HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	カテプシンK阻害剤の骨代謝に対する影響に関する研究
Author(s)	越智, 保夫
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第6950号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6950
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58875
Type	doctoral thesis
File Information	Yasuo_Ochi.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

カテプシン K 阻害剤の骨代謝に対する影響に関する研究

北海道大学　大学院農学院

越智　保夫

要旨

高齢化が進む現代社会において, 運動器疾患を診断・治療することは患者の Quality of life（QOL）の観点から重要な課題である．運動器疾患の一つである骨粗鬆症は高齢（閉経）による骨代謝変動が原因となり，骨量の低下とともに骨折リスクが増大する疾患である．骨粗鬆症を栄養あるいは運動療法により予防することは非常に重要であるが，一旦骨密度が一定値を下回ると骨折リスクが著しく高まることから，積極的な薬物療法が必要となる．骨粗鬆症の薬物療法に関しては alendronate に代表されるビスホスホネート製剤（BP）が普及している．BP は椎体（背骨）及び非椎体（四肢の骨）に対する骨折予防効果が証明されているものの，その非椎体に対する作用が十分でないこと，服薬コンプライアンス（服用後立位を 30 分以上維持し，食事摂取を制限）や副作用（胃腸障害，非定型骨折等）の問題から，さらなる治療薬の開発が望まれている．骨コラーゲンの分解を担うカテプシン K の阻害剤は BP と同様, 破骨細胞を標的とする薬剤であるが, その作用機序には違いがある．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，ONO-5334（以下，ジケトヒドラジン誘導体 1）及び ONO-KK1-300-01（以下，ジケトヒドラジン誘導体 2）を用い，種々骨代謝におけるカテプシン K の役割を検討した．

ジケトヒドラジン誘導体 1 はラット，ウサギ及びヒトカテプシン K を選択的に拮抗様式で阻害した．ジケトヒドラジン誘導体 1 はヒト破骨細胞による骨コラーゲンの分解（骨吸収）を alendronate と同様に抑制した．しかし，alendronate は破骨細胞の骨格形成に影響したのに対し，本化合物は破骨細胞の骨格形成には影響せず，骨吸収のみを抑制した．

ジケトヒドラジン誘導体 1 の骨吸収に対する作用を甲状腺副甲状腺切除（Thyroparathyroidectomy：TPTX）ラットを用いて検討した結果，本化合物は用量に応じて，骨吸収を抑制した．骨吸収作用は非げっ歯類であるカニクイザルにおいても確認された．また，本化合物は骨形成に対しほとんど影響せず，骨吸収のみを選択的に抑制した．

骨粗鬆症の病態モデルであるラット及びカニクイザル卵巣摘出骨粗鬆症モデルに対するジケトヒドラジン誘導体 1 の作用を検討した．その結果，本化合物は骨粗鬆症モデルにおいても骨吸収を選択的に抑制し，骨形成には影響しなかった．また，本化合物は卵巣摘出による骨密度（椎体，非椎体）の減少を用量依存的に改善し，骨強度も改善した．本化合物の骨への作用は皮質骨に対し顕著であり，海綿骨に対し強い作用を示す alendronate とは異なっていた．この作用点の違いはカテプシン K 阻害剤とビスホスホネートの骨形成に対する作用の違いに起因すると考えられた．

上記のような骨吸収及び骨形成に対する作用から，カテプシン K 阻害剤は parathyroid hormone（PTH）のような骨形成促進剤との併用効果が期待できる．ラット卵巣摘出骨粗鬆症モデルを用いて, ジケトヒドラジン誘導体 2 と PTH の併用効果を alendronate と PTH の併用効果と比較した．その結果，alendronate は PTH による骨形成の上昇を抑制し，alendronate と PTH の併用は脛骨全骨密度に対し，相加的作用を示さなかった．一方，本

化合物は PTH による骨形成の上昇を抑制せず，本化合物と PTH は全骨密度に対し，相加的効果を示した．このような併用は低骨密度骨粗鬆症患者の骨密度を短期間で改善させ，骨折リスクを早期に減少させることが期待できる．

以上，カテプシン K 阻害剤ジケトヒドラジン誘導体 1 及び 2 を用いて，骨代謝に対するカテプシン K の関与を検討した結果，以下の点が明らかになった．

① カテプシン K は破骨細胞において骨吸収機能のみを担うため，既存薬（ビスホスホネート）と異なり，その阻害剤は細胞に傷害を与えない
② その阻害剤は骨吸収を選択的に抑制し，骨形成には（ほとんど）影響しない
③ その阻害剤は動物モデルにおいて骨量を改善する．特に皮質骨に対する作用が顕著であり，それは骨吸収選択的な作用により発揮されると考えられる
④ その阻害剤は皮質骨に対する作用が顕著であることから，海綿骨が豊富な椎体に加え，皮質骨が豊富な四肢の骨（非椎体骨）に対しても優れた効果を発揮する
⑤ その阻害剤は破骨細胞を傷害せず，二次的に骨形成を抑制しないことから，PTH などの骨形成促進剤との併用効果が期待できる

これらの点は，既存薬（BP）とは異なる点（差異化点）であり，骨粗鬆症領域において，カテプシン K 阻害剤の有用性を期待する結果である．本研究では阻害剤を用いた研究により，カテプシン K の骨代謝における重要性を明らかにした．

略号一覧

略号	名称	解説
BP	bisphosphonate	骨粗鬆症治療薬（がん骨病変治療薬）．骨吸収を担う破骨細胞に取り込まれ，骨吸収抑制作用を発揮する．代表的な BP として，alendronate，risedronate などが上市されている．
PTH	parathyroid hormone	副甲状腺ホルモン．骨代謝（骨吸収，骨形成）を亢進させる．単回投与では骨吸収を亢進させるが．間歇連続投与により，骨形成が促進される（Anabolic window：**5 章**にて詳細記載）．骨粗鬆症治療薬として上市されている．
PTHrP	parathyroid hormone related protein	副甲状腺ホルモン関連タンパク．PTH 同様，骨代謝を亢進させる．がん細胞から多く産生され，がん骨転移の原因の一つと考えられている．
TPTX	thyroparathyroidectomy	甲状腺，副甲状腺切除．内因的 PTH を除去する目的で作製したモデル．
SERM	selective estrogen receptor modulators	選択的エストロゲン調整薬． 骨のエストロゲン受容体に選択性の高い薬剤．骨粗鬆症治療薬として，上市されている．
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand	骨芽細胞，骨細胞，T 細胞等より産生される．破骨細胞の受容体（RANK）に作用し，骨吸収を亢進させる．抗体が骨粗鬆症治療薬（がん骨病変治療薬）として，上市されている．
SSBT	severe suppression of bone turnover	骨代謝回転過剰抑制．BP 製剤や抗 RANKL 抗体により発現する作用．過剰な骨代謝の抑制は非定型骨折や顎骨壊死の原因と考えられている．
CTX	type I collagen cross-linked C-telopeptide	I 型コラーゲン架橋 C–テロペプチド．カテプシン K による骨コラーゲン分解産物（C 末端側のペプチド）．骨吸収マーカーとして保険適応．
NTX	type I collagen cross-linked N-telopeptide	I 型コラーゲン架橋 N–テロペプチド．カテプシン K による骨コラーゲン分解産物（N 末端側のペプチド）．骨吸収マーカーとして保険適

		応.
DPD	deoxypyridinoline	デオキシピリジノリン. 3 本鎖コラーゲンの架橋分子. 骨吸収マーカーとして保険適応.
TRAP5b	tartrate-resistant acid phosphatase 5b	酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ 5b. 破骨細胞特異的に産生されるホスファターゼ. 骨吸収マーカーとして保険適応.
OC	osteocalcin	オステオカルシン. 骨芽細胞より分泌される骨基質タンパク質（非コラーゲン）. 骨形成マーカーとして保険適応.
BAP	bone-specific alkaline phosphatase	骨型アルカリフォスファターゼ. 骨芽細胞特異的に産生されるホスファターゼ. 骨形成マーカーとして保険適応.
BMD	bone mineral density	骨密度（単位：mg/cm^2 あるいは mg/cm^3）. DEXA（dual energy X-ray absorptiometry）法あるいは pQCT（peripheral quantitative computed tomography）法により測定.
BMC	bone mineral content	骨塩量（単位：mg あるいは mg/cm）. DEXA（dual energy X-ray absorptiometry）法あるいは pQCT（peripheral quantitative computed tomography）法により測定.
PBMC	peripheral blood mononucleated cell	末梢血単核細胞.

目次

要旨

略号解説

緒言 p.1

1 章：カテプシン K 阻害剤，ジケトヒドラジン誘導体 1 の各種タンパク分解酵素阻害作用 p.6

2 章：ジケトヒドラジン誘導体 1 の破骨細胞に対する作用 p.16

3 章：ジケトヒドラジン誘導体 1 のラット骨吸収抑制作用 p.21

4 章：卵巣摘出ラット骨粗鬆症モデルに対するジケトヒドラジン誘導体 1 の作用 p.28

5 章：ラット卵巣摘出骨粗鬆症モデルに対するジケトヒドラジン誘導体 2 と parathyroid hormone（PTH）の併用効果 p.40

6 章：ジケトヒドラジン誘導体 1 のサル骨吸収抑制作用 p.53

7 章：卵巣摘出サル骨粗鬆症モデルに対するジケトヒドラジン誘導体 1 の作用 p.65

総括 p.85

引用論文

緒言

骨粗鬆症とは長年の生活習慣などにより低骨量と骨組織の微細構造の異常を来たし，骨の脆弱性が増大し，骨折の危険性が増大する疾患である（折茂ら　2011）．要介護，要支援となる高齢者が増加している現代社会において，寝たきりとなる原因の第 1 位が脳血管疾患、第 2 位が高齢による衰弱、第 3 位が骨折であることから，骨粗鬆症は高齢社会が抱える大きな問題の一つである（厚生労働省　2001）．したがって，骨粗鬆症を予防あるいは治療することは，高齢者の寝たきりのリスクを低減し，Quality of Life（QOL）の向上をもたらすことから，その意義は大きい．運動を行うこと（運動・力学的負荷は骨密度を上昇させる）や摂取する栄養を考慮すること（骨の主成分であるカルシウム（Ca）や Ca 吸収を促進させるためのビタミン D，食物繊維の摂取）は骨粗鬆症の予防に対し有効である．しかし，骨粗鬆症に罹患すると運動・栄養療法以外に薬物療法も考慮する必要がある．

骨代謝は破骨細胞による骨吸収（骨を削る作用）と骨芽細胞による骨形成（骨を造る作用）により制御されている．健康成人では，骨吸収と骨形成のバランスが維持されているため，見かけ上，骨量は変化しない（リモデリング）．また，若年成長期では骨形成が骨吸収を上回ることで骨の量は増加する（モデリング）．しかし，高齢者においては骨吸収が骨形成を上回るため，骨量が減少し，骨折しやすい状態に陥る．

骨粗鬆症の成因の一つは閉経による女性ホルモン（エストロゲン）の不足である．エストロゲンの不足により，骨代謝に変化を来たし，骨吸収が骨形成を上回った結果，骨量が減少する．閉経が骨粗鬆症の原因の一つであることから，かつては骨粗鬆症の治療にはエストロゲンが使用されていた．しかし，エストロゲン投与により乳がん，子宮がんあるいは心血管イベント等の副作用発生リスクが高くなる（Rossouw ら　2002）ことから，現状ではほとんど使用されていない．骨粗鬆症患者は自身が骨折に至るまで痛み等の自覚症状を伴わない，いわばサイレント疾患である．したがって，その治療薬の開発に関しては有効性とともに安全性面でのハードルが高い. 現在, 骨粗鬆症治療にはビスホスホネート(BP)が主に使用されており，本疾患に対する第一選択薬の地位を築いている．BP は破骨細胞の骨吸収を抑制することで，臨床においても椎体，非椎体の骨密度の減少を改善し，骨折予防効果を有することが報告されている（Wells ら　2008，Cranney ら　2002）．その他に骨粗鬆症治療薬としてアメリカ食品医薬局（FDA）より承認されている薬剤として，選択的エストロゲン調整薬（selective estrogen receptor modulators, SERMs），抗 receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand（RANKL）抗体などがある．

骨は外側を構成する皮質骨と内側の網目構造を構成する海綿骨から成り立っている（**図 0-1**）．腰や首などの背骨（椎体）は海綿骨割合が高く，手足（非椎体）の長管骨は皮質骨割合が高い（骨粗鬆症財団ホームページより）．骨代謝は海綿骨部位で活発であることから，骨粗鬆症患者では海綿骨の減少が顕著である．そのため，骨粗鬆症患者の骨折頻発部位は背骨と長管骨骨端部（手首や大腿骨頸部）である．上述の BP は骨のヒドロキシアパタイト

（ピロリン酸）に類似した構造を有しており（**図 0-2**），骨への移行性，蓄積性が高く，骨吸収抑制作用が持続する特徴を有する．また，骨代謝回転の高い部位に蓄積しやすいことから，海綿骨領域に高濃度分布する（Kasting ら　1992）．したがって，ビスホスホネートは海綿骨の多い椎体に対しては優れた効果を発揮する．一方，手足の骨のような皮質骨の多い非椎体に対するビスホスホネートの作用は十分とは言えず，非椎体に対しても優れた効果を発揮する薬剤が待望されている（Black ら　1996，2007）．また，ビスホスホネートは消化管からの吸収性が悪く，食事成分への吸着性も高いことから，朝食事前に服薬し，服薬後は立位を 30 分以上維持する必要があるなど，服薬コンプライアンスの悪さも指摘されている（Gural ら　1985）．現在，ビスホスホネートの間歇投与製剤（週一，月一投与剤）が上市されており，コンプライアンスの悪さを投与頻度の減少により克服している．

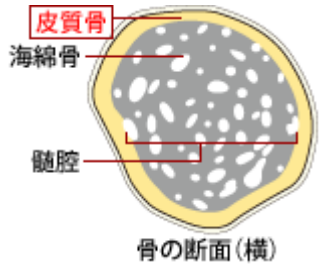


図 0-1　骨の断面（皮質骨と海綿骨）

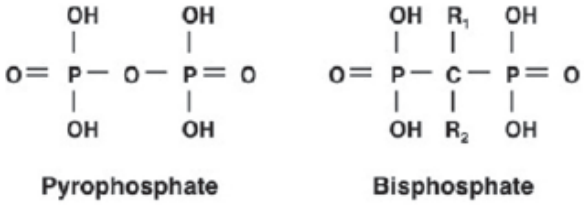


図 0-2　ビスホスホネートとピロリン酸

ビスホスホネートの分子レベルでの作用機序は破骨細胞の有するメバロン酸経路内のファルネシル二リン酸合成酵素（FPPS）を阻害することである（van Beek ら　1999，Bergstrom ら　2000）．メバロン酸経路の抑制は破骨細胞の生存・細胞骨格形成に影響を及ぼし，骨吸収が盛んな破骨細胞の数を減らすことで，骨吸収を抑制する．骨代謝は骨吸収と骨形成により成り立っているが，それぞれの役割を担う破骨細胞と骨芽細胞は密接に相互作用している．例えば，破骨細胞の分化・活性化作用を有する receptor activator of nuclear factor-κB ligand（RANKL）は主に骨芽細胞及び骨細胞によって産生される（Suda ら　1999）．また，骨基質中に埋没している tumor growth factor（TGF）-β は骨吸収により骨から遊離するが，TGF-β には骨形成促進作用があることが報告されている．さらに破骨細胞自体から骨芽細胞に何らかの活性化シグナルが放出されている可能性も報告されて

いる（Rodan ら　1996）．したがって，ビスホスホネートのような破骨細胞の生存・細胞骨格に影響を与える薬剤は破骨細胞数の減少により，骨吸収を抑制した結果，二次的に骨形成の低下に至る．頻度は稀であるが，ビスホスホネートの副作用に顎骨壊死，非定形骨折があり，これらは骨吸収及び骨形成，すなわち骨代謝そのものが強く抑制されたこと（severe suppression of bone turnover, SSBT）が原因と考えられている（Visekruna ら　2008）．以上のことから，ビスホスホネートは骨粗鬆症の第一選択薬ではあるものの，服薬コンプライアンス，安全性が向上し，非椎体への優れた作用を有する薬剤は未だ存在価値が高い．

カテプシン K はパパインスーパーファミリーに属するシステインプロテアーゼであり，破骨細胞に高発現している（Tezuka ら　1992）．カテプシン K は骨の構成成分である I 型コラーゲンを分解する．破骨細胞は骨と強固に結合し，吸収窩にプロトンとカテプシン K を放出することで，骨のカルシウムを溶出させ，コラーゲンを分解する（**図 0-3**，Gelb ら 1996，Gowen ら　1999，McQueney ら　1998，Nishi ら　1999）．カテプシン K の至適 pH が酸性領域であることも，カテプシン K が骨のコラーゲン分解に適した酵素であることの説明になるかもしれない．また，I 型コラーゲンのカテプシン K による分解産物である I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド（NTX）及び I 型コラーゲン架橋 C-テロペプチド（CTX）は骨吸収マーカーとしてすでに臨床応用されている（**図 0-4**）．カテプシン K のノックアウトマウスではこれら骨吸収マーカーが抑制され，骨量の増加が認められる（Dunford ら 2001，Rizzoli ら　2002，Rosen ら　2005）．ヒトにおけるカテプシン K 欠損は骨吸収異常により骨硬化・易骨折性・低身長を特徴とする濃化異骨症（Pycnodysostosis）を発症する（Gelb ら　1996）．したがって，骨粗鬆症患者においてカテプシン K を阻害することは骨吸収を選択的に抑制し，骨量の改善につながる可能性が高いと考えられる．また，カテプシン K を阻害することは，破骨細胞の形態に異常をきたすことなく，骨吸収機能のみを選択的に抑制することから，ビスホスホネートで見られるような骨形成低下作用が少ないことが期待される（**図 0-5**）．すなわち，カテプシン K 阻害剤は，ビスホスホネートで認められた SSBT による副作用が低減し，食事成分への吸着のない薬剤が創製できれば服薬コンプライアンスの高い薬剤となりえる．また，骨形成に対する影響が少ないと考えられることから，海綿骨のみならず，皮質骨に対しても優れた作用を有する薬剤となることが期待される．

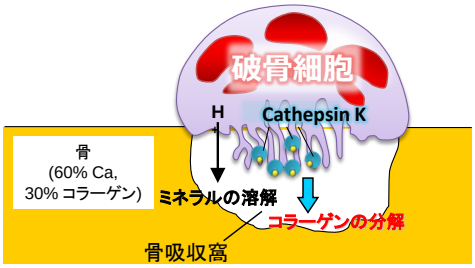


図 0-3　破骨細胞による骨吸収

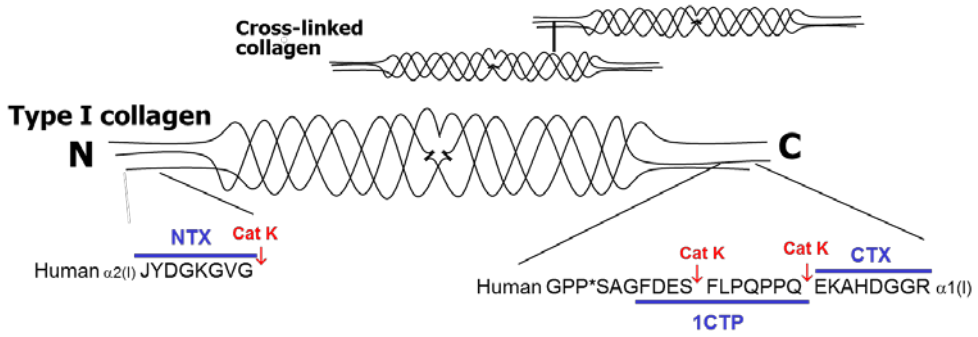


図 0-4　コラーゲン分解産物 NTX，CTX の配列

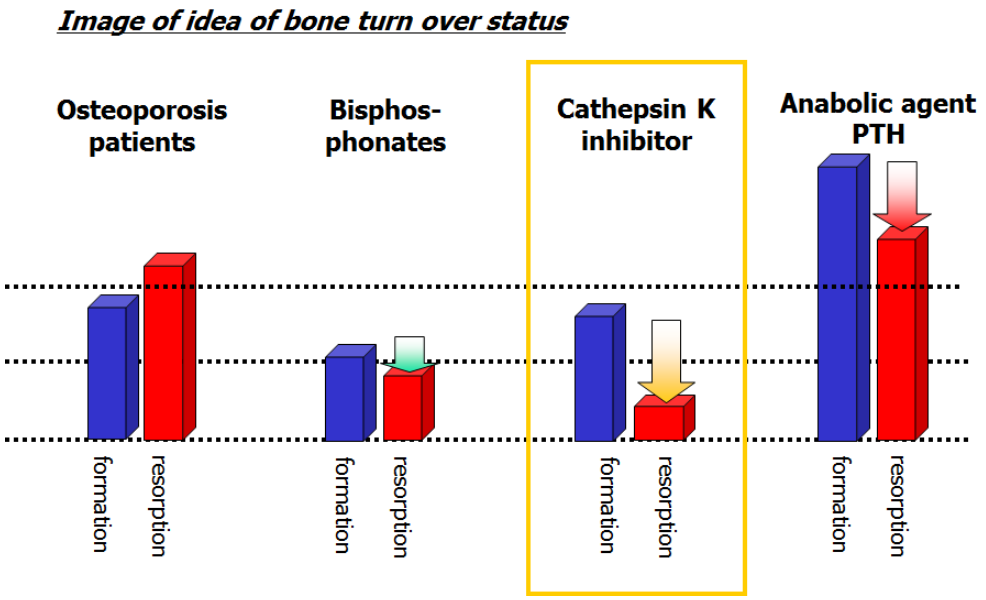


図 0-5　骨粗鬆症患者の骨代謝状態と各種薬剤処置後の変化（イメージ図）

そこで，我々はカテプシン K 阻害剤の開発に着手し，カテプシン K 阻害剤であるジケトヒドラジン誘導体 1（ONO-5334）及びジケトヒドラジン誘導体 2（ONO-KK1-300-01）を創製した（**図 0-6**）．本論文はこれら阻害剤を用いて，骨代謝に対するカテプシン K の関与を明らかにした研究である．

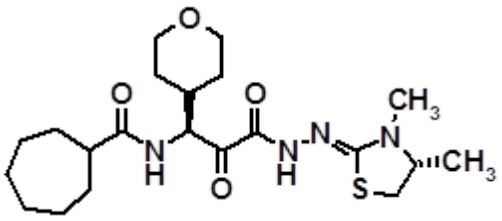
本論文は以下の構成で成り立っている．

①カテプシン K 阻害剤ジケトヒドラジン誘導体 1 の酵素学的特徴

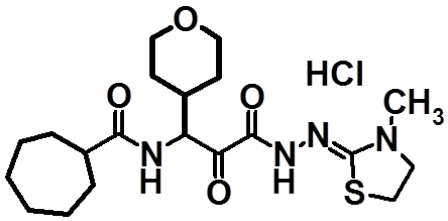
②カテプシン K の骨吸収への関与（細胞学的作用）

③げっ歯類（ラット）における骨代謝へのカテプシン K の関与

④非げっ歯類（サル）における骨代謝へのカテプシン K の関与



ジケトヒドラジン誘導体 1



ジケトヒドラジン誘導体 2

図 0-6　ジケトヒドラジン誘導体 1 及び 2 の構造

注）カテプシン K 阻害剤として先にジケトヒドラジン誘導体 2 を創製した．カテプシン K 阻害剤としての作用はジケトヒドラジン誘導体 2 を用いて検証可能であったが，本化合物は不斉炭素を有したラセミ体構造である．ラセミ体構造の医薬品は存在するが，それら薬剤はその D および L 体の平衡に達するまでの変換速度が速い（つまりラセミ体から活性本体を取り出し，投与しても体内で速やかに変換されるので，ラセミ体を投与するのと変わらないと説明できる）．ジケトヒドラジン誘導体 2 の D 及び L 体の体内での変換速度は遅かったことから，カテプシン K 阻害剤の医薬品化を目指し，D-アミノ酸構造を有するジケトヒドラジン誘導体 1 を合成し，開発を進めた．なお，ジケトヒドラジン誘導体 1 と 2 の酵素阻害プロファイル，ラットにおける作用はほぼ同等である．

1章：カテプシンK阻害剤，ジケトヒドラジン誘導体1の各種タンパク分解酵素阻害作用

1　目的

ジケトヒドラジン誘導体1は小野薬品工業株式会社にて創製されたヒトカテプシンK阻害剤である．本化合物のヒト，ウサギ，ラットカテプシンKに対する阻害作用を検討した．さらに，本化合物のタンパク分解酵素に対する阻害プロファイルを明らかにする目的で，システインプロテアーゼを中心に各種タンパク分解酵素に対する阻害作用を検討した．

2　方法

2.1　被験物質及びその調製

2.1.1　被験物質

ジケトヒドラジン誘導体1

（*N*-((1*S*)-3-{(2*Z*)-2-[(4*R*)-3,4-Dimethyl-1,3-thiazolidin-2-ylidene] hydrazino}-2,3-dioxo-1-(tetrahydro-2*H*-pyran-4-yl) propyl) cycloheptanecarboxamide），（**図 1-1**　ロット番号 HD0401））は，小野薬品工業株式会社にて合成し，室温にて保存した（Ochi ら　2011）．

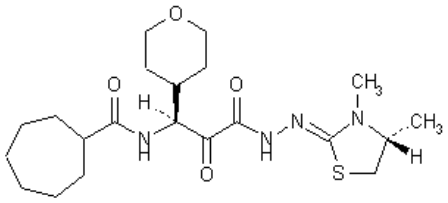


図 1-1　ジケトヒドラジン誘導体1の構造

2.1.2　被験物質の調製

ジケトヒドラジン誘導体1は10 mmol/L（約4.39 mg/mL）の濃度になるようにdimethyl sulfoxide（DMSO）に溶解させ，さらにDMSOで段階希釈して目的濃度に調製した．

2.2　実験材料

2.2.1　酵素源

ヒト組み換えカテプシンK：小野薬品工業株式会社にて作製（-80℃保存）
（Inaoka ら　1995）

ウサギ組み換えカテプシンK：小野薬品工業株式会社にて作製（-80℃保存）
（Aibe ら　1996）

ラット組み換えカテプシンK：小野薬品工業株式会社にて作製（-80℃保存）
（公開特許公報　2000）

ヒトカテプシンS：組み換え酵素，製品番号1183-CY，R&D Systems, Inc. USA（-80℃

保存）

ヒトカテプシン L：肝臓由来，製品番号 219402，Calbiochem Germany（-80℃保存）

ヒトカテプシン B：肝臓由来，製品番号 219364，Calbiochem Germany（-80℃保存）

ウシカテプシン C：脾臓由来，製品番号 C8511，シグマアルドリッチジャパン株式会社　東京（-20℃保存）

ブタカルパイン I：赤血球由来，製品番号 208712，Calbiochem Germany（-80℃保存）

ブタカルパイン II：腎臓由来，製品番号 208715，Calbiochem Germany（-80℃保存）

2.2.2　基質

ヒトカテプシン K：Z-Phe-Arg-MCA
（製品番号 3095-v，株式会社 ペプチド研究所　大阪，-20℃保存）

ウサギ及びラットカテプシン K：Z-Leu-Arg-MCA
（製品番号 3210-v，株式会社 ペプチド研究所　大阪，-20℃保存）

ヒトカテプシン S：Z-Val-Val-Arg-MCA
（製品番号 3211-v，株式会社 ペプチド研究所　大阪，-20℃保存）

ヒトカテプシン L：Z-Phe-Arg-MCA
（製品番号 3095-v，株式会社 ペプチド研究所　大阪，-20℃保存）

ヒトカテプシン B：Z-Arg-Arg-MCA
（製品番号 3123-v，株式会社 ペプチド研究所　大阪，-20℃保存）

ウシカテプシン C：H-Gly-Phe-AMC（製品番号 I-12200050，BACHEM Switzerland，-20℃保存）

ブタカルパイン I, II：Suc-Leu-Tyr-AMC（製品番号 208731, Calbiochem Germany, -20℃保存）

2.3　実験方法

2.3.1　ジケトヒドラジン誘導体 1 のヒト組み換えカテプシン K に対する阻害作用測定

ジケトヒドラジン誘導体 1 のヒト組み換えカテプシン K に対する Ki 値を以下のように測定した．基質及び assay buffer はそれぞれ Z-Phe-Arg-MCA 及び acetate buffer（100 mmol/L acetate，5 mmol/L EDTA，20 mmol/L cysteine，pH 5.5）を使用した（Bossard ら　1996）.

・被験物質：ジケトヒドラジン誘導体 1　　添加量　10 μL/well
（終濃度：0，0.1，0.2，0.3 及び 0.4 nmol/L）
・基質：Z-Phe-Arg-MCA　　添加量　20 μL/well
（終濃度：10，15，25 及び 50 μmol/L）
・Assay buffer　　添加量　150 μL/well

↓混合後，37℃にて 10 分間プレインキュベーション
・ヒト組み換えカテプシン K 溶液　　添加量　20 μL/well
（終濃度：25 munit/mL．ブランクには assay buffer を添加）
↓
混合後，37℃にて蛍光強度を 30 秒間隔で 21 回（10 分間）測定

2.3.2　ジケトヒドラジン誘導体 1 のウサギ組み換えカテプシン K に対する阻害作用測定

ジケトヒドラジン誘導体 1 のウサギ組み換えカテプシン K に対する Ki 値を以下のように測定した. 基質及び assay buffer はそれぞれ Z-Leu-Arg-MCA 及び MES buffer（50 mmol/L 2-morpholinoethanesulfonic acid（MES），2.5 mmol/L EDTA，2.5 mmol/L dithiothreitol（DTT），pH 5.5））を使用した（Falgueyret ら　2004）.

・被験物質：ジケトヒドラジン誘導体 1　　添加量　10 μL/well
（終濃度：0，0.05，0.1 及び 0.2 nmol/L）
・基質：Z-Leu-Arg-MCA　　添加量　20 μL/well
（終濃度：5，7.5，12.5 及び 50 μmol/L）
・Assay buffer　　添加量　150 μL/well
↓混合後，37℃にて 10 分間プレインキュベーション
・ウサギ組み換えカテプシン K 溶液　　添加量　20 μL/well
（終濃度：3 mU/mL．ブランクには assay buffer を添加）
↓
混合後，37℃にて蛍光強度を 30 秒間隔で 21 回（10 分間）測定

2.3.3　ジケトヒドラジン誘導体 1 のラット組み換えカテプシン K に対する阻害作用測定

ジケトヒドラジン誘導体 1 のラット組み換えカテプシン K に対する Ki 値を以下のように測定した．基質及び assay buffer はそれぞれ Z-Leu-Arg-MCA 及び acetate buffer（100 mmol/L acetate，5 mmol/L EDTA，20 mmol/L cysteine，pH 5.5）を使用した（Bossard ら　1996）.

・被験物質：ジケトヒドラジン誘導体 1　　添加量　10 μL/well
（終濃度：0，0.5，1.0，1.5 及び 2.0 nmol/L）
・基質：Z-Leu-Arg-MCA　　添加量　20 μL/well
（終濃度：15，30，50 及び 100 μmol/L）
・Assay buffer　　添加量　150 μL/well
↓混合後，37℃にて 10 分間プレインキュベーション
・ラット組み換えカテプシン K 溶液　　添加量　20 μL/well

（終濃度：0.05 unit/mL．ブランクには assay buffer を添加）
↓
混合後，37℃にて蛍光強度を 30 秒間隔で 21 回（10 分間）測定

2.3.4　ジケトヒドラジン誘導体 1 のヒト組み換えカテプシン S に対する阻害作用測定

ジケトヒドラジン誘導体 1 のヒト組み換えカテプシン S に対する Ki 値を以下のように測定した．基質及び assay buffer はそれぞれ Z-Val-Val-Arg-MCA 及び phosphate buffer（90 mmol/L phosphate buffer，2.5 mmol/L EDTA，2.5 mmol/L DTT，pH 6.5）を使用した．カテプシン S（144 μg/mL）溶液は添付文書に従い，acetate buffer（50 mmol/L acetate buffer，5 mmol/L DTT，250 mmol/L NaCl，pH4.5）にて 14.4 倍希釈し，37℃で 1 時間インキュベートして活性化したものを使用した（Brömme ら　1993）．活性化したカテプシン S 溶液を assay buffer にて 3 μg/mL になるように希釈し，酵素溶液とした（終濃度：0.3 μg/mL）．なお，ブランクには assay buffer を添加した．

・被験物質：ジケトヒドラジン誘導体 1　　添加量　5 μL/well
（終濃度：0，0.5，1.0，1.5 及び 2.0 nmol/L）
・基質：Z-Val-Val-Arg-MCA　　添加量　10 μL/well
（終濃度：15，20，30 及び 60 μmol/L）
・Assay buffer　　添加量　75 μL/well
↓混合後，37℃にて 10 分間プレインキュベーション
・ヒト組み換えカテプシン S 溶液　　添加量　10 μL/well
↓
混合後，37℃にて蛍光強度を 30 秒間隔で 21 回（10 分間）測定

2.3.5　ジケトヒドラジン誘導体 1 のヒトカテプシン L に対する阻害作用測定

ジケトヒドラジン誘導体 1 のヒトカテプシン L に対する Ki 値を以下のように測定した．基質及び assay buffer はそれぞれ Z-Phe-Arg-MCA 及び acetate buffer（340 mmol/L CH_3COONa，60 mmol/L CH_3COOH，4 mmol/L EDTA，8 mmol/L DTT）を使用した（Barrett ら　1981，Yasuma ら　1998）．カテプシン L 溶液を 0.1 % brij 35 にて 0.002 U/mL（終濃度：0.0002 U/mL）に希釈し，酵素溶液とした．なお，ブランクには 0.1% brij 35 を添加した．

・被験物質：ジケトヒドラジン誘導体 1　　添加量　5 μL/well
（終濃度：0，2.5，5.0，7.5 及び 10 nmol/L）
・基質：Z-Phe-Arg-MCA　　添加量　10 μL/well
（終濃度：5，7.5，10 及び 20 μmol/L）

・Assay buffer　　添加量　75 μL/well

↓混合後，30℃にて 10 分間プレインキュベーション

・カテプシン L 溶液　　添加量　10 μL/well

↓

混合後，30℃にて蛍光強度を 30 秒間隔で 21 回（10 分間）測定

2.3.6　ジケトヒドラジン誘導体 1 のヒトカテプシン B に対する阻害作用測定

ジケトヒドラジン誘導体 1 のヒトカテプシン B に対する Ki 値を以下のように測定した．基質及び assay buffer はそれぞれ Z-Arg-Arg-MCA 及び phosphate buffer（88 mmol/L KH_2PO_4，12 mmol/L Na_2HPO_4，1.33 mmol/L EDTA，2.7 mmol/L cysteine）を使用した（Barrett ら　1981）. カテプシン B 溶液を 0.1 % brij 35 にて 0.025 U/mL（終濃度 : 0.0025 U/mL）に希釈し，酵素溶液とした．ブランクには 0.1% brij 35 を添加した．

・被験物質：ジケトヒドラジン誘導体 1　　添加量　5 μL/well

（終濃度：0，25，50，75 及び 100 nmol/L）

・基質 : Z-Arg-Arg-MCA　　添加量　10 μL/well

（終濃度：100，150，250 及び 500 μmol/L）

・Assay buffer　　添加量　75 μL/well

↓混合後，40℃にて 10 分間プレインキュベーション

・カテプシン B 溶液　　添加量　10 μL/well

↓

混合後，40℃にて蛍光強度を 30 秒間隔で 41 回（20 分間）測定

2.3.7　ジケトヒドラジン誘導体 1 のヒトカテプシン C に対する阻害作用測定

ジケトヒドラジン誘導体 1 のヒトカテプシン C に対する Ki 値を以下のように測定した．基質及び assay buffer はそれぞれ H-Gly-Phe-AMC 及び acetate buffer（50 mmol/L acetate buffer，30 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA，1 mmol/L DTT，pH 5.5）を使用した（Horn ら　2000，Kam ら　2004）．カテプシン C 溶液を assay buffer にて 0.4 U/mL（終濃度 : 0.04 U/mL）に希釈し，酵素溶液とした．なお，ブランクには assay buffer を添加した．

・被験物質：ジケトヒドラジン誘導体 1　　添加量　5 μL/well

（終濃度：0，2，4，6 及び 8 μmol/L）

・基質：H-Gly-Phe-AMC　　添加量　10 μL/well

（終濃度：30，50，75 及び 150 μmol/L）

・Assay buffer　　添加量　75 μL/well

↓混合後，37℃にて 10 分間プレインキュベーション

・カテプシン C 溶液　　添加量　10 μ L/well

↓

混合後，37℃にて蛍光強度を 30 秒間隔で 41 回（20 分間）測定

2.3.8　ジケトヒドラジン誘導体 1 のブタカルパイン I に対する阻害作用測定

ジケトヒドラジン誘導体 1 のブタカルパイン I に対する Ki 値を以下のように測定した．基質及び assay buffer はそれぞれ Suc-Leu-Tyr-AMC 及び imidazole buffer（60 mmol/L imidazole buffer，5 mmol/L cysteine，2.5 mmol/L mercaptoethanol，pH 7.3）を使用した（Sasaki ら　1984）．カルパインは溶液中の Ca によって活性化される酵素であるため，ブランクには assay buffer を，その他の well には酵素活性化用 Ca 溶液（50 mmol/L $CaCl_2$ 含有 assay buffer）を添加した．カルパイン I 溶液（203 U/mL）を assay buffer にて 40 U/mL（終濃度：4 U/mL）に希釈し，全 well に添加した．

・被験物質：ジケトヒドラジン誘導体 1　　添加量　5 μ L/well
（終濃度：0，0.1，0.2，0.3 及び 0.4 μ mol/L）
・基質：Suc-Leu-Tyr-AMC　　添加量　10 μ L/well
（終濃度：0.2，0.4，0.6 及び 2.0 mmol/L）
・酵素活性化用 Ca 溶液　　添加量　10 μ L/well
・Assay buffer　　添加量　65 μ L/well
↓混合後，30℃にて 5 分間プレインキュベーション
・カルパイン I 溶液　　添加量　10 μ L/well

↓

混合後，30℃にて蛍光強度を 30 秒間隔で 11 回（5 分間）測定

2.3.9　ジケトヒドラジン誘導体 1 のブタカルパイン II に対する阻害作用測定

ジケトヒドラジン誘導体 1 のブタカルパイン II に対する Ki 値を以下のように測定した．基質及び assay buffer はそれぞれ Suc-Leu-Tyr-AMC 及び imidazole buffer（60 mmol/L imidazole buffer，5 mmol/L cysteine，2.5 mmol/L mercaptoethanol，pH 7.3）を使用した（Sasaki ら　1984）．カルパインは溶液中の Ca によって活性化される酵素であるため，ブランクには assay buffer を，その他の well には酵素活性化用 Ca 溶液（50 mmol/L $CaCl_2$ 含有 assay buffer）を添加した．カルパイン II 溶液（1660 U/mL）を assay buffer にて 800 U/mL（終濃度：80 U/mL）に希釈し，全 well に添加した．

・被験物質：ジケトヒドラジン誘導体 1　　添加量　5 μ L/well
（終濃度：0，0.03，0.06，0.09 及び 0.12 μ mol/L）
・基質：Suc-Leu-Tyr-AMC　　添加量　10 μ L/well

（終濃度：0.3，0.4，0.6 及び 2.0 mmol/L）

・酵素活性化用 Ca 溶液　　添加量　10 μL/well

・Assay buffer　　添加量　65 μL/well

↓混合後，30℃にて 5 分間プレインキュベーション

・カルパイン II 溶液　　添加量　10 μL/well

↓

混合後，30℃にて蛍光強度を 30 秒間隔で 11 回（5 分間）測定

2.3.10　各酵素に対するジケトヒドラジン誘導体 1 の阻害定数（Ki 値）の算出

上述のすべての酵素反応は 96 穴マイクロプレート（フルオロ B プレート，大日本製薬株式会社　大阪）中で行い，励起波長 355 nm，測定波長 460 nm の蛍光強度を蛍光マイクロプレートリーダー（fmax，日本モレキュラーデバイス株式会社　東京）にて測定した．なお，実験は duplicate で行った．

ブランクを差し引いた 1 分間あたりの蛍光強度増加量{relative fluorescence units（RFU）/min}を反応速度とした．被験物質の濃度を X 軸に，反応速度の逆数を Y 軸に Dixon プロットを作成した．各基質濃度における Dixon プロットから近似直線を作成し，各近似直線の交点を算出した．交点の X 座標に-1 を乗じた値の平均値を Ki 値とした．上記の方法に従った実験を独立に 3 回実施し，各実験で算出された Ki 値の平均値及び標準誤差を求めた．ヒトカテプシン K に関しては基質濃度の逆数を X 軸に，反応速度の逆数を Y 軸に Lineweaver-Burk プロットを作成し．ジケトヒドラジン誘導体 1 の阻害様式を判定した．

2.3.11　各種タンパク分解酵素に対するジケトヒドラジン誘導体 1 10 μmol/L での阻害作用の測定

ジケトヒドラジン誘導体 1 の下記タンパク分解酵素に対する阻害作用は MDS Pharma Service 社（台湾，現 Eurofins 社）にて実施した．

・システインプロテアーゼ：　ヒト Caspase3（MDS Pharma 社カタログ No.163200）

・アスパラギン酸プロテアーゼ：　ヒトカテプシン D（MDS Pharma 社カタログ No.112350），ヒトカテプシン E（MDS Pharma 社カタログ No.112400）

・金属プロテアーゼ：　ヒト線維芽細胞 I 型コラゲナーゼ（MMP-1，MDS Pharma 社カタログ No.114110），ゼラチナーゼ B（MMP-9, MDS Pharma 社カタログ No.114910）

・セリンプロテアーゼ：　ヒトキモトリプシン（MDS Pharma 社カタログ No.113400），ヒトトリプシン（MDS Pharma 社カタログ No.165100），

ヒト好中球エラスターゼ（MDS Pharma 社カタログ No.166000）
・スレオニンプロテアーゼ：ヒトプロテアソーム（MDS Pharma 社カタログ No.167000）
これらプロテアーゼに対するジケトヒドラジン誘導体 1　10 μ mol/L の阻害率を算出した．

3　結果

ヒトカテプシン K の Lineweaver-Burk プロットの 1 例を**図 1-2** に示した．ジケトヒドラジン誘導体 1 はヒトカテプシン K を拮抗型の様式で阻害し，その Ki 値は 0.10±0.02 nmol/L であった．

ジケトヒドラジン誘導体 1 のカテプシン K に対する特異性を検討するために，各種タンパク分解酵素に対する阻害作用を検討した．結果を**表 1-1** に示した．ジケトヒドラジン誘導体 1（10 μ mol/L）がほぼ 100%の阻害したプロテアーゼに関しては阻害定数（Ki 値）を算出した．10 μ mol/L での阻害率が 50%に満たないプロテアーゼに関しては，その阻害率を算出した（Ki 値算出不能）．ジケトヒドラジン誘導体はウサギカテプシン K，ラットカテプシン K，ヒトカテプシン S，ヒトカテプシン L，ヒトカテプシン B，ブタカルパインⅡ，ブタカルパイン I 及びウシカテプシン C を阻害し，それらの Ki 値はそれぞれ 0.049±0.001，0.85±0.07，0.83±0.01，1.7±0.2，32±1，69±3，82±2，2500±100 nmol/L であった．

ジケトヒドラジン誘導体 1（10 μ mol/L）のヒト caspase 3，ヒトカテプシン D，ヒトカテプシン E，ヒトトリプシン，ヒトキモトリプシン，ヒト好中球エラスターゼ，ヒト線維芽細胞 I 型コラゲナーゼ（MMP-1），ヒトゼラチナーゼ B（MMP-9）及びヒトプロテアソームの酵素反応に対する阻害率は最も高いものでも 11%であった．

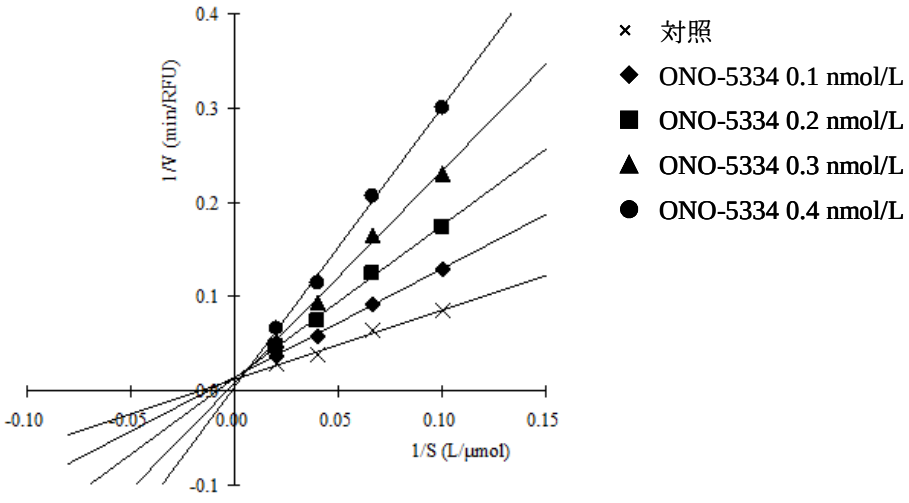


図 1-2　ヒトカテプシン K に対するジケトヒドラジン誘導体 1 の阻害作用（Lineweaver-Burk プロット）

図中の縦軸は反応速度の逆数，横軸は基質濃度の逆数を示す．RFU は相対蛍光強度を示す．
ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

表 1-1　各種タンパク分解酵素に対するジケトヒドラジン誘導体 1 の酵素阻害作用

種類		酵素	10 μ mol/L での阻害率(%)	Ki 値 (nmol/L)	ヒトカテプシン K に対する Ki 値との比
システインプロテアーゼ	パパインスーパーファミリー	ヒトカテプシン K	---	0.10	---
		ウサギカテプシン K	---	0.049	0.49
		ラットカテプシン K	---	0.85	8.5
		ヒトカテプシン S	---	0.83	8.3
		ヒトカテプシン L	---	1.7	17
		ヒトカテプシン B	---	32	320
	カルパインスーパーファミリー	ブタ カルパイン I	---	82	820
		ブタ カルパインⅡ	---	69	690
		ウシ カテプシン C	---	2500	25000
	Caspase ファミリー	Caspase 3	2	---	---
アスパラギン酸プロテアーゼ		カテプシン D	1	---	---
		カテプシン E	1	---	---
メタロプロテアーゼ		線維芽細胞 I 型コラゲナーゼ（MMP-1）	3	---	---
		ゼラチナーゼ B（MMP-9）	6	---	---
セリンプロテアーゼ		トリプシン	1	---	---
		キモトリプシン	11	---	---
		好中球エラスターゼ	3	---	---
スレオニンプロテアーゼ		プロテアソーム	0	---	---

--- : 算出せず

4　考察

ジケトヒドラジン誘導体 1 のカテプシン K 阻害作用及びその選択性を検討するため, 種々のタンパク分解酵素に対する作用を検討した．本化合物はヒトカテプシン K を拮抗型の様式で阻害し，その Ki 値は 0.10 nmol/L であった．また，本化合物は他の動物種（ウサギ及びラット）のカテプシン K に対する阻害作用も有していた．ジケトヒドラジン誘導体 1 はカテプシン K と同様にパパインスーパーファミリーに属するシステインプロテアーゼであるカテプシン S，カテプシン L 及びカテプシン B を阻害したが，Ki 値はヒトカテプシン K と比較してそれぞれ 8.3，17 及び 320 倍高濃度であった．また，カルパインスーパーファミリーに属するシステインプロテアーゼ　ブタカルパイン I，ブタカルパインⅡ及びウシ

カテプシン C を阻害したが，ヒトカテプシン K に対する Ki 値と比較していずれも 100 倍以上高濃度であった．さらに，ジケトヒドラジン誘導体 1（10 μ mol/L）のシステインプロテアーゼ　caspase 3，アスパラギン酸プロテアーゼ　ヒトカテプシン D 及び E，セリンプロテアーゼ　トリプシン，キモトリプシン及び好中球エラスターゼ，メタロプロテアーゼである MMP-1 及び MMP-9 並びにプロテアソームに対する阻害率は 50%に満たなかった．

他社開発段階にあるカテプシン K 阻害剤として，Odanacatib がある（**図 1-3**）．Odanacatib はヒトカテプシン K に対する IC50 値は 0.2 nmol/L であり，ヒトカテプシン K に対する選択性はジケトヒドラジン誘導体 1 よりも優れている（Jacques ら　2008）．しかし，odanacatib のカテプシン K 阻害作用には種差が存在するのに対し，ジケトヒドラジン誘導体 1 は他の動物種におけるカテプシン K 阻害作用を有していることから，動物モデルにおいてカテプシン K の役割を検討するには優れたツールである．また，ジケトヒドラジン誘導体 1 の安全性試験及び臨床試験において，他のタンパク分解酵素阻害に基づく重篤な有害事象は認められおらず（社内試験，Eastell ら　2014），ジケトヒドラジン誘導体 1 のカテプシン K に対する選択性でも，十分に安全性は担保されると考えられる．

ジケトヒドラジン誘導体 1 のアミノ酸部位のテトラヒドロピラン構造はカテプシン K の基質認識部位を捕捉し，本構造がジケトヒドラジン誘導体 1 のカテプシン K に対する親和性を高めていると考えられる．しかし，本構造はカテプシン S, L, B も捕捉できることからジケトヒドラジン誘導体 1 はカテプシン K に比べ，弱いながらもこれら酵素を阻害したと考えられる．

以上，ジケトヒドラジン誘導体 1 は動物種差なくカテプシン K を阻害し，他のタンパク分解酵素に対する選択性を有する化合物であることが明らかとなった（Ochi ら　2011）．

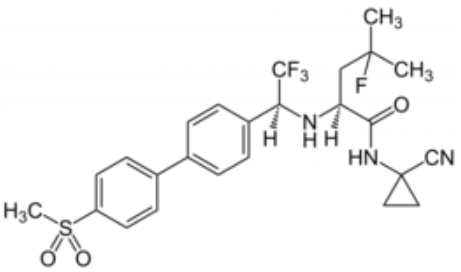


図 1-3　Odanacatib の構造

2 章：ジケトヒドラジン誘導体 1 の破骨細胞に対する作用

1　目的

カテプシン K は破骨細胞に特異的に発現しており，骨の有機成分（I 型コラーゲン）の分解を担っていることから，ヒト末梢血単核細胞（peripheral blood mononucleated cell : PBMC）より破骨細胞を文献報告に基づいて誘導し，ジケトヒドラジン誘導体 1 の骨吸収及び破骨細胞に対する作用を検討し，既存の骨吸収抑制剤であるビスホスホネート（alendronate，**図 2-1**）の作用と比較した．

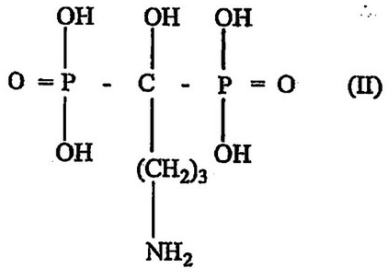


図 2-1　Alendronate の構造

2　方法

2.1　被験物質及びその調製

2.1.1　被験物質

ジケトヒドラジン誘導体 1（ロット番号 7）は，小野薬品工業株式会社にて合成し，室温にて保存した．Alendronate（Lot. BW002D006）は Dr. Reddy's Laboratories India より入手し，-20℃で保存した．

2.1.2　被験物質の調製

ジケトヒドラジン誘導体 1 は 10 mmol/L の濃度になるように dimethyl sulfoxide（DMSO）で溶解した．使用時に，10 mmol/L の濃度のジケトヒドラジン誘導体 1 溶液を DMSO で希釈した後，培地に添加して各濃度に調製した．なお，培地中の DMSO 濃度が 0.1%になるように調製した．

使用時に alendronate を秤量し，0.005 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加え，10 mmol/L の濃度に調製した．10 mmol/L の濃度の alendronate 溶液を蒸留水で希釈した後，培地に添加して各濃度に調製した．また，DMSO を 0.1%の濃度になるように培地に添加した．

2.2　実験材料

2.2.1　ヒト全血採取

40 歳以下の男子健康成人の前腕部静脈より採取した（1 名につき 50 mL）．採血用シリンジには，あらかじめヘパリンナトリウム（終濃度 10 単位/mL）を充填した．なお，本試験

に際しては，小野薬品工業株式会社　研究本部が制定した「ヒト組織を用いた研究」倫理規程を遵守した．

2.2.2　ヒト末梢血単核細胞（PBMC）の調製

採取した末梢血を，37℃に加温した Ca, Mg を含まない phosphate buffered saline（warm PBS）で 2 倍希釈した．この希釈血液を 30 mL ずつ，15mL の Ficoll-Paque Plus（GE ヘルスケアバイオサイエンス株式会社　東京）に重層し，室温で 1500*g*，30 分間遠心分離した後，最上層の血漿を除去して単核細胞層を回収した．回収した細胞に 10 mL の PBS を添加して懸濁し，さらに 40 mL の PBS で希釈して，室温，1500*g*，15 分間遠心分離して PBMC を得た．細胞沈渣を PBS に懸濁し，細胞数を計測した．PBMC は直ちに使用するか，セルバンカー（日本全薬工業株式会社　福島）を用いて凍結保存した．

2.3　実験方法

2.3.1　ヒト PBMC からの破骨細胞形成及び骨吸収活性の評価

破骨細胞の形成は Susa らの方法に準じて行った（Susa ら　2004）．96-well プレートの各 well に PBMC を 1 x 10^5 cells/0.2 mL の濃度になるように添加した．破骨細胞の骨吸収活性を評価するために，PBMC 添加前に，ウシ骨スライス（直径 6 mm，厚さ 150 μ m，京都副生物卸協同組合より食用牛の大腿骨を入手し，骨幹部を精密切断機アイソメット（BUEHLER USA）で厚さ 150 μ m にスライス後，口径 6 mm 生検トレパン（カイ　インダストリーズ株式会社　東京）でくりぬくことにより骨スライスを作製）を 96-well プレートに予め入れた．PBMC は Minimum essential medium alpha medium（Invitrogen Corporation　東京）に 10%FBS（Invitrogen Corporation　東京），100 U/mL penicillin G（Invitrogen Corporation　東京），100 μ g/mL streptomycin（Invitrogen Corporation 東京），25 ng/mL human M-CSF（R&D Systems, Inc. USA），50 ng/mL human RANKL（Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA），5 ng/mL human TGF-β1（R&D Systems, Inc. USA）及び 1 μ mol/L dexamethasone（シグマアルドリッチジャパン株式会社　東京）中で培養することで破骨細胞に分化させた（M-CSF, RANKL, TGF-β1 を破骨細胞分化誘導因子として使用）．細胞は CO_2 インキュベータ（5%　CO_2）内で培養し，1 週間に 2 回の頻度で培地交換を行い，15 日間培養した．なお，上記条件にて，PBMC を 11 日以上培養することで破骨細胞に分化することを社内試験にて確認している．ジケトヒドラジン誘導体 1（0.01，0.1，1 及び 10 μ mol/L）あるいは alendronate（0.1，1，10 及び 100 μ mol/L）は培養 14-15 日の期間に培養液に添加した．15 日目に培養液中の I 型コラーゲン C 末端テロペプチド（CTX）濃度を CrossLaps for culture（Nordic Bioscience Diagnostics A/S Denmark）を用いて測定し，骨吸収活性を評価した．

2.3.2　被験物質の破骨細胞に対する作用

培養終了後，骨スライスを 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した後，0.1% Triton X-100 溶液で処理した．Alexa Flour 488 phalloidin（Molecular Probes　東京）を用いて，骨スライス上の細胞を染色し，アクチンリングの形成を確認した．骨スライスは，SlowFade light antifade kit with DAPI（Molecular probes　東京）を用いて核を染色し，スライドガラス上に封入した．破骨細胞の観察は，共焦点レーザー顕微鏡 TCS-SP2 AOBS（Leica Microsystems Germany）を用いて行った（対物レンズ 40 倍）．

2.4.　統計解析

ジケトヒドラジン誘導体 1 あるいは alendronate を培養 14-15 日に処置した実験の培養液中 CTX 濃度について，無処置群とジケトヒドラジン誘導体 1 処置群，無処置群と alendronate 処置群の間の比較を Dunnett 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

結果を**図 2-1** に示した．ジケトヒドラジン誘導体 1 は添加濃度に応じて培養液中の CTX 濃度を低下させ，10 μ mol/L の濃度では無処置に比べて，94%CTX 濃度を低下させた．CTX を抑制する濃度のジケトヒドラジン誘導体 1 は破骨細胞のアクチンリング形成に影響を及ぼさなかった．Alendronate も添加濃度に応じて培養液中の CTX 濃度を低下させ，100 μ mol/L の濃度では無処置に比べて，69%CTX 濃度を低下させた．しかし，この濃度の alendronate では，一部の破骨細胞において，アクチンリングが崩壊し，核濃縮が認められた．

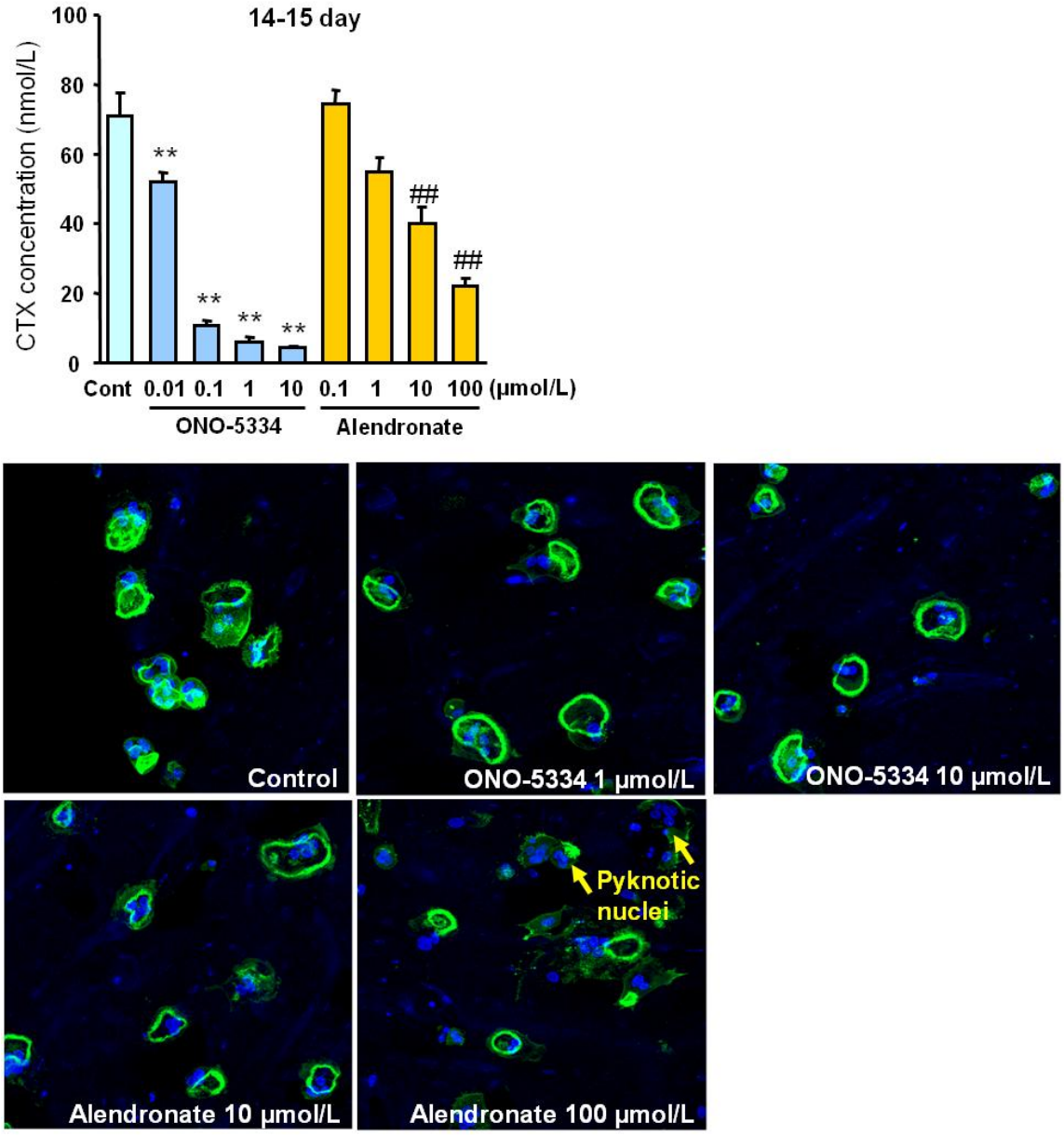


図 2-1　ヒト破骨細胞に対するジケトヒドラジン誘導体 1 及び alendronate の影響

上：培養液中 CTX 濃度

ジケトヒドラジン誘導体 1 及び alendronate は培養 14-15 日の間に処置.

培養 14 日に培地交換し，培養 14-15 日の培養液中 CTX 濃度を測定した.

CTX 濃度は各実験群 8 well の平均値+標準誤差で示す.

**: $P < 0.01$, ##: $P < 0.01$ 無処置群との間に有意差あり（Dunnett 検定）

下：破骨細胞のアクチンリング及び核をそれぞれ Alexa Fluor 488 phalloidin（緑）及び DAPI（青）で染色した．黄色の矢印は核濃縮を示す.

ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

4　考察

カテプシン K 阻害剤ジケトヒドラジン誘導体 1 のヒト破骨細胞における骨吸収抑制作用を検討した．その結果，ジケトヒドラジン誘導体 1 及び alendronate は骨吸収を用量に応じて抑制し，ジケトヒドラジン誘導体 1 は alendronate より 100 倍以上低い濃度で作用した．また，PBMC から形成された破骨細胞にジケトヒドラジン誘導体 1 あるいは alendronate を処置して，破骨細胞の形態を観察した結果，ジケトヒドラジン誘導体 1 は骨スライスからの CTX 遊離を 90%以上抑制する濃度（10 μ mol/L）でも破骨細胞のアクチンリング形成及び生存に影響しなかった．**図 0-3** に示すように，骨吸収過程において，破骨細胞は骨と強固に結合し，酸を放出することにより骨の無機質（カルシウム）を溶出させる．同時にカテプシン K を放出し，骨の有機質（I 型コラーゲン）を分解する．したがって，ジケトヒドラジン誘導体 1 は骨吸収部位に放出されたカテプシン K を阻害することにより，CTX 遊離を抑制したと考えられた．したがって，ジケトヒドラジン誘導体 1 は破骨細胞骨格を構成するアクチンリングを破綻させることなく，骨吸収抑制作用を発揮できたと考えられる．一方，alendronate は CTX 遊離を約 60-70%抑制する濃度（100 μ mol/L）で破骨細胞のアクチンリングの崩壊及びアポトーシスを示す核凝集を引き起こした．Alendronate を含む窒素含有 BP の作用機序は破骨細胞のメバロン酸代謝経路（ファルネシルピロリン酸合成酵素（FPP 合成酵素））の抑制である（van Beek ら　1999，Bergstrom ら　2000，**図 2-2**）．メバロン酸経路を阻害した結果，BP は細胞骨格を構成する Ras や Rho タンパクの産生を抑制する．したがって，alendronate の骨吸収抑制作用は細胞骨格を破綻（アポトーシス）することで発揮することが本試験においても確認された．

以上，ジケトヒドラジン誘導体 1 は破骨細胞の生存に影響を与えることなく骨吸収を抑制したのに対し，alendronate による骨吸収抑制には破骨細胞の傷害を伴っていた（Ochi ら 2011）．

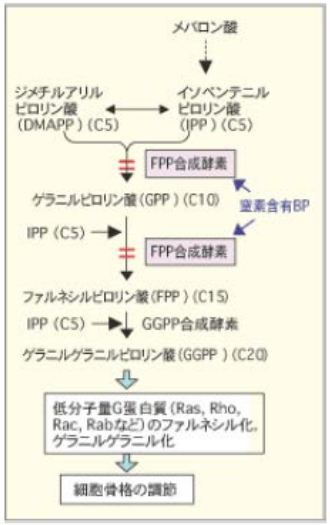


図 2-2　メバロン酸経路と窒素含有 BP（alendronate）の作用点

3 章：ジケトヒドラジン誘導体 1 のラット骨吸収抑制作用

1　目的

ジケトヒドラジン誘導体 1 は，ヒト，ウサギあるいはラットカテプシン K 阻害作用を有し，ヒト破骨細胞の骨吸収を抑制する（Ochi ら　2011）．骨粗鬆症，悪性腫瘍による骨転移や高カルシウム血症は，骨吸収の亢進により引き起こされる疾患である．これらの疾患の治療には骨吸収抑制剤が広く使用されている．骨吸収抑制剤の評価系として，内因性の PTH 及びカルシトニンの制御のない甲状腺副甲状腺摘出（TPTX）ラットに副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone；PTH）あるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白（parathyroid hormone related protein，PTHrP）を処置して，実験的に骨からのカルシウム遊離を惹起し，血中カルシウム濃度を上昇させる系が用いられている（Crippes ら　1996，Kim ら 2006）．本系では甲状腺及び副甲状腺による制御を受けないため，PTHrP 処置によって骨吸収が著しく亢進する．そこで本章では，TPTX ラットに PTHrP を処置し，骨吸収を亢進させることにより血漿中カルシウム濃度及び血漿中 CTX 濃度の上昇を惹起し，ジケトヒドラジン誘導体 1 の血漿中カルシウム濃度及び血漿中 CTX 濃度上昇に対する作用を検討した．

2　方法

2.1　被験物質及びその調製

2.1.1　被験物質

被験物質であるジケトヒドラジン誘導体 1（Lot 番号 HD0401）は小野薬品工業株式会社にて合成し，室温にて保存した．

2.1.2　被験物質の調製と保存方法

2.1.2.1　被験物質用媒体

0.5 w/v%メチルセルロース水溶液（0.5%MC）を被験物質用媒体として用いた．メチルセルロース（MC）400 cP（和光純薬工業株式会社　大阪）に注射用水（株式会社　大塚製薬工場　徳島）を加え，5℃で攪拌することにより溶解し，0.5%MC を調製した．

2.1.2.2　被験物質の調製

必要量のジケトヒドラジン誘導体 1 を秤量し，15 mg/mL になるように 0.5%MC を加え，メノウ製の乳鉢及び乳棒を用いて懸濁した．調製した懸濁液 1 容量に対して 0.5%MC を 9 容量加えて 1.5 mg/mL（高用量）を調製した．また，高用量溶液 1 容量に対して 0.5%MC を 4 容量加えて 0.3 mg/mL（中用量）を調製した．さらに中用量溶液 1 容量に対して 0.5% MC を 4 容量加えて 0.06 mg/mL（低用量）を調製した．さらに低用量溶液 1 容量に対して 0.5%MC を 4 容量加えて 0.012 mg/mL（最低用量）を調製した．

2.2　実験材料

2.2.1　動物

2.2.1.1　使用動物

雌性Crl:CD(SD)系ラット（日本チャールス・リバー株式会社　神奈川，馴化終了時週齢：7週齢）を使用した．実験に供するまでは，ラットWケージ（W 395 mm × L 270 mm × H 180 mm）に1ケージ当り5匹を収容して8日間馴化した．馴化期間中は，上水道水（自動給水装置）及び固型飼料CRF-1（オリエンタル酵母株式会社　東京）を自由摂取させた．馴化期間中の体重の伸び及び馴化終了時の一般状態の観察を行い，適切な動物を使用した（入荷動物数：120匹，使用（手術）動物数：120匹，データ採用数：85匹，TPTX手術翌日の血漿カルシウム濃度を指標に1群14匹を割り当て，TPTX手術非成功例（血漿中Ca濃度が8 mg/dL以上）と中央値から血漿カルシウム濃度が離れた個体を除外した．また，試験期間中に低カルシウム血症により死亡した個体が発生したため，データ採用数は85匹となった）．

なお，本試験に際しては，小野薬品工業株式会社　研究本部が制定した「動物実験等に関する規程」を遵守した．

2.2.1.2　飼育環境

温度：24±2℃，湿度：55±15%，換気：100%新鮮外気にて15±5回/時間

照明：蛍光灯により明暗12時間サイクル（明期8:00-20:00）

2.2.2　試薬その他

2.2.2.1　惹起物質

惹起物質である PTHrP（Hypercalcemia malignancy factor (1-34) amide human，American peptide company USA，Lot 番号 T12039T1）は，-20℃で保存した．

2.2.2.2　惹起物質用媒体

0.1 w/v%ウシ血清アルブミン含有生理食塩液（0.1%BSA/saline）を惹起物質用媒体として用いた．ウシ血清アルブミン（シグマアルドリッチジャパン株式会社　東京）に生理食塩液（株式会社　大塚製薬工場　徳島）を加え，5℃で攪拌することにより溶解し，0.1% BSA/saline を調製した．

2.2.2.3　惹起物質の調製

投与当日に必要量のPTHrPに対し，0.1 mg/mL（Peptide contentとして0.0791 mg/mL）になるように 0.1%BSA/saline を加え惹起物質溶液を調製した．なお，溶液は用時調製後速やかに使用した．

2.3　実験方法

2.3.1　実験群の構成

表　実験群構成

群　名	処置	惹起物質 （皮下投与）	被験物質 （経口投与）	用量 （mg/kg）	例数
偽手術（sham）	偽手術	0.1%BSA/saline	0.5%MC	-	14
TPTX 非惹起（-PTHrp）	TPTX	0.1%BSA/saline	0.5%MC	-	11
対照（Control）	TPTX	PTHrP	0.5%MC	-	12
ジケトヒドラジン誘導体 1 最低用量	TPTX	PTHrP	ONO-5334	0.12	12
ジケトヒドラジン誘導体 1 低用量	TPTX	PTHrP	ONO-5334	0.6	11
ジケトヒドラジン誘導体 1 中用量	TPTX	PTHrP	ONO-5334	3	13
ジケトヒドラジン誘導体 1 高用量	TPTX	PTHrP	ONO-5334	15	12

ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

2.3.2　実験動物の群分け法

馴化終了日の体重を用い，層別無作為化法により 1 群 14 匹を割り当てた．なお，予備検討結果から，対照群の血漿中カルシウム濃度の上昇及びジケトヒドラジン誘導体 1　3 mg/kg の血漿カルシウム濃度低下作用を検出できる動物例数として 1 群 10-12 例と算出した．本試験では低カルシウム血症による死亡例が散見されることから，ジケトヒドラジン誘導体 1 の血漿カルシウム濃度に対する作用を検出する動物数として，1 群 14 例を設定した．

2.3.3　実施方法

2.3.3.1　甲状腺副甲状腺摘出（TPTX）術

群分け日に甲状腺副甲状腺摘出術を実施した．ラットに 10 容量の動物用ケタラール 50（三共ライフテック株式会社　東京）と 1 容量のセラクタール 2%注射液（バイエル株式会社　東京）の混和液を 1 個体当たり 0.2-0.3 mL の容量で腹腔内投与し麻酔を行った．喉部をバリカンで剃毛し，消毒用エタノール（コニシ株式会社　大阪）で消毒後，喉部皮膚とその直下の筋を切開した．気管に付着した左右の甲状腺及び副甲状腺を電気メスを用いて切除した．切開部皮膚の縫合にはミヘル針を用いた．縫合後，ヨードチンキを消毒用エタノールで 5 倍に希釈した液を用いて術創部を消毒した．なお, 偽手術は喉部皮膚の切開のみとし，甲状腺及び副甲状腺の摘出は行わなかった．

2.3.3.2　給餌及び TPTX 術後の飼育方法

TPTX 術終了後に固型飼料 CRF-1（オリエンタル酵母株式会社　東京，100g 試料中 Ca：1.22 g，ビタミン D3：643IU 含有）を約 6-7 g 給餌した．また，給水瓶を用い水道水を給水した．

2.3.3.3　惹起，投与及び採血

TPTX 術翌日にヘパリンナトリウム（1000 units/mL）処置した注射筒を用いてラットの頸静脈より約 0.7 mL 採血した．採血後 5 分以内に PTHrP あるいは惹起物質用媒体をラットに皮下投与した．投与容量は 5 mL/kg とした．惹起物質投与後 3 分以内に被験物質あるいは被験物質用媒体を経口投与した．投与は，10 mL/kg の容量で経口ゾンデ（MZ-1，日本クレア株式会社　東京）を用いて行った．投与液量は，投与当日に測定した体重に基づいて個別に算出した．惹起物質投与 3 時間後に上記と同様の採血を実施した．採取した血液は，4℃にて 12000 rpm（12000*g*），10 分間遠心し，血漿を調製した．得られた血漿は，カルシウム濃度及び CTX 濃度の測定に使用するまで氷上にて保存した．

2.3.3.4　血漿中カルシウム濃度の測定

血漿中カルシウム濃度はカルシウム E-HA テストワコー（和光純薬工業株式会社　大阪）及びマルチキャリブレーターA（和光純薬工業株式会社　大阪）を用い，添付文書に従って 7080 形自動分析装置（株式会社日立製作所　東京）で測定した．なお，血漿は希釈を行わず，原液で測定した．

2.3.3.5　血漿中I型コラーゲン架橋C-テロペプチド（CTX）濃度の測定

血漿中 CTX 濃度は RatLaps ELISA（Nordic Bioscience Diagnostics A/S Denmark）を用い ELISA 法にて測定した．なお，CTX 濃度の測定試料は，血漿をフィルター（Ultrafree-MC，Millipore USA）を用いて限外濾過を行い，分子量 30,000 以上を取り除いたものを用いた．測定手順及び CTX 濃度の算出は添付文書に従った（duplicate 測定，測定範囲：2 ng/mL-198.6 ng/mL）．吸光度の測定は SPECTRA MAX250（日本モレキュラーデバイス株式会社　東京）を使用した．なお，CTX 濃度が測定範囲下限未満の場合，その検体については CTX 濃度を 2 ng/mL とした．

2.4　データの表示及び処理方法

2.4.1　データの表示

血漿中カルシウム濃度（mg/dL）及び血漿中 CTX 濃度（ng/mL）の数値データは，平均値±標準誤差で表示した．また，各個体の血漿中カルシウム濃度及び CTX 濃度の変化量を以下の計算式より算出し，群毎の平均値±標準誤差で表示した．

変化量＝（惹起後 3 時間の血漿中濃度）－（惹起前の血漿中濃度）

2.4.2　統計解析

血漿中カルシウム濃度及び血漿中 CTX 濃度の変化量について，偽手術群と TPTX 術非惹起群及び TPTX 術非惹起群と対照群の間で t 検定を，対照群とジケトヒドラジン誘導体 1 投与群の間で Dunnett 検定を行った．なお，いずれの場合も危険率 5%未満を統計学的に有意とした．

3　結果

3.1　血漿中カルシウム濃度

惹起後 3 時間の血漿中カルシウム濃度から惹起物質投与前の血漿中カルシウム濃度を差し引いた変化量を**図 3-1** に示した. TPTX 術非惹起群では偽手術群に比べ血漿中カルシウム濃度は有意に減少した．PTHrP 惹起により血漿中カルシウム濃度は有意に増加した.
ジケトヒドラジン誘導体 1 は, PTHrP による血漿中カルシウム濃度の増加を 3 mg/kg 以上の用量で有意に抑制した.

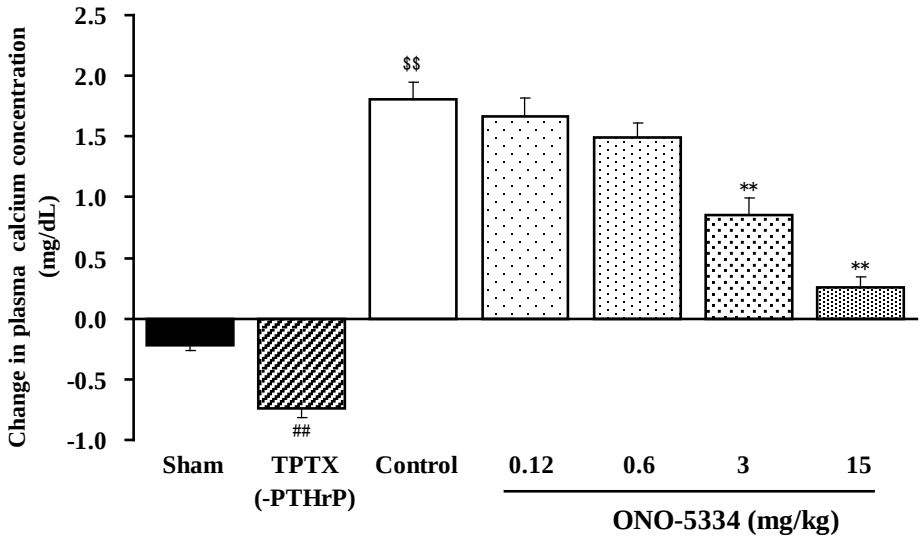


図 3-1　TPTX ラットにおけるジケトヒドラジン誘導体 1 の血漿中 Ca 濃度に対する作用

各カラムは平均値 + 標準誤差を示す（n = 11-14）
なお，数値は投与前の血漿 Ca 濃度からの変化値で表した.
投与前の血漿中 Ca 濃度（mg/dL）は,
Sham：10.55±0.07
TPTX：7.16±0.28
Control：7.36±0.19
ONO-5334, 0.12 mg.kg：6.99±0.18
ONO-5334, 0.6 mg.kg：6.97±0.16
ONO-5334, 3 mg.kg：7.04±0.24
ONO-5334, 15 mg.kg：7.27±0.27
##: $P < 0.01$ 偽手術群（Sham）との間に有意差あり（t 検定）
$$: $P < 0.01$ TPTX 非惹起群（-PTHrP）との間に有意差あり（t 検定）
**: $P < 0.01$ 対照（Control）との間に有意差あり（Dunnet 検定）.
ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

3.2　血漿中 CTX 濃度

惹起後 3 時間の血漿中 CTX 濃度から惹起物質投与前の血漿中 CTX 濃度を差し引いた変化量を**図 3-2** に示した．TPTX 術非惹起群では偽手術群に比べ血漿中 CTX 濃度は有意に減少した．PTHrP 惹起により血漿中 CTX 濃度は有意に増加した．ジケトヒドラジン誘導体 1

は，PTHrP による血漿中 CTX 濃度の増加を 0.6 mg/kg 以上の用量で有意に抑制した．

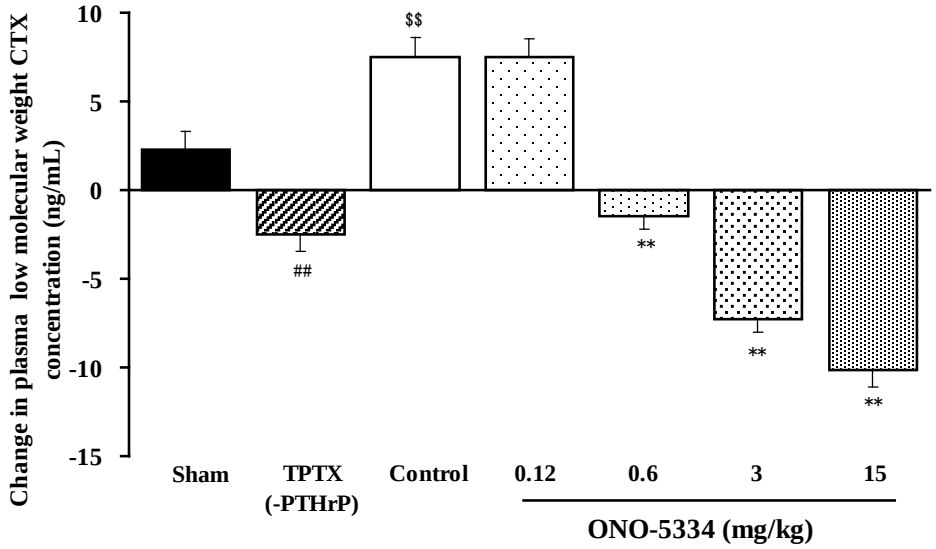


図 3-2　TPTX ラットにおけるジケトヒドラジン誘導体 1 の血漿中 CTX 濃度に対する作用

各カラムは平均値 + 標準誤差を示す（n = 11-14）
なお，数値は投与前の血漿 CTX 濃度からの変化値で表した．
投与前の血漿中 CTX 濃度（ng/mL）は，
Sham：21.14±1.18
TPTX：12.11±1.04
Control：12.94±0.92
ONO-5334, 0.12 mg.kg：11.50±0.68
ONO-5334, 0.6 mg.kg：11.17±0.93
ONO-5334, 3 mg.kg：10.49±0.64
ONO-5334, 15 mg.kg：12.24±0.97
##: $P < 0.01$ 偽手術群（Sham）との間に有意差あり（t 検定）
$$: $P < 0.01$ TPTX 非惹起群（-PTHrP）との間に有意差あり（t 検定）
**: $P < 0.01$ 対照（Control）との間に有意差あり（Dunnet 検定）
ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

4　考察

骨粗鬆症は，骨吸収が亢進し骨密度が減少することによって骨微細構造の破綻をきたし，骨強度が低下に伴い骨折に対するリスクが高まる疾患である．また，悪性腫瘍による骨転移や高カルシウム血症は，主に腫瘍が産生する PTHrP によって骨吸収が亢進するために引き起こされる疾患である．いずれの疾患も，骨吸収の亢進により骨からカルシウム遊離が亢進することから，これらの疾患の治療には骨吸収抑制剤が広く使用されている．正常状態における血中カルシウム濃度は内因性 PTH，カルシトニン及びビタミン D などの作用により一定になるように制御されている．そこで内因性の PTH 及びカルシトニンの制御のない TPTX ラットに PTHrP を処置することにより，血中カルシウム濃度を上昇させる系が用いて，ジケトヒドラジン誘導体 1 の血漿中カルシウム濃度及び血漿中 CTX 濃度上昇に対する作用を検討した．

TPTX ラットに PTHrP を処置すると，血漿中カルシウム濃度及び血漿中 CTX 濃度がいずれも増加した．CTX は骨吸収によるコラーゲンの分解によって放出される分子であることから，本系における血漿中カルシウム濃度の増加は，骨吸収の亢進に伴う事象であると考えられた．ジケトヒドラジン誘導体 1 は，TPTX ラットにおいて単回投与で PTHrP による血漿中カルシウム濃度及び血漿中 CTX 濃度の増加を用量に応じて抑制した．すなわち，本系のように甲状腺及び副甲状腺の制御がなく骨吸収が著しく亢進した状態では，ジケトヒドラジン誘導体 1 は骨吸収を抑制することで，血漿中のカルシウム濃度及び CTX 濃度の上昇を抑制すると考えられた．

以上，ジケトヒドラジン誘導体 1 は単回投与で骨吸収に伴う骨からのカルシウム遊離及び骨のコラーゲン分解を抑制することが示された（Ochi ら　2011）．

4 章：卵巣摘出ラット骨粗鬆症モデルに対するジケトヒドラジン誘導体 1 の作用

1　目的

卵巣を摘出したラットは，エストロゲンの欠乏により骨代謝が亢進し，骨量及び骨強度が低下するため，閉経後骨粗鬆症のモデル動物として薬効評価に多用されている．我々の今までの検討から，ラット卵巣摘出（OVX）骨粗鬆症モデルではヒト骨粗鬆症患者と同様に背骨（椎体）及び手足の骨（非椎体）の骨密度及び骨強度の減少を確認しているが，非椎体，特に脛骨骨端部骨密度は他の部位と比較し短期間で減少することから，有効性評価を実施するに適した部位と考えられる．本試験では，OVX ラットに対し，ジケトヒドラジン誘導体 1 を 2 カ月間反復経口投与し，脛骨の骨密度及び骨強度に対する作用を検討した．

2　方法

2.1　被験物質，対照物質及びその調製

2.1.1　被験物質及び対照物質

被験物質であるジケトヒドラジン誘導体 1（ロット番号 HD0401）は小野薬品工業株式会社にて合成した．対照物質である alendronate（ロット番号 AS001B03）は Dr. Reddy's Laboratory India より入手した．

2.1.2　被験物質及び対照物質の調製と保存方法

2.1.2.1　媒体

0.5 w/v%メチルセルロース水溶液（0.5%MC）を媒体として用いた．メチルセルロース（MC）400 cP（和光純薬工業株式会社　大阪）に注射用水（株式会社　大塚製薬工場　徳島）を加え，5℃で攪拌することにより溶解し，0.5%MC 及び希釈用に用いた 2 w/v%メチルセルロース水溶液（2%MC）を調製した．

2.1.2.2　被験物質の調製

必要量のジケトヒドラジン誘導体 1 を秤量し，30 mg/mL になるように 0.5%MC を加え，メノウ製の容器及びボール並びに遊星型微粒粉砕機（P-7，フリッチュ・ジャパン株式会社大阪）を用いて懸濁した．保存液である 15 mg/mL のジケトヒドラジン誘導体 1 懸濁液は，30 mg/mL 懸濁液を 0.5%MC で 2 倍に希釈することにより調製した．投与当日に，保存液 1 容量に対して 0.5%MC を 9 容量加えて 1.5 mg/mL（高用量）を調製した．また，高用量溶液 1 容量に対して 0.5%MC を 4 容量加えて 0.3 mg/mL（中用量）を調製した．さらに中用量溶液 1 容量に対して 0.5%MC を 4 容量加えて 0.06 mg/mL（低用量）を調製した．さらに低用量溶液 1 容量に対して 0.5%MC を 4 容量加えて 0.012 mg/mL（最低用量）を調製した．

2.1.2.3　対照物質の調製

必要量の alendronate を秤量し，0.02 mol/L 水酸化ナトリウム（NaOH）を加え，超音波処理を行うことにより溶解し 12 mg/mL に調製した．12 mg/mL の alendronate 溶液 1

容量に対して 2%MC を 3 容量加えて十分に攪拌し，3 mg/mL を調製して alendronate 保存液とした．投与当日に，この保存液を蒸留水で 3 倍希釈し，1 mg/mL を調製した．さらにこの 1 mg/mL 溶液を 0.5% MC で 10 倍希釈し，0.1 mg/mL を調製した．

2.2 実験材料

2.2.1 実験動物

2.2.1.1 使用動物

雌性F344/DuCrjラット（入荷時週齢：10週齢，日本チャールス・リバー株式会社）を入手し，ラットSケージ（W 197 mm × L 270 mm × H 180 mm）に1ケージ当り1匹を収容して8日間馴化した．給水は，上水道水（自動給水装置）を自由摂取させた．給餌に関しては，馴化期間中は自由摂取とした．なお，糞尿は自動洗浄機により処理した．F344/DuCrjラットはCrl:CD(SD)ラットに比して，体重が軽く，加齢による体重変動が小さい，骨密度は加重の影響を受けること，骨粗鬆症モデルに対する有効性評価期間は長期間を要することから，加齢による体重変動の小さい動物を使用することが望ましい．したがって，骨密度を評価指標とする試験に関しては雌性F344/DuCrjラットを使用することとした．

本試験に際しては，小野薬品工業株式会社　研究本部が制定した「動物実験等に関する規程」を遵守した．

2.2.1.2 飼育環境

温度：24±2℃，湿度：55±15%，換気：100%新鮮外気にて15±5回/時間，照明：蛍光灯により明暗12時間サイクル（明期8:00-20:00）．

2.3 実験方法

2.3.1 実験群の構成

群名	処置	被験物質	用量 (mg/kg)	例数 (匹)
偽手術	偽手術	0.5%MC	-	14
対照	OVX	0.5%MC	-	14
ジケトヒドラジン誘導体 1 最低用量	OVX	ONO-5334	0.12	14
ジケトヒドラジン誘導体 1 低用量	OVX	ONO-5334	0.6	14
ジケトヒドラジン誘導体 1 中用量	OVX	ONO-5334	3	14
ジケトヒドラジン誘導体 1 高用量	OVX	ONO-5334	15	14
Alendronate	OVX	Alendronate	1	14

ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

2.3.2 実験動物の群分け法

馴化終了日に群分けを行った．馴化終了日の体重をもとに層別無作為化法により 1 群 14 匹を割り当てた（入荷動物数：103 匹，中央値の体重に近い動物 98 匹を使用）．なお，過去の検討から，1 群 10 匹以上の例数を設定することで，対照群の脛骨骨密度減少作用，

alendronate の脛骨骨密度改善作用が検出できることを確認している．試験期間中のトラブルによる除外動物発生の可能性を考慮し，1 群 14 例を設定した．

2.3.3 実施方法

2.3.3.1 卵巣摘出（OVX）及び投与

実験 1 日及び 2 日に，OVX 手術を実施した．ラットにソムノペンチル（共立製薬株式会社　東京）を 64.8 mg/mL，0.10-0.15 mL/body の容量で腹腔内に投与し麻酔を行った．背部をバリカンで剃毛し，消毒用エタノールで消毒した．背部皮膚とその直下の筋及び腹膜を切開し，術創より卵巣を引き出した．卵管部分を周辺脂肪組織ごと結紮した後，結紮部より末梢側で両側卵巣を摘出した．偽手術群は開腹のみとした．切開部筋層の縫合には縫合糸を用い，切開部皮膚の縫合にはミヘル針を用いた．いずれの動物も縫合前に筋層に，感染予防のため 1 バイアルあたり注射用水 5 mL で溶解した注射用ビクシリン S500 液を，0.1 mL/body の用量で滴下した．術後，ヨードチンキを消毒用アルコールで 5 倍に希釈した液を用いて術創部を消毒した．OVX の翌日から投与を開始し，1 日に 1 回，合計 56 回，反復経口投与を行った．投与は，経口ゾンデ（MZ-1，日本クレア株式会社　東京）を用いて行った．投与容量は 10 mL/kg とした．投与液量は，投与前日までの最も近い日に測定した体重に基づいて個別に算出した．なお，体重は，入荷日及び馴化終了日に測定した後，投薬期間中は 1 週間に 1 回測定し，標本採取日にも測定した．

2.3.3.2 給餌方法

投与実施日は，投与 2 時間以上前に絶食を開始し，投与後 2 時間以上の間隔をあけた後に，給餌した．投薬期間中の給餌量は，固形飼料を 1 匹当り 4 粒（約 13 g）とした．固形飼料は，CRF-1（オリエンタル酵母株式会社　東京）を使用した．

2.3.3.3 採尿

投与 54-55 日目に代謝ケージを用いて 24 時間蓄尿した．なお，採尿期間も代謝ケージ内に餌を与えることにより給餌した．尿は，尿量を測定後，4℃にて 3000 rpm（1800*g*），10 分間遠心し，上清を-20℃で保存した．

2.3.3.4 血漿採取

投与 56 日目の投与 3 時間後に，頸静脈より 0.5 mL（0.4-0.6 mL）ヘパリン下採血した．血漿は，採取した血液を，4℃にて 12000 rpm（12000*g*），10 分間遠心することにより調製し，-20℃で保存した．

2.3.3.5 子宮，骨標本及び血清採取

最終投与日（投与 56 日目）の翌日，エーテル麻酔下で腹部大動脈より採血した．血清は，採取した血液を室温にて 30 分以上放置後，3000 rpm（1800*g*），15 分間，4℃の条件下で遠心することにより調製し，1 mL を-80℃で凍結保存した．ラットを放血屠殺後，子宮及び左脛骨を採取した．子宮は，OVX 手術の成否を確認する目的で採取し，重量を測定後処分した．左脛骨は，筋肉などの軟組織を取り除いた後，乾燥を防ぐため生理食塩液を浸した脱脂綿に包んで-20℃で保存した．

2.3.4　評価項目及び評価方法

2.3.4.1　左脛骨近位骨幹端部骨密度の測定

（pQCT法：peripheral quantitative computed tomography法）

左脛骨は，近位から遠位方向の長さ（mm）をデジタルノギス（500-404，株式会社ミツトヨ　神奈川）で測定後，近位骨幹端部（近位骨端から遠位方向に 4 mm の位置）の骨密度を XCT Research SA+(software version 5.40, Stratec Medizintechnik GmbH Germany)を用いて測定した．なお，評価パラメータは，全骨密度（mg/cm^3），全骨塩量（mg/mm），海綿骨骨密度（mg/cm^3），海綿骨骨塩量（mg/mm），皮質骨骨密度（mg/cm^3），皮質骨骨塩量（mg/mm），皮質骨厚（mm），皮質骨外膜周囲長（mm）及び皮質骨内膜周囲長（mm）とした（**図 4-1**）．測定条件は，contour mode 2，peel mode 20，対全骨断面積比 35%，filter 1（true）とした．

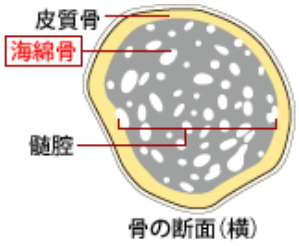


図 4-1　骨の断面図（皮質骨の外側：外膜，内側：内膜）

2.3.4.2　左脛骨近位骨幹端部圧迫強度の測定

骨強度測定装置(インストロン万能材料試験機 5544 型, Software: Merlin version 5.11, インストロンジャパン株式会社　神奈川）を用いて，左脛骨近位骨幹端部の圧迫強度を測定した（**図 4-2**）．左脛骨を近位骨端から 3 mm 及び 5 mm の位置で，精密低速切断機（ISOMET, BUEHLER USA）を用いて切断し，厚さ 2 mm の骨片を得た．骨片を近位側が上になるように試料台に置き，近位から遠位方向に上方から 0.5 mm/min の速度で荷重を加えて，荷重－変位曲線を得た．荷重－変位曲線から絶対負荷（N），剛性（N/mm）及び吸収エネルギー（mJ）を得た．なお，絶対負荷は，荷重－変位曲線上の荷重最大値とし，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．また，これらの数値は解析ソフトウェア Merlin にて算出した．

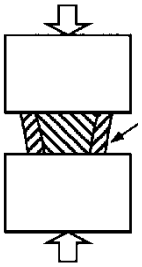


図 4-2　脛骨圧迫強度測定の模式図（Hogan ら　2000）

2.3.4.3　尿中デオキシピリジノリン（DPD）濃度の測定

DPD は 3 本鎖コラーゲン同士を架橋する分子（**図 4-3**，図中の peptide cross-links が該当）であり，NTX，CTX と同様，骨吸収マーカーに位置づけられている．

尿中 DPD 値はオステオリンクス「DPD」（住友製薬バイオメディカル株式会社　大阪）を用いて測定した．なお，吸光度の測定には SPECTRA MAX 250（日本モレキュラーデバイス株式会社　東京）を使用し，測定手順及び DPD 値の算出は添付文書に従った．また，同一検体の尿中クレアチニン（CRE）濃度を L タイプワコー クレアチニン F（和光純薬工業株式会社　大阪）を用い添付文書に従って自動分析装置（7080 形，株式会社 日立製作所 東京）で測定した．次式により尿中 DPD 濃度を算出した．

尿中 DPD 濃度（nmol/mmol CRE）= DPD 値（nmol/L）／｛CRE 濃度（mg/dL）×0.088｝

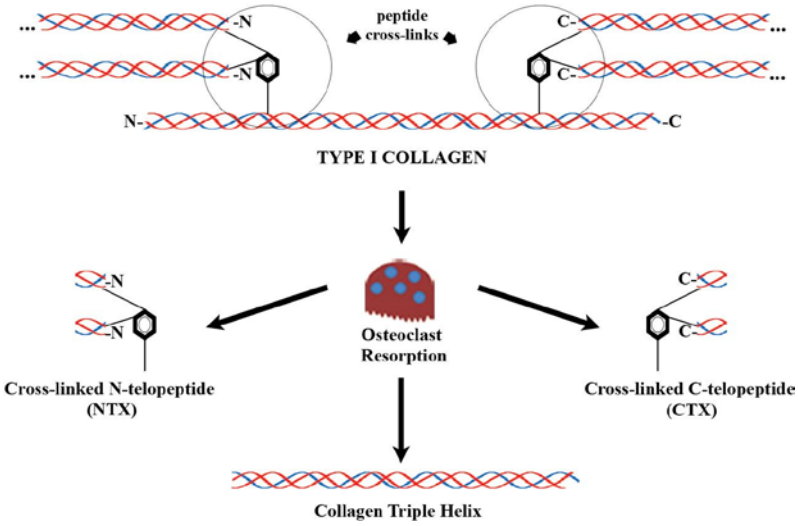


図 4-3　コラーゲンと骨吸収マーカー

2.3.4.4　血漿中CTX濃度の測定

最終投与 3 時間後の血漿中 CTX 濃度を RatLaps ELISA（Nordic Bioscience Diagnostics A/S Denmark）を用いて測定した．血漿は，フィルター（Ultrafree-MC，Millipore USA）を用いて限外濾過を行い，分子量 30,000 以上を取り除いたものを測定試料とした．なお，吸光度の測定は SPECTRA MAX 250（日本モレキュラーデバイス株式会社　東京）を使用し，測定手順は添付文書に従った．なお，CTX 濃度が定量範囲下限値（2 μg/L）未満の場合，その検体については CTX 濃度を 2 μg/L とした．

2.3.4.5　血清中オステオカルシン（OC）濃度の測定

OCは非コラーゲン性タンパク質として骨の有機質の25%を占める．本タンパクは骨芽細胞から分泌されることから，骨形成過程における骨形成マーカーとして汎用されている．血清中OC値をラットオステオカルシンELISA（GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社 東京）を用いて測定した．なお，吸光度の測定は，SPECTRA MAX 250（日本モレキュラ

ーデバイス株式会社　東京）を使用し，測定手順は添付文書に従った．なお，OC濃度は，ELISAで算出されたOC値に希釈倍率を乗じて算出した．

2.4　データの表示及び処理方法

骨採取日の体重，骨密度，骨塩量，皮質骨厚，周囲長，尿中 DPD 濃度，血漿中 CTX 濃度，血清中 OC 濃度，絶対負荷，剛性及び吸収エネルギーについて，以下の様に統計解析を行った．偽手術群と対照群の間で，t 検定を行った．対照群とジケトヒドラジン誘導体 1 投与群の間では Dunnett 検定を行った．また，対照群と alendronate 投与群については，t 検定を行った．危険率 5%未満を統計学的に有意とした．

なお，尿中 DPD 値及び CRE 濃度は，尿中 DPD 濃度を算出するため，子宮重量は OVX の成否の判断に使用するために測定したものであり，これらはいずれも統計解析を行わなかった．また，体重に関しては投与期間中の体重は投与液量の算出のために測定したものであるため統計解析を行わず，骨採取日の体重のみ統計解析を行った．

3　結果

3.1　体重

骨採取日の体重を**表 4-1** に示した．対照群の体重は，偽手術群に比べて増加した．対照群とジケトヒドラジン誘導体 1 及び alendronate 投与群との間に，有意な差はなかった．

表 4-1　剖検日体重

Treatment	Dose (mg/kg)	Body weight (g)
Sham	-	179.9 ± 2.3
OVX	-	188.3 ± 1.3 ##
ジケトヒドラジン誘導体 1	0.12	185.5 ± 3.1
ジケトヒドラジン誘導体 1	0.6	180.8 ± 3.9
ジケトヒドラジン誘導体 1	3	184.1 ± 2.1
ジケトヒドラジン誘導体 1	15	184.9 ± 3.0
Alendronate	1	184.8 ± 2.3

数値は平均値 ± 標準誤差を示す（n = 14）
##: $P < 0.01$ 偽手術群（Sham）との間に有意差あり（t 検定）
OVX: ovariectomy

3.2　子宮重量

子宮重量を**表 4-2** に示した．OVX を行った対照群，ジケトヒドラジン誘導体 1 最低用量

群，低用量群，中用量群，高用量群及び alendronate 群における子宮重量の最大値はそれぞれ 53.8，59.3，57.8，61.8，62.4 及び 67.1 mg であった．一方，偽手術群における子宮重量の最低値は 145.7 mg であり，卵巣摘出動物の子宮重量より大きかった．

表 4-2　剖検日子宮重量

Treatment	Dose (mg/kg)	Uterus weight (mg)		
		Mean±S.E.	Minimum	Maximum
Sham	-	235.8±15.5	145.7	317.1
OVX	-	43.8±1.9	30.1	53.8
ジケトヒドラジン誘導体 1	0.12	50.5±2.0	35.9	59.3
ジケトヒドラジン誘導体 1	0.6	45.5±2.2	27.7	57.8
ジケトヒドラジン誘導体 1	3	46.3±2.8	30.5	61.8
ジケトヒドラジン誘導体 1	15	46.6±2.8	29.2	62.4
Alendronate	1	44.8±3.2	28.5	67.1

OVX: ovariectomy

3.3　骨密度・骨塩量

左脛骨近位骨幹端部の全（Total）骨密度・骨塩量，海綿骨（Trabecular）骨密度・骨塩量及び皮質骨（Cortical）骨密度・骨塩量を**図 4-4** に示した．卵巣摘出対照群の左脛骨近位骨幹端部における全骨密度，全骨塩量，海綿骨骨密度及び海綿骨骨塩量は偽手術群に比べて低下した．ジケトヒドラジン誘導体 1 は，OVX による全骨密度，全骨塩量，海綿骨骨密度及び海綿骨骨塩量の低下を，それぞれ 0.6，15，3 及び 15 mg/kg 以上の用量で抑制した．一方，alendronate もこれらの骨密度，骨塩量の低下を抑制した．卵巣摘出対照群の皮質骨骨密度は，偽手術群に比べて増加した．ジケトヒドラジン誘導体 1 は，0.6 mg/kg 以上の用量で皮質骨骨密度を増加させた．一方，卵巣摘出対照群と alendronate 投与群の間に有意な差はなかった．卵巣摘出対照群の皮質骨骨塩量は，偽手術群に比べて低下した．ジケトヒドラジン誘導体 1 は，3 mg/kg 以上の用量で皮質骨骨塩量を増加させた．一方，alendronate も皮質骨骨塩量の低下を抑制した．

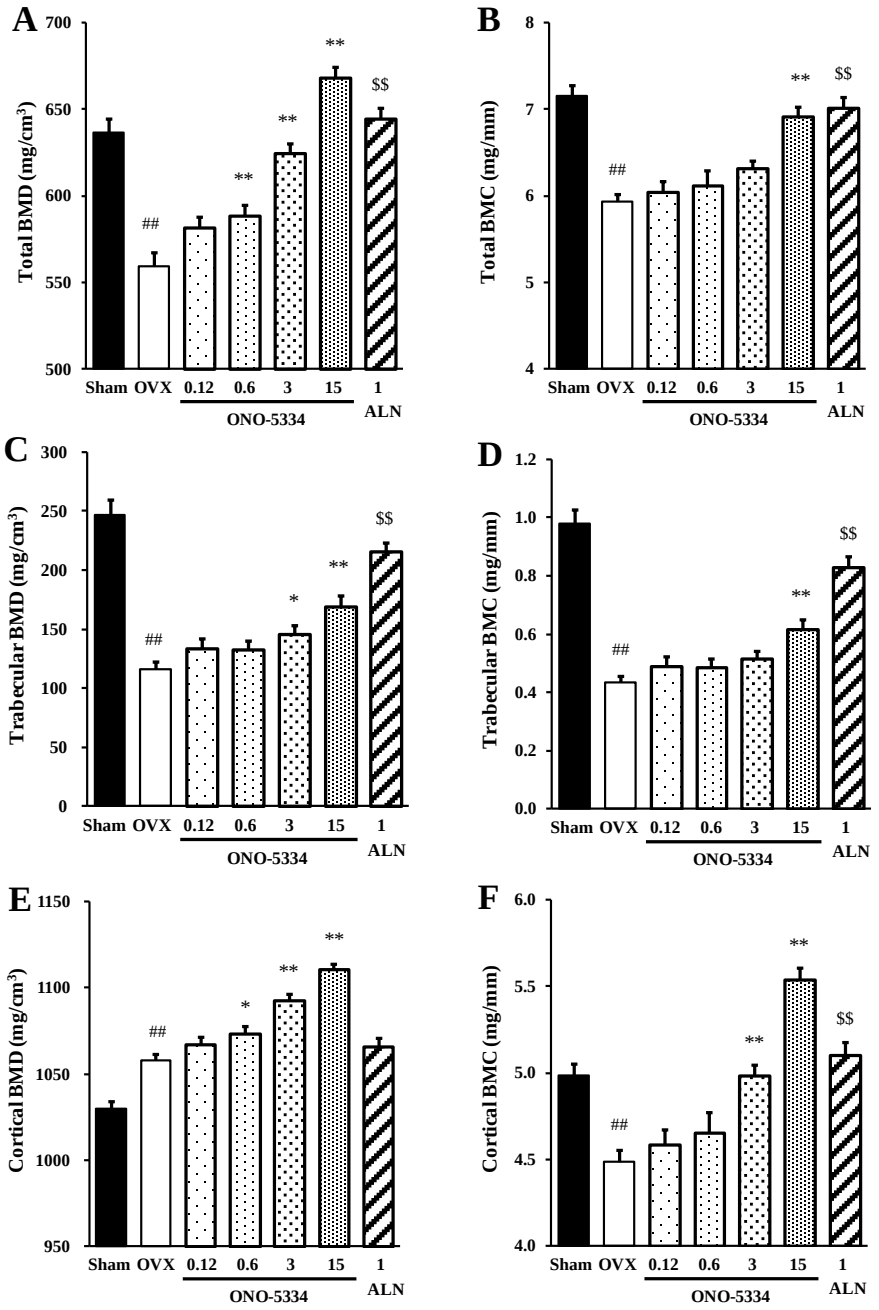


図 4-4　ジケトヒドラジン誘導体 1 の脛骨近位骨幹端部骨密度（BMD），骨塩量（BMC）に対する作用

各カラムは平均値 + 標準誤差を示す（n = 14）

（A）全（Total）骨密度，（B）全骨塩量，（C）海綿骨（Trabecular）骨密度，（D）海綿骨骨塩量，（E）皮質骨（Cortical）骨密度，（F）皮質骨骨塩量

##: $P < 0.01$ 偽手術群（Sham）との間に有意差あり（t 検定）

*, **: $P < 0.05, 0.01$ 対照群（Control）との間に有意差あり（Dunnet 検定）

$$: $P < 0.01$ 対照群（Control）との間に有意差あり（t 検定）

ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

3.4　皮質骨厚，外内膜周囲長

左脛骨近位骨幹端部の皮質骨厚（Cortical Thickness），外膜（Periosteal Circumference）及び内膜周囲長（Endosteal Circumference）を**図 4-5** に示した（外膜，内膜の説明に関しては**図 4-1** 参照）．卵巣摘出対照群の左脛骨近位骨幹端部における皮質骨厚及び外膜周囲長は偽手術群に比べて低下した．ジケトヒドラジン誘導体 1 は，OVX による皮質骨厚の低下を 3 mg/kg 以上の用量で抑制した．一方，alendronate も皮質骨厚の低下を抑制した．外膜周囲長については，対照群とジケトヒドラジン誘導体 1 及び alendronate 投与群との間にも有意な差はなかった．卵巣摘出対照群の皮質内膜周囲長は，偽手術群との間に有意な差はなかった．ジケトヒドラジン誘導体 1 は，3 mg/kg 以上の用量で皮質骨内膜周囲長を低下させた．一方，対照群と alendronate 投与群の間に有意な差はなかった．

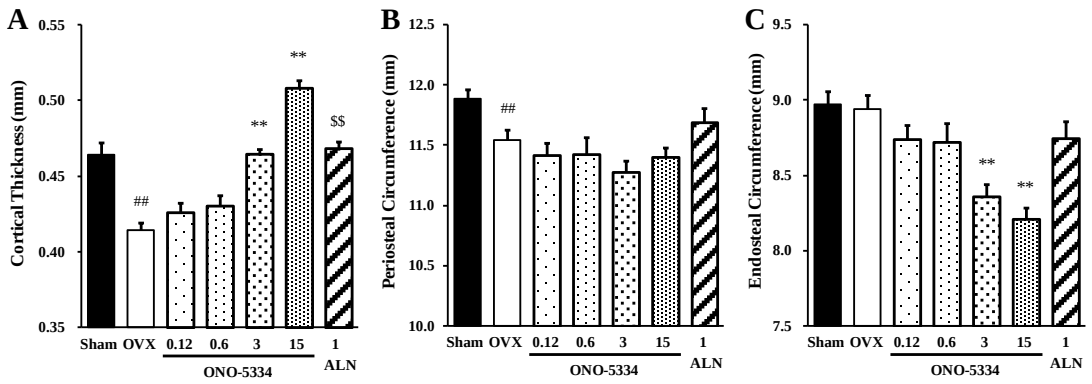


図 4-5　ジケトヒドラジン誘導体 1 の皮質骨に対する作用

各カラムは平均値 + 標準誤差を示す（n = 14）

（A）皮質骨厚（Cortical Thickness），（B）皮質骨外膜周囲長（Periosteal Circumference），（C）皮質骨内膜周囲長（Endosteal Circumference）

##: $P < 0.01$ 偽手術群（Sham）との間に有意差あり（t 検定）

**: $P < 0.01$ 対照群（Control）との間に有意差あり（Dunnet 検定）

$$: $P < 0.01$ 対照群（Control）との間に有意差あり（t 検定）

ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

3.5　骨強度

左脛骨近位骨幹端部の圧迫試験における絶対負荷（Maximum Load），剛性（Stiffness）及び吸収エネルギー（Energy Absorption）を**図 4-6** に示した．卵巣摘出対照群の左脛骨近位骨幹端部における絶対負荷及び吸収エネルギーは偽手術群に比べて低下した．ジケトヒドラジン誘導体 1 は OVX による絶対負荷及び吸収エネルギーの低下を，いずれも 3 mg/kg 以上の用量で抑制した．また，alendronate も絶対負荷及び吸収エネルギーの低下を，いずれも抑制した．剛性については，対照群と偽手術群の間に有意な差はなく，対照群とジケトヒドラジン誘導体 1 及び alendronate 投与群との間にも有意な差はなかった．

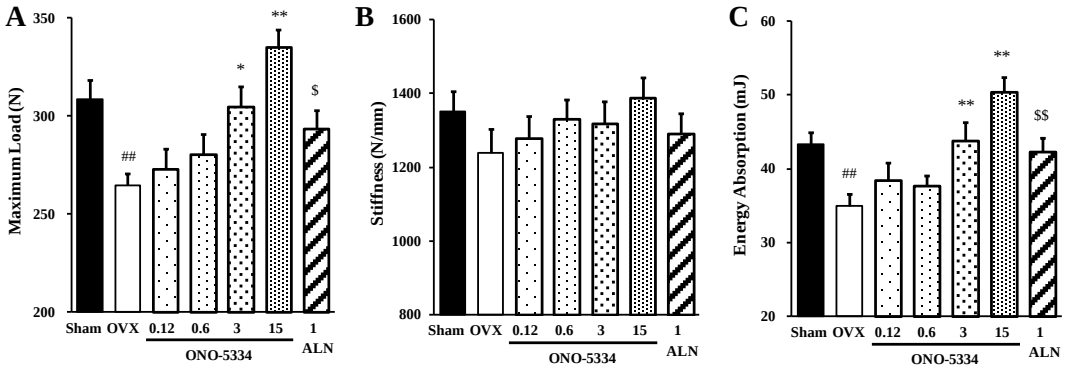


図 4-6　ジケトヒドラジン誘導体 1 の骨強度に対する作用

各カラムは平均値 + 標準誤差を示す（n = 14）

（A）絶対負荷（Maximum Load），（B）剛性（Stiffness），（C）吸収エネルギー（Energy Absorption）

##: $P < 0.01$ 偽手術群（Sham）との間に有意差あり（t 検定）

*, **: $P < 0.05, 0.01$ 対照群（Control）との間に有意差あり（Dunnet 検定）

$, $$: $P < 0.05, 0.01$ 対照群（Control）との間に有意差あり（t 検定）

ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

3.6　骨代謝マーカー

3.6.1　尿中 DPD 濃度

投与 54-55 日目に採取した尿中 DPD 濃度を**表 4-3** 示した．卵巣摘出対照群の尿中 DPD 濃度は，偽手術群に比べて上昇した．ジケトヒドラジン誘導体 1 は，0.6 及び 15 mg/kg の用量で OVX による尿中 DPD 濃度の上昇を抑制した．また，alendronate も尿中 DPD 濃度の上昇を抑制した．

3.6.2　血漿中 CTX 濃度

最終投与 3 時間後の血漿中 CTX 濃度を**表 4-3** に示した．卵巣摘出対照群と偽手術群の血漿中 CTX 濃度に有意な差はなかった．ジケトヒドラジン誘導体 1 は，血漿中 CTX 濃度を 0.12 mg/kg 以上の用量で低下させた. また, alendronate も血漿中 CTX 濃度を低下させた.

3.6.3　血清中 OC 濃度

骨採取日に採取した血清中 OC 濃度を**表 4-3** に示した. 卵巣摘出対照群と偽手術群の血清中 OC 濃度に有意な差はなかった．また，対照群とジケトヒドラジン誘導体 1 及び alendronate 投与群との間に，有意な差はなかった.

表 4-3. 尿中 DPD, 血漿中 CTX, 血清中 OC に対するジケトヒドラジン誘導体 1 の作用

Treatment	Dose (mg/kg)	Urinary DPD (nmol/mmol Cr)	Plasma CTX (μg/L)	Serum osteocalcin (ng/mL)
Sham	-	152.9 ± 7.8	4.4 ± 0.3	23.2 ± 1.3
OVX	-	264.0 ± 14.5 ##	5.4 ± 0.4	25.5 ± 1.2
ジケトヒドラジン誘導体 1	0.12	265.0 ± 15.0	4.2 ± 0.2 **	26.8 ± 1.2
ジケトヒドラジン誘導体 1	0.6	212.2 ± 10.1 *	2.5 ± 0.1 **	23.8 ± 1.1
ジケトヒドラジン誘導体 1	3	225.1 ± 13.1	2.1 ± 0.0 **	24.1 ± 1.3
ジケトヒドラジン誘導体 1	15	200.9 ± 12.8 **	2.0 ± 0.0 **	25.9 ± 1.1
Alendronate	1	142.7 ± 6.9 $$	3.6 ± 0.2 $$	23.1 ± 1.0

数値は平均値 ± 標準誤差を示す（n = 14）
##: $P < 0.01$ 偽手術群（Sham）との間に有意差あり（t 検定）
*, **: $P < 0.05, 0.01$ 対照群（OVX）との間に有意差あり（Dunnett 検定）
OVX: ovariectomy

4 考察

骨粗鬆症は，加齢とともに骨吸収と骨形成のバランスが崩れ，相対的に骨吸収が優位になって骨量の減少が起こり，さらに骨の微細構造の崩壊により骨強度が低下し，骨折が起こり易くなる病態である．よって，骨粗鬆症治療薬は，骨量を増加させるのみでなく，骨強度を増加させ，骨折を予防させなければならない．しかし，ヒトにおいて骨強度を測定する事は出来ないため，非臨床試験において，薬物による骨強度への影響を十分に検討することが重要とされている．OVX ラットは，エストロゲンの欠乏により骨代謝回転が亢進し，骨量及び骨強度が低下して，ヒト閉経後骨粗鬆症と同様の特徴を示すため，非臨床試験として多用されている（Tanaka ら　2008）．

本試験において卵巣摘出動物の子宮重量はいずれも，偽手術群の各動物に比べ低下していたことから，OVX によりエストロゲンの欠乏が惹起されたと考えられた．

骨吸収マーカーについて，卵巣摘出対照群では偽手術群に対して，血漿中 CTX 濃度は有意ではないものの高値を示し，尿中 DPD 濃度は増加した．また，骨形成マーカーである血清中 OC 濃度も有意ではないものの高値を示した．さらに卵巣摘出対照群では偽手術群に対して骨密度，骨塩量，皮質骨厚及び骨強度が低下した．これらのことから，OVX により骨代謝回転は亢進し，それにより骨量の減少並びに骨の脆弱化が引き起こされているものと考えられた．

ジケトヒドラジン誘導体 1 は骨吸収マーカーである尿中 DPD 濃度及び血漿中 CTX 濃度を抑制した．一方，ジケトヒドラジン誘導体 1 は，骨形成マーカーである血清中 OC 濃度に対して作用しなかった．これらのことから，カテプシン K 阻害剤ジケトヒドラジン誘導

体 1 は骨形成には影響を及ぼさず骨吸収を抑制することが明らかとなった.

左脛骨の骨密度について，ジケトヒドラジン誘導体 1 は OVX による近位骨幹端部の全骨密度及び海綿骨骨密度の低下をそれぞれ 0.6 及び 3 mg/kg 以上の用量で抑制した．また，ジケトヒドラジン誘導体 1 は皮質骨骨密度及び骨塩量を顕著に増大させた．一方，alendronate は，OVX による全骨密度及び海綿骨骨密度の低下を抑制するものの，皮質骨骨密度には効果を示さなかった．これらのことから，ジケトヒドラジン誘導体 1 は海綿骨及び皮質骨の両者に対して作用すると考えられた．皮質骨の詳細を解析した結果，ジケトヒドラジン誘導体 1 は皮質骨厚を顕著に増加させた．この皮質骨厚の増加には皮質骨内側の骨量増加が寄与しており，その結果，皮質骨内膜周囲長の減少していると考えられた．カテプシン K 阻害剤は **2 章**で示したように破骨細胞に傷害を与えることなく，骨吸収を抑制する．破骨細胞と骨芽細胞は緒言でも示したように相互作用している．骨芽細胞機能を規定する因子として，骨中に埋没している成長因子やサイトカイン，破骨細胞からの直接の骨芽細胞制御因子の存在が考えられている．カテプシン K 阻害による骨吸収の抑制は骨に埋没している骨形成因子の放出を抑制するため，骨形成機能に影響を及ぼす可能性がある．しかし，破骨細胞自体に傷害は与えないことから，破骨細胞からの骨芽細胞制御因子の放出には影響しない．一方，BP は破骨細胞を傷害し，骨吸収を抑制することから，骨に埋没している骨形成因子及び破骨細胞から直接放出される骨形成因子を共に抑制する．骨代謝回転（速度）の違いから，海綿骨と皮質骨では骨及び破骨細胞由来の因子の骨形成に対する寄与度が異なることが想定される．すなわち，骨粗鬆症患者において骨密度が顕著に減少する海綿骨部位は骨代謝回転が非常に高く，骨埋没因子の骨形成に与える寄与は大きい．一方，皮質骨部位は海綿骨に比べ骨代謝回転が低いため，骨形成における破骨細胞自体の寄与が大きい．したがって，破骨細胞に傷害を与えないカテプシン K 阻害剤は皮質骨に対し，顕著な作用を示したと考えられた.

さらに，ジケトヒドラジン誘導体 1 は OVX による左脛骨近位骨幹端部の骨強度の低下を 3 mg/kg 以上の用量で抑制した．同部位において，ジケトヒドラジン誘導体 1 は骨密度の低下を抑制していることから，骨密度の改善に応じて骨強度を増加させたものと考えられた.

以上，ジケトヒドラジン誘導体 1 はラットを用いた閉経後骨粗鬆症モデルにおいて，骨形成には影響せず，骨吸収を選択的に抑制することで，骨密度，骨塩量及び骨強度の低下を抑制することが確認された(Ochi ら　2014　J Bone Miner Metab).

5 章：ラット卵巣摘出骨粗鬆症モデルに対するジケトヒドラジン誘導体 2 と parathyroid hormone（PTH）の併用効果

1　試験目的

骨粗鬆症治療薬として，BP 製剤に代表される骨吸収抑制剤と PTH に代表される骨形成促進剤が使用されている．BP は **2 章**で述べたように破骨細胞を傷害し，骨吸収機能を抑制する．PTH は **3 章**で述べたように単回投与では骨吸収を亢進し，血中 Ca 及び CTX 濃度を上昇させる．本機序には破骨細胞分化誘導因子である RANKL が関与していると報告されている（Horwood ら　1998）．一方，PTH の間歇投与は骨芽細胞分化亢進，生存を延長させることで，骨形成を促進させる．PTH の間歇（連続）投与は骨形成以外に骨吸収も亢進させるが，**図 5-1** のように骨形成と骨吸収の亢進には時間差があり（Anabolic window）骨形成が吸収を上回ることから，結果的に PTH の間歇投与は骨密度を上昇させる（Silva ら 2011）．これら 2 種類の薬剤は作用標的，作用機序の違いから併用投与により優れた骨密度改善作用を得ることを期待されたが，実際，臨床においてその併用効果は確認されなかった（Felsenberg ら　2005）．その一因として，BP は二次的に骨形成を抑制するため，PTH による骨形成作用を打ち消すことが考えられた．

2 章及び **4 章**で示したようにカテプシン K 阻害剤は骨形成に影響を与えず，骨吸収を選択的に抑制することで骨密度を改善する（Ochi ら　2011, 2014　J Bone Miner Metab）．したがって，BP とは異なり，カテプシン K 阻害剤には骨形成促進剤（PTH）との併用効果が期待される．そこで，カテプシン K 阻害剤ジケトヒドラジン誘導体 2 と PTH の併用効果をラット卵巣摘出（OVX）骨粗鬆症モデルを用いて検討した．また，ビスホスホネート製剤（alendronate）と PTH の併用効果も検討し，両薬剤の作用を比較した．

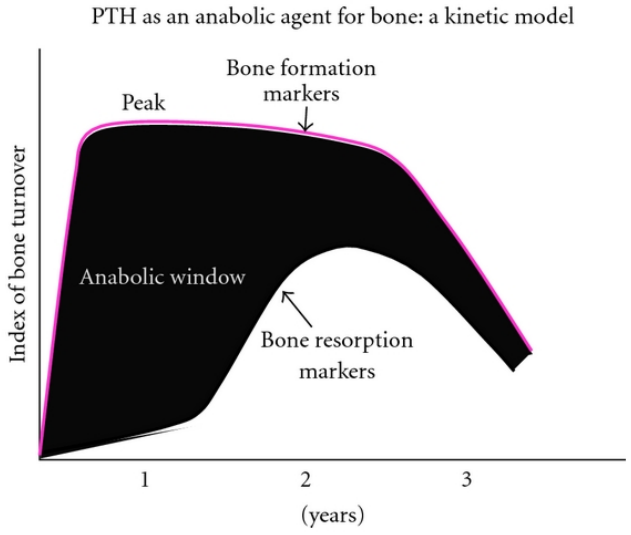


図 5-1　PTH の骨形成，骨吸収作用と Anabolic window

2　方法

2.1　被験物質，対照物質及びその調製

2.1.1　被験物質及び対照物質

骨吸収抑制剤として，カテプシン K 阻害剤　ジケトヒドラジン誘導体 2（**図 5-2**，Lot.3）及び BP　alendronate（Lot.2398202, LKT Laboratories, Inc. USA）を使用した．骨形成促進剤として parathyroid hormone（PTH, Lot.N05129A1, APC USA）を使用した．

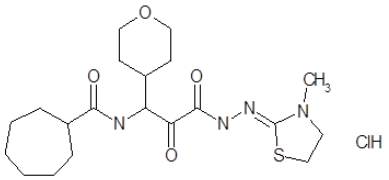


図 5-2　ジケトヒドラジン誘導体 2 の構造

N-｛3-［(2*Z*)-2-（3-methyl-1,3-thiazolidin-2-ylidene) hydrazino］-2,3-dioxo-1-tetrahydro-2*H*-pyran-4-ylpropyl｝cycloheptanecarboxamide hydrochloride

2.1.2　被験物質及び対照物質の調製と保存方法

ジケトヒドラジン誘導体 2 は 0.5%メチルセルロース（MC(4000)，シグマアルドリッチジャパン株式会社　東京）にて 0.6 mg/mL の液を調製した．Alendronate は 5.6 mg/mL の濃度となるよう 0.01 mol/L の NaOH で溶解させた（pH が 7 前後であることを確認）．本液を 0.5%MC にて 28 倍希釈し，0.2 mg/mL 溶液を調製した．PTH は 84 μg/mL の濃度になるように 0.1%ウシ血清アルブミン（以下 BSA，code.A-4503，シグマアルドリッチジャパン株式会社　東京）含有生理食塩液（大塚生食注，大塚製薬株式会社　徳島）にて溶解し，保存液とした．PTH 投与日に 0.1%BSA 含有生理食塩液にて希釈し，使用した．

2.2　実験材料

2.2.1　実験動物

2.2.1.1　使用動物

雌性 F344/NSlc（日本エスエルシー株式会社　静岡，リタイア，購入時週齢：約 6 カ月齢）を使用した．本試験では閉経後骨粗鬆症患者に近い状態を反映させるため，**4 章**で使用した 10 週齢の動物ではなく，約 6 カ月齢のリタイアラットを使用した．ラット S ケージに 1 ケージ当たり 1 匹収容して 1 週間以上馴化した．馴化期間は固形飼料 CRF-1（オリエンタル酵母株式会社　東京）及び上水道水（自動給水装置）を自由摂取させた．実験飼育期間は制限給餌を行った（被験物質投与 2 時間以上前から絶食を開始し，被験物質投与 2 時間以上後から CRF-1 を 9-13 g 給餌した）．

なお，本試験に際しては，小野薬品工業株式会社　研究本部が制定した「動物実験等に関する規程」を遵守した．

2.2.1.2　飼育環境

温度：24±2℃，湿度：55±15%，換気：100%新鮮外気にて 15±5 回/時間，照明：蛍光灯により明暗 12 時間サイクル（明期 8:00-20:00）.

2.3　実験方法

2.3.1　実験群の構成

Group	手術	例数	投与化合物（細字；p.o.，太字；s.c.）
偽手術群 （Sham）	Sham	10	一回目 0.5% MC 5 mL/kg 二回目 0.5% MC 5 mL/kg **0.1%BSA 含有生理食塩液 5 mL/kg，三回/週**
対照群 （Control）	OVX	10	一回目 0.5% MC 5 mL/kg 二回目 0.5% MC 5 mL/kg **0.1%BSA 含有生理食塩液 5 mL/kg，三回/週**
Parathyroid hormone（PTH） 投与群 3μg/kgx3/week	OVX	10	一回目 0.5% MC 5 mL/kg 二回目 0.5% MC 5 mL/kg **PTH 3μg/5 mL/kg，三回/週**
ジケトヒドラジン誘導体 2 （KK1-300-01）投与群 3 mg/kgx2/day	OVX	10	一回目 ONO-KK1-300-01 3 mg/5 mL/kg 二回目 ONO-KK1-300-01 3 mg/5 mL/kg **0.1%BSA 含有生理食塩液 5 mL/kg，三回/週**
Alendronate（ALN）投与群 1 mg/kgx1/day	OVX	10	一回目 Alendronate 1 mg/5 mL/kg 二回目 0.5% MC 5 mL/kg **0.1%BSA 含有生理食塩液 5 mL/kg，三回/週**
PTH + KK1-300-01 投与群	OVX	10	一回目 ONO-KK1-300-01 3 mg/5 mL/kg 二回目 ONO-KK1-300-01 3 mg/5 mL/kg **PTH 3μg/5mL/kg，三回/週**
PTH + ALN 投与群	OVX	9	一回目 Alendronate 1 mg/5 mL/kg 二回目 0.5% MC 5 mL/kg **PTH 3μg/5 mL/kg，三回/週**

ONO-KK1-300-01（KK1-300-01）：ジケトヒドラジン誘導体 2

p.o.：経口投与，s.c.：皮下投与

2.3.2　実験動物の群分け法

手術前日の体重を用いて順位化し，層別無作為化法により 1 群 10 匹割り当てた（入荷及び使用動物数：70 匹，PTH＋ALN 群の 1 例は OVX 手術時の麻酔死により，データ採用動物数：69 匹）．なお，過去の検討から，1 群 10 匹以上の例数を設定することで，対照群の脛骨骨密度減少作用，alendronate の脛骨骨密度改善作用が検出できることを確認している．

2.3.3　実施方法

2.3.3.1　卵巣摘出(OVX)

4 章（**2.3.3.1**）で記載した方法を一部変更して行った．変更点として，動物の苦痛軽減の目的で，動物用ケタラール 50 とセラクタール 2%注射液を 10:1 の割合で混合した液を約 0.2 mL/ラットの用量で腹腔内投与した．処置を揃える目的で，偽手術群では麻酔後，腹部側面の除毛を行い，側腹部の皮，筋を切開し，一度卵巣を露出させ，卵巣を腹腔内に戻した後，筋及び皮膚を縫合した．

2.3.3.2　投与

卵巣摘出の翌日より，ジケトヒドラジン誘導体 2（一日二回）あるいは alendronate（一日一回）を 5 mL/kg の用量で連日経口投与した．なお，一日一回投与の場合，二回目には投与媒体（0.5%MC）を投与した．卵巣摘出 57 日目より PTH を 5 mL/kg の用量で一週間三回皮下投与した． 試験スケジュールを**図 5-3** に示した．

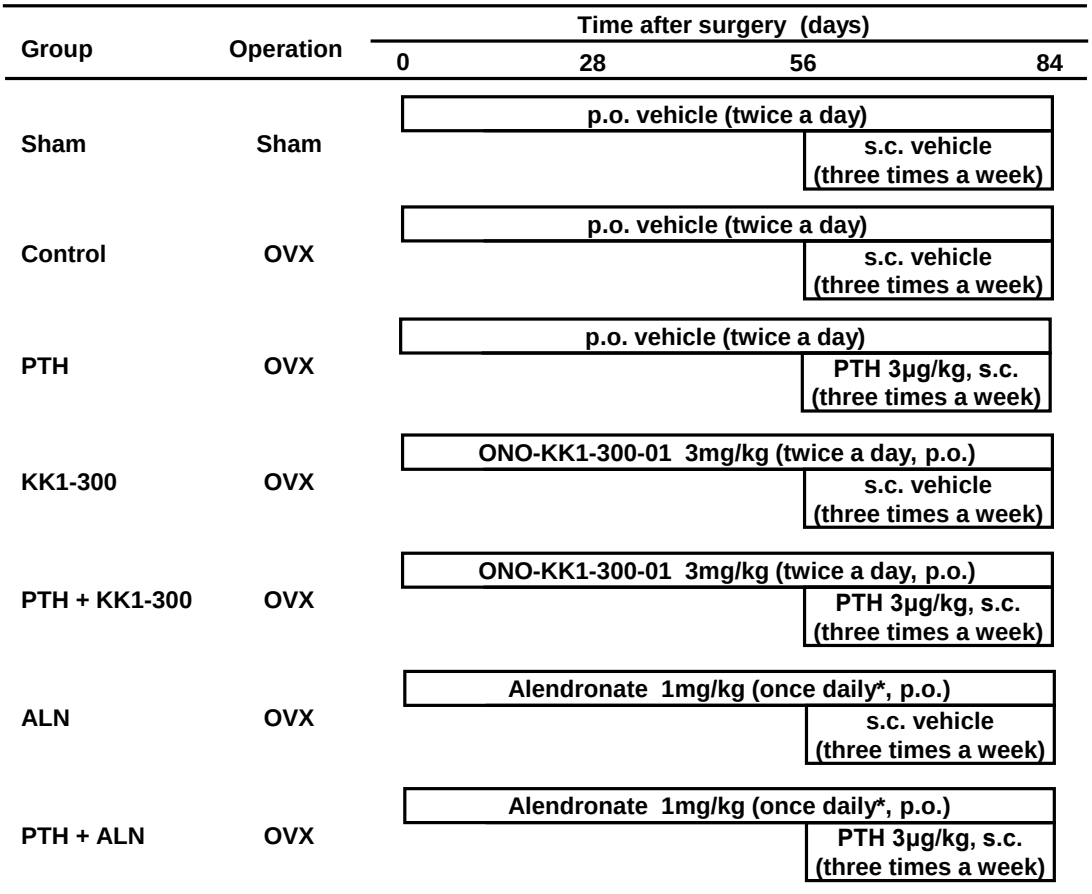


図 5-3　群構成と試験スケジュール

ONO-KK1-300-01（KK1-300）：ジケトヒドラジン誘導体 2

p.o.：経口投与，s.c.：皮下投与

2.3.3.3　採尿及び尿の保存

剖検の前日（手術後 83 日目）に代謝ケージを用いて 24 時間蓄尿を行った．採尿量を測定後，餌の混入を防ぐため，3000 rpm（1800*g*），15 分間遠心分離した．上清の尿を 1 mL 採取し，-20℃にて保存した．

2.3.3.4　剖検及び骨の保存

手術後 84 日目に剖検を行った．ラットをエーテル麻酔下で開腹後，腹部大動脈採血を行った．放血屠殺後，ラットの両肢及び第 4-6 腰椎を採取し，-20℃にて保存した．

2.3.3.5　血清の調製及び保存

採取した血液は室温にて 30 分以上放置後，3000 rpm（1800*g*），15 分間の遠心処置によって血清を分離した．分離血清は-80℃にて保存した．

2.3.3.6　尿中 DPD 濃度の測定

採取尿を材料として，DPD 濃度を MicroVue DPD（Quidel corporation, CA USA）を用いて測定した．吸光度の測定には SPECTRA MAX 250（日本モレキュラーデバイス株式会社 東京）を用いた．

2.3.3.7　尿中クレアチニン（CRE）濃度の測定

採取尿を材料として，CRE 濃度を酵素発色液 A（L-Type Creatinine F 酵素発色液 A；和光純薬工業株式会社　大阪）及び酵素発色液 B（L-Type Creatinine F 酵素発色液 B；和光純薬工業株式会社　大阪）を用いて測定した．なお，クレアチニン標準液（和光純薬工業株式会社　大阪, 10 mg/dL）及び本液を注射用水（株式会社　大塚製薬工場　徳島）にて 1.25, 2.5, 5 mg/dL に希釈した液を標準液として使用した．吸光度の測定には SPECTRA MAX 250（日本モレキュラーデバイス株式会社　東京）を用いた．

なお，尿中 DPD 濃度の測定値（nmol/mL）は同一個体について測定した尿中クレアチニン濃度（mmol/mL）で割った値（nmol/mmol CRE）で表示した．

2.3.3.8　血清中 OC 濃度の測定

採取血清を材料として，ラットオステオカルシン ELISA（GE ヘルスケアバイオサイエンス株式会社　東京）を使用し，血清中の OC 濃度を測定した．吸光度の測定には SPECTRA MAX 250（日本モレキュラーデバイス株式会社　東京）を用いた．

2.3.3.9　血清中酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ（TRAP5b）活性の測定

酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ 5b（TRAP5b）は破骨細胞が特異的に発現している酵素であり，破骨細胞を染色する際のマーカーとしても用いられている．したがって，TRAP5b は破骨細胞数を反映するマーカーとして汎用されている．採取血清を材料として，TRAP5b 測定キット（RatTRAP Assay, Immunodiagnostic Systems, Ltd. UK）を使用し，血清中の TRAP5b 活性を測定した．吸光度の測定には SPECTRA MAX 250（日本モレキュラーデバイス株式会社　東京）を用いた．

2.3.3.10　骨密度の測定

骨密度を末梢骨骨密度測定装置（pQCT：peripheral Quantitative Computed Tomography, XCT-Research SA+, Stratec Medizintechnik GmbH Germany, Software version 5.40）を用いて，voxel size 0.12mm で測定した．骨密度を測定する骨は付着している筋肉などの軟組織を取り除いた．左脛骨近位骨幹端部（骨端から 4 mm 部位）及び第 5 腰椎の骨密度を測定した．骨密度の測定終了後，70%エタノール溶液に浸漬し，4℃にて保存した．

2.3.3.11　脛骨骨形態計測

左足脛骨近位骨幹端部海綿骨について，骨形態計測を実施した．形態計測を実施するためにラットに剖検日の 5 及び 15 日前にカルセイン溶液を 8 mg/0.8mL/kg の用量で左足に筋肉注射した．カルセインは投与日に生理食塩液，2 mol/L NaOH 及び 2 mol/L HCl にて 10 mg/mL（最終的に pH.7 に調製）溶液を調製し，使用した．骨形態計測パラメーターに関しては**表 5-1** 及び**表 5-2** に記載した．

表 5-1　骨形態計測パラメーター（一次パラメーター）

計測の種類	測定項目名	略語
面積（μm^2）	組織量（tissue volume）	TV
	骨量（bone volume）	BV
長さ（μm）	骨面（bone surface）	BS
	類骨面（osteoid surface）	OS
	吸収面（eroded surface）	ES
	骨芽細胞面（osteoblast surface）	Ob.S
	破骨細胞面（osteoclast surface）	Oc.S
	一重標識面（single labeled surface）	sLS
	二重標識面（double labeled surface）	dLS
距離（μm）	類骨幅（osteoid thickness）	O.Th
	骨梁幅（trabecular thickness）	Tb.Th
数	骨芽細胞数（osteoblast number）	N.Ob
	破骨細胞数（osteoclast number）	N.Oc

表 5-2　骨形態計測パラメーター（二次パラメーター）

インデックス	略語	計算式	単位
静的インデックス			
骨量（bone volume）	BV/TV		%
類骨面（osteoid surface）	OS/BS		%
骨芽細胞面（osteoblast surface）	Ob.S/BS		%
吸収面（eroded surface）	ES/BS		%
破骨細胞面（osteoclast surface）	Oc.S/BS		%
破骨細胞数（osteoclast number）	N.Oc/B.Pm		1/100mm
構造インデックス			
骨梁数（trabecular number）	Tb.N	(BV/TV)/Tb.Th	1/mm
骨梁間距離（trabecular separation）	Tb.Sp	(1/Tb.N)- Tb.Th	μ m
動的インデックス			
骨石灰化面（mineralizing surface）	MS/BS	(dLS+sLS/2)/BS	%
骨石灰化速度（mineral apposition rate）	MAR	Ir.LTh/Ir.L.t	μ m/day
骨形成速度（bone formation rate）	BFR/BS	MAR(MS/BS)	$mm^3/cm^2/year$

B.Pm：骨面の長さ

Ir.LTh/Ir.L.t：標識期間当たりの二重標識の距離

2.4　統計解析

骨採取日の体重，骨密度，骨塩量，骨代謝マーカー，骨形態計測結果について，以下の様に統計解析を行った．Sham 群と Control 群の比較には t 検定，薬物の有効性比較には Tukey 検定を用い，危険率 5%未満を有意な差とした．

3　結果

3.1　体重

対照群の体重は，偽手術群に比べて増加した．対照群と被験物質投与群との間に，有意な差はなかった．

3.2　骨密度・骨塩量

左脛骨近位骨幹端部の全(Total)骨密度, 海綿骨(Trabecular)骨密度及び皮質骨(Cortical)骨密度を**図 5-4** に示した. 卵巣摘出対照群の左脛骨近位骨幹端部における全骨密度及び海綿骨密度は偽手術群に比べて低下した．PTH，ジケトヒドラジン誘導体 2 及び alendronate は単独で卵巣摘出による全脛骨骨密度の減少を改善した．海綿骨骨密度に関して，PTH 及びジケトヒドラジン誘導体 2 は卵巣摘出対照群に比して高値を示したが有意ではなかった．一方，alendronate は卵巣摘出対照群に比して海綿骨骨密度を有意に上昇させた．ジケトヒドラジン誘導体 2 の皮質骨骨密度は卵巣摘出対照群に比して高値を示した．また，ジケト

ヒドラジン誘導体 2 は PTH との併用により全脛骨骨密度の上乗せ効果が認められたが，alendronate と PTH の併用では上乗せ効果が認められなかった．ジケトヒドラジン誘導体 2 と PTH の併用効果は海綿骨骨密度において明確に認められた．

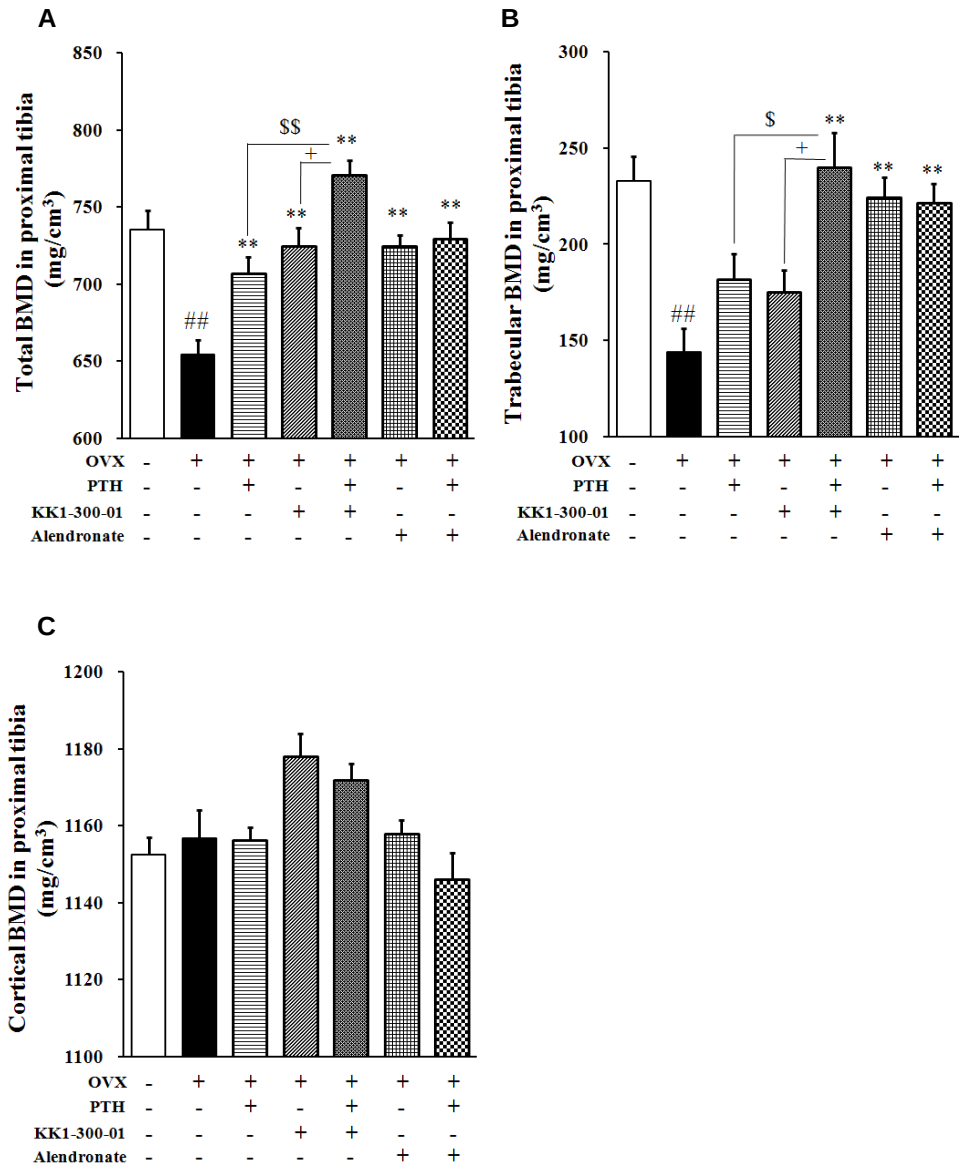


図 5-4　各種薬剤単独あるいは併用投与後の脛骨骨幹端部骨密度（BMD）に対する作用

各カラムは平均値 + 標準誤差を示す（n = 9-10）

（A）全（Total）骨密度，（B）海綿骨（Trabecular）骨密度，（C）皮質骨（Cortical）骨密度

##: $P < 0.01$ 偽手術群との間に有意差あり（t 検定）

**: $P < 0.01$ 対照群（Control）との間に有意差あり（Tukey 検定）

$, $$: $P < 0.05$, 0.01 PTH 群との間に有意差あり（Tukey 検定）

+: $P < 0.05$ KK1-300-01 群との間に有意差あり（Tukey 検定）

KK1-300-01：ジケトヒドラジン誘導体 2

第 5 腰椎全骨密度を**図 5-5** に示した．個体差が大きく脛骨骨密度ほど明確な変化は認められなかったが，卵巣摘出対照群の腰椎骨密度は偽手術群に比して減少し，PTH，ジケトヒドラジン誘導体 2 及び alendronate 投与により腰椎骨密度は卵巣摘出対照群に比べ高値を示した．ジケトヒドラジン誘導体 2 は PTH の併用群では腰椎骨密度に関しても上乗せ効果が認められた．

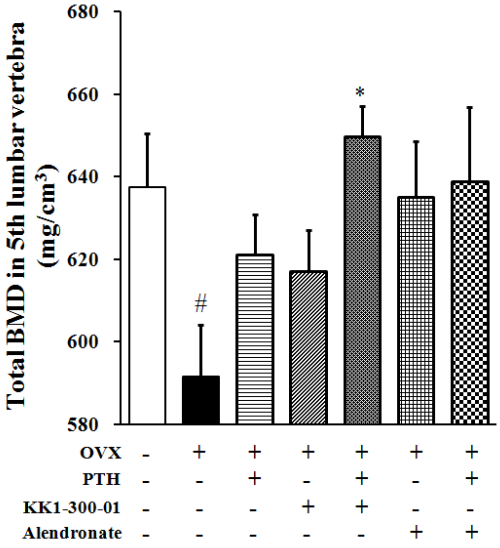


図 5-5　各種薬剤単独あるいは併用投与後の腰椎骨密度（BMD）に対する作用
各カラムは平均値 + 標準誤差を示す（n = 9-10）
#: $P < 0.05$ 偽手術群との間に有意差あり（t 検定）
*: $P < 0.05$ 対照群（Control）との間に有意差あり（Tukey 検定）
KK1-300-01：ジケトヒドラジン誘導体 2

3.3　骨代謝マーカー

3.3.1　尿中 DPD 濃度

剖検日前日より剖検日までに採取した尿中 DPD 濃度を**図 5-6** 示した．卵巣摘出対照群の尿中 DPD 濃度は偽手術群に比べて上昇した．ジケトヒドラジン誘導体 2 及び alendronate は卵巣摘出による尿中 DPD 濃度の上昇を抑制した. PTH は尿中 DPD 濃度の上昇を抑制しなかった. ジケトヒドラジン誘導体 2 あるいは alendronate に PTH を併用しても尿中 DPD 濃度の抑制作用は維持されていた.

3.3.2　血清中 OC 濃度

骨採取日に採取した血清中 OC 濃度を**図 5-6** に示した. 卵巣摘出対照群の血清 OC 濃度は偽手術群に比して上昇した．PTH 投与により血清 OC 濃度は卵巣摘出対照群に比して上昇した．ジケトヒドラジン誘導体 2 及び alendronate の血清 OC 濃度は卵巣摘出対照群と比して有意な変化を示さなかった．ジケトヒドラジン誘導体 2 と PTH の併用により血清 OC 濃度は PTH 単独群と同程度に維持されていたが，PTH に alendronate を併用することに

より PTH 単独群に比して血清 OC 濃度は低下した.

3.3.3　血清中 TRAP5b 活性

骨採取日に採取した血清中 TRAP5b 活性を**図 5-6** に示した．卵巣摘出対照群の血清 TRAP5b 活性は偽手術群に比べ変化を示さなかった. PTH 単独, alendronate 単独及び PTH と alendronate 併用群では対照群に比して有意に血清 TRAP5b 活性が低下した.

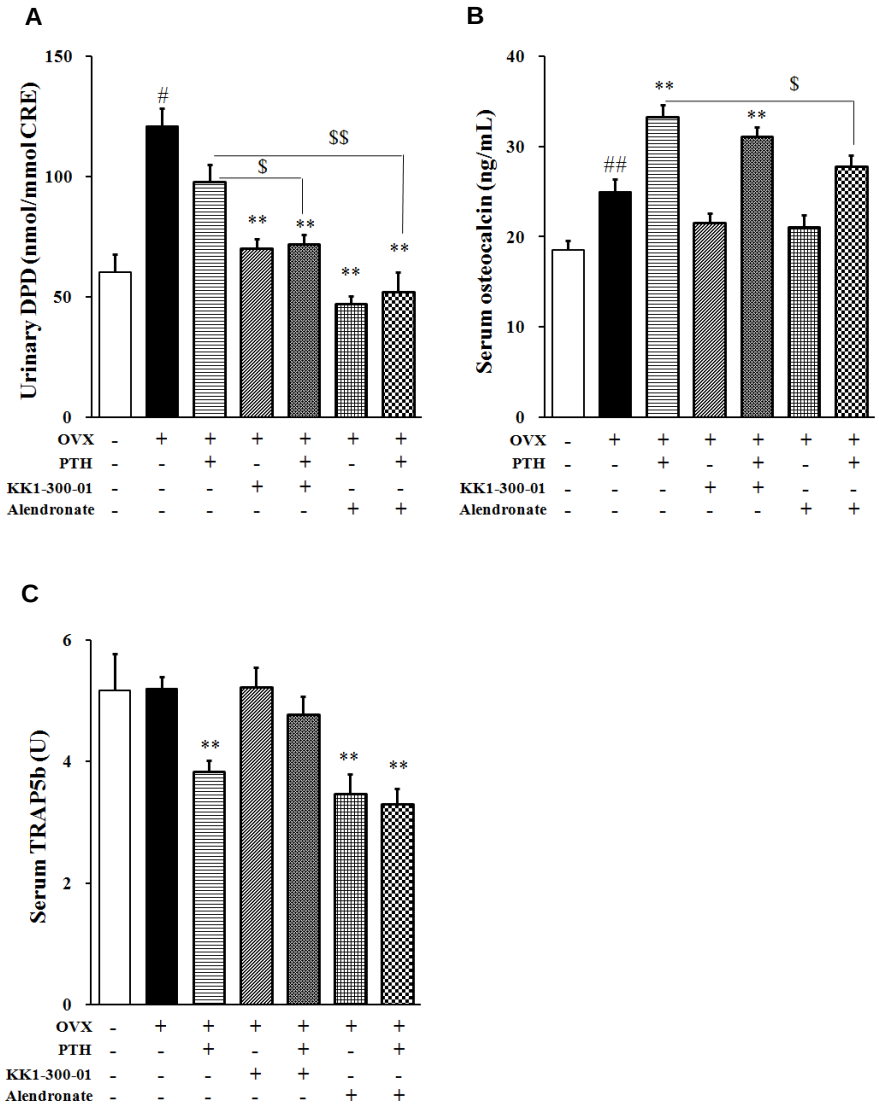


図 5-6　各種薬剤単独あるいは併用投与後の骨代謝マーカーに対する作用

各カラムは平均値 + 標準誤差を示す（n = 9-10）

（A）尿中 DPD 濃度,（B）血清中オステオカルシン濃度,（C）血清中 TRAP5b 活性

#, ##: $P < 0.05, 0.01$ 偽手術群との間に有意差あり（t 検定）

**: $P < 0.01$ 対照群（Control）との間に有意差あり（Tukey 検定）

$, $$: $P < 0.05, 0.01$ PTH 群との間に有意差あり（Tukey 検定）

KK1-300-01：ジケトヒドラジン誘導体 2

3.3.4　骨形態計測

脛骨骨幹端部海綿骨形態計測結果を**表 5-3** に示した．卵巣摘出対照群において，海綿骨骨量（BV/TV），骨梁数（Tb.N）の減少，骨梁間距離（Tb.Sp）の増加が認められた．PTH 及びジケトヒドラジン誘導体 2 は卵巣摘出対照群における変化を抑制する傾向は認められたが，有意な変化ではなかった．alendronate は海綿骨梁数を上昇させ，骨梁間距離を減少させた．PTH とジケトヒドラジン誘導体 2 の併用あるいは alendronate（単独及び PTH との併用）はこれらパラメーターを偽手術群と同程度まで改善させた．

骨吸収に関して，卵巣摘出対照群では偽手術群に比して，吸収面（ES/BS），破骨細胞面（Oc.S/BS），破骨細胞数（N.Oc/BS）が上昇した．PTH は骨吸収パラメーターに対し，影響しなかった．ジケトヒドラジン誘導体 2 の骨吸収パラメーターは卵巣摘出対照群に比して低値を示したが，有意ではなかった．Alendronate は卵巣摘出対照群に比して吸収面を低下させた．ジケトヒドラジン誘導体 2 と PTH の併用による骨吸収パラメーターはジケトヒドラジン誘導体 2 単独と同程度であった．Alendronate と PTH の併用は alendronate 単独に比べ骨吸収パラメーターが若干増加していた．

骨形成に関して，卵巣摘出対照群では偽手術群に比して明確な変化は認められなかった．PTH は骨石灰化面（MS/BS），骨形成速度（BFR/BS）を上昇させた．ジケトヒドラジン誘導体 2 は対照群に比して類骨面（OS/BS），骨石灰化速度（MAR）を低下させた．Alendronate は対照群に比して類骨面，骨石灰化速度，骨石灰化面を低下させた．PTH とジケトヒドラジン誘導体 2 の併用は類骨面を低下させたものの，その他の骨形成パラメータに関して PTH 単独群と同レベルを維持していた．Alendronate と PTH の併用群のこれら骨形成パラメーターはジケトヒドラジン誘導体 2 と PTH の併用より低かった．

表 5-3. 脛骨骨端部海綿骨に対する各種薬剤（単独あるいは併用）の作用

	Sham	OVX	PTH	KK1-300-01	PTH + KK1-300-01	ALN	PTH + ALN
骨量 BV/TV (%)	19.05 ± 1.66	12.79 ± 1.43$^{\#}$	14.68 ± 1.02	12.89 ± 0.83	17.65 ± 1.11	16.62 ± 1.04	18.14 ± 1.57*
骨梁幅 Tb.Th (μm)	73.99 ± 4.09	67.93 ± 2.53	75.23 ± 3.03	63.71 ± 2.08	75.83 ± 3.35^{+}	63.37 ± 1.98	71.91 ± 3.74
骨梁数 Tb.N (1/mm)	2.56 ± 0.12	1.85 ± 0.15$^{\#\#}$	1.94 ± 0.09	2.01 ± 0.10	2.33 ± 0.10*	2.61 ± 0.12**	2.49 ± 0.11$^{**, \$}$
骨梁間距離 Tb.Sp (μm)	325.2 ± 21.0	503.0 ± 44.6$^{\#\#}$	450.1 ± 26.0	446.7 ± 30.5	362.7 ± 21.5*	327.2 ± 20.1**	335.9 ± 22.3**
類骨面 OS/BS (%)	6.12 ± 2.95	6.50 ± 1.47	6.21 ± 0.96	1.20 ± 0.21**	2.67 ± 0.35$^{**, \$}$	0.89 ± 0.19**	2.01 ± 0.38$^{**, \$\$}$
類骨幅 O.Th (μm)	3.12 ± 0.77	2.25 ± 0.25	3.30 ± 0.29	1.70 ± 0.36	2.44 ± 0.30	1.68 ± 0.39	1.95 ± 0.26$^{\$}$
吸収面 ES/BS (%)	1.11 ± 0.14	1.83 ± 0.23$^{\#}$	1.67 ± 0.15	1.24 ± 0.17	1.27 ± 0.13	0.86 ± 0.09**	1.27 ± 0.20
破骨細胞面 Oc.S/BS (%)	0.34 ± 0.07	1.09 ± 0.18$^{\#\#}$	0.80 ± 0.12	0.81 ± 0.15	0.64 ± 0.07	0.57 ± 0.08	0.87 ± 0.14
破骨細胞数 N.Oc/B.Pm (1/100mm)	18.41 ± 2.80	44.11 ± 5.68$^{\#\#}$	35.21 ± 4.37	38.60 ± 5.61	36.18 ± 3.09	26.56 ± 2.99	40.58 ± 6.63
骨石灰化速度 MAR (μm/day)	0.51 ± 0.08	0.66 ± 0.05	0.67 ± 0.04	0.47 ± 0.06*	0.68 ± 0.03^{+}	0.41 ± 0.05**	0.59 ± 0.03
骨石灰化面 MS/BS (%)	5.73 ± 1.16	8.61 ± 1.51	16.07 ± 1.25**	3.71 ± 0.75	13.85 ± 1.73^{++}	1.69 ± 0.28**	10.77 ± 1.83$^{\&}$
骨形成速度 BFR/BS ($mm^3/cm^2/year$)	0.74 ± 0.33	1.06 ± 0.26	2.38 ± 0.40*	0.34 ± 0.10	2.13 ± 0.53^{++}	0.14 ± 0.04	1.30 ± 0.28

OVX: ovariectomy, PTH: parathyroid hormone, KK1-300-01: ジケトヒドラジン誘導体 2, ALN: alendronate

#, ##: $P < 0.05, 0.01$ 偽手術群との間に有意差あり（Student t test）

*, **: $P < 0.05, 0.01$ 対照群との間に有意差あり（Tukey test）

$, $$: $P < 0.05, 0.01$ PTH 群との間に有意差あり（Tukey test）

+, ++: $P < 0.05, 0.01$ ONO-KK1-300-01 群との間に有意差あり（Tukey test）

&: $P < 0.05$ Alendronate 群との間に有意差あり（Tukey test）

4 考察

骨吸収抑制剤であるビスホスホネート（BP）と骨形成促進剤である PTH はその標的細胞（BP：破骨細胞，PTH：骨芽細胞）の違いから，両者の併用は優れた骨密度改善作用を発揮することが期待された．しかし，臨床において両者の併用は骨密度に対し相加効果を示さなかった（Felsenberg ら 2005）．この原因として，BP は骨吸収に加え，二次的に骨形成も抑制することから，PTH の骨形成促進作用を打ち消したと考えられた．BP とカテプシン K 阻害剤の標的細胞は破骨細胞であるが，その骨吸収抑制作用の機序は異なっている（BP：破骨細胞の傷害，カテプシン K 阻害：破骨細胞の骨吸収機能の抑制）．そこで，2 種類の骨吸収抑制剤（カテプシン K 阻害剤(ジケトヒドラジン誘導体 2)あるいは

BP(alendronate)）と PTH の併用効果を比較検討した．その結果，ジケトヒドラジン誘導体 2 と PTH の併用は alendronate と PTH の併用に比べ，骨密度改善効果に優れていた．Alendronate の前処置により血清中 TRAP5b 活性の低下していたことから，alendronate により破骨細胞が傷害され，細胞数が減少したと考えられる．骨形成と骨吸収は相互作用しているため，alendronate による破骨細胞数の低下が，二次的に骨形成の低下を引き起こし，骨形成促進作用を有する PTH の効果が現れにくくなったと考えられた．実際，PTH と BP の併用は PTH により上昇した血清中 OC 濃度を低下させ，骨形態計測においても PTH により上昇した骨形成パラメーターを低下させている．一方，ジケトヒドラジン誘導体 2 は血清中 TRAP5b 活性を抑制しなかったことから，破骨細胞数に影響を与えず，骨形成への影響が小さいため，PTH との併用にてビスホスホネートより優れた効果を発揮したと考えられた（Ochi ら　2014　J Bone Miner Metab.，印刷準備中）．

6 章：ジケトヒドラジン誘導体 1 のサル骨吸収抑制作用

1　目的

カテプシン K 阻害剤であるジケトヒドラジン誘導体 1 は，ヒト，ウサギあるいはラットカテプシン K 阻害作用を有し，ヒト破骨細胞の骨吸収を抑制した．また，ジケトヒドラジン誘導体2はラットに単回経口投与後,血漿中カルシウム及びCTX濃度を抑制した(**3 章**)．また，ラット卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおいて骨密度，骨強度改善作用を示した（**4 章**)．

骨格形成において，幼生動物の成長期の骨形成は「モデリング」（新規構築）と呼ばれており，成長期を過ぎた成動物では見かけ上骨形態変化が見られず安定な状態を保っているが，ある一定の割合で常に骨の入れかえが行われており，「リモデリング」（再構築）と呼ばれている（**図 6-1**)．骨粗鬆症治療薬の薬効判定では，モデリング時期とリモデリング時期を対象とした 2 種の動物モデルを設定することが必要とされている．ラットは骨代謝の観点からモデリング動物に位置づけられ，骨代謝におけるモデリング（骨吸収や骨形成により，骨のサイズを拡大しながら骨量も増やしていくこと）の割合が高く，ヒトの骨代謝とは異なる．ヒトはリモデリング動物に位置づけられ，骨代謝におけるリモデリング（出来上がった骨では，骨吸収と骨形成がバランスよく行われることによって，外形を大きく変えることなく組織が毎日すこしずつ入れかわること）の割合が高い．本試験では，ヒトと同じリモデリング動物に位置づけられるカニクイザルを用いて，ジケトヒドラジン誘導体 1 を 7 日間反復投与後の骨代謝マーカーに対する作用を検討した．なお，ヒトとサルのカテプシン K 活性体の遺伝子配列は同一であることが報告されている（McQueney ら 1998)．

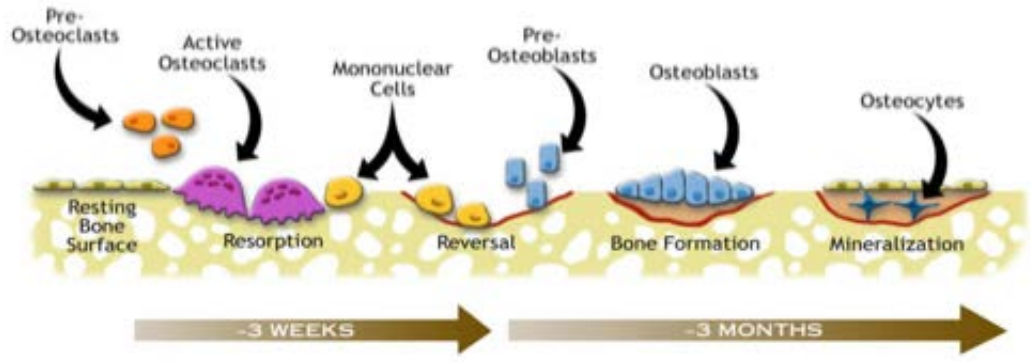


図 6-1　骨のリモデリング

2　方法

2.1　被験物質及びその調製

2.1.1　被験物質

被験物質であるジケトヒドラジン誘導体 1（Lot 番号 HD0401）は小野薬品工業株式会に

て合成し，室温にて保存した.

2.1.2　被験物質の調製と保存方法

2.1.2.1　被験物質用媒体

0.5 w/v%メチルセルロース水溶液（0.5%MC）を被験物質用媒体として用いた．メチルセルロース（MC）400 cP（和光純薬工業株式会社　大阪）に注射用水（株式会社　大塚製薬工場　徳島）を加え，5℃で攪拌することにより溶解し，0.5%MC を調製した.

2.1.2.2　被験物質の調製

必要量のジケトヒドラジン誘導体 1 を秤量し, 30 mg/mL になるように 0.5%MC を加え，メノウ製の容器，ボール及び遊星型微粒粉砕機（P-7，フリッチュ・ジャパン株式会社　大阪）を用いて懸濁した．保存液である 3 mg/mL（High）のジケトヒドラジン誘導体 1 懸濁液は，30 mg/mL 懸濁液を 0.5%MC で 10 倍に希釈することにより調製した．保存液 1 容量に対して 0.5%MC を 9 容量加えて 0.3mg/mL（Middle）を調製した．また，Middle 溶液 1 容量に対して 0.5%MC を 9 容量加えて 0.03 mg/mL（Low）を調製した.

2.2　実験方法

2.2.1　実験群の構成

6 頭の雌性カニクイザル（5-7 歳，Siman Conservation Breeding and Research Center, Inc. Philippines, Scientific Primates Filipinas, Inc. Philippines より入手）を用いて，クロスオーバー法にて 4 回の administration schedule の試験を実施した（各群 6 例）．動物実験は INA RESEARCH PHILLIPINE にて実施した.

なお，本試験に際しては，INA RESEARCH PHILLIPINE が制定した「Animal care and use policy statement」を遵守した.

実験群の構成

Dose Group	Dosing Substance	Dose (mg/kg/day)	Dose Volume (mL/kg)	Dosing Period (days)	Recovery Period (days)
Control	0.5 % MC 400	0	10	7	14
Low	ジケトヒドラジン誘導体 1	0.3	10	7	14
Middle	ジケトヒドラジン誘導体 1	3	10	7	14
High	ジケトヒドラジン誘導体 1	30	10	7	14

MC：メチルセルロース

各個体の投与スケジュール

Animal Number	First administration schedule	Second administration schedule	Third administration schedule	Fourth administration schedule
	Days 1 - 7	Days 23 - 29	Days 45 - 51	Days 67 - 73
2101, 2102	Control	Low	High	Middle
2103	Low	Control	Middle	High
2104	Middle	High	Low	Control
2105, 2106	High	Middle	Control	Low

なお，本試験では Control 群を対照群，Low 群をジケトヒドラジン誘導体 1　0.3 mg/kg 群，Middle 群をジケトヒドラジン誘導体 1　3 mg/kg 群，High 群をジケトヒドラジン誘導体 1　30 mg/kg 群と表記した．また，各 administration schedule の被験物質投与 2 日前から最終投与後 14 日目までの期間を便宜上クールと表記した．

各クールは 7 日間の被験物質投与，14 日間の washout，4 処置とし，4 クールのクロスオーバー試験とした．

各クールの試験日

クール	各クールの試験日					
	Pre	投与 1 日目	投与 3 日目	投与 7 日目	最終投与後 7 日目	最終投与後 14 日目
	試験期間を通じた日数					
1	Day -2	Day 1	Day 3	Day 7	Day 14	Day 21
2	Day 21	Day 23	Day 25	Day 29	Day 36	Day 43
3	Day 43	Day 45	Day 47	Day 51	Day 58	Day 65
4	Day 65	Day 67	Day 69	Day 73	Day 80	Day 87

2.2.2　投与，採血及び採尿

被験物質は 1 日 1 回，7 日間投与した．被験物質の投与開始 2 日前，投与 1，3，7 日目，最終投与後 7，14 日目に採尿を実施した（採尿日の前日より，蓄尿を開始し，24 時間蓄尿を回収）．各クールの尿は飼料等の混入を防ぐため，遠心分離後，上清を-80℃に保存した．また，被験物質投与開始 2 日前，投与 1，3，7 日目の被験物質投与 4 時間後，最終投与後 7，14 日目に採血を実施した．室温に 30 分以上静置し，遠心分離後，上清（血清）を-80℃に保存した．

2.2.3　測定検体

各クールの尿を I 型コラーゲン C 末端テロペプチド（CTX）及び I 型コラーゲン N 末端

テロペプチド（NTX）濃度の測定に使用した．なお，1-3 クール目の最終投与後 14 日目の尿は次クールの被験物質投与 2 日前の尿に相当する．

各クールの血清を CTX，NTX，骨型アルカリフォスファターゼ（BAP）及びオステオカルシン（OC）濃度の測定に使用した．なお，1-3 クール目の最終投与後 14 日目の血清は次クールの被験物質投与 2 日前の血清に相当する．

なお，NTX，CTX は I 型コラーゲンの N 末端及び C 末端からカテプシン K の切断により産生されるペプチドであり，骨吸収マーカーとしてヒトにおいても汎用されている．オステオカルシンは骨芽細胞より分泌される骨基質タンパク，BAP は骨芽細胞特異的に産生される酵素であり，いずれもヒトにおいて骨形成マーカーとして汎用されている．

2.2.4　骨代謝マーカーの測定

2.2.4.1　尿中CTX濃度

尿中 CTX 値をフレライザβクロスラプス（Nordic Bioscience Diagnostics A/S Denmark）を用い，ELISA 法にて測定した．吸光度の測定には SPECTRA MAX 250（日本モレキュラーデバイス株式会社　東京）を用いた．フレライザβクロスラプスの添付文書に従い，同一検体の尿中クレアチニン（CRE）濃度を用いて，次式により尿中 CTX 濃度を算出した．

尿中 CTX 濃度（μg/mmol CRE）＝　CTX 値（μg/L）／｛CRE 濃度（mg/dL）×0.088｝

なお，尿を原液で測定しても，尿中 CTX 値が 100μg/L 未満の場合，その検体については尿中 CTX 値を 100μg/L とした．

2.2.4.2　尿中I型コラーゲン架橋N-テロペプチド（NTX）濃度

尿中 NTX 値をオステオマーク（Wampole USA）を用い，ELISA 法にて測定した．吸光度の測定には SPECTRA MAX 250（日本モレキュラーデバイス株式会社　東京）を用いた．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 CRE）

＝　NTX 値（nmol BCE/L）／｛Cr 濃度（mg/dL）×0.088｝

BCE：Bone Collagen Equivalents

2.2.4.3　血清中CTX濃度

血清中 CTX 濃度（ng/mL）を Serum CrossLaps ELISA（Nordic Bioscience Diagnostics A/S Denmark）を用い，ELISA 法にて測定した．吸光度の測定には SPECTRA MAX 250（日本モレキュラーデバイス株式会社　東京）を用いた．

2.2.4.4　血清中NTX濃度

血清中 NTX 濃度（nmol BCE/L）をオステオマーク NTx 血清（Wampole USA）を用い，ELISA 法にて測定した．吸光度の測定には SPECTRA MAX 250（日本モレキュラーデバイス株式会社　東京）を用いた．

2.2.4.5　血清中骨型アルカリフォスファターゼ（BAP）濃度

血清中 BAP 濃度（U/L）をオステオリンクス「BAP」（Quidel USA）を用い，ELISA 法にて測定した．吸光度の測定には SPECTRA MAX 250（日本モレキュラーデバイス株式会

社　東京）を用いた.

2.2.4.6　血清中OC濃度

血清中 OC 濃度（ng/mL）を METRA Osteocalcin EIA kit（Quidel USA）を用い，SPECTRA MAX250（日本モレキュラーデバイス株式会社　東京）にて測定した.

2.3　データの表示及び処理方法

2.3.1　データの表示

各骨代謝マーカーに関して，被験物質投与 2 日前の数値（Pre 値）を 100 とした場合の相対値を算出した．相対値の表示は整数とした.

2.3.2　統計解析

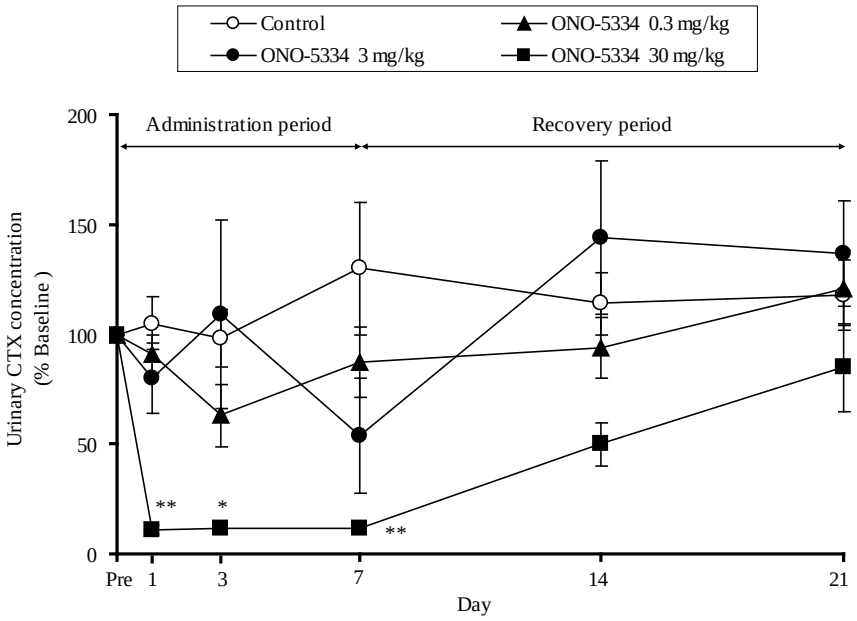
各骨代謝マーカーの相対値について, 対照群とジケトヒドラジン誘導体 1　0.3 mg/kg 群, 3 mg/kg 群及び 30 mg/kg 群の間で経時型分散分析を実施した．時間と群の交互作用が有意であれば，時点ごとに Dunnett 検定を行った．有意水準はいずれも両側 5%とした.

3　結果

3.1　尿中骨代謝マーカー

3.1.1　尿中 CTX 濃度

尿中 CTX 濃度の相対値を**図 6-2** に示した．試験期間を通して，対照群の尿中 CTX 濃度はほぼ一定であった．ジケトヒドラジン誘導体 1 は 30 mg/kg の用量で投与 1，3 及び 7 日目において，尿中 CTX 濃度を低下させた．また，ジケトヒドラジン誘導体 1 の投与を休止することでこの低下作用は減弱し，最終投与後 7 日目以降の尿中 CTX 濃度の相対値は対照群に比べ有意な差はなかった.



経時型分散分析結果

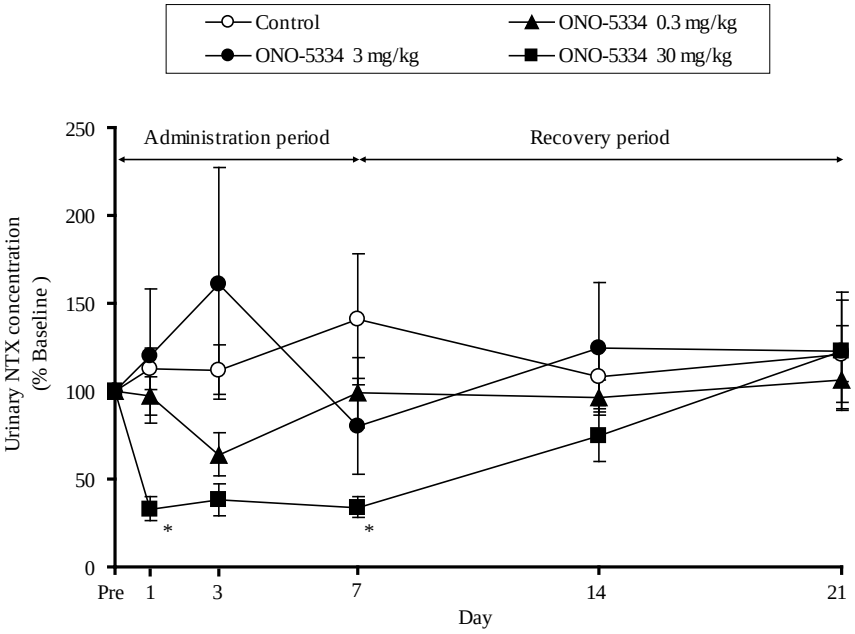
因子	自由度	平均平方和	F統計量	p値
群	3	31811.9444	7.2686	0.0017
個体間の誤差	20	4376.6528	3.0422	0.0001
時間	5	9108.0611	6.3311	0.0000
群と時間の交互作用	15	3454.9167	2.4015	0.0052
個体内の誤差	100	1438.6294	---	---

図 6-2　ジケトヒドラジン誘導体 1 のサル尿中 CTX 濃度に対する作用

各プロットは平均値 ± 標準誤差を示す（n = 6）
*, **: $P < 0.05, 0.01$ 対照群（Control）との間に有意差あり（Dunnet 検定）
ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

3.1.2　尿中 NTX 濃度

尿中 NTX 濃度の相対値を**図 6-3** に示した．試験期間を通して，対照群の尿中 NTX 濃度はほぼ一定であった．ジケトヒドラジン誘導体 1 は 30 mg/kg の用量で投与 1 及び 7 日目において，尿中 NTX 濃度を低下させた．また，ジケトヒドラジン誘導体 1 の投与を休止することでこの低下作用は減弱し，最終投与後 7 日目以降の尿中 NTX 濃度の相対値は対照群に比べ有意な差はなかった．



経時型分散分析結果				
因子	自由度	平均平方和	F統計量	p値
群	3	20420.1019	2.4090	0.0972
個体間の誤差	20	8476.4833	3.5760	0.0000
時間	5	2749.1778	1.1598	0.3343
群と時間の交互作用	15	4351.2741	1.8357	0.0396
個体内の誤差	100	2370.3567	---	---

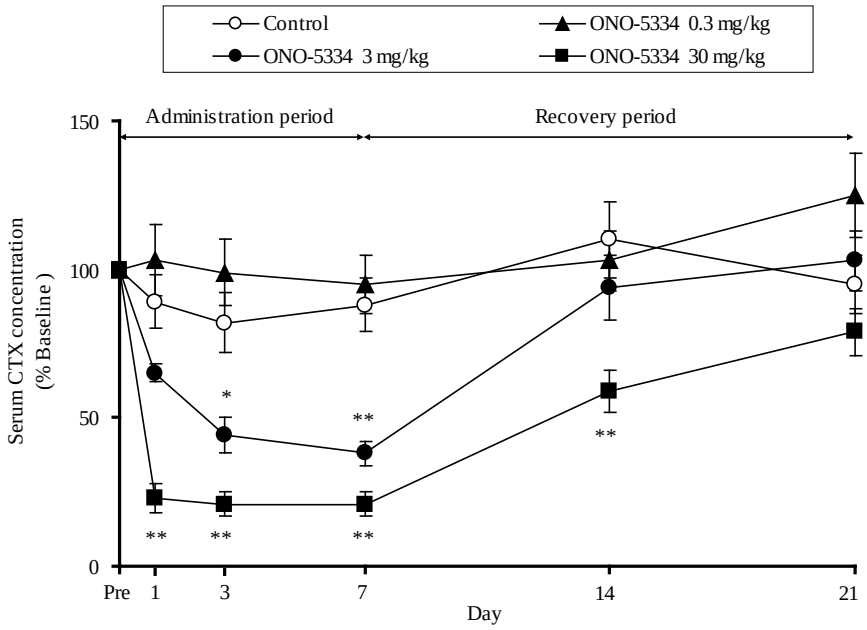
図 6-3　ジケトヒドラジン誘導体 1 のサル尿中 NTX 濃度に対する作用

各プロットは平均値 ± 標準誤差を示す（n = 6）
*: $P < 0.05$ 対照群（Control）との間に有意差あり（Dunnet 検定）
ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

3.2　血清中骨代謝マーカー

3.2.1　血清中 CTX 濃度

血清中 CTX 濃度の相対値を**図 6-4** に示した．試験期間を通して，対照群の血清中 CTX 濃度はほぼ一定であった．ジケトヒドラジン誘導体 1 は 3 mg/kg の用量で投与 3 及び 7 日目において，30 mg/kg の用量で投与 1，3，7 日目及び最終投与後 7 日目において血清中 CTX 濃度を低下させた．また，ジケトヒドラジン誘導体 1 の投与を休止することでこの低下作用は減弱し，最終投与後 14 日目の血清中 CTX 濃度の相対値は対照群に比べ有意な差はなかった．



経時型分散分析結果

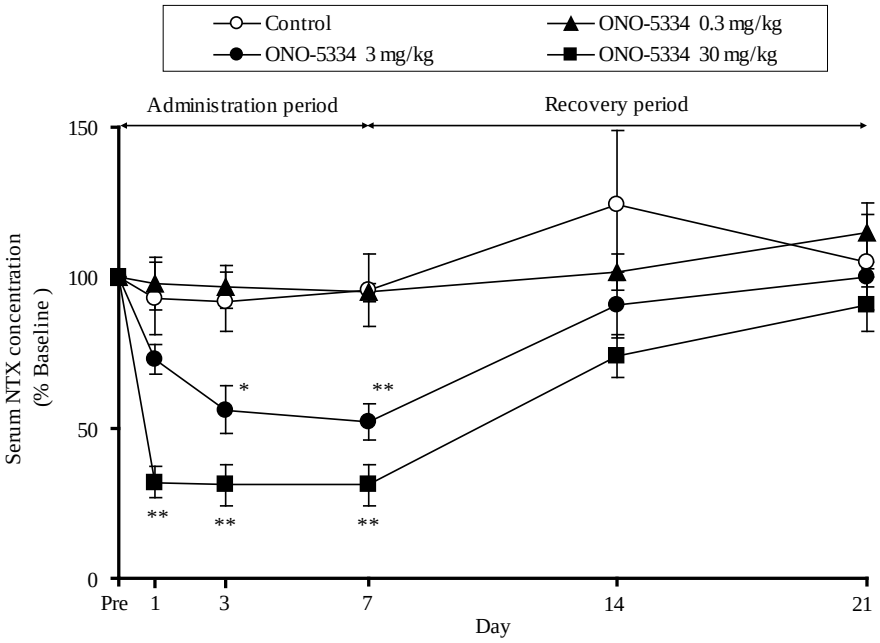
因子	自由度	平均平方和	F統計量	p値
群	3	20098.0625	14.6009	0.0000
個体間の誤差	20	1376.4903	6.3546	0.0000
時間	5	8554.3903	39.4915	0.0000
群と時間の交互作用	15	1593.3014	7.3555	0.0000
個体内の誤差	100	216.6136	---	---

図 6-4　ジケトヒドラジン誘導体 1 のサル血清中 CTX 濃度に対する作用

各プロットは平均値 ± 標準誤差を示す（n = 6）
*, **: $P < 0.05, 0.01$ 対照群（Control）との間に有意差あり（Dunnet 検定）.
ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

3.2.2　血清中 NTX 濃度

血清中 NTX 濃度の相対値を**図 6-5** に示した．試験期間を通して，対照群の血清中 NTX 濃度はほぼ一定であった．ジケトヒドラジン誘導体 1 は 3 mg/kg の用量で投与 3 及び 7 日目において，30 mg/kg の用量で投与 1，3 及び 7 日目において血清中 NTX 濃度を低下させた．また，ジケトヒドラジン誘導体 1 の投与を休止することでこの抑制効果は減弱し，最終投与後 7 日目以降の血清中 NTX 濃度の相対値は対照群に比べ有意な差はなかった．



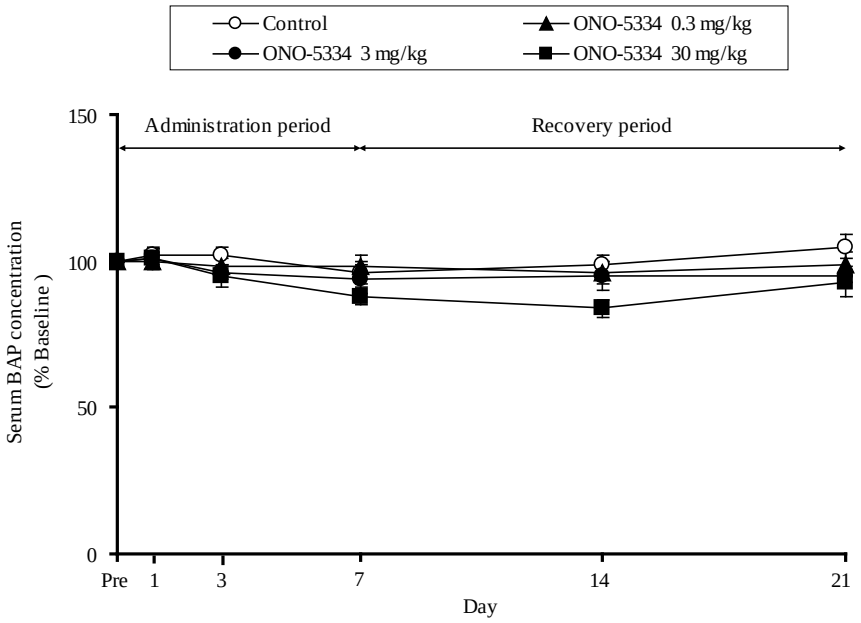
経時型分散分析結果				
因子	自由度	平均平方和	F統計量	p値
群	3	14438.5440	9.2852	0.0005
個体間の誤差	20	1555.0069	5.2815	0.0000
時間	5	6587.6458	22.3747	0.0000
群と時間の交互作用	15	1231.3051	4.1821	0.0000
個体内の誤差	100	294.4236	---	---

図 6-5　ジケトヒドラジン誘導体 1 のサル血清中 NTX 濃度に対する作用

各プロットは平均値 ± 標準誤差を示す（n = 6）
*, **: $P < 0.05$, 0.01 対照群（Control）との間に有意差あり（Dunnet 検定）
ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

3.2.3　血清中 BAP 濃度

血清中 BAP 濃度の相対値を**図 6-6** に示した．試験期間を通して対照群の血清中 BAP 濃度はほぼ一定であった．ジケトヒドラジン誘導体 1 は血清中 BAP 濃度に影響を及ぼさなかった．



経時型分散分析結果

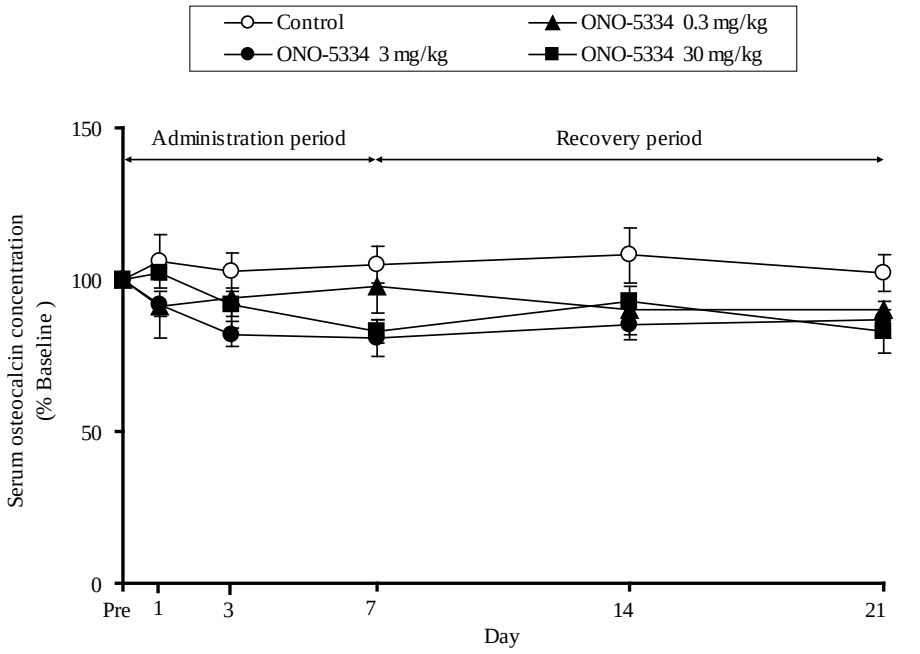
因子	自由度	平均平方和	F統計量	p値
群	3	329.0255	2.2280	0.1164
個体間の誤差	20	147.6792	2.9935	0.0002
時間	5	217.0903	4.4006	0.0012
群と時間の交互作用	15	54.2755	1.1002	0.3662
個体内の誤差	100	49.3325	---	---

図 6-6　ジケトヒドラジン誘導体 1 のサル血清中 BAP 濃度に対する作用

各プロットは平均値 ± 標準誤差を示す（n = 6）
ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

3.2.4　血清中 OC 濃度

血清中 OC 濃度の相対値を**図 6-7** に示した. 試験期間を通して対照群の血清中 OC 濃度はほぼ一定であった. ジケトヒドラジン誘導体 1 は血清中 OC 濃度に影響を及ぼさなかった.



経時型分散分析結果

因子	自由度	平均平方和	F統計量	p値
群	3	1715.3796	2.3641	0.1016
個体間の誤差	20	725.5917	5.4238	0.0000
時間	5	313.7778	2.3455	0.0466
群と時間の交互作用	15	175.9519	1.3152	0.2073
個体内の誤差	100	133.7783	---	---

図 6-7　ジケトヒドラジン誘導体 1 のサル血清中 osteocalcin 濃度に対する作用
各プロットは平均値 ± 標準誤差を示す（n = 6）
ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

4　考察

カテプシン K は破骨細胞に特異的に発現しているシステインプロテアーゼであり，骨吸収過程における骨コラーゲンの分解を担っている（Troen ら　2004）．骨吸収マーカーとして汎用されている CTX や NTX は I 型コラーゲンの N 及び C 末端側から遊離するカテプシン K の分解産物である（**図 0-4**）．カテプシン K 阻害剤は骨コラーゲンの分解を抑制することで骨吸収を選択的に抑制し，骨形成を抑制しないと考えられる（Stroup ら　2001）．そこでヒトと同じリモデリング動物におけるカテプシン K 阻害剤の骨代謝に対する影響を検討する目的で，正常カニクイザルを用いてジケトヒドラジン誘導体 1 の骨代謝マーカーに対する作用を検討した．

本試験の結果，ジケトヒドラジン誘導体 1 は正常カニクイザルにおいて，骨吸収マーカーである尿中 CTX 及び NTX ならびに血清中 CTX 及び NTX 濃度を低下させた．血液検体はジケトヒドラジン誘導体 1 投与 4 時間後に採取しており，ジケトヒドラジン誘導体 1 の骨吸収に対する最大作用が発揮される時間と考えられる．一方，尿検体は 24 時間の蓄尿検体であり，ジケトヒドラジン誘導体 1 の 1 日を通じた骨吸収抑制作用を反映しているものと考えられる．従って，血漿中骨吸収マーカーに対して，ジケトヒドラジン誘導体 1 は 3 mg/kg から有意な抑制作用を示したのに対し，尿中骨吸収マーカーに対しては，30 mg/kg で有意な抑制作用を示したと考えられた．尿中 CTX 及び NTX に対し，ジケトヒドラジン誘導体 1　3mg/kg 群の投与 3 日目における作用が明確でない（用量依存性が確認できず，むしろ Control 群より高値を示している）．これは，両骨吸収マーカー濃度を算出するためのクレアチニン濃度が低値を示したことによると考えられる．尿への水分等の混入によりクレアチニン濃度が正確に測定できなかった可能性が考えられるが原因は不明である．ただし，ジケトヒドラジン誘導体 1 はラット，サルにおける安全性試験及び臨床試験において腎毒性を示さないことが確認されて（いずれも社内試験）おり，薬剤に起因するクレアチニン濃度の変動ではないと考えられる．

ジケトヒドラジン誘導体 1 の投与を休止することでこれら骨吸収マーカーの低下作用は減弱し，最終投与後 14 日目には対照群と同程度まで回復した．一般的にに骨吸収抑制薬の作用は CTX に対して鋭敏である（Eastell ら　2014）．本試験においても，ジケトヒドラジン誘導体 1 の CTX に対する作用は NTX に対する作用より鋭敏であり（抑制作用が強い），投薬休止後の回復にも時間を要すると考えられた．

また, ジケトヒドラジン誘導体 1 はいずれの用量においても骨形成マーカー（血清中 BAP 及び OC 濃度）を抑制しなかった．

以上，ジケトヒドラジン誘導体 1 は，正常カニクイザルにおいて骨吸収を選択的に抑制し，骨形成を抑制しないが明らかとなった（Ochi ら　2011）．

7章：卵巣摘出サル骨粗鬆症モデルに対するジケトヒドラジン誘導体1の作用

1　目的

4章では卵巣摘出ラット骨粗鬆症モデルに対するジケトヒドラジン誘導体1の作用を確認した．骨粗鬆症のガイドライン（骨粗鬆症用薬の臨床評価方法に関するガイドラインについて　各都道府県衛生主管部(局)長あて厚生省医薬安全局審査管理課長通知　平成一一年四月一五日　医薬審第七四二号）によると，非臨床試験において薬物効果を判定する場合には，卵巣を摘出した成熟ラット（モデリング動物）と他の種類のリモデリング動物の骨量減少モデルを対象とするのが好ましい，とされている．リモデリング動物としては，ヒトの骨代謝に比較的近いとされる霊長類（ヒヒ，カニクイサル，アカゲサル等）やミニブタの卵巣摘出モデルが使われることが多い．そこで，カニクイザルを用いて卵巣摘出骨粗鬆症モデルを作製し，ジケトヒドラジン誘導体1の8カ月間反復経口投与による骨密度，骨強度，骨代謝マーカー及び骨の微細構造に対する作用を検討した．

2　方法

2.1　被験物質及び対照物質等

2.1.1　被験物質及び対照物質

被験物質であるジケトヒドラジン誘導体 1（ロット番号 HD0401）は小野薬品工業株式会社にて合成した．対照物質である alendronate（ロット番号 AS001B03）は Dr. Reddy's Laboratory India より入手した．

2.1.2　被験物質，対照物質及びその調製

2.1.2.1　媒体

0.5 w/v%メチルセルロース水溶液（0.5%MC）を媒体として用いた．メチルセルロース（MC）400 cP（和光純薬工業株式会社　大阪）に注射用水（株式会社　大塚製薬工場　徳島）を加え，5℃で攪拌することにより溶解し，0.5%MC 及び希釈用に用いた 2 w/v%メチルセルロース水溶液（2%MC）を調製した．

2.1.2.2　被験物質の調製

必要量のジケトヒドラジン誘導体 1 を秤量し，100 mg/mL になるように 0.5%MC を加え，メノウ製の容器及びボール並びに遊星型微粒粉砕機（P-7，フリッチュ・ジャパン株式会社　大阪）を用いて懸濁した．保存液である 10 mg/mL のジケトヒドラジン誘導体 1 懸濁液は，100 mg/mL 懸濁液を 0.5%MC で 10 倍に希釈することにより調製した．投与当日に，保存液 3 容量に対して 0.5%MC を 7 容量加えて 3 mg/mL（高用量）を調製した．また, 高用量溶液 1 容量に対して 0.5%MC を 9 容量加えて 0.3 mg/mL（中用量）を調製した．さらに中用量溶液 1 容量に対して 0.5%MC を 9 容量加えて 0.03 mg/mL（低用量）を調製した．

2.1.2.3　対照物質の調製

必要量の alendronate を秤量し，0.02 mol/L 水酸化ナトリウム（NaOH）を加え，超音波処理を行うことにより溶解し 12 mg/mL に調製した．12 mg/mL の alendronate 溶液 1 容量に対して 2%MC を 3 容量加えて十分に攪拌し，3 mg/mL を調製して alendronate 保存液とした．投与当日に，この保存液を蒸留水で 3 倍希釈し，1 mg/mL を調製した．さらにこの 1 mg/mL 溶液を 0.5% MC で 20 倍希釈し，0.05 mg/mL を調製した．

2.2 実験材料

2.2.1 実験動物

2.2.1.1 使用動物

雌性カニクイザル（入荷時週齢：9-25歳，Primate Quality Control Center (PQCC) Philippines, SICONBREC Inc. Philippines, A.T. Viri Primate Breeding Corp. Philippines, DEL MUNDO Trading Corp. Philippines, Scientific Primates Filipinas, Inc. (SPF) Philippines）を購入し，使用した．サルは供給元にて検査済みのものを入手した．1ケージ当り1匹を収容して10週間馴化した．給水は，上水道水（自動給水装置）を自由摂取させた．給餌に関しては，馴化期間中は自由摂取とした．なお，糞尿は自動洗浄機により処理した．また，動物実験はINA RESEARCH PHILLIPINEにて実施した．

なお，本試験に際しては，INA RESEARCH PHILLIPINE が制定した「Animal care and use policy statement」を遵守した．

2.2.1.2 飼育環境

温度：23.9-26.6℃，湿度：28.4-77.6%，換気：100%新鮮外気にて12-13回/時間，照明：蛍光灯により明暗12時間サイクル（明期7:00-19:00）．

2.3 実験方法

2.3.1 実験群の構成

群　名	処置	被験物質	用量（mg/kg）	例数（匹）
偽手術	偽手術	0.5%MC	-	8
対照	卵巣摘出	0.5%MC	-	8
ジケトヒドラジン誘導体 1 低用量	卵巣摘出	ジケトヒドラジン誘導体 1	0.3	6
ジケトヒドラジン誘導体 1 中用量	卵巣摘出	ジケトヒドラジン誘導体 1	3	8
ジケトヒドラジン誘導体 1 高用量	卵巣摘出	ジケトヒドラジン誘導体 1	30	8
Alendronate	卵巣摘出	Alendronate	0.5	7

2.3.2 実験動物の群分け法

購入した 69 匹の動物より，骨量，体重，臨床検査，エストラジオール値を測定し，適切な 50 匹を選抜した．選抜した動物の腰椎骨密度を指標に偽手術，対照，ジケトヒドラジン誘導体 1 低用量，中用量，高用量及び alendronate 群に 1 群 8 匹を割り当てた．群分け時に除外となった動物についても卵巣摘出手術を行い予備動物とし，卵巣摘出対照群で月経出血を認めた 1 例を手術失敗例として予備動物と入れ替えた．各群の動物数は過去に INA RESEARCH PHILLIPINE にて実施した試験において，alendronate の腰椎骨密度に対する改善傾向が検出できる最低例数とした．

2.3.3 実施方法

2.3.3.1 卵巣摘出及び投与

卵巣摘出手術を実施日を実験 0 日に設定した．カニクイザルに ketamine hydrochloride (10 mg/kg, Ketaject, Astrapin GmbH & Co., KG Germany) and xylazine (0.5 mg/kg, Ilium, Xylazil-100, Troy Laboratories PTY, Limited Australia)を筋肉内投与し，麻酔を行った．手術前は 15 時間以上の絶食とした．背部をバリカンで剃毛し，消毒用エタノールで消毒した．背部皮膚とその直下の筋及び腹膜を切開し，術創より卵巣を引き出した．卵管部分を周辺脂肪組織ごと結紮した後，結紮部より末梢側で両側卵巣を摘出した．偽手術群は開腹のみとした．切開部筋層及び皮膚の縫合には縫合糸を用いた．なお，副交感神経を遮断する目的で麻酔前に atropine sulfate (0.05 mg/kg, Hizon Laboratries, Inc., and Biosis, Taiwan, Biotech Co., Ltd., IM)を投与した．感染予防の目的で手術後から 1 週間，injectable ampicillin (5 mg/kg, Pentrexyl, Bristol-Myers, Squibb Company USA)を投与した．

卵巣摘出日の翌日から被験物質あるいは対照物質の投与を開始し, 1 日に 1 回, 8 カ月間，反復経口投与を行った. 被験物質及び対象物質の投与前に 1 mL の蒸留水にて口腔周囲を洗浄した．次いで，被験物質あるいは対象物質の投与を行った．投与にはポリプロピレンシリンジを用いた．投与後，5 mL の蒸留水を投与した．投与容量は 10 mL/kg とした．投与液量は，投与前日までの最も近い日に測定した体重に基づいて個別に算出した．なお，投薬期間中に体重は 1 週間に 1 回測定し，標本採取日にも測定した．

2.3.3.2 給餌

飼料は Certified Primate Diet PS (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan　100g 試料中 Ca：1.64 g，ビタミン D3：803IU 含有)を 1 日約 100 g 給餌した．摂餌量の少ない動物（50 g 以下）にはペースト状の飼料あるいは果物を与えた．採血前 16 時間は絶食とした．

2.3.3.3 生体骨密度測定（dual energy X-ray absorptiometry, DEXA）

腰椎（第 3 から第 5 腰椎）骨密度を卵巣摘出前，卵巣摘出手術 2，4 及び 7 カ月後に測定した．骨密度には Lunar DPX-α X-ray bone densitometer（Lunar Corporation USA）を用いた．骨密度測定前は 15 時間以上の絶食とした．

2.3.3.4 骨標識

骨形態計測実施のため骨を標識する目的で骨標本採取 18 日前及び 7 日前に Calcein を 10 mg/5mL/kg の用量で筋肉に投与し，二重標識を行った.

2.3.3.5　採尿

卵巣摘出 2 日前，卵巣摘出 6-7，13-14，20-21，27-28 日目並びに 2，4 及び 7 カ月目に 24 時間蓄尿を実施した．尿は，尿量を測定後，4℃にて 1500 rpm（400*g*），5 分間遠心し，上清を-80℃で保存した.

2.3.3.6　血清採取

卵巣摘出 2 日前，卵巣摘出 28 日目並びに 2，4 及び 7 カ月目の投与 4 時間後に，大腿静脈より約 15 mL 採血した．採取血液を約 30 分間室温で放置後，4℃にて 3000 rpm，15 分間遠心することにより血清を調製し，-80℃で保存した.

2.3.3.7　骨採取

卵巣摘出 8 カ月目に剖検を実施した．ketamine hydrochloride と xylazine による導入麻酔後，pentobarbital (30 mg/kg, Pentoxyn, Parnell Laboratories Australia)の静脈内投投与により動物を屠殺した．放血後，左右大腿骨及び第 3-6 腰椎を摘出した．左大腿骨，第 4，5 腰椎は骨強度測定のため，結合組織を取り除いた後，生理食塩液を浸したガーゼに包み，-80℃で保存した．右大腿骨，第 3 腰椎は骨形態計測実施のため，結合組織を取り除いた後，エタノール液中にて保存した．残りの骨は結合組織を取り除いた後，生理食塩液を浸したガーゼに包み，-80℃で保存した.

2.3.4　評価項目及び評価方法

2.3.4.1　摘出骨密度の測定（DEXA法及びpQCT法）

左大腿骨，第 4，5 腰椎は骨強度測定前に DEXA 法及び pQCT 法により骨密度パラメーターを測定した．なお，pQCT による骨密度の測定には pQCT RM machine (XCT-RM, Norland Corp., WI USA)を用いた.

2.3.4.2　摘出骨強度の測定

骨密度を測定した上記の骨に関して以下の方法で骨強度を測定した.

骨	強度測定方法	骨密度測定法
第 4 腰椎（シリンダー）	圧縮強度	DEXA, pQCT
左大腿骨頚部	圧縮強度	pQCT

骨強度測定装置（インストロン万能材料試験機 4465 型，Software: MerlinII，インストロン株式会社　神奈川）を用いて，第 4 腰椎シリンダー部の圧迫強度を測定した．各骨片を試料台に置き，上方から 6 mm/min の速度で荷重を加えて，荷重－変位曲線を得た．また左大腿骨近位部を用いて，大腿骨頚部の cantilever 圧縮強度試験を実施した．左大腿骨近位部を固定し，上方から 12 mm/min の速度で頚部に荷重を加えて，荷重－変位曲線を得た．荷

重－変位曲線から絶対負荷（N），剛性（N/mm）及び吸収エネルギー（mJ）を得た．

2.3.4.3　尿中 CTX 濃度の測定

尿中 CTX 値は Urine BETA CrossLaps ELISA（Immunodiagnosticsystems UK）を用いて測定した．なお，吸光度の測定には SPECTRA MAX 250（日本モレキュラーデバイス株式会社　東京）を使用し，測定手順及び CTX 値の算出は添付文書に従った．また，同一検体の尿中クレアチニン（CRE）濃度を L タイプワコー クレアチニン F（和光純薬工業株式会社　大阪）を用い添付文書に従って自動分析装置（7070 形，株式会社日立製作所　東京）で測定した．次式により尿中 CTX 濃度を算出した．

尿中 CTX 濃度（μg/mmol CRE）= CTX 値（μg/L）／｛CRE 濃度（mg/dL）×0.088｝

2.3.4.4　血清中OC濃度の測定

血清中OC値をMicroVue Osteocalcin EIA kit（Quidel Corporation USA）を用いて測定した．なお，吸光度の測定は，SPECTRA MAX 250（日本モレキュラーデバイス株式会社東京）を使用し，測定手順は添付文書に従った．なお，OC濃度は，ELISAで算出されたOC値に希釈倍率を乗じて算出した．

2.3.4.5.　骨形態計測

第3腰椎を用いて海綿骨骨形態計測を，右大腿骨骨幹部を用いて皮質骨骨形態計測を実施した．第3腰椎，右大腿骨をメタクリル酸メチル（MMA）樹脂に包埋し，ミクロトームを用いて，5-10μmの薄切切片を調製した．薄切切片にトルイジンブルー染色を行い，骨及び細胞形態を確認した．米国骨代謝学会（American Society for Bone and Mineral Research：ASBMR）の一般命名法に基づいた分類計測に従い，第3腰椎海綿骨，右大腿皮質骨の形態計測を実施した．以下に，骨形態計測による評価項目を示す．

(Ct.) BV/(Ct.) TV（%）：骨量　（Ct：皮質骨）
Tb.Th（μm）：骨梁幅
Tb.N（1/mm）：骨梁数
Tb.Sp（μm）：骨梁間距離
OS/BS（%）：類骨面
MS/BS（%）：石灰化面
MAR（μm/day）：石灰化速度
BFR/BS（$\mu m^3/\mu m^2$/year），BFR/BV（%year）：骨形成速度
ES/BS（%）：吸収面
Oc.S/BS（%）：破骨細胞面
N.Oc/BS（1/mm）：破骨細胞数
Porosity（Ca.V/Ct.V, %）：多孔性
Cortical width（mm）：皮質骨厚

2.4　データの表示及び処理方法

2.4.1　データの表示

数値データは平均値±標準誤差で表示した．なお，骨密度の経時変化並びに各骨代謝マーカーに関して卵巣摘出手術前の数値（Pre 値）に対する相対値（Pre 値を 100 とした場合）を算出した．

2.4.2　統計解析

偽手術群と対照群及び対照群と alendronate 投与群の間で，t 検定を行った．対照群とジケトヒドラジン誘導体 1 投与群の間では Dunnett 検定を行った．また，経時データに関しては各処理における二元配置の分散分析を実施し，時間と処理の交互作用が有意であった場合に，時点別の解析を実施した．一つの測定パラメータに対し，複数回の分散分析を実施したことになるが，処理あるいは各薬剤の時点別効果を判定する上では統計学上，問題ない．危険率 5%未満を統計学的に有意とした．なお，尿中 CRE 濃度は，尿中 CTX 濃度を算出するために測定したものであり，統計解析を行わなかった．

3　結果

3.1　体重

卵巣摘出手術前と骨採取日の体重を**表 7-1** に示した. 試験期間中に一時的に体重減少を示す個体はみられたものの，試験期間を通じて各群の体重に有意な差はなかった．

表 7-1　試験開始時及び剖検時体重

群　名	Mean of BW at baseline (kg)[a]	Mean of BW at necropsy (kg)[a]
偽手術　(Sham)	4.04 ± 0.30	4.15 ± 0.27
対照　(OVX)	3.59 ± 0.19	3.62 ± 0.31
ジケトヒドラジン誘導体 1 0.3 mg/kg (ONO-5334 Low)	3.24 ± 0.19	3.28 ± 0.17
ジケトヒドラジン誘導体 1 3 mg/kg (ONO-5334 Middle)	3.45 ± 0.13	3.62 ± 0.27
ジケトヒドラジン誘導体 1 30 mg/kg (ONO-5334 High)	3.53 ± 0.12	3.49 ± 0.19
Alendronate (ALN)	3.71 ± 0.25	3.84 ± 0.32

[a] 平均値 ± 標準誤差を示す

ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

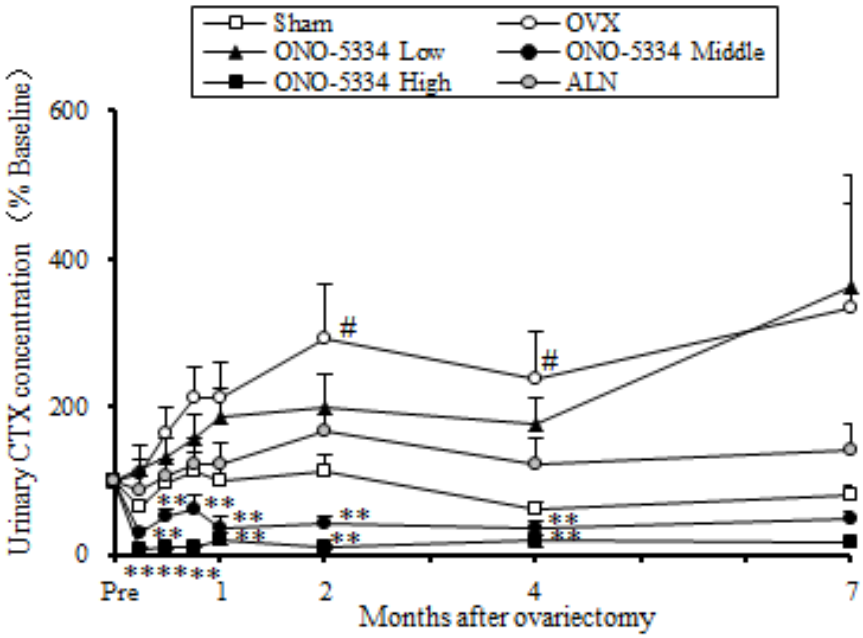
3.2　動物状態，死亡例

ジケトヒドラジン誘導体 1 低用量群で 2 例, alendronate 群で 1 例死亡例が認められた．

低用量 2 例は感染，alendronate 群は心膜炎による死亡が疑われた．ジケトヒドラジン誘導体 1 に関しては用量に応じた反応ではないこと，alendronate に関しては今までの検討において，alendronate 投与群で頻発した事例ではなく，高齢のサルでは頻度が少ないながらも確認された事項であることから，死亡は薬剤に起因するものではないと考えられた．死亡例の死亡時までの測定データは集計から除外した．その他，ジケトヒドラジン誘導体 1 及び alendronate 群で薬剤に起因する有害事象は認められなかった．

3.3 骨代謝マーカー

尿中 CTX 濃度推移を**図 7-1** に示した．卵巣摘出手術 2 及び 4 カ月後に尿中 CTX 濃度は偽手術群に比して上昇し，その上昇は 7 カ月後まで維持されていた．Alendronate は卵巣摘出による尿中 CTX 濃度の上昇を抑制する傾向を示したものの，有意ではなかった．
ジケトヒドラジン誘導体 1 は中あるいは高用量群において，いずれの期間においても尿中 CTX 濃度を有意に抑制した．



Sham vs. OVX
経時型分散分析結果

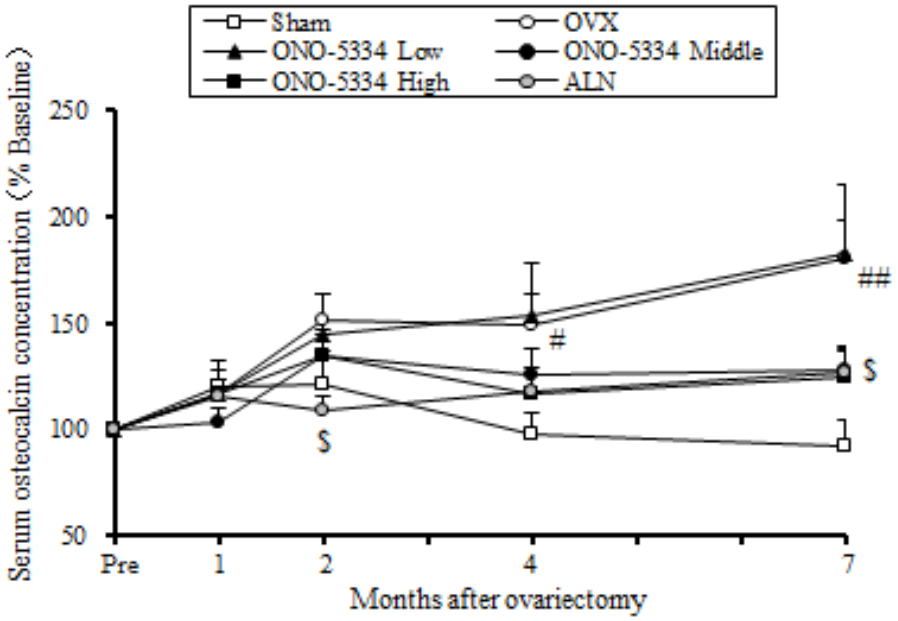
因子	自由度	平均平方和	F統計量	p値
群	1	427928.1328	6.8355	0.0204
個体間の誤差	14	62603.5792	5.0646	0.0000
時間	7	29939.3650	2.4221	0.0249
群と時間の交互作用	7	27270.5792	2.2062	0.0400
個体内の誤差	98	12360.9109	---	---

OVX vs. ONO-5334				
経時型分散分析結果				
因子	自由度	平均平方和	F統計量	p値
群	3	510204.0587	10.7490	0.0001
個体間の誤差	26	47465.0383	5.1096	0.0000
時間	7	40198.1162	4.3273	0.0002
群と時間の交互作用	21	23775.8468	2.5595	0.0004
個体内の誤差	182	9289.4261	---	---
OVX vs. Alendronate				
経時型分散分析結果				
因子	自由度	平均平方和	F統計量	p値
群	1	222628.7263	2.6161	0.1298
個体間の誤差	13	85099.8134	5.8341	0.0000
時間	7	41134.7304	2.8200	0.0105
群と時間の交互作用	7	13966.9685	0.9575	0.4670
個体内の誤差	91	14586.6768	---	---

図 7-1　サル卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおけるジケトヒドラジン誘導体 1 の尿中 CTX に対する作用

各プロットは平均値 ＋ 標準誤差を示す（n = 6-8）
#: $P < 0.05$ 偽手術群（Sham）との間に有意差あり（t 検定）
**: $P < 0.01$ 対照群（OVX）との間に有意差あり（Dunnett 検定）
ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

血清 OC 濃度推移を**図 7-2** に示した．卵巣摘出手術 4 及び 7 カ月後に血清 OC 濃度は偽手術群に比して上昇した．Alendronate は卵巣摘出 2 及び 7 カ月目において，卵巣摘出により上昇した血清 OC 濃度を有意に抑制した．ジケトヒドラジン誘導体 1 投与群の血清 OC 濃度は卵巣摘出群に比して，低値を示したものの有意ではなかった．



Sham vs. OVX				
経時型分散分析結果				
因子	自由度	平均平方和	F統計量	p値
群	1	21648.2000	6.3507	0.0245
個体間の誤差	14	3408.8107	6.2034	0.0000
時間	4	3560.7688	6.4800	0.0002
群と時間の交互作用	4	5849.2938	10.6447	0.0000
個体内の誤差	56	549.5027	---	---

OVX vs. ONO-5334				
経時型分散分析結果				
因子	自由度	平均平方和	F統計量	p値
群	3	5485.4106	1.5179	0.2333
個体間の誤差	26	3613.7747	6.0450	0.0000
時間	4	14097.0506	23.5809	0.0000
群と時間の交互作用	12	1305.0175	2.1830	0.0176
個体内の誤差	104	597.8155	---	---

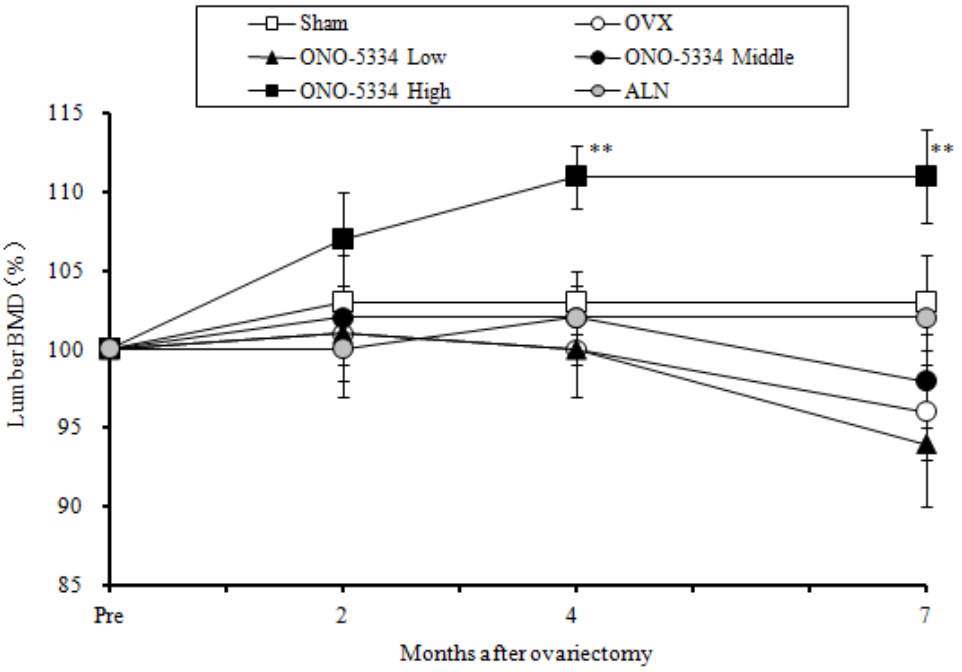
OVX vs. Alendronate				
経時型分散分析結果				
因子	自由度	平均平方和	F統計量	p値
群	1	11911.2688	5.1056	0.0417
個体間の誤差	13	2332.9629	5.0302	0.0000
時間	4	6011.9099	12.9626	0.0000
群と時間の交互作用	4	2172.3099	4.6838	0.0026
個体内の誤差	52	463.7905	---	---

図 7-2　サル卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおけるジケトヒドラジン誘導体 1 の血清中 OC に対する作用

各プロットは平均値 ＋ 標準誤差を示す（n = 6-8）
#, ##: $P < 0.05, 0.01$ 偽手術群（Sham）との間に有意差あり（t 検定）
$: $P < 0.05$ 対照群（OVX）との間に有意差あり（t 検定）
ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

3.4　腰椎骨密度（DEXA）

腰椎骨密度の経時変化を**図 7-3** に示した．偽手術群では卵巣摘出 7 カ月目において摘出前に比して約 3%腰椎骨密度が上昇した. 卵巣摘出対照群では卵巣摘出 7 カ月目において摘出前に比べ約 4%骨密度が低下したが，試験期間を通して対照群と偽手術群の腰椎骨密度に有意差は認められなかった. Alendronate 群の腰椎骨密度は卵巣摘出対照群に比して高値を示し，偽手術群と同程度の骨密度であった．ジケトヒドラジン誘導体 1 は用量に応じて腰椎骨密度を増加させた．特に高用量群は偽手術群以上に腰椎骨密度を増加させた．卵巣摘出 4 及び 7 カ月後の腰椎骨密度の上昇は対照群に比べ有意であった.



Sham vs. OVX				
経時型分散分析結果				
因子	自由度	平均平方	F統計量	p値
群	1	126.5625	1.6650	0.2178
個体間の誤差	14	76.0134	3.5748	0.0007
時間	3	19.6250	0.9229	0.4381
群と時間の交互作用	3	37.6875	1.7724	0.1671
個体内の誤差	42	21.2634	---	---

OVX vs. ONO-5334				
経時型分散分析結果				
因子	自由度	平均平方	F統計量	p値
群	3	480.2181	5.0651	0.0068
個体間の誤差	26	94.8085	4.1191	0.0000
時間	3	87.5865	3.8053	0.0133
群と時間の交互作用	9	85.5903	3.7186	0.0006
個体内の誤差	78	23.0168	---	---

OVX vs. Alendronate				
経時型分散分析結果				
因子	自由度	平均平方	F統計量	p値
群	1	58.9360	1.0955	0.3143
個体間の誤差	13	53.7998	2.6798	0.0087
時間	3	15.0297	0.7486	0.5298
群と時間の交互作用	3	34.4074	1.7138	0.1800
個体内の誤差	39	20.0764	---	---

図 7-3　サル卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおけるジケトヒドラジン誘導体 1 の腰椎骨密度に対する作用

各プロットは平均値 ＋ 標準誤差を示す（n = 6-8）
**: $P < 0.01$ 対照群（OVX）との間に有意差あり（Dunnett 検定）
ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

3.4　大腿骨頚部骨密度（pQCT）

左大腿骨 pQCT 解析の結果を**表 7-2** に示した．卵巣摘出対照群の全骨密度は偽手術群に比べ低値を示した．全骨塩量，海綿骨骨密度，海綿骨骨塩量，皮質骨骨塩量，皮質骨領域，皮質骨厚は卵巣摘出対照群で有意に減少した．Alendronate は全骨密度，皮質骨骨塩量を増加傾向，皮質骨骨密度の有意な増加作用を示した．ジケトヒドラジン誘導体 1 は用量に応じて全骨密度，全骨塩量，海綿骨骨塩量，皮質骨骨密度，皮質骨塩量，皮質骨領域を増加させた．海綿骨骨密度，皮質骨厚はジケトヒドラジン誘導体 1 中及び高用量投与群で高値を示したものの有意ではなかった．ジケトヒドラジン誘導体 1 中及び高用量群の全，海綿骨及び皮質骨骨密度は偽手術群よりも高値であった．

表 7-2　サル卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおけるジケトヒドラジン誘導体 1 の大腿骨頸部に対する作用（pQCT 法による測定）

	Sham	OVX (*P* value vs. Sham)	ONO-5334 (p value vs. OVX)			ALN (*P* value vs. OVX)
			Low	Middle	High	
全骨密度 Total BMD (mg/mm³)	730.01 ± 31.32	640.53 ± 30.31 (*P* = 0.059)	693.48 ± 30.77	757.54 ± 41.16*	783.79 ± 24.73**	720.94 ± 24.20 (*P* = 0.063)
全骨塩量 Total BMC (mg/mm)	53.52 ± 3.96	40.07 ± 2.01##	44.42 ± 1.43	47.58 ± 2.96 (*P* = 0.051)	51.96 ± 2.37**	44.86 ± 1.98
海綿骨骨密度 Trabecular BMD (mg/mm³)	521.08 ± 44.94	395.58 ± 37.34#	457.50 ± 53.73	554.96 ± 67.69	547.46 ± 49.10	477.83 ± 36.65
海綿骨骨塩量 Trabecular BMC (mg/mm)	17.13 ± 1.65	11.14 ± 1.09##	13.04 ± 1.28	15.27 ± 1.55 (*P* = 0.075)	16.30 ± 1.55*	13.31 ± 0.99
海綿骨領域 Trabecular Area (mm²)	33.60 ± 3.40	28.16 ± 0.45	28.94 ± 1.02	28.52 ± 2.22	29.86± 0.98	28.19 ± 1.49
皮質骨骨密度 Cortical BMD (mg/mm³)	835.53 ± 22.49	805.14 ± 12.82	834.47 ± 17.59	861.54 ± 22.33*	902.16 ± 13.82**	868.30 ± 18.24$
皮質骨骨塩量 Cortical BMC (mg/mm)	47.48 ± 3.44	33.11 ± 2.51##	40.05 ± 2.24	43.13 ± 2.93*	48.21 ± 2.77**	39.82 ± 2.07 (*P* = 0.064)
皮質骨領域 Cortical Area (mm²)	57.22 ± 4.53	40.89 ± 2.54##	48.02 ± 2.61	49.95 ± 2.89 (*P* = 0.058)	53.58 ± 3.37**	45.89 ± 2.30
皮質骨圧 Cortical Thickness (mm)	2.67 ± 0.26	1.87 ± 0.15##	2.36 ± 0.28	2.62 ± 0.28	2.66 ± 0.22	2.17 ± 0.09

#, ##: $P < 0.05, 0.01$ 偽手術群（Sham）との間に有意差あり（t 検定）
*, **: $P < 0.05, 0.01$ 対照群（OVX）との間に有意差あり（Dunnett 検定）
$: $P < 0.05$ 対照群（OVX）との間に有意差あり（t 検定）
$0.05 < P < 0.1$ の場合に P 値を記載
ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

3.5　骨形態計測

第 3 腰椎海綿骨骨形態計測結果を**表 7-3** に示した．卵巣摘出対照群では有意な骨量（BV/TV）減少を示した．骨代謝パラメーターに関して，卵巣摘出対照群では有意に骨石灰化速度（mineral apposition rate ; MAR），破骨細胞面（osteoclast surface ; Oc.S/BS）及び破骨細胞数（osteoclast number ; N.Oc/BS）が上昇した．海綿骨厚（trabecular thickness ; Tb.Th）は減少傾向，骨形成速度（bone formation rate ; BFR/BS）は上昇傾向を示した．Alendronate は構造パラメーター（BV/TV，Tb.Th，Tb.N，Tb.Sp）に影響を与えなかったが，石灰化面（mineralizing surface ; MS/BS），MAR，骨形成速度（bone formation rate ; BFR/BS 及び BFR/BV）を有意に低下させた．ジケトヒドラジン誘導体 1

は構造パラメーターに影響を与えなかったものの，石灰化速度（MAR），骨形成速度（BFR/BS 及び BFR/BV）等の骨形成パラメーターを有意に低下させた.

表 7-3　サル卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおけるジケトヒドラジン誘導体 1 の海綿骨に対する作用（第 3 腰椎形態計測）

	Sham	OVX (*P* value vs. Sham)	ONO-5334 (*P* value vs. OVX)			ALN (*P* value vs. OVX)
			Low	Middle	High	
骨量 BV/TV (%)	32.50 ± 1.92	26.90 ± 1.36#	32.13 ± 2.64	33.34 ± 3.82	28.89 ± 2.27	27.81 ± 1.81
骨梁幅 Tb.Th (μm)	144.63 ± 9.30	120.25 ± 6.59 (*P* = 0.051)	140.73 ± 9.75	153.60 ± 23.59	133.76 ± 9.66	124.37 ± 5.28
骨梁数 Tb.N (1/mm)	2.28 ± 0.15	2.27 ± 0.14	2.29 ± 0.13	2.24 ± 0.12	2.20 ± 0.16	2.24 ± 0.11
骨梁間距離 Tb.Sp (μm)	306.28 ± 26.02	332.72 ± 26.83	305.30 ± 32.24	302.12 ± 22.49	340.39 ± 36.75	328.49 ± 20.76
石灰化面 MS/BS (%)	17.23 ± 1.89	18.24 ± 3.12	23.17 ± 2.03	14.75 ± 5.02	8.97 ± 2.06	7.02 ± 2.05$
石灰化速度 MAR (μm/day)	0.57 ± 0.04	0.79 ± 0.02##	0.66 ± 0.04	0.51 ± 0.04**	0.39 ± 0.06**	0.47 ± 0.06$$
骨形成速度 BFR/BS (μm³/μm²/year)	35.99 ± 5.00	51.78 ± 8.33	55.99 ± 6.01	30.65 ± 11.49	14.46 ± 4.28**	14.54 ± 5.05$$
骨形成速度 BFR/BV (%/year)	50.70 ± 6.93	86.96 ± 15.71 (*P* = 0.062)	82.73 ± 11.43	36.61 ± 9.38**	21.09 ± 6.07**	24.39 ± 9.44$$
破骨細胞面 Oc.S/BS (%)	2.87 ± 0.33	4.57 ± 0.57#	3.35 ± 0.16	3.29 ± 0.48 (*P* = 0.078)	4.53 ± 0.32	3.96 ± 0.67
破骨細胞数 N.Oc/BS (1/mm)	0.86 ± 0.09	1.39 ± 0.16#	0.97 ± 0.07 (*P* = 0.092)	0.98 ± 0.13 (*P* = 0.069)	1.41 ± 0.12	1.19 ± 0.19

#, ##: $P < 0.05, 0.01$ 偽手術群（Sham）との間に有意差あり（t 検定）
*, **: $P < 0.05, 0.01$ 対照群（OVX）との間に有意差あり（Dunnett 検定）
$, $$: $P < 0.05, 0.01$ 対照群（OVX）との間に有意差あり（t 検定）
$0.05 < P < 0.1$ の場合に P 値を記載
ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

大腿骨皮質骨骨形態計測結果を**表 7-4** に示した．卵巣摘出対照群では有意に皮質骨厚（Cortical width；Ct.Wi）が低下し，osteonal（骨単位，オステオン当たり，**図 7-4**）及び総（total）骨形成速度（BFR/BS, BFR/BV）が上昇した. Alendronate は有意に骨量（BV/TV），皮質骨厚（Ct.Wi）を上昇させ, osteonal（BFR/BS, BFR/BV）及び総骨形成速度（BFR/BV）を低下させた．Alendronate 群の骨内膜骨形成速度（endocortical BFR）は偽手術群に比べ低値を示したが, 有意ではなかった. ジケトヒドラジン誘導体 1 は用量に応じて骨量（BV/TV）及び皮質骨厚（Ct.Wi）を上昇させ，osteonal 及び総骨形成速度は低値を示した．しかし，いずれの部位の骨形成速度に関してもジケトヒドラジン誘導体 1 投与群では alendronate

群よりも高値を示した.

表 7-4　サル卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおけるジケトヒドラジン誘導体 1 の皮質骨に対する作用（大腿骨中央部形態計測）

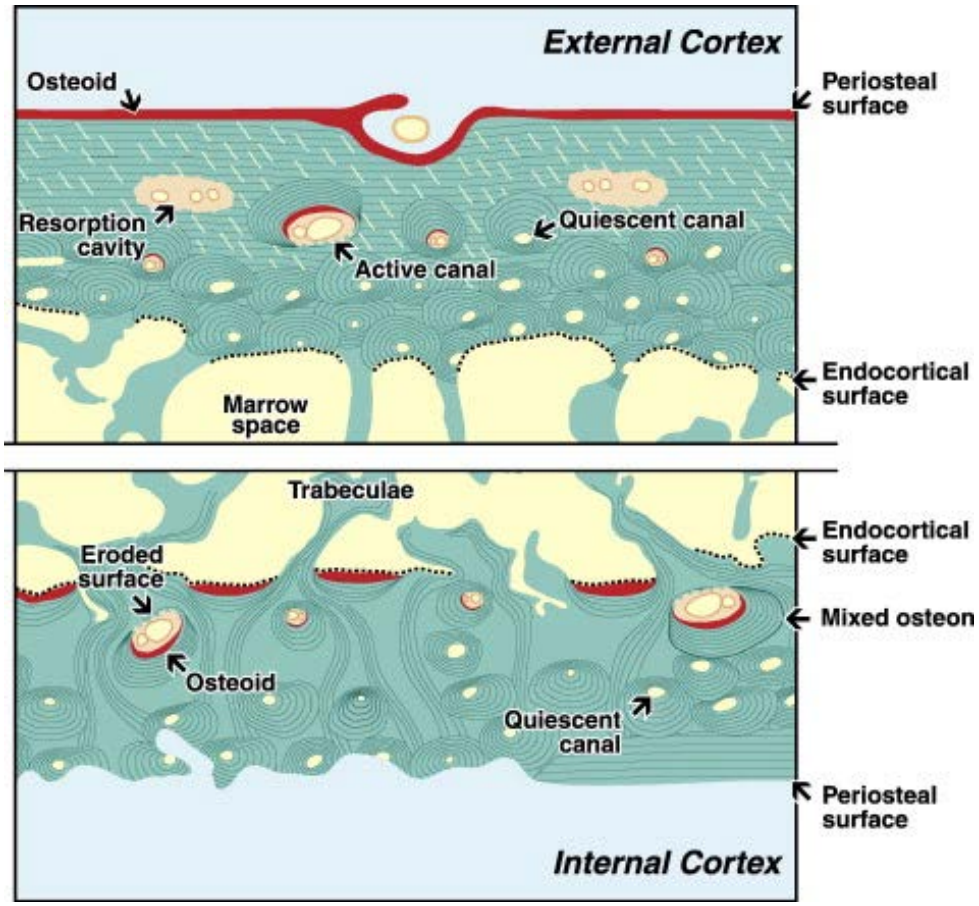
	Sham	OVX	ONO-5334 Low	ONO-5334 Middle	ONO-5334 High	ALN
骨梁 BV/TV (%)	66.06 ± 2.01	61.04 ± 2.07	63.05 ± 1.80	64.12 ± 2.03	67.35 ± 1.86	67.31 ± 1.90$
多孔性 Porosity (%)	1.43 ± 0.48	1.94 ± 0.48	1.69 ± 0.19	2.30 ± 0.64	1.21 ± 0.19	1.51 ± 0.25
皮質骨厚 Cortical Width (mm)	1.97 ± 0.05	1.76 ± 0.07#	1.82 ± 0.06	1.97 ± 0.08	2.04 ± 0.07*	2.00 ± 0.08$
骨外膜骨形成速度 Periosteal BFR/BS ($\mu m^3/\mu m^2$/year)	8.61 ± 7.73	3.61 ± 2.13	38.08 ± 21.25	13.93 ± 8.97	13.74 ± 7.39	6.76 ± 4.91
ｵｽﾃｵﾝ骨形成速度 Osteonal BFR/BS ($\mu m^3/\mu m^2$/year)	4.23 ± 1.38	45.56 ± 8.90##	45.86 ± 12.97	34.26 ± 8.36	17.45± 8.77	13.60 ± 4.75$$
骨内膜骨形成速度 Endocortical BFR/BS ($\mu m^3/\mu m^2$/year)	32.39 ± 17.94	55.59 ± 27.93	49.56 ± 24.45	27.60 ± 12.61	70.10 ± 25.75	26.29 ± 6.71
骨外膜骨形成速度 Periosteal BFR/BV (%/year)	0.53 ± 0.48	0.27 ± 0.17	2.74 ± 1.52	0.93 ± 0.61	0.87 ± 0.48	0.43 ± 0.31
ｵｽﾃｵﾝ骨形成速度 Osteonal BFR/BV (%/year)	0.62 ± 0.24	7.65 ± 2.02#	7.57 ± 2.20	7.22 ± 2.21	2.57 ± 1.40	1.92 ± 0.66$
骨外膜骨形成速度 Endocortical BFR/BV (%/year)	1.11 ± 0.60	2.93 ± 1.46	2.05 ± 1.02	1.25 ± 0.64	2.65 ± 1.02	1.00 ± 0.26
総骨形成速度 Total BFR/BV (%/year)	2.26 ± 1.00	10.86 ± 2.87#	12.36 ± 3.16	9.40 ± 2.81	6.10 ± 2.07	3.34 ± 0.86$

#, ##: $P < 0.05, 0.01$ 偽手術群（Sham）との間に有意差あり（t 検定）

*: $P < 0.05$ 対照群（OVX）との間に有意差あり（Dunnett 検定）

$, $$: $P < 0.05, 0.01$ 対照群（OVX）との間に有意差あり（t 検定）

ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1



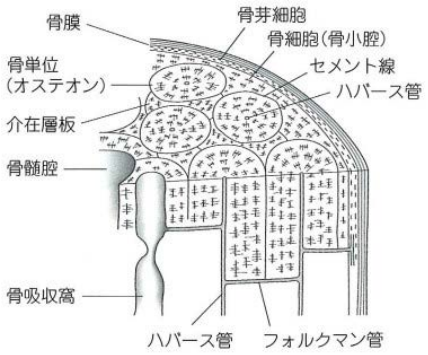


図 7-4　皮質骨表面の模式図

オステオン（osteon；骨単位）：骨の外側を構成する皮質骨内部の骨単位のことをいう．オステオンは，その中心にハバース管があり，これを取り囲む同心円のハバース層板からなる高さ数 mm の円柱形の構造体であり，この骨単位が集合して皮質骨を構成する．

3.5　骨強度

第 4 腰椎の骨強度測定結果を**図 7-5** に示した．卵巣摘出対照群の絶対負荷及び吸収エネルギーは偽手術群に比べて低下した. Alendronate は卵巣摘出対照群に比して有意に絶対負

荷，剛性を改善した．吸収エネルギーに関しては改善傾向を示した．ジケトヒドラジン誘導体 1 は用量に応じて，有意に絶対負荷を改善した．剛性，吸収エネルギーに関しては有意ではなかったものの，卵巣摘出対照群に比して高値を示し，ジケトヒドラジン誘導体 1 高用量群における絶対負荷，剛性，吸収エネルギーは alendronate 群と同程度であった．

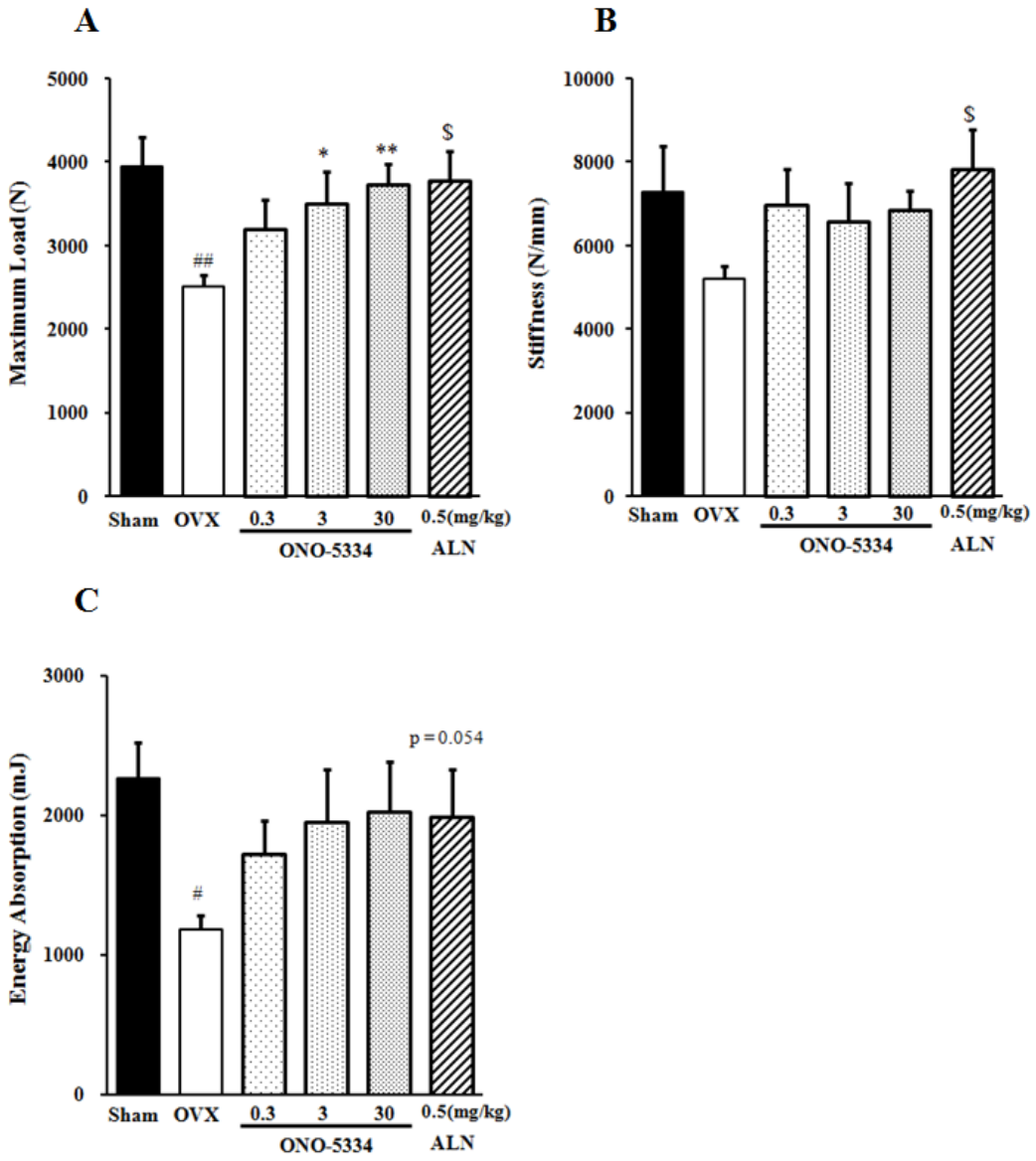


図 7-5　サル卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおけるジケトヒドラジン誘導体 1 の腰椎骨強度に対する作用

各カラムは平均値 + 標準誤差を示す（n = 6-8）

（A）絶対負荷（Maximum Load），（B）剛性（Stiffness），（C）吸収エネルギー（Energy Absorption）

#, ##: $P < 0.05, 0.01$ 偽手術群（Sham）との間に有意差あり（t 検定）

*, **: $P < 0.05, 0.01$ 対照群（OVX）との間に有意差あり（Dunnett 検定）

$: $P < 0.05$ 対照群（OVX）との間に有意差あり（t 検定）
ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

左大腿骨頚部の骨強度測定結果を**図 7-6** に示した. 卵巣摘出対照群の絶対負荷及び吸収エネルギーは偽手術群に比べて低下した. Alendronate は卵巣摘出対照群に比して有意に絶対負荷を改善し，吸収エネルギーの改善傾向を示した．ジケトヒドラジン誘導体 1 は用量に応じて，有意に絶対負荷及び吸収エネルギーを改善した．また，ジケトヒドラジン誘導体 1 高用量群では卵巣摘出対照群に比べ，有意に剛性を上昇させた．ジケトヒドラジン誘導体 1 中及び高用量におけるこれら骨強度に対する作用は alendronate 投与群よりも強かった.

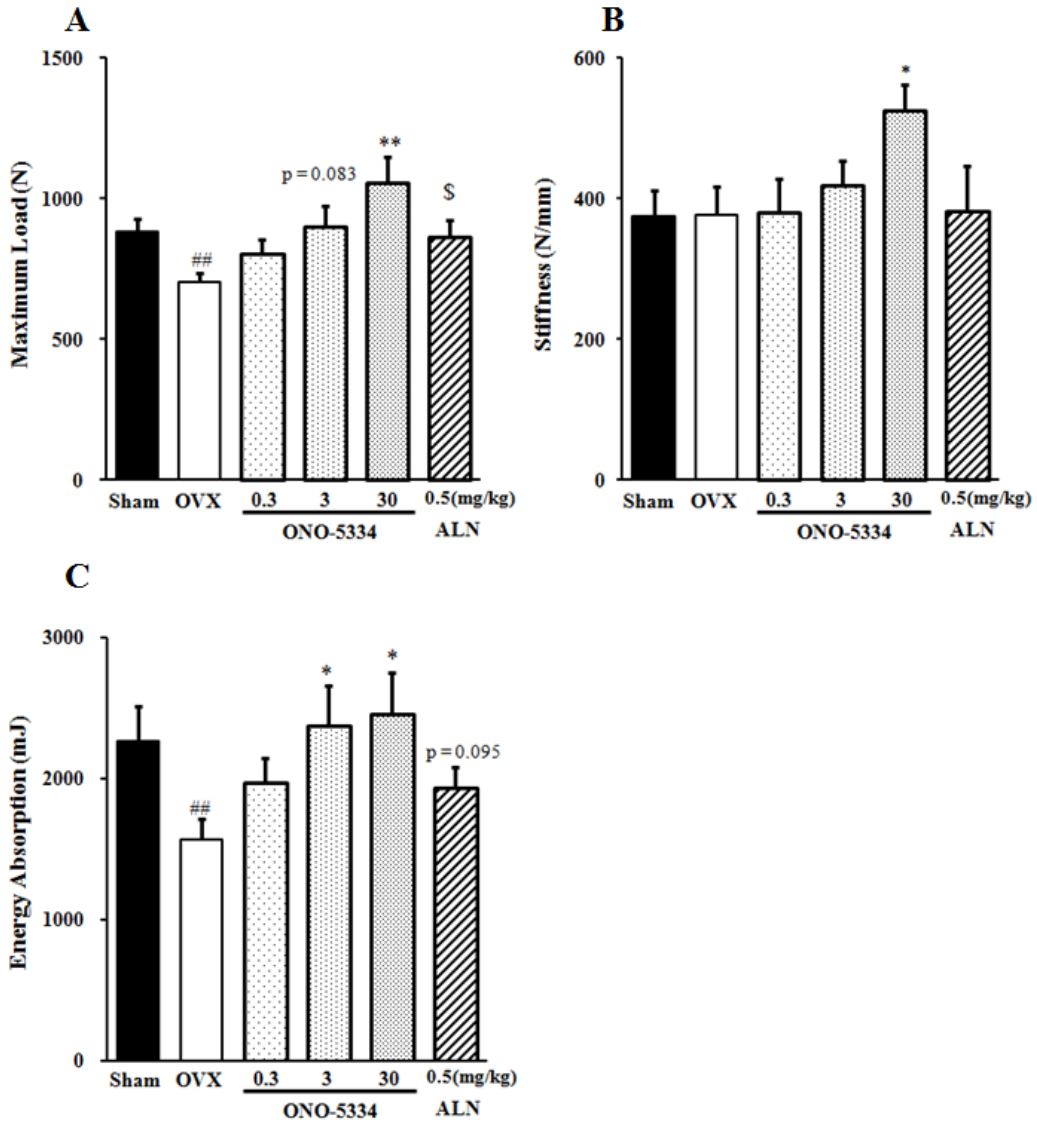


図 7-6　サル卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおけるジケトヒドラジン誘導体 1 の大腿骨頸部骨強度に対する作用

各カラムは平均値 + 標準誤差を示す（n = 6-8）
（A）絶対負荷（Maximum Load），（B）剛性（Stiffness），（C）吸収エネルギー（Energy Absorption）
##: $P < 0.05$ 偽手術群（Sham）との間に有意差あり（t 検定）
*, **: $P < 0.05, 0.01$ 対照群（OVX）との間に有意差あり（Dunnett 検定）
$: $P < 0.05$ 対照群（OVX）との間に有意差あり（t 検定）
ONO-5334：ジケトヒドラジン誘導体 1

4 考察

骨粗鬆症治療薬の薬効判定においては、モデリング時期とリモデリング時期を対象とした 2 種の動物モデルを設定することが必要とされている．**4 章**において，ジケトヒドラジン誘導体 1 のラット卵巣摘出骨粗鬆症モデルに対する作用を確認した（モデリング動物）．本章ではヒトと同じリモデリング動物に位置づけられるカニクイザルを用いて，卵巣摘出骨粗鬆症モデルに対するジケトヒドラジン誘導体 1 の作用を検討した．

本試験において卵巣摘出動物の骨吸収マーカー及び骨形成マーカーの上昇が確認され，卵巣摘出により骨代謝回転が亢進したことが示唆された．卵巣摘出による骨代謝回転の亢進は第 3 腰椎骨形態計測結果（石灰化速度，破骨細胞面，破骨細胞数の上昇，骨形成速度の上昇傾向）からも確認できた．骨代謝回転の亢進に伴い腰椎骨密度，大腿骨頚部骨密度，骨塩量の減少が確認された．腰椎骨密度の減少は第 3 腰椎骨形態計測結果（骨量の減少）からも確認できた．腰椎及び大腿骨骨強度はこれら骨密度，骨塩量の減少に伴い低下した．

Alendronate は卵巣摘出により上昇した骨代謝マーカーを偽手術群と同程度まで抑制したことから，骨代謝回転を抑制していることが示唆された．その結果，alendronate は腰椎骨密度，骨強度，大腿骨頚部骨密度（骨塩量），骨強度を偽手術群と同程度まで改善させた．骨代謝回転の抑制は海綿骨骨形態計測結果においても確認された（石灰化面，石灰化速度，骨形成速度の低下）．したがって，ビスホスホネートである alendronate は卵巣摘出により上昇した骨代謝回転を正常レベルまで抑制し，骨への改善作用を示すと考えられた．

ジケトヒドラジン誘導体 1 は用量に応じて骨吸収マーカーを抑制した．特に中及び高用量のジケトヒドラジン誘導体 1 は偽手術群よりも低いレベルまで骨吸収マーカーを低下させた．一方，骨形成マーカーに対する抑制はジケトヒドラジン誘導体 1 高用量群においても alendronate 投与群と同レベルであった．したがって，カテプシン K 阻害剤ジケトヒドラジン誘導体 1 は骨吸収を選択的に抑制し，骨形成に対する影響は小さいと考えられた．ジケトヒドラジン誘導体 1 は用量に応じて腰椎骨密度を上昇させた．特に，高用量群での骨密度は偽手術群の骨密度を上回る作用であった．また，ジケトヒドラジン誘導体 1 は大腿骨骨密度の改善作用も示した．ジケトヒドラジン誘導体 1 高用量の大腿骨骨密度は偽手術群に比して高く，特に皮質骨の改善作用に優れていた．以上の結果からジケトヒドラジン誘導体 1 が骨吸収を選択的に抑制することは，椎体においては強い骨密度増加作用，非椎体（長管骨）においては強い皮質骨増加作用につながると考えられた．なお，非椎体への作用は骨強度の改善作用としても確認できている．

ヒトと同じリモデリング動物に位置づけられるカニクイザルを用いて，卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおけるジケトヒドラジン誘導体 1 の作用を検討した結果, ジケトヒドラジン誘導体 1 は骨吸収を選択的に抑制し, 骨形成への影響は小さいことが確認できた. これは, 骨吸収・骨形成を同程度抑制するビスホスホネート（alendronate）とは異なった作用である．この作用の違いは，**2 章**で示したように両薬剤ともに骨吸収を抑制するもののの，その作用機序の違いによるものと考えられた. カテプシン K 阻害剤ジケトヒドラジン誘導体 1 の骨吸収を選択的に抑制することは強い骨密度改善作用，特に皮質骨の改善作用につながることが確認できた（Ochi ら　2014　Bone.）.

総括

世界的な超高齢化社会の進展に伴い，高齢者が抱える疾患を予防・治療することは患者負担の軽減及び医療経済学的にも重要な課題である．政府は骨粗鬆症，変形性関節症，腰部脊柱管狭窄症，サルコペニア（筋減弱症）等の高齢者の抱える運動器疾患をロコモティブシンドロームと命名し，啓蒙活動を働きかけると共に，その予防，治療に対する重要性を発信している(厚生労働省　第二次健康日本 21)．骨粗鬆症の予防･治療戦略に関しては，このような社会情勢を鑑み，まずます関心が高まっている．カルシウム，ビタミン D，ビタミン K 不足は骨粗鬆症の危険因子であることから，これら因子を規則正しく摂取することは骨粗鬆症の予防のためにも重要なことである．カルシウムを多く含む乳製品，ビタミン D を含む魚類及びキノコ類あるいはビタミン K を含む緑黄色野菜の摂取などは，日常心がけるべき骨粗鬆症の予防法と言える．また，バランスの良い食生活，例えば食物繊維や乳製品を摂取することで効率的なカルシウムの吸収を促す試みやカルシウム吸収の促進を目指した機能性食品やビタミンサプリメントの開発は骨粗鬆症予防の観点から意義深い．また，荷重や運動負荷は骨代謝に影響を及ぼすことから，適度な運動を組み合わせることも骨粗鬆症の予防に重要である（折茂ら　2011）．一方，骨密度が一旦低下し骨粗鬆症を発症すると，予防法のみでの骨折リスクからの脱却は困難であるため，積極的な薬物治療が必要となる. しかし, その際にもカルシウムやビタミン D などの栄養的補助は必要であり，現状の薬物療法において，カルシウムとビタミン D の補充はほぼ全ての骨粗鬆症患者に併用されている．骨粗鬆症治療薬としてはビスホスホネート製剤や選択的エストロゲン調整薬（Selective Estrogen Receptor Modulators, SERMs）が上市されているが，緒言でも触れたように，骨密度改善効果や骨折予防効果が立証されているものの，さらなる非椎体骨への作用や低骨密度患者へのさらなる有効性の向上が望まれており，副作用や服薬コンプライアンスの問題も残されている．骨吸収を担う破骨細胞の有するカテプシン K を抑制することは，これら既存薬の抱える問題点を克服し，骨粗鬆症治療薬の第一選択薬としての可能性があるため，各製薬企業が挙って本阻害剤の開発に着手した．我々が創製したジケトヒドラジン誘導体 1 はヒト，ラットカテプシン K 阻害活性を有し，他のカテプシン類やシステイン，セリン，金属プロテアーゼに対する選択性にも優れていた（Ochi ら　2011）．ジケトヒドラジン誘導体 1 はヒト破骨細胞の骨吸収を抑制し，ビスホスホネートとは異なり，破骨細胞の骨格形成には影響を与えず，骨吸収機能のみを選択的に抑制することが本研究より明らかとなった．ジケトヒドラジン誘導体 1 と他社カテプシン K 阻害剤との違いはジケトヒドラジン誘導体 1 はヒトのみならずげっ歯類（ラット，ウサギ等）カテプシン K 阻害作用を有する点である（Ochi ら　2011，Kumar ら　2006）．ジケトヒドラジン誘導体 1 の経口投与はラット，サルの骨吸収を抑制し，骨形成には影響を与えなかった．また，ラットあるいはサル骨粗鬆症モデルに対し，ジケトヒドラジン誘導体 1 は骨密度，骨強度改善作用を示した．これら試験結果は骨粗鬆症モデル作製直後からカテプシン阻害剤を投与した結

果であり，骨粗鬆症モデルに対する予防効果を示した結果である．しかし，陽性対照に設定しているalendronateでも同様の予防効果が確認され（Azumaら　1998.），骨粗鬆症患者において治療効果を発揮する（Libermanら　1995）ことから，カテプシンK阻害剤もBP同様，骨粗鬆症患者に対し治療効果を発揮するものと期待される．また，ジケトヒドラジン誘導体1は皮質骨に対する作用が明確であり，ビスホスホネートとは異なり，皮質骨含量の多い非椎体骨に対しても優れた効果を発揮する可能性が示唆された．また，カテプシンK阻害剤の骨形成を抑制しないメリットは，骨形成促進剤であるparathyroid hormone（PTH）との併用試験においても確認することができた．以上のように基礎試験にて，ジケトヒドラジン誘導体1は骨吸収を選択的に抑制し，非椎体骨に対する優れた作用が確認できたこと，安全性試験においてもビスホスホネートのような消化管障害は認められず，重篤な毒性が確認されなかったことから，臨床開発段階へと進めることができた．ジケトヒドラジン誘導体1は日本閉経後女性及び健康男性における吸収性（食事成分により吸収は影響を受けない），忍容性が確認されている．また，海外（欧州）において，閉経後女性における忍容性が確認され，閉経後骨減少症及び骨粗鬆症患者を対象とした第Ⅱ相試験において，2年間の投与でalendronateと同程度の骨密度改善作用が確認された（Eastellら　2014）．alendronateとの骨密度に対する明確な違いは確認できなかったものの，さらなる長期間投与により，ビスホスホネートを上回る骨密度改善作用が得られるものと期待している．

本研究では骨代謝におけるカテプシンKの重要性を検討した．カテプシンKは破骨細胞の重要機能である有機質の分解を担うメインの酵素であること，本機能を阻害することにより骨芽細胞と破骨細胞の相互作用は完全に遮断されないこと，げっ歯類，非げっ歯類を通じて骨代謝に対し共通の作用を有していることを明らかにすることが出来た．

最後に本研究を実施するに当たり，栄養学的立場からご指導いただいた北海道大学大学院　農学研究科　原　博　教授，薬理学的立場からご指導いただいた小野薬品工業株式会社　川澌　和一十　研究本部長に厚く御礼申し上げたい．また，本論文作成を陰ながらバックアップしてくれた家族（妻と3人の息子たち）に感謝したい．

2014年10月6日　小野薬品工業　水無瀬研究所　創薬研究部にて
越智　保夫

引用論文

- Aibe K, Yazawa H, Abe K, Teramura K, Kumegawa M, Kawashima H, Honda K.
  Substrate specificity of recombinant osteoclast-specific cathepsin K from rabbits.
  Biol Pharm Bull. 1996; 19(8): 1026-31.
- Azuma Y, Oue Y, Kanatani H, Ohta T, Kiyoki M, Komoriya K.
  Effects of continuous alendronate treatment on bone mass and mechanical properties in ovariectomized rats: comparison with pamidronate and etidronate in growing rats.
  J Pharmacol Exp Ther. 1998; 286(1): 128-35.
- Barrett AJ, Kirschke H.
  Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L.
  Methods Enzymol. 1981; 80 Pt C: 535-61.
- Bergstrom JD, Bostedor RG, Masarachia PJ, Reszka AA, Rodan G.
  Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase.
  Arch Biochem Biophys. 2000; 373(1): 231-41.
- Black DM, Cummings SR, Karpf DB, Cauley JA, Thompson DE, Nevitt MC, Bauer DC, Genant HK, Haskell WL, Marcus R, Ott SM, Torner JC, Quandt SA, Reiss TF, Ensrud KE.
  Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. Fracture Intervention Trial Research Group.
  Lancet. 1996; 348(9041): 1535-41.
- Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, Cosman F, Lakatos P, Leung PC, Man Z, Mautalen C, Mesenbrink P, Hu H, Caminis J, Tong K, Rosario-Jansen T, Krasnow J, Hue TF, Sellmeyer D, Eriksen EF, Cummings SR; HORIZON Pivotal Fracture Trial.
  Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis.
  N Engl J Med. 2007; 356(18): 1809-22.
- Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, Amegadzie BY, Hanning CR, Jones C, Kurdyla JT, McNulty DE, Drake FH, Gowen M, Levy MA.
  Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification.
  J Biol Chem. 1996; 271(21): 12517-24.
- Brömme D, Bonneau PR, Lachance P, Wiederanders B, Kirschke H, Peters C, Thomas DY, Storer AC, Vernet T.
  Functional expression of human cathepsin S in Saccharomyces cerevisiae. Purification and characterization of the recombinant enzyme.

J Biol Chem. 1993; 268(7): 4832-8.

- Cranney A, Tugwell P, Adachi J, Weaver B, Zytaruk N, Papaioannou A, Robinson V, Shea B, Wells G, Guyatt G; Osteoporosis Methodology Group and The Osteoporosis Research Advisory Group.
  Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. III. Meta-analysis of risedronate for the treatment of postmenopausal osteoporosis.
  Endocr Rev. 2002; 23(4): 517-23.
- Crippes BA, Engleman VW, Settle SL, Delarco J, Ornberg RL, Helfrich MH, Horton MA, Nickols GA.
  Antibody to beta3 integrin inhibits osteoclast-mediated bone resorption in the thyroparathyroidectomized rat.
  Endocrinology. 1996; 137(3): 918-24.
- Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD, Ebetino FH, Rogers MJ.
  Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates.
  J Pharmacol Exp Ther. 2001; 296(2): 235-42.
- Eastell R, Nagase S, Small M, Boonen S, Spector T, Ohyama 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.
- Falgueyret JP, Black WC, Cromlish W, Desmarais S, Lamontagne S, Mellon C, Riendeau D, Rodan S, Tawa P, Wesolowski G, Bass KE, Venkatraman S, Percival MD.
  An activity-based probe for the determination of cysteine cathepsin protease activities in whole cells.
  Anal Biochem. 2004; 335(2): 218-27.
- Felsenberg D, Boonen S.
  The bone quality framework: determinants of bone strength and their interrelationships, and implications for osteoporosis management.
  Clin Ther. 2005; 27(1): 1-11.
- Gelb BD, Shi GP, Chapman HA, Desnick RJ.
  Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency.
  Science. 1996; 273(5279): 1236-8.

- Gowen M, Lazner F, Dodds R, Kapadia R, Feild J, Tavaria M, Bertoncello I, Drake F, Zavarselk 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.
- Gural RP, Chungi VS, Shrewsbury RP, Dittert LW.
  Dose-dependent absorption of disodium etidronate.
  J Pharm Pharmacol. 1985; 37(6): 443-5.
- Hogan HA, Ruhmann SP, Sampson HW.
  The mechanical properties of cancellous bone in the proximal tibia of ovariectomized rats.
  J Bone Miner Res. 2000; 15(2): 284-92.
- Horn M, Pavlík M, Dolecková L, Baudys M, Mares M.
  Arginine-based structures are specific inhibitors of cathepsin C. Application of peptide combinatorial libraries.
  Eur J Biochem. 2000; 267(11): 3330-6.
- Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ, Gillespie MT.
  Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells.
  Endocrinology. 1998; 139(11): 4743-6.
- 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.
- Kam CM, Götz MG, Koot G, McGuire M, Thiele D, Hudig D, Powers JC.
  Design and evaluation of inhibitors for dipeptidyl peptidase I (Cathepsin C).
  Arch Biochem Biophys. 2004; 427(2): 123-34.
- Kasting GB, Francis MD.
  Retention of etidronate in human, dog, and rat.
  J Bone Miner Res. 1992; 7(5): 513-22.
- Kim MK, Kim HD, Park JH, Lim JI, Yang JS, Kwak WY, Sung SY, Kim HJ, Kim SH, Lee CH, Shim JY, Bae MH, Shin YA, Huh Y, Han TD, Chong W, Choi H, Ahn BN, Yang SO, Son MH.
  An orally active cathepsin K inhibitor, furan-2-carboxylic acid, 1-{1-[4-fluoro-2-(2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-phenyl]-3-oxo-piperidin-4-ylcarbamoyl}-cyclo hexyl)-amide (OST-4077), inhibits osteoclast activity in vitro and bone loss in

ovariectomized rats.
J Pharmacol Exp Ther. 2006; 318(2): 555-62.

- Kumar S, Dare L, Vasko-Moser JA, James IE, Blake SM, Rickard DJ, Hwang SM, Tomaszek T, Yamashita DS, Marquis RW, Oh H, Jeong JU, Veber DF, Gowen M, Lark MW, Stroup G.
  A highly potent inhibitor of cathepsin K (relacatib) reduces biomarkers of bone resorption both in vitro and in an acute model of elevated bone turnover in vivo in monkeys.
  Bone. 2007; 40(1): 122-31.
- Liberman UA, Weiss SR, Bröll J, Minne HW, Quan H, Bell NH, Rodriguez-Portales J, Downs RW Jr, Dequeker J, Favus M.
  Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. The Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group.
  N Engl J Med. 1995; 333(22): 1437-43.
- McQueney MS, Feild J, Hanning CR, Brun K, Ramachandran K, Connor J, Drake F, Jones CS, Amegadzie BY.
  Cynomolgus monkey (Macaca fascicularis) cathepsin K: cloning, expression, purification, and activation.
  Protein Expr Purif. 1998; 14(3): 387-94.
- Nishi Y, Atley L, Eyre DE, Edelson JG, Superti-Furga A, Yasuda T, Desnick RJ, Gelb BD.
  Determination of bone markers in pycnodysostosis: effects of cathepsin K deficiency on bone matrix degradation.
  J Bone Miner Res. 1999; 14(11): 1902-8.
- 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.
- Ochi Y, Yamada H, Mori H, Kawada N, Tanaka M, Imagawa A, Ohmoto K, and Kawabata K.
  Combination therapy with ONO-KK1-300-01, a cathepsin K inhibitor, and parathyroid hormone results in additive beneficial effect on bone mineral density in ovariectomized rats.
  J Bone Miner Metab. 2014 [印刷準備中, DOI: 10.1007/s00774-014-0643-1].

- 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.
- 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.
- Rizzoli R, Greenspan SL, Bone G 3rd, Schnitzer TJ, Watts NB, Adami S, Foldes AJ, Roux C, Levine MA, Uebelhart B, Santora AC 2nd, Kaur A, Peverly CA, Orloff JJ; Alendronate Once-Weekly Study Group.
  Two-year results of once-weekly administration of alendronate 70 mg for the treatment of postmenopausal osteoporosis.
  J Bone Miner Res. 2002; 17(11): 1988-96.
- Rodan GA RL, Bilezikian JP.
  Pathophysiology of osteoporosis.
  In: Bilezikian JP RL, Rodan GA, editor. Principles of bone biology. 2 ed. New York: Academic Press 1996: 979–990.
- Rosen CJ, Hochberg MC, Bonnick SL, McClung M, Miller P, Broy S, Kagan R, Chen E, Petruschke RA, Thompson DE, de Papp AE; Fosamax Actonel Comparison Trial Investigators.
  Treatment with once-weekly alendronate 70 mg compared with once-weekly risedronate 35 mg in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized double-blind study.
  J Bone Miner Res. 2005; 20(1): 141-51.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators.
  Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial.
  JAMA. 2002; 288(3): 321-33.
- Sasaki T, Kikuchi T, Yumoto N, Yoshimura N, Murachi T.
  Comparative specificity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occurring peptides and synthetic fluorogenic substrates.

J Biol Chem. 1984; 259(20): 12489-94.

- Silva BC, Costa AG, Cusano NE, Kousteni S, Bilezikian JP.
  Catabolic and anabolic actions of parathyroid hormone on the skeleton.
  J Endocrinol Invest. 2011; 34(10): 801-10.
- Stroup GB, Lark MW, Veber DF, Bhattacharyya A, Blake S, Dare LC, Erhard KF, Hoffman SJ, James IE, Marquis RW, Ru Y, Vasko-Moser JA, Smith BR, Tomaszek T, Gowen M.
  Potent and selective inhibition of human cathepsin K leads to inhibition of bone resorption in vivo in a nonhuman primate.
  J Bone Miner Res. 2001; 16(10): 1739-46.
- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ.
  Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families.
  Endocr Rev. 1999; 20(3): 345-57.
- Susa M, Luong-Nguyen NH, Cappellen D, Zamurovic N, Gamse R.
  Human primary osteoclasts: in vitro generation and applications as pharmacological and clinical assay.
  J Transl Med. 2004; 2(1): 6.
- Tanaka M, Mori H, Kayasuga R, Ochi Y, Kawada N, Yamada H, Kishikawa K.
  Long-term minodronic acid (ONO-5920/YM529) treatment suppresses increased bone turnover, plus prevents reduction in bone mass and bone strength in ovariectomized rats with established osteopenia.
  Bone. 2008; 43(5): 894-900.
- Tezuka K, Sato T, Kamioka H, Nijweide PJ, Tanaka K, Matsuo T, Ohta M, Kurihara N, Hakeda Y, Kumegawa M.
  Identification of osteopontin in isolated rabbit osteoclasts.
  Biochem Biophys Res Commun. 1992; 186(2): 911-7.
- Troen BR.
  The role of cathepsin K in normal bone resorption.
  Drug News Perspect. 2004; 17(1): 19-28.
- van Beek E, Pieterman E, Cohen L, Löwik C, Papapoulos S.
  Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates.
  Biochem Biophys Res Commun. 1999; 264(1): 108-11.
- Visekruna M, Wilson D, McKiernan FE.
  Severely suppressed bone turnover and atypical skeletal fragility.

J Clin Endocrinol Metab. 2008; 93(8): 2948-52.

- Wells GA, Cranney A, Peterson J, Boucher M, Shea B, Robinson V, Coyle D, Tugwell P.
  Alendronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women.
  Cochrane Database Syst Rev. 2008; (1): CD001155.
- Yasuma T, Oi S, Choh N, Nomura T, Furuyama N, Nishimura A, Fujisawa Y, Sohda T.
  Synthesis of peptide aldehyde derivatives as selective inhibitors of human cathepsin L and their inhibitory effect on bone resorption.
  J Med Chem. 1998; 41(22): 4301-8.

- 公開特許公報
  ラットカテプシン K のポリヌクレオチド及びポリペプチド配列
  特開 2000-37191
- 厚生労働省
  国民生活基礎調査結果　平成 13 年度版
  2001
- 骨粗鬆症財団ホームページ ; 用語集骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会（委員長　折茂　肇）
- 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2011 年度版
  ライフサイエンス出版，2011