

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790531

研究課題名(和文) 生体リズムを基盤とした抗リウマチ薬の至適投与設計の構築

研究課題名(英文) Application of chronotherapy of antirheumatic drug to perform proper therapy

研究代表者

藤 秀人 (To, Hideto)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：90346809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：臨床研究では、メトトレキサートによって治療を受けている関節リウマチ(RA)患者を対象に、多施設無作為割付二重盲検比較試験を行っている。中間解析では、既存治療群と比較して時間治療群において治療成績が高い傾向を示した。基礎研究では、RAモデル動物を対象に炎症反応の日周リズムを評価した結果、RA発症前では認められなかったが、RA発症後に血中SAA(炎症の指標)やTNF-alphaに明瞭な日周リズムがあることが明らかとなった。今後、この機序解明を実施することで、個別化治療に向けた投薬マーカーの同定が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have performed the randomized double blind controlled trial of chronotherapy against rheumatoid arthritis (RA) patients treated methotrexate (MTX). We divided into two groups of the standard MTX schedule and chronotherapy schedule, in which the dose and number of doses per week were not changed from the standard MTX schedule of each patient but MTX was administered once a day at bedtime. In interim report, the chronotherapy schedule group improved therapeutic effects compared with the standard MTX schedule group. In basic study, we investigated what cytokines and/or transcriptional factors are involved in the formation of 24-hour variations in TNF-alpha levels after the onset of RA using MRL/lpr mice. SAA and TNF-alpha concentrations clearly exhibited 24-hour rhythms with higher levels at the light phase and lower levels at the dark phase after RA crisis. One of the causes of the 24-hour rhythm of TNF-alpha expression in RA may have been clarified by this study.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：応用薬理学

キーワード：関節リウマチ メトトレキサート 時間治療 臨床研究 生体リズム 個別化治療

## 1. 研究開始当初の背景

時間薬物療法は、地球上に生息するヒトを始めとした多くの生物に存在する各種生体内成分の生体リズムおよび投薬する薬物の薬物動態や標的細胞等への親和性等の日内変動を考慮して、最適な投薬タイミングに薬物を投薬することで高い治療効果と安全性を実現する生体に優しい薬物療法である。実際に気管支喘息や脂質異常症などでは、発作などが高発現する時刻に効率的に薬物を投薬する時間薬物療法が国内外で汎用されている。申請者は、時間薬物療法は短期的・長期的な視野で検討すべき非常に有益な研究テーマであり、社会的な貢献度も高いと考えている。短期的な成果としては、“投薬時刻”を変えるとという簡潔・明快な方法により既存薬の眠っているポテンシャルを呼び覚ますことで、現在の治療法と比較しても治療成績の向上が期待できることである。さらに、本治療法は、新薬開発などを勘案すると開発コストの軽減や臨床現場にて既存の医薬品を用いるため国内外の多くの診療施設への速やかな波及が可能であると考えられる。また、長期的な研究成果として、これらの概日リズムの制御機構を解明し、概日リズム形成制御因子をターゲットとした新薬を開発することで、現在の治療薬と比較してより有効性の高い治療薬が開発できると考えられる。以上の観点から、申請者は疾患治療法の一法として時間薬物療法を広く臨床応用したいと考えている。

申請者は、これまでに抗がん剤の基礎研究ならびに臨床研究において、薬物の投薬タイミングを考慮することで治療効果の向上や副作用の軽減が可能になることを明らかにしてきた (Chronobiol. Int. 18: 851, 2001; J. Pharmacol. Exp. Ther. 315: 764, 2005)。また、これらの研究を通して、実験動物のデータにおいて、抗がん剤の副作用が軽減できる時刻を体系化し、これを基に抗がん剤の併用を検

討したところ、従来の併用方法と比較しより高い安全性と有効性を示す投与スケジュールの提案に成功した (Cancer Res. 65: 8448, 2005; 平成 18 年度 日本医療薬学会奨励賞)。以上より、各薬物の最適な投薬時刻を体系的に取りまとめ、これらを応用することで、より安全かつ効果的な時間薬物療法の提案が可能になるものと期待される。

時間薬物療法を多くの疾患で体系的に応用できるようにするためには、各種疾患で認められる概日リズムの制御機構の解明とそれに基づく各薬物の至適投薬タイミングの同定が必要である。そこで、申請者は関節リウマチ(RA)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。また近年、朝のこわばりに対応するように血液中の炎症性サイトカイン (IL-6 や TNF- $\alpha$  など) が早朝に増加することが報告され (Ann. Rheum. Dis. 62: 593, 2003)、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。このような作業仮説に基づき申請者は、複数の抗リウマチ薬を対象とした基礎研究及びメトトレキサート (MTX) を対象とした臨床研究を行った。これまでに、RA モデル動物を用いて、抗リウマチ薬であるメトトレキサート (MTX) を投薬した結果、投薬時刻の違いによって有意に関節炎を抑制できることを明らかにした (J. Pharm. Pharmacol. 61: 1333, 2009)。また、RA 患者に対しても、従来の投与方法から夜間にのみ MTX を投薬する時間薬物療法に変更することで、治療効果の指標である DAS28 が時間治療開始前と比較して有意に減少し、その抑制効果は観察期間の 3 ヶ月間保持されるという成果を得た。(平成 21 年度 厚生労働科学研究費補助金研究報告書;平成 22 年 臨床薬理研究振興財団 研究大賞)

以上のように、RA 症状の改善が長期間認められなかった患者に対して、MTX の投与量や投薬回数を変えることなく投薬時刻のみを変更するといった非常にシンプルな治療方法によって、従来の治療法と比較し時間薬物療法で高い治療成績が得られることを申請者は明らかにした。

## 2. 研究の目的

### (1) 抗リウマチ薬 MTX の時間薬物療法

従来の MTX の投与方法群（既存投薬群）と申請者が新たに提案した寝る前投薬群（時間治療群）の 2 群を設けた無作為割り付け二重盲検比較試験を実施し、既存投薬群と比較し時間治療群で、安全性を維持しつつ高い治療効果が得られるか否かを評価する。

### (2) 患者一人一人に合わせた個別化時間薬物療法を構築するための生体リズム診断法の開発

基礎研究および臨床研究によって、RA 患者の生体リズムを考慮した薬物療法の有用性を示してきた。しかし、現代社会ではヒトの生活習慣の多様化が進み、実験的に規格化された集団である実験動物のように固定化した投薬時刻では、患者一人一人に対して適切な時間薬物療法が提供できない可能性が考えられる。そのため、患者一人一人の体内時計（最適な投薬タイミング）を計測する生体リズム診断法の開発が必要となる。そこで、本研究では、時間薬理学的な効果を示した薬剤を対象に、薬物の効果とその機序との関連性を明らかにし、生体リズム診断法のプロトタイプを開発する。

## 3. 研究の方法

### (1) RA 患者を対象とした多施設無作為割り付け二重盲検比較試験

MTX を投薬中の RA 患者でインフォームド・コンセントが得られた被験者を対象に、既存の投薬方法群と時間治療群の 2 群に無作

為に分け、二重盲検比較試験を実施した。既存投薬群では、試験実施時に服用している投与方法で MTX を継続使用した。時間治療群では、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 1 日 1 回寝る前投与とした。調査日は無作為割り付け時及び観察期間 2 ヶ月目、4 ヶ月目の計 3 回とし、disease activity score (DAS) 28 および European league against rheumatism (EULAR) 改善基準、MHAQ、白血球数などを測定した。

### (2) RA モデル動物を対象にした概日リズム解析

・実験動物：明暗周期（明期；7:00-19:00）、自由摂食飲水条件下で 2 週間以上飼育した 10、15 週齢 MRL/lpr 雄性マウスを使用した。概日リズムの検討では、マウス白血球、脾臓または血漿を 6 時点（9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00）のいずれかの時刻に採取し、実験に使用した。

・血漿中 SAA 濃度および IgG-RF 抗体価測定：得られた血漿を ELISA 法により測定した。血漿中サイトカイン濃度測定：得られた血漿を抗体マイクロアレイ法により測定した。

・各種サイトカイン mRNA 発現量測定：各種サイトカイン mRNA 発現量は total RNA を抽出後、beta-actin を内部標準とする Real-time PCR 法により測定した。

・使用薬剤：抗リウマチ薬は MTX を用い、1% に調製したメイロン<sup>®</sup>に溶解し、腹腔内投与した。

・MTX の投薬時刻の違いによる RA 治療効果への影響：10 週齢の MRL/lpr マウスを使用した。投薬は 10 週齢から開始し、1 週間の内に MTX 10 mg/kg or vehicle 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、10 週齢から 12 週齢まで続けた。サンプリン

グは休薬期間最終日の day 7 (11 週齢) と day14 (12 週齢) の 9:00 に行った。そして RA 治療効果を SAA 濃度および IgG-RF 抗体価、サイトカイン濃度にて評価した。

ルシフェラーゼレポーターアッセイ: マウス TNF- $\alpha$  遺伝子の 5' 上流域 (約 1.2kbp) のクローニングを行い、pGL3-basic Vector に導入し TNF- $\alpha$  レポータープラスミドを作成した。リポフェクション法により LT- $\alpha$ 、LT- $\beta$  発現プラスミドと共に EL-4 細胞にトランスフェクトし、48 時間培養後にルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) RA 患者を対象とした多施設無作為二重盲検比較試験

本試験は、現在も継続実施中であり、本報告では試験が終了した RA 患者 29 例の中間解析結果を報告する。29 名の RA 患者がエントリーされたが、試験開始前に選択基準から逸脱した症例や参加を辞退した症例、他の疾患で入院となった被験者を除いた 16 名が無作為割り付け対象となった (脱落率 48.3%)。既存治療群 8 名と時間治療群 8 名に分けられた被験者は、4 ヶ月間任意の治療法にて、MTX の投薬が実施された。観察期間中、時間治療群の被験者 1 名が、転倒による骨折となったため、解析対象から除外した。

時間治療群の解析対象者は 7 名で、男性は 2 例、女性は 5 例であり、平均年齢は 69.9 歳であった。一方、既存治療群の解析対象者は 8 名で、男性は 1 例、女性は 7 例であり、平均年齢は 57.6 歳であった。

ブラインド試験開始時の被験者の DAS28 は、時間治療群で 4.05、既存治療群で 3.98 であり、両群間に有意な差異は認められなかった。

EULAR 改善基準の中等度反応は、時間治療群で 7 名中 5 名 (71.4%)、既存治療群で 8 名中 3 名 (37.5%) であり、統計学的な有意性は見られないが時間治療群で治療効果が得

られやすい傾向が見られた。

##### (2) RA モデル動物を対象にした概日リズム解析

RA 症状の進行にともなう RA 因子の日内変動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 週齢共に有意な日内変動が認められなかった。しかし、10 週齢の血中 SAA 濃度では有意な日内変動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。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。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。そこで、炎症に関与する TNF- $\alpha$  の概日リズムをターゲットとし、抗リウマチ薬である MTX の時間薬理的検討を試み、RA の治療効果を評価したところ、TNF- $\alpha$  の概日リズムがピークを示す前に投薬した方が、トラフを示す前に投薬した方と比較し、有意に RA の治療効果が得られた。

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のある因子として炎症性サイトカインである

LT- $\alpha$ , 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- $\alpha$ , LT- $\beta$ の影響について検討した結果、LT- $\alpha$ , LT- $\beta$ 共存下において形成される LT $\alpha_1\beta_2$  または LT $\alpha_2\beta_1$  とそのレセプターである LT- $\beta$ R を介した LT シグナル伝達が、RA における TNF- $\alpha$  の概日リズムの形成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

本研究により、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、炎症性サイトカインである 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および投薬実験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。以上より、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。投薬実験においても、炎症に関与する TNF- $\alpha$  の概日リズムを考慮して MTX を投薬することで RA の治療に有効であることが示唆された。

また、MRL/lpr マウスにおいて RA 症状の進行にともなう 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- $\alpha$ , LT- $\beta$  が関与している可能性が示唆された。

以上、本研究より RA 病態における炎症反応の概日リズムの形成に関わる生体因子を同定することができた。今後、これらの成分などが投薬マーカーとして利用可能か否かについて検証していく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Yoshimatsu H., Okazaki F., Ieiri I., To H.; Mechanism of the 24-hour rhythm of tumor necrosis factor-alpha formed by onset of rheumatoid arthritis. *Chronobiol. Int.* 31: 564-571, 2014. (査読有)
2. Kanasaki Y., Tomonari M., Sasaki H., To H.; Chronopharmacology of mizoribine in collagen-induced arthritis rats. *J. Pharmacol. Sci.* 120: 112-120, 2012. (査読有)
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 mice. *J. Pharmacol. Sci.* 116: 264-273, 2011. (査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 小山葵、田中安紀、河村銀河、五十嵐信夫、藤秀人；メトトレキサートの少量頻回投薬による関節炎増悪抑制効果への影響 第 34 回 日本臨床薬理学会（東京、2013 年 12 月 5 日）
2. 藤秀人；関節リウマチの時間薬物療法 日本薬学会第 133 年会（横浜、2013 年 3 月 30 日）
3. 藤秀人；生物時計とリウマチ 第 20 回 日本時間生物学会学術大会（大阪、2013 年 11 月 9 日）
4. 藤秀人；タイミングの重要性 第 6 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム（京都、2012 年 11 月 24 日）
5. 曾根本 恵美、藤秀人、辻 泰弘、紙谷 友里子、寺田 馨、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 第 44 回 九州・沖縄支部学術集会（北九州、2012 年 9 月 15 日）
6. 藤秀人；時間治療の実践（薬剤師の立場から）医療薬学フォーラム 2012（福岡、2012 年 7 月 14 日）

〔図書〕(計 2 件)

1. 藤秀人;変形性関節症、関節リウマチ。「時間治療学」藤村昭夫編, 82-90, 日本医事新報社, 東京, 2014.
2. 藤秀人;リウマチ。「時間薬理学による最新の治療戦略」大戸茂弘編, 276-91, 医薬ジャーナル社, 東京, 2013.

〔その他〕

1. ”からだの時計”が医療を変える、クローズアップ現代, NHK (2012年4月23日)
2. ダイエットからがん治療まで!“時計遺伝子”活用術、あさイチ, NHK (2012年5月9日)
3. 日本時間生物学会 奨励賞「時間薬物療法の臨床応用を目指したトランスレーションリサーチ」(2013年11月10日)
4. 第34回日本臨床薬理学会学術総会 優秀演題賞「トトレキサートの少量頻回投薬による関節炎増悪抑制効果への影響」(指導学生受賞)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤 秀人 (Hideto To)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・  
教授

研究者番号: 90346809