

カテプシン K 阻害剤のサル骨粗鬆症及び関節リウマチ
モデルにおける薬効薬理研究

2019 年

山田 裕之

論文目録

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。なお、報文内容の転載許可は、各出版社から取得済みである。

1. Hiroyuki Yamada, Yasuo Ochi, Hiroshi Mori, Satoshi Nishikawa, Yasuaki Hashimoto, Yasutomo Nakanishi, Makoto Tanaka, Mark Bruce, Steve Deacon, Kazuhito Kawabata. Effects of 16-month treatment with the cathepsin K inhibitor ONO-5334 on bone markers, mineral density, strength and histomorphometry in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Bone*. **2016**, 86, 43-52. [第 1 章]
2. Hiroyuki Yamada, Yasuo Ochi, Hiroshi Mori, Satoshi Nishikawa, Yasuaki Hashimoto, Makoto Tanaka, Steve Deacon, Kazuhito Kawabata. Cortical bone mineral density is increased by the cathepsin K inhibitor ONO-5334, which leads to a robust increase in bone strength: results from a 16-month study in ovariectomised cynomolgus monkeys. *J Bone Miner Metab*. **2019**, 37, 636-47. [第 1 章]
3. Hiroyuki Yamada, Hiroshi Mori, Yasutomo Nakanishi, Satoshi Nishikawa, Yasuaki Hashimoto, Yasuo Ochi, Makoto Tanaka, Kazuhito Kawabata. Effects of the cathepsin K inhibitor ONO-5334 and concomitant use of ONO-5334 with methotrexate on collagen-induced arthritis in cynomolgus monkeys. *Int J Rheumatol*. **2019**, Article ID 5710340, 9 pages. [第 2 章]

目次

序論.....	1
第1章 サル卵巢摘出骨粗鬆症モデルにおけるカテプシン K 阻害剤 ONO-5334 の効果.....	5
1 緒言.....	5
2 実験材料と方法.....	6
3 結果.....	15
4 考察.....	38
5 小括.....	42
第2章 サルコラーゲン誘発関節炎モデルにおけるカテプシン K 阻害剤 ONO-5334 の予防及びメトトレキサートとの併用効果.....	43
1 緒言.....	43
2 実験材料と方法.....	43
3 結果.....	47
4 考察.....	52
5 小括.....	54
総括.....	55
謝辞.....	56
引用文献.....	57

略語表

Ac.f	Activation frequency (骨単位活性化率)
AIA	Adjuvant induced arthritis (アジュバンド関節炎)
Aj.AR	Adjusted apposition rate (補正骨石灰化速度)
AS	Arthritic score (関節腫脹スコア)
AUC	Area under the concentration-time curve (血中濃度-時間曲線下面積)
BAP	Bone specific alkaline phosphatase (骨型アルカリフォスファターゼ)
BFR/BS	Bone formation rates/bone surface (骨形成速度/骨面基準)
BFR/BV	Bone formation rates/bone volume (骨形成速度/骨量基準)
BS/BV	Bone surface/bone volume (骨面)
BV/TV	Bone volume/tissue volume (骨量)
C ₂₄	Concentration 24 hours after dosing (投与 24 時間後の血中濃度)
CD	Cluster of differentiation (分化抗原群)
CIA	Collagen induced arthritis (コラーゲン誘発関節炎)
C _{max}	Maximal blood concentration (最高血中濃度)
Conn-Dens	Connectivity density
Cr	Creatinine (クレアチニン)
Ct.Ar	Cortical area (皮質骨面)
CTLA4-Ig	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-IgG1 (細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 と IgG1 の融合蛋白)
CTX-I	C-terminal telopeptide of type I collagen (I 型コラーゲン C 末端テロペプチド)
CTX-II	C-terminal telopeptide of type II collagen (II 型コラーゲン C 末端テロペプチド)
DIP	Distal interphalangeal (遠位指節間)
DMARDs	Disease modifying anti-rheumatic drugs (疾患修飾性抗リウマチ薬)
DXA	Dual energy X-ray absorptiometry (二重 X 線吸収法)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (酵素結合免疫吸着検定法)
ES/BS	Eroded surface/bone surface (浸食面)
FDA	Food and drug administration (アメリカ食品医薬品局)
FP	Formation period (形成期間)
IL	Interleukin (インターロイキン)
Integral BMC	Integral bone mineral content (全骨塩量)
Integral BMD	Integral bone mineral density (全骨密度)
IP	Interphalangeal (指節間)
Ma.Ar	Marrow area (骨髄面)

MAR	Mineral apposition rate (骨石灰化速度)
MC	Methyl Cellulose (メチルセルロース)
ML	Maxumum load (最大荷重)
MMP	Matrix metalloproteinase (マトリックスメタロプロテアーゼ)
MP	Metacarpophalangeal (中手指節間)
MS/BS	Mineralizing surface/bone surface (骨石灰化面)
MTX	Methotrexate (メトトレキサート)
N.Oc/BS	Osteoclast number/bone surface (破骨細胞数)
NTX	N-terminal telopeptide (I型コラーゲンN末端テロペプチド)
OA	Osteoarthritis (変形性膝関節症)
Oc.S/BS	Osteoclast surface/bone surface (破骨細胞面)
OS/BS	Osteoid surface/bone surface (類骨面)
O.Th	Osteoid thickness (類骨幅)
OV/BV	Osteoid volume/bone volume (類骨量)
OVX	Ovariectomy (卵巣摘出)
PINP	Procollagen type I N-terminal Propeptide (I型プロコラーゲンN末端プロペプチド)
PIP	Proximal interphalangeal (近位指節間)
pQCT	peripheral quantitative computed tomography (末梢型定量コンピュータ断層法)
RA	Rheumatoid arthritis (関節リウマチ)
RANKL	Receptor activator of NF- κ B ligand (破骨細胞分化因子)
Rs.P	Resorption period (吸収期間)
Rv.P	Reversal period (逆転期間)
SERM	Selective estrogen receptor modulator (選択的エストロゲン受容体調節薬)
SMI	Structure model index
T.Ar	Total area (全骨面)
Tb.N	Trabecular number (骨梁数)
Tb.Sp	Trabecular separation (骨梁間隙)
Tb.Th	Trabecular thickness (骨梁幅)
TLR-9	Toll-like receptor 9 (Toll様受容体)
TNF- α	Tumor necrosis factor- α (腫瘍壊死因子)
TRAP5b	Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ 5b)
vBMD	volumetric bone mineral density (体積骨密度)

序論

骨粗鬆症は、「低骨量と骨組織の微細構造の異常を特徴とし、骨の脆弱性が増大し、骨折の危険性が増大する疾患」と世界保健機関（WHO）は定義している[1]。骨折部位としては、椎体、前腕部、大腿骨近位部などが多く、骨粗鬆症は、生活の質（QOL）が低下するだけでなく、死亡リスクを増加させることが分かっている[2-3]。国内の患者数は1300万人と推測されており、高齢化に伴い患者数は増加傾向にある。高齢者の骨折は、要支援、要介護となる主要原因であり、超高齢化社会となった現代では、社会的問題となっている。

破骨細胞によって古い骨が吸収され（骨吸収）、骨芽細胞によって新しい骨が作られる（骨形成）。骨量は骨吸収と骨形成のバランスによって決定され、例えば閉経後骨粗鬆症では、エストロゲンの枯渇に伴い、骨吸収が骨形成よりも優位となり、骨量が減少する。骨粗鬆症の治療の第一目的は骨折を予防することである[4]。骨粗鬆症の治療薬として、ビスホスホネート製剤や選択的エストロゲン受容体調節薬（SERM）、抗 RANKL 抗体である Denosumab が使用されているが、ビスホスホネート製剤が第一選択薬となっている。ビスホスホネート製剤は椎体骨折を 40-70%抑制するが、非椎体骨折への効果は弱い[5-8]。さらに、ビスホスホネート製剤では、わずかな外傷で骨折に至る大腿骨非定型骨折などの副作用が報告されている[5, 9-12]。この理由として、ビスホスホネート製剤は骨代謝回転を極度に抑制することで、リモデリングやマイクロダメージの修復すらも抑制し、結果として骨強度を低下させる可能性が示唆されている[5, 13]。副甲状腺ホルモン薬であるテリパラチドは、骨粗鬆症治療薬として承認された薬剤の中で、唯一、骨形成を促進する作用を持つ。しかしながら、ラットへの長期投与により骨肉腫が見られたことから、2年以上は使用できないよう制限されている。

テリパラチドは骨形成及び骨吸収のいずれも活性化し、ビスホスホネート製剤はいずれも抑制する。テリパラチドとビスホスホネート製剤の一つであるアレンドロネートを併用することで、テリパラチドの骨形成促進作用とアレンドロネートの骨吸収抑制作用の両方を活かす試みが臨床試験で行われたが、予想に反し、テリパラチドの骨密度増加作用がアレンドロネートによって打ち消された[14-15]。骨量を一定に保つために、骨吸収と骨形成が共益される機構をカップリングと呼ぶが[16]、骨吸収を抑制し、骨形成に影響しないような薬剤は新たな骨粗鬆症治療薬になる可能性がある[17-18]。

関節リウマチ（RA）は関節及び関節周囲の組織だけでなく、他の臓器にも慢性炎症を引き起こす自己免疫疾患である。RA の関節の炎症は、関節の腫れ、痛み、こわばり、及び発赤を引き起こす[19]。関節における慢性炎症は、軟骨、骨及び靭帯の破壊にもつながり、関節の変形をも引き起こす。関節の損傷は、病気の初期に起こり進行性である。RA 患者の 50~70%

において、X線写真の変化は、発症から2年以内に起こり、機能障害に関連すると考えられる。

関節リウマチの治療は、関節痛や腫脹の軽減から、関節破壊の抑制、QOL及び予後の改善が重視されるようになってきた。そのため、発症早期から疾患修飾性抗リウマチ薬(DMARDs)を用いて、寛解を目指し、寛解が達成出来たら維持するといった、目標達成に向けた治療(Treat-to-Target : T2T)が国際基準となっている[20-22]。メトトレキサート(MTX)は、RAの管理に使用される最も一般的なDMARDsであり[23-24]、RAの標準薬・第一選択薬となっている。MTXは、単独でも、他の薬剤と併用でも処方される[25]。しかし、MTXは有効ではないケースもあり、また、重大な有害事象(例えば、骨髄抑制、肝毒性など)を引き起こす可能性も指摘されている[26]。抗腫瘍壊死因子(TNF)抗体、抗インターロイキン-6(IL-6)受容体抗体、抗CD20抗体及びCTLA4-Igといった生物学的DMARDsは、症状及び関節破壊に対して効果があるが、薬剤費が高いこと、副作用(例えば、感染症、アレルギーなど)、静脈内または皮下注射の不便さが課題として挙がる。このような背景から、安全で、関節破壊の進行を抑制できる新たな薬剤が求められている。

カテプシンKはシステインプロテアーゼの一種で[27]、破骨細胞に高発現しており[28-30]、骨の有機成分であるI型コラーゲンを分解する[31]。カテプシンKが骨吸収において重要な役割を担うことが、遺伝子欠損マウスなどの研究で明らかにされている[32-33]。通常、骨吸収と骨形成はカップリングしていることから、骨吸収が亢進すれば骨形成も亢進し、骨吸収が抑制されれば骨形成も抑制される。カテプシンK欠損マウスでは、骨吸収は抑制されているにも関わらず、骨形成はむしろ増加していた。骨吸収がより選択的に抑制されるような状態(アンカップリング)を作り出せる薬剤として、カテプシンK阻害剤が考えられる[18, 34]。骨吸収及び骨形成のいずれも抑制するビスホスホネートとカテプシンK阻害剤は、骨への影響が異なる可能性が考えられる。

また、カテプシンKは、I型コラーゲンだけでなく、II型コラーゲン並びに骨や軟骨の細胞外マトリックスであるオステオネクチンやアグリカンなど、他の成分も分解する[27, 35]。カテプシンKは、前述のように、骨吸収において中心的な役割を果たしている[30, 36-37]が、RAや変形性関節症(OA)の滑膜線維芽細胞及びマクロファージにもカテプシンKの発現が確認されている[28, 38-40]。カテプシンKを過剰発現させたトランスジェニックマウスでは滑膜炎や軟骨破壊が見られること[41]、コラーゲン誘発関節炎(CIA)マウスにおいてカテプシンK阻害剤が、炎症、軟骨破壊及び骨びらんを減少させたことが報告されている[42]。これらのことから、カテプシンK阻害剤は、RAによる関節炎や関節破壊を抑制する薬剤となる可能性が考えられる。

ONO-5334 は低分子のカテプシン K 阻害剤であり、ヒトカテプシン K に対する阻害活性は K_i 値で 0.1 nM である。カテプシン K と同じシステインプロテアーゼに属するカテプシン S、カテプシン L、カテプシン B、カルパイン II、カルパイン I 及びカテプシン C に対する ONO-5334 の阻害活性は、 K_i 値でそれぞれ、0.83、1.7、32、69、82 及び 2500 nM であった。カテプシン D 及び E、MMP1 及び 9、キモトリプシン、トリプシン、エラスターゼ及びプロテアソームは 10 μ M でもほとんど阻害しなかった[43]。我々はこれまでに、ヒト末梢血単核球から分化させた破骨細胞培養系において、ONO-5334 が破骨細胞の生存には影響せず、骨基質の分解のみを抑制することを報告している[43]。また、卵巣摘出 (OVX) ラットに ONO-5334 を 8 週間投与した試験において、ONO-5334 が OVX による脛骨の骨密度及び骨強度の減少を抑制することを確認している[44]。

骨は、骨吸収と骨形成が絶えず行われ、常にその一部が新しい骨に入れ替わっている。骨吸収が行われた後に、その部位に骨形成が起こることをリモデリングという。成長を終えたヒトの骨格では、形状は大きく変化することなく、リモデリングにより骨の新陳代謝が行われる。一方、骨の発育過程では、骨のサイズを増大させつつ、骨量も増やすような骨代謝が行われ、これをモデリングと呼ぶ。マウス、ラットなどのげっ歯類は、骨代謝におけるモデリングの割合が高く、皮質骨の構造もヒトと大きく異なり、オステオンやハバース管の形成が認められない。げっ歯類の骨代謝はヒトと異なる部分が多いことから、骨粗鬆症用薬の臨床評価方法に関するガイドライン[45]では、治験薬の効果を動物で評価する際、少なくとも 2 種類の動物で検討することが妥当とされている。1 つはモデリング動物であるラットを選択する。もう 1 つはリモデリング動物であるミニブタ、ヒツジ、イヌ及びサルなどから選択できるが、リモデリング動物については動物の選択基準を明確にする必要がある。ラットはカテプシン K のアミノ酸配列の相同性がヒトと比べて 88%[46]であり、ONO-5334 のラットカテプシン K 阻害活性もヒトに比べて 8.5 倍弱い[43]。我々はリモデリング動物の中でも、カテプシン K のアミノ酸配列がヒトと同一 (100%) であり ONO-5334 の阻害活性に種差がないサルを、評価動物として選択した。

また、RA 患者での臨床効果を予測する上でも、サルはラットより、適している可能性がある[47-48]。げっ歯類の CIA モデルも、抗リウマチ薬の評価や RA の病因を解析する上で広く使用されているが、ヒトとげっ歯類の間には免疫システムに大きな種差が存在する[49]。げっ歯類の CIA モデルでは、関節炎が足首に起こることが多いが、サル CIA モデルでは RA 患者と同様に指関節が腫れる。さらに、カテプシン K の骨及び軟骨代謝における役割も、げっ歯類とヒトでは少し異なっている。CTX-I 及び CTX-II は、それぞれ I 型及び II 型コラーゲンがカテプシン K によって分解された際に生じるペプチドであり、カテプシン K の酵素活性の指標となる。ヒトでは、カテプシン K の遺伝的欠損やカテプシン K 阻害剤の投与によって CTX-I が減少することが示されている[50-52]。対照的に、カテプシン K 欠損マウスでは、CTX-I 及

び CTX-II が増加することが報告されている[53-54]。これまでの検討結果から、ONO-5334 は卵巣摘出カニクイザル[55]及び閉経後骨粗鬆症患者[50-51]において、CTX-I を減少させることを確認しており、げっ歯類の病態モデルと患者とのギャップを埋める上で、サル CIA モデルは有用と考えられる。

本研究では、小野薬品工業株式会社にて創製したカテプシン K 阻害剤である ONO-5334 を用いて、第一章では、サル閉経後骨粗鬆症モデルにおける薬効薬理研究を、第二章ではサルコラーゲン誘発関節炎モデルにおける薬効薬理研究を行った。

第 1 章 サル卵巢摘出骨粗鬆症モデルにおけるカテプシン K 阻害剤

ONO-5334 の効果

1 緒言

我々は、卵巢摘出 (OVX) カニクイザルを用いた予備試験[55]で、ONO-5334 が骨形成よりも骨吸収をより強く抑制すること、骨密度を増加させることを確認している。一方、予備試験は 1 群の例数が 6-8 例と少なく、投与期間も 8 カ月と短い。サルの骨リモデリング期間 (骨吸収が開始してから骨形成が完了するまでの期間) はヒトに比べて約 1/3 であることから、サルの 8 カ月はヒトの 2 年に相当する[56]。骨粗鬆症の臨床第 III 相試験では、3-4 年の評価期間が必要であり、非臨床試験でその投与期間を担保する必要がある。骨粗鬆症用薬の臨床評価方法に関するガイドライン[45]では、霊長類を用いた試験の場合、16 カ月以上の投与期間を設けることが推奨されており、長期投与による骨質への影響を評価するためには、ヒトの 3 年に相当する投与期間 (サルの 12 カ月に相当) が必要と記載されている。従って、先に実施した予備試験[55]は、骨質を評価するには投与期間が不足している。

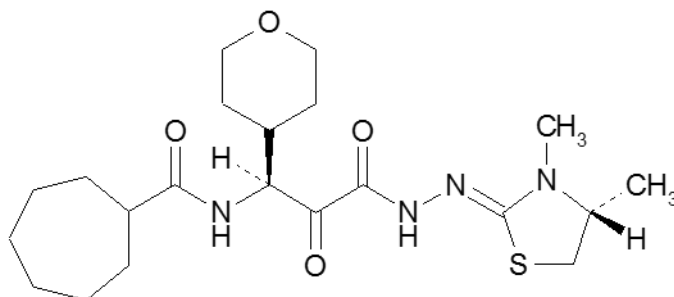
骨質と骨量は骨強度を決定づける重要な要素である[4, 57]。例えば、フッ化ナトリウムは骨量を増加させたにも関わらず、骨強度は減少することが報告されている[58-59]。本作用は、フッ化ナトリウムにより骨質が劣化し、骨の脆弱性が増したことが原因とされている。ONO-5334 は、閉経後骨粗鬆症患者で骨密度を増加させた[51]。一方、ヒトでは非侵襲的に骨強度を調べる方法がないため、ONO-5334 がヒトで骨強度を増加させたか否かは不明である。また、骨粗鬆症用薬の臨床評価方法に関するガイドライン[45]では、薬剤の骨強度に及ぼす影響などは、ヒトにおいて非侵襲的な方法による確認が困難であること、骨粗鬆症治療薬の効果をヒトで確認するためには、多数の患者と長期間の評価が必要になることから、治験に先立つ非臨床試験において、骨強度や骨組織像などへの影響について、十分な検討を行うことが重要と記載されている。なお、複数のサル卵巢摘出骨粗鬆症モデルを解析した報告[60]によると、腰椎の骨密度、大腿骨頸部の骨強度及び腰椎の骨強度において、80%の検出力で統計学的有意差を得るためにはそれぞれ、1 群 18 例、20 例及び 21 例必要との情報があつたことから 1 群 20 例を設定した。

これらの情報を踏まえ、本章では、1群20例のカニクイザルを用いて、ONO-5334を16カ月間投与した際の、骨代謝マーカー、骨量、骨形態計測及び骨強度に及ぼす影響を調べた。

2 実験材料と方法

2-1 被験物質

ONO-5334 (N-((1S)-3-((2Z)-2-[(4R)-3,4-Dimethyl-1,3-thiazolidin-2-ylidene]hydrazino)-2,3-dioxo-1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)propyl)cycloheptanecarboxamide)は、小野薬品工業株式会社にて合成した。アレンドロネートはDr. Reddy's Laboratories (Andhra Pradesh, India)より購入した。



ONO-5334

2-2 動物及び群分け

骨格的に成熟した9~12歳の雌性カニクイザル (*Macaca fascicularis*) を150頭、Universal Fauna (Jakarta, Indonesia)より入手し、62日間馴化した。動物実験は株式会社新日本科学で実施した。本試験は、株式会社新日本科学安全性研究所 (SNBL, Kagoshima, Japan) の動物実験倫理委員会により承認され (承認番号 C015-091)、動物実験倫理指針に従って実施された。動物は12時間毎の明暗サイクル (7:00-19:00点灯)、温度24.4-28.0℃、湿度40-71%及び換気 (約15回/時) の条件下で飼育した。約108gの固型飼料 (HF Primate 5K91 12G 5K9J、Purina Mills, LLC, MO, USA) を1日1回与えた。水道水を自動給水装置を用いて自由に摂取させた。

Dual energy X-ray absorptiometry (DXA)法で測定した第3-5腰椎 (L3-L5) の骨密度を用いて、中央値との乖離が大きい個体は除外し、120頭を選抜した。L3-L5腰椎の骨密度及び体重が各群で均等になるように、各群20例ずつ、偽手術群、対照群、ONO-5334群3用量、アレンドロネート群の計6群に分けた。群分け除外とした30頭は、株式会社新日本科学のストック動物とした。

2-3 卵巣摘出

動物を塩酸ケタミン（50 mg/mL、0.2 mL/kg、Kamud Drugs Pvt. Ltd., Maharashtra, India）の筋肉内投与により麻酔した。腹側の正中線にそって 10 cm ほど開腹し、両側の卵巣を摘出した。偽手術群は同様に開腹し、両側の卵巣を肉眼で確認した後、元の位置に戻して閉腹した。卵巣摘出手術の成否を確認するため、卵巣摘出前、卵巣摘出後 0.5、2、4、8、12 及び 16 カ月後に血清エストラジオール濃度を測定した。また、投与期間中は膣からの出血の有無を 1 日 2 回、全ての動物に対して確認した。剖検時、動物をペントバルビタールナトリウム（Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan）による麻酔下、放血により安楽死させ、卵巣組織の残存を解剖学的に確認した。

2-4 実験群の構成

実験群の構成を以下に示す。

Group	OVX Status	Test Article and Negative Control Article-1		Positive Control Article and Negative Control Article-2		Number of Animals (Animal Nos.)
		Dose Level (mg/kg/day, p.o.)	Dose Volume (mL/kg)	Dose Level (mg/kg/2 weeks, i.v.)	Dose Volume (mL/kg)	
1	Sham	0.5 w/v %MC	10	Physiological saline	1	19 (1 to 7, 9 to 20)
2	OVX	0.5 w/v %MC	10	Physiological saline	1	20 (21 to 40)
3	OVX	ONO-5334 1.2 (mg/kg/day)	10	Physiological saline	1	20 (41 to 60)
4	OVX	ONO-5334 6 (mg/kg/day)	10	Physiological saline	1	19 (61 to 78, 80)
5	OVX	ONO-5334 30 (mg/kg/day)	10	Physiological saline	1	20 (81 to 100)
6	OVX	0.5 w/v %MC	10	Alendronate 0.05 (mg/kg/2 weeks)	1	20 (101 to 120)

Sham：偽手術、OVX：卵巣摘出、MC：メチルセルロース。

* 動物番号 8 及び 79 は試験期間中に死亡した。

ONO-5334 及びアレンドロネートは卵巣摘出手術の翌日から投与した。ONO-5334 は 1 日 1 回経口投与（計 483 回）、アレンドロネートは 2 週間に 1 回静脈内投与（計 35 回）した。偽手術群、対照群及びアレンドロネート群には 0.5%MC を 10 mL/kg の容量で 1 日 1 回経口投与した。偽手術群、対照群及び ONO-5334 群には、生理食塩水を 1 mL/kg の容量で、2 週間に 1 回前腕部橈側皮静脈より静脈内投与した。ONO-5334 の用量は臨床での血中暴露を基に設定した。ONO-5334 をサルに 1.2 mg/kg 及び 6 mg/kg の用量で経口投与した 24 時間後の血中濃度は、ヒトに ONO-5334 を 100 mg 及び 300 mg 経口投与した 24 時間後の血中濃度に相当することから[61]、1.2 mg/kg 及び 6 mg/kg の用量を設定した。FDA のガイドラインに従い[62]、骨への安全性を確認する目的で、至適有効用量の 5 倍に相当する 30 mg/kg を設定した。サル OVX モデルで使用実績のあるアレンドロネートを陽性対照に設定した。アレンドロネートの用量

は卵巣摘出ヒヒでの有効性試験[63]、及び卵巣摘出カニクイザルでの Relacatib[64]及び Denosumab [65]の有効性試験で陽性対照として用いられた用量に基づき設定した。

2-5 薬物動態

ONO-5334 の薬物動態パラメーターを算出するため、初回及び最終投与日の投与 0.5、1、2、6 及び 24 時間後に大腿静脈より採血を行った。なお、最終投与日は投与前にも採血した。ONO-5334 投与群の個々の動物に関して、投与 24 時間後の血中濃度 (C_{24})、最高血中濃度 (C_{max})、投与後 24 時間の血中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{0-24h}) 及び半減期を求め、群ごとに平均値を算出した。

2-6 骨代謝マーカーの測定

NTX 及び CTX-I は I 型コラーゲンがカテプシン K によって切断された際に、それぞれ N 末端側及び C 末端側で生じるペプチド断片であり、骨吸収を反映するマーカーとして臨床で用いられている。アルカリフォスファターゼには 4 つの型があり、骨組織に多く存在するアルカリフォスファターゼは BAP と呼ばれる。BAP は骨芽細胞の細胞膜表面に存在する酵素であり、骨芽細胞の機能亢進に伴って血中に放出され、未分化な骨芽細胞活性を反映すると言われている。PINP は骨芽細胞で合成された I 型プロコラーゲンから I 型コラーゲンが生成される際に生じる N 末端のペプチド断片であり、早期の骨形成を反映すると言われている。TRAP5b は破骨細胞に存在する酵素で、破骨細胞数や破骨細胞の活性を鋭敏に反映する。以上のことから、骨吸収マーカーとして尿中 NTX 及び血清中 CTX-I を、骨形成マーカーとして血清中 BAP 及び PINP を、破骨細胞数の指標として血清中 TRAP5b 活性を測定した。

2-6-1 検体の採取

卵巣摘出前、卵巣摘出の 0.5、2、4、8、12 及び 16 カ月後に尿及び血清を採取した。尿は 24 時間蓄尿を採取した。血清用の採血は給餌前に実施した。なお、検査日を除き、給餌、除餌及び ONO-5334 の投与は、それぞれ 8 : 30~10 : 30、10 : 30~12 : 30 及び 14 : 30~17 : 30 に実施した。血清及び尿は、遠心分離後の上清を検体とし、 -70°C の冷凍庫に保存した。

ONO-5334 の血中濃度測定用に、初回及び最終投与日の、投与 0.5、1、2、6 及び 24 時間後に血漿用の採血を全群で実施した。また、最終投与日は投与前に血漿用の採血も実施した。検体は -70°C の冷凍庫に保存した。

2-6-2 尿中 I 型コラーゲン N 末端テロペプチド (NTX) 濃度の測定

尿中 NTX 値はオステオマーク (ZEUS Scientific, Inc, NJ, USA) を用い ELISA 法にて測定した。測定手順は添付文書に従った (duplicate 測定、定量範囲 20~3000 nmol BCE/L)。なお、duplicate の平均値を測定値と規定した。吸光度の測定にはマイクロプレートリーダー

(SPECTRA MAX250、Molecular Devices) を使用した。検体原液における測定値が定量範囲下限値未満の場合は、その検体については測定値を 20 nmol BCE/L とした。測定値が定量範囲上限値を超えた場合は、検体を濃度既知の尿で希釈した後、再測定を行った。

オステオマークの添付文書に従い、次式により尿中 NTX 濃度を算出した。

尿中 NTX 濃度 (nmol BCE/mmol Cr) = NTX 値 (nmol BCE/L) / {Cr 濃度 (mg/dL) / 11.3}

BCE : Bone Collagen Equivalents

2-6-3 血清中 CTX-I 濃度の測定

血清中 CTX-I 濃度は Serum CrossLaps ELISA (Immunodiagnostic Systems Ltd., Boldon, UK) を用い ELISA 法にて測定した。測定手順は添付文書に従った (duplicate 測定、定量範囲 最低濃度標準液～最高濃度標準液)。なお、duplicate の平均値を測定値と規定した。吸光度の測定にはマイクロプレートリーダー (SPECTRA MAX250、Molecular Devices) を使用した。検体原液における測定値が定量範囲下限値未満の場合は、その検体については測定値を最低濃度標準液の濃度とした。測定値が定量範囲上限値を超えた場合は、検体を付属の Standard A で希釈した後、再測定を行った。

2-6-4 血清中骨型アルカリフォスファターゼ (BAP) 濃度の測定

血清中 BAP 濃度はオステオリックス BAP (Quidel Corporation, CA, USA) を用い EIA 法にて測定した。測定手順は添付文書に従った (duplicate 測定、定量範囲 2～140 U/L)。なお、duplicate の平均値を測定値と規定した。吸光度の測定にはマイクロプレートリーダー (SPECTRA MAX250、Molecular Devices) を使用した。検体は付属の測定用緩衝液で 2 倍希釈し、測定に供した。

2-6-5 血清中 I 型プロコラーゲン N 末端プロペプチド (PINP) 濃度の測定

血清中 PINP 濃度は Intact N-terminal propeptide of type I procollagen Radioimmunoassay kit (Orion Diagnostica UniQ PINP RIA, Espoo, Finland) を用いて測定した。測定手順は添付文書に従った (duplicate 測定、定量範囲 : 5～250 µg/L)。なお、duplicate の平均値を測定値と規定した。放射活性の測定にはガンマカウンター (コブラ 5010 型、パーキンエルマーライフサイエンスジャパン株式会社) を使用した。測定値が定量範囲上限値を超えた場合は、検体を生理食塩液で希釈し、再測定した。

2-6-6 血清中 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP5b) 活性の測定

血清中 TRAP5b 活性は Bone TRAP5b Assay (Immunodiagnostic Systems Ltd., Boldon, UK) を用いて測定した。測定手順は添付文書に従った (duplicate 測定、定量範囲 : 0.5～10.0 U/L)。なお、duplicate の平均値を測定値と規定した。濃度の測定には、マイクロプレートリーダー

(SPECTRA MAX250、Molecular Devices) 及び付属する解析ソフト (Softmax Pro、Molecular Devices) を使用した。測定値が定量範囲上限値を超えた場合は、検体を付属の Sample Diluent で希釈し、再測定した。

2-7 生体骨密度の測定

2-7-1 DXA 法

動物を塩酸ケタミン (50 mg/mL、0.2 mL/kg、Kamud Drugs Pvt. Ltd., Maharashtra, India) の筋肉内投与により麻酔した。卵巣摘出前、卵巣摘出の 2、4、8、12 及び 16 カ月後に、腰椎 (L3-L5)、左大腿骨頸部、左橈骨遠位部及び左脛骨近位部の骨密度を DXA (Discovery-A, HOLOGIC Inc., MA, USA) で測定した。

2-7-2 Peripheral quantitative computed tomography (pQCT) 法

動物を塩酸ケタミン (50 mg/mL、0.2 mL/kg、Kamud Drugs Pvt. Ltd., Maharashtra, India) の筋肉内投与により麻酔した。卵巣摘出前、卵巣摘出の 8 及び 16 カ月後に、左脛骨近位部の骨密度を pQCT (XCT3000, Norland Medical Systems Inc., WI, USA) で測定した。脛骨近位端より脛骨全長の 7% 部位について、全骨、海綿骨及び皮質骨骨密度を、脛骨近位端より 25% の部位について、皮質骨の形状を解析した。

2-8 摘出骨密度の測定

2-8-1 pQCT 法

卵巣摘出 16 カ月後に、L4 及び左橈骨を摘出した。L4 は軟組織を取り除き、骨密度及び骨塩量を pQCT 骨密度測定装置 (XCT-RM, Norland Corp., WI, USA) により測定した。椎体の中央部を 0.5 mm の厚さでスキャンし、付属のソフト (pQCT RM/Norland software version 5.40) で解析した。

左橈骨の遠位部及び骨幹部の骨密度及び骨塩量を、pQCT 骨密度測定装置 (XCT Research SA+, Strattec Medizintechnik GmbH, Pforzheim, Germany) により測定した。橈骨遠位端より全長の 5% (遠位部) 及び 50% (骨幹部) の部位を 0.8 mm の厚さでスキャンし、付属のソフト (RM/Norland software version 5.50E) で解析した。

2-9 μ CT による骨微細構造の解析

2-9-1 左橈骨遠位部骨切片の調製

左橈骨を遠位骨端から全長の10%の位置の前後5 mmを、低速切断機ミニトム (Struers Inc., Westlake, OH, USA) を用いて切断し、厚さ10 mmの左橈骨遠位部骨切片を作製した。

2-9-2 左橈骨遠位部の皮質骨及び海綿骨の解析

調製した骨切片について、 μ CT (コーンビームマイクロ CT スキャナー μ CT40、SCANCO Medical, Brüttisellen, Switzerland) を用いてCTデータを収集した。橈骨遠位骨幹部の骨片を測定容器 (直径: 20.5 mm) に入れ、X線源にて近位側から遠位方向へ20 μ mのスライス厚にて骨片全体が含まれる領域 (454 スライス) を撮影し、2次元スライス画像を得た。収集したデータはワークステーション (AlfaStation DS10, COMPAQ, TX, USA)にて、付属の解析ソフトを用いて三次元構築し解析した。皮質骨解析では平均皮質骨厚 (Ct.Th) を、海綿骨解析では骨微細構造の各パラメーターとして、骨量 (BV/TV)、骨梁幅 (Tb.Th)、骨梁間距離 (Tb.Sp)、骨梁数 (Tb.N)、structure model index (SMI) ※1 及び Connectivity density (Conn-Dens) ※2 を算出した。

※1: 骨梁構造の状態を示す指標。骨梁の構造が理想的な板状のときをSMI=0、棒状のときをSMI=3、球状のときをSMI=4として、その間の混合状態を0~4の間の値で指標化したもの
※2: トポロジーの概念の一つであるEuler指数より算出し、図形の形や太さ、大きさを考慮せずに図形のつながり方のみを評価した指数

2-10 骨強度の測定

剖検時、摘出骨の肉片をトリミングした後、生理食塩液を浸したガーゼで骨検体を包み、凍結保存した。

2-10-1 第四腰椎 (L4) の圧迫強度の測定

L4の棘突起及び横突起を除去した。低速切断機ミニトム (Struers Inc., Westlake, OH, USA) を用いて、頭部及び尾部の切断面が平行で、高さ7 mmになるようにL4を切断した。切断したL4を、インストロン万能材料試験機 (Instron 4465 retrofitted to 5500, Bucks, UK) の上下2プレートの間に挟み、6 mm/minの速度で、骨が破断するまで、圧迫負荷をかけた。得られた荷重-変位曲線から、インストロン解析ソフト (Bluehill v2.5, Instron, Bucks, UK) を用いて、最大荷重 (N)、剛性 (N/mm) 及び吸収エネルギー (mJ) を算出した。なお、最大荷重は荷重-変位曲線上の荷重の最大値とし、剛性は荷重-変位曲線上における最大荷重の20%と80%の点より算出した。

2-10-2 左大腿骨骨幹部の3点折り曲げ骨強度の測定

左大腿骨骨幹部は前部が下側になるように試料台に設置した。骨を支える下部二点の間隔は60 mmとし、負荷をかける上部デバイスは大腿骨中央に揃えた。インストロン万能材料試

験機 (Instron 4465 retrofitted to 5500, Bucks, UK) を用いて、12 mm/min の速度で、骨が破断するまで、折り曲げ負荷をかけた。得られた荷重-変位曲線から、インストロン解析ソフト (Bluehill v2.5, Instron, Bucks, UK) を用いて、最大荷重 (N)、剛性 (N/mm) 及び吸収エネルギー (mJ) を算出した。なお、最大荷重は荷重-変位曲線上の荷重の最大値とし、剛性は荷重-変位曲線上における最大荷重の 20% と 80% の点より算出した。

2-10-3 左橈骨骨幹部の 3 点折り曲げ骨強度の測定

左橈骨を試料台に後部が上になるように設置し、中央点を中心として、下方の 2 点 (60 mm 間隔) で保持した。インストロン万能材料試験機 (Instron 5544, Bucks, UK) で、中央の 1 点に上方から 12 mm/min の速度で、破断するまで荷重を加えた。得られた荷重-変位曲線から、インストロン解析ソフト (Merlin v5.11, Instron, Bucks, UK) を用いて、最大荷重 (N)、剛性 (N/mm) 及び吸収エネルギー (mJ) を算出した。なお、最大荷重は荷重-変位曲線上の荷重の最大値とし、剛性は荷重-変位曲線上における最大荷重の 20% と 80% の点より算出した。

2-10-4 左橈骨遠位部の圧迫強度の測定

左橈骨遠位部については、2-9-2 項で調製した骨切片を、遠位側が上になるように試料台に設置した。インストロン万能材料試験機 (Instron 5544, Bucks, UK) で、遠位から近位方向に 1.2 mm/min の速度で、骨が破断するまで、圧迫負荷をかけた。得られた荷重-変位曲線から、インストロン解析ソフト (Merlin v5.11, Instron, Bucks, UK) を用いて、最大荷重 (N)、剛性 (N/mm) 及び吸収エネルギー (mJ) を算出した。なお、最大荷重は荷重-変位曲線上の荷重の最大値とし、剛性は荷重-変位曲線上における最大荷重の 20% と 80% の点より算出した。

2-11 骨形態計測

骨に蛍光標識を入れるため、剖検の 23 日及び 8 日前 (標識の間隔は 15 日) に、カルセイン (4 mg/mL/kg) を全動物に静脈内投与した。カルセインを生理食塩水に溶解させ、2 mol/L の NaOH で pH を 7.4 に調整した後、4 mg/mL の濃度になるように生理食塩水でメスアップした。海綿骨の解析には第二腰椎 (L2) を、皮質骨の解析には右大腿骨骨幹部を用い、骨形態計測を実施した。L2 と右大腿骨骨幹部は、軟組織を除いた後、エタノールで固定した。L2 は椎弓及び横突起を低速切断機ミニトム (Struers Inc., Westlake, OH, USA) を用いて、除去した。椎体の高さの 1/5 に相当する骨を頭部側及び尾部側からそれぞれ切除した。椎体は脱灰せず、methylmethacrylate 樹脂で包埋した。椎体中央部を、回転式マイクロトム (Reichert-Jung 2050, Magee Scientific Inc., Dexter, MI) を用いて、矢状面に薄切した。4-6 μm の標本はトルイジンブルーで染色し光学顕微鏡で、8-10 μm の標本は染色せず、蛍光顕微鏡で観察した。未染色標本で構造的及び動的指標の観察を、トルイジンブルー染色標本で組織学的指標の観察を行った。右大腿骨は脱灰せず、methylmethacrylate 樹脂で包埋した。低速切断機 (Exakt,

Appatatebau, Otto Herman, Nordersted, Germany) を用いて約 50 μm の厚みの横断面切片を作成し、蛍光顕微鏡で観察した。未染色標本で構造的及び動的指標の観察を行った。骨形態計測の名称や単位は American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) Histomorphometry Nomenclature Committee の報告に従った[66]。骨形態計測は光学/蛍光顕微鏡 (Nikon Eclipse E400) 及び骨形態計測装置 (OsteoMetrics, Inc., Atlanta, GS) を用いて実施した。骨石灰化面/骨面基準 (MS/BS) は二重標識面と一重標識面の 1/2 の和で算出した。皮質骨の多孔化については最小のポアの直径を 20 μm と規定した。

2-12 骨量と骨強度の相関解析

L4 の骨量及び骨強度について相関解析を行った。骨塩量及び骨密度は pQCT 法を用いて測定した値 (全骨塩量 : Integral BMC、全骨密度 : Integral BMD) を、骨強度は最大荷重の値 (Maximum load) を用いた。全骨塩量と骨強度、全骨密度と骨強度について、群毎に Pearson 及び Spearman の相関係数を算出した。これらの散布図を作成するとともに、全骨塩量あるいは全骨密度を独立変数、骨強度を従属変数とした場合の回帰直線を群毎に表示した。

2-13 骨量及び骨強度のサブグループ解析

全骨塩量が同等でも、ONO-5334 群とアレンドロネート群では骨強度に違いがある可能性が示唆されたことから、本事象を考察する目的で、サブグループ解析を実施した。ONO-5334 30 mg/kg 群の方がアレンドロネート群に比べて全骨塩量が高い方に分布していたため、全骨塩量の分布が両群で重なる範囲で、全骨塩量が比較的高いあるいは低い 2 つのサブグループを設定した。いずれのサブグループも ONO-5334 30 mg/kg 群及びアレンドロネート群の中から、全骨塩量の平均値が同程度となるよう各群 10 例、計 20 例を選択した。なお、サンプリングバイアスを避けるため、以下の範囲に入った個体は両群共に、全例採用とし、いずれの群も全骨塩量の値で連続した 10 例を選択した。これら 2 つのサブグループ、それぞれについて、全骨 (海綿骨と皮質骨の和) 塩量、海綿骨骨塩量、皮質骨骨塩量及び最大荷重を ONO-5334 30 mg/kg 群とアレンドロネート群の間で比較した。なお、骨塩量の代わりに骨密度を用いた解析も同様に行った。

【全骨塩量が低いサブグループ】

ONO-5334 30 mg/kg 群 : 全骨塩量の平均値 (範囲) : 49.50 mg/mm (46.24-55.13 mg/mm)

アレンドロネート群 : 全骨塩量の平均値 (範囲) : 49.68 mg/mm (46.15-52.12 mg/mm)

【全骨塩量が高いサブグループ】

ONO-5334 30 mg/kg 群 : 全骨塩量の平均値 (範囲) : 53.71 mg/mm (47.54-59.34 mg/mm)

アレンドロネート群 : 全骨塩量の平均値 (範囲) : 53.78 mg/mm (50.18-60.09 mg/mm)

【全骨密度が低いサブグループ】

ONO-5334 30 mg/kg 群：全骨密度の平均値（範囲）：481.43 mg/cm³ (424.60-524.80 mg/cm³)

アレンドロネート群：全骨密度の平均値（範囲）：483.33 mg/cm³ (452.90-503.10 mg/cm³)

【全骨密度が高いサブグループ】

ONO-5334 30 mg/kg 群：全骨密度の平均値（範囲）：516.31 mg/cm³ (482.60-548.50 mg/cm³)

アレンドロネート群：全骨密度の平均値（範囲）：522.88 mg/cm³ (487.10-586.80 mg/cm³)

2-14 統計学的検討

有意差検定は SAS 9.1 (SAS Institute Inc., NC, USA) を用いて行った。経時データについては、偽手術群と対照群、対照群と ONO-5334 投与群、対照群とアレンドロネート群の間で経時型分散分析を実施し、時間と群の交互作用に有意差が認められた場合、時点別解析を実施した。時点ごとに偽手術群と対照群及び対照群とアレンドロネート群の間で t 検定を、対照群と ONO-5334 投与群の間で Dunnett 検定を行った。摘出骨の pQCT、 μ CT 及び骨強度のパラメーターについては、偽手術群と対照群及び対照群とアレンドロネート群の間で t 検定を、対照群と ONO-5334 投与群の間で Dunnett 検定を行った。全骨塩量と骨強度、全骨密度と骨強度の相関解析において、群毎に Pearson 及び Spearman の相関係数を算出した。サブグループ解析では、全骨塩量、海綿骨骨塩量、皮質骨骨塩量、全骨密度、海綿骨骨密度、皮質骨骨密度及び最大荷重における ONO-5334 30mg/kg 群とアレンドロネート群の比較を t 検定により行った。検定は両側検定とし、有意水準は 5%とした。

3 結果

3-1 体重及び血中エストラジオール濃度

群分け時及び剖検時の体重に、各群で有意な差は認められなかった (Table 1)。偽手術群の1例及びONO-5334 6 mg/kg 群の1例が状態悪化により死亡したため、データ解析から除外した。その他の動物については、状態悪化などは見られなかった。偽手術群では、試験期間中、定期的な血中エストラジオールの高値及び膣からの出血が認められた。一方、対照群、ONO-5334 群、アレンドロネート群の全ての動物で、血中エストラジオール濃度は検出下限 (30 pg/mL) 未満であり、膣からの出血も見られなかった。剖検時、偽手術群以外の群では、卵巣組織が残存していなかったことから、卵巣摘出術が成功していたと考えられる。

Table 1. Animals mean body weight (BW) at baseline and at necropsy.

Group	Number of Animals	Mean of BW at baseline (kg)^a	Mean of BW at necropsy (kg)^a
Sham	19	3.01 ± 0.09	3.26 ± 0.13
OVX control	20	2.95 ± 0.08	2.91 ± 0.11
ONO-5334 1.2 mg/kg	20	2.94 ± 0.08	2.91 ± 0.09
ONO-5334 6 mg/kg	19	2.94 ± 0.10	3.02 ± 0.10
ONO-5334 30 mg/kg	20	2.93 ± 0.09	2.97 ± 0.07
Alendronate 0.05 mg/kg	20	3.03 ± 0.07	3.07 ± 0.10

a: Values are mean ± SE.

Yamada et al., *Bone*. 2016, 86, 43-52, Table 1 より改変.

3-2 ONO-5334 の薬物動態

ONO-5334 の薬物動態パラメーターの結果を Figure 1 及び Table 2 に示す。投与 24 時間後の血中濃度 (C_{24})、最高血中濃度 (C_{max}) 及び投与後 24 時間の血中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{0-24h}) は用量依存的に増加した。初回投与日 (Day 1) と最終投与日 (Day 483) で薬物動態パラメーターに顕著な変化はなかった。

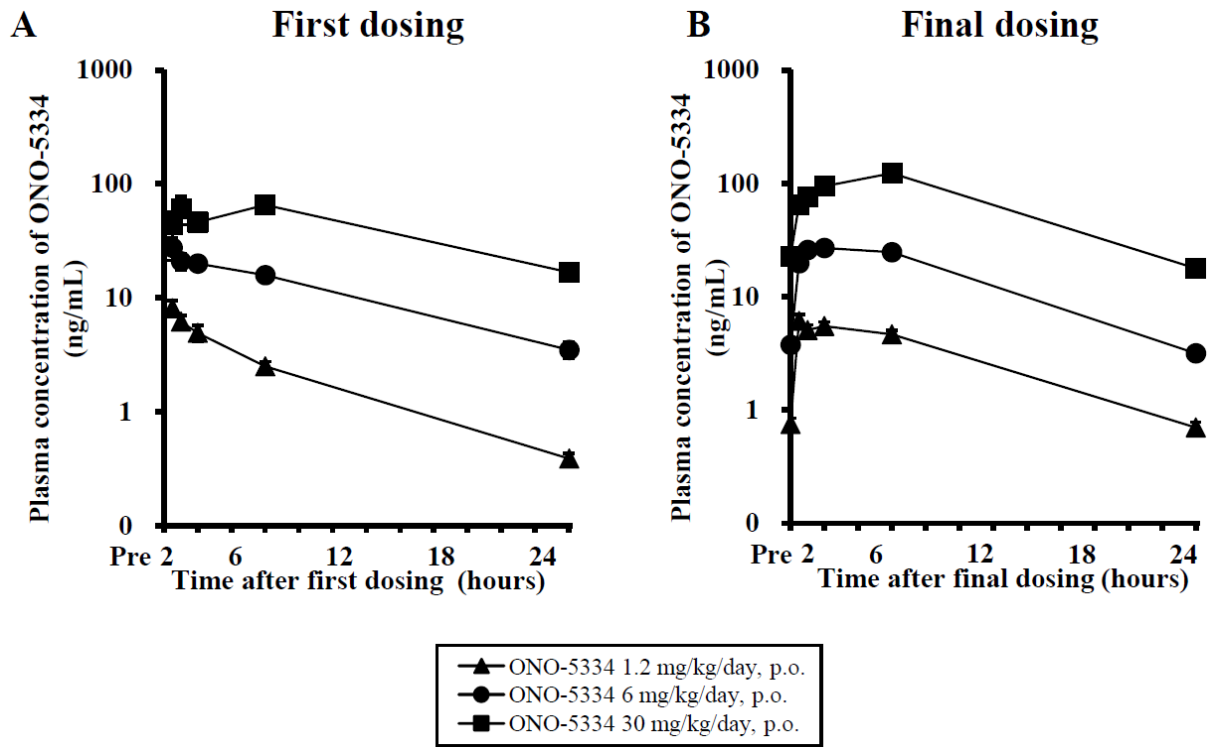


Figure 1. ONO-5334 mean plasma concentration profile on the first and final dosing days. Data are presented as mean \pm SE (n = 19-20 animals).

Yamada et al., *Bone*. 2016, 86, 43-52, Figure 4.

Table 2. Pharmacokinetic parameters of ONO 5334 on the first and the final dosing days.

ONO-5334 Dose	C ₂₄ (ng/mL)		C _{max} (ng/mL)		AUC (h·ng/mL)		Half life (h)	
	First dosing	Final dosing	First dosing	Final dosing	First dosing	Final dosing	First dosing	Final dosing
1.2 mg/kg	0.387 ± 0.043	0.701 ± 0.087	9.10 ± 1.31	7.11 ± 0.77	52 ± 5	78 ± 6	7.11 ± 0.47	6.57 ± 0.22
6 mg/kg	3.56 ± 0.60	3.17 ± 0.32	31.6 ± 6.1	30.8 ± 2.4	271 ± 25	397 ± 25	11.6 ± 3.1	6.17 ± 0.31
30 mg/kg	16.7 ± 1.4	17.7 ± 1.4	98.3 ± 15.7	130 ± 15	1052 ± 79	1837 ± 175	11.9 ± 1.3	6.85 ± 0.35

Data are presented as the mean ± SEM; 19-20 animals per group; first dosing (Day 1); final dosing (Day 483).

Yamada et al., *Bone*. **2016**, 86, 43-52, Table 5.

3-3 ONO-5334 の骨代謝マーカーに対する作用

3-3-1 尿中 NTX 濃度

尿中 NTX 濃度の変化率を Figure 2A に示した。卵巣摘出 4 カ月後以降において対照群の尿中 NTX 濃度の変化率は偽手術群に比べて増加した。ONO-5334 は卵巣摘出 0.5 カ月後以降において全ての用量で尿中 NTX 濃度の変化率を対照群に比べて減少させた。アレンドロネートは卵巣摘出 4 カ月後以降において尿中 NTX 濃度の変化率を対照群に比べて減少させた。

3-3-2 血清中 CTX-I 濃度

血清中 CTX-I 濃度の変化率を Figure 2B に示した。卵巣摘出 0.5 カ月後以降において対照群の血清中 CTX-I 濃度の変化率は偽手術群に比べて増加した。ONO-5334 は卵巣摘出 0.5 カ月後以降において全ての用量で血清中 CTX-I 濃度の変化率を対照群に比べて減少させた。アレンドロネートは卵巣摘出 2 カ月後以降において血清中 CTX-I 濃度の変化率を対照群に比べて減少させた。

3-3-3 血清中 BAP 濃度

血清中 BAP 濃度の変化率を Figure 2C に示した。卵巣摘出 2 カ月後以降において対照群の血清中 BAP 濃度の変化率は偽手術群に比べて増加した。ONO-5334 は 1.2 mg/kg の用量で卵巣摘出 2~12 カ月後に、6 mg/kg の用量で卵巣摘出 0.5 カ月後以降に、30 mg/kg の用量で卵巣摘出 4 カ月以降において、血清中 BAP 濃度の変化率を対照群に比べて減少させた。アレンドロネートは卵巣摘出 0.5 カ月後以降において血清中 BAP 濃度の変化率を対照群に比べて減少させた。

3-3-4 血清中 PINP 濃度

血清中 PINP 濃度の変化率を Figure 2D に示した。卵巣摘出 2 カ月後以降において、対照群の血清中 PINP 濃度の変化率は偽手術群に比べて増加した。ONO-5334 は全ての用量で卵巣摘出 2 カ月後以降、血清中 PINP 濃度の変化率を対照群に比べて減少させた。アレンドロネートは卵巣摘出 2 カ月後以降において、血清中 PINP 濃度の変化率を対照群に比べて減少させた。

3-3-5 血清中 TRAP5b 活性

血清中 TRAP5b 活性の変化率を Figure 2E に示した。卵巣摘出 0.5 カ月後以降において、対照群の血清中 TRAP5b 活性の変化率は偽手術群に比べて増加した。ONO-5334 は 1.2 mg/kg の用量で卵巣摘出 2、8、12 及び 16 カ月後に、30 mg/kg の用量で卵巣摘出 12 カ月後に、血清中 TRAP5b 活性の変化率を対照群に比べて増加させた。一方、ONO-5334 は 6 及び 30 mg/kg の用量で卵巣摘出 0.5 カ月後に、血清中 TRAP5b 活性の変化率を対照群に比べて減少させた。

アレンドロネートは卵巣摘出 2 カ月後以降において、血清中 TRAP5b 活性の変化率を対照群に比べて減少させた。

3-4 ONO-5334 の骨密度に対する作用（生体 DXA）

卵巣摘出により、対照群の腰椎、橈骨遠位部、大腿骨頸部及び脛骨近位部骨密度は、偽手術群に比べて有意に減少した（Figure 3）。ONO-5334 は測定した全ての部位で、対照群と比較し、有意に骨密度を増加させた。ONO-5334 による骨密度の増加は、腰椎及び脛骨近位部では投与 2 カ月後から、大腿骨頸部及び橈骨遠位部では投与 4 カ月後から、有意であった。ONO-5334 は 6 及び 30 mg/kg の用量で、偽手術群以上に骨密度を増加させた。一方、アレンドロネートは卵巣摘出による骨密度の低下を、腰椎では投与 2 カ月後から、大腿骨頸部では投与 8 カ月後から、脛骨近位部では投与 12 カ月後から、対照群に比べて有意に抑制し、偽手術群と同程度に維持した。アレンドロネートは、卵巣摘出による橈骨遠位部の骨密度低下を抑制しなかった。

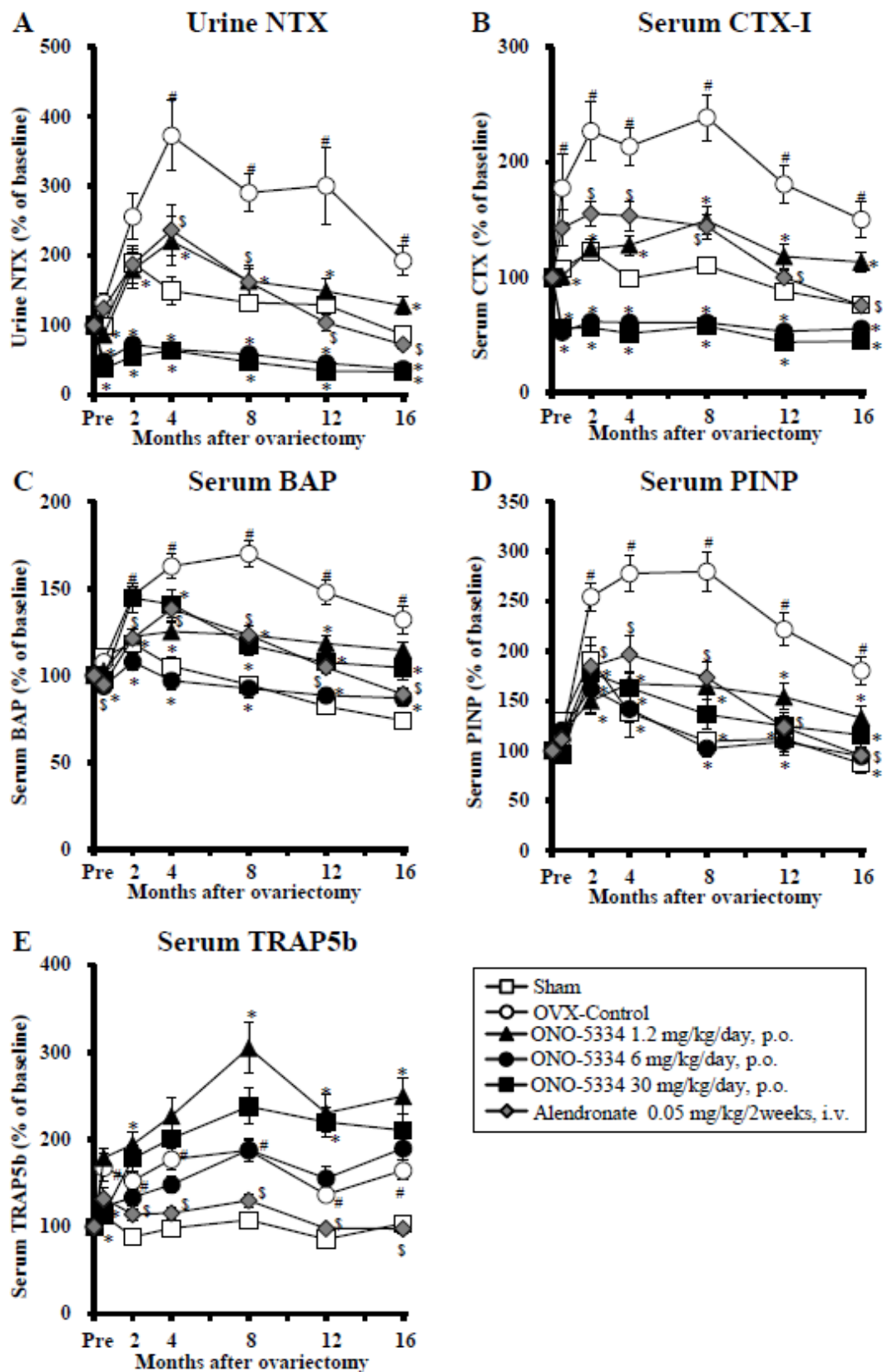


Figure 2. Changes in urinary NTX (A), serum CTX-I (B), BAP (C), PINP (D) and TRAP5b (E) in the Sham group, OVX control group, ONO-5334-treated groups, and alendronate-treated group. Data are presented as % of baseline (mean \pm SE, n = 19-20 animals). #: p<0.05 versus Sham group; *: p<0.05 versus OVX control group; \$: p<0.05 versus OVX control group.

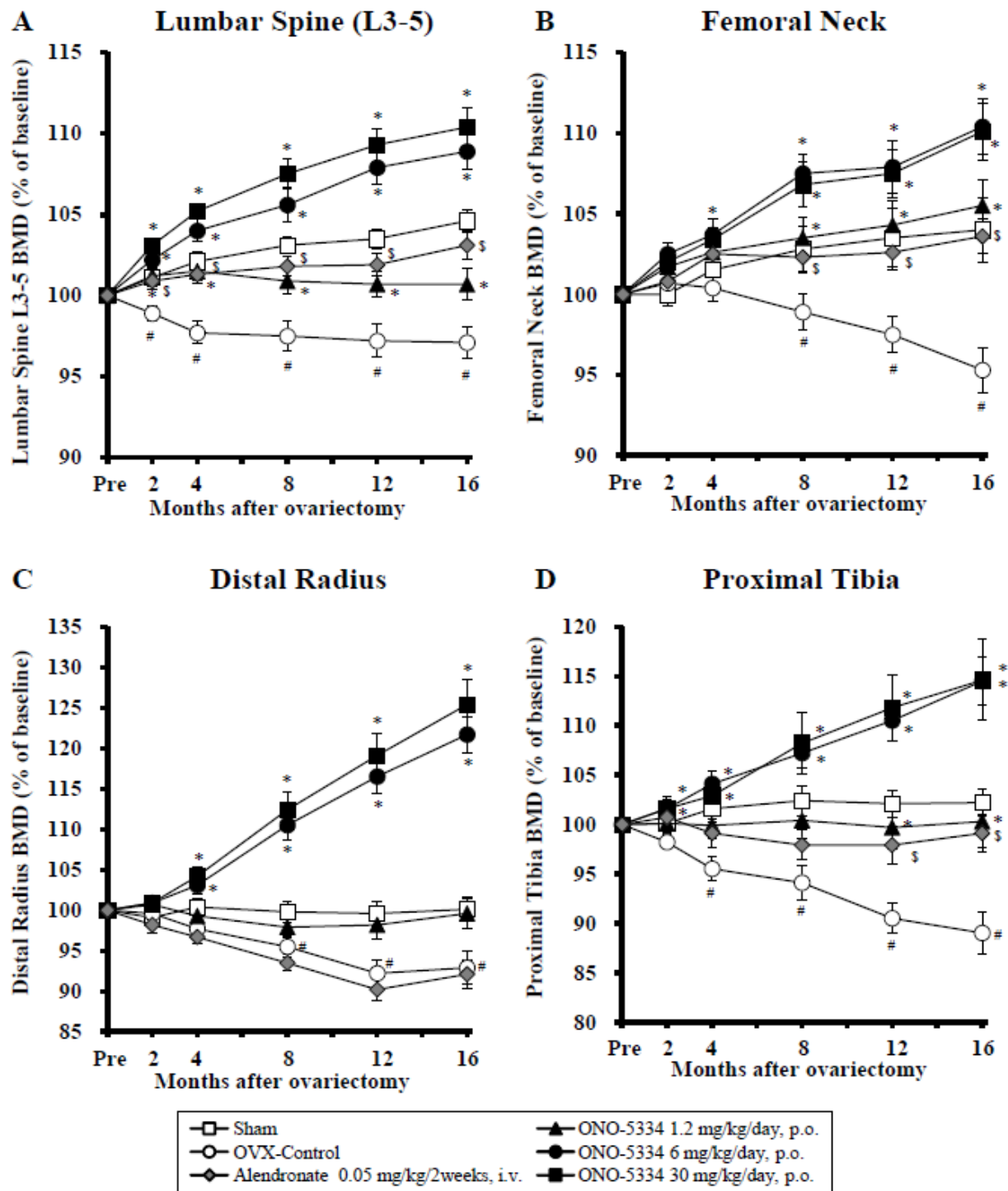


Figure 3. Changes in bone mineral density as measured by DXA in the lumbar spine (L3-L5) (A), femoral neck (B), distal radius (C) and proximal tibia (D) of animals in the sham group, OVX control group, ONO-5334-treated groups, and alendronate-treated group. Data are presented as % of baseline (mean \pm SE, n = 19-20 animals). #: p<0.05 versus Sham group; *: p<0.05 versus OVX control group; \$: p<0.05 versus OVX control group.

Yamada et al., *Bone*. 2016, 86, 43-52, Figure 2.

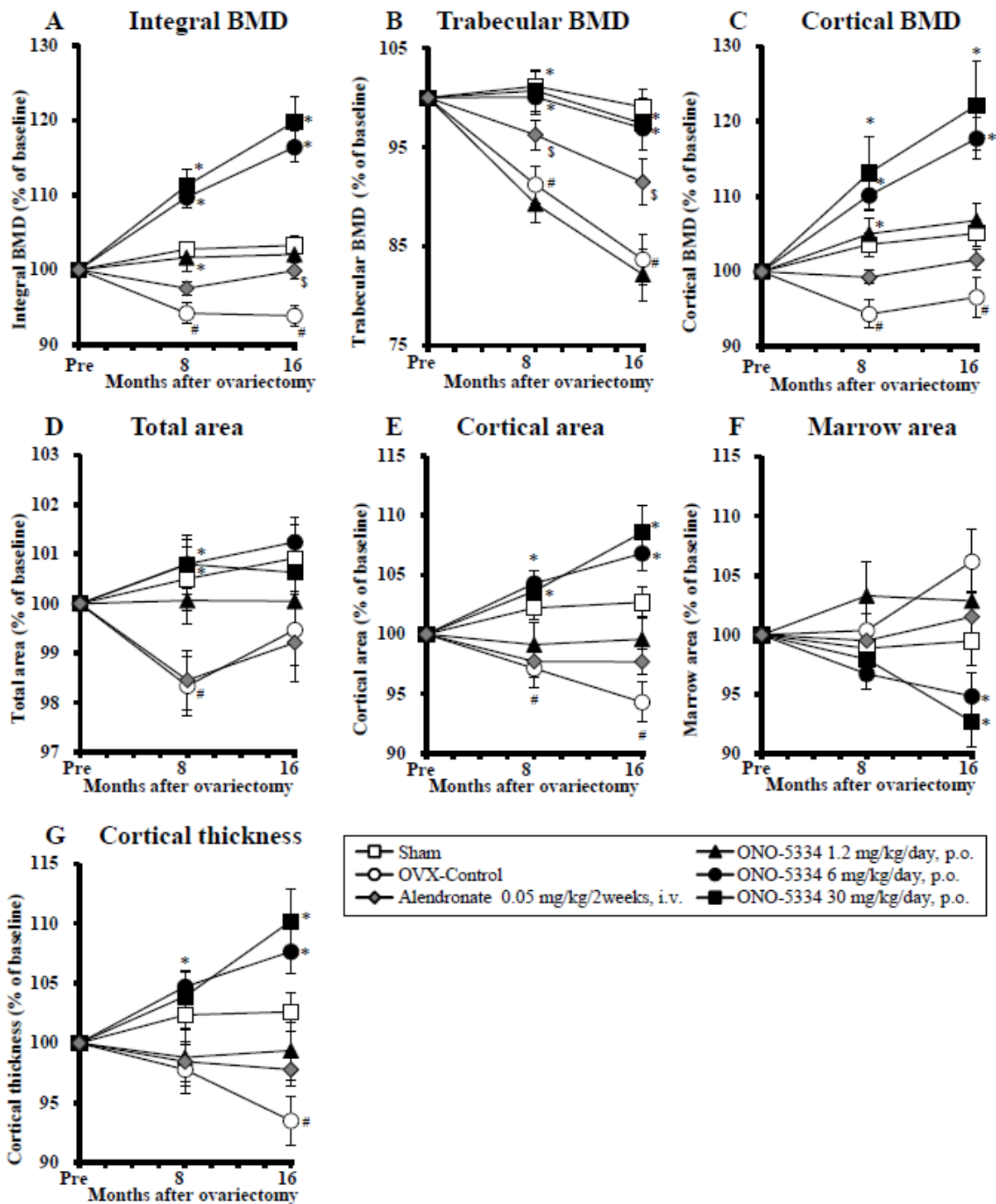


Figure 4. Changes in bone mineral density and geometry parameters as measured by pQCT in the proximal tibia: integral BMD (A), trabecular BMD (B), cortical BMD (C), total area (D), cortical area (E) marrow area (F) and cortical thickness (G) of animals in the sham group, OVX control group, ONO-5334-treated groups, and alendronate-treated group. BMD and geometry parameters were measured at 7% and 25% of bone total length from the proximal end, respectively. Data are presented as % of baseline (mean \pm SE, n = 19-20 animals). #: p<0.05 versus Sham group; *: p<0.05 versus OVX control group; \$: p<0.05 versus OVX control group.

Yamada et al., *Bone*. 2016, 86, 43-52, Figure 3.

3-5 ONO-5334 の骨密度に対する作用（生体 pQCT）

卵巣摘出により、対照群の全骨（海綿骨と皮質骨の和）密度、海綿骨骨密度及び皮質骨骨密度は、偽手術群に比べて有意に減少した（Figure 4）。ONO-5334 は 1.2 mg/kg の用量で、卵巣摘出による全骨密度及び皮質骨骨密度の減少を有意に抑制したが、海綿骨骨密度では同様の作用はなかった。ONO-5334 は 6 及び 30 mg/kg の用量で、海綿骨骨密度は偽手術群レベルまで、全骨密度及び皮質骨骨密度は偽手術群以上に増加させた。一方、アレンドロネートは全骨密度及び海綿骨骨密度を対照群に比べて有意に増加させたものの、皮質骨骨密度への作用は弱かった。卵巣摘出により、皮質骨厚（Ct.Th）及び皮質骨面（Ct.Ar）は、偽手術群に比べて有意に減少した。ONO-5334 は 6 及び 30 mg/kg の用量で、骨髓面（Ma.Ar）を減少させ、Ct.Th 及び Ct.Ar の低下を有意に抑制した。アレンドロネートは皮質骨の形状に有意な作用は示さなかった。

3-6 摘出骨の pQCT 解析

3-6-1 L4 の pQCT 解析

卵巣摘出により、全骨密度、海綿骨骨密度、皮質骨骨密度は有意に変化しなかったが、皮質骨骨塩量及び皮質骨厚は偽手術群に比べて有意に減少した（Table 3、Figure 5a）。皮質骨厚の菲薄化は内膜周囲長の有意な増加に基づくと考えられた。ONO-5334 は 30 mg/kg の用量で、対照群に比べて皮質骨厚を有意に増加させた。アレンドロネートは対照群に比べて全骨密度を有意に増加させた。またアレンドロネートは内膜周囲長の増加及び皮質骨厚の減少を有意に抑制した。

3-6-2 橈骨遠位部（遠位端より全長の 5%部位）の pQCT 解析

卵巣摘出により、海綿骨骨密度は偽手術群に比べて有意に減少した（Table 3、Figure 5b）。ONO-5334 は 30 mg/kg の用量で、卵巣摘出による海綿骨骨密度の減少を有意に抑制した。ONO-5334 は 6 及び 30 mg/kg の用量で、対照群に比べて全骨密度を有意に増加させた。ONO-5334 は全ての用量で、対照群に比べて皮質骨骨密度を有意に増加させた。ONO-5334 の 6 及び 30 mg/kg 群では、内膜周囲長の有意な減少と皮質骨厚の有意な増加が認められた。アレンドロネートは全骨密度、海綿骨骨密度及び皮質骨骨密度に対して有意な作用を示さなかった。

3-6-3 橈骨骨幹部（全長の 50%部位）の pQCT 解析

卵巣摘出により、皮質骨骨密度は偽手術群に比べて有意に減少した（Table 3）。ONO-5334 は全ての用量で、対照群に比べて皮質骨骨密度を有意に増加させた。ONO-5334 の 6 及び 30 mg/kg 群では、皮質骨厚の有意な増加を伴っていた。アレンドロネートは皮質骨に対して有意な作用を示さなかった。

3-7 橈骨遠位部の μ CT 解析

卵巣摘出により、骨量 (BV/TV)、骨梁数 (Tb.N) 及び骨梁幅 (Tb.Th) は有意に減少した (Table 4)。ONO-5334 は 6 及び 30mg/kg の用量で、BV/TV を有意に増加させ、30 mg/kg 群では偽手術群と同程度であった。ONO-5334 は 30 mg/kg の用量で、Tb.Th を除く全パラメーターで卵巣摘出による変化を有意に抑制した。アレンドロネートも Tb.Th には作用しなかったが、卵巣摘出による BV/TV、Tb.N、Tb.Sp、Conn-Dens 及び SMI の悪化を有意に抑制した。橈骨遠位部の 2 次元画像 (各群の代表例として皮質骨幅が中央値に近い個体を選択) において、ONO-5334 群では、皮質骨の肥厚が認められた (Figure 6a)。また、橈骨遠位部の 3 次元構築画像 (各群の代表例として骨梁幅が中央値に近い個体を選択) において、ONO-5334 群では、骨梁の肥厚が認められた (Figure 6b)。

3-8 ONO-5334 の骨強度に対する作用

L4 を用いて、圧迫強度を測定した (Table 5)。対照群の L4 の剛性は、偽手術群と比較して有意に減少したが、最大荷重及び吸収エネルギーについて有意な差は認められなかった。ONO-5334 は 6 及び 30 mg/kg の用量で、対照群と比較して、最大荷重を有意に増加させた。大腿骨骨幹部については、全ての群間で有意な差は認められなかった。

卵巣摘出により、橈骨遠位部及び骨幹部の最大荷重は有意に減少した (Figure 7)。ONO-5334 は 6 及び 30mg/kg の用量で、橈骨遠位部及び骨幹部の最大荷重を、対照群と比較して有意に増加させた。ONO-5334 による最大荷重の増加は、剛性及び吸収エネルギーの改善を伴っていた (Table 6)。アレンドロネートは橈骨遠位部及び骨幹部の最大荷重に対して有意な作用を示さなかった。

Table 3. Integral bone, trabecular bone and cortical bone-related parameters assessed by peripheral quantitative computed tomography.

	Sham	OVX control	ONO-5334			Alendronate
			1.2 mg/kg	6 mg/kg	30 mg/kg	0.05 mg/kg
Lumbar vertebral body (L4)						
Integral bone content (mg/mm)	51.08± 2.15	46.94± 1.61	46.62±1.33	52.89± 1.65*	53.59± 1.76*	49.17± 1.36
Integral bone density (mg/cm³)	482.8± 13.7	450.2± 12.5	466.0± 8.2	496.1± 9.4*	504.2± 13.5**	485.9± 10.6 ^{\$}
Trabecular bone content (mg/mm)	13.92± 0.70	12.99± 0.52	12.52± 0.45	14.33± 0.56	14.19± 0.63	13.74± 0.49
Trabecular bone density (mg/cm³)	375.6± 14.3	356.4± 11.9	357.8± 8.3	385.0± 10.8	381.8± 15.0	389.0± 12.5
Cortical bone content (mg/mm)	34.93± 2.48	27.51± 1.98 [#]	29.57± 1.32	34.63± 1.71*	37.53± 2.55**	32.33± 1.53
Cortical bone density (mg/cm³)	604.7± 13.2	586.0± 13.7	598.2± 9.5	633.4± 10.2*	642.3± 14.2**	599.2± 12.1
Endosteal circumference (mm)	24.35± 0.76	26.76± 0.88 [#]	25.14± 0.65	25.48± 0.43	24.10± 1.11	24.14± 0.89 ^{\$}
Periosteal circumference (mm)	36.34± 0.42	36.20± 0.56	35.45± 0.54	36.54± 0.38	36.53± 0.38	35.65± 0.44
Cortical bone thickness (mm)	1.91± 0.13	1.50± 0.11 [#]	1.64± 0.07	1.76± 0.08	1.98± 0.17*	1.83± 0.11 ^{\$}
Distal radius						
Integral bone content (mg/mm)	25.61± 0.89	22.80± 0.72 [#]	24.08± 0.72	31.07± 0.90**	32.37± 1.01**	21.82± 0.47
Integral bone density (mg/cm³)	422.5± 12.2	401.7± 14.5	450.9± 19.3	564.9± 16.3**	593.0± 17.4**	410.6± 12.7
Trabecular bone content (mg/mm)	7.06± 0.40	6.14± 0.43	5.51± 0.51	4.33± 0.30**	4.47± 0.38*	6.12± 0.46
Trabecular bone density (mg/cm³)	232.3± 7.5	201.0± 6.8 ^{##}	198.2± 6.8	220.5± 8.7	250.5± 9.0**	213.8± 5.4
Cortical bone content (mg/mm)	14.70± 0.86	13.91± 0.77	16.11± 0.87	23.92± 0.86**	24.68± 1.17**	12.77± 0.62
Cortical bone density (mg/cm³)	729.0± 13.0	715.1± 19.4	781.7± 21.9*	880.1± 6.5**	875.3± 10.9**	724.4± 19.7
Endosteal circumference (mm)	22.57± 0.49	21.76± 0.59	20.55± 0.74	18.72± 0.48**	18.19± 0.50**	21.27± 0.60
Periosteal circumference (mm)	27.60± 0.41	26.81± 0.44	26.13± 0.55	26.33± 0.35	26.20± 0.27	25.99± 0.47
Cortical bone thickness (mm)	0.80± 0.04	0.80± 0.04	0.89± 0.04	1.21± 0.05**	1.28± 0.06**	0.75± 0.03
Midshaft radius						
Cortical bone content (mg/mm)	21.10± 0.52	18.96± 0.62 [#]	20.66± 0.63	22.13± 0.73**	22.08± 0.63**	18.73± 0.46
Cortical bone density (mg/cm³)	1124.3± 6.7	1061.2± 9.8 ^{##}	1109.8± 9.8**	1138.7± 8.0**	1124.6± 5.6**	1063.4± 13.8
Endosteal circumference (mm)	9.53± 0.30	9.66± 0.30	8.97± 0.30	8.88± 0.27	9.36± 0.29	9.59± 0.27
Periosteal circumference (mm)	18.08± 0.27	17.83± 0.24	17.74± 0.22	17.97± 0.28	18.30± 0.24	17.72± 0.19
Cortical bone thickness (mm)	1.36± 0.03	1.30± 0.03	1.40± 0.04	1.45± 0.04*	1.42± 0.04*	1.29± 0.03

Data are presented as the mean ± SEM; 19-20 animals per treatment group; #p<0.05, ##p<0.01 difference from Sham group; *p<0.05, **p<0.01 difference from OVX control group; \$p<0.05 difference from OVX control group.

Yamada et al., *J Bone Miner Metab.* **2019**, 37, 636-47, Table 1.

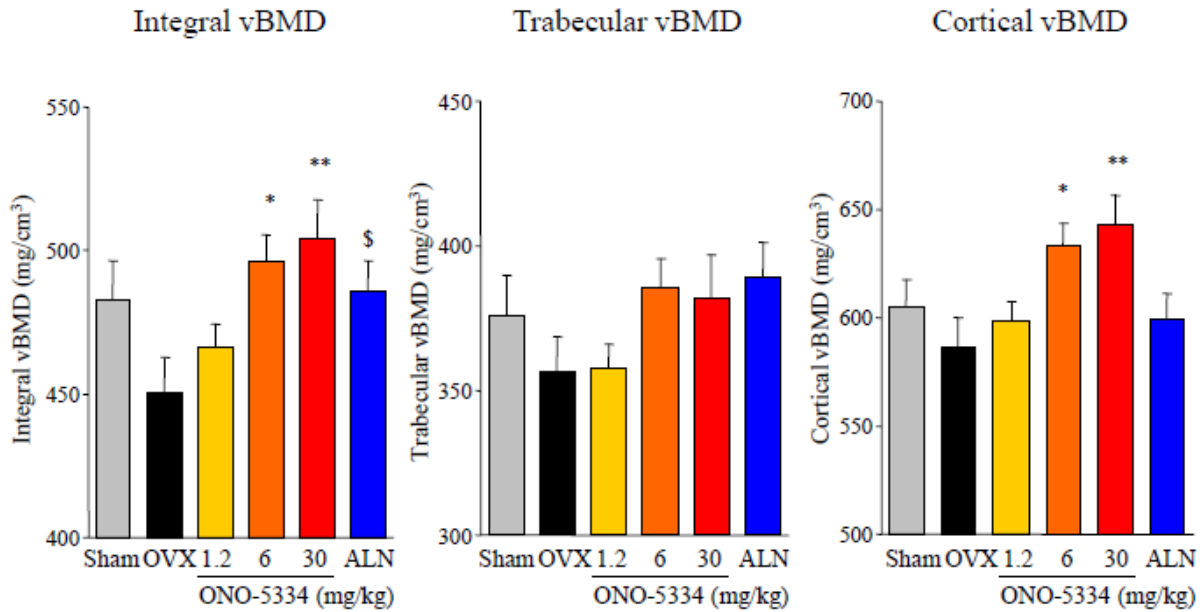
Table 4. Effect of ONO-5334 on the trabecular structure of the distal radius assessed by micro-CT.

	Sham	OVX control	ONO-5334			Alendronate
			1.2 mg/kg	6 mg/kg	30 mg/kg	0.05 mg/kg
BV/TV (%)	0.200 ± 0.016	0.111 ± 0.011 ^{##}	0.124 ± 0.014	0.169 ± 0.014 [*]	0.200 ± 0.018 ^{**}	0.157 ± 0.011 ^{\$\$}
Tb.N (1/mm)	1.58 ± 0.08	1.22 ± 0.07 ^{##}	1.25 ± 0.08	1.44 ± 0.07	1.55 ± 0.10 [*]	1.48 ± 0.06 ^{\$\$}
Tb.Th (mm)	0.162 ± 0.004	0.149 ± 0.004 [#]	0.153 ± 0.004	0.158 ± 0.006	0.163 ± 0.007	0.144 ± 0.003
Tb.Sp (mm)	0.63 ± 0.05	0.85 ± 0.05 ^{##}	0.85 ± 0.07	0.68 ± 0.04	0.65 ± 0.05 [*]	0.66 ± 0.03 ^{\$\$}
Conn-Dens (1/mm³)	6.76 ± 0.90	3.28 ± 0.59 ^{##}	3.44 ± 0.48	4.76 ± 0.58	5.69 ± 0.96 [*]	4.83 ± 0.48 ^{\$}
SMI	1.52 ± 0.14	1.95 ± 0.09 [#]	1.77 ± 0.09	1.64 ± 0.16	1.39 ± 0.17 ^{**}	1.59 ± 0.13 ^{\$}

Data are presented as the mean ± SEM; 19-20 animals per treatment group; #p<0.05, ##p<0.01 difference from Sham group; *p<0.05, **p<0.01 difference from OVX control group; \$p<0.05, \$\$p<0.01 difference from OVX control group; BV/TV: bone volume per tissue volume; Tb.N: trabecular number; Tb.Th: trabecular thickness; Tb.Sp: trabecular separation; Conn-Dens: connectivity density; SMI: structure model index.

Yamada et al., *J Bone Miner Metab.* **2019**, 37, 636-47, Table 2.

a) lumbar vertebra (L4)



b) distal radius

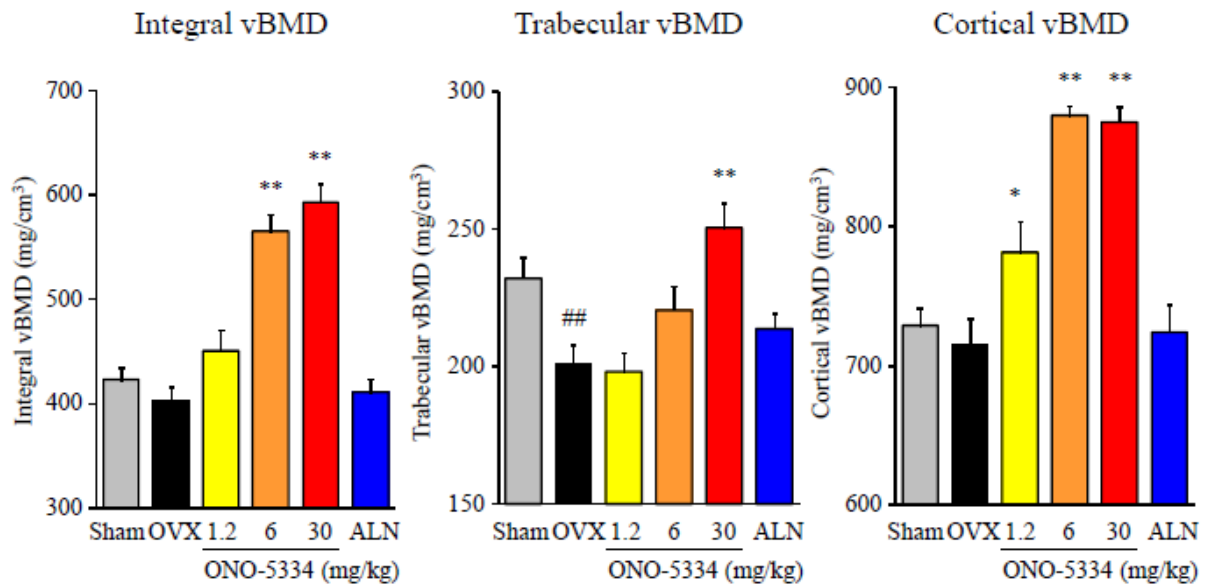
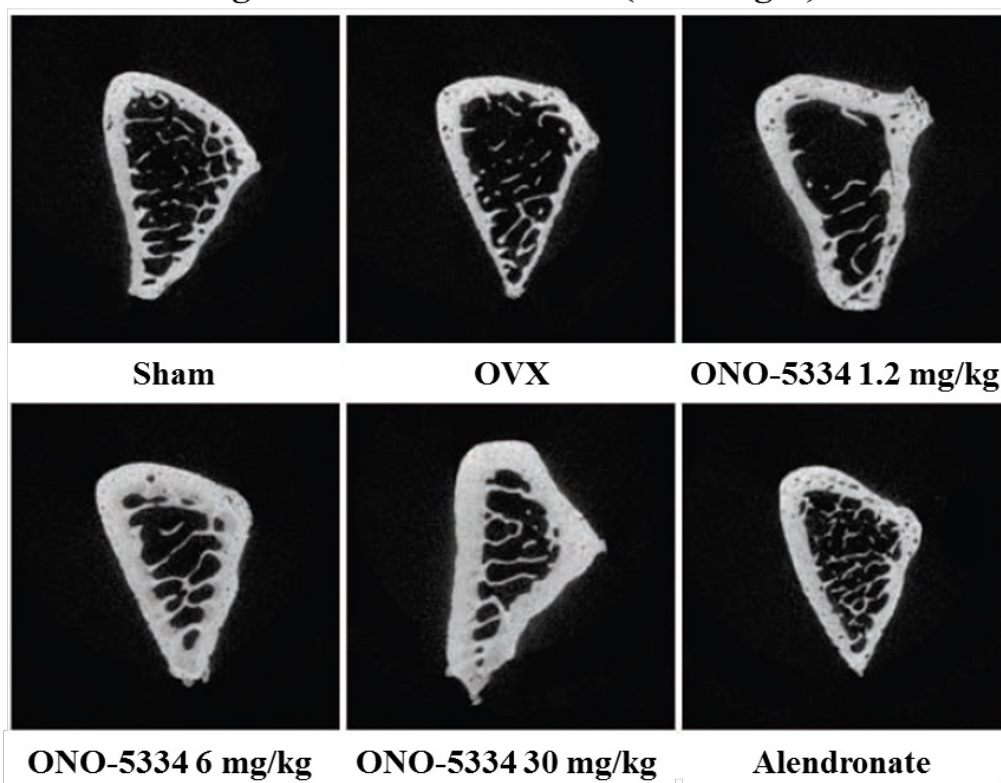


Figure 5. Bone mineral density assessed by peripheral quantitative computed tomography at a) the lumbar vertebra (L4) and b) the distal radius after 16 months of treatment with ONO-5334. Data are presented as mean \pm SE (n = 19–20 animals). ###: p<0.01 versus Sham group; *: p<0.05, **: p<0.01 versus OVX control group; \$: p<0.05 versus OVX control group.

Yamada et al., *J Bone Miner Metab.* **2019**, 37, 636-47, Figure 1.

a) micro-CT images at the distal radius (2D images)



b) micro-CT images at the distal radius (trabecular bone)

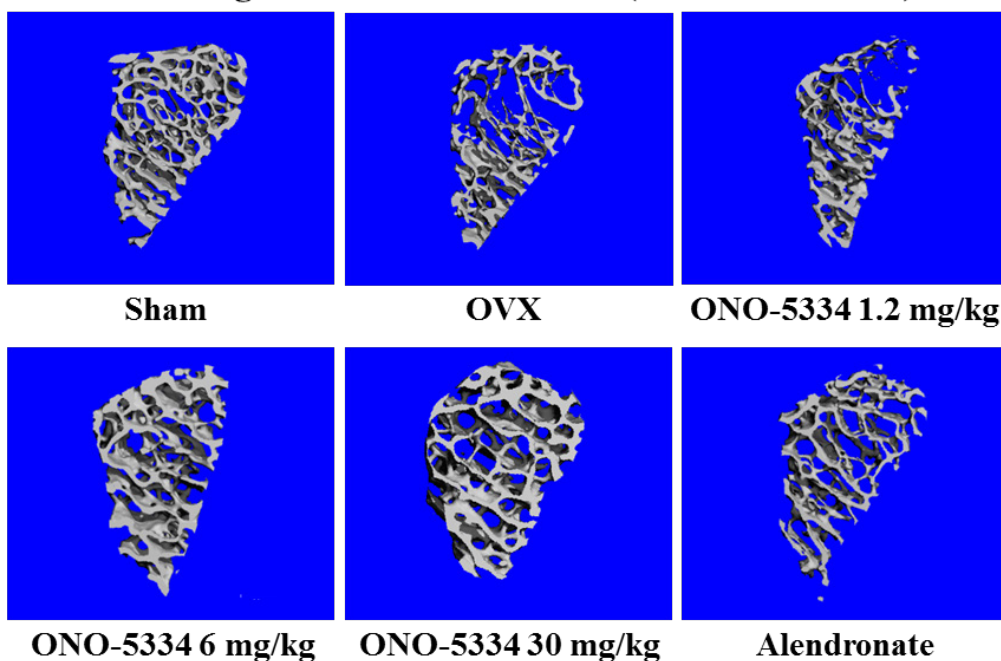


Figure 6. Representative micro-CT images at the distal radius. a) two dimensional image; individuals having median cortical thickness in each group are shown, b) three dimensional images of trabecular bone; individuals having median trabecular thickness in each group are shown.

Yamada et al., *J Bone Miner Metab.* **2019**, 37, 636-47, Figure 2.

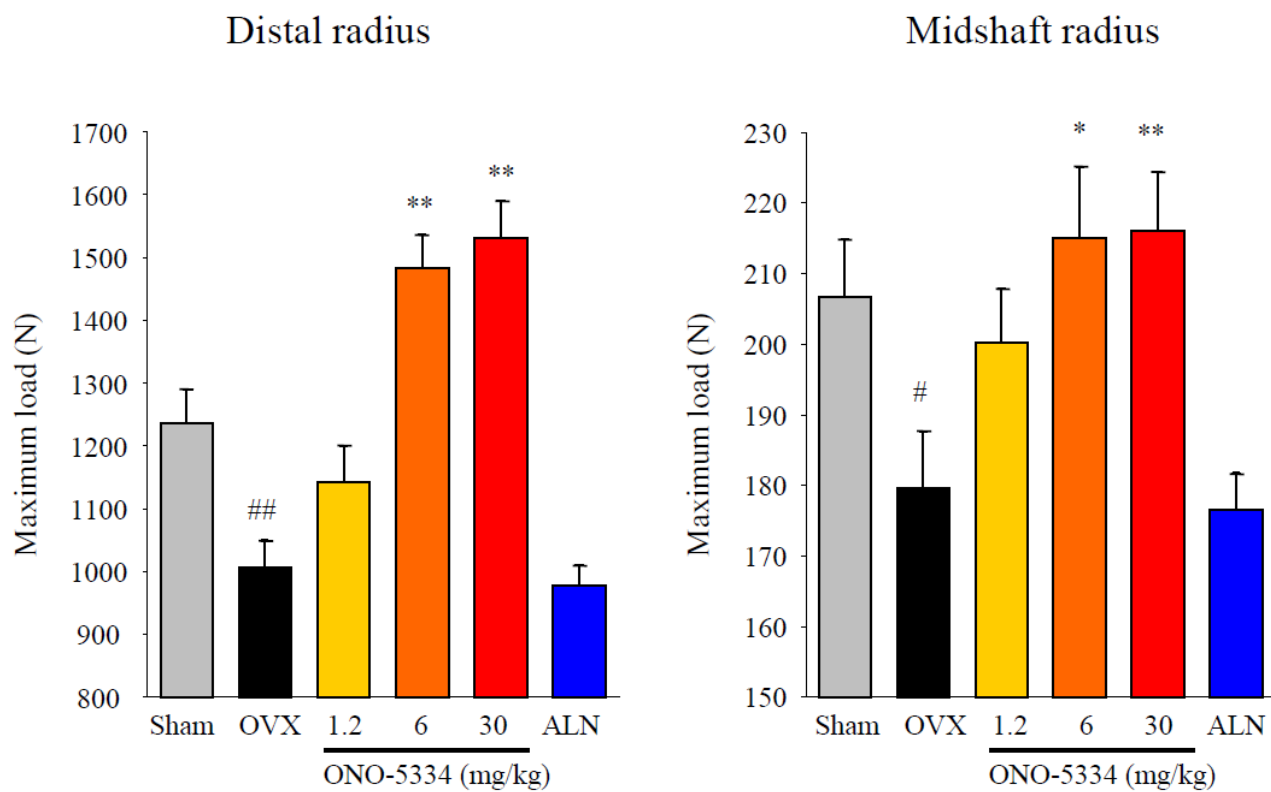


Figure 7. Bone strength as assessed by maximum load at the distal and midshaft radius after 16 months of treatment with ONO-5334. Data are presented as mean \pm SE (n = 19–20 animals). #: p<0.05, ##: p<0.01 versus Sham group; *: p<0.05, **: p<0.01 versus OVX control group.

Yamada et al., *J Bone Miner Metab.* **2019**, 37, 636-47, Figure 3.

Table 5. Bone strength parameters in the lumbar vertebral body (L4) and femoral midshaft.

	Sham	OVX control	ONO-5334			Alendronate
			1.2 mg/kg	6 mg/kg	30 mg/kg	0.05 mg/kg
Lumbar vertebral body (L4)						
Maximum load (N)	2490 ± 130	2174 ± 129	2292 ± 76	2801 ± 134*	2854 ± 112*	2360 ± 92
Stiffness (N/mm)	6885 ± 274	5635 ± 516 [#]	5888 ± 420	6500 ± 453	6493 ± 321	6529 ± 471
Energy absorbed (mJ)	1247 ± 148	1128 ± 142	1095 ± 103	1244 ± 92	1302 ± 151	1039 ± 112
Femoral midshaft						
Maximum load (N)	783 ± 28	770 ± 35	785 ± 32	773 ± 24	831 ± 38	723 ± 21
Stiffness (N/mm)	753 ± 31	686 ± 31	704 ± 28	775 ± 31	781 ± 33	689 ± 27
Energy absorbed (mJ)	832 ± 90	758 ± 51	870 ± 96	801 ± 49	966 ± 96	717 ± 46

Data are presented as the mean ± SEM; 19-20 animals per group; [#]p<0.05 difference from Sham group; *p<0.05 difference from OVX control.

Yamada et al., *Bone*. 2016, 86, 43-52, Table 4.

Table 6. Effect of ONO-5334 on bone strength at the distal and midshaft radius.

	Sham	OVX control	ONO-5334			Alendronate
			1.2 mg/kg	6 mg/kg	30 mg/kg	0.05 mg/kg
Distal radius						
Maximum load (N)	1236.5 ± 54.9	1006.1 ± 43.8 ^{###}	1142.0 ± 58.5	1483.2 ± 53.4 ^{**}	1530.5 ± 59.5 ^{**}	977.4 ± 32.5
Stiffness (N/mm)	2286.4 ± 28.3	2233.6 ± 24.6	2262.8 ± 20.9	2343.3 ± 20.4 ^{**}	2365.5 ± 24.1 ^{**}	2232.9 ± 23.9
Energy absorption (mJ)	418.3 ± 33.5	297.6 ± 24.2 ^{###}	369.4 ± 31.8	573.7 ± 34.7 ^{**}	615.9 ± 40.6 ^{**}	268.2 ± 14.4
Midshaft radius						
Maximum load (N)	206.6 ± 8.2	179.5 ± 8.2 [#]	200.1 ± 7.7	215.0 ± 10.1 [*]	216.0 ± 8.3 ^{**}	176.4 ± 5.3
Stiffness (N/mm)	120.9 ± 6.8	100.3 ± 5.9 [#]	109.4 ± 5.1	116.5 ± 7.1	116.7 ± 6.1	96.3 ± 3.8
Energy absorption (mJ)	339.8 ± 23.7	307.1 ± 19.3	368.3 ± 22.4	414.2 ± 35.0 [*]	423.7 ± 29.0 ^{**}	326.6 ± 20.1

Data are presented as the mean ± SEM; 19-20 animals per treatment group; #p<0.05, ###p<0.01 difference from Sham group; *p<0.05, **p<0.01 difference from OVX control group.

Yamada et al., *J Bone Miner Metab.* **2019**, 37, 636-47, Table 3.

3-9 ONO-5334 の骨組織に対する作用

3-9-1 海綿骨での解析

第二腰椎 (L2) を用いて、骨形態計測を実施した結果、海綿骨の構造的指標は卵巣摘出により変化しなかった (Table 7)。同様に、ONO-5334 も構造的指標に対して、対照群と有意な差は認められなかった。ONO-5334 は 30 mg/kg の用量で、破骨細胞数 (N.Oc/BS) 及び破骨細胞面 (Oc.S/BS) を対照群と比較して、有意に増加させた。逆に、アレンドロネートは対照群と比較して、破骨細胞面を有意に減少させた。骨石灰化面 (MS/BS)、骨石灰化速度 (MAR)、骨形成速度 (BFR/BS 及び BFR/BV)、骨単位活性化率 (Ac.f)、補正骨石灰化速度 (Aj.Ar) などの骨形成系の指標は偽手術群に比べて、対照群で有意に高かった。ONO-5334 及びアレンドロネートは骨形成系の指標を対照群に比べて、有意に減少させた。

3-9-2 皮質骨での解析

大腿骨骨幹部を用いて、骨形態計測を実施した。対照群の皮質骨多孔率は偽手術群に比べて、有意に増加した (Table 8)。ONO-5334 は 6 mg/kg の用量で、皮質骨多孔率を対照群と比較して、有意に減少させたが、30 mg/kg の作用は有意ではなかった。ONO-5334 は 6 及び 30 mg/kg の用量で、卵巣摘出によるオステオンの動的指標の増加を有意に抑制した。一方で、ONO-5334 はいずれの用量においても、骨膜及び骨内膜の動的指標に影響を及ぼさなかった。アレンドロネートは卵巣摘出により亢進した骨内膜の動的指標を有意に抑制したが、オステオン及び骨膜の動的指標には作用しなかった。

Table 7. Data of trabecular histomorphometric analysis of the 2nd lumbar vertebral body (L2).

	Sham	OVX control	ONO-5334			Alendronate
			1.2 mg/kg	6 mg/kg	30 mg/kg	0.05 mg/kg
Structural						
BV/TV (%)	29.7 ± 1.6	26.3 ± 1.0	26.2 ± 0.9	27.3 ± 1.0	26.9 ± 1.4	27.0 ± 1.2
BS/BV (mm ² /mm ³)	17.5 ± 0.86	18.3 ± 0.73	19.3 ± 0.56	18.7 ± 0.69	17.8 ± 0.85	19.9 ± 0.88
Tb.Th (µm)	119 ± 5.8	113 ± 4.5	105 ± 2.9	110 ± 4.1	117 ± 5.1	105 ± 5.9
Tb.N (N/mm)	2.49 ± 0.07	2.38 ± 0.09	2.50 ± 0.08	2.51 ± 0.08	2.32 ± 0.10	2.62 ± 0.08 [§]
Tb.Sp (µm)	287 ± 12.0	319 ± 13.5	303 ± 12.4	297 ± 13.6	329 ± 18.3	284 ± 10.3 [§]
Histological						
OS/BS (%)	6.58 ± 0.88	11.06 ± 1.66 [#]	7.12 ± 0.99 [*]	1.87 ± 0.51 [*]	1.10 ± 0.34 [*]	2.84 ± 0.78 [§]
OV/BV (%)	0.88 ± 0.13	1.63 ± 0.26 [#]	0.94 ± 0.14 [*]	0.19 ± 0.05 [*]	0.11 ± 0.04 [*]	0.33 ± 0.08 [§]
O.Th (µm)	7.58 ± 0.32	8.09 ± 0.31	6.95 ± 0.22	5.23 ± 0.30 [*]	4.86 ± 0.70 [*]	6.22 ± 0.30 [§]
N.Oc/BS (N/mm)	0.71 ± 0.05	0.82 ± 0.06	0.82 ± 0.09	1.02 ± 0.09	1.13 ± 0.07 [*]	0.66 ± 0.06
Oc.S/BS (%)	2.53 ± 0.20	3.06 ± 0.21	3.06 ± 0.32	3.65 ± 0.33	4.05 ± 0.27 [*]	2.38 ± 0.23 [§]
ES/BS	6.79 ± 0.46	8.21 ± 0.39 [#]	7.60 ± 0.50	8.64 ± 0.46	8.05 ± 0.44	7.74 ± 0.41
Dynamic						
MS/BS (%)	12.1 ± 1.3	17.6 ± 1.4 [#]	13.5 ± 1.1 [*]	11.4 ± 1.0 [*]	7.8 ± 1.0 [*]	5.0 ± 1.3 [§]
MAR (µm/day)	0.53 ± 0.02	0.61 ± 0.02 [#]	0.53 ± 0.02 [*]	0.40 ± 0.02 [*]	0.34 ± 0.01 [*]	0.42 ± 0.02 [§]
BFR/BS (µm ³ /µm ² /year)	23.4 ± 2.7	39.8 ± 3.7 [#]	26.9 ± 2.8 [*]	17.1 ± 2.1 [*]	9.9 ± 1.5 [*]	8.6 ± 2.5 [§]
BFR/BV (%/year)	40.1 ± 4.6	71.4 ± 6.5 [#]	52.8 ± 6.2 [*]	31.0 ± 3.5 [*]	16.8 ± 2.4 [*]	14.7 ± 3.6 [§]
Combined						
Ac.f (/year)	0.82 ± 0.11	1.59 ± 0.21 [#]	0.97 ± 0.17 [*]	0.21 ± 0.06 [*]	0.10 ± 0.03 [*]	0.32 ± 0.10 [§]
Aj.AR (µm/day)	0.51 ± 0.02	0.60 ± 0.02 [#]	0.53 ± 0.02 [*]	0.40 ± 0.02 [*]	0.34 ± 0.01 [*]	0.39 ± 0.03 [§]
FP (days)	29.7 ± 0.83	25.4 ± 0.95 [#]	28.9 ± 1.33	41.3 ± 3.24 [*]	45.2 ± 1.55 [*]	41.5 ± 3.19 [§]
Rs.P + Rv.P (days)	64.5 ± 28.7	26.2 ± 3.4	53.7 ± 13.6	584.1 ± 146.7 [*]	957.7 ± 212.4 [*]	342.8 ± 91.1 [§]

Data are presented as the mean ± SEM; 19-20 animals per group; #p<0.05 difference from Sham group; *p<0.05 difference from OVX control group; §p<0.05 difference from OVX control group; BV/TV: trabecular bone volume; BS/BV: bone surface to bone volume; Tb.Th: trabecular thickness; Tb.N: number; Tb.Sp: separation; OS/BS: osteoid surface; OV/BV: osteoid volume; O.Th: osteoid thickness; N.Oc/BS: osteoclast number/bone surface reference; Oc.S/BS: osteoclast surface; ES/BS: eroded surface; MS/BS: mineralizing surface; MAR: mineral apposition rate; BFR/BS and BFR/BV: bone formation rates; Ac.f: activation frequency; Aj.AR: adjusted apposition rate; FP: formation period; Rs.P + Rv.P: resorption period+reversal period.

Yamada et al., *Bone*. 2016, 86, 43-52, Table 2.

Table 8. Data of cortical histomorphometric analysis of the femoral midshaft.

	Sham	OVX control	ONO-5334			Alendronate
			1.2 mg/kg	6 mg/kg	30 mg/kg	0.05 mg/kg
Structural						
T.Ar (mm ²)	57.0 ± 1.49	55.0 ± 1.89	55.8 ± 1.63	55.0 ± 1.70	59.5 ± 1.71	56.2 ± 1.47
Ct.Ar (mm ²)	35.1 ± 1.02	34.8 ± 0.90	36.2 ± 1.10	34.8 ± 0.70	37.5 ± 1.41	35.5 ± 0.61
Ma.Ar (mm ²)	21.9 ± 1.26	20.2 ± 1.29	19.6 ± 1.34	20.3 ± 1.48	22.0 ± 1.45	20.7 ± 1.57
Porosity (%)	1.08 ± 0.11	2.13 ± 0.17 [#]	2.47 ± 0.57	1.02 ± 0.12 [*]	1.55 ± 0.19	1.99 ± 0.30
Dynamic						
Periosteal						
MS/BS (%)	1.08 ± 0.48	5.69 ± 1.57 [#]	5.90 ± 1.93	3.71 ± 1.37	6.81 ± 1.69	6.95 ± 1.94
MAR (µm/day)	0.13 ± 0.04	0.38 ± 0.07 [#]	0.30 ± 0.05	0.30 ± 0.07	0.53 ± 0.06	0.30 ± 0.07
BFR/BS (µm ³ /µm ² /year)	1.19 ± 0.53	10.54 ± 3.44 [#]	10.94 ± 4.82	9.86 ± 5.57	18.20 ± 6.01	12.43 ± 3.88
Endocortical						
MS/BS (%)	3.50 ± 1.86	14.52 ± 3.79 [#]	14.70 ± 2.93	11.62 ± 3.31	9.09 ± 4.62	1.74 ± 0.72 ^{\$}
MAR (µm/day)	0.16 ± 0.06	0.51 ± 0.11 [#]	0.46 ± 0.09	0.34 ± 0.06	0.34 ± 0.08	0.18 ± 0.06 ^{\$}
BFR/BS (µm ³ /µm ² /year)	6.81 ± 3.79	51.59 ± 14.73 [#]	37.90 ± 9.61	22.84 ± 7.86	30.40 ± 18.71	3.93 ± 2.41 ^{\$}
Osteonal						
MS/BS (%)	3.32 ± 0.72	14.70 ± 1.46 [#]	11.75 ± 1.82	3.37 ± 0.73 [*]	5.37 ± 1.16 [*]	14.42 ± 1.27
MAR (µm/day)	0.72 ± 0.09	1.18 ± 0.03 [#]	1.21 ± 0.07	0.80 ± 0.08 [*]	0.69 ± 0.09 [*]	1.16 ± 0.03
BFR/BS (µm ³ /µm ² /year)	11.40 ± 2.62	64.62 ± 7.08 [#]	54.89 ± 8.57	12.33 ± 3.22 [*]	19.09 ± 5.13 [*]	61.53 ± 5.81

Data are presented as the mean ± SEM; 19-20 animals per group; [#]p<0.05 difference from Sham group; ^{*}p<0.05 difference from OVX control; ^{\$}p<0.05 difference from OVX control group; T.Ar: total area; Ct.Ar: cortical area; Ma.Ar: marrow area; MS/BS: mineralizing surface; MAR: mineral apposition rate; BFR/BS: bone formation rates.

Yamada et al., *Bone*. 2016, 86, 43-52, Table 3.

3-10 骨量と骨強度の相関解析

腰椎椎体における骨量及び最大荷重の関係を群毎に回帰分析した結果、ONO-5334 の 1.2 mg/kg 群の骨密度及び最大荷重の関係を除き、全ての群で骨量と骨強度の間に有意な正の相関関係が認められた (Table 9)。ONO-5334 の 6 及び 30 mg/kg 群の回帰直線は、対照群、ONO-5334 の 1.2 mg/kg 群及びアレンドロネート群の回帰直線よりも、骨強度が高い方向へシフトした (Figure 8a、8b)。

腰椎椎体の全骨塩量をほぼ等しくしたサブグループでの解析において、ONO-5334 群の最大荷重はアレンドロネート群よりも有意に高かった (Figure 9a)。この時、海綿骨骨塩量はアレンドロネート群が ONO-5334 群に比べて、皮質骨骨塩量は ONO-5334 群がアレンドロネート群に比べて、有意ではないものの高い値を示した。同様に、全骨密度をほぼ等しくしたサブグループ解析においても、ONO-5334 群の最大荷重はアレンドロネート群より高かった (Figure 9b)。海綿骨骨密度はアレンドロネート群が、皮質骨骨密度は ONO-5334 群が高く、骨密度の低いサブグループでは、いずれの差も有意であった。

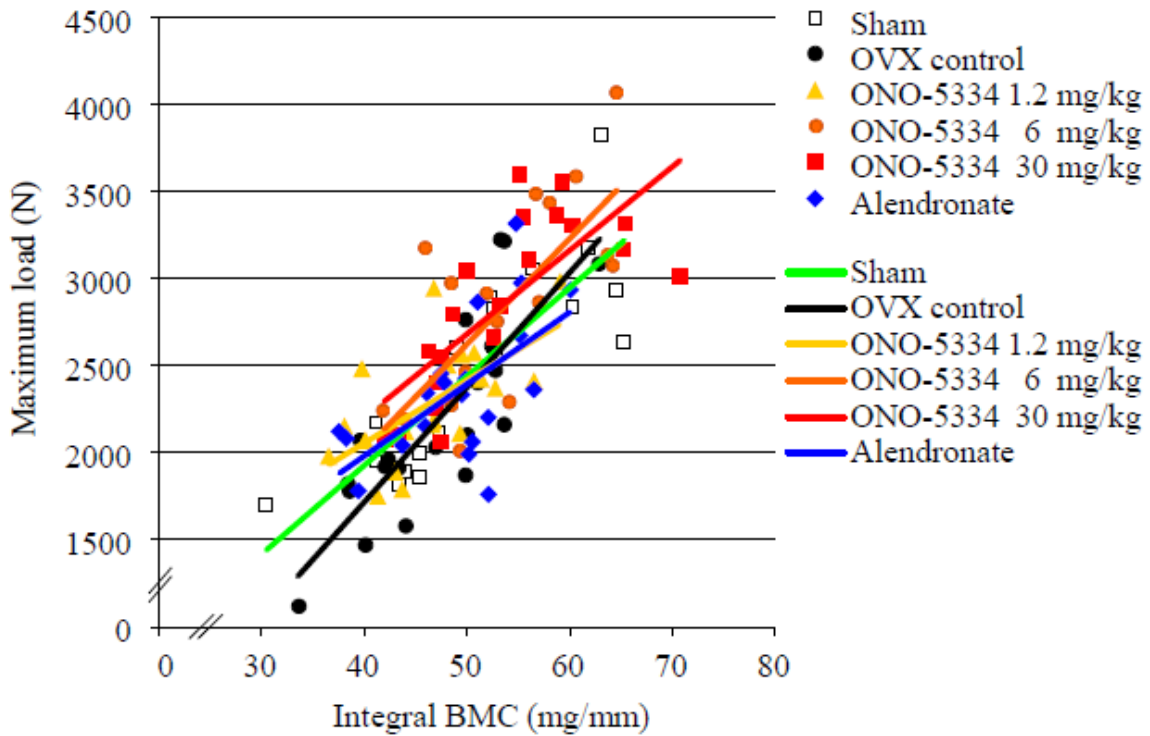
Table 9. Correlation analysis between bone mass and bone strength.

Group	Number	BMC vs ML		BMD vs ML	
		Pearson Correlation coefficient	p-value	Spearman Correlation coefficient	p-value
Sham	19	0.84	< 0.01	0.81	< 0.01
OVX control	20	0.83	< 0.01	0.65	< 0.01
ONO-5334 1.2 mg/kg	20	0.62	< 0.01	0.20	0.39
ONO-5334 6 mg/kg	19	0.75	< 0.01	0.81	< 0.01
ONO-5334 30 mg/kg	20	0.75	< 0.01	0.75	< 0.01
Alendronate	20	0.61	< 0.01	0.46	< 0.05

Integral bone mineral content (BMC), Integral bone mineral density (BMD), Bone strength: Maximum load (ML).

Yamada et al., *J Bone Miner Metab.* **2019**, 37, 636-47, Table 4.

a) Maximum load and BMC



b) Maximum load and BMD

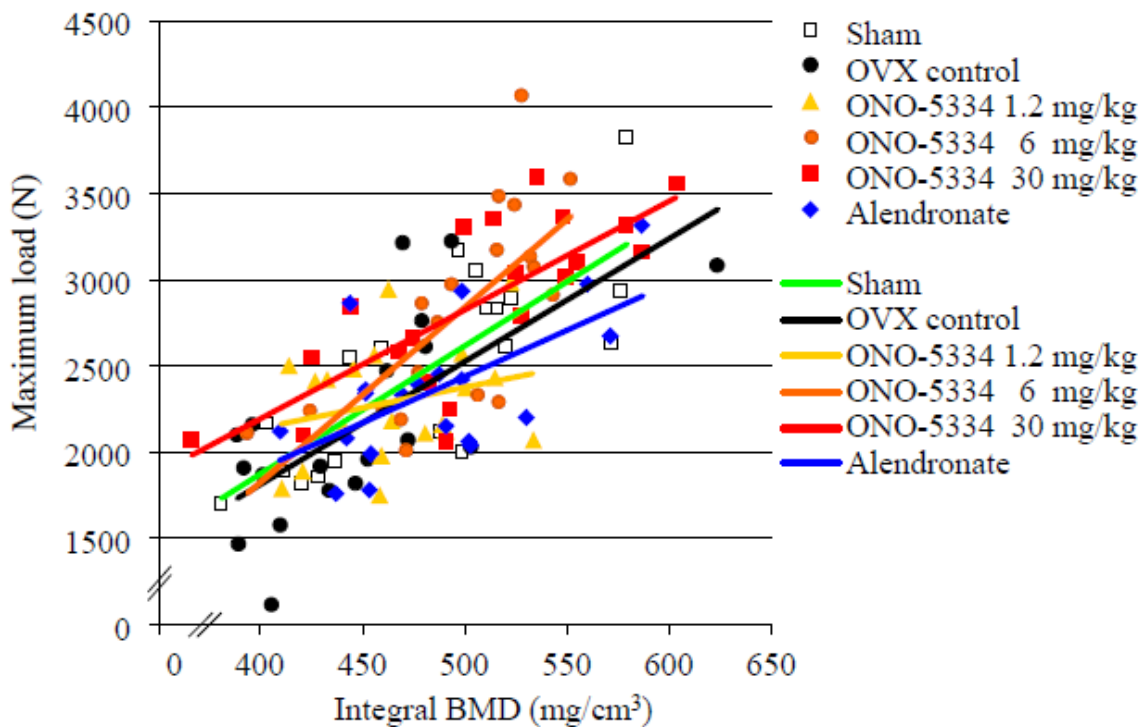
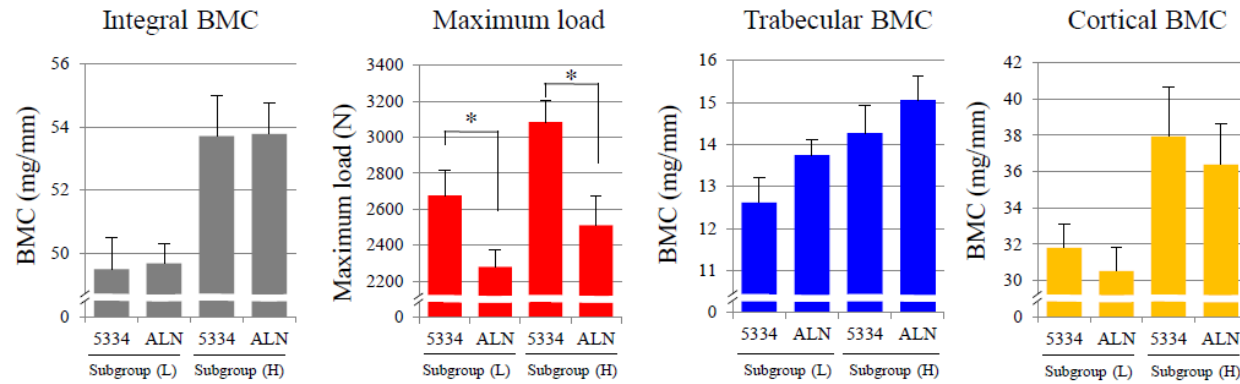


Figure 8. Relationship between bone mass and strength at the lumbar vertebra (L4). Scatter plot and regression line were drawn by regression analysis. a) Maximum load and BMC and b) Maximum load and BMD.

Yamada et al., *J Bone Miner Metab.* **2019**, 37, 636-47, Figure 4.

a) Subgroup analysis between maximum load and BMC



b) Subgroup analysis between maximum load and BMD

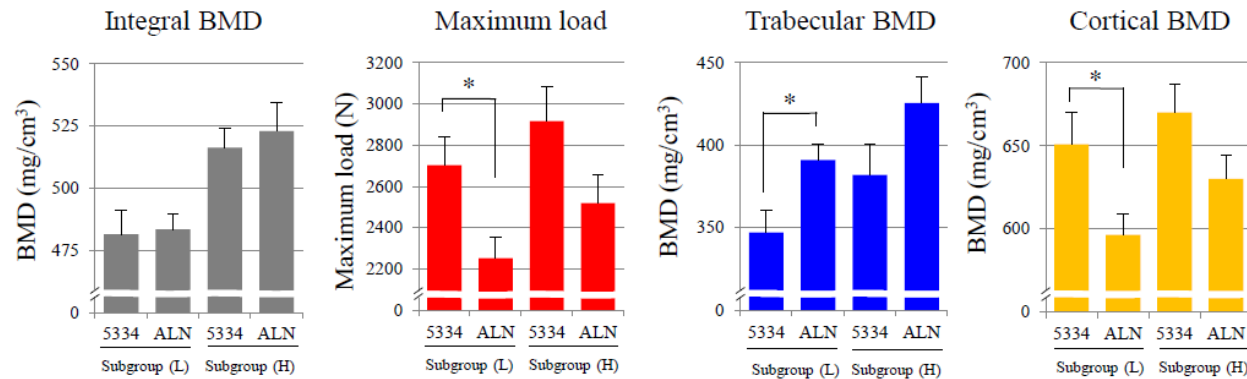


Figure 9. Subgroup analysis between bone mass and bone strength at the lumbar vertebra (L4). a) Subgroup analysis between maximum load and BMC and b) Subgroup analysis between maximum load and BMD. Subgroup (L): lower BMC or BMD group, Subgroup (H): higher BMC or BMD group. Data are expressed as mean ± SE (n = 10 animals). ONO-5334: 30 mg/kg *: p < 0.05, Significantly different from the ALN group.

Yamada et al., *J Bone Miner Metab.* **2019**, 37, 636-47, Figure 5.

4 考察

骨吸収マーカーである血清 CTX-I 及び尿中 NTX、骨形成マーカーである BAP 及び PINP は、卵巣摘出後 16 カ月間、高いレベルに維持されていたことから、臨床と同様に、骨吸収及び骨形成がいずれも亢進した高代謝型の骨粗鬆症が惹起されたと考えられる。ONO-5334 は卵巣摘出により亢進した骨吸収マーカーを偽手術群の半分程度に減少させたが、骨形成マーカーは偽手術群以上のレベルに保っていた。これらの事象は閉経後骨粗鬆症患者に ONO-5334 を投与した臨床試験成績と一致した結果であった[50-51]。ONO-5334 が骨形成よりも骨吸収をより強く抑制する理由について、ONO-5334 の作用が骨の部位によって異なる可能性が考えられた。

骨形態計測の結果、海綿骨では ONO-5334 はアレンドロネートと同様に、骨形成を低下させた。海綿骨では、骨リモデリングにより古い骨が吸収され、新しい骨へと置き換わる。そのため、骨吸収が行われた後に同じ場所で骨形成が起こると考えられる[67]。ONO-5334 とアレンドロネートはいずれも骨吸収を抑制することから、骨吸収に続いて起こる骨形成も抑制したと考えられる。ONO-5334 は大腿骨骨幹部において、オステオンの骨形成を減少させた。卵巣摘出によって亢進した皮質骨外周及び内周の骨形成には影響せず、本作用が、皮質骨サイズの増大に寄与したと考えられる。構造の異なるカテプシン K 阻害剤である Odanacatib[68]や Balicatib[69]でも、同様の事象が報告されている。海綿骨と異なり、皮質骨外膜はモデリング（骨成長）サイトと考えられ、骨吸収の抑制が必ずしも骨形成の抑制に結びつかない。骨形成マーカーは全身の骨形成活動の総和を反映しており、骨形態計測の結果から、ONO-5334 は海綿骨では骨形成を抑制するのに対し、皮質骨外周では骨形成を高いレベルに維持していたと考えられる。

カテプシン K 阻害が骨形成に及ぼす影響として、以下のようなことが考えられる。ヒトの骨生検サンプルでカテプシン K を免疫染色した結果、骨におけるカテプシン K の発現は破骨細胞に限局しており、骨芽細胞など他の骨細胞や骨髄系の細胞には発現していなかった[70]。さらに、骨芽細胞のカテプシン K を欠損させても骨形成及び骨吸収に何も影響は見られなかったことが報告されている[71]。また、ONO-5334 はウサギの骨髄細胞を用いた実験で、骨形成の指標であるアルカリフォスファターゼ活性を減少させなかった（data not shown）。これらのことから、ONO-5334 が直接的に骨形成に影響を与えた可能性は低いと考えられる。

骨形態計測の結果、ONO-5334 は海綿骨の破骨細胞数及び破骨細胞面を用量依存的に増加させた。カテプシン K ノックアウトマウスでは破骨細胞数の指標である血清 TRAP5b 活性が

増加しており、海綿骨においても同様の事象が確認されている[53]。これらの結果から、ONO-5334 は破骨細胞の生存に影響せず、骨吸収能のみを抑制することが示唆された。ONO-5334 の破骨細胞分化に対する影響を確認するために、骨スライス上にヒト末梢血単核細胞を培養し、ONO-5334 を day14-17（破骨細胞分化後に処置）及び day0-17（破骨細胞分化期間も含めて処置）の異なるタイミングで処置した。いずれの処置期間においても骨スライスから遊離される CTX-I の量に変化はなかったことから、ONO-5334 は破骨細胞の分化に影響しないと考えられた[72]。類薬であるカテプシン K 阻害剤 Odanacatib も破骨細胞の生存期間は延長しなかった。カテプシン K 阻害剤による破骨細胞数の増加は、骨吸収抑制作用に対する代償反応の可能性がある[70]。一方で、アレンドロネートは破骨細胞数の指標である破骨細胞面及び血清中 TRAP5b 活性を減少させたことから、ONO-5334 との作用機序の違いが明確に表れた結果と考えられる。骨吸収能を持たない破骨細胞が骨形成を促進するとの報告[73]があることから、ONO-5334 は骨吸収が抑制された破骨細胞数を増加させることで間接的に骨形成を刺激し、この作用により骨吸収と骨形成のアンカップリングを引き起こしている可能性が考えられた。

DXA を用いて、ONO-5334 とアレンドロネートの、様々な骨に対する骨量増加作用を経時的に確認した。ONO-5334 は 1.2 mg/kg の用量において、測定した全ての部位で卵巣摘出による骨密度の低下を抑制し、6 mg/kg 以上の用量では、測定した全ての部位で骨密度を増加させた。アレンドロネートは腰椎、大腿骨頸部、脛骨近位部の骨密度低下を抑制したが、橈骨遠位部では無効であった。また、摘出骨を用いて、海綿骨及び皮質骨を分けて解析したところ、ONO-5334 は海綿骨骨密度だけでなく皮質骨骨密度も増加させ、その程度は海綿骨よりも皮質骨で大きいことが明らかとなった。一方、アレンドロネートは、卵巣摘出による腰椎の骨密度減少は抑制したが、橈骨では作用が見られなかった。これらの結果は、アレンドロネートの非椎体骨への効果は椎体骨への効果よりも弱いという臨床成績と一致する[74-76]。ONO-5334 とアレンドロネートの骨量増加作用が骨の部位によって異なった理由の 1 つとして、両剤の分布特性の違いにより骨吸収抑制作用の違いが出た可能性が考えられた。ONO-5334 は血流を介して、海綿骨及び皮質骨の両方に分布する。放射性同位体で標識した ONO-5334 を用いたサル分布試験において、椎体骨中の ONO-5334 濃度を 100%とした場合、皮質骨中の ONO-5334 濃度は 70%以上であった[77]。一方、アレンドロネートはラットの海綿骨に蓄積することが報告されている[78]。サルにおいても、イバンドロネートの非椎体骨中の濃度は椎体骨中の濃度に比べて 30%以下と報告されている[79]。ビスホスホネートが皮質骨に分布し難い原因として、ビスホスホネートは骨代謝（骨吸収・骨形成）を介して骨に取り込まれるという化合物特性が考えられる。ビスホスホネートは、骨代謝が活発な海綿骨では化合物濃度が高くなるが、骨代謝回転が低い皮質骨には取り込まれにくい。これらのデー

タは、ONO-5334 の非椎体骨に対する作用がアレンドロネートと比較して優れているという結果を支持すると考えられた。

我々は、ビスホスホネート製剤の一つであるミノドロン酸（ONO-5920/YM529）の卵巣摘出カニクイザルを用いた有効性試験[80]において、海綿骨の微細構造は2次元の骨形態計測よりも、 μ CTを用いた3次元解析の方が正確であることを経験している。そのため、 μ CTを用いて、海綿骨構造パラメーターにおけるONO-5334とアレンドロネートの作用の違いを解析した。ONO-5334とアレンドロネートは、卵巣摘出によるBV/TV、Tb.N、Tb.Sp、Conn-Dens及びSMIの悪化を抑制したが、海綿骨の微細構造に対しては、両化合物の作用に明確な違いはなかった。これらの知見は、構造の異なるOdanacatibで見られた事象と一致している[81]。

ONO-5334は6及び30 mg/kgの用量で腰椎の最大荷重を有意に増加させた。ONO-5334の骨強度、骨密度、骨代謝マーカーに対する作用は6 mg/kgでほぼ最大に達したことから、ONO-5334の骨強度に対する有効性は骨代謝マーカーの抑制作用及び骨密度増加作用と連動していると考えられた。そこで、ONO-5334による骨量増加は骨強度の増加に繋がるのか、より詳細に解析するとともに、骨量と骨強度の関係性について、作用機序の異なるアレンドロネートと比較した。骨塩量と骨強度、骨密度と骨強度の相関解析を行ったところ、正の相関がみられたことから、ONO-5334は骨量の増加に伴い、骨強度も増加させることが明らかとなった。さらに、ONO-5334群の回帰直線は、アレンドロネート群よりも骨強度が高い方向へシフトする傾向が見られた。全骨塩量や全骨密度の改善が、ONO-5334とアレンドロネートで同程度であったとしても、骨強度はONO-5334の方が高くなることを示唆している。本事象をさらに解析するために、海綿骨と皮質骨の比率が骨強度に及ぼす影響について検討した。効果の程度を調整して比較するため、腰椎骨塩量が同等となるように両群から抽出し、サブグループ解析を実施したところ、骨強度及び皮質骨骨塩量はアレンドロネート群よりもONO-5334群で高い傾向があり、逆に海綿骨骨塩量はONO-5334群よりもアレンドロネート群で高い傾向があった。骨密度を用いた解析でも同様の傾向であった。これらのことから、骨強度への寄与度は海綿骨よりも皮質骨の方が高い可能性が示唆された。

ONO-5334の閉経後骨粗鬆症患者を対象とした臨床第II相試験において、投与24カ月後のDXA法による骨密度測定結果では、ONO-5334とアレンドロネートのいずれも骨密度を増加させたが、両剤の効果に明確な違いは認められなかった[51]。臨床成績とサルの結果が異なった点に関して、いくつかの仮説が考えられる。DXA法は広く普及した骨密度測定方法であり、臨床第III相試験などでも用いられているが、骨の形状に対する解析や、海綿骨と皮質骨を分けた解析ができないといった課題がある。本課題を踏まえ、我々は臨床第II相試験でpQCTによる解析を実施した。ONO-5334を2年間投与することで、腰椎及び大腿骨頸部の全骨密

度及び海綿骨骨密度は継続的に、かつ有意に増加した。皮質骨骨密度も増加したが、その速度は緩やかであった[82]。サル骨リモデリング期間はヒトの 1/3 であり、サルにおける 16 カ月はヒトの 4 年に相当する[56]。新生骨は石灰化するまでに時間を要することから、短期間では骨密度増加作用を過小評価する可能性があり、両化合物の違いを明らかにするには、より長期間の臨床評価が必要かもしれない。Odanacatib の閉経後骨粗鬆症患者に対する臨床試験では、8 年に渡り、腰椎骨密度が増加することが示されている[83-85]。Odanacatib を投与したサルでは皮質骨外膜で骨形成が促進されていたことから[86]、Odanacatib のヒトでの継続的な骨密度増加は、皮質骨への作用による可能性がある。皮質骨外周などのモデリングサイトでの骨形成の維持は、Denosumab を処置したサルでも見られており、継続的な骨密度増加に繋がる可能性があると考えられている[87]。

一方、Odanacatib の骨粗鬆症を対象とした医薬品開発は中止された。16,000 例以上の閉経後骨粗鬆症患者を組み入れた Odanacatib の臨床第 III 相試験において、Odanacatib は骨折リスク低下作用は示したものの、脳梗塞のリスクを増加させたことが理由である[46, 88]。なお、Odanacatib が脳梗塞のリスクを増加させたメカニズムについては不明である[88]。

カテプシン K を創薬標的とすることの妥当性は、濃化異骨症 (Pycnodysostosis) 患者の情報によっても支持されると考えられる。濃化異骨症はカテプシン K の先天的欠損により発症する常染色体劣性の疾患であり、高骨密度でありながら、生命を脅かすような疾患ではないとされている[89]。

2019 年 5 月現在、MEDIVIR 社のカテプシン K 阻害剤 MIV-711 が変形性関節症を対象に開発されている。カテプシン K による骨吸収と軟骨分解の両方を抑制することにより、変形性関節症への効果が期待されている[90]。

5 小括

- ONO-5334 は卵巣摘出により亢進した骨吸収マーカーを偽手術群以下に減少させたが、骨形成マーカーは偽手術群以下には減少させなかった。
- ONO-5334 が骨形成よりも骨吸収をより強く抑制する理由として、ONO-5334 の骨形成に対する作用が骨の部位によって異なる点が挙げられる。また、ONO-5334 は破骨細胞の骨吸収能のみを抑制することで、骨形成を促進していた可能性も考えられた。
- ONO-5334 は椎体骨（腰椎）だけでなく、非椎体骨（大腿骨頸部、脛骨及び橈骨）においても骨密度を増加させた。ONO-5334 は、特に皮質骨に対して優れた作用を発揮した。ONO-5334 とアレンドロネートの作用の違いは、化合物の骨への分布特性の違いに起因する可能性が考えられた。
- 骨量と骨強度に正の相関が認められたことから、ONO-5334 は骨量の増加に伴って、骨強度を増加させることが確認された。
- 全骨塩量及び全骨密度がほぼ同等となる条件で比較すると、ONO-5334 は海綿骨よりも皮質骨への効果が強い傾向があり、アレンドロネートでは逆の傾向が見られた。ONO-5334 は、骨強度への寄与度が高い皮質骨を増加させることで、非椎体骨で優れた作用を発揮する可能性が示唆された。
- 既存の骨粗鬆症治療薬は非椎体骨での骨折リスク低下作用が限定的であることから、ONO-5334 は、閉経後骨粗鬆症の新たな治療オプションになる可能性が示唆された。

第2章 サルコラーゲン誘発関節炎モデルにおけるカテプシン K 阻害剤

ONO-5334 の予防及びメトトレキサートとの併用効果

1 緒言

RA の治療においては、関節破壊を予防し、関節の生理的機能を保持することが重要である。カテプシン K は破骨細胞に高発現し、骨吸収に重要な役割を果たしている[28, 30, 36-37]。さらに、カテプシン K は RA 患者の滑膜組織にも発現し、関節破壊に関与している可能性がある[91-92]。

関節炎の発症率は男性よりも女性で高いことから、本試験では雌性カニクイザルを用いた[47]。序論でも述べた通り、サルは系統学的にも生理学的にもヒトに近く、サル CIA モデルは、RA 患者での臨床効果を予測する上で、ラット CIA モデルよりも適している可能性がある[47-48]。そこで、本章では、カテプシン K 阻害剤の RA 治療薬としての可能性を検証する目的で、サル CIA モデルを用いて、関節破壊に対する ONO-5334 の予防効果と MTX との併用効果について検討した。なお、我々の知る限り、本試験はカテプシン K 阻害剤の有効性をサル CIA モデルで初めて検討した試験である。

2 実験材料と方法

2-1 被験物質

ONO-5334 は、小野薬品工業株式会社にて合成された。MTX は Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan より購入した。

2-2 動物

本試験は、株式会社新日本科学 安全性研究所の動物実験倫理委員会により承認され（承認番号 D015-092）、動物実験倫理指針に従って実施された。36 頭の雌性カニクイザル（3～6 歳、2.25～3.00 kg）を繁殖業者（Gaoyao Kangda Laboratory Animals Science and Technology Co., LTD., Guangdong, China、Guangzhou Kesen Imports and Exports Co., Ltd., Guangzhou, China、Guangxi Grandforest Scientific Primate Co., Ltd., Guangxi, China 及び Guangdong Scientific

Instruments and Material Import / Export Corporation, Guangzhou, China) より入手し、12 時間毎の明暗サイクル、24.2~26.4°C、湿度 46~65%の条件で個別に飼育した。約 108 g の固型飼料 (HF Primate 5K91 12G 5K9J、Purina Mills, LLC, MO, USA) を 1 日 1 回与えた。水道水を自動給水装置を用いて自由に摂取させた。体重の層別無作為化により 4 群 (対照群、ONO-5334 群、MTX 群、ONO-5334+MTX 群) に分けた。

2-3 コラーゲン関節炎の惹起

ウシ II 型コラーゲンを Freund 完全アジュバントと共に免疫することによって関節炎を誘発した[93]。すなわち、冷却したウシ II 型コラーゲン溶液 (4 mg/mL、コラーゲン技術研修会, Tokyo, Japan) 及び Freund 完全アジュバント (Becton Dickinson, Grayson, GA, USA) を等量混合し、冷却したシリンジを用いて懸濁してエマルジョンを作製した。エマルジョン (2 mL/個体) を各個体の背部皮内 (19 カ所) 及び尾根部 (1 カ所) に皮内投与し、1 回目の感作とした。感作 1 回目 (投与 1 日目) の 3 週間後 (投与 22 日目) に 2 回目の感作を同様に行った。

2-4 被験物質の投与

ONO-5334 は 0.5%メチルセルロース (MC) に懸濁した。MTX は 10 mg をゼラチンカプセル (サイズ#2、有限会社ノイチ, Japan) に充填した。対照群には 0.5%MC を 1 日 1 回、空カプセルを週に 2 回、経口投与した。ONO-5334 群と併用群には ONO-5334 を 30 mg/kg の用量で 1 日 1 回、経口投与した。MTX 群と併用群には、10 mg の MTX を含有したカプセルを週に 2 回、経口投与した。ONO-5334 群と MTX 群には、それぞれ、空カプセルを週に 2 回、0.5% MC を 1 日 1 回、経口投与した。被験物質は感作 1 回目から 9 週間投与した。ONO-5334 の用量は卵巣摘出サル骨粗鬆症モデルを参考に設定した[94]。ONO-5334 は 30 mg/kg の用量で、卵巣摘出による骨量及び骨強度の減少を抑制した。サル CIA モデル構築の予備試験において、MTX は 10 mg の週 2 回投与で、指関節の腫脹を抑制した[95]。

Table 10. 実験群の構成。

群	被験物質及び媒体	投与量	評価対象の動物番号 (例数)
1	0.5 w/v% MC	—	1～6、8、9
	空カプセル	—	(8)*
2	ONO-5334	30 mg/kg	10～18
	空カプセル	—	(9)
3	0.5 w/v% MC	—	19～25、27
	MTX	10 mg/body	(8)*
4	ONO-5334	30 mg/kg	28～36
	MTX	10 mg/body	(9)

*：動物番号7及び26は途中死亡例のため、評価対象としなかった。

2-5 全身状態の評価

感作1回目の前、3、5、7及び9週後に動物の全身状態を評価した。全身状態スコアの判定基準は以下の通り。

- スコア0： 異常なし
- スコア1： ケージ内を移動する際、指を使った移動が困難な状態
- スコア2： ケージ内で指を使った移動ができない状態
- スコア3： 前肢または後肢のみによる移動がみられる状態
- スコア4： うずくまり状態

2-6 関節腫脹の評価

感作1回目の前、3、5、7及び9週後に関節腫脹を評価した。塩酸ケタミン（50 mg/mL、0.2 mL/kg、Kamud Drugs Pvt. Ltd., Maharashtra, India）の筋肉内投与による麻酔下で、前肢及び後肢の遠位指節間（DIP）関節、近位指節間（PIP）関節及び中手指節間（MP）関節（第1指はIP及びMP関節）並びに手首、足首、肘及び膝の関節腫脹（計64関節/個体）について、以下の判定基準に従いブラインドで評価した[95]。個体ごとに各部位のスコアの合計を算出して関節腫脹スコアとした（arthritic score: 0–4、total 64 joints/body、maximum score: 256）。

- スコア0： 異常なし
- スコア1： 触診によって腫脹が確認できる
- スコア2： 肉眼的な観察で腫脹が疑われ、触診して腫脹が確認できる

スコア 3： 肉眼的な観察のみで腫脹が確認できる

スコア 4： 固縮

2-7 関節破壊の評価

感作 1 回目の前及び 9 週後に塩酸ケタミンで 2-6 と同様に動物を麻酔し、据置型デジタル式汎用 X 線透視診断装置 (DREX-WIN64、株式会社東芝メディカルシステムズ, Japan) を用いて、指関節のレントゲン写真を撮影した。前肢及び後肢の第 2、3、4 及び 5 指の DIP、PIP 及び MP 関節 (計 48 関節/個体) について、ブラインドで、以下の所見を観察し、関節破壊の重症度を評価した[95]。なお、骨びらんあるいは関節破壊が観察された場合、関節裂隙狭小化や骨萎縮の所見はとらなかった。異常を認めた関節数をレントゲン検査スコアとした (maximum score: 48)。また、以下の所見が観察された割合を、全関節 (DIP+PIP+MP) 及び各関節毎に集計した。

異常なし：	0 点		No abnormality
関節裂隙狭小化：	1 点	}	Mild
骨萎縮：	1 点		
関節裂隙狭小化及び骨萎縮：	1 点		
骨びらん：	1 点	}	Severe
関節破壊：	1 点		

2-8 骨及び軟骨代謝マーカーの評価

感作 1 回目の前、3、5、7 及び 9 週後に 24 時間畜尿し、採尿を行った。尿検体は採取後遠心し、上清を -70℃ で保管した。

2-8-1 尿中 CTX-I 及び CTX-II 濃度の測定

尿中 CTX-I 及び CTX-II 濃度は、それぞれ Urine CrossLaps ELISA (Immunodiagnostic Systems Ltd., Boldon, UK) 及び Pre-clinical CartiLaps ELISA (Immunodiagnostic Systems Ltd., Boldon, UK) を用いて測定した。尿中 CTX-I 及び CTX-II は尿中クレアチニン濃度で補正した。

2-9 統計学的解析

データ集計、平均値及び標準誤差の算出、並びに図の作成は、Microsoft Excel 2002 (マイクロソフト株式会社) を使用した。中央値及び第 1、3 四分位点の算出、並びに統計解析は SAS 9.1 (SAS Institute Japan 株式会社) を用いて行った。全身状態スコア及び関節腫脹スコアについて、対照群、ONO-5334 群、メトトレキサート群及び併用群の間で Steel-Dwass 検定を行った。レントゲン検査スコア、尿中 CTX-I 及び CTX-II 濃度について、対照群、ONO-5334 群、メトトレキサート群及び併用群の間で Tukey 検定を行った。有意水準は両側 5% とした。関

節腫脹スコアとレントゲン検査スコアの関係について、Spearman の相関検定を行った。投与期間中に死亡した 2 例（対照群：1 例、MTX 群：1 例）はデータ解析から除外した。

3 結果

3-1 全身状態スコア

対照群の全身状態スコアは、病態惹起後、時間の経過と共に増加した（Table 11）。投与期間中、対照群の 1 例、ONO-5334 群の 4 例、MTX 群の 6 例、併用群の 4 例に、異常所見は認められなかった。ONO-5334 群、MTX 群及び併用群の全身状態スコアの平均値は、対照群に比べてやや低く推移したものの、有意差は認められなかった。

Table 11. General condition score in collagen-induced arthritis monkeys.

Treatment Group	Dosing (Day)				
	Pre-dose	21	35	49	63
Control	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.3	1.1 ± 0.4	1.3 ± 0.5	1.3 ± 0.4
ONO-5334	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.2
MTX	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.3	0.4 ± 0.4	0.5 ± 0.5
ONO-5334/MTX	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.4	0.7 ± 0.3

Data are presented as mean ± SE; Control (n=8), ONO-5334 (n=9), Methotrexate (n=8), Combination (n=9). The general condition of animals was evaluated in accordance with the following criteria: Score 0 - no abnormality; Score 1 - difficulty in hanging from the bars of the home cage by the fingers; Score 2 - inability to hang from the bars of the home cage by the fingers (using wrist); Score 3 - movement only by using forelimbs or hindlimbs; Score 4 - crouching.

Yamada et al., *Int J Rheumatol.* **2019**, Article ID 5710340, 9 pages, Table 1.

3-2 関節腫脹スコア

対照群の関節腫脹スコアは感作 7 週後まで増加した（Figure 10）。ONO-5334 は関節腫脹を軽減しなかったが、MTX 群及び併用群では、同程度に関節腫脹が抑制された。感作 7 及び 9 週後の MTX 群と併用群の関節腫脹スコアの中央値は対照群の 50%以下であったが、有意な差は認められなかった。

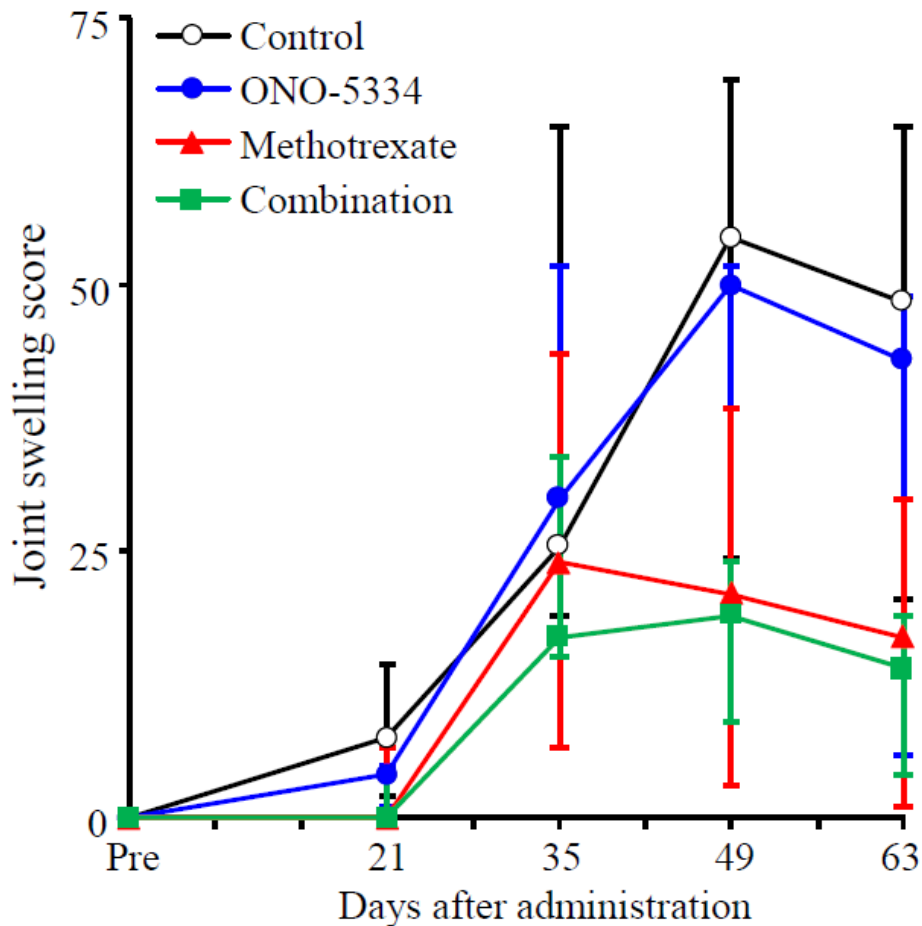


Figure 10. Joint swelling score in collagen induced arthritis monkeys. The swelling levels of DIP, PIP and MP joints in 5 digits of the fore and hind limbs as well as wrist, ankle, elbow, and knee joints in individual animals were evaluated in a blinded manner in accordance with the following criteria: Score 0 - no abnormality; Score 1 - swelling not visible but can be determined by touch; Score 2 - swelling slightly visible and can be confirmed by touch; Score 3 - swelling clearly visible; Score 4 - rigidity of the joints. The maximum score is 256 (total 64 joints/body and arthritic score 0–4). Data are expressed as median (Quantile 3-1); Control (n=8), ONO-5334 (n=9), Methotrexate (n=8), Combination (n=9).

Yamada et al., *Int J Rheumatol.* 2019, Article ID 5710340, 9 pages, Figure 1.

3-3 関節破壊スコア

感作 1 回目の前に実施したレントゲン検査では、いずれの個体にも異常所見は認められなかった。感作 1 回目の 9 週間後、ONO-5334 は対照群と比較して、関節破壊スコアを 64%減少させた ($p<0.05$) (Figure 11)。MTX は 46%関節破壊スコアを減少させたが、有意差は認められなかった。ONO-5334 と MTX の併用により、対照群と比較して、関節破壊スコアは 74%まで減少した ($p<0.01$)。

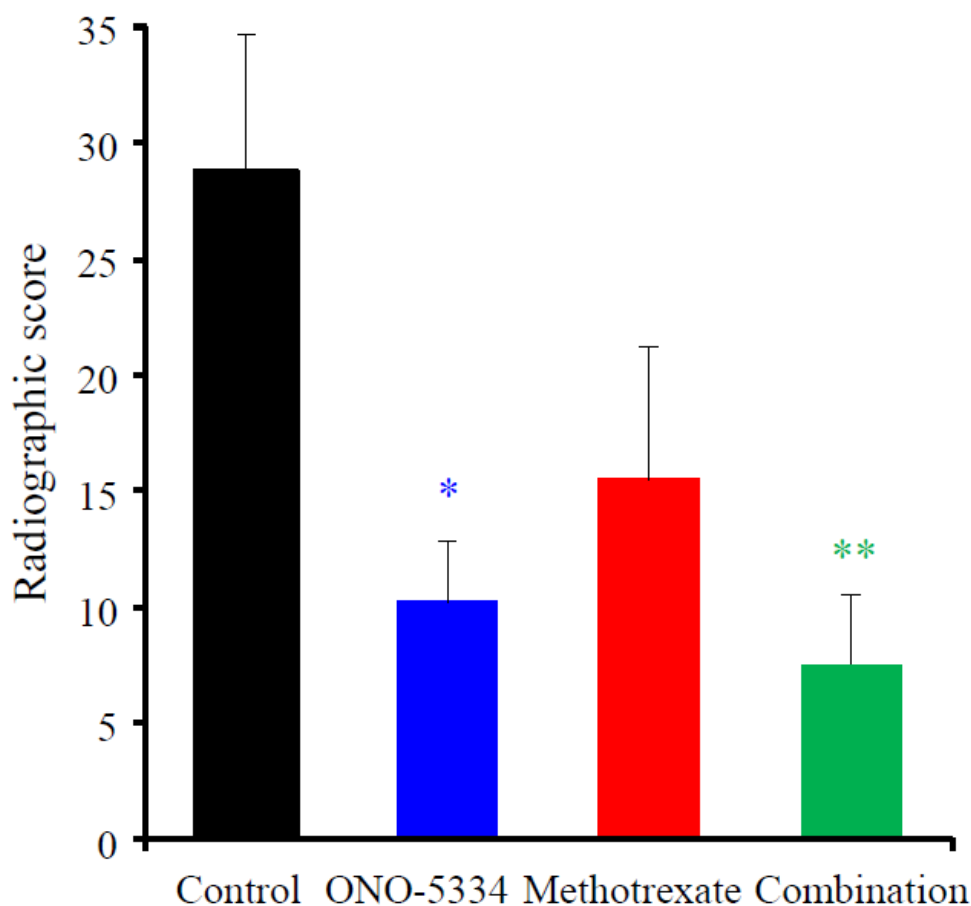


Figure 11. X ray examination of total affected joint number (DIP, PIP and MP joints in the second, third, fourth and fifth digits of the forelimbs and hindlimbs: total 48 joints/monkey) in collagen induced arthritis monkeys. Data are expressed as mean \pm SE of Control (n=8), ONO-5334 (n=9), Methotrexate (n=8) and Combination (n=9) groups. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ versus control group (Tukey test).

Yamada et al., *Int J Rheumatol.* 2019, Article ID 5710340, 9 pages, Figure 2.

次に、指関節の関節破壊の程度を群間で比較した。全関節を合計して解析した結果 (Figure 12a)、ONO-5334群では対照群と比較して異常所見のない関節数の割合が高く (79% vs 40%)、併用群においても MTX 単独群より高かった (84% vs 68%)。逆に、重篤な関節破壊が起こった関節数の割合は ONO-5334 群で対照群より低く (11% vs 32%)、併用群においても MTX 単独群より低かった (5% vs 20%)。DIP、PIP 及び MP 関節を個別に解析した結果 (Figure 12b-d)、関節破壊の程度は部位によって異なっていた。対照群で重篤な関節破壊が起こった関節数の割合は MP 関節に比べ、DIP 及び PIP 関節で高かった。ONO-5334 はいずれの関節においても、重篤な関節破壊が起こった関節数の割合を、対照群と比較して減少させ、併用群においても MTX 単独群より減少させた。

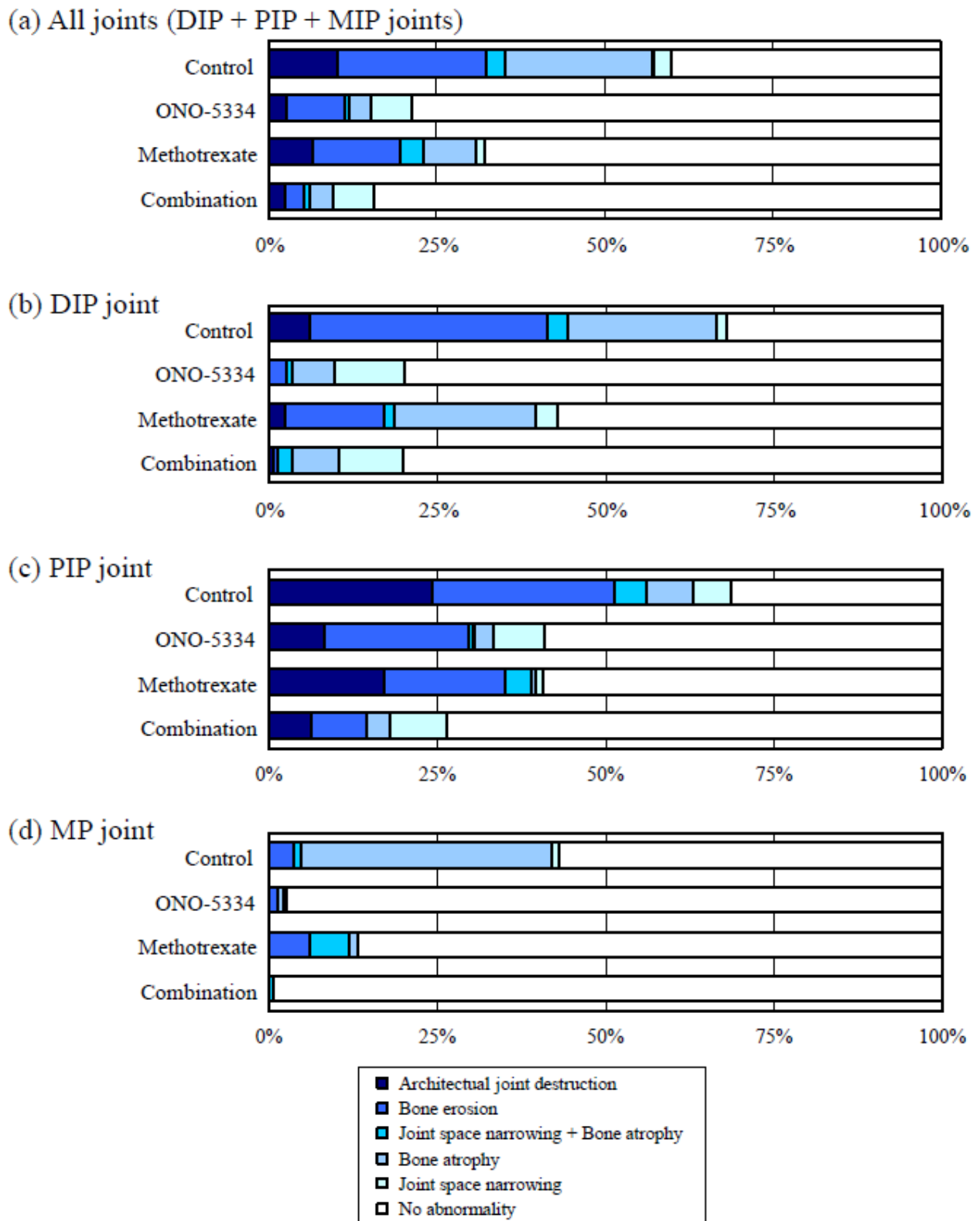


Figure 12. Severity of joint destruction at (a) all, (b) DIP, (c) PIP and (d) MP joints in collagen-induced arthritis monkeys. The number of all joints (DIP + PIP + MP) was 384 (48 joints/monkey, n=8) in the control and MTX group and 432 (48 joints/monkey, n=9) in the ONO-5334 and ONO-5334/MTX groups.

Yamada et al., *Int J Rheumatol.* 2019, Article ID 5710340, 9 pages, Figure 3.

3-4 関節腫脹スコアと関節破壊スコアの関連性

ピーク時の関節腫脹スコアと感作 1 回目の 9 週後における関節破壊スコアは有意に相関した (相関係数、 p 値) ; 対照群 (0.89、 $p < 0.01$)、ONO-5334 群 (0.87、 $p < 0.01$)、MTX 群 (0.94、 $p < 0.01$)、併用群 (0.87、 $p < 0.01$)。関節腫脹スコアと関節破壊スコアは直線的な相関関係にあったが、各個体の分布は群によって異なっていた。ONO-5334 群は対照群に比べて、関節破壊スコアが低いゾーンに分布したが、関節腫脹スコアでは大きな差はなかった。MTX 群では対照群に比べて、関節腫脹及び関節破壊スコアは共に低くなった。併用群では、MTX 群に比べて関節破壊スコアのみ低いゾーンに分布した (Figure 13)。

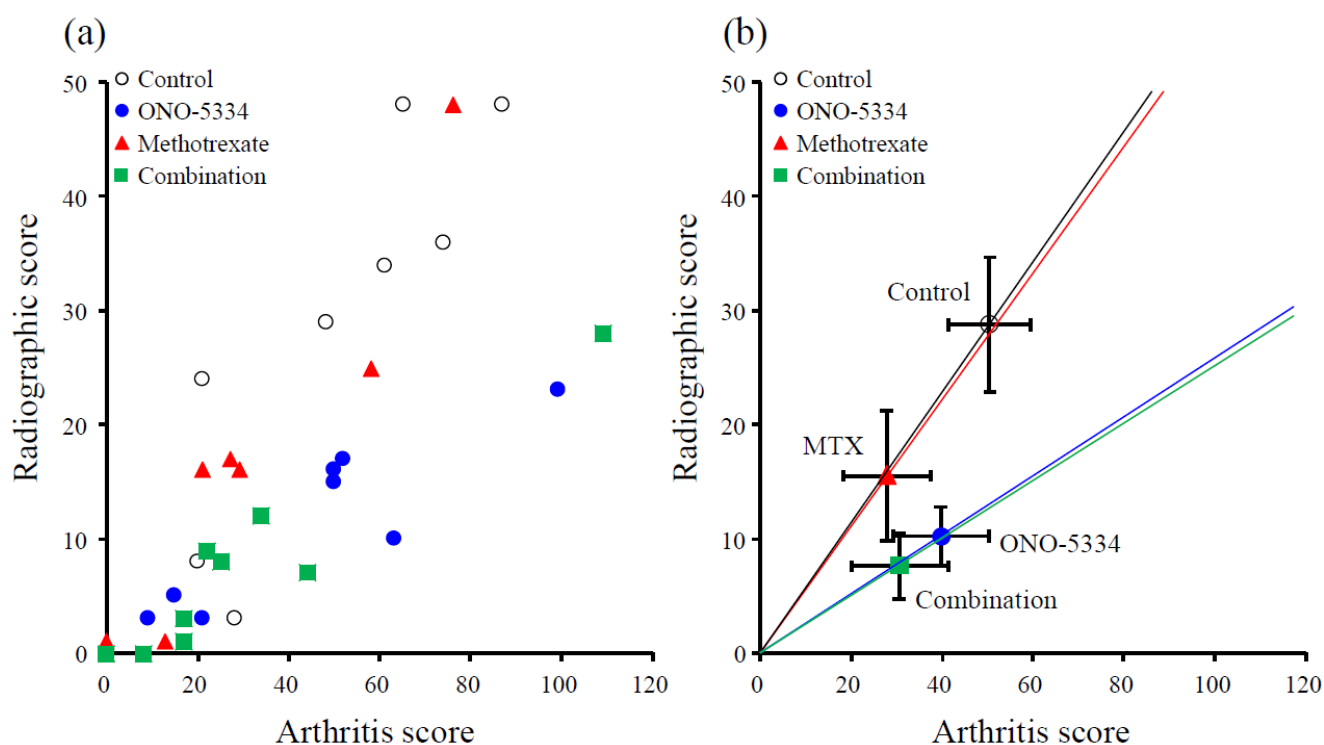


Figure 13. Relation between joint swelling score at peak and X-ray score at day 63 for (a) individual animals and (b) treatment groups in collagen-induced arthritis monkeys. Data are expressed as mean \pm SE; Control (n=8), ONO-5334 (n=9), Methotrexate (n=8), Combination (n=9).

Yamada et al., *Int J Rheumatol.* 2019, Article ID 5710340, 9 pages, Figure 4.

3-5 骨及び軟骨代謝マーカー

骨吸収マーカーである尿中 CTX-I は感作により著しく増加し、感作 1 回目の 7 週後には、中央値で感作前の 10 倍まで増加した。その後緩やかに減少し、試験終了時点では 6 倍の増加となった (Figure 14a)。ONO-5334 及び併用群では、尿中 CTX-I 濃度は感作前と同程度に維持されており、感作 1 回目の 3、5 及び 7 週後では、対照群と比較して有意な差が認められた。MTX は、感作 1 回目の 3 週後に、対照群に比べて CTX-I を有意に抑制したが、感作 1 回目の

5 週後以降は対照群と同様に推移した。軟骨代謝マーカーである尿中 CTX-II は、感作 1 回目の 3 週間後には、感作前の 7 倍まで増加した。その後緩やかに減少し、試験終了時点では 3 倍の増加となった (Figure 14b)。ONO-5334 群、MTX 群及び併用群では、CTX-II の増加は抑制されたが、有意差はなかった。

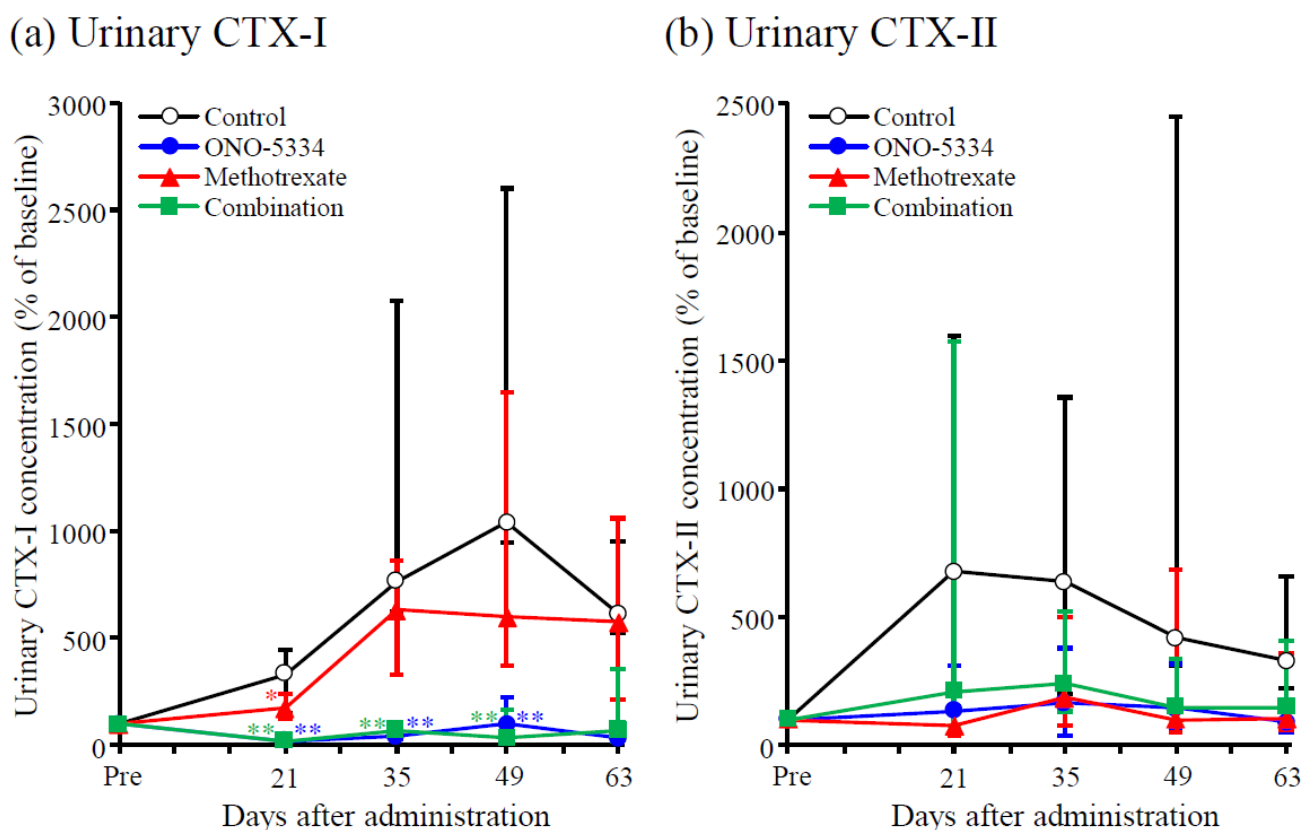


Figure 14. Percent changes in urinary CTX-I (a) and CTX-II (b) in collagen-induced arthritis monkeys. Data are expressed as median (Quantile 3-1); Control (n=8), ONO-5334 (n=9), Methotrexate (n=8), Combination (n=9). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ versus control group (Tukey test).

Yamada et al., *Int J Rheumatol.* 2019, Article ID 5710340, 9 pages, Figure 5.

4 考察

本試験の結果、ONO-5334 は関節腫脹を抑制しなかった。これまでにカテプシン K 阻害剤がアジュバンド関節炎 (AIA) ラット[96]や CIA マウス[42]において、炎症を部分的に抑制したとの報告がある。カテプシン K 阻害剤がげっ歯類で抗炎症作用を発揮する理由は明らかではないが、カテプシン K 阻害剤である NC-2300 が TLR-9 経路を介して IL-12 産生を抑制する

ことが一機序として考察されている[96]。我々は ONO-5334 にも NC-2300 と同様の作用があるのか、ヒト及びマウス樹状細胞を用いて検討した。マウス樹状細胞において、TLR-9 のリガンドである CpG 刺激による IL-12 産生を、ONO-5334 が有意に抑制することを確認した[97]。しかしながら、ヒト樹状細胞では、TLR-9 経路は ONO-5334 によって阻害されなかった[98]。これら一連の結果から、カテプシン K はサル CIA モデルの炎症に重要な役割を果たしておらず、げっ歯類で認められたカテプシン K 阻害剤による抗炎症作用は、サルへの外挿性に乏しい可能性が示唆された。

レントゲン検査の結果、ONO-5334 群と併用群では、関節裂隙狭小化、骨萎縮、骨びらん、関節破壊の程度が対照群に比べて軽減されていた。また、ONO-5334 群と併用群では、CTX-I 及び CTX-II がベースラインレベルあるいは以下に維持されていた。本モデルでは、ONO-5334 の抗炎症作用が認められなかったことを踏まえると、ONO-5334 は直接、骨及び軟骨破壊を抑制することで、関節破壊の進行を予防した可能性が考えられた。

ONO-5334 と MTX を併用することで、関節腫脹スコアは ONO-5334 単独に比べ低下した。MTX 群と併用群の関節腫脹スコアが同程度であったことから、併用による関節腫脹スコアの低下は MTX に寄与するものと考えられた。同様に、併用群の関節破壊スコアは MTX 群よりも低かったことから、ONO-5334 は MTX の関節破壊抑制効果を増強する可能性が考えられた。ONO-5334 と MTX が関節破壊に及ぼす影響を考察するため、関節腫脹スコアと関節破壊スコアの散布図から、相関解析を行った。対照群では関節腫脹スコアと関節破壊スコアが直線的な相関関係にあったことから、炎症の程度に応じて、関節破壊が進行することが示唆された。MTX 群の分布は、程度の差はあるものの、対照群と同軸方向であったことから、MTX は関節腫脹を抑制することで、関節破壊を抑制したと考えられる。一方、ONO-5334 は抗炎症作用を示さず関節破壊を抑制した。ONO-5334 群の分布は MTX 群と異なっており、この違いは ONO-5334 と MTX の作用機序の違いによるものと考えられた。

抗 RANKL 抗体である Denosumab は、RA 患者の骨びらん及び CTX-I をプラセボ群と比較して有意に抑制したとの報告がある[99]。本結果は、RA 患者において、骨吸収の抑制は関節破壊の抑制につながることを示唆するエビデンスである。しかしながら、軟骨破壊の指標である関節裂隙狭小化は Denosumab により改善しなかった。その理由として、Denosumab が CTX-II を抑制しなかったことが挙げられる。II 型コラーゲンは軟骨の主要な構成成分の 1 つであり、カテプシン K によって分解されることが知られている[31, 35]。従って、カテプシン K は関節軟骨の破壊にも関与すると考えられる。興味深いことに、ONO-5334 は閉経後女性において尿中の CTX-II を有意に減少させた[50]ことから、ONO-5334 は RA 患者の軟骨破壊を抑制できる可能性がある。ONO-5334 の骨粗鬆症を対象とした臨床第 II 相試験において、治

療上問題となる安全性の懸念はなかった[51]。ONO-5334 は生物製剤と比較し、安全性及び利便性に優れ、RA による関節破壊を予防する薬剤になる可能性がある。

本試験の限界として、個々の動物における関節炎のバラツキが大きく、関節破壊スコア及び尿中 CTX-I を除く他の測定項目に関して、統計学的有意差が得られなかったことが挙げられる。関節炎の発症率が、げっ歯類の CIA モデルでは 100%であるのに対し、サル CIA では 60%であることが報告されている[47]。もう一つの研究の限界として、本病態モデルの関節炎の程度が、RA 患者に比べてかなり重篤であった可能性が挙げられる。本モデルでは、ピーク時の尿中 CTX-I 及び CTX-II は、ベースラインに比べてそれぞれ 10 倍及び 7 倍まで増加した。RA 患者では健康成人に比べて尿中 CTX-II が約 2 倍に増加するとの報告がある[100]。さらに、本試験では、9 週間で関節破壊が認められており、臨床に比べてはるかに短い期間で病態が進行していると考えられた。

5 小括

- ONO-5334 は、サル CIA モデルにおいて、関節裂隙の狭小化、骨萎縮、骨びらん及び関節破壊を抑制した。
- ONO-5334 の関節腫脹に対する有効性は認められなかった。
- ONO-5334 と MTX を併用することで、関節破壊や骨吸収マーカーである CTX-I が、MTX 単独群に比べて減少することが明らかとなった。
- ONO-5334 を MTX に併用することで、関節腫脹への上乗せ効果はなかったが、関節破壊は、MTX 単独群に比べて軽減された。

総括

本研究では、カテプシン K 阻害剤である ONO-5334 の骨粗鬆症及び関節リウマチにおける有効性を、ヒトに近いサルを用いて検証した。

第 1 章では、サル卵巢摘出 (OVX) 骨粗鬆症モデルにおける骨代謝マーカー、骨密度、骨強度及び骨形態計測に対する ONO-5334 の作用について、アレンドロネートと比較検討した。ONO-5334 は OVX により増加した骨吸収マーカーを偽手術群の半分程度まで減少させたが、骨形成マーカーは偽手術群と同等以上に維持していた。一方、アレンドロネートは骨吸収及び骨形成マーカーのいずれも同程度減少させた。骨形態計測の結果、アレンドロネートは破骨細胞数を減少させたが、ONO-5334 は破骨細胞数を増加させた。ONO-5334 は腰椎だけでなく、大腿骨、脛骨及び橈骨においても、骨密度を偽手術群以上に増加させた。アレンドロネートは、腰椎の骨密度は増加させたが、橈骨では無効であった。ONO-5334 は腰椎及び橈骨の骨強度を増加させた。腰椎の骨量及び骨強度の相関を解析したところ、正の相関が認められたことから、ONO-5334 は骨量の増加に伴い骨強度を増加させることが確認された。

第 2 章では、雌性カニクイザルを用いたコラーゲン誘発関節炎 (CIA) モデルにおいて、ONO-5334 の関節破壊に対する予防及び MTX との併用効果について検討した。ONO-5334 は関節腫脹に対して作用を示さなかったが、MTX 及び ONO-5334 と MTX の併用群では、関節腫脹が抑制された。X 線スコアは ONO-5334 及び併用群で減少した。指関節の関節破壊の程度を比較したところ、ONO-5334 群及び併用群では、関節裂隙狭小化、骨萎縮、骨びらん、関節破壊の程度が対照群に比べて軽減された。CIA により、骨代謝マーカーである CTX-I 及び軟骨代謝マーカーである CTX-II は、ベースラインのそれぞれ 10 倍及び 7 倍まで増加したが、ONO-5334 群及び併用群では、いずれのマーカーもベースライン付近を維持していた。

以上、骨粗鬆症において、ONO-5334 はビスホスホネート製剤の効果は十分ではない非椎体骨に対して、優れた作用を有する薬剤となる可能性が示された。また、関節リウマチでは、ONO-5334 は関節炎を抑制しなかったものの、関節破壊は抑制した。ONO-5334 は MTX と併用することで、MTX の関節破壊抑制作用を高める可能性が示唆された。

謝辞

本論文を発表する機会を与えていただき、また、論文作成に関してご助言、ご指導を賜りました京都薬科大学 薬物治療学分野 加藤 伸一 教授に深く御礼申し上げます。また、本論文の作成に当たり、ご助言並びにご高閲を賜りました、京都薬科大学 病態生化学分野 秋葉 聡 教授、並びに薬理学分野 田中 智之 教授に深甚なる感謝の意を表します。

さらに、本研究の遂行にあたり、多大なるご指導を賜りました小野薬品工業株式会社 川瀬 和一十 博士、越智 保夫 博士、田中 真 博士及び共同研究者である森 裕史 博士、橋本 泰明 博士、西川 聡 氏、中西 康友 氏に厚く御礼申し上げます。

最後に、本論文作成を陰ながら支えてくれた家族（妻と3人の子供達）に感謝したい。

引用文献

1. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* **1994**, *843*, 1-129.
2. Borges, J. L.; Bilezikian, J. P., Update on osteoporosis therapy. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **2006**, *50* (4), 755-63.
3. Qu, X.; Huang, X.; Jin, F.; Wang, H.; Hao, Y.; Tang, T.; Dai, K., Bone mineral density and all-cause, cardiovascular and stroke mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Int J Cardiol* **2013**, *166* (2), 385-93.
4. Nih Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, D.; Therapy, Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* **2001**, *285* (6), 785-95.
5. Watts, N. B.; Diab, D. L., Long-term use of bisphosphonates in osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* **2010**, *95* (4), 1555-65.
6. Russell, R. G., Pharmacological diversity among drugs that inhibit bone resorption. *Curr Opin Pharmacol* **2015**, *22*, 115-30.
7. Black, D. M.; Delmas, P. D.; Eastell, R.; Reid, I. R.; Boonen, S.; Cauley, J. A.; Cosman, F.; Lakatos, P.; Leung, P. C.; Man, Z.; Mautalen, C.; Mesenbrink, P.; Hu, H.; Caminis, J.; Tong, K.; Rosario-Jansen, T.; Krasnow, J.; Hue, T. F.; Sellmeyer, D.; Eriksen, E. F.; Cummings, S. R.; Trial, H. P. F., Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* **2007**, *356* (18), 1809-22.
8. Chesnut, C. H., 3rd; Skag, A.; Christiansen, C.; Recker, R.; Stakkestad, J. A.; Hoiseth, A.; Felsenberg, D.; Huss, H.; Gilbride, J.; Schimmer, R. C.; Delmas, P. D.; Oral Ibandronate Osteoporosis Vertebral Fracture Trial in North, A.; Europe, Effects of oral ibandronate administered daily or intermittently on fracture risk in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* **2004**, *19* (8), 1241-9.
9. Lenart, B. A.; Lorich, D. G.; Lane, J. M., Atypical fractures of the femoral diaphysis in postmenopausal women taking alendronate. *N Engl J Med* **2008**, *358* (12), 1304-6.
10. Tamminen, I. S.; Yli-Kyyny, T.; Isaksson, H.; Turunen, M. J.; Tong, X.; Jurvelin, J. S.; Kroger, H., Incidence and bone biopsy findings of atypical femoral fractures. *J Bone Miner Metab* **2013**, *31* (5), 585-94.
11. Sellmeyer, D. E., Atypical fractures as a potential complication of long-term bisphosphonate therapy. *JAMA* **2010**, *304* (13), 1480-4.
12. Schneider, J. P., Should bisphosphonates be continued indefinitely? An unusual fracture in a healthy woman on long-term alendronate. *Geriatrics* **2006**, *61* (1), 31-3.
13. Odvina, C. V.; Zerwekh, J. E.; Rao, D. S.; Maalouf, N.; Gottschalk, F. A.; Pak, C. Y., Severely suppressed bone turnover: a potential complication of alendronate therapy. *J Clin Endocrinol Metab* **2005**, *90* (3), 1294-301.

14. Finkelstein, J. S.; Hayes, A.; Hunzelman, J. L.; Wyland, J. J.; Lee, H.; Neer, R. M., The effects of parathyroid hormone, alendronate, or both in men with osteoporosis. *N Engl J Med* **2003**, *349* (13), 1216-26.
15. Finkelstein, J. S.; Wyland, J. J.; Lee, H.; Neer, R. M., Effects of teriparatide, alendronate, or both in women with postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* **2010**, *95* (4), 1838-45.
16. Parfitt, A. M., The coupling of bone formation to bone resorption: a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. *Metab Bone Dis Relat Res* **1982**, *4* (1), 1-6.
17. Gennari, L.; Rotatori, S.; Bianciardi, S.; Nuti, R.; Merlotti, D., Treatment needs and current options for postmenopausal osteoporosis. *Expert Opin Pharmacother* **2016**, *17* (8), 1141-52.
18. Mukherjee, K.; Chattopadhyay, N., Pharmacological inhibition of cathepsin K: A promising novel approach for postmenopausal osteoporosis therapy. *Biochem Pharmacol* **2016**, *117*, 10-9.
19. McInnes, I. B.; Schett, G., The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* **2011**, *365* (23), 2205-19.
20. Singh, J. A.; Furst, D. E.; Bharat, A.; Curtis, J. R.; Kavanaugh, A. F.; Kremer, J. M.; Moreland, L. W.; O'Dell, J.; Winthrop, K. L.; Beukelman, T.; Bridges, S. L., Jr.; Chatham, W. W.; Paulus, H. E.; Suarez-Almazor, M.; Bombardier, C.; Dougados, M.; Khanna, D.; King, C. M.; Leong, A. L.; Matteson, E. L.; Schousboe, J. T.; Moynihan, E.; Kolba, K. S.; Jain, A.; Volkman, E. R.; Agrawal, H.; Bae, S.; Mudano, A. S.; Patkar, N. M.; Saag, K. G., 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* **2012**, *64* (5), 625-39.
21. Smolen, J. S.; Breedveld, F. C.; Burmester, G. R.; Bykerk, V.; Dougados, M.; Emery, P.; Kvien, T. K.; Navarro-Compan, M. V.; Oliver, S.; Schoels, M.; Scholte-Voshaar, M.; Stamm, T.; Stoffer, M.; Takeuchi, T.; Aletaha, D.; Andreu, J. L.; Aringer, M.; Bergman, M.; Betteridge, N.; Bijlsma, H.; Burkhardt, H.; Cardiel, M.; Combe, B.; Durez, P.; Fonseca, J. E.; Gibofsky, A.; Gomez-Reino, J. J.; Graninger, W.; Hannonen, P.; Haraoui, B.; Kouloumas, M.; Landewe, R.; Martin-Mola, E.; Nash, P.; Ostergaard, M.; Ostor, A.; Richards, P.; Sokka-Isler, T.; Thorne, C.; Tzioufas, A. G.; van Vollenhoven, R.; de Wit, M.; van der Heijde, D., Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis* **2016**, *75* (1), 3-15.
22. Smolen, J. S.; Landewe, R.; Breedveld, F. C.; Buch, M.; Burmester, G.; Dougados, M.; Emery, P.; Gaujoux-Viala, C.; Gossec, L.; Nam, J.; Ramiro, S.; Winthrop, K.; de Wit, M.; Aletaha, D.; Betteridge, N.; Bijlsma, J. W.; Boers, M.; Buttgerit, F.; Combe, B.; Cutolo, M.; Damjanov, N.; Hazes, J. M.; Kouloumas, M.; Kvien, T. K.; Mariette, X.; Pavelka, K.; van Riel, P. L.; Rubbert-Roth, A.; Scholte-Voshaar, M.; Scott, D. L.; Sokka-Isler, T.; Wong, J. B.; van der Heijde, D., EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis* **2014**, *73* (3), 492-509.

23. Sokka, T.; Pincus, T., Contemporary disease modifying antirheumatic drugs (DMARD) in patients with recent onset rheumatoid arthritis in a US private practice: methotrexate as the anchor drug in 90% and new DMARD in 30% of patients. *J Rheumatol* **2002**, *29* (12), 2521-4.
24. Aletaha, D.; Smolen, J. S., The rheumatoid arthritis patient in the clinic: comparing more than 1,300 consecutive DMARD courses. *Rheumatology (Oxford)* **2002**, *41* (12), 1367-74.
25. Kremer, J. M.; Genovese, M. C.; Cannon, G. W.; Caldwell, J. R.; Cush, J. J.; Furst, D. E.; Luggen, M. E.; Keystone, E.; Weisman, M. H.; Bensen, W. M.; Kaine, J. L.; Ruderman, E. M.; Coleman, P.; Curtis, D. L.; Kopp, E. J.; Kantor, S. M.; Waltuck, J.; Lindsley, H. B.; Markenson, J. A.; Strand, V.; Crawford, B.; Fernando, I.; Simpson, K.; Bathon, J. M., Concomitant leflunomide therapy in patients with active rheumatoid arthritis despite stable doses of methotrexate. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* **2002**, *137* (9), 726-33.
26. Weinblatt, M. E.; Kaplan, H.; Germain, B. F.; Block, S.; Solomon, S. D.; Merriman, R. C.; Wolfe, F.; Wall, B.; Anderson, L.; Gall, E.; et al., Methotrexate in rheumatoid arthritis. A five-year prospective multicenter study. *Arthritis Rheum* **1994**, *37* (10), 1492-8.
27. Bossard, M. J.; Tomaszek, T. A.; Thompson, S. K.; Amegadzie, B. Y.; Hanning, C. R.; Jones, C.; Kurdyla, J. T.; McNulty, D. E.; Drake, F. H.; Gowen, M.; Levy, M. A., Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *J Biol Chem* **1996**, *271* (21), 12517-24.
28. Yasuda, Y.; Kaleta, J.; Bromme, D., The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: rationale for the design of new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* **2005**, *57* (7), 973-93.
29. Drake, F. H.; Dodds, R. A.; James, I. E.; Connor, J. R.; Debouck, C.; Richardson, S.; Lee-Rykaczewski, E.; Coleman, L.; Rieman, D.; Barthlow, R.; Hastings, G.; Gowen, M., Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem* **1996**, *271* (21), 12511-6.
30. Inaoka, T.; Bilbe, G.; Ishibashi, O.; Tezuka, K.; Kumegawa, M.; Kokubo, T., Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone. *Biochem Biophys Res Commun* **1995**, *206* (1), 89-96.
31. Kafienah, W.; Bromme, D.; Buttle, D. J.; Croucher, L. J.; Hollander, A. P., Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Biochem J* **1998**, *331* (Pt 3), 727-32.
32. Gowen, M.; Lazner, F.; Dodds, R.; Kapadia, R.; Feild, J.; Tavarria, M.; Bertocello, I.; Drake, F.; Zavorselk, S.; Tellis, I.; Hertzog, P.; Debouck, C.; Kola, I., Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization. *J Bone Miner Res* **1999**, *14* (10), 1654-63.
33. Saftig, P.; Hunziker, E.; Wehmeyer, O.; Jones, S.; Boyde, A.; Rommerskirch, W.; Moritz, J. D.; Schu, P.; von Figura, K., Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95* (23), 13453-8.
34. Ng, K. W., Potential role of odanacatib in the treatment of osteoporosis. *Clin Interv Aging* **2012**, *7*, 235-47.

35. Hou, W. S.; Li, Z.; Buttner, F. H.; Bartnik, E.; Bromme, D., Cleavage site specificity of cathepsin K toward cartilage proteoglycans and protease complex formation. *Biol Chem* **2003**, *384* (6), 891-7.
36. Littlewood-Evans, A.; Kokubo, T.; Ishibashi, O.; Inaoka, T.; Wlodarski, B.; Gallagher, J. A.; Bilbe, G., Localization of cathepsin K in human osteoclasts by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Bone* **1997**, *20* (2), 81-6.
37. Ishibashi, O.; Inui, T.; Mori, Y.; Kurokawa, T.; Kokubo, T.; Kumegawa, M., Quantification of the expression levels of lysosomal cysteine proteinases in purified human osteoclastic cells by competitive RT-PCR. *Calcif Tissue Int* **2001**, *68* (2), 109-16.
38. Hou, W. S.; Li, Z.; Gordon, R. E.; Chan, K.; Klein, M. J.; Levy, R.; Keysser, M.; Keyszer, G.; Bromme, D., Cathepsin k is a critical protease in synovial fibroblast-mediated collagen degradation. *Am J Pathol* **2001**, *159* (6), 2167-77.
39. Hou, W. S.; Li, W.; Keyszer, G.; Weber, E.; Levy, R.; Klein, M. J.; Gravallesse, E. M.; Goldring, S. R.; Bromme, D., Comparison of cathepsins K and S expression within the rheumatoid and osteoarthritic synovium. *Arthritis Rheum* **2002**, *46* (3), 663-74.
40. Kontinen, Y. T.; Mandelin, J.; Li, T. F.; Salo, J.; Lassus, J.; Liljestrom, M.; Hukkanen, M.; Takagi, M.; Virtanen, I.; Santavirta, S., Acidic cysteine endoproteinase cathepsin K in the degeneration of the superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **2002**, *46* (4), 953-60.
41. Morko, J.; Kiviranta, R.; Joronen, K.; Saamanen, A. M.; Vuorio, E.; Salminen-Mankonen, H., Spontaneous development of synovitis and cartilage degeneration in transgenic mice overexpressing cathepsin K. *Arthritis Rheum* **2005**, *52* (12), 3713-7.
42. Svelander, L.; Erlandsson-Harris, H.; Astner, L.; Grabowska, U.; Klareskog, L.; Lindstrom, E.; Hewitt, E., Inhibition of cathepsin K reduces bone erosion, cartilage degradation and inflammation evoked by collagen-induced arthritis in mice. *Eur J Pharmacol* **2009**, *613* (1-3), 155-62.
43. Ochi, Y.; Yamada, H.; Mori, H.; Nakanishi, Y.; Nishikawa, S.; Kayasuga, R.; Kawada, N.; Kunishige, A.; Hashimoto, Y.; Tanaka, M.; Sugitani, M.; Kawabata, K., Effects of ONO-5334, a novel orally-active inhibitor of cathepsin K, on bone metabolism. *Bone* **2011**, *49* (6), 1351-6.
44. Ochi, Y.; Yamada, H.; Mori, H.; Kawada, N.; Kayasuga, R.; Nakanishi, Y.; Tanaka, M.; Imagawa, A.; Ohmoto, K.; Kawabata, K., ONO-5334, a cathepsin K inhibitor, improves bone strength by preferentially increasing cortical bone mass in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab* **2014**, *32* (6), 645-52.
45. 骨粗鬆症用薬の臨床評価方法に関するガイドライン .
<https://www.pmda.go.jp/files/000226259.pdf>. Accessed 17 March 2019.
46. Drake, M. T.; Clarke, B. L.; Oursler, M. J.; Khosla, S., Cathepsin K Inhibitors for Osteoporosis: Biology, Potential Clinical Utility, and Lessons Learned. *Endocr Rev* **2017**, *38* (4), 325-350.
47. Vierboom, M. P.; Jonker, M.; Tak, P. P.; t Hart, B. A., Preclinical models of arthritic disease in non-human primates. *Drug Discov Today* **2007**, *12* (7-8), 327-35.

48. Tanaka, M.; Yamada, H.; Nishikawa, S.; Mori, H.; Ochi, Y.; Horai, N.; Li, M.; Amizuka, N., Joint Degradation in a Monkey Model of Collagen-Induced Arthritis: Role of Cathepsin K Based on Biochemical Markers and Histological Evaluation. *Int J Rheumatol* **2016**, *2016*, 8938916.
49. Vierboom, M. P.; Jonker, M.; Bontrop, R. E.; t Hart, B., Modeling human arthritic diseases in nonhuman primates. *Arthritis Res Ther* **2005**, *7* (4), 145-54.
50. Eastell, R.; Nagase, S.; Ohshima, M.; Small, M.; Sawyer, J.; Boonen, S.; Spector, T.; Kuwayama, T.; Deacon, S., Safety and efficacy of the cathepsin K inhibitor ONO-5334 in postmenopausal osteoporosis: the OCEAN study. *J Bone Miner Res* **2011**, *26* (6), 1303-12.
51. Eastell, R.; Nagase, S.; Small, M.; Boonen, S.; Spector, T.; Ohshima, M.; Kuwayama, T.; Deacon, S., Effect of ONO-5334 on bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal osteoporosis: 2-year results from the OCEAN study. *J Bone Miner Res* **2014**, *29* (2), 458-66.
52. Stoch, S. A.; Zajic, S.; Stone, J. A.; Miller, D. L.; van Bortel, L.; Lasseter, K. C.; Pramanik, B.; Cilissen, C.; Liu, Q.; Liu, L.; Scott, B. B.; Panebianco, D.; Ding, Y.; Gottesdiener, K.; Wagner, J. A., Odanacatib, a selective cathepsin K inhibitor to treat osteoporosis: safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics--results from single oral dose studies in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* **2013**, *75* (5), 1240-54.
53. Kiviranta, R.; Morko, J.; Alatalo, S. L.; NicAmhlaibh, R.; Risteli, J.; Laitala-Leinonen, T.; Vuorio, E., Impaired bone resorption in cathepsin K-deficient mice is partially compensated for by enhanced osteoclastogenesis and increased expression of other proteases via an increased RANKL/OPG ratio. *Bone* **2005**, *36* (1), 159-72.
54. Sondergaard, B. C.; Henriksen, K.; Wulf, H.; Oestergaard, S.; Schurigt, U.; Brauer, R.; Danielsen, I.; Christiansen, C.; Qvist, P.; Karsdal, M. A., Relative contribution of matrix metalloprotease and cysteine protease activities to cytokine-stimulated articular cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* **2006**, *14* (8), 738-48.
55. Ochi, Y.; Yamada, H.; Mori, H.; Nakanishi, Y.; Nishikawa, S.; Kayasuga, R.; Kawada, N.; Kunishige, A.; Hashimoto, Y.; Tanaka, M.; Sugitani, M.; Kawabata, K., Effects of eight-month treatment with ONO-5334, a cathepsin K inhibitor, on bone metabolism, strength and microstructure in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Bone* **2014**, *65*, 1-8.
56. Lundon, K.; Grynepas, M., The long-term effect of ovariectomy on the quality and quantity of cortical bone in the young cynomolgus monkey: a comparison of density fractionation and histomorphometric techniques. *Bone* **1993**, *14* (3), 389-95.
57. Chesnut, C. H., 3rd; Rosen, C. J.; Bone Quality Discussion, G., Reconsidering the effects of antiresorptive therapies in reducing osteoporotic fracture. *J Bone Miner Res* **2001**, *16* (12), 2163-72.
58. Riggs, B. L.; Hodgson, S. F.; O'Fallon, W. M.; Chao, E. Y.; Wahner, H. W.; Muhs, J. M.; Cedel, S. L.; Melton, L. J., 3rd, Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* **1990**, *322* (12), 802-9.

59. Lafage, M. H.; Balena, R.; Battle, M. A.; Shea, M.; Seedor, J. G.; Klein, H.; Hayes, W. C.; Rodan, G. A., Comparison of alendronate and sodium fluoride effects on cancellous and cortical bone in minipigs. A one-year study. *J Clin Invest* **1995**, *95* (5), 2127-33.
60. Jerome, C. P.; Peterson, P. E., Nonhuman primate models in skeletal research. *Bone* **2001**, *29* (1), 1-6.
61. Nagase, S.; Ohyama, M.; Hashimoto, Y.; Small, M.; Kuwayama, T.; Deacon, S., Pharmacodynamic effects on biochemical markers of bone turnover and pharmacokinetics of the cathepsin K inhibitor, ONO-5334, in an ascending multiple-dose, phase 1 study. *J Clin Pharmacol* **2012**, *52* (3), 306-18.
62. Osteoporosis: Nonclinical evaluation of drugs intended for treatment guidance for industry, June 2016.
<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm506366.pdf>. Accessed 17 March 2019.
63. Balena, R.; Toolan, B. C.; Shea, M.; Markatos, A.; Myers, E. R.; Lee, S. C.; Opas, E. E.; Seedor, J. G.; Klein, H.; Frankenfield, D.; et al., The effects of 2-year treatment with the aminobisphosphonate alendronate on bone metabolism, bone histomorphometry, and bone strength in ovariectomized nonhuman primates. *J Clin Invest* **1993**, *92* (6), 2577-86.
64. Stroup, G. B.; Kumar, S.; Jerome, C. P., Treatment with a potent cathepsin K inhibitor preserves cortical and trabecular bone mass in ovariectomized monkeys. *Calcif Tissue Int* **2009**, *85* (4), 344-55.
65. Ominsky MS, J. J., Smith SY, Vlasseros F, Samadfam R, Kostenuik PJ, Transition from Alendronate to Denosumab Resulted in Further Reductions in Local and Systemic Bone Turnover Parameters and Reduced Cortical Porosity in Ovariectomized Cynomolgus Monkeys. *J Bone Miner Res* **2008**, *23* (Suppl. 1), S61.
66. Parfitt, A. M.; Drezner, M. K.; Glorieux, F. H.; Kanis, J. A.; Malluche, H.; Meunier, P. J.; Ott, S. M.; Recker, R. R., Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* **1987**, *2* (6), 595-610.
67. Parfitt, A. M., Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* **1994**, *55* (3), 273-86.
68. Masarachia, P. J.; Pennypacker, B. L.; Pickarski, M.; Scott, K. R.; Wesolowski, G. A.; Smith, S. Y.; Samadfam, R.; Goetzmann, J. E.; Scott, B. B.; Kimmel, D. B.; Duong, L. T., Odanacatib reduces bone turnover and increases bone mass in the lumbar spine of skeletally mature ovariectomized rhesus monkeys. *J Bone Miner Res* **2012**, *27* (3), 509-23.
69. Jerome, C.; Missbach, M.; Gamse, R., Balicatib, a cathepsin K inhibitor, stimulates periosteal bone formation in monkeys. *Osteoporos Int* **2011**, *22* (12), 3001-11.
70. Leung, P.; Pickarski, M.; Zhuo, Y.; Masarachia, P. J.; Duong, L. T., The effects of the cathepsin K inhibitor odanacatib on osteoclastic bone resorption and vesicular trafficking. *Bone* **2011**, *49* (4), 623-35.

71. Lotinun S, K. R., Alzate J, Campard G, Vuorio E, Horne W, Sabatakos G, Baron R, Osteoclast-targeted deletion of cathepsin K in mice increases bone formation whereas deletion in osteoblasts has no effect. *J Bone Miner Res* **2009**, *24* (Suppl. 1), S48.
72. Data on File. Effect of ONO-5334 on human osteoclasts differentiated from peripheral blood mononuclear cells. (E06PI017). *Ono Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan, 2012*.
73. Karsdal, M. A.; Martin, T. J.; Bollerslev, J.; Christiansen, C.; Henriksen, K., Are nonresorbing osteoclasts sources of bone anabolic activity? *J Bone Miner Res* **2007**, *22* (4), 487-94.
74. Qin, L.; Choy, W.; Au, S.; Fan, M.; Leung, P., Alendronate increases BMD at appendicular and axial skeletons in patients with established osteoporosis. *J Orthop Surg Res* **2007**, *2*, 9.
75. Greenspan, S. L.; Parker, R. A.; Ferguson, L.; Rosen, H. N.; Maitland-Ramsey, L.; Karpf, D. B., Early changes in biochemical markers of bone turnover predict the long-term response to alendronate therapy in representative elderly women: a randomized clinical trial. *J Bone Miner Res* **1998**, *13* (9), 1431-8.
76. Bouxsein, M. L.; Parker, R. A.; Greenspan, S. L., Forearm bone mineral densitometry cannot be used to monitor response to alendronate therapy in postmenopausal women. *Osteoporos Int* **1999**, *10* (6), 505-9.
77. Data on File. Pharmacokinetic study of ONO-5334 absorption, distribution and excretion in monkeys after single administration. (AE-4009-G). *Ono Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan, 2005*.
78. Azuma, Y.; Sato, H.; Oue, Y.; Okabe, K.; Ohta, T.; Tsuchimoto, M.; Kiyoki, M., Alendronate distributed on bone surfaces inhibits osteoclastic bone resorption in vitro and in experimental hypercalcemia models. *Bone* **1995**, *16* (2), 235-45.
79. Smith, S. Y.; Recker, R. R.; Hannan, M.; Muller, R.; Bauss, F., Intermittent intravenous administration of the bisphosphonate ibandronate prevents bone loss and maintains bone strength and quality in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Bone* **2003**, *32* (1), 45-55.
80. Mori, H.; Tanaka, M.; Kayasuga, R.; Masuda, T.; Ochi, Y.; Yamada, H.; Kishikawa, K.; Ito, M.; Nakamura, T., Minodronic acid (ONO-5920/YM529) prevents decrease in bone mineral density and bone strength, and improves bone microarchitecture in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Bone* **2008**, *43* (5), 840-8.
81. Cabal, A.; Jayakar, R. Y.; Sardesai, S.; Phillips, E. A.; Szumiloski, J.; Posavec, D. J.; Mathers, P. D.; Savitz, A. T.; Scott, B. B.; Winkelmann, C. T.; Motzel, S.; Cook, L.; Hargreaves, R.; Evelhoch, J. L.; Dardzinski, B. J.; Hangartner, T. N.; McCracken, P. J.; Duong, L. T.; Williams, D. S., High-resolution peripheral quantitative computed tomography and finite element analysis of bone strength at the distal radius in ovariectomized adult rhesus monkey demonstrate efficacy of odanacatib and differentiation from alendronate. *Bone* **2013**, *56* (2), 497-505.
82. Engelke, K.; Nagase, S.; Fuerst, T.; Small, M.; Kuwayama, T.; Deacon, S.; Eastell, R.; Genant, H. K., The effect of the cathepsin K inhibitor ONO-5334 on trabecular and cortical bone in postmenopausal osteoporosis: the OCEAN study. *J Bone Miner Res* **2014**, *29* (3), 629-38.

83. Bone, H. G.; McClung, M. R.; Roux, C.; Recker, R. R.; Eisman, J. A.; Verbruggen, N.; Hustad, C. M.; DaSilva, C.; Santora, A. C.; Ince, B. A., Odanacatib, a cathepsin-K inhibitor for osteoporosis: a two-year study in postmenopausal women with low bone density. *J Bone Miner Res* **2010**, *25* (5), 937-47.
84. Langdahl, B.; Binkley, N.; Bone, H.; Gilchrist, N.; Resch, H.; Rodriguez Portales, J.; Denker, A.; Lombardi, A.; Le Bailly De Tillegem, C.; Dasilva, C.; Rosenberg, E.; Leung, A., Odanacatib in the treatment of postmenopausal women with low bone mineral density: five years of continued therapy in a phase 2 study. *J Bone Miner Res* **2012**, *27* (11), 2251-8.
85. Rizzoli, R.; Benhamou, C. L.; Halse, J.; Miller, P. D.; Reid, I. R.; Rodriguez Portales, J. A.; DaSilva, C.; Kroon, R.; Verbruggen, N.; Leung, A. T.; Gurner, D., Continuous treatment with odanacatib for up to 8 years in postmenopausal women with low bone mineral density: a phase 2 study. *Osteoporos Int* **2016**, *27* (6), 2099-107.
86. Cusick, T.; Chen, C. M.; Pennypacker, B. L.; Pickarski, M.; Kimmel, D. B.; Scott, B. B.; Duong, L. T., Odanacatib treatment increases hip bone mass and cortical thickness by preserving endocortical bone formation and stimulating periosteal bone formation in the ovariectomized adult rhesus monkey. *J Bone Miner Res* **2012**, *27* (3), 524-37.
87. Ominsky, M. S.; Libanati, C.; Niu, Q. T.; Boyce, R. W.; Kostenuik, P. J.; Wagman, R. B.; Baron, R.; Dempster, D. W., Sustained Modeling-Based Bone Formation During Adulthood in Cynomolgus Monkeys May Contribute to Continuous BMD Gains With Denosumab. *J Bone Miner Res* **2015**, *30* (7), 1280-9.
88. Mullard, A., Merck & Co. drops osteoporosis drug odanacatib. *Nat Rev Drug Discov* **2016**, *15* (10), 669.
89. Turan, S., Current research on pycnodysostosis. *Intractable Rare Dis Res* **2014**, *3* (3), 91-3.
90. MEDIVIR cathepsin K inhibitor MIV-711. <https://www.medivir.com/our-projects/proprietary/miv-711>. Accessed 21 May 2019.
91. Hummel, K. M.; Petrow, P. K.; Franz, J. K.; Muller-Ladner, U.; Aicher, W. K.; Gay, R. E.; Bromme, D.; Gay, S., Cysteine proteinase cathepsin K mRNA is expressed in synovium of patients with rheumatoid arthritis and is detected at sites of synovial bone destruction. *J Rheumatol* **1998**, *25* (10), 1887-94.
92. Salminen-Mankonen, H. J.; Morko, J.; Vuorio, E., Role of cathepsin K in normal joints and in the development of arthritis. *Curr Drug Targets* **2007**, *8* (2), 315-23.
93. Uchiyama, Y.; Yorozu, K.; Hashizume, M.; Moriya, Y.; Mihara, M., Tocilizumab, a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody, ameliorates joint swelling in established monkey collagen-induced arthritis. *Biol Pharm Bull* **2008**, *31* (6), 1159-63.
94. Yamada, H.; Ochi, Y.; Mori, H.; Nishikawa, S.; Hashimoto, Y.; Nakanishi, Y.; Tanaka, M.; Bruce, M.; Deacon, S.; Kawabata, K., Effects of 16-month treatment with the cathepsin K inhibitor ONO-5334 on bone markers, mineral density, strength and histomorphometry in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Bone* **2016**, *86*, 43-52.

95. Kasai, H.; Horai, N.; Fukuzaki, K.; Sumichika, H., Therapeutic effect of prednisolone, methotrexate, and etanercept on collagen-induced arthritis in cynomolgus monkeys. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* **2007**, P1-35.
96. Asagiri, M.; Hirai, T.; Kunigami, T.; Kamano, S.; Gober, H. J.; Okamoto, K.; Nishikawa, K.; Latz, E.; Golenbock, D. T.; Aoki, K.; Ohya, K.; Imai, Y.; Morishita, Y.; Miyazono, K.; Kato, S.; Saftig, P.; Takayanagi, H., Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. *Science* **2008**, *319* (5863), 624-7.
97. Data on File. Establishment of immunological response assay system for TLR-9 signaling using mouse dendritic cells (E08PI031). *Ono Pharmaceutical Co., Ltd, Osaka, Japan.*
98. Data on File. Effect of ONO-5334 on immunological response via TLR-9 signaling in human dendritic cells (E09PI004). *Ono Pharmaceutical Co., Ltd, Osaka, Japan.*
99. Cohen, S. B.; Dore, R. K.; Lane, N. E.; Ory, P. A.; Peterfy, C. G.; Sharp, J. T.; van der Heijde, D.; Zhou, L.; Tsuji, W.; Newmark, R.; Denosumab Rheumatoid Arthritis Study, G., Denosumab treatment effects on structural damage, bone mineral density, and bone turnover in rheumatoid arthritis: a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial. *Arthritis Rheum* **2008**, *58* (5), 1299-309.
100. Garnero, P.; Landewe, R.; Boers, M.; Verhoeven, A.; Van Der Linden, S.; Christgau, S.; Van Der Heijde, D.; Boonen, A.; Geusens, P., Association of baseline levels of markers of bone and cartilage degradation with long-term progression of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis: the COBRA study. *Arthritis Rheum* **2002**, *46* (11), 2847-56.