

## 進行期悪性黒色腫における抗 PD-1 抗体による治療とその後 BRAF 阻害剤使用時に生じた薬疹における CD4<sup>+</sup>及び CD8<sup>+</sup>T 細胞分画の経時的変化

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 講師

### 研究要旨

最近、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進行期悪性黒色腫（Advanced malignant melanoma; AMM）の治療に広く使用されるようになった。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。Stevens-Jonson 症候群様の Severe Cutaneous Adverse Reaction (SCAR)なども報告されており、その発症機序の解明が急務である。本研究では、AMM 症例（n=4）においてニボルマブ投与中の末梢血 CD4<sup>+</sup>及び CD8<sup>+</sup>T 細胞分画の変化に焦点を置き解析を行った。さらにニボルマブ投与後にベムラフェニブを内服し、薬疹を発症した症例と発症していない症例で T 細胞サブセットの変化を比較検討した。末梢血 CD4<sup>+</sup>T 細胞数はニボルマブ投与後減少傾向を示したが CD8<sup>+</sup>T 細胞の推移には一定の傾向がなく、薬疹を発症した症例では投与後上昇していた。CD4<sup>+</sup>T 細胞は、開始後に PD-1 陽性率が減少する傾向が見られたが、薬疹を認めた症例では投与中 PD-1 陽性率の減少は緩やかであった。今後、こうした T 細胞プロファイルの違いに注目することで薬疹発症が予測できる可能性がある。

#### A. 研究目的

進行期悪性黒色腫（advanced malignant melanoma; AMM）は治療抵抗性で極めて予後が悪い悪性腫瘍の一つとされてきた。しかし、近年、ニボルマブなど programmed cell death-1 (PD-1) に対する抗体に代表される免疫チェック・ポイント阻害薬や BRAF V600E 突然変異特異をもつ悪性黒色腫に対するベムラフェニブなどの BRAF 阻害薬が臨床現場で使われはじめ生命予後の大幅な延長も期待できるようになった。

本邦では薬剤承認の時期の関係から、こうした薬剤が実地で使われ出した初期には抗 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ている。抗 PD-1 抗体により免疫応答が活性化された後、BRAF 阻害薬による腫瘍崩壊によってさらに自己免疫応答が亢進した結果として重篤な皮膚障害が生

じると考えられているが、その詳細な機序は不明である。我々は抗 PD-1 抗体に続けて BRAF 阻害薬を投与した結果、薬疹と考えられる皮疹が出現した症例を経験した。薬疹の発症機序のさらなる解明のため、また、今後の薬疹の発症予測に役立てるため、一般病院でも解析可能な T 細胞サブセットの変化に注目し、薬疹発症例と未発症例の間での推移の違いを明らかにすることを本年度の研究の目的とした。

#### B. 研究方法

解析対象としたのは 2015～2016 年に杏林大学医学部付属病院にて AMM に対してニボルマブ治療を受けた 4 例である。解析対象の 4 例中、症例 1 は平成 29 年度に制御性 T 細胞分画の数の変化の推移を報告したニボルマブ投与に続けて、ベムラフェニブ投与開始後に紅斑が出現した症例である。本症例は、原発巣拡大切除術施行の後、インターフェロン<sup>2</sup> 局注にて加療するも多発

遠隔転移を生じ、ニボルマブ投与を2コース施行したが、治療抵抗性で転移巣は増大した。BRAFFV600E変異を同定し得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日後に発熱と軽度の搔痒を伴う軀幹・四肢遠位主体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し皮疹の再燃はなかった。注目すべきことにベムラフェニブ投与後、腫瘍は著明に縮小した。

解析対象の患者の治療期間中、経時的に末梢血を採血し、単核細胞 (PBMC) を分離した。分離したPBMCをanti-CD4, CD8, PD-1モノクローナル抗体で染色しBD社製FACSCanto IIフローサイトメーターにて測定し、FlowJoソフトウェアにて解析した。

### (倫理面への配慮)

本研究の実施にあたり、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

本年は主にニボルマブ投与後中のCD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup>T細胞の変化に着目し調査した。まず、PBMC中のリンパ球分画中に占めるCD4<sup>+</sup>T細胞分画の割合を調査したところ、ニボルマブの投与によって減少する傾向が見られたが、その減少の程度は症例によって様々であった (Fig. 1a)。一方、CD8<sup>+</sup>T

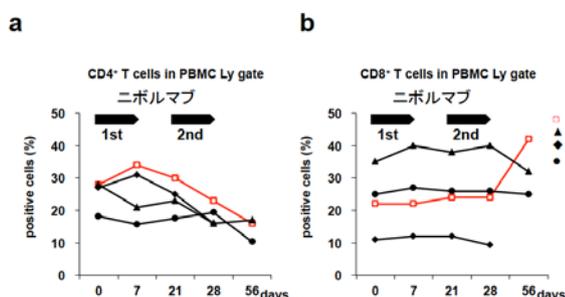


図1. AMMにおけるニボルマブ投与がT細胞サブセットに与える影響の検討。

細胞分画の割合は症例ごとに開始前の割合にはばらつきがあった。この割合は各症例において経過中殆ど変化が見られなかった (Fig. 1b)。

しかし、興味深いことにニボルマブ2コース終了後ベムラフェニブに治療を変更後に皮疹が見られた症例1では、CD8<sup>+</sup>T細胞の割合がニボルマブ投与後に増加に転じる現象が観察された (Fig. 1b)。

次いで、CD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup>T細胞分画中のPD-1陽性率の変化について調査を行った。全症例に共通した傾向としてCD4<sup>+</sup>T細胞中のPD-1<sup>+</sup>細胞の割合は、ニボルマブ投与後に減少し、1コース終了後から2コース終了までの間、健常人と同レベルの陽性率 (19.5%±1.4, n=4)を維持した (Fig. 2a)。しかし、この減少の程度は皮疹を生じた症例では緩やかであった。

一方、ニボルマブ投与によるCD8<sup>+</sup>T細胞中のPD-1<sup>+</sup>細胞の割合の変化は、CD4<sup>+</sup>T細胞と比較して急激に減少し、健常人よりも低いレベルまで減少した (13.1±3.8%, n=4) (Fig. 2b)。

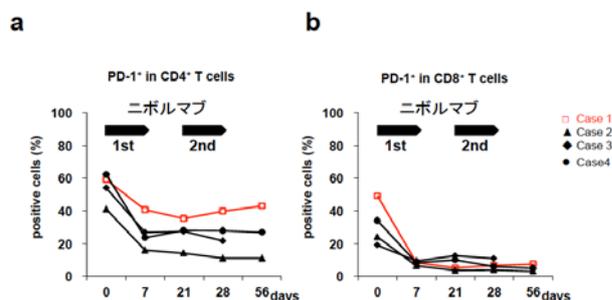


図2. ニボルマブ投与に伴うCD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup>T細胞分画中のPD-1<sup>+</sup>細胞の割合の推移。

しかしながら、ベムラフェニブに治療を変更しその後、薬疹と考えられる皮疹が見られた症例1では、ニボルマブ終了後からベムラフェニブ投与開始し皮疹出現にいたるまでCD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>T細胞の割合が増加しはじめ、皮疹が軽快後、一時的に減少に転じていた (Fig. 3)。

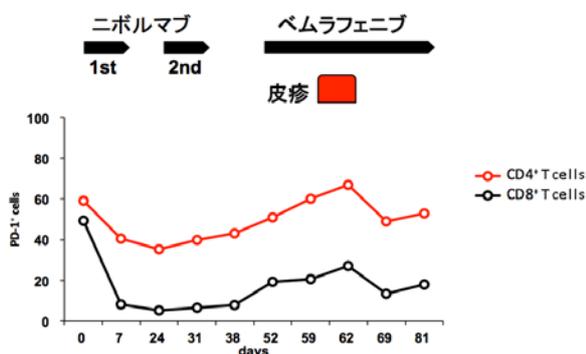


図3. 薬疹を生じた症例における CD4<sup>+</sup>及び CD8<sup>+</sup> T 細胞分画中の PD-1<sup>+</sup>細胞の割合の推移.

#### D. 考察

今回の検討においてニボルマブ投与後、ペムラフェニブ投与中に薬疹と考えられる皮膚を生じた症例では皮膚を生じなかった症例と比較して、1) ニボルマブ投与終了後の CD8<sup>+</sup> T 細胞分画の上昇 2) CD4<sup>+</sup> T 細胞中における PD-1<sup>+</sup>細胞の減少率が小さい 3) 皮膚出現前に PD-1<sup>+</sup>細胞の割合が増加出現後に減少 という特徴があった。

今回解析対象となった症例数が少なく、検出された変化が一般化できるか否かは今後の症例の集積を待つ必要がある。また、今回得た所見が薬疹発症の機序に直接的に関与しているものなのか、単に薬疹発症のプロセスで生じる副反応的なものなのかについてもさらなる検証が必要である。

解析に供したサンプルを採取した時とは異なり、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、同様のレジメンで治療を受ける症例は今後数がきわめて限られるであろう。その意味で今回の解析で得られた所見の意義は限定的であるかも知れない。

しかし、今年度の研究の大きな目的である AMM に対する抗 PD-1 抗体の使用後に生じる薬疹の予測因子を同定するという観点から見れば、本研究で薬疹出現症例の T 細胞分画の変化を検出し得たことは今後の SCAR 発症機序の解明の一助となりうる所見であると考えられる。T 細胞分画の推移

の検討は一般病院でも解析可能な事項であるため、今後さらなる検討が必要であると考えられた。

#### E. 結論

免疫チェックポイント阻害薬など免疫系に対して新しい作用機序を持つ薬剤が原因となって生じる皮膚の有害事情の発症機序、または発症予測因子の解明には、薬剤の投与中、投与後における T 細胞分画の経時的な変化を解析することが重要と考えられる。

今後さらなる症例の集積により重症薬疹の発症予測を可能にする技術の開発が望まれる。

#### 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: 固定薬疹の発症機序-なぜ同じ部位に再発するのか-. アレルギーの臨床, 37: 1055-1057, 2017.
2. 水川良子: スキルアップのためのQ&A. 薬疹におけるステロイドの始め方と減らし方を教えてください. 皮膚アレルギーフロンティア 15: 47, 2017.
3. Kato M, Nitta K, Kano Y, Yamada M, Ishii N, Hashimoto T, Ohyama M. Case of phenylephrine hydrochloride-induced periorbital contact dermatitis with fulminant keratoconjunctivitis causing pseudomembrane formation. J Dermatol 45(2) e27-28 2018.
4. Nitta K, Hayakawa J, Ohyama M. A case of coxsackie virus-induced acute generalized exanthematous pustulosis with unique periadnexal eosinophilic infiltration. Dermatologica Scinica 2017 (in press)

## 2. 著書

なし

## 3. 学会発表

1. 水川良子：急性発疹症 初期対応のコツ。-何をすべきか、何をすべきでないか- 第 33 回 日本臨床皮膚科医会・臨床学術大会，神戸，平成 29 年 4 月 22 日。
2. 水川良子：SJS/TEN のモデルとしての固定薬疹 -なぜ、固定薬疹は SJS/TEN にならないのか- 第 116 回 日本皮膚科学会総会学術大会，仙台，平成 29 年 6 月 4 日
3. Takahashi R, Sato Y, Kimishima M, Shiohara T, Ohyama M: Influence of programmed cell death-1 immune checkpoint blockade on T cell profile and response to melanoma-associated antigen in advanced malignant melanoma patients. 47th Annual ESDR Meeting 2017, Salzburg, Austria, Sep 27th-30th, 2017.
4. 水川良子，塩原哲夫：薬剤性過敏症症候群-臨床から診断、治療、non-HIVIRIS の概念をふまえて- 第 66 回 日本感染症学会東日本地方会学術集会，東京，平成 29 年 11 月 1 日。
5. 水川良子，吉池沙保里，下田由莉江，加藤峰幸，早川 順，高橋孝幸，大山学：皮膚筋炎治療中の帯状疱疹後に Stevens-Johnson 症候群を生じた 1 例。第 47 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会、鹿児島，平成 29 年 12 月 9 日。
6. 光井聖子，青山裕美，水川良子，川上佳夫：多発性固定薬疹における局所脱感作と病変拡大部位の免疫学的検討。第 47 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会，鹿児島，平成 29 年 12 月 9 日。
7. Takahashi R, Sato Y, Kimishima M, Shiohara T, Ohyama M:

Characterization of the influence of PD-1 blockade on IFN- $\gamma$ , granzyme B and IL-9 production by T cells in advanced melanoma patients. 42nd Annual Meeting of JSID, Kochi, Japan, Dec 15th-17th, 2017.

## 4. その他

1. 加藤峰幸：分子標的薬による皮膚障害とその対策。West Tokyo Dermatology Update Seminar，東京，2017 年 9 月 13 日。
2. 加藤峰幸：分子標的薬による皮膚障害とその対策。多摩皮膚科，東京，2017 年 10 月 14 日。

## 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