

- Jinno, H., Hasegawa, R., Kaniwa, N., Sawada, J., Komamura, K., Ueno, K., Kamakura, S., Kitakaze, M., Kitamura, Y., Kamatani, N., Minami, H., Ohtsu, A., Shirao, K., Yoshida, T. and Saijo, N.: *UGT1A1* haplotypes associated with reduced glucuronidation and increased serum bilirubin in irinotecan-administered Japanese patients with cancer. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **75**: 501-515 (2004).
- 13) Kaniwa, N., Kurose, K., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Saito, Y., Saeki, M., Sawada, J., Tohkin, M. and Hasegawa, R.: Racial variability in haplotype frequencies of *UGT1A1* and glucuronidation activity of a novel SNP 686C>T (P229L) found in an African-American. *Drug Metab. Dispos.*, in press.
- 14) Ritter, J. K., Crawford, J. M. and Owens, I. S.: Cloning of two human liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNAs with expression in COS-1 cells. *J. Biol. Chem.*, **266**: 1043-1047 (1991).
- 15) Ikushiro, S., Emi, Y. and Iyanagi, T.: Activation of glucuronidation through reduction of a disulfide bond in rat UDP-glucuronosyltransferase 1A6. *Biochemistry*, **41**: 12813-12820 (2002).

---

### 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(<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<sup>1,2)</sup>.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<sup>2,3)</sup>.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<sup>4)</sup>.

*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<sub>tot</sub>)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<sub>int,h</sub>)が低下したとしても,CL<sub>tot</sub>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 CLtot 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、CLtot が大きい（肝抽出比>0.3）薬物では、静脈内投与後の場合、CLtot は肝血流速度にも依存するため、遺伝多型による CLint,h の変化が直接 CLtot 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、CLint,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 CLtot や経口 CL (CLpo) の低下に反映される訳ではない<sup>9)</sup>。更に、CYP2C9 遺伝子多型により CLtot が低下し、定常状態における平均血中濃度 (Cpss,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, HNF3  $\alpha$ /4  $\alpha$  など) が関与することが報告されている<sup>9)</sup>。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<sup>7)</sup>。

### 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（ $C_u$ ）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（ $F_a = 1.0$ ）、肝代謝により消失する薬物（ $A_e < 2\%$ ）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  $C_p$  [ $C_{u,ss,ave} = (Dose/\tau) / \text{遊離形 } CL_{po} (= CL_{po,u})$ ] は、患者の肝代謝活性（肝固有クリアランス、 $CL_{int,h} = CL_{po,u}$ ）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  $CL_{po,u}$  が大きいために、投与量/kg は兩人種でほぼ等しいのにもかかわらず、 $C_{u,ss,ave}$  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  $CL_{po,u}$  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<sup>8)</sup>。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<sup>8)</sup>。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（ $CL_{po,u}$ ）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プロマロンなどの 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<sup>4)</sup> (図 1)。

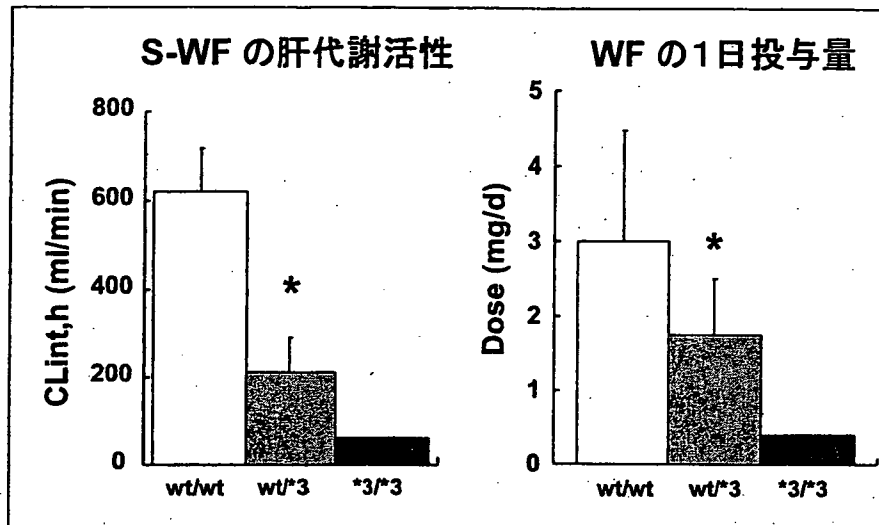


図1. 日本人における S-WF の肝代謝活性 (CLint,h) と WF 投与量に及ぼす CYP2C9\*3 変異の影響

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 Lancet<sup>9)</sup> や JAMA<sup>10)</sup> 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<sup>11)</sup>。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)。

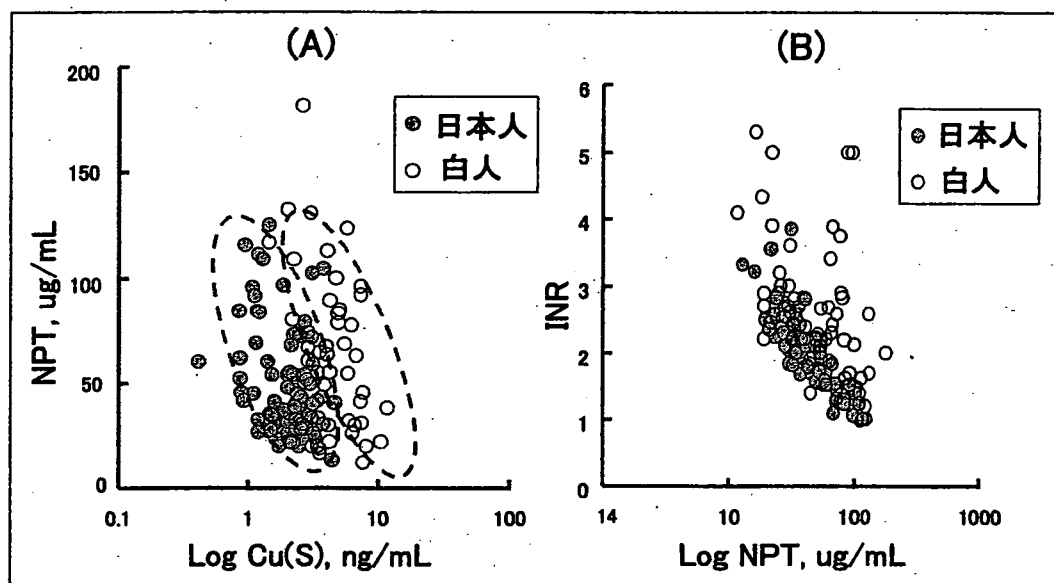


図2. 血漿中 S-WF 遊離形濃度 [Cu (S)]—血漿中 Normal Prothrombin 濃度 (NPT), 及び NPT—INR の関係

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 Nature<sup>12)</sup>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<sup>13)</sup>。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<sup>14)</sup>、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<sup>11)</sup>。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)。

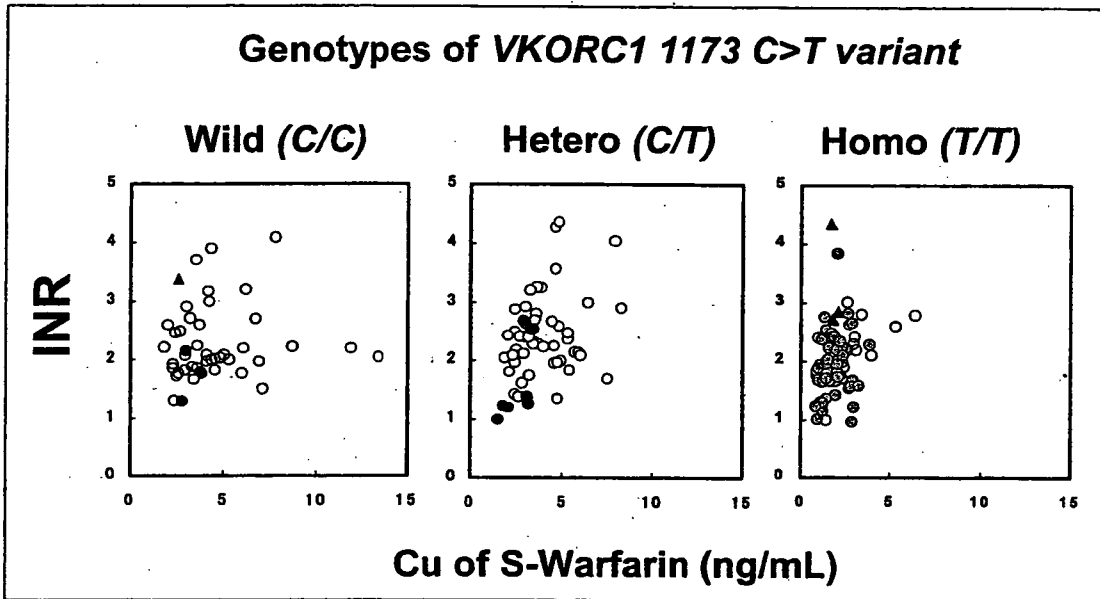


図3. S-WF の血漿中遊離形濃度と INR の関係に及ぼす *VKORC1* 1173 C>T 変異の影響

○; 白人, ●; 日本人,

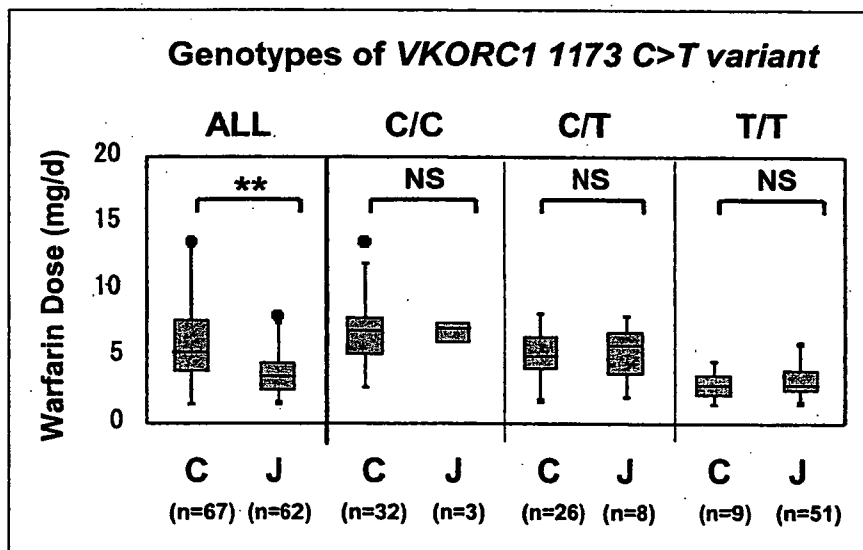


図4. WF 維持量の人種差に及ぼす *VKORC1* 1173 C>T 変異の影響

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兩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<sup>11)</sup>。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,  $\gamma$ -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<sup>15-17)</sup>。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<sup>18)</sup>。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).

◆特集：血栓症治療の最前線◆

## 個別化されたワルファリン療法 確立への道

越前宏俊\*

A quest for individualized warfarin therapy

Hirotoishi ECHIZEN\*

Key words: warfarin, cytochrome P450 (CYP), CYP2C9, VKORC1, genetic polymorphism



越前宏俊

明治薬科大学薬物治療学教室教授  
1978年北海道大学医学部卒業、医学博士（東京大学、1986年）、国立病院医療センター内科、コロラド大学臨床薬理、ドイツ共和国ボン大学内科、国立健康栄養研究所成人栄養部、北里大学医学部薬理学を経て1995年から現職。

### 1. はじめに

ワルファリンカリウム（ワーファリン<sup>®</sup>、以下ワルファリンと略）は国際的に最も広く使用されている経口抗凝固薬であるが<sup>1)</sup>、比較的狭い治療域 INR を得るために必要とされるワルファリン投与量は 0.5～7.0mg/日と個人の間で10倍以上の個人差がある。そこで、ワルファリン療法の個別化を目指す研究が精力的に行われ、ワルファリン投与量の個人差を説明するワルファリンの薬物動態（pharmacokinetics: PK）とワルファリンの標的分子であるビタミンKエポキシド還元酵素複合体（VKORC）および関連分子における薬力学（pharmacodynamics: PD）の個人間変動要因の検討がなされている。

### 2. ワルファリン PK の個人間変動要因

市販のワルファリン製剤は1対の（S体とR体）光学異性体からなるラセミ体である。S体-ワルファリンの抗凝固活性はR-体よりも3～5倍高いため、PK上の個人差要因としてはS体ワルファリンの体内動態の個人差が重要である。S体ワルファリンの不活化には肝薬物代

謝酵素チトクローム P450 (CYP) 2C9分子種がほぼ選択的に関与するため、このCYP分子種の活性を支配する要因が検討された<sup>2)</sup>。歴史的には、まずCYP2C9活性の個人差解明に向けてCYP2C9遺伝子の発現領域の変異探索が行われ、その結果はデータベースにまとめられている<sup>3)</sup>。現時点でアレル頻度の比較的高いCYP2C9\*2およびCYP2C9\*3の1塩基置換（SNP）変異以下CYP2C9\*24まで変異型アレルと野生型CYP2C9\*1の亜系（CYP2C9\*1A, B, C, D）が登録されている。CYP2C9\*6（フレームシフト変異）を除いては全て1塩基置換（SNP）である。CYP2C9\*2, CYP2C9\*3, CYP2C9\*6, CYP2C9\*11変異は、*in vitro*で発現された酵素蛋白の活性低下のみならず、*in vivo*でのS体ワルファリン代謝活性の低下と投与量の低下にも反映される変異であるが、他の変異アレルについては*in vivo*ワルファリン代謝活性との関連は不明確なものが多い<sup>4)</sup>。更に、これらの変異アレル保有者を除外し、現時点で野生型CYP2C9を有すると推定される患者間においても極めて大きなワルファリンPKの個人差が存在するため、ワルファリン投与量の個人差に関わる遺伝要因の探求はCYP2C9近傍の非翻訳

\* 明治薬科大学薬物治療学 [〒204-8588 清瀬市野塩 2-522-1]

Department of Pharmacotherapy, Meiji Pharmaceutical University [2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan]  
Tel, Fax: 042-495-8483 e-mail: echizen@my-pharm.ac.jp

領域のゲノム情報を考慮したより広範なゲノム探索へと向かった。特に *CYP2C9* の 5' 上流領域には、CAR や PXR などの発現調節因子の結合サイトが複数存在するため<sup>9)</sup>、この領域のユニークな変異がワルファリン PK の個人差を説明する期待がもたれた。

最も詳細な *CYP2C9* ゲノム近傍の解析は Veenstra ら<sup>9)</sup> による 192 名の欧州起源の白人を対象とした研究で、彼らは *CYP2C9* ゲノムおよびその近傍の上・下流およびイントロン領域を総計 60kb に渡り詳細に解析し、121 個の非翻訳領域変異と従来の *exon* 領域変異を併合解析することで 23 種のハプロタイプを見いだした。更に、これらのハプロタイプはクラスター解析により 6 種のグループ (1A, 1B, 1C, 1D, 2, 3) に分類された。しかし、これほど詳細な *CYP2C9* ゲノム解析によっても非翻訳領域には *CYP2C9* の発現量の調節を介してワルファリン PK の個人差を説明できるような変異は発見されなかった。ワルファリン投与量の低下と関係する *CYP2C9* ハプロタイプはグループ 2 とグループ 3 であるが、これらのグループはいずれも *exon* 領域に由来から知られた構造領域の loss of function (LOF) 変異である *CYP2C9*\*2 と *CYP2C9*\*3 と強い連鎖不平衡を持っていたのであった。

臨床的観点からは、これらの *CYP2C9* 変異アレルの検出頻度が重要である。*CYP2C9* 変異アレルの出現頻度には人種差が認められ、白人は *CYP2C9*\*2 (13%), \*3 (7%), \*11 (1.3%) と比較的変異アレルの頻度が高いので遺伝子診断の有用性はあるが、黒人では変異アレルの頻度が *CYP2C9*\*2 (3.4%), \*3 (1.5%), \*5 (1.8%), \*6 (<0.5%), \*11 (2.3%) と白人より低く、アジア人 (日本人を含む) では *CYP2C9*\*3 (1.8%)、とさらに低い<sup>2)4)</sup>。従って、アジア人においてはワルファリン療法の個別化において *CYP2C9* の遺伝子診断をする意義は白人よりも少ないと考えられる。*CYP2C9* の LOF 変異アレルを有する患者を 1 人発見するために遺伝

子スクリーニングを受ける患者数は、白人、黒人、アジア人の順に、それぞれ 5 人、11 人、56 人である。従って、現時点での対費用効果関係では白人以外に日常的な臨床検査としては医療経済的に実施困難と思われる。白人患者における *CYP2C9* のジェノタイピングの臨床的有用性を検討した約 50 名の小規模な臨床試験<sup>7)</sup>によれば、整形外科手術に先立って *CYP2C9* 遺伝子診断を行いワルファリン投与量の個別化を行うと、*CYP2C9* の変異アレルを保有する患者でも治療域の INR を得るまでの時間は野生型アレル保有患者と同等とすることができた。しかし、出血副作用の発現は依然として *CYP2C9* 変異アレル保有者に多く遺伝子診断の意義はより大規模な臨床試験における検討が必要とされている。

### 3. ワルファリン PD の個人間変動因子の探求

2004 年に Rost ら<sup>8)</sup> は永年に渡って難攻不落であったワルファリンの標的分子であるビタミン K エポキシド還元酵素複合体 (VKORC) 遺伝子の一部と想定される VKORC サブユニット 1 (*VKORC1*) を同定した。彼らは同時に遺伝的な血液凝固異常症家系 (combined deficiency of vitamin K-dependent clotting factors) から 6 種類の *VKORC1* SNP を発見した。但し、これらの変異は健常人対照群では発見されないほど頻度は低かった。しかし、*VKORC1* 遺伝子が同定されると、ワルファリン応答性の高い患者集団のゲノム探索から、ついに D'Andrea G ら<sup>9)</sup> が *VKORC1* のイントロン 1 部位の SNP (1173C>T) がワルファリンに対する応答性増大に関係することを明らかにした。その後堰を切ったように多くの報告がなされ、*VKORC1* には連鎖不平衡の関係にある多くの変異が存在し、なかでも上記の変異 (1173C>T) を含むハプロタイプは *VKORC1* の mRNA 発現量の低下と関係し、ワルファリン応答性の増加 (即ち投与量の低下) と関連することが判明した<sup>10)</sup>。 *VKORC1* の

1173C>T 変異には、人種差があり、日本人を含むアジア人では1173 C アレル頻度がは0.9前後と高い(ワルファリン高応答性)が、白人では0.4前後、アフリカ系アメリカ人では0.1前後と大きな差異があった<sup>11)</sup>。また、*VKORC1* 1173C>T 変異のワルファリン応答性への影響は人種を越えて保存されており<sup>11)</sup>、従来から経験的に知られていたアジア人の平均的ワルファリン投与量が白人やアフリカ系アメリカ人よりも低いことのよい説明となっていた。

肝細胞小胞体(ER)のビタミンK redox サイクルに関係するVKORCは複数の機能サブユニット複合体から構成される膜蛋白である。VKORCのサブユニットモデルとしては、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、ミクロゾームエポキシドヒドロラーゼ(mEH)が想定されている<sup>12)</sup>。但し、mEHについてはmEH-nullマウスにビタミンK欠乏を示唆する表現系上の所見がないため<sup>13)</sup>、VKORCのサブユニット構成員ではないとする説もある。GSTには多数の分子種が存在するが、VKORCに関係するGSTの分子種は精製されたVKOR活性酵素のGST配列のホモロジー検索からその配列が*GSTA1*分子種の $\alpha$ クラスのサブユニットに類似しているため*GSTA*分子種と想定されている<sup>12)</sup>。*GSTA*と*mEH*にはそれぞれ複数の機能変化に関係する遺伝多型が報告されており、特に*mEH*については*mEH 612T>C*変異がワルファリン抵抗性(高用量投与)患者に多い可能性が示唆されている<sup>14)</sup>。 $\gamma$ -グルタミルカルボキシラーゼ(GGCまたはGGCX)はビタミンK依存性の凝固因子のグルタミン残基の $\gamma$ -カルボキシ化を担う酵素であるが、還元型ビタミンKを受け取るためにVKORCの近傍に存在すると考えられている。GGCの遺伝多型、特にイントロン6のCAA繰り返し配列についてはくり返し数が多いほどワルファリン抵抗性を生じるとの報告がある<sup>15)-17)</sup>が、一致した見解に達していない。更に、ヒトのワルファリン抵抗性の動物モデルとして古くから研究されている

ビタミンK拮抗作用を持つ殺鼠剤抵抗性ラットの研究から、カルメニン(calumenin; CALU)の過剰発現とワルファリン耐性の関係が注目されている。CALUはERに存在するCa<sup>2+</sup>結合能を有するシャペロン蛋白で、VKORあるいはGGCに結合し還元型ビタミンKのVKORからGGCへの受け渡しを阻害するとされる。Vecslerら<sup>17)</sup>は、*VKORC1*と*CYP2C9*の多型とは独立して*CALU 11G>A*変異がワルファリン抵抗性と関連すると報告している。また、ビタミンK依存性蛋白である第X因子と第VII因子の挿入(I)および欠失(D)がそれぞれワルファリン応答性に関するとの報告がなされている<sup>18)</sup>。

本稿で論じたワルファリンのPKおよびPD上の変動要因の遺伝多型と年齢、喫煙、体重、ビタミンK摂取量などの非遺伝的あるいは環境因子を変動要因としてワルファリン投与量の個人差に対する多変量解析をおこなうと、全ての変動因子の貢献はこれまで60%を超えたことはない。この事実の意味するところは、未知の変動因子の存在を示唆するのか、それともワルファリン応答性機構においては遺伝因子に束縛されない本来ランダムなエピジェネティックな変動因子が存在する事を暗示しているのかの解明は今後の検討に委ねられている。

## 文 献

- 1) Ansell J, Hirsh J, Poller L, Bussey H, Jacobson A, Hylek E: The pharmacology and management of the vitamin K antagonists: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 126 : 204S-233S, 2004.
- 2) Voora D, McLeod HL, Eby C, Gage BF: The pharmacogenetics of coumarin therapy. *Pharmacogenomics* 6 : 503-13, 2005.
- 3) <http://www.cypalleles.ki.se/> (accessed on June 24, 2006).
- 4) Takahashi H, Echizen H: Pharmacogenetics of CYP2C9 and interindividual variability in anticoagulant response to warfarin. *Pharmacogenomics* J 3 : 202-14, 2003.
- 5) Chen Y, Kissling G, Negishi M, Goldstein JA: The nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor cross-talk with hepatic nuclear factor 4 $\alpha$  to synergistically activate the human CYP2C9 promoter. *J Pharmacol Exp Ther* 314 : 1125-33, 2005.
- 6) Veenstra DL, Blough DK, Higashi MK, Farin FM, Srinouanprachan S, Rieder MJ, Rettie AE: CYP2C9 haplotype structure in European American warfarin patients

- and association with clinical outcomes. *Clin Pharmacol Ther* 77 : 353-64, 2005.
- 7) Voora D, Eby C, Linder MW, Milligan PE, Bukaveckas BL, McLeod HL, Maloney W, Clohisy J, Burnett RS, Grosso L, Gatchel SK, Gage BF: Prospective dosing of warfarin based on cytochrome P-450 2C9 genotype. *Thromb Haemost* 93 : 700-5, 2005.
  - 8) Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hortnagel K, Pelz HJ, Lappegard K, Seifried E, Scharrer I, Tuddenham EG, Muller CR, Strom TM, Oldenburg J: Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427 : 537-41, 2004.
  - 9) D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M, Santacrose R, Brancaccio V, Grandone E, Margaglione M: A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* 105(2): 645-9, 2005.
  - 10) Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, Blough DK, Thummel KE, Veenstra DL, Rettie AE: Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med* 352 : 2285-93, 2005.
  - 11) Takahashi H, Wilkinson GR, Nutescu EA, Morita T, Ritchie MD, Scordo MG, Pengo V, Barban M, Padrini R, Ieiri I, Otsubo K, Kashima T, Kimura S, Kijima S, Echizen H: 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 : 101-10, 2006.
  - 12) Wallin E, Huston SM: Warfarin and the vitamin K-dependent  $\gamma$ -carboxylation system. *Trends Mol Med* 10 : 299-302, 2004.
  - 13) Miyata M, Kudo G, Lee YH, Yang TJ, Gelboin HV, Fernandez-Salguero P, Kimura S, Gonzalez FJ: Targeted disruption of the microsomal epoxide hydrolase gene. Microsomal epoxide hydrolase is required for the carcinogenic activity of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *J Biol Chem* 274 : 23963-8, 1999.
  - 14) Loebstein R, Vecsler M, Kurnik D, Austerweil N, Gak E, Halkin H, Almog S: Common genetic variants of microsomal epoxide hydrolase affect warfarin dose requirements beyond the effect of cytochrome P450 2C9. *Clin Pharmacol Ther* 77 : 365-72, 2005.
  - 15) Shikata E, Ieiri I, Ishiguro S, Aono H, Inoue K, Koide T, Ohgi S, Otsubo K: Association of pharmacokinetic (CYP2C9) and pharmacodynamic (factors II, VII, IX, and X; proteins S and C; and gamma-glutamyl carboxylase) gene variants with warfarin sensitivity. *Blood* 103 : 2630-5, 2004.
  - 16) Chen LY, Eriksson N, Gwilliam R, Bentley D, Deloukas P, Wadelius M: Gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) microsatellite and warfarin dosing. *Blood* 106 : 3673-4, 2005.
  - 17) Vecsler M, Loebstein R, Almog S, Kurnik D, Goldman B, Halkin H, Gak E: Combined genetic profiles of components and regulators of the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system affect individual sensitivity to warfarin. *Thromb Haemost* 95 : 205-11, 2006.
  - 18) Aquilante CL, Langae TY, Lopez LM, Yarandi HN, Tromberg JS, Mohuczy D, Gaston KL, Waddell CD, Chirico MJ, Johnson JA: Influence of coagulation factor, vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, and cytochrome P450 2C9 gene polymorphisms on warfarin dose requirements. *Clin Pharmacol Ther* 79 : 291-302, 2006.

## INVOLVEMENT OF HEPATOCYTE NUCLEAR FACTOR 4 $\alpha$ IN THE DIFFERENT EXPRESSION LEVEL BETWEEN CYP2C9 AND CYP2C19 IN THE HUMAN LIVER

Sachiyo Kawashima, Kaoru Kobayashi, Kaori Takama, Tomoaki Higuchi, Tomomi Furihata, Masakiyo Hosokawa, and Kan Chiba

Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba, Japan

Received January 18, 2006; accepted March 10, 2006

### ABSTRACT:

CYP2C9 and CYP2C19 are clinically important drug-metabolizing enzymes. The expression level of CYP2C9 is much higher than that of CYP2C19, although the factor(s) responsible for the difference between the expression levels of these genes is still unclear. It has been reported that hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) plays an important role in regulation of the expression of liver-enriched genes, including P450 genes. Thus, we hypothesized that HNF4 $\alpha$  contributes to the difference between the expression levels of these genes. Two direct repeat 1 (DR1) elements were located in both the CYP2C9 and CYP2C19 promoters. The upstream and downstream elements in these promoters had the same sequences, and HNF4 $\alpha$  could bind to both elements *in vitro*. The transactivation levels of constructs containing two DR1 elements

of the CYP2C9 promoter were increased by HNF4 $\alpha$ , whereas those of the CYP2C19 promoter were not increased. The introduction of mutations into either the upstream or downstream element in the CYP2C9 gene abolished the responsiveness to HNF4 $\alpha$ . We also examined whether HNF4 $\alpha$  could bind to the promoter regions of the CYP2C9 and the CYP2C19 genes *in vivo*. The results of chromatin immunoprecipitation assays showed that HNF4 $\alpha$  could bind to the promoter region of the CYP2C9 gene but not to that of the CYP2C19 promoter in the human liver. Taken together, our results suggest that HNF4 $\alpha$  is a factor responsible for the difference between the expression levels of CYP2C9 and CYP2C19 in the human liver.

Cytochromes P450 (P450s) comprise a superfamily of metabolic enzymes that play important roles in the oxidative metabolism of xenobiotics and endogenous substrates (Gonzalez and Gelboin, 1994). The human CYP2C subfamily is composed of four isoforms (CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, and CYP2C19) that account for about 20% of the total human adult liver P450 contents (Shimada et al., 1994). Among the CYP2C subfamily isoforms, CYP2C9 and CYP2C19 play critical roles in the metabolism of clinically used drugs (Goldstein and de Morais, 1994). It has been reported that the expression level of the CYP2C9 gene in the human liver is about 20 times higher than that of the CYP2C19 gene (Furuya et al., 1991; Romkes et al., 1991; Inoue et al., 1997), indicating that there are some differences between the regulatory mechanisms of CYP2C9 and CYP2C19 gene transcriptions. It has been reported that pregnane X receptor, constitutive androstane receptor, glucocorticoid receptor, and hepatocyte nuclear factor 3 $\gamma$  participate in the basal expression of CYP2C9 and CYP2C19 genes (Ferguson et al., 2002; Gerbal-Chaloin

et al., 2002; Chen et al., 2003; Bort et al., 2004). However, the factor(s) responsible for the difference between the expression levels of CYP2C9 and CYP2C19 genes is still unclear.

Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) is a member of the nuclear receptor superfamily (Sladek et al., 1990) and is expressed at high levels in the liver, kidney, pancreas, and small intestine (Sladek et al., 1990; Thomas et al., 2001). HNF4 $\alpha$  appears to be an important factor for liver differentiation and function because it is involved in regulation of the expression of numerous liver-enriched genes, such as those related to glucose or lipid metabolism (Watt et al., 2003), those related to synthesis of blood coagulation factors (Sladek and Seidel, 2001), and drug-metabolizing enzymes, including CYP3A4, CYP2A6, CYP2C9, and CYP2D6 (Jover et al., 2001). It is thought that HNF4 $\alpha$  binds to a specific DNA sequence called a direct repeat 1 (DR1) element as a homodimer to stimulate transcription of these genes (Cairns et al., 1996; Tirona et al., 2003; Pitarque et al., 2005). However, HNF4 $\alpha$  does not always transactivate all the genes that have a DR1 element. For example, it has been reported that a DR1 element exists in the CYP2C18 promoter but that HNF4 $\alpha$  does not bind to the DR1 element of the CYP2C18 gene and does not transactivate this promoter (Ibeanu and Goldstein, 1995).

It has been reported that there are two DR1 elements in the promoter region of the CYP2C9 gene, and HNF4 $\alpha$  can activate the transcription of this gene via the DR1 element (Ibeanu and Goldstein, 1995; Chen et al., 2005). We also identified two DR1 elements in the CYP2C19 promoter, but it is not clear whether these elements are functional. Therefore, to clarify the mechanism determining the dif-

This work was supported by a grant-in-aid (17790112) for Young Scientists (B) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan, and a grant-in-aid from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan (Research in Regulatory Science of Pharmaceutical and Medical Devices).

A preliminary account of this work was presented at the International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX) meeting held on August 29 to September 2, 2004 in Vancouver, Canada.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://dmd.aspetjournals.org>.

doi:10.1124/dmd.106.009365.

**ABBREVIATIONS:** P450, cytochrome P450; HNF4 $\alpha$ , hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ ; DR1, direct repeat 1; kb, kilobase(s); kbp, kilobase pair(s); EMSA, electrophoretic mobility shift assay; ChIP, chromatin immunoprecipitation; PCR, polymerase chain reaction; WT, wild-type; MT, mutated.

ference between the expression levels of *CYP2C9* and *CYP2C19* genes, we hypothesized that HNF4 $\alpha$  contributes to the difference between the expression levels of *CYP2C9* and *CYP2C19* in the human liver. The 5'-flanking regions from -2 kilobase pairs (kbp) to the translation start site of these genes were analyzed by electrophoretic mobility shift assays (EMSA), cotransfection assays, mutagenesis, and chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays. Our results suggest that HNF4 $\alpha$  participates in the regulation of *CYP2C9* gene transcription but not in that of the *CYP2C19* gene despite the fact that the same DR1 elements exist in both gene promoters.

#### Materials and Methods

**EMSA and Supershift Assays.** EMSAs were performed using double-stranded DNA labeled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ) and 10  $\mu$ g of the nuclear extracts as described previously (Furihata et al., 2004). The following is the sequence of the oligonucleotides used as probes, wild-type, or mutated specific cold competitors: 5'-ACAA-GACCAAAGGACATTT-3' for the DR1-A WT, 5'-ACACCCCAAGGACATTT-3' for the DR1-A MT, 5'-AGTGGGTCAAAGTCCTTTC-3' for the DR1-B WT, 5'-AGTCCCTCAAAGTCCTTTC-3' for the DR1-B MT, 5'-TCGAGCGCTGGGCAAAGGTCACCTGC-3' for the HNF4 WT, and 5'-TCGAGCGCTAGGCACCGGTCACCTGC-3' for the HNF4 MT. Only the sequences of the sense strands are displayed above, and mutated nucleotides are underlined. Nuclear extracts were prepared from HepG2 cells by using a CellLytic Nuclear Extraction Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) according to the manufacturer's protocol. After extracting nuclear contents, the protein concentration was determined by using a Bio-Rad Dc Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The nuclear extracts were stored at -80°C until used.

For competition experiments, unlabeled competitive double-stranded DNA was added to the binding reaction mixture at a 50-fold excess of the probe amount before addition of the probe. For supershift assays, either 2  $\mu$ g of IgG against HNF4 $\alpha$  (22K9218H; Perseus Proteomics, Tokyo, Japan) or control mouse IgG (sc-2025; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) was added to the binding reaction mixture at room temperature for 30 min before addition of the probe.

**Plasmids.** The 5'-flanking regions of the *CYP2C9* and *CYP2C19* genes were isolated by polymerase chain reaction (PCR) with the common sense primer 5'-ACCTCTAGATTGCTTTTCTTTGCCCTGTAT-3' (for *CYP2C9* and *CYP2C19*) and the antisense primer 5'-GAGGACCTGAAGCCTTCTCTCTTGTTA-3' (for *CYP2C9*) or 5'-GGGGACCTGAAGCCTTCTCTCTTGTTA-3' (for *CYP2C19*) using human genomic DNA as a template. The amplicons were subcloned into a pGEM-T-easy vector (Promega, Madison, WI). After XbaI and BamHI digestion, the fragment was ligated into a pGL3-basic vector (Promega). These constructs are hereafter referred to as 2C9 -2k and 2C19 -2k, respectively. The nucleotide sequences were determined using a Dye Terminator Cycle Sequencing-Quick Start Kit (Beckman Coulter, Fullerton, CA) and a CEQ 2000 DNA Analysis System (Beckman Coulter). Fourteen deletion constructs were generated by nested PCR of the primary clone using the following sense primers: 5'-TCTCTAGAGGTTAA-TCTAAATCTAAGAATCA-3' (2C9 -380 and 2C19 -380), 5'-ATTTCT-AGAGCATCAGATTATTTACTTCA-3' (2C9 -340), 5'-ATTACGCGTGC-ATCAGATTGTTTACTTCA-3' (2C19 -340), 5'-TCTAGAGTGCTCTCAA-TTATGATGGTG-3' (2C9 -320), 5'-TCTAGACAGTGCTCTCAAATTATG-AC-3' (2C19 -320), 5'-TTTTCTAGAAATACCTAGGCTCCAACCAAG-T-3' (2C9 -255), 5'-TCTAGAATTACCAATACCTAGGCTTCAA-3' (2C19 -255), 5'-ATACGCGTAAGGAGAACAAGACCAAAGGAC-3' (2C9 -195 and 2C19 -195), 5'-TTTCTAGATATCAGTGGGTCAAAGTCT-3' (2C9 -160 and 2C19 -160), and 5'-ATCTAGATTTCAGAAGGAGCATATAG-T-3' (2C9 -140 and 2C19 -140). The antisense primer used was the same as that used in genome cloning. The obtained 5'-deletion fragments except for 2C9 -195, 2C19 -340, and 2C19 -195 were transferred into the pGL3-basic vector as described above. 2C9 -195, 2C19 -340, and 2C19 -195 were inserted into the pGL3-basic vector by MluI and BamHI digestion. All the constructs are named as shown in parentheses.

The cDNA clone of mouse HNF4 $\alpha$ 2 was isolated from mouse liver cDNA by PCR amplification and was subcloned into pTARGET mammalian expres-

sion vector (Promega) by EcoRI digestion, resulting in pHNF4 $\alpha$ 2 as described elsewhere (Furihata et al., 2006).

**Site-Directed Mutagenesis.** Site-directed mutagenesis was carried out as described elsewhere (Furihata et al., 2004). To introduce mutations into the reporter plasmids, complementary primers harboring a few mutations were designed for each target site as follows: 5'-GGAGAACAAGACCT\_\_GGA-CATTTTATTTTATCTGTATCAGTGGG-3' and 5'-CCCACTGATACAG-ATAAAAATAAAATGTCCA\_\_GGTCTTGTCTCC-3' for the *CYP2C9* DR1-Amt; 5'-CTGTATCAGTGGGTCT\_\_GTCCTTTCAGAAGGAGCAT-ATAGTGG-3' and 5'-CCACTATATGCTCTCTCTGAAAGGACA\_\_GAC-CCCACTGATACAG-3' for the *CYP2C9* DR1-Bmt; 5'-CGAAGGAGAACA-AGACCT\_\_GGACATTTTATTTTATCTCTATCAGTGG-3' and 5'-CCA-CTGATAGAGATAAAAATAAAATGTCCA\_\_GGTCTTGTCTCTCTC-G-3' for the *CYP2C19* DR1-Amt; 5'-CTCTATCAGTGGGTCT\_\_GTCCTT-TCAGAAGGAGCATATAGTGGG-3' and 5'-CCCACTATATGCTCTCTCTGAAAGGACA\_\_GACCCCACTGATAGAG-3' for the *CYP2C19* DR1-Bmt. The mutagenic sites are underlined, and spaces indicate deletions of 2-bp nucleotides.

**Cell Culture, Transient Transfection, and Dual Luciferase Assay.** FLC7 cells (Kawada et al., 1998), a human hepatocellular carcinoma cell line, were provided by Dr. S. Nagamori (Kyorin University, Tokyo, Japan). FLC7 cells were maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 50 U/ml penicillin and 50  $\mu$ g/ml streptomycin.

FLC7 cells were plated at a density of  $1.8 \times 10^5$  cells/well in 24-well plates 1 day before transfection. The reporter plasmids (200 ng/well) were cotransfected with pHNF4 $\alpha$  (100 ng/well) and pRL-TK vector (Promega, 4 ng/well) into FLC7 cells by TransIT-LT1 (Mirus, Madison, WI). Twenty-four hours after transfection, luciferase reporter activities were measured as described previously (Kobayashi et al., 2004). The *Renilla* luciferase activity derived from the control plasmid pRL-TK was used to normalize the results of the firefly luciferase activity of reporter plasmids. Experiments were performed in triplicate, and each value is the mean  $\pm$  S.D. from three or four separate assays.

**ChIP Assays.** ChIP assays were performed by using a ChIP-IT kit (Active Motif, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocol. Human liver (from a 56-year-old Caucasian male) was supplied by the National Disease Research Interchange (Philadelphia, PA) through HAB Research Organization (Tokyo, Japan), and this study was approved by the Ethics Committee of Chiba University (Chiba, Japan). The human liver tissue (2.4 g) was isolated and chopped on ice and then cross-linked by 1% formaldehyde for 12 min. Cross-linking was stopped by the addition of glycine solution. The chromatin was sheared by using an ultrasonic disruptor UD-201 (TOMY SEIKO, Tokyo, Japan) at 25% power with 14 pulses. Nine micrograms of the sheared chromatin was immunoprecipitated with either control mouse IgG or anti-HNF4 $\alpha$  IgG (2ZH1415H). After incubating for 4 h at 4°C with gentle rotation, salmon sperm DNA/protein G agarose was added to the mixture, and it was further incubated for 1.5 h under the same conditions. The DNA fragment was purified and used as a template for PCR. The DNA sequences around DR1 elements of the *CYP2C9* and *CYP2C19* genes were amplified by using the sense primers 5'-CAACCAAGTACAGTAAAACCTG-3' (for *CYP2C9*) and 5'-CAGAATG-TACAGAGTGGGCAC-3' (for *CYP2C19*) and the antisense primers 5'-TAA-CACTCCATGCTAATTCGG-3' (for *CYP2C9*) and 5'-AACACTCCAT-GCTAATTAAGT-3' (for *CYP2C19*). The specificity of the *CYP2C9* and *CYP2C19* primers was verified by the lack of amplification from sheared genomic DNA than the intended target. PCR conditions were as follows: 94°C for 2 min, followed by 94°C for 30 s, 47°C (for *CYP2C9*) or 50°C (for *CYP2C19*) for 30 s, and 72°C for 30 s, 40 cycles. The amplicons were visualized by ethidium bromide staining, and the sequence of each amplicon was confirmed by direct DNA sequence.

**Determination of mRNA Levels.** To measure the *CYP2C9* and *CYP2C19* mRNA levels, cDNA prepared from total RNA of the same human liver used for ChIP assays was subjected to quantitative real-time PCR with an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The mRNA levels of *CYP2C9* and *CYP2C19* were determined by using Gene Expression Assays (Applied Biosystems) gene expression products for *CYP2C9* and *CYP2C19*, respectively. The mRNA levels were normalized against glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA determined by



Fig. 1. Nucleotide sequences of the promoter regions of the *CYP2C9* and *CYP2C19* genes. Nucleotides are arbitrarily numbered in negative numbers from the ATG coding for the initiation codon (+1). Differences in nucleotide sequence are highlighted in bold letters, and putative HNF4 $\alpha$  binding sites (DR1-A and DR1-B) are indicated by arrows.

PreDeveloped TaqMan Assay Reagents for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Applied Biosystems).

**Statistical Analyses.** Data are presented as mean  $\pm$  S.D. The *p* values for each experimental comparison were determined using Student's *t* test.

## Results

**Identification of Two DR1 Elements in the *CYP2C19* Gene.** A comparison of the 5'-flanking regions of the *CYP2C9* and *CYP2C19* genes is shown in Fig. 1. The 5'-flanking region from -2 kbp to the translation start site of the *CYP2C9* gene was 88.8% identical to that of the *CYP2C19* gene. We searched for the DR1 element in the *CYP2C19* promoter by using a searching program for nuclear receptor binding sites (<http://www.nubiscan.unibas.ch/>; Podvinec et al., 2002) and found two putative DR1 elements (score,  $\geq 0.75$ ). No other DR1 element was identified with this score in this region. The upstream and downstream elements identified in the *CYP2C19* promoter had the same sequences as those of two DR1 elements of the *CYP2C9* promoter to which it has been reported that HNF4 $\alpha$  can bind (Ibeanu and Goldstein, 1995; Chen et al., 2005). The upstream elements and the downstream elements in both genes are hereafter referred to as the DR1-A element and the DR1-B element, respectively.

**Binding of HNF4 $\alpha$  to the DR1-A and DR1-B Elements of the *CYP2C9* and *CYP2C19* Promoters in Vitro.** EMSAs were performed to examine whether HNF4 $\alpha$  could bind to the DR1-A and DR1-B elements in the *CYP2C9* and *CYP2C19* promoters. We used a nuclear extract prepared from HepG2 cells because it has been reported that this cell line endogenously expressed HNF4 $\alpha$  (Ihara et al., 2005; Furihata et al., 2006). As shown in Fig. 2A, specific protein-DNA complexes were formed when the radiolabeled probe containing either the DR1-A element (DR1-A WT) or the DR1-B element (DR1-B WT) was incubated with HepG2 nuclear extracts (lanes 3 and

9, respectively). These complexes migrated at the same position as that of the one formed with the radiolabeled probe of HNF4 $\alpha$  consensus (HNF4 WT, lane 1). The formation of the complexes was eliminated by the addition of self-competitors (DR1-A WT, lane 4; DR1-B WT, lane 10) or unlabeled HNF4 WT (lanes 6 and 12). However, complex formation was not inhibited in the presence of mutated competitors (DR1-A MT, lane 5; DR1-B MT, lane 11; HNF4 MT, lanes 7 and 13).

To determine the proteins forming these complexes, supershift assays were performed using IgG against HNF4 $\alpha$ . The addition of anti-HNF4 $\alpha$  IgG to the mixture resulted in generation of a supershifted band when either DR1-A WT or DR1-B WT was used as a probe (Fig. 2B, lanes 3 and 7, respectively). Control mouse IgG, used as a negative control, did not affect the formation of any complexes (lanes 4 and 8). These results indicate that HNF4 $\alpha$  can bind to both the DR1-A and DR1-B elements of the *CYP2C9* and *CYP2C19* promoters.

**Effects of HNF4 $\alpha$  on the Transcriptional Activity of the *CYP2C9* and *CYP2C19* Promoters in FLC7 Cells.** Cotransfection analyses were performed by using human hepatocarcinoma FLC7 cells to examine whether HNF4 $\alpha$  played different roles in the transactivation of the *CYP2C9* and *CYP2C19* promoters. We have determined that this cell line does not express endogenous HNF4 $\alpha$  (Furihata et al., 2006). Several constructs containing various lengths of the *CYP2C9* promoter region and the HNF4 $\alpha$  expression vector were cotransfected into FLC7 cells (Fig. 3, left). The levels of the transcriptional activities of the five constructs containing two DR1 elements (2C9 -2k, 2C9 -380, 2C9 -340, 2C9 -320, and 2C9 -255) in the presence of HNF4 $\alpha$  were increased to 4.9-, 2.4-, 4.2-, 4.0-, and 3.5-fold, respectively, compared with those in the absence of HNF4 $\alpha$ .



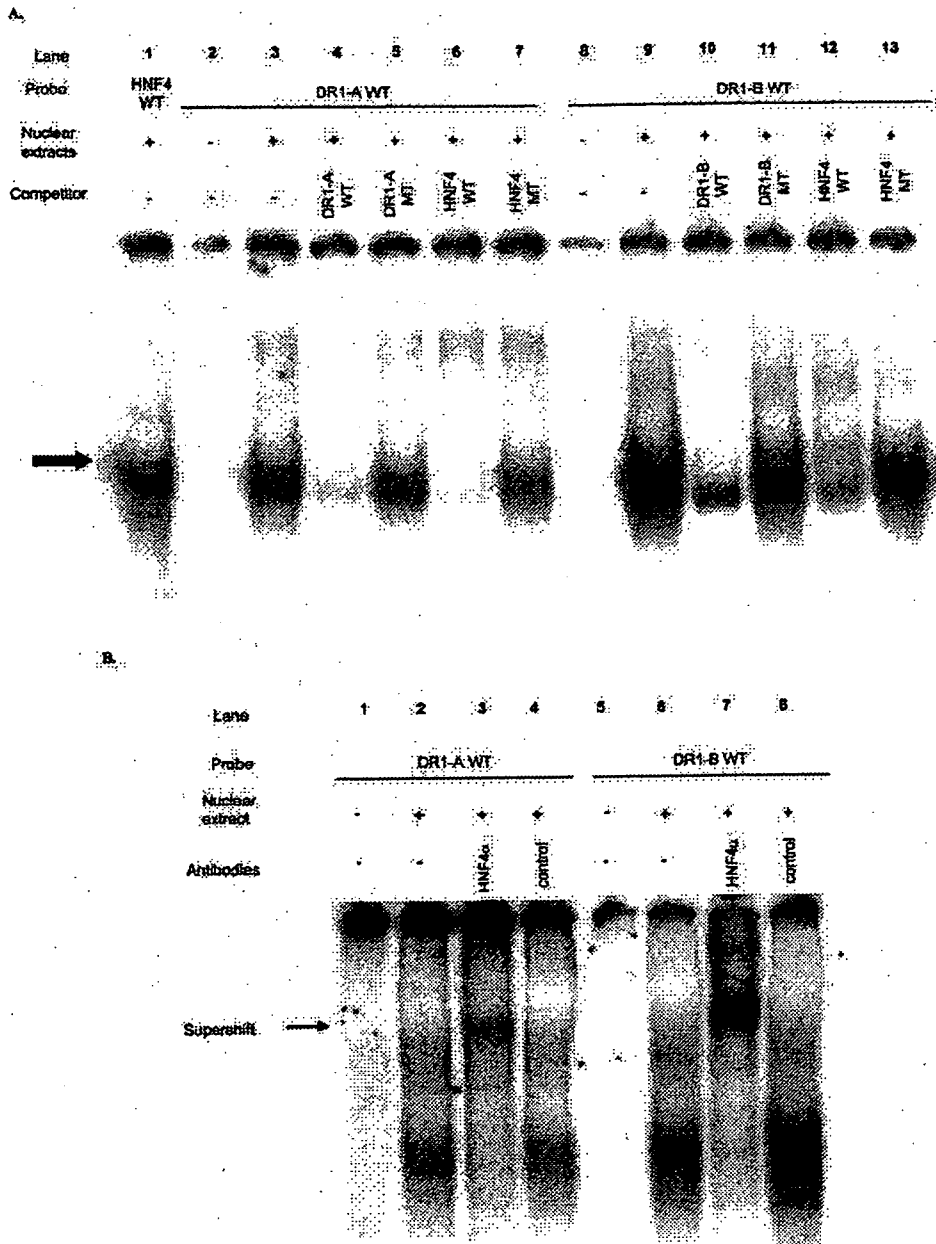


FIG. 2. Binding of HNF4 $\alpha$  to the DR1-A and DR1-B elements of the *CYP2C9* and *CYP2C19* promoters in vitro. A, EMSAs were performed using nuclear extracts prepared from HepG2 cells with the following probes: HNF4 WT in lane 1, DR1-A WT in lanes 2 through 7, and DR1-B WT in lanes 8 through 13. Oligonucleotide competitors were added with 50-fold excess amounts of the following probes: DR1-A WT in lane 4, DR1-A MT in lane 5, DR1-B WT in lane 10, DR1-B MT in lane 11, HNF4 WT in lanes 6 and 12, and HNF4 MT in lanes 7 and 13. Symbols (+) and (-) indicate the presence and absence of the nuclear extracts or competitors, respectively. B, supershift assays were performed using antibodies specific for HNF4 $\alpha$ . Anti-HNF4 $\alpha$  IgG (2  $\mu$ g) was added to the reaction mixtures in lanes 3 and 7. Control IgG (2  $\mu$ g) was used as a negative control (lanes 4 and 8). Symbols (+) and (-) indicate the presence and absence of the nuclear extracts or IgG, respectively. The arrow indicates supershifted bands.

However, the transcriptional activity of 2C9 -195 was not increased by HNF4 $\alpha$  despite the fact that this construct contained two DR1 elements. Deletion of the DR1-A element (2C9 -160) or both elements (2C9 -140) from the promoter region abolished its response for transactivation by HNF4 $\alpha$ . The same experiments were also performed using eight different deletion constructs of the *CYP2C19* promoter (Fig. 3, right). In contrast to the results obtained from the *CYP2C9* constructs, the levels of the transcriptional activities of *CYP2C19* constructs were not increased in the presence of HNF4 $\alpha$ . Deletion of the DR1-B elements of *CYP2C9* (2C9 -140) and

*CYP2C19* (2C19 -140) from the promoter regions abolished the transcriptional activities in the presence and absence of HNF4 $\alpha$ .

Mutation analyses were performed to examine whether HNF4 $\alpha$  required two DR1 elements for its transactivation ability (Fig. 4). As for the *CYP2C9* constructs, HNF4 $\alpha$  could stimulate the level of the promoter activity of the wild-type construct (2C9 -2k) to approximately 4-fold, but the introduction of mutation of each DR1 element resulted in complete loss of transactivation of the mutated *CYP2C9* promoter (2C9 DR1-Amt, 2C9 DR1-Bmt) by HNF4 $\alpha$  (Fig. 4, left). On the other hand, the levels of the transcriptional activities of constructs

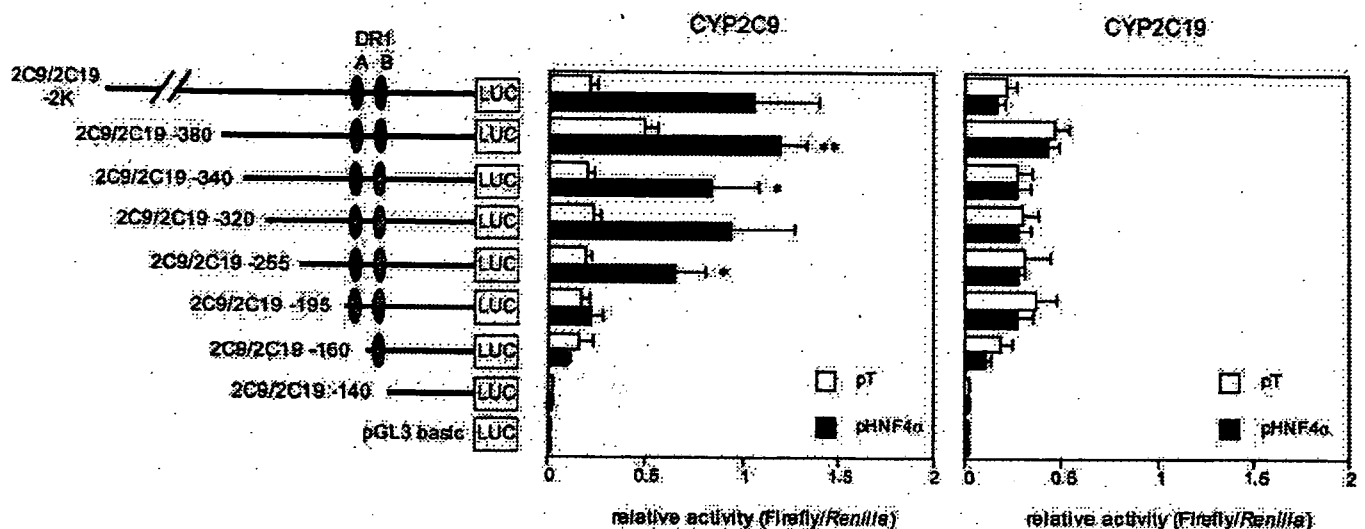


Fig. 3. Effects of HNF4 $\alpha$  on transcriptional activity of the *CYP2C9* and *CYP2C19* promoters in FLC7 cells. Deletion constructs (200 ng) of the *CYP2C9* or *CYP2C19* promoter were cotransfected with 100 ng of HNF4 $\alpha$  expression vector (pHNF4 $\alpha$ , open bars) or 100 ng of an empty vector (pT, closed bars). Two HNF4 $\alpha$  binding sites are shown in circles. Each value is the mean  $\pm$  S.D. of relative activity (firefly/Renilla) for four separate experiments, each performed in triplicate. \*,  $p < 0.05$  and \*\*,  $p < 0.01$  compared with the empty vector. Luc, luciferase.

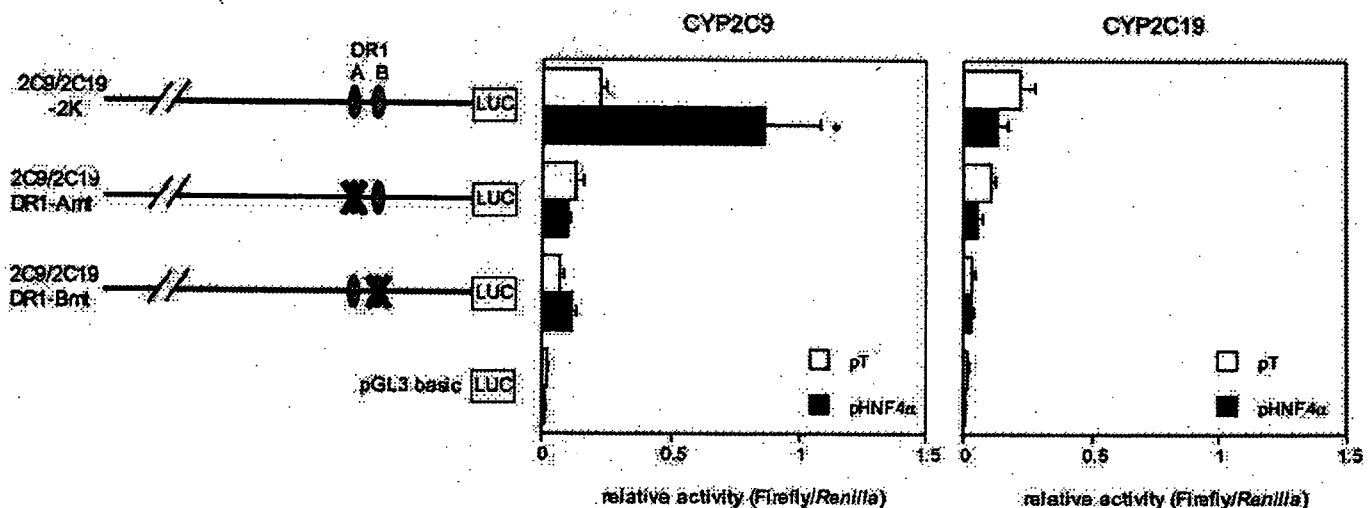


Fig. 4. Mutation analysis for two HNF4 $\alpha$  binding sites of the *CYP2C9* and *CYP2C19* promoters in FLC7 cells. Reporter constructs (200 ng) of the *CYP2C9* or *CYP2C19* promoter were cotransfected with 100 ng of HNF4 $\alpha$  expression vector (pHNF4 $\alpha$ , open bars) or 100 ng of an empty vector (pT, closed bars). Two HNF4 $\alpha$  binding sites are shown in circles, and mutations are indicated by crosses. Each value is the mean  $\pm$  S.D. of relative activity (firefly/Renilla) for three separate experiments, each performed in triplicate. \*,  $p < 0.05$  and \*\*,  $p < 0.01$  compared with the empty vector. Luc, luciferase.

of the *CYP2C19* promoter (2C19 -2k, 2C19 DR1-Amt, and 2C19 DR1-Bmt) were not increased by HNF4 $\alpha$  (Fig. 4, right). These results indicate that HNF4 $\alpha$  can increase the level of transcriptional activity of the *CYP2C9* promoter but not that of the *CYP2C19* promoter and that this activation occurred only when two DR1 elements of the *CYP2C9* promoter were simultaneously functional. Introduction of mutation of DR1-B elements decreased transcriptional activities of the *CYP2C9* and *CYP2C19* promoters in the presence and absence of HNF4 $\alpha$ .

**Binding of HNF4 $\alpha$  to the *CYP2C9* Promoter but Not to the *CYP2C19* Promoter in Vivo.** ChIP assays were performed using human liver to examine whether HNF4 $\alpha$  could bind to the *CYP2C9* and *CYP2C19* gene promoters in vivo (Fig. 5). After DNA extraction of the immunoprecipitated chromatin, PCR was performed to detect the occupancy of DR1 elements of the *CYP2C9* and *CYP2C19* genes by HNF4 $\alpha$ . As for *CYP2C9*, the DR1 elements were much more

abundant in DNA extracted from chromatin immunoprecipitated with anti-HNF4 $\alpha$  IgG than in that with control mouse IgG (Fig. 5, top). On the other hand, no DNA fragment around the DR1 elements of the *CYP2C19* gene was detected in both extracted DNA samples (Fig. 5, bottom). We also determined the expression levels of *CYP2C9* and *CYP2C19* mRNA in the same liver used for ChIP assays by using quantitative real-time PCR. The expression level of *CYP2C9* mRNA was 82.5 times higher than that of *CYP2C19* mRNA.

#### Discussion

The present study showed that two DR1 elements were located in the *CYP2C9* promoter (Fig. 1) and that the transcriptional activities of the *CYP2C9* promoter were increased by exogenous HNF4 $\alpha$  (Fig. 3). The introduction of mutation to each DR1 element resulted in complete loss of transactivation (Fig. 4). These results are consistent with the results presented in a recent report (Chen et al., 2005). We also

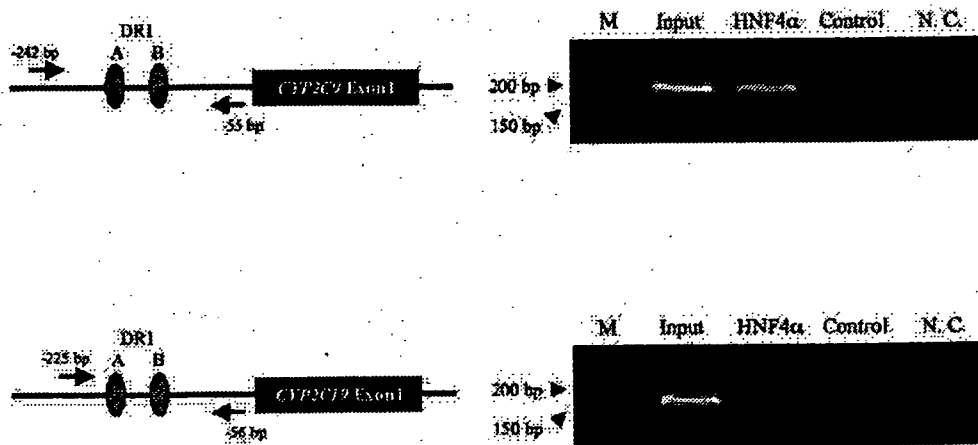


FIG. 5. Binding of HNF4 $\alpha$  to the DR1-A and DR1-B elements of the *CYP2C9* and *CYP2C19* promoters in vivo. ChIP assays were performed using the sheared genomic DNA extracted from human liver (9  $\mu$ g), control mouse IgG (3  $\mu$ g), and anti-HNF4 $\alpha$  IgG (3  $\mu$ g). M, DNA size marker; input, control sheared genomic DNA; HNF4 $\alpha$ , sheared genomic DNA immunoprecipitated with anti-HNF4 $\alpha$  IgG; control, sheared genomic DNA immunoprecipitated with control mouse IgG; N.C., nontemplate control.

performed the same experiments for the *CYP2C19* promoter. In contrast to the case of the *CYP2C9* promoter, transactivation by HNF4 $\alpha$  was not observed in the *CYP2C19* promoter despite the existence of two DR1 elements (Fig. 3). In addition, HNF4 $\alpha$  could bind to the DR1 elements located in the *CYP2C9* promoter but not to those in the *CYP2C19* promoter in vivo (Fig. 5). These results suggest that HNF4 $\alpha$  participated in the transactivation of at least  $-2$  kbp of the *CYP2C9* promoter but not that of the *CYP2C19* promoter.

Significant decreases in the levels of *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2A6*, *CYP2B6*, *CYP2C9*, and *CYP2D6* mRNA have been observed in HNF4 $\alpha$ -deficient human hepatocytes (Jover et al., 2001), and several studies have shown that transcription of *CYP3A4*, *CYP2A6*, and *CYP2D6* genes are regulated by HNF4 $\alpha$  via DR1 elements located in their promoters (Cairns et al., 1996; Tirona et al., 2003; Pitarque et al., 2005). Our results and the results of a recent study by Chen et al. (2005) showed that HNF4 $\alpha$  was involved in the expression of the *CYP2C9* gene. Therefore, these findings suggest that HNF4 $\alpha$  plays important roles in regulation of the expression of these *P450* genes in the human liver. On the other hand, it has been reported that HNF4 $\alpha$  is not involved in transactivation of the *CYP2C18* promoter, although a DR1 element is located in this promoter (Ibeanu and Goldstein, 1995). Considering the fact that the expression level of *CYP2C18* mRNA in the human liver is very low compared with the expression levels of other genes of the *CYP2C* subfamily (Goldstein and de Morais, 1994), it is possible that the lack of a functional DR1 element in the *CYP2C18* promoter contributed to this low level of expression of *CYP2C18* mRNA in the human liver. Accordingly, the same idea would also explain why the expression level of *CYP2C19* is lower than that of *CYP2C9*. That is, the existence of "functional" DR1 elements in the regulatory region of the *CYP2C9* gene would be crucial factors for its higher level of expression than that of the *CYP2C19* gene in the human liver.

The reason for the different effects of HNF4 $\alpha$  on transactivation of the *CYP2C9* and *CYP2C19* genes is currently unknown. However, the results obtained from our study provided some clues for understanding this difference. HNF4 $\alpha$  could not transactivate the *CYP2C9* promoter in the absence of the region from  $-255$  to  $-195$  bp ( $-255/-195$  bp), although two DR1 elements were still present in the promoter (Fig. 3), suggesting that the region  $-255/-195$  bp of the *CYP2C9* promoter is necessary for HNF4 $\alpha$  to up-regulate the transcription of the *CYP2C9* gene. One possible explanation for these results is that other HNF4 $\alpha$  binding sites exist in the region  $-255/-195$  bp of the *CYP2C9* gene, and they can help the action of HNF4 $\alpha$

that is recruited to the downstream elements. However, no DR1 elements were found in this region of the *CYP2C9* promoter by a searching program for nuclear receptor binding sites (<http://www.nubiscan.unibas.ch/>; Podvivec et al., 2002), and HNF4 $\alpha$  could not bind to this region in EMSA by using an oligonucleotide probe ranging from  $-255$  to  $-195$  bp (data not shown). Therefore, effects of the region  $-255/-195$  bp on transcription of the *CYP2C9* gene are unlikely to be mediated by the direct binding of HNF4 $\alpha$  to this region. Another possibility is that a certain factor, which assists with HNF4 $\alpha$ -mediated transactivation of the *CYP2C9* promoter, specifically binds to the region  $-255/-195$  bp of the *CYP2C9* gene but not to the *CYP2C19* gene. Actually, there are 8-bp differences between the region  $-255/-195$  bp of the *CYP2C9* promoter and the region  $-257/-197$  bp of the *CYP2C19* promoter. The factor that binds to the region  $-255/-195$  bp of the *CYP2C9* promoter may stabilize the binding of HNF4 $\alpha$  to the DR1 element of the *CYP2C9* promoter, or it may recruit cofactors that are required for function of HNF4 $\alpha$ . However, no complexes were formed in EMSAs using HepG2 nuclear extracts and an oligonucleotide probe ranging from  $-255$  to  $-195$  bp (data not shown). A searching program for transcriptional factors could not identify any factors that fulfill these requirements. Thus, further detailed study is needed to elucidate the role of the region  $-255/-195$  bp of the *CYP2C9* promoter in HNF4 $\alpha$  function.

Deletion and mutation of DR1-B elements decreased transcriptional activities of the *CYP2C9* and *CYP2C19* promoters in the presence and absence of HNF4 $\alpha$  (Figs. 3 and 4). A putative binding site of CCAAT enhancer-binding protein was found in the downstream of DR1-B elements partly overlapped. Therefore, the binding of CCAAT enhancer-binding protein to the *CYP2C9* and *CYP2C19* promoters may be inhibited by deletion and mutation of DR1-B elements, resulting in the decrease of basal activities of *CYP2C9* and *CYP2C19* promoters.

In conclusion, we showed that HNF4 $\alpha$  is one of the important factors regulating promoter activity of the *CYP2C9* gene but not that of the *CYP2C19* gene in the human liver. The direct binding of HNF4 $\alpha$  to two DR1 elements of the *CYP2C9* promoter is essential for HNF4 $\alpha$ -mediated transactivation of the *CYP2C9* promoter. In addition, this transactivation requires certain factors that facilitate the function of HNF4 $\alpha$  via the region from  $-255/-195$  bp of the *CYP2C9* promoter. The results of the present study suggest that HNF4 $\alpha$  is one of the determinants for the difference between expression levels of *CYP2C9* and *CYP2C19* in the human liver.

## References

- Bort R, Gomez-Lechon MJ, Castell JV, and Jover R (2004) Role of hepatocyte nuclear factor 3 $\gamma$  in the expression of human CYP2C genes. *Arch Biochem Biophys* 426:63–72.
- Cains W, Smith CA, McLaren AW, and Wolf CR (1996) Characterization of the human cytochrome P4502D6 promoter. A potential role for antagonistic interactions between members of the nuclear receptor family. *J Biol Chem* 271:25269–25276.
- Chen Y, Ferguson SS, Negishi M, and Goldstein JA (2003) Identification of constitutive androstane receptor and glucocorticoid receptor binding sites in the CYP2C19 promoter. *Mol Pharmacol* 64:316–324.
- Chen Y, Kissling G, Negishi M, and Goldstein JA (2005) The nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor cross-talk with hepatic nuclear factor 4 $\alpha$  to synergistically activate the human CYP2C9 promoter. *J Pharmacol Exp Ther* 314:1125–1133.
- Ferguson SS, Lechuyse EL, Negishi M, and Goldstein JA (2002) Regulation of human CYP2C9 by the constitutive androstane receptor: discovery of a new distal binding site. *Mol Pharmacol* 62:737–746.
- Furihata T, Hosokawa M, Masuda M, Satoh T, and Chiba K (2006) Hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  plays pivotal roles in the regulation of mouse *carboxylesterase 2* gene transcription in mouse liver. *Arch Biochem Biophys* 447:107–117.
- Furihata T, Hosokawa M, Satoh T, and Chiba K (2004) Synergistic role of specificity proteins and upstream stimulatory factor 1 in transactivation of the mouse *carboxylesterase 2* microsomal acylcarbamate hydrolase gene promoter. *Biochem J* 384:101–110.
- Furuya H, Meyer UA, Gelboin HV, and Gonzalez FJ (1991) Polymerase chain reaction-directed identification, cloning and quantification of human CYP2C18 mRNA. *Mol Pharmacol* 40:375–382.
- Gerbal-Chaloin S, Dautaj M, Pascucci JM, Pichard-Garcia L, Vilarem MJ, and Maurel P (2002) Transcriptional regulation of CYP2C9 gene: Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* 277:209–217.
- Goldstein JA and de Morais SM (1994) Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics* 4:285–299.
- Gonzalez FJ and Gelboin HV (1994) Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab Rev* 26:165–183.
- Ibeanu GC and Goldstein JA (1995) Transcriptional regulation of human CYP2C genes: functional comparison of CYP2C9 and CYP2C18 promoter regions. *Biochemistry* 34:8028–8036.
- Ihara A, Yamagata K, Nammo T, Miura A, Yuan M, Tanaka T, Sladek FM, Matsuzawa Y, Miyagawa J, and Shimomura I (2005) Functional characterization of the HNF4 $\alpha$  isoform (HNF4 $\alpha$ 8) expressed in pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochem Biophys Res Commun* 329:984–990.
- Inoue K, Yamazaki H, Imiya K, Akasaka S, Guengerich FP, and Shimada T (1997) Relationship between CYP2C9 and 2C19 genotypes and tolbutamide methyl hydroxylation and 5-mephenytoin 4'-hydroxylation activities in livers of Japanese and Caucasian populations. *Pharmacogenetics* 7:103–113.
- Jover R, Bort R, Gomez-Lechon MJ, and Castell JV (2001) Cytochrome P450 regulation by hepatocyte nuclear factor 4 in human hepatocytes: a study using adenovirus-mediated antisense targeting. *Hepatology* 33:668–675.
- Kawada M, Nagamori S, Aizaki H, Fukaya K, Niya M, Matsuura T, Sujino H, Hasumura S, Yashida H, Muzutani S, et al. (1998) Massive culture of human liver cancer cells in a newly developed radial flow bioreactor system: ultrafine structure of functionally enhanced hepatocarcinoma cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol* 34:109–115.
- Kobayashi K, Yamagami S, Higuchi T, Hosokawa M, and Chiba K (2004) Key structural features of ligands for activation of human pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos* 32:468–472.
- Pitarque M, Rodriguez-Antona C, Oscarsson M, and Ingelman-Sundberg M (2005) Transcriptional regulation of the human CYP2A6 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 313:814–822.
- Podvinec M, Kaufmann MR, Handschin C, and Meyer UA (2002) NUBIScan, an in silico approach for prediction of nuclear receptor response elements. *Mol Endocrinol* 16:1269–1279.
- Romkes M, Faletto MB, Blaisdell JA, Raucy JL, and Goldstein JA (1991) Cloning and expression of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome P450IIc subfamily. *Biochemistry* 30:3247–3255.
- Shimada T, Yamazaki H, Minura M, Inui Y, and Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 270:414–423.
- Sladek FM and Seidel SD (2001) Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ , in *Nuclear Receptors and Genetic Disease* (Burriss TP and McCabe B eds) pp 309–361, Academic Press, San Francisco.
- Sladek FM, Zhong W, Lai E, and Darnell JE (1990) Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev* 4:2353–2365.
- Thomas H, Jaschkoewitz K, Bulman M, Frayling TM, Mitchell SM, Roosen S, Lingott-Frieg A, Tack CJ, Ellard S, Ryffel GU, et al. (2001) A distant upstream promoter of the HNF-4 $\alpha$  gene compacts the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mol Genet* 10:2089–2097.
- Tirona RG, Lee W, Leake BF, Lan LB, Cline CB, Lamba V, Parviz F, Duncan SA, Inoue Y, Gonzalez FJ, et al. (2003) The orphan nuclear receptor HNF4 $\alpha$  determines PXR- and CAR-mediated xenobiotic induction of CYP3A4. *Nat Med* 9:220–224.
- Watt AJ, Garrison WD, and Duncan SA (2003) HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function. *Hepatology* 37:1249–1253.

---

Address correspondence to: Kaoru Kobayashi, Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Inohana 1-8-1, Chuo-ku, Chiba 260-8675, Japan. E-mail: kaoruk@p.chiba-u.ac.jp

---