

Z00500149 A

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療研究事業

アトピー性疾患の疾患感受性遺伝子同定に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 有波 忠雄

平成18(2006)年 4月

目 次

I. 総括研究報告書	
アトピー性疾患の疾患感受性遺伝子同定に関する研究	1
有波 忠雄	
II. 分担研究報告書	
1. アトピー性皮膚炎および花粉症のゲノム DNA 検体収集.....	5
野口恵美子	
大塚 藤男	
玉利真由美	
柴崎 正修	
荒川 浩一	
鈴木 洋一	
2. 網羅的遺伝子発現解析によるアレルギー疾患関連遺伝子の同定.....	8
斎藤博久	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	10
IV. 研究成果の刊行物・別刷	12

厚生労働化学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

アトピー性疾患の疾患感受性遺伝子同定に関する研究

主任研究者 有波忠雄 筑波大学 大学院人間総合研究科
社会環境医学専攻遺伝医学分野 教授

研究要旨

アトピー性疾患は罹患者も多く、その病態の解明と治療法の開発は医療および経済的に急務の課題である。本研究では日本人のアトピー性皮膚炎と花粉症の患者家系および症例対照サンプルを用いて、全ゲノム網羅的解析により疾患感受性遺伝子を同定することを目的とする。アトピー性皮膚炎についてはSNPによる全ゲノム連鎖解析により日本人アトピー性皮膚炎家系において6番および8番染色体に連鎖領域を見いだした。また花粉症のゲノム解析についてはサンプル収集が進行中である。局所における網羅的遺伝子発現解析として花粉症（10人）および非花粉症者（7人）の下鼻甲介由来線維芽細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、花粉症患者において発現が増加・低下している遺伝子群を見いだした。

分担研究者

野口恵美子 筑波大学人間総合科学研究科
遺伝医学分野 講師
玉利真由美 理化学研究所アレルギー体質
関連遺伝子研究チーム チームリーダー
斎藤博久 国立成育医療センター研究所免
疫アレルギー研究部 部長
鈴木洋一 千葉大学大学院医学研究院環境
医学講座公衆衛生学 助教授
大塚藤男 筑波大学人間総合科学研究科皮
膚病態医学分野 教授
柴崎正修 筑波技術大学小児科 教授
荒川浩一 群馬大学小児生態防御学 教授
前仲勝実 九州大学生体防御医学研究所ワ
クチン開発構造生物学分野 助教授

アトピー性疾患は罹患者も多く、その病態の解明と治療法の開発は医療および経済的に急務の課題である。本研究では日本人のアトピー性皮膚炎と花粉症の患者家系および症例対照サンプルを用いて、全ゲノム網羅的解析により疾患感受性遺伝子を同定することを目的とする。

B. 研究方法

日本人アトピー性皮膚炎患者および花粉症家系および症例対照サンプルを用いてSNPによる全ゲノム連鎖解析を行い、続いて、連鎖領域のデンスマッピングをおこなない関連の認められたSNPsを検出する。関連が見られたSNPsについては独立したケースコントロールサンプルを用いて、結果を追認する。さらに疾患特異的な組織を

A. 研究目的

用いた網羅的発現解析を加え疾患発症のパスウェイを同定する。

C. 研究結果

アトピー性皮膚炎：イルミナタイピングシステムを使用して50家系83罹患同胞対192人の全ゲノム連鎖解析が終了し、6番および8番染色体に連鎖領域を見いだしている。今年度に新たに収集した家系を追加して計94家系127罹患同胞対324人の全ゲノム連鎖解析を現在行っており平成18年4月に終了可能である。当初の研究計画では連鎖解析の結果に基づいた連鎖領域の連鎖不平衡解析により遺伝子を絞り込む解析を平成17年度中に着手予定であったが、それは18年度にずれ込む見込みである。

花粉症：2002年に発表した花粉症の全ゲノム解析の連鎖領域（1p36.2, 4q13.3, 9q34.3）の連鎖領域を狭めることを目的としてマイクロサテライトマーカーによるデンスマッピングを行い、4q13.3領域については疾患感受性遺伝子を同定した（Zhang et al, J Allergy Clin Immunol, 2005）。1p36.2, 9q34.3についてはデンスマッピングをおこなったが、依然として多くの候補遺伝子が存在し、疾患感受性遺伝子の同定にいたるのは困難と判明した。そこで花粉症患者と非花粉症者のサンプルを使用する全ゲノム SNP 関連解析（10万 SNP）に一次解析を変更した。また局所における網羅的遺伝子発現解析として花粉症（10人）および非花粉症者（7人）の下鼻甲介由来線維芽細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、花粉症患者において発現が増加・低下している遺伝子群を見いだした。さらにアレルギー関連細胞（マスト細胞、好酸球、好塩基球）

の網羅的発現解析ではこれらの細胞に特異的な遺伝子 400 個を同定した。またマスト細胞の活性化における実験では IgE による Fcεレセプターの架橋により、発現が特異的に上昇するいくつかの遺伝子を同定した。

D. 考察

1) 達成度について

アトピー性皮膚炎については一番の目的であった SNP による全ゲノム連鎖解析は終了する見通しが立っている。しかし、当初の今年度中の目的であるデンスマッピングを行なうことは困難となっている。この理由として、家系サンプル採集が予想より遅れたことがあげられる。

花粉症については、網羅的遺伝子発現解析については当初の目的通り終了したが、SNP 解析については家系解析による疾患感受性遺伝子の同定が困難であることが実験遂行の過程で判明し、全ゲノム SNP 解析に一次解析を変更したため、当初の目的である一次解析の終了は平成18年5月にずれ込む予定である。

構造解析（前仲分担）については、ターゲットとなる遺伝子がいまだ同定されていないため、平成17年度内に開始することができなかった。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

過去に白人家系を用いたアトピー性皮膚炎の全ゲノム解析が3つ報告されている

（Lee et al, 2000, Cookson et al, 2001, Bradly et al, 2002）が、これらの連鎖領域は一致していない。本邦においてはアトピー性皮膚炎と候補遺伝子の症例対照研究が散見され

るのみで家系を用いた研究は申請者らの報告のみである。アジア人におけるアトピー性皮膚炎の全ゲノム解析は行われていないため、本研究の全ゲノム連鎖解析はアジア人初のものとなり、アジア人に頻度の高いアトピー性皮膚炎疾患感受性遺伝子が同定される可能性がある。

花粉症についてはスギ花粉症の特化した全ゲノム関連解析は行われておらず、複数の報告で追認されているものはない。本研究はアトピー性疾患遺伝研究について家系と症例対照研究を全遺伝子網羅的に行うことにより、日本人アトピー性疾患感受性遺伝子の同定を行い、またアトピー性喘息を含む3疾患の疾患感受性遺伝子の比較を行うことにより疾患特異的遺伝子およびアトピー素因に関連する遺伝子を同定するという点で独創的であると考えられる。

3) 今後の展望について

アトピー性皮膚炎：一番困難であると考えられる家系収集が当初の予定通り平成17年度に終了したため、平成18年度内の二次解析、さらに疾患感受性候補遺伝子同定は十分可能であると考えられる。

花粉症：研究体制を強化するために平成18年度から研究組織に福井大学の藤枝重治教授を加える。一次解析用のスギ花粉症患者100人の検体収集はすでに収集済みであり、またコントロール200人の10万SNP遺伝子型決定はすでに終了しているため、平成18年度の前半には一次解析終了が可能である。花粉症の網羅的遺伝子発現解析はすでに終了しているのでその結果を合わせて二次解析をおこない、疾患感受性遺伝子を同定する。

E. 結論

日本人アトピー性皮膚炎家系において6番および8番染色体に連鎖領域を見いだした。また花粉症局所における網羅的遺伝子発現解析として花粉症(10人)および非花粉症者(7人)の下鼻甲介由来線維芽細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、花粉症患者において発現が増加・低下している遺伝子群を見いだした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Zhang J, Noguchi E, Migita O, Yokouchi Y, Nakayama J, Shibasaki M, Arinami T (2005) Association of a haplotype block spanning SDAD1 gene and CXC chemokine genes with allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol 115:548-554
- Okumura S, Sagara H, Fukuda T, Saito H, Okayama Y (2005) FcεRI-mediated amphiregulin production by human mast cells increases mucin gene expression in epithelial cells. J Allergy Clin Immunol 115:272-279
- Saito H (2005) Much atopy about the skin: genome-wide molecular analysis of atopic eczema. Int Arch Allergy Immunol 137:319-325
- Saito H, Abe J, Matsumoto K (2005) Allergy-related genes in microarray: an update review. J Allergy Clin Immunol 116:56-59
- Cheng L, Hirota T, Enomoto T, Tamari M,

- Akahoshi M, Matsuda A, Shimizu M, Takahashi N, Enomoto K, Yamasaki A, Mao XQ, Hopkin JM, Shirakawa T (2006) Lack of association between the IL13 variant Arg110Gln and susceptibility to cedar pollinosis in a Japanese population. *Int Arch Allergy Immunol* 139:25-30
- Shimizu M, Matsuda A, Yanagisawa K, Hirota T, Akahoshi M, Inomata N, Ebe K, Tanaka K, Sugiura H, Nakashima K, Tamari M, Takahashi N, Obara K, Enomoto T, Okayama Y, Gao PS, Huang SK, Tominaga S, Ikezawa Z, Shirakawa T (2005) Functional SNPs in the distal promoter of the ST2 gene are associated with atopic dermatitis. *Hum Mol Genet* 14:2919-2927
 - Takahashi N, Akahoshi M, Matsuda A, Ebe K, Inomata N, Obara K, Hirota T, Nakashima K, Shimizu M, Tamari M, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nakashima H, Ikezawa Z, Shirakawa T (2005) Association of the IL12RB1 promoter polymorphisms with increased risk of atopic dermatitis and other allergic phenotypes. *Hum Mol Genet* 14:3149-3159
 - 野口恵美子 花粉症の遺伝的背景 臨床検査 vol.50, No.2 p139-144, 2006
 - 斎藤博久. 遺伝子チップを用いた臨床免疫研究の最前線：アレルギー疾患への応用 日本臨床免疫学会雑誌 2005;28(2):67-72.
 - 村松礼子、荒川浩一、小児アトピー性皮膚炎、アレルギー科、20:142-147.
2. 学会発表
- 野口恵美子：アレルギー疾患の遺伝、花粉症を中心に 花粉症研究シンポジウム（文部科学省・理化学研究所主催）平成18年1月17日 東京
 - 斎藤博久. マイクロアレイ法によるアレルギー疾患新規診断マーカーの探索 II シンポジウム「アレルギー疾患の新規診断マーカー」第52回日本臨床検査医学会総会
 - 前仲勝美：ヒト非古典的 MHC 分子 HLA-G の機能構造解析 日本蛋白質科学会年会 シンポジウム 福岡
 - 玉利真由美：第52回日本臨床検査医学会総会・第45回日本臨床化学会年会連合大会シンポジウム SNPによるアレルギー疾患の診断 2005年11月 福岡
 - 荒川浩一 新生児および1ヶ月時の皮膚バリア機能測定と乳児アトピー性皮膚炎発症の関連についての検討 日本小児科学会 2005年4月 東京
- H. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む）
なし

厚生労働化学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

アトピー性皮膚炎および花粉症のゲノム DNA 検体収集

分担研究者 野口恵美子 筑波大学 大学院人間総合研究科遺伝医学分野 講師
大塚藤男 筑波大学人間総合科学研究科皮膚病態医学分野 教授
玉利真由美 理化学研究所アレルギー体質関連遺伝子研究チーム
チームリーダー
柴崎 正修 筑波技術大学小児科 教授
荒川浩一 群馬大学小児生態防御学 教授
鈴木洋一 千葉大学大学院医学研究院環境医学講座公衆衛生学 助教授

研究要旨

アトピー性疾患は罹患者も多く、その病態の解明と治療法の開発は医療および経済的に急務の課題である。本研究では日本人のアトピー性皮膚炎と花粉症のゲノム解析に必要なサンプル収集を目的とした。アトピー性皮膚炎については現在までに一次解析の全ゲノム連鎖解析用の計 94 家系 127 罹患同胞対 324 人の家系収集が終了した。花粉症については全ゲノム関連解析（一次解析）100 人の臨床情報および DNA について取得した。二次解析用のアトピー性皮膚炎 600 人、花粉症 600 人と非アトピー性疾患コントロール 600 の DNA および臨床情報についても取得が完了した。

A. 研究目的

アトピー性疾患は罹患者も多く、その病態の解明と治療法の開発は医療および経済的に急務の課題である。本研究では日本人のアトピー性皮膚炎と花粉症のゲノム解析に必要なサンプル収集を目的とする。

た患者を対象とした。該当施設はその倫理審査機構における本研究の認可を受けており、倫理委員会の指針に基づいて患者の臨床情報および検体採取を行った。採取された検体は当該施設、または筑波大学遺伝医学において DNA が抽出され、研究遂行まで -20 度で保管した。

B. 研究方法

研究対象者は筑波大学皮膚科、筑波技術大学小児科、群馬大学小児科に通院中のアトピー性皮膚炎、花粉症患者、非アトピー性疾患コントロールで、口頭および文書によりインフォームドコンセントを取得し

C. 研究結果

アトピー性皮膚炎：現在までに一次解析の全ゲノム連鎖解析用の計 94 家系 127 罹患同胞対 324 人の家系収集が終了している。二次解析としてアトピー性皮膚炎 600 人と

非アトピー性疾患コントロール600のDNA、および臨床情報については取得済みである。

花粉症：全ゲノム関連解析（一次解析）100人の臨床情報およびDNAについては取得済みである。二次解析用の花粉症600人と非アトピー性疾患コントロール600人のDNAおよび臨床情報についても取得している。

D. 考察

4) 達成度について

DNAについては当初の目的通り収集を行うことができた。皮膚生検による遺伝子およびタンパク質発現解析用の検体採取については筑波大学倫理委員会の承認を得ており、患者様への検体提供協力について依頼を継続している。

5) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

過去に白人家系を用いたアトピー性皮膚炎の全ゲノム解析が3つ報告されている

(Lee et al, 2000, Cookson et al, 2001, Bradley et al, 2002) が、これらの連鎖領域は一致していない。本邦においてはアトピー性皮膚炎と候補遺伝子の症例対照研究が散見されるのみで家系を用いた研究は申請者らの報告のみである。アジア人におけるアトピー性皮膚炎の全ゲノム解析は行われていないため、本全ゲノム連鎖解析はアジア人初のものとなり、アジア人固有のアトピー性皮膚炎疾患感受性遺伝子が同定される可能性がある。

花粉症についてはスギ花粉症の特化した全ゲノム関連解析は行われておらず、複数

の報告で追認されているものはない。本研究はアトピー性疾患遺伝研究について家系と症例対照研究を全遺伝子網羅的に行うことにより、日本人アトピー性疾患感受性遺伝子の同定を行い、またアトピー性喘息を含む3疾患の疾患感受性遺伝子の比較を行うことにより疾患特異的遺伝子およびアトピー素因に関連する遺伝子を同定するという点で独創的であると考えられる。

E. 結論

アトピー性皮膚炎については一番困難であると考えられる家系収集が当初の予定通り平成17年度に終了した。

花粉症では研究体制を強化するために平成18年度から研究組織に福井大学の藤枝重治教授を加える。一次解析用のスギ花粉症患者100人の検体収集はすでに収集済みであり、またコントロール200人の10万SNP遺伝子型決定はすでに終了しているため、平成18年度の前半には一次解析終了が可能である。花粉症の網羅的遺伝子発現解析はすでに終了しているのでその結果を合わせて二次解析をおこない、疾患感受性遺伝子同定につとめる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Zhang J, Noguchi E, Migita O, Yokouchi Y, Nakayama J, Shibasaki M, Arinami T (2005) Association of a haplotype block spanning SDAD1 gene and CXC chemokine genes with allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol 115:548-554
- Cheng L, Hirota T, Enomoto T, Tamari M, Akahoshi M, Matsuda A, Shimizu M,

- Takahashi N, Enomoto K, Yamasaki A, Mao XQ, Hopkin JM, Shirakawa T (2006) Lack of association between the IL13 variant Arg110Gln and susceptibility to cedar pollinosis in a Japanese population. *Int Arch Allergy Immunol* 139:25-30
- Shimizu M, Matsuda A, Yanagisawa K, Hirota T, Akahoshi M, Inomata N, Ebe K, Tanaka K, Sugiura H, Nakashima K, Tamari M, Takahashi N, Obara K, Enomoto T, Okayama Y, Gao PS, Huang SK, Tominaga S, Ikezawa Z, Shirakawa T (2005) Functional SNPs in the distal promoter of the ST2 gene are associated with atopic dermatitis. *Hum Mol Genet* 14:2919-2927
 - Takahashi N, Akahoshi M, Matsuda A, Ebe K, Inomata N, Obara K, Hirota T, Nakashima K, Shimizu M, Tamari M, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nakashima H, Ikezawa Z, Shirakawa T (2005) Association of the IL12RB1 promoter polymorphisms with increased risk of atopic dermatitis and other allergic phenotypes. *Hum Mol Genet* 14:3149-3159
 - 野口恵美子 花粉症の遺伝的背景 臨床検査 vol.50, No.2 p139-144, 2006
 - 村松礼子、荒川浩一、小児アトピー性皮膚炎、アレルギー科、20:142-147.
2. 研究発表
- 玉利真由美：第52回日本臨床検査医学会総会・第45回日本臨床化学会年会連合大会シンポジウム SNPによるアレルギー疾患の診断 2005年11月 福岡
 - 荒川浩一 新生児および1ヶ月時の皮膚バリア機能測定と乳児アトピー性皮膚炎発症の関連についての検討 日本小児科学会 2005年4月 東京
 - 野口恵美子：アレルギー疾患の遺伝、花粉症を中心に 花粉症研究シンポジウム（文部科学省・理化学研究所主催）平成18年1月17日 東京
- H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
- なし

厚生労働化学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

網羅的遺伝子発現解析によるアレルギー疾患関連遺伝子の同定

分担研究者 斎藤博久 国立成育医療センター研究所免疫アレルギー研究部 部長

研究要旨

アトピー性疾患は罹患者も多く、その病態の解明と治療法の開発は医療および経済的に急務の課題である。本研究では網羅的遺伝子解析によりアトピー関連遺伝子を同定することを目的とした。網羅的遺伝子解析の結果、ステロイド非応答性で、IgEによるFcεレセプターの架橋刺激により発現の変化が認められる17遺伝子を同定した。

A. 研究目的

アトピー性疾患は罹患者も多く、その病態の解明と治療法の開発は医療および経済的に急務の課題である。本研究では網羅的遺伝子解析によりアトピー関連遺伝子を同定することを目的とする。

B. 研究方法

アレルギー炎症に重要な役割を果たしているマスト細胞を用いてIgEによるFcεレセプターの架橋刺激におけるアフィメトリクスU95AおよびU133Aアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを検討した。刺激特異的に変化が認められた遺伝子についてはELISA法により結果の確認をおこなった。

C. 研究結果

網羅的遺伝子解析の結果、ステロイド非応答性で、IgEによるFcεレセプターの架橋刺激により発現の変化が認められる17遺伝子を同定した。17遺伝子のうちのひとつであるAmphiregrinの刺激による上昇は

ELISA法においても確認され、またAmphiregrinの発現上昇は喘息患者のマスト細胞では認められたが、正常者では認められなかった。

D. 考察

報告者はアレルギー炎症に関わり、アレルギー疾患の疾患重症化に大きく関与するアレルギー炎症細胞、すなわちマスト細胞、好酸球、好塩基球にのみ特異的に発現している遺伝子・分子を網羅的遺伝子発現解析により同定している(Nakajima et al., JACI, 2004)。今回の成果はその結果をさらに発展させるものであり、これらの発現データと、患者遺伝子多型情報をあわせることにより本研究課題に貢献できると考える。

E. 結論

マスト細胞をにおけるFcεレセプターの架橋刺激により発現が変動する17遺伝子を同定した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Okumura S, Sagara H, Fukuda T, Saito H, Okayama Y (2005) FcεRI-mediated amphiregulin production by human mast cells increases mucin gene expression in epithelial cells. J Allergy Clin Immunol 115:272-279
- Saito H (2005) Much atopy about the skin: genome-wide molecular analysis of atopic eczema. Int Arch Allergy Immunol 137:319-325
- Saito H, Abe J, Matsumoto K (2005) Allergy-related genes in microarray: an update review. J Allergy Clin Immunol

116:56-59

- 斎藤博久. 遺伝子チップを用いた臨床免疫研究の最前線：アレルギー疾患への応用 日本臨床免疫学会雑誌 2005;28(2):67-72.

2. 学会発表

- 斎藤博久. マイクロアレイ法によるアレルギー疾患新規診断マーカーの探索 II シンポジウム「アレルギー疾患の新規診断マーカー」 第52回日本臨床検査医学会総会・第45回日本臨床生化学会年会 連合大会 福岡 (濱崎直孝)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Zhang J, <u>Noguchi E</u> , Migita O, Yokouchi Y, Nakayama J, Shibasaki M, <u>Arinami</u> <u>T</u>	Association of a haplotype block spanning SDAD1 gene and CXC chemokine genes with allergic rhinitis	J Allergy Clin Immunol	115	548-554	2005
Saito H	Much atopy about the skin: genome-wide molecular analysis of atopic eczema	Int Arch Allergy Imm	137	319-325	2005
Saito H, Abe J, Matsumoto K	Allergy-related genes in microarray: an update review	J Allergy Clin Immunol	116	56-59	2005
Okumura S, Sagara H, Fukuda T, Saito H, Okayama Y	FcepsilonRI-mediated amphiregulin production by human mast cells increases mucin gene expression in epithelial cells	J Allergy Clin Immunol	115	272-279	2005
Cheng L, , Hirota T, Enomoto T, <u>Tamari M</u> , Akahoshi M, Matsuda A, Shimizu M, Takahashi N, Enomoto K, Yamasaki A, Mao XQ, Hopkin JM, Shirakawa T	Lack of association between the IL13 variant Arg110Gln and susceptibility to cedar pollinosis in a Japanese population.	Int Arch Allergy Imm	139	25-30	2005

Shimizu M, Matsuda A, Yanagisawa K, Hirota T, Akahoshi M, Inomata N, Ebe K, Tanaka K, Sugiura H, Nakashima K, <u>Tamari M</u> , Takahashi N, Obara K, Enomoto T, Okayama Y, Gao PS, Huang SK, Tominaga S, Ikezawa Z, Shirakawa T	Functional SNPs in the distal promoter of the ST2 gene are associated with atopic dermatitis.	Hum Mol Genet	14	2919-2927	2005
Takahashi N, Akahoshi M, Matsuda A, Ebe K, Inomata N, Obara K, Hirota T, Nakashima K, Shimizu M, <u>Tamari M</u> , Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nakashima H, Ikezawa Z, Shirakawa T	Association of the IL12RB1 promoter polymorphisms with increased risk of atopic dermatitis and other allergic phenotypes	Hum Mol Genet	14	3149-3159	2005
野口恵美子	花粉症の遺伝的背景	臨床検査	50	139-144	2006
斎藤博久	遺伝子チップを用いた臨床免疫研究の最前線：アレルギー疾患への応用	日本臨床免疫学会雑誌	28	67-72	2005
村松礼子、 <u>荒川浩一</u>	小児アトピー性皮膚炎	アレルギー科	20	142-147	2005

Association of a haplotype block spanning *SDAD1* gene and *CXC* chemokine genes with allergic rhinitis

Jian Zhang, MD,^a Emiko Noguchi, MD, PhD,^{a,b} Ohsuke Migita, MD,^{a,b} Yukako Yokouchi, MD, PhD,^{a,b} Junko Nakayama, MD, PhD,^{a,b} Masanao Shibasaki, MD, PhD,^c and Tadao Arinami, MD, PhD^a Tsukuba City, Japan

Background: Seasonal allergic rhinitis (SAR) is a common allergic disorder characterized by episodes of sneezing, rhinorrhea, and swelling of the nasal mucosa. Although the pathogenesis of SAR remains unclear, there does appear to be a genetic predisposition to development of SAR. We previously identified regions of chromosomes 1p, 4q, and 9q linked to SAR in 48 families (188 members) identified through children with SAR against orchard grass pollens.

Objective: The aim of the current study was to identify susceptibility genes for SAR on 4q.

Methods: We screened for markers associated with SAR on 4q with 17 microsatellite markers and then for mutations in 11 genes. We genotyped 44 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 48 SAR families and performed haplotype-based haplotype relative risk statistics implemented in the UNPHASED program. We also examined expression of genes with human multiple tissue and immune system cDNA panels.

Results: We found that 1 microsatellite marker, *D4S3042*, was associated with SAR ($P = .034$). The haplotype-based haplotype relative risk approach revealed that SNPs in *SDA1* domain containing 1; chemokine, CXC motif, ligand (*CXCL*)-9; *CXCL10*; and *CXCL11* were associated with SAR ($P = .001-.04$). These SNPs made up a haplotype block, and the most common haplotype of this block was transmitted preferentially to affected offspring ($P = .002$).

Conclusion: Our results suggests that genetic variations in a haplotype block spanning the *SDA1* domain containing 1 and *CXC* chemokine genes on 4q21 may contribute to development of SAR in the Japanese population. (*J Allergy Clin Immunol* 2005;115:548-54.)

Key words: Seasonal allergic rhinitis, linkage, HHRR, CXC chemokine, *SDAD1*

From ^athe Department of Medical Genetics and ^bthe Department of Pediatrics, Majors of Medical Sciences, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba; and ^cthe Department of Pediatrics, Tsukuba College of Technology.

Supported by scientific research grants (12204001 and 12024201) from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan.

Received for publication September 8, 2004; revised November 11, 2004; accepted for publication November 12, 2004.

Available online January 31, 2005.

Reprint requests: Emiko Noguchi, MD, PhD, Department of Medical Genetics, Majors of Medical Sciences, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Laboratory of Advanced Research D, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8577, Japan. E-mail: enoguchi@md.tsukuba.ac.jp.

0091-6749/\$30.00

© 2005 American Academy of Allergy, Asthma and Immunology
doi:10.1016/j.jaci.2004.11.034

Abbreviations used

CXCL: Chemokine, CXC motif, ligand
HHRR: Haplotype-based haplotype relative risk
LD: Linkage disequilibrium
LOD: Logarithm of the odds
Mb: Megabase
OG: Orchard grass
SAR: Seasonal allergic rhinitis
SDAD1: *SDA1* domain containing 1
SNP: Single nucleotide polymorphism

Atopic diseases such as asthma, allergic rhinitis, and atopic eczema are major causes of morbidity in developed countries and have been increasing in frequency.^{1,2} The prevalence of rhinitis in various countries ranges from 3% to 19%.^{3,4} Allergic rhinitis is characterized by mucosal inflammation in response to allergen exposure and is a common disease of complex inheritance. Twin and family studies have confirmed the existence of a genetic predisposition to the development of allergic diseases,⁵⁻⁷ although a clear Mendelian pattern of inheritance has not been established. Several genome-wide screens for genes associated with allergic diseases have been conducted. Ten genome-wide screens for asthma,⁸⁻¹⁷ 3 for atopic dermatitis,¹⁸⁻²⁰ and 2 for allergic rhinitis^{21,22} have been reported. Haagerup et al²¹ performed a genome-wide screen of 33 Danish families with sibling pairs affected by rhinitis caused by common environmental allergens; they found 1 major candidate region on chromosome 4q24-q27 (logarithm of the odds [LOD] = 2.83) and 8 minor candidate regions on 2q12-q33, 3q13, 4p15-q12, 5q13-q15, 6p24-p23, 12p13, 22q13, and Xp21 (LOD = 1.04-1.63) that were associated with allergic rhinitis. In our genome-wide screen for seasonal allergic rhinitis (SAR) triggered by orchard grass (OG),²² we found evidence for linkage of marker *D4S392* at 4q13 to SAR (maximum LOD score = 2.01; $P = .001$), indicating that the chromosome 4q is one of the regions that contain susceptibility genes for SAR.

In the current study, we screened for mutations in 11 genes located in the 4q linkage region to identify genetic variations associated with SAR by haplotype-based haplotype relative risk (HHRR) statistics.

METHODS

Subjects

Probands of the allergic rhinitis families were children with allergic rhinitis who were recruited from 3 elementary schools and a junior high school in Matsukawa, a farming community in central Japan where OG pollens are thought to be a major cause of SAR. Children with rhinitis were identified by means of a questionnaire, and diagnosis was confirmed by physicians. Other family members were contacted, and a total of 48 families (188 individuals) who gave informed consent participated in this study. The diagnostic criteria for SAR induced by exposure to OG included hay fever or persistent nasal symptoms, associated itching of the eyes or nose, and/or watering or redness of the eyes; regular occurrence of any symptom only between April and June; and positive position prick test or radioallergosorbent test reactivity to OG antigen (Torii, Tokyo, Japan).²² OG-specific IgE levels and total serum IgE level were determined for all participants with the Pharmacia CAP system (Pfizer, New York, NY). To achieve homogeneity of the patients with SAR, only subjects with OG-specific IgE levels higher than 3.5 U_A/mL were included as affected subjects. Characteristics of the families with SAR are shown in Table I. This study was approved by the Committee of Ethics of the University of Tsukuba.

Microsatellite marker screening, single nucleotide polymorphism discovery, and genotyping

We genotyped 17 microsatellite markers between *D4S2638* and *D4S3042* spanning 18.8 megabase (Mb) to screen for association with SAR. The map location and distances between markers were obtained from the Marshfield Human Genetic Map (<http://marshmed.org/genetics/>). Because we observed a possible association of *D4S3042* with SAR, 11 genes around *D4S3042* and spanning 586 kb were selected for mutation screening. All exons, exon-intron junctions, and the 5'-flanking region of each gene were amplified by PCR from genomic DNAs isolated from 24 unrelated patients, and the products were subjected to direct sequencing with a Big-Dye Terminator Kit (Applied Biosystems, Foster City, Calif). Genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNPs) was performed by RFLP analysis, Taqman Assay-on-Demand SNP typing (Applied Biosystems), or direct sequencing.

PCR screening of multiple tissue cDNA panels

We used human multiple tissue and human immune system cDNA panels (BD Biosciences/Clontech, Palo Alto, Calif) to analyze expression of SDA1 domain containing 1 (*SDAD1*); chemokine, CXC motif, ligand (*CXCL9*); *CXCL10*; and *CXCL11* in various tissues by PCR. Primers were 5'-TGGCCCAAATGAGAAAA-GAA-3' and 5'-TCTTTTCAAAGTGCATCTCG-3' for *SDAD1*; 5'-TTTCTCTTTGGGCATCATC-3' and 5'-GCTTTTCTTTT-GGCTGACC-3' for *CXCL9*; 5'-ACCGTACGCTGTACCTGCAT-3' and 5'-GCTCCCTCTGGTTTAAGG-3' for *CXCL10*; and 5'-GCCTTGGCTGTGATATTGTG-3' and 5'-AGATGCCCTTTT-CCAGGACT-3' for *CXCL11*. Amplification conditions were an initial denaturation step at 94°C for 2 minutes followed by denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 60°C for 30 seconds, and extension at 72°C for 30 seconds. Samples were removed after a total of 26, 30, 34, and 38 cycles, and products were checked by electrophoresing in 2% agarose gel. Expected product sizes were 295 bp, 276 bp, 233 bp, and 299 bp for *SDAD1*, *CXCL9*, *CXCL10*, and *CXCL11*, respectively.

TABLE I. Characteristics of families with SAR*

Children (n)	123
Mean age (y)	14.1 ± 4.4
Sex ratio (M:F)	66:57
Log (total IgE [U _A /mL])	2.6 ± 0.55 (398.11)
Log (OG-RAST IgE [U _A /mL])	1.3 ± 0.54 (20.51)
Affected children (n)	104
Affected sibling pairs (n)	67

*Log (total IgE) and log (OG specific IgE) were means ± SDs. The values in parentheses were geometric means.

Statistical analysis

Deviation from predicted Hardy-Weinberg frequencies was examined by χ^2 test. Family-based association study by HHRR statistics was performed with the TDTPHASE command implemented in UNPHASED program version 2.43 (available at <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/~fdudbrid/software/unphased/>).²³ EM and dropare options were used. Linkage disequilibrium between polymorphisms and haplotype block structures was evaluated by Haploview software version 2.05 (available at <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/index.php>).²⁴ Haplotype blocks were generated by the default algorithm of Gabriel et al.²⁵

RESULTS

In our genome-wide screen, we reported that a region of 4q was linked to SAR triggered by OG with a maximum LOD score of 2.01 at *D4S392*.²² We genotyped 17 microsatellite markers between 4q12 (*D4S2638*) and 4q21 (*D4S3042*). HHRR analysis revealed that *D4S3042* is associated with SAR ($P = .034$ for global test).

We then screened for mutations in 11 genes around *D4S3042* that span approximately 583 kb (Fig 1). Forty-seven SNPs were identified and genotyped in DNAs from 48 unrelated patients to evaluate allele frequencies and linkage disequilibrium (LD). Forty-four SNPs with minor allele frequencies greater than 0.05 were genotyped in 188 members of 48 families with SAR. The LD map constructed from 25 SNPs with minor allele frequencies greater than 0.2 is shown in Fig 2. LD was divided into 3 blocks. *D4S3042* was located in block 1, spanning 81.7 kb. There are 4 genes in the LD region: *SDAD1*, *CXCL9*, *CXCL10*, and *CXCL11*.

Haplotype-based haplotype relative risk revealed that SNPs in *SDAD1*, *CXCL9*, *CXCL10*, and *CXCL11* were associated with SAR (Table II); however, none was a nonsynonymous polymorphism. Because these polymorphisms were in 1 LD block, we evaluated haplotype associations with SAR. Only 2 common haplotypes had frequencies greater than 0.1, and the most common haplotypes were transmitted preferentially to the affected offspring (Table III). Selected haplotype tag SNPs (rs271528C/T and rs3733239T/G in *SDAD1*) also showed this association.

Expression of *SDAD1*, *CXCL9*, *CXCL10*, and *CXCL11* in various tissues was analyzed by PCR-based methods (Fig 3). *CXCL9* was expressed strongly in tonsils, spleen, lymph nodes, and thymus. *CXCL10* was expressed in

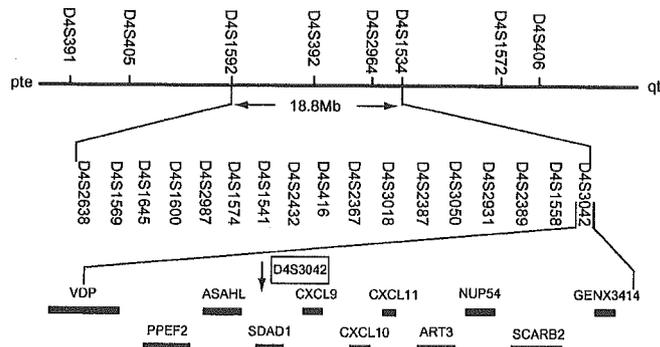


FIG 1. Genetic map of linkage region for SAR on chromosome 4q. *Top*, Microsatellite markers used in linkage study. *Middle*, Microsatellite markers used for dense mapping around *D4S392*, in which a maximum LOD score of 2.01 for SAR was observed in our genome-wide screen. *pte*, Petit telomere; *qte*, queue telomere. *Bottom*, location of genes around *D4S3042*. Arrow indicates location of *D4S3042*. *VDP*, Vesicle docking protein p 115; *PPEF2*, protein phosphatase, EF hand calcium-binding domain 2; *ASAHL*, N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase)-like; *ART*, ADP-ribosyltransferase 3; *NUP54*, nucleoporin 54kDa; *SCARB2*, scavenger receptor class B, member 2; *GENX-3414*, genethonin 1.

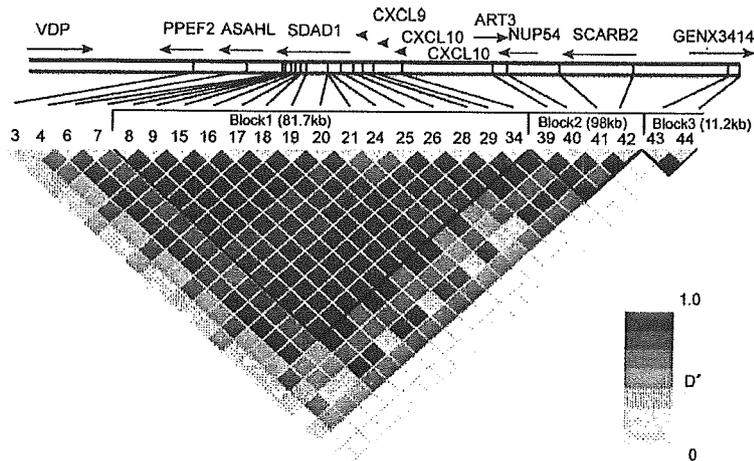


FIG 2. Pairwise linkage disequilibrium between polymorphisms in a 538-kb region as measured by D' in 188 subjects. LD is divided into 3 blocks. *D4S3042* is located in block 1. The D' values for LD are color-coded, and the extent of red indicates the strength of LD.

various organs and immune cells, including placenta, lung, liver, kidney, pancreas, spleen, lymph nodes, and thymus (Fig 3, *A and B*). In the blood fraction panel, *CXCL9* and *CXCL10* were expressed at higher levels in activated cells than in resting cells (Fig 3, *C*). *CXCL11* expression was observed in pancreas, spleen, and lymph nodes, but expression was very low in samples of the blood fraction panel. The expression level of *SDADI* was very low. It was not observed in samples after 34 cycles of amplification, but it was detected in most of the tissues examined after 38 cycles of amplification (Fig 3, *A-C*).

DISCUSSION

Our data showed that haplotypes of the *SDADI*, *CXCL9*, *CXCL10*, and *CXCL11* genes, which are located

consecutively on chromosome 4q21, were associated with OG-specific SAR. LD is a nonrandom association between alleles at different loci, and it creates opportunities as well as difficulties in gene mapping. In our LD analysis with SNPs, 1 LD block was a 81.7-kb region where polymorphisms in 4 genes showed associations with SAR. These genes are in strong LD with each other, making it difficult to determine which SNP in which gene is associated with susceptibility to SAR. To our knowledge, the current study is the first to show an association between genetic variations in *CXCL9*, *CXCL10*, and *CXCL11* and an allergic disease; *CXCL9*, *CXCL10*, and *CXCL11* are likely to contribute to susceptibility to SAR.

Chemokine, CXC motif, ligand 9 (also called MIG [monokine induced by IFN- γ]); *CXCL10* (also called IP-10 [IFN- γ -inducible protein of 10 kDa]); and *CXCL11* (also called IP-9/I-TAC [IFN- γ -inducible

Rhinitis, sinusitis, and ocular diseases

TABLE II. Results of HHRR in SAR families on chromosome 4q21

Gene	SNPs*	Location(NCBI Build 34)	Major allele	T/NT†	Minor allele	Minor allele frequency	P value
VDP	1 rs3853184	77128575	C	118/120	T	0.024	.47
	2 rs905954	77194606	T	105/102	C	0.122	.56
PPEF2	3 rs2280100	77267964	C	67/69	T	0.495	.80
ASAH1	4 rs3733233	77305546	T	71/65	A	0.446	.42
SDAD1	5 rs11732759	77314835	T	109/111	C	0.086	.58
	6 rs3796482	77330701	A	62/74	G	0.463	.13
	7 rs3796483	77331079	T	68/72	C	0.43	.61
	8 rs3796484	77332909	A	75/58	T	0.423	.03
	9 rs2242470	77337083	C	75/58	T	0.423	.03
	10 rs2242471	77337111	C	114/115	G	0.077	.78
	11 rs2242742	77337122	C	113/112	G	0.048	.82
	12 IVS18+44C/T	77337325	C	114/115	T	0.074	.78
	13 rs2242473	77337351	A	114/115	G	0.074	.78
	14 1415C/A	77339749	C	106/108	A	0.165	.69
	15 IVS16-47A/G	77339787	G	61/78	A	0.455	.03
	16 rs4859577	77339796	A	75/56	G	0.423	.01
	17 rs1857821	77340374	T	75/58	C	0.423	.03
	18 rs2271527	77343818	A	61/78	G	0.455	.03
19 rs2271528	77347231	C	77/56	T	0.426	.007	
20 rs3733238	77361134	T	77/56	C	0.426	.006	
21 rs3733239	77361170	T	56/73	G	0.452	.03	
22 rs3733240	77361370	A	120/107	G	0.048	.001	
23 rs10008757	77361431	C	115/116	T	0.079	.79	
24 rs10021434	77361690	C	44/65	G	0.421	.006	
25 rs6838162	77370623	C	58/72	G	0.484	.07	
CXCL9	26 rs2869460	77380209	T	60/44	C	0.447	.04
	27 rs10336	77381383	G	114/115	A	0.08	.78
	28 rs2276886	77386823	C	75/56	T	0.423	.014
CXCL10	29 rs2869462	77393114	C	75/58	G	0.432	.03
	30 rs4859588	77402072	A	114/115	G	0.08	.78
CXCL11	31 rs4241578	77402886	C	115/116	T	0.079	.79
	32 rs13130221	77414018	A	115/116	G	0.079	.79
	33 rs6532111	77414309	T	115/116	C	0.079	.79
	34 rs12649185	77414574	G	75/58	G	0.423	.03
	35 rs4241580	77414583	C	115/116	T	0.079	.79
	36 rs4859415	77414923	A	115/116	G	0.079	.79
	37 IVS1+25T/C	77415572	T	115/116	C	0.079	.79
ART3	38 rs10017484	77443331	T	107/109	G	0.152	.68
	39 rs6829592	77477967	A	56/66	G	0.481	.18
NUP54	40 HCV158575	77487361	G	76/69	A	0.414	.36
SCARB2	41 HCV7919722	77522909	T	94/103	C	0.239	.14
	42 rs999361	77575969	G	66/53	A	0.487	.09
GENX3414	43 rs736634	77648664	T	58/74	C	0.457	.03
	44 rs1036788	77659882	T	75/66	C	0.417	.23

*Name of SNPs are according to reference SNP numbers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), Celera discovery system (<http://www.celeradiscovery.com/>), or gene nomenclature systems.

†Number of transmitted/nontransmitted alleles.

T cell α -chemoattractant]) are IFN- γ -inducible chemokines that preferentially attract T_H1 lymphocytes through the CXC chemokine receptor, which is a G protein-coupled receptor expressed at high levels on T_H1 lymphocytes.²⁶⁻²⁹ Although these chemokines activate the same receptor and are functionally and structurally related, CXCL9 and CXCL10 differ in their patterns of expression in response to inducers such as *Plasmodium yoelii*, *Toxoplasma gondii*, and vaccinia virus, suggesting specific roles *in vivo*.³⁰ In human inflammatory skin diseases, CXCL10 and CXCL11 were expressed mainly by basal keratinocytes, whereas CXCL9 mRNA was expressed

predominantly in dermal infiltrates.³¹ Monoclonal antibody neutralization revealed that CXCL10 is required for survival of mice after infection with *Toxoplasma gondii* and can not be compensated for by other CXCR3 ligands.³² These data support the idea that these chemokines have different functional roles.

Allergic rhinitis is considered a T_H2-type disease like asthma or atopic dermatitis. The proportion of IL-4-producing lymphocytes increases significantly at the peak of the birch pollen season in comparison with the proportion outside the pollen season in patients with allergic rhinitis, whereas this trend is not observed in nonallergic

TABLE III. Haplotype association*

Haplotype	Freq	T	Freq-T	NT	Freq-NT	OR	χ^2	Individual	Global
ACAATGCTGGGTCCG	0.397	54	0.5	32	0.2963	4.125	9.432	0.002132	0.02
TTGGCATCTCCCTGA	0.389	35	0.3241	48	0.4444	1.782	3.317	0.06856	
ACGATACTGCCCCG	0.078	10	0.0926	6	0.05556	4.074	1.091	0.2963	
Haplotype tag SNP (rs2271528C/T-rs3733239T/G) (<i>SDAD1</i>)									
----C-G----	0.4438	60.99	0.5258	41.97	0.3618	1	6.353	0.01172	0.007
----T-T----	0.4265	39.99	0.3447	58.97	0.5083	0.467	6.384	0.01152	
----C-T----	0.1123	14.01	0.1121	12.03	0.1124	0.686	0.17	0.6802	

Freq, Frequency of haplotypes; freq-T(NT), frequency of transmitted (nontransmitted) haplotypes; T (NT), number of transmitted (nontransmitted) haplotypes; OR, odds ratio.

*The order of the SNPs in haplotype is as follows: rs3796484, rs224270, IVS16-47A/G, rs4859577, rs1857821, rs2271527, rs2271528, rs3733238, rs3733239, rs10021434, rs6838162 (*SDAD1*)/rs2869460, rs2276886 (*CXCL9*)/rs2869462 (*CXCL10*)/rs12649185 (*CXCL11*).

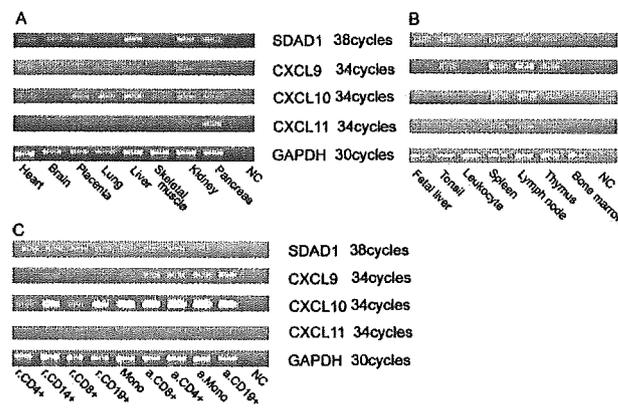


FIG 3. Expression of *SDAD1*, *CXCL9*, *CXCL10*, and *CXCL11* in human multiple tissue panels. PCR amplifications of cDNA from (A) body organs, (B) immune system, and (C) blood fractions are shown. *G3PDH* was used as internal control. a, Activated; *GADPH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; mono, monocyte; NC, nontemplate control; r, resting.

controls.³³ *CXCL9*, *CXCL10*, and *CXCL11* are T_H1 -type chemokines induced by IFN- γ stimulation and are expressed in various T_H1 -type diseases such as psoriasis³⁴ and multiple sclerosis.³⁵ There are conflicting data suggesting that T_H1 inflammation can both augment^{36,37} and attenuate^{38,39} allergic inflammation.

Expression of *CXCL9*, *CXCL10*, and *CXCL11* increases during the inflammatory phase of allergic contact dermatitis.⁴⁰ On the contrary, *CXCL9* levels in the plasma of subjects with allergy decrease from the pre-season to the grass pollen season.⁴¹ Airway neutralization of *CXCL9* at the time of allergen challenge significantly increases airway hyperreactivity, airway eosinophil accumulation, and IL-4 levels in bronchoalveolar lavage fluid and significantly decreases airway levels of IL-12. In contrast, introduction of exogenous *CXCL9* into the airway at the time of allergen challenge dramatically reduces airway hyperreactivity and eosinophil accumulation.⁴² *CXCL9* is expressed at high levels in vernal keratoconjunctivitis.⁴³

The increased level of *CXCL10* in the plasma of patients with atopic dermatitis could be associated with increased activity of skin fibroblasts.⁴⁴ Production of *CXCL10* is increased in allergic pulmonary inflammation

in a mouse model of asthma.⁴⁵ Keratinocytes contribute to the vigorous immigration by sequential expression of monocyte chemoattractant protein 1, RANTES, and *CXCL10* induced by *CXCL9*, indicating that differential and sequential expression of multiple chemokines occurs during allergic contact hypersensitivity.⁴⁶ *CXCL10* and *CXCL9* are expressed in allergic patch test reactions.⁴⁷

Compared with the *CXCLs*, less is known about the function of *SDAD1*. *SDAD1* was initially identified in fetal liver at 22 weeks of gestation.⁴⁸ Relatively constant expression of *SDAD1* is observed in organs and immune systems; however, the expression levels are weaker than those of *CXCLs*. However, in the current study, the strongest genetic association with SAR was observed in SNPs in *SDAD1*. Therefore, the relation between the function of *SDAD1* and allergic diseases warrants further study.

We screened 17 microsatellite markers in the region spanning 18.8 Mb from 4q12 to 4q21 for association with SAR. We used all of the microsatellite markers listed in the Marshfield database for this region, and the distances between markers ranged from 17 kb to 3.2 Mb. Therefore, it is possible that genetic variations in regions of 4q12-q21 other than the *D4S3042* region examined in the current study are associated with SAR.

In conclusion, our data showed that genes in the haplotype block containing *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*, and *SDADI* may be associated with SAR. Although the exact relations between *CXCLs* and *SDADI* and SAR remain to be elucidated, our data may contribute to a better understanding of the pathophysiology underlying allergic rhinitis.

We thank Mrs Shirota, who helped collect samples, and all family members who participated in this study.

REFERENCES

- Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet* 1998;351:1225-32.
- Gergen PJ, Weiss KB. The increasing problem of asthma in the United States. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:823-4.
- Nakamura A, Asai T, Yoshida K, Baba K, Nakae K. [Allergic rhinitis epidemiology in Japan]. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 2002;105:215-24.
- Skoner DP. Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:S2-8.
- Genes for asthma? an analysis of the European Community Respiratory Health Survey. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1773-80.
- Hopp RJ, Bewtra AK, Watt GD, Nair NM, Townley RG. Genetic analysis of allergic disease in twins. *J Allergy Clin Immunol* 1984;73:265-70.
- Hopper JL, Hannah MC, Macaskill GT, Mathews JD. Twin concordance for a binary trait, III: a bivariate analysis of hay fever and asthma. *Genet Epidemiol* 1990;7:277-89.
- A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). *Nat Genet* 1997;15:389-92.
- Daniels SE, Bhattacharyya S, James A, Leaves NI, Young A, Hill MR, et al. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature* 1996;383:247-50.
- Dizier MH, Besse-Schmittler C, Guilloud-Bataille M, Annesi-Maesano I, Boussaha M, Bousquet J, et al. Genome screen for asthma and related phenotypes in the French EGEA study. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1812-8.
- Haagerup A, Bjerke T, Schiøtz PO, Binderup HG, Dahl R, Kruse TA. Asthma and atopy—a total genome scan for susceptibility genes. *Allergy* 2002;57:680-6.
- Laitinen T, Daly MJ, Rioux JD, Kauppi P, Laitinen C, Petays T, et al. A susceptibility locus for asthma-related traits on chromosome 7 revealed by genome-wide scan in a founder population. *Nat Genet* 2001;28:87-91.
- Ober C, Tsalenko A, Parry R, Cox NJ. A second-generation genomewide screen for asthma-susceptibility alleles in a founder population. *Am J Hum Genet* 2000;67:1154-62.
- Wjst M, Fischer G, Immervoll T, Jung M, Saar K, Rueschendorf F, et al. A genome-wide search for linkage to asthma. German Asthma Genetics Group. *Genomics* 1999;58:1-8.
- Xu J, Meyers DA, Ober C, Blumenthal MN, Mellen B, Barnes KC, et al. Genomewide screen and identification of gene-gene interactions for asthma-susceptibility loci in three U.S. populations: collaborative study on the genetics of asthma. *Am J Hum Genet* 2001;68:1437-46.
- Yokouchi Y, Nukaga Y, Shibasaki M, Noguchi E, Kimura K, Ito S, et al. Significant evidence for linkage of mite-sensitive childhood asthma to chromosome 5q31-q33 near the interleukin 12 B locus by a genome-wide search in Japanese families. *Genomics* 2000;66:152-60.
- Hakonarson H, Bjornsdottir US, Halapi E, Palsson S, Adalsteinsdottir E, Gislason D, et al. A major susceptibility gene for asthma maps to chromosome 14q24. *Am J Hum Genet* 2002;71:483-91.
- Bradley M, Soderhall C, Luthman H, Wahlgren CF, Kockum I, Nordenskjold M. Susceptibility loci for atopic dermatitis on chromosomes 3, 13, 15, 17 and 18 in a Swedish population. *Hum Mol Genet* 2002;11:1539-48.
- Cookson WO, Ubhi B, Lawrence R, Abecasis GR, Walley AJ, Cox HE, et al. Genetic linkage of childhood atopic dermatitis to psoriasis susceptibility loci. *Nat Genet* 2001;27:372-3.
- Lee YA, Wahn U, Kehrt R, Tarani L, Businco L, Gustafsson D, et al. A major susceptibility locus for atopic dermatitis maps to chromosome 3q21. *Nat Genet* 2000;26:470-3.
- Haagerup A, Bjerke T, Schiøtz PO, Binderup HG, Dahl R, Kruse TA. Allergic rhinitis—a total genome-scan for susceptibility genes suggests a locus on chromosome 4q24-q27. *Eur J Hum Genet* 2001;9:945-52.
- Yokouchi Y, Shibasaki M, Noguchi E, Nakayama J, Ohtsuki T, Kamioka M, et al. A genome-wide linkage analysis of orchard grass-sensitive childhood seasonal allergic rhinitis in Japanese families. *Genes Immun* 2002;3:9-13.
- Dudbridge F. Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol* 2003;25:115-21.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. Epub 2004 Aug 5.
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002;296:2225-9.
- Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 1998;187:129-34.
- Siveke JT, Hamann A. T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *J Immunol* 1998;160:550-4.
- Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, et al. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* 1996;184:963-9.
- Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 1998;187:875-83.
- Amichay D, Gazzinelli RT, Karupiah G, Moench TR, Sher A, Farber JM. Genes for chemokines MuMig and Crg-2 are induced in protozoan and viral infections in response to IFN-gamma with patterns of tissue expression that suggest nonredundant roles in vivo. *J Immunol* 1996;157:4511-20.
- Flier J, Boersma DM, van Beek PJ, Nieboer C, Stoof TJ, Willemze R, et al. Differential expression of CXCR3 targeting chemokines CXCL10, CXCL9, and CXCL11 in different types of skin inflammation. *J Pathol* 2001;194:398-405.
- Khan IA, MacLean JA, Lee FS, Casciotti L, DeHaan E, Schwartzman JD, et al. IP-10 is critical for effector T cell trafficking and host survival in *Toxoplasma gondii* infection. *Immunity* 2000;12:483-94.
- Wosinska-Becler K, Plewako H, Hakansson L, Rak S. Cytokine production in peripheral blood cells during and outside the pollen season in birch-allergic patients and non-allergic controls. *Clin Exp Allergy* 2004;34:123-30.
- Giustizieri ML, Mascia F, Frezzolini A, De Pita O, Chinni LM, Giannetti A, et al. Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:871-7.
- Sorensen TL, Trebst C, Kivisakk P, Klaege KL, Majumdar A, Ravid R, et al. Multiple sclerosis: a study of CXCL10 and CXCR3 co-localization in the inflamed central nervous system. *J Neuroimmunol* 2002;127:59-68.
- Lack G, Bradley KL, Hamelmann E, Renz H, Loader J, Leung DY, et al. Nebulized IFN-gamma inhibits the development of secondary allergic responses in mice. *J Immunol* 1996;157:1432-9.
- Cohn L, Homer RJ, Niu N, Bottomly K. T helper 1 cells and interferon gamma regulate allergic airway inflammation and mucus production. *J Exp Med* 1999;190:1309-18.
- Li L, Xia Y, Nguyen A, Feng L, Lo D. Th2-induced eotaxin expression and eosinophilia coexist with Th1 responses at the effector stage of lung inflammation. *J Immunol* 1998;161:3128-35.
- Hansen G, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest* 1999;103:175-83.
- Moed H, Boersma DM, Tensen CP, Flier J, Jonker MJ, Stoof TJ, et al. Increased CCL27-CCR10 expression in allergic contact dermatitis: implications for local skin memory. *J Pathol* 2004;204:39-46.

41. Campbell JD, Stinson MJ, Simons FE, HayGlass KT. Systemic chemokine and chemokine receptor responses are divergent in allergic versus non-allergic humans. *Int Immunol* 2002;14:1255-62.
42. Thomas MS, Kunkel SL, Lukacs NW. Regulation of cockroach antigen-induced allergic airway hyperreactivity by the CXCR3 ligand CXCL9. *J Immunol* 2004;173:615-23.
43. Abu El-Asrar AM, Struyf S, Al-Kharashi SA, Missotten L, Van Damme J, Geboes K. The T-lymphocyte chemoattractant Mig is highly expressed in vernal keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 2003;136:853-60.
44. Villagomez MT, Bae SJ, Ogawa I, Takenaka M, Katayama I. Tumour necrosis factor-alpha but not interferon-gamma is the main inducer of inducible protein-10 in skin fibroblasts from patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2004;150:910-6.
45. Medoff BD, Sauty A, Tager AM, Maclean JA, Smith RN, Mathew A, et al. IFN-gamma-inducible protein 10 (CXCL10) contributes to airway hyperreactivity and airway inflammation in a mouse model of asthma. *J Immunol* 2002;168:5278-86.
46. Goebeler M, Trautmann A, Voss A, Brocker EV, Toksoy A, Gillitzer R. Differential and sequential expression of multiple chemokines during elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Am J Pathol* 2001;158:431-40.
47. Flier J, Boorsma DM, Bruynzeel DP, Van Beek PJ, Stoof TJ, Scheper RJ, et al. The CXCR3 activating chemokines IP-10, Mig, and IP-9 are expressed in allergic but not in irritant patch test reactions. *J Invest Dermatol* 1999;113:574-8.
48. Yu Y, Zhang C, Zhou G, Wu S, Qu X, Wei H, et al. Gene expression profiling in human fetal liver and identification of tissue- and developmental-stage-specific genes through compiled expression profiles and efficient cloning of full-length cDNAs. *Genome Res* 2001;11:1392-403.