

る場合が多いと言われている。実際に、比較的頻度の高い *UGT1A1\*60* と TA ボックスにおける変異とはかなり強い連鎖があることが報告されており、本研究においても確認されたので、これらの2箇所のアレルの PK/PD に及ぼす影響を、独立で検討することは好ましくないことは明かである。

*UGT1A1\*6* (211G>A) はアジア人に特徴的な SNP であるために、ハプロタイプ解析においてマーカーSNPとして使用されることが少ないが、本研究においては、211G>A と 686C>A も用いて、詳細なハプロタイプ構造を決定し、人種間の差を検討することができた。今回頻度は低い白人においても、211G>A が検出されたが、白人における同アレルを含むハプロタイプの構造は明らかにできなかった。

著者のグループの研究では、ハプロタイプの\*28あるいは\*6のいずれかを同時に持つ患者では、SN-38の代謝が大きく低下していることを明かにしてきた。<sup>6)</sup> 我が国における標準的なイリノテカンの用法・用量は、1週間間隔での100 mg/m<sup>2</sup>又は2週間間隔での150 mg/m<sup>2</sup>投与であるため、また、副作用に対する処置法が確立されてきたため、現在では重篤な副作用が発症することは少ないが、米国では3週間間隔による350 mg/m<sup>2</sup>投与が主流であり、文献によれば今なお重篤な副作用がしばしば観察されている<sup>17)</sup>。現在、FDAではイリノテカンの治療における遺伝子多型診断の導入を検討中であると伝聞するが、本研究結果は、日本人のみならず、米国に住むアジア系癌患者の安全性に対して有用な情報を提供できるのではないかと考える。また、本研究で示された *UGT1A1* の機能変化を伴うハプ

ロタイプの頻度が人種間で相違することは、医薬品の開発にあたって、有効成分の主たる解毒化機構が、*UGT1A1*によるグルクロン酸抱合である場合には、人種間で異なるハプロタイプに対して注意を向けなければならないことを示唆する。

## E. 結論

*UGT1A1*を2つに分け、ハプロタイプ解析を行った。ブロック1では、8種類のハプロタイプを、また、ブロック2では6種類のハプロタイプを0.99以上の確からしさと推定できた。特にグルクロン酸抱合能の低下と密接な関連にあると言われている、*UGT1A1*のブロック1におけるハプロタイプ\*28、\*6、\*37の頻度は、人種間で大きく異なった。本研究結果は、欧米と日本では、種として *UGT1A1* によって解毒される薬物を投与する場合、あるいは、開発する場合には、それぞれ異なるタイプの遺伝子多型に注意を払わなければならないことを示唆している。

## 謝辞

本研究へご協力いただいた協力研究者の頭金正博博士、黒瀬光一博士、斎藤嘉朗博士、及び佐伯真弓研究員に深謝致します。

## 参考文献

- 1) W.E. Evans et al., *Science*, **286**, 487 (1999).
- 2) R.H. Tukey & C.P. Strassburg, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **40**, 581 (2000).
- 3) L. Iyer et al., *Pharmacogenomics J.*, **2**, 43 (2002).
- 4) Y. Ando et al., *Cancer Res.*, **60**, 6921 (2000).

- 5) F. Innocenti et al., *Pharmacogenetics*, **12**, 725 (2002).
- 6) K. Sai et al., *Clin. Pharm. Ther.* **75**, 501, 2004.
- 7) L. Iyer et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **65**, 576 (1999).
- 8) J-F Gagne et al., *Mol. Pharmacol.*, **62**, 608 (2002).
- 9) M. Saeki et al., *Clin. Chem.*, **49**, 1182 (2003).
- 10) M. Saeki et al., *Drug Met. Pharmacokinet.*, **17**, 488 (2002).
- 11) M. Stephens et al., *Am. J. Hum. Genet.*, **73**, 1162 (2003).
- 12) M. Stephens et al., *Am. J. Hum. Genet.*, **68**, 978 (2001).
- 13) C.S. Huang et al., *Pharmacogenetics*. **10**, 539 (2000).
- 14) D.A. Day and M.F. Tuite. *J. Endocrinol.*, **157**, 361 (1998).
- 15) B. Conne, et al., *Nat. Med.* **6**, 637 (2000).
- 16) G. Acuna, et al., *Pharmacogenomics J.* **2**, 327 (2002).
- 17) E. Marcuello, et al., *Br. J. Cancer*, **91**, 678 (2004).

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

N. Kaniwa, K. Kurose, H. Jinno, T. Tanaka-Kagawa, Y. Saito, M. Saeki, J. Sawada, M. Tohkin and R. Hasegawa: Racial variability in haplotype

frequencies of UGT1A1 and glucuronidation activity of a novel SNP 686C>T (P229L) found in an African-American. *Drug Metab. Dispos.*, **33**, 458-465, 2005.

2. 学会発表

1) Nahoko Kaniwa, Masahiro Tohkin, Koichi Kurose, Hideto Jinno, Yoshiro Saito, Toshiko Tanaka-Kagawa, Mayumi Saeki, Ryuichi Hasegawa, Ethnic differences in allele frequencies of genotypes in UGT1A1. The 7<sup>th</sup> International ISSX Meeting, Vancouver, 2004. 8.

2) Nahoko Kaniwa, Masahiro Tohkin, Kouichi Kurose, Hideto Jinno, Yoshiro Saito, Toshiko Tanaka-Kagawa, Mayumi Saeki, Jun-ichi Sawada, and Ryuichi Hasegawa, Ethnic differences in allele frequencies of genotypes in UGT1A1 and glucuronidation activity of a novel SNP 686C>T (P229L). 第19回日本薬物動態学会年会、金沢、2004. 11.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

Table 1 Allele frequencies of genetic polymorphisms of UGT1A1 in the three ethnic groups

Position	Nucleotide change	Amino acid	Ethnic group						P ( $\chi^2$ -test)
			African-American		Caucasian		Japanese		
			Number of heterozygotes/ homozygotes <sup>a</sup>	Allele frequency (lower limit, upper limit)	Number of hetero/homo individuals <sup>a</sup>	Allele frequency (lower limit, upper limit)	Number of hetero/homo individuals <sup>a</sup>	Allele frequency (lower limit, upper limit)	
-3279	T>G		36/109 (300)	0.847 (0.806, 0.888)	65/50 (300)	0.550 (0.494, 0.606)	55/11 (300)	0.257 (0.208, 0.306)	p<0.0001
TA box	(TA)5		13/0 (298)	0.044 (0.021, 0.067)	5/0 (294)	0.017 (0.002, 0.032)	0/0 (300)	0.000	p<0.0001
	(TA)6		69/32 (298)	0.446 (0.390, 0.502)	77/48 (294)	0.588 (0.532, 0.644)	23/124 (300)	0.903 (0.870, 0.936)	
	(TA)7		65/34 (298)	0.446 (0.390, 0.502)	78/18 (294)	0.388 (0.332, 0.444)	23/3 (300)	0.097 (0.064, 0.130)	
	(TA)8		17/1 (298)	0.064 (0.000, 0.092)	2/0 (294)	0.007 (0.000, 0.017)	0/0 (300)	0.000	
211	G>A	G71R	0/0 (300)	0.000	2/0 (300)	0.007 (0.000, 0.016)	35/6 (300)	0.157 (0.116, 0.198)	p<0.0001
686	C>A	P229Q	0/0 (298)	0.000	0/0 (300)	0.000	1/0 (300)	0.003 (0.000, 0.009)	p=0.405
	C>T	P229L	0/1 (298)	0.003 (0.000, 0.009)	0/0 (300)	0.000	0/0 (300)	0.000	
1813	C>T		61/22 (300)	0.350 (0.296, 0.404)	54/6 (300)	0.220 (0.173, 0.267)		Not determined	p<0.0001
1941	C>G		43/6 (300)	0.183 (0.1393, 0.227)	47/1 (300)	0.163 (0.121, 0.205)	25/2 (300)	0.097 (0.064, 0.130)	p=0.0074
2042	C>G		68/23 (300)	0.380 (0.325, 0.435)	60/6 (300)	0.240 (0.192, 0.288)		Not determined	p<0.0001

<sup>a</sup> Values in parenthesis are numbers of chromosomes determined.

Table 2 Haplotypes in block 1 (the enhancer/promoter regions and exon 1) of UGT1A1 for three ethnic groups

Position	-3279		TA box					211		686		Haplotype frequency		
	T	G	5	6	7	8	G	A	C	A	African-American	Caucasian	Japanese	
*1a	■			■			■		■		0.150	0.451	0.610	
*6a	■			■				■	■		0.000	0.000	0.141	
*6d				■				■	■		0.000	0.000	0.003	
*28b					■			■	■		0.446	0.389	0.097	
*28c					■			■		■	0.000	0.000	0.003	
*36b						■		■	■		0.044	0.017	0.000	
*37b							■	■	■		0.065	0.007	0.000	
*60a								■	■		0.296	0.135	0.145	

Haplotype distribution patterns in Block 1 were statistically different among the three ethnic groups ( $p < 0.0001$  by the  $\chi^2$ -test).  
 Fourteen subjects with ambiguous diplotypes were excluded from the analysis.

Table 3 Haplotypes in block 2 (exons 2-5) of UGT1A1 for three ethnic groups

Position	1813		1941		2042		Frequency		
	C	T	C	G	C	G	African-American	Caucasian	Japanese <sup>d</sup>
	*IA	■		■		■		0.617	0.757
*IB		■		■		■	0.183	0.157	0.097
*IC		■	■			■	0.163	0.060	0.000
*ID	■		■		■	■	0.033	0.017	0.000
*IE	■			■		■	0.000	0.007	0.000
*IF		■	■		■		0.003	0.003	0.000

Haplotype distribution patterns in Block 2 were statistically different among the three ethnic groups ( $p < 0.0001$  by the  $\chi^2$ -test).

<sup>a</sup> Haplotypes in Japanese were determined according to the genotype of 1941C>G because it was previously reported that all three marker genotypes were completely associated each other in a Japanese population.

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
分担研究報告書

薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する研究

分担研究者 家入 一郎 鳥取大学医学部附属病院薬剤部助教・副薬剤部長

研究要旨: メトホルミン(MT)は肥満のある2型糖尿病患者に常用されるピクアナイド系インスリン抵抗性改善薬であるが、十分な血糖低下作用が得られない、いわゆるノンレスポnder(NR)が存在する。MTの血糖低下作用には多くの機序が指摘されるが、肝での糖新生抑制が主な機序とされる。MTの肝への取り込みには肝特異的な薬物輸送蛋白であるOCT1が、尿排泄には近位尿細管に特異的に発現するOCT2が重要な役割を果たす。本研究では、OCT1の機能低下がNRの原因と仮定し、遺伝子多型解析、変異の人種差を明らかにするとともに、当院内科患者を対象として、変異の臨床効果への関与について検討を加えた。多型解析の結果、OCT1, 2, 3遺伝子に、それぞれ3, 2, 1箇所のアミノ酸置換を伴う変異を同定した。人種間の頻度比較では、OCT1遺伝子のP341L、V408M変異に差が見られ、前者は日本人で頻度が高く、後者は白人で高い結果が得られた。MTのNRとレスポnderとの違いを判別関数分析で評価した結果、V408M変異による効果減弱が示唆され、判別効率は、55.5%であった。臨床効果に寄与が予想される他のタンパク遺伝子解析が必要であるが、変異の有無による効果の投与前予測の可能性、効果に対する人種差の存在が示唆された。

A. 研究目的

メトホルミン(MT)の肝への取り込みは、血糖降下作用のための第一段階と考えられる。そこで、肝取り込みに関与するorganic cation transporter 1 (OCT1)の遺伝子多型解析を行い、多型の臨床効果への関与を明らかにする。多型情報や患者情報に基づいた適正使用の可能性について言及する。さらに、腎排泄に関与するOCT2や同じ分子種であるOCT3の遺伝子解析も同時に行い、多型情報を収集するとともに、人種差の有無についての検討も平行して行うことを目的とする。

B. 研究方法

健康な日本人、白人、黒人より得たゲノムDNA、各150検体を試料とした。日本人由来DNAを用い、OCT1, 2, 3遺伝子の翻訳領域を中心に多型解析を実施した。患者検討では、鳥取大学病院内科に通院するMT服用患者33名を対象とした。HbA1cの変動と医師の診察をもとに、レスポnder(24名)とノンレスポnder(9名)に層別した。  
(倫理面への配慮) 白人、黒人の血液は、研究用に採血されたもので、米国血液供給会社より購入した。日本人検体については、健康成人ボランティアから得た。本研究の目的等、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に準拠した説明を行い、各自より書面による承諾を得た後に試料とした。本研究は、鳥取大学医学部倫理審査委員会により審査・承認を得た後に実施した。すべての日本人検体は鳥取大学医学部附属病院において連結不可能匿名化を行い、血液からDNAを抽出後、共通の番号を付け各共同研究施設に送付した。

C. 研究結果

遺伝子解析の結果、OCT1, 2, 3遺伝子にそれぞれ3, 2, 1箇所のアミノ酸置換を伴う変異を同定した。変異の種類と日本人での頻度は以下の通り: OCT1 (F160L, 0.109), (P341L, 0.181), (V408M, 0.172); OCT2 (T201M, 0.01), (A270S); OCT3 (T424S, 0.05)。人種間の比較では、OCT2, 3遺伝子に見る変異については、顕著な差は見られなかった。一方、OCT1遺伝子については、P341Lが日本人で、V408Mは白人での発現率が高かった。MTのレスポnderとノンレスポnder間での変異の頻度比較では、V408M変異の頻度がノンレスポnder群で高かった。さらに両群を区別する要因を明らかとする目的で、判別関数分析を行った。年齢、性別などの患者情報12項目、遺伝子変異情報5項目を取り入れた分析を実施した。その結果、年齢(係数 = 0.09)、BMI (body mass index, 0.23)、高脂血症治療薬の投与の有無 (2.25)、T117075G (患者解析で認められた変異, -2.35)、V408M (-2.51)の関与が認められた。遺伝子変異については、両変異の存在でMTの臨床効果は減弱する方向に変動する。V408Mの関与が認められたために、

ヒト肝に発現するOCT1 mRNA発現量と変異の関連について検討した。その結果、V408Mの変異の存在により、肝での発現量の低下が観察された。

D. 考察

糖尿病専門医が持つMTに対するノンレスポnderは、肝抵抗性を示す患者との印象がある。これら臨床医の感想をきっかけに本研究を展開した。OCT1, 2, 3遺伝子においても、他の薬物トランスポーター同様に多くの変異を同定したが、OCT1遺伝子でも3箇所のアミノ酸置換を伴う変異と他のトランスポーターと比較して少ない傾向が見られた。しかし、人種間の頻度比較では、同様に、人種差の存在が認められた。本検討では、ノンレスポnderを予測する患者要因として、年齢、体重、高脂血症の有無が挙げられた。いずれも正の関与であり、肥満で高脂血症のある高齢者でMTが有効である一方、V408M変異の存在では、無効に作用を受けることが明らかとなった。V408M変異の機能については、発現系でのin vitro検討の結果、輸送能の低下が報告されている。本検討でも同様の結果が得られているが、その背景としては、肝での発現量の低下が示唆された。in vivo機能評価は本検討が初めてであり、今後の追加検討が待たれる。以上の要因を考慮した場合の予測精度は、55.5%であった。本数値に対する評価は今後の問題であるが、MTが肝取り込みされた後には、AMPK、ACC、PEPCK、G6Paseなどのタンパクが重要な働きをすることが指摘されていることから、これらのタンパク遺伝子の情報を加えることにより、さらに精度の高い予測が可能になると思われる。

E. 結論

MTの血糖降下作用に見る個人差にOCT1遺伝子多型が関与する可能性が示唆された。しかし、年齢、体重、合併症といった患者情報の考慮が必要であり、さらに良好な予測精度を得るためには、関与する諸タンパク遺伝子の情報も必要と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

別紙一覧を参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在までに出願、登録はない。

分担研究報告書

CYP3A の遺伝子多型と人種差に関する研究  
分担研究者 千葉 寛 千葉大学大学院教授

研究要旨

平成 16 年度は、日本人と白色人種の肝組織を用い、*CYP3A4\*2*, *CYP3A4\*5*, *CYP3A4\*6*, *CYP3A5\*3* が薬物代謝活性に与える影響を人種間で比較した。*CYP3A4* および *CYP3A5* の変異解析は、PCR-RFLP 法および denaturing HPLC 法により行い、CYP3A による薬物代謝活性は testosterone (TS) 6 $\beta$ -hydroxylation と midazolam (MDZ) 1' および 4-hydroxylation により測定した。*CYP3A4\*2*, *CYP3A4\*5* は検討を行ったいずれの肝検体にも認められなかったが、*CYP3A4\*6* のヘテロ型が日本人検体に一例検出され、その TS6 $\beta$ -hydroxylation 活性は日本人の野生型の平均値の約 1/3 の低値を示した。一方、日本人、白人種すべての肝ミクロソーム検体の中で、*CYP3A5\*1\*1* の遺伝子型を持つ検体が最も高い MDZ 水酸化活性を示し、1'-hydroxylation 活性については *CYP3A5\*3* との間に比較的明瞭な gene-dose effect が認められた。これらの結果は、*CYP3A4\*6* と *CYP3A5\*3* がヒト肝ミクロソームにおける CYP3A 活性の個人差を決定する重要な要因の一つである可能性を強く示唆するものと考えられた。しかし、*CYP3A4\*6* の頻度はきわめて低いこと、*CYP3A5\*3* の頻度は高いが日本人と白人種間に頻度の差がないことから、これらの遺伝子変異は日本人と白人種間の人種差の原因となる可能性は低いものと考えられた。

A. 研究目的

CYP3A は、多くの医薬品の代謝に重要な役割を果たす CYP subfamily であり、*CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7*, *CYP3A43* の 4 分子種からなる。これらの分子種の中で医薬品の代謝に最も重要なのは *CYP3A4* であり、CYP で代謝を受ける薬物の 50% 以上に関わっているとされている。*CYP3A4* の肝臓における発現量に 10-50 倍のばらつきがあり、クリアランスでも 11-48 倍のばらつきがある。この原因の一つとして遺伝子多型の存在が示唆されているが、これまでに、報告されている *CYP3A4* 遺伝子に関する変異発現頻度の多くは白人種について解析されたものであり、日本人や黒人種に関する情報は極めて少ない。本研究の目的は、白人種、黒人種、日本人のゲノムを対象として、*CYP3A4* の変異遺伝子の発現頻度を解析し、人種間で比較することにより、

CYP3A 活性の人種差を考える基盤となる情報を得ることである。

初年度は、*CYP3A4* 遺伝子の 5'-上流の変異である *CYP3A4\*1B* の発現頻度を解析することにより、本研究で使用するゲノムが、白人種、黒人種、日本人の一般的な母集団であることを確認した。第二年度は、*CYP3A4* の機能低下に関わるとされる変異のうち *CYP3A4\*2*, *CYP3A4\*5*, *CYP3A4\*6* について解析し、人種間での変異発現頻度の比較を行い、さらに、*CYP3A4\*4*, *CYP3A4\*8* の解析について、迅速な解析法である denaturing HPLC 法による DNA フラグメント解析法を確立した。今年度は日本人と白色人種の肝組織を用い、*CYP3A4\*2*, *CYP3A4\*5*, *CYP3A4\*6*, *CYP3A5\*3* が薬物代謝活性に与える影響を白人種間で比較した。

## B. 研究方法

CYP3A4 および CYP3A5 の変異解析は、PCR-RFLP 法および denaturing HPLC 法により行った。すなわち、ゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、得られた PCR 産物をそれぞれ *Sty I* あるいは *Cla I* で制限酵素処理することにより変異の有無を調べた。CYP3A4\*6 については、PCR-RFLP 法と denaturing HPLC 法を組み合わせた DNA フラグメント解析法により解析した。すなわち、野生型では *Hinf I* により切断されないため、denaturing HPLC 法によりクロマトグラフ上で単一ピークとして検出されるのに対し、CYP3A4\*6 変異型では、二つのピークとして検出されることに基づいて判定した。Testosterone (TS) 6 $\beta$ -hydroxylation 活性、midazolam (MDZ) 1' および 4-hydroxylation 活性は、HPLC により測定した。

## C. 研究結果

日本人および白人種の肝組織由来ゲノム DNA について CYP3A4 の変異遺伝子の頻度を調べた結果、CYP3A4\*2 および CYP3A4\*5 は、解析した日本人 19 検体 および白人種 36 検体の全てにおいて検出されなかった。一方、CYP3A4\*6 に関しては、白人種検体で検出されなかったのに対し、日本人では 1 人がヘテロ型として検出され、その TS 6 $\beta$ -hydroxylation 活性は 0.086 nmol/mg protein/min と日本人の野生型の平均値 (0.23 $\pm$ 0.13 nmol/mg protein/min) の約 1/3 の低値を示した。しかし、この検体を除いた日本人 15 検体の TS 6 $\beta$ -hydroxylation 活性の平均値 (0.23 $\pm$ 0.12 nmol/mg protein/min) は白人種 21 検体の平均値 (0.23 $\pm$ 0.19 nmol/mg protein/min) との間で差が認められなかった。

一方、日本人および白人種の肝組織由来ゲノム DNA について CYP3A5\*3 の頻度を調べた結果、日本人が 0.81、白人種が 0.85 であり、これまでの報告とよく一致した値が得られた。また、日本人 (21 検体) においては野生型 CYP3A5\*1 アレルをホモでもつ個体 (CYP3A5\*1/\*1) は確認されなかった

のに対し、白人種 (30 検体) では 1 例 (HHL6) 認められ、その検体の TS 6 $\beta$ -hydroxylation 活性は、全検体中最も高い活性を示し、その値は白人種の平均活性値の約 4 倍であった。次に、MDZ 水酸化活性に関しては、4-hydroxylation 活性の高濃度 (200  $\mu$ M) を除けば、1'-, 4-水酸化いずれの活性についても CYP3A5\*1 をホモで保有する検体が白人種の検体中で最も高い活性を示した。さらに 1'-hydroxylation 活性については、高基質濃度 (200  $\mu$ M)、低基質濃度 (2.5  $\mu$ M) のいずれについても、CYP3A5\*1/\*3 の活性は\*3/\*3 の活性よりも高値を示し、比較的明瞭な gene-dose effect を示した。しかし、TS 6 $\beta$ -hydroxylation 活性と高濃度 (200  $\mu$ M) の MDZ 4-hydroxylation 活性については、CYP3A5\*1/\*3 と\*3/\*3 の間に明らかな差は認められなかった。

## D. 考察

これまでに CYP3A4\*6 の heterozygote の代謝活性は *in vivo* における平均的代謝能の約 15% にまで減少するという報告がある (Hsieh *et al.*, 2001)。しかし、今回見いだされた CYP3A4\*6 の heterozygote (GHL29) の *in vitro* における TS 6 $\beta$ -hydroxylation 活性は平均の約 1/3 程度であった。CYP3A4\*6 は 1 塩基挿入によりフレームシフトが起こり、その結果、ストップコドンを形成する。そのため、CYP3A4\*6 を heterozygote として持つ個体では活性が通常約 1/2 程度に低下するものと予想される。したがって、今回、得られた活性はその予想とほぼ一致するものであった。しかし、CYP3A4\*6 の頻度はきわめて低く、昨年度行った結果では日本人 149 人中 1 人が heterozygote として検出されたのみであった。従って、CYP3A4\*6 は日本人における CYP3A4 の活性低下に一部寄与する可能性はあるものの、頻度がきわめて低いため、日本人と白人種における CYP3A 活性の人種差を説明する主要な要因とはなる可能性は低いものと思われた。

一方、CYP3A subfamily の一分子種である CYP3A5 は個体によっては CYP3A4 と同程



度発現していることもあり、さらに CYP3A4 と類似した基質特異性を示すこともあり、CYP3A 活性に一部寄与している可能性が指摘されている。これまでに、発現系およびヒト肝ミクロソームを用いた検討により、CYP3A5 の TS 6  $\beta$ -hydroxylation 活性は CYP3A4 より高いあるいは同程度であるという報告や低いという報告があり統一した見解は得られていない。しかし、MDZ 1'-hydroxylation 活性については CYP3A5 の活性が CYP3A4 より高いという報告が多く、逆に MDZ 4-hydroxylation 活性は、CYP3A4 よりも低いか同程度であるという報告が多い。今回の結果はこれらの報告とよく一致しており、CYP3A 活性には CYP3A4 と CYP3A5 の両方が寄与しているがその度合は基質により異なり、MDZ 1'-hydroxylation で最も高く、MDZ 4-hydroxylation と testosterone 6  $\beta$ -hydroxylation では MDZ 1'-hydroxylation よりも低いため、MDZ 1'-hydroxylation では高基質濃度、低基質濃度のいずれについても CYP3A5\*3 は比較的明瞭な gene-dose effect を示したのに対し、MDZ 4-hydroxylation 活性については低濃度のみ示し、TS6 $\beta$ -hydroxylation 活性については明瞭な gene-dose effect が認められなかったものと考えられた。実際、MDZ 4-hydroxylation 活性については高濃度時において CYP3A4 活性と高い相関を示すとされており、高濃度の MDZ 4-hydroxylation 活性では \*1/\*3 と \*3/\*3 に差が認められなかったという今回の結果とよく一致するものと考えられた。

#### E. 結論

CYP3A4\*6 は、日本人における CYP3A4 の活性低下に一部寄与する可能性はあるものの、日本人、白人種における頻度がきわめて低いため、両人種における CYP3A 活性の人種差を説明する主要な要因とはなり得ないものと思われた。それに対し CYP3A5 \*3 は頻度が高く CYP3A5 の関与が高い薬物の代謝の個人差には重要な要因となると考えられた。しかし、日本人と白人種にお

ける CYP3A5\*3 の頻度にはほとんど差がないため、個人差の原因とはなっても、人種差の原因になる可能性は低いものと思われる。ただし、黒人種については白人種や日本人と比較して CYP3A5\*3 の頻度が有意に低いことから、日本人あるいは白人種との間に人種差が生じる原因となる可能性を考慮する必要があるものと思われた。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Morita J, Kobayashi K, Wanibuchi A, Kimura M, Irie S, Ishizaki T, Chiba K. A novel single nucleotide polymorphism (SNP) of the CYP2C19 gene in a Japanese subject with lowered capacity of mephobarbital 4'-hydroxylation. Drug Metab Pharmacokinet. 19:236-8,2004
2. Hirota T, Ieiri I, Takane H, Maegawa S, Hosokawa M, Kobayashi K, Chiba K, Nanba E, Oshimura M, Sato T, Higuchi S, Otsubo K. Allelic expression imbalance of the human CYP3A4 gene and individual phenotypic status. Hum Mol Genet. 13:2959-69, 2004
3. Kobayashi K, Morita J, Chiba K, Wanibuchi A, Kimura M, Irie S, Urae A, Ishizaki T. Pharmacogenetic roles of CYP2C19 and CYP2B6 in the metabolism of R- and S-mephobarbital in humans. Pharmacogenetics. 14:549-56, 2004
4. Iida I, Miyata A, Arai M, Hirota M, Akimoto M, Higuchi S, Kobayashi K, Chiba K. Catalytic roles of CYP2C9 and its variants (CYP2C9\*2 and CYP2C9\*3) in lornoxicam 5'-hydroxylation. Drug Metab Dispos. 32:7-9, 2004
5. Morimoto K, Oishi T, Ueda S, Ueda M, Hosokawa M, Chiba K. A novel variant allele of OATP-C (SLCO1B1) found in a Japanese patient with pravastatin-induced myopathy. Drug Metab Pharmacokinet. 19:453-5, 2004

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

別添5

### III 研究成果の刊行に関する一覧表

## 別添5

## 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

なし

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
Takahashi H, Wilkinson GR, Padrini R, Echizen H	CYP2C9 and oral anticoagulation therapy with acenocoumarol and warfarin: similarities yet differences.	Clin Pharmacol Ther.	75	376-80	2004
Takahashi H, Ieiri I, Wilkinson GR, Mayo G, Kashima T, Kimura S, Otsubo K, Echizen H	5'-Flanking region polymorphisms of CYP2C9 and their relationship to S-warfarin metabolism in Caucasian and Japanese patients	Blood	103	3055-3057	2004
N. Kaniwa, K. Kurose, H. Jinnno, T. Tanaka-Kagawa, Y. Saito, M. Saeki, J. Sawada, M. Tohkin and R. Hasegawa	Racial variability in haplotype frequencies of UGT1A1 and glucuronidation activity of a novel SNP 686C>T (P229L) found in an African-American	Drug Metab. Dispos.	33	458-465	2005
Ieiri I, Takane	The MDR1 (ABCB1)	Clin	43	553-576	2004

H, Otsubo K.	gene polymorphism and its clinical implications.	Pharmacokinet			
Kobayashi D, Ieiri I, Hirota T, Takane H, Maegawa S, Kigawa J, Suzuki H, Nanba E, Oshimura M, Terakawa N, Otsubo K, Mine K, Sugiyama Y.	Functional assessment of ABCG2 (BCRP) gene polymorphisms to protein expression in human placenta.	Drug Metab Dispos	33	94-101	2005
Takane H, Kobayashi D, Hirota T, Kigawa J, Terakawa N, Otsubo K, Ieiri I.	Haplotype-oriented genetic analysis and functional assessment of promoter variants in the MDR1 (ABCB1) gene.	J Pharmacol Ther Exp	311	1179-1187	2004
Hirota T, Ieiri I, Takane H, Maegawa S, Hosokawa M, Kobayashi K, Chiba K, Nanba E, Oshimura M, Sato T, Higuchi S, Otsubo K.	Allelic expression imbalance of the human CYP3A4 gene and individual phenotypic status.	Hum Mol Genet	13	2959-2969	2004
Morita J, Kobayashi K, Wanibuchi A, Kimura M, Irie S, Ishizaki T, Chiba K.	A novel single nucleotide polymorphism (SNP) of the CYP2C19 gene in a Japanese subject with lowered capacity of mephobarbital 4'-hydroxylation.	Drug Metab Pharmacokinet.	19	236-8	2004

Kobayashi K, Morita J, Chiba K, Wanibuchi A, Kimura M, Irie S, Urae A, Ishizaki T.	Pharmacogenetic roles of CYP2C19 and CYP2B6 in the metabolism of R- and S-mephobarbital in humans.	Pharmacogenetics.	14	549-56	2004
Iida I, Miyata A, Arai M, Hirota M, Akimoto M, Higuchi S, Kobayashi K, Chiba K.	Catalytic roles of CYP2C9 and its variants (CYP2C9*2 and CYP2C9*3) in lornoxiam 5'-hydroxylation.	Drug Metab Dispos	32	7-9	2004
Morimoto K, Oishi T, Ueda S, Ueda M, Hosokawa M, Chiba K	A novel variant allele of OATP-C (SLCO1B1) found in a Japanese patient with pravastatin-induced myopathy.	Drug Metab Pharmacokinet.	19	453-5	2004
家入一郎 大坪健司	薬物トランスポー ターの遺伝的多型と臨 床的意義	臨床検査	48	139-147	2004

## IV 研究成果の刊行物・別刷

# *CYP2C9* and oral anticoagulation therapy with acenocoumarol and warfarin: Similarities yet differences

Harumi Takahashi, PhD, Grant R. Wilkinson, PhD, DSc, Roberto Padrini, MD, and Hirotochi Echizen, MD *Tokyo, Japan, Nashville, Tenn, and Padova, Italy*

Interindividual variability in drug metabolism presents a major challenge to optimizing therapy for a particular patient. Much effort has gone into identifying the sources of such variability, and in recent years, attention has focused on possible genetic determinants that alter the expression or function of involved enzymes. With the cytochrome P450 (CYP) superfamily of enzymes, genetic polymorphisms such as those with *CYP2C19* and *CYP2D6* are well established, but their overall clinical importance is debatable except in limited instances. However, with *CYP2C9*, there is now considerable evidence that genetic variation may be of more practical significance and importance in optimizing drug therapy. This situation is primarily based on several retrospective studies with warfarin in which drug dosage and adverse events, during both induction and maintenance phases of anticoagulation, have been shown to be associated with the *CYP2C9* genotype; the presence of *CYP2C9\*2* and, to a far greater extent, *CYP2C9\*3* alleles results in greater difficulty and problems in anticoagulation than in wild-type (*CYP2C9\*1/\*1*) homozygotes.<sup>1-3</sup>

From the Department of Pharmacotherapy, Meiji Pharmaceutical University, Tokyo; Division of Clinical Pharmacology, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville; and Department of Pharmacology and Anesthesiology, University of Padova, Padova. Supported by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (12670703); Japanese Research Foundation for Clinical Pharmacology; United States Public Health Service (GM31304); and Ministero della Ricerca Scientifica e Technologica (MURST).

Received for publication Dec 22, 2003; accepted Jan 13, 2004.

Reprint requests: Harumi Takahashi, PhD, Department of Pharmacotherapy, Meiji Pharmaceutical University, Noshio 2-522-1, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan.

E-mail: [harumit@my-pharm.ac.jp](mailto:harumit@my-pharm.ac.jp)

Clin Pharmacol Ther 2004;75:376-80.

0009-9236/\$30.00

Copyright © 2004 by the American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics.

doi:10.1016/j.cjpt.2004.01.007

Warfarin is mainly prescribed in North America and Asia, whereas acenocoumarol is more commonly used in several European countries. These 2 drugs are structurally related, have a mechanism of action similar to that of vitamin K antagonists, and exhibit a marked difference in dosage requirements (up to 10-fold) and unpredictable interindividual variability in anticoagulation response. Furthermore, their metabolism involves *CYP2C9*,<sup>4,5</sup> from which it might be presumed that in the case of acenocoumarol the genetic variability in this enzyme would, as with warfarin, affect the drug's clinical effect. Indeed, 2 articles<sup>6,7</sup> in this issue of the Journal demonstrate this; however, they also indicate that the genetic factor is less important than with warfarin despite the similarities between the 2 drugs.

Morin et al<sup>6</sup> describe an association between several genetic polymorphisms of the *CYP2C9* gene and the immediate anticoagulation response, 24 hours after a single oral dose of acenocoumarol by healthy subjects, as compared with homozygous *CYP2C9\*1/\*1* patients. In addition to coding region variants (*CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3*, and *CYP2C9\*5*), single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the -2.1-kb promoter region were also investigated. The haplotype containing the *CYP2C9\*3* allele was the only one having a statistically significant, albeit limited (14%), contribution to the overall interindividual variability of the anticoagulant response, as measured by a reduction in plasma factor VII activity. Schalekamp et al,<sup>7</sup> in contrast, studied patients during their initial 3 to 6 months of anticoagulation therapy and concluded that the *CYP2C9\*3* allele was associated with a lower stabilization dose and a higher risk of overanticoagulation and that it took longer to reach a state of stabilization. In addition, they also noted that the international normalized ratio (INR) value measured 4 days after initiation of therapy was significantly but modestly higher in *CYP2C9\*3* carriers. In neither study was anticoagulation associated with the *CYP2C9\*2* allele. These *CYP2C9* genotype-anticoagulant response data are different from those

with warfarin, for which both the *CYP2C9\*2* and *CYP2C9\*3* alleles have much more pronounced effects.<sup>1-3</sup> We will comment in brief on this and related issues.

Like warfarin, acenocoumarol is administered as a racemic mixture of *R*- and *S*-enantiomers. However, there are substantial differences in the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics between the 2 drugs. With acenocoumarol, the anticoagulation potencies of the *R*- and *S*-enantiomers are essentially comparable, as indicated by the area under the effect curve (AUEC) of prothrombin time normalized to the area under the plasma concentration-time curve (AUC) of the respective enantiomers (ie, AUEC/AUC) calculated on the basis of previously reported data.<sup>8,9</sup> Furthermore, the mean oral clearance of *S*-acenocoumarol in homozygous wild-type (*CYP2C9\*1/\*1*) subjects is 13-fold greater than that of *R*-acenocoumarol (19.8 L/h versus 1.56 L/h), and its elimination half-life is far shorter (1.0 hours versus 8.8 hours).<sup>10</sup> As a result, the overall anticoagulation response in individuals of this genotype is attributable largely to *R*-acenocoumarol. By contrast, the anticoagulation activity of the *S*-enantiomer of warfarin is 3 to 5 times greater than its antipode.<sup>11</sup> However, its oral clearance in *CYP2C9\*1/\*1* subjects is only 40% greater than that of *R*-warfarin (0.25 L/h versus 0.18 L/h),<sup>12</sup> and the associated elimination half-life (32 hours versus 43 hours) is sufficiently long to produce an anticoagulant response throughout the usual once-daily dosing interval. Thus the intrinsically more potent *S*-warfarin is essentially responsible for the anticoagulant responses to racemic warfarin.

*CYP2C9* is almost exclusively involved in the metabolism of the *S*-enantiomers of both acenocoumarol and warfarin through 6- and 7-hydroxylations.<sup>4,5</sup> On the other hand, other enzymes besides *CYP2C9* (eg, *CYP1A2*, *CYP2C19*, and *CYP3A4*) mediate the metabolism of the *R*-enantiomers of both anticoagulants.<sup>4,5</sup> Accordingly, the genetic polymorphisms of *CYP2C9* would be predicted to have a greater influence on the metabolism and pharmacodynamic response of warfarin compared with acenocoumarol, and this would be more apparent with *CYP2C9\*3* than with *CYP2C9\*2* because of the considerably lower metabolic activity of the former.<sup>13</sup> Indeed, patients with the *CYP2C9\*1/\*3* genotype have an approximately 50% lower mean oral clearance of *S*-acenocoumarol than *CYP2C9\*1/\*1* homozygotes (10.9 L/h versus 19.8 L/h),<sup>10</sup> resulting in 2-fold higher steady-state *S*-acenocoumarol plasma concentrations in such patients relative to those of the homozygous wild-type

genotype. The pharmacokinetics of *R*-acenocoumarol is only modestly affected in *CYP2C9\*1/\*3* heterozygotes<sup>10</sup>; accordingly, the steady-state concentrations of this enantiomer would be minimally different from those in the *CYP2C9\*1/\*1* genotype, and, therefore, its plasma concentrations would still far exceed (>6-fold) those of the *S*-enantiomer. Accordingly, the overall anticoagulation effect (INR) in such heterozygotes is attributable to the sum of the plasma concentrations of *R*- and *S*-acenocoumarol, but this would be similar or only modestly increased compared with wild-type homozygotes.<sup>10</sup> The data of Morin et al<sup>6</sup> are consistent with these pharmacokinetic considerations, in that subjects with the *CYP2C9\*1/\*3* genotype showed only a 15% greater INR value and a 53% greater reduction in factor VII coagulant activity at 24 hours after a single oral dose of the drug. In the single *CYP2C9\*3/\*3* homozygote, the increased effects were still quite modest, consistent with the still dominant role of *R*-acenocoumarol, because it has been estimated that the clearance of the *S*-enantiomer in such individuals is about 20% of that in homozygous wild-type subjects.<sup>10</sup> Nevertheless, Schalekamp et al<sup>7</sup> observed that, in patients treated with acenocoumarol for 3 to 6 months, the *CYP2C9\*3* allele was associated with greater difficulties in empirically determining an optimal anticoagulation dose than in wild-type patients and carriers of the *CYP2C9\*2* allele. In addition, the stabilized dose requirement for *CYP2C9\*3* patients was 20% less than in *CYP2C9\*1/\*1* individuals. With warfarin, however, the reduced metabolic activity of the *CYP2C9\*2* and *CYP2C9\*3* variants also primarily affects only the *S*-enantiomer, which in this case is also the isomer responsible for almost all of the anticoagulation effect, especially in patients carrying these mutations. Thus a 50% lower clearance in *CYP2C9\*1/\*3* patients is associated with a 2-fold reduction in warfarin's maintenance dose compared with that in wild-type homozygotes, and even in *CYP2C9\*2* carriers, the dose is lower.<sup>14,15</sup> In *CYP2C9\*3/\*3* homozygotes an even greater dose reduction (5-fold) is required.<sup>14,15</sup>

Morin et al<sup>6</sup> also investigated SNPs in the -2.1-kb 5'-flanking region that putatively might affect *CYP2C9* expression. As noted previously,<sup>16,17</sup> a number of these were found to be in linkage disequilibrium with common functional SNPs in the coding region, and, therefore, haplotype associations rather than single SNP analyses are, in principle, probably more appropriate for genetic analysis. Morin et al note that just 4 major haplotypes accounted for 97% of the white population; 2 of them were linked with either *CYP2C9\*2* or *CYP2C9\*3*, and in the case of the latter haplotype, the



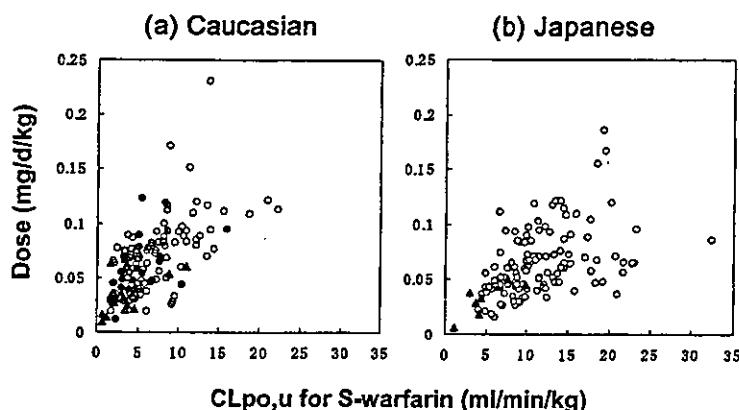


Fig 1. Relationships between unbound oral clearance ( $CL_{po,u}$ ) for *S*-warfarin and daily doses of warfarin in white (Caucasian; a) and Japanese (b) patients of different genotypes: *CYP2C9*\*1/\*1 (open circles), *CYP2C9*\*2 (\*1/\*2 or \*2/\*2) (gray circles), *CYP2C9*\*1/\*3 (gray triangles), *CYP2C9*\*3/\*3 or *CYP2C9*\*2/\*3 (black triangles), and *CYP2C9*\*1/\*11 (black diamond).

consequence of the impaired reduction in the encoded enzyme's activity far exceeded any effect on expression, if it was present. In fact, no 5'-flanking region variants through -2.1 kb that up-regulate *CYP2C9* expression have yet been identified.<sup>16,17</sup> Whether these exist in more distal regions remains to be determined, but such information would possibly provide insights into yet unresolved questions.

Fig 1, for example, shows the relationship between the empirically established daily maintenance doses of warfarin and the unbound clearance of *S*-warfarin obtained in white patients ( $n = 47$ ) and Japanese patients ( $n = 126$ ) in our previous studies<sup>18-20</sup> and in white patients ( $n = 93$ ) reported by Scordo et al.<sup>14</sup> In this figure, variability on the abscissa and ordinate represents that in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin, respectively. Despite significant differences in target INR value (2 to 3 in white patients versus 1.5 to 2.5 in Japanese patients) and body size ( $76.5 \pm 16.6$  kg in white patients versus  $56.7 \pm 11.3$  kg in Japanese patients), a significant relationship linked to *CYP2C9* genotype exists. Given that the dosing rate reflects clearance at steady state and *S*-warfarin's clearance is predominantly *CYP2C9*-mediated, this is not too surprising; that is, patients who require higher doses of warfarin possess greater *CYP2C9* activities. However, it is noteworthy that there is considerable variability within the overall pharmacokinetic and pharmacodynamic relationship and within any particular genotype. Similar interindividual variability in the warfarin dosage requirement among *CYP2C9*\*1/\*1 homozygous patients, who constitute the majority of all

populations studied to date, has also been reported by Daly and King.<sup>15</sup> Furthermore, Morin et al<sup>6</sup> observed marked differences in acenocoumarol's short-term pharmacodynamic response. Because factors such as age, body size, sex, diet, and vitamin K status do not fully account for such apparently non-*CYP2C9*-associated variability,<sup>6,21,22</sup> this strongly suggests that other, currently unknown environmental determinants or possibly unidentified genetic variants may be involved, especially in the 5'-flanking region or the transcriptional regulatory receptors of the gene.<sup>23</sup> These considerations also apply to the significantly greater unbound clearance of *S*-warfarin in *CYP2C9*\*1/\*1 homozygotes of Japanese descent compared with white patients.<sup>20</sup> In addition, the possibility of genetically determined variability in the various proteins involved in the anticoagulant effect, such as vitamin K-dependent coagulation factors,<sup>24</sup> which may contribute to differences in warfarin and acenocoumarol dosage requirements, is a largely unexplored area with regard to interindividual variability in responsiveness.

Finally, the current reports,<sup>6,7</sup> along with additional findings regarding warfarin, acenocoumarol, and other *CYP2C9* substrates,<sup>25-27</sup> clearly indicate that genotype contributes to variability in these drugs' overall pharmacodynamic responses. The critical question, however, is whether this factor is sufficiently determining that knowledge of an individual's *CYP2C9* genotype before prescribing a drug dose would lead to improved optimization of therapy, including a reduced risk of bleeding episodes. Given the implied and possibly significant involvement of nongenetic determinants in

warfarin's anticoagulant effects (Fig 1 and Verstuyft et al<sup>28</sup>), for example, the answer to this question is not self-evident. It is even less apparent for acenocoumarol. An appropriately designed, large, multicenter clinical trial will be required to test this hypothesis and could serve as a bellwether study for the future of genetically based, personalized drug therapy involving interindividual variability in drug metabolism. The design, funding, implementation, and evaluation of such a trial, including pharmacoeconomic issues, for drugs such as warfarin and acenocoumarol, whose patents will have expired, will be difficult; the development of alternative and safer anticoagulants such as direct thrombin inhibitors also complicates the issue. In the absence of such a study, there is the possibility that, as with CYP2C19 and CYP2D6, genetically determined variability in CYP2C9 activity may simply remain an interesting scientific phenomenon with limited clinical application except to explain observations in a limited number of situations.

None of the authors has financial or personal relationships that could be perceived as conflicts of interest.

### References

1. Aithal GP, Day CP, Kesteven P, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 1999;353:717-9.
2. Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, Wittkowsky AK, Srinouanprachanh SL, Farin FM, et al. Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA* 2002;287:1690-8.
3. Peyvandi F, Spreafico M, Siboni SM, Moia M, Mannucci PM. CYP2C9 genotypes and dose requirements during the induction phase of oral anticoagulant therapy. *Clin Pharmacol Ther* 2004;75:198-203.
4. Rettie AE, Korzekwa KR, Kunze KL, Lawrence RF, Eddy AC, Aoyama T, et al. Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P-450: a role for P-4502C9 in the etiology of (S)-warfarin-drug interactions. *Chem Res Toxicol* 1992;5:54-9.
5. Thijssen HH, Flinois JP, Beaune PH. Cytochrome P4502C9 is the principal catalyst of racemic acenocoumarol hydroxylation reactions in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2000;11:1284-90.
6. Morin S, Bodin L, Lioriot MA, Thijssen HHW, Robert A, Strabach S, et al. Pharmacogenetics of acenocoumarol pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* 2004;75:403-14.
7. Schalekamp T, van Geest-Daalderop JHH, de Vries-Goldschmeding H, Conemans J, Bernsen MJ, de Boer A. Acenocoumarol stabilization is delayed in CYP2C9\*3 carriers. *Clin Pharmacol Ther* 2004;75:394-402.
8. Meinertz T, Kasper W, Kahl C, Jähnchen E. Anticoagulant activity of the enantiomers of acenocoumarol. *Br J Clin Pharmacol* 1978;5:187-8.
9. Godbillon J, Richard J, Gerardin A, Meinertz T, Kasper W, Jähnchen E. Pharmacokinetics of the enantiomers of acenocoumarol in man. *Br J Clin Pharmacol* 1981;12:621-9.
10. Thijssen HHW, Ritzen B. Acenocoumarol pharmacokinetics in relation to cytochrome P450 2C9 genotype. *Clin Pharmacol Ther* 2003;74:61-8.
11. Breckenridge A, Orme M, Wesseling H, Lewis RJ, Gibbons R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the enantiomers of warfarin in man. *Clin Pharmacol Ther* 1974;15:424-30.
12. O'Reilly RA. Studies on the optical enantiomorphs of warfarin in man. *Clin Pharmacol Ther* 1974;16:348-54.
13. Haining RL, Hunter AP, Veronese ME, Trager WF, Rettie AE. Allelic variants of human cytochrome P450 2C9: Baculovirus-mediated expression, purification, structural characterization, substrate stereoselectivity, and prochiral selectivity of the wild-type and I359L mutant forms. *Arch Biochem Biophys* 1996;333:447-58.
14. Scordo MG, Pengo V, Spina E, Dahl ML, Gusella M, Padrini R. Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on warfarin maintenance dose and metabolic clearance. *Clin Pharmacol Ther* 2002;72:702-10.
15. Daly AK, King BP. Pharmacogenetics of oral anticoagulants. *Pharmacogenetics* 2003;13:247-52.
16. Shintani M, Ieiri I, Inoue K, Mamiya K, Ninomiya H, Tashiro N, et al. Genetic polymorphisms and functional characterization of the 5'-flanking region of the human CYP2C9 gene: in vitro and in vivo studies. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70:175-82.
17. Takahashi H, Ieiri I, Wilkinson GR, Mayo G, Kashima T, Kimura S, et al. 5'-Flanking region polymorphisms of CYP2C9 and their relationship to S-warfarin metabolism in Caucasian and Japanese patients. *Blood* 2004;103:3055-7.
18. Takahashi H, Kashima T, Nomizo Y, Muramoto N, Shimizu T, Nasu K, et al. Metabolism of warfarin enantiomers in Japanese patients with heart disease having different CYP2C9 and CYP2C19 genotypes. *Clin Pharmacol Ther* 1998;63:519-28.
19. Takahashi H, Kashima T, Nomoto S, Iwade K, Tainaka H, Shimizu T, et al. Comparisons between in-vitro and in-vivo metabolism of (S)-warfarin: catalytic activities of cDNA-expressed CYP2C9, its Leu<sub>359</sub> variant and their mixture versus unbound clearance in patients with the corresponding CYP2C9 genotypes. *Pharmacogenetics* 1998;8:365-73.
20. Takahashi H, Wilkinson GR, Caraco Y, Muszkat M, Kim RB, Kashima T, et al. Population differences in S-warfarin metabolism between CYP2C9 genotype-matched Caucasian and Japanese patients. *Clin Pharmacol Ther* 2003;73:253-63.
21. Loebstein R, Yonath H, Peleg D, Almog S, Rotenberg M, Lubetsky A, et al. Interindividual variability in sensitivity

- to warfarin: nature or nurture? *Clin Pharmacol Ther* 2001;70:159-64.
22. Kamali F, Khan TI, King BP, Frearson R, Kesteven P, Wood P, et al. Contribution of age, body size, and *CYP2C9* genotype to anticoagulant response to warfarin. *Clin Pharmacol Ther* 2004;75:204-12.
  23. Ferguson SS, Lecluyse EL, Negishi M, Goldstein JA. Regulation of human *CYP2C9* by the constitutive androstane receptor: discovery of a new distal binding site. *Mol Pharmacol* 2002;62:737-46.
  24. Shikata E, Ieiri I, Ishiguro S, Aono H, Inoue K, Koide T, et al. Association of pharmacokinetic (*CYP2C9*) and pharmacodynamic (vitamin K-dependent protein-Factors II, VII, IX and X, proteins S and C and  $\gamma$ -glutamyl carboxylase) gene variants with warfarin sensitivity. *Blood* 2004;103:2630-5.
  25. Odani A, Hashimoto Y, Otsuki Y, Uwail Y, Hattori H, Furusho K, et al. Genetic polymorphism of the *CYP2C* subfamily and its effect on the pharmacokinetics of phenytoin in Japanese patients with epilepsy. *Clin Pharmacol Ther* 1997;62:287-92.
  26. Kirchheiner J, Brockmüller J, Meineke I, Bauer S, Rohde W, Meisel C, et al. Impact of *CYP2C9* amino acid polymorphisms on glyburide kinetics and on the insulin and glucose response in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2002;71:286-96.
  27. Uchida S, Watanabe H, Nishio S, Hashimoto H, Yamazaki K, Hayashi H, et al. Altered pharmacokinetics and excessive hypotensive effect of candesartan in a patient with the *CYP2C9*\*1/\*3 genotype. *Clin Pharmacol Ther* 2003;74:505-8.
  28. Verstuyft C, Robert A, Morin S, Loriot MA, Flahault A, Beaune P, et al. Genetic and environmental risk factors for oral anticoagulant overdose. *Eur J Clin Pharmacol* 2003;58:739-45.

## Brief report

5'-Flanking region polymorphisms of *CYP2C9* and their relationship to S-warfarin metabolism in white and Japanese patients

Harumi Takahashi, Ichiro Ieiri, Grant R. Wilkinson, Gail Mayo, Toshitaka Kashima, Sosuke Kimura, Kenji Otsubo, and Hirotochi Echizen

White and Japanese patients require different warfarin dosages to achieve therapeutic anticoagulation, but this can be only partly explained by genetic variability in the coding region of *CYP2C9*—a critical enzyme in the drug's metabolism. Accordingly, analysis of the -2.1-kb 5'-flanking region of *CYP2C9* was undertaken in 22 white and 38 Japanese patients whose unbound oral clearance of S-warfarin had been previously deter-

mined. Thirteen single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified, some of which were in linkage disequilibrium with functionally defective coding region variants. Those 5'-flanking patterns linked with at least one *CYP2C9\*3* allele or *CYP2C9\*2\*3* were associated with reduced *CYP2C9* activity and warfarin dose. Japanese patients possessing the wild-type promoter and coding sequences had significantly ( $P < .01$ ) greater *CYP2C9* ac-

tivity than white patients with the corresponding genotype. In conclusion, either unidentified polymorphisms further upstream in the promoter region or environmental factor(s) account for the differences in the warfarin doses between whites and Japanese. (Blood. 2004;103:3055-3057)

© 2004 by The American Society of Hematology

## Introduction

Population differences in the drug-metabolizing enzymes are important in bridging therapeutic doses and safety profiles of drugs from one population to another. Warfarin is a widely used oral anticoagulant and its effect is largely attributable to the pharmacologically more active S-enantiomer.<sup>1</sup> Recently, we observed that Japanese patients receiving warfarin therapy had a significantly greater body weight-normalized plasma unbound clearance (CL<sub>po,u</sub>) of S-warfarin than white patients,<sup>2</sup> which is predominantly reflective of *CYP2C9*-mediated hepatic metabolism.<sup>3</sup> At present, 11 coding region variant alleles of the gene have been reported.<sup>4</sup> Because whites have greater allelic frequencies than Southeast Asians<sup>5</sup> of the 2 most common functionally defective variants (*CYP2C9\*2* and *CYP2C9\*3*), it is possible that the population differences in S-warfarin metabolism may be attributed to this distribution difference. However, in our previous study a difference in S-warfarin metabolism was noted even when the 2 populations were matched with respect to the homozygous wild-type *CYP2C9* genotype (*CYP2C9\*1/\*1*).<sup>2</sup> This indicates that such a coding region polymorphism cannot fully account for the population differences in the *CYP2C9* activity. Recently, Shintani et al<sup>6</sup> reported 7 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the 5'-flanking region of *CYP2C9* in Japanese subjects, some of which were associated with an altered level of gene transcription. Accordingly, we investigated SNPs within the -2.1-kb promoter region of *CYP2C9* in white and Japanese patients receiving warfarin and assessed their contribution to the variability of in vivo *CYP2C9* activity within and between the 2 populations.

## Study design

The promoter region analysis was performed in the participants of an earlier investigation,<sup>2</sup> 22 white (9 men and 13 women) and 38 Japanese patients (25 men and 13 women), whose DNA samples were available. Details of the study have been reported.<sup>2</sup> Briefly, the subjects were recruited at Vanderbilt University Hospital (Nashville, TN), and the International Medical Center of Japan. All patients received a constant oral dose of racemic warfarin once daily for at least 1 month before blood sampling. None had impaired hepatic function. Informed consent was obtained from each patient and the study protocol was approved by the institutional review boards at both institutions. Blood samples were obtained from patients at approximately 16 hours after oral administration of the last dose of warfarin. These samples were analyzed for the separate R- and S-enantiomers of warfarin, along with the extent of their plasma binding, resulting in estimates of the plasma unbound concentration (Cu) and unbound clearance (CL<sub>po,u</sub>) of S-warfarin.<sup>7-9</sup>

Variants in the 5'-flanking region of *CYP2C9* up to -2137 bp were analyzed according to the method of Shintani et al<sup>6</sup> using DNA previously collected from the patients.<sup>2</sup> Coding region SNPs (*CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3*, *CYP2C9\*4*, *CYP2C9\*5*, and *CYP2C9\*6*) were analyzed as previously described.<sup>2</sup>

Population differences in the mean values were compared using an unpaired Student *t* test. Multiple comparisons for the mean CL<sub>po,u</sub> for S-warfarin and other parameters obtained from different genotypes within each population were performed by analysis of variance followed by the Tukey-Kramer test. A *P* value of less than .05 was considered statistically significant.

From the Department of Pharmacotherapy, Meiji Pharmaceutical University, Tokyo, Japan; the Department of Hospital Pharmacy, Faculty of Medicine, Tottori University, Tottori, Japan; the Division of Clinical Pharmacology, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN; and the Department of Cardiovascular Surgery, International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan.

Submitted July 30, 2003; accepted November 17, 2003. Prepublished online as Blood First Edition Paper, December 30, 2003; DOI 10.1182/blood-2003-07-2521.

Supported by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (no. 12670703), the Japanese Research Foundation

for Clinical Pharmacology, and the United States Public Health Service (no. GM31304).

Reprints: Hirotochi Echizen, Department of Pharmacotherapy, Meiji Pharmaceutical University, Noshio 2-522-1, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan; e-mail: echizen@my-pharm.ac.jp.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2004 by The American Society of Hematology