

(*HNF4A*, *TNFAIP3*, *IPF1*, *HMOX1*, *GPX1*)
につき多型解析を終了し、順次、解析対象とするタグ多型を同定した。またこれらタグ多型のタイピング系を一部開発し、さらに *IRS1* や *WFS1* の既知多型も含め、SU 剤の二次無効患者および対象患者につき、多型タイピングを開始した。また、アフィメトリクス 500 K チップを用いた網羅的遺伝子多型解析も開始した。

B. 研究方法

1) シーケンシングによる遺伝子多型同定、連鎖不平衡解析、及びハプロタイプ解析

検体は、分担研究者である国立国際医療センター研究所・安田和基部長及び協力研究者である国立医薬品食品衛生研究所・頭金正博室長を通じて練馬総合病院より供与頂いたもの（それぞれ計 158 及び 60 検体）の一部を解析した。

CYP2C9, *CYP2C19*, *ABCC8*, *KCNJ11*, *HNF4A*, *TNFAIP3*, *IPF1*, *HMOX1*, *GPX1* のシーケンシングの概略は以下の通りである。対象領域はエクソン部分およびその近傍のイントロン部分、並びに既知のプロモーター領域及びエンハンサー領域とした。ゲノム DNA (約 50-150 ng) を用いて、ミックスプライマー法またはロングレンジ PCR 法にて、まず第 1 段目の増幅を行った。ミックスプライマー法 (*CYP2C9*, *CYP2C19*, *HNF4A*) の場合には、各エクソン (領域) を増幅するプライマーセットを混ぜたものを用い、Ex-Taq DNA polymerase (宝バイオ株、滋賀) により増幅反応を行った。PCR 反応は 94°C で 5 分処理後、94°C で 30 秒、60°C で 1 分、及び 72°C で 2 分を 30 サイクル行い、最後に 72°C で 7

分処理した。一方、ロングレンジ PCR 法 (*ABCC8*, *HMOX1*, *TNFAIP3*, *GPX1*) の場合には、約 3-20 kb の領域につき、Z-Taq DNA polymerase (宝バイオ株) を用いて増幅反応を行った。PCR 反応は 98°C で 5 秒、55°C で 5 秒、及び 72°C で 190 秒を 30 サイクル行った。なお、エクソン数が少ない *IPF1* 及び *KCNJ11* については、1 段目の PCR 反応は行わなかった。第 2 段目の PCR 反応は各エクソン (領域) を増幅するために行った。即ち、第 1 段目の PCR 産物等を一部用いて、Ex-Taq により増幅反応を行った。PCR 反応は 94°C で 5 分処理後、94°C で 30 秒、60°C で 1 分、及び 72°C で 2 分を 30 サイクル行い、最後に 72°C で 7 分処理した。PCR 産物を PCR Product Pre-Sequencing Kit (USB Co., Cleveland, OH, USA) にて処理した後、ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いたサイクルシーケンシング反応を行った。反応液を DyeEx96 Kit (Qiagen, Hilden, Germany) にて処理し過剰の塩基等を除いた後、ABI Prism 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) にて配列を解析した。まれに検出された多型については、再度ゲノム DNA からの増幅・シーケンシングを行い、その存在を確認した。

連鎖不平衡解析はソフトウェア SNPalyze (Dynacom, Yokohama, Japan) により行い、 $|D'|$ 値および r^2 値で連鎖の強さを評価した。解析の結果を視覚的に表示するため、 $|D'|$ 値および r^2 値の大きさ (0~1) を 10 段階の青色の濃さで表すマクロを MS Excel を用いて開発したものを使用した。さらにハプロタイプ解析をソフトウェア LDSUPPORT (Kitamura Y. et al., *Ann. Hum. Genet.* 66: 183-193 (2002)) により行った。

2) タイピング系の開発と検体解析

TNFAIP3 については、ハプロタイプ解析結果に基づき、パイロシーケンシング法による簡便なタイピング系を開発し、二次無効との相関解析に利用した。即ち、頻度約 2%以上のコモンハプロタイプ 5 種及びまれではあるがアミノ酸置換を伴うハプロタイプ 3 種を検出するための 7 種のタグ多型を対象とした。まず各多型部位を含む約 500-700 bp の断片をゲノム DNA (約 15 ng) より Ex-Taq を用いて特異的に増幅した。この際、それぞれのプライマーのいずれか一方は、ビオチンラベルしたものを用いた。PCR 条件は 94°C で 5 分処理後、94°C で 30 秒、55°C で 45 秒、72°C で 30 秒を 50 サイクル行い、最後に 72°C で 5 分処理した。PCR 産物を 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl, 0.05% Tween 20 を含む 5 mM Tris-HCl (pH 7.6) 中で Streptavidin-Sepharose High Performance (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) と 10 分インキュベートして結合させ、MultiScreen-HV Plate (Millipore Corp., Billerica, MA, USA) に移した。0.2 M NaOH を添加して 1 分間処理することにより 1 本鎖化し、さらに洗浄後、2 mM Mg-acetate を含む 20 mM Tris-acetate (pH 7.6) 中でビーズを懸濁し 96-well PSQ plate (Biotage AB, Uppsala, Sweden) に移した。シーケンシングプライマーを 10 pmol 分加え、95°C で 2 分間処理した後、室温まで冷却し、シーケンシングプライマーと PCR 産物をハイブリダイズさせた。これを PSQTM96MA (Biotage AB) 及び PSQ 96 SNP Reagent Kit (Biotage AB) を用いてミニシーケンシング反応を行い多型を解析した。なお、ゲノム DNA は分担研究者である国立国際医療センター研究所・安田和基部長より供与された SU 剤の二次無効患者群 24 名

および対象患者群 60 名分を解析した。

同タイピング系は、*IAPP* の Ser20Gly 多型についても開発・検体解析を行った。

3) Taq-Man 法による遺伝子多型タイピング

二次無効との相関解析のため、Taq-Man SNP Genotyping Assay Kit (Applied Biosystems) を用いたタイピングを、SU 剤の二次無効群および対象群のゲノム DNA 84 検体につき、*IRS1* 及び *WFS1* の既知多型各 1 種につき、添付のマニュアル通り行い解析した。

4) ゲノム網羅的遺伝子多型解析

二次無効との相関解析のため、Human Mapping 500K (*Nsp, Sty*) Array (Affymetrix Japan Inc., 東京) を用いたゲノム網羅的遺伝子多型解析を、添付のマニュアル通り、SU 剤の二次無効群および対象群のゲノム DNA につき開始した。

5) *CYP2C9* の新規遺伝子多型の機能解析

pcDNA3.1 ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) に組み込んだ野生型 *CYP2C9* cDNA を鋳型として、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) にて解析対象とした 7 種の塩基置換を導入した。プラスミドを調製後、配列確認を行った。アフリカミドリザルの腎臓細胞株 COS-1 は 10% ウシ胎児血清及び 100 U/ml ペニシリン及び 0.1 mg/ml ストレプトマイシンを含む DMEM 培地にて 5% CO₂ 存在下培養した。トランスフェクションの 24 時間前に 2.4 x 10⁶ 細胞を 10 cm dish にまき直した。トランスフェクションは 14 µg のプラスミド DNA を用いて Lipofectamine 2000 (Invitrogen) にて、OPTI-MEM 培地中で行った。28 時間イン

キュベートした後、細胞を氷冷した PBS (pH 7.4)にて洗浄後、0.25 M Sucrose, 25 mM KCl, 0.5 mM EDTA を含む 50 mM Kpi-buffer (pH 7.4)中でスクレーパーにて剥がし、ホモジナイズ・超音波処理して破碎した。4°Cにて 9,000 g x 10 分間遠心後の上清を、105,000 g x 1 時間遠心し、さらに 1 回洗浄した後、その沈殿を 100 mM Kpi-buffer (pH 7.4)に懸濁しミクロソーム画分とした。また、別途、mRNA 定量のため全 RNA 画分を RNeasy Kit (Qiagen)にて調製し、さらに DNase (Invitrogen) 処理した。

mRNA レベルの定量は、High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems)を用いて逆転写後、TaqMan Gene Expression Assay (Hs01682803_mH, Applied Biosystems)により行い、TaqMan β -actin control 試薬 (Applied Biosystems)により定量した β -actin mRNA レベルで補正した。

蛋白質レベルの測定は、30 μ g のミクロソーム画分につき、ヤギ抗 CYP2C6 抗血清 (第一化学薬品株、東京) 及び西洋わさびペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヤギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Lab. West Grove, PA, USA) を用いたイムノブロット法により行い、CYP2C9 の発現量が既知の、ヒト CYP2C9 発現リンパ球細胞のミクロソーム画分 (BD Gentest, Woburn, MA, USA) と比較することにより定量した。

活性測定は CYP2C9 の典型的基質であるジクロフェナクを用いて行った。即ち、2.5 - 100 μ M のジクロフェナク、150 μ g のヒト NADPH-P450 還元酵素発現ミクロソーム画分 (BD Gentest) 、NADPH-regenerating システムを含む 500 μ l の 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)を 37°Cで 5 分間加温した後、CYP2C9 発現 COS-1 細胞のミクロソーム画分を 400 μ g 加えて反応を開始

し、さらに 37°Cで 50 分間インキュベートした。100 μ l のアセトニトリル - 氷酢酸 (94 : 6, v/v) を加えて攪拌後、6,000 x g で 20 分間、4°Cにて遠心した。その上清をフィルター濾過し高速液体クロマトグラフィーによる分析に供した。分析に用いたカラムは Inertsil ODS-3 (5 μ m, 250 x 4.6 mm i.d., GL サイエンス株、東京)、カラム温度は 50°Cで、1 ml/分の流速下、移動相として 1 mM 過塩素酸を含む 30%アセトニトリル (A)、及びメタノール(B)を用い、20 分間でメタノール(B)を直線的に 30%から 100%にするグラジエントにて溶離した。溶出物は 280 nm の吸収で、原薬及び 4'-ヒドロキシジクロフェナクを測定した。

本反応の速度論的解析は、Prism v3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて Michaelis-Menten プロットを作成し、見かけの K_m 及び V_{max} 値を算出した。インビトロクリアランス値は V_{max}/K_m とした。

(倫理面への配慮)

本研究は患者検体由来のヒトゲノム DNA を対象にし、遺伝子多型解析を行うと共に、臨床データを取り扱うものであり、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」及び「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、研究倫理審査委員会の承認のもとに行った。

C. 研究結果

- 1) シーケンシングによる遺伝子多型同定、連鎖不平衡解析、及びハプロタイプ解析
- a) CYP2C9 : 32 種の新規を含む 62 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴う

ものは 9 種類であり、うち新規は 7 種類であった。活性低下を伴う既知の多型(Ile359Leu)の頻度は 0.03 であった。本多型情報を用いて連鎖不平衡解析を行ったところ、強い連鎖が解析領域全体で認められたため、1 ブロックとしてハプロタイプ解析を行った。その結果、46 種のハプロタイプを推定したが、このうち頻度 3%以上のものは 3 種類、2%以上のものは 5 種類であった。本結果に基づき、5 種類のコモンハプロタイプを同定するためのタグ多型 4 種を同定した。

b) *CYP2C19* : 27 種の新規を含む 48 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは 7 種類であり、うち新規は 4 種類であった。本多型情報を用いて連鎖不平衡解析を行ったところ、強い連鎖が解析領域全体で認められたため、1 ブロックとしてハプロタイプ解析を行った。その結果、31 種のハプロタイプを推定したが、このうち頻度 3%以上のものは 4 種類、2%以上のものは 5 種類であった。本結果に基づき 5 種類のコモンハプロタイプを同定するためのタグ多型 5 種を同定した。

c) *ABCC8* 及び *KCNJ11* : *ABCC8* では 55 種の新規を含む 111 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは 8 種類であり、うち新規は 6 種類であった。*KCNJ11* では 11 種の新規を含む 21 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは既知の 2 種類であった。これら 2 種の遺伝子は染色体上で近傍に位置しているため、一緒に連鎖不平衡解析を行い、4 つの強い連鎖が認

められる領域にブロックを分割し、ハプロタイプ解析を行った。ブロック 1 では頻度 3%以上の 6 種を含む 30 種類を、ブロック 2 では頻度 3%以上の 6 種を含む 17 種類を、ブロック 3 では頻度 3%以上の 5 種を含む 36 種類を、ブロック 4 (このブロックは *KCNJ11* を含む) では頻度 3%以上の 6 種を含む 34 種類を、それぞれ推定した。さらに頻度 3%以上のコモンハプロタイプを同定するためのタグ多型も同定した。

d) *HNF4A* : まずエクソン部分につき解析し、16 種の新規を含む 39 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは 3 種類であり、うち新規は 2 種類であった。本多型情報を用いて連鎖不平衡解析を行い、3 つの強い連鎖が認められる領域にブロックを分割し、ハプロタイプ解析を行った。ブロック 1 では頻度 3%以上の 5 種を含む 10 種類を、ブロック 2 では頻度 3%以上の 3 種を含む 16 種類を、ブロック 3 では頻度 3%以上の 8 種を含む 12 種類を、それぞれ推定した。さらに頻度 3%以上のコモンハプロタイプを同定するためのタグ多型も同定した。

e) *TNFAIP3*: 12 種の新規を含む 18 多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは 4 種類であり、うち新規は 3 種類であった。本多型情報を用いて連鎖不平衡解析を行ったところ、強い連鎖が解析領域全体で認められたため、1 ブロックとしてハプロタイプ解析を行った。その結果、13 種のハプロタイプを推定したが、このうち頻度 3%以上のものは 4 種類、2%以上のものは 5 種類で

あった。本結果に基づき、5種類のコモンハプロタイプを同定するためのタグ多型4種及びアミノ酸置換を伴うハプロタイプ3種を検出するためのタグ多型3種を同定した。

- f) *IPF1* : 6種の新規を含む10多型を同定した。アミノ酸置換を伴うものは検出されなかった。本多型情報を用いて連鎖不平衡解析を行ったところ、強い連鎖が解析領域全体で認められたため、1ブロックとしてハプロタイプ解析を行った。その結果、8種のハプロタイプを推定したが、このうち頻度3%以上のものは4種類であった。本結果に基づき、4種類のコモンハプロタイプを同定するためのタグ多型3種を同定した。
- g) *HMOX1* : 9種の新規を含む15多型を同定した。アミノ酸置換を伴うものは既知の1種類であった。本多型情報を用いて連鎖不平衡解析を行ったところ、強い連鎖が解析領域全体で認められたため、1ブロックとしてハプロタイプ解析を行った。その結果、19種のハプロタイプを推定したが、このうち頻度3%以上のものは5種類であった。本結果に基づき、5種類のコモンハプロタイプを同定するためのタグ多型5種を同定した。
- h) *GPX1* : 4種の新規を含む9多型を同定した。このうちアミノ酸置換を伴うものは既知の2種類であった。本多型情報を用いて連鎖不平衡解析を行ったところ、強い連鎖が解析領域のほぼ全体で認められたため、1ブロックとしてハプロタイプ解析を行った。その結果、7種

のハプロタイプを推定したが、このうち頻度3%以上のものは3種類であった。本結果に基づき、3種類のコモンハプロタイプを同定するためのタグ多型2種を同定した。

2) タイピング系の開発と検体解析

上記項で同定した *TNFAIP3* の7種のタグ多型及び *IAPP* の既知多型1種につき、開発したパイロシーケンシング法によるタイピングを試みたところ、解析した全ての多型及び検体(84例)につき明瞭なタイピング結果が得られた。*TNFAIP3* の *IVS2-94A>G* 及び *IVS5+28C>A* の結果を例として、図1に示した。また、本パイロシーケンシング法による解析結果は直接シーケンス法による結果と完全に一致した。

3) Taq-Man 法による遺伝子多型タイピング

IRS1 の1多型及び *WFS1* の1多型につき、Taq-Man 法によるタイピングを行い、解析した全ての多型及び検体(84例)につき明瞭なタイピング結果が得られた。

4) ゲノム網羅的遺伝子多型解析

Nsp Array を用いて、まず日本人由来樹立細胞株のDNAにつき解析し、アリル判定率が90%程度以上になることを確認した後、検体を用いた解析を開始した。

5) *CYP2C9* の新規遺伝子多型の機能解析

空ベクター、野生型及び7種の変異型 (*Leu17Ile*, *Lys118ArgfsX9*, *Thr130Arg*, *Arg150Leu*, *Gln214Leu*, *Pro279Thr*, *Ala477Thr*) につき解析を行った。まずイムノブロットングにて蛋白発現レベルを解析したところ、野生型、及び *Lys118ArgfsX9* 以外の6種の変異型では発

現が認められ、かつ野生型と 6 種の変異型間で発現レベルに有意差は認められなかった (図 2 A)。一方、Lys118ArgfsX9 では蛋白質が検出できなかつた。なお、小胞体のマーカー蛋白である Calnexin レベルは、サンプル間で差は見られなかつた。一方、mRNA 発現レベルを検討したところ、野生型及び 7 種の変異型間で有意な差は認められなかつた (図 2 B)。

最後にジクロフェナクの 4'-水酸化活性を測定したところ、まず Lys118ArgfsX9 では全く代謝物の生成が認められなかつた。他の 6 種の変異型の中では、野生型に比して、 K_m 値については Gln214Leu 及び Ala477Thr で有意な上昇が、P450 当たりの V_{max} 値では Thr130Arg で有意な低下が、それぞれ認められ、クリアランス (V_{max}/K_m) 値についても Thr130Arg, Gln214Leu 及び Ala477Thr で有意な低下が認められた (図 3, 表 1)。一方、Leu171Ile, Arg150Leu 及び Pro279Thr における各パラメーター値は野生型と同様であった。なお、空ベクターをトランスフェクトした場合の活性は、定量限界値以下であった。

6) グリメピリドの一次無効及び副作用と、ハプロタイプの相関解析

上記 CYP2C9, CYP2C19, ABCC8, KCNJ11 のハプロタイプ解析結果 (134 名分) と HbA_{1c} 値の変化や低血糖発現等の臨床情報との相関解析を、多変量解析手法を用いて開始した。なお、インビトロ機能解析の結果は、本解析を行う際に利用する。

D. 考察

グリメピリドの一次無効及び副作用との

相関を検討するための遺伝子多型解析は、解析が最終段階にある薬物トランスポータ ABCC1 等を含めて、ほぼ終了し、現在、相関解析を行っている。また二次無効との相関を検討するための遺伝子多型解析は、日本人における遺伝子多型情報が不足していた遺伝子群につきシーケンシング解析・ハプロタイプ解析を行い、5 遺伝子で終了・タグ多型の同定を行った。この他、TCF1 等についてもほぼ終了しており、順次、タイプング系の開発・検体解析を行う予定である。さらに HapMap プロジェクト等のデータを活用して、他の候補遺伝子の多型解析も行う。またこれら候補遺伝子の解析に加えて、GeneChip を用いたゲノム網羅的遺伝子多型解析も継続する。

CYP2C9 のインビトロ機能解析では、解析した 7 種の新規多型のうち 1 種で活性の消失が、また 3 種で活性の低下が認められた。活性が消失した Lys118ArgfsX9 は基質やヘムの結合領域を含む約 75%を失う。mRNA の発現は見られたものの、蛋白質は検出されなかつたことから、生成した未成熟蛋白質の分解が亢進している可能性が考えられた。 K_m 値の上昇は 2 種の変異型で認められたが、このうち Ala477Thr は 6 箇所ある CYP2C9 の基質認識領域の 6 番目内に位置するアミノ酸の置換である。Ala から水溶性の Thr に置換されることにより、基質との相互作用が変化した可能性が考えられる。 V_{max} 値が低下した Thr130Arg は CYP2C ファミリーで保存されているアミノ酸部位での置換であり、C-helix に位置する。近傍の多型である Arg144Cys や Arg125His のインビトロ機能解析の報告から、本 Thr130 アミノ酸を含む領域は、酵素活性に必要な NADPH-P450 還元酵素やシクロクロム b5 との会合に関与していると考えられ、Thr130Arg 置換がこれら

補因子との会合に影響を与えることにより酵素活性の低下を招いている可能性が考えられた。活性低下を伴う Ile359Leu を有する患者を含め、これら活性低下を示す多型を有している場合、グリメピリドの血糖降下作用が十分みられる傾向にあり、これらの多型による代謝能低下・薬物血中濃度上昇の可能性が考えられた。またジクロフェナクに対する活性変化が認められなかった Arg150Leu 及び Pro279Thr でも、薬物効果は同程度に強く見られたことから、グリメピリドを基質とした場合には、これらの多型が活性に影響を与える可能性も考えられ、さらなるインビトロ解析が必要である。

今後は二次無効群および対象群の検体数を増やして遺伝子多型解析を継続すると共に、候補遺伝子の多型解析では、対象遺伝子数も大幅に増やす予定である。また、*HNF4A* 及び *TNFAIP-3* については、本年度の解析でアミノ酸置換を伴う新規遺伝子多型を見いだしたため、これらのインビトロ機能解析を行いたい。

E. 結論

SU 剤グリメピリドの一次無効及び副作用との相関解析のため、*CYP2C9*, *CYP2C19*, *ABCC8*, *KCNJ11* の遺伝子多型をグリメピリド投与患者等において同定し、さらにハプロタイプを推定した。これら 4 遺伝子計 6 ブロックのハプロタイプ群につき、相関解析を開始した。また本解析に利用するため、*CYP2C9* で同定したアミノ酸置換を伴う新規遺伝子多型 7 種につき、インビトロ機能解析を行い、うち 4 種で機能低下・消失を確認した。一方、SU 剤の二次無効との相関解析では、5 種の候補遺伝子の多型同定とハプロタイプの推定、並びに一部はタグ多型につきタイピング系の開発を行った。さらに他の遺伝子の既知多型も含め、

検体を用いた多型タイピングを、順次行った。またゲノム網羅的遺伝子多型解析も開始した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H. Fukushima-Uesaka, Y. Saito, K. Maekawa, S. Ozawa, R. Hasegawa, H. Kajio, N. Kuzuya, K. Yasuda, M. Kawamoto, N. Kamatani, K. Suzuki, T. Yanagawa, M. Tohkin, and J. Sawada: Genetic variations and haplotypes of *CYP2C19* in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 20, 300-307, 2005.
- 2) S. Ikeda, K. Kurose, H. Jinno, K. Sai, S. Ozawa, R. Hasegawa, K. Komamura, T. Kotake, H. Morishita, S. Kamakura, M. Kitakaze, H. Tomoike, T. Tamura, N. Yamamoto, H. Kunitoh, Y. Yamada, Y. Ohe, Y. Shimada, K. Shirao, K. Kubota, H. Minami, A. Ohtsu, T. Yoshida, N. Saijo, Y. Saito and J. Sawada: Functional analysis of four naturally occurring variants of human constitutive androstane receptor. *Mol. Genet. Metab.*, 86, 314-319, 2005.
- 3) K. Sai, M. Itoda, Y. Saito, K. Kurose, N. Katori, N. Kaniwa, K. Komamura, T. Kotake, H. Morishita, H. Tomoike, S. Kamakura, M. Kitakaze, T. Tamura, N. Yamamoto, et al.: Genetic variations and haplotype structures of the *ABCB1* gene in a Japanese population: an expanded haplotype block covering the distal promoter region, and associated ethnic differences. *Ann. Hum. Genet.*, in press,

2006.

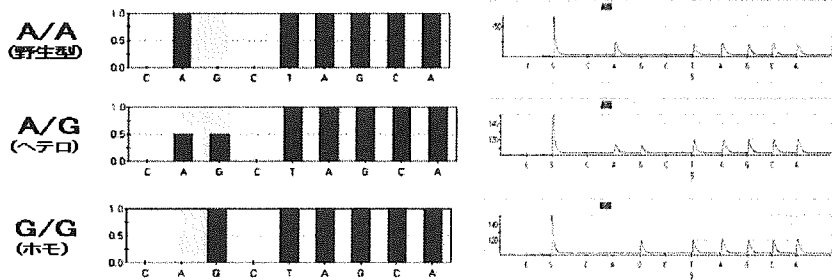
- 4) K. Maekawa, H. Fukushima-Uesaka, M. Tohkin, R. Hasegawa, H. Kajio, N. Kuzuya, K. Yasuda, M. Kawamoto, N. Kamatani, K. Suzuki, T. Yanagawa, Y. Saito and J. Sawada: Four novel defective alleles and comprehensive haplotype analysis of CYP2C9 in Japanese. *Pharmacogenet. Genomics*, in press, 2006.
- 5) H. Fukushima-Uesaka, Y. Saito, K. Maekawa, M. Saeki, N. Kamatani, H. Kajio, N. Kuzuya, K. Yasuda and J. Sawada: Novel genetic variations and haplotypes of hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4A) found in Japanese type II diabetic patients. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, in press, 2006.

2. 学会発表

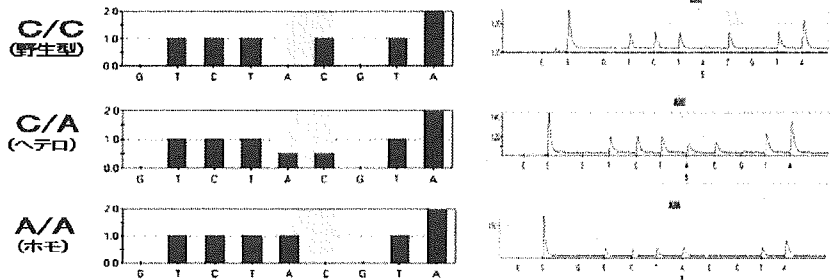
- 1) 斎藤嘉朗、福島（上坂）浩美、前川京子、長谷川隆一、梶尾 裕、葛谷信明、安田和基、川本学、鎌谷直之、鈴木佳寿子、柳川達生、頭金正博、澤田純一：日本人における薬物代謝酵素 CYP2C19 の遺伝子多型探索及びハプロタイプ解析。日本薬学会第 126 年会、仙台、2006 年 3 月。
- 2) 前川京子、福島（上坂）浩美、頭金正博、長谷川隆一、梶尾 裕、葛谷信明、安田和基、川本学、鎌谷直之、鈴木佳寿子、柳川達生、斎藤嘉朗、澤田純一：日本人における薬物代謝酵素 CYP2C9 の遺伝子多型の探索及びハプロタイプ解析。日本薬学会第 126 年会、仙台、2006 年 3 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況なし。

A: IVS2-94A>G: 順鎖



B: IVS5+28C>A: 順鎖

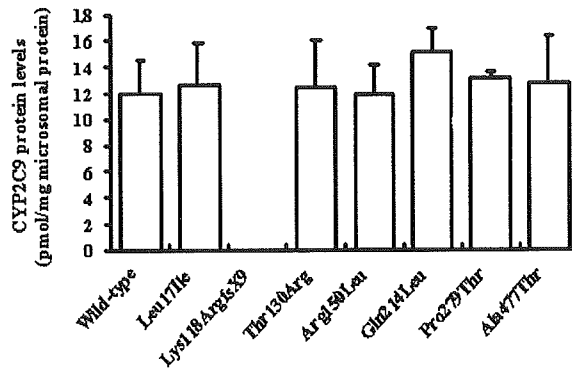


理論的パターン

測定パターン

図1 パイロシーケンシング法による TNFAIP3 多型のタイピング(A: IVS2-94A>G, B: IVS5+28C>A)

A 蛋白質発現レベル



B mRNA 発現レベル

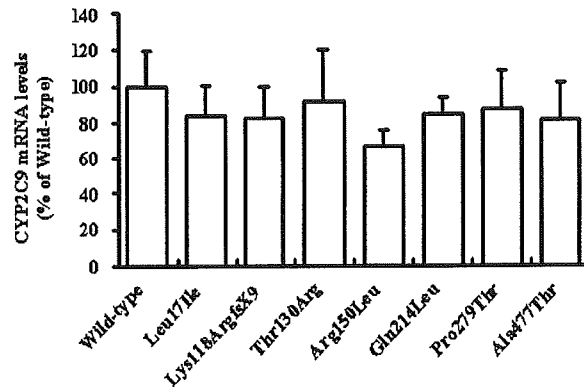


図2 COS-1細胞にトランスフェクションした野生型および置換型CYP2C9のmRNA及び蛋白質発現レベル

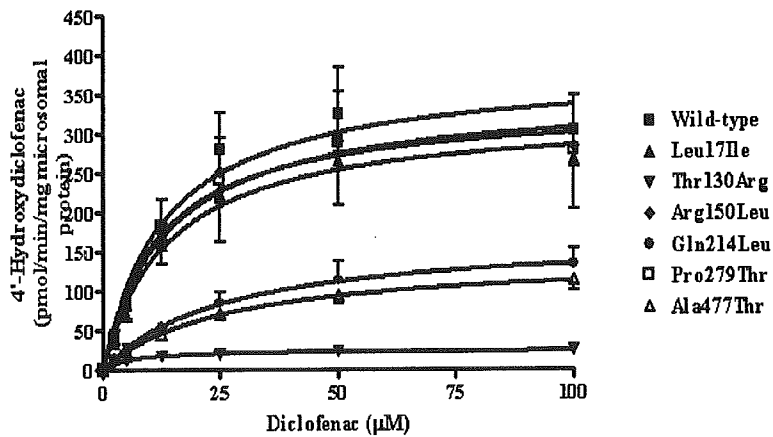


図3 野生型および置換型CYP2C9によるジクロフェナク4'-水酸化反応のミカエリス-メンテン プロット

表1 野生型および置換型CYP2C9によるジクロフェナク4'-水酸化反応の速度論的パラメーター

Amino acid alteration	<i>K_m</i> (μM)	<i>V_{max}</i> (pmol/min/mg protein)	<i>V_{max}</i> (pmol/min/pmol P450)	Clearance (<i>V_{max}</i> / <i>K_m</i>) (μl/min/mg protein)	Clearance (<i>V_{max}</i> / <i>K_m</i>) (μl/min/pmol P450)
Wild type	13.2 ± 1.0	381.7 ± 59.9	32.1 ± 2.4	29.1 ± 5.3	2.4 ± 0.09
Leu17Ile	13.7 ± 2.6	326.0 ± 85.3	27.9 ± 11.5	23.6 ± 2.9	2.0 ± 0.52
Lys118ArgfsX9 (*25)	ND	ND	ND	ND	ND
Thr130Arg (*26)	5.9 ± 2.0	25.9 ± 6.0 ****	2.2 ± 0.7 **	4.7 ± 1.8 ****	0.4 ± 0.22 ****
Arg150Leu (*27)	13.4 ± 3.2	351.2 ± 86.8	31.0 ± 11.8	26.1 ± 0.4	2.2 ± 0.43
Gln214Leu (*28)	25.9 ± 4.5 ***	170.6 ± 31.3 *	11.5 ± 2.4	6.7 ± 1.3 ****	0.5 ± 0.13 ****
Pro279Thr (*29)	11.9 ± 2.7	338.1 ± 34.7	26.0 ± 3.0	29.0 ± 4.4	2.2 ± 0.37
Ala477Thr (*30)	25.9 ± 0.7 ***	142.9 ± 14.7 **	11.7 ± 2.5	5.5 ± 0.6 ****	0.5 ± 0.10 ****

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$ vs. wild type. One-way ANOVA, post-hoc test; Scheffe.

Data is represented by mean ± S.D.

ND: not detected.

インスリン分泌促進型経口糖尿病薬の薬物応答関連遺伝子の多型に関する機能解析

分担研究者 埴岡伸光 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 助教授

研究要旨： 本研究はインスリン分泌促進薬の酸化的代謝に関与するシトクロム P450 2C19 (CYP2C19) の2種の新規変異型遺伝子（仮に *CYP2C19*X* 及び *CYP2C19*Y* と名付ける）の酵素化学的特性を明らかにすることを目的とした。野生型 CYP2C19 (CYP2C19*1A あるいは CYP2C19*1C) cDNA を鋳型にして *CYP2C19*X* 及び *CYP2C19*Y* cDNA を作製し、野生型及び変異型 CYP2C19 酵素蛋白質 (CYP2C19.1A、CYP2C19.1B、CYP2C19.X 及び CYP2C19.Y) を酵母で発現した。酵素機能の解析は *S*-メフェニトインを基質に用いて 4'-水酸化活性を測定することにより行った。ミクロソーム画分の CYP 含量は野生型 (CYP2C19.1A、CYP2C19.1B) に比較して、CYP2C19.X では低下が、CYP2C19.Y では増加が認められた。野生型及び変異型 CYP2C19 酵素はいずれも典型的な Michaelis-Menten プロットを示した。CYP2C19.X 及び CYP2C19.Y の K_m 値は CYP2C19.1A 及び CYP2C19.1B のそれらより高かった。CYP2C19.X の CYP 含量当たりの V_{max} 値は CYP2C19.1A 及び CYP2C19.1B とほぼ同程度の値であったが、CYP2C19.Y は野生型の 50%以下であった。また、CYP2C19.X 及び CYP2C19.Y の CYP 含量当たりの *in vitro* クリアランス値 (V_{max}/K_m) はいずれも野生型より低かった。これらの結果より *CYP2C19*X* 及び *CYP2C19*Y* の遺伝子多型（ハプロタイプ）が引き起こすアミノ酸置換は、CYP2C19 酵素機能を低下させインスリン分泌促進薬の代謝に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。

A. 研究目的

トルブタミド、グリメピリドやグリベンクラミドなどのインスリン分泌促進型経口糖尿病薬 (SU 剤) は2型糖尿病治療の第一選択薬としてよく使用されている。しかし、SU 剤には薬効が強くなることによる低血糖等の副作用が知られており、これが治療における投与規定因子となっている。

SU 剤は主に肝臓に発現しているシトクロム P450 (CYP) により代謝されることが報告されている。なかでも CYP2C 分子種 (CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19) がそれらの代謝に重要な役割を果たしていることが示唆されている。これら CYP2C には遺伝子多型が存在することはよく知られているが、特に CYP2C19 は他の分

子種に比べ報告されている変異型遺伝子の数は多い (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2c19.htm>)。CYP2C19*2A 及び CYP2C19*3 は東洋人で高頻度に出現しており、*S*-メフェニトインの代謝能が極めて低い。本研究が対象としている SU 剤の代謝や低血糖発現にも CYP2C19 の遺伝子多型が何らかの影響を与えることが考えられる。

主任研究者である齋藤らは、グリメピリドを投与中あるいは投与経験のある日本人糖尿病患者から2種の CYP2C19 の新規変異型遺伝子（仮に *CYP2C19*X* 及び *CYP2C19*Y* と名付ける）を見出している。これら変異型遺伝子は野生型の一つである *CYP2C19*1C* のアミノ酸置換に加え、さらに1箇所ずつのアミノ酸置換

を伴っている。本研究では SU 剤による副作用発現と CYP2C19**X* 及び CYP2C19**Y* の遺伝子多型 (ハプロタイプ) の関連性を明確にし、SU 剤の適正投薬法を確立することを目的として、異種細胞発現系で作製した野生型及び変異型 CYP2C19 酵素の機能を S-メフェニトイン 4'-水酸化反応をプローブに用いて解析した。

B. 研究方法

試薬

実験に用いた試薬は以下から購入あるいは供与された。QuikChange site-directed mutagenesis kit : Stratagene ; HindIII、calf intestine alkaline phosphatase (CIAP) 及び DNA ligation kit v2.1 : Takara ; BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit : Applied Biosystems ; NZ アミン : ナカライテスク ; Yeast nitrogen base w/o amino acids : Difco ; Zymolyase : 生化学工業 ; 抗ヒト CYP2C19 抗体 : BD Biosciences Discovery Labware ; ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG : Zymed Laboratories ; ECL plus reagents : Amersham Biosciences ; pGYR1 及び酵母細胞 *Saccharomyces cerevisiae* AH22 株 : 船江良彦教授 (大阪市立大学医学部) ; pcDNA3.1(+)/CYP2C19*1A : Joyce A. Goldstein 博士 (米国国立環境研究所) ; その他の試薬は全て市販特級試薬を使用した。

野生型及び変異型 CYP2C19 プラスミドの作製

pcDNA3.1(+) ベクターに挿入されている CYP2C19*1A cDNA (pcDNA3.1(+)/CYP2C19*1A) を鋳型にして塩基置換を有するプライマーを用いて部位特異的変異導入法により CYP2C19*1C、CYP2C19**X* 及び CYP2C19**Y* プラスミドを作製した。これら塩基置換の導入及び PCR エラーの有無は、BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit を用

いてシーケンシングを行った。得られた CYP2C19*1A、CYP2C19*1C、CYP2C19**X* 及び CYP2C19**Y* のプラスミド DNA は、Fig. 1 に示すように制限酵素 HindIII で消化し、それぞれのインサートを発現ベクター pGYR1 へ挿入し、さらに発現プロモーターに対する CYP2C19 cDNA の挿入方向をシーケンシングにより確認した。

CYP2C19 酵素の発現

酵母細胞の形質転換はリチウム法により行った (*J. Bacteriol.*, 153, 163-168 (1983))。すなわち、YPD 液体培地 2 ml で *Saccharomyces cerevisiae* AH22 株を 30°C で振盪培養し、YPD 液体培地 5 ml に植菌後、対数増殖期 (OD₆₀₀: 0.6-1.0) まで同様に培養した。その酵母培養液 1 ml を 4°C、2000g で 2 分間遠心して集菌し、0.1 M 塩化リチウム 1 ml で懸濁した後、同条件で遠心した。得られた菌体を 1 M 塩化リチウム 20 µl で懸濁し受容菌とした。この受容菌に CYP2C19 が挿入されている pGYR1 プラスミド DNA 及び 70% ポリエチレングリコール溶液 30 µl を加え懸濁後、30°C で 1 時間放置した。次いで滅菌精製水 140 µl を加えて希釈し、SDH 寒天培地に蒔き、30°C で 72 時間培養した。得られたコロニーを SDH 液体培地に植菌し、30°C で 60 時間振盪培養した。その酵母培養液 1 ml を SDH 液体培地 10 ml に植菌し、同条件下 24 時間振盪培養した。次いで、その酵母培養液 5 ml を SDH 液体培地 200 ml に植菌し同条件下 24 時間振盪培養した。さらにその全量を 1.8 l の SDH 液体培地に植菌し、pH 5.5、好氣的条件下で 24 時間培養した。

酵母ミクロソーム画分の調製

Oeda らの方法 (*DNA*, 4, 203-210 (1985)) に準じて行った。上記酵母培養液を 2000g で

20 分間遠心し、得られた菌体を氷冷した精製水で懸濁後、再度同条件で遠心した。上清を除去し、菌体を Solvent A [10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)-2 M D-glucitol-0.1 mM DTT-0.2 mM EDTA] で懸濁後、同条件で遠心した。上清を除去し、菌体を 50 units/ml zymolyase 含有 Solvent A で穏やかに懸濁し、35°C で 90 分間振盪した後、2000g で 10 分間遠心した。上清を除去し、菌体をプロテアーゼ阻害剤 (1 mM EDTA-1 mM PMSF-0.1 µg/ml aprotinase-0.1 µg/ml leupeptin) を含む Solvent B [10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)-0.65 M D-glucitol-0.1 mM EDTA] で穏やかに懸濁後、30 秒間、5 分間隔で 10 回超音波処理を行った。得られたライセートを 9000g で 20 分間遠心分離し、上清を 105000g で 60 分間遠心分離した。得られた沈殿に Buffer C [100 mM phosphate buffer (pH 7.4)-1 mM EDTA-1 mM DTT-20% glycerol] を加え、ホモジナイズし、ミクロソーム画分を調製した。得られたミクロソーム画分は使用するまで -80°C で保存した。タンパク質定量は Lowry 法 (*J. Biol. Chem.*, 193, 1048-1056 (1951)) に従って行った。

還元型 CO 差スペクトルの測定

ミクロソーム画分を Buffer D [100 mM phosphate buffer (pH 7.4)-0.4% Emulgen911-20% glycerol] に懸濁し (10 mg/ml)、Omura と Sato の方法 (*J. Biol. Chem.*, 239, 2370-2378 (1964)) に従って吸収スペクトルを測定した。希釈した試料 1 ml ずつを試料セル及び対照セルに入れ、400~500 nm 間のベースラインを補正した。次いで試料セルのみに一酸化炭素を通じ、両セルに約 1 mg のヒドロサルファイトナトリウムを加え穏やかに混和した後、400~500 nm 間のスペクトルを記録した。得られた 450 及び

490 nm の吸光度差より吸光度係数 $91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて CYP 含量を算出した。

ウェスタンブロット分析

酵母ミクロソームを Laemmli らの方法 (*Nature*, 227, 680-685 (1970)) に準じて 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付した。泳動後、Towbin らの方法 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76, 4350-4354 (1979)) に従いタンパク質を PVDF 膜に転写した。PVDF 膜は一次抗体として抗ヒト CYP2C19 抗体を、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG を加え、室温でインキュベートした。洗浄後、抗体と結合したタンパク質を化学発光法により検出した。

S-メフェニトイン 4'-水酸化活性の測定

S-メフェニトイン 4'-水酸化活性は、Nakajima らの方法 (*Drug Metab. Dispos.*, 26, 261-266 (1998)) に準じて測定した。

上記反応溶液を 37°C で 1 分間プレインキュベートした後、ミクロソーム画分の添加により反応を開始した。5~40 分間のインキュベートの後、ジクロロ

	Final concentration
Kpi buffer (pH 7.4)	50 mM
MgCl ₂	10 mM
G-6-P	10 mM
G-6-PDH	0.5 U/ml
EDTA	0.2 mM
S-Mephenytoin	10-1000 µM
Microsomes	50-2000 µg protein/ml
NADPH	1 mM
Total volume	500 µl

メタン 3 ml を混合することで反応を停止した。内部標準物質として 5 nmol のフェノバルビタールを添加し振盪抽出後、1200g で 10 分間遠心分離した。有機溶媒層を分取し、蒸発乾固させた後、残渣を 50%メタノール 200 µl に溶解して HPLC 用の試料とした。HPLC 条件

は以下に示す。

HPLC conditions

Column: Inertsil ODS 80A
(4.6 mm i.d. × 150 mm)
Column temperature: 40°C
Elution: 20 mM KH₂PO₄ (pH 4.0)-methanol-
acetonitrile (77:6:17, v/v/v)
Flow rate: 1.0 ml/min
Detection: UV 204 nm

データ解析

S-メフェニトイン 4'-水酸化反応の速度論的解析は、Prism v4.0 (GraphPad Software) を用いて Michaelis-Menten プロット及び Eadie-Hofstee プロットを作成し、 K_m 及び V_{max} 値を算出した。*In vitro* クリアランス値は V_{max}/K_m とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、既発表の遺伝子多型に関するインビトロ機能解析のため、倫理面での問題は生じないと考えられる。

C. 研究結果

酵母細胞における野生型及び変異型 CYP2C19 タンパク質の発現

野生型及び変異型 CYP2C19 酵素タンパク質の発現はウェスタンブロット分析により確認した。ネガティブコントロール (pGYR1 のみで形質転換し、酵母細胞で発現したタンパク質) を除きいずれも酵母細胞に CYP2C19 が酵素タンパク質として発現していることを確認した。しかし、それらバンド強度は酵素間で大きく異なっていた (CYP2C19.Y > CYP2C19.1B > CYP2C19.1A > CYP2C19.X)。さらに、還元型 CO 差スペクトルにより各マイクロソーム画分中の機能性 CYP 含量を測定した (Fig. 2)。CYP2C19.1A、CYP2C19.1B、CYP2C19.X 及び CYP2C19.Y の CYP 含量はそれぞれ 12.7、14.0、4.4 及び 76.1 pmol/mg protein であった。

野生型及び変異型 CYP2C19 酵素の機能解析

酵母細胞のマイクロソームに発現した CYP2C19 タンパク質を用いて、S-メフェニトイン 4'-水酸化活性を測定した。Fig. 3 に基質濃度 100 µM で測定した時の代表的な HPLC クロマトグラムを示す。Fig. 4 は 100 µM の基質濃度における CYP2C19.1A に対する CYP2C19.1B、CYP2C19.X 及び CYP2C19.Y の相対的活性を示したものである。マイクロソームタンパク質量当たり及び CYP 含量当たりいずれにおいても CYP2C19.1B は CYP2C19.1A とほぼ同程度の活性値を示した。CYP2C19.X はマイクロソームタンパク質量当たりでは CYP2C19.1A の約 30%の活性であった。一方、CYP2C19.Y のマイクロソームタンパク質量当たりの活性値は CYP2C19.1A の約 1.5 倍あったが、CYP 含量当たりでは逆に約 25%までに低下した。

野生型及び変異型 CYP2C19 の酵素化学的特性をさらに得るために、S-メフェニトイン 4'-水酸化反応の速度論的解析を基質濃度 1~500 µM の範囲で行った。その Michaelis-Menten プロットを Fig. 5 及び Fig. 6 に、算出された速度論的パラメーターを Table 1 に示す。CYP2C19.X 及び CYP2C19.Y の K_m 値は CYP2C19.1A 及び CYP2C19.1B のそれらより高かった。CYP2C19.X の CYP 含量当たりの V_{max} 値は CYP2C19.1A 及び CYP2C19.1B とほぼ同程度の値であったが、CYP2C19.Y は野生型の 50%以下であった。また、CYP2C19.X 及び CYP2C19.Y の CYP 含量当たりの *in vitro* クリアランス値 (V_{max}/K_m) はいずれも野生型より低かった。

D. 考察

本研究で検討した野生型及び変異型いずれの CYP2C19 も酵素タンパク質として発現していることが確認できたが、機能性 CYP 発現量

は酵素間で大きく異なっていた (Fig. 2)。特に CYP2C19.X の CYP 含量は野生型 (CYP2C19.1A, CYP2C19.1B) の 40%以下と低く、CYP2C19*X が引き起こすアミノ酸置換は CYP 含量を顕著に減少させることが示唆された。

CYP2C19 の酵素機能解析は *S*-メフェニトイン 4'-水酸化活性を測定することにより行った。CYP2C19.X 及び CYP2C19.Y の K_m 値は野生型 CYP2C19 より高く、*S*-メフェニトインに対する親和性はアミノ酸置換により低下することが明らかとなった。ミクロソームタンパク質量当たりの V_{max} 値は CYP2C19.X では野生型 CYP2C19 に比較して低く、CYP2C19.Y は逆に高い値を示した。また、CYP2C19.X 及び CYP2C19.Y の CYP 含量当たりの *in vitro* クリアランス値はいずれも野生型より低く、CYP2C19*X 及び CYP2C19*Y におけるアミノ酸置換部位は *S*-メフェニトイン 4'-水酸化反応の触媒活性を規定する重要なアミノ酸残基であることが示唆された。

E. 結論

CYP2C19*X 及び CYP2C19*Y の遺伝子多型 (ハプロタイプ) により引き起こされるアミノ酸置換は、CYP2C19 酵素機能を変動させインスリン分泌促進薬の代謝に何らかの影響を及ぼす可能性が推察された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Isobe, T., Hichiya, H., Hanioka, N., Yamamoto, S., Shinoda, S., Funae, Y., Satoh, T., Yamano, S., and Narimatsu, S. (2005). Different effects of desipramine on bufuralol 1"-hydroxylation by rat and human CYP2D enzymes. *Biol. Pharm. Bull.*

28, 634-640.

2) Narimatsu, S., Takatsu, N., Yamano, S., Inoue, Y., Hanioka, N., Kiryu, K., Naito, S., Gonzalez, F.J., and Yamamoto S. (2006). The effect of dimethyl sulfoxide on the function of cytochrome P450 2D6 in HepG2 cells upon the co-expression with NADPH-cytochrome P450 reductase. *Chem. Biol. Interact.* 159, 47-57.

2. 学会発表

1) Saito, K., Dan, H., Masuda, K., Katsu T., Hanioka, N., Yamamoto, S., and Narimatsu, S.: The role of Glu-300 in stereoselective hexobarbital 3'-hydroxylation by cytochrome P450 2C19. 15th NA ISSX/20th JSSX Meeting, Maui, October, 2005.

2) 奥村佳史, 比知屋寛之, 埴岡伸光, 斎藤嘉朗, 祖山晃子, 上野和行, 澤田純一, 成松鎮雄: 酵母発現 CYP2D6*10 酵素蛋白質のメキシレチン代謝能. 第 44 回日本薬学会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 松山, 2005 年 11 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

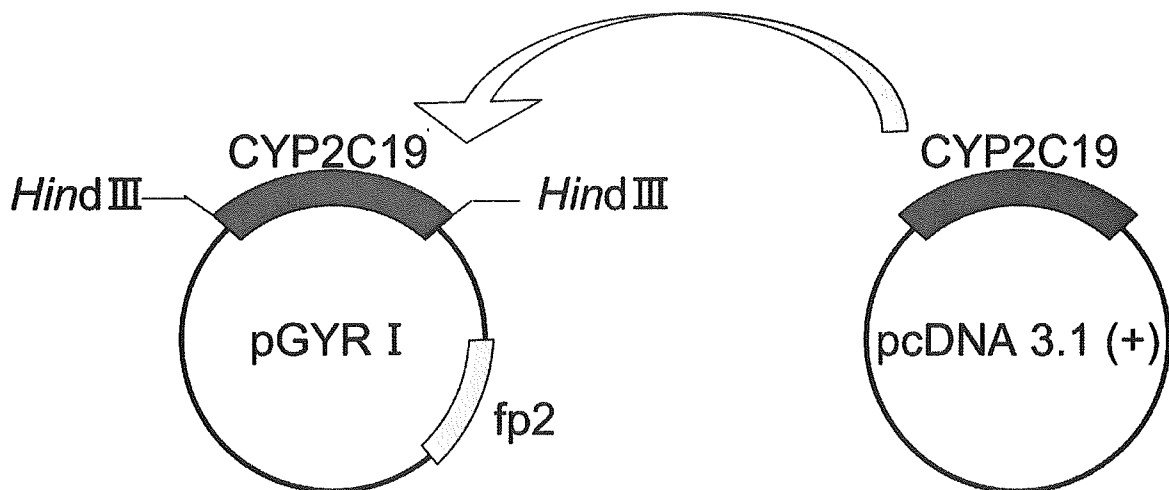


Fig. 1. Subcloning of CYP2C19

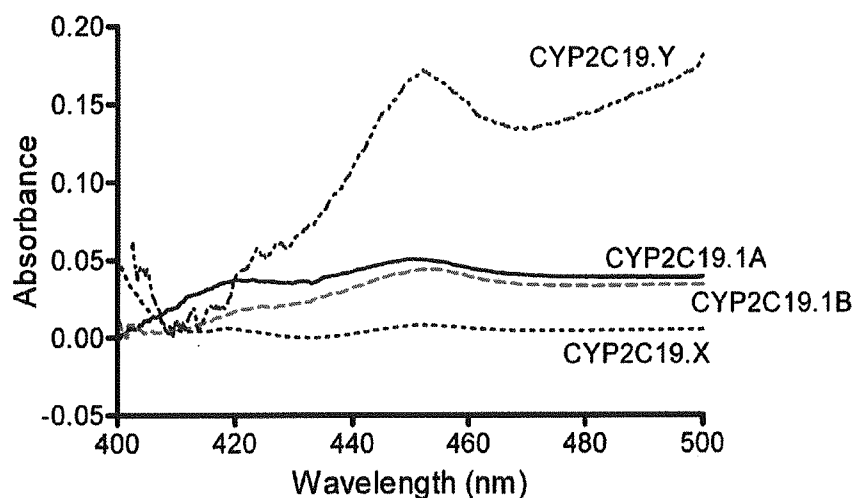


Fig. 2. Reduced CO-difference spectra of microsomes from yeast cells expressing wild-type and variant CYP2C19s.

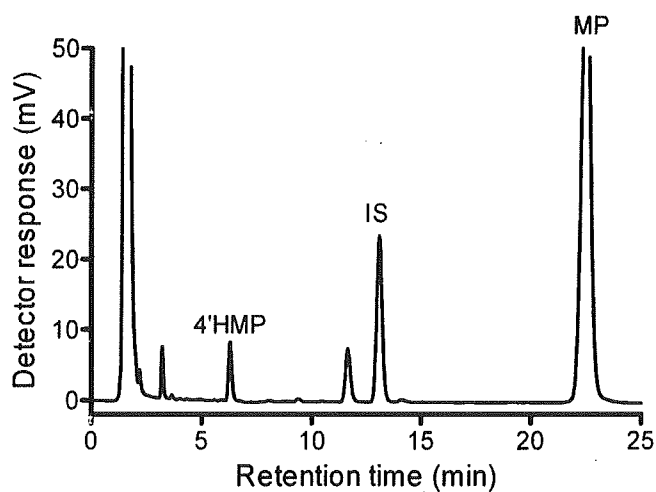


Fig. 3. HPLC chromatogram of *S*-mephenytoin 4'-hydroxylation by microsomes from yeast cells expressing wild-type CYP2C19. The substrate concentration used was 100 μ M. 4'HMP, 4'-hydroxymephenytoin; IS, phenobarbital; and MP, *S*-mephenytoin.

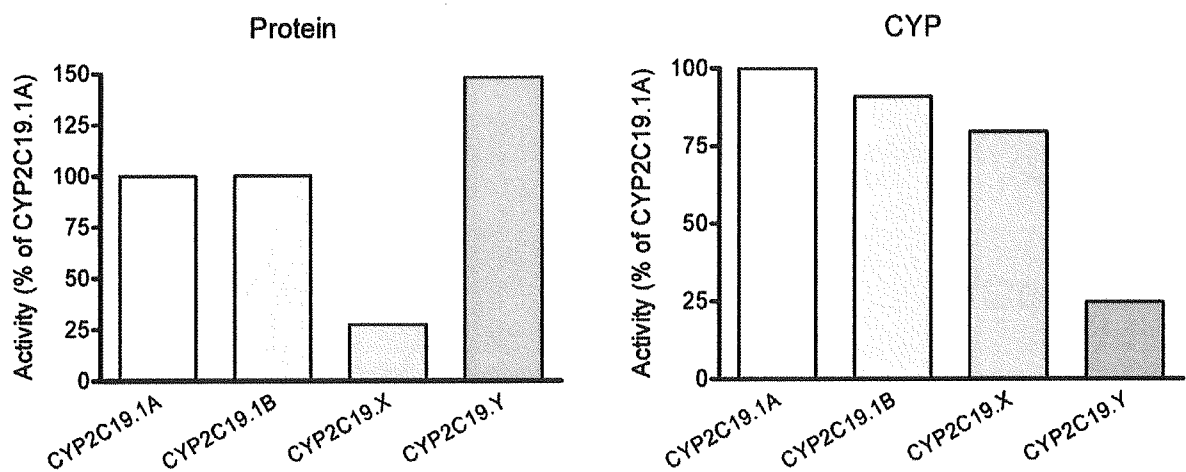


Fig. 4. *S*-Mephenytoin 4'-hydroxylation activities in microsomes from yeast cells expressing wild-type and variant CYP2C19s. The substrate concentration used was 100 μM . The activity of CYP2C19.1A on the basis of the microsomal protein level was 26.7 pmol/min/mg protein. The activity of CYP2C19.1A on the basis of the CYP2C19 was 2.11 pmol/min/CYP2C19.

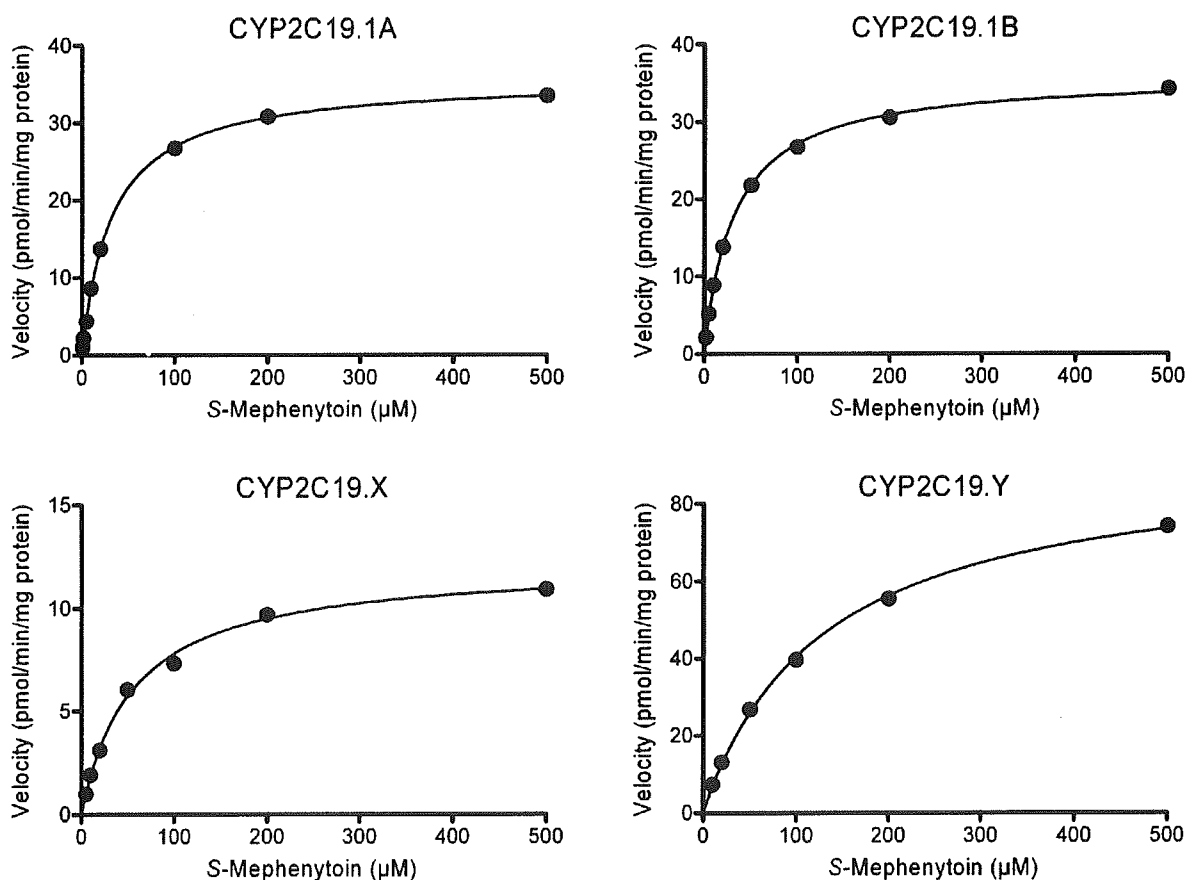


Fig. 5. Michaelis-Menten kinetics for *S*-mephenytoin 4'-hydroxylation by microsomes from yeast cells expressing wild-type and variant CYP2C19s. The results are expressed as pmol/min/mg protein.

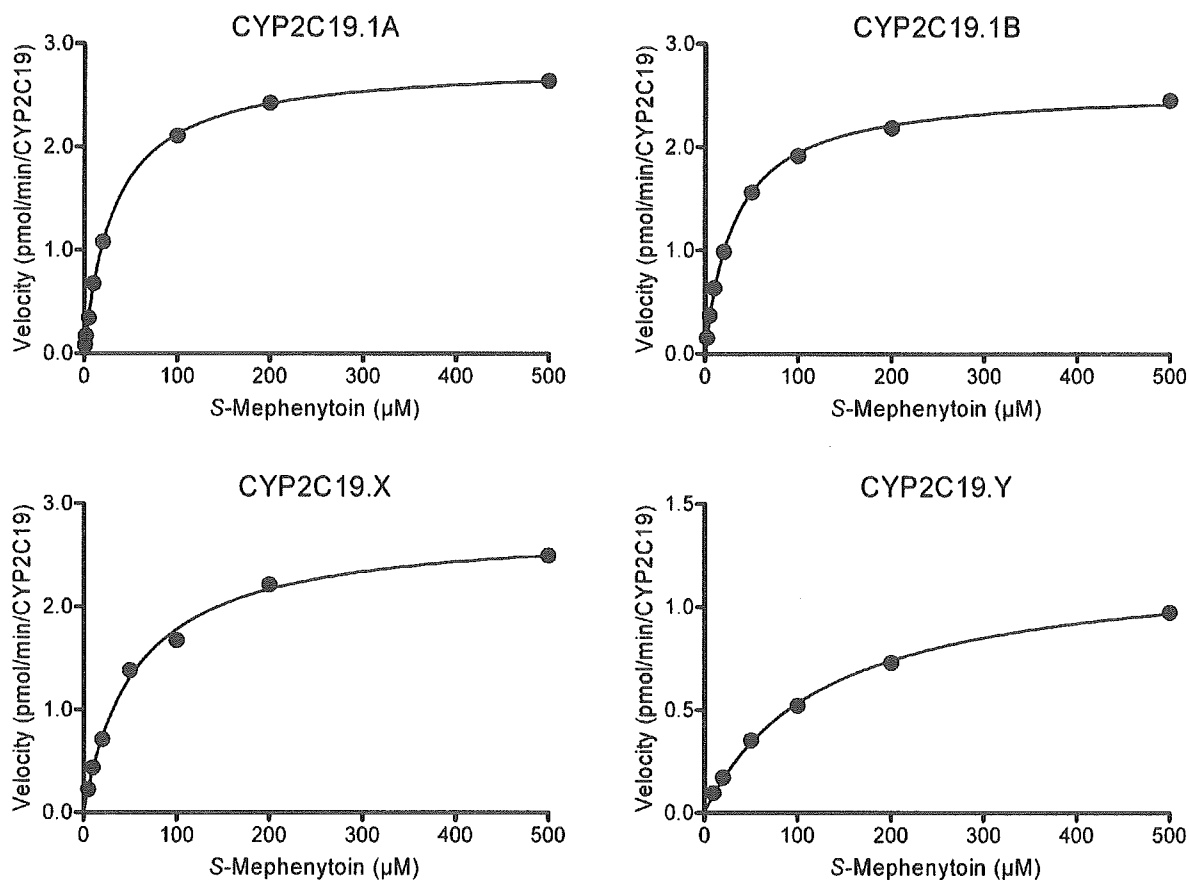


Fig. 6. Michaelis-Menten kinetics for *S*-mephenytoin 4'-hydroxylation by microsomes from yeast cells expressing wild-type and variant CYP2C19s. The results are expressed as pmol/min/CYP2C19.

Table 1. Kinetic parameters for *S*-mephenytoin 4'-hydroxylation by microsomes from yeast cells expressing wild-type and variant CYP2C19s

Variant	K_m^a	V_{max}		V_{max}/K_m	
		Protein ^b	CYP ^c	Protein ^d	CYP ^e
CYP2C19.1A	32.4	35.6	2.81	1.10	86.7
CYP2C19.1B	32.5	35.8	2.59	1.10	79.7
CYP2C19.X	55.9	12.1	2.78	0.22	49.7
CYP2C19.Y	128	92.3	1.21	0.72	9.45

Each value represents the mean of two determinations.

^a μM.

^b pmol/min/mg protein.

^c pmol/min/CYP2C19.

^d nl/min/mg protein.

^e nl/min/CYP2C19.

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Yasuda K. et al.	Genetic variations and haplotypes of <i>CYP2C19</i> in a Japanese population	Drug Metab. Pharmacokin.	20	300-307	2005
Ikeda S, Kurose K, Saito Y, et al.	Functional analysis of four naturally occurring variants of human constitutive androstane receptor	Mol. Genet. Metab.	86	314-319	2005
Isobe T, Hichiya H, Hanioka N, et al.	Different effects of desipramine on bufuralol 1''-hydroxylation by rat and human CYP2D enzymes.	Biol. Pharm. Bull	28	634-640	2005
Narimatsu S, Takatsu N, Yamano S, Inoue, Y., Hanioka N, et al.	The effect of dimethyl sulfoxide on the function of cytochrome P450 2D6 in HepG2 cells upon the co-expression with NADPH-cytochrome P450 reductase.	Chem. Biol. Interact.	159	47-57	2006
Sai K, Itoda M, Saito Y. et al.	Genetic variations and haplotype structures of the <i>ABCB1</i> gene in a Japanese population: an expanded haplotype block covering the distal promoter region, and associated ethnic differences	Ann. Hum. Genet.			in press
Maekawa K, Yasuda K, Saito Y, et al.	Four novel defective alleles and comprehensive haplotype analysis of <i>CYP2C9</i> in Japanese	Pharmacogenet. Genomics			in press
Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Yasuda K. et al.	Novel genetic variations and haplotypes of hepatocyte nuclear factor 4 α (<i>HNF4A</i>) found in Japanese type II diabetic patients	Drug Metab. Pharmacokin.			in press