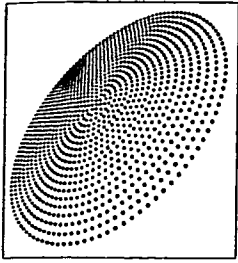


- Cortese R (1991) LFB3, a heterodimer-forming homeoprotein of the LFB1 family, is expressed in specialized epithelia. *EMBO J* 10:1435-1443.
- Enomoto A and Endou H (2005) Roles of organic anion transporters (OATs) and a urate transporter (URAT1) in the pathophysiology of human disease. *Clin Exp Nephrol* 9:195-205.
- Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha SH, Hosoyamada M, Takeda M, Sekine T, Igarashi T, et al. (2002) Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 417:447-452.
- Froguel P and Velho G (1999) Molecular genetics of maturity-onset diabetes of the young. *Trends Endocrinol Metab* 10:142-146.
- Golik A, Weissgarten J, Cotariu D, Cohen N, Zaidenstein R, Ramot Y, Averbukh Z, and Modai D (1993) Renal uric acid handling in non-insulin-dependent diabetic patients with elevated glomerular filtration rates. *Clin Sci (Lond)* 85:713-716.
- Gresh L, Fischer E, Reimann A, Tanguy M, Garbay S, Shao X, Hiesberger T, Piette L, Igarashi P, Yaniv M, et al. (2004) A transcriptional network in polycystic kidney disease. *EMBO J* 23:1657-1668.
- Hediger MA, Johnson RJ, Miyazaki H, and Endou H (2005) Molecular physiology of urate transport. *Physiology (Bethesda)* 20:125-133.
- Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN, Lindner T, Yamagata K, Ogata M, Tomonaga O, et al. (1997) Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat Genet* 17:384-385.
- Hosoyamada M, Ichida K, Enomoto A, Hosoya T, and Endou H (2004) Function and localization of urate transporter 1 in mouse kidney. *J Am Soc Nephrol* 15:261-268.
- Ichida K, Hosoyamada M, Hisatome I, Enomoto A, Hikita M, Endou H, and Hosoya T (2004) Clinical and molecular analysis of patients with renal hypouricemia in Japan-influence of URAT1 gene on urinary urate excretion. *J Am Soc Nephrol* 15:164-173.
- Imaoka T, Kusuhara H, Adachi-Akahane S, Hasegawa M, Morita N, Endou H, and Sugiyama Y (2004) The renal-specific transporter mediates facilitative transport of organic anions at the brush border membrane of mouse renal tubules. *J Am Soc Nephrol* 15:2012-2022.
- Iwai N, Mino Y, Hosoyamada M, Tago N, Kokubo Y, and Endou H (2004) A high prevalence of renal hypouricemia caused by inactive SLC22A12 in Japanese. *Kidney Int* 66:935-944.
- Kikuchi R, Kusuhara H, Hattori N, Shiota K, Kim I, Gonzalez FJ, and Sugiyama Y (2006) Regulation of the expression of human organic anion transporter 3 by hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ / $\beta$  and DNA methylation. *Mol Pharmacol* 70:887-896.
- Lazzaro D, De Simone V, De Magistris L, Lehtonen E, and Cortese R (1992) LFB1 and LFB3 homeoproteins are sequentially expressed during kidney development. *Development* 114:469-479.
- Ledermann HM (1995) Is maturity onset diabetes at young age (MODY) more common in Europe than previously assumed? *Lancet* 345:648.
- Lee YH, Sauer B, and Gonzalez FJ (1998) Laron dwarfism and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Hnf-1 $\alpha$  knockout mouse. *Mol Cell Biol* 18:3059-3068.
- Li T, Walsh JR, Ghishan FK, and Bai L (2004) Molecular cloning and characterization of a human urate transporter (hURAT1) gene promoter. *Biochim Biophys Acta* 1681:53-58.
- Magoula I, Tsapas G, Paletas K, and Mavromatidis K (1991) Insulin-dependent diabetes and renal hypouricemia. *Nephron* 59:21-26.
- Maher JM, Slitt AL, Callaghan TN, Cheng X, Cheung C, Gonzalez FJ, and Klaassen CD (2006) Alterations in transporter expression in liver, kidney, and duodenum after targeted disruption of the transcription factor HNF1 $\alpha$ . *Biochem Pharmacol* 72:512-522.
- Mendel DB and Crabtree GR (1991) HNF-1, a member of a novel class of dimerizing homeodomain proteins. *J Biol Chem* 266:677-680.
- Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M, Doyen A, Kress C, Bach JP, Babinet C, and Yaniv M (1996) Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* 84:575-585.
- Pontoglio M, Prie D, Cheret C, Doyen A, Leroy C, Froguel P, Velho G, Yaniv M, and Friedlander G (2000) HNF1 $\alpha$  controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO Rep* 1:359-365.
- Pontoglio M, Sreenan S, Roe M, Pugh W, Ostrega D, Doyen A, Pick AJ, Baldwin A, Velho G, Froguel P, et al. (1998) Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ -deficient mice. *J Clin Invest* 101:2215-2222.
- Rafey MA, Lipkowitz MS, Leal-Pinto E, and Abramson RG (2003) Uric acid transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12:511-516.
- Rey-Campos J, Chouard T, Yaniv M, and Cereghini S (1991) vHNF1 is a homeoprotein that activates transcription and forms heterodimers with HNF1. *EMBO J* 10:1445-1457.
- Ryffel GU (2001) Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *J Mol Endocrinol* 27:11-29.
- Shichiri M, Iwamoto H, and Shiigai T (1987) Diabetic renal hypouricemia. *Arch Intern Med* 147:225-228.
- Shih DQ, Bussen M, Sehayek E, Ananthanarayanan M, Shneider BL, Suchy FJ, Shefer S, Bollilini JS, Gonzalez FJ, Breslow JL, et al. (2001) Hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism. *Nat Genet* 27:375-382.
- Shiota K (2004) DNA methylation profiles of CpG islands for cellular differentiation and development in mammals. *Cytogenet Genome Res* 105:325-334.
- Tronche F and Yaniv M (1992) HNF1, a homeoprotein member of the hepatic transcription regulatory network. *Bioessays* 14:579-587.
- Winter WE and Silverstein JH (2000) Molecular and genetic bases for maturity onset diabetes of youth. *Curr Opin Pediatr* 12:388-393.
- Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, Lathrop GM, Boriraj VV, et al. (1996) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* 384:455-458.

---

**Address correspondence to:** Dr. Yuichi Sugiyama, Department of Molecular Pharmacokinetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan. E-mail: sugiyama@mol.f.u-tokyo.ac.jp

---



特集●Vol.34 No.1 トランスポーター

# トランスポーターの 遺伝子多型と臨床

家入一郎\*

## 1. はじめに

トランスポーターは、腫瘍細胞に発現する抗がん剤に対する耐性の原因タンパクとして特定された。しかし、その後の研究により、特定されたトランスポーターの殆どがヒトの正常組織に普通に発現しており、生体物質や異物を始めとする医薬品の膜を介した取り込みと汲み出しに関与することが明らかとされた。近年、薬物の効果や体内動態に見る大きな個人差を関連タンパク遺伝子の多型から説明し、医薬品の適正使用へ活用する試みが盛んに行われている。その代表は、薬物代謝酵素であるが、代謝を受けるためには、肝臓に薬物が運ばれる、すなわち、分布する必要がある。トランスポーターは、この分布のみならず、吸収や排泄過程にも重要な役割を果たすことから、代謝酵素と同様に遺伝子多型からの個人差解明が期待されている。本稿では、現在までに詳細な遺伝子多型解析が行われ、その機能への関与が明らかとなったトランスポーターを取り上げ、遺伝子診断に基づいた医薬品適正使用への試みの一端を紹介する。

## 2. トランスポーター遺伝子多型

現在までに数多くのトランスポーター遺伝子について多型が報告されている。表1にその一部をまとめたが、総ての変異が機能の変化を伴う訳ではない。変異の多くは一塩基置換 (SNPs) であり、薬物代謝酵素に見られる遺伝子の全欠損や重複の報告はない。変異のヒトでの機能評価はSNPsの有無で行われるケースが多いものの、MDR1やOATP-C遺伝子では、いくつかのSNPsが連鎖不均衡にあるため、ハプロタイプが指標となる場合がある。また、薬物代謝酵素遺伝子と同様に、変異の頻度には人種間で差が見られることから、以下に述べる効果や体内動態への影響には人種差に留意する必要がある。我々の解析経験では、例外もあるだろうが、日本人での変異の頻度は、アフリカ系黒人と共通点が多い印象がある。また、変異の数は代謝酵素遺伝子と比べ、多い感がある。

## 3. 遺伝子多型の臨床的意義

トランスポーター遺伝子多型の機能評価は遺伝性疾患との関連が中心に展開されてきた。

\*鳥取大学医学部附属病院薬剤部 助教授・副薬剤部長

表1 主な薬物トランスポーター遺伝子の多型と日本人での頻度

gene	mutation	effect	frequency (%)	遺伝子多型の機能評価	
				<i>in vitro</i> 評価	<i>in vitro</i> 評価
MDR1	-129T>C	—	8.30		
	1236C>T	—	64.60		
	2677G>T	893Ala>Ser	41.70	◎	◎
	2677G>A	893Ala>Thr	21.80		
	2956A>G	986Met>Val	0.50		
	3435C>T	—	49.00		
MRP1	128G>C	43Cys>Ser	1.00		
	218C>T	73Thr>Ile	1.00	◎	なし
	2168G>A	723Arg>Gln	7.30		
	3173G>A	1058Arg>Gln	1.00		
MRP2	-24C>T	—	18.80		
	1249G>A	417Val>Ile	12.50		
	2302C>T	768Arg>Trp	1.00	◎	◎
	2366C>T	789Ser>Phe	1.00		
	4348G>A	1450Ala>Thr	1.00		
BCRP	34G>A	12Val>Met	18.00		
	376C>T	126Gln>Stop codon	1.00	◎	◎
	1515C>delete	509Met>Stop codon	0.50		
OATP-B	109C>T	37Pro>Thr	30.90		
	935G>A	312Arg>Gln	32.80	◎	なし
	1457C>T	486Ser>Phe	30.90		
OATP-C	388A>G	130Asn>Asp	62.90		
	521T>C	174Val>Ala	15.80	◎	◎
	1454G>T	485Cys>Phe	0.80		
OATP-8	334T>G	112Ser>Ala	29.70	◎	なし
	699G>A	233Met>Ile	29.70		
OAT3	1166C>T	389Ala>Val	0.80	なし	◎
OCT1	123625C>T	341Phe>Leu	16.10		
	126827A>G	408Met>Val	82.80	◎	◎
OCT2	29679C>T	200Thr>Met	98.96	◎	なし
	31048T>G	270Ser>Ala	12.50		

表中の変異は、我々の研究室で検討を加えたもので、一部のみを抜粋した。また、健康成人から得たゲノムDNAを試料とした。

しかし、ここ数年、薬物の効果や体内動態についての知見が急速に蓄積されつつある。機能評価はノックアウトマウスや発現細胞実験が中心となるが、それらの結果を受けて展開されているヒトでの臨床試験の結果を中心に述べる。

### 3.1 MDR1 (ABCB1) 遺伝子

表1に見るように、p-糖タンパクをコードするMDR1遺伝子には、非常に多くの変異が確認されている。100名の日本人の遺伝子解析を行った結果では、総ての検体は何らかの変異を有していた<sup>1)</sup>。それらの変異の中では、1236C>T (exon 12)、2677G>T/A (exon 21)、3435C>T (exon 26) が注目されている。当初、

3435C>Tの機能変化が衝撃をもって報告されたが、本変異はアミノ酸置換も伴わない変異であったことから、別の変異との関連が考えられていた。その後、これら3種の変異が連鎖不均衡にあり、高率に同一染色体上に存在する(このパターンをハプロタイプと呼び、総ての位置に変異がない場合はC-G-Cの配列を、総て変異体であると、T-T(A)-Tの配列をとる)ことが明らかとなった。2677G>T/Aがアミノ酸置換 [893Ala>Ser (Thr)] を伴う。図1には、心不全治療薬であり、血中濃度を測定するジゴキシンでの結果を示す<sup>2)</sup>。検討は、2677G-3435Cと2677T-3435Tのホモ接合タイプ(それぞれI群とIII群)、G-C/T-Tのヘテロ接合タイ

ブ (II群) の遺伝子型を示す健常成人にジゴキシンを経口と静注で投与し、体内動態を比較した。興味深いことに、ジゴキシンを静注した際の血中濃度には3群間で差は無かったが、経口投与での吸収率は、III群>II群>I群の順で低い結果であった。この検討では、2つのポイントがある。1つ目は、I群で吸収率が低かった点である。腸管に発現するp-糖タンパクは、小腸上皮細胞に到達した薬物を再度、腸管内に汲み出す働きを有していることから、機能が正常に働く場合は、薬物の吸収率を低下させる方向に作用する。従って、本検討の結果からは、変異は機能低下、すなわち、汲み出し能の低下=吸収率の上昇、を伴うことが考えられる。2つ目は、多型の影響が経口投与時にのみ見られた点である。静注したジゴキシンは腸管上皮細胞と接触することがない。従って、腸管に発現するp-糖タンパクの影響を受けない。現在までに、p-糖タンパクが関与する体内動態や薬物相互作用が数多く報告されているが<sup>3)</sup>、経口と静注、すなわち、医薬品の投与方法の違いにより結果が異なる。本現象は臨床的にも極めて重要となる。

トランスポーター遺伝子多型の機能評価では、MDR1遺伝子が最もよく検討が加えられており、情報量も多い。一部を表2にまとめた<sup>3)</sup>。効果との関連では、三環系抗うつ薬と薬剤性低血圧、HIV-1治療薬と免疫機能改善、免疫抑制剤とステロイド使用期間や中枢性副作用などが

あり、いずれも変異による機能低下を指摘する。しかし、体内動態への影響を見ると、論文間で必ずしも一致した知見が得られておらず、ジゴキシンや抗アレルギー薬であるフェキソフェナジンに見られる結果は、機能評価に混乱を招いている。MDR1遺伝子のヒトでの機能評価には、いくつかの問題点がある。1つ目は、使用する基質の特異性がある。表2に挙げた医薬品の中で、ジゴキシンやフェキソフェナジンは、p-糖タンパクの基質であるが、同時に後述するOATPの基質でもある。OATPの分子種の中には、機能変化を伴う遺伝子変異が知られている。また、シクロスポリンやタクロリムスは、より特異性の高い基質と思われるが、いずれも個人差の大きい代謝酵素 (CYP3A) で代謝されるため、得られる結果に代謝酵素の個人差が混在する。2つ目は、発現部位が挙げられる。p-糖タンパクは、小腸、肝臓、腎臓、脳毛細血管など、多くの部位に発現し、それぞれが輸送方向性を持って機能している。従って、血中濃度を指標した場合には、どこの部位の関与が反映されたかが不明と言える。残念ながら、p-糖タンパクに特異的で、代謝を受けない基質は、今のところ見つかっていない。しかし、後者の問題については、PETを用いた脳毛細血管、 $\gamma$ カメラによる肝胆輸送<sup>4)</sup>といった、局所での機能を評価する方法が工夫されている。

### 3.2 BCRP (ABCG2) 遺伝子

p-糖タンパクと同様にATPを駆動力として異

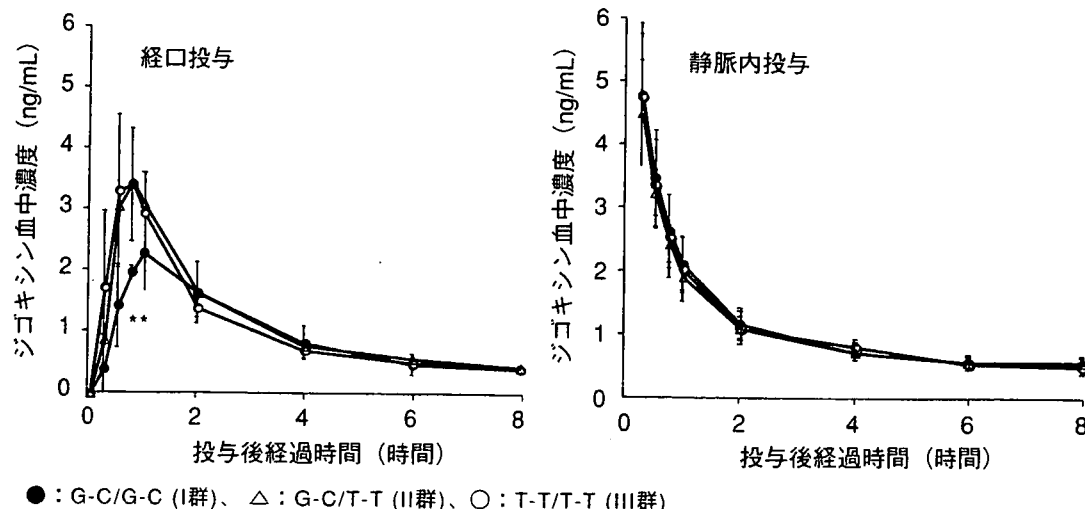


図1 MDR1遺伝子型とジゴキシン血中濃度推移 (文献2を一部変更)

表2 MDR1遺伝子多型のヒトでの機能評価 (文献3より一部抜粋)

遺伝子変異	基質薬物	対象	機能変化
3435C>T	ジゴキシシン	健常成人	T/T>C/C (最高血中濃度)
2677G>T	ジゴキシシン	健常成人	M/M>W/M>W/W (吸収率)
3435C>T			W/W>W/M>M/M (腎・分泌クリアランス)
3435C>T	ジゴキシシン	健常成人	C/C>T allele 保有者 (血中濃度)
3435C>T	フェニトイン	健常成人	T/T>C/C (血中濃度)
3435C>T	シクロスポリン	健常成人	(T/T+T/C)>(C/C) (血中濃度)
3435C>T	シクロスポリン	腎移植患者	変化なし (血中濃度や拒絶反応の頻度)
3435C>T	フェキソフェナジン	健常成人	C/C=T/T
3435C>T	フェキソフェナジン	健常成人	C/C>T/T
3435C>T	ノルトリプチリン	鬱患者	T/T>C/T>C/C (薬剤性低血圧)
3435C>T	ネルフィナビル	HIV-1患者	T/T>C/T>C/C (CD4細胞数や回復率)
	エファビレンツ		C/C>C/T>T/T (最低血中濃度)
2677G>T	ステロイド	小児心移植患者	W/W>W/M>M/M (ステロイド服用期間)
3435C>T	タクロリムス	部分肝移植患者	(T/A)>G (中枢性副作用頻度)
2677G>T/A			

W:野生型アレル、M:変異アレル、

物を細胞外へ汲み出すABCトランスポーター(後述するMRP2もこの種類)に属するBCRPにもその遺伝子には多くの変異が報告されている。その中では、421C>A (141Gln>Lys)が注目される。ヒト胎盤や変異導入細胞でのタンパク発現量が、本変異により著しく減少することが報告されている<sup>5)</sup>。ヒトでの機能評価は十分ではないが、抗がん剤であるカンプトテシンの誘導体、ジフロモテカンを経口投与した臨床試験が報告されている(図2)<sup>6)</sup>。平均血中濃度推移には、変異の有無で大きな差が観察される。

### 3.3 MRP2 (ABCC2) 遺伝子

肝臓の胆管側膜に発現するMRP2は、肝臓内で産生される各種抱合体を基質としている。抱合型ビリルビン高値を主徴とする先天性疾患であるDubin-Johnson症候群はMRP2の機能障害により生じ、原因となる遺伝子変異が数多く同定されている。789Ser>Pheといった原因となる遺伝子変異は、タンパクの膜上へのソーティングを障害する<sup>7)</sup>。これらの変異の多くはその頻度は低い(<1%)ものの、健常人でもよく目することがある。しかし、変異がホモ型で存在する頻度は極めて低い。Dubin-Johnson症候群は

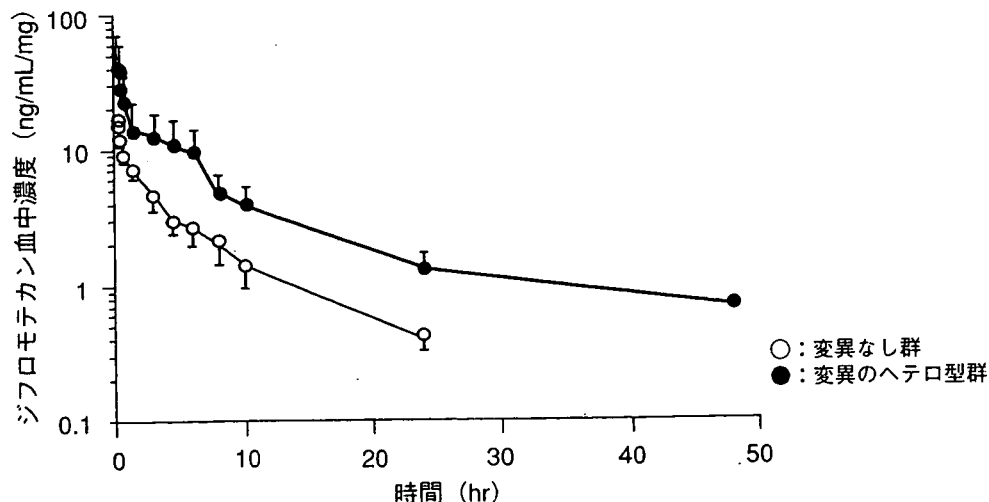


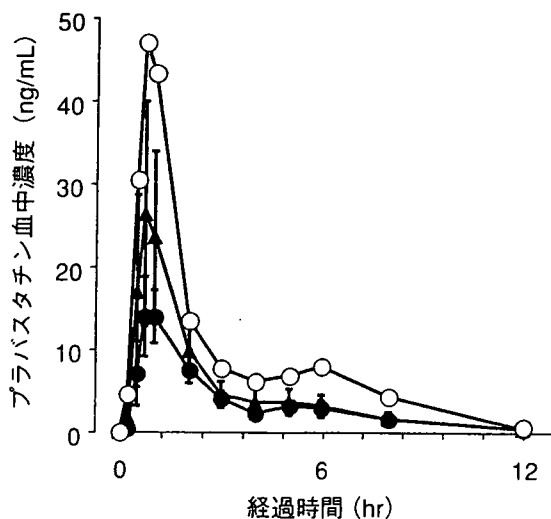
図2 BCRP421C>A (141Gln>Lys) 変異とジフルモテカン血中濃度推移 (文献6より)

原因遺伝子変異がホモ接合体をとることで発症することから、実際には希な疾患となる。これらの変異に対して、機能に影響しない変異も多い。例えば、417Val>Ileの日本人での頻度は、12.5%と極めて高いが、その機能には変化が見られない<sup>7,8)</sup>。

### 3.4 OATP-C (SLCO1B1) 遺伝子

p-糖タンパク、BCRP、MRP2が排出系 (efflux) のトランスポーターであるのに対し、肝の類洞側膜に発現するOATP-Cは、薬物の肝への取り込み (uptake) に働く。多数の遺伝子変異が確認されており、現在までに約20種類のハプロタイプが報告されている。その中で、アミノ酸置換を伴う130Asn>Aspと174Val>Ala、さらには、最近、プロモーター領域に位置する-11187G>Aが注目されている。日本人の一部ではこれらの変異はハプロタイプを構成している。130位と174位の2箇所の変異が同時に存在するタイプをOATP-C\*15型、3種類の変異が同時に存在する場合をOATP-C\*17型と呼ぶ (国際命名) が、著者らの解析では、日本人では\*17型が多いようである。130位のみに変異がある場合は、OATP-C\*1b型と呼び、日本人で最も多い遺伝子型である。\*1b型、\*15型のホモ型 (それぞれをI、III群)、ヘテロ型 (II群) にOATP-Cの基質薬物であり、高脂血症治療薬であるプラバスタチン (HMG-CoA還元酵素阻害剤) を投与した際の血中濃度推移を図3に示す<sup>9)</sup>。II群、III群、すなわち、174位に変異を有する被検者では、全身クリアランスの低下と血中濃度の上昇が観察される。OATP-C遺伝子多型のヒトでの機能評価は、その後、数報が報告されている。いずれの研究もプラバスタチンを使用しているが、総ての報告で一致した結果が得られている。さらに、発現系による*in vitro*研究もいくつか実施されている。それらの知見をまとめると、174位の変異により基質薬物の輸送能は低下する。従って、ヒトで観察された変異保有者での血中濃度の上昇は、プラバスタチンの肝への取り込みの低下が原因と考えられる。HMG-CoA還元酵素阻害剤は肝に取り込まれることでコレステロール低下作用を示すことから、本変

異保有患者では、期待する効果が得られないことが予想される。この仮説を証明する研究が徐々に報告されつつある<sup>10)</sup>。本変異保有患者に対しては、OATP-Cの基質ではないスタチンの投与が適切であることが示唆される。



●: \*1b/\*1b (I群)、▲: \*1b/\*15 (II群)、○: \*15/\*15 (III群)

図3 OATP-C遺伝子型とプラバスタチン血中濃度推移 (文献9より)

### 3.5 ビリルビンの肝輸送と遺伝子多型

肝でのビリルビンの輸送については、まだ不明な点が多いが、トランスポーターが関与する輸送機構としては図4に示す経路が考えられている; OATP-Cによる非抱合型ビリルビンの取り込み→グルクロン酸転移酵素 (UGT1A1) による抱合化→MRP2による抱合体の胆汁排泄。いずれのタンパクをコードする遺伝子にも機能変化を伴う多型が知られている。UGT1A1では、プロモーター領域に存在する (TA) 配列の繰り返し数の異なるUGT1A1\*28が日本人で知られており、ジルベール症候群 (Gilbert syndrome) の原因遺伝子変異である。それぞれの機能を評価する目的で、変異の有無による血清ビリルビン値の比較を試みた<sup>8)</sup>。その結果、UGT1A1\*28やOATP-C\*15変異を有する場合、総ビリルビンとともに、非抱合型ビリルビンが高値となる傾向が見られた。さらに、非抱合型ビリルビン濃度とプラバスタチンの血中濃度とは良好な正の相関を認めた。以上の結果から、遊離型ビリルビンの肝取り込みの一部には、OATP-Cが関与することが示唆された。ここでは、生体成分で

あるビリルビンを取り上げたが、医薬品の体内動態を数種類の遺伝子多型を考慮して明らかにする検討が最近の本領域の流れとなっている。

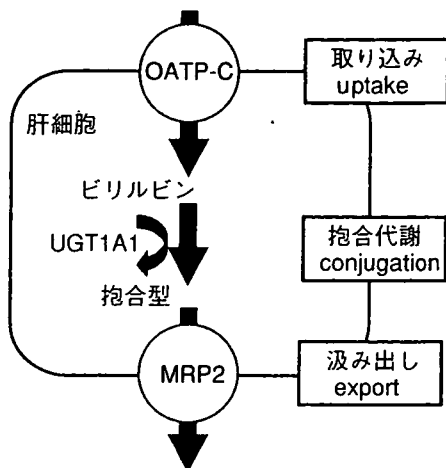


図4 トランスポーターが関与したビリルビン肝輸送の1例

#### 4. おわりに

一部のトランスポーターのみを取り上げたが、その輸送機能の個人差が遺伝子多型により生じていることが明らかとなりつつある。しかし、生体成分や医薬品の動態は、いくつかのプロセスからなり、多くのタンパクが関与する。代謝酵素やトランスポーター遺伝子多型により、大まかな個人の特徴付けは可能となってきたが、実用化には、さらなる精度が要求される。多遺伝子多型の同時解析(診断)やエピジェネティックな遺伝子発現メカニズムなど、さまざまなハード、ソフトを取り入れた研究の展開が、今後ますます必要となるであろう。

#### ■文献

- 1) Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S, Terakawa N, Otsubo K: Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene, *J Pharmacol Exp Ther*, **297**: 1137-1143, 2001.
- 2) Kurata Y, Ieiri I, Kimura M, Morita T, Irie S, Urae A, Ohdo S, Ohtani H, Sawada Y, Higuchi S, Otsubo K: Role of human MDR1 gene polymorphism in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein, *Clin Pharmacol Ther*, **72**: 209-219, 2002.

- 3) Ieiri I, Takane H, Otsubo K: The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications, *Clin Pharmacokinet*, **43**: 553-576, 2004.
- 4) Wong M, Evans S, Rivory LP, Hoskins JM, Mann GJ, Farlow D, Clarke CL, Balleine RL, Gurney H: Hepatic technetium Tc 99m-labeled sestamibi elimination rate and ABCB1 (MDR1) genotype as indicators of ABCB1 (P-glycoprotein) activity in patients with cancer, *Clin Pharmacol Ther*, **77**: 33-42, 2005.
- 5) 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.
- 6) Sparreboom A, Gelderblom H, Marsh S, Ahluwalia R, Obach R, Principe P, Twelves C, Verweij J, McLeod HL: Diflomotecan pharmacokinetics in relation to ABCG2 421C>A genotype, *Clin Pharmacol Ther*, **76**: 38-44, 2004.
- 7) Hirouchi M, Suzuki H, Itoda M, Ozawa S, Sawada J, Ieiri I, Otsubo K, Sugiyama Y: Characterization of the cellular localization, expression level, and function of SNP variants of MRP2/ABCC2, *Pharm Res*, **21**: 742-748, 2004.
- 8) Ieiri I, Suzuki H, Kimura M, Takane H, Nishizato Y, Irie S, Urae A, Kawabata K, Higuchi S, Otsubo K, Sugiyama Y: Influence of common variants in the pharmacokinetic genes (OATP-C, UGT1A1, and MRP2) on serum bilirubin levels in healthy subjects, *Hepatol Res*, **30**: 91-95, 2004.
- 9) Nishizato Y, Ieiri I, Suzuki H, Kimura M, Kawabata K, Hirota T, Takane H, Irie S, Kusuhara H, Urasaki Y, Urae A, Higuchi S, Otsubo K, Sugiyama Y: Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: Consequences for pravastatin pharmacokinetics, *Clin Pharmacol Ther*, **73**: 554-565, 2003.
- 10) Tachibana-Iimori R, Tabara Y, Kusuhara H, Kohara K, Kawamoto R, Nakamura J, Tokunaga K, Kondo I, Sugiyama Y, Miki T: Effect of genetic polymorphism of OATP-C (SLCO1B1) on lipid-lowering response to HGM-CoA reductase inhibitors, *Drug Metab Pharmacokinet*, **19**: 375-380, 2004.

#### Pharmacogenetics of Drug Transporter and its Clinical Implications

Ichiro Ieiri\*

\*Department of Hospital Pharmacy, Tottori University Hospital

## ○ 基礎

## 薬物トランスポーターと薬剤感受性 (2)

## —薬物トランスポーター遺伝子多型の臨床的意義—

家入 一郎\*

## 要 旨

抗癌剤の耐性原因タンパク質として同定されたトランスポーターの多くは、血液脳関門、肝、腎、消化管などの諸臓器にも発現し、薬物の体内動態（吸収、分布、排泄）や臨床効果に大きく寄与することが明らかになりつつある。体内動態や効果の個人差をこれらのトランスポーターをコードする遺伝子多型から説明し、医薬品の個別適正使用に活用する研究が精力的に行われている。薬物代謝酵素遺伝子多型とともにその有用性が期待される。

## はじめに

消化管から循環血への薬物移行（経口吸収）、その後の臓器や組織への分布、胆汁や尿への排泄は、種々の細胞膜を介した輸送現象である。受動的な拡散に加え、細胞膜に局在する輸送担体、トランスポーターが重要な役割を果たす。多くは小腸、肝、腎などの消化管や脳、肺といった主要臓器の上皮細胞（あるいは血管内皮細胞）に発現し、膜を介した薬物の取り込みと汲み出しに関与する。トランスポーターが関与する薬物の吸収、分布、排泄過程には、代謝過程と同様に大きな個人差が見られる。このため、代謝酵素と同

様にトランスポーターをコードする遺伝子の多型や発現調節機構からこの個人差を解明する研究が精力的に行われている。本稿では、現在までに詳細な遺伝子多型解析が行われ、その機能への関与が明らかとなったトランスポーターを取り上げ、遺伝子診断に基づいた医薬品適正使用への試みの一端を紹介する。

## トランスポーター遺伝子多型

現在までに数多くのトランスポーター遺伝子について多型が報告されている。表1に重要な変異のみを抜粋してまとめた。変異の多くは1塩基多型（SNPs）で、薬物代謝酵素に見られる遺伝子の全欠損や重複の報告は今のところない。ヒトでの変異の機能評価は、SNPsの有無で行われるケースが多い。しかしSNPsのみでは個人差が説明できないケースや幾つかのSNPsが連鎖不均衡にある遺伝子では、ハプロタイプ解析が導入されてい

\* 鳥取大学医学部附属病院 薬剤部 助教授・副薬剤部長

キーワード：薬物輸送タンパク質、薬物トランスポーター、遺伝子多型、薬物動態、臨床効果

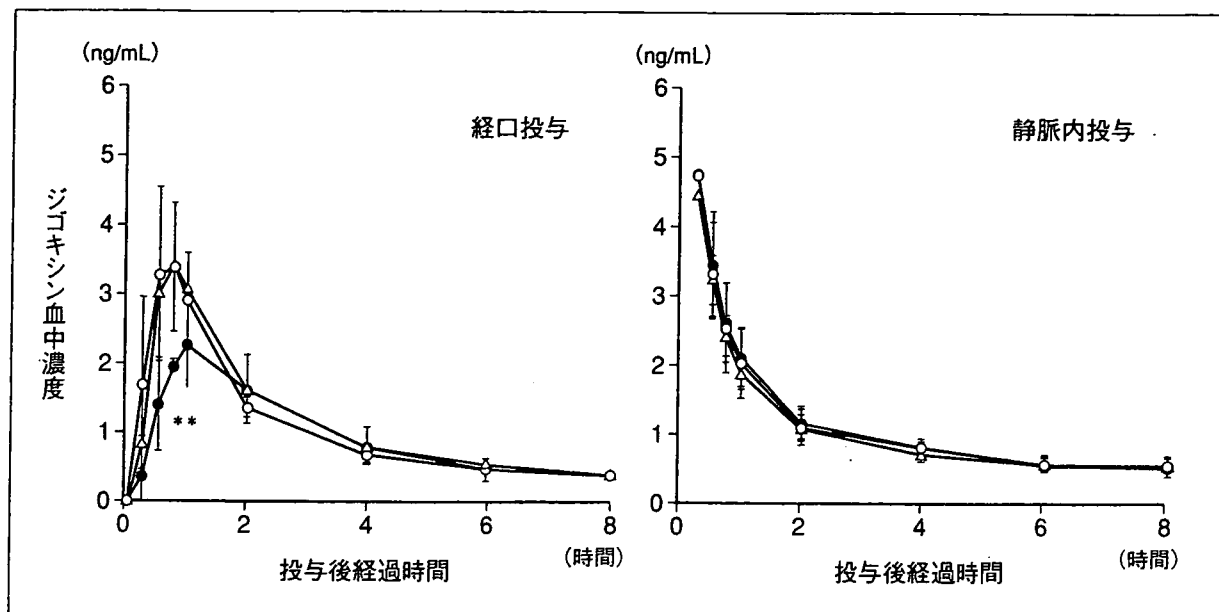


表1 主な薬物トランスポーター遺伝子の多型と日本人での頻度

遺伝子	変異	効果	頻度 (%)
<i>MDR1</i>	-129T>C	—	8.30
	1236C>T	—	64.60
	2677G>T	893Ala>Ser	41.70
	2677G>A	893Ala>Thr	21.80
	2956A>G	986Met>Val	0.50
	3435C>T	—	49.00
<i>MRP1</i>	128G>C	43Cys>Ser	1.00
	218C>T	73Thr>Ile	1.00
	2168G>A	723Arg>Gln	7.30
	3173G>A	1058Arg>Gln	1.00
<i>MRP2</i>	-24C>T	—	18.80
	1249G>A	417Val>Ile	12.50
	2302C>T	768Arg>Trp	1.00
	2366C>T	789Ser>Phe	1.00
	4348G>A	1450Ala>Thr	1.00
<i>MRP4</i>	559G>T	187Gly>Trp	?
	2578G>A	860Val>Met	?
	3095C>G	1932Pro>Arg	?
<i>BCRP</i>	34G>A	12Val>Met	18.00
	376C>T	126Gln>stop codon	1.00
	421C>A	141Gln>Lys	35.50
	1515C>delete	509Met>stop codon	0.50
<i>OATP-B</i>	109C>T	37Pro>Thr	30.90
	935G>A	312Arg>Gln	32.80
	1457C>T	486Ser>Phe	30.90
<i>OATP-C</i>	388A>G	130Asn>Asp	62.90
	521T>C	174Val>Ala	15.80
	1454G>T	485Cys>Phe	0.80
<i>OATP-8</i>	334T>G	112Ser>Ala	29.70
	699G>A	233Met>Ile	29.70
<i>OAT3</i>	1166C>T	389Ala>Val	0.80
<i>OCT1</i>	123625C>T	341Phe>Leu	16.10
	126827A>G	408Met>Val	82.80
<i>OCT2</i>	29679C>T	200Thr>Met	98.96
	31048T>G	270Ser>Ala	12.50

表中の変異は我々の研究室で検討を加えたもので、一部のみを抜粋した。また、健康成人から得たゲノム DNA を試料とした。表中 ? 印は未検討を意味する。

略語：巻末の「今月の略語」参照

図1 *MDR1* 遺伝子多型とジゴキシン血中濃度推移 (文献<sup>3)</sup>より引用一部改変)

●：2677G/3435C のホモ接合タイプ(1群), △：2677G/3435C と 2677T/3435T のヘテロ接合タイプ(2群), ○：2677T/3435T のホモ接合タイプ(3群), \* $P < 0.05$ . 1群の血中濃度が2群, 3群の値より有意に低い.

る。*MDR1* や *OATP-C* 遺伝子が例として挙げられる。さらに、薬物代謝酵素遺伝子と同様に変異の頻度には人種間で差が見られることから、効果や体内動態への影響には人種差が指摘される。我々の解析経験では、例外もあるだろうが、日本人での変異の頻度はアフリカ系黒人と共通する印象を持つ。また、変異の数は代謝酵素遺伝子と比べて多い。

#### 遺伝子多型の臨床的意義

トランスポーター遺伝子多型の機能評価は、遺伝性疾患との関連が中心に展開されてきた。薬物の体内動態や臨床効果についての知見は、ここ数年急速に蓄積されつつある。機能評価はノックアウトマウスや発現細胞実験が中心であるが、ここではヒトでの機能評価を中心に述べる。

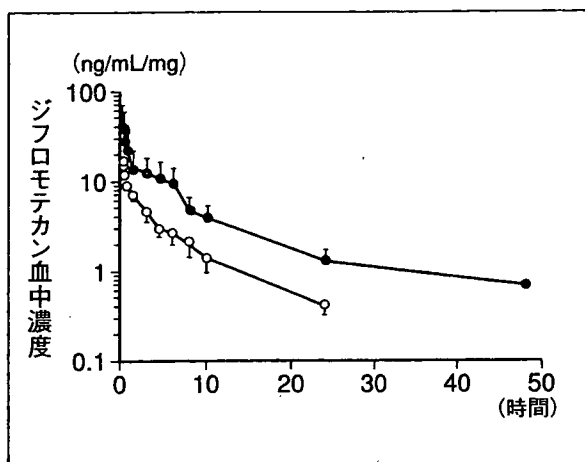
#### 1. *MDR1* (*ABCB1*) 遺伝子<sup>1)</sup>

p糖タンパク質をコードする *MDR1* 遺伝子には数多くの変異が確認されている。100人の日本人の解析結果ではすべての検体が何

らかの変異を有していた。それらの変異の中では、5' 上流非翻訳領域にある -1517aT>C と -129T>C、翻訳領域にある 2677G>T(A) (エキソン 21) と 3435C>T (エキソン 26) が注目されている。面白いことに、それぞれの領域にある変異は高率に連鎖不均衡の関係にあり、同一染色体上に存在する。-1517aT/-129T, -1517aC/-129C, 2677G/3435C, 2677T(A)/3435T のハプロタイプを高率で構成する<sup>1)2)</sup>。しかし、2677G>T(A) のみがアミノ酸置換 [893Ala>Ser(Thr)] を伴う。

図1に、心不全治療薬ジゴキシンでの結果を示す<sup>3)</sup>。検討は、2677G/3435C と 2677T/3435T のホモ接合タイプ (それぞれ1群と3群), (2677G/3435C)/(2677T/3435T) のヘテロ接合タイプ (2群) の遺伝子型を示す健康成人にジゴキシンを経口と静注で投与し、体内動態を比較した。興味深いことに、ジゴキシンを静注した際の血中濃度には3群間で差はなかったが、経口投与での吸収率は3群>2群>1群の順で低い結果であった。腸管に発現するp糖タンパク質は、小腸上皮

図2 BCRP 421C>A (141Gln>Lys) 変異による  
ジフロモテカン体内動態変化  
(文献<sup>5)</sup>より引用改変)



縦軸はジフロモテカン血中濃度で、濃度を投与量で補正してある。

○：変異なし群

●：421C>A変異のヘテロタイプ保有患者

細胞に到達した薬物を再度腸管内に汲み出す働きを有していることから、機能が正常に働く場合や高発現する場合は薬物の吸収率を低下させる方向に作用する。したがって本検討の結果からは、変異は機能低下=汲み出し能の低下=吸収率の上昇を伴うことが考えられる。さらに、本検討では多型の影響が経口投与時にのみ見られた。静注したジゴキシンは腸管上皮細胞と接触することがない。したがって、腸管に発現するp糖タンパク質の影響を受けない。現在までに、p糖タンパク質が関与する体内動態や薬物相互作用が数多く報告されているが、経口と静注、すなわち医薬品の投与方法の違いにより得られる結果が異なる。p糖タンパク質の基質で経口と注射の両方の剤形がある医薬品を使用する場合には注意が必要と言える。

トランスポーターの中ではMDR1遺伝子多型が最もよく検討が加えられており、情報量も多い<sup>1)</sup>。臨床効果との関連では、三環系抗うつ薬ノルトリプチリンによる薬剤性低血圧(3435T/Tで生じやすい)、HIV-1治療

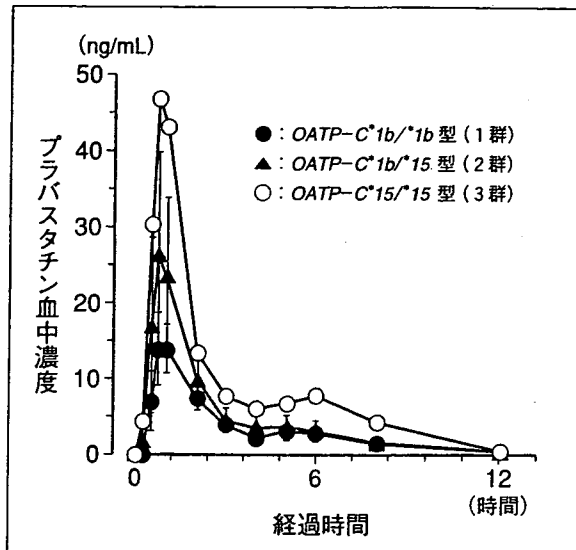
薬によるCD4細胞数や免疫機能改善効果(3435T/Tで高い)、心移植小児患者におけるステロイド使用期間(2677T/T, 3435T/Tで短い)などがあり、いずれも変異による機能低下を支持する結果である。

MDR1遺伝子多型の機能評価で特に体内動態への影響を見ると、報告論文間で異なった結果が得られており混乱が見られる。具体的には、ここで紹介した結果とは異なり、変異が輸送機能亢進を伴う方向に作用することを指摘する。検討に使用する基質薬物の特異性、取り扱う変異の種類などの影響に加え、さまざまな部位で輸送方向性を保ちながら機能するp糖タンパク質の評価の難しさを示す結果と言える。可能な限り局所での機能評価が理想的であり、PETを用いた脳毛細血管を介した脳への薬物移行やγカメラによる肝胆輸送などの知見の集積が行われている。

## 2. BCRP (ABCG2) 遺伝子

p糖タンパク質と同様にATPを駆動力として薬物を細胞外に汲み出すABCトランスポーターに属するBCRPにも、その遺伝子には多くの変異が認められる<sup>9)</sup>。アミノ酸置換を伴う34G>A(12Val>Met), 376C>T(126Gln>終止コドン), 421C>A(141Gln>Lys)の3種類の変異はハプロタイプを構成する。しかし、その中でも421C>Aが注目される。ヒト胎盤や発現細胞実験では、本変異によるタンパク質発現量の低下が報告されている。ヒトでの機能評価は十分ではないが、抗癌剤であるカンプトテシン誘導体、ジフロモテカンでの臨床試験の報告がある(図2)<sup>5)</sup>。変異を有する患者では、高い平均血中濃度の推移が見られる。日本人での421C>A頻度は35.5%と高く、C/C型、C/A型、A/A型がそれぞれ42, 45, 13%であった。ホモ型変異保有者も多いことから、さらなる機能解析が望まれる。

図3 OATP-C 遺伝子多型とプラバスタチン血中濃度推移 (文献<sup>7)</sup>より引用改変)



### 3. MRP2 (ABCC2) 遺伝子

肝臓の胆管側膜に発現する ABC トランスポーターである MRP2 は、肝臓内で産生される各種抱合体を基質としている。抱合型ビリルビン高値を主徴とする先天性疾患である Dubin-Johnson 症候群は MRP2 の機能障害により生じ、原因となる遺伝子変異が 10 種類以上同定されている。789Ser>Phe といった原因となる遺伝子変異は、タンパク質の膜上へのソーティングを障害する。これらの変異の多くはその頻度は低い(1%以下)、健常人でもよく目にするところがある。しかし、変異がホモ型で存在する頻度は極めて低い。Dubin-Johnson 症候群は原因遺伝子変異がホモ接合体をとることで発症することから、実際にはまれな疾患となる。これらの変異に対して、機能に影響しない変異も多い。例えば 417Val>Ile の日本人での頻度は 12.5% と極めて高いが、その機能には変化が見られない<sup>6)</sup>。

### 4. OATP-C (SLCO1B1) 遺伝子

p 糖タンパク質、BCRP, MRP2 が汲み出し (efflux) のトランスポーターであるのに

対し、肝の類洞側膜に特異的に発現する OATP-C は薬物の肝への取り込み (uptake) に働く。他のトランスポーター同様、多数の遺伝子変異が確認されており、現在までに約 20 種類のハプロタイプも報告されている。その中では、5' 上流非翻訳領域に位置する -11187G>A, アミノ酸置換を伴う 388A>G (130Asn>Asp, エキソン 4) と 521T>C (174Val>Ala, エキソン 5) が注目される。これらの変異も高率でハプロタイプを構成している。130 位のみが存在するタイプを OATP-C\*1b 型, 174 位のみを OATP-C\*5 型, 130 位と 174 位の 2 ヶ所の変異が同時に存在するタイプを OATP-C\*15 型, 3 種類の変異が同時に存在するタイプを OATP-C\*17 型と呼ぶ (国際命名委員会)。174 位の変異に注目した場合、白人では \*5 型と \*15 型が存在するのに対し、日本人では \*17 型が多いようである。\*1b 型, \*15 型のホモ接合タイプ (それぞれを 1, 3 群), ヘテロ接合タイプ (2 群) を示す健常成人に、OATP-C の基質薬物であり高脂血症治療薬であるプラバスタチン (HMG-CoA 還元酵素阻害薬) を投与した際に得られた血中濃度推移を図 3 に示す<sup>7)</sup>。2 群, 3 群, すなわち 174 位に変異を有する被検者では、肝クリアランスの低下と血中濃度の上昇が観察される。興味あることに、血中濃度は 3 群 > 2 群 > 1 群の順で低くなる gene-dose effect を示す。現在までに、OATP-C 遺伝子多型のヒトでの機能評価は数報が報告されている。いずれの研究もプラバスタチンあるいはピタバスタチンを使用しているが、すべての報告で一致した結果が得られている。さらに、発現系による *in vitro* 研究も幾つかが報告されている。これらの知見をまとめると、174 位の変異により基質薬物の輸送能は低下する。したがって、ヒトで観察された変異保有者での血中濃度の上昇は、プラバスタチンの

肝への取り込みの低下を伴うと考えられる。HMG-CoA還元酵素阻害薬は肝に取り込まれることでコレステロール低下作用を示すことから、本変異保有患者では期待する効果が得られにくいと予想される。この仮説を検証する研究が徐々に報告されつつある。

#### おわりに

本稿では一部のトランスポーター遺伝子多型のヒトでの機能評価を紹介したが、OCTsなどの他のトランスポーターでの評価も散見されている。薬物の体内動態や臨床効果の個人差に關与することを裏づけるデータが得られつつある。薬物代謝酵素やトランスポーター遺伝子多型により、大まかな個人の特徴づけが可能となってきた。さらなる精度を高めた実用化が望まれる。

#### 文 献

- 1) Ieiri I, et al: The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 43 (9): 553-576, 2004.
- 2) Takane H, et al: Haplotype-oriented genetic analysis and functional assessment of promoter variants in the MDR1 (ABCB1) gene. *J Pharmacol Exp Ther* 311 (3): 1179-1187, 2004.
- 3) Kurata Y, et al: Role of human MDR1 gene polymorphism in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther* 72 (2): 209-219, 2002.
- 4) Kobayashi D, et al: Functional assessment of ABCG2 (BCRP) gene polymorphisms to protein expression in human placenta. *Drug Metab Dispos* 33 (1): 94-101, 2005.
- 5) Sparreboom A, et al: Diflomotecan pharmacokinetics in relation to ABCG2 421C>A genotype. *Clin Pharmacol Ther* 76 (1): 38-44, 2004.
- 6) Ieiri I, et al: Influence of common variants in the pharmacokinetic genes (OATP-C, UGT1A1, and MRP2) on serum bilirubin levels in healthy subjects. *Hepatol Res* 30 (2): 91-95, 2004.
- 7) Nishizato Y, et al: Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 73 (6): 554-565, 2003.

---

### Pharmacogenomics of Drug Transporters and Its Pharmacokinetic/Clinical Implications

Ichiro Ieiri

Department of Hospital Pharmacy, Tottori University Hospital

## Human organic cation transporter (*OCT1* and *OCT2*) gene polymorphisms and therapeutic effects of metformin

Eriko Shikata · Rei Yamamoto · Hiroshi Takane ·  
Chiaki Shigemasa · Tadasu Ikeda · Kenji Otsubo ·  
Ichiro Ieiri

Received: 25 August 2006 / Accepted: 27 October 2006 / Published online: 17 November 2006  
© The Japan Society of Human Genetics and Springer 2006

**Abstract** Organic cation transporters (OCTs) are responsible for the hepatic and renal transport of metformin. In this study we analyzed variants of *OCT1* and *OCT2* genes in 33 patients (24 responders and nine non-responders) based on the hypothesis that polymorphisms in both genes contribute to large inter-patient variability in the clinical efficacy of metformin. The sequences of the 5'-flanking and coding regions of the two genes of interest were screened by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. To compare the causative factors between responders and non-responders, we performed stepwise discriminant functional analysis. Age, body mass index (BMI) and treatment with lipid-lowering agents were demonstrated as positive predictors, and two mutations in the *OCT1* gene, -43T > G in intron 1 and 408Met > Val (1222A > G) in exon 7, were negative

and positive predictors, respectively, for the efficacy of metformin; the predictive accuracy was 55.5% ( $P < 0.05$ ). Subsequent study indicated that *OCT1* mRNA levels tended to be lower in human livers with the 408Met (1222A) variant, though the differences did not reach the level of significance. In this study it is suggested that *OCT1* and *OCT2* gene polymorphisms have little contribution to the clinical efficacy of metformin.

**Keywords** Metformin · *OCT1* · *OCT2* · Polymorphisms · Pharmacokinetics · Pharmacodynamics

### Introduction

Metformin is one of the most commonly used drugs for the treatment of type 2 diabetes, but we sometimes encounter patients who do not respond sufficiently, even under approved dosage conditions (e.g., 500–750 mg/day in Japan). Although the effects of metformin on glycemic control and lipids have been reported to be dose dependent, recent pharmacogenomic studies indicate that genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and transporters should be taken into consideration when large inter-patient variability in the intensity and duration of both drug effects and side effects is observed. Among various pharmacokinetic-related genes, since renal secretion, not hepatic metabolism, is the major route of elimination of metformin, the contribution of genetic variations in drug transporters is of interest.

Human organic cation transporters (OCTs; *OCT1*–*3*) are poly-specific transporters of small and hydrophilic

---

E. Shikata · H. Takane · K. Otsubo · I. Ieiri  
Department of Hospital Pharmacy, Faculty of Medicine,  
Tottori University, Yonago, Japan

R. Yamamoto · C. Shigemasa  
Department of Molecular Medicine and Therapeutics,  
Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago, Japan

T. Ikeda  
Department of Adult and Elderly Nursing,  
Faculty of Medicine, Tottori University,  
Yonago, Japan

*Present Address:*

I. Ieiri (✉)  
Department of Clinical Pharmacokinetics,  
Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Kyushu University, 3-1-1, Maidashi, Higashi-ku,  
Fukuoka 812-8582, Japan  
e-mail: ieiri-ttr@umin.ac.jp

organic cations, including toxic substances, endogenous compounds (e.g., dopamine and serotonin), and clinically used drugs (e.g., procainamide and amantadine) (Jonker and Schinkel 2004). Among the OCT family, OCT1 is expressed predominantly in the basolateral membrane of hepatocytes, and mouse Oct1, which is homologously and functionally similar to OCT1, is responsible for the hepatic uptake of metformin (Wang et al. 2002, 2003). Although the precise mechanism of the action of metformin remains unclear, it is believed that hepatic uptake is an essential step in reducing hepatic glucose production as well as the occurrence of life-threatening side effects such as lactic acidosis (Hundal et al. 2000; Stumvoll et al. 1995; Wang et al. 2002). Recently, a number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) has been identified in the *OCT1* gene. Some of these SNPs have been found to be associated with altered in vitro transport activity (Hundal et al. 2000; Sakata et al. 2003; Shu et al. 2003; Takeuchi et al. 2003).

In the kidney, OCT2, another subfamily of the OCT family, is expressed on the basolateral membrane of the proximal tubule epithelium and is involved in the uptake of many xenobiotics from the bloodstream into renal epithelial cells (Jonker and Schinkel 2004). Kimura et al. (2005) demonstrated that metformin is a good substrate for OCT2, using HEK293 cells expressing OCT2. Similar to those in the *OCT1* gene, functionally different variants have been identified in the *OCT2* gene (Leabman et al. 2002).

We hypothesized that large inter-patient variability in the clinical efficacy of metformin may occur as a result of variations in *OCT1* and/or *OCT2*. In this report we evaluated the functional significance of genetic polymorphisms of *OCT1* and *OCT2* genes with regard to the efficacy of metformin in patients with type 2 diabetes. To date, no study has addressed the genotype–phenotype relationship in light of *OCT* in humans.

## Materials and methods

### Study subjects

Thirty-three patients (nine men and 24 women; mean age 60 years, range 29–73 years) treated with metformin for at least 1 month were enrolled. We excluded patients who discontinued metformin because of adverse effects (e.g., diarrhea and headache). There are no generally accepted criteria in the clinical cut-off point to divide patients into responders and non-responders. Thus, we selected the criteria empirically,

based on our clinical experiences and a previous report (Takei et al. 2001) as follows: (1) responders [ $n = 24$ ; mean age 62 years, range 29–73 years; mean body mass index (BMI)  $25.4 \text{ kg/m}^2$ , range  $20.4\text{--}34.5 \text{ kg/m}^2$ ], i.e., those whose HbA<sub>1c</sub> levels had decreased by more than 0.5% from the baseline within 3 months of metformin therapy and had remained low for more than 3 months; and (2) non-responders ( $n = 9$ ; mean age 56 years, range 34–69 years; mean BMI  $25.1 \text{ kg/m}^2$ , range  $17.8\text{--}30.6 \text{ kg/m}^2$ ), i.e., those for whom either metformin therapy had been discontinued within 3 months and/or after another hypoglycemic drug (e.g., sulfonylurea) had been added to the therapy because of insufficient improvement in HbA<sub>1c</sub> levels. Eighteen of the responders and six of the non-responders were treated with the maximum approved daily dose in Japan (i.e., 750 mg/day). Eight of the responders and four of the non-responders received metformin monotherapy, and others were co-medicated with sulfonylurea,  $\alpha$ -glycosidase inhibitor or insulin. This study was approved by the Ethics Review Board of the Faculty of Medicine, Tottori University, and all subjects gave informed consent before participating.

### Identification of variants in *OCT1* and *OCT2* genes

Genomic DNA was extracted from peripheral blood. The primer design was based on the sequence of the 5'-flanking region and the intron/exon junction of *OCT1* and *OCT2* genes (GenBank accession number AL353625 for *OCT1*, AL162582 for *OCT2*). Primers were designed to divide all 11 exons of each gene into fragments of approximately 350 bp so that mutations could be screened by subsequent single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. Polymerase chain reaction (PCR) products were sequenced either directly or after subcloning on an ABI 3100 automatic sequencer (Applied Biosystems, Foster City, VA, USA).

### Quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted with an RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) from 58 human liver samples (33 Caucasian and 25 Japanese non-diabetic donors), and reverse transcribed into cDNA using oligo dT primers and reverse transcriptase. *OCT1* mRNA was quantified by real-time PCR using an ABI PRISM 7700 sequence detector (Applied Biosystems) with SYBR-green detection of reaction products. Primers for *OCT1* mRNA were directed at a sequence that spans the junction of exons 9 and 10, corresponding to open reading frame 1437–1509; 5'-CAC

CCCCATCATAGTCTTCAG-3' (forward) and 5'-GCC CAACACCGCAAACAAAAT-3' (reverse). The copy number of the transcript was measured against the copy-number standard curve of cloned target templates consisting of serial tenfold dilution points.  $\beta_2$ -microglobulin mRNA was used as the reference gene for OCT1 mRNA.

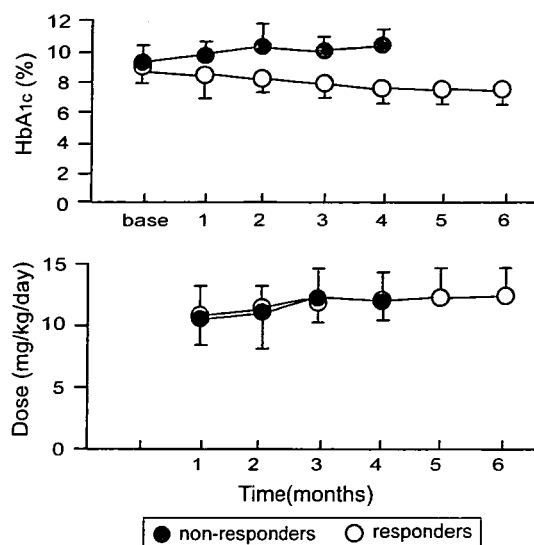
### Statistical analysis

The significance of differences in allelic frequency was calculated by  $\chi^2$  analysis using  $2 \times 2$  contingency tables. Statistical differences among the data for each group were determined by analysis of variance (ANOVA), followed by the Fisher least significant difference test. To compare the causative factors between responders and non-responders, we performed stepwise discriminant functional analysis. At each step, improvement in the  $\chi^2$  and the  $P$  values was used to check whether the variable entered at that step significantly improved the discrimination. The independent variables were as follows: polymorphisms, gender, age, duration of disease, types and numbers of co-medicated anti-hyperglycemic drugs, daily dose of metformin, BMI, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) and treatment with lipid-lowering agents (statins and fibrates). Data are shown as means  $\pm$  SDs. A  $P$  value  $<0.05$  was considered to be significant.

### Results

Although the time course of change in the mean daily dose of metformin (milligrams per kilogram per day) and the initial level of HbA<sub>1c</sub> did not differ between the two groups, the mean HbA<sub>1c</sub> level was significantly lower in the responder group than in the non-responder group during metformin therapy (Fig. 1).

To identify polymorphisms, we performed PCR–SSCP analysis of all 11 exons of the two genes of interest (*OCT1* and *OCT2*), using DNA obtained from all patients, and the allelic frequency was compared between the responder and non-responder groups. In the *OCT1* gene, 11 polymorphisms were detected by SSCP analysis and identified by subsequent sequencing; none were novel polymorphisms (Table 1). Of these, five SNPs resulted in the following amino acid substitutions: 123C > G (41Phe > Leu), 350C > T (117Pro > Leu), 480C > G (160Phe > Leu), 1022C > T (341Pro > Leu), and 1222A > G (408Met > Val). Although 480C > G, 1022C > T, and 1222A > G variants had a relatively



**Fig. 1** Time course of changes in HbA<sub>1c</sub> and metformin daily dose during the observation period in responders and non-responders

high incidence, 123C > G and 350C > T were observed in one patient as heterozygosity. In the *OCT2* gene, two non-synonymous variants were observed: 602C > T (201Thr > Met) and 808G > T (270Ala > Ser). Altogether, there were no remarkable differences in the prevalence of any mutation between responders and non-responders.

The result of discriminant functional analysis is shown in Table 2. Variables selected by the discriminant process were age, BMI, treatment with lipid-lowering agents and two mutations in the *OCT1* gene ( $-43T > G$  and  $1222A > G$ ). Other variables, such as duration of disease, daily dose of metformin, and types of co-medicated anti-hyperglycemic drugs, had no significant effect on the discrimination. Although age, BMI and treatment with lipid-lowering agents were demonstrated as positive predictors,  $-43T > G$  and  $1222A > G$  (408Met > Val) were negative and positive predictors, respectively, for the efficacy of metformin. Total predictive accuracy using these factors was 55.5% ( $\chi^2 = 5.59$ ,  $P < 0.05$ ).

As shown in Table 1, since the frequency of the 408Met allele tended to be higher in non-responders than in responders (0.28 vs 0.19), and since the non-synonymous 408Met > Val variant was selected as a positive predictor, we next examined the association of the 408Met > Val ( $1222A > G$ ) variant with the expression of OCT1 mRNA in the human liver samples (Fig. 2). Of 58 samples, we analyzed 31 that were homozygotes for the  $-43T$  variant ( $-43T/T$ ). The mean ( $\pm$  SD) hepatic expression level of OCT1 in homozygotes for 408Met ( $1222A/1222A$ ), heterozygotes for



**Table 1** Summary of *OCT1* and *OCT2* gene polymorphisms

Gene	Location	Position <sup>a</sup>	Allele <sup>a</sup>	Nucleotide sequence	Amino acid substitution	Allelic frequency (95% CI)		
						Responders ( <i>n</i> = 24)	Non-responders ( <i>n</i> = 9)	
<i>OCT1</i>	Exon 1	123	C	tcttCctgg	41Phe > Leu	0.98 (0.94–1.02)	1.000	
			G	tcttGctgg		0.02 (–0.02–0.06)	0.000	
		156	T	C	agagTcctg	Ser52	0.58 (0.44–0.72)	0.44 (0.21–0.67)
							C	agagCcctg
		243	C	T	cgggCgagg	Gly81	1.000	0.94 (0.84–1.05)
							C	cgggTgagg
		350	T	C	ctgcCgctg	117Pro > Leu	1.000	0.94 (0.84–1.05)
							T	ctgcTgctg
	Intron 1	–43	T	G	atggTtctg	–	0.42 (0.28–0.56)	0.33 (0.12–0.55)
							G	atggGtctg
	Exon 2	480	C	G	tcttCtttg	160Phe > Leu	0.88 (0.78–0.97)	0.83 (0.66–1.01)
							G	tcttGtttg
	Exon 6	1022	C	T	acgcCgagc	341 Pro > Leu	0.81 (0.70–0.92)	0.89 (0.74–1.03)
							T	acgcTgagc
	Exon 7	1222	A	G	ggccAtgtc	408Met > Val	0.19 (0.08–0.30)	0.28 (0.07–0.49)
							G	ggccGtgtc
	Intron 7	+8	Deletion		(ggtaagtt)0		0.81 (0.70–0.92)	0.72 (0.52–0.93)
(ggtaagtt)1							0.19 (0.08–0.30)	0.28 (0.07–0.49)
Intron 10	+26	C	T	actcCgagg		0.98 (0.94–1.02)	1.000	
						T	actcTgagg	0.02 (–0.02–0.06)
	–21	C	T	ccaaCttt		0.46 (0.32–0.60)	0.39 (0.16–0.61)	
						T	ccaaTttt	0.54 (0.40–0.68)
<i>OCT2</i>	Exon 3	602	C	tataCgtgg	201Thr > Met	0.98 (0.94–1.02)	0.94 (0.84–1.05)	
						T	tataTgtgg	0.02 (–0.02–0.06)
	Exon 4	808	G	T	agttGctct	270Ala > Ser	0.92 (0.88–0.96)	0.94 (0.84–1.05)
							T	agttTctct

<sup>a</sup> Position is relative to the ATG start site, and the reference allele for each gene was obtained from the GenBank accession numbers AL353625 for *OCT1* and AL162582 for *OCT2*

408Met > Val (1222A/1222G), and homozygotes for 408Val (1222G/1222G) was  $0.69 \pm 0.43$ ,  $0.92 \pm 0.53$ , and  $1.01 \pm 0.66$ , respectively. Although the hepatic expression of *OCT1* tended to be lower in livers with the 408Met (1222A) variant, the differences did not reach the level of significance. In the –43T > G variant, the mean *OCT1* expression level in –43T/T (*n* = 18), –43T/G (*n* = 8), and –43G/G (*n* = 10) samples (all harbored the 1222G/1222G allele) was  $1.01 \pm 0.70$ ,  $1.04 \pm 0.34$ , and  $1.46 \pm 0.53$ , respectively.

**Table 2** Stepwise discriminant functional analysis of the efficacy of metformin

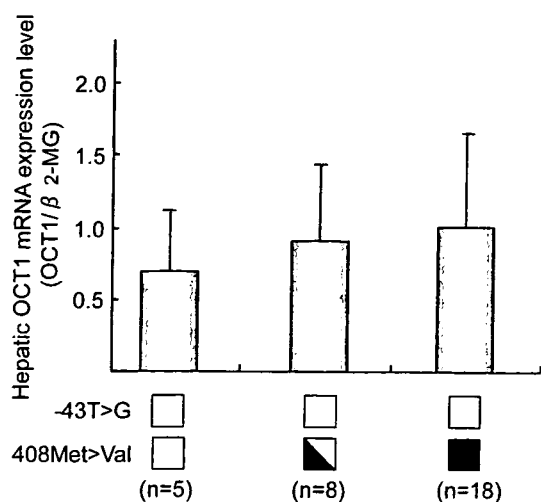
Variable	Coefficient	$\chi^2$ value	<i>P</i>
Age	0.09	5.59	0.05
BMI	0.23		
Treatment with lipid-lowering agents	2.25		
–43T > G (intron 1)	–2.35		
408Met > Val (exon 7)	2.51		

Predictive accuracy = 55.5%

## Discussion

In this study we first analyzed mutations in *OCT1* and *OCT2* and then examined the association between polymorphisms in these two genes and the efficacy of metformin, because in vitro studies have indicated that *OCT1* and *OCT2* are responsible, respectively, for the hepatic and renal transport of metformin (Kimura et al. 2005; Wang et al. 2002, 2003). In contrast to studies in vitro and with animals, there are no data from human studies on the contribution of these polymorphisms to the phenotypes of metformin.

In the *OCT1* gene, all non-synonymous variants except 41Phe > Leu and 117Pro > Leu have already been identified in some racial populations, with a frequency of 0.005–0.81 (Kerb et al. 2002; Shu et al. 2003). The 41Phe > Leu and 117Pro > Leu allele frequencies were relatively low (0.004), and they have already been reported in a Japanese population (Itoda et al. 2004). Recent expression studies have indicated that 341Pro > Leu had decreased ability to transport test compounds, while 160Phe > Leu and 408Met > Val were unchanged (Kerb et al. 2002; Sakata et al. 2003;



**Fig. 2** Hepatic OCT1 mRNA expression levels with regard to the 408Met > Val (1222A > G) variant. Among 58 samples, 31, which were homozygotes for the -43T variant (-43T/T), were analyzed. *Open squares*, *partially filled squares* and *closed squares* correspond to patients homozygous for the 408Met (1222A) allele and heterozygous and homozygous for the 408Val (1222G) allele

Shu et al. 2003). Interestingly, the 341Pro > Leu variant was observed in Asian and African American populations but not in Caucasians (Shu et al. 2003); however, there was no difference in the allele frequency of 341Pro > Leu between responders and non-responders to metformin therapy in this study.

In contrast to those in the *OCT1* gene, it appears that the number of non-synonymous variants in the *OCT2* gene and their allelic frequencies were lower than in other known drug transporter genes such as *MDR1*, *MRP1*, *MRP2*, and *OATP-C* (Nishizato et al. 2003). These observations are consistent with the finding of a lower frequency of non-synonymous variants in ethnically diverse genomic DNA samples (Leabman et al. 2002). Recent population-genetic analysis has demonstrated that selection has acted against amino acid changes in *OCT2* (Leabman et al. 2002), suggesting that *OCT2* is relatively intolerant of non-synonymous changes. In general, the less frequent non-synonymous variants resulted in more significant and deleterious functional changes. However, the 270Ala > Ser variant was reported to exhibit subtle functional differences from the reference form of *OCT2* (Leabman et al. 2002).

Although there were no remarkable differences in the prevalence of any mutation sites between responders and non-responders, we next carried out discriminant functional analysis including not only genetic polymorphisms but also the patients' background. As shown in Table 2, age, BMI and treatment

with lipid-lowering agents were demonstrated as positive predictors of metformin efficacy. These observations are partially in agreement with the findings by Knowler et al. (2002), that metformin was less effective in subjects with lower BMI or a lower fasting plasma glucose concentration. BMI > 25 kg/m<sup>2</sup> is defined as obesity in Japan; 66.7% of responders and 44.4% of non-responders were obese in this study. Although the precise mechanism is unknown, these data suggest that metformin is more effective in the case of obesity-induced insulin resistance that is higher fasting plasma glucose. The contribution of lipid-lowering agents was somewhat unexpected, because metformin therapy has been reported to improve both glycemic control and lipid concentrations (i.e., plasma total and low-density lipoprotein cholesterol and triglyceride) in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus (DeFronzo and Goodman 1995). However, in our study, 12 responders and two non-responders were treated with lipid-lowering agents, and most of these patients (11/12 responders and 1/2 non-responders) used HMG-CoA reductase inhibitors (statins). Several studies have shown that low-density lipoprotein (LDL) size rather than plasma LDL level is more correlated with insulin resistance and eventual progression of coronary heart disease (Rizzo and Berneis 2006). Although the efficacy of modifying LDL size is different among agents (fluvastatin and atorvastatin seem to be much more effective agents than pravastatin and simvastatin), statins moderately lower all LDL subclasses, and, somehow, this process seems to make metformin more effective.

Since -43T > G and 408Met > Val (1222A > G) variants were identified as negative and positive predictors, respectively, for the clinical effectiveness of metformin, we evaluated the functional significance of the latter non-synonymous variant in the expression of OCT1 mRNA, using human liver samples. Our findings indicate that samples with the 408Met (1222A) allele tended to be associated with a reduced expression level, as compared with those without the 408Met allele; however, the difference did not reach significance. A recent study using site-directed mutagenesis has indicated that point mutations in the predicted ninth transmembrane domain such as 1222A > G (408Met > Val) do not lead to functional changes (Kerb et al. 2002). We also measured OCT1 mRNA expression with regard to the non-coding -43T > G variant; however, no significant effect was observed. In the present study, the predicted accuracy is still insufficient for its clinical application (i.e., 55.5%). Thus, if these observations are taken into consideration, the contribution of polymorphisms in

*OCT1* and *OCT2* genes to metformin efficacy may not be as significant as our expectations had led us to believe. However, since a non-synonymous variant 408Met > Val is often observed simultaneously with other non-synonymous variants (Shu et al. 2003), further in vitro and in vivo studies with regard to the haplotypic consideration, including the non-coding region, are needed to elucidate the functional properties of the variants identified in this study.

While data from only 24 responders and nine non-responders were used, this preliminary investigation is the first study addressing the genotype–phenotype relationship of OCTs in the efficacy of metformin. However, obviously, the small number of patients is a drawback in our study. For example, co-medication of other anti-hyperglycemic drugs in both groups made it difficult for us to judge whether the decreases in HbA<sub>1c</sub> levels in the responders are attributable to the metformin effect. Clearly, definition of the clinical cut-off point is also essential to divide patients into the two groups correctly. In order to overcome these problems, it is clear that the results in this study should be confirmed in a population study involving large numbers of patients. Nevertheless, this report provides for the possibility of OCTs' functions in humans.

**Acknowledgments** This work was supported by Health and Labor Sciences Research grants from the Ministry of Health, Labor, and Welfare for Research on Advanced Medical Technology. None of the authors claims any conflict of interest.

## References

- DeFronzo RA, Goodman AM (1995) Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. *N Engl J Med* 333:541–549
- Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, Inzucchi SE, Schumann WC, Petersen KF, Landau BR, Shulman GI (2000) Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes* 49:2063–2069
- Itoda M, Saito Y, Maekawa K, Hichiya H, Komamura K, Kamakura S, Kitakaze M, Tomoike H, Ueno K, Ozawa S, Sawada J (2004) Seven novel single nucleotide polymorphisms in the human *SLC22A1* gene encoding organic cation transporter 1 (OCT1). *Drug Metab Pharmacokinet* 19:308–312
- Jonker JW, Schinkel AH (2004) Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (*SLC22A1–3*). *J Pharmacol Exp Ther* 308:2–9
- Kerb R, Brinkmann U, Chatskaia N, Gorbunov D, Gorboulev V, Mornhinweg E, Keil A, Eichelbaum M, Koepsell H (2002) Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. *Pharmacogenetics* 12:591–595
- Kimura N, Okuda M, Inui K (2005) Metformin transport by renal basolateral organic cation transporter hOCT2. *Pharm Res* 22:255–259
- Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM (2002) Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346:393–403
- Leabman MK, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, DeYoung J, Taylor T, Clark AG, Herskowitz I, Giacomini KM (2002) Pharmacogenetics of Membrane Transporters Investigators: polymorphisms in a human kidney xenobiotic transporter, OCT2, exhibit altered function. *Pharmacogenetics* 12:395–405
- Nishizato Y, Teiri I, Suzuki H, Kimura M, Kawabata K, Hirota T (2003) Polymorphisms of OATP-C (*SLC21A6*) and OAT3 (*SLC22A8*) genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 73:554–565
- Rizzo M, Berneis K (2006) The clinical relevance of low-density-lipoproteins size modulation by statins. *Cardiovasc Drugs Ther* 20:205–217
- Sakata T, Anzai N, Shin HJ, Noshiro R, Hirata T, Yokoyama H (2003) Novel single nucleotide polymorphisms of organic cation transporter 1 (*SLC22A1*) affecting transport functions. *Biochem Biophys Res Commun* 313:789–793
- Shu Y, Leabman MK, Feng B, Mangravite LM, Huang CC, Stryke D, Kawamoto M, Johns SJ, DeYoung J, Carlson E, Ferrin TE, Herskowitz I, Giacomini KM, Pharmacogenetics of Membrane Transporters Investigators (2003) Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5902–5907
- Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE (1995) Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 333:550–554
- Takei I, Miyamoto K, Funae O, Ohashi N, Meguro S, Tokui M, Saruta T (2001) Secretion of GIP in responders to acarbose in obese type2 (NIDDM) patients. *J Diabetes Complications* 15:245–249
- Takeuchi A, Motohashi H, Okuda M, Inui K (2003) Decreased function of genetic variants, Pro283Leu and Arg287Gly, in human organic cation transporter hOCT1. *Drug Metab Pharmacokinet* 18:409–412
- Wang DS, Jonker JW, Kato Y, Kusuhara H, Schinkel AH, Sugiyama Y (2002) Involvement of organic cation transporter 1 in the hepatic and intestinal distribution of metformin. *J Pharmacol Exp Ther* 302:510–515
- Wang DS, Kusuhara H, Kato Y, Jonker JW, Schinkel AH, Sugiyama Y (2003) Involvement of organic cation transporter 1 in the lactic acidosis caused by metformin. *Mol Pharmacol* 63:1–5

## Pharmacogenetic determinants of variability in lipid-lowering response to pravastatin therapy

Hiroshi Takane · Masanori Miyata · Naoto Burioka ·  
Chiaki Shigemasa · Eiji Shimizu · Kenji Otsubo ·  
Ichiro Ieiri

Received: 24 April 2006 / Accepted: 30 May 2006 / Published online: 18 August 2006  
© The Japan Society of Human Genetics and Springer-Verlag 2006

**Abstract** Pravastatin is mainly taken up from the circulation into the liver via organic anion-transporting polypeptide 1B1 (*SLCO1B1* gene product). We examined the contribution of genetic variants in the *SLCO1B1* gene and other candidate genes to the variability of pravastatin efficacy in 33 hypercholesterolemic patients. In the initial phase of pravastatin treatment (8 weeks), heterozygous carriers of the *SLCO1B1*\*15 allele had poor low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) reduction relative to non-carriers (percent reduction: -14.1 vs -28.9%); however, the genotype-dependent difference in the cholesterol-lowering effect disappeared after 1 year of treatment. Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (*CYP7A1*) and apolipoprotein E (*APOE*) are known to contribute to lipid metabolism. Homozygous carriers of the *CYP7A1* -204C allele or heterozygotes for both *CYP7A1* -204C and *APOE*  $\epsilon$ 4 alleles showed significantly poorer

LDL-C reduction compared to that in other genotypic groups after 1 year of treatment (-24.3 vs -33.1%). These results suggest that the *SLCO1B1*\*15 allele is associated with a slow response to pravastatin therapy, and the combined genotyping of *CYP7A1* and *APOE* genes is a useful index of the lipid-lowering effect of pravastatin.

**Keywords** *SLCO1B1* · *CYP7A1* · *APOE* · Pravastatin · Cholesterol

### Introduction

Coronary heart disease is the leading cause of death worldwide. Several risk factors for cardiovascular disease are well known, especially increased low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and decreased high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C). Statins are inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, a rate-limiting enzyme in cholesterol biosynthesis. Lipid-lowering therapy by statins has the potential to improve outcomes in patients at risk for cardiovascular disease. Despite these large effects, interindividual variability in the response to statins has been observed in clinical situations (Pazzucconi et al. 1995). Previous studies have demonstrated that the mechanisms responsible for variability in the statin response are due, at least in part, to genetic factors. Most studies have focused on the association between variants ( $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 and  $\epsilon$ 4) in apolipoprotein E (*APOE*) gene, which is a primary ligand for the LDL receptor found on the liver, and the response to statins (Ojala et al. 1991; Ordovas et al. 1995). In addition, recent studies have demonstrated

H. Takane · K. Otsubo  
Department of Hospital Pharmacy, Faculty of Medicine,  
Tottori University, Yonago, Japan

M. Miyata · N. Burioka · E. Shimizu  
Division of Medical Oncology and Molecular Respiriology,  
Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago, Japan

C. Shigemasa  
Division of Molecular Medicine and Therapeutics,  
Department of Multidisciplinary Internal Medicine, Faculty  
of Medicine, Tottori University, Yonago, Japan

I. Ieiri (✉)  
Department of Clinical Pharmacokinetics,  
Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Kyushu University, 3-1-1, Maidashi, Higashi-ku,  
Fukuoka 812-8582, Japan  
e-mail: ieiri-ttr@umin.ac.jp