

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。私たちも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はい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、答えはいまだわかりません。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てもかかわらず、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の量があま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—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—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、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)が人種間で相当に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		
		VKORC1 genotype frequency	多い Non-A/ Non-A	少ない Non-A/A A/A
		0.936	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

30.7%, 従来法 33.1%で二つの方法に差はみられなかった。ワルファリン導入時に遺伝型の情報を有効に用いることを目指した論文が発表された。297名のワルファリン導入時のPT-INRを調べ、PT-INRがはじめて治療域に入るまでの日数を遺伝型に分けて調べたところ、VKORC1多型がこの日数に大きく影響を与え、CYP2C9多型は影響しなかった⁴⁾。治療域に入るまでの平均日数は、Non-A/Non-A型15日、Non-A/A型11日、A/A型7日であり、A/A型の患者は有意に治療域への移行が早かった。日本人にはNon-A/Non-A型は1%しかみられず、日本人の80%はA/A型であるので、日本人は治療域への移行が容易である患者が多いことになる。ワルファリン初回導入時のワルファリン量を推定するアルゴリズムが公開されており (<http://www.warfarindosing.org>)、また投与3日後に投与量を補正するアルゴリズムも発表されている⁵⁾。

今後、ワルファリンの個人の反応性にかかわる遺伝子型を、臨床的に有効に応用する試みが増加してくるものと思われる。われわれも、「ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討：The Study on the Contribution of Genetic Factors or Dietary Vitamin K Intake to Individual Warfarin Dosage (Godward Study)」を開始し、わが国におけるワルファリンの個別化医療実施可能性について、検討をおこなっている。

2 | アスピリン抵抗性 (aspirin-resistance)

アスピリンは、心筋梗塞や脳梗塞などのアテローム血栓症の予防薬として、最も多用されている抗血小板薬である。血栓塞栓症のハイリスク患者をランダムに割り付けた試験のメタアナリシスでは、アスピリン投与群(29,652名)の2年間の追跡期間中のイベント(心筋梗塞、脳梗塞、致死性血管傷害)発生率は12.9%であり、非投与群(29,743名)では16.0%であったと報告されている⁶⁾。したがって、この差である3.1%がアスピリンの二次イベントの発症抑制効果と考えられる。このように、大規模なメタアナリシスにより、その有効性が示されているものの、この結果から、アスピリンを服薬しても、ハイリスク患者の8人に1人(12.9%)は2年間でイベントを再発していることとなる。発症の原因としていくつか

表② 検査学的アスピリン抵抗性の頻度 (42の研究のメタ解析)
(Hovens MM *et al* 2007⁷⁾より引用)

	頻度	
	補正前 % (95% CI)	補正後* % (95% CI)
全体	23.8 (19.5~28.0)	27.1 (21.5~32.6)
測定法		
PFA-100	28.1 (22.2~33.9)	29.0 (23.1~34.8)
RPFA	18.9 (12.1~25.8)	26.2 (18.6~33.9)
LTA	15.4 (7.8~23.0)	21.3 (15.1~27.5)
Rest	35.0 (6.0~64.0)	31.8 (21.6~42.0)
対象疾患		
CAD	22.4 (17.5~27.4)	22.9 (17.0~28.7)
Stroke	26.0 (16.3~35.7)	32.1 (22.4~41.8)
Rest	27.3 (9.5~45.1)	26.3 (16.5~36.0)
用量		
≤100 mg	27.1 (18.7~35.6)	35.6 (28.1~43.2)
101~299 mg	29.6 (21.8~37.5)	28.2 (20.9~35.6)
≥300 mg	21.7 (11.8~31.7)	18.6 (11.3~26.0)
Unknown	19.8 (10.7~28.9)	25.8 (16.2~35.4)

アスピリンレジスタンスの測定に使用された測定法、対象疾患、用量に分けてアスピリンレジスタンスの頻度を求めた。PFA-100とRPFAは、測定に用いた機種(本文参照)。LTA:血小板凝集能の濁度法。95% CI:95%信頼区間

*測定法、対象疾患、用量で補正した

の要因が考えられるが、その一因として、アスピリンに代表される抗血小板薬はワルファリンとは異なり、モニタリングをおこなわず、一定量で投与されることが多いため、アスピリンの効果に個人差が認められることが指摘されている。これらアスピリンの効果を血小板凝集能やトロンボキサン代謝産物量などを用いて評価し、アスピリンを服薬しているにもかかわらず、血小板機能抑制効果が弱い患者群をアスピリン抵抗性 (aspirin-resistance) と定義し、その頻度や意義について検討した報告が増加している。実際、さまざまな *in vitro* もしくは *ex vivo* 測定系を用いて評価しアスピリン抵抗性を定義した、いわゆる検査学的アスピリン抵抗性の頻度に関して、42の試験を集めておこなわれたメタアナリシスの結果が報告されている⁷⁾。表②にその結果を示した。用いられた血小板機能評価法は、ずり応力下での血小板凝集能を測定するPFA-100、フィブリノーゲンが固相化された使い捨てタイプのカートリッジを用いる rapid platelet functional assay (RPFA)、古典的な血小板凝集法 (LTA) などである。メタアナリシスの結果では、これらの測定法

表③ 検査学的アスピリン抵抗性と心血管系疾患の再発（臨床学的アスピリン抵抗性）との関連，メタアナリシス (Snoep JD *et al* 2007¹⁰⁾より引用)

研究 (対象者数)	心血管疾患イベントを発症した人数				
	検査学的アスピリン抵抗性を示した患者数 (%)	検査学的アスピリン抵抗性を示した患者数* (%)	検査学的アスピリン抵抗性を示さなかった患者数* (%)	オッズ比 (95% CI)	P 値
Grotemeyer <i>et al</i> , 1993 (180)	60 (33)	24/60 (40)	5/114 (4)	14.5 (5.2~40.9)	<0.001
Buchanan <i>et al</i> , 2000 (289)	158 (55)	15/158 (10)	9/131 (7)	1.4 (0.6~3.4)	0.42
Andersen <i>et al</i> , 2002 (71)	25 (35)	9/25 (36)	11/46 (24)	1.8 (0.6~5.2)	0.28
Eikelboom <i>et al</i> , 2002 (448 cases, 488 controls)	NR	NR	NR	1.8 (1.2~2.9)	0.01
Grundmann <i>et al</i> , 2003 (35 cases, 18 controls)	12 (23)	12/35 (34)	0/18 (0)	6.8 (1.8~26.2)	0.004
Gum <i>et al</i> , 2003 (326)	17 (5)	4/17 (24)	30/309 (10)	2.9 (0.9~9.3)	0.09
Cotter <i>et al</i> , 2004 (73)	21 (29)	6/21 (29)	3/52 (6)	6.5 (1.5~29.3)	0.01
Cheng <i>et al</i> , 2005 (422)	113 (27)	NR	NR	2.9 (1.5~5.7)	0.002
Pamukcu <i>et al</i> , 2006 (105)	20 (19)	9/20 (45)	10/85 (12)	6.1 (2.0~18.5)	<0.001
Stejskal <i>et al</i> , 2006 (103)	57 (55)	50/57 (88)	21/46 (46)	8.5 (3.2~22.7)	<0.001
Mueller <i>et al</i> , 1997 (100)	65 (65)	8/65 (12)	0/35 (0)	10.5 (0.6~187.5)	0.048
Ziegler <i>et al</i> , 2002 (52)	5 (10)	0/5 (0)	13/47 (28)	0.2 (0.0~4.5)	0.31
Yilmaz <i>et al</i> , 2005 (14 cases, 14 controls)	8 (29)	7/14 (50)	1/14 (7)	13.0 (1.3~128.1)	0.03
Poston <i>et al</i> , 2006 (225)	22 (10)	4/22 (18)	12/203 (6) ^a	3.5 (1.0~12.1)	0.06
Chen <i>et al</i> , 2004 (151)	29 (19)	15/29 (52)	30/122 (25)	3.3 (1.4~7.6)	0.004
Lev <i>et al</i> , 2006 (150)	19 (13)	7/18 (39)	23/126 (18)	2.9 (1.0~8.1)	0.045

* 分子：心血管系疾患イベント発症者数，分母：対象患者数

で求めた検査学的アスピリン抵抗性の頻度は 24% (95%信頼区間：20~28%) であり，測定方法，対象疾患，アスピリンの用量で補正した頻度は 27% (95%信頼区間：22~33%) であった。また，補正後では，100 mg 以下のアスピリン投与でのアスピリン抵抗性の頻度は 36%，300 mg 以上の投与では 19% であった。測定法でもアスピリン抵抗性の頻度に大きな違いがみられており，アラキドン酸惹起血小板凝集能ではその頻度は 6% であったものの，PFA-100 や RPFA を用いた場合は，それぞれ 28% および 19% であったと報告されている。

これらの検査学的アスピリン抵抗性が，実際どのような臨床的意義をもつかについても検討がなされている。アスピリンを服薬しているにもかかわらず血栓塞栓症を発症した患者群を臨床学的アスピリン抵抗性と定義し，上述した検査学的アスピリン抵抗性が，臨床学的アスピリン抵抗性のリスク因子であるとの報告³⁾⁹⁾がなされている。

表③に，2007 年に発表された検査学的アスピリン抵抗性と心血管系疾患の再発（臨床学的アスピリン抵抗性）との関連を検討したメタアナリシスの結果を示す¹⁰⁾。この解析では 16 の試験のデータを用いている。これらの結果をまとめると，そのオッズ比は 3.8 (95%信頼区間：2.3~6.1) であり，アスピリン服薬患者において，血小板の機能が効果的に抑制されていない患者では，効果的に抑制されている患者にくらべ，心血管系疾患の再発率が高いことが示唆される。2008 年にも同様のメタアナリシスの結果が報告¹¹⁾されている。心筋梗塞，急性冠症候群，脳梗塞，経皮的冠動脈形成術 (percutaneous coronary intervention: PCI)，冠動脈バイパス術，血管疾患に対して二次予防としてアスピリンを投与された患者に対するアスピリン抵抗性を検討した 20 試験に対するメタアナリシスであり，アスピリン投与量は 75 mg/日から 325 mg/日であった。用いられた血小板機能検査でアスピリ

表④ アスピリン抵抗性のメカニズム

(De Gaetano G *et al* : Aspirin resistance : a revival of platelet aggregation tests? *J Thromb Haemost* 1 : 2048-2050, 2003より引用)

1. アスピリンのバイオアベイラビリティ
 - 服薬不全,
 - アスピリン投与量の不足,
 - salicylate の蓄積によるアスピリンの COX-1 結合部位への結合の妨害
 - 非ステロイド性抗炎症薬の同時服用によるアスピリンの効果の妨害
 - プロトンポンプ阻害薬によるアスピリンのバイオアベイラビリティの減少
2. 血小板機能
 - 血小板の代謝によるアスピリンにさらされていない新しい血小板の血中への出現
 - 新しく形成された血小板中の COX-2 の発現量の違い
 - ADP とコラーゲンへの血小板感受性の増強
3. 遺伝子多型
 - 血小板コラーゲン受容体の遺伝子多型
 - COX-1, COX-2, TXA₂合成酵素, アラキドン酸代謝酵素の遺伝子多型
 - 血小板フィブリノーゲン受容体 GP IIb/IIIa 遺伝子多型
 1. 低用量アスピリンによる FXIII 活性化の阻害の差異につながる FXIII Val34Leu 遺伝子多型
4. 他の血球細胞や細胞由来産物と血小板の相互作用
 - 赤血球による血小板活性化の不十分な阻害
 - アスピリン処理された血小板と血管細胞の間におこるアラキドン酸代謝の細胞間の移動
 - 単球-マクロファージ由来 TxA₂
 - 血小板 TxA₂の制御として COX-1/COX-2 で生成する PGI₂ もしくは血管の e-PA の放出
5. 他の因子
 - 過度の運動や心理的ストレスによるノルエピネフリン量の増加
 - 喫煙
 - 酸化ストレスとアラキドン酸非酵素的な過酸化によって生成する活性をもつ 8-Iso-PGF_{2α} の生成
 - アスピリンとアセチルコリンによって生じる一酸化窒素 (NO) の抗血小板作用と血管拡張作用の相互作用

ン抵抗性と分類された患者が全体の 28%で、そのなかの 39%で心血管イベントが発生した。一方、アスピリンに対して感受性を示した患者では、心血管イベントの発生率は 16%であったと報告され、アスピリン抵抗性群における心血管イベント発生のオッズ比は、3.85 (95%信頼区間：3.08~4.80) であった。

アスピリンは、プロスタグランジンの生合成を阻害することにより薬理学的作用を発揮する。プロスタグランジンの生合成は、ホスホリパーゼ A が膜リン脂質からアラキドン酸を生成することではじまる。このアラキドン酸はプロスタグランジン (PG) H 合成酵素により PGG₂ に変換され、さらに同酵素の過酸化酵素作用により PGH₂となる。この PGH 合成酵素はシクロオキシゲナーゼ (COX) ともよばれ、COX-1 と COX-2 が知られる。

アスピリンは、COX-1 の Ser529 をアセチル化し活性中心のコンホメーション変化を起こし、基質であるアラキドン酸への結合が阻害され、その結果 PGH₂産生を抑制する。アスピリンの COX-1 の阻害効果は COX-2 の阻害より約 170 倍強い。このように、アスピリンはトロンボキサン依存性の血小板活性化を抑制する。

アスピリン抵抗性の原因として、血小板活性化経路は、トロンボキサン依存経路だけでなく、カテコールアミン、トロンピン、adenosine diphosphate (ADP) といった刺激による血小板活性化経路など、さまざまにその活性化が制御されているため、トロンボキサン依存性の血小板活性化を抑制しても、血小板活性化経路の一部を抑制しているに過ぎないことが考えられる。それ以外にも、現時点で、さまざまなアスピリン抵抗性のメカニズムが指

摘されている (表④)。

それらのなかで、健康人や心血管系疾患患者を対象にして、検査学的アスピリン抵抗性と遺伝子多型、とくに COX-1 遺伝子多型との関連についても報告されている^{12)~14)}。また、ADP 受容体である P2Y₁₂ の遺伝子多型とアスピリン服用後の残存アラキドン酸惹起血小板凝集能との関連について指摘されている¹⁵⁾。

わが国においても、アスピリン抵抗性に関する優れた研究が発表されている¹⁶⁾。これによると、アスピリン服薬患者のコラーゲン惹起血小板凝集能を四分位 (quartile) に分けると、凝集能が最も残存している群は、他の群より有意にイベント発症が高かった (ハザード比=8) と報告されている。われわれも、脳梗塞/一過性脳虚血発作ならびに急性冠症候群に対する二次予防としてアスピリン投与を受けている患者群を対象に、わが国におけるアスピリン抵抗性の頻度、その予後ならびに遺伝子背景を明らかにするために、多施設共同前向き観察研究「アスピリン抵抗性の実態ならびにその遺伝子背景に関する研究 (The Study on Profile and Genetic factors of Aspirin Resistance: ProGEAR study) を実施し、患者登録を完了している。今後、登録後 2 年間の臨床イベントを追跡し、わが国においてアスピリン抵抗性が臨床的意義をもつのかどうか、もつとしたら、どのような測定系 (遺伝子背景を含めて) が臨床的アスピリン抵抗性を最適に反映できるのかどうか、検討をおこなう予定である。

アスピリン抵抗性に対する対応策として、検査学的アスピリン抵抗性を示した患者に対して、他の抗血小板薬に変更することにより予後が改善する可能性がある¹⁷⁾。実際このようなコンセプトにもとづいた介入試験¹⁸⁾が実施されており、検査学的アスピリン抵抗性を示す患者に対して、他の抗血小板薬に変更することで患者予後が改善することがこのような介入試験で証明されれば、抗血小板療法の個別化が現実味を帯びてくると思われる。

3 クロピドグレル抵抗性

チエノピリジン (Thienopyridine) 化合物であるクロピドグレルは、ADP 受容体 P2Y₁₂ を特異的に阻害することで、血小板凝集を抑制する。薬物そのものには抗血小板作用はなく、肝臓で代謝され活性化体となってはじめて抗血小板作用を発揮するプロドラッグである。

クロピドグレルについても、その血小板機能抑制効果にかなりの個人差があることが指摘されている¹⁹⁾²⁰⁾。その測定には、古典的な血小板凝集計を用いた ADP 惹起血小板凝集、ずり応力下での血小板凝集能を測定する PFA-100、フィブリノーゲンが固相化された使い捨てタイプのカートリッジを用いる RPEA、さらに特異的にクロピドグレルによる P2Y₁₂ 受容体抑制効果を測定可能な vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) のリン酸化を測定する方法などが用いられている。それら検討の結果が多数報告されており、測定方法によって異なるものの、検査学的クロピドグレル抵抗性、すなわちクロピドグレルを投与されているが、血小板機能が効果的に抑制されていない患者の頻度は 5% から 44% の幅であった¹⁹⁾²⁰⁾。

これら検査学的クロピドグレル抵抗性と心血管系疾患の再発 (臨床的クロピドグレル抵抗性) との関連を検討した研究についても近年、その報告が増加している¹⁹⁾²⁰⁾。待機的 PCI をおこなった 379 症例について、クロピドグレル導入後、70% を超える ADP 惹起血小板凝集が残存している患者群では、70% 以下に抑制されている患者群と比較して、PCI 実施 3 ヶ月後までの心血管イベントが有意 (オッズ比: 4.9, 95% 信頼区間: 1.66~14.96) に多く、心血管イベントに関係している因子に対して調整をおこなった後も、クロピドグレルに対する低反応性は、独立した危険因子であったと報告²¹⁾されている。急性 ST 上昇型心筋梗塞でプライマリ PCI を予定している連続 60 症例について検討 (全員アスピリン投与継続され、クロピドグレルは 3 ヶ月間服薬された) した報告²²⁾がなされている。ADP 凝集の結果で患者群を四分位 (quartile) に分けた (1 群: 103% ± 8%, 2 群: 69% ± 3%, 3 群: 58% ± 7%, 4 群: 33% ± 12%)。6 ヶ月のフォローアップ期間中に 7 名が心血管イベントを発症し、そのうち 6 名は 1 群 (クロピドグレル抵抗性群) に属し、残り 1 名は 2 群に属した。3 群ならびに 4 群には発症者はいなかった ($p=0.007$)。非 ST 上昇型急性冠症候群で PCI をおこなった 292 症例において、クロピドグレル導入後において 70% を超える ADP 惹起血小板凝集が残存していることが、1 ヶ月後までの心血管イベントに対し、唯一独立したリスク因子であったと報告²³⁾されている。さらに、クロピドグレル抵抗性に対し、治療介入することで患者予後に改善がみられるかどうかに関する多施設共

同ランダム化比較試験が報告²⁴⁾されている。PCIを実施する406症例のなかで、クロピドグレル600mgのloading doseで投与後、VASP指数を測定し、50%を超える(すなわちクロピドグレルによるP2Y₁₂受容体抑制効果が弱い)患者162症例を無作為に割り付け、VASP-guided群(78症例)は、VASP指数が50%以下に低下するまで、最大3回24時間ごとにクロピドグレル600mgが追加投与され、その後PCIが実施された。コントロール群(84症例)は、クロピドグレルの追加投与なしにPCIが実施された。その結果、PCI後1ヵ月までのフォローアップ期間に、心血管イベントは有意にVASP-guided群で、コントロール群と比較して少なかった(0% vs 10%, $p=0.007$)。これらの報告は、症例数が少ない検討であり、今後更なるデータの蓄積が望まれる。

現時点で指摘されているクロピドグレル抵抗性のメカニズムを表⑤に示す。これらの原因のなかで、クロピドグレル抵抗性に対する遺伝子多型の関与について検討した結果も報告されている。

健常人にクロピドグレルを服用させ、ADP惹起血小板凝集やVASPのリン酸化といった指標を用いてクロピドグレルの効果を評価し、これに関する個人差を説明する遺伝子多型が、候補遺伝子を対象に探索された。ADP凝集が十分に抑制されない遺伝的背景として、ADP受容体であるP2Y₁₂、P2Y₁、血小板膜受容体GP1a、プロドラッグであるクロピドグレルの活性化体への変換に関与するCytochrome P450であるCYP3A4、CYP3A5、CYP2C19の多型が報告された。これらはいずれも小規模な研究であったので、他の集団を用いて確認する必要がある。そこで、クロピドグレルとアスピリンを併用した1,419名の心筋梗塞患者を対象にADP凝集能とアラキドン酸凝集能を測定し、CYP3A4、CYP2C19、P2Y₁₂の多型を調べた研究がイタリアから報告された²⁵⁾。この三つの遺伝子のなかでCYP2C19の多型のみがADP凝集に強く関連を示した。この多型は、スプライス異常を生じる681G>Aであり、CYP2C19*2として知られている。本変異のAアレル保有者はADP凝集能が高く、その凝集能はアレル数に依存していた。また、この効果は弱いながらアラキドン酸凝集能にも関連を示した。以前の報告で関連がみられたCYP3A4とP2Y₁₂の多型は、本研究ではADP凝集能と関連を示さなかった。フランスの報告では、CYP3A4、CYP3A5、CYP2C19の多型を検討し、

表⑤ クロピドグレル抵抗性のメカニズム (De Miguel A et al 2008²⁶⁾より引用)

1. クロピドグレルのバイオアベイラビリティ
 - 服薬不全、
 - クロピドグレル投与量の不足、
 - 吸収不全
 - Cytochrome P450 3As に対する薬剤相互作用
2. 遺伝子多型
 - P2Y₁₂遺伝子多型
 - Cytochrome P450 3As の遺伝子多型
 - GP1a の遺伝子多型
 - 2. GP1Ib/IIIa の遺伝子多型
3. ADP 放出の増加
4. P2Y₁₂受容体の増加
5. 治療前の血小板活性化の病態
 - 急性冠症候群
 - 糖尿病/インスリン抵抗性
 - 高い body mass index
6. P2Y₁₂に依存しない血小板刺激伝達系の亢進
7. P2Yに依存しない血小板刺激伝達系の亢進
 - トロンピン
 - トロンボキサン A₂
 - コラーゲン
 - エピネフリン
8. 血小板 turn-over の亢進

この研究でもCYP2C19の多型だけが関連を示す結果となった²⁶⁾。この研究では、クロピドグレルとアスピリンの併用療法をおこなっている急性冠症候群患者603名を対象にADP凝集、VASPのリン酸化、血小板表面へのPセレクトインの発現を調べた。CYP2C19*2はこれらいずれの測定値に対しても強い関連を示し、CYP2C19*2変異保有者ではADP惹起血小板凝集能が残存する結果となった。これらの報告を総合すると、クロピドグレル服用者の抗血小板作用のモニターとしてADP惹起血小板凝集を用いてクロピドグレル抵抗性を評価すると、CYP2C19多型がクロピドグレルの効果に関連を示す。クロピドグレルはプロドラッグであり、おもにCYP2C19を通して活性化体へ変換され、活性化体がP2Y₁₂のCys97を修飾し、P2Y₁₂が膜脂質ラフトから離れることによりADP凝集が抑制される²⁷⁾。このように、CYP2C19がクロピドグレルの活性化体への変換反応に大きく関わっている可能性が考えられた。

日本人を対象としたクロピドグレルの効果と遺伝子多型に関する研究はこれまでのところみつからない。CYP2C19の多型頻度に関しては、日本人を対象に詳しく

表⑥ 日本人の CYP2C19 遺伝型のアレル頻度 (国立食品薬品衛生研究所でタイピングした 253 人から得られた頻度)

クロピドグレルへの反応性		よい		悪い	
CYP2C19	CYP2C19	*1/*1	*1/*2	*2/*2	
クロピドグレルへの反応性	genotype frequency	0.5376	0.3912	0.0712	
	*1/*1	0.7596	0.41	0.30	0.05
	*1/*3	0.2239	0.12	0.09	0.02
よい	*3/*3	0.0165	0.01	0.01	0.00
悪い					
CYP2C19*2, *3 は酵素ができないアレル		CYP2C19	*1/*1	*1/*2	*2/*2
白人での頻度			0.71	0.27	0.03

日本人はクロピドグレルを活性化体へ変換する CYP2C19 量が少ないヒトが多い。

調べられており、多くの論文が発表されている。なかでも、国立医薬品食品衛生研究所がミレニアムゲノムプロジェクトの一環としておこなった多型頻度に関する研究は、日本人 253 名を対象とし、ハプロタイプの構築までおこなっており、日本人の CYP2C19 の変異研究の集大成である²⁸⁾。これによると CYP2C19*2 のアレル頻度は 0.267、*3 のアレル頻度は 0.128 である。*2 は先ほども紹介したようにスプライス異常変異であり、*3 は停止コドンとなるナンセンス変異である。ともに、蛋白質に重大な影響を与える。両変異の頻度をもとに計算すると、日本人の約 40% しか CYP2C19 の野生型をもたないことが理解されよう (表⑥)。日本人の約 1 割は、CYP2C19 をまったく発現しない*2 のホモ体もしくは*3 のホモ体である。白人では CYP2C19*2 のアレル頻度は 0.16 であり*3 は存在しない。したがって、日本人は CYP2C19 を欠損する遺伝型を高頻度に保有すると理解されている。

おわりに

ここまで、抗血栓薬の抵抗性について、テーラーメイド (個別化) 医療実施の可能性の観点から述べてきたが、これら薬剤抵抗性に関しては、いまだ臨床的に受け入れられているとはいいがたい²⁰⁾²⁹⁾。その大きな理由として、*in vivo* における血小板機能を鋭敏に反映する *in vitro* もしくは *ex vivo* 血小板機能測定系はいまだ確立されておらず、普遍的に認められた診断上のカットオフ値の設定

もできないため、これら薬剤抵抗性の診断基準が確立できていないことが指摘されている。また、抗血栓薬に限らず、どんな薬剤でもすべての患者に有効であるわけではない。したがって、薬剤抵抗性と定義せずに “treatment failure” (治療不成功) とすべきで、特別な疾患として分類する必要はないとも指摘されている。さらに、薬剤服薬のコンプライアンスを確認する必要があること、また、血栓塞栓症は、血小板機能のみに依存するのではなく、さまざまな要因に依存すること、抗血小板薬は血小板凝集にかかわる刺激伝達系のたった一つの経路を抑えるに過ぎないことなどの理由で、抗血小板薬に過大な期待をもつこと自体が誤りであることも指摘されている。したがって、現時点では血小板機能を測定して、その結果をもって抗血小板療法に介入することを臨床現場でおこなうべきではないことを、強調しておきたい。今後、われわれが実施している研究も含めて、更なる検討が進められ、今後、個別化医療により、さらに有効で安全な抗血栓療法が確立されることを期待したい。

【謝辞】

この論文の成果の一部は、厚生労働科学研究費補助金および (独) 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おこなった。

●文 献●

- 1) Yin T *et al*: Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1—rationale and perspectives. *Thromb*

- Res* 120 : 1-10, 2007
- 2) Fukuda T *et al* : Warfarin dose requirement for patients with both *VKORC1* 3673A/A and *CYP2C9**3/*3 genotypes. *Clin Pharmacol Ther* 80 : 553-554, 2006
 - 3) Anderson JL *et al* : Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation* 116 : 2563-2570, 2007
 - 4) Schwarz UI *et al* : Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N Engl J Med* 358 : 999-1008, 2008
 - 5) Millican EA *et al* : Genetic-based dosing in orthopedic patients beginning warfarin therapy. *Blood* 110 : 1511-1515, 2007
 - 6) Antithrombotic Trialists' Collaboration : Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 324 : 71-86, 2002
 - 7) Hovens MM *et al* : Prevalence of persistent platelet reactivity despite use of aspirin : a systematic review. *Am Heart J* 153 : 175-181, 2007
 - 8) Eikelboom JW *et al* : Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* 105 : 1650-1655, 2002
 - 9) Gum PA *et al* : A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 41 : 961-965, 2003
 - 10) Snoop JD *et al* : Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events : a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 167 : 1593-1599, 2007
 - 11) Krasopoulos G *et al* : Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity : systematic review and meta-analysis. *BMJ* 336 : 195-198, 2008
 - 12) Halushka MK *et al* : Genetic variation in cyclooxygenase 1 : effects on response to aspirin. *Clin Pharmacol Ther* 73 : 122-130, 2003
 - 13) Maree A *et al* : Glycoprotein IIb/IIIa antagonists in acute coronary syndromes : where are we now? *Semin Vasc Med* 3 : 385-390, 2003
 - 14) Lepantalo A *et al* : Polymorphisms of COX-1 and GPVI associate with the antiplatelet effect of aspirin in coronary artery disease patients. *Thromb Haemost* 95 : 253-259, 2006
 - 15) Li Q *et al* : Frequency of genetic polymorphisms of *COX1*, *GP IIIa* and *P2Y1* in a Chinese population and association with attenuated response to aspirin. *Pharmacogenomics* 8 : 577-586, 2007
 - 16) Ohmori T *et al* : Aspirin resistance detected with aggregometry cannot be explained by cyclooxygenase activity : involvement of other signaling pathway(s) in cardiovascular events of aspirin-treated patients. *J Thromb Haemost* 4 : 1271-1278, 2006
 - 17) Cheng X *et al* : Aspirin resistance or variable response or both? *Am J Cardiol* 98 : 11N-17N, 2006
 - 18) Pettersen AA *et al* : Unstable angina, stroke, myocardial infarction and death in aspirin non-responders. A prospective, randomized trial. The ASCET (ASpirin non-responsiveness and Clopidogrel Endpoint Trial) design. *Scand Cardiovasc J* 38 : 353-356, 2004
 - 19) Gurbel PA *et al* : Clopidogrel resistance? *Thromb Res* 120 : 311-321, 2007
 - 20) De Miguel A *et al* : Clinical implications of clopidogrel resistance. *Thromb Haemost* 100 : 196-203, 2008
 - 21) Geisler T *et al* : Low response to clopidogrel is associated with cardiovascular outcome after coronary stent implantation. *Eur Heart J* 27 : 2420-2425, 2006
 - 22) Matetzky S *et al* : Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 109 : 3171-3175, 2004
 - 23) Cuisset T *et al* : Benefit of a 600-mg loading dose of clopidogrel on platelet reactivity and clinical outcomes in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome undergoing coronary stenting. *J Am Coll Cardiol* 48 : 1339-1345, 2006
 - 24) Bonello L *et al* : Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance : a multicenter randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol* 51 : 1404-1411, 2008
 - 25) Giusti B *et al* : Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism, but not CYP3A4 IVS10+12G/A and P2Y12 T744C polymorphisms, is associated with response variability to dual antiplatelet treatment in high-risk vascular patients. *Pharmacogenet Genomics* 17 : 1057-1064, 2007
 - 26) Frere C *et al* : Effect of cytochrome p450 polymorphisms on platelet reactivity after treatment with clopidogrel in acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 101 : 1088-1093, 2008
 - 27) Savi P *et al* : The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y12 receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 : 11069-11074, 2006
 - 28) Fukushima-Uesaka H *et al* : Genetic variations and haplotypes of CYP2C19 in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet* 20 : 300-307, 2005
 - 29) Cattaneo M : Aspirin and clopidogrel-efficacy, safety, and

the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*
24 : 1980-1987, 2004

みやた・しげき

宮田茂樹 - 国立循環器病センター輸血管理室医長

1961年、奈良県生まれ。

奈良県立医科大学小児科入局、同助手。1992年から4年間 The Scripps Research Institute (CA, USA) に留学。2000年から現職。研究テーマは、流動状況下（ずり応力下）血小板血栓形成メカニズム、アスピリンレジスタンス、人工心肺使用手術周術期の血小板機能低下のメカニズム、ヘパリン起因性血小板減少症（HIT）など。

Original Article

Genetic Variations of *CYP2C9* in 724 Japanese Individuals and Their Impact on the Antihypertensive Effects of Losartan

Tong YIN¹, Keiko MAEKAWA², Kei KAMIDE³, Yoshiro SAITO², Hironori HANADA¹, Kotaro MIYASHITA⁴, Yoshihiro KOKUBO⁵, Yasuhisa AKAIWA⁴, Ryoichi OTSUBO⁴, Kazuyuki NAGATSUKA⁴, Toshiho OTSUKI⁴, Takeshi HORIO³, Shin TAKIUCHI³, Yuhei KAWANO³, Kazuo MINEMATSU⁴, Hiroaki NARITOMI⁴, Hitonobu TOMOIKE⁵, Jun-ichi SAWADA², and Toshiyuki MIYATA¹

CYP2C9, a drug-metabolizing enzyme, converts the angiotensin II receptor blocker losartan to its active form, which is responsible for its antihypertensive effect. We resequenced *CYP2C9* in 724 Japanese individuals, including 39 hypertensive patients under treatment with losartan. Of two novel missense mutations identified, the Arg132Gln variant showed a fivefold lower intrinsic clearance toward diclofenac when expressed in a baculovirus-insect cell system, while the Arg335Gln variant had no substantial effect. Several known missense variations were also found, and approximately 7% of the Japanese individuals (53 out of 724) carried one of the deleterious alleles (*CYP2C9**3, *13, *14, *30, and Arg132Gln) as heterozygotes. After 3 months of losartan treatment, systolic blood pressure was not lowered in two patients with *CYP2C9**1/*30, suggesting that they exhibited impaired *in vivo* *CYP2C9* activity. *CYP2C9**30 might be associated with a diminished response to the antihypertensive effects of losartan. (*Hypertens Res* 2008; 31: 1549–1557)

Key Words: *CYP2C9*, single nucleotide polymorphism, hypertension, losartan

Introduction

CYP2C9, a major isoform of the cytochrome P450 superfamily, accounts for approximately 20% of the total cytochrome P450 protein in liver microsomes and is responsible for the

oxidative metabolism of up to 15% of drugs that undergo phase I metabolism (1, 2). About 30 nonsynonymous variations of *CYP2C9* have been identified. Of these, the effects of *CYP2C9**2 (Arg144Cys) and *CYP2C9**3 (Ile359Leu) have been well studied for their reduced metabolic activities towards substrates such as warfarin, tolbutamide, and losar-

From the ¹Research Institute, ²Division of Hypertension and Nephrology, Department of Medicine, ³Cerebrovascular Division, Department of Medicine, and ⁴Department of Preventive Cardiology, National Cardiovascular Center, Suita, Japan; and ⁵Division of Functional Biochemistry and Genomics, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan.

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, Labour and Welfare of Japan, and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan. T.Y. is a recipient of Takeda Foundation, from the Institute of Geriatric Cardiology, General Hospital of the People's Liberation Army, Beijing, China.

Address for Reprints: Kei Kamide, M.D., Ph.D., Division of Hypertension and Nephrology, National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishirodai, Suita 565-8565, Japan. E-mail: kamide@hsp.ncvc.go.jp

Received December 27, 2007; Accepted in revised form April 28, 2008.

tan, both *in vitro* and *in vivo* (3, 4). The allelic frequencies for these deleterious variations differ considerably among different ethnic populations. In Caucasian populations, the frequencies of *CYP2C9*2* and *CYP2C9*3* were 8–14% and 4–16%, respectively (5). In contrast, *CYP2C9*2* was not present in Asian populations, and *CYP2C9*3* was present in only 1–4% of Asian populations. Therefore, interethnic variability reported in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs, metabolized mainly by *CYP2C9*, could not be fully explained by the common variants alone. Recently, a number of novel nonsynonymous variations of *CYP2C9* have been identified in different Asian populations (6–11). Functional analysis of these variations *in vitro* indicated the existence in Asians of new deleterious alleles of *CYP2C9* that might have clinical relevance.

Losartan, the first selective angiotensin II receptor antagonist, was reported to significantly reduce the risk of cardiovascular endpoint outcomes compared with atenolol in high-risk hypertensive patients with left ventricular hypertrophy (12). Large interindividual variations in the efficacy and toxicity of losartan have been reported, and it has been suggested that they are genetically determined. A relationship was suggested between the polymorphism in the receptor gene, *AGTR1*, and its humoral and renal hemodynamic responses (13). However, losartan is oxidized primarily by *CYP2C9* to an active carboxylic acid metabolite, E-3174, which has higher potency and a longer half-life than losartan and is therefore responsible for most of the antihypertensive effects (14, 15). The effects of *CYP2C9*2* and *CYP2C9*3* on losartan oxidation have been extensively studied both *in vitro* and *in vivo*, consistently demonstrating the functional defect of the *CYP2C9*3* allele in decreasing the oxidation of losartan (16–20). However, the clinical relevance of genotypes of *CYP2C9* to the variable blood pressure-lowering responses to losartan in hypertensive patients has not been fully clarified. Furthermore, it remains unknown whether the other deleterious *CYP2C9* alleles in Asians (6–11) might lead to the phenotypes of impaired therapeutic responses to this drug.

We studied several genes responsible for essential hypertension and interindividual differences in responses to warfarin and antihypertensive drugs (21, 22). To identify the functional mutations, we resequenced some candidate genes including *WNK4*, *SCNN1B*, *SCNN1G*, *NR3C2*, and *RGS2* for hypertension (23–26) and *VKORC1*, *GGCX*, and *CALU* for warfarin (22, 27). In the course of this resequencing, we noticed that the deleterious mutations are present more frequently than we expected, and the rare mutations with deleterious function would increase the total phenotype change.

In the present study, we resequenced the *CYP2C9* in 724 Japanese individuals. Two novel missense mutations were functionally analyzed in the baculovirus/insect cell expression system with diclofenac as a substrate. Furthermore, we assessed the blood pressure-lowering responses to losartan in hypertensive patients with the deleterious mutations in *CYP2C9*.

Methods

Subjects

Seven hundred twenty-four Japanese subjects in this study were enrolled for genetic sequencing of *CYP2C9*. The study subjects consisted of 312 patients with stroke and 412 patients with hypertension. Stroke patients (87 females and 225 males; average age: 65.36 ± 11.87 years; body mass index: 23.28 ± 3.01 kg/m²) were admitted to the Cerebrovascular Division of the National Cardiovascular Center (22, 28). They had all experienced an ischemic stroke within 7 d prior to admission. Hypertensive patients (196 females and 216 males; average age: 64.83 ± 10.42 years; body mass index: 24.55 ± 3.69 kg/m²) were recruited from the outpatients clinic in the Division of Hypertension and Nephrology at the National Cardiovascular Center (23–26, 29). Hypertension was defined as systolic blood pressure >140 mmHg, diastolic blood pressure >90 mmHg, or the current use of antihypertensive medication. Ninety-three percent of the study subjects (382 subjects) were diagnosed with essential hypertension, and the rest had secondary hypertension, including renal hypertension (10 subjects), renovascular hypertension (9 subjects), primary aldosteronism (7 subjects), and others (4 subjects).

Sixty-nine essential hypertensive patients (30 females and 39 males; average age: 64.36 ± 9.34 years; body mass index: 22.65 ± 7.84 kg/m²) were taking one of three angiotensin II receptor blockers (losartan, candesartan, and valsartan) for treatment of hypertension. Among them, 39 patients had been receiving 50 mg/d of losartan for more than 3 months. We evaluated the patients' average resting blood pressure measured on three consecutive outpatient clinic visits, before and after losartan treatment.

The study was approved by the Ethics Review Committee of the National Cardiovascular Center, and only those subjects who provided written informed consent for genetic analyses were included in the study.

Resequencing of *CYP2C9* in 724 Japanese Subjects

Whole blood was collected from each participant, and genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocyte. From each subject, 687 base pairs of the promoter region, all exons and intron-exon junctions, and the 3'-UTR of *CYP2C9* were amplified and sequenced directly on both strands using an ABI 3730 Automated Sequence Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA), as described previously (27, 30). Primers were designed to be specific to *CYP2C9*, with particular attention being paid to avoid amplification of sequences from homologous genes (*cf.* Online Table 1). The obtained sequences were examined for the presence of variations using Namihei software (Mitsui Knowl-

edge Industry Co., Ltd., Japan) and Sequencher software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA), followed by visual inspection. Novel nonsynonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) were confirmed by sequencing of PCR products generated from new genomic DNA amplifications. The genomic and cDNA sequences of *CYP2C9*, obtained from GenBank (NC_000010.8 and NM_000771.2, respectively), were used as reference sequences. The A of ATG of the initiator Met codon was denoted as nucleotide +1, and the initial Met residue was denoted as amino acid +1. The identified missense mutations were mapped in the human *CYP2C9* crystal structure bound with warfarin (31) by the PyMOL v0.99 molecular visualization system (DeLano Scientific LLC, San Carlos, USA).

Cloning, Site-Directed Mutagenesis and Vector Constructions

A full-length human NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase (OR) cDNA was isolated by PCR from human adult normal liver Quick-Clone cDNA (Clontech, Palo Alto, USA) with the forward primer, 5'-CACCAGTTTCATGATCAA CATGGG-3', and the reverse primer, 5'-GCCCTAGCTCC ACACGTCC-3'. The underlined sequence was introduced to the directional TOPO cloning system. The PCR products were cloned directly into the pcDNA3.1D/TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's instructions (pcDNA3.1D/OR). Two single *CYP2C9* variations, 3573 G>A (Arg132Gln) and 42543 G>A (Arg335Gln), were introduced into the wild-type plasmid (pcDNA3.1D/CYP2C9/Wild-type) as a template using a QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, USA). The primer sequences used for the construction of variant plasmids were as follows: 5'-CTCCCTCATGACGCTGCA GAATTTTGGGATGG-3' (sense) and 5'-CCATCCCAA AATTCIGCAGCGTCATGAGGGAG-3' (antisense) for pcDNA3.1D/CYP2C9/ Arg132Gln. 5'-TGATTGGCAGAA ACCAGAGCCCCTGCATGCA-3' (sense) and 5'-TGCATG CAGGGGCTCTGGTTTCTGCCAATCA-3' (antisense) for pcDNA3.1D/CYP2C9/ Arg335Gln.

The position of the exchanged nucleotide is underlined and in boldface. To ensure that no errors had been introduced during amplification, the entire cDNA regions were confirmed by sequencing the plasmid construct. Both OR and *CYP2C9* wild-type or variant cDNAs were subcloned into the baculovirus transfer vector, pFastBac Dual (Invitrogen), 3' of the P10 promoter, and the polyhedron promoter (polh), respectively (pFastBac Dual/P10.OR/polh.CYP2C9). Recombinant baculoviruses carrying both *CYP2C9* and OR cDNAs were produced according to the Bac-to-Bac Baculovirus Expression system protocol of Invitrogen.

Expression of Recombinant Proteins in Insect Cells and Preparation of Microsomal Fractions

For the expression of recombinant proteins using the baculovirus expression systems, adherent *Spodoptera frugiperda* (*Sf21*) insect cells (3.7×10^8 cells per 225 cm² flask) were infected with recombinant baculoviruses at a multiplicity of 4 in supplemented form of Grace's Insect Medium (Invitrogen) with 10% fetal bovine serum and 10 µg/mL gentamycin. At 16–24 h post-infection, the culture media were supplemented with 0.2 mmol/L ferric citrate and 0.3 mmol/L δ-aminolevulinic acid, and the cells were harvested at 72-h post-infection. Microsomal fractions from *Sf21* cells were prepared as described previously (11).

Characterization of Protein Expression

The cytochrome P450 content in insect cell microsomes was measured by reduced CO-spectrum using the method of Omura and Sato (32). NADPH-cytochrome P450 OR activity in insect cell microsomes was measured using cytochrome C as a substrate as described by Phillips and Langdon (33). The molar amount of OR was calculated based on an assumed specific activity of 3.0 µmol cytochrome C reduced/min/nmol purified human OR (34). Western blotting of *CYP2C9* and OR was performed using 2 µg of microsomal protein from insect cells as described previously (11). For immunostaining of OR, goat anti-rat OR antiserum (diluted 1:1,000; Daiichi Pure Chemical Co., Tokyo, Japan) and horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-goat IgG (diluted 1:20,000; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA) were used as the first and second antibodies, respectively.

Assay for CYP2C9-Mediated Enzymatic Activity

CYP2C9 activities for the wild-type and two variants were assessed by diclofenac 4'-hydroxylation as described previously (11) except that the incubation mixture contained diclofenac (1.0–100 µmol/L), 5 pmol of P450 from insect microsomes, 10 pmol of purified cytochrome b5 (Oxford Biomedical Research, Oxford, UK), and an NADPH regenerating system (1.3 mmol/L NADP⁺, 3.3 mmol/L glucose 6-phosphate, 3.3 mmol/L MgCl₂ and 0.4 unit/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase), and the reactions were allowed to proceed for 10 min. The initial mobile phase of high-performance liquid chromatography consisted of 70% of a 30% acetonitrile solution containing 1 mmol/L perchloric acid (A) and 30% of methanol (B) and was delivered for 5 min, after which a 20 min linear gradient from 30% to 100% of B was formed at a flow rate of 1 mL/min. Under these conditions, the retention times of 4'-hydroxydiclofenac, 5-hydroxydiclofenac, and diclofenac were 14.2, 14.7, and 19.6 min, respectively.

Table 1. Genetic Variants in CYP2C9 Identified in 724 Japanese Individuals

SNP position ^a	SNP position ^b	Location	Nomenclature ^c	Amino acid change	Number of subjects			Minor allele frequency	Flanking sequences (5' to 3')	rs ID No.	Reference
					Wild-type	Heterozygote	Homozygote				
-251 C>A ^d	-251	promoter			723	1	0	0.0007	ttattaccaata[C>A]ctaggetccaac		
-162 A>G	-162	promoter			723	1	0	0.0007	cattttatttt[A>G]tctgtatcagtg	rs9332104	(27)
251 T>C	IVS1 + 83	Intron 1			716	7	1	0.0062	cctagaggtaca[T>C]gttacaagaggt		
3136 T>C ^d	IVS1 - 40	Intron 1			722	2	0	0.0014	aaatggacaaa[T>C]agtaattcgtt		(11)
3154 T>C	IVS1 - 22	Intron 1			723	1	0	0.0007	ctt-gtttgcg[T>C]tactctgtcta	rs17847036	(6)
3235 G>A	228	Exon 2		Val76	706	18	0	0.0124	accctatgtggt[G>A]ctgcatggat		
3276 T>C	269	Exon 2	<i>CYP2C9*13</i>	Leu90Pro	722	2	0	0.0014	ccctgattgatic[T>C]tggagaggatt	rs9332120	
3411 T>C	IVS2 + 73	Intron 2			712	11	1	0.0090	gacttacagagc[T>C]cctcggcagag		
3451 G>A ^d	IVS2 - 59	Intron 2			723	1	0	0.0007	tggctcccagc[G>A]tcagctcctct		
3455 G>C ^d	IVS2 - 55	Intron 2			723	1	0	0.0007	tgcccagtgca[G>C]cttctcttctt		
3488 G>T ^d	IVS2 - 22	Intron 2			723	1	0	0.0007	atctccctcta[G>T]tttcgtttctct		(11)
3514 T>C	336	Exon 3		Ile112	721	3	0	0.0021	tgttaggaat[T>C]gtttcagca		
3544 G>A ^d	366	Exon 3		Glu122	723	1	0	0.0007	gaaatggaaggat[G>A]atccggcgttc		(7)
3552 G>A	374	Exon 3	<i>CYP2C9*14</i>	Arg125His	723	1	0	0.0007	aggagatccggc[G>A]ttctccctcat		
3573 G>A ^d	395	Exon 3		Arg132Gln	723	1	0	0.0007	tcatgacgtgc[G>A]gaaatttgggat		(11)
3627 G>T	449	Exon 3	<i>CYP2C9*27</i>	Arg150Leu	721	3	0	0.0021	aagaggaagccc[G>T]c'tgccttggga	rs9332127	
9032 G>C	IVS3 - 65	Intron 3			592	126	6	0.0953	ctactattact[G>C]tacaataaca		
10411 A>G ^d	IVS4 - 15	Intron 4			723	1	0	0.0007	atttaataaatt[A>G]tgttttctct		
33553 A>G ^d	951	Exon 6		Pro317	723	1	0	0.0007	gctgaagcacc[A>G]gaggtcacaggt		
42543 G>A ^d	1004	Exon 7		Arg335Gln	722	2	0	0.0014	tggcagaacc[G>A]gagcccctgcat	rs1057910	
42614 A>C	1075	Exon 7	<i>CYP2C9*3</i>	Ile359Leu	677	47	0	0.0325	gtccagagatac[A>C]tgaccctccc		
42676 T>C	1137	Exon 7		Tyr379	714	10	0	0.0069	attcagaacta[T>C]ctc-attcccag		(11)
47377 T>C ^d	1176	Exon 8		Thr392	723	1	0	0.0007	aatttcccgtac[T>C]tctgtctatc		
50298 A>T	1425	Exon 9		Gly475	678	46	0	0.0319	agttgcaatgg[A>T]tttgcctctgtg	rs1057911	
50302 G>A	1429	Exon 9	<i>CYP2C9*30</i>	Ala477Thr	722	2	0	0.0014	gtcaatgatt[G>A]cctctgtgccgc		
50369 C>T ^d	1496 (*23 ^e)	3'-UTR			723	1	0	0.0007	atggcctggcgt[C>T]tgcctgtgcagc		(11)
50378 A>G ^d	1505 (*32 ^e)	3'-UTR			722	2	0	0.0014	ctgctgcgtgc[A>G]gtcccctgagct		
50456 C>T ^d	1583 (*110 ^f)	3'-UTR			721	3	0	0.0021	cctgtcatctca[C>T]attttcccctcc		
50613 T>C ^d	1740 (*267 ^e)	3'-UTR			722	2	0	0.0014	ttagttattaa[T>C]atgtattattaa		(7)
50614 AT>—	1741_1742 (*268_ *269 ^e)	3'-UTR			721	3	0	0.0021	ttagttattaa[AT>—]ttagttattaaa		
50742 T>A	1835+34 ^f (*396 ^e)	3' flanking			686	38	0	0.0263	tctttttatgca[T>A]aatgaggtcag	rs9332245	

^aThe A of the initiation Met codon is denoted as nucleotide + 1. ^bFrom the translational initiation site or from the end of the nearest exon. ^cNomenclature for *CYP2C9* allele cited from: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm> ^dNovel mutations identified in this study. ^eThe nucleotide following the translation termination codon TGA is numbered *1. ^fThe first nucleotide downstream of the 3'-end of exon 9 is numbered +1.

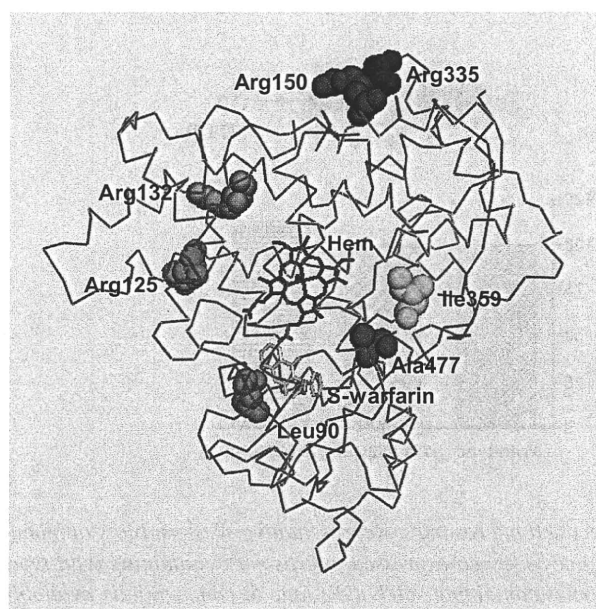


Fig. 1. Mapping of identified missense variations on the crystal structure of human CYP2C9 protein bound with warfarin (PDB: 10G5). Hem and S-warfarin are shown by red and pink, respectively. The seven missense mutations identified in this study are presented by a space-filling model.

Statistical Analysis

All SNPs identified were tested for deviations from the Hardy-Weinberg disequilibrium through the use of a χ^2 test. Pairwise linkage disequilibrium (LD) between two SNPs was evaluated by r^2 using SNPalyze version 4.0 software (DYNACOM Co., Ltd., Mobarra, Japan). Kinetic parameters K_m and V_{max} were estimated using a software program designed for non-linear regression analysis of a hyperbolic Michaelis-Menten equation (Prism v.3.0a, GraphPad Software, San Diego, USA). Kinetic data are presented as the mean \pm SD for three microsomal preparations derived from separate transfections for each variant and analyzed by one-way analysis of variance. Multiple comparisons were made with the Scheffe test.

Results

Resequencing of CYP2C9 in 724 Japanese Subjects

Upon sequencing the CYP2C9 in 724 Japanese subjects, we identified a total of 31 genetic variations, including 15 novel ones (Table 1). All of the detected variations (except for the SNPs of 251 C>A in intron 1 and 3411 T>C in intron 2) were in Hardy-Weinberg equilibrium for two separate groups ($p \geq 0.81$ in stroke patients and $p \geq 0.82$ in hypertensive patients) and for all subjects ($p \geq 0.66$). Since we did not find

any significant differences in frequencies between the stroke patients and the hypertensive patients ($p > 0.05$ by χ^2 test or Fisher's exact test), the data for all subjects were analyzed as one group.

Fourteen variations (seven missense and seven synonymous ones) were identified in the coding regions of CYP2C9. Two out of the seven missense mutations were novel, including Arg132Gln in one hypertensive patient and Arg335Gln in two stroke patients. The other five known missense mutations, Ile359Leu (CYP2C9*3), Leu90Pro (CYP2C9*13), Arg125His (CYP2C9*14), Arg150Leu (CYP2C9*27), and Ala447Thr (CYP2C9*30), were found in 47, 2, 1, 3, and 2 individuals, respectively. All the missense mutations were heterozygous, and there were no compound heterozygotes. The positions of seven missense mutations on the crystal structure of human CYP2C9 bound with warfarin are shown in Fig. 1.

Seven synonymous variations were identified, of which three novel ones (Glu122Glu; $n=1$, Pro317Pro; $n=1$, and Thr392Thr; $n=1$) were found as single heterozygotes. In the putative promoter region, two variants (-251 C>A and -162 A>G) (35) were detected, each in only one individual. A total of 15 variations were found in the intronic, 3'-UTR, and 3'-flanking regions. Five novel variations in introns 1, 2, and 4 and four novel variations in the 3'-UTR were identified with allele frequencies less than 0.01.

LD analysis showed that CYP2C9*3 was in LD ($r^2 > 0.8$) with two variations, 50298 A>T (Gly475Gly) in exon 9 and 50742 T>A in the 3'-flanking region. LD ($r^2 = 0.7$) was also noted between two intronic variants, 251 T>C in intron 1 and 3411 T>C in intron 2.

Functional Characterization of Two Novel Missense Mutations

To functionally characterize the two novel missense mutations, Arg132Gln and Arg335Gln, the wild-type and two CYP2C9 variants were coexpressed with NADPH-cytochrome P450 OR in *Sf21* insect cells. The holo-CYP2C9 content was not significantly different between the wild-type and variants: 188.6 \pm 22.9 pmol/mg microsomal protein for wild-type, 192.3 \pm 14.5 pmol/mg microsomal protein for Arg132Gln, and 159.3 \pm 5.5 pmol/mg microsomal protein for Arg335Gln, as determined on three lots from independent expression experiments. Quantities of cytochrome P420 were negligible for all preparations (data not shown). Cytochrome C reductase activities varied slightly but were not significantly different among the preparations (632–808 nmol cytochrome C reduced/min/mg protein), and the mean OR/CYP2C9 molar ratios in microsomal fractions were calculated to be 1.2, 1.3, and 1.6 for wild-type, Arg132Gln, and Arg335Gln, respectively.

Immunoblot analyses of CYP2C9 and OR were performed using insect cell microsomes, and representative data from three independent preparations are shown in Fig. 2. Quantitative analysis revealed that neither apo-CYP2C9 nor OR pro-

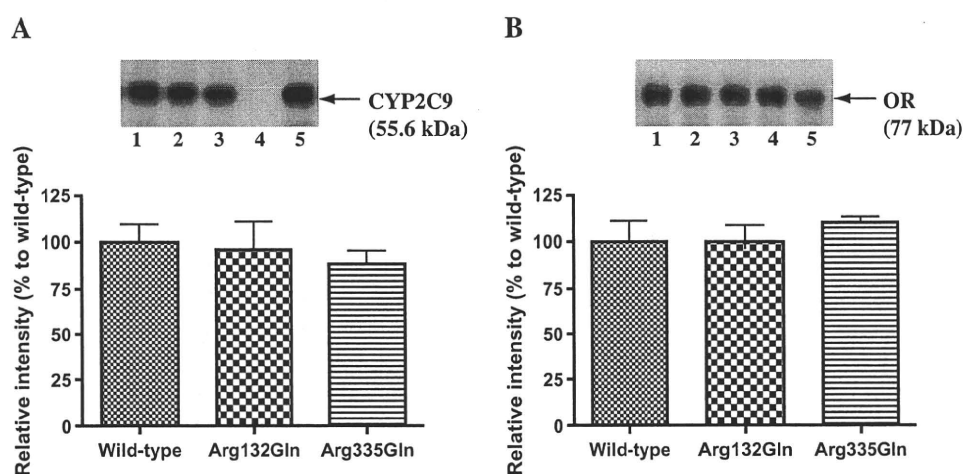


Fig. 2. Expression of wild-type and two variants of *CYP2C9* in insect cell microsomes. Representative Western blots of immunoreactive *CYP2C9* (A) and OR (B) proteins (upper) are shown. Lanes 1–3: co-expressed microsomes containing wild-type, Arg132Gln, and Arg335Gln *CYP2C9* each with OR; lane 4: microsomes containing solely OR; lane 5: commercially available co-expressed supersomes containing *CYP2C9.1* and OR (BD Bioscience, San Jose, USA). Relative intensities of immunoreactive *CYP2C9* (A) and OR (B) protein are shown in the lower panels. Each bar represents the mean \pm SD of three separate experiments.

Table 2. Kinetic Parameters for Hydroxylation Activities of Wild-Type and Variant *CYP2C9* against Diclofenac

Amino acid alteration	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	V_{max} (pmol/min/pmol P450)	Clearance (V_{max}/K_m) ($\mu\text{L/min/pmol P450}$)
Wild-type	3.4 ± 0.17	79.8 ± 6.6	23.4 ± 0.81
Arg132Gln	$1.8 \pm 0.05^{**}$	$7.8 \pm 0.4^{**}$	$4.2 \pm 0.31^{**}$
Arg335Gln	$3.0 \pm 0.10^*$	$65.4 \pm 2.1^*$	$22.0 \pm 0.06^*$

* $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$ vs. wild-type. One-way analysis of variance, post-hoc test: Scheffe. Data are represented by means \pm SD.

tein expression levels were significantly different among the wild-type and two variants ($p = 0.77$ for *CYP2C9*, $p = 0.64$ for OR). Catalytic activities of the wild-type and variant (Arg132Gln and Arg335Gln) proteins were assessed using diclofenac as a substrate. Diclofenac 4'-hydroxylation exhibited typical hyperbolic kinetic profiles in both the wild-type and variant proteins (data not shown). The kinetic parameters are summarized in Table 2. The Arg132Gln protein showed a 90% decrease in the V_{max} value and a partial decrease in the K_m value, resulting in fivefold lower intrinsic clearance relative to the wild-type (Table 2). A slight diminution in intrinsic clearance (6%) was observed for the Arg335Gln protein with slightly decreased K_m and V_{max} values (Table 2). The formation of 5-hydroxy diclofenac was observed in neither the wild-type nor variant (Arg132Gln and Arg335Gln) proteins (data not shown), suggesting that these substitutions do not alter the regioselectivity of diclofenac hydroxylation.

***CYP2C9* Polymorphisms and the Effectiveness of Losartan in 39 Hypertensive Patients**

Among 39 patients taking losartan, 34 patients carried the

wild genotype of *CYP2C9**1/*1, and the other 5 patients carried missense mutations, including *CYP2C9**1/*3 in 2 patients, *CYP2C9**1/*30 in 2 patients, and Arg132Gln mutation in one patient. The changes in systolic and diastolic blood pressure with respect to genotypes at 3 months of losartan treatment are presented in Table 3. Losartan obviously lowered systolic blood pressure in 2 patients with *CYP2C9**3 and in a patient with the Arg132Gln mutation. However, losartan was not effective in 2 patients with *CYP2C9**1/*30.

Discussion

In the present study, the large-scale direct resequencing effort of the *CYP2C9* allowed us to detect 31 genetic variations in 724 Japanese individuals. We also obtained accurate frequencies of the known variations, *CYP2C9**3, *13, *14, *27 and *30, that are specific to Asians, except for *3. As for the novel alleles, Arg132Gln and Arg335Gln, their effects on both protein expression levels and enzymatic activity were assessed using a baculovirus expression system.

The most frequently identified missense mutation in the present study was *CYP2C9**3 (Ile359Leu), with a frequency

Table 3. Patient Characteristics and Blood Pressure Response to Losartan with Respect to Genotypes: Essential Hypertensive Patients Taking Losartan

	CYP2C9 genotype				Arg132Gln	
	*1/*1	*1/*3		*1/*30		
Case number	34	2		2	1	
Sex (male/female)	21/13	0/2		2/0	1/0	
Age (years)	65.10±7.04	70	67	77	71	70
BMI (kg/m ²)	25.10±3.07	21.47	24.20	24.33	25.59	20.7
SBP						
At baseline (mmHg)	151.10±14.75	130 ^a	156	155	172	157
At 3 month (mmHg)	142.80±16.23	119	141	151	173	128
Change (mmHg)	-8.70±14.35	-11	-15	-4	1	-29
DBP						
At baseline (mmHg)	88.80±9.26	71 ^a	104	81	98	82
At 3 month (mmHg)	84.90±9.98	75	96	83	95	70
Change (mmHg)	-4.20±6.91	4	-8	2	-3	-12

Values are mean±SD. BMI, body mass index; SBP, DBP, systolic and diastolic blood pressures. ^aOffice blood pressure in this patient with CYP2C9 *1/*3 was 130/71 mmHg. Losartan was prescribed because this patient had higher home SBP (over 150 mmHg).

of 0.033, which was in good agreement with the previously published results in Japanese populations (11, 36, 37). The frequency of CYP2C9*13 (Leu90Pro), 0.0014 in the present study, was comparable to that recently reported in a Japanese population (11) but much lower than those in previous studies of other Asian populations (6, 9). CYP2C9*13 was first identified in a Chinese individual who showed poor metabolizer phenotype for both lornoxicam and tolbutamide (6). Functional analysis of the CYP2C9*13 protein showed decreased enzymatic activity for tolbutamide and diclofenac (10). Another recently published allele, CYP2C9*14 (Arg125His), was detected in an individual in the present study. This allele was first identified in an Indian patient, and the variant protein exhibited 80–90% lower catalytic activity toward tolbutamide (7, 8). CYP2C9*27 (Arg150Leu) and *30 (Ala477Thr), both detected recently in a Japanese population (11), were also identified in 3 and 2 individuals in the present study, respectively. The *in vitro* study revealed that the CYP2C9*30 protein had a twofold higher K_m value and a threefold lower V_{max} value than the wild-type towards diclofenac, whereas the catalytic activity of the CYP2C9*27 protein was similar to the wild-type (11).

The novel Arg132Gln variant exhibited a 90% decrease in the V_{max} value toward diclofenac 4'-hydroxylation (Table 2). Arg132 is located in a loop region between the C and D helices (Fig. 1) and is highly conserved in the CYP2C family (<http://drnelson.utmem.edu/humP450.aln.html>). Arg133, the corresponding residue of CYP2B4, is suggested to play a prominent role in binding its redox partners, cytochrome b5 and P450 reductase (38). Accordingly, the loss of catalytic activity of the Arg132Gln variant might reflect the altered affinity of variant protein to these redox partners due to electrostatic changes as proposed for *2 (Arg144Cys), *14 (Arg125His), and *26 (Thr130Arg) (8, 11, 39).

The Arg335Gln variant showed a similar holo-CYP2C9 content to wild-type in insect cell microsomes. Furthermore, the intrinsic clearance of the Arg335Gln variant was only slightly lower than that of the wild-type. In contrast to Arg335Gln, a substitution in the same position, Arg335Trp (*11), was reported to exhibit a threefold increase in K_m and more than a twofold decrease in the intrinsic clearance for tolbutamide when expressed in a bacterial cDNA expression system (40). In addition, catalytically active CYP2C9*11 holo protein was expressed at a very low level due to its decreased stability in insect cells (41). To confirm whether or not the protein stability of the Arg335Gln variant might be influenced by the *in vitro* expression system used, the wild-type and variant proteins were expressed in a mammalian expression system using COS-1 cells. The protein expression level of Arg335Gln variant in COS-1 microsomes was decreased by only 30% compared with that of the wild-type (data not shown), indicating that the protein stability of the Arg335Gln product was not substantially different between mammalian expression systems and baculovirus/insect cell systems. Thus, the substituted residues (Trp vs. Gln) at this position might quite differently influence the stability of protein as well as catalytic activities.

Thirty-nine patients were taking losartan, which is known to exhibit considerable inter-individual variation in its antihypertensive effects. Losartan is primarily oxidized by CYP2C9 to an active carboxylic acid metabolite, E-3174 (14–16). CYP3A4 also plays a limited role in the metabolic activation of losartan *in vitro*; however, its significance *in vivo* has not been demonstrated (3, 15, 16). We evaluated the impact of CYP2C9 variations on the antihypertensive effect of losartan based on the patients' average resting blood pressure measured before and three months after losartan treatment.

Two Japanese hypertensive patients carrying the *CYP2C9**3 heterozygous allele showed lowered systolic blood pressure by losartan (Table 3). This is in line with the previous report that no significant differences in the pharmacokinetics of losartan and E-3174 were observed between *CYP2C9**1/*3 and *1/*1 (42). Contrary to our result, a Danish prospective study of optimal monotherapy with losartan in type 1 diabetic patients with nephropathy showed that the reduction in systolic 24 h blood pressure was significantly greater in wild-type patients ($n=48$) than in *CYP2C9**3 carriers ($n=12$) (43). Furthermore, similar changes in diastolic and systolic 12 h blood pressures were also observed between *CYP2C9**1/*1 ($n=4$) and *1/*3 ($n=3$) Japanese patients (20). The role of heterozygous *CYP2C9**3 in the blood pressure-lowering response to losartan in hypertensive patients should be further studied in a large cohort of patients.

Inconsistent with our *in vitro* study, systolic blood pressure in a patient with Arg132Gln was obviously lowered by losartan (Table 3). For this variation, the substrate-dependent differences between diclofenac and losartan oxidation are unlikely because Arg132 might interact with redox partners but not with substrates as described above. However, the change in enzymatic activity toward losartan should be further analyzed.

However, losartan was not effective in 2 patients carrying the heterozygous *CYP2C9**30 (Ala477Thr) allele. A serious impact on the pharmacodynamics of losartan was not demonstrated statistically because of the small sample size of individuals with *30. Ala477 is located in the substrate recognition site-6 region in the β 2 sheet, which shows very strong hydrophobic interactions with the substrates (44), suggesting the importance of this residue in metabolic activity of *CYP2C9* toward various substrates. Therefore, insufficient conversion of losartan to E-3174 by this defective mutation might be responsible for the therapeutic failure of these patients. Pharmacokinetic analysis of *CYP2C9**30 towards losartan would be necessary to further elucidate its clinical relevance.

In conclusion, multiple rare functional variations of *CYP2C9* were detected in a Japanese population. Approximately 7% of the Japanese individuals analyzed (53 of 724) carried one of the functionally deleterious alleles (*CYP2C9**3, *13, *14, *30, and Arg132Gln). In addition to *CYP2C9**3, *CYP2C9**30 might also be used for determining inter-individual responses to losartan treatment in Japanese hypertensive patients.

Acknowledgements

We thank Ms. Junko Ishikawa and Mr. Katsuhiko Yamamoto of the National Cardiovascular Center for their technical assistance.

References

- Miners JO, Birkett DJ: Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 1998; **45**: 525–538.
- Evans WE, Relling MV: Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999; **286**: 487–491.
- Lee CR, Goldstein JA, Pieper JA: Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the *in-vitro* and human data. *Pharmacogenetics* 2002; **12**: 251–263.
- Kirchheiner J, Brockmoller J: Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 2005; **77**: 1–16.
- Schwarz UI: Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human *CYP2C9* gene. *Eur J Clin Invest* 2003; **33** (Suppl 2): 23–30.
- Si D, Guo Y, Zhang Y, *et al*: Identification of a novel variant *CYP2C9* allele in Chinese. *Pharmacogenetics* 2004; **14**: 465–469.
- Zhao F, Loke C, Rankin SC, *et al*: Novel *CYP2C9* genetic variants in Asian subjects and their influence on maintenance warfarin dose. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **76**: 210–219.
- DeLozier TC, Lee SC, Coulter SJ, *et al*: Functional characterization of novel allelic variants of *CYP2C9* recently discovered in southeast Asians. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; **315**: 1085–1090.
- Bae JW, Kim HK, Kim JH, *et al*: Allele and genotype frequencies of *CYP2C9* in a Korean population. *Br J Clin Pharmacol* 2005; **60**: 418–422.
- Guo Y, Zhang Y, Wang Y, *et al*: Role of *CYP2C9* and its variants (*CYP2C9**3 and *CYP2C9**13) in the metabolism of lornoxicam in humans. *Drug Metab Dispos* 2005; **33**: 749–753.
- Maekawa K, Fukushima-Uesaka H, Tohkin M, *et al*: Four novel defective alleles and comprehensive haplotype analysis of *CYP2C9* in Japanese. *Pharmacogenet Genomics* 2006; **16**: 497–514.
- Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, *et al*: Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 2002; **359**: 995–1003.
- Baudin B: Angiotensin II receptor polymorphisms in hypertension. Pharmacogenomic considerations. *Pharmacogenomics* 2002; **3**: 65–73.
- Lo MW, Goldberg MR, McCrea JB, *et al*: Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3174 in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1995; **58**: 641–649.
- Stearns RA, Chakravarty PK, Chen R, Chiu SH: Biotransformation of losartan to its active carboxylic acid metabolite in human liver microsomes. Role of cytochrome P4502C and 3A subfamily members. *Drug Metab Dispos* 1995; **23**: 207–215.
- Yasar U, Tybring G, Hidestrand M, *et al*: Role of *CYP2C9* polymorphism in losartan oxidation. *Drug Metab Dispos* 2001; **29**: 1051–1056.
- Yasar U, Forslund-Bergengren C, Tybring G, *et al*: Pharmacokinetics of losartan and its metabolite E-3174 in relation to the *CYP2C9* genotype. *Clin Pharmacol Ther* 2002; **71**: 89–98.
- Yasar U, Dahl ML, Christensen M, Eliasson E: Intra-indi-

- vidual variability in urinary losartan oxidation ratio, an *in vivo* marker of CYP2C9 activity. *Br J Clin Pharmacol* 2002; **54**: 183–185.
19. Babaoglu MO, Yasar U, Sandberg M, et al: CYP2C9 genetic variants and losartan oxidation in a Turkish population. *Eur J Clin Pharmacol* 2004; **60**: 337–342.
 20. Sekino K, Kubota T, Okada Y, et al: Effect of the single CYP2C9*3 allele on pharmacokinetics and pharmacodynamics of losartan in healthy Japanese subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; **59**: 589–592.
 21. Matayoshi T, Kamide K, Takiuchi S, et al: The thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter gene, C1784T, and adrenergic receptor-β3 gene, T727C, may be gene polymorphisms susceptible to the antihypertensive effect of thiazide diuretics. *Hypertens Res* 2004; **27**: 821–833.
 22. Kimura R, Miyashita K, Kokubo Y, et al: Genotypes of vitamin K epoxide reductase, γ-glutamyl carboxylase, and cytochrome P450 2C9 as determinants of daily warfarin dose in Japanese patients. *Thromb Res* 2007; **120**: 181–186.
 23. Kamide K, Tanaka C, Takiuchi S, et al: Six missense mutations of the epithelial sodium channel β and γ subunits in Japanese hypertensives. *Hypertens Res* 2004; **27**: 333–338.
 24. Kamide K, Takiuchi S, Tanaka C, et al: Three novel missense mutations of WNK4, a kinase mutated in inherited hypertension, in Japanese hypertensives: implication of clinical phenotypes. *Am J Hypertens* 2004; **17**: 446–449.
 25. Kamide K, Yang J, Kokubo Y, et al: A novel missense mutation, F826Y, in the mineralocorticoid receptor gene in Japanese hypertensives: its implications for clinical phenotypes. *Hypertens Res* 2005; **28**: 703–709.
 26. Kamide K, Kokubo Y, Hanada H, et al: Genetic variations of *HSD11B2* in hypertensive patients and in the general population, six rare missense/frameshift mutations. *Hypertens Res* 2006; **29**: 243–252.
 27. Kimura R, Kokubo Y, Miyashita K, et al: Polymorphisms in vitamin K-dependent γ-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.
 28. Yin T, Hanada H, Miyashita K, et al: 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. *Thromb Res* 2008; **122**: 179–184.
 29. Banno M, Hanada H, Kamide K, et al: Association of genetic polymorphisms of endothelin-converting enzyme-1 gene with hypertension in a Japanese population and rare missense mutation in preproendothelin-1 in Japanese hypertensives. *Hypertens Res* 2007; **30**: 513–520.
 30. Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, et al: Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 11902–11907.
 31. Williams PA, Cosme J, Ward A, et al: Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature* 2003; **424**: 464–468.
 32. Omura T, Sato R: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 1964; **239**: 2370–2378.
 33. Phillips AH, Langdon RG: Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: isolation, characterization, and kinetic studies. *J Biol Chem* 1962; **237**: 2652–2660.
 34. Yamazaki H, Nakajima M, Nakamura M, et al: Enhancement of cytochrome P-450 3A4 catalytic activities by cytochrome b5 in bacterial membranes. *Drug Metab Dispos* 1999; **27**: 999–1004.
 35. Shintani M, Ieiri I, Inoue K, et al: Genetic polymorphisms and functional characterization of the 5'-flanking region of the human CYP2C9 gene: *in vitro* and *in vivo* studies. *Clin Pharmacol Ther* 2001; **70**: 175–182.
 36. Nasu K, Kubota T, Ishizaki T: Genetic analysis of CYP2C9 polymorphism in a Japanese population. *Pharmacogenetics* 1997; **7**: 405–409.
 37. Yin T, Miyata T: Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1—rationale and perspectives. *Thromb Res* 2007; **120**: 1–10.
 38. Bridges A, Gruenke L, Chang YT, et al: Identification of the binding site on cytochrome P450 2B4 for cytochrome b5 and cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem* 1998; **273**: 17036–17049.
 39. Crespi CL, Miller VP: The R144C change in the CYP2C9*2 allele alters interaction of the cytochrome P450 with NADPH: cytochrome P450 oxidoreductase. *Pharmacogenetics* 1997; **7**: 203–210.
 40. Blaisdell J, Jorge-Nebert LF, Coulter S, et al: Discovery of new potentially defective alleles of human CYP2C9. *Pharmacogenetics* 2004; **14**: 527–537.
 41. Tai G, Farin F, Rieder MJ, et al: *In-vitro* and *in-vivo* effects of the CYP2C9*11 polymorphism on warfarin metabolism and dose. *Pharmacogenet Genomics* 2005; **15**: 475–481.
 42. Lee CR, Pieper JA, Hinderliter AL, Blaisdell JA, Goldstein JA: Losartan and E3174 pharmacokinetics in cytochrome P450 2C9*1/*1, *1/*2, and *1/*3 individuals. *Pharmacotherapy* 2003; **23**: 720–725.
 43. Lajer M, Tarnow L, Andersen S, Parving HH: CYP2C9 variant modifies blood pressure-lowering response to losartan in Type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabet Med* 2007; **24**: 323–325.
 44. Afzelius L, Zamora I, Ridderstrom M, Andersson TB, Karlen A, Masimirembwa CM: Competitive CYP2C9 inhibitors: enzyme inhibition studies, protein homology modeling, and three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis. *Mol Pharmacol* 2001; **59**: 909–919.