

Table 5. Reduction in Casual Blood Pressure

Item	Group	n	Baseline period mean	Treatment period mean	Reduction		Differences between treatment groups		
					Mean	95% confidence interval	p*	Mean	95% confidence interval
Systolic BP	Irbesartan 100 mg	39	163.5	150.4	13.1	9.8-16.3	0.0001	9.0	4.7-13.4
	Placebo	39	164.2	160.1	4.1	1.1-7.0			
Diastolic BP	Irbesartan 100 mg	39	99.7	92.0	7.7	5.7-9.8	0.0004	5.0	2.3-7.7
	Placebo	39	99.3	96.6	2.7	0.9-4.5			

Unit: mmHg. BP, blood pressure. *t-test.

Table 6. Overall Safety Rating

Group	Safe	Slightly unsafe	Probably unsafe	Unsafe	No information available	Total	Safety rate (%)	95% confidence interval (%)
Irbesartan 100 mg	36	2	1	0	0	39	92.3	79.1-98.4
Placebo	32	5	2	1	0	40	80.0	64.4-90.9

(32/40), respectively. Hence, a similarly high level of safety was observed in both groups.

Discussion

The present study demonstrates that once-daily administration of 100 mg of irbesartan decreases the BP of patients with essential hypertension for up to 24 h. With ABPM, BP data can be obtained outside the examination room and the white coat effect can be eliminated. The placebo effect was also considered to be nonexistent or minimal in these ABPM studies (10). Given that ABPM can measure BP at both peak and trough blood levels, it has become a popular choice for investigating the duration of drug effects. The current "International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use" (ICH) guideline proposes that the *T/P* ratio be evaluated using ABPM and that the placebo-subtracted *T/P* ratio be at least 50% (7). Despite the usefulness of ABPM, no placebo-controlled clinical studies have been conducted in Japan among hypertensive patients. The present study was a placebo-controlled, double-blind randomized trial, and ABPM was carried out under standardized conditions. These methodological conditions strengthen the scientific value of the findings.

The present study showed that irbesartan significantly reduced 24-h, daytime, and nighttime BPs whereas no significant changes in these readings were observed for the placebo. These results thus confirm that irbesartan has a stable antihypertensive effect over 24 h, and that the placebo effect is negligible. In the present study, the ABPM was performed in the hospital so that the monitoring conditions were identical during the baseline and treatment periods, BP was monitored at short intervals, and the mean values at each hour were cal-

culated at 1-h intervals to minimize the effects of measurement error. Thus, a high level of accuracy was achieved because the mean values for 24-h BP readings were calculated under these strict conditions. The *T/P* ratios for systolic and diastolic BPs in the irbesartan group were 0.84 and 0.78, respectively, and the placebo-corrected *T/P* ratios were 0.77 and 0.64, respectively. These results suggest that once-daily administration of 100 mg of irbesartan is highly effective for 24 h without altering the diurnal BP profile.

A placebo-controlled ABPM study of irbesartan (9) has been conducted in Italy. The results from the Italian study cannot be simply compared with those from the present study because of differences in dose of irbesartan (75 and 150 mg vs. 100 mg), treatment period (8 weeks vs. 6 weeks) and ABPM condition (outpatient vs. inpatient). In the Fogari *et al.* study (9), the reduction in 24-h BP following administration of irbesartan 150 mg was 10.5 mmHg for systolic BP and 7.2 mmHg for diastolic BP, with *T/P* ratios of 0.68 and 0.76, respectively. The reductions in BPs in the Italian study tended to be greater, although the *T/P* ratio was similar. The smaller reduction in our study may be attributed to the smaller dosage of irbesartan and the in-hospital ABPM, because it is generally recognized that hospitalization reduces BP (11). Other possibilities include ethnic differences, and differences in lifestyle, such as dietary sodium intake. It is known that sodium intake, which influences the effect of angiotensin receptor blockers, is generally higher in Japan than in Western countries (12). It has also been shown that the antihypertensive effect of inhibitors of the renin angiotensin system is comparable to that of the calcium channel blockers among Caucasians (13), but not among the Japanese (14, 15).

Angiotensin II receptor blockers (ARBs) are now used widely in the treatment of hypertension because of their BP-

lowering and organ-protective abilities and few side effects. All commercially available ARBs have considerable durations of hypotensive effect and are usually administered once daily. However, the duration of action differs among ARBs mainly due to the different pharmacokinetic properties. The half life of plasma ARBs after oral administration is 1–3 h for losartan, 4–7 h for valsartan, 7–10 h for candesartan, 9–11 h for olmesartan, 11–15 h for irbesartan, and 20–24 h for telmisartan (16, 17). A study which compared the effect of irbesartan (150 mg) and valsartan (80 mg) in hypertensive patients showed that irbesartan produced greater reductions in trough BP, morning home BP and the average 24-h BP than valsartan (18). In a randomized double-blind trial, the effect of irbesartan (150 mg) on 24-h BP was slightly smaller than olmesartan (20 mg) but was greater than losartan (50 mg) or valsartan (80 mg) (19). In a recent systematic review regarding the antihypertensive activity of ARBs, irbesartan ranked second and third among seven ARBs for reductions in 24-h BP and BP during the last 4 h of the interdose period, respectively (20). Therefore, among the ARBs, irbesartan is considered to have effective and sustained antihypertensive properties.

In terms of safety, the overall safety rating was even higher for the irbesartan than the placebo. The incidences of adverse events and adverse drug reactions in the irbesartan group were comparable to those in the placebo group. These results confirmed the safety of irbesartan shown in previous studies (9).

In summary, a stable antihypertensive effect lasting 24 h was observed following once-daily administration of 100 mg irbesartan. From these findings, we concluded that this regimen can be clinically useful in the treatment of hypertension and that the safety of irbesartan was comparable to that of placebo.

Acknowledgements

We would like to thank the investigators who participated in this multicenter study.

Appendix

Medical Institutions and Investigators

Asahikawa City Hospital: Kunihiko Hirasawa, Yasumi Igarashi, Yoshinao Ishii, and Yutaka Yamada; Sapporo Shiraiishi Cardiovascular Hospital: Akifumi Kondo, Kimio Soma, Shuzaburo Fukuyama, and Setsuko Kuroda; Ofuna Central Hospital: Takeshi Morishita, Kiyoshi Okamoto, Toshiya Watanabe, Ken-ichiro Saisho, and Fumihiko Hara; Daishin-kai Ookuma Hospital: Yasushi Wakita, Junichi Nakagawa, and Yasuo Kuroda; National Cardiovascular Center: Yuhei Kawano,* Takeshi Horio, Kei Kamide, and Shin Takiuchi; Osaka Pharmacology Research Clinic: Shigeto Kanada, Junichi Azuma, Toshiro Aoki, Susumu Hashida, Isamu Yamamoto, Saneo Higaki, Yasushi Fujio, Tomohiro Katsuya, Mitsuru Ohishi, Norio Komai, Yoshio

Iwashima, Ken Sugimoto, and Masaharu Kaibe; Onomichi General Hospital: Nobuyuki Morishima and Yasuo Ooue; Fukuyou Hospital: Kensuke Fukuoki; National Nagasaki Medical Center: Hironori Ezaki, Hisayuki Hamada, and Hironori Kimura; Keiai-kai Nakamura Hospital: Masaharu Hiraga, Hidetaka Akinaga, Takashi Doi, and Yosuke Nakamura (*Study coordinator).

References

1. Sytkowski PA, Kannel WB, D'Agostino RB: Changes in risk factors and decline in mortality from cardiovascular disease: the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 1990; **322**: 1635–1641.
2. Staessen J, Li Y, Thijs L: Blood pressure reduction and cardiovascular prevention: an update including the 2003–2004 secondary prevention trials. *Hypertens Res* 2005; **28**: 385–407.
3. Imai Y, Abe K, Sasaki S, et al: Determination of clinical accuracy and nocturnal blood pressure pattern by new portable device for monitoring indirect ambulatory blood pressure. *Am J Hypertens* 1990; **3**: 293–301.
4. Imai Y, Sasaki S, Minami N, et al: The accuracy and performance of the A&D TM2421, a new ambulatory blood pressure monitoring device based on the cuff-oscillometric method and the Korotkoff sound technique. *Am J Hypertens* 1992; **5**: 719–726.
5. Kuwajima I, Nishinaga M, Kanamura A: The accuracy and clinical performance of a new compact ambulatory blood pressure monitoring device, the ES-H531. *Am J Hypertens* 1998; **11**: 1328–1333.
6. Imai Y: Prognostic significance of ambulatory blood pressure. *Blood Press Monit* 1999; **4**: 249–256.
7. Principles for Clinical Evaluation of New Antihypertensive Drugs. Notification No. 0128001 of the Evaluation and Licensing Division, PFSB, dated January 28, 2002. *Iyaku-hin Kenkyu* 2002; **33**: 546–550 (in Japanese).
8. Yoshinaga K: A late phase II clinical study of irbesartan capsules, an angiotensin II receptor antagonist, in patients with essential hypertension—single-agent therapy/monotherapy—. *J Clin Therap Med* 2008; **24**: 345–366 (in Japanese).
9. Fogari R, Ambrosoli S, Corradi L, et al: 24-hour blood pressure control by once-daily administration of irbesartan assessed by ambulatory blood pressure monitoring. *J Hypertens* 1997; **15**: 1511–1518.
10. Shimada K, Imai Y, Kuwajima I, et al: Guidelines for Diagnosis and Treatment of Cardiovascular Disease (1998–1999 yearly report of the research group), Usage Guidelines for 24-hour Blood Pressure Monitoring Devices (ABPM). *Jpn Circ J* 2000; **64** (Suppl V): 1207–1248 (in Japanese).
11. Katarzyna P, Bogna P, Marek K, et al: Clinical evaluation of 24 h ambulatory monitoring of blood pressure under various environmental conditions (home and work versus hospital). *Blood Press Monit* 1998; **3**: 289–294.
12. Kawano Y, Ando K, Matsuura H, et al: Report of the Working Group for Dietary Salt Reduction of the Japanese Society of Hypertension: (I) Rationale for salt restriction and salt-restriction target level for the management of hypertension. *Hypertens Res* 2007; **30**: 879–886.
13. Morgan T, Anderson A: A comparison of candesartan, felo-

- dipine and their combination in the treatment elderly patients with systolic hypertension. *Am J Hypertens* 2002; **15**: 544-549.
14. Kojima S, Kawano Y, Yoshitomi Y, et al: Comparison of first-line antihypertensive drugs by a randomized crossover method—a preliminary report. *Hypertens Res* 1995; **18**: 303-305.
 15. Eguchi K, Kario K, Hoshida Y, et al: Comparison of valsartan and amlodipine on ambulatory and morning blood pressure in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 2004; **17**: 112-117.
 16. Miura K, Iwao H: Clinical pharmacology of angiotensin receptor blockers: characteristics of pharmacokinetics and pharmacological actions. *Prog Med* 2000; **20**: 1235-1242 (in Japanese).
 17. Miyazaki M: Overview of pharmacology of angiotensin receptor blockers. *J Blood Press* 2005; **12**: 21-26 (in Japanese).
 18. Mancia G, Korlipara K, van Rossum P, Villa G, Silvert B: An ambulatory blood pressure monitoring study of the comparable antihypertensive efficacy of two angiotensin receptor antagonists, irbesartan and valsartan. *Blood Press Monit* 2002; **7**: 135-142.
 19. Oparil S, Williams D, Chrysant SG, Marbury TC, Neutel J: Comparative efficacy of olmesartan, losartan, valsartan, and irbesartan in the control of essential hypertension. *J Clin Hypertens* 2001; **3**: 283-291.
 20. Fabia MJ, Abdilla N, Oltra R, Fernandez C, Redon J: Anti-hypertensive activity of angiotensin II AT₁ receptor antagonists: a systematic review of studies with 24 h ambulatory blood pressure monitoring. *J Hypertens* 2007; **25**: 1327-1336.



ELSEVIER

BRIEF COMMUNICATION

No association between vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (*VKORC1L1*) and the variability of warfarin dose requirement in a Japanese patient population

Tong Yin ^a, Hironori Hanada ^a, Kotaro Miyashita ^b, Yoshihiro Kokubo ^c, Yasuhisa Akaiwa ^b, Ryoichi Otsubo ^b, Kazuyuki Nagatsuka ^b, Toshiho Otsuki ^b, Akira Okayama ^c, Kazuo Minematsu ^b, Hiroaki Naritomi ^b, Hitonobu Tomoike ^c, Toshiyuki Miyata ^{a,*}

^a Research Institute, National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

^b Cerebrovascular Division, Department of Medicine, National Cardiovascular Center, Osaka, Japan

^c Department of Preventive Cardiology, National Cardiovascular Center, Osaka, Japan

Received 29 June 2007; received in revised form 15 September 2007; accepted 15 September 2007
Available online 21 February 2008

Introduction

Warfarin therapy management is challenging due to the greater than 10-fold interindividual variability in the therapeutic dose [1–4]. Haplotypes in the gene of vitamin K epoxide reductase complex (*VKORC1*), encoding vitamin K epoxide reductase which is a target enzyme of warfarin, have been linked to the effective maintenance dose of warfarin [5–8]. Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (*VKORC1L1*) is a paralogous gene of *VKORC1* and shares about 50% amino acid identity with *VKORC1* protein [9,10]. The active sites of *VKORC1* are predicted to reside at the thioredoxin-like Cys132-X-X-Cys135 center embedded in the transmembrane

region, and the mutagenesis at one of Cys residues lost their activity [11,12]. A recent study suggested that the complex's protein disulfide isomerase subunit provides electrons for the reduction of the Cys132-X-X-Cys135 center in *VKORC1* [13]. The Cys132-X-X-Cys135 center in *VKORC1* is perfectly conserved in *VKORC1L1* [9,10], suggesting the functional importance of the *VKORC1L1* protein as a reductase for vitamin K recycling. However, the function of *VKORC1L1* is totally unknown, including whether or not the *VKORC1L1* genotypes are associated with the variability of the effective warfarin dose [14].

The International HapMap Project has deposited the patterns of more than 1 million single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genome sequences drawn from four diverse human populations including Japanese, with the data now available worldwide [15]. This data offer new tools for identifying phenotype-related genes and disease-causing genes in humans.

* Corresponding author. Tel.: +81 6 6833 5012x2512; fax: +81 6 6835 1176.

E-mail address: miyata@ri.ncvc.go.jp (T. Miyata).

Table 1 Characteristics of patients administered warfarin maintenance dose

Number	87
Male/Female	62/25
Age (years)	67.60 ± 10.60
Weight (kg)	60.20 ± 9.40
Warfarin dose (mg/day)	3.00 ± 1.03
Warfarin dose range (mg/day)	1.25–5.50

Age, weight, and warfarin dose are shown as mean ± SD.

In the present study, we constructed haplotype blocks for the *VKORC1L1* gene in a Japanese population using HapMap data and investigated the influence of 8 SNPs in the haplotype blocks on the interindividual variability of warfarin dose. Our data showed that none of the SNPs and haplotypes in the *VKORC1L1* gene showed an association with the variability of the daily warfarin maintenance dose.

Materials and methods

Haplotype block construction and selection of tag SNPs

The *VKORC1L1* gene is located on chromosome 7q11.21 and ranges from 64,975,692 to 65,057,237 bp on the NCBI Build 36

assembly. HapMap data regarding the NCBI Build 36 assembly covering 200 kb length centered on the *VKORC1L1* gene for 45 normal Japanese singletons were downloaded. Haplotype blocks were constructed using Haploview version 3.32 software (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/index.php>) [16]. Strong linkage disequilibrium between a pair of SNPs was defined by r^2 ranging from 0.7 to 0.98. A block was created if 95% of the informative comparisons were in strong linkage disequilibrium. The block-by-block tag SNPs were selected based on Paul de Bakker's Tagger [17] with an LOD score cutoff of 3.0 and r^2 a threshold of 0.80. Frequencies of the constructed haplotype blocks and selected tag SNPs were re-confirmed using SNPalyze v4.0 software (DYNACOM, Kanagawa, Japan).

Genotyping of selected tag SNPs in patients with warfarin dose

The study population consisted of 87 unrelated Japanese patients admitted to the Cerebrovascular Division of the National Cardiovascular Center between November 2003 and March 2004. The patients had all experienced an ischemic stroke within the 7 days prior to admission. Anticoagulation of all patients was stably controlled with a target international normalized ratio of 1.6–2.6 for the prevention of stroke recurrence [18,19]. Inclusion criteria were a confirmed date of initial exposure to warfarin and current anticoagulation therapy. Data collection consisted of inpatient and outpatient medical records. The anticoagulant database was used to obtain information on daily warfarin doses. The patient group had been previously studied for the association of four genes—*VKORC1*, γ -glutamyl carboxylase, calumenin, and *CYP2C9*—with the warfarin maintenance dose [20]. In the present study, we

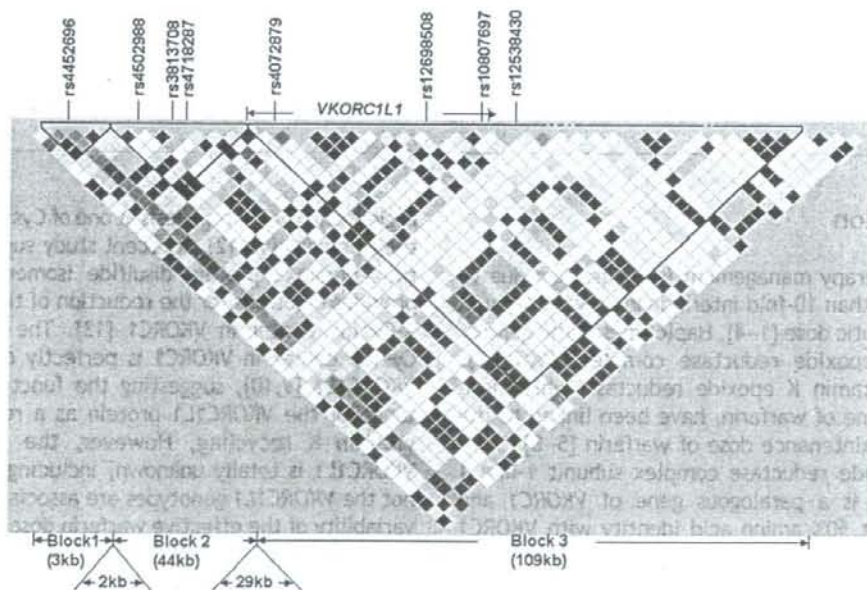


Figure 1 Haploview analysis of linkage disequilibrium structure and haplotype blocks centered on *VKORC1L1*. Pairwise linkage disequilibrium in r^2 was derived from 45 Japanese individuals (HapMap Data phase II, on NCBI Build 36 assembly). Shading represents the magnitude and significance of linkage disequilibrium, with the black-to-white gradient reflecting higher to lower linkage disequilibrium values. Three haplotype blocks were constructed covering a 200 kb length centered on the *VKORC1L1* gene. Based on the strength of linkage disequilibrium among SNP pairs, one SNP tagging the 3-kb block 1, three SNPs tagging the 44-kb block 2, and 4 SNPs tagging the 109-kb block 3 were identified. The interval length is 2 kb between blocks 1 and 2, and 29 kb between blocks 2 and 3. *VKORC1L1* is partly encompassed by block 3.

Table 2 Differences in daily warfarin dose for each SNP of the *VKORC1L1* gene

rs number	Position in reference sequence (bp)	SNP location	Genotype	Allele frequency	n	Mean±SD (mg/day)	p
rs4452696	64924147	upstream	AA	A/G	39	3.00±1.05	0.17
			AG	0.71/0.29	41	3.12±1.05	
			GG		7	2.32±0.61	
rs4502988	64935181	upstream	GG	G/A	63	2.99±1.03	0.87
			GA	0.89/0.11	24	3.03±1.07	
			AA		0	–	
rs3813708 ^a	64943067	upstream	GG	G/T	60	3.07±1.05	0.44
			GT	0.83/0.17	26	2.89±0.99	
			TT		0	–	
rs4718287 ^b	64944462	upstream	CC	C/G	20	3.05±1.18	0.70
			CG	0.49/0.51	40	2.90±0.95	
			GG		27	3.11±1.07	
rs4072879	65011286	intron 1	TT	T/C	47	2.96±0.90	0.93
			TC	0.76/0.24	36	3.01±1.18	
			CC		3	3.17±1.53	
rs12698508 ^a	65049393	intron 1	AA	A/T	60	3.07±1.05	0.46
			AT	0.83/0.17	25	2.89±1.01	
			TT		1	1.75	
rs10807697	65053605	intron 2	AA	A/G	2	2.63±0.53	0.82
			AG	0.13/0.87	24	3.07±1.60	
			GG		61	2.99±1.05	
rs12538430 ^b	65057623	3' UTR	CC	C/T	18	3.09±1.24	0.55
			CT	0.49/0.51	40	2.87±0.93	
			TT		29	3.13±1.05	

Positions of SNPs in reference sequence are derived from NCBI Mapview Build 36.2.

P values were calculated by one-way analysis of variance.

UTR: untranslated region. Warfarin daily maintenance dose are shown as mean±SD.

^a SNPs were in linkage disequilibrium with $r^2=1$.

^b These SNPs were in linkage disequilibrium with $r^2=0.99$.

genotyped 8 SNPs in *VKORC1L1*—rs4452696, rs4502988, rs3813708, rs4718287, rs4072879, rs12698508, rs10807697, and rs12538430—in the same patient group using the TaqMan-PCR system as previously described [21]. The PCR primers and probes used for the TaqMan system are available on request. We also resequenced directly the exon 1 and promoter regions of *VKORC1L1*, which were not covered by the constructed haplotype blocks, in all the patients. This study was approved by the Ethical Review Committee of the National Cardiovascular Center. All patients who participated in the study provided written informed consent for genetic analysis.

Statistical methods

All SNPs identified were tested for deviations from the Hardy-Weinberg disequilibrium through the use of a chi-square test. Pair-wise linkage disequilibrium between two SNPs was evaluated by r^2 . Individual diplotype was estimated by means of an expectation maximization algorithm using SNPalyze v4.0 software. The association of the genotypes and the inferred haplotypes with daily warfarin doses was examined by one-way analysis of variance. Statistical analyses were performed using Prism4 (GraphPad, San Diego, CA) and JMP V 5.1 software and the SAS release 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC). P values lower than 0.05 were considered to be statistically significant. The association of the genotypes with daily warfarin doses was reconfirmed by quantitative associ-

Table 3 Differences in daily warfarin dose for each haplotype of the *VKORC1L1* gene

Haplotype sequence ^a	Genotype	n	Mean±SD (mg/day)	p
AGGCTAGC	homo	6	3.04±0.49	0.49
	hetero	20	2.74±1.10	
	none	58	3.06±1.06	
AGGCCAGC	homo	3	3.17±1.53	0.95
	hetero	34	2.96±1.19	
	none	47	2.98±0.91	
AGGGTAGT	homo	4	3.06±1.16	0.14
	hetero	32	3.26±1.00	
	none	48	2.79±1.03	
GGTGTGT	homo	1	1.75	0.30
	hetero	22	2.77±1.06	
	none	61	3.04±1.03	
GAGGTAAT	homo	0	–	0.79
	hetero	24	3.03±1.07	
	none	60	2.96±1.04	

^aFor each haplotype sequence, SNPs are listed in sequential order as rs4452696, rs4502988, rs3813708, rs4718287, rs4072879, rs12698508, rs10807697, and rs12538430.

P values were calculated by one-way analysis of variance.

Warfarin daily maintenance dose are shown as Mean±SD.

Hs_VKORC1	MGSTWGSFGWVRLA--LCLTGLVLSL YALHVKAAARDRDRYALCDVGTATSCSR	53
Hs_VKORC1L1	MAAPVLLRVSVPRWVERVAR YAVCAAGILLLSI YAYHVEREKERDPEHRALCDLGFVVKCSA	60
Mm_VKORC1L1	MAAPVLLRVSVPRWVERVAR YAVCAAGILLLSI YAYHVEREKERDPEHRALCDLGFVVKCSA	60
Bt_VKORC1L1	MAAPVLLRVSVPRWVERVAR YAVCAAGILLLSI YAYHVEREKERDPEHRALXXXGYWF----	56
Gg_VKORC1L1	VSVPWRWVERVAR SAVCAAGILLLSL YACHLREKGR-----ALCDLSERENCSA	47
Tr_VKORC1L1	MAAPVLLRVSTPRWERIARVLVCLLGI LLSL YAPHVEREHARDPSYKALCDVSSSISCSK	59
Hs_VKORC1	VFSSRWGRGPGGLVEHVLGQDSILNQSN SIPGCI FYTLQLLL GCLRTRWASVLMLLSSLVS	113
Hs_VKORC1L1	ALASRWGRGPGGLGSI PGKDGVLNQPN SVFGLIPY ILQLLL GMTASAVAAL ILMTSS IMS	120
Mm_VKORC1L1	ALASRWGRGPGGLGSI PGKDGVLNQPN SVFGLIPY ILQLLL GMTASAVAAL VLMTSS IVS	120
Bt_VKORC1L1	SLP YRWGRGPGGLGSI PGKDGVLNQPN SIPGLIPY ILQLLL GLTASAVAAL ILMTSS IMS	116
Gg_VKORC1L1	AITSRWGRGPGGLGSI PGKDSAINQSN SVFGLVPIY ILQMLL GMTASAVAAL ILMTSS IVS	107
Tr_VKORC1L1	VFGSRWGRGPGGLGSI PGNDLALNQPN SVYGVIPYAFQLLL GMTVSAMAAL ILMTSS IMS	119
Hs_VKORC1	LAGSVYLAWILFPVL YDRSIVSITTTAYAINVSLM WLSFRKVKVQEPQGAKRH	163
Hs_VKORC1L1	VVGSYLAYILYFVLKPEPDIIVITVYV LNFLLLI INYKRLVYLNEAWKRLQPKQD	176
Mm_VKORC1L1	VVGSYLAYILYFVLKPEPDIIVTTVYV LNFLLLI INYKRLVYLNEAWKRLQPKED	176
Bt_VKORC1L1	VVGSYLAYILYFVLKPEPDIIVITVYV LNFILLI INYKRLVYLNEAWKRLQPKQD	172
Gg_VKORC1L1	VVGSYLAYILYFVLKPEPDIIVVITVYV LNFILFI INYKRLVYLNEAWKRLQPKQE	163
Tr_VKORC1L1	VVGSYLGYILYFVLKDLVIVITVYV LNFILFV LNYKRLVYLNEAWKRLQAKQD	175

Figure 2 Amino acid sequence alignment of VKORC1L1 proteins from different species and from human VKORC1 protein. The proteins are labeled by their gene symbols and a prefix indicating the species (Hs, *Homo sapiens*; Mm, *Mus musculus*; Bt, *Bos taurus*; Gg, *Gallus gallus*; Tr, *Takifugu rubripes*). MultAlin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/>) was used to perform the sequence alignment. Hyphens represent the amino acid deletion in the sequences. The active site Cys residues in the Cys132-X-X-Cys135 center of VKORC1 protein are indicated by a black background. The Cys-X-X-Cys center is highly conserved in VKORC1L1 proteins from various species.

ation test using the PLINK v 0.99p software (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>).

Results

Patient characteristics are summarized in Table 1. A total of 78 SNPs in the region of 200 kb centered on *VKORC1L1* in 45 normal Japanese has been retrieved from the Phase II HapMap data. Three haplotype blocks were constructed using 41 SNPs on Haploview, as shown in Fig. 1. The interval length between block 1 and 2 was 2 kb and between block 2 and 3 was 29 kb. Block 2 covered the putative promoter region of *VKORC1L1* (except for the 1.4 kb length of sequence in the upstream of exon 1), and block 3 included the region from Intron 1 to exon 3 of *VKORC1L1*. Thus, three haplotype blocks covered the gene of *VKORC1L1* except for exon 1.

We identified 8 tag SNPs in three haplotype blocks, as shown in Fig. 1. One SNP, rs4452696, resided in block 1, three SNPs—rs4502988, rs3813708, and rs4718287—in block 2, and four SNPs—rs4072879, rs12698508, rs10807697, and rs12538430—were presented in block 3. Haplotype frequencies and selected tag SNPs were confirmed independently by means of Haplotype Inference analysis.

We genotyped 8 tag SNPs of *VKORC1L1* in 87 patients with warfarin dose. None of the SNPs showed genotype deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.1$). Two pairs of SNPs (rs3813708 vs rs12698508, and rs4718287 vs rs12538430) were in tight linkage disequilibrium with r^2 values of more than

0.99, which were consistent with HapMap Phase II dataset. Comparisons of minor allele frequency between those found in the current study and those found in the HapMap dataset showed no significant differences ($p > 0.2$).

None of the SNPs exhibited a significant association with the effective daily maintenance dose of warfarin (Table 2). These results were reconfirmed by the PLINK quantitative association test ($p > 0.36$). Five haplotypes were estimated to show a frequency of more than 0.05. None of these haplotypes demonstrated a significant association with the variability of the daily warfarin maintenance dose (Table 3).

The exon 1 and part of the promoter regions of *VKORC1L1* were not covered by the constructed haplotype blocks, we sequenced these regions in all the patients, and a total of 9 SNPs were detected with minor allele frequency ranged from 0.05 to 0.15. No SNP could be detected in the coding region of exon 1. Association analysis showed that none of the detected SNPs had a significant association with the effective daily maintenance dose of warfarin ($p > 0.22$, data not shown).

Discussion

The genes of *VKORC1* (encoding a warfarin target enzyme) and *CYP2C9* (encoding a warfarin metabolizing enzyme) are well established genetic factors for affecting inter-individual variability of the maintenance dose of warfarin [3]. *VKORC1* protein

shows a reductase activity for conversion of vitamin K epoxide to vitamin K and vitamin K to vitamin KH₂, which is essential for γ -glutamyl carboxylation of vitamin K dependent clotting factors [22]. *VKORC1L1* is a paralogous gene of *VKORC1*. Human *VKORC1* and *VKORC1L1* showed about 50% identity at the amino acid level, and the Cys-X-X-Cys center in *VKORC1* is perfectly conserved in *VKORC1L1*. The amino acid sequence of *VKORC1L1* among five different species showed 58% identity (102/176 residues) (Fig. 2).

In our previous study, we sequenced the entire coding regions of the *VKORC1* gene in order to identify the genetic variations and genotyped SNPs in relation to the daily warfarin maintenance dose in a Japanese population. We found that the *VKORC1* genotype can explain an approximately 0.9 mg daily interindividual difference in warfarin maintenance dose [20–23]. In the present study, we utilized the same patient group to evaluate the contribution of the tagging SNPs and the haplotypes of *VKORC1L1* for the interindividual variability of warfarin dose. However, no association of the *VKORC1L1* genotype with warfarin dose requirement was found. Two well known functional SNPs, *CYP2C9*3* and *VKORC1 1173 C>T*, might mask the effect of *VKORC1L1* genotype on the warfarin effective dose. To eliminate this possibility, we analyzed the association of the tagging SNPs and the haplotypes of *VKORC1L1* with interindividual variability of the daily warfarin maintenance dose in 67 patients who did not carry the variations of *CYP2C9*3* and *VKORC1 1173 C>T*. Unfortunately, significant association still could not be found ($p>0.13$, data not shown). These results suggested that *VKORC1L1* is not likely to be involved in the interindividual variability of the therapeutic dose of warfarin.

Tagging SNPs selected on the basis of HapMap data could be most effective only for the common potential functional sequence variations (more than 5% frequency) in the gene [24]. Resequencing the whole *VKORC1L1* gene would be imperative, and alternative ways for finding associations of rare variations (less than 5% frequency) with strong deleterious functional effects to the phenotype of warfarin dose would be necessary [25].

Summary

The *VKORC1* gene has been claimed to determine the interindividual variability in the maintenance dose of warfarin, but it is unknown whether the *VKORC1L1* gene, a paralogous gene of *VKORC1*, sharing about 50% amino acid identity with *VKORC1* protein, also plays a role in the variability of warfarin dose. Our goal was to

study the association of the *VKORC1L1* haplotypes with the warfarin maintenance dose. After constructing haplotype blocks covering a 200 kb length centered on the *VKORC1L1* gene using HapMap data in a Japanese population, we selected eight common tag SNPs in three haplotype blocks and genotyped them in 87 patients on stable anticoagulation with a target international normalized ratio of 1.6–2.6. None of the SNPs or haplotypes exhibited a significant association with the effective daily warfarin dose. Although the *VKORC1L1* protein exhibits a significant amino acid identity with the *VKORC1* protein, no association could be found between the *VKORC1L1* genotype and the variability of the warfarin dose in a Japanese patient population. The genotypes of this gene denied a role in the interindividual variability of the effects of warfarin. Further functional analysis of *VKORC1L1* is warranted.

Conflict of interest

We do not have any direct and indirect conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was supported by the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO) of Japan and by Grants-in-Aid from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan, and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan.

Tong Yin, M.D., is a recipient of Takeda Foundation, from Institute of Geriatric Cardiology, General Hospital of People's Liberation Army, Beijing, China.

References

- [1] Hirsh J, Fuster V, Ansell J, Halperin JL. American Heart Association/American College of Cardiology Foundation guide to warfarin therapy. *Circulation* 2003;107:1692–711.
- [2] Gage BF. Pharmacogenetics-based coumarin therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006:467–73.
- [3] Yin T, Miyata T. Warfarin dose and the pharmacogenomics of *CYP2C9* and *VKORC1*—rationale and perspectives. *Thromb Res* 2007;120:1–10.
- [4] Milligan E, Jacobsen-Lenzini PA, Milligan PE, Grosso L, Eby C, Deych E, Grice G, Clohisey JC, Barrack RL, Burnett RS, Voora D, Gatchel S, Tiemeier A, Gage BF. Genetic-based dosing in orthopaedic patients beginning warfarin therapy. *Blood* 2007;110:1511–5.
- [5] 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* 2005;352:2285–93.
- [6] Geisen C, Watzka M, Sittlinger K, Steffens M, Daugela L, Seifried E, Muller CR, Wienker TF, Oldenburg J. *VKORC1*

- haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-ethnic variability of oral anticoagulation. *Thromb Haemost* 2005;94:773-9.
- [7] Marsh S, King CR, Porche-Sorbet RM, Scott-Horton TJ, Eby CS. Population variation in VKORC1 haplotype structure. *J Thromb Haemost* 2006;4:473-4.
- [8] Osman A, Enstrom C, Arbring K, Soderkvist P, Lindahl TL. Main haplotypes and mutational analysis of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) in a Swedish population: a retrospective analysis of case records. *J Thromb Haemost* 2006;4:1723-9.
- [9] 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* 2004;427:537-41.
- [10] Li T, Chang CY, Jin DY, Lin PJ, Khvorova A, Stafford DW. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 2004;427:541-4.
- [11] Wajih N, Sane DC, Hutson SM, Wallin R. Engineering of a recombinant vitamin K-dependent gamma-carboxylation system with enhanced gamma-carboxylglutamic acid forming capacity: evidence for a functional CXXC redox center in the system. *J Biol Chem* 2005;280:10540-7.
- [12] Rost S, Fregin A, Hunerberg M, Bevens CG, Muller CR, Oldenburg J. Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC1: evidence that highly conserved amino acids define structural requirements for enzymatic activity and inhibition by warfarin. *Thromb Haemost* 2005;94:780-6.
- [13] Wajih N, Hutson SM, Wallin R. Disulfide-dependent protein folding is linked to operation of the vitamin K cycle in the endoplasmic reticulum. A protein disulfide isomerase-VKORC1 redox enzyme complex appears to be responsible for vitamin K1 2,3-epoxide reduction. *J Biol Chem* 2007;282:2626-35.
- [14] Wadelius M, Chen LY, Eriksson N, Bumpstead S, Ghori J, Wadelius C, Bentley D, McGinnis R, Deloukas P. Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. *Hum Genet* 2007;121:23-34.
- [15] Consortium. The H. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005;437:1299-320.
- [16] Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21:263-5.
- [17] de Bakker PI, Yelensky R, Pe'er I, Gabriel SB, Daly MJ, Altshuler D. Efficiency and power in genetic association studies. *Nat Genet* 2005;37:1217-23.
- [18] Yamaguchi T. Optimal intensity of warfarin therapy for secondary prevention of stroke in patients with nonvalvular atrial fibrillation: a multicenter, prospective, randomized trial. Japanese Nonvalvular Atrial Fibrillation-Embolism Secondary Prevention Cooperative Study Group. *Stroke* 2000;31:817-21.
- [19] Chimowitz MI, Lynn MJ, Howlett-Smith H, Stern BJ, Hertzberg VS, Frankel MR, Levine SR, Chaturvedi S, Kasner SE, Benesch CG, Sila CA, Jovin TG, Romano JG. Comparison of warfarin and aspirin for symptomatic intracranial arterial stenosis. *N Engl J Med* 2005;352:1305-16.
- [20] Kimura R, Miyashita K, Kokubo Y, Akaiwa Y, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Okayama A, Minematsu K, Naritomi H, Honda S, Tomoike H, Miyata T. Genotypes of vitamin K epoxide reductase, gamma-glutamyl carboxylase, and cytochrome P450 2C9 as determinants of daily warfarin dose in Japanese patients. *Thromb Res* 2007;120:181-6.
- [21] Tanaka C, Kamide K, Takiuchi S, Miwa Y, Yoshii M, Kawano Y, Miyata T. An alternative fast and convenient genotyping method for the screening of angiotensin converting enzyme gene polymorphisms. *Hypertens Res* 2003;26:301-6.
- [22] Chu PH, Huang TY, Williams J, Stafford DW. Purified vitamin K epoxide reductase alone is sufficient for conversion of vitamin K epoxide to vitamin K and vitamin K to vitamin KH2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:19308-13.
- [23] Kimura R, Kokubo Y, Miyashita K, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Sakata T, Nagura J, Okayama A, Minematsu K, Naritomi H, Honda S, Sato K, Tomoike H, Miyata T. Polymorphisms in vitamin K-dependent gamma-carboxylation-related genes influence interindividual variability in plasma protein C and protein S activities in the general population. *Int J Hematol* 2006;84:387-97.
- [24] Gibbs R. Deeper into the genome. *Nature* 2005;437:1233-4.
- [25] Topol EJ, Frazer KA. The resequencing imperative. *Nat Genet* 2007;39:439-40.

心血管系血栓症—その病態解明と治療への応用—

血栓症とその予防薬に対する遺伝子のかかわり

Genetic involvement in thrombosis diseases and treatments in Japanese

宮田敏行

● はじめに

多因子疾患である静脈血栓塞栓症(venous thromboembolism; VTE)は、その遺伝的背景として凝固制御因子であるアンチトロンビン、プロテインC、プロテインSの先天性欠損症が広く知られている。白人種では、比較的頻度の高い凝固V因子Leiden変異とプロトロンビンG20210A変異もVTEの遺伝的背景として知られている。VTEの環境因子として、手術、外傷、癌、脊椎損傷、長期臥床、経口避妊薬、妊娠、産褥期が知られている。このように、VTEの発症の危険因子が明らかになっているにもかかわらず、米国ではVTEの発症が増加している。これは医師や国民のVTEへの関心の低さに原因があると考えられ、2008年3月号のArterioscler Thromb Vasc Biol誌は、VTEに関する8つの総説を掲載しVTEへ喚起を呼びかけた。また、2007年にBlood誌のPerspectiveにもVTEが取り上げられた。

VTEの発症は加齢で増加する。米国ミネソタ州の1966～1990年の統計によると、VTE発症者数は55歳から増加し、80歳では約年に1回/100人の発症となり、80歳以上では45歳以下と比べて約1,000倍上昇するという。今後、本邦でもVTE発症は診断法の普及とともに増加すると考えられるので、VTE発症に関与する因子を、日本人を対象に調査することは重要であると考えられる。こういった調査を大規模な一般住民を対象に行うと、VTEの背景因子が明らかにできると考えられる。

国立循環器病センター循環器予防検診部は、循環器疾患の背景因子を解明することを目的として、地域一般住民を対象としたコホート研究を進めている。本稿では一般住民およびVTE発症患者を対象とした研究を紹介する。また、ファルマコゲノミクス研究として進めているワルファリンとアスピリンにかかわる遺伝子研究も紹介

したい。

● 一般住民を対象にしたVTEに関する研究

当センター予防検診部は、地域一般住民を対象としたコホート研究を1989年から開始している。これは住民台帳から性別と10歳ごとで無作為に抽出した30歳代から70歳代の14,200人を対象にしている。最近では2年に1度、のべ4,000人程度の方の参加がある。図1に血液凝固のカスケード反応を示す。血液の流動性は凝固因子と制御因子のバランスで成り立っており、過凝固因子状態もしくは低制御因子状態は、VTEのリスクとなる。われわれはこれまで図1の*印で示す因子を含めて、計13種の血漿因子の活性もしくは抗原量を測定してきた。なかでも、アンチトロンビン、プロテインC、プロテインSの先天性欠損症はVTEのリスクであるため、一般住民を対象に活性を測定し、欠損症の頻度を求めることは重要である。

われわれはアンチトロンビン、プロテインC、プロテインS、プラスミノーゲンの活性について一般住民を対象に測定した。その結果を図2に示す¹⁾。プラスミノーゲンは活性値が60%程度に小さなピークが見られるが、これはプラスミノーゲンAla620Thr変異保有者である。プロテインCとプロテインSの活性はアンチトロンビンより広い活性分布を示した。次いで、これら4因子の活性を男女に分けて10歳代ごとで示す(図3)¹⁾。男性では4つのいずれの因子の活性も加齢により低下し、これが高齢者の血栓傾向を一部説明するかもしれない。一方、女性は30歳代と40歳代のプロテインCとプロテインS活性が低いことがわかる。これらの活性値から、一般住民におけるそれぞれの因子の欠損症の頻度を求めることができる。すなわち、プロテインCは0.13%(4,517人中6人)、プロテインSは1.12%および1.60%(男性:1,252人

国立循環器病センター研究所病因部
National Cardiovascular Center Research Institute

Toshiyuki Miyata

● Key words: 静脈血栓塞栓症, 血栓性素因, プロテインS, ワルファリン, アスピリン

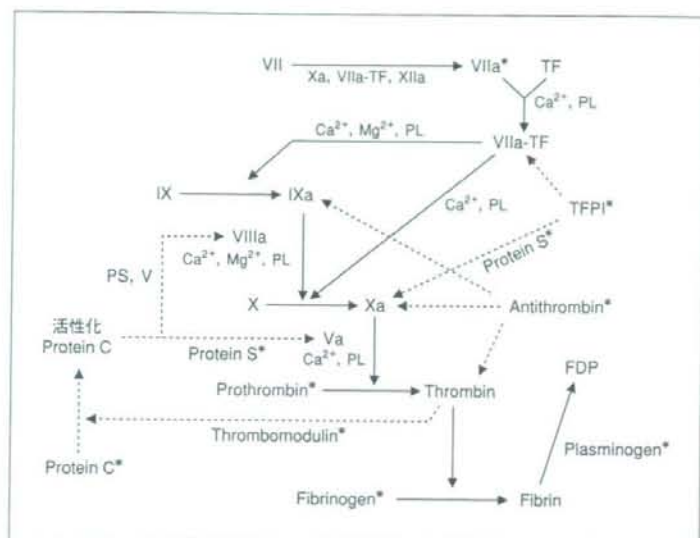


図1
血液凝固カスケード

血液凝固は凝固VIIa因子が組織因子(tissue factor; TF)に結合することで開始される。この複合体によりIXやXが活性化され大量のトロンビンが生成する(実線)。一方、凝固を抑制する因子として、プロテアーゼインヒビターであるアンチトロンビンと組織因子経路インヒビター(TFPI)、および内皮細胞上でプロテインC抗凝固反応を担うプロテインCとプロテインSがある。これらの抑制反応は点線で示した。一般住民を対象に活性を測定した因子は*印で示した。ここに示した因子以外に、フォンビルブラント因子(vWf)とPAI-1も一般住民を対象に測定を終了している。

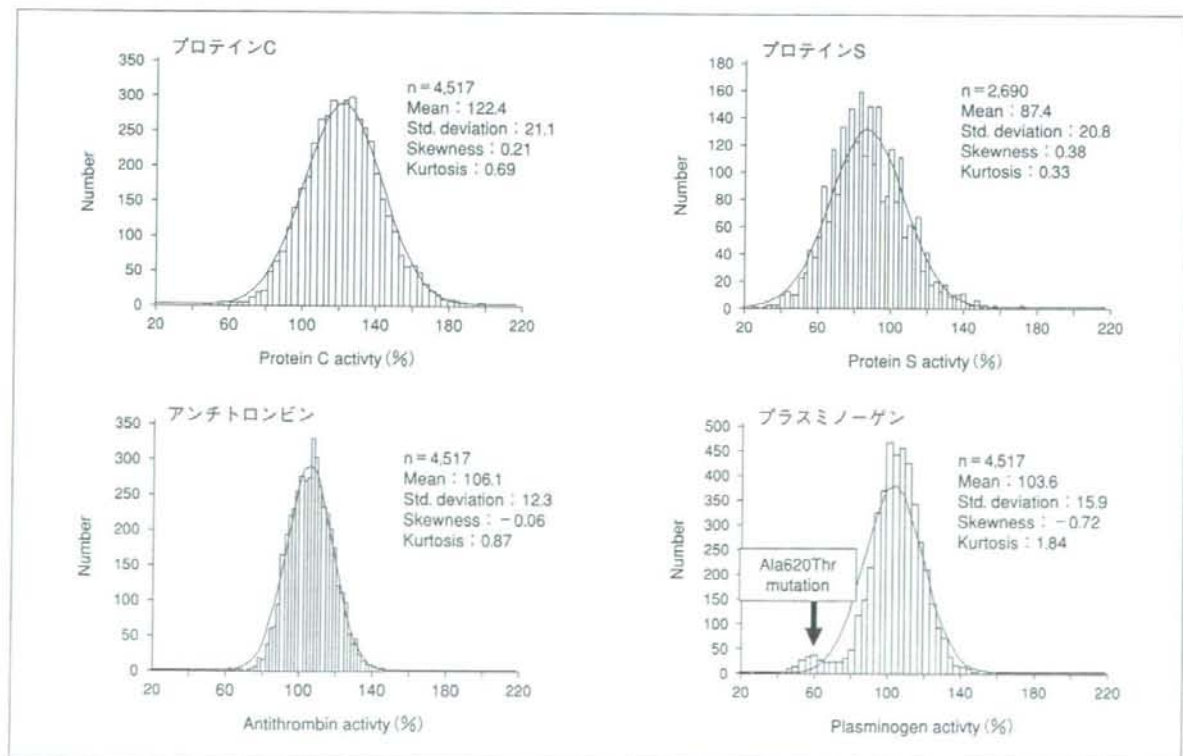


図2 プロテインC, プロテインS, アンチトロンビン, プラスミノゲンの活性

測定対象は一般住民4,517人。プロテインSのみ2,690人で測定した。プロテインCとプロテインSは広い活性幅を示す。プラスミノゲンは活性60%程度を示すピークが存在した。これらの多くはAla620Thr変異(いわゆる plasminogen Tochigi 変異)を有する。

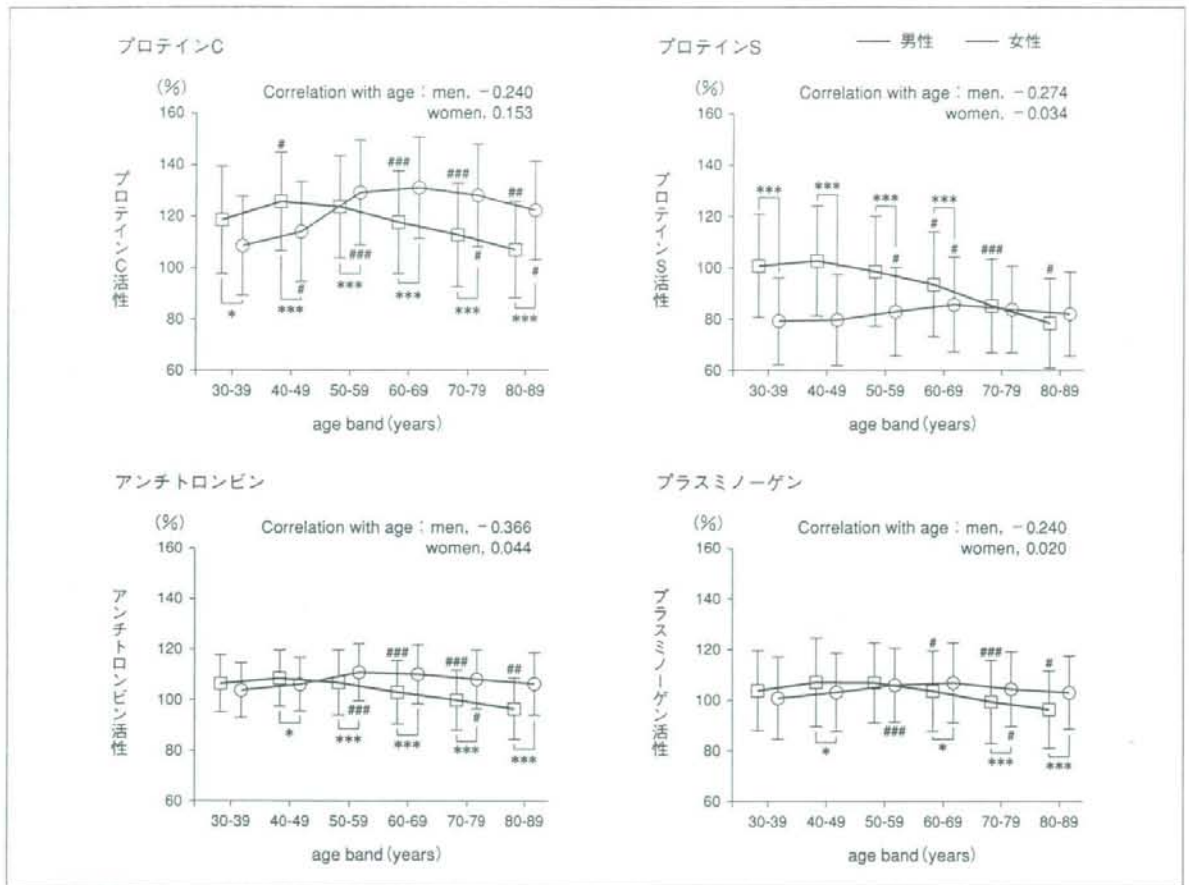


図3 プロテインC, プロテインS, アンチトロンビン, プラスミノーゲン活性の性差と年齢差
 活性と男女別に10歳ごとに示した。プロテインCとプロテインSの活性に大きな性差が見られる。特に、30歳代と40歳代の女性のプロテインS活性は同年代の男性より約20%低い。

中14人, 女性:1,438人中23人), アンチトロンビンは0.15%(4,517人中7人), プラスミノーゲンは4.29%(4,517人中ヘテロ192人, ホモ2人)であった。こうして求めた一般住民での頻度と, 国立循環器病センターで収集したVTE患者(108人)の活性値から測定した欠損症の頻度を比較した。その結果, プロテインC欠損症およびアンチトロンビン欠損症はオッズ比が52および38であり, VTEの強い危険因子であることが判明した¹⁾。一方, プラスミノーゲン欠損症のオッズ比は0.65であるVTEの危険因子ではなかった¹⁾。これらの結果は, 欧米での報告によく一致した。プロテインS活性はVTE患者で測定していなかったため, 欠損症がリスクになるかどうかはわれわれの結果では明らかではないが, 欧米の結果ではプロテ

インS欠損症もVTEのリスクであることが明らかとなっている。以上の結果は, 活性値を測定し, 低い活性値を示す人を欠損症と考えて, 欠損症の頻度を一般住民群とVTE群で比較したものである。

表1に日本人と欧米人の欠損症の頻度を, 一般住民とVTE患者で示した¹⁾。日本人に広く見られるプラスミノーゲン欠損症は, 幸いなことに, VTE危険因子ではなかった。VTEの危険因子であるアンチトロンビンとプロテインCの欠損症の頻度は, 日本人と欧米人で差は見られない。プロテインS欠損症は日本人に多く見られるVTEの危険因子であった。

一般住民を対象に欠損症の頻度を求めることができたので, これを用いて日本人の欠損症の人数を推定できる。

表1 日本人と欧米人での血栓性因子欠損症の頻度の比較

		一般住民	VTE患者
プラスミノーゲン 欠損症(%)	日本人	4.29	2.8
	欧米人	0.3~0.5	n.d.
アンチトロンビン 欠損症(%)	日本人	0.15	5.6
	欧米人	0.17	1.1
プロテインC 欠損症(%)	日本人	0.13	6.5
	欧米人	0.15~0.33	3.2
プロテインS 欠損症(%)	日本人	1.12	n.d.
	欧米人	0.03~0.13	1.3~2.2

日本人のプラスミノーゲン欠損症のほとんどはA620T変異を持ち、この変異は白人種には存在しない。

その推定では、プロテインS欠損症は約140万人、プロテインC欠損症は約16万人、アンチトロンビン欠損症は約19万人となる。欠損症によるVTE発症の浸透率は明らかとなっていないものの、それほど高いものではないと想像される。したがって、活性低値保有者が必ずしもVTEを発症するものではないが、こういった人は、VTEの発症を避ける生活様式をとることが薦められよう。

● VTE患者を対象にした遺伝子の研究

厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業、血液凝固異常症に関する調査研究班では「特発性血栓症サブグループ」を組織し、VTE患者の遺伝的背景に関する研究を進めてきた。本サブグループは6施設(大阪大学；川崎富夫、京都府立医科大学；辻肇、名古屋大学；小嶋哲人、自治医科大学；坂田洋一、慶應義塾大学；村田満、国立循環器病センター；宮田敏行)で構成された。本サブグループでVTE患者約170人を登録し、一般住民を対象としてVTEの遺伝的背景を調査した。

まず、候補となる次の5つの変異を検討した²⁾。ADAMTS13 P475S変異は、血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP)の原因遺伝子である。P475S変異はわれわれが同定したミスセンス変異で、これによりプロテアーゼ活性は低下する(しかし、TTPの発症を起こすまでにはいらない)。プラスミノーゲン Ala620Thr変異はすでに述べたように活性低下を示す変異である。プロテインS K196E変異も活性低下を示す。凝固Ⅲ因子-4C>T変異は変異により本来のATG配列より上流に新しいATGができるので、ここから翻訳が始まり本来のATGからの翻訳量が減少するため血

中Ⅲ因子量が低下する。PAI-1 4G/5Gはプロモーター領域の変異で転写因子の結合に影響を与え、PAI-1 mRNA量が変化する。

これら5多型をタイピングした結果、プロテインS K196E変異の変異Eアレル頻度が、VTE群で有意に高く、変異EアレルがVTEのリスクであることが判明した(オッズ比; 5.6, 95%信頼区間; 2.90-9.46)(表2)²⁾。ほかの4多型はプラスミノーゲン A620T変異を含めて一般住民群とVTE群で頻度に差が見られず、VTEと関連を示さなかった。プロテインS K196E変異は九州大学濱崎教授が行った研究でもVTEと関連を示した(オッズ比; 3.7)。このように、2つの独立した研究から本変異とVTEの関連が明らかになった。われわれの研究から、一般住民3,651人中にヘテロ接合体が66人、ホモ接合体はいなかったため、アレル頻度は0.9%と計算された。これは、以前名古屋大学が算出した0.8%、今回九州大学が求めた0.8%とよく一致した。これより、一般住民の約55人に1人がヘテロ接合体と算出された。この頻度から、12,000人に1人がホモ接合体と計算された。日本人総人口を1億2,000万人とすると、1万人がホモ接合体であると推定された。

プロテインS K196E変異は1993年に名古屋大学と三重大学がVTE患者に同定したミスセンス変異であり、血中に本変異を有する異常分子が存在する。本変異体は活性化プロテインCのコファクター活性を示さないことが発現実験で明らかとなっている。われわれは本変異のヘテロ接合体保有者の血中プロテインS活性を調べるため、一般住民1,862人の活性を測定し、遺伝型との関連を調べた³⁾。このうち34人がヘテロ接合体であり、プロテインS活性は40%から110%まで広い範囲を示した(図4)。一方、野生型プロテインSをもつ1,828人の活性も40%から170%までの広い活性分布を示した。このように血中のプロテインS活性だけではK196E変異を識別できないことが判明した。しかし、遺伝型に分けて活性を比較すると、変異Eアレルのヘテロ接合体者は平均16%の有意な活性低下を示すことが明らかとなった³⁾。

プロテインS K196E変異はプロテインS活性を低下させることから、ほかの血栓性疾患の素因になる可能性があり、この点が今後の課題である。また、本変異は日本人だけでなく東アジア人に共通に見られる変異と考えられるので、韓国人や中国人を対象にした研究も進められるべきであろう。

図3に一般住民を対象にしたプロテインS活性の性・

表2 日本人VTE患者を対象とした5遺伝子多型の症例対照研究

		ADAMTS13 P475S	PLG A620T	PS K196E	FXII -4C>T	PAI-1 4G/5G
VTE	Major homo	139	152	146	63	61
	Hetero	20	9	13	75	69
	Minor homo	1	0	2	23	30
	Total	160	161	161	161	160
	MAF	0.069	0.028	0.053	0.376	0.403
General population (Suita study)	Major homo	3,290	3,501	3,585	1,513	1,468
	Hetero	332	149	66	1,651	1,686
	Minor homo	17	0	0	486	497
	Total	3,639	3,650	3,651	3,650	3,651
	MAF	0.050	0.020	0.009	0.359	0.367
χ^2		2.179	0.987	75.464	0.372	3.402
P		0.336	0.320	<0.0001	0.830	0.183
Major allele		Pro	Ala	Lys	T	4G
Minor allele		Ser	Thr	Glu	C	5G

MAF : minor allele frequency

(文献2より改変引用)

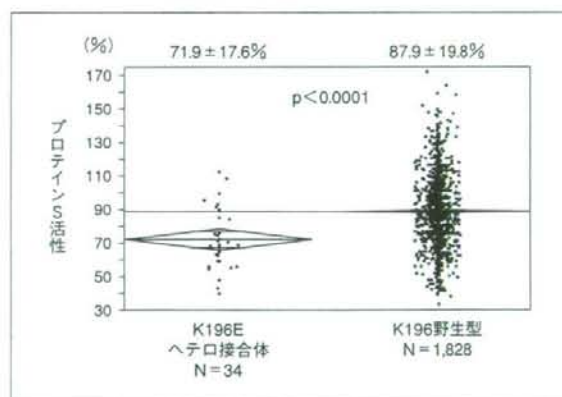


図4 プロテインS K196E変異保有者の血中プロテインS活性

一般住民1,862人の血中プロテインS活性を測定し、K196E変異の遺伝型に分けて活性を比較した。ヘテロ接合体(34人)のプロテインS活性(71.9±17.6%, 平均値±SD)は野生型(1,828人)のプロテインS活性(87.9±19.8%)より有意に低い(p<0.0001)。

年齢差を示したが、プロテインS活性は多くの後天性因子の影響を受ける。特に妊娠時のプロテインS活性は欠損症に匹敵する程度にまで低下することが知られており、注意が必要である。図5にプロテインSの抗凝固能

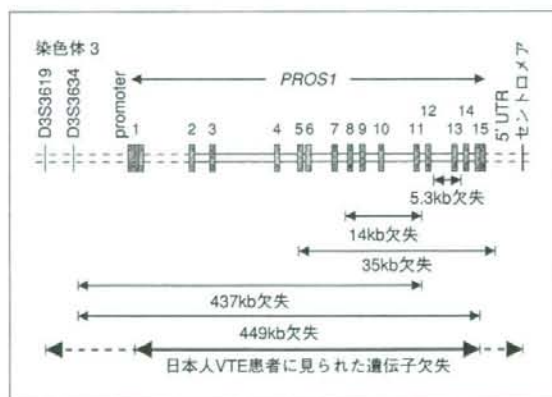


図5 プロテインS遺伝子に同定された遺伝子欠損

日本人VTE患者に認められた欠損はプロテインS遺伝子の全域が欠損していた。

についてまとめた。プロテインS活性の抗凝固能は活性化プロテインCのコファクター、およびTFPIのXa因子阻害の促進で説明される。プロテインSは血中では補体制御因子であるC4BPと複合体を形成し、複合体のプロテインSは抗凝固能を持たず、遊離型だけが抗凝固能を示す。C4BPはα鎖だけで構成される分子とβ鎖を含む分子がある。プロテインSはβ鎖にのみ結合する。α鎖は

表3 173人のVTE患者に見られたアミノ酸配列が変化する変異を有する患者数

遺伝子名	患者数
プロテインS	24
プロテインC	12
アンチトロンビン	14
プロテインS+プロテインC	5
合計	55

炎症が増加するがβ鎖は増加しない。したがって、炎症時でも遊離プロテインS量は大きな変動はなく、プロテインSによる抗凝固能も大きく変化するものではない。

プロテインS欠損症とみなされる程度にまで活性が低下した患者のプロテインS遺伝子の解析を行っても、その半数にしか原因変異は同定されず、残りの症例には変異を同定できないことが世界的な問題になっている。これは、重症血友病患者の遺伝子解析を思い起こさせる。この場合、第Ⅷ因子遺伝子のAlu配列特異的逆位(inversion)で説明された。しかし、プロテインS遺伝子近傍にはAlu配列は存在しない。そこで、プロテインS遺伝子の欠失を想定し、VTE患者163人のプロテインS遺伝子欠損の解析を行った⁹⁾。その結果、プロテインS活性21%を示す1人の患者に遺伝子全域の欠失を認めた。163人中に1人では高頻度に認められることにはならないが、プロテインS活性が50%以下で、かつミスセンス変異が同定されない患者とすると6人に絞られ、そのうちの1人が遺伝子欠失を保有していたことになる。プロテインSの遺伝子欠失はVTE患者に広く認められるものではないが、活性低下症例には存在することが明らかとなった。

● VTE患者にみられる稀な変異

VTEの遺伝的背景として、アンチトロンビン、プロテインC、プロテインSの遺伝子変異が知られているが、どれくらいの頻度でどういった変異が存在するのかは、日本人を対象に行った研究はなかった。そこで、サブグループで収集したVTE患者173人を対象に3つの遺伝子の蛋白質コード全領域のDNAシーケンシングを行った。その結果を表3に示す。VTE患者54人にミスセンス変異などのアミノ酸変化を伴う遺伝子異常を同定した。プロテインS遺伝子欠損患者1人を加えると、総計55人、約32%の患者に、39種のアミノ酸の変化を伴う変異を同定した。なかでもプロテインS K196Eは前述のように最も

表4 2つの遺伝子に変異を有する5人の患者

プロテインS	プロテインC	VTE発症年齢	家族歴
K196E	K193del	57	情報なし
K196E	R221W	40	no
K196E	R27W	39	yes
K196E	V339M	25	yes
K196E	V339M	55	no

表5 変異保有者と非保有者のVTE発症年齢の比較

	変異保有者	変異非保有者
人数	55*	118
発症年齢 平均±SD	44.7±16.5	52.6±16.1

*5人はプロテインSとプロテインCに変異を持つ。2人はプロテインS K196E変異を持つ。1人はプロテインS K196E、R101Cの複合ヘテロ体である。
p=0.0031

多くの患者に見られ、次いでプロテインCのK193del変異とV339M変異が4人ずつの患者に同定されたので、これらの変異は日本人のVTEのリスクとして重要であることが明らかとなった。V339M変異保有者のプロテインCアミド活性は1人(77%)を除き、低い活性を示したが、K193del変異保有者はいずれもアミド活性は90%以上を示した。本変異保有者は九州大学も同定しており、その抗凝固活動は低値を示していることから、本変異は抗凝固活性には影響を与えるがアミド活性には影響しないものと考えられる。素因スクリーニングとしてプロテインCアミド活性の測定の際に注意が必要である。K196残基はプロテインC軽鎖のC末端から6残基目に位置するので、この残基がアミド活性に影響しないことを説明できよう。

VTE患者の5人は、2つの遺伝子に変異を保有していた。この5人の患者はいずれもプロテインS K196E変異を保有していた(表4)。このことから、プロテインS K196E変異はほかの変異と重複することによりVTE発症のリスクを上げていると考えられた。

VTE患者55人にアミノ酸変化を伴う遺伝子異常を同定したので(表3)、次にこれら遺伝子変異保有者のVTE発症年齢を変異非保有者と比較した(表5)。その結果、変異保有者のVTEは非保有者より有意に若年で発症することが判明し、遺伝子変異のVTE発症への寄与が明らかになった。

ここに述べたVTE患者は、初発例、再発例、家族発症を有する例、癌患者など、種々の背景因子を持つ。大病院にかかっている患者という特性も考慮する必要がある。

●トロンボモジュリンと組織因子経路インヒビター、その他の遺伝子多型

われわれはVTEの遺伝的背景を明らかにするため、トロンボモジュリン(thrombomodulin; TM)遺伝子と、組織因子経路インヒビター(tissue factor pathway inhibitor; TFPI)遺伝子を解析した。これらの遺伝子に多型を同定し、血中濃度と関連を示す多型を同定することができた。そのなかで、TMのA455V変異を含むハプロタイプが男性でVTEに関連を示した($p=0.02$, 95%信頼区域; 1.14-6.67)⁵⁾。しかし、TFPIの多型はVTEと関連を示さなかった。凝固因子の γ -カルボキシル化に関与する酵素の遺伝子変異は凝固制御因子であるプロテインSとプロテインCの血中濃度に影響を与えると考えられる。そこで、 γ -カルボキシル化に関与する3遺伝子(VKORC1, GGCX, CALU)の多型に関する研究を行った⁶⁾。その結果、女性で γ -カルボキシグルタミンナーゼGGCX 8016G>A (R325Q変異)のGG型保有者はAG型もしくはAA型保有者より血中プロテインCアミド活性が4~5%高いことを明らかにした($130.8 \pm 1.5\%$ vs $126.8 \pm 0.7\%$, $125.4 \pm 0.6\%$, $p=0.002$)。また、ビタミンKエポキシド還元酵素VKORC1 3730G>AとカルメニンCALU 20943T>Aは女性で血中プロテインS抗凝固活性に弱いながら関連を示した。

以上述べたようにわれわれはVTEの遺伝的背景を明らかにする症例対照研究で候補遺伝子のVTEへの関連を検討した。この時、それぞれの血中因子の活性(もしくは抗原量)を中間形質として用い、遺伝子の影響を検討した。中間形質である血中の因子の活性に影響を与える遺伝子多型は同定できたものの、それらの多くはVTEとは関連を示さず、唯一プロテインS K196E変異が強い関連を示す結果となった。

●白人種と日本人のVTEの遺伝的背景の相違 (表6)

白人のVTEの遺伝的背景として、第V因子Leiden変異(FV R506Q変異)が知られている。本変異保有者は活性化プロテインC添加の凝固時間の延長が見られない(APC抵抗性と呼ばれる)。ヨーロッパ北部の一般住民の10~15%およびVTE患者の20~40%に見られる変異である

表6 VTEの遺伝的素因

	白人	日本人
比較的よくみられる変異	凝固第V因子 (Leiden, R506Q)	プロテインS (Tokushima, K196E)
稀な変異	プロテインS プロテインC アンチトロンピン	プロテインS プロテインC アンチトロンピン

が、日本人を含む東アジア人には見られない。また、白人種はプロトロンピン遺伝子の3'非翻訳領域に20210G>A変異をもつ。Aアレル保有者は血中プロトロンピン量が高く、VTEのリスクとなる。本変異は白人一般住民の約2%およびVTE患者の6~8%に見られるが、日本人には同定されていない。プロテインS、プロテインC、アンチトロンピンに見られる稀な変異は、白人・日本人を問わず、あらゆる人種に見られる。一方、日本人を対象にした研究から、VTEの遺伝的背景としてプロテインS K196E変異が明らかとなった。最近のヒトゲノム多様性の研究から、人種の違いによる遺伝子多型の差が広く知られるようになってきた。その最も有名な例は、アルコール摂取にかかわるモンゴロイド特有のアセトアルデヒド脱水素酵素多型であろう。また、ゲノム網羅的SNPタイピングとしてチップが広く用いられるが、タイピングの対象となる50万SNPサイトのうち、日本人は15万サイトがモノアレルであるという。

●ワルファリン量の個人差にかかわる遺伝子多型

ワルファリンは経口抗凝固薬として血栓塞栓症の再発予防に用いられるが、治療域が狭いためコントロールの難しさが指摘されている。ワルファリン量の個人差にかかわる遺伝子としてワルファリン分解酵素であるCYP2C9と標的酵素であるVKORC1が報告され⁷⁾、両遺伝子の多型と体重などの情報を用いた適正量の予測法の開発も試みられている。これらの遺伝子多型別にワルファリン量を調べると、遺伝子多型群間のワルファリン量のオーバーラップが大きく、多型情報だけで、ワルファリン維持量が規定されていないのは明らかである。多型情報に体重や性別などの情報を加えても、個人差の40~50%は説明できない。現在、多型情報をいかに有効にワルファリン量の予測に用いるかについて臨床研究がわれわ

れを含めて世界各国で進められているところであり、近い将来、遺伝情報と背景因子をどのようにワルファリン量に用いればよいかを提示されることを期待している。

● アスピリン抵抗性

心血管系疾患の2次予防として低用量アスピリンが抗血小板薬として用いられている。しかし、アスピリン服薬にもかかわらず、血小板機能の抑制が十分でない患者群にイベントを高率に再発するとの報告が増加している。われわれは、このアスピリン抵抗性の遺伝的素因の寄与などを明らかにし、アスピリン抵抗性の検査方法を開発する研究を、全国23施設の協力のもとに前向き共同研究(The Study on Profile and Genetic Factors of Aspirin Resistance, ProGEAR Study)を進めている。この研究は脳梗塞、一過性脳虚血発作(transient ischemic attack; TIA)および急性冠症候群の2次予防としてアスピリンの投与を受けている患者を登録し、3種類の血小板機能検査と2種類のシクロオキシゲナーゼの機能検査を行い、2年間イベント発症を追跡する研究である。遺伝的背景も同時に検討する。本邦でのアスピリン抵抗性の実態解明につながるものと考えている。

本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金および独立行政法人医薬基盤研究所保健医療分野における基礎研究推進事業で行った。

文 献

- 1) Miyata T, Kimura R, Kokubo Y, Sakata T : Genetic risk factors for deep vein thrombosis among Japanese : importance of protein S K196E mutation. *Int J Hematol* 2006 ; 83 : 217-223
- 2) Kimura R, Honda S, Kawasaki T, et al : Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese patients. *Blood* 2006 ; 107 : 1737-1738
- 3) Kimura R, Sakata T, Kokubo Y, et al : Plasma protein S activity correlates with protein S genotype but is not sensitive to identify K196E mutant carriers. *J Thromb Haemost* 2006 ; 4 : 2010-2013
- 4) Yin T, Takeshita S, Sato Y, et al : A large deletion of the PROS1 gene in a deep vein thrombosis patient with protein S deficiency. *Thromb Haemost* 2007 ; 98 : 783-789
- 5) Sugiyama S, Hirota H, Kimura R, et al : Haplotype of thrombomodulin gene associated with plasma thrombomodulin level and deep vein thrombosis in the Japanese population. *Thromb Res* 2007 ; 119 : 35-43
- 6) Kimura R, Kokubo Y, Miyashita K, et al : Polymorphisms

in vitamin K-dependent gamma-carboxylation-related genes influence interindividual variability in plasma protein C and protein S activities in the general population. *Int J Hematol* 2006 ; 84 : 387-397

- 7) Yin T, Miyata T : Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1 - rationale and perspectives. *Thromb Res* 2007 ; 120 : 1-10

● 討 論

座 長 : 加藤規弘

(国立国際医療センター研究所遺伝子診断治療開発研究部)

加藤(座長) 宮田先生に、一般集団での検討から、静脈血栓塞栓症(venous thromboembolism; VTE)の患者集団を用いた研究、展望まで、幅広くご説明いただきました。

一瀬(山形大学) プロテインC(PC)とプロテインS(PS)の変異をあわせ持つVTE症例5人ですが、変異を単独で持つ症例より発症年齢は若いのですか。

宮田(国立循環器病センター) 変異を持つ方は、持たない方よりも明らかに発症年齢は若いのですが、単独で持つ場合とあわせ持つ場合とでは比べていません。

堀内(京都大学) PSの変異に関して、VTEの起こりやすさは数倍増えるということですが、一定観察期間内での発症頻度はどのくらい違うのでしょうか。

宮田 そういうデータはありませんが、私の印象ではさほど高くないと思っています。

坂田(自治医科大学) 比較的高頻度なPS K196Eとプラスミノゲン多型の両方が重なっている症例で、特にVTEを起こしやすいということはありますか。

宮田 まだそこまでデータを集計していないのでわかりませんが、重要なご指摘だと思います。

加藤 一般集団でこれだけ多くの被験者数に対して4因子の活性を測られたデータは、貴重だと思います。個人々でみた場合、測定結果の再現性に影響する要因はありますか。

宮田 測定の技術面に関しては、数%以内の誤差程度とかなり再現性はいいようです。ただしPSは酵素活性がなく、補酵素の活性を測るものなので、ほかのファクターに影響されやすい測定法だと思います。

加藤 測定されたPS、PC、アンチトロンビン、プラスミ

ノーゲンの4因子では、いずれも活性は一峰性分布に見えます。そうすると、多因子制御が想定されますが、レアな変異ではなくコモンな多型が、集団中でのばらつきをどれくらい遺伝的に規定しているか興味を持たれます。それを決めていくことが臨床的意義、またVTE以外の血栓性病態における線溶系のかかわりを考えたときには、重要になってくる気がします。

宮田 まさにそうした視点から、議論が多くなされています。私たちがフィブリノゲンなどで、血中濃度を規定するような多型を認めましたが、せいぜい数%の増減に過ぎず、動脈血栓症のリスクまでにはいたっていない印象を受けています。

平山(日本大学) PSのK196Eの欠損に関して、同じように低い活性であれば、ワイルドタイプでも、変異のヘテロ保有者でもVTEが同じように起こってくるのですか。それとも変異保有者だけによりVTEが起こりやすいのですか。

宮田 正直なところ、答えははまだわかりません。活性の低さは大切だと思いますが、先生へのお答えになるようなデータは持ち合わせていません。

平山 臨床的にアスピリンレジスタンスの人を見つけるのは難しいと思いますが、その定義はどう考えたらよろしいでしょうか。

宮田 文献的には定義は2種類あります。1つは臨床的アスピリンレジスタンスで、2次予防としてアスピリンを飲んでいるにもかかわらず、イベントが起こったということです。

もう1つは、診断学的アスピリンレジスタンスで、

標準的定義はないのですが、血小板凝集能の残存、例えば尿中や血小板中のトロンボキサンB2の量があり抑えられていないという指標で定義している報告もあります。

加藤 宮田先生のご研究のますますのご発展を祈念しています。

●座長のまとめ

血栓症の成因と、抗血栓薬の感受性には遺伝素因がかかわっており、それらを明らかとすることが血栓症リスクの予知・層別化、治療法の至適化、そして患者への薬理ゲノム学的知見の提供に役立つ。発表者の宮田敏行氏は、日本人の血栓性疾患(特に深部静脈血栓症)の治療における遺伝情報の活用を目指して、大規模な一般集団での追跡調査研究(吹田研究)と患者一対照群での研究成果を報告した。特に、血栓形成の重要な因子であるプロテインSの活性がその遺伝子変異K196E保有の有無によって大きく影響を受けることを3,500人以上の一般集団のデータで示し、さらに集団中での頻度自体は0.9%と高くないものの、同変異が日本人における深部静脈血栓症のリスクを有意に高めることを患者一対照研究で示した。加えて、血栓症治療の主役であるワルファリンに関しても、遺伝子多型情報に基づく服薬必要量の推定法(ファーマコゲノミクスに基づく処方)の至適化)が人種間で異なる可能性を報告した。本発表は、日本人における血栓症の遺伝子解析研究とそれに基づく独自のエビデンスの構築の必要性を示唆するものといえよう。

抗血栓薬の抵抗性と遺伝子

宮田茂樹¹、宮田敏行²、嘉田晃子³、山本晴子⁴、長束一行⁵MIYATA Shigeki, MIYATA Toshiyuki, KADA Akiko, YAMAMOTO Haruko, NAGATSUKA Kazuyuki
国立循環器病センター ¹輸血管理室, ²研究所病因部, ³臨床研究センター, ⁴臨床研究開発部, ⁵内科脳血管部門

ワルファリンの必要投与量に、その標的酵素であるビタミン K エポキシド還元酵素や代謝酵素の遺伝子多型が関与していることが指摘されている。また、抗血小板薬が投与されているが、それらの血小板機能抑制効果が低い（抵抗性）患者群の存在が指摘され、抵抗性を示す患者群は、抗血小板薬感受性を示す患者群と比較して、心血管イベントの発生頻度が増加するとの報告が相ついでいる。一因として、標的蛋白や代謝酵素の遺伝子多型の関与も指摘されている。今後、患者個々に適した薬剤や、投与量を決定しようとする試み、すなわち個別化医療に結びつく可能性がある。

Key Words

抗血栓薬、ワルファリン投与量、アスピリン抵抗性、クロピドグレル抵抗性、遺伝子多型

はじめに

不安定粥腫の破綻を契機として形成される動脈血栓症を、アテローム血栓症としてとらえ、脳梗塞や心筋梗塞などを包括した概念として検討することが提唱されている。生活水準の向上による高齢化や生活習慣病の蔓延により、アテローム血栓症の克服が、ますます重要なテーマとなっている。実際、世界保健機構（WHO）の報告では、アテローム血栓症は世界の死因の約 3 割を占める人類最大の疾患となっている。アテローム血栓症に対する最も基本的な薬物療法が、抗血小板療法である。また、高齢化に伴う心房細動などにより血流が鬱滞し、それに内皮機能障害を伴うことによって発症する心原性脳梗塞の予防、また、弁置換術後患者、とくに機械弁を用い

た場合には、抗凝固療法は不可欠となる。しかしながらこれら薬物による抗血栓療法は、出血など重篤な副作用を引き起こす可能性があり、最大限に効果的であつ副作用を抑制できる治療方法の選択が、重要課題となっている。

そのために、これら抗血栓薬について、患者個々に適した薬剤や、その投与量を決定しようとする試み、逆に、患者に適さない薬剤や投与量の抽出（いわゆる抵抗性の定義）をおこなおうとする試みがなされており、今後、テーラーメイド（個別化）医療に結びつく可能性がある。

本稿では、現時点で最も代表的な抗凝固薬であるワルファリン、抗血小板薬であるアスピリンならびにクロピドグレルについて、遺伝子多型の情報も含めた個別化医療に向けた検討について、その概要を述べる。

表① 日本人のアレル頻度を用いた VKORC1/CYP2C9 遺伝型の推定 (国循でタイピングした頻度をもとに計算した)

ワルファリン	CYP2C9	ワルファリン	多い	少ない
		VKORC1 genotype frequency	Non-A/Non-A	Non-A/A A/A
			0.008	0.164
多い	*1/*1	0.936	0.008	0.154
	*1/*3	0.063	0.001	0.010
少ない	*3/*3	0.001	0.000	0.000

日本人の 78%は VKORC1 A と CYP2C9 野生型をもつ

日本人の 5%は VKORC1 A と CYP2C9 *1/*3をもつ

日本人の 15%は VKORC1 ヘテロと CYP2C9 野生型をもつ

1 ワルファリン投与量の個人差にかかわる遺伝子多型

近年、ファーマコゲノミクスが注目され、個別化医療という言葉も現実味を帯びてきている。個人に適した治療を目指した研究が進められ、とくに遺伝子型にもとづいた薬物療法の選択や投薬量の調整がおこなわれようとしている。このファーマコゲノミクスの最先端をいくのがワルファリンと遺伝子型の研究である。

ワルファリン投与患者では、その効果を PT-INR (Prothrombin Time-International Normalized Ratio: プロトロンビン時間-国際標準化比) などでモニタリングしながら投与量を調節し、治療をおこなっている。しかしながら、その投与量は、各個人によってかなりのばらつきがある。ワルファリンの代謝酵素である CYP2C9 の遺伝子多型がワルファリン反応性の個人差を説明するものとして以前から報告されていた。しかし、白人より少量のワルファリンでコントロールできる傾向にある日本人は、CYP2C9 の活性を下げる多型の頻度が白人より少ないことから、CYP2C9 だけではワルファリンの反応性がうまく説明できなかった。

2004 年に、二つのグループがワルファリンの標的酵素であるビタミン K エポキシド還元酵素 (vitamin K epoxide reductase complex subunit 1: VKORC1) をクローニングした。多型解析から、本酵素の多型がきわめて強くワルファリン必要量と関連することが明らかとなった。多くの研究から、ワルファリンの個人差の約 30%が

VKORC1 多型、約 10%が CYP2C9 多型、約 15%が年齢、性別、併用薬などで説明される。しかし、なお残りの 45%程度は、これらの因子では説明できていない¹⁾。

日本人における抗凝固作用は白人にくらべ少量のワルファリンで維持される傾向にある。この一因として、白人の VKORC1 遺伝子では、酵素活性の高いアレルの頻度が日本人にくらべて高いので、VKORC1 蛋白質が多く発現し、その活性を阻害するためには、多くのワルファリンが必要であると考えられる。表①に日本人の VKORC1 と CYP2C9 の遺伝子多型頻度を示した。ワルファリン量は両遺伝子の多型の組み合わせで影響を受けるが、日本人の約 78%は同一の遺伝子型 (VKORC1 A/A と CYP2C9 *1/*1) を保有している。このことより、日本人のワルファリン維持量の個人差は比較的少ないと推定される。しかし、頻度は低い (約 1%) ながらも、大量のワルファリンを必要とする日本人 (VKORC1 Non-A/Non-A と CYP2C9 *1/*1) もいる (表①)。反対に、きわめてまれであるが、VKORC1 A/A と CYP2C9 *3/*3 の保有者は、少ないワルファリン量で維持できると考えられる。こういった患者では、過剰投与により出血が起こらないように十分な注意が必要であると思われる²⁾。

206 名のワルファリン導入時において、ファーマコゲノミクス (PG) を用いて遺伝子情報により投与量を決定する方法と従来法を比較検討し、3 ヶ月間 PT-INR をフォローした報告がある³⁾。これによると、PG 法はワルファリン量の変更が少なく、その変更量も小幅だった。しかし、PT-INR が治療域をはずれるケースは PG 法