

2009 340 47A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤 秀人

平成 22 (2010) 年 4 月

## 目 次

I. 構成員名簿	1
II. 総括研究報告書	3
抗リウマチ薬の時間薬物療法の確立	4
III. 分担研究報告書	9
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	10
RA発症に基づく生体リズム変容の機序解明	15
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
V. 研究成果の刊行物・別刷	21

## I. 構成員名簿

平成21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
代表	藤 秀人	准教授	長崎大学病院 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

研究代表者：藤 秀人 長崎大学病院 薬剤部 准教授

### 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。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 マウスを対象に種々の生体成分を測定した結果、血清アミロイド A タンパク (SAA) および tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 濃度は明期に高値を暗期に低値を示す明瞭な概日リズムが RA 発症後に認められた。また、TNF- $\alpha$  の概日リズム形成には、TNF- $\alpha$  遺伝子の発現制御因子である LT- $\alpha$  と LT- $\beta$  が寄与している可能性が明らかとなった。次に、既にメトトレキサート (MTX) で治療中の RA 患者を対象に MTX の時間治療の効果を評価した。MTX は各被験者が投薬されていた投薬スケジュールを基盤に、投与量および投薬回数を変更せずに、MTX を 1 日 1 回寝る前に投薬した。時間治療開始時と比較し時間治療開始後 3 ヶ月で有意に disease activity score (DAS) 28 は減少した。また、17 例中 7 例 (41.2%) で EULAR 改善基準の中等度反応を示し、この中の 4 例 (23.5%) では臨床的寛解に到達した。また、機能障害の指標である modified health assessment questionnaire (MHAQ) も時間治療開始後 3 ヶ月間で顕著に改善した。一方、副作用は認められなかった。投与量や投薬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の一つになると考えられる。

### 共同研究者

井田弘明：長崎大学病院 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

関節リウマチ (RA) は関節滑膜を病変の主座とする進行性の全身性炎症性疾患である。RA の症状は朝のこわばりが特徴的であり、RA の病態には関節滑膜における血管新生や炎症性細胞浸潤、滑膜細胞増殖、軟骨・骨破壊などが挙げられ、これらの病態形

成には過剰に産生されるサイトカインが大きく関与するといわれている。なかでも炎症性サイトカインである tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) や interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、 interleukin-6 (IL-6) は RA 患者の血中や関節滑液中で高濃度に発現している。これらのサイトカインの複合的な作用の結果、関節炎は改善と憎悪を繰り返しながら進行し、さらに軟骨・骨破壊を起し関節の変形に至る。これにより患者の日常労作は障害され、生活の質 (QOL) は著しく低下する。このため、患者の QOL 向上を目指し、より効果的な治療法の開発が期待されている。

長年にわたり RA の薬物治療は痛みを抑制することに注視され、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) や副腎皮質ホルモン薬が投薬されてきた。これらの治療は、痛みの抑制においてある程度の成果を挙げてきたが、関節破壊という RA の本質的な問題には十分に対応することはできなかった。疾患修飾性抗リウマチ薬 (DMARD) は、炎症自体を抑える作用は有さないものの、RA の免疫異常を修飾することによって RA の活動性をコントロールすることができる薬物である。なかでも、抗がん剤として使用されていたメトトレキサート (MTX) は、抗リウマチ効果の作用機序に不明な点が多いものの、american college of rheumatology (ACR) 改善率や関節炎抑制効果、生活改善効果が実証されており、アンカードラッグとして RA 薬物療法の中心的な役割を担っている。

また、近年では、抗ヒト TNF- $\alpha$  モノクローナル抗体製剤であるインフリキシマブやエタネルセプトなどの生物学的製剤が開発され、これらの薬物は RA の炎症反応に関与する炎症性サイトカインの作用を効果的に抑制することで、従来の抗 RA 薬と比較して高い有効性を示している。RA 薬物治療は今まさにパラダイムシフトの真ただ中にあり、この機会にもう一度 RA 病態の特徴や薬物の特性を理解し、より効果的な治療法の構築が必要であると考えられる。

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 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 (藤、井田)。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 (藤、井田)

対象被験者は、年齢 20 歳以上で RA と診断され disease activity score (DAS) 28 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、1 週間における総投与量及び投薬回数は変更せず、時

間治療型 MTX 投薬レジメンでは、1 日 1 回寝る前投薬とし、時間治療開始後 3 ヶ月間評価した。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、modified health assessment questionnaire (MHAQ) を、有害事象については白血球減少を評価した。

## II. RA 発症に基づく生体リズム変容の機序解明 (藤)

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 マウスを対象に 9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00 の 6 時点に脾臓または血漿を採取し、血漿中 SAA 濃度および IgG-RF 抗体価、各種サイトカイン (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) 濃度、コルチコステロンを測定した。また、形成された概日リズムの機序を明らかにするために、各種サイトカイン mRNA 発現量測定およびルシフェラーゼレポーターアッセイなどを行った。

### (倫理への配慮)

臨床研究では、長崎大学病院および佐世保中央病院 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 (藤、井田)

試験開始前 2 ヶ月間の被験者の DAS28 は、ほぼ中等度疾患活動性を維持していた ( $P = 0.279$ )。時間治療開始時と比較し時間治療開始後 3 ヶ月で有意に DAS28 は減少した ( $P < 0.01$ )。また、MHAQ は時間治療開始後 3 ヶ月間で有意に減少した ( $P < 0.05$ )。一方、試験期間中、重篤な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)

10 週齢のマウスの血中 SAA および TNF- $\alpha$  濃度では有意な概日リズムが認められなかったのに対して、15 週齢のマウスでは明期に高値を暗期に低値を示す明瞭な概日リズムが認められた。また、RA 症状の進行にともない白血球内 TNF- $\alpha$  mRNA 発現量にも暗期後半にピークを示す概日リズムが認められた。次に、RA 症状の進行にともない TNF- $\alpha$  の遺伝子発現に認められた概日リズムの制御機構の解明を目的とし、RA サイトカインカスケードに着目し、各種サイトカイン mRNA 発現を生体リズムの観点から PCR array 法にて網羅的に解析した。その結果、RA における TNF- $\alpha$  遺伝子発現の制御因子として、LT- $\alpha$  と LT- $\beta$  が寄与している可能性が明らかとなった。



## D. 考察

### I. RA 患者を対象とした MTX の時間治療 (藤、井田)

MTX を寝る前に投薬する時間治療によって、臨床的寛解に 17 名中 4 名 (23.5%) が到達し、有効性が 17 例中 7 例 (41.2%) で認められた。機能障害の指標である MHAQ も 3 ヶ月間の時間治療によって顕著に機能障害が改善された。また、寝る前に MTX を投薬する時間治療を導入することで MTX の排泄遅延による副作用の増大が危惧されたが、骨髄抑制が現れた被験者はなく、他の副作用発現も認められなかった。

投与量や投薬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。

### II. RA 発症に基づく生体リズム変容の機序解明 (藤)

MRL/lpr マウスにおいて RA 発症後、炎症の指標である SAA や血中 TNF- $\alpha$  濃度は明期に増加することが明らかとなった。また、TNF- $\alpha$  が特定の時間帯にピークを示す現象には、RA 症状の進行と共に発現量の上昇および概日リズムの形成を示した LT- $\alpha$  と LT- $\beta$  が関与している可能性が示唆された。今後、より詳細に RA 発症に関与していると考えられている影響因子の探索を試みたいと考えている。

## E. 結論

### I. RA 患者を対象とした MTX の時間治療 (藤、井田)

MTX の服用タイミングを寝る前に変更することで、治療効果の向上が期待できる。今後、無作為化比較試験を経て、MTX の時間治療の有用性を判断したい。

### II. RA 発症に基づく生体リズム変容の機序解明 (藤)

炎症性サイトカインの明瞭な概日リズムは、RA 発症前では認められず RA 発症後に発現したことから、炎症性サイトカインの概日リズムを制御する因子の同定は新たな RA 療法を考える上で非常に重要であると考えられる。本研究では、TNF- $\alpha$  発現の抑制因子である LT- $\alpha$  と LT- $\beta$  の概日リズムが TNF- $\alpha$  の概日リズムの形成に関与している可能性が明らかとなった。今後は、より詳細な機序解明を行い、RA 治療の新薬開発のための創薬研究を行いたい。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) To H., Irie S., Tomonari M., Watanabe Y., Kitahara T., Sasaki H.: Therapeutic index of methotrexate depends on circadian cycling of tumor necrosis factor- $\alpha$  in collagen-induced arthritis rats

and mice. *J. Pharm. Pharmacol.*  
61: 1333-8, 2009.

- 2) 藤秀人：抗リウマチ薬の時間治療への展望、*時間生物学*、15: 33-39, 2009.
- 3) 藤秀人：抗リウマチ薬の時間薬物療法を目指して、*薬事新報*、2610: 15-21, 2010.

## 2. 学会発表

- 1) 藤秀人、井田弘明、佐々木均、江口勝美：関節リウマチ患者に対するメトトレキサートの時間治療を導入した 1 例 第 53 回日本リウマチ学会学術集会（東京、2009 年 4 月）
- 2) 藤秀人、佐々木均：マウスを対象とした抗リウマチ薬ミゾリビンの時間薬理学的検討 第 53 回日本リウマチ学会学術集会（東京、2009 年 4 月）
- 3) 藤秀人：抗リウマチ薬の時間薬物療法を目指して 第 17 回クリニカルファーマシーシンポジウム（京都、2009 年 7 月）

## H. 知的財産権の出願・登録状況

出願番号：特願 2010-056428

出願日：平成 22 年 3 月 12 日

発明の名称：関節リウマチ薬

発明者：中村秀人

### 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

研究代表者：藤 秀人 長崎大学病院 薬剤部 准教授  
研究分担者：井田弘明 長崎大学病院 第一内科 講師  
研究協力者：弦本敏行 長崎大学病院 整形外科 准教授  
植木幸孝 佐世保中央病院 病院長

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 (MTX) を投薬されている RA 患者を対象に、従来の投薬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。17 症例で 3 ヶ月間の時間治療を行った。disease activity score (DAS) 28 は、時間治療導入後 1 ヶ月目より有意に減少し、この抑制効果は 3 ヶ月間維持された。また、modified health assessment questionnaire (MHAQ) も経時的に減少した。一方、重篤な副作用は試験期間中認められなかった。

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薬法の変更で実施可能な MTX の時間治療は、安全かつ効果的な RA 療法の一法として期待できると考えられる。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) 患者の多くで早朝に現れる四肢の関節のこわばりは、RA 患者特有の生体リズムである。近年、朝のこわばりに対応するように、RA 患者では炎症性サイトカインが早朝にピークとなる概日リズムを示すことが明らかとなった。これまでの当研究グループによる研究の結果、RA モデル動物を対象に、メトトレキサート (MTX) の投薬時刻の違いによる抗リウマチ効果への影響を評価した

ところ、1 日の中でも炎症性サイトカインが増加し始める時刻に MTX を投薬することで、有意に抗リウマチ効果が高まることが明らかとなった (*J. Pharm. Pharmacol.* 61: 1333, 2009)。

以上の結果を基盤に本研究では、時間薬理学・時間治療学を応用し、RA 特有の生体リズムを考慮することで、より安全かつ効果的な RA 治療法の構築を目的とする。

## B. 研究方法

平成 21 年 7 月以前より、医療法人白十字会佐世保中央病院に外来にて通院している年齢 20 歳以上の RA 患者で、すでに現在 RA に対する治療として MTX を投薬され、disease activity score (DAS) 28 が 3.2 以上で、生物学的製剤を現在使用していない患者を候補被験者とした。候補被験者に対して、本試験の研究概要を説明し、インフォームド・コンセントが得られた RA 患者 22 例を本試験の被験者とした。被験者に対する投与方法としては、被験者が投薬されていた既存の MTX の投薬方法を基準とし、MTX の 1 週間における総投与量及び投薬回数は変更せず、時間治療では 1 日 1 回寝る前投薬とした。例えば、1 日目朝・夕、2 日目朝の場合は 1, 2, 3 日目に寝る前投薬とし、1 日目朝・夕、2 日目朝・夕の場合は、1, 2, 3, 4 日目に寝る前投薬とする。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、modified health assessment questionnaire (MHAQ) 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 タンパク (SAA)、血清サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 など)、抗 DNA 抗体、IgG 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イナーゼ-3 (MMP-3) の時間治療前・

後の値を測定し、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薬後 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、長崎大学病院および佐世保中央病院 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

本試験には、41 歳から 78 歳の 22 例の RA 患者が登録した。3 ヶ月間の試験を完了した被験者は、登録した 22 例のうち 17 例 (77%) であった。DAS28 は、1 例が高疾患活動性であり、16 例が中等度疾患活動性であった。時間治療開始前 2 ヶ月の DAS28 は 3.65 (平均値) であり、時間治療開始時 DAS28 は 3.83 (平均値) であり、各被験者における DAS28 は試験開始前 2 ヶ月間で有意な変化はなかった ( $P = 0.279$ ; Figure 1A)。時間治療開始時と比較して、時間治療開始後 1 ヶ月目より DAS28 は有意に減少し、その抑制効果は観察期間の 3 ヶ月間保持された (vs. 1 ヶ月目:  $P < 0.05$ , 2 ヶ月目:  $P < 0.01$ , 3 ヶ月目:  $P < 0.01$ ; Figure 1A)。DAS28 の 4 つの評価項目のうち、特に腫脹関節数では、試験期間を通して時間治療開始時と比較して有意に減少した ( $P < 0.01$ )。一方、全身健康状態は 3 ヶ月間

の観察期間中、明瞭な変化は認められなかった。MHAQは時間治療開始後3ヶ月間で有意に減少した ( $P < 0.05$ )。また、時間治療開始前のMHAQは0.625 (中央値) で、時間治療開始後3ヶ月目のMHAQは0.429 (中央値) であり、顕著なMHAQの減少が認められた ( $P = 0.0768$ ; Figure 1B)。

試験期間中、重篤な副作用は認められなかった。

#### D. 考察

本邦では、MTXの投薬は1週間を1単位として1日目朝・夕、2日目朝を基本とする投薬がなされている。RA患者では、早朝にこわばりや炎症性サイトカインが増加する概日リズムがあることから、これまでの動物実験の結果を含め総合的に判断すると、RA患者では夜間にのみMTXを投薬することで、より高い抗リウマチ効果が得られるのではないかと考えた。そこで、本研究ではRA患者を対象に従来の治療法からMTXの投与量や投薬回数を変えずに服用時刻のみを寝る前に変更する時間治療を実施することで、治療効果が得られるか否か検討した。本研究では、22例のエントリーがあり、そのうち17例の被験者で時間治療を開始し3ヶ月の観察期間が終了した。MTXを寝る前に投薬する時間治療では、時間治療開始後比較的早期より治療効果が現れ、DAS28は平均で時間治療開始前と比較し1ヶ月目で0.460、2ヶ月目で0.506、3ヶ月目で0.521減少し、時間治療を開始することで有意

にDAS28の低下が認められた。また、17例中7例 (41.2%)でEULAR改善基準の中等度反応を示し、この中の4例 (23.5%) では臨床的寛解に到達した。3ヶ月間の時間治療では炎症反応の低下はそれほど認められなかったが、本研究で得られたデータとして特徴的なものは、腫脹関節数が顕著に減少したことであった。関節痛の低減はRA患者のQOLを非常に向上できることから、MTXの時間治療の有用性は高いと考えられる。また、寝る前にMTXを投薬する時間治療を導入することでMTXの排泄遅延による副作用の増大が危惧されたが、骨髄抑制が現れた被験者はなく、他の副作用発現も認められておらず、安全にMTXの投薬が実施できている。以上より、MTXは生物学的製剤と比較し薬剤費が安く、世界的にアンカードラッグとして最も使用されている抗リウマチ薬であるため、MTXの時間治療に関する本研究は、RA療法において非常に大きなインパクトを与えるものと期待できる。

本臨床研究は17症例のRA患者を対象に、時間治療による3ヶ月間の薬効評価試験を実施した。また、現在エントリーしている被験者に対して12ヶ月間の長期試験を継続するための手続きを行っており、MTXの時間治療の長期的な効果について今後評価する。また、より科学性の高い評価を行うために、次年度より無作為化比較試験を実施し、RAにおけるMTXの時間治療の有用性を検証する。さらに、

これまでの研究成果より、MTX の投薬タイミングを考慮することで高い抗リウマチ効果を得るには、炎症性サイトカインの概日リズムの把握が重要になると考えている。今後、この炎症性サイトカインの概日リズム形成に関わる影響因子を同定し、炎症性サイトカインの概日リズムモニタリングによる患者個々に対応した時間治療法の構築を目指したい。

#### E. 結論

投与量や投薬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。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 藤秀人：抗リウマチ薬の時間治療への展望、*時間生物学*、15: 33-39, 2009.
- 2) 藤秀人：抗リウマチ薬の時間薬物療法を目指して、*薬事新報*、2610: 15-21, 2010.

##### 2. 学会発表

- 1) 藤秀人、井田弘明、佐々木均、江口勝美：関節リウマチ患者に

対するメトトレキサートの時間治療を導入した 1 例 第 53 回日本リウマチ学会学術集会（東京、2009 年 4 月）

- 2) 藤秀人：抗リウマチ薬の時間薬物療法を目指して 第 17 回クリニカルファーマシーシンポジウム（京都、2009 年 7 月）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

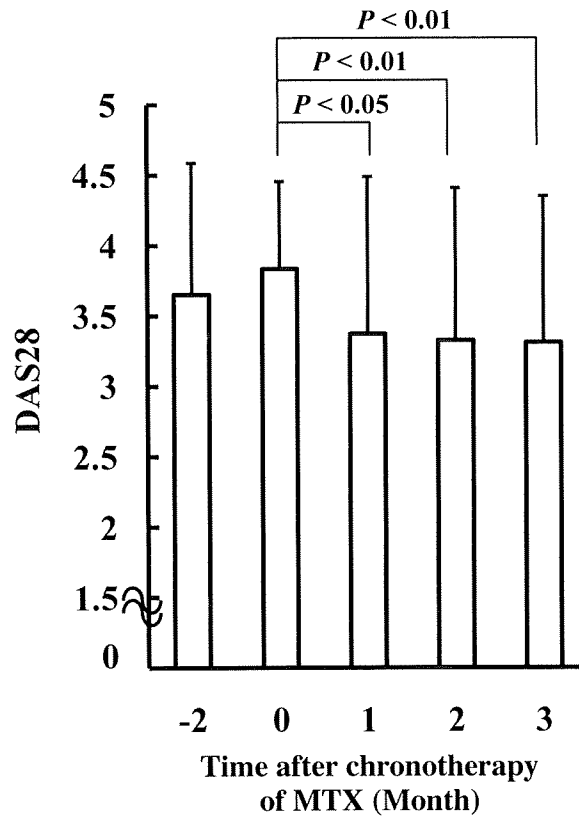
出願番号：特願 2010-056428

出願日：平成 22 年 3 月 12 日

発明の名称：関節リウマチ薬

発明者：中村秀人

### A. DAS28



### B. MHAQ

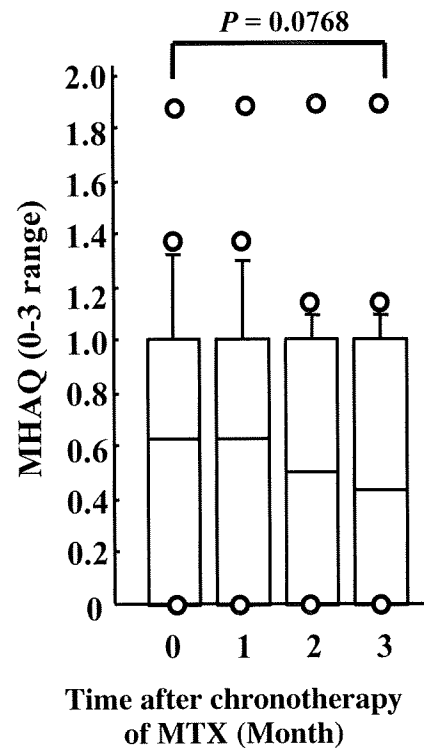


Figure 1. MTX の時間治療導入による DAS28 および MHAQ への影響



## RA発症に基づく生体リズム変容の機序解明

研究代表者：藤 秀人  
長崎大学病院 薬剤部 准教授

### 研究要旨

関節リウマチ (RA) の進行にともなう炎症および炎症性サイトカイン発現の概日リズム形成因子を評価するために、自然発症型リウマチモデル動物 MRL/lpr マウスを対象に、RA 症状の進行にともなう炎症およびサイトカインの概日リズムを評価し、生体リズムの観点より RA 症状の進行に影響を及ぼす因子の探索を行った。RA 発症前では、炎症指標および炎症性サイトカインに概日リズムは認められなかった。しかし、RA 発症後では明期に高値を暗期に低値を示す有意な概日リズムが認められた。これらの概日リズム形成には、TNF- $\alpha$  mRNA 発現量が関与している可能性が明らかとなり、この遺伝子発現の制御には、抑制因子である LT- $\alpha$ と LT- $\beta$ が一部関与している可能性が明らかとなった。今後、より詳細な機序解明を行い、RA 発症によって発現する種々の生体成分の概日リズムがどのような因子によって制御を受けているのか明らかにしたい。

### A. 研究目的

関節リウマチ (RA) は免疫機構の異常にともなうサイトカイン産生により慢性的に炎症が起こった結果生じるものであり、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 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 RA 患者特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 発症機序の解明の糸口が見出されるのではないかと考えられる。しかし、このように RA の症状には日周性が認められるため、RA に重要な因子にもリズム性変

動がある可能性が考えられ、この様な場合、ある一時点のみでの評価では、RA に重要な因子を認知できない可能性が生じる。そこで、RA 発症機序について生体リズムの観点より解明できないかと考えた。本研究では、RA 症状の進行にともなう炎症および炎症性サイトカイン発現の変動を多方面から検討することで、RA 発症の機序解明を試みた。自然発症型リウマチモデル動物 MRL/lpr マウスを対象に、RA 症状の進行にともなう炎症およびサイトカインの概日リズムを評価し、生体リズムの観点より RA 症状の進行に影響を及ぼす因子の探索を行った。

また、MRL/lpr マウスを対象に、炎症発現および炎症性サイトカインの概日リズムの形成に関わる因子や RA 発症に深く関与する因子について検討を試みた。

## 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。10 週齢および 15 週齢の MRL/lpr マウスを対象に 9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00 の 6 時点に脾臓または血漿を採取し、血清アミロイド A タンパク (SAA) 濃度および IgG-RF 抗体価、各種サイトカイン (tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) や interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、interleukin-6 (IL-6)) 濃度、コルチコステロンを測定した。また、各種サイトカイン mRNA 発現量測定し、サイトカインの発現を制御する因子解析をルシフェラーゼレポーターアッセイなどによって行った。

### (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

RA 症状の進行にともなう RA 因子の概日リズムの変化を検討するため、RA 進行前である 10 週齢と RA 進行後である 15 週齢の MRL/lpr マウスを対

象に検討を行った。自己免疫の程度の指標である IgG-RF 抗体価および炎症性マーカーである SAA 濃度は、RA 症状の進行と共に 10 週齢と比較し 15 週齢で有意な上昇を示した。IgG-RF 抗体価では、10 週齢および 15 週齢共に有意な概日リズムは認められなかった。しかし、10 週齢の血中 SAA 濃度では有意な概日リズムが認められなかったのに対して、15 週齢では明期に高値を暗期に低値を示す有意な概日リズムが認められた (Figure 1A)。また、RA の炎症を引き起こす原因となるサイトカインを抗体マイクロアレイ法にて網羅的に測定した結果、RA 症状の進行にともない SAA と同様に明期前半にピークを示す有意な概日リズムが TNF- $\alpha$  で認められた (Figure 1B)。さらに、RA 症状の進行にともない白血球内 TNF- $\alpha$  mRNA 発現量にも暗期後半にピークを示す概日リズムが認められた。次に、RA 症状の進行にともない TNF- $\alpha$  遺伝子の発現に認められた概日リズムの制御機構の解明を目的とし、RA サイトカインカスケードに着目し、各種サイトカイン mRNA 発現を生体リズムの観点から PCR array 法にて網羅的に解析した。その結果、RA における TNF- $\alpha$  遺伝子の発現を制御する可能性がある因子として炎症性サイトカインである LT- $\alpha$  と LT- $\beta$  が挙がってきた。そこでマウス TNF- $\alpha$  遺伝子の全プロモーター領域の塩基配列を含むルシフェラーゼレポーターベクターを作成し、その転写活性に及ぼす LT- $\alpha$  と LT- $\beta$  の影響につ

いて検討した結果、LT- $\alpha$  と LT- $\beta$  共存下では、TNF- $\alpha$  の発現はこれらの非存在下と比較して有意に減少することが明らかとなった。

#### D. 考察

本研究より、MRL/lpr マウスにおいて RA 症状の進行と共に自己免疫は進行し、炎症症状は明期に悪化することが明らかとなった。また、TNF- $\alpha$  において明期前半に高値を暗期後半に低値を示す有意な概日リズムが認められた。さらに、抗体マイクロアレイ法により、この炎症症状は主に炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  により惹起されていることが示唆された。したがって、RA の病変形成過程において中心的な作用を有するとされるサイトカインの中でも、TNF- $\alpha$  が RA において重要であることが示唆された。また、RA 症状の進行にともない TNF- $\alpha$  の特定の時間帯にピークを示す現象は、RA 症状の進行と共に発現量の上昇および概日リズムの形成を示した LT- $\alpha$  と LT- $\beta$  が関与している可能性が示唆された。

#### E. 結論

以上より、炎症の概日リズムには、炎症性サイトカインの概日リズムが関与していると考えられる。また、炎症性サイトカインの明瞭な概日リズムは、RA 発症前では認められず RA 発症後に発現したことから、炎症性サイトカインの概日リズムを制御する因子の同定は新たな RA 療法を考える

上で非常に重要であると考えられる。本研究において、炎症性サイトカインの発現を抑制する因子である LT- $\alpha$  と LT- $\beta$  もまた RA の発症によって概日リズムが現れることが明らかとなった。今後は、RA 発症によって炎症性サイトカイン発現の増加に寄与する制御因子を探索し、炎症性サイトカイン発現機構を基盤とした創薬研究を行っていきたい。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) To H., Irie S., Tomonari M., Watanabe Y., Kitahara T., Sasaki H.: Therapeutic index of methotrexate depends on circadian cycling of tumor necrosis factor- $\alpha$  in collagen-induced arthritis rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 61: 1333-8, 2009.
- 2) 藤秀人：抗リウマチ薬の時間治療への展望、*時間生物学*、15: 33-39, 2009.
- 3) 藤秀人：抗リウマチ薬の時間薬物療法を目指して、*薬事新報*、2610: 15-21, 2010.

##### 2. 学会発表

- 1) 藤秀人、佐々木均：マウスを対象とした抗リウマチ薬ミゾリピンの時間薬理学的検討 第53回日本リウマチ学会学術集会（東

- 京、2009年4月)
- 2) 藤秀人：抗リウマチ薬の時間薬物療法を目指して 第17回クリニカルファーマシーシンポジウム（京都、2009年7月）
- 3)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

出願番号：特願 2010-056428  
 出願日：平成 22 年 3 月 12 日  
 発明の名称：関節リウマチ薬  
 発明者：中村秀人

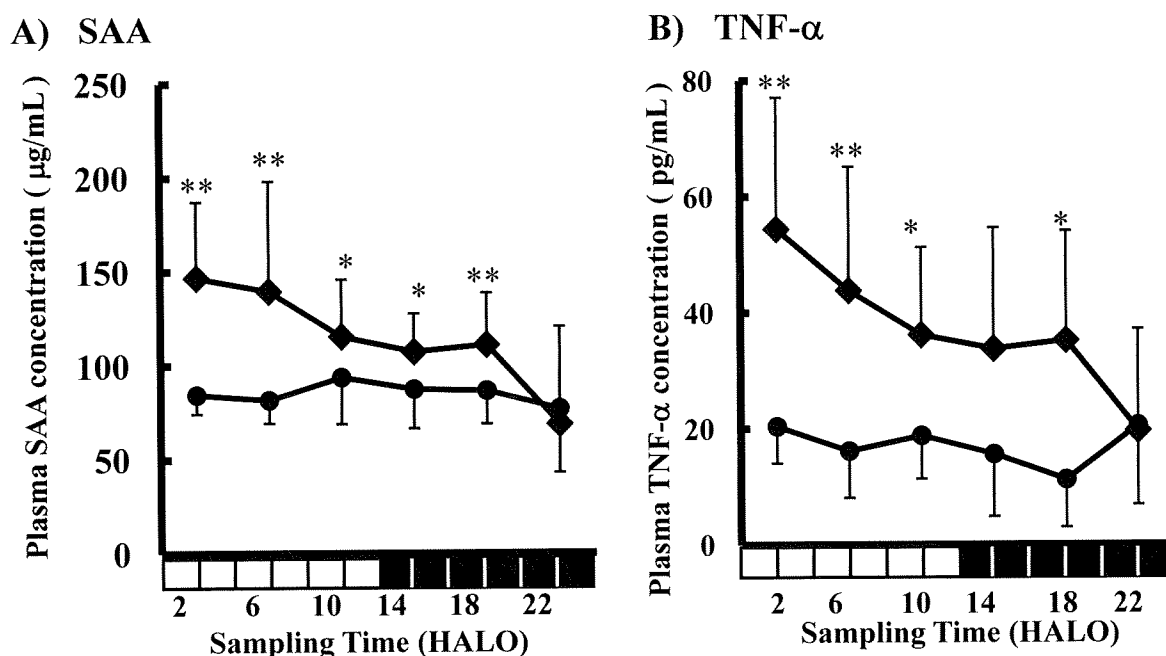


Figure 1. MRL/lpr マウスにおける RA 発症前後における血中 SAA および TNF- $\alpha$  濃度の概日リズム

● : 10 週齢 (RA 発症前) ◆ : 15 週齢 (RA 発症後)、\* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$  vs 10 週齢  
 HALO : 動物飼育室点灯後の時間 (hours after the light was turned on)