

総説

抗凝固治療の個別化における
遺伝子診断 (genotyping) の意義

高橋 晴美*

はじめに

ワルファリン (WF) は発売以来 50 年以上、世界で最も繁用されている抗凝固薬であり、特に日本では経口投与可能な唯一の抗凝固薬である。しかし、WF 投与により生じる抗凝固効果 (International Normalized Ratio; INR) には非常に大きな個人差が存在する。そのため、日本人の至適治療域とされる INR を 2 前後にコントロールするための WF の平均投与量は患者間で 10 倍以上も異なり、特に初期投与量の設定が临床上非常に困難である。更に、WF の平均投与量は白人・黒人に比較して日本人や中国人などのアジア人で少なく、人種差の存在も示唆されている。そこで WF を経口投与後 WF が血中に現われるまでの体内動態 (Pharmacokinetics; PK) に関する過程と、WF が血中に現われてから抗凝固効果 (INR) を発現するまでの感受性 (Pharmacodynamics; PD) に関する過程に分けて、それぞれの過程における個人差に関わる影響因子について、日本人を含むアジア人、白人、黒人という異なる人種・遺伝背景を有する患者を対象に様々な研究が報告されている¹⁾。それらの検討の結果、最近 WF の PK と PD の個人差にはそれぞれの過程に関与する異なる遺伝子変異が大きく影響していることが、明らかにされてきている^{1,2)}。本稿では WF の投与量の個人差に関連すると考えられる PK と PD に関わる遺伝子変異に注目して、現在までに明らかになっている知見を紹介したい。

WF の体内動態に影響する遺伝子変異

薬物の効果、あるいは副作用は血漿中遊離形濃度 (Cu) に大きく影響される。WF はほぼ完全に消化管から吸収され、肝代謝により体内から消失する薬物であるので (肝代謝型)、経口投与後の定常状態における WF の平均遊離形 Cu は、患者の肝代謝活性 (肝固有クリアランス) で決定される。また、WF は光学異性体の等量混合物 (ラセミ体) の製剤として市販されているが、抗凝固効果は S-WF が R-WF よりも 3~5 倍強力である。そのため、WF の抗凝固効果に個人差をもたらす PK 上の要因としては、患者の S-WF の肝代謝活性、即ち主代謝酵素である CYP2C9 活性が重要となる。

近年、CYP2C9 遺伝子変異が S-WF の肝代謝活性に大きく影響することが明らかになってきている。現在までのところ、CYP2C9 遺伝子多型として CYP2C9*30 まで変異型アレルが報告されている (<http://www.cypalleles.ki.se/>)。CYP2C9 変異アレルの出現頻度には人種差が認められ、白人は *2 (13%)、*3 (7%)、*11 (1.3%)、黒人は *2 (3.4%)、*3 (1.5%)、*5 (1.8%)、*6 (<0.5%)、*11 (2.3%)、日本人を含むアジア人は *3 (1.8%) が主な変異型アレルである³⁾。これらの CYP2C9 変異型の出現頻度はいずれも、白人や黒人の方がアジア人に比較して高い。CYP2C9 遺伝子変異が CYP2C9 代謝活性に及ぼす影響に関しては、*in vivo* で代謝活性の低下が確認されている変異は CYP2C9*2、CYP2C9*3 と CYP2C9*6 に限られる^{3,4)} (図 1)。日本人に限れば CYP2C9*2 と CYP2C9*6 は存在しないため、CYP2C9*3 変異の出現頻度が日本人では白人より低いことが、S-WF の肝代謝活性の人種差 (日本人

*明治薬科大学薬物治療学教室

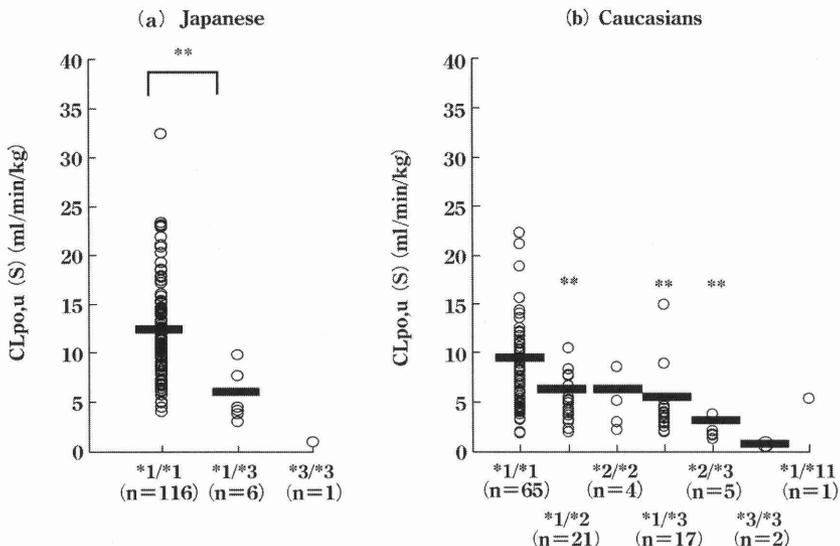


図1 S-WFの肝代謝活性(経口遊離形クリアランス; CL_{po,u})に及ぼす *CYP2C9* 遺伝子変異の影響
日本人でも白人でも *CYP2C9**2 や *CYP2C9**3 変異を持つと S-WF の代謝活性が低下する。

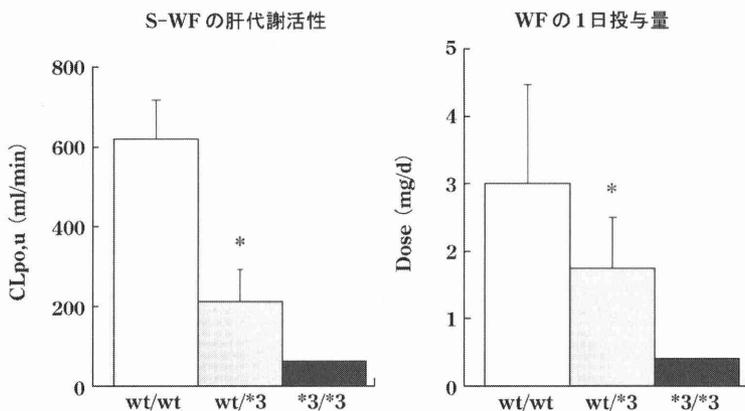


図2 日本人における S-WF の肝代謝活性(経口遊離形クリアランス; CL_{po,u})と WF 投与量に及ぼす *CYP2C9**3 変異の影響
*CYP2C9**3 変異により S-WF の肝代謝活性が低下するので、抗凝固効果を治療域にコントロールするためには、WF の減量が必要となる。

の方が白人より肝代謝活性が大きい)に少なくとも一部寄与している可能性がある⁴⁾。*CYP2C9**3 変異を有する日本人の患者では S-WF の肝代謝活性が低下し、その影響が WF の平均投与量の低下に非常に良く反映している⁴⁾(図2)。即ち、*CYP2C9**3 変異を有する患者に対して S-WF の Cu を野生型患者と同様に治療域に保つためには、WF の投与量を低下する必要がある。S-WF の肝代謝活性の低下作用が報告されている *CYP2C9**2 や *CYP2C9**3 変異アレルの WF 治療に及ぼす影響について Lancet⁵⁾や JAMA⁶⁾に報告された臨床試験成績をまと

めると、以下の結論が導かれる。

① WF の低投与量群では *CYP2C9**2/*3 変異型患者が多い(*CYP2C9**2/*3 変異により S-WF の全身クリアランスが低下し、Cu や INR が上昇するため、投与量が減少される可能性)。

② これらの変異型患者では安定した抗凝固効果を得るための時間がかかる(*CYP2C9**2/*3 変異により S-WF の全身クリアランスの低下、および半減期の延長が起こり、定常状態に到達する時間が長くなる可能性)。

③ 変異型患者では WF 導入期に INR の上限をこ

えるリスクが高い(S-WFのCuの上昇による可能性).

④変異型患者群では導入期の出血頻度が高い(S-WFのCuの上昇による可能性).

前述のごとく代謝活性の低下を起こす遺伝子変異とその臨床的影響についてはある程度明らかとなってきたが、一方、*in vivo*でCYP2C9代謝活性を上昇させ、その結果レジスタンスを起こす遺伝子変異は未だ発見されていない。しかし、現実にはWFの肝代謝活性(経口クリアランス)の上昇により1日当たりのWF投与量が25mg/d以上を示す患者の存在が報告されている^{7,8)}。*In vitro*実験ではCYP2C9の発現調節に影響する因子として種々の核内受容体(CAR, PXR, RXR, VDR, GR, HNF3 α 4 α など)が関与することが知られているが⁹⁾、その発現調節メカニズムの詳細は現在のところ明らかでなく、特にアジア人の場合、既知のCYP2C9遺伝子の翻訳・非翻訳領域の変異のみでは*in vivo*で認められるCYP2C9活性の10倍以上もの大きな個人差の5%程度しか説明できるにすぎない¹⁰⁾(図3)。

WFの感受性に影響する遺伝子変異

次にWFの感受性(PD)について考えてみると、WFは肝臓においてビタミンKサイクル(Vitamin

K epoxide reductase; VKOR)を阻害し、ビタミンKに依存した凝固因子(F-II, VII, IX, X)の γ -carboxylationを阻害することにより、抗凝固効果(INRの上昇)を発現する。したがってWF濃度-INR関係に影響する感受性側の因子としてはWFの直接の作用蛋白であるVKOR活性が重要となる。

VKORについては2004年に初めてその一部(VKOR complex subunit 1; VKORC1)の塩基配列と6カ所の変異がNature¹¹⁾に報告された。最初に報告された6カ所のSNPsについてはWF耐性家系や凝固因子異常家系で発見されたものであり、それらの素因がない白人では非常に稀である。しかし、2005年初めに発表されたWF服薬中の白人患者を対象として行われた臨床試験で、VKORC1のintron 1の変異(1173C>T)によりWF投与量が大きく減少することが報告された¹²⁾。ついでワシントン大学のグループからVKORC1の詳細なハプロタイプ解析結果が報告され¹³⁾、intron 1の変異(1173C>T)を含む5つのほぼ完全リンクするSNPsがVKORC1のmRNA発現量とWF投与量の決定因子であることが示された(図4)。ついで我々は、1173変異の出現頻度が日本人患者では0.891であるのに対し、白人では0.422、更に黒人では0.086であり、変異出現頻度に著しい人種差が認められること、

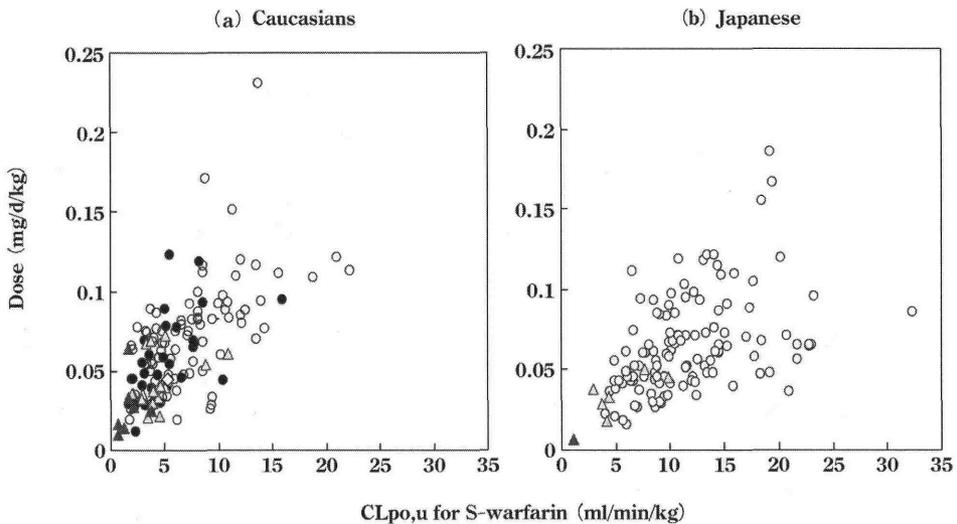


図3 S-WFの肝代謝活性(経口遊離形クリアランス; CL_{po,u})とWFの1日投与量の関係に及ぼすCYP2C9遺伝子変異の影響

●: CYP2C9*2変異, △: CYP2C9*1/*3変異, ▲: CYP2C9*3/*3変異

日本人でも白人でもCYP2C9*2やCYP2C9*3変異を持つ患者ではS-WFの肝代謝活性とWFの1日投与量が低下する傾向がある。

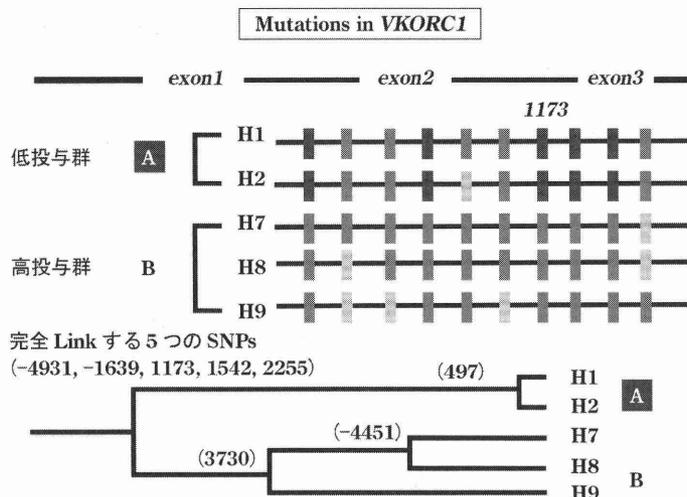


図4 VKORC1 のハプロタイプ解析結果¹³⁾

5ヵ所のほぼ完全リンクする遺伝子変異をもつ A グループは WF の低投与量群である。

Genotypes of VKORC1 1173 C > T variant

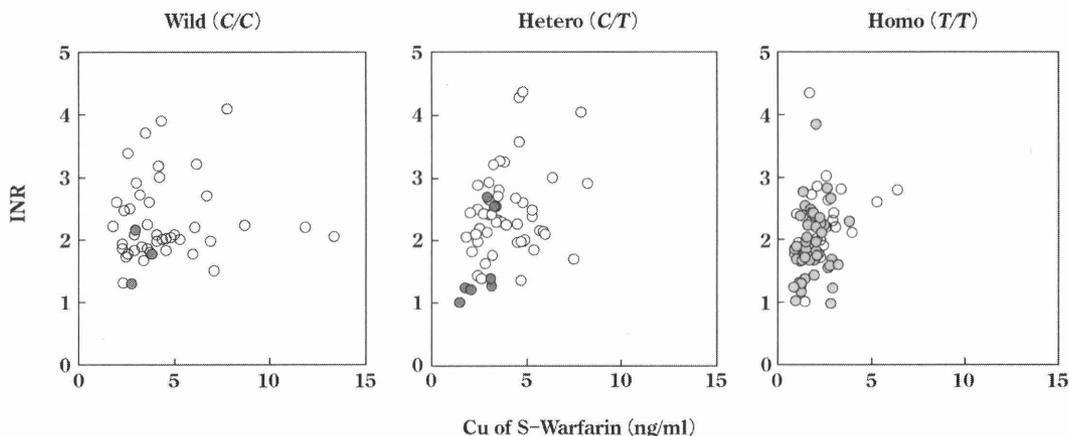


図5 S-WF の血漿中遊離形濃度と INR の関係に及ぼす VKORC1 1173 C > T 変異の影響

○; 白人, ●; 日本人

人種によらず日本人, 白人に共通して VKORC1 1173C > T 変異により, WF の濃度-INR 関係の傾きが上昇し, 感受性が高くなる。

更にこの変異が S-WF の Cu-INR 関係に大きく影響し, 日本人, ならびに白人ともにこの変異の存在により感受性が高くなることを報告した¹⁾(図5). また, VKORC1 1173 の同一遺伝子型を有していれば, S-WF の Cu-INR 関係は日本人と白人の間で明確な相異は認められなかった. 次に, CYP2C9 野生型患者を対象にして(WF 投与量に及ぼす CYP2C9 変異の影響を除いた), WF 投与量について日本人と白人の比較を行った(図6). 全体で比較すると日本人の投与量は白人患者より有意に少なかったが,

VKORC1 の同一 genotype を有する患者では人種によらず WF 投与量はほぼ等しかった. 更に, この変異をヘテロ, あるいはホモ型で有する患者の順に両人種共により低用量の WF が投与されており (gene-dose 効果の存在), 日本人患者の 80% 以上は感受性の高いホモ変異型を有していることが判明した. 一方でこの結果は, 抗凝固コントロールのために日本人患者の約 18% (5~6 名に 1 名) は, 日本人の平均 WF 投与量 (約 3.3mg/d) 以上を必要とする WF レジスタンス遺伝子型を有していること

Genotypes of *VKORC1* 1173 C > T variant

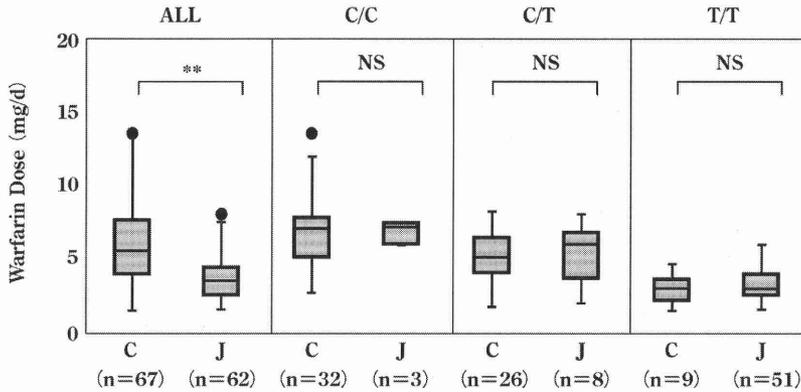


図6 1日 WF 投与量の人種差に及ぼす *VKORC1* 1173 C > T 変異の影響
C; 白人, J; 日本人, **p<0.01, NS; Not Significant

を示している. 次に WF 維持量の患者間変動に及ぼす影響因子を明らかにする目的で, 多変量解析を行った結果, 年齢, 体重, *CYP2C9*, ならびに *VKORC1* の genotypes が WF 投与量の有意な影響因子であり, これらの因子により WF 維持量の個人差の約 60% が説明できることを明らかにした¹⁾. 最近, WF 投与量の個人差に及ぼす他の Vitamin K 依存凝固関連蛋白 (F-II, F-VII, F-IX, F-X, γ -glutamyl carboxylase とその内因性阻害蛋白である calumenin など) や WF 投与量に影響する可能性のある 29 の遺伝子変異の影響について詳細な検討結果が報告されたが, これらの遺伝子変異の影響は *VKORC1* や *CYP2C9* に比較すると, いずれも小さいと考えられる²⁾. 更に, 動脈硬化性疾患に及ぼす *VKORC1* 変異の影響についても中国人を対象として検討され, 脳血管障害や冠動脈疾患患者ではコントロール群に比較して *VKORC1* 野生型 (WF 感受性が低い genotype) を有している割合が約 2 倍高いことが報告された¹⁴⁾. 動脈硬化病変部位での血栓形成には Vitamin K 依存蛋白の活性化が関与していることが示唆されているが, そのような状況下における *VKOR* の役割について, 今後の検討が期待される.

おわりに

WF の PK の人種差 (日本人の方が白人より肝代謝活性が高い) により生じた血中 S-WF 濃度の人種差 (日本人の方が白人より低い) は *VKORC1* による PD の人種差 (日本人の方が白人より感受性が高い)

で相殺されて, 最終的な日本人の INR は白人より僅かに低値を示していた. このように, 最終的な WF の投与量-効果関係に影響を及ぼす WF の PK と PD には相反する方向の人種差が存在するため, 今後, 欧米白人データに基づく抗凝固治療ガイドラインを日本人患者に適応する場合には, PK/PD 両面からの人種差の検討が不可欠であることが示唆される. このような WF 投与量に認められる個人差・人種差には WF の肝代謝活性に影響する *CYP2C9* 変異と同様に, 感受性の影響因子である *VKORC1* 変異が大きく関与していることが明らかとなったため, FDA では 2005 年末, WF の添付文書に *CYP2C9* と *VKORC1* に関する遺伝子情報を追加するための検討を開始し, 現在 USA と Europe では大規模臨床試験が進行中である. 更に USA では Genelex 社が両遺伝子検査を既に開始しており, 遺伝子診断キットも今年度中に発売される予定である. 日本人では両遺伝子の出現頻度が白人と異なるため, 今後, 日本人における抗凝固治療の個別化に向けてこれらの遺伝子検査の有用性について, 日本人を対象にした prospective な検討が必要とされている.

文 献

- 1) Takahashi H, Wilkinson GR, Nutescu EA, et al: Different contributions of polymorphisms in *VKORC1* and *CYP2C9* to intra- and inter-population differences in maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African-Americans. *Pharmacogenet Genomics*

- 2006; 16: 101–10.
- 2) Wadelius M, Chen LY, Eriksson N, et al: Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. *Hum Genet* 2007; 121: 23–34.
 - 3) Takahashi H, Echizen H: Pharmacogenetics of warfarin elimination and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40: 587–603.
 - 4) Takahashi H, Wilkinson GR, Caraco Y, et al: Population difference in (S)-warfarin metabolism between *CYP2C9* genotype-matched Caucasians and Japanese patients. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73: 253–63.
 - 5) Aithal GP, Day CP, Kesteven P, et al: Association of polymorphisms in the cytochrome P450 *CYP2C9* with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 1999; 353: 717–9.
 - 6) Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, et al: Association between *CYP2C9* genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA* 2002; 287: 1690–8.
 - 7) Hallak HO, Wedlund PJ, Modi MW, et al: High clearance of (S)-warfarin in a warfarin-resistant subject. *Br J Clin Pharmacol* 1993; 35: 327–30.
 - 8) Harrington DJ, Underwood S, Morse C, et al: Pharmacodynamic resistance to warfarin associated with a Val66Met substitution in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1. *Thromb Haemost* 2005; 93: 23–6.
 - 9) Kawashima S, Kobayashi K, Takama K, et al: Involvement of hepatocyte nuclear factor 4 α in the different expression level between *CYP2C9* and *CYP2C19* in the human liver. *Drug Metab Dispos* 2006; 34: 1012–8.
 - 10) Takahashi H, Wilkinson GR, Padriani R, et al: *CYP2C9* and oral anticoagulation therapy with acenocoumarol and warfarin: Similarities yet differences. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75: 376–80.
 - 11) Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, et al: Mutations in *VKORC1* cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 2004; 427: 537–41.
 - 12) D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, et al: A polymorphism in the *VKORC1* gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* 2005; 105: 645–9.
 - 13) Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, et al: Effect of *VKORC1* haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med* 2005; 352: 2285–93.
 - 14) Wang Y, Zhang W, Zhang Y, et al: *VKORC1* haplotypes are associated with arterial vascular diseases (stroke, coronary heart disease, and aortic dissection). *Circulation* 2006; 113: 1615–21.