

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

抗リウマチ薬の投薬時刻の違いによる関節炎抑制効果への影響

研究代表者：藤秀人

富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）医療薬学研究室 教授

研究要旨

【目的】古くから関節リウマチ（RA）患者の多くで、朝のこわばりという RA 特有の日周リズムが発現することが知られている。これまで、当研究グループでは、メトトレキサート(MTX)を用いて、RA 患者及び RA モデル動物を対象に時間薬物療法の有用性を評価し、投薬タイミングを考慮することで、より効果的な抗リウマチ効果が得られることを明らかにしてきた。そこで、本研究では、本邦で使用されている疾患修飾性抗リウマチ薬 (DMARDs) のうちタクロリムス (FK506) 及びミゾリビン (Miz) を対象に、抗 RA 効果及び副作用に及ぼす投薬時刻の影響について検討した。また、その機序を薬物動態学的及び薬力学的側面より検討した。【方法】実験動物は自由摂食飲水、明暗周期（明期 7:00 - 19:00）条件下で 1 週間以上飼育した DBA/1J 雄性マウス LEW ラットを使用し、ウシ II 型コラーゲンを感作し、コラーゲン誘発関節炎を誘導させた。マウスに FK506 (4mg/kg) を 9:00 もしくは 21:00 に連日腹腔内投与し、抗 RA 効果の指標として関節炎スコアを、副作用の指標として体重変化率及び BUN 濃度、尿中 NAG 活性を評価した。また、FK506 を 9:00 もしくは 21:00 に単回投薬後、経時的に採血し、全血中濃度を MEIA 法にて測定した。また、ラットにコラーゲン感作後翌日より Miz (10 mg/kg) を 5:00 もしくは 17:00 に連日 28 日間投薬し、抗 RA 効果の指標として関節炎スコア等を評価した。【結果】FK506 では、関節炎スコアの中央値は control 群で 17、9:00 投薬群で 4.5、21:00 投薬群で 11.5 であり、9:00 投薬群の関節炎スコアは、control 群及び 21:00 投薬群と比較し有意に低値を示した。体重は 21:00 投薬群と比較し 9:00 投薬群で有意な増加抑制が認められた。しかし、両投薬群とも control 群と比較し腎機能は増悪しなかった。薬物動態は両投薬群間で差異は認められなかった。血漿中 TNF- α 濃度は、未感作群と比較し関節炎発症群において約 4 - 5 倍高値を示し、未感作群及び関節炎発症群で、明期に高値、暗期に低値を示す有意な日周リズムが認められた。また、Miz では、Miz 投薬群は、control 群と比較し有意に関節炎スコアを低下させた。また、5:00 投薬群は 17:00 投薬群と比較して有意な関節炎スコア抑制効果を示した。

CIA ラットの白血球数は、コラーゲン感作前と比較し感作後では有意に増加した。5:00 投薬群では、この白血球増加を有意に抑制した。【考察】FK506 では、初回投与時に 9:00 投薬群で体重が減少したが、投薬期間中に重篤な副作用は両投薬群で認められなかった。一方、抗 RA 効果は投薬時刻間に明確な差異が認められた。この投薬時刻の違いによる効果の差異には、FK506 の薬物動態よりむしろ炎症性サイトカインの日周リズムが寄与していると考えられた。また、Miz でも同様に、投薬時刻の違いによって顕著に抗リウマチ効果に変化することを明らかにした。以上より、効果的な RA 治療を行うには FK506 や Miz の投薬タイミングを考慮することが重要であると考えられる。

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での炎症性細胞浸潤、滑膜細胞増殖、軟骨・骨破壊などが挙げられる。この病態形成において過剰に産生される炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) が中心的な役割を果たすことが明らかとなってきた。そこで本研究では RA の特徴的な症状の一つである朝こわばりに着目した。RA では朝のこわばりという症状の日周リズムがあるだけではなく、朝のこわばりに対応するように炎症性サイトカインに日周リズムが存在することが示唆されており、時間薬理学的見地から RA 治療を行うことでより効果的な薬物療法が可能になると考えられる。これまでに当研究グループでは、抗リウマチ薬メトトレキサート (MTX) を用いて、RA モデル動物及び RA 患者を対象に投薬時刻の違いによる治療効果及び副作用への影響を検討した。その結果、RA モデル動物では、血中 TNF- α の概日リズムを考慮して MTX を投薬することで、有意に関

節炎抑制効果が軽減できることを明らかにした。また、RA 患者においても、従来の投与方法から MTX を寝る前に投薬する時間治療に変更することで、有意に DAS28 が改善できることを明らかにした。このような効果は、MTX のみならず、他の抗リウマチ薬にも認められるものと考えられる。そこで、本研究ではコラーゲン誘発関節炎 (CIA) モデル動物を作成し、タクロリムス (FK506) 及びミゾリビン (Miz) の投薬時刻を考慮することによって治療効果及び副作用発現の程度に差異が認められるか否かを検討した。

B. 方法

CIA マウスを対象に FK506 (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 17、24、31 及び 38 における関節炎スコアを評価した。また、CIA マウスにおいて day 24、31 及び 38 の 9:00、13:00、17:00、21:00、1:00 及び 5:00 のいずれかに採血し、未感作の DBA/1J マウス (normal 群) においても上記 6 時点のいずれかに採血

し、血漿中サイトカイン濃度を測定した。CIA ラットを対象に Miz (10 mg/kg) を初回感作後翌日 (day 1) より 5:00 及び 17:00 に 28 日間連日経口投薬し、関節炎スコアを経日的に観察した。

C. 結果

血漿中 TNF- α 及び IL-6 濃度はいずれの測定時刻においても、CIA 群において normal 群と比較し顕著に増加し、明期に高値、暗期に低値を示す明瞭な日周リズムを示した。そこで、炎症性サイトカインの日周リズムを考慮して TAC の投薬時刻を 9:00 または 21:00 に設定し、関節炎スコアへの投薬時刻の影響を検討した結果、初回感作後 day 38 における関節炎スコアの中央値は control 群と比較し 9:00 投薬群で約 1/4、21:00 投薬群で約 1/2 となり、9:00 投薬群は 21:00 投薬群と比較して有意な関節炎スコア抑制効果を示した。よって、炎症性サイトカインの日周リズムを考慮することで、FK506 の関節炎スコア抑制効果をより増強できることが示唆された (図 1)。一方、FK506 投薬群に重篤な副作用は認められず、投薬時刻の違いによる毒性の差異も認められなかった。

Miz でも、5:00 投薬群および 17:00 投薬群で Control 群と比較し有意に低い関節炎スコアを示した ($P < 0.01$)。さらに、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 ($P < 0.01$; 図 1)。一方、Miz 投薬群間で投薬時刻の違いによる毒性の差異も認められなかった。

D. 考察

これら 2 つの薬物の共通点は、MTX と同様に、炎症反応が増加し始める時期に投薬することで、顕著に効果の向上が期待できることが明らかとなったことである。したがって、DMARDs では、RA 病態の概日リズムを考慮した投与を行うことで、治療効果の向上が期待できるものと考えられる。今後、種々の DMARDs についても、時間薬理学的検討を行いたい。

E. 結論

本研究より、MTX と同様に TAC 及び Miz においてもそれぞれの薬物の投薬時刻を考慮することで、より安全かつ治療的な治療が可能になることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) To H., Yoshimatsu H., Tomonari M., Ida H., Tsurumoto T., Tsuji Y., Sonemoto E., Shimasaki N., Koyanagi S., Sasaki H., Ieiri I., Higuchi S., Kawakami A., Ueki Y., Eguchi K.; Methotrexate chronotherapy is effective against rheumatoid arthritis. *Chronobiol. Int.* 28: 267-274, 2011.
- 2) 藤秀人; 関節リウマチの体内時計機構と時間治療、柴田重信編集「体内時計の科学と産業応用」pp. 80-85, 2011.
- 3) Obayashi K., Tomonari M., Yoshimatsu H., Fukuyama r., Ieiri I., Higuchi S., To H.; Dosing-time

dependency of the arthritis inhibiting effect of tacrolimus in collagen-induced arthritis mice. J. Pharmacol. Sci. (accepted).

- 4) To H.; Chronobiology and Chronotherapy of Rheumatoid Arthritis., Fang-Ping Huang Ed. "Autoimmune Disorder/ Book 2", ISBN 979-953-307-269-1 (accepted)

2. 学会発表

- 1) 藤秀人；関節リウマチ病態の概日リズムと時間薬物療法 第31回日本臨床薬理学会（京都、2011年12月）
- 2) Mari Tomonari, Hideto To, Hiromichi Yoshimatu, Yasuhiro Tuji, Emi Sonemoto, Noriko Shimasaki, Ichiro Ieiri, Shun Higuchi, Hitoshi Sasaki, Yukitaka Ueki: Methotrexate chronotherapy is effective against rheumatoid arthritis第4回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム（東京、2010年11月）
- 3) 島崎訓子、藤秀人、友成真理、辻泰弘、曾根本恵美、佐々木均、植木幸孝：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 医療薬学フォーラム2010（広島、2010年7月）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

出願番号：PCT/JP2010/007262

出願日：平成22年12月15日

発明の名称：関節リウマチ薬

出願人：Hideto Nakamura

2. 実用新案登録

なし

3. その他

雑誌・記事掲載

1. 藤秀人；関節リウマチの時間治療、メディカルトリビューン（2009年2月12日）
2. 藤秀人；日経ドラッグインフォメーション（2009年9月10日）
3. 藤秀人；生体の時計システム利用した時間治療、メディカルトリビューン（2011年2月17日）

受賞

1. 臨床薬理研究振興財団 研究大賞 「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」（2010年4月）
2. 医療薬学フォーラム2010/ 第18回 クリニカルファーマシーシンポジウム 優秀ポスター賞「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」（2010年7月）

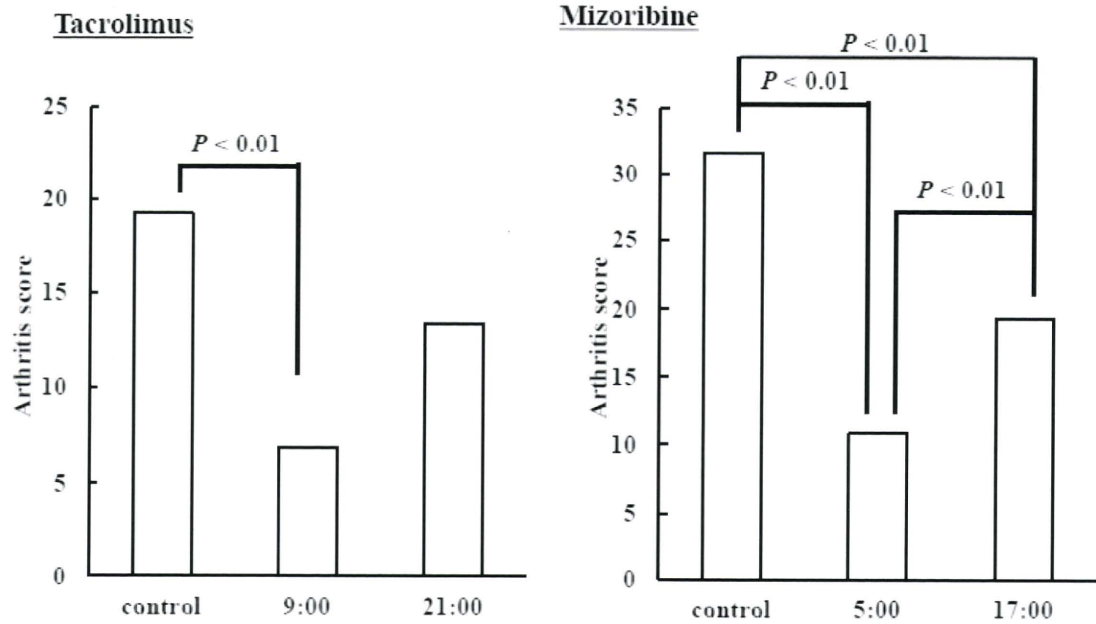


図1. タクロリムスおよびミゾリビンの投薬時刻の違いによる抗リウマチ効果への影響

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

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
藤 秀人	関節リウマチの体内時計機構と時間治療	柴田重信	体内時計の科学と産業応用	シーエムシー出版	東京	2011	80-85
To H.	Chronobiology and Chronotherapy of Rheumatoid Arthritis	Fang-Ping Huang	Autoimmune Disorder /Book 2	INTECH	Croatia	2011	accepted

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
藤 秀人	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	臨床薬理の進歩 2010	31	15-24	2010
To H., Yoshimatsu H., Tomonari M., Ida H., Tsurumoto T., Tsuji Y., Sonemoto E., Shimasaki N., Koyanagi S., Sasaki H., Ieiri I., Higuchi S., Kawakami A., Ueki Y., Eguchi K.	Methotrexate chronotherapy is effective against rheumatoid arthritis.	Chronobiol. Int.	28	267-274	2011
藤 秀人	関節リウマチにおける病態の概日リズムと時間薬物療法	臨床薬理	42	109-110	2011
Obayashi K., Tomonari M., Yoshimatsu H., Fukuyama r., Ieiri I., Higuchi S., To H.	Dosing-time dependency of the arthritis inhibiting effect of tacrolimus in collagen-induced arthritis mice	J. Pharmacol. Sci.	accepted		2011

V. 研究成果の刊行物・別刷

第9章 関節リウマチの体内時計機構と時間治療

藤 秀人*

1 関節リウマチと薬物療法

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が、発症機序は十分に明らかにされていない¹⁾。RAの症状は早朝に現れる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る。RA患者の血中や関節滑液中に、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor- α (TNF- α) や interleukin- 1β (IL- 1β), interleukin-6 (IL-6) が高濃度に発現していることが知られており、これらのサイトカインの複合的な作用によって、RA患者の関節炎は改善と憎悪を繰り返しながら進行し、軟骨・骨破壊を起こし関節の変形に至る。その結果、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とになる。したがって、過剰に産生されるこれらのサイトカインがRA病態形成の一因と考えられている^{2, 3)}。

RAの薬物療法の目的は、1990年前後まで患者の訴える痛みや炎症を抑制することにあった。そのため、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) や副腎皮質ホルモン薬による治療が主流であった。しかし、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。1980年代に入り、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ができる疾患修飾性抗リウマチ薬 (DMARD) がRA薬物療法に用いられるようになり、RAの活動性を比較的コントロールしやすくなった。特に、抗リウマチ効果の作用機序が十分に解明されているわけではないが^{4, 5)}、抗がん剤でよく知られているメトトレキサート (MTX) は、american college of rheumatology (ACR) 改善率⁶⁾ や関節炎抑制効果⁷⁾、生活改善効果⁸⁾ などリウマチ治療において高い治療成績を収めており、今日では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- α 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すことが明らかになった⁹⁾。

* Hideto To 富山大学大学院 医学薬学研究部 (薬学) 医療薬学研究室 教授

2 関節リウマチの関節炎の概日リズム

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こわばりは、RAの特徴的な症状の一つであり¹⁰⁻¹²⁾、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。例えば、炎症の指標であるC-reactive protein (CRP) 濃度は、RA患者において早朝に高値、夕方に低値を示す概日リズムが存在し¹³⁾、その周期は関節の痛みやこわばりの周期に対応している。また、RAにおける炎症反応や病態形成には、TNF- α 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ことが知られているが、RA患者のIL-6やTNF- α などの炎症性サイトカインの血中濃度は、こわばりに対応するように早朝に最高値を示すという概日リズムが認められる(図1)^{14, 15)}。一方、健康人や自己免疫疾患である結合組織症の患者では、炎症性サイトカインの概日リズムは認められない。さらに、RAモデル動物においても、RA発症前では炎症性サイトカインの概日リズムは認められないが、RA発症後にこの明瞭な概日リズムが発現する¹⁶⁾。実験動物およびRA患者で共通の現象が認められたことから、炎症反応や炎症性サイトカインの概日リズムが発現することは、RA特有の現象であると考えられる。

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の成因は、未だ十分に明らかにされていない。これまでの研究より、ホルモンバランスや時計遺伝子などが、RAの概日リズム形成に関与していると考えられている。

炎症性サイトカインの分泌に関わるホルモンには、コルチゾールやメラトニンが挙げられる^{16, 17)}。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¹⁸⁾、実験的にメラトニンの生合成や分泌を抑制したとき免疫抑制状態となる^{19, 20)}。また、メ

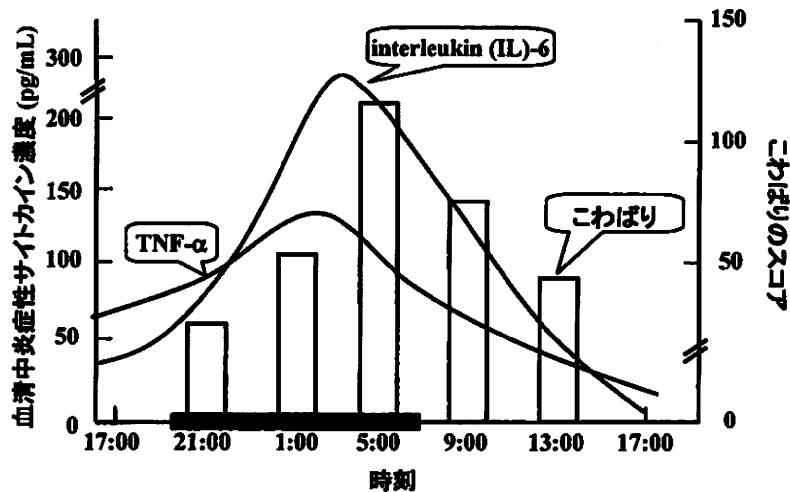


図1 RA患者におけるこわばりと炎症性サイトカインの概日リズム (Cutolo M. et al., Ann. Rheum. Dis., 62: 593-596, 2003. 一部改変)

メラトニンは炎症性サイトカインの生成を増大させる²¹⁾。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- α 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²²⁾。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²³⁾、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²⁴⁾。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、健康人と異なることが報告されている。RA患者では、健康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²⁵⁾、朝にピークを示すコルチゾールの濃度は減少する²⁶⁾。このようなホルモンの分泌量の変化及び概日リズムによって、RA患者の炎症性サイトカインは、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。その結果、これらは、早朝にピークとなる概日リズムを有するものと考えられている¹⁵⁾。

また、近年、時計遺伝子の一つである*Cryptochrome (Cry)*が、TNF- α の発現制御に関与していることが報告された²⁷⁾。TNF- α は、RAの病態形成に重要な役割を有している生体成分である。この報告では、*Cry1*^{-/-}*Cry2*^{-/-}マウスにリウマチ様の関節炎を発症させたとき、wild typeマウスと比較して有意に血清中TNF- α 濃度が増加していることが明らかとなった。また、関節炎の程度も、wild typeマウスと比較し、*Cry1*^{-/-}*Cry2*^{-/-}マウスでは顕著に悪化していた。これらのことから、*Cry*はRAにおける炎症性サイトカインの発現の制御や関節炎の抑制に寄与する因子であることが示唆される。現在、RA病態における種々の生体成分を対象とした概日リズム解析及びこれら因子とRA病態発症の機構解明が進められている。今後、これらの研究によって、RA病態で認められる概日リズム形成制御因子の同定がなされることで、生体リズム制御による新たなRA治療法の開発が期待される。

3 関節リウマチ患者を対象とした時間薬物療法

RAの時間治療の歴史は古く、1980年前半には当時主流のRA治療であったNSAIDや副腎皮質ホルモン薬について研究が実施されている。痛み止めとして用いられていたインドメタシンでは、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²⁸⁾。また、合成副腎皮質ホルモン薬では、プレドニゾンの徐放化製剤を作製し、従来の薬剤を朝投薬する群と新徐放性製剤を用いて寝る前に投薬する群の2群に分け、二重盲検比較試験が行われた²⁹⁾。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。このような研究より、痛みや炎症といったRA症状を改善するため、RAに対する時間治療は有益であると考えられる。

現在のRA薬物療法では、MTXが最も世界的に汎用されている。Ⅱ型コラーゲン感作型(CIA)マウスは、ウシのⅡ型コラーゲンを感作させることで、四肢の関節に炎症が生じるRAモデルである。このモデルを対象に炎症反応の指標である血清アミロイドA(SAA)を測定したところ、明期に最高値を示す概日リズムが発現した(図2)。そして、この周期を考慮して、MTXを5:00

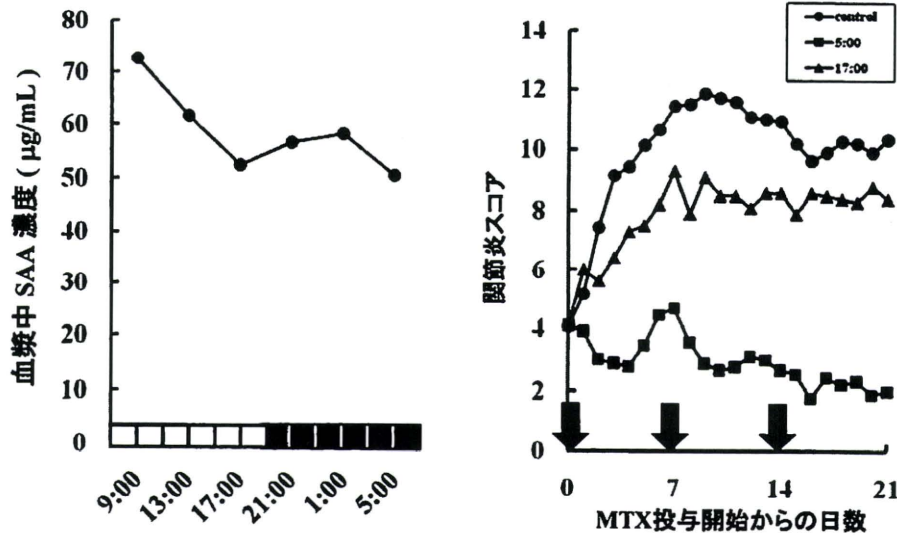


図2 RAモデル動物における血漿中SAA濃度の概日リズムとMTXの投薬時刻の違いによる関節炎抑制効果への影響
(To H. *et al.*, J. Pharm. Pharmacol. 61: 1333-1338, 2009. 一部改変)

または17:00に投薬した結果、炎症反応が増加し始める5:00に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示された(図2)¹⁶⁾。また、自然発症型RAモデル動物であるMRL/lprマウスを対象に同様の評価をしたところ、明期に最高値を示す概日リズムがSAAやTNF- α で認められ、これらが増加し始める時期にMTXを投薬することで、control群と比較し有意にSAAやTNF- α 濃度が減少することが明らかとなった。以上より、病態形成が異なる2種類のRAモデル動物にて、炎症反応や炎症性サイトカインの概日リズムの位相が類似していたことおよびこの周期を考慮したMTXの投薬によって高い治療効果が認められたことから、RA治療においてMTXの時間薬物療法は有用であると考えられる。

このような基礎研究の成果を基に、single-arm studyが実施された³⁰⁾。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。しかし、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¹⁵⁾ことと、これら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られた。そこで、著者らは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。本試験の被験者の一例を図3に示した。RAの疾患活動性の評価は、28個の関節を対象にした圧痛関節数と腫脹関節数、CRP濃度及び被験者の全身健康状態をVisual Analogue Scale (VAS)で測定した数値を用いて数値化するDAS28によって表現される。寝る前にMTXを投薬する時間薬物療法の結果、被験者は試験開始わずか1ヵ月で顕著にDAS28の減少が認められ、3ヶ月間その効果は維持された。ま

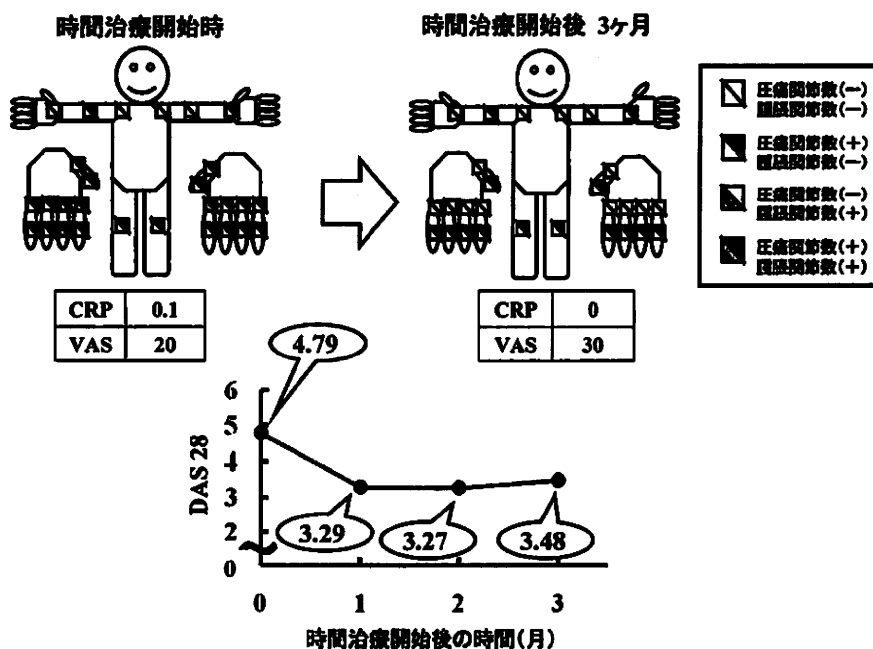


図3 MTXの時間薬物療法 (症例1)

た、試験全体では、約41%の被験者で治療効果が認められ、全体の24%の被験者が臨床的寛解に到達した。さらに、夜間に投薬することで血液中濃度の上昇による副作用が危惧されたが、重篤な副作用は試験期間中認められなかった³⁰⁾。現在、種々の抗リウマチ薬について時間治療の有用性評価を基礎研究等で検討している。今後、抗リウマチ薬の時間治療に関する体系化が進んでいくが、RA病態の概日リズムをターゲットにした薬物療法は、新たな治療ツールの一つとして期待できる。

4 おわりに

RAは、未だ発症機構が十分に明らかにされていない自己免疫疾患である。しかし、早朝にピークを示すこばりや炎症性サイトカインの概日リズムといった極めて明瞭で、多くの患者で共通に現れる現象が存在する。測定技術の高度化によって、これまで測定できなかったRAに関わる様々な因子が、近年、比較的容易に測定できるようになってきた。今後、このようなリズムをターゲットにした新規医薬品の開発や時間治療の臨床応用によって、RAの薬物療法に新たな治療戦略が誕生することを期待したい。

文 献

- 1) van Boekel MA *et al.*, *Arth. Res.*, 4, 87 (2002)
- 2) McInnes IB *et al.*, *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, 1, 31 (2005)
- 3) Arend WP, *Arth. Rheum.*, 45, 101 (2001)
- 4) Dolhain RJ *et al.*, *Br. J. Rheumatol.*, 37, 502 (1998)
- 5) Gerards AH *et al.*, *Rheumatol.*, 42, 1189 (2003)
- 6) Cohen S *et al.*, *Arth. Rheum.*, 44, 1984 (2001)
- 7) Kremer JM *et al.*, *Arth. Rheum.*, 35, 138 (1992)
- 8) Choi HK *et al.*, *Lancet*, 359, 1173 (2002)
- 9) Olsen NJ *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 350, 2167 (2004)
- 10) Kowanko IC *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.*, 41, 453 (1982)
- 11) Bellamy N *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.*, 61, 1075 (2002)
- 12) Bellamy N *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.*, 50, 243 (1991)
- 13) Herold M *et al.*, *Prog. Clin. Biol. Res.*, 227B, 271 (1987)
- 14) Arvidson NG *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.*, 53, 521 (1994)
- 15) Cutolo M *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.*, 62, 593 (2003)
- 16) To H *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 61, 1333 (2009)
- 17) Straub RH *et al.*, *Arth. Rheum.*, 56, 399 (2007)
- 18) Maestroni GJ, *J. Pineal. Res.*, 14, 1 (1993)
- 19) Reiter RJ, *Endocrinol. Rev.*, 12, 151 (1991)
- 20) Maestroni GJ, *J. Pineal. Res.*, 20, 84 (1996)
- 21) Garcia-Mauriño S *et al.*, *J. Immunol.*, 159, 574 (1997)
- 22) Caldenhoven E *et al.*, *Mol. Endocrinol.*, 9, 401 (1995)
- 23) Kennaway DJ *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 1013 (1998)
- 24) Miyatake A *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 51, 1365 (1980)
- 25) Sulli A *et al.*, *Ann. New York Acad. Sci.*, 966, 276 (2002)
- 26) Neeck G *et al.*, *J. Rheumatol.*, 17, 24 (1990)
- 27) Hashiramoto A *et al.*, *J. Immunol.*, 184, 1560 (2010)
- 28) Levi F *et al.*, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 37, 77 (1985)
- 29) Buttgerit F *et al.*, *Lancet*, 371, 205 (2008)
- 30) To H *et al.*, *Chronobiol. Int.* (in press)

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

Chronotherapy of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis

藤 秀人*

Key words : 時間治療、生体リズム、関節リウマチ、メトトレキサート、炎症性サイトカイン

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が、発症機序は十分に明らかにされていない¹⁾。そのため、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²⁾。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。1980年代に入り、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ができる疾患修飾性抗リウマチ薬 (DMARD) を用いるようになり、RAの活動性を比較的コントロールしやすくなった³⁾。近年、RAの病態形成には、過剰に産生されるtumor necrosis factor- α (TNF- α) やinterleukin-1 β (IL-1 β)、interleukin-6 (IL-6) などの炎症性サイトカインが重要な役割を有することが明らかとなった⁴⁾。そして、抗ヒトTNF- α 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の開発により、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すようになった⁵⁾。しかし、高い薬剤費の問題や生物学的製剤に対する抗体産生など多くの問題があり、RA治療にとって生物学的製剤は、特効薬で

はない。科学技術の発達によって診断技術や分子生物学的な解析技術などが向上し、様々なRAの診断法や薬物治療法が開発されており、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る。そのため、この機会に再度RA病態の特徴や既存の抗リウマチ薬の特性を理解し、より効果的な治療法を検討すべきであると考えた。

そこで、本研究では、RA患者の多くで発現する朝のこわばりに着目した。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ある⁶⁾。また近年、朝のこわばりに対応するように血中IL-6やTNF- α などが早朝に増加することが報告され⁷⁾、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。

本研究では、RA発症後における炎症性サイトカインの概日リズムをRAモデル動物にて測定し、この概日リズムに合わせてメトトレキサート (MTX) を投薬することで、治療効果が向上できるか否か評価した。また、これらの研究結果をもとに、MTXを用いた既存の薬物療法と比較し時間治療法で、より効果的な治療成績が得られるかどうかRA患者を対象に臨床研究を実施した。

*To Hideo 長崎大学病院 薬剤部

方 法

1. 基礎研究

1-1. 実験動物

実験動物は、DBA/1J雄性マウス及びMRL/lpr雄性マウスを使用した。マウスは、自由摂食飲水、明期を7:00-19:00とする12時間明暗周期、恒温恒湿の室内で2週間以上飼育した後、実験に使用した。本研究による動物実験は、長崎大学動物実験委員会の承認を得て、実験を行った。

1-2. CIA (collagen-induced arthritis) モデルの作成

初回感作 (Day 0) では凍結乾燥ウシⅡ型コラーゲン (CⅡ) を2mg/mLになるように、追加感作 (Day 14) ではCⅡを4mg/mLになるように、0.02M Tris-0.15M NaCl (pH 8.0) 溶液で溶解する。作成されたCⅡ溶液は、完全アジュバントと1:1の割合で混合し、初回感作では1mg/mL、追加感作では2mg/mLのw/oエマルジョンを作製した。感作は、ジエチルエーテル麻酔下、エマルジョン100μLを皮内注射した。

1-3. MTXの調整と投薬

MTXは、炭酸水素ナトリウム注射液に溶解し、体重10gに対して0.1mLマウスに腹腔内投与した。

CIAモデルマウスでは、初回感作後21日目から5:00または17:00にMTX (60mg/kg) または炭酸水素ナトリウム (control) を7日毎に計3回投薬した。MRL/lprマウスでは、10週齢からMTX (10mg/kg) または炭酸水素ナトリウム (control) を1:00または13:00に3日間連日腹腔内投与した後4日間休薬した。これを1クールとし2回繰り返した。

1-4. 血液中生体成分の測定

炎症性サイトカイン等の概日リズムの評価では、初回感作後28日目 (Day 28) のCIAマウス及び未感作DBA/1Jマウスを対象に、9:00及び13:00、17:00、21:00、1:00、5:00のいずれかの時刻に採血

を行い、血漿を採取した。また、10週齢 (RA未発症) と15週齢 (RA発症) のMRL/lprマウスを対象に上記の6時点に採血を行い、血漿を採取した。MRL/lprマウスを対象としたMTXの治療効果の評価では、Day14の9:00に採血を行い、血漿を採取した。

炎症性サイトカインの測定には、Mouse Inflammatory Four-Plex Antibody Bead Kitを用い、Luminex®100にて測定した。IgG-RF抗体価及び血清アミロイドA (SAA) 濃度は、ELISA法にて測定した。corticosterone濃度は、radio-immunoassay kitを用い測定した。

1-5. 関節炎スコアの評価

CIAモデルマウスの関節炎スコアは、MTX投薬開始後21日間連日観察した。評価法は、Kutty Selva Nandakumarらの関節炎の評価方法⁹⁾を参考にし、マウス1匹あたり40点満点で評価した。スコアについて以下に示す。前肢、後肢のそれぞれの指の第一関節、第二関節のどちらか一方、もしくは両方の腫脹が見られる場合は1点を付与した。前肢甲部と後肢の裏部において軽微な発赤・腫脹が見られる場合は3点、中程度で4点、重篤な場合5点を付与した。

1-6. MTXの血漿中薬物濃度の測定

DBA/1Jマウスに5:00または17:00にMTX (60mg/kg) を腹腔内投薬し、0.5及び1、2、4、6、8時間後に採血を行い、血清を採取した。MTX濃度は、TDx®メトトレキサート-Ⅱ・ダイナパック®を用いて測定を行った。

2. 臨床研究

被験者は、佐世保中央病院に外来通院中で、年齢20歳以上でRAと診断されDisease Activity Score (DAS) 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。本研究に参加した被験者背景を表1に示した。

表1 被験者背景

被験者数	12例
年齢(歳)	63.8(41 - 80) ^{a)}
性別	6/6 ^{b)}
体重(kg)	51.8(34.7 - 72.0) ^{a)}
発症期間(年)	14(2 - 33) ^{a)}
MTX投与量(mg)	6(4 - 8) ^{a)}
病期・進行度	
Stage I	0
Stage II	2
Stage III	4
Stage IV	6
機能障害	
Class I	1
Class II	11

a) 平均値(最小値-最大値)、b) 男性/女性、c) 中央値(最小値-最大値)

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は変更せずに、時間治療型MTX投薬レジメンでは、1日1回寝る前投与とした。主要評価項目の有効性にはDAS 28による疾患活動性を、副作用では白血球減少を評価し、時間治療変更時と時間治療開始1ヶ月後のデータを比較検討した。

本臨床研究は、長崎大学病院 臨床研究倫理委員会の承認を受け実施した。

3. 統計解析

概日リズム解析には、one-way ANOVA及びCosinor法を用いた。関節炎スコアの評価は、多群間の比較にはKruskal-Wallis testを行い、特定群間の比較検定にはMann-WhitneyU test with Bonferroni correctionを用いた。その他の多群間の比較にはone-way ANOVAを行い、特定群間の比較検定にはscheffe's testを用いた。また、2群間の比較には、Paired *t* testまたはStudent's *t* testで解析を行った。なおすべての検定において有意水準を5%以下とした。

結 果

1. CIAマウスにおける血漿中TNF-α濃度の概日リズム

血漿中TNF-α濃度は、未感作群及びCIA群のいずれも明期に高値、暗期に低値を示す有意な概日リズムが認められた(未感作群: F from ANOVA=4.08, $P<0.01$; P from Cosinor<0.01; CIA群: F from ANOVA 3.93, $P<0.01$; P from Cosinor<0.01)。また、CIA群の血漿中TNF-α濃度はいずれの時刻においても未感作群と比較して有意に高値を示した($P<0.01$) (図1)。

2. CIAマウスにおける関節炎抑制効果におよぼすMTX投薬時刻の影響

図2Aには、初回感作後21日目から42日目における関節炎スコアを示した。MTXの初回投薬(Day 21)後、5:00投薬群は速やかな関節炎スコアの低下が確認されたが、投薬後4日目より再び増加傾向に転じた。一方、17:00投薬群ではcontrol群とほぼ同等のスコア推移を示した。続いて2回目(Day 28)、3回目(Day 35)と反復投与を行ったとき、MTX投薬により5:00投薬群は再び関節炎の低下が確認されRAの発症は抑制され

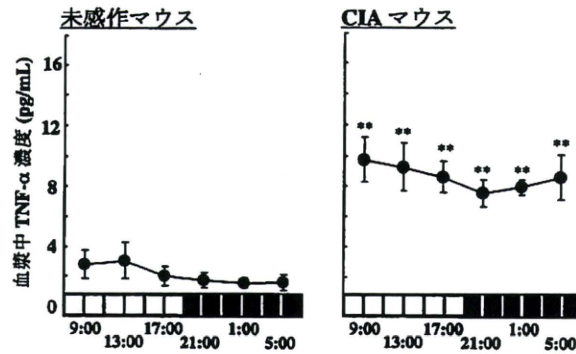


図1 未感作マウス及びCIAマウスにおける血漿中TNF- α 濃度の概日リズム
データは、平均値±標準偏差を示し、未感作マウスは5または6匹、CIAマウスは9匹である。未感作群とCIA群間で、各サンプリング時刻において有意な差が認められた場合は、**: $P < 0.01$ で示した。

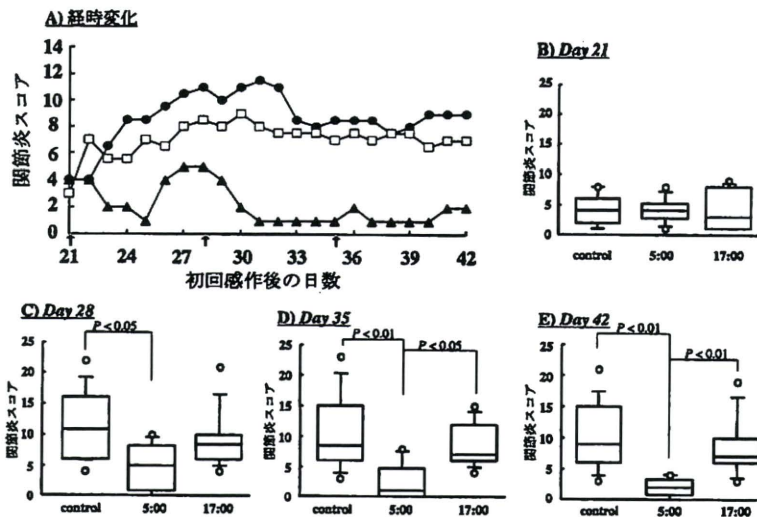


図2 CIAマウスを対象としたMTXの投薬時刻の違いによる抗リウマチ効果への影響
Aのデータは中央値で、B-Dのデータは箱ひげ図で示し、下から最小値、第1四分点、中央値、第3四分点、最大値を表している。Control群(●)は14匹、5:00投薬群(▲)は9匹、17:00投薬群(□)は10匹である。

たのに対して、17:00投薬群はcontrol群と同等の高い関節炎スコア推移を保ち続けた。

また、Day 21、Day 28、Day 35及び最終観察日であるDay 42において、各群におけるスコアの分布を図2B-Eに示した。Day 28では5:00投薬群はcontrol群と比較して関節炎スコアが有意に抑制され ($P < 0.05$)、またDay 35では5:00投薬群の関節炎スコアは、control群及び17:00投薬群と比較

して有意に低値を示した ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。さらに、Day 42でも5:00投薬群はcontrol群及び17:00投薬群と比較して有意に低い関節炎スコアを示した ($P < 0.01$ 、 $P < 0.01$)。

3. MRL/lprマウスにおけるRA症状の進行にともなう生体成分の概日リズムの変化
炎症マーカーであるSAAは、RA症状の進行と

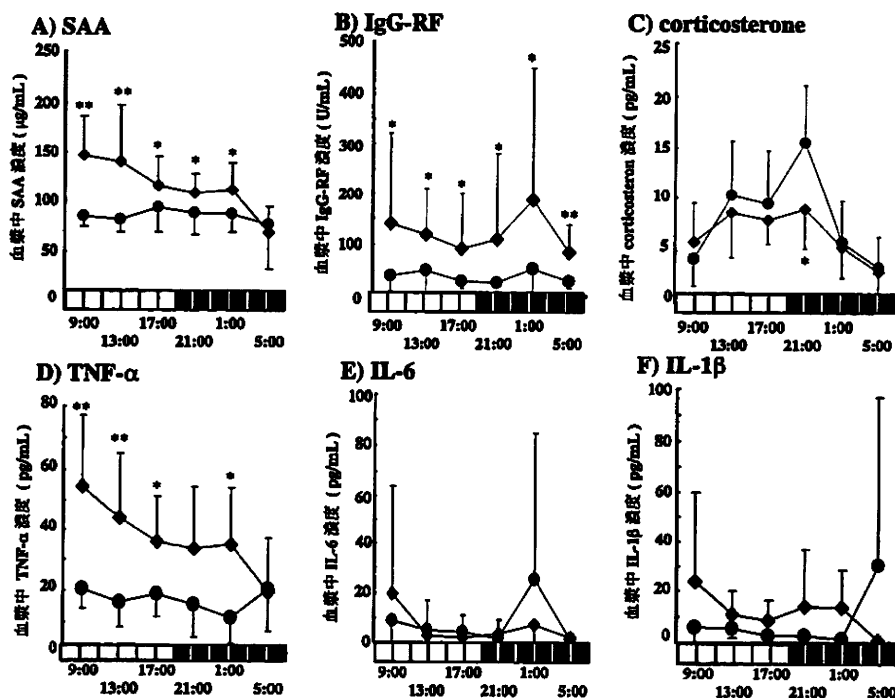


図3 MRL/lprマウスにおけるRA発症前・後の血漿中SAA、IgG-RF、corticosterone、TNF-α、IL-6、IL-1β濃度の概日リズム

データは、平均値±標準偏差を示し、SAA、IgG-RFは15または16匹、その他は6-8匹である。RA未発症（10週齢）マウスは●で、RA発症（15週齢）マウスは◆で表し、各サンプリング時刻において有意な差が認められた場合は、それぞれ*： $P < 0.05$ 、**： $P < 0.01$ で示した。

共に10週齢と比較し15週齢で有意に上昇した（17:00、21:00、1:00： $P < 0.05$ 、9:00、13:00： $P < 0.01$ ；図3A）。また10週齢のSAAでは概日リズムが認められなかったのに対して、15週齢のSAA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（F from ANOVA=8.74、 $P < 0.01$ ；P from Cosinor < 0.01 ；図3A）。

IgG-RF抗体価はサンプル時刻の別を問わずRA症状の進行と共に一様に上昇し、10週齢と比較し15週齢の各時点で有意に上昇した（9:00、13:00、17:00、21:00、1:00： $P < 0.05$ 、5:00： $P < 0.01$ ；図3B）。また10週齢及び15週齢のIgG-RF抗体価は共に有意な日内変動は認められなかった。

血漿中corticosterone濃度は21:00において10週齢と比較し15週齢で有意に減少した（ $P < 0.05$ ；図3C）。また10週齢と15週齢のcorticosterone濃度

は共に暗期前半にピークを明期前半にトラフを示す有意な概日リズムが認められた（10週齢：F from ANOVA=6.64、 $P < 0.01$ ；P from Cosinor < 0.01 、15週齢：F from ANOVA=3.21、 $P < 0.05$ ；P from Cosinor < 0.01 ；図3C）。しかし、血漿中corticosterone濃度の概日リズムは10週齢と比較しRA症状が進行した15週齢で周期性及び振幅ともに低下を示した。

血中炎症性サイトカインを網羅的に測定した結果、TNF-α濃度は1:00及び9:00、13:00、17:00の各時点において10週齢と比較し15週齢で有意に上昇した（17:00、1:00： $P < 0.05$ ；9:00、13:00： $P < 0.01$ ；図3D）。また、IL-1β及びIL-6濃度は、10週齢のほとんどのマウスにおいて測定感度以下であったが、15週齢では10週齢と比較しこれらの濃度は上昇した。しかし、RA症状が進行した15週齢でも

高発現するもの、ほとんど発現しないものなどマウス間の個体差は非常に大きかった。10週齢のMRL/lprマウスにおいて測定したサイトカインのすべてで概日リズムは認められなかった。15週齢のMRL/lprマウスにおいてもIL-1 β 及びIL-6濃度に明瞭な概日リズムは認められなかった。しかし、TNF- α 濃度は15週齢では明期前半にピークを暗期後半にトラフを示す有意な概日リズムが認められた (F from ANOVA=2.73、 $P < 0.05$; P from Cosinor < 0.01 ; 図3D)。

4. MRL/lprマウスにおける炎症及び自己免疫反応に及ぼすMTXの投薬時刻の影響

MTXの投薬開始後14日目のSAA濃度は、control群及び13:00投薬群と比較し1:00投薬群で

有意に低値を示した ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$; 図4)。MTXの投薬開始後14日目のIgG-RF抗体価は、control群と比較し1:00投薬群で有意に低値を示した ($P < 0.05$; 図4)。MTXの投薬開始後14日目のTNF- α 濃度は、control群と比較し1:00投薬群で有意に低値を示した ($P < 0.05$; 図4)。

5. CIAマウスにおける薬物動態に及ぼすMTXの投薬時刻の影響

MTX投薬後0.5及び1、2時間目の血中濃度では、17:00投薬群が5:00投薬群と比較し高値を示し (0.5hr: $P < 0.05$, 2hr: $P < 0.01$)、4時間目以降では5:00投薬群が17:00投薬群と比較し高い血中濃度を示した (4hr, 6hr: $P < 0.01$, 8hr: $P < 0.05$; 表2)。同一個体より経時的に採血を行えなかったため各

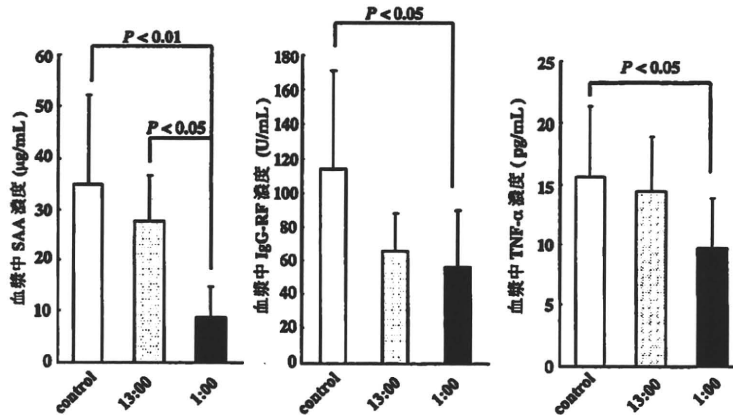


図4 MRL/lprマウスを対象としたMTXの投薬時刻の違いによる抗リウマチ効果への影響
データは、平均値±標準偏差を示し、control群は14または15匹、MTX投薬群は8匹である。

表2 5:00または17:00にMTX (60mg/kg, i.p.) を投薬したときの血中濃度及び薬物動態パラメータ

	MTX 濃度 (µg/mL)						AUC ₀₋₈ (µg/mL·hr)	MRT ₀₋₈ (hr)
	0.5 hr	1 hr	2 hr	4 hr	6 hr	8 hr		
5:00	17.1 ± 1.92	6.37 ± 3.47	0.73 ± 0.37	0.113 ± 0.017	0.072 ± 0.023	0.039 ± 0.013	23,622	0.654
17:00	23.1 ± 4.07	8.64 ± 1.47	1.67 ± 0.52	0.037 ± 0.009	0.009 ± 0.006	0.020 ± 0.015	32,305	0.585
P 値	<0.05	N.S.	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05		

各データは平均±標準偏差で示した (n=5-6)。N.S.: 有意差なし