

200832052A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

抗リウマチ薬の時間薬物療法の確立

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤 秀人

平成 21 (2009) 年 3 月

## I. 構成員名簿

平成20年度 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業  
抗リウマチ薬の時間薬物療法の確立

構成員名簿

	氏名	職名	所属	所属施設の所在地
主任	藤 秀人	准教授	長崎大学医学部・歯学部附属病院 薬剤部	〒852-8501 長崎市坂本1-7-1
分担	井田弘明	講師	長崎大学医学部・歯学部附属病院 第一内科	〒852-8501 長崎市坂本1-7-1
	家入一郎	准教授	九州大学大学院薬学研究院 薬物動態学分野	〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1
	小柳 悟	准教授	九州大学大学院薬学研究院 薬剤学分野	〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1

## II. 総括研究報告書

## 抗リウマチ薬の時間薬物療法の確立

主任研究者：藤 秀人

長崎大学医学部・歯学部附属病院 薬剤部

### 研究要旨

本研究では、早朝に現れる四肢の関節のこわばり等の関節リウマチ (RA) 患者特有の生体リズムに着目し、抗 RA 薬の効果・副作用に及ぼす投薬時刻の影響について研究する。また、個々の RA 患者の生体成分の概日リズムをモニタリングすることで、個別化時間治療法の確立を目指す。

複数の RA モデル動物を用いた研究では、RA 発症後いずれの RA モデル動物においても、早朝に高値、夜間に低値を示す概日リズムが炎症指標である CRP や SAA および炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  で認められた。これらの概日リズムを考慮して、抗 RA 薬メトトレキサート (MTX) を投薬した結果、有意に抗リウマチ効果を向上できることが明らかとなった。したがって、投薬タイミングを考慮した RA 薬物療法は、より有効性の向上が期待できると考えられる。また、ここで得られた炎症性サイトカインの概日リズムは、RA モデル動物及び RA 患者において共通の概日リズムの位相を示すことが明らかとなった。今後これらを解明することで、RA における種々の生体成分の概日リズム制御因子の解明及びこれらを用いた新規薬物療法の構築が可能になると考えられる。

RA 患者を対象とした臨床研究では、従来の投与方法から MTX を夕投与のみに投薬スケジュールを変更する時間治療について検討を行った。現在試験実施中のため明確な結論は示せないが、多くの症例で時間治療を実施することで DAS28 が試験開始前と比較し顕著に減少する知見を得ている。MTX の時間治療は、有益な治療法となる可能性が期待できる。今後、症例数を加算し、時間治療の有用性を評価したい。

### 共同研究者

井田弘明：長崎大学医学部・歯学部附属病院 第一内科 講師  
家入一郎：九州大学大学院薬学研究院 薬物動態学分野 准教授  
小柳 悟：九州大学大学院薬学研究院 薬剤学分野 准教授

### A. 研究目的

早朝に現れる四肢の関節痛である“朝のこわばり”は、古くからよく知られている関節リウマチ (RA) の特徴的な症状の一つである。日中には現れず早朝に現れるこの関節痛はまさに RA 患者固有の概日リズムである。また、この朝のこわば



りに対応して血中IL-6やTNF- $\alpha$ が深夜から早朝にかけて高値を示す概日リズムがRA患者で認められる可能性が近年示唆され (*Arth Rheum* 56: 399, 2007)、RA患者特有の朝のこわばりの発症機序に少なからず炎症性サイトカインの概日リズムが関与しているのではないかと考えられている。これまでRAの時間治療に関する研究は、世界的にもほとんど行われてこなかった研究分野である。

そこで、本年度の研究では、RA治療における第一選択薬であるメトトレキサート (MTX) に着目し、MTXの投薬時刻の違いによる治療効果への影響について臨床試験を実施した (井田、藤)。また、RAモデル動物を対象にRA発症前後における種々の生体リズムの解析を試みた (藤)。

## B. 研究方法

### I. RA患者を対象としたMTXの時間治療 (井田、藤)

対象被験者は、年齢20歳以上でRAと診断されDAS28が3.2以上であり、現在RAに対する治療にてMTXを投薬され、生物学的製剤を使用していないまたは使用の意思を持たない患者とした。臨床研究は、上記の基準を満たしインフォームドコンセントが得られた患者に対し、被験者が投薬されていた既存の投与方法を基準として設定し、1週間における総投与量及び投与回数は変更しない。時間治療型MTX投薬レジメンでは、1日1回夕投与とした。時間治療開始前と開始後3ヶ月目のDAS28などを評価した。

### II. RA発症に基づく生体リズム変容の機序解明 (藤)

CIAモデルおよびMRL/lprマウスを対象に関節炎発症前・後によって生体成分のどのような因子が変化するか評価した。それぞれの過程において、9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00の6時点に採血を行った。血清中SAA, CRP, 炎症性サイトカイン (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) を測定した。

### (倫理への配慮)

臨床研究では、長崎大学医学部・歯学部病院 臨床研究倫理委員会の承認を受け、試験内容はUMIN Clinical Trials Registryに登録した。倫理指針に従い、患者情報の匿名化などに配慮して臨床試験を実施した。

動物実験は、長崎大学実験動物委員会の了承を受け、指針に基づき実施した。

## C. 研究結果

### I. RA患者を対象としたMTXの時間治療 (井田、藤)

現在エントリーしているもしくはエントリー予定の被験者は、7例である。また、3ヶ月間の試験を終了した症例は2例である。症例1は61歳女性で、DAS28は変更時4.48、3ヶ月目で3.48と経時的に減少し、時間治療開始時から3ヶ月で0.99 DAS28は低下した。症例2は、64歳男性でDAS28は変更時5.21、3ヶ月目で4.27と経時的に減少し、時間治療開始時から3ヶ月

月で 0.94 DAS28 は低下した。また、両症例とも副作用は認められなかった。

## II. RA 発症に基づく生体リズム変容の機序解明 (藤)

CII 未感作マウスおよびラットの血液中 SAA、CRP 及び TNF- $\alpha$ 濃度には明瞭な概日リズムは認められなかったが、CII 感作後では明期に高値、暗期に低値を示す有意な概日リズムが SAA、CRP 及び TNF- $\alpha$ 濃度で認められた。また、MRL/lpr マウスでも同様に明期に高値、暗期に低値を示す有意な概日リズムが SAA 及び TNF- $\alpha$ 濃度で認められた。

## D. 考察

### I. RA 患者を対象とした MTX の時間治療 (井田、藤)

投与量や投与回数を変更することなく、生体リズムに合わせた MTX の薬物治療は、安全かつ効果的に RA 治療を実践できる可能性が示唆された。今後、臨床試験を進め、時間治療の有用性を検証したい。

### II. RA 発症に基づく生体リズム変容の機序解明 (藤)

本研究では、複数の RA モデル動物を対象に生体リズム解析を実施した。これら生体成分の概日リズム形成及び位相には類似点が多く、マウス・ラットといった種差及び RA モデルの差を超え RA 発症による概日リズム発現には何らかの共通した因子が

関与していると考えられる。また、これらの周期性は、夜行性・昼行性の違いがあるにもかかわらず RA 患者の炎症性サイトカインの概日リズムの位相に類似していることが考えられた。今度、RA 患者における生体成分の概日リズム解析及び本研究成果を踏まえ、RA 発症に関与していると考えられている影響因子の同定を目指したい。

## E. 結論

### I. RA 患者を対象とした MTX の時間治療 (井田、藤)

薬物の服用タイミングを夜間に変更するといった非常にシンプルな投与方法の変更ではあるが、生体成分の概日リズムを考慮した上で投与することで、RA 症状を軽減できる可能性が考えられる。今後、詳細な検討を行い、RA 患者を対象とした MTX の薬物療法の有用性を評価する。

### II. RA 発症に基づく生体リズム変容の機序解明 (藤)

炎症及び炎症性サイトカインの概日リズムが、動物モデルや種が異なる個体においても同様の位相を示すことから、これらの概日リズム形成には環境因子が一部関与していると考えられる。今後はこの因子の同定を試み、RA における概日リズム発現の機序を明らかにし治療への応用を目指す。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

該当なし

### 2. 学会発表

- 1) 藤秀人：関節リウマチの時間治療  
第15回日本時間生物学会：シンポジウム（岡山、2008年11月）
- 2) To H., Yoshimatsu H., Irie S., Ohbayashi K., Kitahara T., Ieiri I., Ohdo S., Higuchi S., Sasaki H.:  
Therapeutic index of methotrexate depends on circadian cycling of tumor necrosis factor-alpha in MRL/lpr and collagen-induced arthritis mice. CPT 2008 Conference (Québec, July 2008)
- 3) 藤秀人、佐々木均：マウスを対象とした抗リウマチ薬タクロリムスの時間薬理的検討 第52回日本リウマチ学会学術集会（札幌、2008年4月）

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



### III. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）  
分担研究報告

関節リウマチ患者を対象としたメトトレキサートの時間治療

主任研究者：藤 秀人

長崎大学医学部・歯学部附属病院 薬剤部

研究分担者：井田弘明

長崎大学医学部・歯学部附属病院 第一内科

研究要旨

これまで、関節リウマチ (RA) 患者を対象とした抗 RA 薬の時間治療はほとんど行われてこなかった。本研究では、メトトレキサートを投与されている RA 患者を対象に、従来の投与方法から時間治療にスイッチすることで、疾患活動性などの RA 症状や副作用がどのように変化するかを検討した。現在、臨床研究の途中であるが、3ヶ月間の試験が終了した被験者では良好な治療成績が認められた。したがって、新規の薬剤を使用せず、服用時刻を変更するといった非常にシンプルな投与方法の変更によって有益な効果が得られる可能性を時間治療は期待させる。今後、対象症例数を加算し、時間治療の有用性の有無を明確に検討したい。

A. 研究目的

当研究グループでは、関節リウマチ (RA) モデルマウスを対象にメトトレキサート (MTX) の投薬時刻の違いによる抗 RA 効果への影響を評価し、投薬時刻を考慮することで、より顕著に抗 RA 効果を向上できることを明らかにした。また、この要因として、炎症性サイトカインの tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の概日リズムが密接に関与する可能性を明らかにした。RA 患者においても、この TNF- $\alpha$  の概日リズムが発現していることが知られている。したがって、当研究グルー

プの動物実験による研究成果およびヒトの炎症性サイトカインの概日リズムを基盤に、RA 患者における MTX の投薬時刻を考察すると、夕方から夜間にかけて投与することでより効果的な治療が可能になると推察される。

そこで、本研究では、RA 患者を対象に MTX の夜間投薬を行うことで、従来の治療方法と比較し効果の向上および副作用の軽減が可能か否かについて評価する。

B. 研究方法

被験者は、年齢 20 歳以上で RA と

診断され DAS28 が 3.2 以上であり、現在 RA に対する治療にて MTX を投薬され、生物学的製剤を使用していないまたは使用の意思を持たない患者とした。用法・用量は、上記の基準を満たしインフォームドコンセントが得られた被験者に対し、被験者が投薬されていた既存の投与方法を基準として設定し、1 週間における総投与量及び投与回数を変更しない。時間治療型 MTX 投薬レジメンでは、1 日 1 回夕投与とする。例えば、1 日目朝・夕、2 日目朝の場合は 1, 2, 3 日目に夕投与とし、1 日目朝・夕、2 日目朝・夕の場合は、1, 2, 3, 4 日目に夕投与する。主要評価項目の有効性には European League Against Rheumatism (EULAR) 改善基準及び DAS28 による疾患活動性を、有害事象では白血球減少を評価した。副次的項目としては、血清アミロイド A 蛋白 (SAA)、血清サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 など)、抗 DNA 抗体、gG 型リウマチ因子、リウマチ因子 (RF) 定量、抗シトルリン化ペプチド (CCP) 抗体、抗ガラクトース欠損 IgG 抗体、マトリックスメタロプロティナーゼ-3 (MMP-3) の時間治療前・後の値を算出し、治療効果の有無を評価した。評価期間は、時間治療変更時と投与後 3 ヶ月後を必須とし、被験者から承諾が得られた場合は時間治療後 1, 2, 6, 12 ヶ月も測定を行う。

#### (倫理への配慮)

臨床研究では、長崎大学医学部・歯学部病院 臨床研究倫理委員会の承

認を受け、試験内容は UMIN Clinical Trials Registry に登録した。倫理指針に従い、患者情報の匿名化などに配慮して臨床試験を実施した。

#### C. 研究結果

現在エントリーしているもしくは 2009 年 2 月 10 日までにエントリー予定の被験者は、7 例である。また、3 ヶ月間の試験期間を終了した症例は 2 例である。3 ヶ月の試験が終了した症例 1 は、61 歳女性で平成 15 年に関節リウマチと診断され MTX (2 mg) を 1, 2 日目の朝・夕に投薬 (8 mg/週) されていた。時間治療ではこれまでの投与量・投与回数 (1 回 2 mg を 4 回投薬) を変更せずに MTX を夕のみ投薬した。その結果、試験前の白血球数は、6000 / $\mu$ l で、試験開始 3 ヶ月後も 6000 / $\mu$ l と白血球減少は認められなかった。また、他の有害事象も認められなかった。一方、DAS28 は、変更時 4.48、1.5 ヶ月目で 3.85、3 ヶ月目で 3.48 と経時的に減少し、時間治療開始時から 3 ヶ月間の試験成績は EURAR 改善基準で moderate response (0.99 減少)であった。本症例の特徴的な変化としては、腫脹関節痛が 6 から 6 と変化しなかったにもかかわらず、圧痛関節痛が 6 から 1 へ、また全般的健康状態も大幅に減少したことにある。しかし、CRP などの炎症マーカーや RF などの因子の顕著な減少は認められなかった。

症例 2 は、64 歳男性で DAS28 は変更時 5.21、3 ヶ月目で 4.27 と経時的に減少し、時間治療開始時から 3 ヶ月で



0.94 DAS28 は低下した。本症例の特徴的な変化としては、腫脹関節痛や全般的健康状態に減少は認められなかったが、圧痛関節痛が 2 から 0 へ CRP が 4.51 mg/dL から 1.14 mg/dL へ減少した。症例 1 と 2 では、DAS28 の減少はほぼ同等であったが、減少した項目が大きく異なり、RA 患者個々で MTX の効果が異なるのは非常に興味深いところである。

また、予備的な検討で、時間治療導入後 15 ヶ月を経過した症例が 1 例おり、本症例は時間治療開始後 2 ヶ月で DAS28 が 5.41 から 3.81 と減少し、用量・投与量の増減もなく 15 ヶ月間このスコアはほぼ一定である。臨床的寛解を目指すためには、今後用量の増加を行う必要があるかと考えられるが、長期的にも時間治療の応用は安定した治療効果が見込める可能性が考えられる。以上より、MTX の時間治療は副作用を増悪させることなく、治療効果を向上できる可能性が考えられる。

#### D. 考察

投与量や投与回数を変更することなく、投薬時刻のみの変更で安全性を維持しつつ治療効果の向上が得られる MTX の時間治療は、RA の薬物療法にとって有用な治療法になると考えられる。今後、多くの被験者を対象に MTX の時間治療の効果を検証し、明確なエビデンスを確立したい。

#### E. 結論

以上より、MTX の時間治療は、RA 治療において有益であることを示された。また、RA 発症機序の解明より、炎症及び炎症性サイトカインの概日リズムが、動物モデルや種の異なる個体においても同様の位相を示すことから、これらの概日リズム形成には環境因子が一部関与していると考えられる。今後はこの因子の同定を試み、RA における概日リズム発現の機序を明らかにし、患者個々に対応した時間治療法の構築を目指したい。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし

##### 2. 学会発表

- 1) 藤秀人：関節リウマチの時間治療  
第 15 回日本時間生物学会：シンポジウム（岡山、2008 年 11 月）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



## RA発症に基づく生体リズム変容の機序解明

主任研究者：藤 秀人

長崎大学医学部・歯学部附属病院 薬剤部

### 研究要旨

早朝に現れる四肢の関節痛である“朝のこわばり”は、古くからよく知られている関節リウマチ (RA) の特徴的な症状の一つである。近年、朝のこわばりに対応するように血中 IL-6 や TNF- $\alpha$  などが早朝に増加することが報告され、炎症によるこわばりの発症機序に少なからず炎症性サイトカインの概日リズムが関与しているのではないかと考えられている。したがって、日中には現れず早朝に現れるこの関節痛はまさに RA 患者固有の概日リズムであり、これらの成因を解明することで新たな RA 治療の糸口が見出されるのではないかと考えた。そこで本研究では、RA モデル動物を用いて、RA 発症前後における各種生体成分の概日リズムを網羅的に測定した。

### A. 研究目的

複数の関節リウマチ (RA) モデル動物を対象に RA 発症前・後によって生体成分のどのような因子の概日リズムが変化するか評価する。この実験結果にて得られる生体成分のデータを基盤に、RA 発症によって概日リズムが変化する因子を抽出し、概日リズム発振に重要な役割を有する時計遺伝子を中心に候補を網羅的に測定し、RA 発症に伴う概日リズム発振の制御機構及び概日リズム制御因子の同定を試みる。

### B. 研究方法

自由摂食飲水、明暗周期（明期 7:00-

19:00）条件下で 1 週間以上飼育した Lewis 雌性ラット及び DBA/1J 雄性マウスに II 型コラーゲン(CII) を感作し、collagen-induced arthritis (CIA) 動物を作成した。また、血液学的・病理学的に相同性が非常に高い自然発症型 RA 動物モデルの MRL/lpr マウスを使用した。CIA モデルでは、CII 感作前・後に、9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00 の 6 時点で採血を行い、血清中 SAA や CRP は ELISA 法を用い、炎症性サイトカイン (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) はマイクロアレイビーズ法にて網羅的に測定した。評価は、関節炎形成によって変化する生体成分の概日リズムの有無について評価した。また、形成さ

れた概日リズムに依存して MTX の治療効果が変化するか否かについて評価した。MRL/lpr マウスでは、RA 発症前・後に 9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00 の 6 時点で採血を行い、血清中 SAA や IL-6, TNF- $\alpha$  を測定した。また、形成された概日リズムに依存して MTX の治療効果が変化するか否かについて評価した。

#### (倫理への配慮)

動物実験は、長崎大学実験動物委員会の了承を受け、指針に基づき実施した。

### C. 研究結果

CII 未感作マウスやラットの血液中 SAA 及び CRP 濃度には明瞭な概日リズムは認められなかったが、CII 感作後の CIA モデルでは明期に高値、暗期に低値を示す有意な概日リズムが SAA 及び CRP 濃度で認められた (Figure 1)。RA 発症によって現れるこのような現象は、自然発症型 RA モデル動物である MRL/lpr マウスでも我々の先の研究によって明らかにしている (Figure 1)。

また、MRL/lpr マウス及び CIA マウス・ラットに対し MTX の投薬時刻の違いによる抗 RA 効果について評価した。いずれのモデルにおいても、CRP, SAA が増加し始める暗期後半から明期前半にかけて MTX を投薬することで、有意に治療効果を向上できることが明らかとなった (Figure 2)。

### D. 考察

本研究より、MTX を効率的に投薬するには、炎症性サイトカインや炎症の概日リズムを考慮することが有用であると考えられる。詳細な機構解明を行わねばならないが、RA 患者の場合深夜から早朝にかけて炎症性サイトカインが増加することから、MTX を夕投与することでより高い効果が期待できると考えられる。

RA 症状発症後の炎症指標や炎症性サイトカインの概日リズム形成及び位相には類似点が多く、マウス・ラットといった種差及び RA モデルの差を超え RA 発症による概日リズム発現には何らかの共通した因子が関与していると考えられる。また、RA 患者でもこわばりや炎症性サイトカインの概日リズムが、早朝にピークを迎えることが報告されている (*Arth Rheum* 56: 399, 2007)。夜行性である実験動物と昼行性であるヒトでは、活動リズムが約 12 時間異なるため、多くの生体成分でも約 12 時間概日リズムの位相がシフトしている。本研究で認められたように、炎症などの概日リズムがヒト及び実験動物で類似することは非常に興味深く、いずれの生物に対しても共通の周期によって暴露される影響因子が、RA 症状の概日リズムの制御に関与していると考えられる。今後、この制御因子を同定し、RA 症状の概日リズムを制御することで RA の治療に貢献できる薬物の創製や薬物療法の開発を行いたい。

## E. 結論

炎症及び炎症性サイトカインの概日リズムが、動物モデルや種が異なる個体においても同様の位相を示すことから、これらの概日リズム形成には環境因子が一部関与していると考えられる。今後はこの因子の同定を試み、RAにおける概日リズム発現の機序を明らかにし治療への応用を目指す。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

該当なし

### 2. 学会発表

- 1) 藤秀人：関節リウマチの時間治療  
第15回日本時間生物学会：シンポジウム（岡山、2008年11月）
- 2) To H., Yoshimatsu H., Irie S., Ohbayashi K., Kitahara T., Ieiri I., Ohdo S., Higuchi S., Sasaki H.: Therapeutic index of methotrexate depends on circadian cycling of tumor necrosis factor-alpha in MRL/lpr and collagen-induced arthritis mice. CPT 2008 Conference (Québec, July 2008)
- 3) 藤秀人、佐々木均：マウスを対象とした抗リウマチ薬タクロリムスの時間薬理学的検討 第52回日本リウマチ学会学術集会（札幌、2008年4月）

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



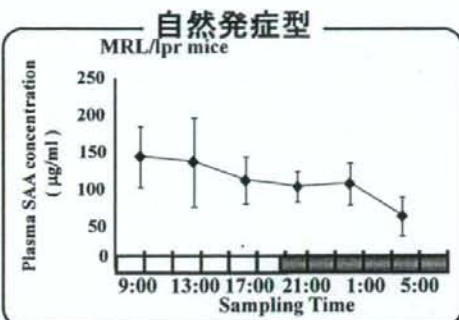
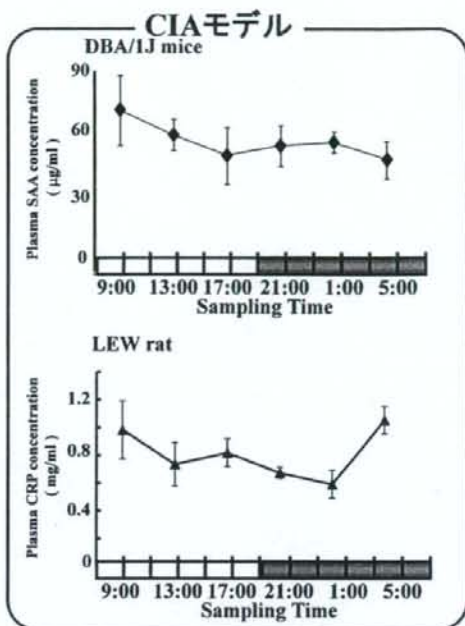


Figure 1. 各RAモデルにおける炎症の概日リズム

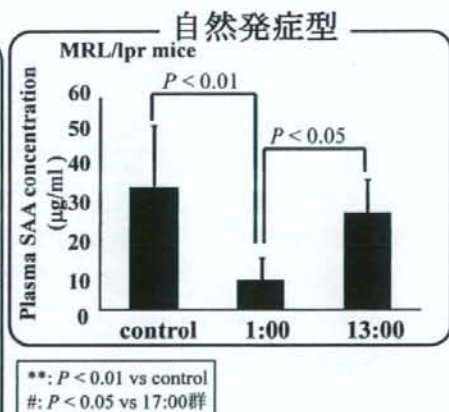
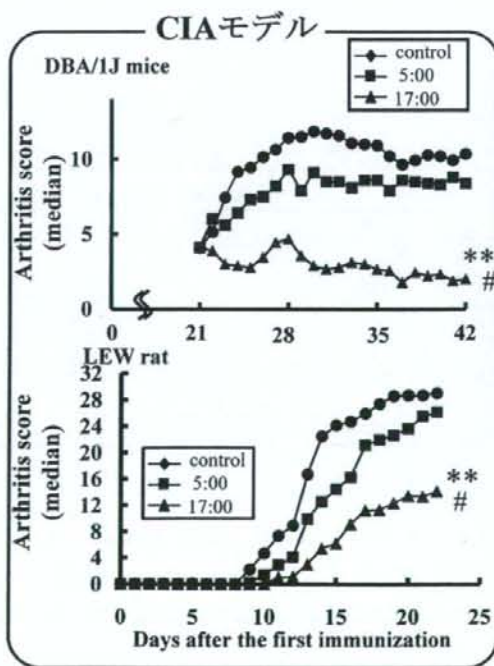


Figure 2. 各RAモデルにおけるMTXの投与時刻の違いにおいて抗RA効果への影響