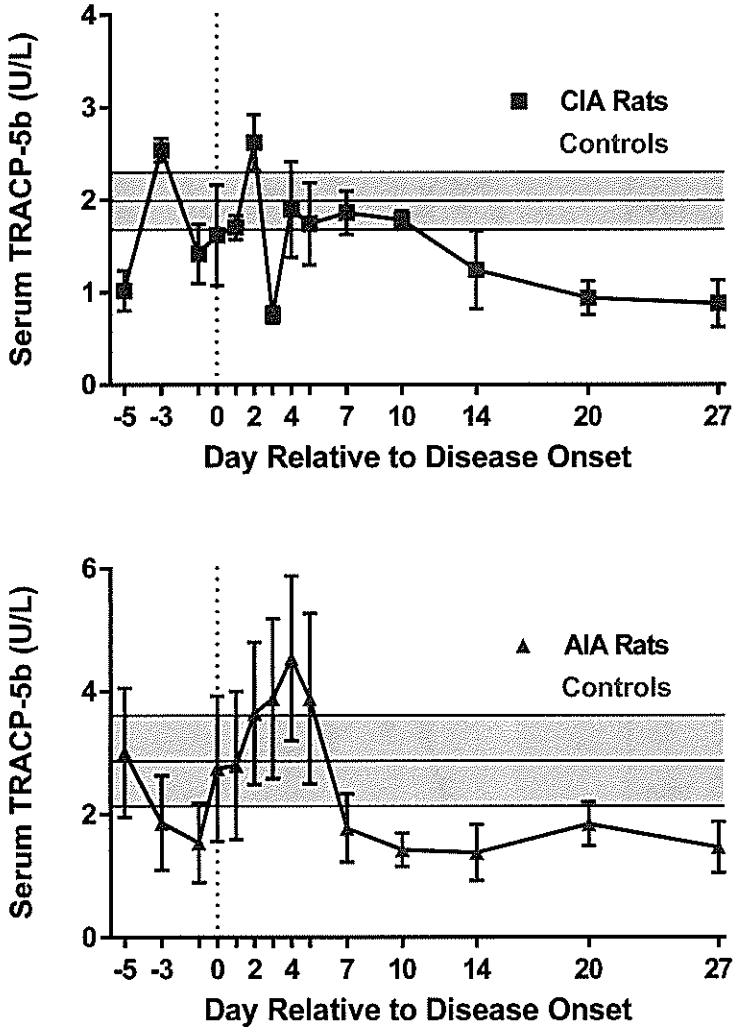
Serum RANKL was determined by ELISA for 5 arthritic rats (CIA, upper panel; AIA, lower panel) at each time point, and for 1 healthy untreated normal control sacrificed on Days -3, 0, 3, 7, 10, 14, 20, and 27. Data for CIA and AIA groups represent mean ± standard error of the mean. Healthy untreated control animal data across these 8 time points were combined into single sex-matched controls (8 females for CIA, 8 males for AIA) and are represented as mean ± standard error by horizontal grey bars.

図 2.6.2.2.1-6　RANKL Protein Concentration in Hind Paws Adjusted for Total Paw Protein in CIA and AIA Models



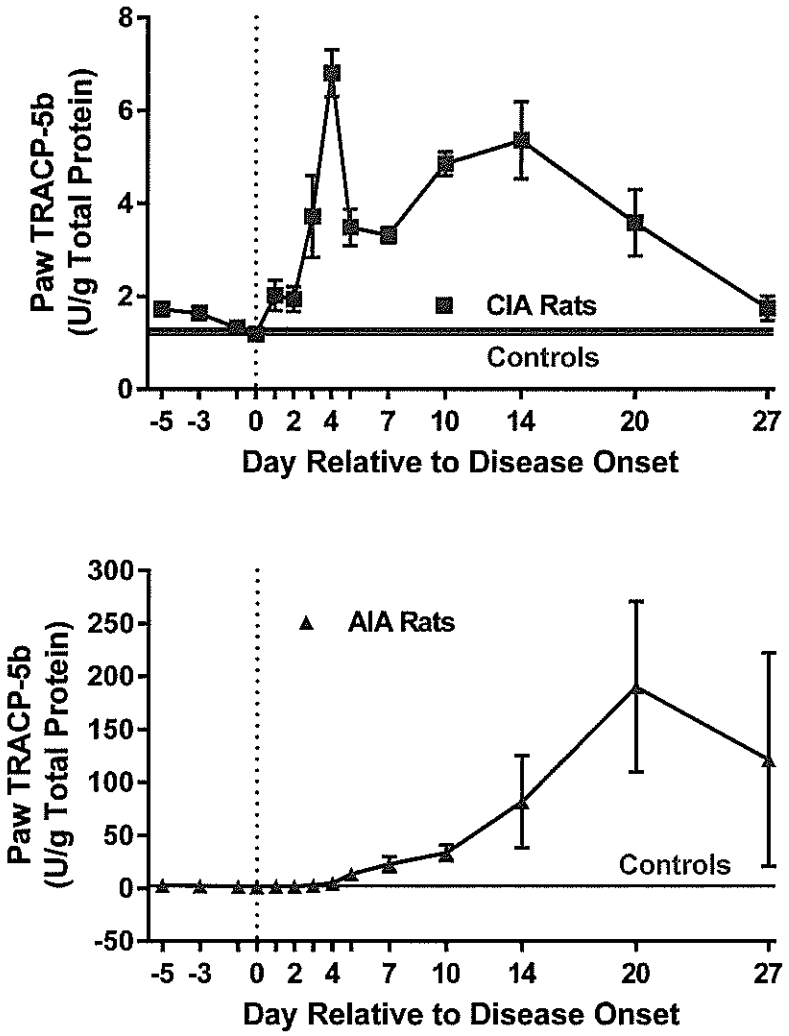
RANKL in hind paw protein extracts was determined by ELISA for 5 arthritic rats (CIA, upper panel; AIA, lower panel) at each time point, and for 1 healthy untreated normal control sacrificed on Days -3, 0, 3, 7, 10, 14, 20, and 27. Adjustment for total paw protein was performed by dividing paw RANKL content by paw total protein content. Data for CIA and AIA groups represent mean ± standard error of the mean. Healthy untreated control animal data across these 8 time points were combined into single sex-matched controls (8 females for CIA, 8 males for AIA) and are represented as mean ± standard error by horizontal grey bars.

図 2.6.2.2.1-7　Serum TRACP-5b Concentration in CIA and AIA Models



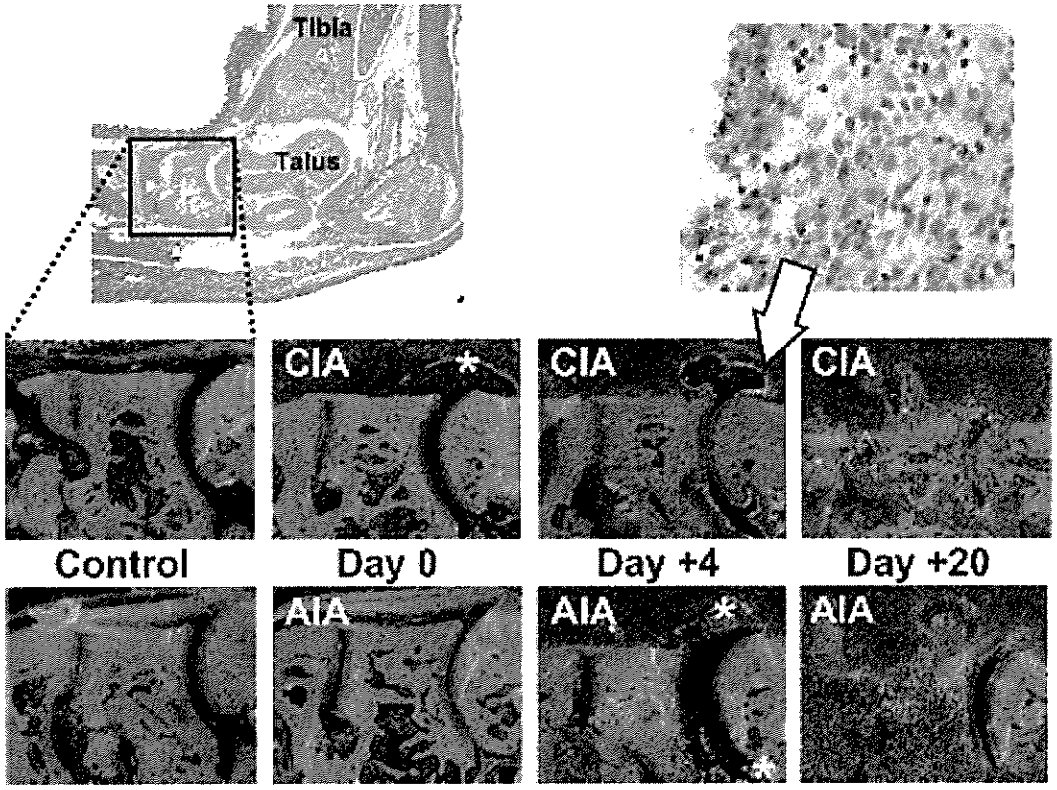
Serum TRACP-5b (tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b) was determined by ELISA for 5 arthritic rats (CIA, upper panel; AIA, lower panel) at each time point, and for 1 healthy untreated normal control sacrificed on Days -3, 0, 3, 7, 10, 14, 20, and 27. Data for CIA and AIA groups represent mean ± standard error of the mean. Healthy untreated control animal data across these 8 time points were combined into single sex-matched controls (8 females for CIA, 8 males for AIA) and are represented as mean ± standard error by horizontal grey bars.

図 2.6.2.2.1-8　TRACP-5b Protein Concentrations in Hind Paws Adjusted for Total Paw Protein in CIA and AIA Models



TRACP-5b (tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b) in hind paw protein extracts was determined by ELISA for 5 arthritic rats (CIA, upper panel; AIA, lower panel) at each time point, and for 1 healthy untreated normal control sacrificed on Days -3, 0, 3, 7, 10, 14, 20, and 27. Adjustment for total paw protein was performed by dividing paw TRACP-5b content by paw total protein content. Data for CIA and AIA groups represent mean ± standard error of the mean. Healthy untreated control animal data across these 8 time points were combined into single sex-matched controls (8 females for CIA, 8 males for AIA) and are represented as mean ± standard error by horizontal grey bars.

図 2.6.2.2.1-9　In Situ Hybridization of *Rankl* mRNA in Hind Paws in CIA and AIA Models



Photomicrographs of representative histology sections from selected hind paws. The two uppermost bright field images were stained with hematoxylin and eosin (H&E). The upper left image indicates the navicular tarsal region as represented in the lower dark field images. The upper right image is a high magnification bright field image of the inflammatory pannus tissue shown in the CIA Day +4 dark field (in situ) photomicrograph. The lower 8 photomicrographs represent dark field images of *Rankl* mRNA expression in the region of the navicular tarsal from healthy untreated normal control, CIA and AIA rats sacrificed on Days 0, 4, and 20 relative to initial disease onset. White asterisk symbols indicate the location of earliest overexpression of *Rankl* mRNA in each disease model. For in situ assessment, a ^{33}P-labeled probe was transcribed from nucleotides 395-640 of the rat *Rankl* gene, amplified by RT-PCR, cloned into the pGEM-T vector, and hybridized to sections overnight at 60°C, followed by RNase digestion and rinsing in a series of SSC washes with highest stringency of 0.1X SSC at 55°C for 30 minutes. Slides were coated with NTB2 emulsion and exposed for 3 weeks in the dark at 0°C to 4°C, developed, and counterstained with H&E.

2.2　ラットコラーゲン誘発関節炎モデルでのオステオプロテゲリン－免疫グロブリン結晶化フラグメントの作用（評価資料）

添付資料番号 4.2.1.1-2

【方法】ラット CIA モデルでのラット OPG-Fc の作用を検討した。ウシ II 型コラーゲンとフロイント不完全アジュバントを 1:1 に乳化させ（最終濃度 3 mg/mL）、Lewis 系雌ラット（8～9 週齢、体重 128 g～147 g、n = 12/group）に、この乳剤 150 μL をラット尾根部皮内に、Day 1 及び Day 7 に投与した。OPG-Fc 投与動物（CIA + rat OPG-Fc）には、OPG-Fc 3 mg/kg を Day 16、18、20、22、及び 24 に皮下投与した。OPG-Fc の投与量及び投与間隔は、先に実施した CIA に対する OPG-Fc の効果を検討した試験（2.6.2.2.3 及び 2.6.2.2.4）をもとに設定した。関節炎

対照動物（CIA control）及び非感作動物（Non-disease）にはリン酸緩衝生理食塩液（phosphate buffered saline: PBS）を同様に投与した。関節炎の発症は臨床スコア、後肢体積、及び後肢の厚みで経時的に評価した。腰椎及び足根関節の BMD は二重エネルギーX 線吸収（dual X-ray absorptiometry: DXA）法で測定した。血清及び足根関節中の TRACP-5b 活性及び血清中 OPG-Fc 濃度を測定した。また、Day 26 の解剖で採取した後肢関節の病理組織検査を行い、炎症、軟骨傷害、パンヌス、骨膜／外骨性変化、骨吸収、及び破骨細胞数をスコア化した。

【結果】CIA 対照動物（CIA Control）では非感作動物に比べて Day 26 で体重が減少し、足関節の臨床スコアは 0～4 段階のうちの 3 を示し（表中は両側の合計）、後肢の厚み及び後肢体積も増加した（表 2.6.2.2.2-1）。関節炎の発症は病理組織学的検査によっても確認された（表 2.6.2.2.2-4）。OPG-Fc 投与動物（CIA + Rat OPG-Fc）では CIA 関節炎対照動物に比較して、Day 25 の脛骨足根関節部の BMD が増加し（表 2.6.2.2.2-2）、Day 26 の後肢抽出液中 TRACP-5b 活性が減少し（表 2.6.2.2.2-3）、後肢の破骨細胞減少及び骨吸収抑制が示唆された。しかし、OPG-Fc 投与動物では関節炎のスコアや後肢の腫脹に対しては効果がなく（表 2.6.2.2.2-1）、また病理組織学的検査でも炎症、軟骨傷害、パンヌス、及び骨膜／外骨性変化に対しては投与による変化はなかった。（表 2.6.2.2.2-4）。

以上の結果から、OPG-Fc は CIA の後肢の炎症及び病理組織学的関節炎スコアに対しては無効であったが、BMD 低下抑制作用や破骨細胞及び TRACP-5b 活性減少を伴う骨吸収抑制作用を示した。

表 2.6.2.2.2-1　Body Weight, Clinical Score, Paw Thickness, and Paw Volume on Day 26

	Non-Disease	CIA Control	CIA + Rat OPG-Fc
Body Weights (g)	172.9 ± 7.0	141.7 ± 8.2***	140.5 ± 6.8***
Clinical Score [a,b]	0.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
Paw Thickness (mm)[c]	3.413 ± 0.061	5.363 ± 0.332	5.313 ± 0.341
Paw Volume (mL)[b]	2.162 ± 0.084	3.240 ± 0.174	3.244 ± 0.194

CIA = collagen-induced arthritis, OPG-Fc = osteoprotegerin-Fc
a: 0, normal; 1, mild, but definite redness and swelling of the hind paws or apparent redness and swelling limited to individual digits, regardless of the number of affected digits; 2, moderate redness and swelling of the hind paw; 3, severe redness and swelling of the hind paw; 4, maximally inflamed hind paw with involvement of multiple joints
b: Sum of left and right hindpaw. No statistical analysis was conducted.
c: Average of left and right hindpaw. No statistical analysis was conducted.
Data represent mean ± standard deviation (n = 12). *** $P \leq 0.001$ vs. non-disease control (t-test)

表 2.6.2.2.2-2　Lumbar Vertebra and Ankle Bone Mineral Density on Day 25

	Non-Disease	CIA Control	CIA + Rat OPG-Fc
Lumbar spine (L1- L4) (g/cm^2)	0.1763 ± 0.0053	0.1587 ± 0.0049**	0.1683 ± 0.0054*†
Right tibiotarsal joint (g/cm^2)	0.2668 ± 0.0088	0.2353 ± 0.0110**	0.2738 ± 0.0075†

CIA = collagen-induced arthritis, OPG-Fc = osteoprotegerin-Fc
Data represent mean ± standard deviation (n = 12).
* $P \leq 0.01$, ** $P \leq 0.001$ vs. non-disease control (adjusted t-test), † $P \leq 0.001$ vs. CIA control (adjusted t-test)

表 2.6.2.2.2-3 Serum and Hind Paw TRACP-5b and Serum OPG-Fc concentrations

		Non-Disease	CIA Control	CIA + Rat OPG-Fc
Serum TRACP-5b (U/L) [a]	Day 16	5.462 ± 0.589	8.366 ± 1.584*	8.415 ± 1.309*
	Day 26	4.150 ± 0.390	3.856 ± 0.727 [c]	0.042 ± 0.144*†
Hind paw TRACP-5b (U/g) [a]	Day 26	0.624 ± 0.318	8.757 ± 3.646*	0.224 ± 0.118*†
Serum OPG-Fc (ng/mL) [b]	Day 26	< LLOQ	66 ± 128	12600 ± 1920

CIA = collagen-induced arthritis, TRACP-5b = tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b, OPG-Fc = osteoprotegerin-Fc
Data represent mean ± deviation (n = 12). * $P \leq 0.001$ v.s. non-disease control (adjusted Wilcoxon), † $P \leq 0.001$ v.s. CIA control (adjusted Wilcoxon)
a: Lower limit of quantificatin (LLOQ) = 0.49 U/L. Below LLOQ, concentration value of 0 was assigned.
b: LLOQ = 10 ng/mL
c: n = 11; one animal was excluded from mean because percent difference between singlicate concentrations is > 30%

表 2.6.2.2.2-4 Histopathological Arthritis Score of Hind Paw on Day 26

Scoring Item	Non-Disease	CIA Control	CIA + Rat OPG-Fc
Inflammation [a]	0.08 ± 0.08	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
Cartilage damage [a]	0.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	3.92 ± 0.08
Pannus [a]	0.00 ± 0.00	3.83 ± 0.11	4.00 ± 0.00
Bone resorption [a]	0.00 ± 0.00	3.83 ± 0.11	1.83 ± 0.17
Periosteal/exostotic changes [a]	0.00 ± 0.00	3.92 ± 0.08	3.83 ± 0.11
Osteoclast [b]	1.83 ± 0.21	4.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00

CIA = collagen-induced arthritis, OPG-Fc = osteoprotegerin-Fc
Data represent mean ± standard error of the mean (n = 12).
a: arthritis score; 0, normal; 1, minimal; 2, mild; 3, moderate; 4, severe
b: osteoclast score; 0, no osteoclast; 1, occasional osteoclasts (≤ 10); 2, small number of osteoclasts (10-100); 3, moderate number of osteoclasts (100-200); 4, large number of osteoclasts (> 200)

2.3 ラットコラーゲン誘発関節炎及びアジュバント誘発関節炎モデルに対するオステオプロテゲリン－免疫グロブリン結晶化フラグメントによる RANKL 阻害の作用（参考資料）

添付資料番号 4.2.1.1-3

【方法】ラット CIA 及び AIA モデルでの OPG-Fc の関節及び全身性の骨減少に対する影響を検討した。CIA モデルは Lewis 系雌ラット（8～9 週齢、n = 8/group）及び AIA モデルは Lewis 系雄ラット（8～9 週齢、n = 8/group）を用い、前記の方法（2.6.2.2.1）と同様に作製した。関節炎モデル動物には発症 4 日後から 12 日後まで 1 日おきに、OPG-Fc 3 mg/kg を皮下投与した。関節炎対照動物（n = 8/group）には PBS を発症 4 日後から 13 日後まで毎日投与し、非感作動物には投与しなかった。発症 14 日後に足関節及び腰椎の BMD 及び破骨細胞数、血清中及び足関節組織抽出液中 TRACP-5b 活性、血清 RANKL を測定し、並びに後肢関節の micro-computed tomography（μCT）を実施した。

【結果】両関節炎モデルの関節炎対照群では、非感作動物群に対して血清 RANKL 濃度及び後肢抽出液中 TRACP-5b 活性が増加し（表 2.6.2.2.3-1）、足関節及び腰椎の BMD が減少し（表 2.6.2.2.3-2）、腰椎の破骨細胞が増加し、海綿骨量が減少し（表 2.6.2.2.3-3）、いずれの

項目も有意な差が認められた。CIA 及び AIA 関節炎動物に OPG-Fc を投与すると、関節炎対照群に比べて血清及び後肢抽出液中 TRACP-5b 活性が減少し（表 2.6.2.2.3-1）、後肢 BMD が増加した（表 2.6.2.2.3-2）。OPG-Fc は腰椎破骨細胞数を減少させて、腰椎海綿骨量を増加させた（表 2.6.2.2.3-3）。OPG-Fc は AIA モデルでは腰椎 BMD を有意に増加させ、CIA モデルでは増加傾向を示したが、有意な差はなかった（表 2.6.2.2.3-2）。後肢足関節の μCT 画像解析では、両関節炎モデルで皮質骨及び海綿骨の減少並びに骨棘様病変形成を伴った骨膜骨形成は認められたが、関節構造に大きな変化はなかった。骨膜骨形成以外のこれらの病変に対して、OPG-Fc は両関節炎モデルで骨及び関節構造の保護作用を示した（図 2.6.2.2.3-1、図 2.6.2.2.3-2）。

これらの結果から、OPG-Fc は CIA モデルだけでなく、AIA モデルでも同様に骨吸収を抑制することが示唆された。

表 2.6.2.2.3-1　Effects of OPG-Fc on RANKL and TRACP-5b in Rat Collagen- and Adjuvant-Induced Arthritis on Day 14 after onset

	Collagen-induced arthritis			Adjuvant-induced arthritis		
	Normal Control	Arthritis + Vehicle	Arthritis + OPG-Fc	Normal Control	Arthritis + Vehicle	Arthritis + OPG-Fc[a]
Serum RANKL (pg/mL)	57.61 ± 5.04 [b]	151.70 ± 18.04 *	NT	65.27 ± 7.91 [b]	189.12 ± 21.08 *	NT
Serum TRACP-5b (U/L)	10.84 ± 0.38 †	8.65 ± 0.51	0.36 ± 0.05 †	9.50 ± 0.51 †	8.20 ± 0.33	0.10 ± 0.02 †
Hind Paw TRACP-5b (U/g total protein)	0.051 ± 0.010 †[b]	0.143 ± 0.020	0.010 ± 0.003 †	0.011 ± 0.002 ‡[b]	0.697 ± 0.304	0.021 ± 0.003 ‡

OPG-Fc = osteoprotegerin-Fc, RANKL = receptor cativator of nuclear factor kappa B ligand,
TRACP-5b = tartrate-resistant adic phosphatase isoform 5b, NT = not tested
Data represent mean ± standard error of the mean (n = 8).
a: n = 7 because one animal died on 12 days after disease onset, b: n = 6
* $P < 0.05$ vs. normal control (unpaired t test), † $P < 0.05$ vs. arthritis + vehicle (Dunnett's test), ‡ $P < 0.05$ v.s. arthritis + vehicle (Dunnett's test after log-transformation)

表 2.6.2.2.3-2　Effects of OPG-Fc on Bone Mineral Density in Rat Collagen- and Adjuvant-Induced Arthritis on Day 14 after onset

	Collagen-induced arthritis			Adjuvant-induced arthritis		
	Normal Control	Arthritis + Vehicle	Arthritis + OPG-Fc	Normal Control	Arthritis + Vehicle	Arthritis + OPG-Fc[a]
Hind paw BMD (g/cm^2)	0.228 ± 0.004 *	0.204 ± 0.001	0.236 ± 0.002 *	0.247 ± 0.004 *	0.174 ± 0.008	0.254 ± 0.005 *
Lumbar vertebral BMD (g/cm^2)	0.208 ± 0.005 *	0.186 ± 0.003	0.193 ± 0.004	0.211 ± 0.001 *	0.172 ± 0.004	0.197 ± 0.002 *

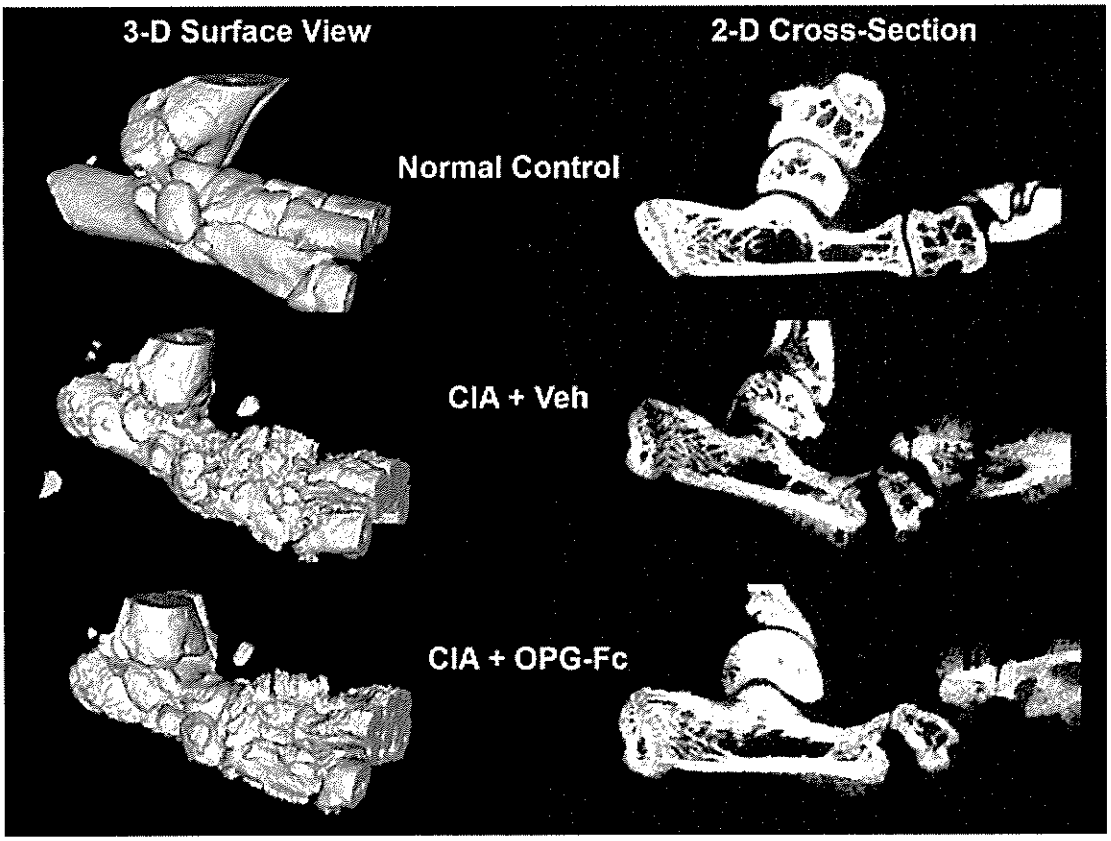
OPG-Fc = osteoprotegerin-FC, BMD = bone mineral density
Data represent mean ± standard error of the mean (n = 8).
a: n = 7 because one animal died on 12 days after disease onset.　* $P < 0.05$ vs. arthritis + vehicle (Dunnett's test)

表 2.6.2.2.3-3　Effects of OPG-Fc on Lumbar Vertebral Histomorphometry Data in Rat Collagen- and Adjuvant-Induced Arthritis on Day 14 after onset

	Collagen-induced arthritis			Adjuvant-induced arthritis		
	Normal Control [a]	Arthritis + Vehicle	Arthritis + OPG-Fc	Normal Control	Arthritis + Vehicle	Arthritis + OPG-Fc [b]
BV/TV (%)	45.38 ± 1.23 *	31.69 ± 1.25	41.43 ± 0.64 *	42.85 ± 1.60 *	24.59 ± 2.05	41.03 ± 1.79 *
N.Oc/BS (%)	0.81 ± 0.09 *	1.10 ± 0.07	0.04 ± 0.02 *	1.13 ± 0.12 *	1.57 ± 0.13	0.00 ± 0.00 *
N.Ob/BS (%)	1.04 ± 0.24	0.71 ± 0.10	0.34 ± 0.04	3.02 ± 0.54 *	0.68 ± 0.19	0.58 ± 0.04

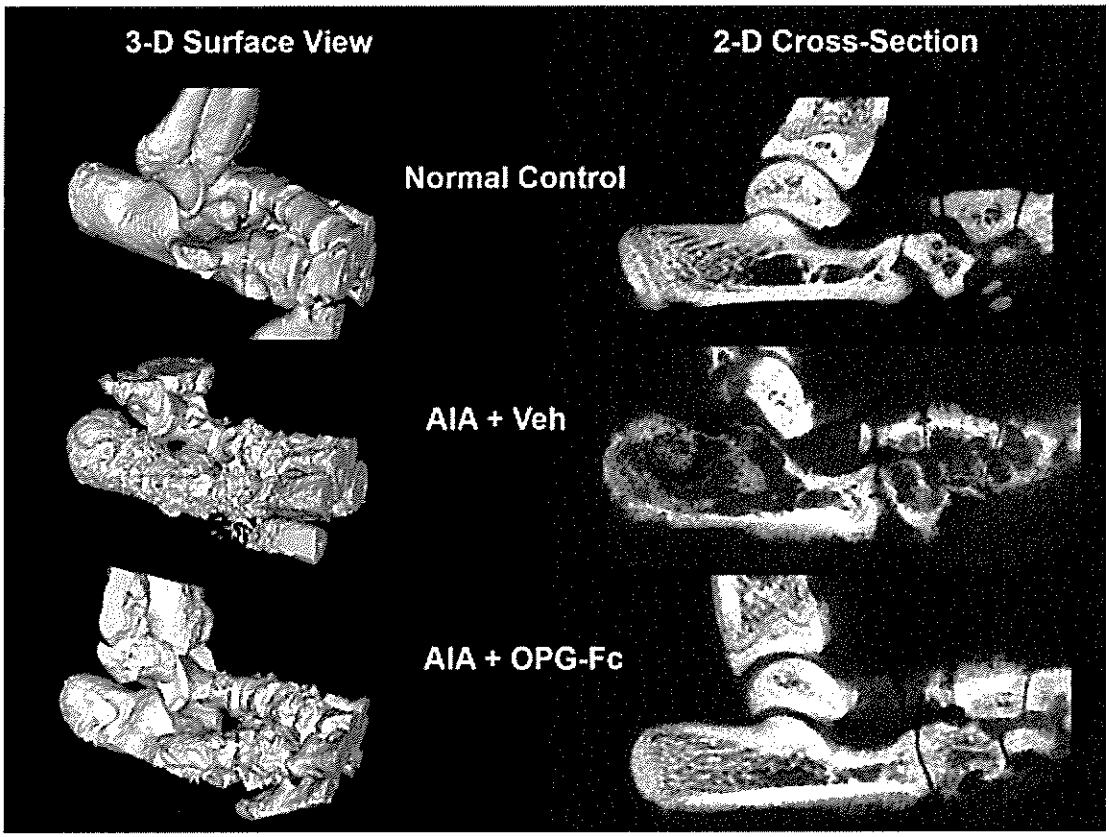
OPG-Fc = osteoprotegerin-FC, BV/TV = trabecular bone volume per total tissue volume, N.Oc/BS = number of osteoclasts per mm bone surface, N.Ob/BS = number of osteoblasts per mm bone surface
Data represent mean ± standard error of the mean (n = 8).
a: n = 7, b: n = 7 because one animal died on 12 days after disease onset.　* $P < 0.05$ vs. arthritis + vehicle (Dunnett's test)

図 2.6.2.2.3-1　Representative Reconstructed Micro-CT Images of Hind Paws for Collagen-Induced Arthritis on Day 14 after onset



CIA = collagen-induced arthritis.　Animals were sacrificed on Day 14 after initial disease onset, at which time hind paws were collected for micro-CT scanning.　Images on the left are 3-dimensional surface view reconstructions. Images on the right are 2-dimensional cross-sectional reconstructions.

図 2.6.2.2.3-2　Representative Reconstructed Micro-CT Images of Hind Paws for Adjuvant-Induced Arthritis on Day 14 after onset



AIA = adjuvant-induced arthritis.　Animals were sacrificed on Day 14 after initial disease onset, at which time hind paws were collected for micro-CT scanning.　Images on the left are 3-dimensional surface view reconstructions. Images on the right are 2-dimensional cross-sectional reconstructions.

2.4　ラットコラーゲン誘発関節炎及びアジュバント誘発関節炎モデルでの RANKL、TNFα、及び IL-1 の阻害作用の影響（参考資料）

添付資料番号 4.2.1.1-4

【方法】ラット CIA 及び AIA での関節炎局所及び全身性の BMD 並びに骨吸収及び炎症マーカーに対する RANKL、TNFα、及び IL-1 の阻害の影響を、それぞれの阻害薬 OPG-Fc、sTNFR1（pegsunercept）、及び IL-1 Ra（anakinra）を用いて検討した。CIA モデルは Lewis 系雌ラット（8～9 週齢、体重 146 g～186 g、n = 8/group）及び AIA モデルは Lewis 系雄ラット（8～9 週齢、体重 186 g～277 g、n = 8/group）に、前記の方法（2.6.2.2.1）と同様に作製した。関節炎モデル動物に発症 4 日後から 13 日後まで OPG-Fc（3 mg/kg、皮下投与、2 日に 1 回）、sTNFR1（4 mg/kg、皮下投与、毎日）、あるいは IL-1 Ra（100 mg/kg/day、皮下投与、浸透圧ポンプによる持続投与）を発症 14 日後まで投与した。関節炎対照動物（n = 8/group）には PBS を 1 日 1 回皮下投与し、無処置動物には被験物質及び溶媒のいずれも投与しなかった。関節炎局所炎症の指標として後肢径（CIA モデル）及び後肢体積（AIA モデル）を毎日測定した。関節炎発症 4 日後（Day 4）及び投与終了時（Day 14）の足関節及び腰椎の BMD を測定した。

発症 14 日後に剖検し、採取した血清中の RANKL、TRACP-5b、TNFα、interleukin (IL)-1β、IL-8、chemokine CC-motif ligand 2 (CCL2)、IL-17、alpha-1-acid glycoprotein (α1AGP)、ヒト OPG-Fc、及びラット OPG の濃度を測定した。足関節の組織学的検査で炎症性細胞の浸潤をスコア化した。

【結果】CIA（表 2.6.2.2.4-1）及び AIA（表 2.6.2.2.4-2）関節炎に対して、OPG-Fc 投与により足関節及び腰椎の BMD 減少が抑制されたが、後肢の腫脹及び炎症性細胞の浸潤に対しては無効であった。sTNFR1 投与により両関節炎モデルの後肢の腫脹は抑制され、AIA では足関節 BMD 減少が一部軽減した。IL-1 Ra 投与により CIA の足関節腫脹が抑制され、両モデルで足関節 BMD 減少が抑制された。Day 14 の血清バイオマーカーを測定した（表 2.6.2.2.4-3、表 2.6.2.2.4-4）。関節炎対照動物では両モデルとも血清 RANKL 濃度が上昇した。sTNFR1 及び IL-1 Ra 投与により血清 RANKL 濃度は部分的に減少したが、血清 TRACP-5b 活性には変化がなかった。一方、OPG-Fc 投与により両関節炎モデルで血清 TRACP-5b 活性は 95%以上抑制された。無処置動物に比較して、両関節炎対照動物では血清 α1AGP、IL-1β、IL-8、及び CCL2 が有意に上昇し、AIA 関節炎対照動物では血清 TNFα、及び IL-17 も有意に上昇した。sTNFR1 投与により AIA 関節炎動物の血清 α1AGP 及び CCL2 が減少し、CIA 関節炎動物の CCL2、IL-1β、及び α1AGP が減少した。IL-1 Ra 投与により CIA 関節炎動物の血清 IL-1β、IL-8、及び α1AGP が減少し、AIA 関節炎動物の血清 α1AGP が減少した。これに対して、OPG-Fc は両関節炎モデルの血清炎症パラメータを抑制しなかった。

これらの結果から、CIA 及び AIA 両関節炎動物では sTNFR1 及び IL-1 Ra は炎症パラメータを抑制し、関節炎局所の骨減少を部分的に抑制した。これに対して、OPG-Fc は炎症パラメータには影響はなかったが、関節炎局所及び全身性の骨減少が抑制された。

表 2.6.2.2.4-1　Hind Paw Swelling, BMD, and Inflammatory Score of CIA Rat

	Untreated Control	CIA + Vehicle	CIA + OPG-Fc	CIA + sTNFR1	CIA + IL-1 Ra
Hind Paw Diamensions [a]	0.74 ± 0.32	0.45 ± 1.00	4.51 ± 2.76	-6.65 ± 1.37^{c,v,o}	-13.23 ± 1.27^{c,v,o}
Hind Paw Ankle BMD [b]	0.02 ± 1.73^{v}	-8.46 ± 0.85^{c,o}	3.42 ± 0.96^{v}	-4.85 ± 1.47^{c,o}	-1.01 ± 1.25^{v}
Lumber Vertebral BMD [b]	-0.03 ± 2.26^{v}	-10.68 ± 1.55^{c}	-5.30 ± 0.58	-11.92 ± 1.02^{c,o}	-8.59 ± 2.05^{c}
Inflammatory Score [d]	0^{v,o}	3.1 ± 0.1^{c}	3.4 ± 0.2 ^{c}	2.0 ± 0.3^{c,v,o}	1.2 ± 0.1^{c,v,o}

CIA = collagen-induced arthritis, OPG-Fc = osteoprotegerin-Fc, sTNFR1 = soluble tumor necrosis factor receptor 1, IL-1 Ra = interleukin-1 receptor antagonist, BMD = bone mineral density
a: % change from Day 4 to Day 14 after disease onset, b: % change from Day 0 to Day 14 after disease onset, d: histopathological score of inflammatory cell infiltration on Day 14 after disease onset; 0 = no infiltrate, 1 = minimal, 2 = mild, 3 = moderate, and 4 = marked.
Mean ± standard error of the mean (n = 8). The symbols c, v, and o indicate significant differences from untreated control, arthritis + Veh, and arthritis + OPG-Fc, respectively. $P < 0.05$ (Dunnett's test)

表 2.6.2.2.4-2 Hind Paw Swelling, BMD, and Inflammatory Score of AIA Rat

	Untreated Control	AIA + Vehicle	AIA + OPG-Fc [c]	AIA + sTNFR1	AIA + IL-1 Ra
Hind Paw Volume [a]	2.85 ± 0.52[v,o]	21.48 ± 4.24[c]	14.41 ± 1.80[c]	-14.17 ± 1.55[c,v,o]	12.91 ± 3.25[c]
Hind Paw Ankle BMD [b]	-0.14 ± 1.53[v]	-35.14 ± 1.25[c,o]	3.49 ± 2.52[v]	-8.34 ± 0.98[c,v,o]	-22.31 ± 2.52[c,v,o]
Lumber Vertebral BMD [b]	0.00 ± 0.61[v,o]	-18.27 ± 1.76[c,o]	-6.50 ± 1.05[c,v]	-15.67 ± 2.47[c,o]	-17.72 ± 1.81[c,o]
Inflammatory Score [d]	0[v,o]	3.8 ± 0.1[c]	3.8 ± 0.2[c]	3.6 ± 0.3[c]	3.8 ± 0.2[c]

AIA = adjuvant-induced arthritis, OPG-Fc = osteoprotegerin-Fc, sTNFR1 = soluble tumor necrosis factor receptor 1, IL-1 Ra = interleukin-1 receptor antagonist, BMD = bone mineral density
a: % change from Day 4 to Day 14 after disease onset, b: % change from Day 0 to Day 14 after disease onset, d: histopathological score of inflammatory cell infiltration on Day 14 after disease onset; 0 = no infiltrate, 1 = minimal, 2 = mild, 3 = moderate, and 4 = marked, e: One animal from the AIA + OPG-Fc group (ID 5.7) was found dead in cage on Day 12; cause of death was undetermined.
Mean ± standard error of the mean (n = 8). The symbols c, v, and o indicate significant differences from untreated control, arthritis + Veh, and arthritis + OPG-Fc, respectively. $P < 0.05$ (Dunnett's test)

表 2.6.2.2.4-3 Serum Biomarkers for CIA Rat on Day 14

	Untreated Control	CIA + Vehicle	CIA + OPG-Fc	CIA + sTNFR1	CIA + IL-1 Ra
RANKL (pg/mL)	57.61 ± 5.04 [v,a]	151.70 ± 18.04 [c]	NA	103.87 ± 7.17 [c,v]	111.80 ± 7.48 [c,v]
TRACP-5b (U/L)	10.84 ± 0.38 [v,o]	8.65 ± 0.51 [c,o]	0.36 ± 0.05 [c,v]	7.77 ± 0.20 [c,o]	7.71 ± 0.25 [c,o]
TNFα (pg/mL)	9.93 ± 5.34	27.63 ± 17.52	15.50 ± 8.05	5.38 ± 4.14	0.00 ± 0.00
IL-1β (pg/mL)	6.63 ± 0.82 [v,o]	11.63 ± 1.76 [c]	11.38 ± 0.65 [c]	6.63 ± 0.32 [v,o]	5.00 ± 0.19 [v,o]
IL-8 (pg/mL)	338.50 ± 18.95 [v,o]	673.88 ± 87.71 [c,o]	1074.50 ± 80.60 [c,v]	747.00 ± 85.97 [c,o]	125.25 ± 12.09 [v,o]
CCL2 (pg/mL)	205.38 ± 16.17 [v,o]	424.25 ± 23.95 [c]	463.38 ± 74.68 [c]	246.88 ± 16.79 [v,o]	365.50 ± 44.47 [c]
IL-17 (pg/mL)	8.12 ± 5.23	5.48 ± 3.69	3.77 ± 2.31	11.45 ± 4.97	7.72 ± 6.44
α1AGP (μg/mL)	127.74 ± 10.56 [v,o,b]	370.57 ± 25.47 [c,o]	445.76 ± 11.56 [c,v]	284.28 ± 21.63 [c,v,o]	64.26 ± 9.65 [v,o]
Human OPG-Fc (μg/mL)	ND	ND	16.45 ± 5.1	ND	ND
Rat OPG (pg/mL)	176.71 ± 15.26 [a]	160.70 ± 8.47 [d]	ND	ND	ND

CIA = collagen-induced arthritis, OPG-Fc = osteoprotegerin-Fc, sTNFR1 = soluble tumor necrosis factor receptor 1, IL-1 Ra = interleukin-1 receptor antagonist, RANKL = receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, TRACP-5b = tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b, TNFα = tumor necrosis factor alpha, IL-1ß = interleukin-1 beta, IL-8 = interleukin-8, CCL2 = chemokine C-C motif ligand 2, IL-17 = interleukin-17, α1AGP = alpha-1-acid glycoprotein, OPG = osteoprotegerin.
Data represent mean ± standard error of the mean (n = 8). Due to sample volume limitations, the n for some analytes ranges a, n = 6; b, n = 7; d, n = 5.
NA, not applicable due to OPG-Fc interference with RANKL detection. ND, not determined as per study protocol.
c $P < 0.05$ vs. Untreated Control (Dunnett's test), v $P < 0.05$ vs. AIA + Veh (Dunnett's test), o $P < 0.05$ vs. AIA + OPG-Fc (Dunnett's test)

表 2.6.2.2.4-4 Serum Biomarkers for AIA Rat on Day 14

	Untreated Control	AIA + Vehicle	AIA + OPG-Fc	AIA + sTNFR1	AIA + IL-1 Ra
RANKL (pg/mL)	65.27 ± 7.91 [v,a]	189.12 ± 21.08 [c]	NA	114.58 ± 7.74 [c,v]	107.54 ± 5.93 [c,v]
TRACP-5b (U/L)	9.50 ± 0.51 [o]	8.20 ± 0.33 [o]	0.10 ± 0.02 [c,v,b]	7.96 ± 0.13 [c,o]	8.38 ± 0.61 [o]
TNF-α (pg/mL)	0.75 ± 0.75 [v]	12.63 ± 1.86 [c]	7.23 ± 3.33 [b]	5.00 ± 2.08	12.38 ± 3.54 [c]
IL-1β (pg/mL)	7.00 ± 0.38 [v,o]	11.00 ± 0.53 [c]	13.14 ± 1.24 [c,b]	9.88 ± 0.44 [c,o]	11.13 ± 0.79 [c]
IL-8 (pg/mL)	313.75 ± 31.44 [v,o]	604.75 ± 48.34 [c]	682.71 ± 68.52 [c,b]	449.75 ± 63.97 [o]	415.50 ± 53.56 [o]
CCL2 (pg/mL)	287.88 ± 21.10 [v,o]	506.50 ± 30.64 [c]	438.86 ± 46.58 [c,b]	344.25 ± 16.96 [v]	588.13 ± 31.09 [c,o]
IL-17 (pg/mL)	7.45 ± 3.80 [v,o]	57.32 ± 13.24 [c]	64.80 ± 13.73 [c,b]	57.14 ± 13.92 [c]	38.61 ± 12.96
α1AGP (μg/mL)	109.56 ± 20.61 [v,o]	1360.70 ± 58.65 [c]	1389.98 ± 78.35 [c,b]	965.94 ± 126.39 [c,v,o]	1050.07 ± 52.33 [c,v,o]
Human OPG-Fc (μg/mL)	ND	ND	360.33 ± 39.34 [b]	ND	ND
Rat OPG (pg/mL)	193.87 ± 11.10 [a]	233.13 ± 18.22 [d]	ND	ND	ND

CIA = collagen-induced arthritis, OPG-Fc = osteoprotegerin-Fc, sTNFR1 = soluble tumor necrosis factor receptor 1, IL-1 Ra = interleukin-1 receptor antagonist, RANKL = receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, TRACP-5b = tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b, TNFα = tumor necrosis factor alpha, IL-1ß = interleukin-1 beta, IL-8 = interleukin-8, CCL2 = chemokine C-C motif ligand 2, IL-17 = interleukin-17, α1AGP = alpha-1-acid glycoprotein, OPG = osteoprotegerin.
Data represent mean ± standard error of the mean (n = 8). Due to sample volume limitations, the n for some analytes ranges a, n = 6; b, n = 7; d, n = 5.
NA, not applicable due to OPG-Fc interference with RANKL detection. ND, not determined as per study protocol.
c $P < 0.05$ vs. Untreated Control (Dunnett's test), v $P < 0.05$ vs. AIA + Veh (Dunnett's test), o $P < 0.05$ vs. AIA + OPG-Fc (Dunnett's test)

3. 副次的薬理試験

本申請で該当する試験は実施していない。

4. 安全性薬理試験

安全性薬理試験は初回承認申請資料中で検討されている。本申請で追加の安全性薬理試験は実施していない。

5. 薬力学的薬物相互作用

本申請で該当する試験は実施していない。

6. 考察及び結論

関節リウマチ患者の関節構造損傷に対するデノスマブの作用を検討する目的で、動物の関節炎モデルに対するデノスマブのサロゲート分子である OPG-Fc を用いて薬理試験を実施した。

本申請の非臨床薬理試験は、抗リウマチ薬の臨床評価方法に関するガイドライン[3]を参考に選択した。このガイドラインでは薬効薬理試験として 1）作用機序解明のための in vitro 試験、2）薬効を裏付ける動物モデルを用いた試験、及び 3）代謝物の薬理作用を検索し、臨床用量の推定を行う試験を求めている。1）のデノスマブの作用機序を示す in vitro 試験は、既申請の申請資料に含まれる試験成績からデノスマブはヒト RANKL を阻害して、関節リウマチの関節破壊を抑制することが推測されていることから、本申請では追加試験は実施しなかった。2）の薬効を裏付ける動物モデルを用いた試験として、ガイドラインに例示されている動物モデルの中で、免疫あるいは炎症反応に直接作用がない本薬の作用機序を考慮して、関節破壊を評価可能なラット CIA モデルを選択した。また、参考資料として、AIA での関節破壊を評価した試験を含めた。3）の代謝物の薬効は、デノスマブが抗体製剤で代謝物の寄与はほとんどないことから検討しなかった。また、本申請ではデノスマブのサロゲートである OPG-Fc で薬効評価を行ったことから、非臨床試験からデノスマブの薬効用量の推定は行わなかった。

デノスマブはげっ歯類の RANKL に結合しないため[4]、ラットの CIA 及び AIA で効果を評価できない。そのため、既承認の各種骨疾患のげっ歯類モデルと同様に、本申請の薬理試験でもデノスマブのサロゲートである OPG の C 末端に免疫グロブリン Fc 領域を融合させた OPG 免疫グロブリン結晶化フラグメント（osteoprotegerin Fc segment complex: OPG-Fc）を使用した。OPG は内因性 RANKL 阻害物質である。OPG-Fc は、非臨床モデルでの血中半減期を延長するために作製した。

ラット CIA モデルに対し、関節炎が発症してから OPG-Fc 3 mg/kg を 2 日に 1 回投与したところ、関節炎による骨組織損傷の進行が阻止され、それに伴って足関節の BMD が増加し、病理組織検査でも後肢の破骨細胞減少及び骨吸収抑制がみられた。一方、足関節の炎症及び病理組織学的関節炎スコアに対しては OPG-Fc は無効であった。また、参考資料の成績からラット AIA モデルでも、OPG-Fc は関節組織中 TRACP-5b 活性の低下及び関節炎に伴う骨組織損傷の抑制を示すが、炎症反応に対して影響を及ぼさないことが確認された。

ラット CIA 及び AIA モデルに対して TNFα 及び IL-1 の特異的阻害剤を投与すると、炎症パラメータが低下したが、関節炎局所の骨減少への作用は限定的で、全身性の骨減少には無効であった。これに対し、OPG-Fc は関節炎局所及び全身性の骨減少を回復させたことから、TNFα 及び IL-1 のような炎症性サイトカインの阻害剤と異なる作用を示すことが明らかになった。

以上の結果から、OPG-Fc と同様の作用機序を持つデノスマブは、ヒト RA に対して関節の骨組織損傷を抑制させる治療薬として期待できることが示された。

7. 図表

図表は本文中に記載した。

8. 参考文献一覧

1 Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell. 1998;93(2):165-76.

2 Lacey DL, Tan HL, Lu J, et al. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. Am J Pathol. 2000;157(2):435-48.

3 「抗リウマチ薬の臨床評価方法に関するガイドライン」について，薬食審査発第 0217001 号（平成 18 年 2 月 17 日）.

4 Kostenuik PJ, Nguyen HQ, McCabe J, 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):182-95.

5 Stolina M, Adamu S, Ominsky M, 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(10):1756-65.

6 Stolina M, Schett G, Dwyer D, et al. RANKL inhibition by osteoprotegerin prevents bone loss without affecting local or systemic inflammation parameters in two rat arthritis models: comparison with anti-TNFalpha or anti-IL-1 therapies. Arthritis Res Ther. 2009;11(6):R187.

目次

1. 薬理試験： 一覧表 2
2. 効力を裏付ける試験 3
3. 副次的薬理試験 7
4. 安全性薬理試験 8
5. 薬力学的薬物相互作用試験 9

1. 薬理試験： 一覧表

Test Article: OPG-Fc

Type of Study	Test System	Test Article	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics						
Temporal changes of collagen- and adjuvant-induced arthritis in rats	Rat	No	Not applicable	[redacted] USA	R20[redacted]0080	4.2.1.1-1
Effect of rat OPG-Fc on collagen-induced arthritis model in the rat	Rat	OPG-Fc	SC	[redacted] Canada	121718	4.2.1.1-2
Effect of human OPG-Fc on collagen- and adjuvant-induced arthritis in rats	Rat	OPG-Fc	SC	[redacted] USA	R20[redacted]0081	4.2.1.1-3
Comparison of human OPG-Fc and anti-inflammatory (anti-TNF-α and anti-IL-1) treatment effects on adjuvant-induced and collagen-induced rat arthritis models	Rat	OPG-Fc sTNFR1 IL-1RA	SC	[redacted] USA	R20[redacted]0092	4.2.1.1-4
Secondary Pharmacodynamics						
Not applicable						
Safety Pharmacology						
Not applicable						
Pharmacodynamic Drug Interactions						
Not applicable						

OPG-Fc = osteoprotegerin Fc segment complex, sTNFR1 = soluble tumor necrosis factor receptor 1, IL-1 RA = interleukin-1 receptor antagonist, SC = subcutaneous

2. 効力を裏付ける試験

Test Article: OPG-Fc

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	Noteworthy Findings	Study Number
Temporal changes of collagen- and adjuvant-induced arthritis in rats	Rat	Not applicable	Not applicable	Initial disease onset, recognized by hind paw erythema and edema, occurred 11 and 9 days after injections of collagen or adjuvant in collagen-induced arthritis (CIA) and adjuvant-induced arthritis (AIA) models, respectively. Thereafter, hind paw volume and total paw protein were increased in CIA and AIA rats through the end of study. Local bone erosions and increased osteoclasts were histologically evident in hind paws of CIA and AIA rats beginning 2-3 days after disease onset, coinciding with increased hind paw concentrations of receptor activator of nuclear factor kappa B (RANKL). The osteoclast marker tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b (TRACP-5b) in the hind paw was elevated in CIA and AIA rats within 1 and 5 days after initial disease onset, respectively. Increased *Rankl* mRNA expression was evident in affected hind paws of CIA and AIA rats by in situ hybridization at the time of initial disease onset, increasing thereafter in association with infiltrating leukocytes, pannus tissue, and regions of bone erosions. Serum RANKL was also increased in CIA and AIA rats, beginning 2 days after initial disease onset and remaining elevated for most of the follow-up period.	R20[redacted]0080

Test Article: OPG-Fc

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	Noteworthy Findings	Study Number
Effect of rat OPG-Fc on collagen-induced arthritis model in the rat	Rat	SC, every 2 days	Rat OPG-Fc 3 mg/kg	The objective of this study was to evaluate the efficacy of rat osteoprotegerin Fc segment complex (OPG-Fc) in the rat arthritis model when administered to rats subcutaneously (SC) every other day for 10 days (5 doses total). Collagen injections induced arthritis in all animals injected, confirmed by clinical score and increases in paw thickness and paw volume on Day 16. Effects were further confirmed by histopathological evaluation of hindpaws on Day 26. At termination, rats that were treated with OPG-Fc at 3 mg/kg had increased bone mineral density (BMD) and decreased TRACP-5b levels in the tibiotarsal joint, as well as decreased osteoclast cellularity and bone resorption in the hindpaw, when compared to the CIA Control animals. OPG-Fc did not affect indices of arthritis including inflammation, pannus, cartilage damage and periosteal/exostotic changes.	121718

Test Article: OPG-Fc

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	Noteworthy Findings	Study Number
Effect of human OPG-Fc on collagen- and adjuvant-induced arthritis in rats	Rat	SC, every 2 days	Human OPG-Fc 3 mg/kg	The current studies were conducted to assess the effects of the RANKL inhibitor OPG-Fc on local and systemic bone loss in two commonly used rat models of experimental inflammatory arthritis. Initial onset of arthritic disease was identified on study day 0 based on the appearance of hind paw edema and erythema. On study day 14, after a 10-day course of OPG-Fc or vehicle injections, CIA + vehicle (Veh) and AIA + Veh groups had greater serum RANKL and hind paw TRACP-5b, lower hind paw and lumbar vertebral BMD, decreased lumbar trabecular bone volume and increased lumbar trabecular osteoclasts. OPG-Fc administration to CIA and AIA rats caused reductions in serum and hind paw TRACP-5b, decreased lumbar trabecular osteoclasts, and greater hind paw BMD and lumbar trabecular bone volume. OPG-Fc also significantly increased lumbar BMD in AIA rats but not in CIA rats. Micro-CT images of hind paws indicated structural deterioration of joints in CIA + Veh and AIA + Veh rats, including substantial cortical and trabecular bone loss and reactive periosteal bone formation in the form of osteophyte-like lesions. OPG-Fc administration substantially preserved bone volume and joint architecture in CIA and AIA rats, without obvious effects on reactive periosteal bone formation.	R20[redacted]0081

Test Article: OPG-Fc

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	Noteworthy Findings	Study Number
Comparison of human OPG-Fc and anti-inflammatory (anti-TNF-α and anti-IL-1) treatment effects on adjuvant-induced and collagen-induced rat arthritis models	Rat	SC; every 2 days (OPG-Fc), daily (sTNFR1), continuous infusion (IL-1 Ra)	Human OPG-Fc 3 mg/kg sTNFR1 4 mg/kg IL-1 Ra 100 mg/kg/day	Progression of CIA and AIA was associated with significant paw swelling and loss of BMD in hind paw ankles and in lumbar vertebrae. OPG-Fc (3 mg/kg, SC every 2 days) reduced BMD loss in ankles and vertebrae in both models, but had no effect on paw swelling. TNFα inhibitor sTNFR1 (4 mg/kg, SC daily) reduced paw swelling in both models, and partially mitigated reductions in ankle BMD in AIA rats. IL-1 receptor antagonist (Ra) (100 mg/kg/day, SC continuous infusion) decreased paw swelling in CIA rats, and reduced ankle BMD loss in both models. sTNFR1 and IL-1Ra did not mitigate vertebral BMD loss in either model. Serum RANKL was elevated in AIA + Veh and CIA + Veh rats. sTNFR1 and IL-1Ra partially normalized serum RANKL without affecting serum TRACP-5b, whereas OPG-Fc reduced serum TRACP-5b by over 95% in CIA and AIA rats. Compared with their normal controls, CIA + Veh and AIA + Veh rats had significantly greater serum α1AGP, IL-1β, IL-8, and CCL2, and AIA + Veh rats also had significantly greater serum TNF-α and IL-17. sTNFR1 reduced serum α1AGP and CCL2 in AIA rats, and sTNFR1 reduced serum CCL2, IL-1ß, and α1AGP in CIA rats. IL-1Ra decreased serum IL-1ß, IL-8, and α1AGP in CIA rats, and IL-1Ra reduced serum α1AGP in AIA rats. In contrast, OPG-Fc did not reduce serum inflammatory marker levels in either model.	R20[redacted]0092

3. 副次的薬理試験

該当する試験は実施していない。

4. 安全性薬理試験

該当する試験は実施していない。

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。