

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25515003

研究課題名(和文) ヒトの関節炎と睡眠障害の研究

研究課題名(英文) Study on the relationship between arthritis and the quality of sleep

研究代表者

塩沢 俊一 (Shiozawa, Shunichi)

九州大学・大学病院・学術研究員(特任教授)

研究者番号：40154166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：RAの疾患活動性と睡眠の質の関係について、RA 284例でみたPittsburghスコアはglobal score  $6.42 \pm 2.76$  と正常域5を超えて有意に睡眠障害があると判断された。アクチグラフィでは %sleep  $89.1 \pm 10.5$ , total wake after sleep  $49.5 \pm 45.2$  min, average wake after sleep onset  $9.9 \pm 23.3$  times と健常対照者に比し睡眠障害が示唆され、これら指標は血中CRP値と腫脹関節数と相関を示した ( $p < 0.02$ )。生物学的製剤治療RA 517例においてこれら睡眠の質障害が有意に改善された。

研究成果の概要(英文)：The contribution of inflammation (arthritis) to the quality of sleep and vice versa was studied in the patients with rheumatoid arthritis (RA). We have studied 517 patients with rheumatoid arthritis with biologic DMARDs (tocilizumab 175, abatacept 98, or infliximab 144). Evaluation was made with Pittsburgh score, Epworth score and actigraphy, and the results were compared with arthritic indices. As a result, Pittsburgh score showed presence of sleep disturbance, in which global score showed  $6.42 \pm 2.76$  which was higher than normal level 5, thus indicating the presence of sleep disturbance. Actigraphy showed that %sleep  $89.1 \pm 10.5$ , total wake after sleep  $49.5 \pm 45.2$  min, average wake after sleep onset  $9.9 \pm 23.3$  times, and these values were abnormal as compared with healthy controls. Further, these values showed a positive correlation with C-reactive protein levels and swollen joint counts of patients. After biologic DMARDs treatments ( $n=517$ ), these abnormalities were all normalized.

研究分野：内科学、膠原病学

キーワード：関節リウマチ 睡眠 生物学的製剤 rheumatoid arthritis sleep biological DMARDs

## 1. 研究開始当初の背景

夜間の照明が昼の如く明るい現代社会にあっては、睡眠あるいは日内リズムがヒトの健康に及ぼす影響は無視できない重要な研究課題になって来ていた (Edgar RS et al. **Nature** 485:459, 2012)。本研究の申請時にはとくに睡眠研究が重視され日内リズムにかかる Period 転写因子の制御機構 (Padmanabhan K et al. **Science** 337:599, 2012)や Clock:BMAL1 転写複合体蛋白の立体構造が解明される (Huang N et al. **Science** 337:18, 2012) など睡眠研究は飛躍的に進んで来ていた。こうした流れの中で、私達の研究は、紛れもなく睡眠と疾病の関わりに関する最初の直接的証拠の一つであるが、研究は初めから意図された訳でなく、元より RA の強い関節腫脹と破壊、中でも“腫瘍様”と古来形容されてきた‘無制限ではないが無制限に近いほど強い滑膜増殖’の原因を求めて、私達はこれが c-Fos 過剰に起因することを突き止め、特異的 c-Fos 阻害薬を開発して現在に至ったが、本申請は、古来有名な「リウマチ気質」が、ある意味不当な用語で、本当は疾患に依り来った病態、すなわち治療により克服し得るという可能性に基づいて企画された。

## 2. 研究の目的

私達は RA の発症病因を研究する中で、RA の中核症状が関節 (滑膜) の腫脹および破壊にあり、関節の主要構成要素である滑膜細胞の、古来から腫瘍様と形容されている、強い滑膜増殖と、特有の関節周囲の骨粗鬆症、のいずれもが増殖性転写因子 c-Fos の過剰によって生起し、これを阻害することによって関節炎・関節破壊が改善することを見出した(J

**Clin Invest** 99:1210, 1997; **Ann Rheum Dis** 59:636, 2000)。さらに、c-Fos 転写因子の結合部位である AP-1 サイトにおいて c-Fos に拮抗して c-Fos の DNA への結合を阻害する c-Fos 阻害薬を開発した (**J Med Chem** 47:4239, 2004; **J Med Chem** 49:80, 2006; **Nature Biotechnol** 26:817, 2008)。

この中で注目されたのは、c-Fos が immediate early gene として G1 早期に発現して DNA 合成を促進させる一方、同時に Wee1 キナーゼのプロモーターに直接結合して Wee1 の発現を亢進させる点であった。すなわち、Wee1 は M 期移行にかかる MPF (mitosis promoting factor) の Cdc2 の 15 位 tyrosine をリン酸化させて MPF を不活化させることを私達は見出した (**EMBO J** 20:4618, 2001; **Oncogene** 22:6839, 2003)が、このことは、RA では c-Fos が亢進して過増殖すると同時に Wee1 が亢進して細胞分裂しない、すなわち RA の腫瘍様増殖が再現されることを意味し、古来腫瘍様と形容されながら原因不明であった RA 特有の腫瘍様滑膜増殖の原因が c-Fos 過剰にあることを示すものであった。

さらに驚いたことに、Wee1 の亢進が日内リズムにも深く関わるとする岡村らの知見を受けて、私達は岡村らと共にマウスに実験的関節炎を起こし、関節炎により日内リズムにかかる Per, Bmal, Clock 等の日内周期が遅延ないし低下する等著しく乱れること、反対に日内リズムを欠く Cry ノックアウトマウスに誘起した実験関節炎は対象 littermate に比して関節炎が最大限度まで増悪することを見出した (**J Immunol** 184:1560, 2010)。

このことは、関節炎が日内リズムに、また反対に日内リズムが炎症 (関節炎) に影響を

及ぼすことを実験的に明示し、ヒトにおける睡眠という日常生活動作 activity of daily living (ADL)に属する一要素が、関節炎という疾患に明確な影響を及ぼす可能性を強く示唆し、昔から示唆された RA の病状に対する気圧変化など日常事象の影響の分子医学的証左といえる。そこで私達は、442 例の RA 患者で睡眠の様相を、現在頻用される Pittsburg スコア、そしてこれを客観的に裏付けるアクチグラフィーおよびソムノグラフィーを用いて調べた結果、Pittsburg グローバルスコアが  $7.57 \pm 4.94$  と対照の  $2.67 \pm 1.70$  と比して正常限界 5 を超えて有意に高く、アクチグラフィー等の結果は RA 患者に覚醒時間の増加、睡眠効率の低下、中途覚醒の増加、長期覚醒の増加などのあることを示し、これらは RA の疾患活動性 (DAS28-CRP や炎症指数) との間に相関を示した。

そこで今回、ヒトにおいて実際、炎症が睡眠にまた睡眠が炎症に及ぼす影響について RA すなわち関節の炎症 (関節炎) で検証する。すなわち、生理的見地からさらに一步踏み込んで、睡眠と炎症の関わり合いの分子機構を明らかにすることによって睡眠と疾病にかかる時間疾患学とでも言うべき学問領域を推進すると同時に、具体的に、いわゆるリウマチ気質は疾病に因るものであって RA の治療により改善すべき症候と捉えて、治療を企図して、一方で RA の疾患活動性に対する生物学的製剤や私達の開発した c-Fos 阻害薬による治療的介入によって、睡眠障害が除去されて明るい方向へ患者の ADL が改善されることを目指す。また反対に、RA 患者の睡眠を生理的日内リズム改善薬であるメラトニ

ン或いは他の睡眠導入薬を用いて改善させることによって、RA 患者の睡眠のみならず疾患活動性までが改善されるか否かについて医学的に検証した。目標を達成するために本研究は、臨床的に、生物学的製剤等の治療の前後を通じて、患者の疾患活動性の変化と共に治療の睡眠障害への効果を検証し、また反対に、夜のホルモンであるメラトニンの臨床的投与の睡眠および疾患活動性への効果を正常の睡眠への導入という視点から調べた。

### 3. 研究の方法

炎症が睡眠に及ぼす影響を調べる目的で、生物学的製剤 (トシリズマブ、アバタセプト、インフリキシマブ) を投与して RA を治療する治療的介入を行う (n=517) 中で、治療的介入によって、患者の睡眠障害が改善されて ADL が向上するか否かを、世界的に認証された睡眠障害にかかるアンケート調査として主観的尺度 Pittsburgh スコア、昼間における睡眠傾向を判定するアンケート調査として Epworth スコア、および時計に似て手に装着して体の動態を解析できる客観的尺度であるアクチグラフィーを用いて検証した。この際、関節炎症の指標についてその変化を治療の前後に患者末梢血で定量して比較した。またこの反対に、睡眠が炎症に及ぼす影響を調べる目的で、RA 患者の睡眠を生理的日内リズム改善薬であるメラトニン或いは他の睡眠導入薬を用いて改善させることによって、RA 患者 (n=10) の睡眠の程度を上記の主観的・客観的にモニターしつつ、RA の疾患活動性までが改善されるか否かを検証した。

### 4. 研究成果

炎症が睡眠の質に及ぼす影響、及びその逆の影響を調べ、以て炎症と睡眠の相互関係を関節リウマチ RA の ADL 改善への寄与を調

べるために、最初 RA (n=284) の観察研究で、RA 患者の睡眠の実態について Pittsburgh スコア、Epworth スコアおよびアクチグラフィーを用い、Pittsburgh スコアは global score  $6.42 \pm 2.76$  と正常域 5 を超えて有意に睡眠障害が示唆された。昼間の眠気指標である Epworth スコアは予想通り異常は見出されなかった。アクチグラフィーの結果は、%sleep  $89.1 \pm 10.5$ , total wake after sleep  $49.5 \pm 45.2$  min, average wake after sleep onset  $9.9 \pm 23.3$  times と全て対照に比し有意 ( $p < 0.02$ ) に増加を示し睡眠異常が示唆されたが、wake after sleep onset は  $8.0 \pm 4.7$  times と変化なかった。これら指標と疾患活動性との関係を調べると、%sleep, total wake after sleep, wake after sleep onset, average wake after sleep onset の 4 項目において血中 CRP 値と相関が見出された。また、%sleep, wake after sleep onset, average wake after sleep onset と腫脹関節数との間にも有意の相関があった。さらに、現在最終解析中の予備的結果によれば、生物学的製剤使用 (トシリズマブ、アバタセプト、インフリキシマブ) により RA 517 例において、前三者 (睡眠の質異常) が有意に改善されており、RA の疾患活動性の改善が患者 ADL の改善に有効であることが強く示された。反対に睡眠改善を図ることが RA の疾患活動性に影響を及ぼすか否かにかかる研究は、当初ラメルテオン至適投与量決定のために遂行した研究において必ずしも共同研究者の協力が得られず計 10 例 (加古川病院 6 例、私の外来 4 例) と例数が集積されず、この中の解析結果では、ラメルテオン投与前後において RA の疾患活動性が有意差に改善されたとする結果は見出されなかった。

## 5 . 主な発表論文等

{ 雑誌論文 } ( 計 14 件 )

1. Kameda H, Shiozawa S (最終第 4 著者). A merged presentation of clinical and radiographic data using probability plots in a clinical trial, the JESMR study. *Ann Rheum Dis* 72(2): 310-312, 2013. Doi:10.1136/annrheumdis-2012-201804.
2. Yoshida K, et al, Shiozawa S (最終著者). Mixed connective tissue disease (MCTD) is distinct from SLE: study of MICA and HLA gene polymorphism. *Tissue Antigens* 81:44-45, 2013. doi: 10.1111/tan.12027.
3. Yamada K, et al, Shiozawa S (第 7 著者). *EWS/ATF1* expression induces sarcomas from neural crest-derived cells in mice. *J Clin Invest* 123 (2): 600-610, 2013. doi: 10.1172/JCI63572.
4. Yoshida K, et al, Shiozawa S (最終著者). TNF- $\alpha$  modulates expression of the circadian clock gene *Per2* in rheumatoid synovial cells. *Scand J Rheumatol* 42 (4): 276-280, 2013. doi: 10.3109/03009742.2013.765031.
5. Miyazaki Y, et al, Shiozawa S (最終著者). Self-organized criticality theory and the expansion of PD-1 positive effector CD4 T cells: search for autoantibody-inducing CD4 T cells. *Front Immunol* 4:87, 2013. doi: 10.3389/fimmu.2013.00087.
6. Tsumiyama K, et al, Shiozawa S (最終著者). IFN $\gamma$ -producing effector CD8 T lymphocytes cause immune glomerular injury by recognizing antigen presented as immune complex on target tissue. *J Immunol* 191 (1):91-96, 2013. doi: 10.4049/jimmunol.1203217
7. Miyazaki Y, Shiozawa S. In vivo cell transfer assay to detect autoreactive T cell subsets. *Methods Mol Biol* 1142: 49-53, 2014. doi: 10.1007/978-1-4939-0404-4\_6.
8. Shiozawa S, Uto K. Studies on the T cell receptor (TCR) revision of autoantibody-inducing CD4 T (aiCD4 T) cell. *Methods Mol Biol* 1142:65-73, 2014. doi: 10.1007/978-1-4939-0404-4\_8.

9. Tsumiyama K, [Shiozawa S](#). Induction of de novo autoimmune disease in normal mice upon repeated immunization with antigen. **Methods Mol Biol** 1142:85-90, 2014. doi: 10.1007/978-1-4939-0404-4\_10.
  10. Verheul MK, et al, [Shiozawa S \(最終著者\)](#). Anti-carbamylated protein antibodies in rheumatoid arthritis patients of Asian descent. **Rheumatology** 54(10):1930-32, 2015. Doi:10.1093/rheumatology/kev250
  11. Yoshida T, et al, [Shiozawa S\(最終第3著者\)](#). The impact of c-Fos/Activator protein-1 inhibition on allogeneic pancreatic islet transplantation. **Am J Transpl** 15:2565-75, 2015. Doi: 10.1111/ajt.13338.
  12. Ishida M, et al, [Shiozawa S \(最終第2著者\)](#). T-5224, a selective inhibitor of c-Fos activator protein-1, improves survival by inhibiting serum high mobility group box-1 in lethal lipopolysaccharide-induced acute kidney injury model. **J Intensive Care** 3:49, 2015. Doi:10.1186/s40560-015-0115-2.
  13. Shiozawa K, et al, [Shiozawa S \(最終著者\)](#). MMP-3 as a predictor for structural remission in RA patients treated with MTX monotherapy. **Arthritis Res Ther** 18:55 (9 pages), 2016. Doi:10.1186/s13075-016-0948-7.
  14. Kamide D, et al, [Shiozawa S\(最終第2著者\)](#). Selective activator protein-1 inhibitor T-5224 prevents lymph node metastasis in an oral cancer model. **Cancer Sci**. Doi:10.1111/cas.12914.
- [学会発表](計17件)
1. Tsumiyama K, [Shiozawa S](#). Antigen cross-presentation via Sec61 is indispensable for the development of lupus nephritis. **J Immunol** 182: 42.8, 2013.
  2. [Shiozawa S](#), et al. Pathogenesis of SLE and aiCD4 T cell: new insight. **J Immunol** 182: 133.14, 2013.
  3. Miyazaki Y, Tsumiyama K, [Shiozawa S](#). The autoantibody-inducing CD4 T cell causing SLE belongs to CCR4+CD45RB<sup>lo</sup>122<sup>lo</sup> subpopulation. **J Immunol** 182: 133.16, 2013.
  4. [Shiozawa S](#), et al. Weak TCR signaling due to repeated immunization with antigen is the key for peripheral TCR revision on generating aiCD4 T cell. **J Immunol** 182: 197.3, 2013.
  5. Miyazaki Y, Tsumiyama K, [Shiozawa S](#). PD-1+CD45RB<sup>lo</sup> 122<sup>lo</sup> autoantibody-inducing CD4 T cell (aiCD4 T cell) as a key in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Abstract 1648. ACR/ARHP Annual Meeting 13, Oct.27-30, 2013, San Diego.
  6. [Shiozawa S](#), et al. MMP3 as a predictor identifying a subgroup of RA patients who are successfully treated with MTX alone but still subject to radiographic progression. Abstract 2302. ACR/ARHP Annual Meeting 13, Oct.27-30, 2013, San Diego.
  7. [Shiozawa S](#), et al. Anti-carbamylated protein antibody in Japanese patients with RA. Abstract 1316. ACR/ARHP Annual Meeting 13, Oct.27-30, 2013, San Diego.
  8. Tsumiyama K, [Shiozawa S](#). Sec61 plays an essential role in facilitating antigen cross-presentation to induce immune glomerular injury: a novel 'Self-organized criticality theory' explaining the cause of SLE. The 101<sup>st</sup> Annual Meeting of American Association of Immunologists (AAI), May 2-6, 2014, Pittsburgh.
  9. Miyazaki Y, Tsumiyama K, [Shiozawa S](#). The autoantibody-inducing CD4 T cell (aiCD4 T cell) causing SLE belongs to PD-1+CD45RB<sup>lo</sup>122<sup>lo</sup> CD4 subpopulation. The 101<sup>st</sup> Annual Meeting of AAI, May 2-6, 2014, Pittsburgh.
  10. Shiozawa K, et al, [Shiozawa S](#). MMP3 predicts a subgroup of rheumatoid patients

- with structural remission under low-dose methotrexate (MTX) monotherapy. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR) 2014, June 11-14, Paris, France. Abstract FR10006.
11. Shiozawa K, et al, Shiozawa S. Long term efficacy of rheumatoid arthritis (RA) patients with adequate responses to methotrexate (MTX) on maintenance of function and structure: 3-year study results. EULAR 2014, June 11-14, Paris, France. Abstract AB0394.
  12. Miyazaki Y, Tsumiyama K, Shiozawa S. Proof of concept, self-organized criticality theory of autoimmunity: autoantibody-inducing CD4 T cell that causes SLE belongs to CD45RB-CD122-PD1+ subset. EULAR2014, June 11-14, Paris, France. Abstract AB0192.
  13. Tsumiyama K, Shiozawa S. Sec61 is essentially required for antigen cross-presentation and induction of lupus kidney disease: proof of concept, self-organized criticality theory explaining the cause of SLE. EULAR2014, June 11-14, Paris, France. Abstract AB0031.
  14. Shiozawa K, et al, Shiozawa S. Good response to methotrexate (MTX) and/or MTX plus adalimumab (ADA): 3yrs study results in patients with RA. Abstract 2510. ACR/ARHP Annual Meeting 13, Nov.15-19, 2014, Boston.
  15. Tsumiyama K, Shiozawa S. Increase of endosomal Sec61 enhances antigen cross-presentation and induces immune glomerular injury: a novel 'self-organized criticality theory' explaining SLE. The American Association of Immunologist (AAI), 102nd annual meeting, May 8-12, 2015, New Orleans.
  16. Shiozawa S, Miyazaki Y, Tsumiyama K. Specifying the autoantibody-inducing CD4 T cell causing SLE out of PD-1<sup>+</sup>CD45RB<sup>lo</sup> 122<sup>lo</sup> CD4 subpopulation using mass spectrometry. The AAI, 102nd annual meeting, May 8-12, 2015, New Orleans.
  17. Tsumiyama K, Shiozawa S. Endosome-to-cytoplasm pathway via Sec61 and proteasomal degradation as an essential component of antigen cross-presentation and the lupus tissue injury in systemic lupus erythematosus (SLE). The AAI, 103rd annual meeting, May 13-17, 2016, Seattle.
- 〔図書〕(計5件)
1. 塩沢俊一、分担執筆：全身性エリテマトーデスほか、笠倉正典他編、「器官病理学」、改訂14版、pp897-913、南山堂、2013.8.
  2. 塩沢俊一他編、「リウマチ病セミナー XXIV」、永井書店、2013.12.
  3. Shiozawa S, eds. Methods in Molecular Biology, vol. 1142: Arthritis Research, 2nd ed. Pp1-204, Springer Humana Press, New York, 2014.
  4. 塩沢俊一他編、「リウマチ病セミナー XXV」、永井書店、2014.12.
  5. 塩沢俊一著、「膠原病学」、改訂第6版、(全688頁)、丸善、2015.7.
- 〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)  
該当なし  
取得状況(計0件)  
該当なし
- 〔その他〕  
ホームページ等  
該当なし
6. 研究組織  
(1)研究代表者 塩沢俊一(SHIOZAWA Shunichi)  
九州大学・大学病院・  
教授(現在、特任教授)  
研究者番号：40154166
  - (2)研究分担者  
該当なし