

ついて、患者血清と花粉抗原エキスをそれぞれ inhibitory antigen として反応させた後、HRP 標識抗ヒト IgE 抗体を加えさらに 1 時間室温にて反応させた。その後発色液を加え ELISA にてプレートに固相化された抗原と反応した血清 IgE の量を定量し評価した。

$\{(\text{positive control の吸光度}) - (\text{それぞれの吸光度})\} / (\text{positive control の吸光度}) \times 100\%$  の式でプレートへの IgE 吸着率を計算し、高濃度でプレートと同一抗原にて反応させた血清の IgE 量における値を 100% に換算し評価した。

### C. 結果

山形市、福井市、甲府市のスギ花粉飛散数飛散状況は同一市内の複数の測定施設の値は、ほぼ連動しており一致していた。重症アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜では、グルココルチコイド  $\beta$  受容体の発現が増強しており、ステロイド耐性状態であることが示唆された。また、ペリオスチンは上皮の基底膜に強く発現し、ペンドリンは腺細胞で陽性であった。これらの所見から、気管支喘息の粘液分泌過多とリモデリングに相当する変化が鼻粘膜でも生じていると考えられた。さらに、花粉抗原の共通抗原性について検討した。その結果、シラカンバ抗原に対してはコナラ・ヤナギ抗原、クルミ抗原に対してはシラカンバ・コナラ・ヤナギ抗原、ヒメスイバ抗原に対してはシラカンバ抗原、コナラ抗原に対してはクルミ抗原、ヤナギ抗原に対してはシラカンバ・コナラ抗原において添加した抗原の濃度に依存した抑制が掛かり、何らかの共通抗原性を疑う結果を得た。

### D. 考察：

山形市、福井市、甲府市の 3 地域での複数の施設でのスギ花粉飛散数は、花粉開始時期、最大飛散数、日々の飛散数の変化はほぼ一致していたが、部分的に異なる傾向もありよりきめの細かい花粉飛散状況の情報提供には複数施設の利点を生かすことも一案と考えられた。また、アレルギー炎症の重症化の機序には、糖質コルチコイド受容体、ペリオスチン、ペンドリンなどの分子が関与している可能性が示唆された。特に、グルココルチコイドの  $\alpha$   $\beta$  受容体の発現のバランスが重要であり、気管支喘息や潰瘍性大腸炎などで  $\beta$  受容体の発現が亢進している症例では、ステロイドの抵抗性が高いことが報告されている。今回の検討でも、ステロイドに抵抗する症例の局所では  $\beta$  受容体の発現が高い傾向が認められた。また、花粉抗原の共通抗原性について検討したところ、ヒメスイバ、コナラ、ヤナギ、クルミ、シラカバに共通抗原性がある可能性が示唆された。

### E. 結論

スギ花粉飛散数は同一市内の複数地点での測定ではその変動と数はほぼ一致した。重症アレルギー性鼻炎症例の鼻粘膜では、グルココルチコイド  $\beta$  受容体、ペンドリン、ペリオスチンなどの発現が亢進しており、これらの変化が重症化の一因と考えられた。また、種々の花粉抗原は共通抗原性を有しており、花粉飛散が重なる初夏にはこの点を念頭に置き治療戦略を立てる必要があると考えられた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) 鈴木祐輔, 太田伸男, 櫻井真一, 青柳優, 深瀬滋: 山形市におけるアレルギー性鼻炎患者の花粉抗原陽性率の検討. アレルギー 58(12):1619-1628, 2009
- 2) Ahikiro Ishida, Nobuo Ohta, Shuji Koike, Masaru Aoyagi, Mitsunori Yamakawa: Overexpression of glucocorticoid receptor-beta in severe allergic rhinitis. Auris Nasus Larynx 37:584-588, 2010
- 3) Yamauchi k, Tamura G, Akasaka T, Chiba T, Honda K, Kishi M, Kobayashi H, Kuronuma T, Matsubara A, Morikawa T, Ogawa H, Ohta N, Okada M, Sasaki M, Saito J, Sano K, Satoh m, Shibata Y, Takanashi Y, Inoue H: Analysis of the comorbidity of bronchial asthma and allergic rhinitis by questionnaire in 10,009 patients. Allergol Int. 58(1):55-61, 2009
- 4) 太田伸男, 鈴木祐輔, 後藤崇成, 高橋裕一, 青柳優: スギ花粉症におけるベポタスチンベシル酸塩とプラナルカスト水和物の初期治療効果 QOL と睡眠障害. アレルギー・免疫, 2010; 17(2):98-105
- 5) 太田伸男, 鈴木祐輔, 後藤崇成, 高橋裕一, 青柳優, 大久保公裕: スギ花粉症患者の QOL と睡眠障害. アレルギー・免疫, 2010; 17(2):90-97
- 6) 太田伸男: アレルギー性副鼻腔炎 up to date アレルギーの臨床 2010; 30(2):17-20
- 7) 太田伸男, 鈴木祐輔, 高橋裕一, 青柳優, 大久保公裕: スギ花粉症患者の QOL と睡眠障害. アレルギー・免疫 2010; 17(2):90-97
- 8) 太田伸男: 鼻噴霧用ステロイド薬の臨床ステロイド抵抗性 アレルギーの臨床 30(11):27-31, 2010
- 9) 太田伸男, 鈴木祐輔, 後藤崇成, 高橋裕一, 青柳 優, 大久保公裕: リアルタイムモニターによるスギ花粉飛散数情報の提供と病診連携 鼻アレルギーフロンティア

10(3):44-48, 2010

10) 太田伸男: 花粉症治療の最前線 2011 年のスギ花粉飛散予測 アレルギーの臨床 31(1):17-20, 2011.

11) 太田伸男: 花粉症と副鼻腔炎の合併 新薬と臨床 60(1):29-33, 2011

## 2. 学会発表

1) 鈴木祐輔, 太田伸男, 高橋裕一, 青柳優, 深瀬滋, 大久保公裕: 当科における花粉抗原陽性率と花粉共通抗原性の検討. 第 28 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 福井; 2010 年 2 月

2) 太田伸男, 鈴木祐輔, 高橋裕一, 青柳優: イネ科花粉症に対するモメタゾンフランカルボン酸エステルの効果. 第 28 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 福井; 2010 年 2 月

3) 後藤崇成, 太田伸男, 鈴木祐輔, 青柳優: 初期治療のスギ花粉症患者の QOL および睡眠障害に対する効果. 第 28 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 福井; 2010 年 2 月

4) 太田伸男, 鈴木祐輔, 青柳優: イネ科花粉症に対するモメタゾンフランカルボン酸エステル点鼻液の効果. 第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 京都; 2010 年 5 月

5) 高橋裕一, 太田伸男, 鈴木祐輔, 青柳優, 最上久美子, 大久保公裕: 同一市内における

リアルタイム花粉モニター(KH3000)相互測定と比較. 第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 京都; 2010 年 5 月

6) 太田伸男: 教育講演『治療と管理』アレルギー性鼻炎の治療と管理. 第 22 回アレルギー学会春季臨床大会, 京都, 2010 年 5 月

7) 太田伸男: 教育講演 鼻アレルギーガイドライン. 第 22 回アレルギー学会春季臨床大会, 京都, 2010 年 5 月

8) 石田晃弘, 太田伸男, 青柳優: 鼻疾患における pendrin および periostin の発現についての検討. 第 111 回日本耳鼻咽喉科学会総会, 仙台; 2010 年 5 月

9) 太田伸男, 藤枝重治, 増山敬祐, 大久保公裕: 同一市内の複数のリアルタイム花粉モニター測定値の比較 山形市, 中央市, 福井市 3 市の検討. 第 49 回日本鼻科学会, 札幌; 2010

10) 太田伸男: イブニングシンポジウム『One way one disease の基礎と臨床』小児科、内科、耳鼻科医の協力による気道炎症疾患の管理. 第 49 回鼻科学会総会, 札幌; 2010

## G. 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

## スギ花粉症患者の QOL と睡眠障害

Ota Nobuo    Suzuki Yusuke    Goto Takanari    Takahashi Yuichi    Aoyagi Masaru    Okubo Kimihiro  
太田 伸男<sup>1)</sup>   鈴木 祐輔<sup>1)</sup>   後藤 崇成<sup>1)</sup>   高橋 裕一<sup>1)</sup>   青柳 優<sup>1)</sup>   大久保公裕<sup>2)</sup><sup>1)</sup>山形大学医学部情報構造統御学講座耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野 <sup>2)</sup>日本医科大学耳鼻咽喉科

## Summary

スギ花粉飛散数とスギ花粉症患者の QOL と睡眠障害の関連について検討した。その結果、スギ花粉飛散数の増加に伴ってスギ花粉症患者の鼻・眼症状が増悪し、QOL が低下するだけでなく、睡眠も障害されることが示唆された。可及的速やかに個々の患者にとって最適な治療パターンを確立するためには、病型と重症度に応じた薬剤選択を行うと同時に、QOL と睡眠障害を念頭に置いた治療戦略を考えることが重要である。

Key Words : スギ花粉症 / QOL / 睡眠障害 / リアルタイムモニター

## はじめに

スギ花粉症は、通年性アレルギー性鼻炎とは異なり、特定の時期に大量の花粉が飛散することによって非常に強い局所症状のみならず全身症状を引き起こす。近年スギ花粉症の患者数は急増し、国民の約 20% を超えると報告されており、現代社会においてこの疾患の治療は重要性を増している<sup>1)</sup>。スギ花粉症に罹患する患者層は若年層が多く、治療はくしゃみ、鼻汁、鼻閉などの鼻、眼の症状だけではなく、倦怠、集中力の低下など日中のパフォーマンスが労働や就学に及ぼす影響があるために QOL (quality of life) を考慮した治療が求められている<sup>1)~5)</sup>。しかし、スギ花粉の飛散数とスギ花粉症患者の QOL と睡眠障害の関連については十分な検討がなされていない。そこで今回、我々はスギ花粉飛散数とスギ花粉症患者の QOL および睡眠障害について検討したのでその結果について報告する。

## I. 対象と方法

## 1. 対象

2009 年 2 月から 4 月のスギ花粉飛散前と飛散中に山形大学医学部耳鼻咽喉科関連の 3 施設 (山形大学医学部附属病院耳鼻咽喉科, 町立真室川病院耳鼻咽喉科, 天童温泉篠田病院耳鼻咽喉科) を受診した 15 歳以上のスギ花粉症患者で本試験の参加に同意を得られた 84 例を対象とした。性別は男性 30 例, 女性 52 例, 年齢は 21 歳から 83 歳で, 平均年齢は 48.3 歳であった。スギ花粉症の診断は, 問診, 鼻内所見, 鼻汁中好酸球検査, 皮膚反応, 血中特異的 IgE (immunoglobulin E) 検査 (CAP-RAST) によった。これらのアレルギー検査は奥田の判定基準により判定し, CAP-RAST はスコア 1 以上を陽性とした。

また, 健常人 20 例をコントロールとし, 患者群と同様に花粉飛散初期とピーク時に後述する質問票を用いて鼻症状および QOL について検討を行った。

2. スギ花粉飛散数の測定

スギ花粉飛散数は、リアルタイムモニター (KH300) およびダーラム型花粉捕集器を用い、山形県山形市の山形大学医学部屋上にて測定した。

3. 観察項目および評価方法

1) 症状スコア

アレルギー疾患治療ガイドラインの重症度分類に基づく鼻閉とくしゃみ発作または鼻汁の程度の分類に最重症として++++を加え、日本アレルギー学会アレルギー性鼻炎委員会が作成した symptom score の基準によって重症度の点数付けを行った。

2) QOL および睡眠障害

奥田らの作成した JRQLQ (No.1 および No.2) 調査票を用いた<sup>1), 2)</sup>。JRQLQ (No.1) 調査票は、鼻症状4項目 (鼻汁, くしゃみ, 鼻閉, 鼻のかゆみ), 眼症状2項目 (かゆみ, 流涙), QOL は6因子17項目, すなわち ① 日常生活 (5項目), ②

戸外活動 (2項目), ③ 社会活動 (3項目), ④ 身体 (2項目), ⑤ 精神生活 (4項目), ⑥ 睡眠 (1項目) から構成されている。また、鼻・眼以外の症状の評価のために JRQLQ (No.2) 調査票を用いて検討を行った。JRQLQ (No.2) 調査票は、鼻症状4項目 (鼻汁, くしゃみ, 鼻閉, 鼻のかゆみ), 眼症状2項目 (かゆみ, 流涙), QOL は6因子15項目, すなわち ① 気道 (4項目), ② のど (2項目), ③ 鼻閉 (2項目), ④ 口耳皮膚 (4項目), ⑤ 全身 (2項目), ⑥ 睡眠 (1項目) から構成されている。JRQLQ の評価はそれぞれの重症度を0から4の5段階でスコア化し各々の障害の程度を分析, さらに総合スコアを求めて評価を行った。

また、睡眠障害についてはピッツバーグ睡眠問診票 (PSQI) を用いた<sup>6), 7)</sup>。PSQI は主観的な睡眠の質を評価分析する自記式質問票で、① 睡眠の質, ② 入眠時間, ③ 睡眠時間, ④ 睡眠効率, ⑤ 睡眠困難, ⑥ 眠剤の使用, ⑦ 日中の覚醒困難の7

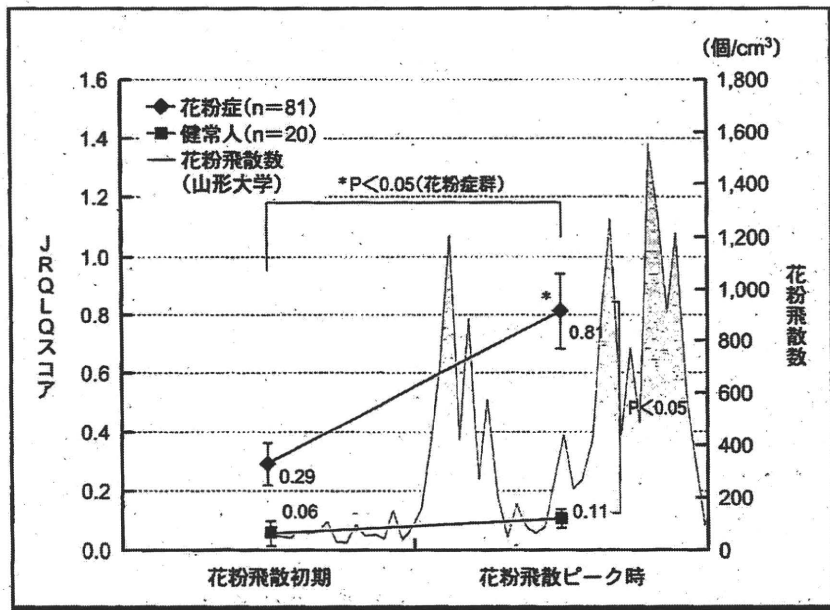


図1 2009年度のスギ花粉飛散数と症状スコア

飛散開始日は2月27日で、総飛散数は7,638個/m<sup>3</sup>であった。花粉飛散初期ではスギ花粉症と健康人でJRQLQスコアに有意な差を認めなかった。しかし、花粉飛散ピーク時にはスギ花粉症のJRQLQスコアの有意な上昇を認めた。



つの項目から構成されている。評価方法であるが、睡眠時間以外は重症度を0から3の4段階で評価し、さらに通常総合スコアを用いて睡眠障害の程度について評価した。

#### 4. 統計学的解析

初期治療群および発症後投与群の症状改善度、全般改善度などの比較はWilcoxonの順位検定およびpaired t検定を用いた。検定における有意水準は両側危険率5%以下とした。

## II. 結果

### 1. スギ花粉飛散状況と症状

2009年の山形市のスギ花粉の飛散状況は図1のようであった。すなわち飛散開始日は2月27日、総花粉飛散数は7,638個/m<sup>3</sup>であった。3月下旬と4月上旬に2つの花粉飛散ピークを認める例年にない稀なパターンであった。JRQLQの症状と各QOLの項目を合わせた23項目のスコアは、スギ花粉飛散初期には健常人とスギ花粉症患者で有意な差は認められなかったが、スギ花粉症患者ではスギ花粉飛散数の増加に伴って上昇し、花粉飛散ピーク時には健常人と比較して有意な差を認めた(図1)。

### 2. QOL

健常人とスギ花粉症患者のJRQLQ(No.1)の各サブスケール別スコアを比較検討した。花粉飛散初期には、日常生活、野外活動、社会生活、睡眠、身体、精神生活のいずれのサブスケールにおいても健常人とスギ花粉症患者との間で有意な差は認められなかった(図2)。しかし、花粉飛散ピーク時期では、日常生活、野外活動、社会生活、睡眠、身体、精神生活のいずれのサブスケールにおいてもスギ花粉症患者で有意なスコアの上昇が認められた(図3)。スギ花粉飛散ピーク時のJRQLQ(No.1)の全項目について、健常人とスギ花粉症患者のスコアを比較検討すると、水っばな、くしゃみ、鼻づまり、鼻のかゆみ、目のかゆみ、涙目のすべての症状のスコアがスギ花粉症患者で上昇し、日常生活や野外活動だけでなく、社会生活や睡眠などほぼすべての項目でスコアの有意な差が認められ、QOLが大きく低下していることが確認された(図4)。次に、眼鼻以外の症状を主に検討するJRQLQ(No.2)の各サブスケール別スコアを比較検討した。花粉飛散初期には、気道、のど、鼻閉、口耳皮膚、全身、いびきのいずれのサブスケールにおいても健常人とスギ花粉症患者と

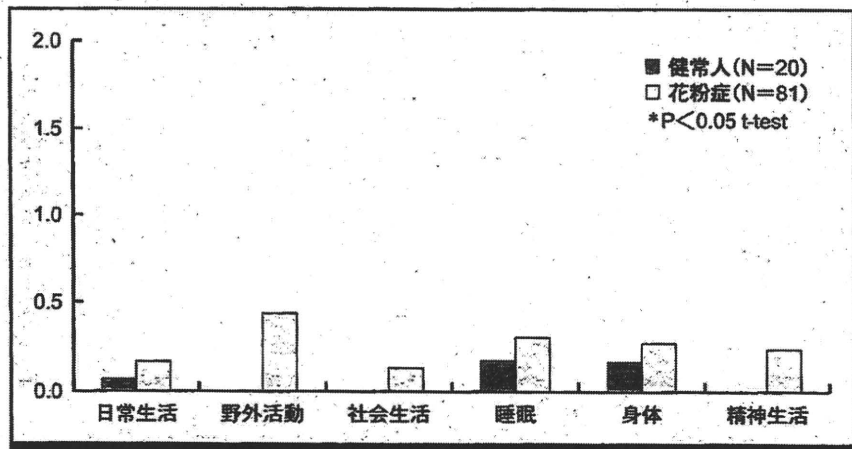


図2 JRQLQ (No.1) スギ花粉飛散初期のサブスケール花粉症と健常人でサブスケールに有意な差を認めなかった。

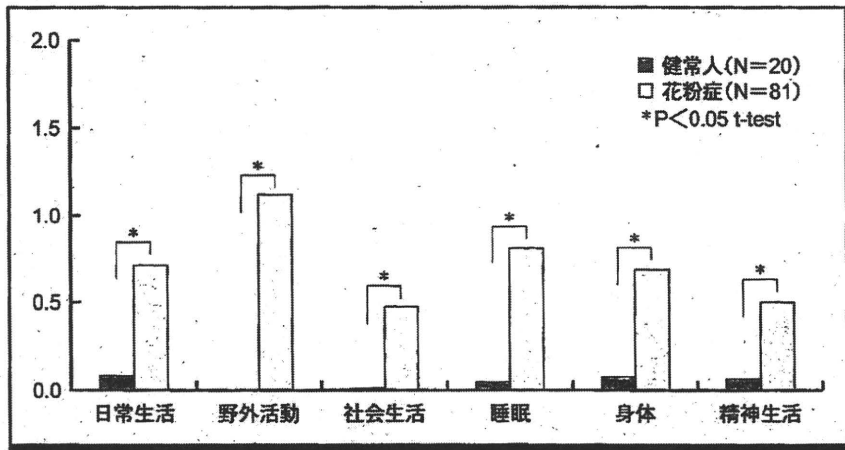


図3 JRQLQ (No.1) スギ花粉飛散ピーク時期のサブスケール

花粉症では健康人と比べて日常生活, 野外活動, 社会生活, 睡眠, 身体, 精神生活のすべてにおいてスコアの上昇を認めた。

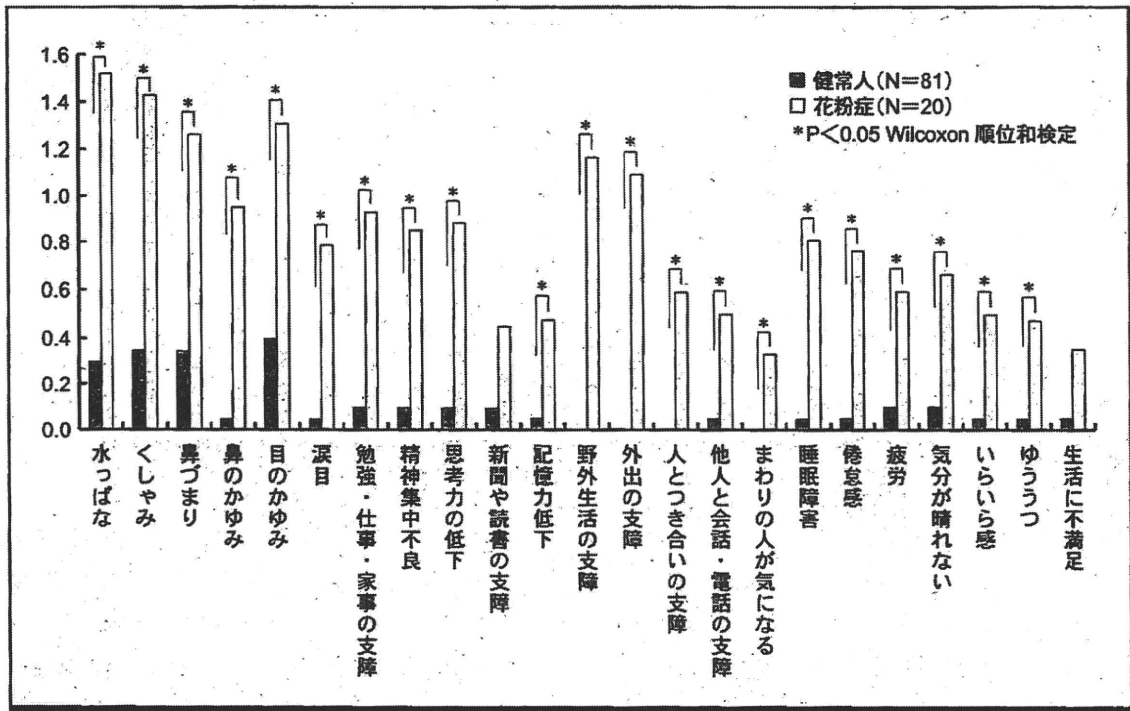


図4 JRQLQ (No.1) スギ花粉飛散ピーク時期の各項目

花粉症では健康人と比べて多くの項目において有意なスコアの上昇を認めた。

の間で有意な差は認められなかった(図5)。しかし、花粉飛散ピーク時期では、気道、のど、鼻閉、口耳皮膚、いびきのサブスケールにおいてスギ花

粉症患者で有意なスコアの上昇が認められた(図6)。スギ花粉飛散ピーク時のJRQLQ (No.2)の全項目について、健康人とスギ花粉症患者のスコ

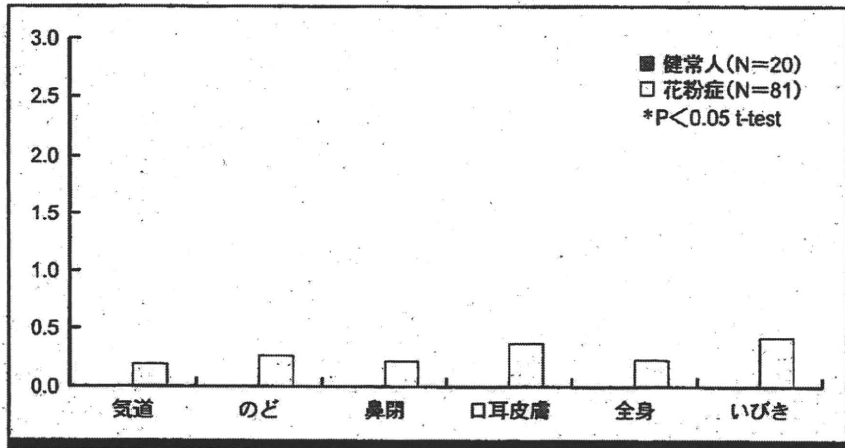


図5 JRQLQ (No.2) スギ花粉飛散初期のサブスケール  
花粉症と健康人でサブスケールに有意な差を認めなかった。

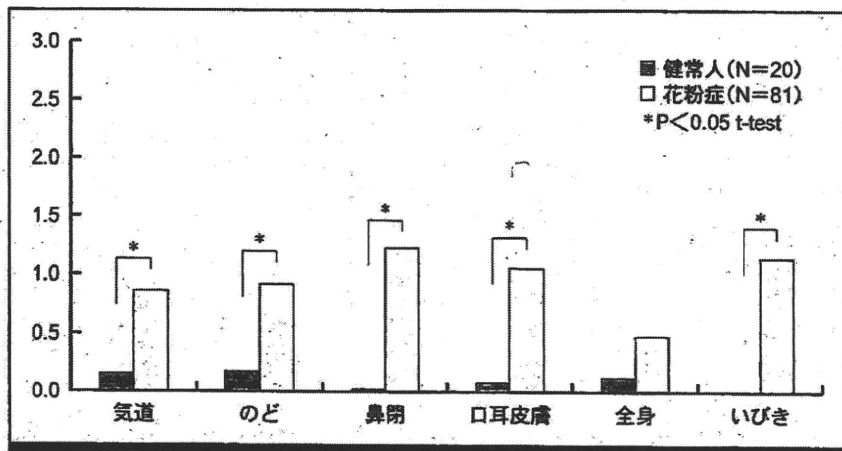


図6 JRQLQ (No.2) スギ花粉飛散ピーク時期のサブスケール  
花粉症では健康人と比べて気道、のど、鼻閉、口耳皮膚、いびきにおいて有意なスコアの上昇を認めた。

アを比較検討すると、眼鼻の症状が増悪するだけでなく、気道、のど、口耳皮膚、全身に影響が及ぶことが確認された(図7)。

### 3. 睡眠障害

健康人とスギ花粉症患者の睡眠障害についてPSQIを用いて比較検討した。花粉飛散初期には、健康人とスギ花粉症患者で明らかな差は認められなかった。しかし、花粉飛散ピーク時期では、健

常人は睡眠スコアの有意な上昇は認められなかったのに対して、スギ花粉症患者では有意な上昇が認められ、睡眠が障害されている可能性が示唆された(図8)。スギ花粉飛散初期とピーク時でスギ花粉症患者のPSQIのサブスケールを検討した結果、睡眠の質、入眠時間、睡眠困難および日中覚醒困難のスコアの有意な上昇が認められた(図9)。

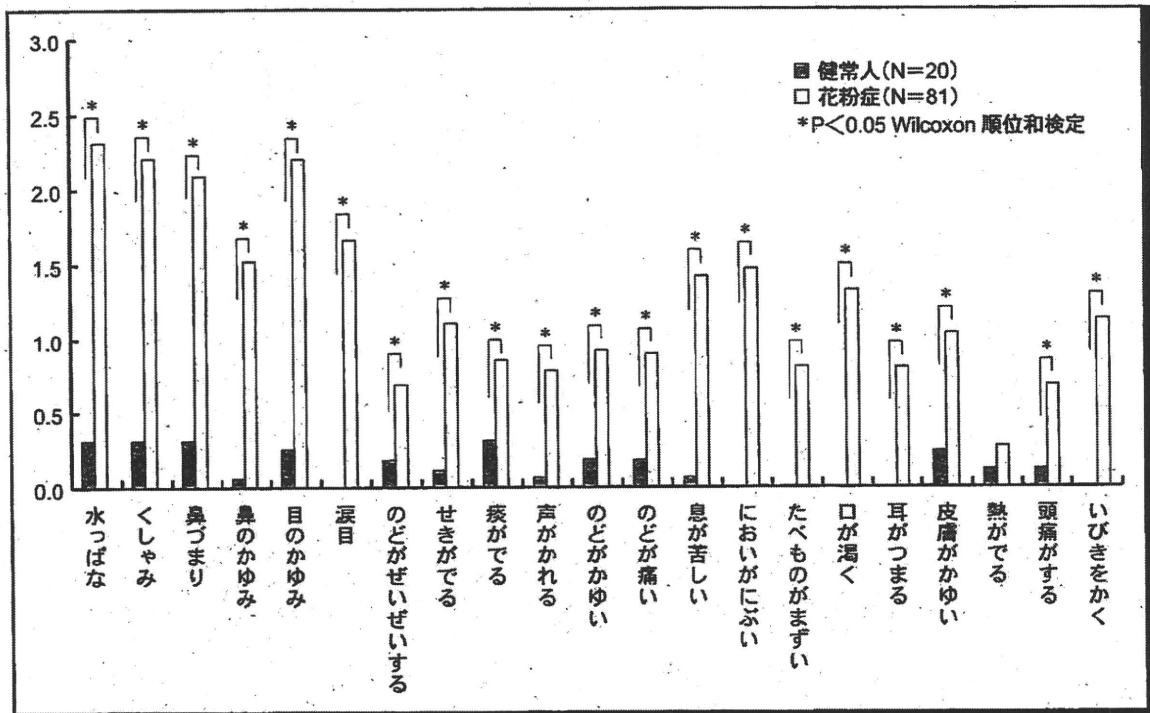


図7 JRQLQ (No.2) スギ花粉飛散ピーク時期の各項目  
花粉症では健常人と比べて多くの項目において有意なスコアの上昇を認めた。

### III. 考察

スギ花粉症は発症の低年齢化と自然寛解率が低いため、その患者数が非常に増加している<sup>11, 2)</sup>。いわゆる働き盛りの世代に患者が多く、日常生活のQOLが著しく低下すると報告されている。我々はスギ花粉飛散数とスギ花粉症患者の症状、QOLおよび睡眠障害について健常人と比較検討した。その結果、スギ花粉症患者ではスギ花粉飛散数の増加に連動して、QOLが低下することが確認された。また、アレルギー性鼻炎の症状が労働や学業を障害し、睡眠障害の原因となる可能性についても報告されている<sup>6)~9)</sup>。スギ花粉症に罹患することによって労働生産性にも影響が生じることも懸念されている<sup>10)</sup>。今回の検討でも、スギ花粉症患者では健常人と比較して、スギ花粉飛散数に伴って睡眠障害のスコアが有意に上昇してお

り、睡眠が著しく障害されている可能性が示唆された。特に、睡眠の質と入眠時間が障害されていたが、アレルギー性鼻炎の睡眠障害に関する検討では、鼻症状の悪化が明らかに睡眠を障害し、特に鼻閉が大きく関与していると報告されている<sup>6), 8), 11)~14)</sup>。2009年度はスギ花粉飛散数も多い大量飛散年における検討であるため、症状は完全型の割合も多く、鼻閉がQOLの低下および睡眠障害の主要な原因となっていると考えられる。

今回の検討でスギ花粉飛散数の増加に伴ってスギ花粉症患者の鼻および目の症状が増悪し、QOLが低下するだけでなく、睡眠も障害される実態があることが示唆された。スギ花粉症患者の治療に対する満足度は高くなく、患者の満足度を高めるためには眼鼻の症状を抑制するだけでなく、夜間睡眠や日常生活のQOLを低下させない工夫が必要であると考えられる<sup>9)~14)</sup>。今回の結果を

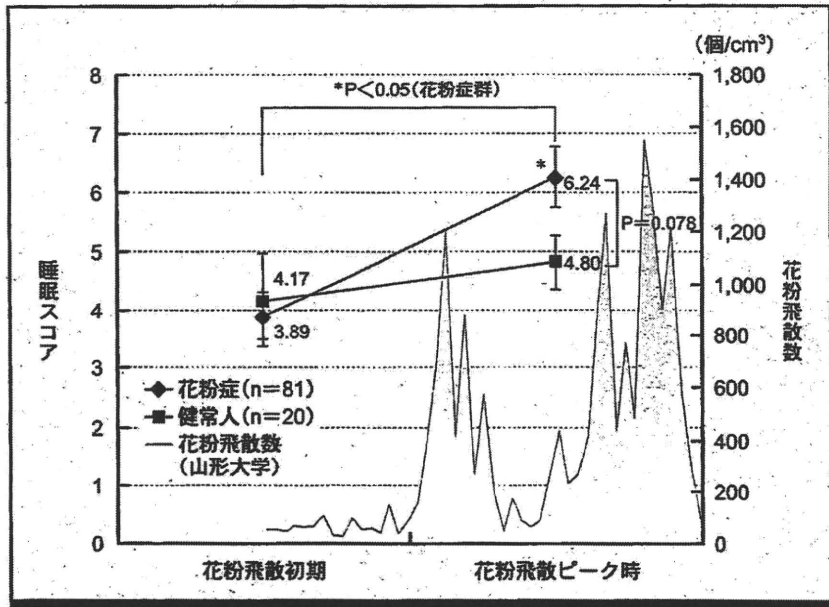


図8 2009年度のスギ花粉飛散数と睡眠障害

スギ花粉症では、花粉飛散初期と比べてピーク時に睡眠スコアの有意な上昇を認めた。

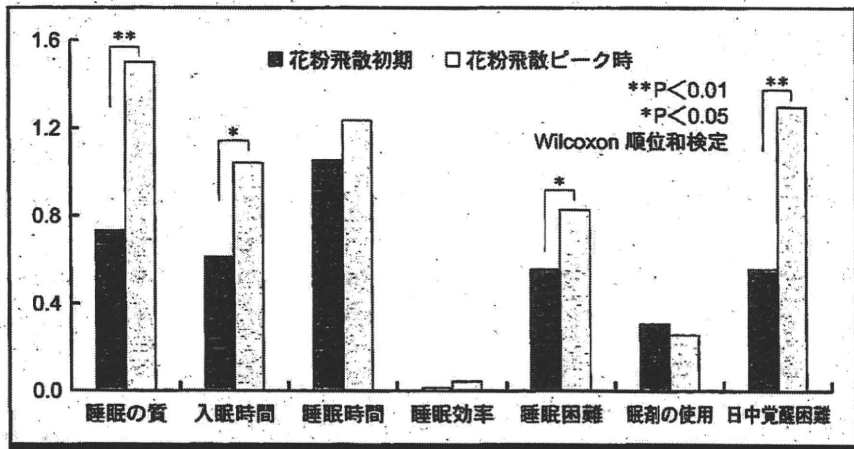


図9 PSQIの各項目

スギ花粉症では、花粉飛散初期と比べてピーク時に睡眠の質、入眠時間、睡眠困難、日中覚醒困難の各スコアの有意な上昇が認められた。

踏まえて、スギ花粉症患者の治療にあたっては、重症度に応じた薬剤選択を行うと同時に、QOL

と睡眠障害も念頭に置いた治療戦略を考える必要があると考えられた。

文献

- 1) Okuda M: Epidemiology of Japanese cedar pollinosis throughout Japan. *Ann Allergy Asthma Immunol* **91** (3): 288-296, 2003.
- 2) 鼻アレルギー診療ガイドライン作成委員会: 鼻アレルギー診療ガイドライン-通年性鼻炎と花粉症- 2009年版. ライフ・サイエンス, 東京, 2008
- 3) 大久保公裕: 花粉症の全身症状. *アレルギー・免疫* **16** (2): 149-152, 2009
- 4) 北村剛一, 長谷川達哉, 荒木 進ほか: スギ花粉症の症状の重症化およびQOLに影響を及ぼす因子に関する検討. *耳鼻咽喉科免疫アレルギー* **27** (1): 25-30, 2009
- 5) 萩野 敏, 馬場謙治, 入船盛弘ほか: スギ花粉症に対するブランルカスト投与のQOLに与える影響(第1報). *アレルギー・免疫* **15** (11): 1566-1572, 2009
- 6) 千葉伸太郎: 花粉症と睡眠障害. *MEDICO* **40** (2): 41-45, 2009
- 7) 千葉伸太郎: 通年性アレルギー性鼻炎患者における睡眠の質に関する検討. *睡眠医療* **2**: 337-342, 2008
- 8) 岡本美孝: 花粉症の治療実態と睡眠. *Prog Med* **28** (10): 2524-2533, 2008
- 9) 原 浩貴, 菅原一真, 橋本 誠ほか: 通年性アレルギー性鼻炎患者の睡眠障害に対するロイコトリエン受容体拮抗薬の効果. *Prog Med* **28** (10): 2506-2511, 2008
- 10) 伊藤真貴, 竹内紀子, 萩野 敏: 花粉症による労働生産性への影響の研究(第1報) ニンテンドーDSを用いて. *耳鼻咽喉科免疫アレルギー* **26** (4): 291-296, 2009
- 11) 今野昭義ほか: 患者満足度からみた花粉症治療 花粉症アンケート調査結果から. *Prog Med* **23**: 2705-2709, 2003
- 12) Juniper EF, Guyatt GH: Development and testing of a new measure of health status for clinical trials in rhinoconjunctivitis. *Clin Exp Allergy* **21**: 77-83, 1991
- 13) Leger D, Annesi-Maesano I, Carat F et al: Allergic rhinitis and its consequences on quality of sleep. *Arch Intern Med* **166**: 1744-1748, 2006
- 14) Woods L et al: The importance of rhinitis on sleep, daytime somnolence, productivity and fatigue. *Curr Opin Pulm Med* **12**: 390-396, 2003

## Overexpression of glucocorticoid receptor- $\beta$ in severe allergic rhinitis

Akihiro Ishida<sup>a,b</sup>, Nobuo Ohta<sup>a,\*</sup>, Shuji Koike<sup>a</sup>, Masaru Aoyagi<sup>a</sup>, Mitsunori Yamakawa<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Otolaryngology, Yamagata University School of Medicine, 2-2-2 Iida-nishi, Yamagata, Yamagata 990-9585, Japan

<sup>b</sup> First Department of Pathology, Yamagata University School of Medicine, Yamagata, Japan

Received 16 October 2009; accepted 31 December 2009

Available online 24 February 2010

### Abstract

**Objective:** To clarify the role of glucocorticoid receptor- $\beta$  in resistance to glucocorticoid therapy for allergic rhinitis, we studied 37 tissue samples from 20 patients with severe allergic rhinitis, and samples from age-matched controls.

**Methods:** Patients were treated with intranasal fluticasone for 6 months and inferior turbinectomy was performed for patients with poor response to glucocorticoid treatment. The expression of glucocorticoid receptor- $\alpha$  (GR- $\alpha$ ), glucocorticoid receptor- $\beta$  (GR- $\beta$ ), and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in nasal mucosa was studied immunohistochemically.

**Results:** GR- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B were expressed to a similar extent in patients and controls, but GR- $\beta$  was expressed significantly more in patients, resulting in an increased GR- $\beta$ /GR- $\alpha$  ratio.

**Conclusion:** Our findings suggest that GR- $\beta$  plays an important role in resistance to glucocorticoid therapy for allergic rhinitis, and its expression might be used as an additional parameter indicating steroid resistance in allergic rhinitis.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Allergic rhinitis; Glucocorticoid receptor; Resistance

### 1. Introduction

Glucocorticoids (GCs) are commonly used as anti-inflammatory agents in the treatment of chronic allergic diseases, including allergic rhinitis [1]. Their effects are mediated by glucocorticoid receptor- $\alpha$  (GR- $\alpha$ ). Upon binding GC, activated GR- $\alpha$  enhances transcription of anti-inflammatory genes and interacts with other proteins regulating inflammation, such as nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) [2]. However, these clinical benefits are sometimes limited because some patients demonstrate persistent tissue inflammation despite treatment with high doses of GC [3]. It is generally considered that the interference of non-functional GR variants in immune cells may result in GC resistance [4,5]. GR- $\beta$  is a well-known natural spliced variant of GR consisting of 742 amino acids encoded by exons 2–8 and part of 9 $\beta$ , but cannot bind to GC. GR- $\beta$  expression was

increased in patients with bronchial asthma or with ulcerative colitis who did not respond to GC administration [2–6]. Here we tested this hypothesis by investigating the correlation between the expression of GR- $\alpha$ , GR- $\beta$ , and NF- $\kappa$ B in patients with allergic rhinitis and their response to GC treatment.

### 2. Subjects and methods

#### 2.1. Subjects

The patient group consisted of 20 subjects with allergic rhinitis, aged from 21 to 32 years (mean age 23.5), who showed persistent GC resistance necessitating surgical removal of the inferior turbinate after 6 months' GC treatment. The patients with poor response to GC treatment for 6 months' were defined as GC resistance. The control group consisted of 10 subjects aged from 21 to 32 years (mean age 23.5) who underwent maxillofacial surgery, from

\* Corresponding author. Tel.: +81 236 28 5380; fax: +81 236 25 5382.  
E-mail address: noohta@med.id.yamagata-u.ac.jp (N. Ohta).



whom nasal tissues were taken and who did not receive GC treatment.

## 2.2. Immunohistochemistry to detect GR- $\alpha$ , GR- $\beta$ , and NF- $\kappa$ B

Nasal mucosal tissues were fixed in 10% formalin for 1–2 days, dehydrated through an ethanol series, and embedded in paraffin wax. Sections 3 mm thick were dewaxed in xylene and dehydrated. The sections were washed with 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2) containing 0.15 M NaCl and 0.01% Triton X-100, and incubated for 2 h with rabbit polyclonal anti-GR- $\alpha$  antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), rabbit polyclonal anti-GR- $\beta$  antibody (Affinity Bio Reagents, Rockford, IL, USA), or mouse monoclonal anti-NF- $\kappa$ B antibody (Santa Cruz Biotechnology), each diluted 1:200 in PBS containing 0.1% bovine serum albumin. Controls for nonspecific staining were incubated with 10 mg/mL mouse IgG1 (DAKO, Glostrup, Denmark). Sections were washed and incubated with biotinylated rabbit antibody to mouse IgG, IgA, and IgM (Immunotech, Tokyo, Japan) for 1 h. The sections were incubated with Vectastain reagent (ABC Elite; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), followed by 3,3-diaminobenzidine (Dojin Chemicals, Kumamoto,

Japan) as the chromogen. Finally, the slides were counterstained with hematoxylin.

## 2.3. Assessment of slides

Immunostained sections were assessed under an Olympus microscope with an eyepiece reticule at 200 $\times$  magnification. Cell counts are expressed as means per high-power field (0.202 mm<sup>2</sup>). At least 2 sections were immunostained, and more than 5 areas were evaluated via the graticule. Results are expressed as positive cells per field.

## 2.4. Statistics

Control group means (arithmetic mean  $\pm$  SD) were compared with patient group means by Mann–Whitney *U*-test at  $P = 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Expression of GR- $\alpha$ , GR- $\beta$ , and NF- $\kappa$ B

GR- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B were expressed in the nasal epithelium and submucosal inflammatory cells in both patients and controls, with no significant differences (Figs. 1 and 3). GR-

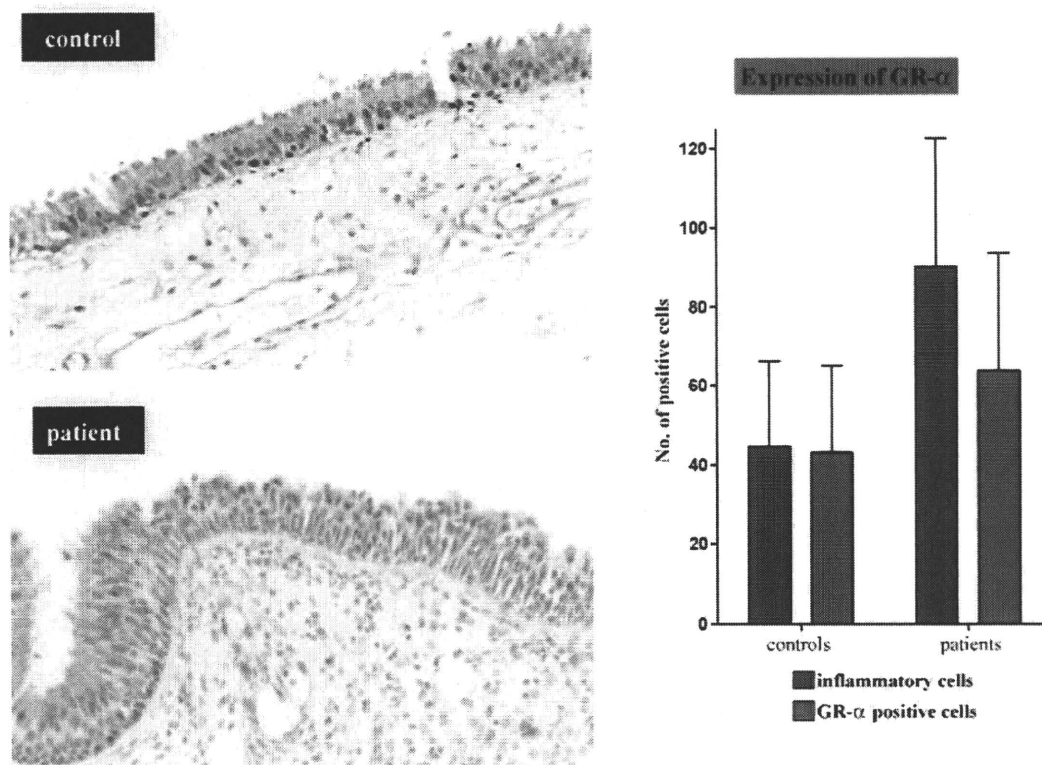


Fig. 1. Representative pathological findings of GR- $\alpha$  and GR- $\alpha$  immunoreactivities in the nasal mucosa of patients with severe nasal allergy and controls (HE, original magnification 100 $\times$ ). The expression of GR- $\alpha$  in the nasal mucosa of patients with severe nasal allergy and controls.



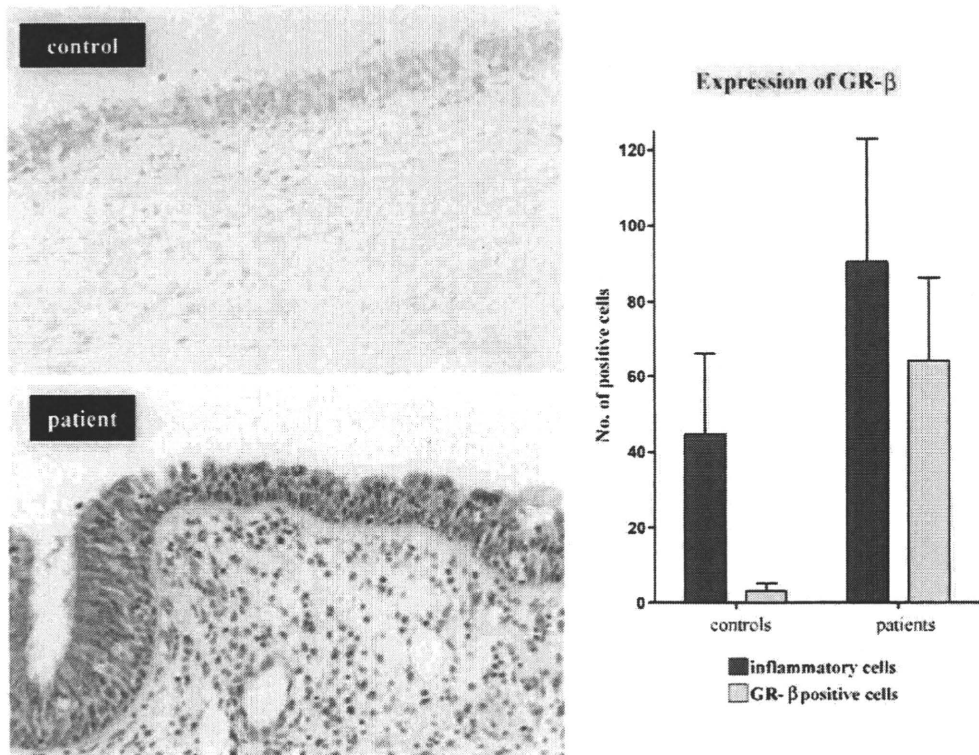


Fig. 2. Representative pathological findings of GR-β and GR-β immunoreactivities in the nasal mucosa of patients with severe nasal allergy and control (HE, original magnification 100×). The expression of GR-β in the nasal mucosa of patients with severe nasal allergy and controls.

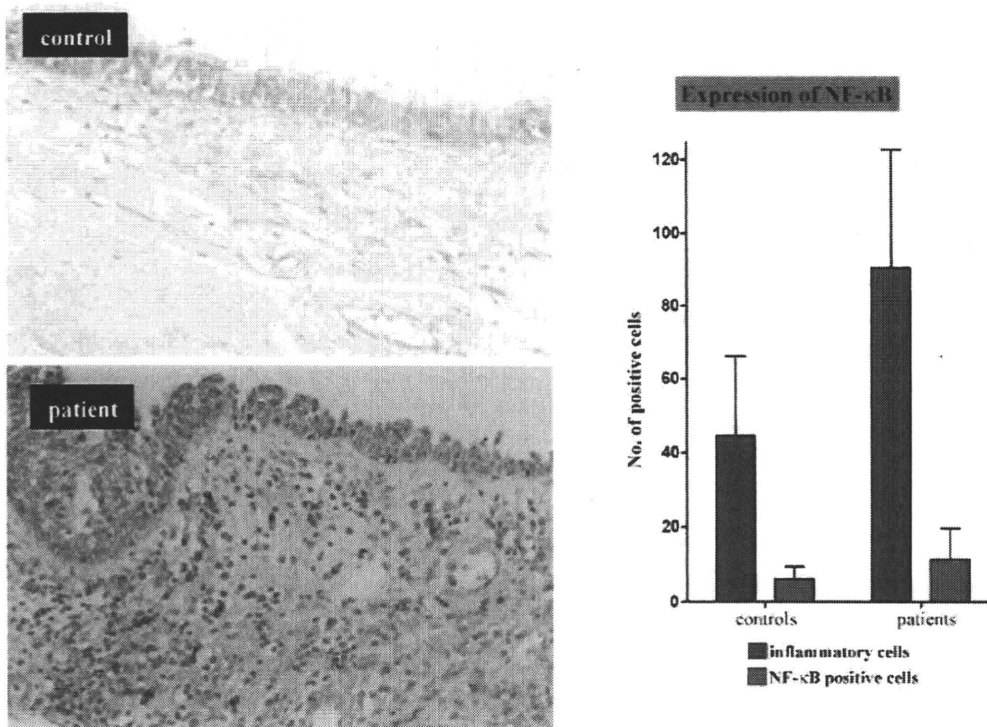


Fig. 3. Representative pathological findings of NF-κB and NF-κB immunoreactivities in the nasal mucosa of patients with severe nasal allergy and controls (HE, original magnification 100×). The expression of NF-κB in the nasal mucosa of patients with severe nasal allergy and controls.

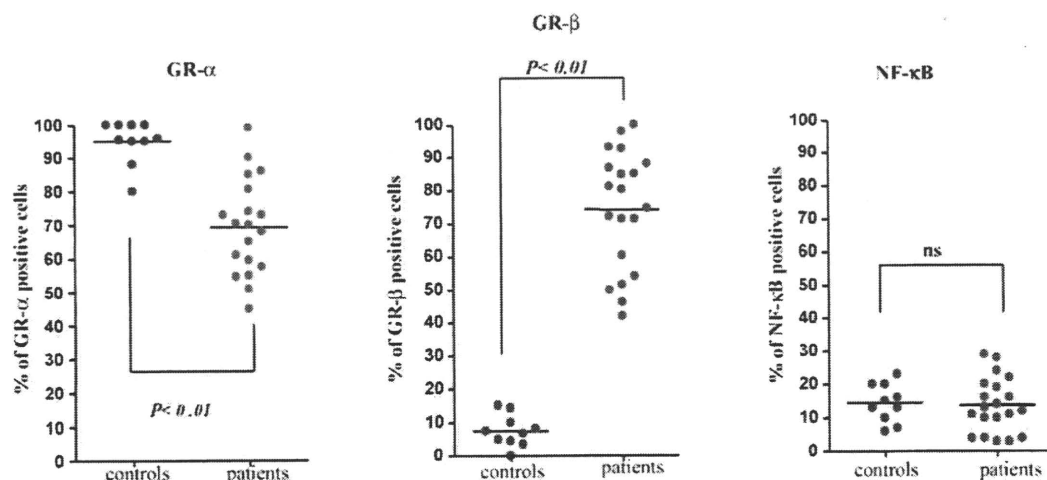


Fig. 4. The number of GR- $\alpha$ -, GR- $\beta$ - and NF- $\kappa$ B-positive cells in the nasal mucosa of patients with severe nasal allergy and controls.

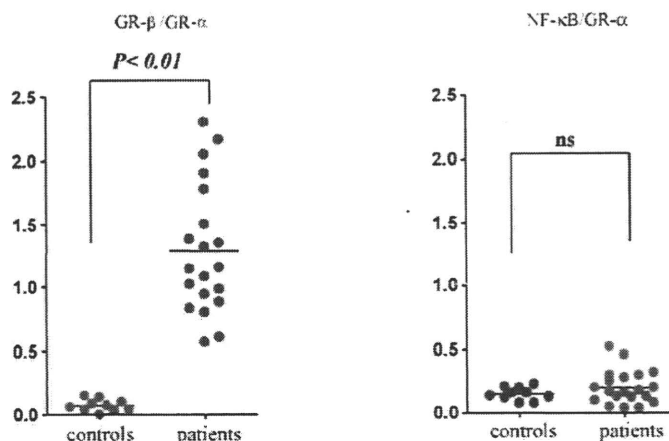


Fig. 5. Ratios of GR- $\beta$ /GR- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B/GR- $\alpha$  of patients with severe nasal allergy and controls.

$\beta$  was expressed significantly more in the nasal epithelium and submucosal inflammatory cells of patients than in controls (Fig. 2).

### 3.2. Numbers of GR- $\alpha$ -, GR- $\beta$ -, and NF- $\kappa$ B-positive cells

The ratio of GR- $\beta$ /GR- $\alpha$  in the nasal epithelium and submucosa was significantly higher in patients than in controls, but the ratio of NF- $\kappa$ B/GR- $\alpha$  was not significantly different (Figs. 4 and 5).

## 4. Discussion

One of the factors associated with GC sensitivity is the presence of non-binding GR variants, such as GR- $\beta$ . It is

generally considered that interference by non-binding GR variants may result in GC resistance [6–11]. For example, GR- $\beta$  expression in peripheral blood mononuclear cells increased in patients with bronchial asthma or ulcerative colitis who did not respond to GC administration [12–17]. A co-transfection assay demonstrated that GR- $\beta$  inhibited GR- $\alpha$ -mediated transcriptional signals [17,18]. These results strongly suggest that GR- $\beta$  expression in inflammatory cells could influence a patient's sensitivity to GC, and explain why some patients exhibit persistent GC resistance despite high-dose treatment. The precise physiological role of GR- $\beta$  remains controversial.

We observed significantly increased expression of GR- $\beta$  in the nasal epithelium and submucosal inflammatory cells of patients with severe nasal allergy, and a significantly higher ratio of GR- $\beta$ /GR- $\alpha$ . Although the precise physiological role of GR- $\beta$  remains elusive, GC resistance seems to

be caused by insufficient GR- $\alpha$ , excessive GR- $\beta$ , or both. GR- $\beta$  might act as a negative regulator of transcription and an inhibitor of signal transduction.

Other mechanisms have also been proposed to account for cellular steroid resistance, including overexpression of transcription factors such as NF- $\kappa$ B and AP-1, which antagonize GR function at the level of gene transcription and via protein–protein interactions [19,20]. NF- $\kappa$ B and AP-1 are induced by multiple cytokines, including TNF- $\alpha$  and IL-6. GR- $\alpha$  can also interact with other proteins regulating inflammation, such as NF- $\kappa$ B [19,20]. Overexpression of NF- $\kappa$ B caused by prolonged inflammation has been associated with GC resistance.

On the basis of these findings, we speculate that the amount of appearance of GR- $\beta$  in the cases who need operation was significantly high compared with healthy control, and the expression of GR- $\beta$  might be used as an additional parameter indicating GC resistance.

#### Acknowledgment

This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan (No. C14571605).

#### References

- [1] Pujols L, Alobid I, Benitez P, Martinez-Anton A, Roca-Ferrer J, Fokkens WJ, et al. Regulation of glucocorticoid receptor in nasal polyps by systemic and intranasal glucocorticoids. *Allergy* 2008;63(10):1377–86.
- [2] Derendorf H, Meltzer EO. Molecular and clinical pharmacology of intranasal corticosteroids: clinical and therapeutic implications. *Allergy* 2008;63(10):1292–300.
- [3] Watanabe S, Suzaki H. Changes of glucocorticoid receptor expression in the nasal polyps of patients with chronic sinusitis following treatment with glucocorticoid. *In Vivo* 2008;1822(1):37–42.
- [4] Georen S, Ahnblad P, Stjame P, Wikstrom AC, Stierna P. Significance of endogenous glucocorticoids sensitivity for airway eosinophilia in murine model of allergy. *Acta Otolaryngol* 2005;125(4):378–85.
- [5] Fakhri S, Tulic M, Christodoulou P, Fukakusa M, Frenkiel S, Leung DY, et al. Microbial superantigens induce glucocorticoid receptor beta and steroid resistance in nasa explant model. *Laryngoscope* 2004;114(5):887–92.
- [6] Matthews JG, Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. Defective glucocorticoid receptor nuclear translocation and altered histone acetylation patterns in glucocorticoid-resistant patients. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:1100–8.
- [7] Okazaki S, Yamakawa M, Maeda K, Ohta N, Aoyagi M. Expression of glucocorticoid receptors in non-neoplastic lymphoid follicles and B cell type malignant lymphomas. *J Clin Pathol* 2006;59(4):410–6.
- [8] Watanabe K, Shirasaki H, Kanaizumi E, Himi T. Effects of glucocorticoids on infiltrating cells and epithelial cells of nasal polyps. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004;113:465–73.
- [9] Hamilos DL, Leung DY, Muro S, Kahn AM, Hamilos SS, Thawley SE, et al. GR $\beta$  expression in nasal polyp inflammatory cells and its relationship to the anti-inflammatory effects of intranasal fluticasone. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:59–68.
- [10] Beppu T, Ohta N, Gon S, Sakata K, Inamura K, Fukase S, et al. Eosinophil and eosinophil cationic protein in allergic rhinitis. *Acta Otolaryngol (Suppl)* 1994;511:221–3.
- [11] Sausa AR, Lane SJ, Cidlowski JA, Staynov DZ, Lee TH. Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor beta-isoform. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:943–50.
- [12] Osada R, Takeno S, Hirakawa K, Ueda T, Furukido K, Yajin K. Expression and localization of nuclear factor-kappa B subunits in cultured human paranasal sinus mucosal cells. *Rhinology* 2003;41(2):80–6.
- [13] Takeno S, Hirakawa K, Ueda T, Furukido K, Osada R, Yajin K. Nuclear factor-kappa B activation in the nasal polyp epithelium: relationship to local cytokine gene expression. *Laryngoscope* 2002;112(1):53–8.
- [14] Adcock IM, Barnes PJ. Molecular mechanisms of corticosteroid resistance. *Chest* 2008;134(1):394–401.
- [15] Meltzer EO. The pharmacological basis for the treatment of perennial allergic rhinitis and non-allergic rhinitis with topical corticosteroids. *Allergy* 1997;52:33–40.
- [16] Pullerits T, Praks L, Skoogh BE, Ani R, Lotvall J. Randomized placebo-controlled study comparing a leukotriene receptor antagonist and a nasal glucocorticoid in seasonal allergic rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159(6):1814–8.
- [17] Lonqui CA, Faria CD. Evaluation of glucocorticoid sensitivity and its potential clinical applicability. *Horm Res* 2009;71(6):305–9.
- [18] Wright RJ. Stress and acquired glucocorticoid resistance: a relationship hanging in the balance. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123(4):831–2.
- [19] Corrigan CJ, Loke TK. Clinical and molecular aspects of glucocorticoid resistant asthma. *Ther Clin Risk Manag* 2007;3(5):771–87.
- [20] Szczepankiewicz A, Breborowicz A, Sobkowiak P, Popiel A. No association of glucocorticoid receptor polymorphisms with asthma and response to glucocorticoids. *Adv Med Sci* 2008;52(2):245–50.

Letter to the Editor

Expression of glucocorticoid receptor spliced variants in lymphoma cell lines

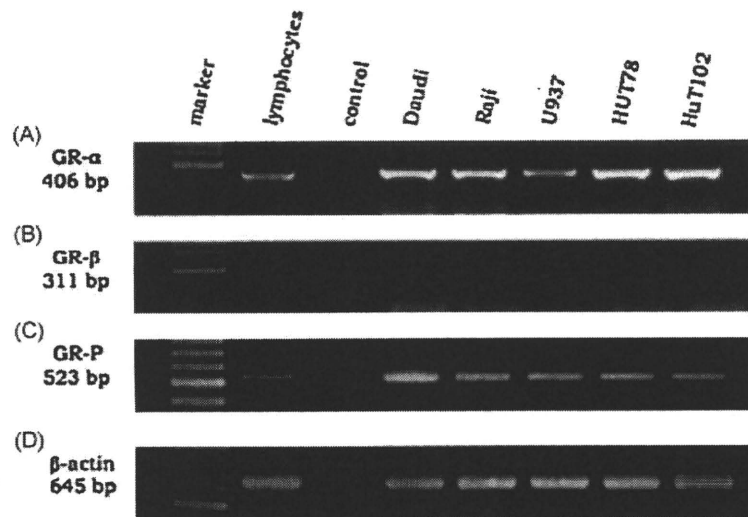
To the Editor

Glucocorticoid (GC) has been commonly used as an anti-inflammatory reagent and a component of chemotherapeutic regimens for inducing apoptosis of haematological malignancies including leukaemia, multiple myeloma and malignant lymphoma [1]. Glucocorticoid receptor (GR) is modulated by alternative splicing of GR mRNA [2,3]. As the hormone-binding domain exists at the C-terminus, GR- $\alpha$  is functional and mediates the transcriptional response of GC. GR- $\beta$  cannot bind to GC but inhibit GR- $\alpha$ -mediated transcriptional signals [4]. However, the role of GR- $\beta$  in modulating GC sensitivity has been highly debated and is as yet unclear [4,5]. Although GR-P is especially highly expressed in haematological malignancies

(23–54% of the total GR) [6], its role has not been clearly established.

Herein, for the first time, we report quantitative data of GR spliced variants in lymphoma cell lines with real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and documented the subcellular distribution of GR- $\alpha$  with GR-P in response to GC administration.

Human lymphoma cell lines Daudi, Raji, U937, HUT78 and HuT102 (a kind gift from Dr. Kudo, Center for Biomedical Research Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai, Japan) were used. For GC stimulation, cells were treated with dexamethasone (Dex) at different concentrations. When Dex was administered for 24 h, cell proliferation of Daudi was significantly



**Figure 1.** The expression of mRNAs of glucocorticoid receptors (GR- $\alpha$ , GR- $\beta$  and GR-P) in normal lymphocytes and different lymphoma cell lines. Marker; 100 bp DNA ladder consists of double-stranded DNA fragments in multiples of 100 bp. Lymphocytes; normal lymphocytes, control; negative control consists of all components required for RT-PCR except the template RNA.  $\beta$ -Actin was amplified as housekeeping gene.

**Table 1.** Expression of glucocorticoid receptor (GR) mRNA of normal lymphocytes and lymphoma cell lines measured by real-time polymerase chain reaction (copies/mg total RNA)

Cells	GR- $\alpha$	GR- $\beta$	GR-P <sup>a</sup>	HPRT
Daudi	$1.11 \pm 0.13 \times 10^6$	$1.16 \pm 0.49 \times 10^3$	$1.83 \pm 0.21 \times 10^6$	$8.72 \pm 1.08 \times 10^5$
Raji	$1.51 \pm 0.09 \times 10^6$	$1.15 \pm 0.33 \times 10^3$	$2.04 \pm 0.53 \times 10^6$	$8.84 \pm 1.36 \times 10^5$
U937	$5.82 \pm 1.64 \times 10^5$	$5.56 \pm 0.32 \times 10^2$	$1.06 \pm 0.09 \times 10^6$	$8.08 \pm 0.88 \times 10^5$
HUT78	$1.64 \pm 0.38 \times 10^6$	$1.92 \pm 0.78 \times 10^3$	$2.01 \pm 0.21 \times 10^6$	$8.20 \pm 2.80 \times 10^5$
HuT102	$6.68 \pm 1.14 \times 10^5$	$2.11 \pm 0.41 \times 10^3$	$8.36 \pm 0.52 \times 10^5$	$8.04 \pm 2.04 \times 10^5$
Normal lymphocytes	$5.12 \pm 1.44 \times 10^5$	$5.11 \pm 1.51 \times 10^2$	$1.74 \pm 0.47 \times 10^3$	$7.96 \pm 1.40 \times 10^5$

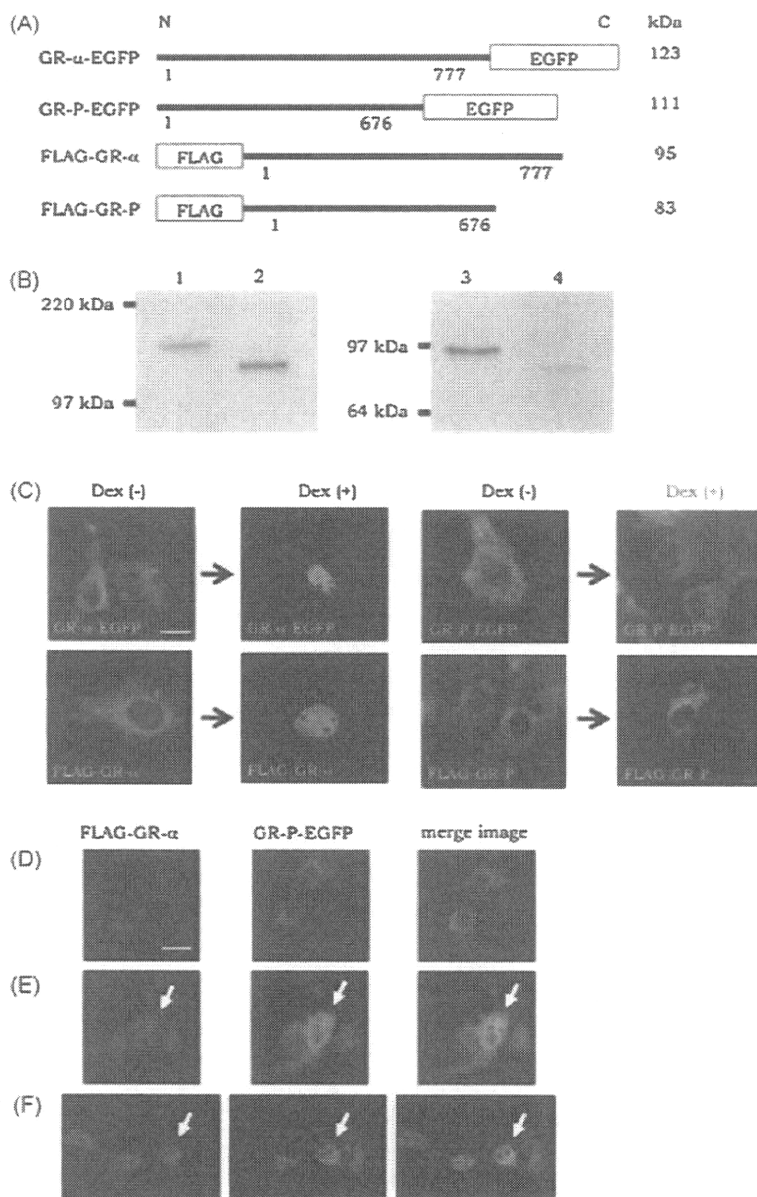
HPRT, hypoxanthine-phosphoribosyltransferase.

<sup>a</sup>Normal lymphocytes versus Daudi, Raji, U937, HUT78 and HuT102, respectively;  $P < 0.05$

increased (Supplementary Figure S1). After 48 h, cell proliferation of Daudi incubated with 10 mM and 1 mM Dex remained significantly increased. However, cell proliferation decreased in Raji and U937 at any Dex concentrations, in HUT78 at only 0.1 mM Dex after 48 h, and in HuT102 at only 0.1 mM Dex after 24 h. At 72 h after Dex administration, there was no significant difference of cell proliferation in any groups.

On PCR GR- $\alpha$  mRNA was expressed in all samples including normal lymphocytes (Figure 1A). Although very

weak 311 bp bands were found in Daudi and Raji, GR- $\beta$  mRNA expression was almost undetectable (Figure 1B). GR-P mRNA was also expressed in all samples including normal lymphocytes (Figure 1C). Basal expression levels of GR transcripts measured by RT-PCR in normal lymphocytes and lymphoma cells were shown in Table 1. In normal lymphocytes, the expression level of GR- $\alpha$  was more than 1,000-fold higher than that for GR- $\beta$  and more than 100-fold than that for GR-P. In lymphoma cells, concentrations of GR- $\alpha$  in Daudi, Raji and HUT78 were



**Figure 2.** Subcellular localization of EGFP- or FLAG-GR- $\beta$  and GR-P in transfected COS-7. A: Schematic representation of the transfected constructs. Numbers on both sides of the bar indicate the start and end positions of amino acids. Expected molecular weights are shown on the right side. B: Western blot analysis for expression of GR- $\beta$  and GR-P in transfected COS-7. Lane 1, GR- $\beta$ -EGFP; Lane 2, GR-P-EGFP; Lane 3, FLAG-GR- $\beta$ ; Lane 4, FLAG-GR-P. Size markers are indicated on the left. C: Confocal micrographs of subcellular localization of GR- $\beta$  and GR-P in COS-7 co-transfected with FLAG-GR- $\alpha$  and GR-P-EGFP before and after Dex (1  $\mu$ M) administration. D-F: Confocal micrographs of subcellular localization of GR- $\alpha$  and GR-P in COS-7 co-transfected with FLAG-GR- $\alpha$  and GR-P-EGFP before and after Dex administration. For detection of FLAG-GR- $\alpha$ , cells were stained with mouse anti-FLAG M2 antibody, and anti-mouse IgG-conjugated Alexa 546 (red). Fluorescent image of COS-7 co-expressed with FLAG-GR- $\alpha$  and GR-P-EGFP before Dex administration (D), with FLAG-GR- $\alpha$  and GR-P-EGFP 10 min after Dex administration (E), and with FLAG-GR- $\alpha$  and GR-P-EGFP 30 min after Dex administration (F). Arrows indicate the same nucleus in each image. C-F: Bar = 20  $\mu$ m.



double that in normal lymphocytes, others were at the same level. Concentrations of GR-β in Dauji, Raji and HuT102 appeared to be slightly higher than that in normal lymphocytes. However, the GR-β/GR-α ratio in lymphoma cells was not different from that of normal lymphocytes. In contrast to GR-α and GR-β, the concentration of GR-P was significantly increased in lymphoma cells, reaching a concentration similar to that of GR-α. Furthermore, auto-regulation began within 2 h after Dex administration (data not shown). Concentrations of GR transcripts incubated without Dex administration were stable at 4, 24 and 48 h time points. Both GR-α and GR-P encoding transcripts were up-regulated in Daudi. GR-P transcripts in Daudi were increased more significantly by Dex administration through the observation period, maintaining excess GR-α transcripts. On the other hand, both GR-α and GR-P transcripts in the other cells were significantly decreased 1 h after Dex administration and recovered to almost the same level before Dex administration at 48 h. There was no significant difference of the concentration of GR-β transcript during the entire observation. To our knowledge, there have not been any reports of GC affecting the translation of GR transcripts. It can be concluded that expression of GR-β may not be related to malignant transformation in lymphocytes, and seems to have no significant role in GC responsiveness in lymphoma cells. Thus, GR-P is a predominant spliced variant generated in lymphoma cells.

Transient transfection of GR-α and GR-P was done using COS-7 cell line. Schematic representation of the transfected constructs of GR-α-EGFP, GR-P-EGFP, FLAG-GR-α and FLAG-GR-P was shown in Figure 2A. The expected size of fusion proteins of GR-α (94 kDa) and GR-P (82 kDa) with the 29 kDa EGFP or 1 kDa FLAG-tag was 123 kDa (GR-α-EGFP), 111 kDa (GR-P-EGFP), 95 kDa (FLAG-GR-α) and 83 kDa (FLAG-GR-P), respectively. The expressed fusion proteins were detected with bands at the expected molecular weight on Western blotting (Figure 2B). To evaluate the subcellular distribution of GR-α and GR-P, the constructed plasmids were transiently transfected in COS-7 cells. Before Dex administration, GR-α-EGFP, FLAG-GR-α, GR-P-EGFP and FLAG-GR-P were predominantly localized in the cytoplasm (Figure 2C). Upon Dex administration, nuclear translocation of GR-α fusion proteins started and was completed within 30 min, excluding them from the nucleolar regions (Figure 2C). The distribution of GR-P-EGFP and FLAG-GR-P was not changed even 30 min after Dex administration. Macromolecules >40 kDa such as GR-α and GR-P are transported to the nucleus through gated channels of the nuclear pore complex (NPC) by active mechanisms including interaction with importin-α and importin-β [7-9]. In this assay, we first revealed that GR-P predominantly localizes in the cytoplasm in the absence of GC.

To investigate how GR-α and GR-P co-expressed in a single living cell, plasmids of FLAG-GR-α and GR-P-EGFP were co-transfected into COS-7 cells. There was no difference in the distribution pattern of each fusion protein between single transfection and co-transfection conditions (Figure 2D). Upon Dex administration, contrary to single

**Table 2.** Subcellular localization of glucocorticoid (GR)-α and GR-P fusion proteins in COS-7 cells before and after dexamethasone (Dex) administration

Fusion protein	Localization	Dex (%)	
		None	Present
GR-α-EGFP	C	96	0
	C=N	4	0
	N	0	100
FLAG-GR-α	C	92	0
	C=N	6	2
	N	2	98
GR-P-EGFP	C	92	88
	C=N	6	10
	N	2	2
FLAG-GR-P	C	84	80
	C=N	12	14
	N	4	6

C, cytoplasm; C = N, cytoplasm = nucleus; N, nucleus.

transfections of GR-P fusion protein, nuclear translocations of not only FLAG-GR-α but also GR-P-EGFP started and completed within 30 min excluding them from the nucleolar region (Figure 2E,F). Nuclear translocation was detected in almost all cells singly expressing GR-α-EGFP or FLAG-GR-α (Table 2), and was not detected in cells singly expressing GR-P-EGFP or FLAG-GR-P 30 min after Dex administration (Table 2). In co-transfection studies, 88% of GR-P fusion proteins were predominantly detected in the nucleus after Dex administration (Table 3). Our co-transfection experiments suggested that translocation of GR-P occurred in the presence of GR-α. Upon GC binding, GR-α interacts with importin-α and importin-β which are docking proteins involved in the nuclear pathway across the NPC [7,8]. GR-P combined with GR-α as heterodimers may translocate to the nucleus for stimulating transcription of target genes in different manners compared with regular GR-α homodimers. The balance between GR-α and GR-P formation may modulate

**Table 3.** Subcellular co-localization of glucocorticoid (GR)-α and GR-P fusion proteins in COS-7 cells before and after dexamethasone (Dex) administration<sup>a</sup>

	FLAG-GR-α (%)		
	C	C = N	N
Dex (-)			
GR-P-EGFP			
C	82	0	0
C = N	18	0	0
N	0	0	0
Dex (+)			
GR-P-EGFP			
C	0	0	0
C = N	0	0	12
N	0	0	88

C, cytoplasm; C = N, cytoplasm = nucleus; N, nucleus.

<sup>a</sup>Localization of fusion proteins was determined by predominant fluorescent region in each cell (total 50 cells).

the effects of GC. It is also possible for GR-P to form "GR-P-GR-P" homodimers by connecting with each other. N-terminal domain in GR- $\alpha$  is required for the regulation of transcription [10]. GR-P may also regulate transcription associated with cell proliferation by its N-terminal domain.

In conclusion, even if it occurs temporally, the abundant GR-P proteins generated as a result of Dex administration may cause relative dominance of "GR- $\alpha$ -GR-P" heterodimers and may inhibit normal transcriptional activity of GR- $\alpha$  homodimers in lymphoma cells.

### Acknowledgements

This work was supported by a Grant-in-Aid from the Global COE program of the Japan Society for the Promotion of Science.

### References

1. Sionov RV, Spokoini R, Kfir-Erenfeld S, Cohen O, Yefenof E. Mechanisms regulating the susceptibility of hematopoietic malignancies to glucocorticoid-induced apoptosis. *Adv Cancer Res* 2008; **101**: 127–248.
2. Duma D, Jewell CM, Cidlowski JA. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; **102**: 11–21.
3. Moutsatsou P, Papavassiliou AG. The glucocorticoid receptor signaling in breast cancer. *J Cell Mol Med* 2008; **12**: 145–163.
4. Gross KL, Lu NZ, Cidlowski JA. Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance. *Mol Cell Endocrinol* 2009; **300**: 7–16.
5. Kino T, Su YA, Chrousos GP. Human glucocorticoid receptor isoform  $\beta$ : recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell Mol Life Sci* 2009; **66**: 3435–3448.
6. Sánchez-Vega B, Krett N, Rosen ST, Gandhi V. Glucocorticoid receptor transcriptional isoforms and resistance in multiple myeloma cells. *Mol Cancer Ther* 2006; **5**: 3062–3070.
7. Alber F, Förster F, Korkin D, Topf M, Sali A. Integrating diverse data for structure determination of macromolecular assemblies. *Annu Rev Biochem* 2008; **77**: 443–477.
8. Freedman ND, Yamamoto KR. Importin 7 and importin  $\alpha$  are nuclear import receptors for the glucocorticoid receptor. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 2276–2286.
9. Gross KL, Cidlowski JA. Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol Metab* 2008; **19**: 331–339.
10. Kumar R, Serrette JM, Khan SH, Miller AL, Thompson EB. Effects of different osmolytes on the induced folding of the N-terminal activation domain (AF1) of the glucocorticoid receptor. *Arch Biochem Biophys* 2007; **465**: 452–460.

Akihiro Ishida<sup>1,2</sup>

Yasukazu Hozumi<sup>3</sup>

Kaoru Goto<sup>3</sup>

Tsukasa Ito<sup>2</sup>

Masaru Aoyagi<sup>2</sup>

Prof. Mitsunori Yamakawa M.D., Ph.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathological Diagnostics, Yamagata University Faculty of Medicine, Yamagata, Japan

<sup>2</sup>Department of Otorhinolaryngology, Yamagata University Faculty of Medicine, Yamagata, Japan

<sup>3</sup>Department of Anatomy and Cell Biology, Yamagata University Faculty of Medicine, Yamagata, Japan

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)  
分担研究報告書

リアルタイムモニター花粉症の情報のあり方の研究と舌下ペプチド・アジュバンド療法の臨床研究  
— スギ花粉症に対する舌下ペプチド免疫療法の効果に関する研究 —

分担研究者 後藤 穰 日本医科大学耳鼻咽喉科講師  
主任研究者 大久保公裕 日本医科大学耳鼻咽喉科教授

研究要旨

免疫療法は、長期寛解・治癒を望めることから、根治的治療と位置付けられているが、副作用の発現のため必ずしも十分普及していない。解決策として、投与経路の変更(例えば舌下免疫療法)や投与エキスの改良が試されてきた。舌下免疫療法は一定の効果が期待できることが臨床研究によって確かめられている。一方、投与エキスの改良としてはペプチド免疫療法が最も有力視されている。T細胞エピトープを治療に用いれば、短期間で大量の抗原ペプチドを投与できるので治療効果の向上と同時に副作用を起こさないことが期待できる。

A. 研究目的

免疫療法はアレルギー疾患を治癒、長期寛解させることが期待できる唯一の治療法である。しかし、抗原エキスを蛋白として投与する場合、アナフィラキシーショックのような致死的な副作用が発生する危険性がある。そこで、いかに安全で有効性の高い方法に改良していくかが課題である。投与エキスを蛋白のままでも投与経路を注射から舌下に変更すれば、副反応の発生頻度は極めて少なくなることが知られており、舌下免疫療法も安全は方法として期待が大きい。別の考え方として、投与経路の変更ではなく治療エキスそのものを改良したもの一例が、ペプチド免疫療法である。主要抗原からB細胞エピトープを除外し、患者の治療に必要なT細胞エピトープだけを抜き出して用いるため、副反応が無く、一度に大量に投与できるので治療期間が少なくなる。今回、スギ花粉症治療に有用と考えられるペプチドを舌下投与し、臨床での有効性及び安全性を検討する臨床研究を計画した。しかしペプチドの臨床使用は実質困難であったことから、本研究については、第一三共株式会社が同社の費用で実施した臨床第Ⅱ相試験結果ならびに主要な解析結果の提供を受けて報告するものである。

B. 方法

投与エキスを第一三共株式会社が創製したCS-712を用いた。スギ花粉症患者120名を対象に、CS-712 1回10mgを1週間隔又は2週間隔にて24週間舌下保持後嚥下投与したときの有効性及び安全性を検討する目的で、2006年スギ花粉飛散期にプラセボ対照無作為化二重盲検試験を実施した。また、翌年の2007年スギ花粉飛散期に

CS-712 無投与下で追跡調査を行い、効果の持続性を検討した。

C. 結果

2006年のSymptom-Medication Score(以下SMS)では、CS-712各群のいずれもプラセボ群と比較してスギ花粉症症状を抑制させる傾向は認められず(図1)、2007年のSMSの推移も同様だった。一方、Cry j 1及びCry j 2刺激に対する末梢血リンパ球増殖反応については、2006年本格飛散時の投与開始時からの変化量が、Cry j 2刺激時のCS-712 2週間隔群を除いてプラセボ群と比較して有意に低値であり(図2)、CS-712がスギ花粉に対する反応性に影響を及ぼした可能性が示唆された。本格飛散時のアレルギー性鼻炎重症度については、2006年、2007年ともに、プラセボ群に比しCS-712 2週間隔群で重症以上の割合が多かったが、1週間隔群では軽症以下の割合が多かった。特に1週間隔群の2名(5.3%)の被験者では無症状で、2007年には1名(2.8%)軽症となったものの1名は継続して無症状であった。また、本格飛散時のQOL合計スコアについては、CS-712各群ともプラセボ群に比較してQOLの悪化を抑制する傾向は認められず、2006年の2週間隔群では有意に高値であった(P=0.0135)。

D. 考察:

臨床症状には有用性を認めなかった要因として、2006年、2007年共にスギ花粉飛散数が極めて少なく、プラセボ群でも軽症患者が多かったことも影響が大きいだろう。しかし、in vitroの検討ではCry j 1及びCry j 2刺激に対する末梢血リンパ球増殖反応において、プラセボ群は花粉の飛散に一致