

#### IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
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	1333-1338	2009
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
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

## V. 研究成果の刊行物・別刷

## Therapeutic index of methotrexate depends on circadian cycling of tumour necrosis factor- $\alpha$ in collagen-induced arthritic rats and mice

Hideto To, Sadaharu Irie, Mari Tomonari, Yuko Watanabe, Takashi Kitahara and Hitoshi Sasaki

Department of Hospital Pharmacy, Nagasaki University Hospital, Nagasaki, Japan

### Abstract

**Objectives** Rheumatoid arthritis is an autoimmune disorder of unknown aetiology. Morning stiffness, a characteristic feature of rheumatoid arthritis, shows a 24-h rhythm. Noticing this rhythm, we hypothesized the presence of a similar rhythm for a rheumatoid arthritis indicator, in addition to dosing-time dependency of the anti-rheumatic effect of methotrexate in arthritis induced by collagen in rats and mice, which reflect the symptomatology of rheumatoid arthritis patients.

**Methods** To measure tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$  concentration, blood was taken at different times (2, 6, 10, 14, 18 or 22 h after the light was turned on (HALO)) in collagen-induced arthritic mice. Methotrexate was administered at two different dosing times based on these findings to estimate arthritis.

**Key findings** The arthritis score was significantly lower in the 22 HALO-treated group than in the control and 10 HALO-treated groups in collagen-induced arthritic rats and mice. Plasma TNF- $\alpha$  concentrations showed obvious 24-h rhythms, with higher levels at light phase and lower levels at dark phase after rheumatoid arthritis crisis. Arthritis was relieved after administration of methotrexate during the dark phase in synchronization with the 24-h rhythm.

**Conclusions** Our findings suggest that choosing an optimal dosing time associated with the 24-h cycling of TNF- $\alpha$  could lead to effective treatment of rheumatoid arthritis by methotrexate.

**Keywords** methotrexate; rheumatoid arthritis; 24-h rhythm; tumour necrosis factor- $\alpha$

### Introduction

Chronotherapy is defined as the administration of medication in accordance with biological rhythms in order to optimize therapeutic outcomes or control adverse effects, and it has been reported that many drugs, such as anti-tumour drugs, antidepressants and analgesics, show rhythm-dependent differences in their effects and pharmacokinetics.<sup>[1–3]</sup> These effects arise from the 24-h rhythms found in elements of cellular physiology such as the cell cycle, receptors, hormones and enzymes.<sup>[4–6]</sup> Moreover, it has been reported that 24-h rhythms exist for asthma attacks and synthesis of cholesterol, and chronotherapy has been actively applied to the medicinal treatment of asthma and hyperlipidaemia.<sup>[7,8]</sup>

Rheumatoid arthritis is an autoimmune disorder of unknown aetiology and is a chronic progressive disease that reduces the quality of life.<sup>[9,10]</sup> Although many requirements must be met to establish the diagnosis, morning stiffness is a well-known characteristic feature of rheumatoid arthritis.<sup>[11]</sup> Morning stiffness shows a 24-h rhythm with a peak in the early morning.<sup>[12–14]</sup> The appearance of cytokines in the joint tissue, synovial fluid and serum of rheumatoid arthritis patients suggests that they may play a role in local and systemic inflammatory responses. It was reported that cytokine and melatonin concentrations in the blood also showed 24-h rhythms, with peaks in the middle of the night to the early morning that mirror the timing of morning stiffness.<sup>[15,16]</sup> The 24-h rhythm of cytokines and melatonin may therefore participate in the 24-hour rhythm of rheumatoid arthritis symptoms.

Chronotherapy of rheumatoid arthritis has been studied using glucocorticoid and benoxaprofen.<sup>[17,18]</sup> In recent years, it was reported that chronotherapy using modified-release prednisone was effective against rheumatoid arthritis compared with standard immediate-release prednisone.<sup>[19]</sup> Thus, the clinical application of chronotherapy is expected. The dosing

Correspondence: Dr Hideto To, Department of Hospital Pharmacy, Nagasaki University Hospital, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki, 852-8501, Japan. E-mail: hide-to@umin.net

time dependency of more popular disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) has not been assessed, although they are administered to many rheumatoid arthritis patients. Methotrexate is a DMARD that is widely used in rheumatoid arthritis patients. Toxicity caused by methotrexate varies significantly depending on the dosing time.<sup>[20]</sup> Therefore, we considered that choosing an optimal dosing time associated with the 24-h rhythm of symptoms could lead to effective treatment of rheumatoid arthritis by methotrexate.

In this study, to detect 24-h rhythms for tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , we measured its serum concentrations at six different times in mice with arthritis induced by collagen (CIA mice). Methotrexate was administered at two different dosing times based on these findings to estimate arthritis. The dosing time dependency of methotrexate pharmacokinetics was determined after a single dose of methotrexate.

## Materials and Methods

### Animals

Lewis rats (7 weeks old) were purchased from Kyudo Co. Ltd (Kumamoto, Japan). DBA/1J mice (5 or 8 weeks old) were purchased from Charles River Japan, Inc. (Kanagawa, Japan). Rats and mice were housed under standardized light–dark cycle conditions (lights on 0700–1900 h) at a room temperature of  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  and humidity of  $60 \pm 10\%$  with free access to food and water. Experiments were performed after formal approval by the Institutional Ethical Committee for Research on Animals.

### Induction of collagen-induced arthritis

In rats, bovine type II collagen (CII; Collagen Research Center, Tokyo, Japan) and Freund's incomplete adjuvant (Difco, Kansas, Mo, USA) were mixed, and the emulsion was prepared at a concentration of 1 mg/ml of CII. The rats were intradermally sensitized at ten sites (100  $\mu\text{l}$  each site) at day 0 by administration of 1 mg CII. Seven and eleven days later, the rats received an intradermal booster injection of one-tenth of the volume used for sensitization.

In mice, CII isolated and purified from bovine articular cartilage was purchased from Chondrex, Inc. (Redmond, USA). Mice were intradermally immunized at day 0 by administration (100  $\mu\text{l}$ ) of 100  $\mu\text{g}$  CII in Freund's complete adjuvant (FCA; Chondrex, Inc.). A booster injection (100  $\mu\text{l}$ ) of 200  $\mu\text{g}$  CII in FCA was given intradermally on day 14.

### Preparation of methotrexate

Methotrexate, supplied by Wyeth K.K. (Tokyo, Japan), was dissolved in 7% sodium bicarbonate. Methotrexate was prepared at a suitable concentration and perorally administered by gavage at 2 ml/kg in rats and intraperitoneally administered at 0.01 ml/g in mice.

### Methotrexate dosing time dependent suppression of collagen-induced arthritis

In rats, methotrexate or sodium bicarbonate (7%) was administered one day after the first immunization. Methotrexate (0.1 mg/kg) was administered orally at 10 or 22 hours after the light was turned on (HALO) every day for 3 weeks

in CIA rats ( $n = 10$ , respectively). Sodium bicarbonate (7%) was administered in the control group ( $n = 9$ ). In mice, methotrexate or sodium bicarbonate (7%) was administered 21 days after the first immunization. Methotrexate (60 mg/kg) was injected intraperitoneally at 10 or 22 HALO every 7 days for 3 weeks in CIA mice ( $n = 9$  or 10). Sodium bicarbonate (7%) was administered in the control group ( $n = 14$ ).

In rats, arthritis score was recorded every day after the first immunization. We used a previously described arthritis scoring system<sup>[21]</sup> that evaluates individual joints and weights the arthritis severity by joint size, as follows: (a) for the interphalangeal joints, each of the 4 lateral digits in hind legs was scored as 0 or 1 (0 = no arthritis and 1 = arthritis present); and (b) for the ankle and midfoot joints, each was scored on a scale of 0–4 (0 = normal, 1 = minimal swelling, 2 = moderate swelling, 3 = severe swelling and 4 = severe swelling and non-weight bearing). The macroscopic score was expressed as a cumulative value for all paws, with a maximum possible score of 32.

Mice were examined visually for the appearance of arthritis in peripheral joints and disease severity was graded on a scale using the modified method of Nandakumar *et al.*<sup>[22]</sup> as specified below. Mice were considered to have arthritis when significant changes in redness or swelling (or both) were noted in the digits or in other parts of the paws. Each inflamed toe counted as 1 point. Arthritis was graded on a scale of 0, 1, 2, 3, 4 and 5 for each wrist/ankle: 0 = no changes; 1 = slight erythema of limb; 2 = minimal swelling; 3 = moderate swelling and erythema of limb; 4 = marked swelling and erythema of the limb; 5 = maximal swelling and redness of the limb and, later, ankylosis. The macroscopic score was expressed as a cumulative value for all paws, with a maximum possible score of 40.

### Methotrexate dosing-time dependent leucopenia

To investigate leucocyte counts, 8-week-old DBA/1J mice were divided into the 10 and 22 HALO-treated groups. Blood samples were drawn by orbital sinus collection 4 day after a single injection of methotrexate or sodium bicarbonate (7%) in the 4 groups ( $n = 4$ –6). Leucocyte counts were measured immediately after blood drawing.

### Twenty-four-hour rhythm in plasma TNF- $\alpha$ concentrations in collagen-induced arthritic mice

To measure TNF- $\alpha$  concentration, blood was taken at different times (2, 6, 10, 14, 18 or 22 HALO) in normal ( $n = 5$  or 6) or CIA ( $n = 8$  or 9) mice. Blood of CIA mice was drawn by orbital sinus collection on day 28 after immunization when arthritis showed in all mice. All blood samples were immediately centrifuged at 3000 rev/min for 15 min, after which the plasma was removed and frozen at  $-20^\circ\text{C}$  until assay. To measure TNF- $\alpha$  concentrations, multianalyte profiling was performed using the Luminex-100 system (Luminex Corporation, Austin, USA). Acquired fluorescence data were analysed by the MasterPlex QT software (Ver. 1.2; MiraiBio, Inc., San Francisco, USA). Plasma concentrations of TNF- $\alpha$  were determined by Mouse Inflammatory Cytokine

4-Plex (Biosource, San Jose, USA). All analyses were performed according to the manufacturer's protocols.

### Chronopharmacokinetics of methotrexate

To investigate the pharmacokinetics, 8 week-old DBA/1J mice were divided into the 10 and 22 HALO-treated groups ( $n = 5$  or 6). Blood samples were drawn by orbital sinus collection at 0.5, 1, 2, 4, 6 and 8 h after methotrexate (60 mg/kg) was intraperitoneally administered. The samples were immediately centrifuged at 3000 rev/min for 15 min. Plasma was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. Methotrexate concentrations in plasma were quantified by Abbott TDx II methotrexate assays.

### Statistical analysis

The data were recorded as the mean  $\pm$  standard deviation (SD), excluding the arthritis score. Arthritis score was shown as a mean and box plot. For each box plot, the median value is represented by the central horizontal line; the upper and lower quartiles (75 and 25 percentiles) are represented by the upper and lower borders of the box; the upper and lower extents of the vertical lines extending from the box represent the value of 90 and 10 percentiles. Intra-group post-hoc testing was done using the Mann-Whitney *U*-test with Bonferroni correction after Kruskal-Wallis test. Differences in leucocyte counts were compared by two-way analysis of variance. Differences in methotrexate concentrations between two groups were analysed by Student's *t*-test. Statistical moment analysis was performed by calculating pharmacokinetic parameters such as area under the plasma-time concentration curve (AUC) and mean residence time (MRT). We defined that the 24-h rhythmicity was statistically significant when both Cosinor analysis and one-way analysis of variance were significant.  $P < 0.05$  was considered to be significant.

## Results

### Influence of dosing time on arthritis score during methotrexate administration in collagen-induced arthritic rats and mice

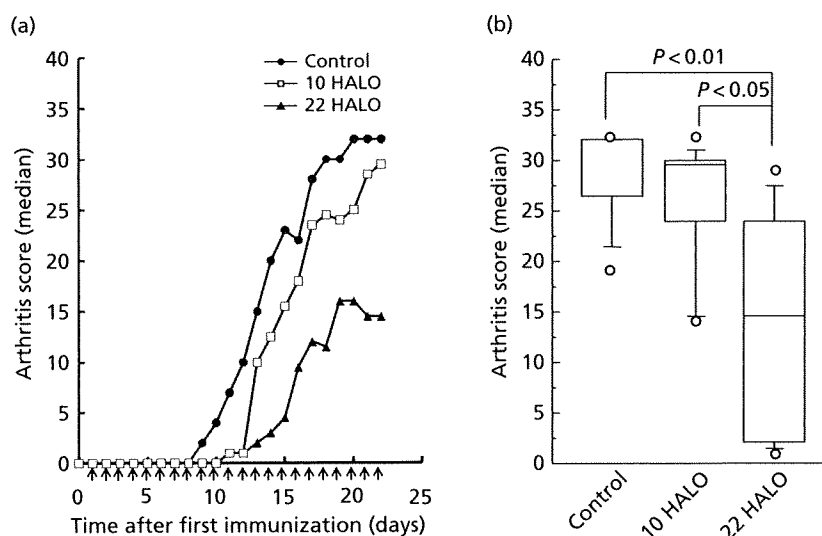
In rats, arthritis score was significantly lower in the 22 HALO-treated group than the control and 10 HALO-treated groups on day 22 ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively; Figure 1). On day 42, the 22 HALO group demonstrated significantly inhibited increase in arthritis score compared with the control and 10 HALO groups in mice ( $P < 0.01$ , respectively; Figure 2). The 10 HALO groups were not different from the control groups for the entire duration of observation in rats and mice.

### Influence of dosing time on leucocyte counts after methotrexate administration in mice

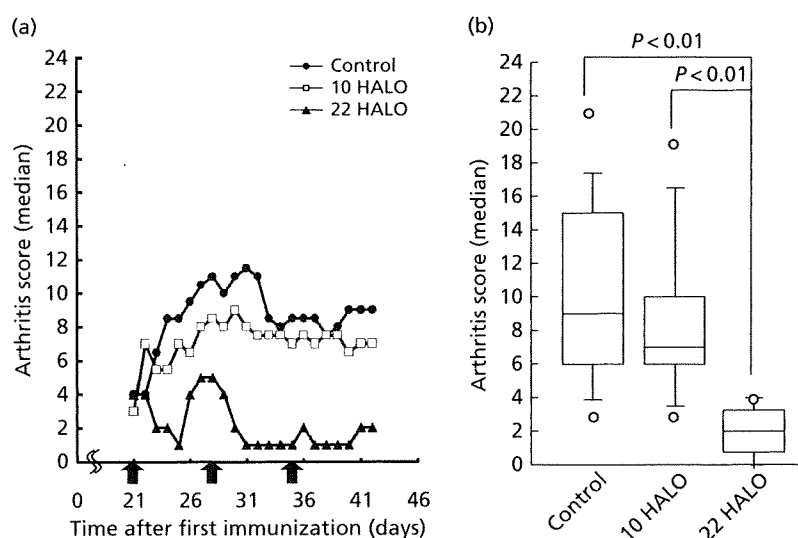
There was no significant difference in leucocyte counts among the control and drug-treated groups (Figure 3).

### Twenty-four-hour rhythm of plasma TNF- $\alpha$ concentrations in normal and collagen-induced arthritic mice

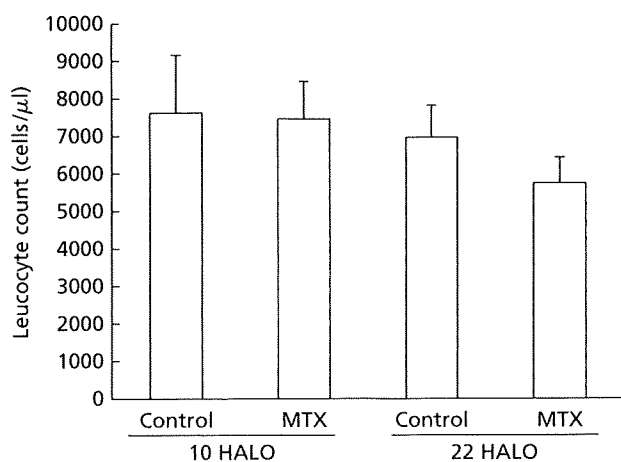
The plasma TNF- $\alpha$  concentrations in normal mice showed a significant 24-h rhythm with higher levels at the light phase and lower levels at the dark phase ( $P < 0.01$ , Figure 4). After immunization, TNF- $\alpha$  levels in CIA mice were 3.03- to 5.39-fold higher than those in normal mice at all sampling times. A significant 24-h rhythm was demonstrated for TNF- $\alpha$  concentrations in CIA mice ( $P < 0.01$ , Figure 4), and the levels were higher at the light phase and lower at the dark phase as observed in normal mice.



**Figure 1** Influence of the dosing time of methotrexate on arthritis score in collagen-induced arthritic rats. Methotrexate (0.1 mg/kg) was administered orally at 10 or 22 hours after lights turned on (HALO) every day for three weeks in collagen-induced arthritic (CIA) rats ( $n = 10$ ). Sodium bicarbonate (7%) was administered to the control group ( $n = 9$ ). Methotrexate was administered one day after the first immunization. Arrows show methotrexate or sodium bicarbonate administration. (a) Each value represents the median. (b) The score on day 22 is indicated by box plots. On day 22, the 22 HALO-treated group showed a significantly decreased arthritis score when compared with the control and 10 HALO-groups ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively, Mann-Whitney *U*-test with Bonferroni correction).



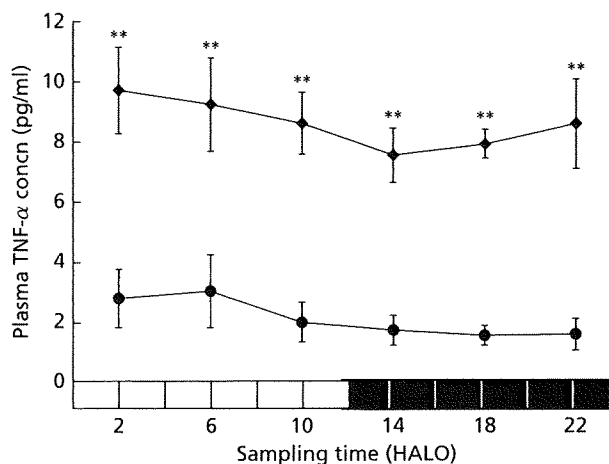
**Figure 2** Influence of the dosing time of methotrexate on arthritis score in collagen-induced arthritic mice. Methotrexate (60 mg/kg) was administered at 10 or 22 hours after lights turned on (HALO) on days 21, 28 and 35 after the first immunization ( $n = 9$  or 10). Sodium bicarbonate (7%) was administered to the control group ( $n = 14$ ). Arrows show methotrexate or sodium bicarbonate administration. (a) Each value represents the median. (b) The score on day 42 is indicated by box plots. On day 42, the arthritis score was significantly lower in the 22 HALO group than the control and 10 HALO groups ( $P < 0.01$ , respectively, Mann-Whitney  $U$ -test with Bonferroni correction).



**Figure 3** Influence of dosing schedule on myelosuppression after administration of methotrexate in mice. Methotrexate (MTX; 60 mg/kg, i.p.) was administered to the experimental group ( $n = 4$ –6); sodium bicarbonate (7%) was administered to the control group ( $n = 5$  or 6). HALO, hours after lights turned on. Each value is the mean  $\pm$  SD.

### Influence of dosing time on pharmacokinetics after methotrexate administration in mice

Plasma methotrexate concentrations at 0.5 and 2 h after methotrexate injection in the 10 HALO group were significantly higher than in the 22 HALO group (0.5 h,  $P < 0.05$ ; 2 h,  $P < 0.01$ ) (Table 1). On the other hand, the 22 HALO group showed significantly higher plasma methotrexate levels than the 10 HALO group at 4, 6 and 8 h (4 h,  $P < 0.01$ ; 6 h,  $P < 0.01$ ; 8 h,  $P < 0.05$ ) (Table 1).



**Figure 4** Twenty-four-hour rhythm of plasma tumour necrosis factor- $\alpha$  levels in normal and collagen-induced arthritic mice. Each value represents the mean  $\pm$  SD of normal ( $n = 5$  or 6) or CIA ( $n = 9$ ) mice. HALO, hours after lights turned on. The plasma tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$  concentrations showed significant 24-h rhythms with higher levels at light phase and lower levels at dark phase in normal and collagen-induced arthritic (CIA) mice (normal:  $F$  from analysis of variance = 4.08,  $P < 0.01$ ;  $P$  from cosinor  $< 0.01$ ; day 28:  $F$  from analysis of variance = 3.93,  $P < 0.01$ ;  $P$  from cosinor  $< 0.01$ ). \*\* $P < 0.01$  compared with the normal group.

### Discussion

Collagen-induced arthritis (CIA) represents a true autoimmune reaction against major joint components with association of class II major histocompatibility complex genes and pannus formation. The CIA model is similar to rheumatoid arthritis in terms of pathology, immunology and genetics.<sup>[23,24]</sup> Using the

**Table 1** Pharmacokinetic data after methotrexate (60 mg/kg, i.p.) administration to mice at 10 or 22 hours after lights turned on

	Methotrexate concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )						AUC <sub>∞</sub> ( $\mu\text{g h/ml}$ )	MRT <sub>∞</sub> (h)
	0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h		
10 HALO	23.1 ± 4.07	8.64 ± 1.47	1.67 ± 0.52	0.037 ± 0.009	0.009 ± 0.006	0.020 ± 0.015	35.2	0.544
22 HALO	17.1 ± 1.92	6.37 ± 3.47	0.73 ± 0.37	0.113 ± 0.017	0.072 ± 0.023	0.039 ± 0.013	27.6	0.547
P value	< 0.05	NS	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.05		

Each value is the mean ± S.D. of 5 or 6 mice. AUC, area under plasma-time concentration curve; HALO, hours after lights turned on; MRT, mean residence time; NS, not statistically significant.

CIA model, we estimated the preventive effect and therapeutic effect against the development of arthritis when methotrexate was administered for 21 days before or after the onset of arthritis. When CIA rats received 0.1 mg/kg methotrexate orally at 10 or 22 HALO, starting on day 1 after the first immunization, the arthritis score in the 22 HALO group showed significantly lower values compared with the control and 10 HALO groups. Inhibition of the increase in arthritis depended on dosing time in the preventive treatment with methotrexate. In the clinical situation, it is difficult to perform preventive treatment for rheumatoid arthritis although early diagnosis has been advancing year after year. Thus, we examined whether the dosing time dependency of therapeutic effect was shown in the CIA model after the onset of arthritis. The effect of methotrexate in CIA rats after the onset of arthritis was reported by Cuzzocrea *et al.*<sup>[25]</sup> We studied the anti-rheumatic effect after the onset of arthritis according to this report, using clinical doses. However, there were no significant differences between the control and methotrexate-treated groups (data not shown). Because the arthritis score in CIA rats increased rapidly after the last sensitization, low-dose methotrexate using clinical doses may not show an anti-rheumatic effect. On the other hand, the arthritis score in CIA mice gradually increased compared with CIA rats after the last sensitization. In a preliminary study, we had clarified that the score in the methotrexate (60 mg/kg) group treated at 22 HALO was lower than that in the control group in CIA mice after the onset of arthritis. Therefore, therapeutic effect was estimated in CIA mice. The 22 HALO-treated group showed a significantly reduced arthritis score when compared with the control and 10 HALO-treated groups, and the arthritis score decreased to almost normal levels in many 22 HALO mice despite lack of score reduction for the 10 HALO group. Leucopenia showed no significant dosing time dependence for methotrexate (60 mg/kg) injection in mice. In a past study, there were adverse effects when 400 mg/kg of methotrexate was administered in mice.<sup>[20]</sup> However, adverse effects were not observed in this study because only 60 mg/kg of methotrexate was administered in mice. These findings suggest that both the preventive effect and therapeutic effect are evidently high in groups treated with methotrexate at 22 HALO compared with those treated at 10 HALO.

To clarify the mechanism underlying dosing time dependency, we investigated the influence of dosing time on the pharmacokinetics of methotrexate. Methotrexate is excreted largely in urine. Both renal blood flow and glomerular filtration rate have been found to follow a 24-h rhythm, with a peak during the active period of animals.<sup>[26,27]</sup> The AUC in the 10 HALO group, which showed no decrease in arthritis score,

was 1.28-fold higher than that in the 22 HALO group, which had a significantly reduced score. The AUC may be high in the 10 HALO group compared with the 22 HALO group since methotrexate was administered during the inactive period. In this study, a relationship was not shown between the concentration of methotrexate and its efficacy. Thus, the 24-h rhythm in the sensitivity of the body seems to play an important role in the daily variation of anti-rheumatic effect rather than pharmacokinetics of methotrexate.

In recent years, it has been stated that cytokines are an important factor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis,<sup>[28]</sup> and that levels of pro-inflammatory cytokines increase in rheumatoid arthritis patients. Blood cytokines show 24-h rhythms in rheumatoid arthritis patients,<sup>[15,16]</sup> and the rhythms correspond to morning stiffness. We considered that rheumatoid arthritis therapy that is associated with cytokine 24-h rhythms might be more effective than the therapy used commonly in clinical practice. It was previously reported that CIA mice showed an augmentation of cytokine levels similar to that seen in rheumatoid arthritis patients.<sup>[29,30]</sup> Thus, to clarify whether there is a 24-h rhythm for the plasma concentration of TNF- $\alpha$ , an important causal factor of rheumatoid arthritis, we measured its concentration in normal and CIA mice. In normal mice, the plasma TNF- $\alpha$  concentration showed a significant 24-h rhythm with higher levels during the light phase and lower levels in the dark phase. Although the TNF- $\alpha$  concentration increased after immunization, an obvious 24-h rhythm with a peak at light phase and a trough at dark phase was maintained in CIA mice. The development of arthritis was significantly inhibited in groups treated with methotrexate at 22HALO when the plasma TNF- $\alpha$  level began to increase. MRL/lpr mice are another rheumatoid arthritis model known to develop autoimmune disorders sharing similarities with human rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.<sup>[31,32]</sup> Thus, we examined the 24-h rhythm of TNF- $\alpha$  and the dosing time dependency of methotrexate effects in MRL/lpr mice. In these results, the daily variation of arthritis inhibition caused by methotrexate corresponded to the 24-h rhythm of TNF- $\alpha$  levels in the same manner as in the CIA model (data not shown). From these results, it is thought that methotrexate has a significant dosing-time dependent anti-inflammatory action, and this effect may be due to the 24-h rhythm of TNF- $\alpha$  levels rather than pharmacokinetics.

## Conclusions

This study showed that daily variation occurred in the plasma TNF- $\alpha$  concentration in the CIA model after rheumatoid



arthritis developed, and that arthritis was relieved after administration of methotrexate at specific times in synchronization with the 24-h rhythm of TNF- $\alpha$ . Choosing an optimal dosing time associated with the 24-h rhythm of TNF- $\alpha$  is therefore expected to lead to effective therapy of rheumatoid arthritis with methotrexate. However, the dose and dosing schedule of methotrexate in the rheumatoid arthritis model animal did not always correspond to that in the rheumatoid arthritis patient because a high dose of methotrexate was administered in the model animal to produce sufficient anti-rheumatic effect in this study. Therefore, we are studying the usefulness of chronotherapy of methotrexate in Japanese rheumatoid arthritis patients.

## Declarations

### Conflict of interest

The Author(s) declare(s) that they have no conflicts of interest to disclose.

### Funding

This study was supported by a Grant-in-Aid for Young Scientists (B) (H.T., 17790126) and Grant-in-Aid for Young Scientists (Start-up) (S.I., 19890161) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology Japan. This project was partially supported by a grant from the Takeda Science Foundation and Japan Research Foundation for Clinical Pharmacology, Grant-in-aid for Scientific Research from Nagasaki University, Japan (H.T.).

### Acknowledgements

We are indebted to Wyeth K.K. (Tokyo, Japan) for supplying the methotrexate used in this study.

## References

1. Tabuchi M *et al.* Therapeutic index by combination of adriamycin and docetaxel depends on dosing time in mice. *Cancer Res* 2005; 65: 8448–8454.
2. Ushijima K *et al.* Chronopharmacological study of antidepressants in forced swimming test of mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 764–770.
3. Iurisci I *et al.* Improved tumor control through circadian clock induction by Seliciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cancer Res* 2006; 66: 10720–10728.
4. Tampellini M *et al.* Docetaxel chronopharmacology in mice. *Cancer Res* 1998; 58: 3896–3904.
5. Matsunaga N *et al.* Influence of feeding schedule on 24-h rhythm of hepatotoxicity induced by acetaminophen in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311: 594–600.
6. Koyanagi S *et al.* Glucocorticoid regulation of 24-hour oscillation in interferon receptor gene expression in mouse liver. *Endocrinology* 2006; 147: 5034–5040.
7. Saito Y *et al.* Comparison between morning and evening doses of simvastatin in hyperlipidemic subjects. A double-blind comparative study. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 816–826.
8. D'Alonzo GE *et al.* Bambuterol in the treatment of asthma. A placebo-controlled comparison of once-daily morning vs evening administration. *Chest* 1995; 107: 406–412.
9. Harris ED. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 1990; 322: 1277–1289.
10. Gabriel SE. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2001; 27: 269–281.
11. Arnett FC *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315–324.
12. Kowanko IC *et al.* Domiciliary self-measurement in the rheumatoid arthritis and the demonstration of circadian rhythmicity. *Ann Rheum Dis* 1982; 41: 453–455.
13. Harkness JA *et al.* Circadian variation in disease activity in rheumatoid arthritis. *Br Med J* 1982; 284: 551–554.
14. Bellamy N *et al.* Circadian rhythm in pain, stiffness, and manual dexterity in rheumatoid arthritis: relation between discomfort and disability. *Ann Rheum Dis* 1991; 50: 243–248.
15. Arvidson NG *et al.* The timing of glucocorticoid administration in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1997; 56: 27–31.
16. Sulli A *et al.* Melatonin serum levels in rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci* 2002; 966: 276–283.
17. Lightfoot RW. Benoxaprofen administered once a day: determination of optimum dosage schedule. *J Rheum* 1980; 6: 61–67.
18. Arvidson NG *et al.* Circadian rhythm of serum interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 521–524.
19. Buttgereit F *et al.* Efficacy of modified-release versus standard prednisone to reduce duration of morning stiffness of the joints in rheumatoid arthritis (CAPRA-1): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2008; 371: 205–214.
20. Ohdo S *et al.* Chronotoxicity of methotrexate in mice and its relation to circadian rhythm of DNA synthesis and pharmacokinetics. *Jpn J Pharmacol* 1997; 75: 283–290.
21. Meng HC *et al.* Identification of two novel female-specific non-major histocompatibility complex loci regulating collagen-induced arthritis severity and chronicity, and evidence of epistasis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2695–2705.
22. Nandakumar KS *et al.* Collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice: description of the disease and the influence of age, sex and genes. *Am J Pathol* 2003; 163: 1827–1837.
23. Wooley PH *et al.* Type II collagen-induced arthritis in mice. II. Passive transfer and suppression by intravenous injection of anti-type II collagen antibody or free native type II collagen. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 1010–1017.
24. Holmdahl R *et al.* Collagen induced arthritis as an experimental model for rheumatoid arthritis. Immunogenetics, pathogenesis and autoimmunity. *APMIS* 1989; 97: 575–584.
25. Cuzzocrea S *et al.* Synergistic interaction between methotrexate and a superoxide dismutase mimetic: pharmacologic and potential clinical significance. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3755–3760.
26. Labrecque G *et al.* 24-hour variations in the distribution of labeled microspheres to the intestine, liver and kidneys. *Annu Rev Chronopharmacol* 1988; 5: 445–448.
27. Cal JC *et al.* Circadian and circannual changes in nephrotoxic effects of heavy metals and antibiotics. *Annu Rev Chronopharmacol* 1986; 2: 143–176.
28. Chu CQ *et al.* Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 1125–1132.
29. Marinova-Mutafchieva L *et al.* Dynamics of proinflammatory cytokine expression in the joints of mice with collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol* 1997; 107: 507–512.
30. Mussener A *et al.* Cytokine production in synovial tissue of mice with collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol* 1997; 107: 485–493.
31. Abe C *et al.* Spontaneous polyarthritis in MRL/l mice. *Ryumachi* 1980; 20: 233–239.
32. Koopman WJ, Gay S. The MRL-lpr/lpr mouse. A model for the study of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1988; 75: 284–289.

## 抗リウマチ薬の時間治療への展望

藤 秀人<sup>□</sup>

長崎大学病院薬剤部

早朝に現れる四肢の関節痛である朝のこわばりは、関節リウマチ患者（RA）に発現するよく知られた概日リズムである。近年の研究で、この概日リズムに沿って血中の炎症性サイトカインが早朝に増加することが報告された。また、炎症性サイトカインの概日リズム形成には、メラトニンやグルココルチコイドの周期性や分泌量などのホルモンバランスの変化が深く関与していると考えられている。一方、RAの薬物療法は現在大きな転換期にあり、時間治療の有用性を評価する絶好の機会が訪れている。近年、グルココルチコイドの徐放性製剤が開発され、RA患者の朝のこわばりを顕著に抑制できることが報告された。また、他の抗リウマチ薬においても基礎研究や臨床研究が次々と行われ、多くの薬物で時間治療の有用性が示されている。本稿では、生体リズムをベースとしたRA病態の解明や抗リウマチ薬の時間治療について概説する。

## 1. はじめに

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 [1-3]。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・骨破壊を起こ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ってきたが、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 [4-6]、american college of rheumatology（ACR）改善率 [7]や関節炎抑制効果 [3-10]、生活改善効果 [11]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、従来の抗リウマチ薬と比較して高い有効性を示している [12, 13]。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。

本稿では、RA患者に認められる概日リズムとその機序及びこれまでに報告されているRAを対象とした時間薬理・時間治療について紹介し、さらに当

研究室にて検討している抗リウマチ薬の時間治療について概説する。

## 2. 関節リウマチと概日リズム

RA患者には他の疾患の患者と異なり、特徴的な症状として朝のこわばりが存在する。朝のこわばりは、深夜から早朝にかけて関節の痛みなどとともに現れ、日中にはほとんど消失する症状であり[14-16]、多くのRA患者に発現する。これらの原因の詳細は十分に明らかになっていないものの、炎症反応が一部関与していると考えられている。RA患者の多くで認められる炎症反応では、主に血中のC-reactive protein (CRP) 濃度や血沈 (ESR) が測定される。

1987年HeroldらはRA患者を対象にCRPを測定し、関節の痛みやこわばりに沿って早朝に高値、夕方に低値を示す概日リズムがCRPで認められることを明らかにした [17]。RAにおける炎症反応や病態形成には、TNF- $\alpha$ やIL-6などの炎症性サイトカインが中心的な役割を有している。また、これらの炎症性サイトカインは、活性化した単球やマクロファージから分泌され、肝細胞にてCRPを産生することが知られている。したがって、CRP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可能性が考えられる。

RA患者のIL-6やTNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインの血中濃度は、早朝に最高値を示すという概日リズムが認められる [18-21]。また、健康人や自己免疫疾患である結合組織症の患者ではIL-6の概日リズムは認められないため、このような概日リズムはRA患者特有の現象であると考えられる [18, 19]。図

1には、自然発症型RAモデル動物であるMRL/lprマウスのRA発症後における血中の血清アミロイド (SAA) 濃度及びTNF- $\alpha$ 濃度を示した。SAAは、CRPと同様に急性期の炎症反応を評価する指標でIL-1やIL-6、TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインによって惹起される。RA発症後の血漿中SAA濃度及びTNF- $\alpha$ 濃度はともに、9:00に最高値 (SAA: 146.6 $\mu$ g/mL、TNF- $\alpha$ : 54.4pg/mL (平均値))、5:00に最低値 (SAA: 68.7 $\mu$ g/mL、TNF- $\alpha$ : 19.7pg/mL (平均値))を示す明瞭な概日リズムを示した。一方、RA発症前のMRL/lprマウスではSAA及びTNF- $\alpha$ 濃度に明瞭な概日リズムは認められず、全サンプリング時刻の平均的なSAAおよびTNF- $\alpha$ 濃度は85 $\mu$ g/mLおよび17.3pg/mLとRA発症時の最小濃度付近であった。また、RA診断の一つとして用いられるIgG型リウマチ因子は、RA未発症群と比較してRA発症群でいずれのサンプリング時刻でも有意に増加するが、RA発症群で明瞭な概日リズムは認められなかった。

これらの結果より、RA未発症時は血中の炎症指標や炎症性サイトカイン濃度に概日リズムは認められず、RAを発症することでこれらに明瞭な概日リズムは発現する。したがって、RAの特徴である関節の痛みや朝のこわばりなどの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密接に関連していると考えられる。また、昼行性であるRA患者と夜行性であるRAモデル動物ではともに早朝にピークとなる概日リズムが炎症性サイトカインで認められた。グルココルチコイドのように多くの生体成分の概日リズムは、活動リズムが異なるヒトと

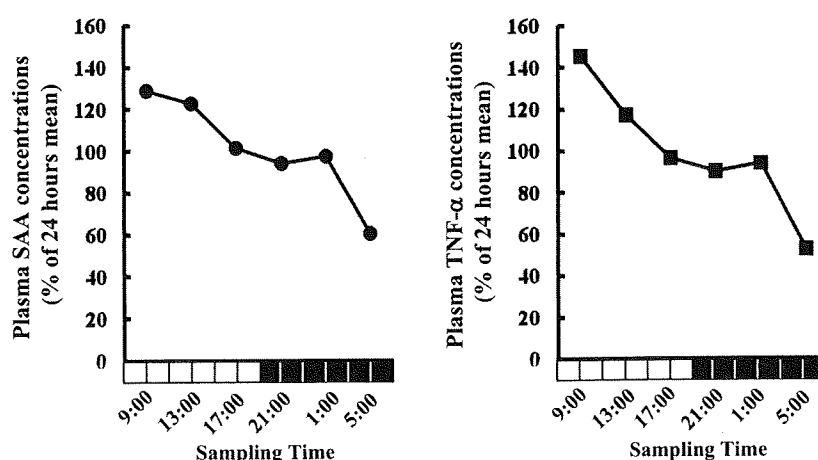


図1 MRL/lprマウスにおけるRA発症後の血漿中SAA及びTNF- $\alpha$ 濃度の概日リズム  
データは全データの24時間平均に対する個々のデータのパーセンテージを算出し、各サンプル時刻の平均値を示した (n=6-16)。

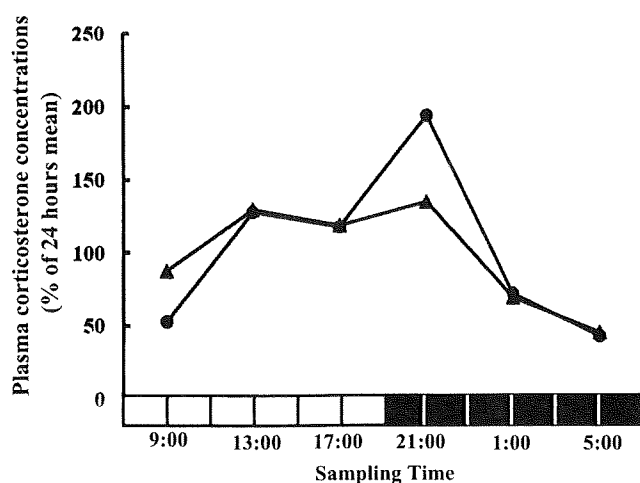


図2 MRL/lprマウスにおけるRA発症前・後の血漿中コルチコステロン濃度の概日リズム  
データは全データの24時間平均に対する個々のデータのパーセンテージを算出し、各サンプル時刻の平均値を示した (n=6-7)。●はRA発症前、▲はRA発症後である。

げっ歯類で逆位相になる。現在、複数のRAモデル動物を用いて炎症指標や炎症性サイトカイン濃度の概日リズムを評価しているが、いずれも早朝にピークとなる周期を有している。そのため、活動リズムに関与せず、ヒトとげっ歯類で共通した位相を有する生体成分がRAにおける炎症などの概日リズム形成に深く関与していると考えられる。そこで、現在当研究室では、炎症性サイトカインなどの概日リズム形成に係わる因子の探索を実施している。

### 3. 関節リウマチにおける炎症性サイトカインの概日リズム形成メカニズム

RA発症時に形成される炎症性サイトカインの概日リズムがどのような機序によって発現するのか十分な解明はなされていない。Cutoloらの仮説では、コルチゾールとメラトニンの分泌のバランスが炎症性サイトカインの概日リズムの形成に深く関与していると提唱している [21, 22]。メラトニンは、Tリンパ球や単球、ナチュラルキラー細胞などの活性化に関与しており [23]、実験的にメラトニンの合成や分泌を抑制したとき免疫抑制状態となる [24, 25]。また、メラトニンは炎症性サイトカインの生成を増大させる [26, 27]。一方、コルチゾールなどのグルココルチコイドは、IL-1やIL-6、TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインの発現を抑制することが知られている [28]。大変興味深いことに、ヒトにおけるメラトニンの血中濃度は3:00をピークとする概日リズムを示し [29]、コルチゾールの血中濃度は8:00をピークとする概日リズムを示す [30]。RA患者の炎

症性サイトカインは、早朝にピークとなる概日リズムを有し、メラトニンの増加に伴い血中濃度は増大し、コルチゾールの増加によって減少する [21]。このように、両ホルモンの分泌の概日リズムに影響を受け炎症性サイトカインは概日リズムを形成している可能性がある。

図2には、MRL/lprマウスの血漿中コルチコステロン濃度の概日リズムを示した。RA発症前の血漿中コルチコステロン濃度は、21:00に最高値 (15.6ng/mL (平均値))、5:00に最低値 (3.44ng/mL (平均値)) を示す明瞭な概日リズムを示した。夜行性であるマウスは、昼行性のヒトと異なりグルココルチコイドの分泌の概日リズムの位相は約12時間シフトし、明期後半から暗期前半にかけてその分泌はピークを迎える [31]。一方、メラトニンは活動リズムの違いによらず、マウスにおいても深夜にピークとなる概日リズムを有している [32]。図1に示したようにマウスにおいても、血漿中TNF- $\alpha$ 濃度はメラトニンの増加に伴い早朝に最高値となり、コルチコステロンの増加に伴い明期後半から暗期にかけて減少している。したがって、ヒト及び実験動物で現れる炎症性サイトカインの類似した概日リズムには、メラトニンの寄与が大きいと考えられる。

また、RA患者ではメラトニンとコルチゾールの分泌バランスが、健常人と異なることが報告されている。RA患者では、健常人と比較し血中メラトニン濃度のピーク時刻は約2時間早まり [33]、朝にピークを示すコルチゾールの濃度は減少する [34]。図2に示したRAモデルマウスにおいても、ピーク

値である21:00のコルチコステロン濃度は、RA発症前 ( $15.6 \pm 5.6 \text{ ng/mL}$  (平均値  $\pm$  標準偏差)) と比較しRA発症後 ( $9.0 \pm 3.76 \text{ ng/mL}$  (平均値  $\pm$  標準偏差)) で有意に減少した。RA患者において、どのようなメカニズムがこれらホルモンの分泌の変化に影響を与えているのか明確なエビデンスはいまだ得られていない。しかし、炎症性サイトカインの産生に寄与するメラトニン分泌の増加やグルココルチコイド分泌の抑制が、RA患者における早朝にピークを示す炎症性サイトカインの概日リズム形成には大きな要因となっていると考えられる。

#### 4. 関節リウマチの時間薬理・時間治療

冒頭でも述べたように、RAの薬物治療には炎症や痛みを抑制する目的でNSAIDや副腎皮質ホルモン薬を、免疫異常に作用し病気の進行自体を抑える目的でDMARDや生物学的製剤を用いる。現在では、早期RA診断法の開発やDMARDや生物学的製剤による積極的な治療により、非常に高い治療成績が得られるようになってきた。RAの時間治療の歴史は古く、1980年前半には当時主流のRA治療薬であるNSAIDや副腎皮質ホルモン薬を用いて研究が実施されている [35, 36]。例えば、痛み止めとして用いられるインドメタシンを8:00, 12:00, 20:00のいずれかに1日1回75mg投薬したところ、20:00投薬群で副作用発現が最も低いことが明らかとなった [37]。また、Arvidsonらは、合成副腎皮質ホルモン薬であるプレドニゾロンを2:00か7:30に1日1回投薬し、時間治療前後で治療成績を評価した。その結果、2:00投薬群は、7:30投薬群と比較して朝のこわばりなどを顕著に軽減できることが明らかとなった [38]。これらの研究成果は、RAにおける痛みや炎症の抑制に時間治療を応用することで、より高い安全性や有効性が得られることを示している。しかし、残念なことに現在のRAの薬物治療において時間治療が広く汎用されるには至っていない。その理由としては、有効性は認められるものの、プレドニゾロンを2:00に服用することが、臨床的には非現実的であったことなどが考えられる。

2008年にButtgereitらによってRAに対する時間治療の新たな取り組みがLancetに報告された [39]。本試験は合成副腎皮質ホルモン薬であるプレドニゾンの徐放性製剤による試みであり、深夜服用が回避され寝る前22:00の服用が新製剤によって可能となった。従来の薬剤を用い朝投薬されるグループと新徐放性製剤を用いて寝る前に投薬されるグループ

の2群に分けられ、二重盲検比較試験が実施された。その結果、新徐放性製剤群が既存薬剤群と比較して有意に朝のこわばりを軽減できることが明らかとなった。副腎皮質ホルモン薬の夜間投薬による不眠などの副作用の頻度がどの程度になるのか、今後の長期投与試験の結果を待たなければならないが、本研究によってRAにおける時間治療の波及に大きな一石が投げられた。

RAによる炎症や痛みの抑制のための薬物の研究は先述のような報告があり、今後の研究の発展に期待したい。現在、大きな転換期を向かえているRAの薬物療法は、主に痛みや炎症を緩和することから免疫異常の改善に目的がシフトしている。しかし、この免疫異常に用いられるDMARDや生物学的製剤を対象とした時間治療に関する研究報告は皆無に等しい。そこで当研究室では、複数のDMARDを用いてRAモデル動物を対象に時間薬理的検討を行っている。また、得られた基礎研究の成果を基にMTXではRA患者を対象に時間治療の有用性を検証している。

図1に示したように、自然発症型RAモデルMRL/lprマウスの炎症指標や炎症性サイトカイン濃度は朝にピークとなる。この周期は、複数のRAモデル動物において共通であった。そこで、II型コラーゲンを感作したラット (CIAラット) およびMRL/lprマウスを対象にMTXを投薬し、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。CIAラットにMTX (0.1mg/kg) を5:00または17:00のいずれかの時刻に連日経口投与した。投薬開始後21日目の関節炎スコアは、control群および17:00投薬群と比較し5:00投薬群で有意に軽減できることが明らかとなった ( $P < 0.01$ , 図3) [40]。また、MRL/lprマウスにMTX (10mg/kg) を1:00または13:00のいずれかの時刻に3日間連日腹腔内投与した後4日間休薬した。投薬開始後14日目の血漿中SAA濃度を測定した (図3)。1:00投薬群のSAA濃度は、control群および13:00投薬群と比較し有意に低値を示した ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。以上より、MTXの投薬時刻の違いによって炎症や関節炎に差異が現れることが明らかとなった。そして、治療効果が高かった時刻は、いずれのRAモデル動物においても1日の中でTNF- $\alpha$ が増加し始める時間帯にMTXを投薬した時間帯であった。

DMARDである他の薬物としてタクロリムスとミゾリピンを選択し、これらの薬物においても投薬時刻の違いによる抗リウマチ効果が認められるか否か

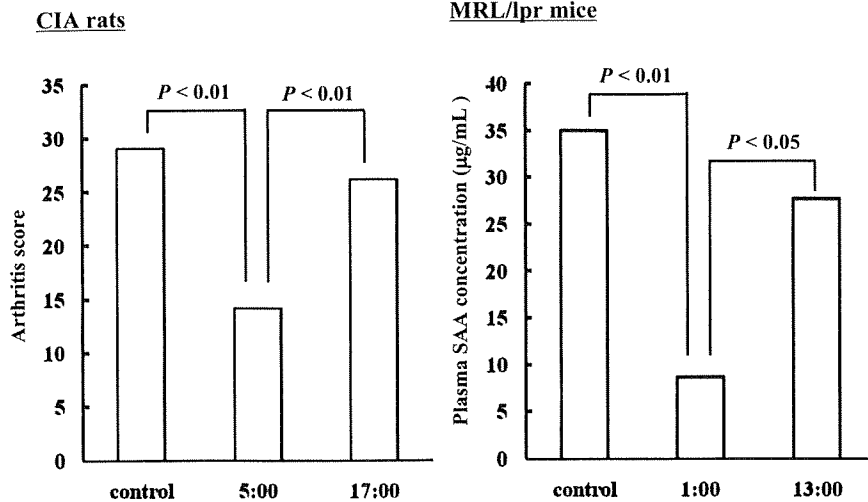


図3 CIAラット及びMRL/lprマウスを対象としたMTXの投薬時刻の違いによる抗リウマチ効果への影響  
データは平均値を示した (n=9-10: CIAラット, n=8-18: MRL/lprマウス)。

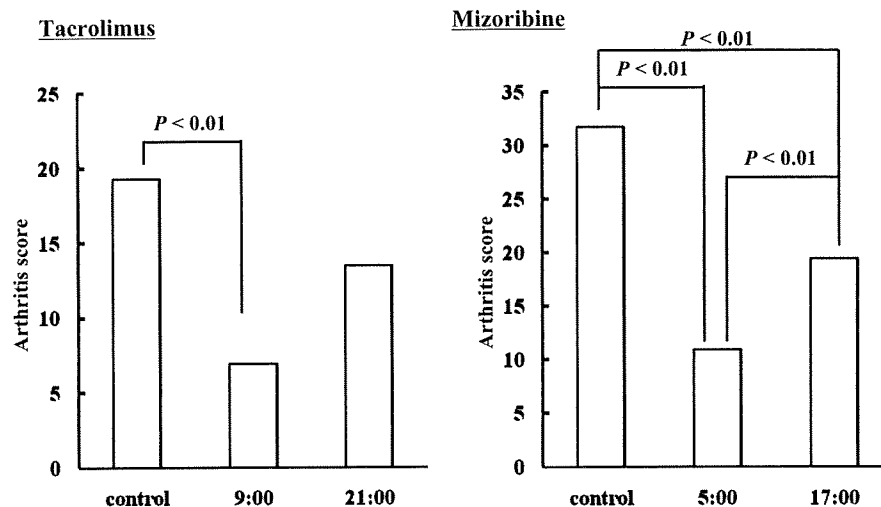


図4 タクロリムスおよびミゾリビンの投薬時刻の違いによる抗リウマチ効果への影響  
データは平均値を示した (n=14-24: タクロリムス, n=12: ミゾリビン)。

評価した。CIAマウスを対象にタクロリムス (4 mg/kg) を 9:00 または 21:00 に初回感作後 17 日目 (day 17) より 3 週間連日腹腔内投与し、day 38 における関節炎スコアを評価した。関節炎スコアの平均値は、control 群で 19.3、9:00 投薬群で 6.86、21:00 投薬群で 13.4 であり、9:00 投薬群は control 群と比較し、有意な関節炎スコア抑制効果を示した ( $P < 0.01$ , 図 4)。また、9:00 投薬群の関節炎スコアは、21:00 投薬群の約 1/2 であった。CIAラットを対象にミゾリビン (10 mg/kg) を 5:00 または 17:00 に初回感作後翌日 (day 1) から 28 日間連日経口投与し、関節炎抑制効果に及ぼすミゾリビンの投薬時刻の影響について検討した。Day 28 における関節炎スコアは、

control 群と比較し 5:00 投薬群および 17:00 投薬群で有意に低値を示した ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ )。また、5:00 投薬群は 17:00 投薬群と比較し有意に関節炎を抑制した ( $P < 0.01$ )。タクロリムスおよびミゾリビンにおいても投薬時刻を考慮することで顕著に抗リウマチ効果が向上できることが示された。これら 2 つの薬物もまた、MTX と同様に 1 日の中で TNF- $\alpha$  が増加し始める時間帯に薬物を投薬することでより高い効果が得られた。

現在、当研究グループでは、これらの研究成果をもとに RA 患者を対象にして MTX の時間治療の有用性を評価している。対象は MTX を既に服用している RA 患者とし、従来の投薬方法から投与量や投薬

回数を変更せず夜間にのみMTXを服用する(時間治療)こととした。現段階では、十分な症例数のデータは得られていないが、時間治療を行うことで顕著にリウマチ症状が改善する症例が認められている。このようにRA動物のみならず、服用時刻を変えるだけでリウマチ症状が軽減できることがRA患者においても認められる可能性が示され始めた。今後、十分な症例数にて評価しなければならないが、比較的高価な薬剤が多いRAの薬物療法において、薬剤を増やすことなく服用時刻を考慮するだけでリウマチ症状の改善が可能となる時間治療は、RA患者にとって非常に有益な治療法の一つになると考えられる。

以上より、RAの薬物治療に時間治療を応用することで、有効性の向上が期待できると考えられる。投薬時刻の違いによって生じる効果の差異には、どのような因子が関与しているのか。個々の患者で適切に時間治療を実施するためには、どのような指標をもとに治療を行うべきかなど、まだ課題は山積している。基礎研究及び臨床研究を通してこれらの問題を解決し、RA患者によりよい医療を提供できるように努力していきたい。

## 5. おわりに

RAを初めとする自己免疫疾患は、自己の免疫異常によって様々な症状が発現する。なぜ、RA患者にだけ朝のこわばりが生ずるのか。炎症が早朝に亢進する疾患は、RA以外にも多く散見される。炎症性サイトカインの概日リズムがホルモンや時計遺伝子によって制御されるのであれば、なぜ健常人ではRA患者のような明瞭な概日リズムを示さないのであろうか。RA発症によって認められる様々な生体成分や症状の概日リズムは、健常人の生体成分の概日リズムと何らかの生体成分が相互作用することによって発現するものと考えられる。RAの病態解析は現在盛んに行われているが、決定的な機序解明には至っていない。また、RA発症前からRA発症後における経時変化に伴う生体成分の詳細な時間生物学的評価は、ほとんど手がつけられていない研究領域である。現在、当研究室では、RAの概日リズム形成に関与する因子の同定に向けた新たな研究を開始した。これらの研究によって、RA発症機序の解明が可能となり、将来的にはRA予防薬の開発に寄与できればと考えている。

また、RAの薬物療法では、時間治療の有用性が多くの抗リウマチ薬で認められる可能性がある。グル

コルチコイドによる夜間投薬では不眠などの副作用を考慮せねばならないが、単にグルコルチコイドの効果や副作用にフォーカスを当てるのではなく、総合的な医療の観点からRA患者の炎症抑制にどのような治療が有用であるのかを、多くの医療従事者や研究者そしてRA患者間で議論して行くべきであると考ええる。また、生物学的製剤はRAの特効薬としてその有用性は示されているものの、1ヵ月の医療費が数万円以上かかることなどから一般に広く普及するには問題は多い。そのため、今あるDMARDの特徴を如何に理解し、治療していくかが重要な課題となる。この問題を解決する一つのキーワードとして時間治療が挙げられることを、当研究室では明らかにしつつある。RAは古くからよく知られた疾患でありながら、今現在もその治療法は発展途上にある。したがって、時間生物学や時間治療学といった概念を含め、今一度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確立が急務であると考ええる。

## 謝辞

本研究は、九州大学大学院薬学研究院薬物動態学分野および長崎大学病院にて行われたものであり、本研究にご協力いただいた先生方及び大学院生に心より深謝いたします。また、本研究の一部は、文部科学省科学研究費若手研究B(17790126)及び厚生労働省科学研究補助金免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業、武田科学振興財団、臨床薬理研究振興財団、研究政策医療振興財団の補助を受けて実施した。

## 引用文献

- 1) Feldmann M, Brennan FM, Maini RN: *Annu Rev Immunol* 14: 397-440 (1996)
- 2) McInnes IB, Liew FY: *Nat Clin Pract Rheumatol* 1: 31-39 (2005)
- 3) Arend WP: *Arth Rheum* 45: 101-106 (2001)
- 4) Dolhain RJ, Tak PP, Dijkmans BA, De Kuiper P, Breedveld FC, Miltenburg AM: *Br J Rheumatol* 37: 502-508 (1998)
- 5) Rudwaleit M, Yin Z, Siegert S, Grolms M, Radbruch A, Braun J, Sieper J: *Ann Rheum Dis* 59: 311-314 (2000)
- 6) Gerards AH, de Lathouder S, de Groot ER, Dijkmans BA, Aarden LA: *Rheumatol* 42: 1189-1196 (2003)

- 7) Cohen S, Cannon GW, Schiff M, Weaver A, Fox R, Olsen N, Furst D, Sharp J, Moreland L, Caldwell J, Kaine J, Strand V: *Arth Rheum* 44: 1984-1992 (2001)
- 8) Kremer JM, Phelps CT: *Arth Rheum* 35: 138-145 (1992)
- 9) Andersen PA, West SG, O'Dell JR, Via CS, Claypool RG, Kotzin BL: *Ann Int Med* 103: 489-496 (1985)
- 10) Weinblatt ME, Weissman BN, Holdsworth DE, Fraser PA, Maier AL, Falchuk KR, Coblyn JS: *Arth Rheum* 35: 129-137 (1992)
- 11) Choi HK, Hernan MA, Seeger JD, Robins JM, Wolfe F: *Lancet* 359: 1173-1177 (2002)
- 12) Olsen NJ, Stein CM: *N Engl J Med* 350: 2167-2179 (2004)
- 13) Gabay C: *Expert Opin Biol Ther* 2: 135-149 (2002)
- 14) Kowanko IC, Knapp MS, Pownall R, Swannell AJ: *Ann Rheum Dis* 41: 453-455 (1982)
- 15) Bellamy N, Sothorn RB, Campbell J, Buchanan WW: *Ann Rheum Dis* 61: 1075-1080 (2002)
- 16) Bellamy N, Sothorn RB, Campbell J, Buchanan WW: *Ann Rheum Dis* 50: 243-248 (1991)
- 17) Herold M, Günther R: *Prog Clin Biol Res* 227B: 271-279 (1987)
- 18) Crofford LJ, Kalogeras KT, Mastorakos G, Magiakou MA, Wells J, Kanik KS, Gold PW, Chrousos GP, Wilder RL: *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1279-1283 (1997)
- 19) Perry MG, Kirwan JR, Jessop DS, Hunt LP: *Ann Rheum Dis* 68: 63-68 (2009)
- 20) Arvidson NG, Gudbjornsson B, Elfman L, Ryden AC, Totterman TH, Hallgren R: *Ann Rheum Dis* 53: 521-524 (1994)
- 21) Straub RH, Cutolo M: *Arth Rheum* 56: 399-408 (2007)
- 22) Cutolo M, Serio B, Cravotto C, Pizzorni C, Sulli A: *Ann Rheum Dis* 62: 593-596 (2003)
- 23) Maestroni GJ: *J Pineal Res* 14: 1-10 (1993)
- 24) Reiter RJ: Pineal melatonin: *Endocrinol Rev* 12: 151-180 (1991)
- 25) Maestroni GJM: *J Pineal Res* 18: 84-89 (1995)
- 26) Esquifino AI, Cardinali DP: *Neuroendocrinol Lett* 20: 163-166 (1999)
- 27) Garcia-Mauriño S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Sanchez-Margalet V, Goberna R, Guerrero JM: *J Immunol* 159: 574-581 (1997)
- 28) Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, Van de Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L, Okret S, Gustafsson JA, Van der Saag PT: *Mol Endocrinol* 9: 401-412 (1995)
- 29) Kennaway DJ, Voultzios A: *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1013-1015 (1998)
- 30) Miyatake A, Morimoto Y, Oishi T: *J Clin Endocrinol Metab* 51: 1365-1371 (1980)
- 31) Koyanagi S, Suyama H, Kuramoto Y, Matsunaga N, Takane H, Soeda S, Shimeno H, Higuchi S, Ohdo S: *Endocrinol* 147: 5034-5040 (2006)
- 32) Conti A, Maestroni GJ: *Ann New York Acad Sci* 840: 395-410 (1998)
- 33) Sulli A, Maestroni GJM, Villaggio B, Hertens E, Cravotto C, Pizzorni C, Briata M, Serio B, Cutolo M: *Ann New York Acad Sci* 966: 276-283 (2002)
- 34) Neeck G, Federlin K, Graef V, Rusch D, Schmidt KL: *J Rheumatol* 17: 24-29 (1990)
- 35) Lightfoot RW Jr.: *J Rheumatol Suppl* 6: 61-67 (1980)
- 36) Kowanko IC, Pownall R, Knapp MS, Swannell AJ, Mahoney PG: *Ann Rheum Dis* 41: 447-452 (1982)
- 37) Levi F, Le Louarn C, Reinberg A: *Clin Pharmacol Ther* 37: 77-84 (1985)
- 38) Arvidson NG, Gudbjornsson B, Larsson A, Hallgren R: *Ann Rheum Dis* 56: 27-31 (1997)
- 39) Buttgereit F, Doering G, Schaeffler A, Witte S, Sierakowski S, Gromnica-Ihle E, Jeka S, Krueger K, Szechinski J, Alten R: *Lancet* 371: 205-214 (2008)
- 40) To H, Irie S, Tomonari M, Watanabe Y, Kitahara T, Sasaki H: *J Pharm Pharmacol* 2009 (in press)



## 医療薬学フォーラム2009

## 抗リウマチ薬の時間薬物療法を目指して

長崎大学病院  
藤 秀人

## 1. はじめに

「薬剤師主導の臨床研究は可能か」は、本シンポジウムのテーマである。薬剤師が中心となって実施する臨床研究は可能であると私は考えています。ただし、薬剤師が医師とともに臨床試験を行うには、これまで以上の努力が必要です。

未承認医薬品を対象とする治験とは異なり、研究者・医師主導型臨床研究は主に治療ガイドラインの作成や投与プロトコルの改善のために日常使用されている薬物を対象に実施されるヒトを対象とした研究です。したがって、研究者・医師主導型臨床研究は、医薬品適正使用を目指すための重要な試験と位置付けられています。このような臨床研究を実施する研究グループとしては、学会や財団、研究会、研究者個人によるものなど多岐に渡りますが、医師主導型臨床研究と言われるように、主には医師が主体となって研究が実施されています。しかし、治療ガイドラインの変更に係わるような臨床研究に薬剤師が携わっている例は

ほとんどありません。

当研究室では関節リウマチ (RA) の薬物療法に関して、薬剤師提案型の臨床研究を展開しています。本稿では、われわれの臨床研究を通して得られた薬剤師提案型臨床研究の実施に必要な条件などについて概説します。

## 2. 薬剤師が主導的に行う臨床研究の難易度

薬剤師が主導的に実施する臨床研究の難易度について表1に簡単にまとめました。症例調査やアンケート調査は、今日、この時からでも調査することが可能な研究であり、比較的容易に実施することが可能です。これらの研究では、患者個々に現れている事象や回答が得られた被験者における実態を把握することができますが、症例調査は客観性に乏しい情報であり、アンケート調査では回答していない被験者の情報は得られないことから偏った情報が収集される可能性があります。そのため、客観的なデータを収集するために、複数の被験者を対象に臨床研究を実施することが必要で

表1 薬剤師が主導的に行う臨床研究の難易度

難易度	研究内容	長所	短所
易	・症例調査	患者個人の治療成果などを把握することができる。	治療薬や治療法などの有効性を判定することはできない。
	・アンケート調査	調査対象者の実態を把握することができる。	患者背景等がバラバラなため効果判定などには不向きである。
↓	・健常人を対象とした臨床研究	新たな治療法や診断法の提言ができる (特に、遺伝子多型や相互作用の研究など)。	最終的に患者での評価が必要である。
	・患者を対象に介入のない後ろ向き研究や疫学調査	評価の対象となる患者を対象に調査することで、問題点の抽出などができる。	後ろ向き研究では、得られた成果について十分な提言ができない。
	・患者を対象に介入が伴う臨床研究	新たな治療法や診断法の提言ができる。ガイドラインへの採用も夢ではない。	薬剤師や薬学研究者だけでは、研究の実施が困難となるものが多い。

あると考えられます。

次に、健常人を対象とした臨床研究は、薬剤師や薬学研究者の得意分野の一つであり、薬物動態、遺伝子多型や薬物間相互作用などの分野では、多くの重要な所見を見出ししてきました。また、臨床で得られた患者の血液データ及び患者情報を収集してtherapeutic drug monitoring (TDM) や母集団薬物動態解析が行われ、薬物動態解析ソフトなどが開発され、臨床現場で多くの情報が活用されています。しかし、臨床で得られた情報を基に情報を整理して評価を試みる後ろ向き研究では、試験プロトコルに準拠した試験を実施しサンプルを収集していないため、患者背景の違いやサンプリング時間の差異など多くの相違点が患者間で存在し、得られた結果にはノイズが多く、適正な評価ができないことがあります。

前向き臨床研究は、被験者の条件や試験方法をあらかじめ設定しておき試験を実施する研究として医師主導の臨床試験で多く実施されている形態であり、これらの研究から新たな治療プロトコルやガイドラインが多く誕生しています。しかし、前向き研究を薬剤師が企画・立案し、臨床研究を実施した例は先にも述べたようにほとんどなく、この問題点としては大きく3つのことが考えられます。

1. 被験者に対して直接医療行為をすることができない。
2. 業務の合間の被験者の対応は困難である。
3. 研究費がない。

以上のように、薬剤師が主導的に実施する臨床試験の難易度は、医師にはない薬剤師ならではの課題も多く散見されますが、よりよい治療法の開発には、薬剤師ならではの薬学的センスが必ず必要です。

### 3. 薬剤師が主導する前向き臨床研究を実施するために

薬剤師が前向き臨床研究を企画し、実施するためには多くの課題が存在します。一般に、研究には、研究の計画や結果の考察を行う頭脳と、実際に研究するマンパワー、そして研究資金の3つの要素が必要だと言われています。医師の場合、この3要素が備われば前向き臨床研究は実施可能ですが、薬剤師の場合、さらにもう一つの要素が必

要となります。それは、研究協力医師です。薬剤師は処方権を有さず、直接医療方針を決定し、処置することはできないため、研究の意図を理解し、試験に協力していただける医師の確保は必要不可欠な条件となります。以上4つの条件をどのように整えていくべきなのかについては、薬剤師一人ひとりが置かれている環境によって変化するため、一概に説明することはできません。そこで、現在当研究室で実施している抗リウマチ薬の時間薬物療法に関する臨床研究を例にとって前向き臨床研究への取り組みについて紹介したいと思います。

#### 1) 研究計画の立案と研究協力医の獲得について

「なぜ、このような臨床研究をしなければならないのか」、医師が必ず試験計画者に尋ねる質問です。何のデータもまとめず経験則で「なんとなく〇〇を投薬した方が効果があるように思うのですが、試験で確認しませんか」、といった説明は絶対にするべきではありません。自分の親族や家族に“なんとなく”で計画された臨床研究に参加させたくないと同様に、医師も明確な根拠がない研究を自身の患者に依頼することはまずありません。臨床研究を提案するうえで最も重要なことは、科学的かつ客観的な観点に基づいて研究の提案を行うことを第一に考えることです。

医師に試験立案の根拠を示す方法としては、2つの方法があります。1つは複数の症例調査や論文等を科学的にまとめる方法と、もう一つは基礎研究にて効果を評価する方法です。私の場合は動物実験によって仮説の妥当性を明らかにしました。

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す。図1に示したようにRAの症状の特徴としては早朝に高発現する朝のこわばりがあります。また、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言われています。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おり、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ります。これにより患者の日常労作は障害され、生活の質 (QOL) は著しく低下します。

RAは未だ明確な発症機序が解明されていない疾患ですが、われわれはこの解明の切り口としてRA患者特有の“朝のこわばり”に着目しました。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す (図1)。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 (図1)、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ます。

現在、多くのRA患者に用いられているメトトレキサート (MTX) は、週ごとに1日目朝・夕、2日目朝を基本とした投薬スケジュールにて投薬が行われています (図1)。しかし、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ます。

そこで、当研究室では、RAモデル動物を対象に炎症性サイトカインの概日リズムを考慮してMTXを投薬することで、抗リウマチ効果の向上が可能か否かを評価しました。図2には、自然発症型RAモデル動物であるMRL/lprマウスのRA発症後における血中の血清アミロイド (SAA) 濃度及びTNF- $\alpha$ 濃度を示しました。SAAは、C-reactive protein (CRP) と同様に急性期の炎症反応を評価する指標でIL-1やIL-6、TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインによって惹起されます。RA発症後の血漿中SAA濃度及びTNF- $\alpha$ 濃度はともに、9:00に最高値 (SAA: 146.6  $\mu$ g/mL, TNF- $\alpha$ : 54.4pg/mL (平均値)), 5:00に最低値 (SAA: 68.7  $\mu$ g/mL, TNF- $\alpha$ : 19.7pg/mL (平均値)) を示す明瞭な概日リズムを示しました。一方、RA発症前のMRL/lprマウスではSAA及びTNF- $\alpha$ 濃度に明瞭な概日リズムは認められず、全サンプリング時刻の平均的なSAA及びTNF- $\alpha$ 濃度は85  $\mu$ g/mL及び17.3pg/mLとRA発症時の最小濃度付近でした。これらの結果より、RA未発症時は血中の炎症指標や炎症性サイトカイン濃度に概日リズムは認められず、RAを発症すること

既存の投与スケジュール

1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目
朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝
○	○					



時間治療に基づく投与スケジュール

1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目
朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝
○		○	○			

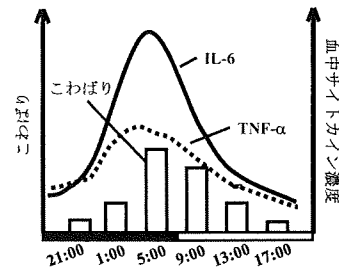


図1 RA治療におけるメトトレキサートの投与スケジュールとRA病態の概日リズム

でこれらに明瞭な概日リズムは発現することが明らかとなりました。したがって、RAの特徴である関節の痛みや朝のこわばりなどの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密接に関連していると考えられました。

次に、MRL/lprマウスを対象にMTXを投薬し、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ました。MRL/lprマウスにMTX (10mg/kg) を1:00または13:00のいずれかの時刻に3日間連日腹腔内投与した後4日間休薬し、投薬開始後14日目の血漿中SAA濃度を測定しました (図3)。1:00投薬群のSAA濃度は、control群及び13:00投薬群と比較し有意に低値を示しました ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。以上より、MTXの投薬時刻の違いによって炎症や関節炎に差異が現れることが明らかとなりました。また、このような現象は、他のRAモデルであるII型コラーゲンを感作したラットにおいても同様に、MTXの投薬時刻の違いによって抗リウマチ効果が変化することが分かりました。非常に興味深いことに、治療効果が高かった時刻は、いずれのRAモデル動物においても1日の中でTNF- $\alpha$ が増加し始める時間帯にMTXを投薬した時間帯でした。

以上のような実験結果を携え、われわれは抗リウマチ薬の時間治療の有用性を医師に訴え、臨床

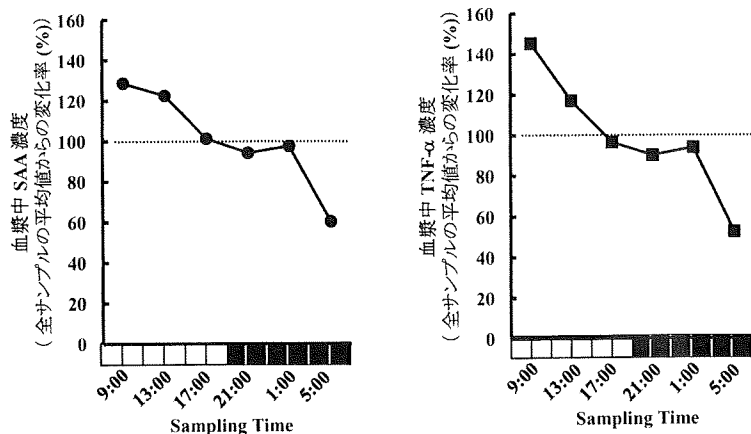


図2 MRL/lprマウスにおけるRA発症後の血漿中SAA及びTNF- $\alpha$ 濃度の概日リズムデータは全データの24時間平均に対する個々のデータのパーセンテージを算出し、各サンプル時刻の平均値を示した (n=6-16)。

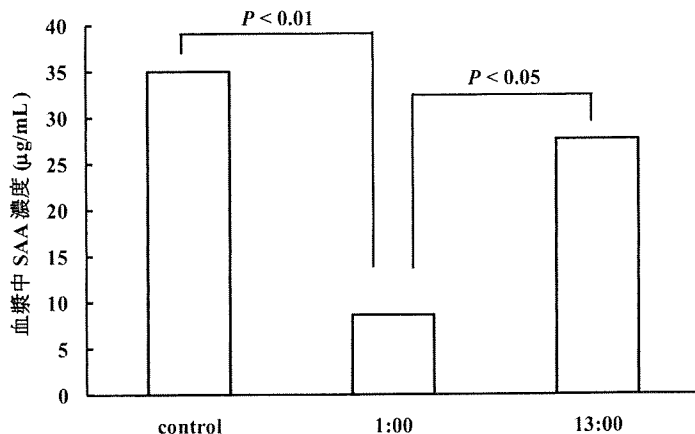


図3 MRL/lprマウスを対象としたMTXの投薬時刻の違いによる抗リウマチ効果への影響データは平均値を示した (n=8-18)。

研究に協力いただくことを了解いただきました。本研究の立案から医師に臨床研究を了解いただくまでには3年の歳月を費やしました。経験則や直感だけでは医師を説得することは困難です。私は自らエビデンスを生み出すことで、自信を持って医師に時間治療の長所と短所を説明し、その中でも時間治療の有用性を説明することができました。したがって、少しの遠回りをしてでも、明確なエビデンスを提示することが重要であり、薬剤師が主導的に臨床研究を実施するための第一歩であると考えます。

## 2) 臨床研究のプロトコール作成について

臨床研究は、誰もがいつでもどこでも実施できるものではなく、ヒトを対象とする以上最低限理解し、守らなければならないルールがあります。今回、このルールに関する詳細は省略させていただきますが、われわれ研究者が守らなければならない倫理的な指針などについては、厚生労働省のホームページ (<http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/ikenkyu/>) に掲載されていますのでご確認ください。また、倫理委員会への申請や承認された研究計画を大学病院医療情報ネットワーク (umin) などの公的な機関へ登録する方法につきましては、各大学や研究所の担当部署におうかがい下さい。

臨床研究の経験はもとより計画書を作成すること自体が初めてであった

われわれは、研究計画書作成に非常に苦勞しました。そのため、臨床研究に関する教科書や治験や臨床研究で、すでに承認を受けている計画書を参考に原案を作成しました。この計画書では、既存の投薬方法のグループと時間治療を実施するグループの2群にRA患者を各群100例程度無作為割り付けし、3ヵ月間の試験実施によるRA症状の改善度を両群間で比較することを目的としており、どの臨床研究の教科書にも記載されているような科学性の高い試験計画を作成しました。計画書作成に3ヵ月費やし、多くの参考書やThe LancetやThe New England Journal of Medicineの論文報告を参考に計画書を作成したため、われ