

厚生労働科学研究費補助金
「難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）」
分担研究報告書

進行期悪性黒色腫における抗PD-1抗体による治療後 BRAF
阻害剤使用時に生じた薬疹における制御性T細胞分画の検討
-重症薬疹の発症抑制機序に関する考察を加えて-

分担研究者 大山 学 杏林大学医学部皮膚科 教授
研究協力者 水川良子 杏林大学医学部皮膚科 准教授
研究協力者 加藤峰幸 杏林大学医学部皮膚科 講師
研究協力者 高橋 良 杏林大学大学院医学研究科共同研究施設
フローサイトメトリー部門

研究要旨

近年、進行期悪性黒色腫等の治療に、抗 programmed cell death-1 (PD-1) 抗体（例：ニボルマブ）や BRAF V600E 突然変異特異的キナーゼ阻害薬（例：ベムラフェニブ）等の免疫チェック・ポイント阻害薬や分子標的薬が使用されるようになってきた。これらの薬剤では皮膚の有害事象の頻度が高いことが知られる。特に抗 PD-1 抗体使用後の BRAF 阻害薬投与にて Stevens-Johnson 症候群様の Severe Cutaneous Adverse Reaction (SCAR) などが報告されている。本研究では、ニボルマブ投与後にベムラフェニブを内服した症例において、薬疹と考えられる皮疹を認めたが重症化しなかった症例を経験した。この症例における制御性 T 細胞（regulatory T cell: Treg）サブセットのプロファイルの変化をフローサイトメトリーを用いて検討したところ、皮疹出現の直前に Treg の増加が一過性に認められた。これより、薬剤に反応し皮疹重症化に寄与すると考えられる effector T 細胞が Treg により抑制され、重症薬疹に進展しなかった可能性が考えられた。

A. 研究目的

進行期の悪性黒色腫は抗がん剤や放射線治療に対する反応性に乏しく極めて予後が悪い悪性腫瘍の一つとされてきた。近年、ニボルマブなどの programmed cell death-1 (PD-1) に対する抗体に代表される免疫チェック・ポイント阻害薬が臨床応用され従来達成することが困難であった治療効果が期待できるようになった。抗 PD-1 抗体はこれまで使用されてきた抗がん剤とは異なり、直接免疫系に作用する為、従来とは異なる機序で副作用が発生する可能性がある。本剤使用による薬疹の報告は比較的多いがその発症機序は十分に検討されているとはいえない。

また悪性黒色腫のなかに BRAF V600E 突然変異特異をもつものがあることが知られ、この変異に特異的なベムラフェニブなどの BRAF 阻害薬も臨床応用され効果をあげている。

本邦ではニボルマブに次いでベムラフェニブが承認された関係から、抗 PD-1 抗体

に引き続いて BRAF 阻害薬を投与された症例が多い。こうした症例のなかに Stevens-Johnson 症候群などの Severe Cutaneous Adverse Reaction (SCAR) を生じた例が報告され注目されている。現在、抗 PD-1 抗体による免疫系の活性化と引き続いて生じた BRAF 阻害薬による腫瘍崩壊によるさらなる免疫応答の亢進により皮膚障害が重症化するなどの機序が想定されてはいるものの、その詳細は十分に検討されていない。今回我々は抗 PD-1 抗体に引き続いて BRAF 阻害薬による治療を受け、皮疹が出現したものの軽症で軽快した症例を経験した。本研究では、免疫チェックポイント阻害薬あるいは BRAF 阻害薬により生じる薬疹の病態解明の一助とするため本症例の経過中のリンパ球サブセットの変化を制御性 T 細胞（regulatory T cell: Treg）に注目しフローサイトメトリーで検討し、重症薬疹に進展しなかった理由を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

解析対象としたのは2016年に杏林大学医学部附属病院にて多発遠隔転移を伴う進行性悪性黒色腫のため加療し、経過中に全身に皮疹を生じた69歳男性例である。

本症例では、原発巣拡大切除の後、インターフェロンβ局注を続けていたが多発遠隔転移が生じ、ニボルマブ投与を2コース施行した。その後も転移巣の増大を認めた。遺伝子検索にてBRAFV600E変異を認めたためベムラフェニブ内服に治療を変更した。

ベムラフェニブ投与開始10日後に発熱とともに軽度の搔痒を伴い間擦部を避け躯幹・四肢遠位主体、左右対称性の紅斑および丘疹が出現した。皮疹はベムラフェニブ投与中止後自然に軽快。投与再開後も皮疹の再燃はみられなかった。ベムラフェニブ投与開始後、腫瘍は著明に縮小していた (Fig.1)。

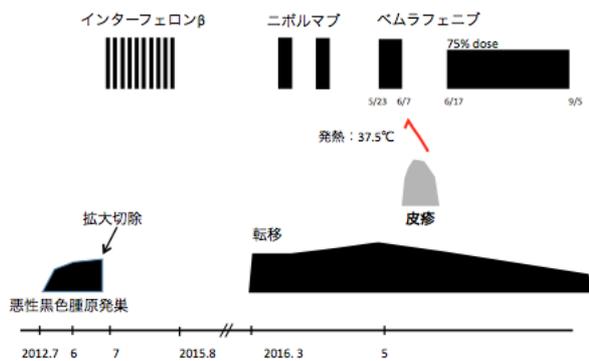


Fig. 1 解析対象症例の臨床経過

この期間中、経時的に末梢血を採血し、単核細胞(PBMC)を分離後、解析まで-80にて凍結保存した。PBMCはフローサイトメトリーを用いて、制御性T細胞(regulatory T cell: Treg)のサブセットの変化を中心に解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたって、杏林大学医学部臨床疫学研究審査委員会にて検討・承認された研究計画の説明文書に準じて、提供

者の同意を書面で得た上で試料を採取・収集した。

C. 研究結果

末梢血中のTreg分画の変化は、細胞核内に発現しているマスター転写因子であるFoxp3の発現をフローサイトメトリーで検出することで評価した。また同様にT細胞の抑制機能を反映するCytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4)の発現も同時に検討した。

近年、Foxp3⁺細胞は、Foxp3とCD45RAの発現強度を指標にすることによって、3つの機能的に異なる分画に分けることが可能になっている。この中で、抑制機能を持つ真の「Treg」細胞は、CD45RA⁺Foxp3⁺のnatural Treg (nTreg)、CD45RA⁻Foxp3⁺⁺ induced Treg (iTreg)であり、CD45RA⁻Foxp3⁺細胞は抑制機能を持たないeffector T細胞であると報告されている。本研究では特にFoxp3⁺CTLA-4⁺iTregの推移に注目した。

ニボルマブの投与2コース終了時点では、末梢血CD4⁺T細胞中のFoxp3⁺CTLA-4⁺細胞の割合は、健康人の平均値と比較して有意な違いが見られなかった(Fig. 2)。

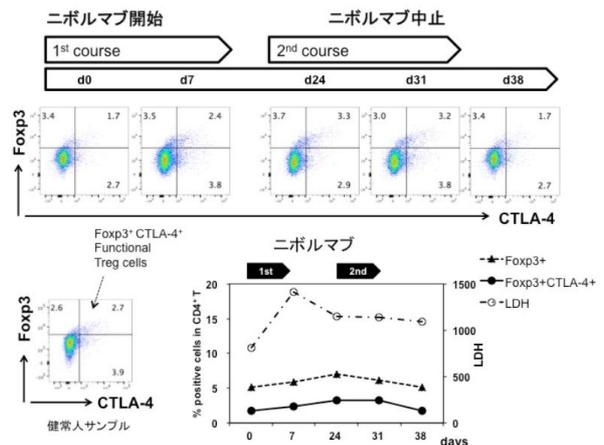


Fig. 2 ニボルマブ投与中のCD4⁺T細胞中のFoxp3⁺CTLA-4⁺分画の変化

しかし、ベムラフェニブ内服に変更後、7

日目以降に Foxp3^+ CTLA-4^+ 細胞が増加し、皮疹が観察された 10 日目にピークとなり皮疹の消失とともに健常人の平均値程度まで減少した (Fig. 3)。

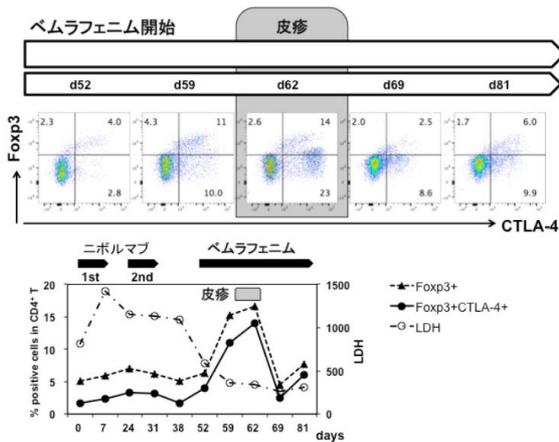


Fig. 3 ベムラフェニブ投与の皮疹出現前後における Foxp3^+ CTLA-4^+ 分画の変化

細胞増殖のマーカーである Ki-67 を用いた解析では、ベムラフェニブ処方 7 日目以降、10 日目をピークに Ki-67^+ Foxp3^+ CD4^+ T 細胞分画が増えていた。

以上より、本症例の Foxp3 、 CTLA-4 の発現に注目した CD4 陽性 T 細胞分画の詳細な検討により、皮疹が出現に先行して免疫抑制機能を有する iTreg 分画が増加していたことが明らかとなった。

D. 考察

これまで、我々は SCAR における Treg の動態について調査してきた (*J Immunol* 2009, 8071-8079)。急性期の Toxic epidermal necrolysis (TEN) の患者末梢血中の Treg の抑制機能を調べると、有意に低下していた。一方、末梢血中の Treg 数を検討すると Foxp3^+ 細胞自体の総数は健常人と有意差を認めなかったことから、抑制機能を持たない CD45RA^+ Foxp3^+ 分画の割合が増加して

いたとではと推察している。

ニボルマブ投与に続いてベムラフェニブの内服治療を行った自験例では、薬疹は出現したものの、現在注目されているような重症薬疹の発症には至らなかった。今回の解析結果から想定される機序として、免疫抑制機能を持った iTreg が皮疹出現に先行して一過性に増加した事により、薬剤に反応する effector T 細胞を抑制したためではないかと推察した。

iTreg が増加した理由として iTreg の増加と並行して上昇した血清 LDH 値が示唆するベムラフェニブによる腫瘍崩壊による iTreg の増加を考えた。つまり、腫瘍崩壊による大量の抗原の放出により生じた免疫応答の活性化を抑制するため iTreg が皮疹出現前に増加していたため皮疹を惹起する免疫応答が抑制されて重症化が避けられたのではないかと考えられた。

わずか 1 例の検討結果であり、現時点ではここで提示した皮疹重症化抑制の機序はあくまでも仮説にすぎない。しかし、皮疹が重症化した症例を同様に解析し結果を比較検討することで、TEN、Stevens-Johnson 症候群などの重症薬疹の発症機序の解明の一助となる所見が得られる可能性もある。現在は BRAF 変異が認められる症例では BRAF 阻害剤の投与が免疫チェックポイント阻害剤投与より優先されているため、同様の治療を受けた症例の蓄積には限りがあることが予想されるものの、今後さらに検討を重ねるべき課題であると思われる。

E. 結論

免疫チェックポイント阻害薬などの免疫系に対して新しい作用機序をもつ薬剤により生じる皮膚の有害事象の発症機序の解明には effector T 細胞だけでなく Treg など含めた免疫系全体の経時的变化を解析する必要があると思われる。また、抗腫瘍免疫と薬疹の発症の背景となる免疫応答の相互の影響を考慮することも今後こうした薬剤に起因する重症薬疹の発症機序の解明にお

いて重要になるとと考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 水川良子：薬疹という“地雷”。Visual Dermatol 15: 385-389, 2016.
2. 水川良子、塩入瑞江、青山裕美：重症薬疹のバイオマーカーとしてのサイトカイン、ケモカイン Derma, 247: 51-56, 2016.
3. 塩原哲夫、狩野葉子、水川良子、ほか：日本皮膚科学会ガイドライン 重症多形滲出性紅斑 スティーブンス・ジョンソン症候群・中毒性表皮壊死症診療ガイドライン 日皮会誌, 126: 1637-1685, 2016.
4. 水川良子、狩野葉子：口唇に生じる固定薬疹 Derma, 251: 22-28, 2016.

2. 著書

1. 水川良子：重症薬疹としての固定薬疹. 薬疹の診断と治療アップデート-重症薬疹を中心に- 91-97, 2016 塩原哲夫編 医薬ジャーナル社

3. 学会発表

1. 川野貴代、佐藤洋平、加藤峰幸、早川順、大山 学：ニボルマブからベムラフェニブに変更し皮疹出現後も継続投与可能であった悪性黒色腫の1例. 第32回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会、鹿児島 (2016.5.27)
2. 加藤峰幸、新田桐子、狩野葉子、大山学、山田昌和：偽膜形成の眼症状からスティーブンス・ジョンソン症候群を考えた塩酸フェニレフリン点眼剤による接触皮膚炎の一例. 第46回日本皮膚アレルギー・接

触皮膚炎学会総会学術大会、東京 (2016.10.30)

3. Ryo Takahashi, Yohei Sato, Momoko Kimishima, Tetsuo Shiohara, and Manabu Ohyama: Impact of therapeutic PD-1 blockade on T cell profile in advanced malignant melanoma: a possible link between PD-1⁺CD4⁺ cell and prognosis, 41st The 41st Annual meeting of the Japanese society for investigative dermatology, 仙台 (2016.12.11)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし