

Table 4 Effect of exacerbated nasal disease on asthma symptoms.

		Exacerbated nasal disease
Asthma symptoms	Deteriorated	38 (30%)
	Unchanged	59 (47%)
	Improved	2 (2%)
	Unknown	27 (21%)
Total		126 (100%)

Table 5 Effect of nasal treatment on asthma symptoms.

		Nasal treatment
Asthma symptoms	Improved	28 (22%)
	Unchanged	71 (57%)
	Deteriorated	0 (0%)
	Unknown	27 (21%)
Total		126 (100%)

(28/126)で、喘息症状が改善すると自覚していた (Table 5)。

また、鼻炎症状が悪化すると喘息症状が悪化すると回答した38名の中で、鼻を治療すると19名(50%：全体の15%)で喘息症状が改善すると自覚しており、“鼻を治療すると喘息症状が改善し、鼻症状が悪化すると喘息症状も悪化する”という強い連関を自覚する一群が存在することが示された。

(2) 喘息症状の変化に伴う鼻炎症状の変化

次に、鼻炎症状と喘息症状を合併する126症例における、喘息症状の変化に伴う鼻炎症状の変化について、検討した。全症例のうち22%(28/126)で、喘息症状が悪化すると、鼻炎症状が悪化すると自覚していることがわかった (Table 6)。また、喘息を治療すると19%(24/126)で、鼻炎症状は改善すると自覚していた (Table 7)。

これらの結果から、鼻炎症状及び喘息症状のある患者の約30%で、両者の相関を自覚しているこ

Table 6 Effect of exacerbated asthma on nasal symptoms.

		Exacerbated asthma
Nasal symptoms	Deteriorated	28 (22%)
	Unchanged	60 (48%)
	Improved	1 (1%)
	Unknown	37 (29%)
Total		126 (100%)

Table 7 Effect of asthma treatment on nasal symptoms.

		Asthma treatment
Nasal symptoms	Improved	24 (19%)
	Unchanged	83 (66%)
	Deteriorated	0 (0%)
	Unknown	19 (15%)
Total		126 (100%)

とがわかった。

②鼻炎症状と喘息症状の連関が高い群の検討

今回のアンケートでは、鼻炎症状の変化によって喘息症状が変化する割合の方が、喘息症状の変化によって鼻炎症状が変化する割合と比較し、より高率であった。そこで、両者の連関がどの患者でより強く観察されるかについての解析は、鼻炎症状の変化によって喘息症状が変化する割合に絞って施行した。アンケートの回答が得られた99人を対象とした。

(1) 基礎疾患による違い

初めに、鼻の基礎疾患の違いによって、鼻炎症状が変化したときの喘息症状の変化が異なるか検討した。初めにTable 2における7群で、鼻炎症状の悪化に伴う喘息症状の悪化を自覚する頻度及び鼻治療に伴う喘息症状の改善を自覚する頻度を検討した。副鼻腔炎の存在は、両者の連関を強める可能性が示唆されたが、各群間で有意差はなかった (Table 8 and data not shown)。

Table 8 Influence of pre-existing nasal disease on association between exacerbated nasal disease and asthma symptoms.

		Exacerbation of asthma by exacerbated nasal disease (+)	Exacerbation of asthma by exacerbated nasal disease (-)	Total
Pre existing nasal disease	AR	8 (33%)	16 (67%)	24
	JCP	7 (35%)	13 (65%)	20
	Sinusitis	0 (0%)	3 (100%)	3
	AR + JCP	10 (36%)	18 (64%)	28
	AR + sinusitis	4 (57%)	3 (43%)	7
	JCP + sinusitis	1 (50%)	1 (50%)	2
	AR + JCP + sinusitis	6 (55%)	5 (45%)	11
	Unknown	2 (50%)	2 (50%)	4
Total		38	61	99

Table 9 Influence of asthma control on association between exacerbated nasal disease and asthma symptoms

		Exacerbation of asthma by exacerbated nasal disease (+)	Exacerbation of asthma by exacerbated nasal disease (-)	Total
Asthma control	Good (symptom-free or minimal symptoms)	31 (53%)	28 (47%)	58
	Not good (occasional or frequent symptoms)	7 (17%)	34 (83%)	41
Total		38	61	99

そこで、副鼻腔炎がある群（23人）と副鼻腔炎がない群（72人）で、両者の連関について検討した。副鼻腔炎がある群と副鼻腔炎のない群とでは、鼻炎症状の悪化による喘息症状の悪化を自覚する割合に差が無かったが（副鼻腔炎あり 47.8%（11/23）：副鼻腔炎なし 34.7%（25/72）： $p=0.26$ ）。副鼻腔炎がある群では、有意ではないが、鼻治療によって喘息症状が改善すると自覚する傾向にあった（副鼻腔炎あり 39.1%（9/23）：副鼻腔炎なし 22.2%（16/72）： $p=0.11$ ）。

(2) 鼻炎・喘息の症状（頻度）による違い

日常的に鼻炎症状がある群（ときどき・しばしば）と鼻炎症状がない群（ほとんどない）で、両者の連関に差があるか検討した。日常的に鼻炎症

状がある群と鼻炎症状がない群とでは、鼻炎症状の悪化による喘息症状の悪化を自覚する割合は、差が無かった（鼻炎あり 38.8%（33/85）：鼻炎なし 35.7%（5/14）： $p=0.82$ ）。また、日常的に鼻炎症状がある群と鼻炎症状が無い群とでは、鼻治療による喘息症状の改善を自覚する割合も差が無かった（鼻炎あり 27.1%（23/85）：鼻炎なし 14.3%（2/14）： $p=0.30$ ）。次に、通年的に喘息症状がある群（ときどき・しばしば）と喘息症状がない群（ほとんどない）で、鼻炎症状と喘息症状の連関に差があるか検討した。通年的に喘息症状がある群では、喘息症状がない群と比較し、鼻炎症状の悪化により喘息症状が悪化するとより自覚していることがわかった（喘息あり 53%（31/58）：喘息なし 17%

Table 10 Influence of asthma control on association between nasal treatment and asthma symptoms.

		Improvement of asthma by nasal treatment (+)	Improvement of asthma by nasal treatment (-)	Total
Asthma control	Good (symptom-free or minimal symptoms)	21 (36%)	37 (64%)	58
	Not good (occasional or frequent symptoms)	7 (17%)	34 (83%)	41
Total		28	71	99

Table 11 Influence of asthma severity on association between exacerbated nasal disease and asthma symptoms.

		Exacerbation of asthma by exacerbated nasal disease (+)	Exacerbation of asthma by exacerbated nasal disease (-)	Total
Asthma Severity	Step 1	2 (40%)	3 (60%)	5
	Step 2	3 (16%)	16 (84%)	19
	Step 3	14 (41%)	20 (59%)	34
	Step 4	18 (55%)	15 (45%)	33
	Unknown	1 (13%)	7 (87%)	8
Total		38	61	99

(7/41) ; $p=0.0002$; Table 9). さらに、通年的に喘息症状のある群では、鼻症状の治療により喘息症状がより改善すると自覚していた (喘息あり 36% (21/58) ; 喘息なし 17% (7/41) ; $p=0.03$; Table 10). したがって、喘息症状のコントロールが悪い群では、鼻炎症状の悪化に伴い喘息症状が悪化しやすく、鼻治療により喘息が改善しやすいと認識していることが示唆された。

また、喘息重症度によって、鼻炎症状と喘息症状の連関に差があるか検討した。喘息の重症度は我が国のガイドラインに準じ¹⁴⁾、ステップ1(軽症間欠型)、ステップ2(軽症持続型)、ステップ3(中等症持続型)、ステップ4(重症持続型)に分類した。鼻炎症状の悪化に伴う喘息症状の悪化を自覚する頻度及び鼻炎治療に伴う喘息症状の改善を自覚する頻度は、各ステップ間で有意差はなかったが (Table 11)、「現在の治療を考慮した喘息重症

度の分類」¹⁴⁾の最重症持続型(ステップ4でコントロール不良)に相当する5名においては、5名全員が、鼻炎症状が悪化すると喘息症状が悪化すると回答しており (data not shown)、重症度が高くなると両者の連関を認識しやすくなる可能性が示唆された。

考 察

今回我々は、アンケート調査により、鼻疾患と喘息を持ち、鼻炎症状と喘息症状を合併した患者の約30%で、両者の連関を自覚していることを明らかにした。さらにその中で、全体の約15%の患者で鼻炎症状が悪化すると喘息症状が悪化し、鼻炎の治療により喘息症状が改善するという強い連関を自覚していることがわかった。また、通年的に喘息症状のある患者、すなわち喘息コントロールの悪い患者で、喘息症状が鼻症状の影響を受け

やすいと自覚していた。今回の検討はアンケートによるものであり、実際の病態を反映していない可能性は否定できないが、自覚症状から見た場合、普段から喘息コントロールを良くすることが、鼻炎症状と喘息症状を合併している患者の管理において特に重要と考えられる。

鼻炎症状と喘息症状を合併した患者の約30%で、鼻炎症状と喘息症状の連関を自覚していた (Table 4~7)。副鼻腔炎単独の5名を除き、アレルギー性鼻炎または花粉症を合併していることを考慮すると、今回の結果から、アレルギー性鼻炎症状と喘息症状の連関を、約3割の患者で自覚していると解釈することが可能と思われる。今までにもアレルギー性鼻炎症状と喘息症状の連関に関しては、多々報告されている^{15)~23)}。Yamauchiらは、アレルギー患者10009名 (成人喘息2781名、小児喘息3283名、アレルギー性鼻炎3945名) に対し、気管支喘息とアレルギー性鼻炎の連関頻度についてのアンケート調査を行った。アレルギー性鼻炎症状のある成人喘息1693名の中で52.3%、アレルギー性鼻炎症状のある小児喘息2238名の中で62.2%の患者が、気管支喘息が悪化する際に、鼻症状も悪化すると認識していた¹⁵⁾。さらに、喘息症状のあるアレルギー性鼻炎1935名の中で74.9%の患者が、アレルギー性鼻炎が悪化する際に、喘息症状も悪化すると認識していることを報告した¹⁶⁾。また、Matsunoらは、大分県の喘息患者246名を対象とし、アレルギー性鼻炎を合併する129名 (全体の52.4%) の中で、35.7%の患者が、気管支喘息が悪化する際に鼻症状の悪化を伴うと認識していることを報告した¹⁹⁾。増田らは、鼻アレルギーを合併する小児気管支喘息患者155名にアンケート調査を行い、38.7%が、喘息と鼻症状が同時に悪化することを明らかにした²⁰⁾。スギ花粉症の気管支喘息に及ぼす影響については、上野らは、スギ花粉症合併成人喘息患者116名のうち、41名 (35.3%) がスギ花粉時期に何らかの喘息症状が増悪し、さらに13名 (11.2%) の患者においては花粉飛散時期にピークフロー値が平均10%以上低下することを報告した²¹⁾。また我々は以前、スギ花粉症合併成人慢性気管支喘息患者71名を対

象としてスギ飛散時期の喘息症状悪化の有無についてのアンケート調査を行い、スギ飛散時期に花粉症のある患者では約半数が喘息への悪化を感じたことを報告した²²⁾。さらに徳安らは、スギ花粉症の罹患率が関東地方より少ない山陰地方で我々と同じアンケート調査を行い、スギ飛散時期の喘息悪化の自覚は、我々の調査 (関東地方) と同等の割合であったことを報告した²³⁾。すなわち、アレルギー性鼻炎またはスギ花粉症を合併する喘息患者の1/3~2/3で、鼻症状の悪化により喘息症状が悪化すると認識しており、実際にピークフロー値が低下する症例も存在すると要約されよう。鼻炎症状に伴って喘息症状が悪化する機序としては、①アレルギーが直接下気道に到達し喘息症状を誘発する②鼻閉塞によってアレルギーが下気道に侵入しやすくなる③鼻局所でロイコトリエンなどの化学伝達物質が産生・放出され、一部が下気道に下降する④アレルギー曝露に伴いIL-5などのTh2サイトカインの産生が亢進し、骨髄に作用し好酸球を増加または活性化させ、気道への好酸球浸潤が増加する、などが想定されている¹³⁾。実際には、これらが複合的に病態形成に関与していると考えられるが、それぞれの関与の割合は不明である。

これまでに、アレルギー性鼻炎の治療のみで喘息症状や気道過敏性亢進が改善するかについて、多々検討されてきた。Welshらは季節性アレルギー性鼻炎患者 (48%で季節性喘息を合併) に点鼻ステロイド治療を行ったところ、喘息スコアが有意に改善したことを報告した⁶⁾。またHenriksenらは、アレルギー性鼻炎+気管支喘息患者 (ICS使用なし) に、点鼻ステロイド治療を行ったところ、咳や喘息重症度の改善が見られたことを報告した⁷⁾。さらに、Foresiらは季節性アレルギー性鼻炎患者 (喘息合併なし) に点鼻ステロイド治療を行ったところ、気道過敏性亢進が改善したことを報告した⁸⁾。Correnらは、季節性アレルギー性鼻炎+気管支喘息患者 (ICS使用なし) に点鼻ステロイド治療を行ったところ、症状やピークフロー値は不変であったが気道過敏性が改善したことを報告した⁹⁾。これらの報告は、点鼻ステロイド

治療が、鼻だけではなく、喘息症状にも有効であることを示唆している。しかし近年では、点鼻ステロイド治療が喘息症状や気道過敏性亢進に対して効果が無いとする報告も散見される²⁴⁾²⁵⁾。結果の乖離の原因として①合併する喘息症状の程度の違い（喘息が重いほど、点鼻ステロイドによる喘息治療効果が少ないことが考えられる）②喘息に対するICS治療の有無の違い（ICS治療が無い群で、より点鼻ステロイドによる喘息治療効果が期待される）③原因抗原の違いなどが想定される。

鼻の基礎疾患の中で、副鼻腔炎の存在は、鼻炎症状と喘息症状の連関を強める傾向にあることが示唆された（Table 8 and data not shown）。副鼻腔炎は、喘息の増悪因子の一つであることが知られている¹⁴⁾。近年では、慢性副鼻腔炎の病態の多様性が認識されるようになった。従来型のマクロライド療法が効果的な慢性副鼻腔炎だけでなく、アレルギー性副鼻腔炎や好酸球性副鼻腔炎などの概念が提唱され、知見が集積している¹⁵⁾¹⁶⁾。アレルギー性副鼻腔炎は、アレルギー性鼻炎に合併し、膿性鼻汁など感染の関与がない副鼻腔炎と考えられており、一般に好酸球浸潤は軽度である¹⁵⁾。好酸球性副鼻腔炎は、マクロライド治療抵抗性の副鼻腔炎であり、鼻茸中に大量の好酸球の浸潤を伴い、鼻汁は粘稠である¹⁵⁾。また、好酸球性副鼻腔炎は、アスピリン喘息や好酸球性中耳炎を合併しやすいことが知られている¹⁶⁾。今回のアンケートで、病理組織より好酸球性副鼻腔炎と診断、または病歴（好酸球性中耳炎の合併またはアスピリン喘息の合併）より好酸球性副鼻腔炎が強く推測された症例は15例（15/28：54%）であった（data not shown）。残りは、特徴的な病歴が無く、組織所見があっても好酸球浸潤は中等度であり、好酸球性副鼻腔炎とアレルギー性副鼻腔炎の鑑別が難しい症例であった。従って、今回の解析における副鼻腔炎の主体は、好酸球性副鼻腔炎であり、アレルギー性鼻炎と関連したアレルギー性副鼻腔炎ではないと考えられる。好酸球性副鼻腔炎では、ポリープがロイコトリエンなどの化学伝達物質の産生源と考えられ、ポリープ切除により喘息コントロールが改善することが知られている¹⁷⁾。今回

の結果からは、副鼻腔炎の存在は、有意ではないが、鼻炎症状と喘息症状の連関を強める可能性が示唆され、副鼻腔炎合併喘息では、特に鼻症状の管理が重要と考えられた。今後は副鼻腔炎の病態によって、喘息悪化への関与が異なるかなどの解析が重要と考えられる。

また、喘息コントロールの悪い患者で、鼻炎症状の悪化に伴い喘息症状が悪化し、鼻治療により喘息症状が改善しやすいと、自覚していることがわかった（Table 9, 10）。喘息コントロールの悪い患者では、わずかな増悪因子（鼻症状の悪化）でも、喘息症状が悪化することは容易に想定される。我々は同時に、喘息の重症度によって、鼻炎症状と喘息症状の連関に差があるか検討したが、最重症持続型の喘息患者では全例（5名中5名）で、鼻炎症状の悪化に伴い喘息症状が悪化すると自覚していた（data not shown）。我が国のガイドラインでは、最重症持続型は重症持続型（ステップ4）でコントロール不良例と定義されており¹⁴⁾、喘息コントロール不良患者では、鼻炎症状の悪化に伴い喘息症状が悪化しやすいと自覚していることが、再確認された。従って、鼻炎及び気管支喘息に対するベースの治療が重要と考えられる。

一方で、今回我々は、ベースの治療薬剤の有無が、鼻炎症状と喘息症状との連関に与える影響についても、検討を試みた。鼻炎症状の変化によって喘息症状が変化する割合について、他剤の有無を考慮せずに、単にその薬を使用しているかないかで、両者の連関にどのように影響を与えるかについて調査した。結果からは、①ベースにICSを使用していない患者では、鼻治療により喘息症状も改善すると自覚しやすい②ベースに点鼻ステロイドを使用している患者では、鼻治療により喘息症状も改善すると自覚しやすいことなどが考えられた。しかし、今回の検討は単剤使用による影響の検討ではなく、本当にその薬による影響かについては、将来のさらなる精査を必要とすると考えられる。

今回のアンケート調査は、対象が少ない、医師の診察の確認もない解析であり、全体として、結論を述べることに限界があると考えられる。アン

ケートの初めの症状コントロールに関する質問部分では、“かぜをひいているときでなくとも”と記載し、感冒を除外するように努めたが、両者の連関に関する質問部分では、“かぜをひいているときでなくとも”との記載はしておらず、感冒による鼻症状や喘息の悪化を完全には除外できていないと考えられる。さらに今回のアンケートでは、“鼻症状”について質問しており、慢性副鼻腔炎単独の5名を除き、鼻症状はアレルギー性鼻炎症状を意味するものと推定することが可能ではあるが、本当に鼻症状がアレルギー性鼻炎症状であるかは明らかではない。病態の異なる鼻疾患をまとめて、気管支喘息との連関を調べている点でも問題がある。従って、今回の結果が、実際の病態を反映していない可能性は否定できない。しかしながら、患者が今回のアンケート結果のように自覚していることは事実と考えられ、上気道下気道の連関を念頭に置きながら、診療に当たることは重要と考えられた。

今回我々は、鼻疾患と喘息を合併する患者において、約30%で両者の症状の連関を自覚していることを確認した。通年的に喘息症状がある患者では、鼻治療により喘息症状が改善すると自覚しており、鼻治療は喘息コントロールに重要と考えられた。従って、鼻症状と喘息症状のある患者に対しては、上下気道にわたる包括的なアレルギー診療が重要と考えられた。

謝 辞

本研究は埼玉医科大学学内グラント21-1-2-09による助成を受けて実施した。

文 献

- 1) Leynaert B, Neukirch F, Demoly P, Bousquet J. Epidemiologic evidence for asthma and rhinitis comorbidity. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: S201-5.
- 2) Settipane RJ, Hagy GW, Settipane GA. Long-term risk factors for developing asthma and allergic rhinitis: a 23-year follow-up study of college students. *Allergy Proc* 1994; 15: 21-5.
- 3) Ramsdale EH, Morris MM, Roberts RS, Hargreave FE. Asymptomatic bronchial hyperresponsiveness in rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75: 573-7.
- 4) Djukanović R, Lai CK, Wilson JW, Britten KM, Wilson SJ, Roche WR, et al. Bronchial mucosal manifestations of atopy: a comparison of markers of inflammation between atopic asthmatics, atopic nonasthmatics and healthy controls. *Eur Respir J* 1992; 5: 538-44.
- 5) Corren J, Adinoff AD, Irvin CG. Changes in bronchial responsiveness following nasal provocation with allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 611-8.
- 6) Welsh PW, Stricker WE, Chu CP, Naessens JM, Reese ME, Reed CE, et al. Efficacy of beclomethasone nasal solution, flunisolide, and cromolyn in relieving symptoms of ragweed allergy. *Mayo Clin Proc* 1987; 62: 125-34.
- 7) Henriksen JM, Wenzel A. Effect of an intranasally administered corticosteroid (budesonide) on nasal obstruction, mouth breathing, and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 1014-8.
- 8) Foresi A, Pelucchi A, Gherson G, Mastropasqua B, Chiapparino A, Testi R. Once daily intranasal fluticasone propionate (200 micrograms) reduces nasal symptoms and inflammation but also attenuates the increase in bronchial responsiveness during the pollen season in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 274-82.
- 9) Corren J, Adinoff AD, Buchmeier AD, Irvin CG. Nasal beclomethasone prevents the seasonal increase in bronchial responsiveness in patients with allergic rhinitis and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 250-6.
- 10) Crystal-Peters J, Neslusan C, Crown WH, Torres A. Treating allergic rhinitis in patients with comorbid asthma: the risk of asthma-related hospitalizations and emergency department visits. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 57-62.
- 11) Gaga M, Lambrou P, Papageorgiou N, Koulouris NG, Kosmas E, Fragakis S, et al. Eosinophils are a feature of upper and lower airway pathology in non-atopic asthma, irrespective of the presence of rhinitis. *Clin Exp*

- Allergy* 2000; 30: 663-9.
- 12) Braunstahl GJ, Kleinjan A, Overbeek SE, Prins JB, Hoogsteden HC, Fokkens WJ. Segmental bronchial provocation induces nasal inflammation in allergic rhinitis patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 2051-7.
 - 13) Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. World Health Organization; GA 2LEN; AllerGen. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA 2LEN and AllerGen). *Allergy* 2008; 63 Suppl 86: 8-160.
 - 14) 日本アレルギー学会. 喘息予防・管理ガイドライン 2006. 東京: 協和企画; 2006.
 - 15) 石川 喟. 慢性副鼻腔炎と免疫・アレルギー. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科MOOK 1. 東京: 金原出版; 1986. p. 17-22.
 - 16) 石戸谷淳一. 好酸球性副鼻腔炎. 日本耳鼻咽喉科学会会報 2008; 111: 712-5.
 - 17) Higashi N, Taniguchi M, Mita H, Kawagishi Y, Ishii T, Higashi A, et al. Clinical features of asthmatic patients with increased urinary leukotriene E₄ excretion (hyperleukotrienuria): Involvement of chronic hyperplastic rhinosinusitis with nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 277-83.
 - 18) Yamauchi K, Tamura G, Akasaka T, Chiba T, Honda K, Kishi M, et al. Analysis of the comorbidity of bronchial asthma and allergic rhinitis by questionnaire in 10,009 patients. *Allergol Int* 2009; 58: 55-61.
 - 19) Matsuno O, Miyazaki E, Takenaka R, Ando M, Ito T, Sawabe T, et al. Links between bronchial asthma and allergic rhinitis in the Oita Prefecture, Japan. *J Asthma* 2006; 43: 165-7.
 - 20) 増田佐和子, 藤澤隆夫, 井口光正, 熱田 純, 南部光彦, 末廣 豊, 他. 鼻アレルギーを合併する小児気管支喘息に関する多施設アンケート調査. *アレルギー* 2006; 55: 566-73.
 - 21) 上野香奈, 美濃口健治, 河野泰郎, 小田成人, 和田記代子, 宮本正秀, 他. 気管支喘息増悪要因としてのスギ花粉症の調査研究. *アレルギー* 2002; 51: 565-70.
 - 22) 福士雅彦, 永田 真, 坂本芳雄. 成人気管支喘息におけるスギ花粉症の影響. *アレルギーの臨床* 2003; 23: 64-5.
 - 23) 徳安宏和, 渡部悦子, 岡崎亮太, 河崎雄司, 清水栄治, 永田 真. 成人気管支喘息におけるスギ花粉症の影響—山陰地方と関東地方の比較. *日本胸部臨床* 2007; 66: 245-50.
 - 24) Pelucchi A, Chiapparino A, Mastropasqua B, Marazzini L, Hernandez A, Foresi A. Effect of intranasal azelastine and beclomethasone dipropionate on nasal symptoms, nasal cytology, and bronchial responsiveness to methacholine in allergic rhinitis in response to grass pollens. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 515-23.
 - 25) Nathan RA, Yancey SW, Waitkus-Edwards K, Prillaman BA, Stauffer JL, Philpot E, et al. Fluticasone propionate nasal spray is superior to montelukast for allergic rhinitis while neither affects overall asthma control. *Chest* 2005; 128: 1910-20.

QUESTIONNAIRE FOR DETERMINING RELATIONSHIP BETWEEN NASAL AND ASTHMA SYMPTOMS

Hiroto Nakada¹⁾²⁾, Kazuyuki Nakagome¹⁾³⁾, Yotaro Takaku¹⁾³⁾, Fuyumi Nishihara¹⁾³⁾,
Takefumi Yamaguchi¹⁾³⁾, Tomoyuki Soma¹⁾³⁾, Kouichi Hagiwara³⁾, Minoru Kanazawa³⁾,
Yasuhiro Kase¹⁾²⁾ and Makoto Nagata¹⁾³⁾

¹⁾ Allergy Center, Saitama Medical University

²⁾ Department of Otolaryngology, Saitama Medical University

³⁾ Department of Respiratory Medicine, Saitama Medical University

Background: The interaction between allergic rhinitis and bronchial asthma is well known. However, there is little epidemiological data on the relationship between nasal diseases and asthma, especially in Japan.

Methods: We administered a questionnaire to 126 patients to examine the frequency of associations between nasal and asthma symptoms in patients with both nasal disease and asthma. We also investigated in which type of patients the asthma symptoms were affected by changes in nasal symptoms.

Results: Thirty-eight patients (30%) were aware that their asthma was worsened by exacerbated nasal disease, and nasal treatment improved asthma in 28 patients (22%). The influence of changes in nasal symptoms on asthma symptoms was stronger in patients lacking good asthma control. The relationship between nasal and asthma symptoms tended to be stronger in patients with sinusitis.

Conclusion: About 30% of patients with nasal disease and asthma reported an association between their nasal and asthma symptoms. Nasal treatment is considered to be important for asthma control, especially in patients with asthma symptoms. These results suggested the important role of comprehensive allergy care in controlling both nasal disease and asthma.

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)
(総合)研究報告書

スギ花粉症に関する網羅的解析

研究分担者	藤枝 重治	福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授
研究協力者	坂下 雅文	福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教
	意元 義政	福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 大学院
	玉利真由美	理化学研究所遺伝子多型センター チームリーダー
	野口恵美子	筑波大学人類遺伝学 准教授

研究要旨

スギ花粉症と陰性コントロールの2群において候補遺伝子アプローチと全ゲノム解析を行った。候補遺伝子アプローチでは、*IFN γ R 1*プロモーター領域(rs2234711)、*IL-33*はrs1929992、*ORMDL3*の9SNP(特にrs7216389)において有意な相関を認めた。機能解析として、リスクアレルの*IFN γ R*プロモーター領域への組み込みによるプロモーターアッセイでは、リスクアレルにおいて*IFN γ R*の発現が高いことが示唆された。血清中*IL-33*は、スギ花粉症においてコントロール、副鼻腔炎に対して有意に高値を示した。EBウイルスにより不活化したB細胞株での検討で、リスクアレル型では*ORMDL3*発現が有意に亢進していた。*ORMDL3*発現は、鼻粘膜上皮、線維芽細胞で認め、それぞれpoly-IC刺激で発現が亢進した。アレル別に末梢血からCD4陽性細胞を分離し、poly-IC刺激を行うとリスクアレルTTで*IL-10*、*IL-17*の産生が有意に高かった。さらにスフィンゴシン1リン酸もリスクアレルTTで高値であった。

スギ花粉症の患者の鼻粘膜を採取し、マイクロアレーにて遺伝子発現を検討すると、*Intelectin-1*が花粉症の症状発現、*in vivo*反応に関与していることが判明した。

一方全ゲノム解析では、三次解析にて*Decay-accelerating factor (DAF, rs10746463)*において有意な相関を認めた。リスクアレル型ではDAF蛋白の発現が低く、血清中総IgEとスギ特異的IgEの両者とも高値であった。

スギ花粉症の根治的治療として2004年から舌下免疫療法を行ってきた。その治療効果はこれまで証明できたが、効果発現機序はいまいである。そこで網羅的蛋白解析を行った結果、*Apolipoprotein A IV (アポA4)*が臨床効果と有意に相関し、症状が改善した者に高い誘導が認められ、改善が乏しかったものでは低値を示していた。リコンビナントアポA4は、*CryJ1*刺激によるヒト好塩基球のヒスタミン遊離率を抑制した。二重盲検試験において実薬群では、プラセボ群に対して、*in vitro*末梢リンパ球での*CryJ1*刺激によるヒスタミン遊離試験においても有意に低値を示した。これらのことはアポA4のアレルギー治療薬として、また臨床マーカーの可能性を示唆するものと考えている。今回の研究でスギ花粉症治療における4つの標的分子が同定できた。

A. 研究目的

2006年~2008年に当教室で行った20歳から50歳まで約2000名の疫学調査で、7項目の吸入アレルゲン(ヤケヒョウヒダニ、コナヒョウヒダニ、スギ、カモガヤ、ブタクサ、カンジダ、アスペルギルス)のうち1項目でも抗原特異的IgEが陽性である人は、70%を占めることが判明した。またこの10年間でスギ花粉症の発症率も10%以上増加し、現在3人のうち1人が花粉症に罹患している。この増加の原因解明のため、候補遺伝子アプローチと全ゲノム解析による遺伝子多型(SNP)の二つの方法にて、スギ花粉症患者の特徴を検討した。さらにスギ花粉の感作と発症の違いに着目し、鼻粘膜での遺伝子発現の差を検討した。舌下免疫療法がスギ花粉症に効果があることは、

これまでの4回の2重盲検試験において実証できたが、効果発現機序を検討することも重要な課題である。その方法として、全蛋白の変化を一気に大量に検討できる網羅的蛋白解析がある。本研究では、スギ花粉症に対するプラセボ対照二重盲検試験の血漿を用いて、この網羅的蛋白解析を行い、臨床結果と相関し臨床効果発現の指標となる因子の同定を試みた。

B. 研究方法

候補遺伝子アプローチは、研究対象者として、スギ花粉症患者734名、吸入アレルゲン7項目がいずれも陰性であり、アレルギー疾患の既往ないもの(陰性コントロール)370名を用いた。候補遺伝子としてサイトカイン、ケモカイン、それらの

受容体、TLR を含む自然免疫関連、シグナル伝達物質、制御性 T 細胞関連、アポトーシス関連、ウイルス感染関連など約 100 項目の遺伝子、各遺伝子において約 5 から 10 の SNP を調べた。有意差を認めた遺伝子に関しては、プロモーターアッセイを用いて遺伝子多型部位の機能解析を行った。さらに小児気管支喘息の全ゲノム解析 (GWAS) にて報告された *ORMDL3* 遺伝子に関して 13SNP を解析し、最も有意な相関を認める部位のスギ花粉症のリスクアレルを同定した。機能解析として、①検索したアレル別 B 細胞での *ORMDL3* の蛋白発現の程度、②*ORMDL3* の発現細胞を同定、③いかなる刺激にて *ORMDL3* の発現増強するか、④アレル別細胞での刺激によるサイトカイン産生の違い、⑤アレル別細胞でのスフィンゴシン 1 リン酸の産生を調べた。EB ウイルスにより不活化した B 細胞 : 70 細胞株において rs7216389 の SNP を調べるとともに、アレル別に *ORMDL3* の蛋白発現をリアルタイム PCR で検討した。*ORMDL3* の発現細胞も各ヒトの臓器を用いてリアルタイム PCR にて調べた。一般的サイトカイン、ケモカイン、toll-like receptor アゴニストの刺激にて *ORMDL3* の蛋白発現が増強するか同じくリアルタイム PCR にて調べた。またアレル別に CD4 陽性細胞を集め、dsRNA 刺激にてサイトカイン産生に違いがないか、各種 ELISA を用いて検討した。さらにアレル別 CD4 陽性細胞からのスフィンゴシン 1 リン酸産生に違いがないか、ELISA にて測定した。

スギ特異的 IgE 陽性かつスギ花粉症発症者、スギ特異的 IgE 陽性ながらスギ花粉未発症者、スギ特異的 IgE 陰性かつスギ花粉未発症の 3 群で、それぞれ鼻粘膜を擦過後 RNA を抽出し、マイクロアレーを行い、各群で有意な発現の差を認めた因子を同定した。得られた因子が、どのような刺激で発現増強するか検討した。

舌下免疫療法前後で採血後、血漿を回収し、網羅的蛋白を行った。解析法は、Ettan DIGE システムにて二次元電気泳動を行い、Decyder により各スポットの発現強度を GeneSpring により解析した。統計的有意な変化を示しているスポットについて質量分析 (mass spectrometry) を行った。ゲルを銀染色し、目的のスポットを Ettan Spot Picker により切り出した後、MALDI-TOFMS : AXIMA-CFR plus を用いて解析、得られた Peptide mass fingerprint を Mascot データベースにより解析した。Mascot で得られた結果と Swiss-2DPAGE のデータが一致した、または複数回の MALDI-TOFMS → Mascot 解析により結果が再現された場合に同定したと判定した。さらに臨床データと比較して、実薬群に特異的に変動し臨床

効果と相関する蛋白を同定した。同定した蛋白の RNA を RT-PCR で増幅してベクターに組み込み、蛋白発現系でリコンビナントを作成した。作成したリコンビナント蛋白を IgE、ケモカイン産生、サイトカイン産生においてどのように影響をおよぼすか検討した。

すべての研究は、福井大学倫理委員会の承認後行い、サンプル提供者からは、文書で同意書をとった。

C. 研究結果

候補遺伝子アプローチにて有意差を認めたのは、Th1 サイトカインの代表である IFN γ の受容体 (IFN γ R) であり、プロモーター領域 (rs2234711) であった。スギ花粉症でのリスクアレルは、C であり、危険率は 1.24 であった。この領域は成人アトピー型喘息での SNP と同様であった。このリスクアレルを IFN γ R 1 プロモーター領域のベクターに組み込み、ヒト単球系細胞株 THP-1 に遺伝子導入し、IFN γ (30ng/ml) 添加して 3 時間培養した後、ルシフェラーゼアッセイを行うとリスクアレル C において IFN γ R の発現が高いことが示唆された。IL-1 と関連深く IL-1 受容体のリガンドであり、Th2 反応に重要な IL-33 の rs1929992 において関連していた。血清中 IL-33 は、スギ花粉症において陰性コントロール、および感染性鼻炎に比較して、有意に高値を示した。

全ゲノム解析では、一次解析にて 384 SNP に絞られ、二次解析を行い、三次解析として 26 SNP に絞られた。その中で *DAF* に注目し解析を行ったところ、rs10746463 においてリスクアレル A がスギ花粉症と有意な相関を認めた。またプラスミドベクターによるリスクハプロタイプを構築し、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ *DAF* の転写が有意に低下した。また *DAF* のプロモーター領域 rs10746463 が A/ A になっていると血清中 IgE の高値を認めた。IgE は総 IgE とスギ特異的 IgE の両方とも高値であった。これは、rs10746463 が A/ A になっていると *DAF* 蛋白の発現が低いことによることが判明した。

ORMDL3 における 13SNP 中 9 SNP において有意な相関を認めた。とりわけアトピー型喘息での責任 SNP (rs7216389) においても高く有意な相関を示した。その部位のリスクアレルは TT であり、EB ウイルスにより不活化した B 細胞株 70 種類においてアレル別 *ORMDL3* 発現を調べるとリスクアレル TT 型で *ORMDL3* 発現が有意に発現していた。*ORMDL3* 発現は、肝臓、肺、脾臓、甲状腺で発現が高かったが、鼻粘膜上皮が最も高く、鼻線維芽細胞でも発現が認められた。そこで鼻線維芽細胞を用いて、ウイルス感染を模倣して、poly-IC

で刺激をすると ORMDL3 の発現が亢進した。LPS, MALP-2 の刺激では ORMDL3 の発現は変化しなかった。

rs7216389 のアレル別 3 群において末梢血から CD4 陽性細胞を分離し、poly-IC 刺激を行うとリスクアレル TT で IL-10, IL-17 の産生が有意に高かった。さらにスフィンゴシン 1 リン酸もリスクアレル TT で高値であった。スギ花粉飛散期に血清中スフィンゴシン 1 リン酸をアレル別で測定したが、有意な差は認められなかった。

鼻粘膜の解析では、スギ花粉症で *Intelectin-1* とその他 17 の遺伝子が有意に変動した。*Intelectin-1* は鼻粘膜上皮で産生されることが同定でき、スギ花粉発症者で高値を示すとともに、非発症者においても皮内反応陽性 RAST 陽性者でも陰性者に比べ有意発現しており、発症直前に関与する可能性が示唆された。*Intelectin-1* は、鼻粘膜を培養すると発現が消失するが、IL-4, IL-13 刺激によって発現が亢進した。それ以上にスギ花粉飛散期に発現が亢進する遺伝子も存在した。

舌下免疫療法の血清中網羅的蛋白解析では、実薬群特異的に変動する 5 種類の蛋白を同定した。そのうち Apolipoprotein A IV (アポ A4) が臨床効果と有意に相関し、症状が改善した者に高い誘導が認められ、改善が乏しかったものでは低値を示していた。リコンビナントアポ A4 は、CryJ1 刺激によるヒト好塩基球のヒスタミン遊離率を抑制した。しかしヒト好酸球の IL-4 産生、ヒト CD4 陽性 T 細胞の IL-5 産生、ヒト好塩基球の IL-13 産生、末梢単核球の IgE 産生には影響を及ぼさなかった。また線維芽細胞の Eotaxin、GM-CSF 産生にも影響を及ぼさなかった。また二重盲検試験において実薬群では、プラセボ群に対して、*in vitro* 末梢リンパ球での CryJ1 刺激によるヒスタミン遊離試験においても有意に低値を示した。アポ A4 は、外科にて採取され小腸上皮細胞に認められた。

D. 考察：

スギ花粉症において、成人アトピー型喘息と同じ IFN γ R 1 プロモーター領域の SNP と相関が認められたことは、One airway, one disease の概念から、予想されたことであった。しかしリスクアレルの導入により IFN γ R の発現が高くなったことは、意外であった。一般的な考え方からするとリスクアレルの導入によって、IFN γ R の発現が低くなり、IFN γ の作用が影響しにくくなった時に、スギ花粉症や成人アトピー型喘息が発症すると考えた方が簡単であった。今回は、IFN γ R の蛋白発現を検討したのみにすぎず、リスクアレルを含む IFN γ R の機能解析 (通常の IFN γ R の働きをするのかという検討)は行っていないため、今後の検討を要する。

もし IFN γ R の機能上問題がなければ、今回の結果は、IFN γ を介したアレルギー炎症の増悪、もしくは IFN γ の減少によって作用を少しでも受けようとする受容体の増加とみるべきであろう。

IL-33 は、Toll-インターロイキン 1 (IL-1) 受容体 (TIR) ドメイン含有受容体 ST2 と結合し、Th2 免疫調節活性を有するとともに、Toll 様受容体 (TLR) の活性を阻害するとされる。そのため、IL-1 のような因子の活性を阻害し、炎症を軽減する可能性がある。これまで IL-33 受容体 (ST2) の SNP が気管支喘息と関連や気管支喘息の症状と ST2 の変化が報告されてきた。スギ花粉症では、IL-33 は高値を示し、まだその機能は十分にわからないが、何らかの役割を担っていることは確かである。

DAF は、補体系 C3 が活性化し C3a となり、リンパ球、平滑筋、血管内皮細胞を活性するのを抑制する働きがあり、我々はスギ花粉症患者では、スギ花粉飛散期に、DAF の発現が低下するデータも別途得ている。すなわち DAF 発現低下によって局所 IgE が上昇し、アレルギー反応を増大させる可能性がある。以上のことは DAF を強発現させるとアレルギー反応を抑制できるかもしれない。スギ花粉症において、アトピー型喘息と同じ ORMDL3 の SNP と相関が認められたことは、予想されたことであった。機能解析においてリスクアレルによって ORMDL3 の発現が有意に高く、ウイルス感染模倣にてさらに発現が亢進した。スギ花粉症発症には IL-10, IL-17 が関与し、スフィンゴシン 1 リン酸産生も ORMDL3 を介して関与している可能性が見出された。

鼻粘膜の網羅的解析からは、*Intelectin-1* がスギ花粉症患者の花散期に有意に高くなることを見いだすとともに、培養細胞では Th2 サイトカイン刺激で発現が亢進した。また感作あり未発症者においても面白い発現をしていたことは、今後ノックアウトマウスやアレルギーマウスモデルにおいてその発現を調べることで、今後治療の標的分子となる可能性を秘めていると考えられた

アポ A4 は、HDL や VLDL に結合しそれらの輸送に関連する蛋白である。他のアポ蛋白に比べてほとんど調べられていない。最近、アポ A4 が大腸炎モデルにおいて抗炎症作用を示すことや IL-4 産生や TNF α 産生抑制を示すことが報告された。さらに抗酸化作用やデキサメタゾン投与によってもアポ A4 が上昇し、PP γ R の活性に関連があることも報告された。またアポ A4 の遺伝子多型解析では、アトピー疾患関連遺伝子多型と有意に相関していることも報告された。酸化コレステロールが T 細胞の活性化に関与することや、アポ蛋白を介した脂質抗原提示も証明されている。リコンビ

ナントアポ A4 が CD34 陽性細胞からのヒスタミン遊離を抑制したこと、実薬群でヒスタミン遊離率が低下したことは、このアポ A4 が有力なアレルギー性鼻炎の治療薬になりえる可能性が認められた。しかし今後は、遺伝子欠損マウスでのアレルギーマウスモデルなどでの研究を行う必要性があり、現在アレルギーマウスモデル、遺伝子改編マウスでのアポ A4 の効果とアポ A4 の標的細胞の同定、その制御機序の解明、効果的な誘導の検討を行っており、臨床使用の実現化に向かっている。

E. 結論

スギ花粉症の遺伝子として *IFN γ R 1* プロモーター領域 (rs2234711)、*IL-33* (rs1929992)、*DAF* (rs10746463) が同定できた。機能解析から *IFN γ R* の蛋白発現亢進、スギ花粉症患者における *IL-33* の高値、*DAF* 発現低下に伴う IgE 上昇が認められ、それぞれが今後スギ花粉症の治療に結び付く可能性があると思われた。

潰瘍性大腸炎において *ORMDL-3*、*Intelectin-1* が発症に関与している可能性がトップジャーナルで報告され、これらが炎症遺伝子の可能性もあると思われる。スギ花粉症というアレルギー炎症において深い関与が示されたことは、炎症という分類で治療標的分子が得られる可能性があると思われた。また今回は報告していないが、鼻粘膜において有意な発現を示した他の 17 遺伝子それぞれも大変面白く、今後花粉症との関連を順次解析していく予定である。100 倍以上の変化を示した分子もあり、これまでの報告では予想もつかないような分子であった。ここに、網羅的解析の面白さを感じた。

アポ A4 は、舌下免疫療法で効果を示した症例で上昇していた。リコンビナントアポ A4 は、*CryJ1* 刺激によるヒト好塩基球のヒスタミン遊離率を抑制し、舌下免疫療法で効果を認めた群での末梢リンパ球での *CryJ1* 刺激によるヒスタミン遊離試験低値と一致していた。これらのことは、アポ A4 によるアレルギー治療の可能性を示すとともに舌下免疫療法の治療効果予測の指標としての有用性が示唆される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Makino Y, et al.: Apolipoprotein A-IV is a candidate target molecule for the treatment of seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin*

Immunol. 2010, 126(6):1163-9.e5.

- 2) Imoto Y, et al.: S2554X mutation in the filaggrin gene is associated with allergen sensitization in the Japanese population. *J Allergy Clin Immunol.* 2010, 125:498-500.
- 3) Yamada T, et al.: Poly(I:C) induces B₂Lys-expression of airway fibroblasts through phosphatidylinositol 3-kinase. *Cytokine.* 2010, 50:163-9.
- 4) Sakashita M, et al.: Prevalence of allergic rhinitis sensitization to common aeroallergens in a Japanese population. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010, 151:255-61.
- 5) Yamamoto H, et al.: Efficacy of oral olopatadine hydrochloride for the treatment of seasonal allergic rhinitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Allergy Asthma Proc.* 2010. 31(4):296- 303.
- 6) Kawai T, et al.: Associations between decay-accelerating factor polymorphisms and allergic respiratory diseases. *Clin Exp Allergy* 39(10): 1508-1514, 2009
- 7) Sakashita M, et al.: Association of serum interleukin-33 level and the interleukin-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. *Clin Exp Allergy.* 2008, 38:1875-1881.
- 8) Okubo K, et al.: A randomized double-blind comparative study of sublingual immunotherapy for cedar pollinosis. *Allergol Int.* 2008, 57:265-275.
- 9) Enomoto H, et al.: Filaggrin null mutations are associated with atopic dermatitis and elevated levels of IgE in the Japanese population: a family and case-control study. *J Hum Genet.* 2008, 53:615-621.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

- 1) 藤枝重治、高橋 昇、大澤 陽子、窪 誠太、有波 忠雄、野口 恵美子、牧野 友香、内田 和彦、大久保 公裕 アレルギー疾患の治療薬且つ治療効果マーカー(特願 2008-053768 平成 20 年 3 月 4 日提出)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Apolipoprotein A-IV is a candidate target molecule for the treatment of seasonal allergic rhinitis

Yuka Makino, MS,^a Emiko Noguchi, MD, PhD,^a Noboru Takahashi, MD, PhD,^c Yuri Matsumoto, MS,^a Seita Kubo, MD,^c Takechiyo Yamada, MD, PhD,^c Yoshimasa Imoto, MD,^c Yumi Ito, MD,^c Yoko Osawa, MD,^c Masanao Shibasaki, MD,^d Kazuhiko Uchida, PhD,^b Kohji Meno, PhD,^b Hideaki Suzuki, BA,^b Kimihiro Okubo, MD, PhD,^a Tadao Arinami, MD, PhD,^a and Shigeharu Fujieda, MD, PhD^c *Tsukuba, Fukui, and Tokyo, Japan*

Background: Allergic rhinitis is a global health problem that causes major illnesses and disability worldwide. Allergen-specific immunotherapy (SIT) is the only available treatment that can alter the natural course of allergic disease. However, the precise mechanism underlying allergen-SIT is not well understood.

Objective: The aim of the current study was to identify protein expression signatures reflective of allergen-SIT—more specifically, sublingual immunotherapy (SLIT).

Methods: Serum was taken twice from patients with seasonal allergic rhinitis caused by Japanese cedar: once before the pollen season and once during the season. A total of 25 patients was randomly categorized into a placebo-treated group and an active-treatment group. Their serum protein profiles were analyzed by 2-dimensional electrophoresis.

Results: Sixteen proteins were found to be differentially expressed during the pollen season. Among the differentially expressed proteins, the serum levels of complement C4A, apolipoprotein A-IV (apoA-IV), and transthyretin were significantly increased in SLIT-treated patients but not in placebo-treated patients. Among these proteins, the serum levels of apoA-IV correlated with the clinical symptom-medication scores ($r = -0.635$; $P < .05$) and with quality of life scores ($r = -0.516$; $P < .05$) in the case of SLIT-treated patients. The amount of histamine released from the basophils *in vitro* was greatly reduced after the addition of recombinant apoA-IV in the medium ($P < .01$).

Conclusion: Our data will increase the understanding of the mechanism of SLIT and may provide novel insights into the

treatment of allergic rhinitis. (*J Allergy Clin Immunol* 2010;126:1163-9.)

Key words: Sublingual immunotherapy, apoA-IV, HNF4A, proteome

Allergic rhinitis is a global health problem that causes major illnesses and disability worldwide. A conservative estimate revealed that allergic rhinitis occurs in over 500 million people around the world.¹ Seasonal allergic rhinitis (SAR) caused by Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*; JC) is the most common allergic disease in Japan. According to a national survey, the prevalence of allergic rhinitis in Japan was 0.16 in 1992 and 0.21 in 2002.² The results of our recent study showed that over 35% of Japanese individuals in the age group 20 to 50 years develop allergic symptoms during JC pollination season.³

Allergen-specific immunotherapy (SIT) is the only available treatment that can alter the natural course of allergic disease by preventing new sensitization/onset and providing long-term remission after discontinuation of treatment.⁴ Many clinical trials have proven the efficacy of SIT in controlling allergic diseases.⁵ Conventional SIT, subcutaneous injection, however, requires frequent hospital visits and is painful, resulting in a low patient compliance. Further, it may cause some adverse events such as anaphylaxis. To overcome these disadvantages, sublingual immunotherapy (SLIT), oral administration of the allergen, was introduced as an alternative method,⁶ and to date, SLIT has been widely used to treat patients with asthma and rhinitis.⁴ The clinical efficacy of SLIT has been widely proven by many studies,^{6,7} and several studies have revealed that there is increased production of blocking antibody, IgG₄,⁸ as well as induction of regulatory T cells⁹ as a result of SLIT. However, the precise mechanism underlying SLIT is not well understood.

The word *proteome* describes the entire collection of proteins in a cell, tissue, or body fluid at a given time. With a proteomic approach, all the proteins present in a biological sample can be visualized simultaneously and identified. This approach is not based on any experimental hypothesis but on correlation-associated network analyses of proteomic profiles, leading to hypotheses regarding relations between structurally and biologically related proteins/peptides. Therefore, this approach can be used to identify proteins associated with SLIT, which could improve our understanding of the mechanism underlying this therapy. In this study, we performed proteomic analysis to identify protein expression signatures that reflect the responsiveness to SLIT and to determine novel therapeutic targets for the treatment of SAR.

From the Departments of ^aMedical Genetics and ^bMolecular Biological Oncology, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan; ^cthe Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui, Fukui, Japan; ^dthe Department of Pediatrics, Tsukuba University of Technology, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan; and ^ethe Department of Otorhinolaryngology, Nippon Medical School, Tokyo, Japan.

Supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Health and Welfare, Japan (H17-Genome-001, H17-Immunology-001, H20-Immunology-001, -004) and from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan (17390458, 18591097, 20390441).

Disclosure of potential conflict of interest: The authors have declared that they have no conflict of interest.

Received for publication March 2, 2010; revised June 18, 2010; accepted for publication June 28, 2010

Available online August 31, 2010.

Reprint requests: Emiko Noguchi, MD, PhD, Department of Medical Genetics, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba-city, Ibaraki, Japan. E-mail: enoguchi@md.tsukuba.ac.jp.
0091-6749/\$36.00

© 2010 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology
doi:10.1016/j.jaci.2010.06.031

Abbreviations used

ApoA-IV:	Apolipoprotein A-IV
2-DE:	Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis
HNf4A:	Hepatocyte nuclear factor 4 α
HRP:	Horseradish peroxidase
JAU:	Japanese allergy unit
JC:	<i>Cryptomeria japonica</i>
JRQLQ:	Juniper Rhinoconjunctivitis Quality-of-Life Questionnaire
MALDI-TOF/TOF:	Matrix laser desorption/ionization 2-stage time-of-flight
QOL:	Quality of life
SAR:	Seasonal allergic rhinitis
SIT:	Specific immunotherapy
SLIT:	Sublingual immunotherapy
SMS:	Symptom-medication score

METHODS**Subjects**

Patients with SAR caused by JC pollens were enrolled in this study. All the patients exhibited the following characteristics: (1) JC pollen-specific RAST score ≥ 2 , (2) positive allergic reaction after nasal challenge with JC allergens, (3) JC pollen-induced symptoms of allergic rhinoconjunctivitis (from February to April) in the last 2 years and medication for the treatment of the symptoms, (4) no history of asthma, and (5) no allergen-specific immunotherapy in the past. Total and specific IgE (JC, *Dermatophagoides*, *Dactylis glomerata*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Candida albicans*, and *Aspergillus*) were measured by using the CAP-RAST method (Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden) in all patients, and positive allergic sensitization was defined if the levels of 1 or more specific IgE molecules were greater than or equal to 0.70 IU/mL (class 2). A total of 25 patients were randomly categorized into a placebo-treated group and an actively treated group; the patients in the latter group received JC pollen extract. One patient in the placebo group withdrew from the study for personal reasons. The characteristics of the patients are presented in Table I and this article's Table E1 in the Online Repository at www.jacionline.org.

Before enrollment, written informed consent was obtained from each patient, and the trial was performed in compliance with the Declaration of Helsinki and Good Clinical Practice. The trial was approved by the ethics committees of the University of Fukui and University of Tsukuba. The members of the ethical committee suggested that the number of samples collected for the active group should be 150% of that collected for the placebo group; thus, we collected samples according to their suggestion. JC pollen extracts were prepared by Torii Pharmaceutical Co. Ltd (Tokyo, Japan). The extracts (2000 Japanese allergy units [JAU]/mL) contained 15 μ g Cry j 1 and 2 to 5 μ g Cry j 2. Administration of the allergen extract was initiated at a dose of 2 JAU/mL with 50% glycerin as a diluent in November 2004; thereafter, the dose was gradually increased to 1 mL 2000 JAU/mL (final maintenance concentration) and maintained at this concentration until April 2005. The placebo-treated group was administered only the diluent, 50% glycerin. The details of the JC pollen sublingual immunotherapy have been described previously.¹⁰

Symptom-medication score and quality of life score

The number of paroxysmal sneezes and occasions when the patients blew their noses were recorded daily on forms that were used to record nasal symptoms. On the basis of these numbers, the patients were graded on a scale of 0 to 4 (0, none; 1, 1-5 times; 2, 6-10 times; 3, 11-20 times; and 4, over 20 times). Nasal congestion was also graded on a scale of 0 to 3 (0, no symptoms; 1, mild; 2, moderate; and 3, severe symptoms).^{10,11} During SLIT/placebo treatment, the use of other medications, including oral antihistamine and topical steroids, was also recorded daily. The total symptom-medication score

(SMS) was daily calculated on the basis of the abovementioned grades; further, we analyzed the correlation between the scores obtained over 2 weeks, during the peak JC pollination season, and the level of serum proteins. Quality of life (QOL) was assessed by using the modified Japanese version of Juniper Rhinoconjunctivitis Quality-of-Life Questionnaire (JRQLQ).^{10,12} This questionnaire includes 17 questions in 6 domains designed to measure the effects of rhinoconjunctivitis symptoms on disease-specific QOL.

Sample collection

Serum was collected from each patient twice: before the pollen season and the initiation of SLIT (November 2004) and during the pollen season (May to April 2005). Serum samples were centrifuged at 3000g for 10 minutes and stored at -80°C until use.

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and protein identification

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) was performed with the IPGphor IEF System (GE Healthcare, Piscataway, NJ) and Ettan DALT six (GE Healthcare) as described previously.¹³ Labeled proteins were visualized with a Typhoon 9400 Imager (GE Healthcare), and 24 images of paired samples were analyzed with the DeCyder Software Platform version 4.0 (GE Healthcare). The detailed Methods are available in this article's Online Repository at www.jacionline.org.

The data concerning the changes in the amounts of proteins in each spot were combined, and the spots, which indicated significant changes in the amount of proteins before and after the treatment, were analyzed.

Protein spots that satisfied both the following criteria were subjected to protein identification: (1) those in which at least a 1.1-fold increase or decrease in protein expression was observed, and (2) those that indicated significant differences in the protein expression levels before and after SLIT (paired *t* test, $P < .05$). Differentially expressed protein spots were subjected to nano-HPLC, and samples were separated on a Paradigm MS4 LC system (Michrom Biosources, Auburn, Calif).¹⁴ The purified samples were analyzed by using matrix-assisted laser desorption/ionization 2-stage time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) mass spectrometry; all the imaging analysis was performed on an Ultraflex II (Bruker Daltonics, Billerica, Mass). Detailed Methods can be accessed in the Online Repository.

Western blot analysis of apolipoprotein A-IV

The protocol of the Western blot analysis to validate the apolipoprotein A-IV (apoA-IV) spot is described in the Methods in the Online Repository. For the quantification of apoA-IV, the protein concentration in the serum was measured by a protein assay (Bio-Rad, Hercules, Calif). Then the protein concentrations in the serum samples were adjusted to 4 μ g/ μ L, and these prepared samples were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels. The separated proteins were transferred onto nylon membranes (PVDF; GE Healthcare) by a semidry electrical transfer (Bio-Rad). Nonspecific binding sites were blocked for 1 hour at room temperature with 1% blocking reagent in PBS-Tween 20 (0.1%; Roche, Indianapolis, Ind). The membranes were incubated with mAb (dilution 1:2000; antihuman apoA-IV mouse IgG antibody; BML, Saitama, Japan) for 1 hour at room temperature. After washing, the membranes were incubated with antimouse IgG (H + L-chain)-horseradish peroxidase (HRP) goat IgG antibody (MBL, Nagoya, Japan) for 1 hour at room temperature. After washing 3 times, the membranes were incubated with Immobilon western chemiluminescent HRP substrate (Millipore, Billerica, Mass) for 1 minute. The chemiluminescent images were then analyzed with a LAS-4000UV mini and Multi Gauge Version 3.0 (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan).

Test for histamine release from basophils containing various apolipoproteins

Recombinant apolipoprotein A-I and apolipoprotein E were purchased from BioVision (Mountain View, Calif), and recombinant apolipoprotein C-III

TABLE I. Characteristics of patients with SAR

	Placebo-treated (n = 9)	Actively treated (n = 15)	P value
Age (y), mean ± SD	47.5 ± 13.1	48.1 ± 14.7	.926
Male/female ratio	11/4	6/3	.742
IgE (IU/mL), mean (range)	124.7 (7-370)	136.5 (11-470)	.823
JC pollen-specific IgE (UA/mL), mean (range)	17.8 (1.25-73.5)	10.6 (1.18-27.1)	.308

was purchased from Abnova Co (Taipei, Taiwan). Recombinant apoA-IV was expressed in COS-7 cells and purified by using the QIAexpress Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen, Valencia, Calif). Detailed Methods for the production of recombinant apoA-IV can be accessed in the Online Repository. Anticoagulated blood obtained from 6 patients with JC pollinosis was subjected to gradient centrifugation to obtain peripheral mononuclear cells by using Lymphoprep (Axis-Shield, Oslo, Norway). The basophils were enriched by using the Basophil Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany) and autoMACS (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. The enriched basophils (>98%) were seeded on a 96-well plate at a density of 5×10^4 cells/well and incubated in RPMI 1640 medium (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) containing 10% FCS (Gibco, Grand Island, NY), 100 U/mL penicillin-G potassium salt (Sigma, St Louis, Mo), and 100 μ g/mL streptomycin sulfate salt (Sigma) at 37°C under 5% CO₂ for 30 minutes. The basophils were further incubated with or without the apolipoproteins (apolipoprotein A-I, apoA-IV, apolipoprotein C-III, and apolipoprotein E; final concentration of apolipoproteins, 1 μ g/mL) for 30 minutes; subsequently, Cry j 1 (Hayashibara Biochemical Laboratories, Okayama, Japan) was added to each well at a final concentration of 0.1 μ g/mL. After 30 minutes of incubation, histamine concentrations in the cells and supernatants were determined by using a Histamine ELISA kit (Oxford Biomedical Research, Oxford, Mich) according to the manufacturer's instructions. Histamine release (%) was calculated as follows:

$$\frac{\text{histamine in supernatant}}{(\text{histamine in supernatant} + \text{histamine in basophils})} \times 100.$$

The percent inhibition of histamine release by apolipoproteins was calculated as follows:

$$\frac{([\text{histamine release without apolipoproteins}] - \text{histamine release with apolipoproteins})}{[\text{histamine release without apolipoproteins}]} \times 100.$$

Pathway analysis

To investigate whether the differentially expressed proteins belong to specific pathways or networks, we used the IPA version 7.1 software (Ingenuity Systems, Mountain View, Calif). This web-based software enables the identification of biologic networks relevant to each researcher's experiment. A data set containing protein identifiers and the corresponding expression values was uploaded onto the Ingenuity pathways knowledge base. These uploaded proteins (referred to as *focus genes*) were then used as starting points for generating biological networks, and a network was constructed such that it was enriched with the proteins of interest.

Statistical analysis

The differences in the protein levels before and after SLIT were analyzed for statistical significance by the paired *t* test. The statistical significance of the difference in apoA-IV levels observed by Western blot analysis was calculated by the Wilcoxon signed-rank sum test. Pairwise correlations between SMS and serum levels of apoA-IV were calculated by using the Pearson correlation. Significance was defined as $P < .05$.

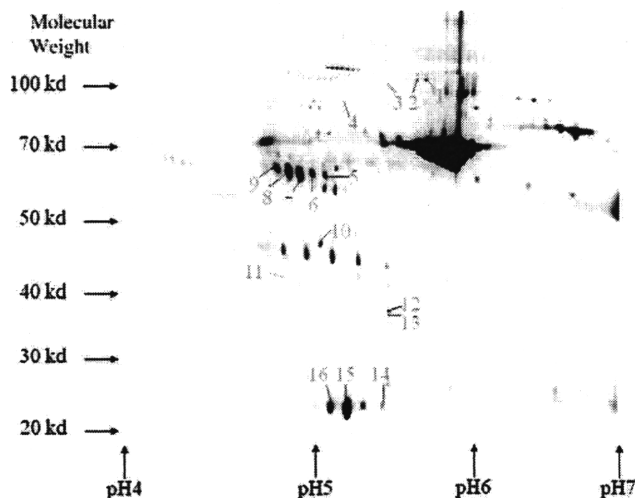


FIG 1. Upregulated and downregulated proteins by 2-DE analysis. Upregulated or downregulated protein spots that were altered in the actively treated and placebo-treated groups are marked with circles. The spot numbers correspond to the numbers in Table II.

RESULTS

A representative 2-DE image of the serum samples from a SLIT-treated patient is shown in Fig 1. Sixteen spots were differentially expressed in the samples obtained before and after the pollen seasons (Fig 1; Table II). Before 2-DE analysis of the samples of patients with SAR, we evaluated the reproducibility and deviation of the spot intensity by repeated experiments with same samples labeled with 2 different dyes (Cy5 and Cy3). The variation in the 2-DE analysis was less than 1.1-fold. Thus, a protein spot showing a greater than 1.1-fold change in expression with a statistically significant difference of $P < .05$ in the samples obtained before and after the pollen season was considered to be differentially expressed spot. Fig 2 shows the output of the DeCyder differential analysis software in the case of spot 10 in actively treated patients. The graphical data showed that the amount of apoA-IV protein increased after SLIT. These altered spots were excised and analyzed by MALDI-TOF/TOF analysis. Fifteen spots were successfully identified by MALDI-TOF/TOF analysis. These identified spots corresponded to 7 proteins (Table II). We classified these 7 proteins on the basis of their function into 4 categories: lipid transporters, complement factors, protease inhibitors, and transporters. An example of MALDI-TOF/TOF analysis is shown in this article's Fig E1 in the Online Repository at www.jacionline.org (spot 10, ApoA-IV). Among these identified proteins, the serum levels of complement C4A, apoA-IV, and transthyretin were significantly increased in the patients belonging to the actively treated group ($P < .05$), but this trend was not observed in the patients belonging to the placebo-treated group. The results of pathway analysis with the 3 SLIT-related proteins are shown in Fig 3. The IPA software generates a large global molecular network on the basis of hundreds of thousands of curated direct and indirect physical and functional interactions between orthologous mammalian genes/proteins from published, peer-reviewed content in the Ingenuity knowledge base. As shown in Fig 3, hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4A) was identified as the hub protein in the network, indicating that these 3 proteins were regulated by the common transcription factor HNF4A.

TABLE II. Differently expressed proteins identified by 2-DE analysis

Protein no	Spot no	Protein	Accession no	Score	Coverage	Actively treated	Placebo-treated	Classification
1	1	Complement C3	P01024	1154.15	16.60%	1.4	1.42	Complement factors
	2			1015.47	14.50%	1.29	1.25	
	11			252.2	7.00%	-1.45	-1.32	
2	3	Unidentified				1.17	1.12	
3	4	Complement C4-A	POCOL4	414.57	6.30%	1.32	1.13	Complement factors
4	5	α -1-Antitrypsin	P01009	522.93	30.40%	1.2	1.17	Protease inhibitors
	6			395.05	32.50%	1.21	1.17	
	7			752.54	45.20%	1.21	1.14	
	8			715.94	39.50%	1.16	1.17	
	9			619.68	41.10%	1.16	1.15	
	10			1339.68	51.00%	1.64	1.12	
5	10	ApoA-IV	P06727	1339.68	51.00%	1.64	1.12	Lipid transporters
6	12	Transthyretin	P02766	184.23	43.50%	1.65	1.31	Transporters
7	13	Apolipoprotein E	P02649	647.84	43.80%	2.88	2.82	Lipid transporters
8	14	Apolipoprotein A-I	P02647	262.23	28.80%	-1.3	-1.51	Lipid transporters
	15			1610.49	77.50%	-1.1	-1.16	
	16			1210.31	77.20%	-1.27	-1.24	

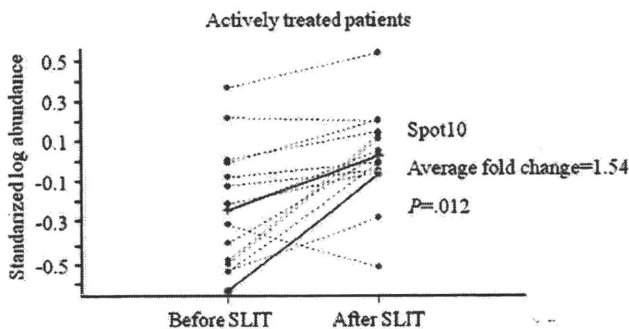


FIG 2. DeCyder differential analysis software output. Quantitative assessments of protein spots were obtained with the DeCyder-based quantization software. The *y*-axis represents the standardized log abundance of protein expression. The graphical data show the abundance of the protein corresponding to spot 10 in the actively treated group. The *spot number* corresponds to the number in Table II.

Subsequently, we analyzed the correlation between the fold change in the levels of these proteins and the nasal SMS. The average SMS during the peak JC pollination season was lower in the patients belonging to the SLIT-treated group than in those belonging to the placebo-treated group (122.0 ± 62.0 vs 166.4 ± 89.0); however, this difference was not significant ($P = .36$). The average medication score during the peak JC pollination season was 39.4 ± 12.5 in the SLIT-treated group and 56.0 ± 16.1 in the placebo-treated group; however, the 2 groups did not differ significantly in this regard ($P = .42$). On the basis of the JRQLQ scores, we found that the QOL of the patients belonging to the SLIT-treated group was superior to that of the patients belonging to the placebo-treated group (9.5 ± 8.3 vs 15.9 ± 19.6 ; $P = .048$).

To confirm the results of 2-DE, we performed Western blotting with apoA-IV-specific antibody. The spot identified by Western blotting was identical to the one detected by 2-DE and MALDI-TOF/TOF analysis (see this article's Fig E2 in the Online Repository at www.jacionline.org). The serum concentration of apoA-IV in each sample was assessed by Western blotting (see this article's Fig E3 in the Online Repository at www.jacionline.org). The average fold change before and after treatment was 3.27 ± 1.3 in the SLIT-treated group and 1.57 ± 1.0 in the placebo-treated group,

and the apoA-IV levels were significantly higher in actively treated group compared with the placebo-treated group ($P < .05$).

The levels of apoA-IV showed significant reverse correlation with SMS (Fig 4; $r = -0.635$; $P = .011$) and JRQLQ ($r = -0.516$; $P = .049$) in the case of patients belonging to the actively treated group; thus, when the levels of apoA-IV were high, a low SMS and QOL score were obtained. However, the serum levels of complement C4A and transthyretin did not show significant correlation with the SMS ($P > .05$).

Next, to evaluate the effect of apoA-IV on histamine release from the basophils, we examined the rate of histamine release from the basophils obtained from the patients with SAR in the presence and absence of apoA-IV (Fig 5). The histamine release from basophils was greatly reduced after the addition of recombinant apoA-IV in the medium; however, this was not observed when extracts from an empty vector (41.7 ± 16.0 vs 70.0 ± 13.7 ; $P < .01$) were added to the medium. The addition of recombinant apolipoprotein A-I, apolipoprotein C-III, and apolipoprotein E did not reduce histamine release from the basophils (apolipoprotein A-I, 62.5 ± 25.3 ; apolipoprotein C-III, 78.3 ± 29.2 ; and apolipoprotein E, 85.0 ± 37.0 vs control medium, 74.3 ± 26.9 ; $P > .05$).

DISCUSSION

This is the first proteomic study to investigate proteins involved in inhalant allergen immunotherapy. The serum protein levels of complement C3, α -1-antitrypsin, apolipoprotein E, and apolipoprotein A-I differed in both the actively treated group and placebo-treated group, suggesting that these 4 proteins may be altered by JC pollen exposure. On the contrary, the levels of apoA-IV, complement C4A, and transthyretin were increased in the actively treated group, whereas such a trend was not observed in the case of the placebo-treated patients. These data indicate that apoA-IV, complement C4A, and transthyretin may be altered with the SLIT treatment.

Several patients had allergy to multiple allergens, and it is possible that reaction to a particular allergen can be influenced by exposure to other allergens. We measured specific IgE levels against 6 major aeroallergens in all patients. Of these patients, 63% of the patients had allergy only to pollen from JC, and the

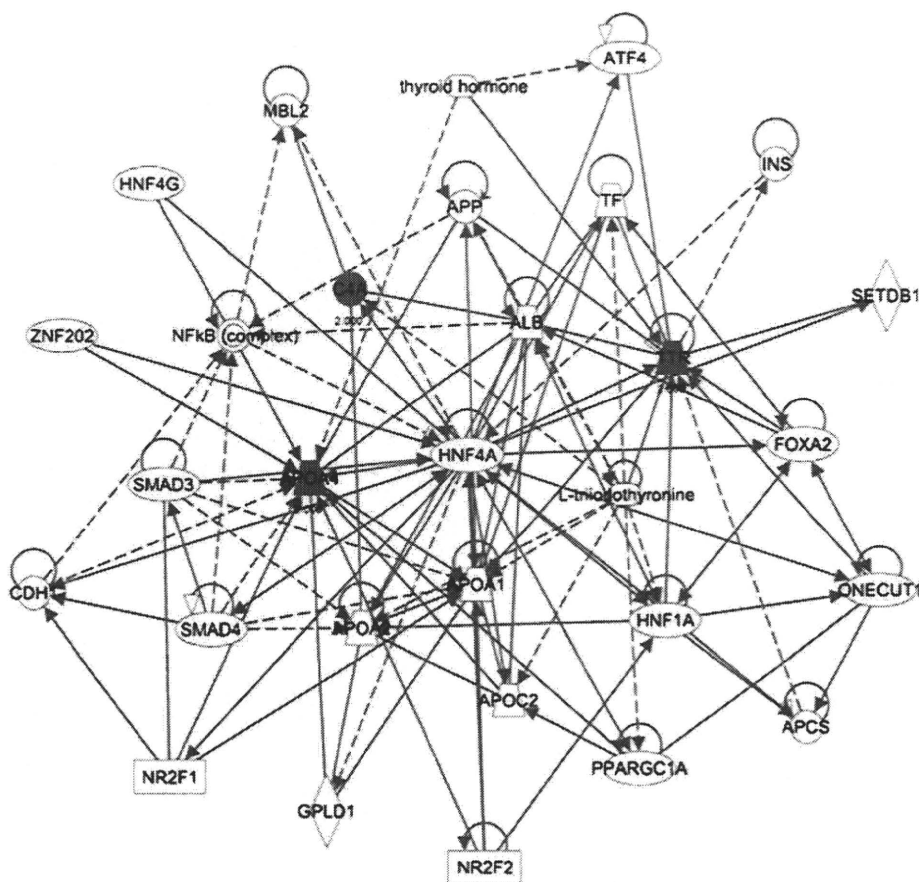


FIG 3. Results of the network analysis by Ingenuity pathways analysis. The complement factor C4A, apoA-IV, and transthyretin are shown in red.

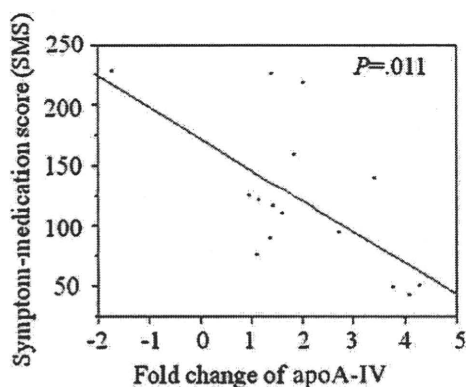


FIG 4. Correlation of the fold change in apoA-IV with the SMS. A statistically significant correlation was observed between the levels of apoA-IV and the SMS ($r = -0.635$; $P = .011$ in the actively treated group).

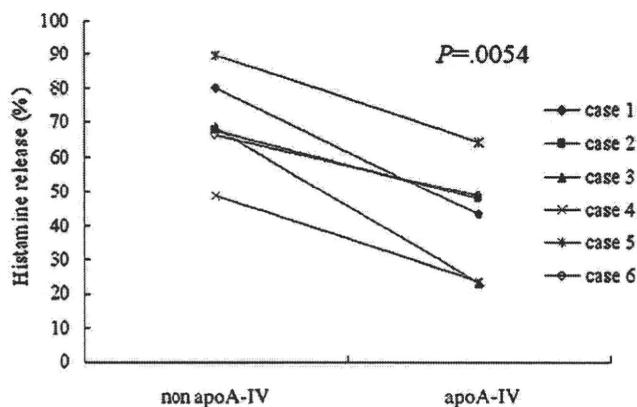


FIG 5. Histamine release from basophils with or without apoA-IV. The graph shows the histamine release rate from the basophils of SAR patients with or without apoA-IV.

rest had allergy to mites and other aeroallergens. Among the allergens tested, the pollens of *D glomerata* and *A artemisiifolia* are not dispersed by air currents between February and April in Japan. One patient had allergy to *C albicans*, and none of the patients had allergy to *Aspergillus*. Five patients had allergy to mites, but they did not exhibit any symptoms related to perennial

allergic rhinitis or asthma. The ratio of patients with allergy to aeroallergens other than JC in the placebo-treated group (0.33) did not differ from that in the actively treated group (0.40; $P = 1$, Fisher exact test); therefore, the allergic reaction obtained against the other allergens did not have a significant impact on the results of our proteomic study.

Among 3 proteins altered during SLIT, the apoA-IV serum levels correlated only with the clinical symptom scores, and identified apoA-IV was detected on the same molecular weight and isoelectric point as native apoA-IV, which was theoretically calculated from the database. Therefore, we think apoA-IV we identified by 2-DE was similar to native apoA-IV. ApoA-IV is a 46-kd glycoprotein that is produced mainly in the small intestine and liver.¹⁵ Although the precise function of apoA-IV has not been completely elucidated, several functions have been proposed, such as lipid transport and metabolism,^{16,17} satiety,¹⁸ and antiatherogenic effects.^{19,20} Several lines of evidence also suggested that apoA-IV has anti-inflammatory effects. Vowinkel et al²¹ showed in their experimental colitis model that apoA-IV knockout mice exhibited a significantly greater inflammatory response than their wild-type littermates, and this inflammation was reversed by exogenous administration of apoA-IV to knockout mice. It has also been shown that expression of human apoA-IV in apolipoprotein E knockout mice significantly reduced the development of atherosclerosis and release of cytokines such as IL-4, IFN- γ , and TNF- α induced by repeated injections of LPS.²² In the current study, increased levels of apoA-IV were observed in the actively treated group, and apoA-IV inhibited the release of histamine from basophils. These results combined with the results of previous studies indicate that the anti-inflammatory effects of apoA-IV and inhibition of histamine release by apoA-IV may contribute to the effect of SLIT for the treatment of allergic rhinitis.

The complement component system provides innate defense against microbial pathogens and acts in conjunction with antibody-mediated immunity. It has been reported that complement-activation products such as C3a and C5a, known as *anaphylatoxins*, contribute to inflammation in allergic rhinitis. Andersson et al²³ showed that an allergen challenge test administered to subjects with allergy induced nasal symptoms and concomitantly increased their C3a and C5a levels. We observed that the acidic complement component C4A was increased in the actively treated group compared with the control placebo group, and the levels of 2 C3 isoforms were upregulated and 1 was downregulated in the actively treated group. The human C4 complement components are encoded by 2 genes, acidic C4A and basic C4B, located on chromosome 6p21.3. C4 deficiencies are reported to be associated with *Mycobacterium leprae* infection and autoimmune diseases²⁴; further, increased levels of C4a, the C4 fragment formed by the cleavage reaction, were observed in the case of patients with aspirin-induced asthma compared with those with aspirin-tolerant asthma.²⁵ To date, the mechanisms underlying the control of C4A gene transcription are poorly understood; however, C4A, apoA-IV, and transthyretin were reported to be regulated by a common transcription factor, HNF4A (Fig 3).²⁶⁻²⁸ Furthermore, apoA-IV and transthyretin possess HNF4A-binding sites in their regulatory regions.²⁸⁻³⁰ HNF4A is a liver-enriched transcription factor, and many acute phase proteins have HNF4A-binding sites in their regulatory elements, and changes in the expression of these acute phase proteins alter the serum protein composition, which facilitates recovery from insult or stress. A recent study showed that HNF4A is responsible for the transcriptional regulatory changes in a cell injury model in which IL-1 β , IL-6, and TNF- α are induced.³⁰ Therefore, we speculated that HNF4A may be upregulated by SLIT, and as a result, the SAR symptoms may be relieved, but the precise mechanism underlying HNF4A upregulation is unknown.

In conclusion, we identified proteins associated with SLIT by 2-DE analysis. Our data will increase the understanding of the mechanism of SLIT and may provide novel insights into the treatment of allergic rhinitis.

We thank Ms Y. Ishikawa of the University of Fukui for the excellent technical assistance. We also thank all of the participants in this study.

Key messages

- This is the first proteomic study to investigate proteins associated with SLIT for SAR, and it led to the identification of apoA-IV, complement C4A, and transthyretin as SLIT-related proteins.
- The serum levels of apoA-IV were inversely correlated with the clinical symptom scores, and apoA-IV was shown to have an inhibitory effect on basophil histamine release, indicating that apoA-IV was a possible therapeutic target for allergic diseases.

REFERENCES

1. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy* 2008; 63(suppl 86):8-160.
2. Nishima S, Chisaka H, Fujiwara T, Hayashi S, Hiraba K, Hisada N, et al. Surveys on the prevalence of pediatric bronchial asthma in Japan: a comparison between the 1982, 1992, and 2002 surveys conducted in the same region using the same methodology. *Allergol Int* 2008;58:37-53.
3. Sakashita M, Hirota T, Harada M, Nakamichi R, Tsunoda T, Osawa Y, et al. Prevalence of allergic rhinitis and sensitization to common aeroallergens in a Japanese population. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;151:255-61.
4. Passalacqua G, Durham SR. Allergic rhinitis and its impact on asthma update: allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:881-91.
5. Calderon MA, Alves B, Jacobson M, Hurwitz B, Sheikh A, Durham S. Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;CD001936:7.
6. Frew AJ. Sublingual immunotherapy. *N Engl J Med* 2008;358:2259-64.
7. Compalati E, Penagos M, Tarantini F, Passalacqua G, Canonica GW. Specific immunotherapy for respiratory allergy: state of the art according to current meta-analyses. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2009;102:22-8.
8. de Blay F, Barnig C, Kanny G, Purohit A, Leynadier F, Tunon de Lara JM, et al. Sublingual-swallow immunotherapy with standardized 3-grass pollen extract: a double-blind, placebo-controlled study. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;99:453-61.
9. Bohle B, Kinaciyan T, Gerstmayr M, Radakovics A, Jahn-Schmid B, Ebner C. Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:707-13.
10. Okubo K, Gotoh M, Fujieda S, Okano M, Yoshida H, Morikawa H, et al. A randomized double-blind comparative study of sublingual immunotherapy for cedar pollinosis. *Allergol Int* 2008;57:265-75.
11. Hyo S, Fujieda S, Kawada R, Kitazawa S, Takenaka H. The efficacy of short-term administration of 3 antihistamines vs placebo under natural exposure to Japanese cedar pollen. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005;94:457-64.
12. Juniper EF, Thompson AK, Ferric PJ, Roberts JN. Validation of the standardized version of the Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:364-9.
13. Nishioka T, Uchida K, Mono K, Ishii T, Aoki T, Imada Y, et al. Alpha-1-antitrypsin and complement component C7 are involved in asthma exacerbation. *Proteomics Clin Appl* 2008;2:46-54.
14. Wang Y, Rosen H, Madtes DK, Shao B, Martin TR, Heinicke JW, et al. Myeloperoxidase inactivates TIMP-1 by oxidizing its N-terminal cysteine residue: an oxidative mechanism for regulating proteolysis during inflammation. *J Biol Chem* 2007; 282:31826-34.
15. Elshourbagy NA, Walker DW, Paik YK, Boguski MS, Freeman M, Gordon JI, et al. Structure and expression of the human apolipoprotein A-IV gene. *J Biol Chem* 1987;262:7973-81.

16. Dvorin E, Gorder NL, Benson DM, Gotto AM Jr. Apolipoprotein A-IV. A determinant for binding and uptake of high density lipoproteins by rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1986;261:15714-8.
17. Goldberg IJ, Scheraldi CA, Yacoub LK, Saxena U, Bisgaier CL. Lipoprotein ApoC-II activation of lipoprotein lipase: modulation by apolipoprotein A-IV. *J Biol Chem* 1990;265:4266-72.
18. Tso P, Liu M. Apolipoprotein A-IV, food intake, and obesity. *Physiol Behav* 2004;83:631-43.
19. Cohen RD, Castellani LW, Qiao JH, Van Lenten BJ, Lusis AJ, Reuc K. Reduced aortic lesions and elevated high density lipoprotein levels in transgenic mice overexpressing mouse apolipoprotein A-IV. *J Clin Invest* 1997;99:1906-16.
20. Duverger N, Tromp G, Caillaud JM, Emmanuel F, Castro G, Fruehart JC, et al. Protection against atherogenesis in mice mediated by human apolipoprotein A-IV. *Science* 1996;273:966-8.
21. Vowinkel T, Mori M, Kriegstein CP, Russell J, Saijo F, Bharwani S, et al. Apolipoprotein A-IV inhibits experimental colitis. *J Clin Invest* 2004;114:260-9.
22. Recalde D, Ostos MA, Badell E, Garcia-Otin AL, Pidoux J, Castro G, et al. Human apolipoprotein A-IV reduces secretion of proinflammatory cytokines and atherosclerotic effects of a chronic infection mimicked by lipopolysaccharide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:756-61.
23. Andersson M, Michel L, Ljull JB, Pipkom U. Complement activation on the nasal mucosal surface—a feature of the immediate allergic reaction in the nose. *Allergy* 1994;49:242-5.
24. Samano ES, Ribeiro Lde M, Goreseu RG, Rocha KC, Gramachi AS. Involvement of C4 allotypes in the pathogenesis of human diseases. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2004;59:138-44.
25. Lee SH, Rhim T, Choi YS, Min JW, Kim SH, Cho SY, et al. Complement C3a and C4a increased in plasma of patients with aspirin-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:370-8.
26. Naiki T, Nagaki M, Shidoji Y, Kojima H, Imose M, Kato T, et al. Analysis of gene expression profile induced by hepatocyte nuclear factor 4alpha in hepatoma cells using an oligonucleotide microarray. *J Biol Chem* 2002;277:14011-9.
27. Rhee J, Ge H, Yang W, Fan M, Handschin C, Cooper M, et al. Partnership of PGC-1alpha and HNF4alpha in the regulation of lipoprotein metabolism. *J Biol Chem* 2006;281:14683-90.
28. Spath GE, Weiss MC. Hepatocyte nuclear factor 4 expression overcomes repression of the hepatic phenotype in dedifferentiated hepatoma cells. *Mol Cell Biol* 1997;17:1913-22.
29. Kristaki E, Lacorte JM, Katrakili N, Zannis VI, Talianidis I. Transcriptional regulation of the apolipoprotein A-IV gene involves synergism between a proximal orphan receptor response element and a distant enhancer located in the upstream promoter region of the apolipoprotein C-III gene. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4689-96.
30. Wang Z, Burke PA. Effects of hepatocyte nuclear factor-4alpha on the regulation of the hepatic acute phase response. *J Mol Biol* 2007;371:323-35.

Correction

With regard to the March 2010 article entitled "Evidence for diminished levels of epithelial psoriasin and calprotectin in chronic rhinosinusitis" (*J Allergy Clin Immunol* 2010;125:667-675), the name of one of the authors, Roderick G. Carter, was incorrect as listed in the article.

METHODS

2-DE

The protein concentrations in the serum were measured by a protein assay (Bio-Rad, Hercules, Calif). Serum was diluted in lysis buffer, and samples containing 30 µg solubilized proteins were labeled with 240 pmol fluorescent dyes (Cy2, Cy3 or Cy5; GE Healthcare), which have the same molecular weight and isoelectric point but different excitation and emission wavelengths. The internal standard, which was a mixture of equal volumes of all the samples, was labeled with Cy2. Serum samples obtained before the initiation of SLIT were labeled with Cy3, and those obtained during SLIT from the same patients were labeled with Cy5. These labeled samples were mixed and solubilized in 450 µL of rehydration buffer and loaded onto 24-cm immobilized pH gradient gel strips (GE Healthcare). Isoelectric focusing was conducted at 8000 V for a total of 65 kV/h at 20°C, and 2-DE was run at 2.5 W for 30 minutes and then at 30 W for 3 hours.

Gel image pairs were processed by the Differential In-gel Analysis (DeCyder™-DIA) software module to codetect and quantify protein spots in the images, considering the internal standard sample as a reference to normalize the data so the rest of the normalized spot maps could be compared. DeCyder biological variation analysis (DeCyder™-BVA) was used for gel-to-gel matching of the internal standard spot maps from each gel. In the BVA, we initially analyzed 24 images of the paired samples obtained from the patients belonging to the 2 groups—the placebo-treated and actively treated groups.

Protein identification

Protein spots that satisfied both of the following criteria were subjected to protein identification: (1) protein spots showing at least a 1.1-fold change in expression, and (2) proteins spots showing statistically significant differences in expression before and after SLIT (paired *t* test; *P* values < .05). The 2-DE was performed with internal control samples; gels were stained with Dodeca Silver Stain Kits (Bio-Rad Laboratories). Differentially expressed protein spots were excised from the gels with Ettan Spot Picker version 1.10 (GE Healthcare). These excised gels were destained with destaining solution containing 15 mmol/L potassium hexacyanoferrate (III) (Wako, Osaka, Japan) and 50 mmol/L sodium thiosulfate (Sigma, St Louis, Mo) and digested with sequencing-grade modified trypsin (Promega, Madison, Wis), and using these peptide extracts, we performed nano-HPLC sample separation with a Paradigm MS4 LC system (Michrom BioResources, Auburn, Calif)¹⁴ and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry with ultraflex II (BRUKER Daltonics, Billerica, Mass).¹⁵ Molecular mass information obtained by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry was searched against the Swiss-Prot protein database (version 56.5, <http://www.expasy.org/sprot/>) with the MASCOT search program (version 2.2; MatrixScience, Boston, Mass) automatically using the Warp-LC software (BRUKER Daltonics), which attached to the ultraflex II. The following search criteria were used: (1) the taxonomy was *Homo sapiens*

(human being); (2) the specified enzyme was trypsin, with up to 1 missed cleavage permitted; (3) the fixed modifications were carbamidomethylation of cysteine residues and variable modifications were oxidation of methionine residues; and (4) the peptide tolerance and MS/MS tolerance were set at 100 ppm and ± 0.5 d, respectively.

Western blot analysis to validate the apoA-IV spot

The serum protein concentration was measured by a protein assay (Bio-Rad). 2-DE was performed with the IPGphor IEF System (GE Healthcare) and Hoefer SE 600 Ruby standard vertical electrophoresis (GE Healthcare). The protein concentration was adjusted to 300 µg in 250 µL rehydration buffer and loaded onto 13-cm immobilized pH gradient gel strips (GE Healthcare). Isoelectric focusing was performed at 8000 V for a total of 65 kV/h at 20°C, and 2-DE was run at 2.5 W for 30 minutes and then at 30 W for 3 hours. Separated proteins were transferred onto nylon membranes (PVDF; GE Healthcare) by a semidry electrical transfer (Bio-Rad). Then the total protein separated by 2-DE was also stained with the Deep Purple Total Protein Stain (GE Healthcare) and visualized with a Typhoon 9400 Imager (GE Healthcare). Next, nonspecific binding sites on the membranes were blocked for 1 hour at room temperature in 5% skim milk (Morinaga Nyugyou, Tokyo, Japan) in PBS-Tween 20 (0.05%). Membranes were incubated with mAb (dilution 1:2000; antihuman apoA-IV mouse IgG antibody; BML, Saitama, Japan) overnight at room temperature. After washing, the membranes were incubated with antimouse IgG HRP-linked sheep antibody (GE Healthcare) overnight at room temperature. After washing 3 times, the membranes were incubated with the Western blotting luminol reagent (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, Calif) for 1 minute; then the chemiluminescent images were analyzed with the Typhoon 9400 Imager (GE Healthcare).

ApoA-IV protein purification

The vector expressing apoA-IV in mammalian cells was developed on the basis of pBudCE4.1 (Invitrogen, San Diego, Calif). PCR was performed by using the primer pair 5'-CAG TCG ACG ATG TTC CTG AAG GCC GTG GTC and 5'-GGG ATC CCA GCT CTC CAA AGG GGC CA with human liver cDNA as a PCR template. The PCR product was digested with *SalI* and *BamHI* (TOYOBO, Tokyo, Japan), then subcloned into pBudCE4.1 (Invitrogen). The accuracy of the sequence was confirmed by the direct sequencing.

COS-7 cells were cultured in RPMI 1640 medium (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) containing 10% FCS (Gibco, Grand Island, NY), 100 U/mL penicillin G potassium salt (Sigma), and 100 µg/mL streptomycin sulfate salt (Sigma), and these cells were transfected with apoA-IV expression constructs with the Effectene Transfection Reagent (Qiagen, Chatsworth, Calif) according to the manufacturer's protocol. After a 48-hour transfection, purification of the His-tagged protein from the cultured cells was performed by using the QIAexpress Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.