

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07161

研究課題名(和文) 生体リズムを考慮した抗リウマチ薬ヤヌスキナーゼ阻害剤の至適投与設計の構築

研究課題名(英文) Construction of the optimal administration plan of the antirheumatic Janus kinase inhibitor in consideration of a biological clock

研究代表者

藤 秀人 (To, Hideto)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授

研究者番号：90346809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：実験動物を対象にトファシチニブ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。その結果、17時投与群と比較し、5時投与群で顕著に関節炎増悪抑制効果がみられた。また、本剤は、臨床で1日2回投与されるため、1回投与量を同量とし、1日1回もしくは、1日2回で投与した結果、1日1回5時投与群は、1日量が半量であるにもかかわらず、1日2回投与とほぼ同等の薬効を示した。以上より、より最適な投与時刻を選定することは、本薬の有効性を向上できると考えられる。今後、臨床試験等を実施し、安全性・有効性を証明しなければならないが、RA治療における医療費の軽減や治療効果の向上に本投薬法が寄与できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチ薬における時間薬理学研究は、基礎及び臨床研究で、種々の検討が行われてきた。タクロリムスのように、実臨床で、それが応用されているが、多くの抗リウマチ薬で、臨床応用は未達である。本研究では、JAK阻害剤を対象に、実験動物にて時間薬理学研究を実施し、投薬時刻の違いによって治療効果が大きく変化することを明らかにした。

今後、臨床研究などが必要であるが、抗リウマチ薬の時間治療が、臨床において有益であることを本研究を通して明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：We investigated influence of dosing-schedule on antirheumatic effects after Tofacitinib (TOF) was given in mice. When TOF (30 mg/kg) was given once a day at 5:00 or 17:00, the 5:00-treated group inhibited 50% of articular increase compared with the control group in mice. Whereas, inhibition rate of arthritis score in the 17:00-treated group remained in 16% relative to the control group. Next, mice were given with one dose as the same amount (15 mg/kg), and TOF was administered once a daily (15 mg/kg/day) at 5:00 or twice daily (30 mg/kg/day) at 5:00 and 17:00. Arthritic depression effect in the once daily 5:00-treated group (15 mg/kg/day) was equivalent to that in the twice daily group (30 mg/kg/day). These findings show that to treat TOF once a day considering suitable dosing-time may improve RA symptoms compared with the current standard dosing methods.

研究分野：時間薬理学

キーワード：生体リズム 関節リウマチ JAK阻害剤

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) 治療は、生物学的製剤の開発により、劇的に治療成績が向上した。しかし、それに伴う医療費の高騰が問題となるとともに、生物学的製剤特有の副作用や投与経路 (静脈内注射、皮下注射) が、治療実施及び継続を困難にすることも多い。近年開発された低分子化合物の RA 治療薬として期待されているヤヌスキナーゼ (JAK) 阻害剤は、炎症性サイトカインの産生に関わる JAK を標的とし、抗リウマチ活性を示す。本剤の特徴は経口投薬できることであり、分子標的を同等の作用機序を持つ生物学的製剤とは、患者自身で容易に使用できるという面で大きな差異がある。しかし、本薬剤の使用も、医療費が高く費用対効果の観点から、なかなか主力薬剤として RA 治療に貢献できていない。

申請者は、これまで生体リズムを考慮した時間薬物療法を研究しており、RA 治療に関して基礎研究及び臨床研究で多くの研究成果を得てきた (Chronobiol. Int. 28: 267, 2011, Chronobiol. Int. 31: 564, 2014)。RA を発症すると、ヒトも実験動物も炎症反応や炎症性サイトカインに明瞭な日周リズムが発現する。申請者は、この特徴を考慮して、種々の抗リウマチ薬で有意な関節炎増悪抑制効果を示してきた (J. Pharm. Pharmacol. 61: 1333, 2009, J. Pharmacol. Sci. 116: 264, 2011, Chronobiol. Int. 31: 564, 2014)。JAK はシグナル伝達経路の最も上流であるサイトカイン受容体に会合している 4 つのチロシンキナーゼ (JAK1, JAK2, JAK3, TYK2) からなる family であり、炎症性サイトカイン産生に重要な役割を有している。申請者は、RA 発症時に生じる炎症性サイトカインの日周リズムの形成には、少なからず JAK が関与していると考えている。なぜなら、JAK に日周性があることで、サイトカイン産生にも周期性が生まれていると考えるからである。現在、RA 病態における JAK に関連する生体内因子の日周性変動は不明である。一方、JAK の日周性変動を捉えることができれば、JAK 阻害剤の時間薬物治療が可能となり、より有用性の高い薬物療法が臨床展開できるようになると期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究では、RA モデル動物を対象に、JAK に関連する生体内因子の日周性変動及びその機序の解明を行う。また、ここで得られた日周リズムを考慮した JAK 阻害剤の時間薬理実験を実施し、その有用性を評価する。また、周期が変化する場合は、それに伴う JAK 阻害剤の薬効に及ぼす投薬タイミングの影響を評価する。

### 3. 研究の方法

#### -1 投薬時刻の違いによる Tofacitinib の関節炎抑制効果の評価

感作日を Day 0 とし、SKG マウスに対して、Day 1 から Day 27 まで 5:00 または 17:00 に Tofacitinib (投薬量 30 mg/kg/day) を連日経口投薬した。Control 群には、0.5% methylcellulose/0.025% Tween 20 溶液を経口投薬した。関節炎スコアは、1 週間に 1 回評価した。

#### -2 投薬スケジュールの違いによる Tofacitinib の関節炎抑制効果の評価

感作日を Day 0 とし、SKG マウスに対して、1 回の投薬量を 15 mg/kg とし、1 日 1 回投薬群 (1 日の総投薬量 : 15 mg/kg) では 5:00 に、1 日 2 回投薬群 (1 日の総投薬量 : 30 mg/kg) では 5:00 と 17:00 に、Tofacitinib を Day 1 から Day 27 まで連日経口投薬した。関節炎スコアは、1 週間に 1 回評価した。

## Tofacitinib の血中薬物動態の測定

BALB/c マウスに対して、Tofacitinib (投薬量: 15 mg/kg) を経口投薬し、0.083、0.5、1、2、4 および 8 時間後に、吸入麻酔下で眼窩採血した。吸入麻酔は、マウス・ラット等小動物実験用簡易吸入麻酔装置 NARCOBIT-E (夏目製作所) を用いてセボフルランを使用した。得られた血液を遠心分離 (3,000 x g, 10 min, 15 ) し、血漿を得た。LC-MS/MS を用いて血中 Tofacitinib 濃度を測定した。

## JAK1 タンパク質の日周リズム測定

BALB/c マウスを対象に、6 時点 (9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00) で脾臓を採取し、実験で使用するまで -80 で保存した。Western blot 法を用いて、各時点における JAK1 タンパク質量を測定した。

## 4 . 研究成果

### -1 投薬時刻の違いによる Tofacitinib の関節炎抑制効果の評価

SKG マウスを対象に、5:00 または 17:00 に Tofacitinib (30 mg/kg) を感作翌日 (Day 1) から Day 27 まで連日経口投薬し、1 週間に 1 回 (Day 0, 7, 14, 21, 28) 関節炎スコアを評価した。

5:00 投薬群は、Day 7 以降すべての測定ポイントで Control 群と比較して有意に低い関節炎スコアを示した ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively, Figure 1)。また、17:00 投薬群と比較して、5:00 投薬群では、投薬開始初期より顕著に高い関節炎抑制効果を示した ( $P = 0.064$ : Day 7,  $P < 0.01$ : Day 14 およ

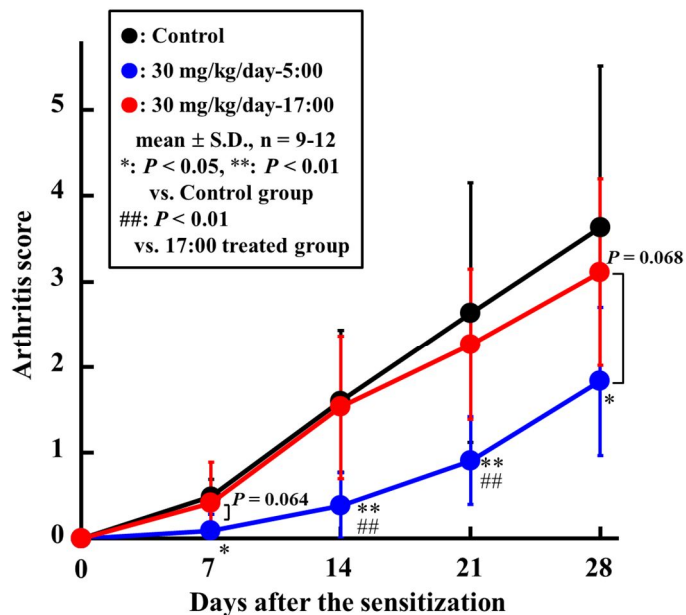


Fig. 1 Tofacitinib (30 mg/kg) の投薬時刻の違いによる関節炎スコアへの影響

び Day 21,  $P = 0.068$ : Day 28)。一方で、17:00 投薬群の関節炎スコアの変化は、Day 14 まで Control 群と同程度であり、Day 21 以降は Control 群と比較して低い値だったが有意な差異はみられなかった。

### -2 投薬スケジュールの違いによる Tofacitinib の関節炎抑制効果の評価

先の実験結果より、Tofacitinib は投薬時刻の違いにより関節炎抑制効果に差異が生じることが明らかになり、時間薬物療法を実施することで、既存の治療法よりも高い有効性を得ることができると考えられる。Tofacitinib は、実臨床では 1 日 2 回連日経口投薬される薬剤である。先の実験で、5:00 投薬では高い関節炎抑制効果を示したが、17:00 投薬群の関節炎スコアは Control 群と同程度であり、17:00 投薬ではほぼ薬効を示さなかった。1 日 2 回投薬する場合、1 回の投薬を有効性の高まる適切なタイミングに投薬したとしても、残り 1 回の投薬タイミングは、適切ではなく有効性が低くなるタイミングである可能性がある。そのため、患者は、効果の低い薬剤を無駄に服用することになってしまうかもしれない。そこで、適切な投薬タイミングに投薬すること

で、1日1回でも十分に関節炎の進行を抑制でき、1日2回投薬する必要がなくなるのではないかと考え、次の実験を行った。

1回の投薬量を15 mg/kgとし、1日1回投薬群(1日の総投薬量:15 mg/kg)では5:00に、1日2回投薬群(1日の総投薬量:30 mg/kg)では5:00と17:00に、TofacitinibをDay1からDay27まで連日経口投薬した。関節炎スコアは、1週間に1回評価した。

1日1回投薬群と1日2回投薬群は、どちらもDay7以降Control群と比較して有意に低い関節炎スコアを示した( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively, Figure 2)。1日1回投薬群と1日2回投薬群は、1日の総投薬量に2倍量の差があるにも関わらず、2群間の関節炎スコアは同程度であり、同等の関節炎抑制効果を示した。

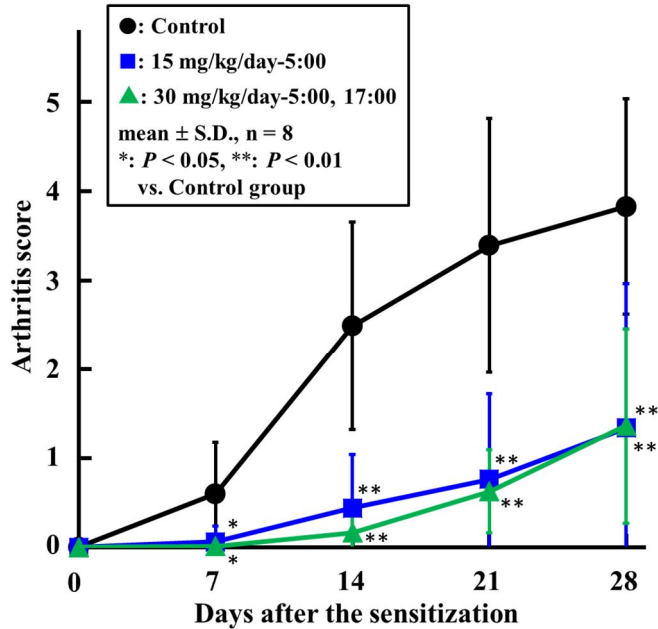


Fig. 2 Tofacitinibの投薬量の違いによる関節炎スコアへの影響

#### Tofacitinibの血中薬物動態の測定

BALB/c マウスを対象に、5:00 または 17:00 に Tofacitinib (15 mg/kg) を単回投薬し、投薬後 0.083、0.5、1、2、4 および 8 時間目に採血し、血漿中 Tofacitinib 濃度を測定した。投薬 4 時間後までの血漿中 Tofacitinib 濃度は、2 群間に有意な差異はなかった。しかし、8 時間後において、5:00 投薬群の血漿中 Tofacitinib 濃度は、17:00 投薬群と比較して有意に高かった。また、各群の  $AUC_{0-8h}$  の平均値および標準偏差を算出したところ、5:00 投薬群は  $1,282 \pm 606$  (ng/mL · hr)、17:00 投薬群は  $1,393 \pm 439$  (ng/mL · hr) であり、2 群間に有意な差異はみられなかった。

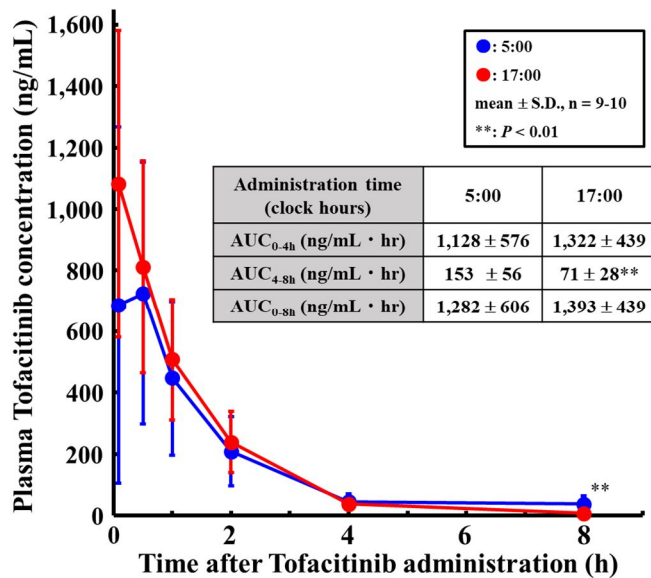


Fig.3 Tofacitinibの投薬時刻の違いによる血中濃度への影響

#### JAK1 タンパク質の日周リズム測定

BALB/c マウスを対象に 6 時点 (9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00) で脾臓を採取し、JAK1 タンパク質量を測定した。BALB/c マウスにおける JAK1 タンパク質量は、21:00 にピーク、9:00 にトラフとなる周期変化がみられたが、有意な日周リズムではなかった。

まとめ

Tofacitinib の投薬時刻を変えることで、関節炎の増悪を顕著に軽減できることが明らかとなった。ここで得られる薬効の差は、効果が弱い 17:00 投薬群において、5:00 投薬群よりも AUC がわずかながら高かったという血液中薬物濃度の差異で説明することができなかった。標的タンパク質である JAK1 には、日周リズムがあるように見える。しかし、この周期性変動と薬効との関連性を本研究では証明することができず、今後、詳細な検証が必要であると考えている。IL-6 など種々の炎症性サイトカインは、マウスやラットにおいて、暗期後半(5:00)から明期前半(9:00)にかけて高値を示すことが知られている。これらが高いときに、Tofacitinib を投薬すると高い効果が得られたため、サイトカインが高濃度で存在するタイミング(時刻)で投薬すると、効果が高まりやすいのかもしれない。

Tofacitinib (商品名：ゼルヤンツ) は、実臨床では 1 日 2 回服用されている。Fig.1 で示した時間薬理実験において、本薬剤は、17:00 投薬ではまったく薬効を示さないことが明らかとなった。1 回の服用量を同用量 (15 mg/kg) として、有効性の高い時間帯の 5:00 に 1 日 1 回と、既存の投与方法にあわせて、5:00 と 17:00 に 1 日 2 回投薬したとき、1 日 1 回 5:00 で十分に同等の効果が得られた。したがって、時間薬物療法を応用することで、効果を維持したまま 1 日量を減量できるかもしれない。また、より高い有効性を求めて 1 日量を変えず、効果が高まりやすい投薬タイミングに 1 日 1 回服用することで、効き目が弱かった人の効果増大に寄与できるかもしれない。

今後、臨床試験等を実施し、本投薬法の安全性・有効性を証明しなければならないが、RA 治療における医療費の軽減や治療効果の向上に本投薬法が寄与できるのではないかと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤 秀人
2. 発表標題 SKGマウスを対象としたトファシチニブの投薬時刻の違いによる抗リウマチ効果への影響
3. 学会等名 日本リウマチ学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------