

分担研究報告書

薬効及び副作用発現の人種差に関わる遺伝子多型に関する研究
リバビリンの肝取り込みに寄与するトランスポーターの同定と人種差の解析

分担研究者 千葉 寛 千葉大学大学院教授

研究要旨

リバビリんと Interferon- α の併用療法は高い奏効率を示すことから、C 型肝炎の標準的治療法となっている。本研究ではリバビリンの肝取り込みに寄与するトランスポーターを同定し、日本人肝臓における発現量と個人差に関する検討を行うことにより、リバビリンの薬効発現に個人差が起こる原因を明らかにするとともに、リバビリンの薬効発現に関連するトランスポーター活性に人種差が存在するか否かを明らかにするための基礎的検討を行った。まず、野生型 MDCK 細胞を核酸系抗癌剤で選択し、内因性核酸トランスポート活性の低い哺乳動物細胞を単離した。得られた MDCK-NTD22 細胞におけるウリジン取り込み活性を比較したところ、MDCK-NTD22 細胞のウリジン取り込み活性は野生型 MDCK 細胞の 15 分の 1 まで低下していることが明らかとなり、本細胞系が核酸トランスポーターの輸送活性を評価する際のホスト細胞として有用であることが示された。次に、リバビリンを輸送する核酸トランスポーター分子種を同定するために、cDNA クローニングにより得られた hENT1, hENT2, hCNT2 および hCNT3 の安定発現系を用いてリバビリン取り込みに対する速度論的解析をおこなった。その結果、リバビリンの細胞膜輸送に関与する核酸トランスポーターは hENT1, hCNT2 および hCNT3 であり、なかでも hENT1 および未同定のトランスポーターがヒト肝臓におけるリバビリンの取り込みに大きく寄与していることが明らかとなった。さらに、日本人肝検体 (n=18) における hENT1 mRNA 発現量を測定したところ、検体間で約 5.6 倍の差が認められ、膜画分における hENT1 タンパク発現量には約 2.9 倍の個人差が認められた。今後、未同定のトランスポーターの同定および肝リバビリントランスポーターの機能および発現量の個人差の解析をおこなうとともに、白人肝検体を用いて同様の検討を行うことにより、リバビリンの薬効発現に関連する核酸トランスポーター活性の人種差の存在を明らかにしていきたい。

A. 研究目的

リバビリんと Interferon (IFN) - α の併用療法は IFN 単独療法と比較して高い奏効率を示すことから、C 型肝炎の標準的治療法となっている。リバビリンは、リン酸化を受けてはじめて抗ウイルス作用を示すと考えられていることから、リバビリンが薬効を発揮するためには肝細胞内に取り込まれる必要がある。リバビリンはグアノシン誘導体であり、親水性が高いため何らかの輸送単体を介して肝細胞内に取り込まれると考えられるが、これまでに、赤血球において equilibrative nucleoside transporter (ENT, SLC29A) 1 が、

小腸の吸収過程において Na⁺の濃度勾配を駆動力とする concentrative nucleoside transporter (CNT, SLC28A) 2 が細胞内取り込みに関与する可能性が示唆されて入るのみで、作用部位である肝臓におけるリバビリンの取り込みに寄与するトランスポーターは明らかでない。本研究ではリバビリンの肝取り込みに寄与するトランスポーターを同定し、その日本人肝臓における発現量と個人差に関する検討を行った。

B. 研究方法

核酸トランスポート欠損 Madin Darby Canine Kidney (MDCK) -NTD (Nucleoside Transport Deficient) 22 細胞株は 2 種の核酸系抗癌剤を用いた選択により単離した。hENT1, hCNT2, hCNT3 および hENT2 の cDNA クローニングは、ヒト小腸 cDNA およびヒト骨格筋 cDNA を用いて PCR 法によりおこなった。これら 4 種の cDNA をリポフェクション法により MDCK-NTD22 細胞にトランスフェクションし、安定発現系を作製した。これらを用いて、 $[3H]$ -uridine および $[3H]$ -ribavirin の細胞内への輸送活性を液体シンチレーションカウンターを用いて測定し、速度論的パラメータ (K_m および V_{max}) を算出した。ヒト肝臓における核酸トランスポーターの発現は RT-PCR 法により検討した。ヒト遊離肝細胞および核酸トランスポーター特異的阻害剤を用いて、 Na^+ 存在下または非存在下での $[3H]$ -ribavirin の肝細胞内への輸送活性に対する阻害効果を測定した。日本人肝検体 ($n=18$) より cDNA を調製し、SLC29A1 遺伝子発現量を real-time PCR 法により定量した。日本人肝臓における hENT1 タンパク発現量は western blot 法により定量した。

C. 研究結果及び考察

1. 核酸トランスポート欠損 MDCK-NTD22 細胞の単離および安定発現系を用いたリバビリン輸送に寄与する核酸トランスポーターの同定

野生型 MDCK 細胞と核酸系抗癌剤で選択した MDCK-NTD22 細胞におけるウリジン取り込み活性を比較した結果、MDCK-NTD22 細胞のウリジン取り込み活性は野生型 MDCK 細胞の 15 分の 1 まで低下していることが示された。cDNA クローニングにより得られた hENT1, hENT2, hCNT2 および hCNT3 の安定発現系を用いてウリジン取り込みに対する速度論的解析をおこなったところ、既報と同程度の K_m 値であった。以上の結果より、MDCK-NTD22 細胞は遺伝子導入した核酸トランスポーターの輸送活性を評価する際のホスト細胞として有用である

ことが示された。次に、リバビリンを輸送する核酸トランスポーター分子種を同定するために、核酸トランスポーター安定発現 MDCK-NTD22 細胞を用いてリバビリン取り込みに対する速度論的解析をおこなった。その結果、hENT1 の K_m 値は $357.1 \mu M$ であり、hENT2 はリバビリン取り込み活性を示さなかった。hCNT2 の K_m 値は $40.6 \mu M$ であり、hCNT3 の K_m 値は親和性の高い成分は $2.1 \mu M$ であり、親和性の低い成分は $36.7 \mu M$ であった。以上の結果より、リバビリンの取り込みに関与するトランスポーターは hENT1, hCNT2 および hCNT3 であることが明らかとなった。各々の発現量は不明であるが、肝臓において hENT1, hCNT2, hCNT3 が発現していることから、リバビリンの取り込みにこれらのトランスポーターが寄与する可能性が考えられた。

2. ヒト遊離肝細胞を用いたリバビリン輸送活性阻害実験および日本人肝臓における hENT1 mRNA 発現量および hENT1 タンパク発現量の個人差の解析

ヒト遊離肝細胞を用いて、hENT1 阻害剤である NBMPR および hENT2 阻害剤である hypoxanthine の Na^+ 存在下および Na^+ 非存在下におけるリバビリンの輸送活性阻害を検討した。その結果、全リバビリン取り込みに対する Na^+ -dependent、 Na^+ -independent NBMPR sensitive、 Na^+ -independent hypoxanthine sensitive および Na^+ -independent NBMPR insensitive の相対寄与率の平均は、0%、30.0%、0%および 70.0%であった。これらの結果より、 Na^+ -independent NBMPR sensitive 画分に相当する hENT1 がリバビリンの肝取り込みに大きく寄与していることが明らかとなった。次に日本人肝検体 ($n=18$) の hENT1 mRNA 発現量を測定したところ、検体間で約 5.6 倍の差が認められた。また、日本人肝検体 ($n=10$) から膜画分を調製し、hENT1 タンパク発現量の個人差を検討した結果、検体間で約 2.9 倍の差が認められた。hENT1 mRNA 発現量と hENT1 タンパク発現量との相関を検討したところ、10 検体において相関は認められなかったものの、6 検体においては

高い相関が認められた。以上の結果より、リバビリンのヒト肝取り込みに大きく寄与するhENT1の発現量には大きな個人差が存在し、その発現量は転写および転写後調節により制御されているという可能性が示唆された。現在、人種差を検討するため、同様の検討を白人種臓肝検体で行っている。

E. 結論

本研究より、リバビリンの肝取り込みに大きく寄与する核酸トランスポーターはhENT1であり、そのmRNA発現量およびタンパク発現量にはそれぞれ約5.6倍および約2.9倍の個人差があることが明らかとなった。今後、白人肝検体を用いて同様の検討を行い、日本との人種差の有無を明らかにしたい。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

学会発表

- 4) 橋詰 美里、降幡 知巳、千葉 寛：MDCK細胞由来新規核酸取り込み欠損細胞は核酸トランスポーターの機能解析に有用である第21回日本薬物動態学会（東京）2006年11月
- 5) 降幡 知巳、橋詰 美里、千葉 寛：内因性核酸トランスポート活性を欠失したMardin-Darby Canine Kidney細胞（MDCK-NTD22）の確立とその有用性、第1回トランスポーター研究会（東京）、2006年12月
- 6) 橋詰 美里、降幡 知巳、福地 由希菜、千葉 寛：内因性核酸トランスポート活性を欠失したMardin-Darby Canine Kidney細胞（MDCK-NTD22）の確立とその有用性、第127回日本薬学会年会（富山）、2007年3月

H. 知的財産権の出願・登録状況

3. 特許取得 なし
4. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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

書籍

発表者氏名	タイトル名	発表誌名	ページ	出版年
高橋晴美、越前宏俊	CYP2C9 遺伝子多型とワルファリン応答性の個人差・人種差	創薬動態－医薬品創製のための考え方と最新情報－、玉井郁巳ら編、日本薬物動態学会、東京	64-71	2006

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 et al.	Different contributions of polymorphisms in VKORC1 and CYP2C9 to intra- and inter-population differences in maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African-Americans.	Pharmacogenet. Genomics	16	101-110	2006
越前宏俊	個別化されたワルファリン療法への道	日本血栓止血学会誌	17	430-433	2006
Kawashima et al.	Involvement of hepatocyte nuclear factor 4{alpha} in the different expression level between CYP2C9 and CYP2C19 in the human liver.	Drug Metab. Dispos.	34	1012-1018	2006

Shimizu et al.	Autoinduction of MKC-963 metabolism in healthy volunteers and its retrospective evaluation using primary human hepatocytes and cDNA-expressed enzymes.	Drug Metab. Dispos.	34	950-954	2006
Ieiri I et al.	Genetic polymorphisms of drug transporters: pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences in pharmacotherapy	Expert Opinion	2	651-674	2006
Takane H et al.	Pharmacogenetic determinants of variability in lipid-lowering response to pravastatin therapy	J. Hum. Genet.	51	822-826	2006
Maeda K et al.	Effects of organic anion transporting polypeptide 1B1 on pharmacokinetics of pravastatin, valsartan, and temocapril	Clin. Pharmacol. Ther.	79	427-439	2006
Shikata E et al.	Multiple gene and polymorphisms and warfarin sensitivity	Eur. J. Clin. Pharmacol.	62	881-883	2006
Shikata E et al.	Human organic cation transporters (OCT1 and OCT2) gene polymorphisms and therapeutic effects of metformin	J. Hum. Genet.	52	117-122	2007

Akutsu et al.	Identification of human cytochrome P450 isozymes involved in diphenhydramine N-demethylation.	Drug Metab. Dispos.	35	72-78	2007
M. Saeki et al.	A combinatorial haplotype of the UDP-glucuronosyl-transferase 1A1 gene (#60-#IB) increases total bilirubin concentrations in Japanese volunteers.	Clin. Chem.	53	356-358	2007

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I-E-3: CYP2C9 遺伝子多型とワルファリン応答性の個人差・人種差

I-E-3-1. CYP2C9 遺伝子多型の薬物動態・応答性に及ぼす影響

CYP2C9(構成アミノ酸:490, 推定分子量:55.6 kDa)はヒト肝細胞に発現している cytochromeP450 中の約 20%を占め, 抗凝固薬 (S-ワルファリン; S-WF など), 抗てんかん薬 (フェニトイン) や経口抗糖尿病薬 (トルブタミドなど) など治療域の狭い薬物や, アンギオテンシン II 受容体阻害薬 (カンデサルタンなど), 非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs; ジクロフェナクなど), ループ利尿薬 (トラセミド) など臨床的に繁用されている薬物の代謝に関与している. 更に, これらの CYP2C9 基質薬物と代謝阻害薬や誘導薬 (リファンピシンなど) の併用による薬物相互作用も多数報告されている.

現在までの所, CYP2C9 遺伝子多型として CYP2C9*30 まで変異型アレルが報告されているが (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles>), CYP2C9*6 と CYP2C9*25 (フレームシフトにより CYP2C9 タンパク質が発現しない) 以外はアミノ酸変異を伴う 1 塩基置換 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) である. これらの変異はハプロタイプ解析により 6 つのハプロタイプグループ (白人; 1A, 1B, 1C, 1D, 2, 3, 日本人; 1A, 1B, 1e, 1f, 1h, 3) に分類されている. ハプロタイプグループ 2 とグループ 3 にはそれぞれ CYP2C9*2 と CYP2C9*3 が入る¹⁻²⁾. また, 最近の詳細なハプロタイプ解析により CYP2C9 と CYP2C19 のハプロタイプ間の相関性が, 報告されている²⁻³⁾. 主要な CYP2C9 変異アレルの出現頻度には人種差が認められ, 白人は*2 (13%), *3 (7%), *11 (1.3%), 黒人は*2 (3.4%), *3 (1.5%), *5 (1.8%), *6 (<0.5%), *11 (2.3%), 日本人を含むアジア人は*3 (1.8%) (*4 は 1 名の日本人のみの報告がある) が主な変異型アレルである. 既知の変異アレルについて, 白人はアジア人に比較してすべての CYP2C9 変異型の出現頻度が高く, これが代謝活性の人種差に一部寄与している⁴⁾.

In vitro 系で CYP2C9 代謝活性が欠損, あるいは低下することが報告されている変異型アレル (CYP2C9*2, *3, *4, *5, *11, *12, *13, *14, *15, *16, *18, *26, *28, *30) は多数認められるが, *in vivo* で明確な代謝活性の低下が確認されている変異は CYP2C9*3 と CYP2C9*6 に限られる. 即ち, *in vitro* 系で CYP2C9 多型による代謝活性の低下が認められたとしても, 個々の基質薬物の体内動態パラメーターや投与方法により *in vivo* の代謝活性に及ぼす CYP2C9 変異の影響の程度は薬物により異なる. 例えば, カンデサルタンのように未変化体尿中排泄率が高い薬物 (52%) では, 全身クリアランス (CL_{tot}) の約半分は腎クリアランスに依存するため, たとえ CYP2C9 の遺伝多型により肝固有クリアランス (CL_{int,h}) が低下したとしても, CL_{tot} への影響は弱められてしまう [即ち,

腎機能低下患者（高齢者など）で *CYP2C9**3 変異を有する患者の場合にのみ臨床的に問題となる *CL*_{tot} の低下がおこる可能性がある〕。また、たとえ主要な消失経路が肝代謝に依存する薬物であっても、*CL*_{tot} が大きい（肝抽出比>0.3）薬物では、静脈内投与後の場合、*CL*_{tot} は肝血流速度にも依存するため、遺伝多型による *CL*_{int,h} の変化が直接 *CL*_{tot} に反映されないことがある。さらに、*CYP2C9* の基質である肝代謝型薬物を経口投与した場合であっても、その薬物の肝代謝に *CYP2C9* 以外の代謝酵素が関与しており、*CL*_{int,h} 全体に対する *CYP2C9* 活性の寄与が低い薬物（ジクロフェナクやトラセミドなど）では、*in vitro* 実験で観察された *CYP2C9* 遺伝子多型による代謝活性の低下がそのまま直接的に *in vivo* における *CL*_{tot} や経口 *CL* (*CL*_{po}) の低下に反映される訳ではない⁵⁾。更に、*CYP2C9* 遺伝子多型により *CL*_{tot} が低下し、定常状態における平均血中濃度 (*C*_{ss,ave}) が上昇する場合であっても、それが効果や副作用といった薬物応答性に影響するためには薬物血中濃度の変動域が該当薬物の薬物濃度-効果関係において薬理効果に直接的に影響する範囲内（血中濃度-効果関係の傾きに依存）に限られるため、実際の臨床の場で *CYP2C9* 多型により投与量の調節が必要であることが明確になっている薬物は、今のところワルファリンやフェニトインに限られている。

In vivo で *CYP2C9* 代謝活性の上昇に関係する変異は未だ発見されていないが、*in vitro* 実験では発現調節に影響する因子として種々の核内受容体 (*CAR*, *PXR*, *RXR*, *VDR*, *GR*, *HNF3α/4α* など) が関与することが報告されている⁶⁾。しかし、*CYP2C9* の発現調節メカニズムの詳細は明らかでなく、特にアジア人の場合、現在報告されている *CYP2C9* 遺伝子の翻訳・非翻訳領域の変異のみでは *in vivo* で認められる *CYP2C9* 活性の 10 倍以上もの大きな個人差の 5% 程度しか説明できるにすぎない⁷⁾。

I-E-3-2. ワルファリンの抗凝固効果の個人差に影響する因子

ワルファリン (WF) は発売以来 50 年以上、世界で最も繁用されている抗凝固薬であり、特に日本では経口投与可能な唯一の抗凝固薬である。しかし、抗凝固効果 (*INR*; International Normalized Ratio, *PT* 時間を測定試薬ごとの係数で補正した値) の個人差が大きいため WF の投与量は患者間で 10 倍以上も異なり、投与量の設定が臨床上非常に困難である。更に、WF の平均投与量は白人・黒人に比較して日本人や中国人などのアジア人で少なく、人種差の存在も示唆されている。そこで我々は WF を経口投与後 WF が血中に現れるまでの体内動態 (Pharmacokinetics; *PK*) に関する過程と、WF が血中に現れてから抗凝固効果 (*INR*) を発現するまでの感受性 (Pharmacodynamics; *PD*) に関する過程に分けて、それぞれの過程における個人差に関わる影響因子について、日本人を含むアジア人、白人、黒人という異なる人種・遺伝背景を有する患者を対象に様々な検討を重ねてきた。その結果、WF の *PK* と *PD* の個人差にはそれぞれの過程に関与する異なる遺伝子変異が大きく影響していることを明らかにした。WF の投与量の個人差に及ぼす *PK* と *PD* に関わるこれらの遺伝子変異の寄与の程度がわかれば、抗凝固治療における遺伝子

検査の意義が明らかとなり、これらの遺伝子情報を利用して患者ごとにより適切な WF の初期投与量の設定（テーラーメイド治療）ができる可能性がある。

I-E-3-3. WF の体内動態に影響する遺伝子変異

薬物の効果、あるいは副作用は血漿中遊離形濃度（Cu）に大きく影響される。WF はほぼ完全に消化管から吸収され（Fa = 1.0）、肝代謝により消失する薬物（Ae < 2%）であるので、経口投与後の定常状態における WF の平均遊離形 Cp [Cuss,ave = (Dose/τ) / 遊離形 CLpo (= CLpo,u)] は、患者の肝代謝活性（肝固有クリアランス、CLint,h = CLpo,u）で決定される。また、WF は光学異性体の等量混合物（ラセミ体）の製剤として市販されているが、抗凝固効果は S-WF が R-WF よりも 3 ～ 5 倍強力である。そのため、WF の抗凝固効果に個人差をもたらす PK 上の要因としては、患者の S-WF の主代謝酵素である CYP2C9 活性が重要となる。前述のごとく、CYP2C9 活性低下に関係するとされる CYP2C9 変異型アレルの出現頻度には人種差が存在し、白人における変異アレル頻度は日本人より高いため、これが S-WF の肝代謝活性の人種差（日本人の方が白人より CLpo,u が大きいために、投与量/kg は両人種でほぼ等しいのにもかかわらず、Cuss,ave は日本人の方が低かった）に少なくとも一部寄与している可能性がある。そこで我々は CYP2C9 のホモ野生型（*1/*1）患者について CLpo,u を日本人・白人間で比較したが、それでも尚 CYP2C9 代謝活性は日本人の方が大きかった。そこで、タンパク発現調節を司るとされる CYP2C9 の 5' 上流域の遺伝子変異について解析し、日本人と白人の比較を行った⁸⁾。その結果、5' 上流域においても多数の遺伝子変異が認められたが、その内 4 カ所の SNPs は CYP2C9*3 変異と、更に別の 4 カ所の SNPs は CYP2C9*2 変異とほぼ完全にリンクしていた。しかし、上流域変異を考慮した後、野生型ハプロタイプを有する患者の平均 S-WF 代謝活性を日本人と白人間で比較しても、やはり日本人の S-WF に対する代謝活性が高かった⁸⁾。以上の結果から、白人と日本人間で認められる CYP2C9 代謝活性の人種差は既知の翻訳領域や 5' 上流域の遺伝子変異のみでは説明できず、他の要因が関与することが示唆された。

以上のような検討結果を基に NONMEM 法により母集団解析を行ったところ、WF の PK 上の決定因子である S-WF の肝代謝活性（CLpo,u）は体表面積を示すと考えられる体重の 0.78 乗に比例し、CYP2C9*3 変異、ブコロームやベンズブロマロンなどの CYP2C9 活性を阻害する作用のある併用薬の投与、人種（日本人と白人・黒人）が影響因子として抽出された。

現在までのところ、CYP2C9 遺伝子の変異型アレルの中で日本人において WF 治療における臨床的意義が明らかにされている変異は CYP2C9*3 のみである。CYP2C9*3 変異を有する日本人の患者では S-WF の肝代謝活性が低下し、その影響が WF の平均投与量の低下に非常に良く反映している⁴⁾（図 1）。

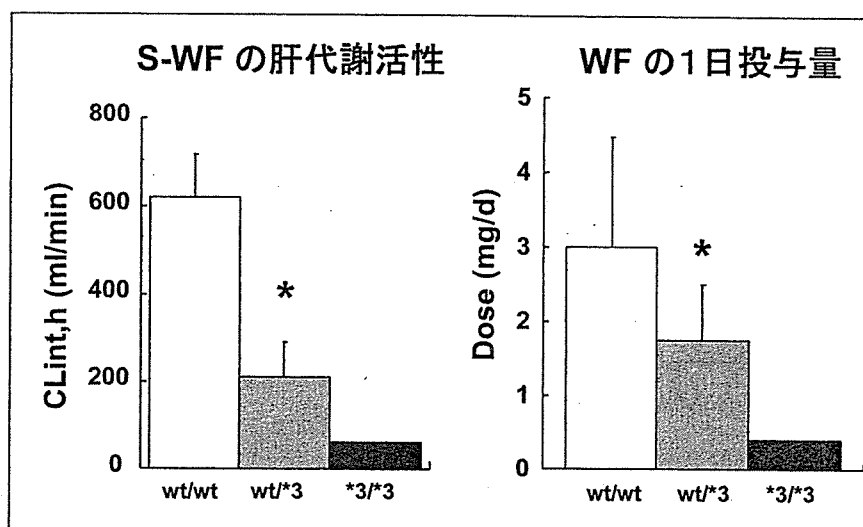


図1. 日本人における S-WF の肝代謝活性 (CLint,h) と WF 投与量に及ぼす CYP2C9*3 変異の影響

wt: 野生型アレル

以上の結果は、CYP2C9*3 変異を有する患者に対して INR を治療域にコントロールするのに必要な S-WF の Cu を野生型患者と同様に保つためには、WF の投与量を低下する必要性を示唆したものである。S-WF の肝代謝活性の低下作用が *in vitro* 系で報告されている CYP2C9*2 (現在のところ日本人での存在は確認されていない) や CYP2C9*3 変異アレルの WF 治療に及ぼす影響について Lancet⁹⁾ や JAMA¹⁰⁾ に報告された臨床試験成績をまとめると、以下の結論が導かれる。

* WF の低投与量群では CYP2C9*2/*3 変異型患者が多い (CYP2C9*2/*3 変異により S-WF の CLpo, u が低下し、Cu や INR が上昇するため、投与量が減少される可能性がある)。

* これらの変異型患者では安定した抗凝固効果を得るための時間がかかる (CYP2C9*2/*3 変異により S-WF の CLtot が低下し、半減期が延長し、定常状態に到達する時間が長くなる可能性がある)。

* 変異型患者では WF 導入期に INR の上限をこえるリスクが高い (S-WF の Cu の上昇による可能性がある)。

* 変異型患者群では導入期の出血頻度が高い (S-WF の Cu の上昇による可能性がある)。

I-E-3-4. WF の感受性に影響する遺伝子変異

次に WF の感受性 (PD) について考えてみると、WF は肝臓においてビタミン K サイクル (Vitamin K epoxide reductase; VKOR) を阻害し、ビタミン K に依存した凝固因子 (F-II, VII, IX, X) の活性化を阻害することにより、抗凝固効果 (INR の上昇) を発現する。従って WF 濃度-INR 関係に影響する感受性側の因子としては WF の直接の作用タンパクである VKOR 活性が重要となる。我々は WF に対する感受性について抗凝固効果 (INR) を血漿中の遊離形 S-WF 濃度 [Cu (S)]

で標準化した $[INR/Cu(S)]$ を用いて評価した結果、日本人の平均値は白人や黒人よりも高い値（感受性が高い）であることを見いだした¹¹⁾。この原因を明らかにするために血漿中 Normal Prothrombin 濃度 (NPT) を測定し、S-WF により INR が上昇する過程を、Cu(S)-NPT, 及び NPT-INR の2つの過程に分けて、WF の感受性について人種差の存在の有無を検討した。その結果、Cu (S) の上昇に伴い NPT レベルが低下する過程には著しい人種差が認められたが、NPT の低下により INR が上昇する過程には明確な人種差は認められなかった（図2）。

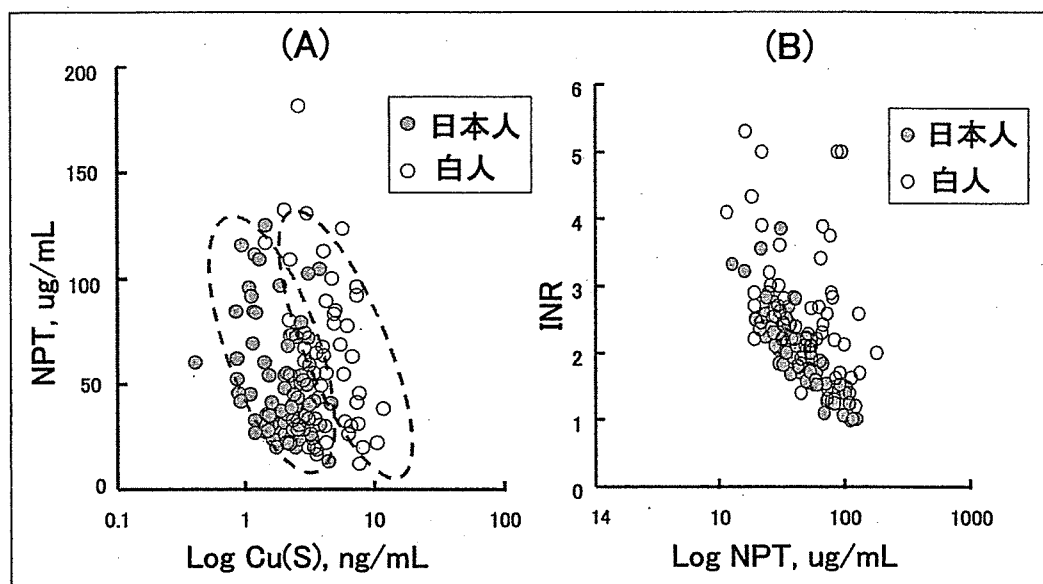


図2. 血漿中 S-WF 遊離形濃度 $[Cu(S)]$ —血漿中 Normal Prothrombin 濃度 (NPT), 及び NPT—INR の関係

図2の結果から、日本人では白人、黒人に比較して低い Cu (S) 濃度で白人や黒人と同程度に NPT レベルを低下できることが明らかとなった。従って、治療前の NPT レベルに反映される血液凝固活性のベースライン値（白人ではベースライン値が日本人より高い可能性）、あるいは WF による VKOR 阻害活性（日本人では VKOR 阻害活性が白人より高い可能性）のいずれか（あるいは両方）に人種差が存在する可能性が示唆された。

VKOR については2004年に初めてその一部 (*VKOR complex subunit 1; VKORC1*) の塩基配列と6カ所の変異型アレルが Nature¹²⁾に報告された。最初に報告された6カ所の SNPs については WF 耐性家系や凝固因子異常家系で発見されたものであり、それらの素因がない白人では非常に稀である。しかし、昨年初めに発表された WF 服薬中の白人患者を対象として行われた臨床試験で、*VKORC1* の intron 1 の変異 (1173C>T) により WF 投与量が大きく減少することが報告された¹³⁾。ついでワシントン大学のグループから *VKORC1* の詳細なハプロタイプ解析結果が報告され¹⁴⁾、intron 1 の変異 (1173C>T) を含む5つのほぼ完全リンクする SNPs が *VKORC1* の mRNA 発現量、並びに WF 投与量の決定因子であることが示された。ついで、我々は1173変異の出現頻度が日本人患者では0.891であるのに対し、白人では0.422、更に黒人では0.086であり、変異出現頻度に

著しい人種差が認められることを報告した¹¹⁾。更にこの変異が S-WF の Cu-INR 関係に及ぼす影響について日本人と白人患者を対象に比較検討した結果、両人種共にこの変異の存在により濃度－効果関係の傾きが大きくなり感受性が高くなることを明らかにした(図3)。更に、*VKORC1* 1173 の同一遺伝子型を有していれば、S-WF の Cu-INR 関係は日本人と白人の間で明確な相異は認められなかった(図3)。

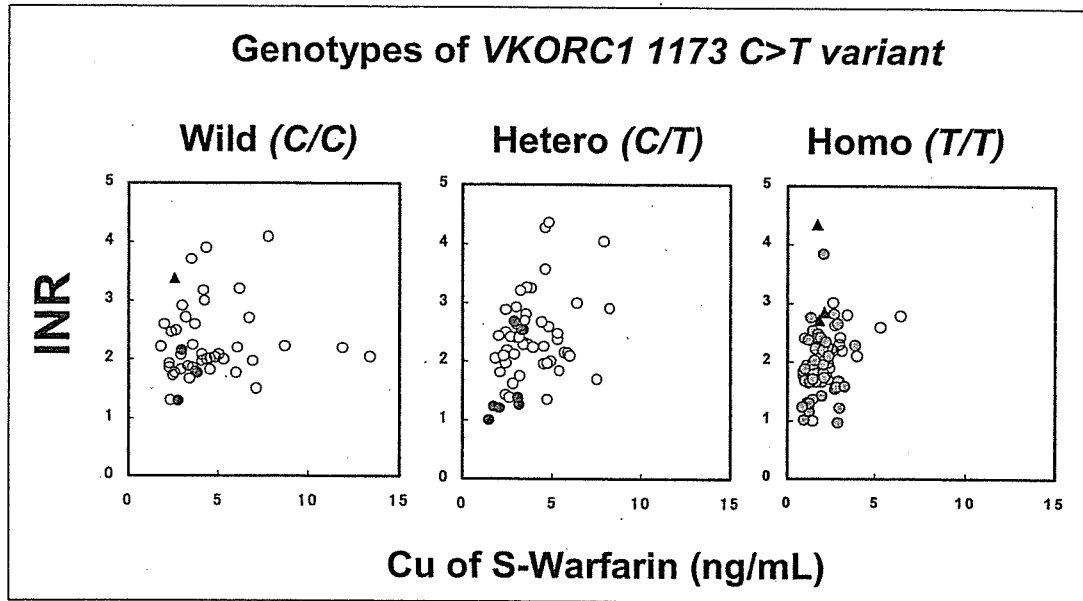


図3. S-WF の血漿中遊離形濃度と INR の関係に及ぼす *VKORC1* 1173 C>T 変異の影響

○；白人，●；日本人，

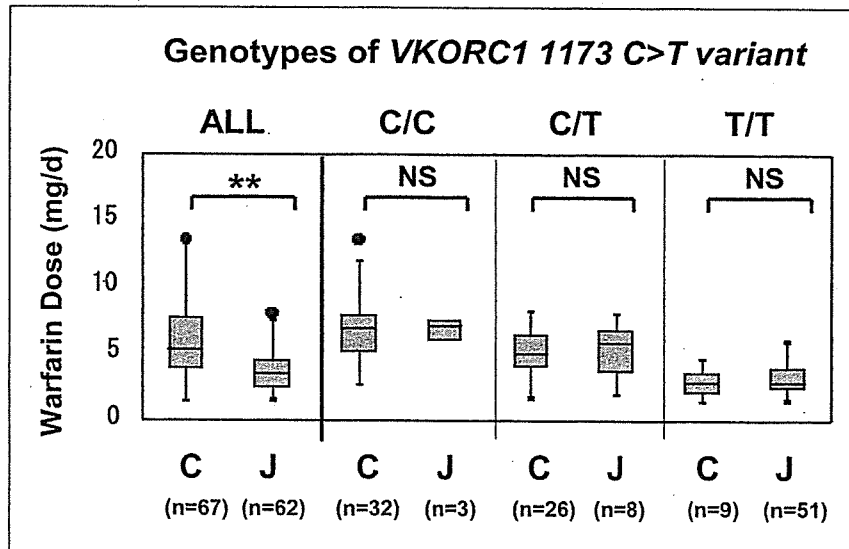


図4. WF 維持量の人種差に及ぼす *VKORC1* 1173 C>T 変異の影響

C；白人，J；日本人，**p<0.01，NS；Not Significant

次に、*CYP2C9* 野生型患者を対象にして（WF 投与量に及ぼす *CYP2C9* 変異の影響を除いた）、WF 投与量について日本人と白人の比較を行った（図 4）。

全体で比較すると日本人の投与量は白人患者より有意に少なかったが、*VKORC1* の同一 genotype を有する患者では人種にかかわらず WF 投与量はほぼ等しかった。また、この変異をヘテロ、あるいはホモ型で有する患者の順に両人種共により低用量の WF が投与されており（gene-dose 効果の存在）、日本人患者の 80% 以上は感受性の高いホモ変異型を有していることが判明した。一方でこの結果は、抗凝固コントロールのために日本人患者の約 18%（5 ～ 6 名に 1 名）は、日本人の平均 WF 投与量（約 3.3 mg/d）以上を必要とする遺伝子型を有していることをも示したものである。次に WF 維持量の患者間変動に及ぼす影響因子を明らかにする目的で、多変量解析を行った結果、年齢、体重、*CYP2C9*、並びに *VKORC1* の genotypes が WF 投与量の有意な影響因子であり、これらの因子により WF 維持量の個人差の約 60% が説明できることを明らかにできた¹¹⁾。WF 投与量の個人差に及ぼす他の Vitamin K 依存凝固関連タンパク質（F-II, F-VII, F-X, γ -glutamyl carboxylase とその内因性 VKOR 阻害タンパクである calumenin など）の遺伝子多型の影響についても検討がなされているが、これらの変異の影響は *VKORC1* や *CYP2C9* に比較するといずれも小さいと考えられる¹⁵⁻¹⁷⁾。更に、最近、動脈硬化性疾患に及ぼす *VKORC1* 変異の影響が中国人を対象として検討され、脳血管障害や冠動脈疾患患者ではコントロール群に比較して *VKORC1* 野生型（WF 感受性が低い genotype）を有している割合が約 2 倍高いことが報告された¹⁸⁾。動脈硬化病変部位での血栓形成には Vitamin K に依存した凝固系の活性化が関与しているが、そのような状況下における VKOR の役割について、今後の検討が期待される。

I-E-3-5. おわりに

以上の結果から、WF の PK の人種差（日本人の方が白人より肝代謝活性が高い）により生じた血中 S-WF 濃度の人種差（日本人の方が白人より低い）は *VKORC1* による PD の人種差（日本人の方が白人より感受性が高い）で相殺されて、最終的な日本人の INR は白人より僅かに低値を示していた。このように、最終的な WF の投与量-効果関係に影響を及ぼす WF の PK と PD には相反する方向の人種差が存在するため、今後、欧米白人データに基づく治療ガイドラインを日本人患者に適応する場合には、PK/PD 両面からの人種差の検討が不可欠であることが示唆される。これらの検討から WF 投与量に認められる個人差・人種差には WF の肝代謝活性に影響する *CYP2C9* 変異と同様に、感受性の影響因子である *VKORC1* 変異が大きく関与していることが明らかとなったため、米国 FDA では昨年末、WF の添付文書に *CYP2C9* と *VKORC1* に関する遺伝子情報を追加するための検討を開始した。また、PGxHealth 社は本年中に *VKORC1* 遺伝子診断キットを発売する事を予定している。しかし日本人では両遺伝子の出現頻度が白人と異なるため、今後、日本人における抗凝固治療の個別化に向けてこれらの遺伝子検査の有用性について、日本人を対象にした prospective な検討が必要とされている。

参考文献

- 1) Veenstra D.L., Blough D.K., Higashi M.K. *et al.*, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **77**, 353-364 (2005).
- 2) Maekawa K., Fukushima-Uesaka H., Tohkin M. *et al.*, *Pharmacogenetics and Genomics*, **16**, 497-514 (2006).
- 3) Walton R., Kimber M., Rockett K. *et al.*, *Nat. Genet.*, **37**, 915-916 (2005).
- 4) Takahashi H., Wilkinson G.R., Caraco Y. *et al.*, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **73**, 253-263 (2003).
- 5) Takahashi H. and Echizen H., *Clin. Pharmacokinet.*, **40**, 587-603 (2001).
- 6) Kawashima S., Kobayashi K., Takama K. *et al.*, *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 1012-1018 (2006).
- 7) Takahashi H., Wilkinson G.R., Padrini R. *et al.*, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **75**, 376-380 (2004).
- 8) Takahashi H., Ieiri I., Wilkinson G.R. *et al.*, *Blood*, **103**, 3055-3057 (2004).
- 9) Aithal G.P., Day C.P., Kesteven P.J.L. *et al.*, *Lancet*, **353**, 717-719 (1999).
- 10) Higashi M.K., Veenstra D.L., Kondo L.M. *et al.*, *JAMA*, **287**, 1690-1698 (2002).
- 11) Takahashi H., Wilkinson G.R., Nutescu E.A. *et al.*, *Pharmacogenetics and Genomics*, **16**, 101-110 (2006).
- 12) Rost S., Fregin A., Ivaskevicius V. *et al.*, *Nature*, **427**, 537-541 (2004).
- 13) D'Andrea G., D'Ambrosio R.L., Di Perna P. *et al.*, *Blood*, **105**, 645-649 (2005).
- 14) Rieder M.J., Reiner A.P., Gage B.F. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **352**, 2285-2293 (2005).
- 15) Aquilante C.L., Langae T.Y., Lopez L.M. *et al.*, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **79**, 291-302 (2006).
- 16) Vecsler M., Loebstein R., Almog S. *et al.*, *Thromb. Haemost.*, **95**, 205-211 (2006).
- 17) Herman D., Peternel P., Stegnar M. *et al.*, *Thromb. Haemost.*, **95**, 782-787 (2006).
- 18) Wang Y., Zhang W., Zhang Y. *et al.*, *Circulation*, **113**, 1615-1621 (2006).

Different contributions of polymorphisms in *VKORC1* and *CYP2C9* to intra- and inter-population differences in maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African-Americans

Harumi Takahashi^a, Grant R. Wilkinson^b, Edith A. Nutescu^c, Takashi Morita^d, Marylyn D. Ritchie^e, Maria G. Scordo^f, Vittorio Pengo^g, Martina Barban^g, Roberto Padriani^h, Ichiro Ieiriⁱ, Kenji Otsubo^j, Toshitaka Kashima^j, Sosuke Kimura^j, Shinichi Kijima^a and Hirotochi Echizen^a

Objective To investigate pharmacokinetic and pharmacodynamic factors associated with population differences in warfarin doses needed to achieve anticoagulation, in particular the possible involvement of genetic variability in vitamin K epoxide reductase (*VKOR*) and *CYP2C9*.

Methods Warfarin maintenance dose, unbound plasma S-warfarin concentration [Cu(S)] and INR were determined in 157 Caucasians, 172 Japanese, and 36 African-Americans stably anticoagulated patients. In a subset ($n=166$), fully carboxylated plasma normal prothrombin levels (NPT) were also measured. Genotyping for seven *CYP2C9* (*CYP2C9**1 through 6 and *11) and seven *VKORC1* variants were performed in 115 Caucasians and 64 Japanese patients and 66 healthy African-Americans. Multivariate analysis was performed to identify covariates associated with warfarin requirement.

Results The relationship between NPT and Cu(S) indicated Japanese are more susceptible to inhibition of NPT production by S-warfarin than the other two populations. *VKORC1* 1173 C>T had a greater frequency in Japanese (89.1%) than Caucasians (42.2%) and African-Americans (8.6%). *CYP2C9* variants with reduced metabolizing ability were less frequent in Japanese compared to the other two populations. The median warfarin dose was significantly higher in Caucasians than Japanese patients (5.5 versus 3.5 mg/day), however, when matched for *CYP2C9**1 homozygosity, no difference in dose was observed between *VKORC1* genotype-matched groups. Furthermore, *VKORC1* 1173C>T and *CYP2C9* (*2/*3/*11) genotypes, age and weight were identified as independent covariates contributing to interpatient variability in warfarin dosage.

Conclusions Both *VKORC1* and *CYP2C9* polymorphisms contribute to inter-population difference in warfarin doses among the three populations, but their contribution to intra-population variability may differ within each population. *Pharmacogenetics and Genomics* 16:101–110 © 2006 Lippincott Williams & Wilkins.

Pharmacogenetics and Genomics 2006, 16:101–110

Keywords: warfarin, Japanese, Caucasian, African-Americans, polymorphism, *VKORC1*, *CYP2C9*

^aDepartments of Pharmacotherapy, ^dBiochemistry, Meiji Pharmaceutical University, Tokyo, Japan, ^bDepartment of Pharmacology, ^cCenter for Human Genetics Research, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, USA, ^eDepartment of Pharmacy Practice, University of Illinois at Chicago, College of Pharmacy, Chicago, Illinois, USA, ^fDepartment of Clinical and Experimental Medicine and Pharmacology, University of Messina, Messina, Italy, ^gDepartments of Clinical and Experimental Medicine, ^hPharmacology and Anesthesiology, University of Padova, Padova, Italy, ⁱDepartment of Hospital Pharmacy, Faculty of Medicine, Tottori University, Tottori, Japan and ^jDepartment of Cardiovascular Surgery, International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan

Correspondence and requests for reprints to Dr Harumi Takahashi, Department of Pharmacotherapy, Meiji Pharmaceutical University, Noshio 2-522-1, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan
Tel/fax: +81-424-95-8453/8612; e-mail: harumit@my-pharm.ac.jp

Sponsorship: This study was supported in part by grants from the Ministries of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (12670703) and of Health, Labor and Welfare (14130301), the Japanese Research Foundation for Clinical Pharmacology, the Italian Ministry of Research (COFIN2000) and the USPHS National Institutes of Health (GM31304).

Dr Harumi Takahashi and Dr Hirotochi Echizen received financial support from Eisai Co. Ltd. (Tokyo, Japan). Other authors: none declared.

Received 25 May 2005 Accepted 6 September 2005

Introduction

Warfarin is the mainstay of anticoagulation therapy, worldwide. Its clinical use, however, is complicated by the fact that it has a narrow therapeutic index with associated adverse effects that are potentially serious, i.e., bleeding, and the dosage requirement to produce a

required degree of anticoagulation varies widely between patients. The reason for the latter is multifactorial and includes determinants such as age [1–3], diet [4], and race [5–10]. Additionally, genetic factors determining the activity of *CYP2C9* have been recently demonstrated to be important. This cytochrome P450 is largely

responsible for the metabolism of S-warfarin, which is the enantiomer predominantly responsible for the drug's anticoagulant activity [11] – warfarin is administered as a racemate. In particular, two structural variants, *CYP2C9.2* and *CYP2C9.3*, have greatly reduced catalytic activity compared to the wild-type enzyme, *CYP2C9.1* [9,12], and retrospective studies have shown associations between the various genotypes and warfarin dose requirement and adverse effects [1–3,9,12–14]. It is apparent, however, that other factors, also possibly genetic, are important because, even when matched according to *CYP2C9* genotype, the dosing requirements for a similar degree of anticoagulation varies across populations and appear to be related to racial ancestry. For example, patients of Asian descent (Chinese [5,8,10], Japanese [9] and Malay [8,10]) require a lower maintenance dose of warfarin than Caucasians and Indians; by contrast, a higher dose is needed in African-Americans [6,7].

Warfarin's anticoagulant activity results from inhibition of hepatic vitamin K epoxide reductase (*VKOR*) that affects the synthesis of various coagulation factors. Recently, variants of the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 gene (*VKORC1*) have been described to have potentially functional consequences [15–21]. For instance, Rieder *et al.* [21] identified five major haplotypes (H1, H2, H7, H8 and H9) based upon 10 common single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *VKORC1* in Caucasian and Asian populations and found that those having either H1 or H2 haplotypes required significantly lower dose of warfarin than those having H7, H8 or H9. In addition, these *VKORC1* haplotypes were correlated with the level of expression of mRNA of *VKORC1* in human liver.

Collectively, genetic polymorphisms involved in both pharmacokinetic (*CYP2C9*) and pharmacodynamic (*VKORC1*) factors, therefore, appear to interplay in the overall interindividual variability of warfarin doses; moreover, the contribution of each factor may differ among different ethnic populations. In this context, we initially studied the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin separately in a large number of patients having different ethnic backgrounds to assess population difference in the pharmacokinetic and pharmacodynamic phenotypes of warfarin among Caucasians, Japanese and African-Americans. We then examined the contribution of genetic polymorphisms of *CYP2C9* and *VKORC1* in smaller subsets of patients in order to study whether differences in the frequencies of *CYP2C9* and *VKORC1* variants would provide a possible explanation for the difference in warfarin requirements between these populations after taking other clinical covariates (e.g., demographics) into account.

Methods

Patients

Three hundred and sixty-five patients (157 Caucasians, 172 Japanese and 36 African-Americans) participated in

the present study. The majority of them (140 Caucasians and 90 Japanese) had been previously investigated with regard to S-warfarin metabolism [9,12]. Further analysis was performed in 179 patients in whom genetic information was available for both *CYP2C9* and *VKORC1*. Each patient received warfarin orally once daily for at least one month with the dose being titrated to an international normalized ratio (INR) target value of 2.0 to 3.0 for Caucasian and African-Americans [22] and 1.5 to 2.5 for Japanese patients [23]. Clinical indications for anticoagulant therapy were prevention or treatment of thromboembolic disease (e.g., atrial fibrillation, deep vein thrombosis, or prosthetic valve replacement). Standard clinical laboratory tests indicated that all of the patients had normal liver function but three had impaired renal function (creatinine clearance ranging from 12 to 23 ml/min). Concurrent medications with potential to affect S-warfarin's metabolism included amiodarone ($n=4$), NSAIDs ($n=3$), cimetidine ($n=2$), thyroid hormone ($n=6$) and carbamazepine ($n=1$).

Study protocol

Blood (5–10 ml) was obtained 12 to 16 h after administration of the last dose of warfarin, during a routine clinic visit. Separated plasma was stored at -70°C until analyzed whereas the buffy coat was maintained at 4°C until extracted for DNA. The study protocol was approved by the IRBs of the respective institutions and written informed consent was obtained from each patient.

Pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin

The plasma concentrations of warfarin's enantiomers were determined by a chiral high-pressure liquid chromatography-based method as previously described [24]. The extent of plasma protein binding was measured using ultrafiltration [24], which permitted estimation of the steady-state unbound plasma concentration [$\text{Cu}(\text{S})$] and unbound oral clearance of S-warfarin [$\text{CL}_{\text{po,u}}(\text{S})$] [9,25].

In addition to the INR value, warfarin's anticoagulant effect was also assessed in 166 patients (54 Caucasians, 91 Japanese and 21 African-Americans) through measurement of the plasma concentration of fully carboxylated or normal prothrombin (NPT) by the carinactivase-1 method [26]. A 'warfarin sensitivity index' [$\text{INR}/\text{Cu}(\text{S})$] was also estimated for all patients.

VKORC1 and *CYP2C9* genotyping

DNA was extracted from the buffy coat of blood using a commercially available kit (Qiagen, Tokyo, Japan). Genotyping for variants in all coding regions and intron/exon boundaries of *VKORC1* (GenBank accession number AY587020) was performed by PCR and direct sequencing

using described primers to identify *VKORC1* 129C > T, 497T > G, 1173C > T, 1196G > A, 1331G > A, 3462C > T and 3730G > A [15,16,21]. In the present study, the position of a nucleotide was numbered according to a previously described system [16]: the A of the ATG initiation codon of AY587020 being denoted as position 1. Thus, the positions of 381, 3673, 6484, 6853 and 7566 of the reference sequence (AY587020) correspond to -4931, -1639, 1173, 1542 and 2255, respectively. Allelic variants of *CYP2C9* (*CYP2C9**1 through *CYP2C9**6, and *CYP2C9**11) were determined by either RFLP analysis or direct sequencing [9,27].

Genotypes for both *VKORC1* and *CYP2C9* were available for 179 patients (115 Caucasians and 64 Japanese). Because no DNA samples were available from African-American patients on warfarin, blood was commercially obtained from 64 healthy African-American subjects (ProMedDx, LLC, Norton, Massachusetts, USA) for analysis of the frequencies of the two gene's allelic variants. The patient haplotypes and their frequencies were estimated by PowerMarker (Ver. 3.23) and a haplotype association test was performed according to the method of Rieder *et al.* [21], which allowed classification of each patient into either Group A (comprising either H1 or H2 haplotypes) or Group B (comprising either H7, H8 or H9 haplotypes). Because the nucleotide at position 861 according to the Rieder's system was not examined, patients with the H7 haplotype were not distinguishable from those with an H8 haplotype. However, this did not affect classification of such individuals into Group B. A log-transformed maintenance dose adjusted for age, sex, body weight and *CYP2C9* genotype and warfarin sensitivity index [INR/Cu(S)] were compared between the patient groups with different haplotypes.

Statistics

Multiple comparisons between the mean values for the pharmacokinetic, pharmacodynamic and demographic data obtained from three populations were performed by ANOVA followed by the Tukey-Kramer test. Relationship between Cu(S) and INR in patients with different *VKORC1* (1173C > T) genotypes was examined by the Pearson's correlation test. Genetic data for deviation from the Hardy-Weinberg proportions were tested using the chi-square test. Multiple comparisons for allelic frequencies of *VKORC1* and *CYP2C9* variants between Caucasian, Japanese and African-American patients were performed by the chi-square test followed by the Tukey-Kramer test. Spearman's rank correlation test followed by the stepwise multiple regression analysis were performed to assess the contribution of patients' covariates [i.e., age, sex, body weight, racial ancestry (Caucasian versus Japanese) and genotypes (wild-type versus heterozygote versus homo- or the combined homozygote) of *VKORC1* and *CYP2C9*] to the overall variability of maintenance doses of warfarin. Squares of the adjusted correlation coefficient (r^2) and Akaike's Information Criterion (AIC) were employed to evaluate the goodness of model fitting. Data are presented as means \pm SD or medians and the upper and lower quartile ranges (25 and 75 percentiles) where appropriate. A *P*-value of less than 0.05 was considered statistically significant for all analyses.

Results

The Caucasian patients were slightly older than the other two populations and there were also differences in body weight between the groups (Table 1). The daily maintenance dose of warfarin and its associated unbound concentration of the S-enantiomer were higher in African-Americans than in Caucasians who, in turn, had larger values than the Japanese; the reverse ranking was present

Table 1 Demographic characteristics of study patients

Parameter	African-American	Caucasian	Japanese
Number of patients studied			
Dose-Cu(S)-INR relationship	36	157	172
Plasma normal prothrombin	21	54	91
Genotyping of <i>CYP2C9</i> and <i>VKORC1</i>	(64)*	115	64
Gender (M/F)	12/24	87/70	101/71
Age (years)	61 \pm 11	65 \pm 13	61 \pm 10†
Body weight (kg)	89.5 \pm 26.4‡	73.7 \pm 17.1	56.5 \pm 10.9†‡
Dose of racemic warfarin (mg/day)	5.3 \pm 2.6	4.7 \pm 2.4	3.5 \pm 1.6†‡
Cu(S) (ng/ml)	6.76 \pm 2.97‡	4.09 \pm 2.08	2.19 \pm 1.25†‡
CL _{po,u} (S) (ml/min)	314.7 \pm 163.1‡	469.4 \pm 294.4	654.3 \pm 376.8†‡
INR	2.67 \pm 0.81	2.50 \pm 0.89	1.84 \pm 0.59†‡
INR/Cu(S) (ml/ng)	0.46 \pm 0.21‡	0.75 \pm 0.45	1.05 \pm 0.58†‡
Normal prothrombin level (μ g/ml)	54.6 \pm 23.2	60.3 \pm 36.1	52.5 \pm 26.1

Abbreviations: Cu(S), plasma unbound concentration of S-warfarin; CL_{po,u}(S), unbound oral clearance of S-warfarin; INR, international normalized ratio of prothrombin time.

Data are mean values \pm SD.

*DNA samples were obtained from healthy subjects.

†*P* < 0.01 between the Caucasian and Japanese groups.

‡*P* < 0.01 between the Japanese and African-American groups.

§*P* < 0.05 between the Caucasian and African-American groups.

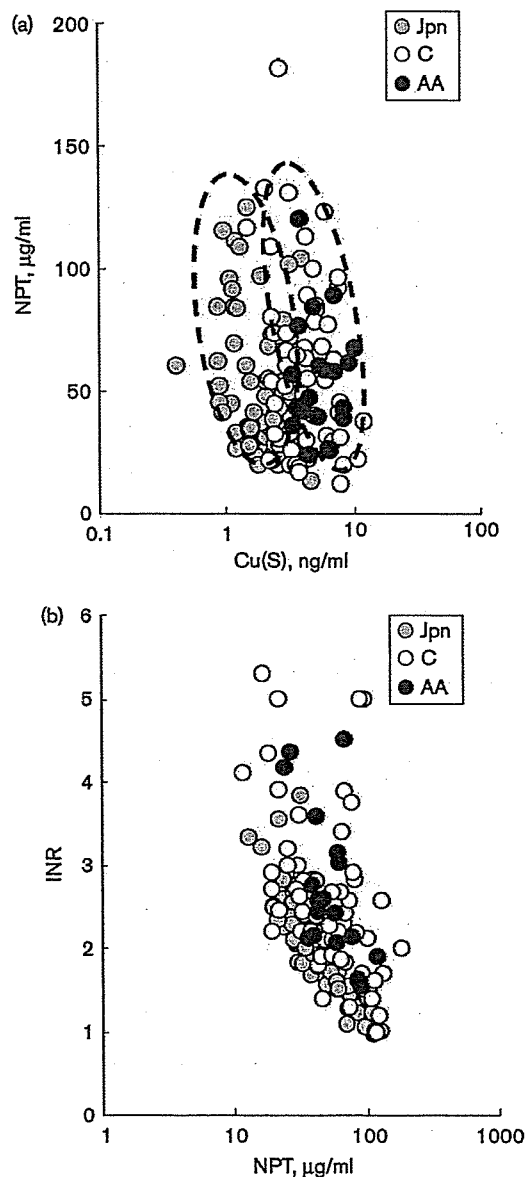
in the oral clearance of unbound S-warfarin (Table 1). No apparent differences in unbound S-warfarin's oral clearance were observed between patients who were given either amiodarone (458 ± 98 ml/min, $n = 4$) or thyroid hormone (330 ± 119 ml/min, $n = 6$) with warfarin and those were given warfarin alone. There was a significant ($P < 0.0001$) correlation between the oral clearances of S-warfarin and R-warfarin ($r = 0.706$).

Population differences were also apparent in the associated measures of anticoagulation (Table 1) with INR values in the Japanese patients being lower than in either of the other two populations. However, the 'warfarin sensitivity index' – a measure of the degree of anticoagulation normalized for the unbound S-warfarin plasma concentration – was higher in Japanese compared to Caucasians or African-Americans. No significant differences were present in the NPT concentrations between the populations, however, the distribution of NPT levels in the Japanese patients relative to the unbound plasma concentration of S-warfarin was shifted to the left compared to that in the Caucasian and African-American populations (Fig. 1a). On the other hand, the relationships between the NPT level and INR value in the three populations overlapped each other (Fig. 1b).

Seven allelic variants in the *VKORC1* gene were identified and these all exhibited differences in frequency between the populations studied (Table 2). With the exception of the 1173C > T transition in Japanese, Hardy-Weinberg equilibrium was present. A synonymous 3462C > T transition (Leu120Leu) in exon 3 was selectively present in African-Americans and two heterozygous cases of an exon 2 substitution (1331G > A, Val66Met) were also found in this population. In contrast, the transitions at 129C > T in exon 1, 497T > G in intron 1 and 1196G > A in intron 1 appeared to be present in Caucasians at a low frequency and the allelic frequencies of the transition at 3730G > A in the 3'-downstream region was significantly higher in African-American and Caucasians compared with Japanese. The most common allelic variant with a significant difference in frequency in all three populations was an 1173C > T polymorphism in intron 1 which was found in 8.6% of African-Americans, 42.2% of Caucasians and 89.1% of Japanese. Population differences in the allelic frequencies of the various *CYP2C9* variants were also found (Table 2); *CYP2C9* variants with reduced metabolizing ability were present at higher frequencies in Caucasians and African-Americans compared with Japanese.

Low but statistically significant ($P < 0.05$) correlations were present between the INR value and the unbound plasma concentrations of S-warfarin in *VKORC1* 1173 C > T heterozygotes and variant homozygotes but not homozygote wild-type in the collective results from all patients (Fig. 2). For any given genotype, the data from

Fig. 1



Relationships between plasma unbound concentrations of S-warfarin [Cu(S)] and plasma concentrations of fully carboxylated normal prothrombin (NPT) (a) and those between plasma concentrations of NPT and INR (b) in Caucasian (open circles), Japanese (grey or halftone circles) and African-American (closed circles) patients.

the Caucasians and Japanese patients overlapped. Additionally, the slopes of the relationships were steeper in the heterozygous and homozygous variant groups (0.163 and 0.183 ml/ng, respectively) than in the wild-type population (0.021 ml/ng). Regarding the novel *VKORC1* 1196 G > A transition, all four such Caucasian patients had an INR value greater than 2.5 at an unbound plasma concentration of S-warfarin < 5 ng/ml (i.e., they had increased warfarin sensitivity). Three of them also carried