

「炎症性サイトカイン分泌を制御する関節リウマチ時間薬物療法の検討」

神戸大学大学院保健学研究科 柱本 照

(1) 研究の背景と目的

私達は、関節リウマチ (Rheumatoid arthritis; 以下 RA と表記) を対象とした時間生物学をテーマに基礎研究を行ってきた。これまでに時計遺伝子 *Cry* 改変マウスを用いたモデル関節炎実験 (J Immunol. 2010;184:1560)、RA 滑膜細胞を用いた時計遺伝子 *Per/Bmal1* の機能解析 (Scand J Rheumatol. 2013;42:276、Biochem Biophys Res Commun. 2018;495:1675)、RA 治療基準薬メソトレキサートの時計遺伝子転写因子を介した薬理作用 (Arthritis Res Ther. 2018;20:55) を報告し、RA 病態形成における時計遺伝子や概日リズムの関与について検討を進めている。今回申請する研究は、臨床の現場で多岐にわたる疾患を対象に検証が進む「時間薬物療法」を RA 治療の分野に導入することを目的とする。

RA は寛解と再燃を繰り返して慢性に進行する多発性関節炎である。RA の症状には日内変動がみられ、RA 患者の血中サイトカイン濃度は、夜中から早朝にかけて上昇する日内変動を示す。一方、元来夜行性動物であるマウスでは、ヒトとは異なりモデル関節炎発症マウスの血中サイトカイン濃度は朝から夕方にかけて上昇する。

RA 患者にみられる「朝の関節のこわばり」や「睡眠障害」は、疾患と概日リズムの関与を象徴する症状であるが (Curr Opin Rheumatol. 2012;24:312)、これに対する周期的な薬物投与計画 (時間薬物療法) は殆ど行われていない。近年、Buttgereit らが報告した副腎皮質ホルモン製剤プレドニゾン徐放剤夜間投与の試みは、RA 患者の深夜のサイトカイン分泌を抑制して朝のこわばりを軽減することを示したが (Lancet. 2008;371:205)、主要な抗リウマチ薬を用いた時間薬物療法の成果は皆無に等しい。プレドニゾン投与の蓄積がもたらす骨粗鬆症、眼疾患、二次性糖尿病といった副次的疾病発症のリスクを回避し、抗リウマチ薬単独投与による時間薬物療法を確立することは、喫緊の課題である。

本研究は、関節リウマチ病態形成に多大な影響を及ぼす「夜間のサイトカイン分泌」が、時間薬物療法によって制御可能か否かを検証するものである。昨今関節リウマチ治療に導入された JAK 阻害剤 Baricitinib (以下、BAR と表記) は経口内服する広域なサイトカイン阻害剤で、JAK1/JAK2 のリン酸化を競合的に阻害して STAT の活性化を抑制することで type I/II サイトカイン受容体由来のシグナル伝達を阻害する。従来から RA 治療に用いられる生物学的製剤は、1~2 週間に 1 回、あるいは 1 か月に 1 回投与してサイトカイン産生を阻害するが、BAR は連日一日一回の投与を行う。

本研究は、時間薬物療法の概念に基づき「サイトカイン産生が亢進する時間帯を標的」とした BAR 投与が、より効率的な関節炎制御をもたらすか否かをモデル関節炎にて検証し、臨床の現場における関節リウマチ診療への時間薬物療法導入の意義を検討するものである。

(2) 方法・研究内容

定法に従い、7 週齢 DBA/1J 雌性マウスにウシ II 型コラーゲンで一次免疫後、3 週後に二次免疫を行い、モデル関節炎 (collagen-induced arthritis; 以下 CIA と表記) を誘導した。無治療群、明条件飼育時間投与群 (朝 8 時 ZT0; BAR 投与群)、暗条件飼育時間

投与群（夕 8 時 ZT12;BAR 投与群）を設定し、CIA マウスに対して BAR3mg/kg を 1 日 1 回、明条件あるいは暗条件の開始直後に 21 日間投与した。

関節炎スコアは 3 日ごとに測定し、投与終了時に脾リンパ球の *IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-17A*、*TNF*、*IFN γ* 、*GM-CSF* の mRNA 発現量を定量 PCR 法にて測定した。また *IL-6*、*TNF α* の経時的な血中サイトカイン濃度は ELISA により測定した。肝臓における *STAT3* のリン酸化をウエスタンブロットで評価し、後足関節サンプルに対しては組織学的所見を観察し、*IL-6* と *TNF α* の組織免疫染色を行った。骨破壊の程度を評価するために、血清 *MMP-3*、*RANKL*、*OPG* を測定し、*RANKL/OPG* 比を算出した。時間薬物療法がマウス時計遺伝子群発現に及ぼす影響を評価するために、脾リンパ球における時計遺伝子 *Bmal1*、*Cry1*、*Per2*、*E4bp4*、*Rora* の発現を定量 PCR 法にて経時的に測定した。

その結果、投与 3 日目以降、BAR 投与両群の関節炎スコアは無治療群に比べ低下し、12 日以降、朝投与群の関節炎スコアは夜投与群に比べ低下した（図 1）。肝臓における *STAT3* のリン酸化はサイトカイン同様の日内変動を示し、朝 8 時 BAR 投与群で有意に抑制された（図 2）。BAR 朝投与群の午前の *IL-6*、*TNF*、*IFN γ* 、*GM-CSF* mRNA 発現量は無治療群に比べ低下した。*IL-6*、*TNF α* の血中濃度は、BAR 夜投与群では投与後一時的に低下し、BAR 朝投与群では明条件下の濃度がより長時間低下した（図 3）。

関節の染色結果は関節炎スコアと血中サイトカイン濃度を反映し、BAR 朝投与群関節組織における関節破壊は抑制され、軟骨も正常に維持されていた。同様に、関節滑膜における *IL-6*、*TNF* 蛋白の発現も、BAR 朝投与群において抑制されていた（図 4）。血清 *MMP-3* と *RANKL* は BAR 朝投与群で有意に低下しており、*RANKL/OPG* 比も同様の結果であった。また、時計遺伝子 *Bmal1*、*E4bp4*、*Rora* の発現は BAR 朝投与群において有意に低下した。

（3）研究成果（研究から得た考察、残された課題、今後の課題を含む）

CIA マウスにおいて、サイトカイン分泌が亢進する朝の時間帯を標的とした BAR の投与は、*JAK/STAT* シグナル伝達系を阻害し、午前のサイトカイン分泌を低下させ、夜の時間帯の投薬よりも効率的に関節炎を抑制した。

IL-6 は CIA マウスの脾臓と血清で上昇を示し、BAR は ZT0 での処理によりそれらを減少させ、ZT12 での処理により ZT18 でそれらを減少させた。しかし、ZT0 群では、血清 *IL-6* は ZT12 群よりも長時間減少した。これは、ZT0 での BAR による *JAK / STAT* 経路を介したシグナル伝達抑制を反映していると考えられた。

一方、ZT0 での BAR 投与は明条件での血清 *TNF- α* レベルのピークを有意に抑制したが、ZT12 での BAR 投与は、ZT14 の 1 点のみ *TNF- α* を抑制した。*TNF- α* は *JAK / STAT* 経路を直接活性化しないが、*JAK* 阻害剤に類似して *STAT* 転写を抑制する抗 *IL-6* 受容体抗体トシリズマブ投与によって、単球由来 *TNF- α* 産生の抑制が報告されている（*Clin Rheumatol* 2015;34:629）。また、抗 *GM-CSF* 抗体処理により、*TNF- α* と *IL-1 β* の発現は CIA マウスの関節で減少し（*Arthritis Res* 2001;3:293）、ヒト単球は *IFN- γ* と *GM-CSF* の相乗刺激により *TNF- α* を分泌する（*Clin exp Immunol* 1991;85:143）。したがって、BAR は、*IL-6*、*IFN- γ* 、*GM-CSF* などの複数のサイトカインを阻害することにより *JAK / STAT* 経路を介したシグナル伝達に影響を及ぼし、*TNF- α* 産生を抑制したと示唆された。

私達は、生物学製剤によって治療された RA 患者の末梢血において、時計遺伝子 *Cry1*、*Per2*、*E4bp4* の発現が治療によって有意に変動し、バイオマーカーとして有用であることを報告した（*Mod Rheumatol* 2019;2:1）。本研究ではマウス脾リンパ球を用いてこれを検証したが、BAR 投与により時計遺伝子 *E4bp4* の発現は 24 時間に渡って抑制された。既報では *JAK* 阻害剤治療による時計遺伝子群の変化は検証していないが、今後、ヒト検

体による同様の検証によって、時間薬物療法が時計遺伝子群発現に及ぼす相互作用の更なる解明が期待される。

(4) 研究がもたらす効果及び波及効果

既存の生物学的製剤と同等の治療効果をもたらす JAK 阻害剤は、経口投与によって速やかに薬物血中濃度が上昇し (tmax 0.88 時間)、連日の内服により広範なサイトカインの分泌を抑制する。しかし、その薬価は生物学的製剤と同様に高価であり、全ての RA 患者がその恩恵を受けることは現状望めない。本研究は、関節炎の病態形成におけるサイトカインの関与を概日リズム研究の観点から検証すると共に、時間薬物療法による投与法の最適化、また投与薬剤の減量を提唱できる可能性を持つ。

疾患活動性をコントロール出来ない状態で関節破壊が進行した RA 患者の生涯医療費は、薬物・手術療法、リハビリテーションに加えて住居改築など膨大な額に達することが知られており、本研究は、最適なリウマチ治療を、少しでも安価に、より多くの患者に提供できる社会的な公益性を有する。概日リズムを司る時計遺伝子については、上述した他にも Ror α 遺伝子の機能抑制によってマクロファージ由来のサイトカイン産生が亢進する事(J Neurochem. 1992;58:192)、ROR α 蛋白と IL-6 産生の関与などが報告されており(Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106:21365)、他の疾患領域では I 型糖尿病治療を視野に入れた展開をみせている(Endocrinology. 2015;156:869)。

本研究の成果を踏まえ、申請者らは神戸海星病院リウマチ科・整形外科、兵庫医大病院リウマチ膠原病内科と連携し、RA 治療領域における「時間薬物療法」の検証作業を開始した。今後、およそ 3 年間をかけて遂行される臨床研究によって、RA 診療における時間薬物療法の意義を明らかにさせる予定である。

図表

図 1：関節炎スコア

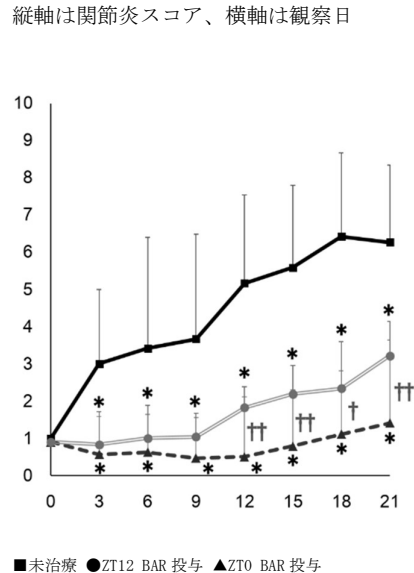
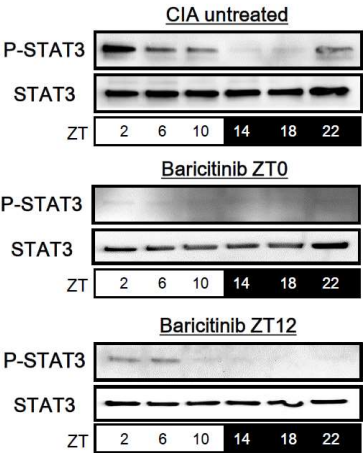


図 2：肝における STAT3 リン酸化



†p<0.05 ††p<0.01

図3：血清 IL-6 と TNF- α の変動

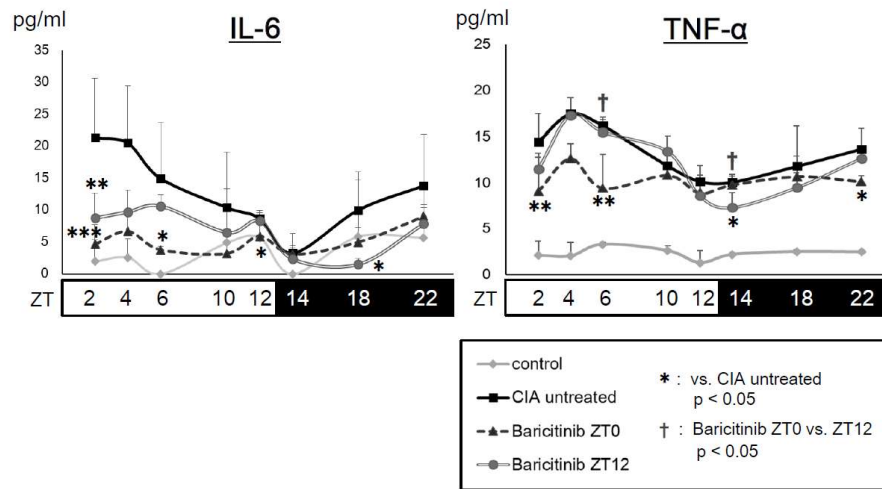


図4：組織像（HE 染色）、関節軟骨（Toluidine blue 染色）と免疫染色（IL-6/TNF- α ）

