

2004-00218B

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

副作用発現回避を目的とした代謝物発現プロファイル  
及び薬剤反応性遺伝子の解析

平成14年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者 平塚 真弘

平成17 (2005) 年 4 月

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

副作用発現回避を目的とした代謝物発現プロファイル  
及び薬剤反応性遺伝子の解析

平成14年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者 平塚 真弘

平成17 (2005) 年 4 月

## 目 次

I. 総合研究報告		
副作用発現回避を目的とした代謝物発現プロファイル及び 薬剤反応性遺伝子の解析		
平塚 真弘	-----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	10
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	11

副作用発現回避を目的とした代謝物発現プロファイル及び薬剤反応性遺伝子の解析

主任研究者 平塚 真弘 東北薬科大学講師

研究要旨

本研究は、薬剤反応性遺伝子の一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism; SNP)が代謝物発現プロファイルや副作用発現にどのように影響するかを解析し、トキシコゲノミクス及びトキシコメタボロミクスの情報をより効果的かつ安全な薬物療法に利用するために立案した。3年間に渡る検討の結果、薬物動態予測のモデル薬物として使用した抗血小板薬シロスタゾールの体内動態には著しい個人差が存在することが明らかになった。また、少なくともシロスタゾールの体内動態予測には、CYP3A4ではなくRXRやHNF4遺伝子のSNP解析が有益であることが示唆された。さらに末梢血中CYP3A4 mRNA量を薬物動態予測のサロゲートマーカーとして用いることは非常に困難であることが示唆された。今後は、さらに解析対象患者数、医薬品数、解析遺伝子数等を増すことによって、より精度の高い薬剤反応性予測システムが構築され、国民医療に貢献できることが期待される。

A. 研究目的

ある種の薬物を服用すると、副作用が発現しやすい人たちが存在する。この要因として、肝や小腸における薬物代謝酵素チトクロームP450(CYP)やCYP以外の代謝酵素が遺伝的に機能低下していることが最近報告されている。したがって、ファルマコゲノミクスやトキシコゲノミクス研究は、厚生労働省が推進する医薬品の適正使用という点で、重篤な副作用発現の回避やQOLの低下防止に貢献することが期待されている。しかし、これまでに薬剤反応性遺伝子のSNPがトキシコメタボロミクスの側面で、どのような影響を及ぼしているかを詳細に解析した例は非常に少ない。特に広範な薬物

の代謝酵素として知られるCYP3A4の機能や発現量に影響するSNPに関しては、統一した見解が得られていないのが現状である。もし、遺伝子診断や代謝物発現プロファイルの情報が副作用発現予測に応用できるなら、より安全かつ効果的な薬物療法が行われ、国民医療に貢献できると考えられる。

本研究ではCYP3A4の基質薬物である抗血小板薬シロスタゾールをモデル薬物として、その代謝物プロファイルや副作用発現に影響を及ぼす薬剤反応性遺伝子のSNP解析及び異所性mRNA定量解析を行う。このことにより、CYP3A4で代謝される薬物の体内動態がどのような因子により影響を受けるかが明らかとなり、

薬剤効果や副作用発現予測を支援できるもの  
と考える。

具体的には、以下の3項目を3年間にわた  
って検討した。

(1) シロスタゾールの体内動態と薬剤反応性  
遺伝子 SNP の相関解析

(2) 薬剤反応性遺伝子の新規 SNP スクリー  
ニング

(3) シロスタゾールの体内動態と異所性  
mRNA 発現の相関解析

## B. 研究方法

(1) シロスタゾールの体内動態と薬剤反応性  
遺伝子 SNP の相関解析

研究開始年となる平成14年度は薬剤反応  
性遺伝子 SNP と代謝物発現プロファイル、副  
作用発現の相関解析を行った。はじめに  
CYP3A4 の基質薬物である抗血小板薬シロ  
スタゾールの血中代謝物プロファイルを解析  
するために、HPLC を用いた定量システムを構築  
した。分析対象物質は親化合物であるシロ  
スタゾールの他に主要代謝物産物 OPC-13015  
及び OPC-13213 とした。解析対象人数はシ  
ロスタゾール既投与患者 47 人とした。シロスタ  
ゾール 100mg を 1 日 2 回、1 週間以上服用し、  
薬物血中濃度が定常状態となっている患者の  
末梢血を採取した。採血ポイントは早朝薬物  
投与前のトラフレベルとした。薬物血中濃度測  
定用に使用する採血管は抗血液凝固剤を含  
まないものを用い、採血後直ちに血清を遠心  
分離した。得られた血清に内標準物質  
(OPC-3930)を加え攪拌し、さらに H<sub>2</sub>O を加え

攪拌後、固相抽出カラム CHEM ELUT  
CE1003 に試料をアプライし、数分間静置した。  
その後クロロホルムで試料を溶出し、その試料  
を固相抽出カラム Sep-Pak Plus に吸着し、酢  
酸エチルで洗浄後、クロロホルム:メタノール  
(70:30)で溶出した。得られた試料を乾固後、  
25%アセトニトリルで溶解し、定量分析用試料と  
した。HPLC は Waters アライアンス 2695 を用  
いた。溶出条件はポンプ 1 側に 25%アセトニ  
トリル、ポンプ 2 側に 60%アセトニトリルを置き、20  
分でポンプ 2 の溶媒が 68%となるようなリニアグ  
ラジエント溶出を行った。流速は 1 mL/min とし、  
カラムは Waters Symmetry 5  $\mu$ m C18 カラム  
(3.9x150mm)を用いた。カラム温度は 40°C、  
サンプル温度は 10°Cとし、254nm で測定を行  
った。また、薬物血中濃度測定用の血液とは  
別に抗血液凝固剤入りの採血管を用い DNA  
及び RNA 抽出用の血液試料を採取し、常法  
によりそれぞれを抽出し、薬剤反応性遺伝子  
の SNP 解析及び mRNA 発現解析の試料とし  
た。SNP 解析対象遺伝子はシロスタゾール代  
謝に関与すると考えられる薬物代謝酵素  
CYP3A4、CYP3A5、CYP2B6、肝特異的発現  
調節因子 HNF1、HNF4A、CYP3A4 の発現調  
節因子 PXR、RXR  $\alpha$ 、RXR  $\beta$ 、RXR  $\gamma$  遺伝子  
の 251 箇所の SNP とした。また解析後、完全に  
連鎖不平衡にある SNP をグループ化し1つに  
まとめた。SNP 検出法は Invader 法、  
PCR-RFLP 法あるいは TaqMan 法のいずれか  
を用いた。得られた SNP 情報は個人のシロ  
スタゾール濃度、OPC-13015 濃度、OPC-13213  
濃度、代謝比 OPC-13015/シロスタゾール濃

度比及び OPC-13213/シロスタゾール濃度比との間で、単変量及びダミー変数を用いた分散分析と Kruscal-Wallis 検定による統計学的解析を行った。

## (2) 薬剤反応性遺伝子の新規 SNP スクリーニング

日本人集団において、シロスタゾール代謝に影響を及ぼす薬剤反応性遺伝子の新規 SNP が存在するか否かを検討した。シロスタゾール投与患者 47 名のゲノム DNA を鋳型として、CYP3A4、CYP2B6、RXR  $\alpha$  のエキソン領域における新規 SNP をダイレクトシーケンス法及び Denaturing HPLC 法によりスクリーニングした。また、対象群として健常人ボランティア 200 名のゲノム DNA を用い、同様の検討を行った。

## (3) シロスタゾールの体内動態と異所性 mRNA 発現の相関解析

末梢血から常法に従い総 RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法により、CYP3A4、CYP3A5、CYP2B6、RXR  $\alpha$  及び MDR1 の mRNA 量を定量した。なお、各遺伝子の mRNA の定量値は、それぞれの遺伝子を cDNA クローニングし、プラスミドに挿入したもののコピー数より検量線を作成し求めた。また、ハウスキーピング遺伝子として GAPDH mRNA 量を定量し、検体間の RNA 収率や cDNA 合成効率を補正した。それらの異所性 mRNA 量を血中のシロスタゾール濃度、OPC-13015 及び OPC-13213 濃度、代謝物/親化合物比との

間で統計学的解析を行い、相関性の有無を評価した。

## (倫理面への配慮)

今回の研究プロトコールは本邦における「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、東北薬科大学倫理委員会及び東北大学医学部倫理委員会に申請・承認された課題名「薬剤反応性遺伝子の多型性が薬効及び薬物動態に与える影響」に従って実施された。今回使用するサンプルは、東北大学医学部附属病院受診患者及び健常人ボランティアに対し、研究内容の十分な説明を行い、書面による同意(インフォームドコンセント)が得られたものを用いた。患者への説明と同意取得は東北大学医学部附属病院における研究協力者の医師(佐藤成、秋元弘治)又は薬剤師(菱沼隆則、岸川幸生)によって行われた。研究対象者に対する人権擁護上の配慮をするにあたり、すべてのサンプルは連結可能あるいは不可能匿名化を行い、一切の個人情報漏洩しないようにした。

## C. 研究結果

### (1) シロスタゾールの体内動態と薬剤反応性遺伝子 SNP の相関解析

シロスタゾールとその主要代謝物である OPC-13015 及び OPC-13213、また内標準物質(OPC-3930)の溶出時間は、それぞれ 14.0 分、12.3 分、3.9 分、10.0 分であり、鋭利で良好なピーク分離が確認された。シロスタゾール既投与患者 47 人の薬物血中濃度は、シロスタゾ

ールが平均値831.4 ng/mL (最大値2379.8 ng/mL、最小値95.9 ng/mL)、OPC-13015が330.8 ng/mL (最大値878.3 ng/mL、最小値26.7 ng/mL)、OPC-13213が284.4 ng/mL (最大値854.4 ng/mL、最小値51.4 ng/mL)であり、もっとも高値を示した人と最も低値を示した人の差はシロスタゾールで24.8倍、OPC-13015で32.9倍、OPC-13213で16.6倍であり、顕著な個人差が確認された。副作用(頭痛、軟便)を示した患者は3名であり、各薬物血中濃度はいずれも中央値付近であった。副作用を呈した症例が少なかったため親化合物や代謝物の血中濃度と副作用の相関性の解析することはできなかった。次に、各主要代謝物の薬物血中濃度を親化合物シロスタゾールで除した代謝比を算出し、それらの値をプロビット解析すると、特にOPC-13213/シロスタゾール比0.5付近で強い二相性の分離点が観察された。また、OPC-13015/シロスタゾール比0.5付近でも弱い二相性の分離点が観察された。続いて、体内薬物濃度の個人差をさらに詳細に解析した。各個人のシロスタゾール、OPC-13015及びOPC-13213血中薬物濃度に関して、シロスタゾール濃度とOPC-13015濃度には中程度の相関性( $r=0.75$ )が、シロスタゾール濃度とOPC-13213濃度には低い相関性( $r=0.61$ )が認められた(図1)。次に酵素活性の指標となる代謝比(OPC-13015/シロスタゾール(MR13015)、OPC-13213/シロスタゾール(MR13213))の個人差を解析した結果、MR13015は単峰性に、MR13213は三峰性を示すことが明らかになった(図2)。次に、47人

のシロスタゾール投与患者において、シロスタゾール濃度、OPC-13015濃度、OPC-13213濃度、OPC-13015/シロスタゾール比及びOPC-13213/シロスタゾール比と各薬剤反応性遺伝子SNPの遺伝子型の相関解析をした結果、個人のMR13015に影響を及ぼす因子としてはRXR $\alpha$ 、RXR $\gamma$ 及びHNF4遺伝子のSNPが見いだされ、それぞれの遺伝子型に有意な相関性が得られた(図3)。MR13213とCYP2B6のSNPの関係に関しては、ハプロタイプ解析を行った。すなわち、検出されたSNPにより対立遺伝子型を特定し、その遺伝子型と代謝比との相関性を解析した。その結果、遺伝子型の種類が多く、ほとんどの遺伝子型でN=1という分布であったため、単変量の分散分析では有意でなかった。しかし最近、in vitroの試験からCYP2B6\*2-\*7由来の酵素タンパクは代謝活性が野生型(CYP2B6\*1)よりも高いという報告が相次いでなされており、特にCYP2B6\*6アレルはシクロフォスファミドの代謝能が亢進していることが明らかになっている。そこで、CYP2B6\*5とCYP2B6\*6アレルを変異アレルと仮定し、どちらかのアレルを1つ有している場合を、ヘテロ型(H)、2つ有している場合を変異ホモ型(M)、全く有していない場合を野生型(W)と分類し、分散分析を行った。その結果、CYP2B6の遺伝子型により代謝比に有意差が認められた(図4)。

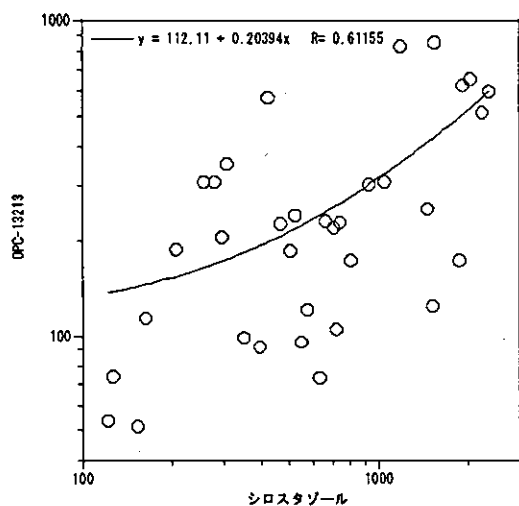
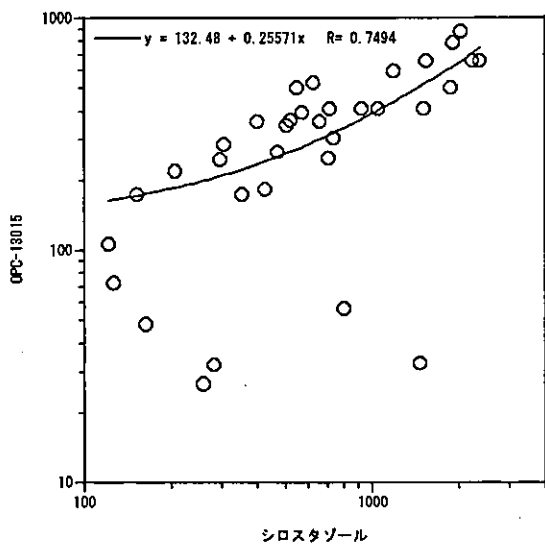


図1 血清シロスタゾール濃度と代謝物濃度の回帰分析

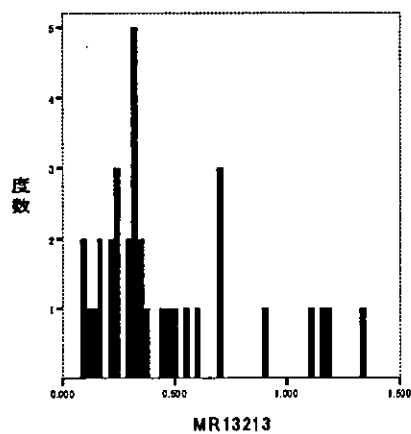
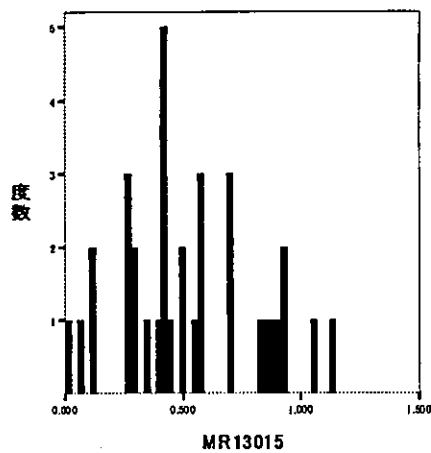


図2 代謝比のヒストグラム

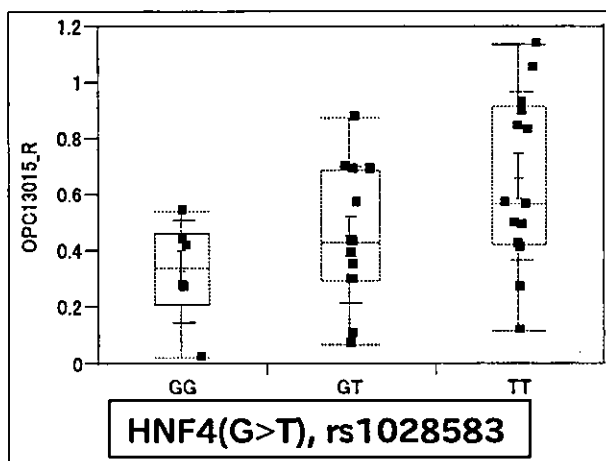


図3 MR13015に影響を及ぼすSNPとその遺伝子型



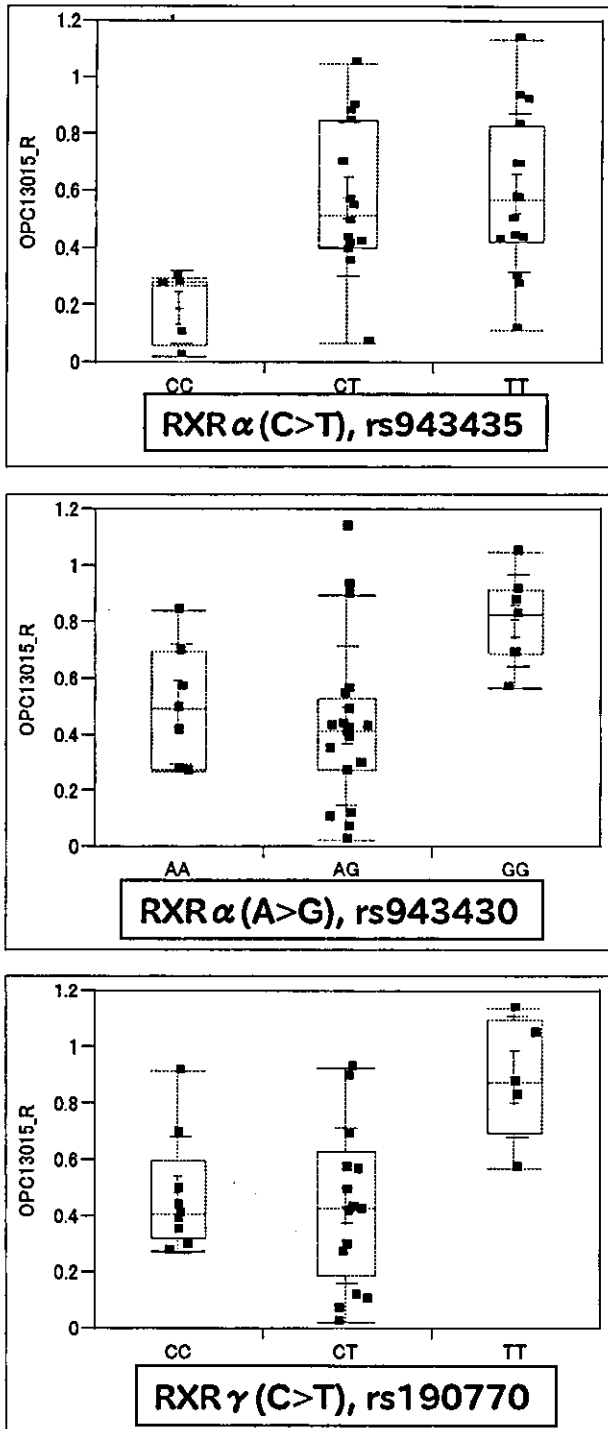


図3 MR13015に影響を及ぼすSNPとその遺伝子型

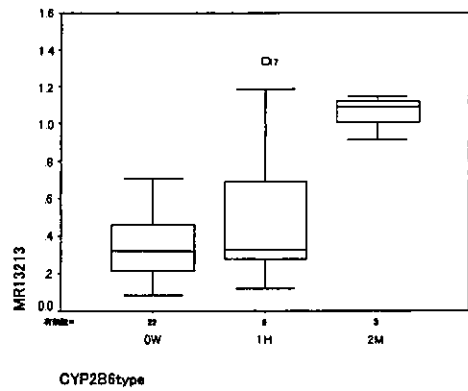


図4 MR1321に影響を及ぼすCYP2B6の遺伝子型 (CYP2B6\*5とCYP2B6\*6を変異アレルとした場合)

## (2) 薬剤反応性遺伝子の新規SNPスクリーニング

今回採取されたシロスタゾール投与患者47名由来のDNA検体からは、CYP3A4、CYP2B6、RXRαのエキソン領域において、既知SNPは多数検出されたが新規SNPは見いだされなかった。しかし、対照群として用いた健常人ボランティアの検体より、CYP2B6のアミノ酸置換を伴う新規SNPを3種 (1375A>G (Met459Val)、1427G>A (Gly476Asp)、1454A>T (Gln485Leu))を見いだした。

## (3) シロスタゾールの体内動態と異所性 mRNA 発現の相関解析

末梢血における CYP3A4、CYP3A5、CYP2B6、RXRα及びMDR1のmRNA量は血中シロスタゾール濃度、OPC-13015濃度、OPC-13213濃度、代謝物/親化合物比のすべてにおいて、相関性は認められなかった。図5に各遺伝子を代表して、末梢血中CYP3A4 mRNA値とシロスタゾール濃度、

OPC-13015 濃度あるいは代謝比 (OPC-13015 濃度/シロスタゾール濃度比) の相関関係を示した。

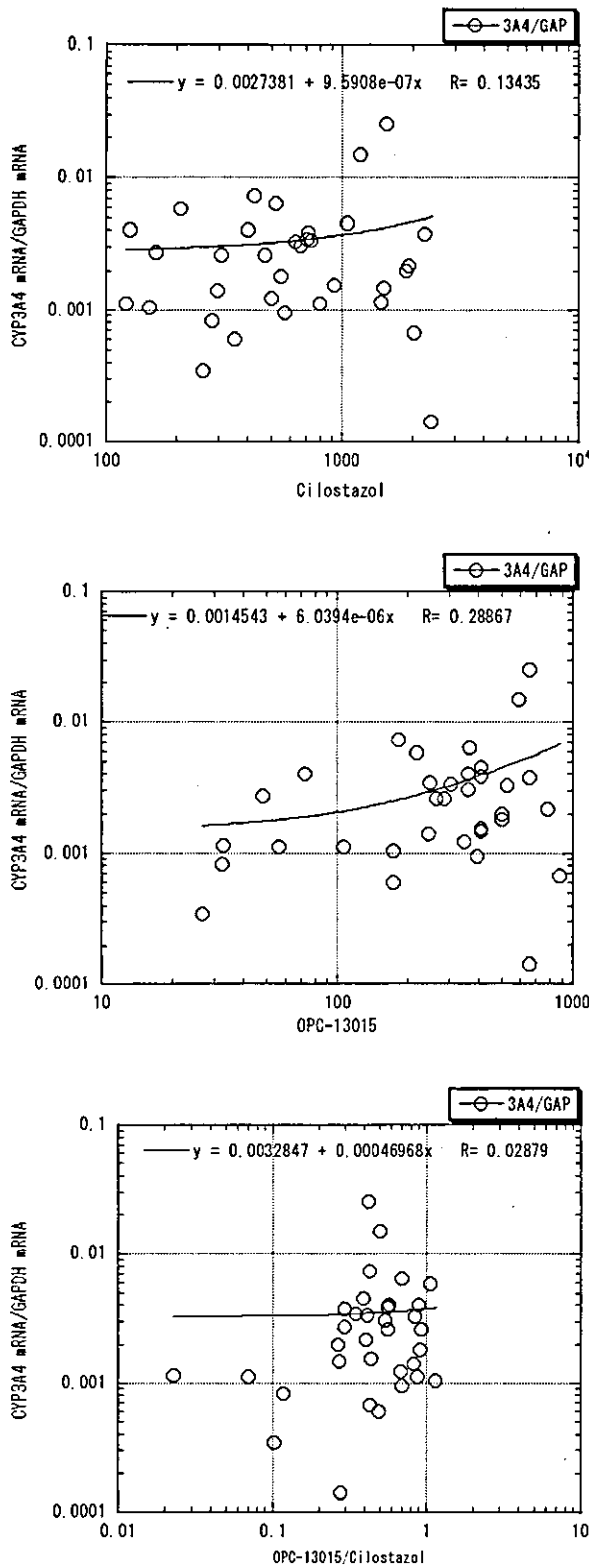


図5 末梢血中CYP3A4 mRNA量 vs シロスタゾール濃度、OPC-13015濃度、代謝比 (OPC-13015/シロスタゾール)

#### D. 考察

今回の検討により、シロスタゾールから OPC-13213 や OPC-13015 に代謝される際に、Extensive Metabolizer と Poor Metabolizer が存在することが示唆された。この原因としては、シロスタゾールの代謝に関与する CYP3A4 を代表とする種々の薬物代謝酵素や薬物トランスポーター遺伝子の SNP の存在、あるいは mRNA レベルでの発現量の差が示唆された。現在までに OPC-13015 代謝には CYP3A4、CYP2D6、CYP1A2 が、OPC-13213 代謝には CYP2B6 の関与が明らかにされている。これ以外の CYP が代謝に関与している可能性もあるが、少なくともこれらの CYP 分子種の SNP 解析を行うことは、シロスタゾール代謝の個人差を解明し、副作用発現回避のシステムを構築するためにも有益であると考えられる。

さらに今回、シロスタゾール投与患者の薬物動態及び副作用発現とそれに関与する薬剤反応性遺伝子の SNP 解析を行った。シロスタゾール代謝物、OPC-13015 及び OPC-13213 の定常状態におけるトラフ濃度は、各個人で親化合物の濃度に強い相関性があることが判明した。この結果より、シロスタゾールの薬物動態は、代謝 (CYP 等) だけでなく分布 (薬物トランスポーター等) の影響を大きく受けることが示唆された。また、主要代謝物/親化合物比の個人差をヒストグラムで表したとき、OPC-13015/シロスタゾール比は一峰性を、OPC-13213/シロスタゾール比は三峰性を示した。この結果は、OPC-13015 への代謝は主に CYP3A4 (酵素活性に影響する SNP はほと

んど報告されていない)で、OPC-13213 への代謝は主に CYP2B6(酵素活性が上昇する SNP あり)が触媒していることを支持するものであった。さらに、個人の OPC-13015/シロスタゾール比に影響を及ぼす SNP は RXR がほとんどであり、主要代謝酵素である CYP3A4 の発現調節段階での調節機構の存在が示唆された。つまり、RXR や NHF4 遺伝子の SNP により、それらのタンパク構造や発現量が増減し、それに伴い CYP3A4 の発現量が増減することが予想された。また、個人の OPC-13213/シロスタゾール比に強く影響を及ぼす SNP は CYP2B6 であり、特に CYP2B6\*5 と CYP2B6\*6 アレルの酵素活性上昇機構が影響することが示唆された。

また、シロスタゾールの体内動態と異所性 mRNA 発現の相関解析により、シロスタゾールの体内動態を今回ターゲットとした薬剤反応性遺伝子(CYP3A4、CYP3A5、CYP2B6、RXR  $\alpha$ )の異所性 mRNA 定量によって予測することは困難であると考えられた。つまり、少なくともシロスタゾール及び主要代謝物の体内動態に関して、CYP3A4 自体の遺伝子多型や異所性 CYP3A4 mRNA 量を調べるよりも、CYP3A4 の発現調節に関与する遺伝子(RXR  $\alpha$  や HNF4)や CYP2B6 の多型をサロゲートマーカーとする方が患者個々の薬物動態予測につながることを示唆された。今回、このようなデータが得られたことは、今後、「どの医薬品の薬物動態あるいは副作用発現はどの遺伝子のどの SNP あるいは異所性 mRNA で予測可能か」を明確にする上でも非常に有益であり、社会

的意義が大きいと言える。現在、副作用回避を目的としたトキシコゲノミクスやファルマコゲノミクス研究は、テーラーメイド医療が展開されていく中で、非常に重要な位置を占めると考えられる。したがって今後は、今回行ったような研究スタイルをベースに、さらに解析対象患者数、医薬品数、解析遺伝子数等を増すことによって、より精度の高い薬剤反応性及び副作用発現予測システムが構築され、国民医療に貢献できることが期待される。

## E. 結論

薬物代謝酵素CYP3A4の基質薬物である抗血小板薬シロスタゾールとその主要代謝物であるOPC-13015及びOPC-13213の血中濃度を連続投与におけるトラフレベルで測定した。47人の薬物投与患者において、顕著な薬物濃度の個人差が認められた。シロスタゾール投与患者の薬物動態とそれに関与する薬剤反応性遺伝子のSNP解析を行った結果、CYP3A4の発現量を予測する因子としてRXR遺伝子の一部のSNPが見いだされた。これらのSNPはRXRのイントロンSNPであったため、これらのSNPあるいはこのSNPとリンクしているSNPやハプロタイプの存在により、RXRタンパクの発現量が増減することでCYP3A4タンパクの発現量が増減する可能性が考えられたため、患者検体を用いてエクソン領域をシーケンシング解析したが、新規SNPは検出されなかった。また、末梢血中CYP3A4 mRNA量を薬物動態予測や副作用発現予測のサロゲートマーカーとして用いることは非常に困難であることが示唆

された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Masahiro Hiratsuka, Yudai Hinai, Yumiko Konno, Hisayoshi Nozawa, Shoetsu Konno, Michinao Mizugaki.

Three novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the CYP2B6 gene in Japanese individuals.

Drug Metab. Pharmacokinet., 19 (2), 155-158 (2004)

### 2. 学会発表

(1) 抗血小板薬シロスタゾールの代謝に関与する薬剤反応性遺伝子のSNP解析

平塚真弘、岸川幸生、奈良原香織、後藤順一、佐藤成、秋元弘治、白土敬之、関豊和、水柿道直、日本薬学会第124年会、大阪市、2004年3月

(2) 日本人におけるCYP2B6遺伝子のアミノ酸置換を伴う新規遺伝子多型

比内雄大、平塚真弘、伊藤慶彦、佐々木崇光、金野由美子、水柿道直、日本薬学会第125年会、東京都、2005年3月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究成果の刊行に関する一覧

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
Masahiro Hiratsuka, Yudai Hinai, Yumiko Konno, Hisayoshi Nozawa, Shoetsu Konno, Michinao Mizugaki	Three novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the <i>CYP2B6</i> gene in Japanese individuals.	Drug Metabol. Pharmacokin.	19 (2),	155-158	(2004)

## SNP Communication

### *Three Novel Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of the CYP2B6 Gene in Japanese Individuals*

Masahiro HIRATSUKA<sup>1</sup>, Yudai HINAI<sup>1</sup>, Yumiko KONNO<sup>1</sup>, Hisayoshi NOZAWA<sup>1,2</sup>,  
Shoetsu KONNO<sup>3</sup> and Michinao MIZUGAKI<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Pharmaceutics, Tohoku Pharmaceutical University, Sendai, Japan

<sup>2</sup>Department of Pharmacy, NTT East Tohoku Hospital, Sendai, Japan

<sup>3</sup>Department of Pharmacy, Hoshi General Hospital, Koriyama, Japan

Full text of this paper is available at <http://www.jssx.org>

**Summary:** We sequenced all exons and exon-intron junctions of the *CYP2B6* gene from 200 Japanese individuals. We found three novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) (1375A>G, 1427G>A and 1454A>T) causing amino acid substitutions (Met<sup>459</sup>Val, Gly<sup>476</sup>Asp and Gln<sup>485</sup>Leu in exon 9), respectively.

The detected SNP was as follows:

- 1) SNP, 031226Hiratsuka01; GENE NAME, *CYP2B6*; ACCESSION NUMBER, AC023172; LENGTH, 25 base; 5'-CAGAACTTCTCCA/GTGGCCAGCCCCG-3'.
- 2) SNP, 031226Hiratsuka02; GENE NAME, *CYP2B6*; ACCESSION NUMBER, AC023172; LENGTH, 25 base; 5'-CCCAGGAGTGTGG/ATGTGGGCAAAT-3'.
- 3) SNP, 031226Hiratsuka03; GENE NAME, *CYP2B6*; ACCESSION NUMBER, AC023172; LENGTH, 25 base; 5'-CCCCAACATACCA/TGATCCGCTTCCT-3'.

**Key words:** CYP2B6; genetic polymorphism; Japanese

#### Introduction

CYP2B6 is involved in the metabolism of clinically important drugs; including cyclophosphamide,<sup>1</sup> ifosfamide,<sup>2</sup> bupropion,<sup>3,4</sup> tamoxifen,<sup>5</sup> and diazepam.<sup>6</sup> The capacity of the activation has been reported to vary among individuals from four to nine times. Recent publications indicate that the extensive interindividual variability of CYP2B6 expression and function is due not only to regulatory phenomena, but also to a common genetic polymorphism.<sup>7</sup> In addition to the wild-type allele *CYP2B6\*1*, to date there are eight variants, designated *CYP2B6\*2* (64C>T), *CYP2B6\*3* (777C>A), *CYP2B6\*4* (785A>G), *CYP2B6\*5* (1459C>T), *CYP2B6\*6* (516G>T and 785A>G), *CYP2B6\*7* (516G>T, 785A>G and 1459C>T),

*CYP2B6\*8* (415A>G), and *CYP2B6\*9* (516G>T) (see <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>).<sup>7,8</sup> Recently, we have reported allele frequencies for *CYP2B6\*2-7* in 256 Japanese subjects using genotyping methods.<sup>9</sup> In this study, we sequenced all exons and exon-intron junctions of the *CYP2B6* gene from 200 Japanese individuals. We identified three novel SNPs of the *CYP2B6* gene.

#### Materials and Methods

Venous blood was obtained from 200 unrelated Japanese volunteers of Tohoku University Hospital. The local Ethics Committee of Tohoku University Hospital and Tohoku Pharmaceutical University approved the study and written, informed consent was obtained from all blood donors. DNA was isolated from anticoagulated (with K<sub>2</sub>EDTA) peripheral blood using a DNA Extractor WB-Rapid Kit (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) or a QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations.

Table 1 lists the primer pairs (PCR) used to amplify

On December 26, 2003, the SNP did not appear either in the "Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee database (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>)" or the "JSNPs database (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>)".

Received; December 20, 2003, Accepted; January 17, 2004

\*To whom correspondence should be addressed: Michinao MIZUGAKI, Ph.D., Department of Clinical Pharmaceutics, Tohoku Pharmaceutical University, 4-4-1, Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan. Tel. +81-22-234-4181, Fax. +81-22-275-2013, E-mail: mizugaki@tohoku-pharm.ac.jp

Table 1. Primers used for amplification and sequencing of the *CYP2B6* gene

Exon	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')	Annealing Temp. (°C)	Note
Exon 1	ccacacaccacacattcacttgcctcact gcagggtcaggataaaaaggcccagttggag	tgtttggtgaagcttcccccaagtaccaagg	60.0	PCR and sequence sequence
Exons 2-3 Exon 2	taaccattaacccttaattgctgggtccca	cagttcgtctgtctctgtctgtccctta cccagtcctctgaggctct	65.0	PCR and sequence sequence
Exon 4	gcctctcggctgccatctataaac	tgttctgggtgttcacctcaccacacacc	60.0	PCR and sequence
Exon 5-6 Exon 5 Exon 6	aaaagtatgagaaagacaataaacaggct caccacccctctttcttgc acggagggcagccaggagatggcggtata	tagccccatttctgcagctcagaaggaggt ccttttctctcccagacc	64.3	PCR and sequence sequence sequence
Exon 7-8 Exon 8	gaaatgcctcttaaaatgagattcattgg ccgctggaaccatagccctctgttt	tctcgttgttttctcaagttggggatagt	60.0	PCR and sequence sequence
Exon 9	cttatgcaaatctgttgcagtgacatttg agagcgaagtgtatgcact	taatctcactctgcactcacttgcattgt agagccattgtctacagagg	60.0	PCR and sequence sequence

*CYP2B6* exons. These primers were designed based on the genomic sequence reported in the Genbank with accession number: AC023172. Amplicons for exons 1, 4, 7-8, and 9 were generated with the AmpliTaq Gold PCR Master Mix by Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). The PCR reactions proceeded using a BIO-RAD iCycler (Hercules, CA, USA). The thermal profile consisted of denaturation at 95°C for 10 minutes, followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing for 30 seconds, extension at 72°C for 30 seconds, and a final extension at 72°C for 7 minutes. The annealing temperatures are indicated in Table 1. Amplicons for exons 2-3 were generated with the LA-Taq DNA polymerase by TaKaRa Co. (Kyoto, Japan). The thermal profile consisted of denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 65°C for 60 seconds, extension at 72°C for 90 seconds, and a final extension at 72°C for 7 minutes. Amplicons for exons 5-6 were generated with the Ex-Taq DNA polymerase by TaKaRa Co. (Kyoto, Japan). The thermal profile consisted of denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 64.3°C for 60 seconds, extension at 72°C for 90 seconds, and a final extension at 72°C for 7 minutes.

Sequences were determined using the CEQ8000® automated DNA sequencer (Beckman-Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). The PCR products were sequenced by the fluorescent dideoxy termination reaction method using the DTCS DNA Sequencing Kit (Beckman-Coulter Inc.) according to manufacturer's instructions with the primers (sequence) listed in Table 1.

## Results and Discussion

We found three novel SNPs as follows:

- 1) SNP, 031226Hiratsuka01; GENE NAME, *CYP2B6*; ACCESSION NUMBER, AC023172; LENGTH, 25 base; 5'-CAGAACTTCTCCA/GTGGC-CAGCCCCG-3'.
- 2) SNP, 031226Hiratsuka02; GENE NAME, *CYP2B6*; ACCESSION NUMBER, AC023172; LENGTH, 25 base; 5'-CCCAGGAGTGTGG/ATGT-GGGCAAAT-3'.
- 3) SNP, 031226Hiratsuka03; GENE NAME, *CYP2B6*; ACCESSION NUMBER, AC023172; LENGTH, 25 base; 5'-CCCCAACATACCA/TGAT-CCGCTTCCT-3'.

The electropherograms of the novel SNPs are shown in Fig. 1. The positions of these SNPs were 459 (031226Hiratsuka01), 476 (031226Hiratsuka02), and 485 (031226Hiratsuka03) in exon 9. All of the SNPs were heterozygous, and their frequencies were 0.0075 for 031226Hiratsuka01, 0.005 for 031226Hiratsuka02, and 0.0025 for 031226Hiratsuka03 in the Japanese population. Sequences from each sample were obtained from at least three different PCR amplifications.

Ariyoshi *et al.* have reported that the 516G>T (Gln<sup>172</sup>His) mutation enhances 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity of the *CYP2B6* enzyme in an *in vitro* assay.<sup>10</sup> Further, Jinno *et al.* have also reported that compared with *CYP2B6*\*1, the alleles *CYP2B6*\*4 (Lys<sup>262</sup>Arg), *CYP2B6*\*5 (Arg<sup>487</sup>Cys), *CYP2B6*\*6 (Gln<sup>172</sup>His; Lys<sup>262</sup>Arg), and *CYP2B6*\*7 (Gln<sup>172</sup>His; Lys<sup>262</sup>Arg; Arg<sup>487</sup>Cys) are associated with a higher intrinsic clearance of 7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin.<sup>11</sup> Xie *et al.* have reported that the *CYP2B6*\*6 carriers has significantly higher cyclophosphamide 4-hydroxylation.<sup>12</sup> In contrast Lang *et al.* have reported that

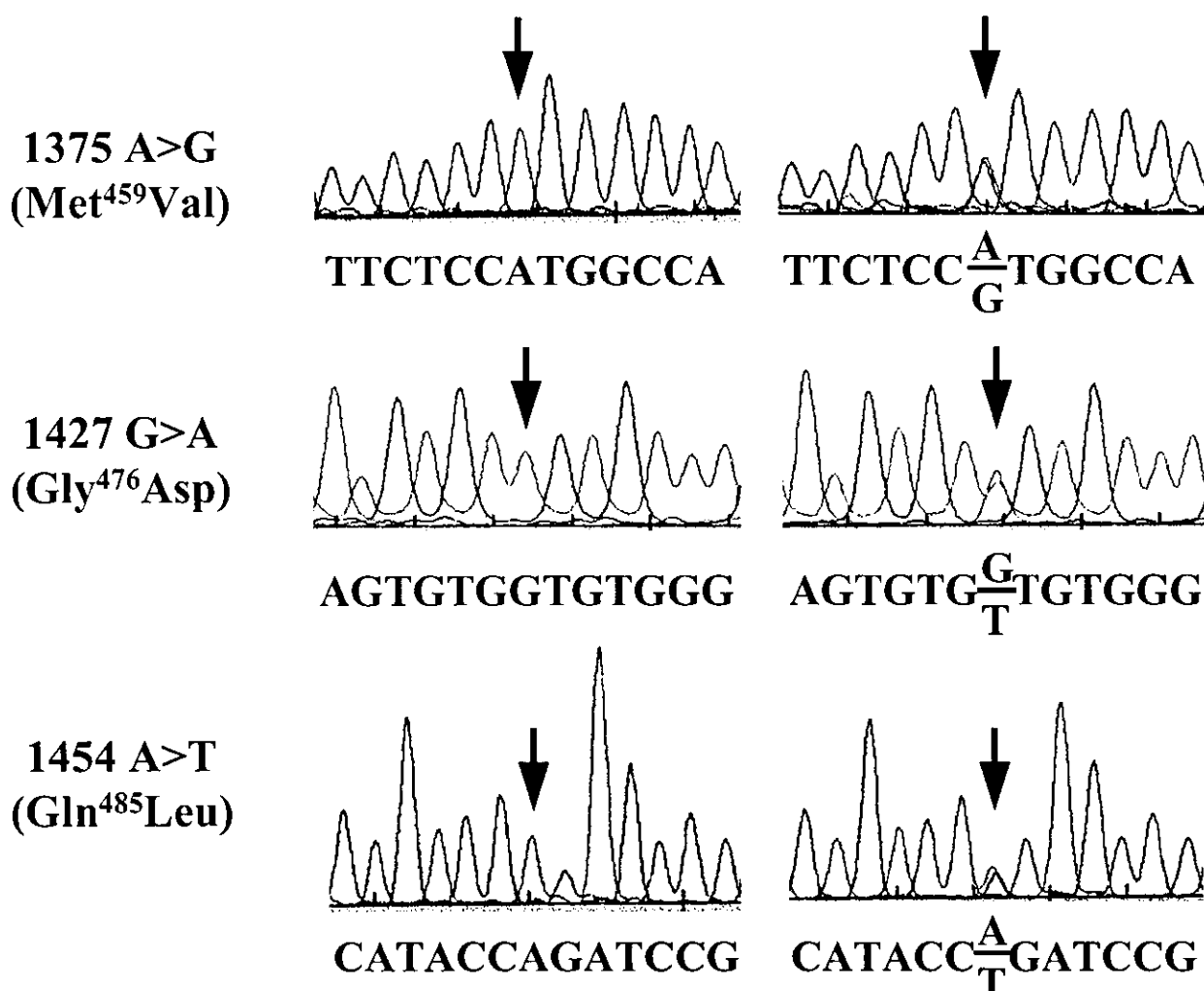


Fig. 1. The nucleotide sequences of the *CYP2B6* gene at exon 9. The sequences are shown for sense strands. Arrows indicate the variant nucleotide positions.

significantly reduced *CYP2B6* protein expression and S-mephenytoin N-demethylase activity were found in carriers of the 1459C>T (Arg<sup>487</sup>Cys) mutation (alleles *CYP2B6*\*5 and *CYP2B6*\*7).<sup>7)</sup> Furthermore, it has been reported that the 1459C>T (Arg<sup>487</sup>Cys) are associated with the lowest level of *CYP2B6* activity in livers of females.<sup>8)</sup> The 1459C>T SNP in exon 9 are closely located in the substrate recognition site.<sup>13)</sup> These three SNPs in this study are also located in the site. In particular, the Gly476 is conserved in the CYP2 family.<sup>13)</sup> Thus, these amino acid substitutions are expected to alter the catalytic properties of the *CYP2B6*.

**Acknowledgements:** This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Research on Advanced Medical Technology from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

#### References

- 1) Chang, T. K., Weber, G. F., Crespi, C. L. and Waxman, D. J.: Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer. Res.*, **53**: 5629-5637 (1993).
- 2) Granvil, C. P., Madan, A., Sharkawi, M., Parkinson, A. and Wainer, I. W.: Role of *CYP2B6* and *CYP3A4* in the *in vitro* N-dechloroethylation of (R)- and (S)-ifosfamide in human liver microsomes. *Drug. Metab. Dispos.*, **27**: 533-541 (1999).
- 3) Hesse, L. M., Venkatakrishnan, K., Court, M. H., Von Moltke, L. L., Duan, S. X., Shader, R. I. and Greenblatt, D. J.: *CYP2B6* mediates the *in vitro* hydroxylation of bupropion: Potential drug interactions with other antidepressants. *Drug. Metab. Dispos.*, **28**: 1176-1183 (2000).
- 4) Faucette, S. R., Hawke, R. L., Lecluyse, E. L., Shord, S. S., Yan, B. F., Laethem, R. M. and Lindley, C. M.: Validation of bupropion hydroxylation as a selective



- marker of human cytochrome P4502B6 catalytic activity. *Drug. Metab. Dispos.*, **28**: 1222–1230 (2000).
- 5) White, I. N., De Matteis, F., Gibbs, A. H., Lim, C. K., Wolf, C. R., Henderson, C. and Smith, L. L.: Species differences in the covalent binding of [14C]tamoxifen to liver microsomes and the forms of cytochrome P450 involved. *Biochem. Pharmacol.*, **49**: 1035–1042 (1995).
  - 6) Ono, S., Hatanaka, T., Miyazawa, S., Tsutsui, M., Aoyama, T., Gonzalez, F. J. and Satoh, T.: Human liver microsomal diazepam metabolism using cDNA-expressed cytochrome P450s: role of CYP2B6, 2C19 and the 3A subfamily. *Xenobiotica*, **26**: 1155–1166 (1996).
  - 7) Lang, T., Klein, K., Fischer, J., Nussler, A. K., Neuhaus, P., Hofmann, U., Eichelbaum, M., Schwab, M. and Zanger, U. M.: Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics*, **11**: 399–415 (2001).
  - 8) Lamba, V., Lamba, J., Yasuda, K., Strom, S., Davila, J., Hancock, M. L., Fackenthal, J. D., Rogan, P. K., Ring, B., Wrighton, S. A. and Schuetz, E. G.: Hepatic CYP2B6 expression: Gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **307**: 906–922 (2003).
  - 9) Hiratsuka, M., Takekuma, Y., Endo, N., Narahara, K., Hamdy, S. I., Kishikawa, Y., Matsuura, M., Agatsuma, Y., Inoue, T. and Mizugaki, M.: Allele and genotype frequencies of CYP2B6 and CYP3A5 in the Japanese population. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **58**: 417–421 (2002).
  - 10) Ariyoshi, N., Miyazaki, M., Toide, K., Sawamura, Y. and Kamataki, T.: A single nucleotide polymorphism of CYP2B6 found in Japanese enhances catalytic activity by autoactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**: 1256–1260 (2001).
  - 11) Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Ohno, A., Makino, Y., Matsushima, E., Hanioka, N. and Ando, M.: Functional characterization of cytochrome P450 2B6 allelic variants. *Drug. Metab. Dispos.*, **31**: 398–403 (2003).
  - 12) Xie, H.-J., Yasar, U., Lundgren, S., Griskevicius, L., Terelius, Y., Hassan, M. and Rane, A.: Role of polymorphic human CYP2B6 in cyclophosphamide bioactivation. *Pharmacogenomics J.*, **3**: 53–61 (2003).
  - 13) Lewis, D. F. V.: The CYP2 family: models, mutants and interactions. *Xenobiotica*, **28**: 617–661 (1998).