

スギ花粉症に関する鼻上皮細胞の網羅的遺伝子解析

意元 義政¹, 藤枝 重治¹¹ 福井大学医学部耳鼻咽喉科頭頸部外科学

現在スギ花粉症は日本で最も多いアレルギー疾患となっている。スギ花粉症に関連する遺伝子を同定するために、スギ花粉症患者と吸入抗原 6 種類に対する特異的 IgE 陰性のコントロールを対象に 2009 年度スギ飛散期に鼻上皮細胞を擦過し、mRNA のプロファイル Illumina 500GX システム (イルミナ) を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。発現解析はスギ花粉症患者群とコントロール群において、発現差が 4 倍以上かつ $p < 0.05$ であるものを有意としたところ 18 遺伝子を同定できた。Intelectin 1 はスギ花粉症患者で 17.4 倍の発現を認めた。定量的 polymerase chain reaction でもスギ花粉症患者で有意な上昇を認めた。2010 年度鼻上皮細胞での Intelectin 1 の発現を再度定量的 PCR で確認した。その結果前年度と同様に、スギ花粉症患者はコントロール群に比べ有意な発現亢進を認めた。しかしスギ特異的 IgE 陽性症状未発症者では、コントロール群と同様低い発現であった。次に通年性アレルギー性鼻炎患者の下甲介粘膜を用いて免疫染色を行ったところ、intelectin 1 は鼻上皮細胞で産生されていることが分かった。また培養鼻粘膜擦過片からの鼻上皮細胞初代培養株において、Intelectin 1 は IL-4 及び IL-13 の刺激により発現された。以上のことから Intelectin 1 はアレルギー性鼻炎の症状 (発症) に関する分子であることが示唆された。

キーワード：マイクロアレイ, 定量的 PCR, 鼻上皮細胞, 季節性アレルギー性鼻炎, 免疫組織染色

略語：cRNA, complementary ribonucleic acid; 定量的 PCR, polymerase chain reaction; IL-4, Interleukin4; IL-13, Interleukin13; IL-17RB, Interleukin 17 receptor B

はじめに

スギ花粉症は、2 月～4 月にかけて日本各地で猛威をふるう季節性アレルギー性鼻炎である。我々が行った最新の疫学調査では、スギ特異的 IgE 陽性者 (CAP スコア 2 以上) は 55.5% (855 名/1,540 名) であり、全体の 39.6% (610 名) がスギ花粉飛散時期にアレルギー症状を有していた¹⁾。

マイクロアレイはプローブに特定の mRNA と一致する DNA 鎖を採用することで、一度に数千から数万種類の遺伝子発現情報を同定することができる優れた解析法である。この手法により、各疾患に関連する細胞や疾患動物モデルにおける、病態関連特異的な遺伝子発現を網羅的に解析することができる。これまで我々はスギ花粉飛散時期に採取した末梢血にてマイクロアレイを行った²⁾。その結果、スギ花粉症患者では、末梢血から分離した CD4 陽性 T 細胞の IL-17RB (Interleukin-17 receptor B) 発現が、非アレルギー

であるコントロール群と比較して有意に上昇していたことを見出した。この結果は Wang らの報告とも一致していた³⁾。一方で気道局所における遺伝子発現解析では、喘息患者由来の気管支組織を用いた研究で、79 遺伝子の発現変化を認めたと報告された⁴⁾。末梢血よりも炎症反応の主体となる組織での遺伝子発現変化を把握することは、病態の解明に大きく貢献できる可能性が高い。そこで我々は 2009 年度のスギ花粉飛散時期に、スギ花粉症発症者、スギ特異的 IgE 陽性未発症者、非アレルギー者から鼻粘膜擦過法にて鼻粘膜上皮細胞を採取し、マイクロアレイ法により mRNA 発現解析を行った。さらに 2010 年度のサンプルを使用して 2009 年度サンプルで得られた結果の追認を行った。

対 象

福井大学アレルギーデータベースからスギ花粉症患者群 (血清スギ特異的 IgE が CAP スコアで 2 以上かつ毎年スギ花粉飛散時期にスギ花粉症の症状を認め、スギ花粉症と診断がされている)、感作陽性未発症者群 (血清スギ特異的 IgE が CAP スコアで 2 以上であるが、今まで全く花粉症の症状がない)、非アレルギー群 (7 項目の吸入アレルゲンに対する血清特異的 IgE が全て陰性であり鼻炎の症状を認

2011 年 8 月 17 日受稿, 2011 年 8 月 23 日受理
別冊請求先: 意元義政
〒910-1193 福井県吉田郡永平寺松岡下合月 23-3
福井大学医学部耳鼻咽喉科頭頸部外科学
TEL: 0776-61-8407, FAX: 0776-61-8118
E-mail: yimoto1214@yahoo.co.jp

表 1 2009 年度及び 2010 年度の対象者の内訳

	2009 年		2010 年		
	スギ花粉症患者	コントロール	スギ花粉症患者	感作未発症者	コントロール
合計 (人)	32	25	17	14	16
男性 (人)	16	13	8	4	6
女性 (人)	16	14	9	10	10
年齢 (歳)	36.8 (25–50)	32.1 (18–47)	30.4 (20–47)	27.2 (19–44)	26.2 (19–41)
RIST (total IgE)	95.6	45.6	75.5	66.7	25.5
スギ特異的 IgE	14.6	0.34 以下	16.2	3.6	0.34 以下
皮内反応テスト (陽性/陰性)			17/0	7/6	0/16
鼻汁好酸球 (陽性/陰性)			10/7	4/10	0/16

めていない) であるコントロール群を抽出した。CAP スコアの測定はスギ, ヤケヒョウヒダニ, コナヒョウヒダニ, カモガヤ, ブタクサ, アスベルギルス, カンジダの 7 項目が測定されている。さらにスギ花粉症の症状の有無, 気管支喘息やアトピー性皮膚炎, 食物アレルギーなどの既往も調べられている。スギ花粉症患者群及び感作陽性未発症者群とも, 血清スギ特異的 IgE のみ CAP スコアで 2 以上であり, 測定した他の 6 項目の血清特異的 IgE は陰性である人を選んだ。さらに 3 群とも気管支喘息, アトピー性皮膚炎, 食物アレルギーの既往は認めていない人を選んだ。

対象者とは本研究の内容を書面と口頭にて説明し, 文書で同意を得た。2009 年対象者はスギ花粉症患者群 32 名, 非アレルギー群 25 名, 2010 年対象者はスギ花粉症患者群 17 名, 感作陽性未発症者群 14 名, 非アレルギー群 16 名であった。(対象者の背景因子を表 1 に示す)

本研究は福井大学医学部倫理委員会における承認を得て行った。

方 法

鼻粘膜上皮採取

鼻粘膜上皮細胞は 2009 年度および 2010 年度とも, スギ花粉飛散時期 (3 月中旬) に施行した。採取は下甲介粘膜を, 細胞診用ブラシ (MEDICAL PACKAGING, Camarillo, CA, USA) で数回擦過し, 鼻粘膜上皮細胞を採取した。採取した鼻粘膜上皮細胞をすぐに TRIzol (Invitrogen, Leek, the Netherlands) に溶解し, -80°C で保存した。

RNA 抽出および cRNA 合成

採取した鼻粘膜上皮細胞より, miRNeasy Mini キット (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用いて total RNA を抽出した。この total RNA (100–500n) から, Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) により, ビオチンラベル化した cRNA を合成した。

マイクロアレイ解析

鼻粘膜上皮細胞より合成した cRNA を用いたマイクロアレイは, HumanRef-8 ver3 BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA) によって行い, アレイの蛍光強度を BeadsStation 500X 遺伝子発現解析システム (Illumina) により検出した。このチップは, 約 24,500 種類のアノテーション済み RefSeq (Build 36.2, Release 22) 転写産物をターゲットとするプローブが掲載されており, 網羅的に mRNA の発現量を調べることが可能となっている。

定量的 polymerase chain reaction (PCR)

cDNA 合成

鼻粘膜上皮細胞より抽出した total RNA から, Oligo(dT)₂₀ Primer (TOYOBO, Osaka, Japan), 5X RT Buffer, dNTP Mixture (10 mM, TOYOBO), ReverTra Ace (100 U/ μL , TOYOBO), RNase OUT (40 U/ μL , Invitrogen) を用いて, 逆転写反応を 42°C , 1 時間行った後, 65°C , 10 分間で酵素失活反応を行い cRNA 合成した。

定量的 PCR 反応

合成した cDNA を Nuclease-free Water により 40 倍に希釈して, 定量的 PCR に使用した。遺伝子の内在性コントロールには Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。qPCRTM Mastermix Plus QuickGoldStar (Eurogentec, Seraing, Belgium), 20 $\times$ GAPDH probe (Applied Biosystems), 20 $\times$ TaqMan expression probe (Applied Biosystems), cDNA からなる反応液を ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) にかけて定量的 PCR を行った。PCR 反応におけるプロトコールは, 95°C 10 分後 PCR による増幅サンプルが指数関数的に起こる領域で, 一定の増幅産物になるサイクル数 (Threshold Cycle; Ct) を検出した。各遺伝子発現量は GAPDH の発現量に対する比を $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法で算出した。

皮内反応テスト

スギ抗原に対する皮内反応テストは、2010年度スギ花粉飛散時期の対象者に施行した。前腕部に皮内反応検査用スギ抗原液 (Torii Pharmaceutical CO. LD, Tokyo, Japan) と対照液をそれぞれ 0.02 ml ずつ皮内に注入し、その 15 分～30 分後に判定を行い、スギ抗原注入部付近で皮膚の発赤径が 20 mm 以上又は、膨疹径が 9 mm 以上を陽性とした。

免疫組織染色

福井大学医学部附属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科において、手術時に採取された通年性アレルギー性鼻炎患者の下甲介粘膜で免疫組織化学的染色を行った。手術時に採取された下甲介粘膜は直ちにホルマリンで固定され、その後パラフィンにて固定されている。体を 4 μ m の厚さに切離し、Intelectin 1 に対するポリクローナル抗体 (R&D Systems, Minneapolis, US) と、ヒツジ IgG に対する 2 次抗体 (R&D) を使用した。

細胞培養

鼻粘膜上皮細胞初代培養細胞株は、通年性アレルギー性鼻炎患者から樹立した。RNA 用の鼻粘膜上皮細胞回収と同様に数回擦過し、すぐにペニシリン (100 unit/ml) とのストレプトマイシン (100 μ g/ml) を含む培養液 (Reagent Pack, Takara, Otu, Japan) に回収した。回収した鼻粘膜上皮細胞を 37°C, 5% CO₂ のインキュベーターにて培養した。培養した鼻粘膜上皮細胞に LPS (100 ng/ml) (invitrogen, Carlsbad, US), IFN- γ (20 ng/ml) (AbD Serotec, Oxford, UK), TNF- α (10 ng/ml) (Cell Signaling Technology, Beverly, US), ヒスタミン (1×10^{-4} M/ml) (Nakarai tesque, Kyoto, Japan), IL-4 (10 ng/ml) (R&D), IL-13 (10 ng/ml) (R&D), IL-33 (10 ng/ml) (R&D) を添加し、刺激後 15 時間後に細胞を回収し、RNA 抽出した。

統計解析

検定はノンパラメトリック法にて行った。網羅的遺伝子発現解析は、BeadStudio ソフトウェア (version 3.1, Illumina) を用い、検出した蛍光強度をシグナル値として出力した。シグナル値とともに出力される Detection p -value は検出結果の信頼性の指標であり、 $p < 0.01$ であればシグナル値の信頼性があるとされる。よってこれらの値を基に結果の信頼性について検討した。また、Detection p -value を基に Flag を付加し、 $p < 0.01$ を Present, $p > 0.05$ を Absent とした。Present と Absent の中間である $0.01 < \text{Detection } p\text{-value} < 0.05$ は Marginal とした。BeadStudio ソフトウェアにより出力された各サンプルのシグナル値より、バックグラウンドを引いた値の解析は、GeneSpring GX Software Version 10.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) によって行った。シグナルの最小値は 5 とし、それ以上の値をシグナル

値として採用した。チップ間のノーマライズは、シグナル値からバックグラウンドを引いた値の 75% タイルに合わせて補正する Median Shift 補正を行った。また Baseline 補正は Baseline to median of all samples により行った。スギ花粉症患者群とコントロール群の遺伝子発現量が 4 倍以上の増加あるいは減少があった遺伝子を抽出した。発現量の比較について Mann-Whitney 検定を行い、多重比較補正は Benjamini Hochberg false discovery rate (FDR) を行い、 $q\text{-value} < 0.05$ を統計学的な有意水準とした。

定量的 PCR の結果の統計解析では、Wilcoxon 検定 (有意水準 5%) を用いた。定量的 PCR と網羅的遺伝子発現解析の結果の相関は、mRNA 発現量の相対値と網羅的遺伝子発現解析によりノーマライズした各遺伝子の発現量について、Spearman 順位相関係数を用いて検証した。

結 果

遺伝子発現解析

2009 年度対象者に行ったマイクロアレイの結果ではスギ花粉症患者群とコントロール群との間で 4 倍以上有意な発現変化を認めた遺伝子は 18 遺伝子であった。そのうち 13 遺伝子はスギ花粉症患者群において、コントロール群と比較して有意に発現が上昇していた。

その中で遺伝子発現レベルが 10 倍以上の差を認めた 4 遺伝子の中に一つが Intelectin 1 であった。Intelectin 1 はコントロール群と比較して 17.6 倍発現が上昇していた。定量的 PCR の結果ではスギ花粉症患者群がコントロール群と比較して 20.4 倍有意に上昇していた (図 1a, $p < 0.0001$)。

2010 年度対象者の鼻粘膜上皮擦過細胞における Intelectin 1 の発現量を定量的 PCR にて行った。その結果、コントロール群と比較して感作陽性未発症者は 1.8 倍上昇していたが有意な変化は認めなかった。一方スギ花粉症群ではコントロール群と比較して 192.4 倍 ($p < 0.0001$) 上昇していた。また、スギ花粉症患者群は感作陽性未発症者と比べても有意に Intelectin 1 の発現は高い結果であった (図 1b, $p < 0.001$)。

2010 年度対象者においてスギ抗原に対する皮内反応で陽性と示した 24 名と陰性を呈した 22 名で Intelectin 1 の発現を比較すると、陽性者は陰性者より 146.1 倍 (図 2a, $p < 0.01$) 高かった。感作陽性未発症者で皮内反応陽性者 7 名と陰性者 6 名とでは有意な発現変化は認めなかった (図 2b)。

また、鼻汁好酸球陽性者 14 名と陰性者 33 名との比較では、陽性者が陰性者と比べ 61.4 倍 Intelectin 1 の発現が有意に高かった (図 3a, $p < 0.0001$)。また感作陽性未発症者の鼻汁好酸球陰性者 10 名と比較して、陽性者 4 名の Intelectin 1 の発現が 5.7 倍有意に高かった (図 3b, $p < 0.01$)。

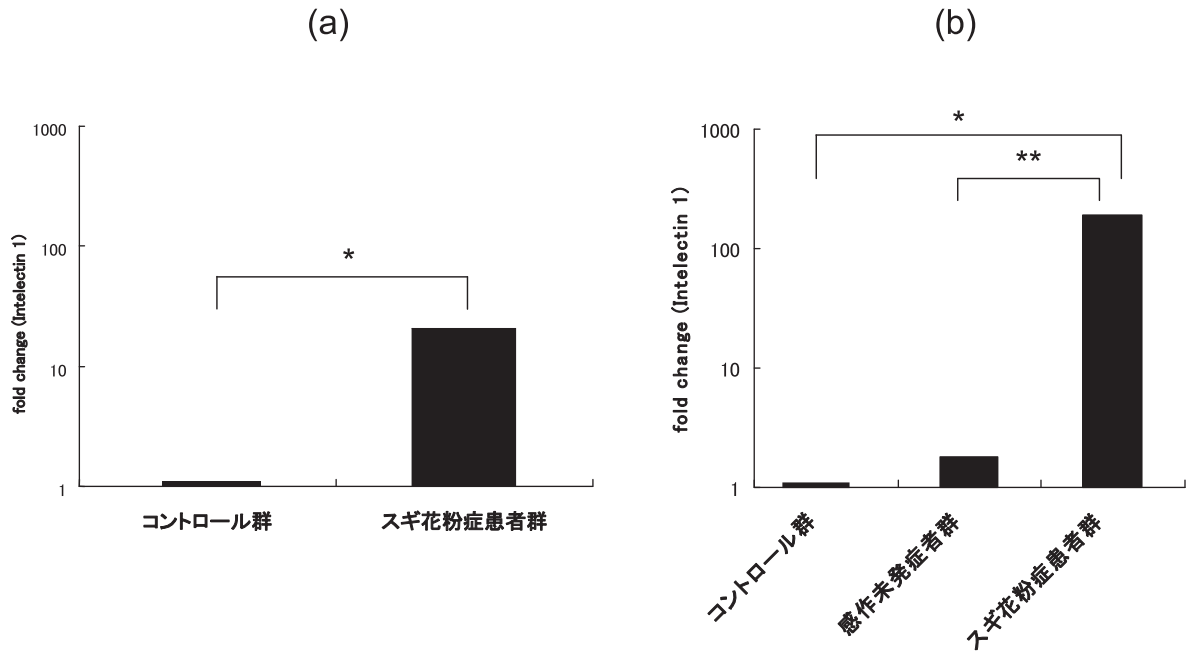


図1 (a) 2009年度 Intelectin 1 の発現量 (定量的 PCR)。コントロール群を基準としたスギ花粉症群の Intelectin 1 の発現量。* $p < 0.0001$ 。(b) 2010年度 Intelectin 1 の発現量 (定量的 PCR)。コントロール群を基準としたスギ花粉症群及び感作陽性未発症者群の Intelectin 1 の発現量。* $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$ 。

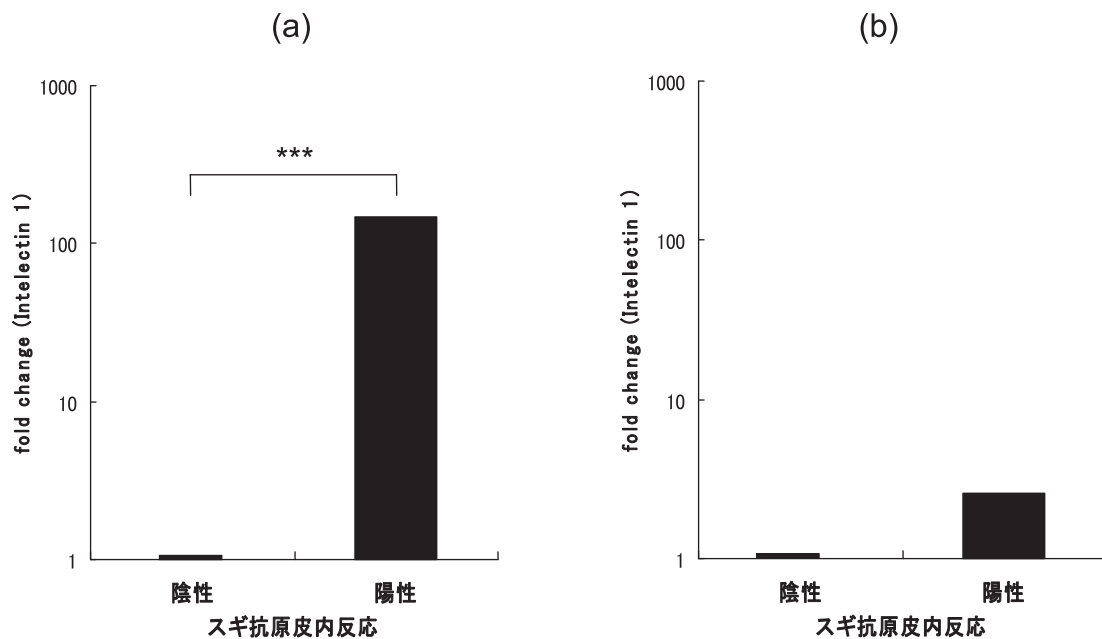


図2 2010年度 Intelectin 1 の発現量 (定量的 PCR)。(a) 2010年度すべての対象者においてスギ抗原皮内反応陰性者を基準とした皮内反応陽性者の Intelectin 1 の発現量。*** $p < 0.01$ 。(b) 感作陽性未発症者群におけるスギ抗原皮内反応陰性者を基準とした皮内反応陽性者の Intelectin 1 の発現量。

免疫染色

通年性アレルギー性鼻炎患者由来の鼻下甲介粘膜における免疫染色では, Intelectin 1 が鼻下甲介粘膜の上皮に局在していることが分かった。一方, 粘膜下組織は染色はされなかった (図4)。

細胞実験

鼻粘膜上皮細胞の採取直後は Intelectin 1 の発現は確認できたが, 初代培養した鼻粘膜上皮細胞では Intelectin 1 の発現が認められなかった。初代培養は鼻粘膜採取後平均 10 日間培養を行った後実験に用いた。そこで LPS, IFN- γ ,

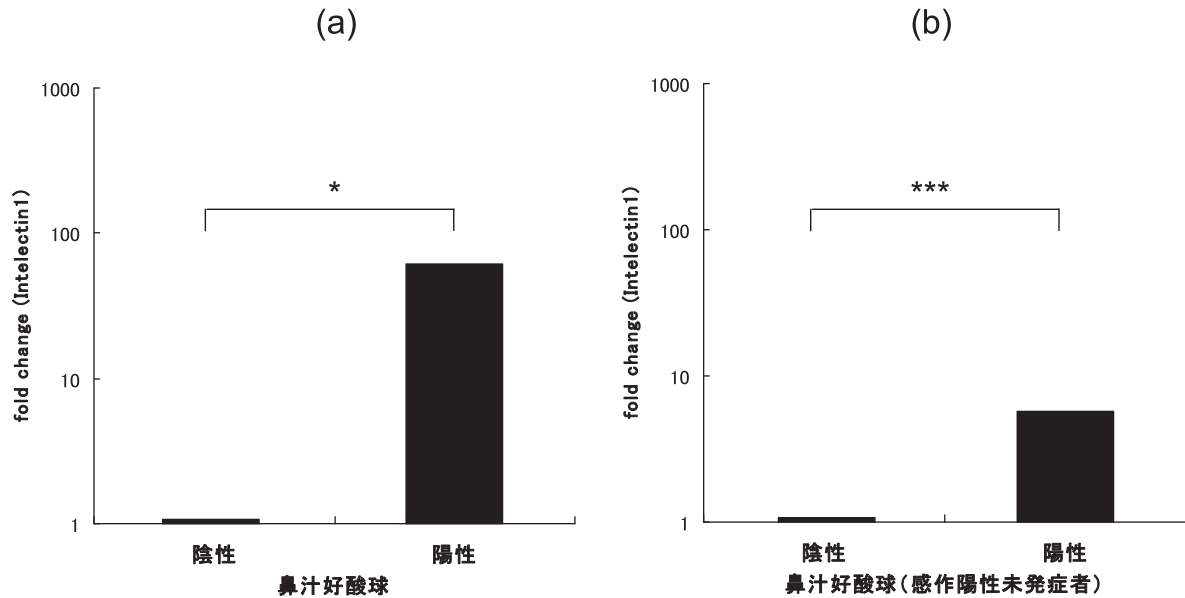


図3 2010年度 Intelectin 1 の発現量 (定量的 PCR)。(a) 鼻汁好酸球陰性者を基準とした鼻汁好酸球陽性者の Intelectin 1 の発現量。 $*p < 0.0001$ 。(b) 感作陽性未発症者群における鼻汁好酸球陰性者を基準とした鼻汁好酸球陽性者の Intelectin 1 の発現量。 $***p < 0.01$ 。

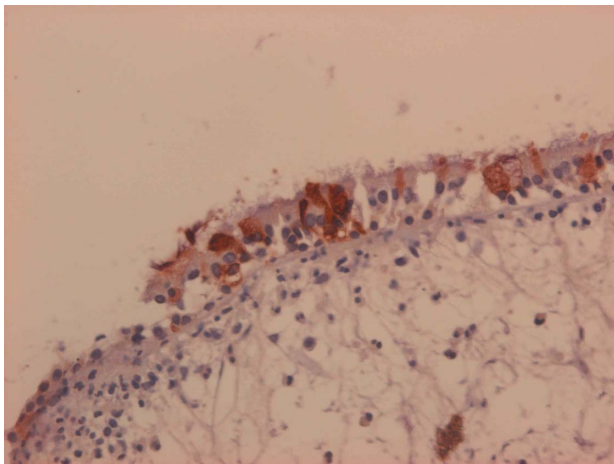


図4 Intelectin 1 免疫染色 (通年性アレルギー性鼻炎患者由来の下甲介粘膜)。Intelectin 1 は下甲介粘膜の上皮細胞に存在している。

TNF- α , ヒスタミン, IL-4, IL-13, IL-33 で 15 時間刺激をすると, IL-4 と IL-13 の刺激で Intelectin 1 の発現が認められた (図5)。

考 察

本研究ではスギ花粉症飛散時期に, スギ花粉症患者の鼻上皮細胞において多量の Intelectin 1 が発現していることが判明した。

Intelectin 1 は常染色体 1q.21.3 にコードされ, ヒトとマウスでは Intelectin 1 と Intelectin 2 の 2 つの Intelectin が同定されている。ヒトでは顎下腺, 小腸, 大腸, 胸腺でその発

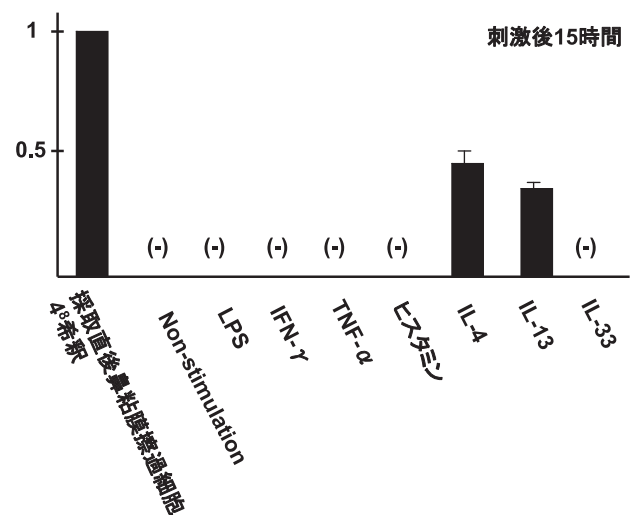


図5 初代培養鼻粘膜上皮細胞における Intelectin 1 の発現。IL-4 と IL-13 の刺激により Intelectin 1 の発現は誘導される。

現が確認されており, 分泌型の糖タンパクとして存在し, いくつかの機能を有している。Intelectin 1 は Omentin や小腸における Lactoferrin receptor と呼ばれ, 鉄の吸収やインスリン刺激による糖代謝や脂肪代謝に関連する⁵⁻⁷⁾。また Intelectin は arabinogalactan を認識し, 結合する^{5,8)}。arabinogalactan は細菌や真菌, 原虫に存在するが, ヒトでは存在しないため⁹⁻¹¹⁾, 細菌や真菌などに結合し, 生体の防御機構に関与していると考えられる。さらに腸管における鞭虫に対する免疫反応に関連するとも考えられている¹²⁻¹⁵⁾。腸管免疫防御機構において, 寄生虫排除が IgE を介することは有名なことである。IgE 産生に関しては, アレルギー性鼻炎も寄生虫感染もほとんど同じような機序が考え

られる。鼻上皮細胞において, Intelectin 1 の発現が IL-4 と IL-13 の Th2 サイトカインで亢進すること, マウスの気道上皮細胞でも Intelectin 1 が IL-13 により誘導されること, ヒト喘息患者での気管支上皮で Intelectin 1 の発現が上昇していること¹⁴⁻¹⁶⁾, そして Intelectin 1 の遺伝子多型と喘息との関連が報告されていること¹⁷⁾から, Intelectin はアレルギー性鼻炎において重要な分子である可能性が高いと思われる。

感作陽性未発症者の存在は, アレルギー性鼻炎発症予防の観点からもとても注目されている。我々は皮内反応テストと鼻汁好酸球の2つのアプローチにて Intelectin 1 が感作陽性未発症者の同定因子になりえないか検討した。その結果, 感作陽性未発症者内の皮内反応テスト陽性: 陰性では差を認めず, 鼻汁好酸球浸潤の有無の方が関連していた。しかしスギ花粉症患者では, Intelectin 1 の値も有意に高く, ちょうど感作陽性未発症者では約 1/3 程度なので, ある一定量の Intelectin 1 産生が好酸球浸潤, そして発症に関与するかもしれない。鼻汁好酸球はアレルギー性鼻炎の鼻粘膜の腫脹や鼻汁との関連や, アレルギー性鼻炎の診断との有意な相関を示す報告がある一方で^{18,19)}, そのパラメーターとしては臨床的には不適切であるとの報告がある²⁰⁾。鼻汁好酸球テストは, 手技的要素や採取の条件により, その感度が一定しないと考えられる。今回スギ花粉症患者群で鼻汁好酸球が陰性であった4名はこれらの要因に含まれるかもしれないが, Intelectin 1 と同時に測定すると, アレルギー性鼻炎の診断の感度をより明確にできるとも考えられる。気道上皮と好酸球, 及び Intelectin 1 の関連では, OVA 感作マウスで Intelectin 1 を抑制すると, 下気道に走化される好酸球の減少と, 下気道の炎症が抑制されたとの報告もある¹⁵⁾。鼻を含め気道上皮は細菌, 真菌, 花粉などの様々なアレルギーにさらされており, 生体はそれらに対する防御反応を有している。好酸球はアレルギーなどの刺激により放出されるサイトカインやケモカインで走化され, 上皮における炎症反応の主役として働く。スギ花粉に対する生体の反応として Intelectin 1 の発現が上昇し, それに伴い好酸球浸潤が起これ, 局所の炎症が増強するストーリーが考えられる。Intelectin 1 を標的とした新しいアレルギー治療を模索中である。

文 献

- 1) Sakashita M, Hirota T, et al. Prevalence of allergic rhinitis and sensitization to common aeroallergens in a Japanese population. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009; 151: 255-61.
- 2) Matsumoto Y, Noguchi E, et al. Upregulation of IL17RB during natural allergen exposure in patients with seasonal allergic rhinitis. *Allergol Int.* 2011; 60(1): 87-92.
- 3) Wang H, Mobini R, et al. Allergen challenge of peripheral blood mononuclear cells from patients with seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy.* 2010; 40(8): 1194-202.
- 4) Laprise C, Sladek R, et al. Functional classes of bronchial mucosa genes that are differentially expressed in asthma. *BMC Genomics.* 2004; 5(1): 21.
- 5) Tsuji S, Uehori J, et al. Human intelectin is a novel soluble lectin that recognizes galactofuranose in carbohydrate chains of bacterial cell wall. *J Biol Chem.* 2001; 276(26): 23456-63.
- 6) Tan BK, Pua S, et al. Decreased plasma omentin-1 levels in Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2008; 25(10): 1254-5.
- 7) Suzuki YA, Shin K, et al. Molecular cloning and functional expression of a human intestinal lactoferrin receptor. *Biochemistry.* 2001; 25; 40(51): 15771-9.
- 8) Tsuji S, Yamashita M, et al. Differential structure and activity between human and mouse intelectin-1: Human intelectin-1 is a disulfide-linked trimer, whereas mouse homologue is a monomer. *Glycobiology.* 2007; 17: 1045-51.
- 9) Pedersen LL, Turco SJ. Galactofuranose metabolism: A potential target for antimicrobial chemotherapy. *Cell Mol Life Sci.* 2003; 60: 259-66.
- 10) Abeygunawardana C, Bush CA, et al. Complete structure of the cell surface polysaccharide of *Streptococcus oralis* C104: A 600-MHz NMR study. *Biochemistry.* 1991; 30: 8568-77.
- 11) Leitao EA, Bittencourt VC, et al. Beta-galactofuranose-containing O-linked oligosaccharides present in the cell wall peptidogalactomannan of *Aspergillus fumigatus* contain immunodominant epitopes. *Glycobiology.* 2003; 13: 681-92.
- 12) Pemberton AD, Knight PA, et al. Proteomic analysis of mouse jejunal epithelium and its response to infection with the intestinal nematode, *Trichinella spiralis*. *Proteomics.* 2004; 4: 1101-8.
- 13) Datta R, deSchoolmeester ML, et al. Identification of novel genes in intestinal tissue which are regulated post infection with an intestinal nematode parasite. *Infect Immun.* 2005; 73: 4025-33.
- 14) Kuperman DA, Lewis CC, et al. Dissecting asthma using focused transgenic modeling and functional genomics. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 116: 305-11.
- 15) Gu N, Kang G, et al. Intelectin is required for IL-13-induced monocyte chemotactic protein-1 and -3 expression in lung epithelial cells and promotes allergic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010; 298(3): L290-6.
- 16) Zhen G, Park SW, et al. IL-13 and epidermal growth factor receptor have critical but distinct roles in epithelial cell mucin production. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007; 36(2): 244-53.
- 17) Pemberton AD, Rose-Zerilli MJ, et al. A single-nucleotide polymorphism in intelectin 1 is associated with increased asthma risk. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 122(5): 1033-4.
- 18) Malmberg H. Symptoms of chronic and allergic rhinitis and occurrence of nasal secretion granulocytes in university students, school children and infants. *Allergy.* 1979; 34: 389-94.
- 19) Zeiger RS, Heller S. development of nasal basophilic cells and nasal eosinophils from age 4 months through 4 years in children of atopic parents. *J Allergy Clin Immunol.* 1993; 91: 723-34.
- 20) Crobach MJ, Hermans J, et al. The diagnosis of allergic rhinitis: how to combine the medical history with the results of radioallergosorbent tests and skin prick tests. *Scand J Prim Health Care.* 1998; 16: 30-6.

Microarray analysis in nasal epithelial cells that are related with Japanese cedar pollinosis

Yoshimasa Imoto¹, Shigeharu Fujieda¹

¹Department of Otorhinolaryngology - Head & Neck Surgery, University of Fukui

ABSTRACT

Seasonal allergic rhinitis caused by Japanese cedar pollen (SAR-JC) is one of the most common allergic diseases in Japan. To identify the genes that related to SAR-JC, we collected nasal samples by brushing inferior turbinate before and during pollen season in 2009. RNA profiles of the samples were analyzed by microarray analysis with Illumina 500GX (Illumina). Subjects were SAR-JC patients (SAR group) and controls without any allergic symptoms/environmental allergens specific IgE (Control group).

We defined over four times fold change between SAR-JC group and Control group as a significant. Eighteen genes were found to be significantly up-regulated after the exposure of allergen. The expression Intelectin 1 exhibited 17.4 times in SAR-JC group compared to Control group. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) verified the same result. We also got the same result in 2010 samples from SAR-JC group. Immunohistochemical staining of inferior turbinate showed that Intelectin1 was expressed in nasal epithelial mucous cells from patient with perennial allergic rhinitis. The stimulation of IL-4 and IL-13 induced Intelectin 1 expression by human cultured nasal epithelial cells. These results indicated that Intelectin 1 might be the candidate gene related to onset of allergic rhinitis.

Key words: microarray, quantitative real-time PCR, nasal epithelial cell, seasonal allergic rhinitis, immunohistochemical staining