

HMG-CoA 還元酵素阻害剤による横紋筋融解症
の候補遺伝子多型解析

2005 年

森本 かおり

目次

緒言.....	4
第一章 先天性横紋筋融解症の原因遺伝子に関する検討.....	7
第一節 序文.....	7
第二節 実験材料および方法.....	8
第一項 対象患者.....	8
第二項 材料および機器.....	9
第三項 解析遺伝子およびその多型/変異.....	10
第四項 遺伝子解析.....	11
第五項 統計解析.....	11
第三節 結果.....	12
第一項 先天性横紋筋融解症原因遺伝子の既知変異の解析.....	12
第二項 症例群に見いだされた ACAD9, 128G>A の頻度解析.....	13
第四節 考察.....	14
第五節 小括.....	15
第二章 薬物動態関連遺伝子に関する検討.....	16
第一節 序文.....	16
第二節 実験材料および方法.....	17
第一項 対象患者.....	17
第二項 材料および機器.....	17
第三項 解析遺伝子およびその多型.....	17
第四項 多型解析.....	18
第五項 統計解析.....	19
第三節 結果.....	19
第一項 CYP3A4.....	19
第二項 ABCB1 (MDR1).....	20
第三項 ABCC2 (MRP2).....	20
第四項 SLCO1B1 (OATP-C).....	22
第四節 考察.....	24

第五節 小括.....	30
第三章 プラバスタチンによりミオパチーを起こした一症例における <i>SLCO1B1</i> の新規変異.....	31
第一節 序文.....	31
第二節 実験材料および方法.....	31
第一項 ゲノム DNA 試料.....	31
第二項 材料および機器.....	31
第三項 遺伝子解析.....	32
第三節 結果.....	33
第一項 プラバスタチンまたはアトルバスタチンでミオパチーを起こした症例における <i>SLCO1B1</i> 遺伝子の解析.....	33
第二項 健常日本人 50 人におけるアレル頻度の推定.....	34
第四節 考察.....	34
第五節 小括.....	36
総括.....	37
参考文献.....	38
謝辞.....	53
主査、副査名.....	54

略語／略号一覧

HMG-CoA 還元酵素	3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A 還元酵素
LDL	Low Density Lipoprotein
GTP	Guanosine Triphosphate
CPT2	Carnitine Palmitoyltransferase II
PYGM	Phosphorylase, glycogen; muscle (Myophosphorypase)
ACAD9	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member9
VLCAD	Very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase
LDHA	Lactate Dehydrogenase A
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP) member 1
ABCC2	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP) member 2
MRP2	Multidrug resistance protein 2
SLCO1B1	Solute carrier organic anion transporter family, member 1B1
OATP-C	Organic anion transporting polypeptide-C
HERG	Human ether-a-go-go-related gene
UGT1A1	UDP-Glucuronosyltransferase 1A1
CK	Creatine Kinase
DNA	Deoxyribonucleic acid
HIV	Human immunodeficiency virus
PCR	Polymerase chain reaction
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
TBE 緩衝液	Tris Borate EDTA 緩衝液
SMV	Simvastatin
ATV	Atorvastatin
PRV	Pravastatin
SNP	Single nucleotide polymorphism
OR	Odds ratio
95%CI	95% confidence interval
MSD	Membrane spanning domain
ULN	Upper limit of normal range

緒言

横紋筋融解症とは筋細胞膜が崩壊し、筋原性酵素などの筋内容成分が循環血中に逸脱する病態で、重篤化した場合腎不全を介して多臓器不全により死に至る場合がある[1]。横紋筋融解症の原因は先天性と後天性に大きく分類することが出来る。先天性横紋筋融解症の多くは筋肉へのエネルギー供給に関わる、解糖、グリコーゲン分解、脂肪酸の β 酸化、ミトコンドリア呼吸鎖等に関与する酵素またはタンパク質の欠損が原因であることが知られている[1]。一方、後天性横紋筋融解症の原因のおよそ80%は毒素や薬物によるものであり、様々な薬物が横紋筋融解症を引き起こすことが知られている[1]。薬物による横紋筋融解症は非常に稀な副作用であるが、ミオパチーが発覚されず薬物の服用が継続されると横紋筋融解症に発展すると考えられている[2]。近年、HMG-CoA還元酵素阻害剤（スタチン）によるミオパチーや横紋筋融解症が多く報告されるようになってきている[3]。

スタチンはLDLコレステロールを有効に低下させるため、高コレステロール血症治療の第一選択薬となっており、心血管イベントの抑制や心疾患罹患率ならびにそれによる死亡率の低減に効果があることが複数の大規模臨床試験により実証されている[4]。スタチンは多くの患者には非常に安全性の高い薬物であるが、Myalgiaから横紋筋融解症まで多様な筋肉障害の原因となる場合がある。この副作用は、2001年にセリバスタチンが3年間で52例の横紋筋融解症による死亡例を出したことを理由に市場から撤退したため強く認識されるようになった[5]。しかしながら、スタチンを単独投与した場合のミオパチーの発症率は0.1～0.5%、横紋筋融解症は0.04～0.2%と非常に稀である[2]。

スタチンによる筋肉障害の発症メカニズムは解明されていないが、これまでにいくつかの仮説が示されている[6]。ひとつの仮説はコレステロール合成抑制の結果、膜のコレステロール含量が低下し流動性が上昇することによる膜の不安定化である[7]。しかし*in vitro*細胞毒性実験で、HMG-CoA還元酵素よりさらに下流でコレステロール合成を阻害（スクアレン合成酵素を阻害）しても細胞毒性は認められていない[8]。もう一つの仮説は、ミトコンドリア電子伝達系で有用な役割を果たすユビキノンの含量低下である。実際、スタチンによりミオパチーを起こした患者においてミトコンドリアミオパチーに類似した症状（赤色ぼろ繊維や乳酸アシドーシス）が認められている[9-11]。一方、実験動物レベルでは筋肉組織中のユビキノン含量は低下しておらず、障害の認められた筋肉繊維周囲ではミトコンドリアの障害が認められないためミトコンドリアの障害が原発ではないとも報告されている[10, 12]。また、細胞周期やアポトーシスの抑制に関わる小分子GTP結合蛋白質のイソプレニル化が抑制されることが原因なのではないかという仮説もある[8, 13, 14]。

このように発症メカニズムは完全な解明には至っていないものの、スタチンによるミオパチーおよび横紋筋融解症の発症は用量および血漿中濃度に依存することが示されている[15, 16]。実際に、スタチンによる筋肉障害の発症率がスタチンの血漿中濃度を上昇させる薬物との併用により上昇すること

が示されている[17]。例えば、シンバスタチンやロバスタチンとシクロスポリン A、ミベフラジル、ケトコナゾール、イトラコナゾール、リトナビル、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、ネファゾドンとの併用により myositis や横紋筋融解症などの筋肉障害例が多く報告されており、スタチンによる横紋筋融解症の60%近くが相互作用によるものであったとされている[18]。

薬物の薬理毒性効果発現の個人間差の一部は遺伝的多型により説明されている。スタチンによる横紋筋融解症は常用量単独投与でも発症しており、非常に稀な副作用であることからこの副作用の感受性には個人差があることが考えられる。しかしながら、これまでにスタチンによる筋肉障害の薬理遺伝学的な報告はなされておらず、スタチンによる筋肉障害の予測に有用な遺伝マーカーに関しても不明である[19]。そこで本研究では、スタチンによる横紋筋融解症発症の個人間差に関わる遺伝的要因を明らかにすることを目的として、2つの仮説に基づき候補遺伝子を選択し、その多型の関与を case-control study により検討した。いくつかの薬物の副作用の原因遺伝子は類似の症状を呈する先天性疾患と同一である場合が知られている[20, 21]。そこで、我々は横紋筋融解症に関わる遺伝的要因を保有している無症候性の患者がスタチン暴露により発症するのではないかとという仮説をたて、先天性横紋筋融解症の原因遺伝子から4つの候補遺伝子を選択した。候補遺伝子としては代謝性横紋筋融解症の原因遺伝子から *carnitine palmitoyl transferase II (CPT2)*, *myophosphorylase (phosphorylase, glycogen; muscle, PYGM)*, *very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase (acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 9, ACAD9)* および *lactate dehydrogenase A (LDHA)* を選択した。前者2遺伝子は日本人特発性ミオグロビン尿症患者に最も多くその欠損が認められており[1]、後者2遺伝子は近年再発性横紋筋融解症の原因として報告が増加傾向にある[1, 22]。さらにスタチンによる筋肉障害の発症率が用量および血漿中濃度依存的に増大することから[15, 16]、我々はスタチンの代謝や膜輸送に関わる遺伝子多型にも注目して候補遺伝子を選択した。その候補遺伝子としては、スタチンの主消失経路に関わることが報告されている遺伝子より *cytochrome P450 3A4, (CYP3A4)*, *ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 (ABCB1 or MDR1)*, *ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2 (ABCC2 or MRP2)* および *solute carrier organic anion transporter family, member 1B1 (SLCO1B1, OATP-C, SLC21A6 or OATP1B1)* を選択した。CYP3A4 はロバスタチン、シンバスタチン、アトルバスタチン、セリバスタチンの代謝に関与する[18]。また、シンバスタチンおよびアトルバスタチンとジゴキシンの相互作用報告があり、*in vitro* 輸送実験において ABCB1 の基質としてこれらが輸送されることが示されている[23, 24]。さらに、プラバスタチンの体内動態において SLCO1B1 による肝臓への取り込みと ABCC2 による胆汁中排泄が重要な役割を果たしており[25]、肝特異的な分布や腸肝循環などのプラバスタチンに特徴的な体内動態の原因になっている。またセリバスタチン[26, 27]、ロスバスタチン[28]、ピタバスタチン[29, 30]、アトルバスタチン[31]も SLCO1B1 の基質として輸送されることが示されている。

本研究では、先天性横紋筋融解症の原因遺伝子である *CPT2*, *PYGM*, *ACAD9*, *LDHA* (第一章) とス

タチンの代謝および膜輸送に関与する *CYP3A4*, *ABCB1*, *ABCC2*, *SLCO1B1* (第二章) について、その遺伝子多型/変異とスタチンによるミオパチーとの関連性を case-control study により検討した。さらにミオパチー発症患者の遺伝子を詳細に解析することにより新規変異を検出した (第三章)。

第一章 先天性横紋筋融解症の原因遺伝子に関する検討

第一節 序文

副作用の原因遺伝子は類似の症状を呈する先天性疾患の原因遺伝子と同一である場合が知られている。その一例としては、アミノグリコシド系抗生物質による難聴とミトコンドリア遺伝子のポイントミューテーション 1555A>G[21]や、薬剤性 QT 延長症候群における HERG の多型[20]、トラニラストによる高ビリルビン血症と Gilbert 症候群の原因である UGT1A1 TA repeat 数の多型[32]などがあげられる。一方、筋弛緩剤による悪性高熱症とリアノジンレセプターの一塩基変異[33]のように薬物に暴露されて初めて発症する遺伝病（薬剤遺伝病）もあるが、その原因遺伝子の機能や発現組織から副作用の症状が矛盾なく説明されている。

従って、スタチンによる横紋筋融解症の原因遺伝子も先天性横紋筋融解症の原因遺伝子と同一である可能性がある。その場合スタチンによる横紋筋融解症は通常は筋肉に異常の認められない患者で発症しているので、その変異は単独では病態に結びつかないものでなければならない。

先天性横紋筋融解症の原因としては、糖および脂質代謝異常、TCA 回路系有機酸代謝異常、ミトコンドリア病、甲状腺機能低下症、筋ジストロフィー等が知られている[1, 34]。特発性横紋筋融解症の約半数は代謝性であったとの報告もある[35]。これらの遺伝子欠損は筋肉への速やかなエネルギー供給が出来ないことが原因であろうと推測されている。中でも糖および脂質代謝に関与する一部の酵素欠損は、後発性で通常無症候性であるが、激しい運動、ウイルス感染、絶食などでの発症例が報告されている[36-40]。この様な弱い表現型を呈する症例が報告されている先天性横紋筋融解症原因遺伝子の中から、*acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member9 (ACAD9, VLCAD)*, *carnitine palmitoyltransferase II (CPT2)*, *phosphorylase, glycogen; muscle (PYGM)*, *lactate dehydrogenase-A (LDHA)*を候補遺伝子として選択した。*CPT2* の変異は先天性横紋筋融解症患者に比較的高頻度に検出されており、*PYGM* がそれに続いている[41]。また、 β 酸化などのミトコンドリアにおける脂質代謝酵素欠損患者の半数以上が筋肉障害を呈し[42]、中でも *ACAD9* の欠損が後発性の横紋筋融解症の原因の多くを占めていることが報告されている[43]。*LDHA* は日本人で最初にその欠損症が発見されている[22, 44]。

スタチンによるミオパチーの発症メカニズムは、コレステロール合成経路の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素を阻害することにより、それより下流の代謝産物の生成速度を低下させることが原因であると推測されている[40, 45, 46]。候補遺伝子として選択した *CPT2* と *ACAD9* はミトコンドリアにおける β 酸化に関与しているため、これらの欠損により機能低下が起こった場合、 β 酸化の産物であるアセチル CoA の産生速度が低下すると考えられる。アセチル CoA はコレステロール合成の出発物質でもあるため、スタチンの筋肉毒性を増強する可能性が考えられる点で興味深い。

なお、候補として選択した遺伝子変異の多くがその欠損患者での報告に留まっており、日本人における LDHA 欠損頻度が 0.12% という報告[47]がある以外、頻度は不明である。従って SNP の定義を満たさない 1% 以下の頻度であるものが多いと推定される。しかし、その影響が強い場合は症例中に変異を検出できる可能性を想定して解析を行った。

第二節 実験材料および方法

第一項 対象患者

千葉大学医学部付属病院および関連病院を受診した患者で、高コレステロール血症のためスタチンを服用中、スタチンによる横紋筋融解症またはそれに発展しうる筋肉症状が疑われた患者 10 例を症例群とした。また、スタチンを 1 年以上服用しても筋肉症状および血清中クレアチンキナーゼ値の上昇の認められない患者 26 例を対照群とした (Table I-1)。

患者からの血液採取に際しては、予め研究の目的、方法、結果から得られる情報の取り扱いに関して口頭および文章による十分な説明を行い書面にて同意を得た。本研究は千葉大学薬学研究院および千葉大学医学研究院の倫理委員会の承認を得た。

症例群の筋肉症状は多様であった。10 例中 3 例では自覚症状は認められなかったが正常上限値 (45IU/L) の 8 倍以上の顕著な CPK の上昇を示した。7 例は主として脱力感、筋肉痛などの自覚症状を経験しており、うち 3 例では生化学データは入手できなかったが医師の判断により症例群に含めた。このうち 2 例ではプラバスタチンおよびアトルバスタチンの両方でミオパチーを経験しており、いずれもアトルバスタチン服用の際、より重篤な筋肉症状 (起立や歩行が困難な程の筋力低下、筋痙攣、痺れ、筋肉痛、褐色尿) を示した。すべての症例においてスタチン服用中止により筋肉症状は消失しており、発症までの服用期間は 1 日から 44 カ月 ($\text{mean} \pm \text{S.D.} = 8 \pm 12$ カ月) であった。症例群における併用薬の内訳はプレドニゾロン (n=3)、ファモチジン (n=2)、アロプリノール、アスピリン、ジピリダモール、ジラゼブ、エナラプリル、ニカルジピン、アムロジピン、プロブコール、イソニアジド、ニコチン酸トコフェロールであった (Appendix 1)。

対照群として 1 年以上継続してスタチンを服用しても筋肉症状の認められない 26 人を収集した。対照群患者の平均服用期間は 70 ± 34 カ月で、症例群における併用薬の内訳はアムロジピン (n=6)、インスリン (n=3)、フロセミド (n=2)、プレドニゾロン、ニカルジピン、グリベンクラミド、テモカプリル、ジピリダモール、アロプリノール、アスピリン、ジラゼブ、エナラプリル、プラゾシン、ワルファリン、テオフィリン、メトトレキサート、ラニチジン、ピオグリタゾン、プロブコール、ニコチン酸トコフェロールであった (Appendix 1)。

症例、および対照群患者における併用薬にはスタチンとの併用により横紋筋融解症を発症する可能性のある薬物（免疫抑制剤、フィブラート系高脂血症治療薬、ニコチン酸、マクロライド系抗生物質、HIV プロテアーゼ阻害剤）は含まれていなかった。年齢、性別、服用したスタチンの種類および用量に群間で有意な差は認められなかった（Table I-1）。本研究で収集した症例および対照群患者はすべて日本人であった。

Table I-1 Demographic comparison between patients with and without myopathy

	With myopathy			Without myopathy		
	(n = 10)			(n = 26)		
Age (years)	58	±	9*	58	±	9
Sex (male/female)	4/6			8/18		
Number of patients treated						
with each statin (n)						
Pravastatin	6**			19		
Atorvastatin	3**			4		
Simvastatin	3			3		
Dose of statin (mg/day)						
Pravastatin	8.3	±	2.6	7.4	±	2.7
Atorvastatin	8.3	±	2.9	10.0	±	0.0
Simvastatin	9.2	±	9.5	5.6	±	3.1

Data are expressed as mean ± S.D. ** Two patients were treated with pravastatin which was discontinued due to muscle complaints and replaced with atorvastatin, but was also discontinued due to muscle complaints. There were no significant differences in the mean values for age, doses of statins (Mann-Whitney's U test) and distribution of sex between the patients with and without myopathy (Chi-square analysis).

第二項 材料および機器

対象患者の血液からのゲノム DNA の抽出は、(株) エスアールエルに委託して Phenol-Chloroform 抽出法により行った。DNA polymerase は、Ampli Taq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)、TaKaRa LA Taq™ (Takara, Shiga, Japan)、KOD-plus-(Toyobo, Osaka, Japan) を用いた。サーマルサイクラーは、PTC-100™ (MJ Research, INC., Waltham, MA, USA)、Mini Cycler™ (MJ Research, INC)、GeneAmp 2700 (Applied Biosystems) を用いた。電気泳動装置は Mupid-2 (Advance.Co,Ltd, Tolyo, Japan) を用いた。ダイレクトシークエンスは CEQ™ DTCS-Quick Start Kit (BECKMAN COULTER, Fullerton,

CA, USA) を用いてサイクルシーケンス反応を行い、CEQTM 2000 XL DNA Analysis System (BECKMAN COULTER) に適用して解析を行った。

第三項 解析遺伝子およびその多型/変異

先天性横紋筋融解症の原因遺伝子から 4 遺伝子 *CPT2*, *ACAD9*, *LDHA*, *PYGM* を選択し (Table I-2)、総計 106 箇所の多型解析を行った。

Table I-2. Candidate genes of statin-induced myopathies selected from inherited rhabdomyolysis-related genes

Symbol	Gene name	Location	Accession ID	Analyzed loci
<i>CPT2</i>	<i>carnitine palmitoyltransferase II</i>	1p13-p11	NM_000098	21
<i>ACAD9</i>	<i>acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member9</i>	3q21.3	NM_014049	36
<i>LDHA</i>	<i>lactate dehydrogenase A</i>	11p15.1-p14	NM_005566	7
<i>PYGM</i>	<i>phosphorylase, glycogen; muscle</i>	11q12-q13.2	NM_005609	42

先天性横紋筋融解症関連遺伝子の多型解析は、各々の遺伝子の欠損患者で報告されている既知変異および多型を対象とした。

CPT2 の遺伝子解析はその欠損患者で報告されている 19 座位の既知変異および多型 [39] を対象として行った。対象とした多型は以下の通りである：149C>A, 338C>T, 370C>T, 452G>A, 520G>A, 533insT;del, 641T>C, 680C>T, 907-918ins, 1145G>A, 1148T>A, 1238-9delAG, 1342T>C, 1436A>T, 1507C>T, 1646G>A, 1649A>G, 1657G>A, 1810C>T, 1883A>C, 1891C>T

PYGM の遺伝子解析はその欠損患者で報告されている 41 座位の既知変異および多型[48-53]を対象として行った。対象とした多型は以下の通りである：1A>C/G, 46G>TT, 74-87del, 148C>T, 159C>G, 255C>A, 280C>T, 347T>C, 373G>T, 415C>T, 580C>T, 613G>A, 622G>T, 808C>T, 875T>C, 1045G>A, 1086G>A, 1162insA;del, 1187T>C, 1463C>A, 1530delG, 1601delA, 1621G>T, 1628A>C, 1726C>T, 1768+1G>A, 1804C>T, 1805G>A, 1963G>A, 1979C>A, 1996C>G, 2053A>T, 2056G>C, 2059G>C, 2111C>T, 2125-7del, 2260delA, 2263C>T, 2312G>A, 2385-6delAA, 2392T>C

ACAD9 の遺伝子解析はその欠損患者で報告されている 35 座位の既知変異および多型[43, 54, 55]を対象として行った。対象とした多型は以下の通りである：128G>A, 473C>A, 476A>G, 520G>A, 553G>A, 637G>A, 552G>A, 728T>G, 740A>C, 779C>T, 790A>G, 830-832del, 842C>A, 948T>C, 869G>A, 881G>A, 897G>T, 950T>C, 1054G>A, 1096C>T, 1097G>A, 1141-43del, 1213G>C, 1246G>A, 1309A>G, 1322G>A, 1349G>A, 1358G>A, 1360G>A, 1367G>A, 1375C>T, 1388G>A, 1405C>T, 1406G>A, 1505T>C, 1804C>A

LDHA の遺伝子解析はその欠損患者で報告されている 7 座位の既知変異[22]を対象として行った。対象とした多型は以下の通りである：58insC, 244G>C, 369-71delTGT, 511C>T, 638-9delCT, 755-74del and 985G>T

第四項 遺伝子解析

多型解析は、症例および対照群患者の末梢血より抽出したゲノム DNA を用いて Appendix 2-4 に示した polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法またはダイレクトシーケンス法により行った。

多型領域を Appendix 2 に示した特異的プライマーを用いて PCR により増幅した。PCR 反応液の組成はゲノム DNA 1-2 ng/μL、sense/antisense primer 200 nM、deoxynucleotide triphosphate 各 200 nM、および Taq Polymerase または KOD *-plus-* polymerase 0.02 U/μL、Mg²⁺ 2.5 mM (Taq polymerase 使用時は MgCl₂ を KOD polymerase 使用時は MgSO₄ を用いた)とし、polymerase 添付 10x buffer および滅菌蒸留水で総量 50 μL として反応を行った。PCR は 95-96°C、20-60 sec (変性)、50-66°C、30sec (アニーリング)、68°Cまたは 72°C、15-300sec (伸長) を 35-40 サイクル行った (Appendix 3)。

PCR-RFLP 法による多型解析は、反応液総量 20 μL として Appendix 4 に示した方法で PCR 産物の切断を行い、得られた断片を 50 ng/mL のエチジウムブロマイドを含む 2-5%アガロースゲルを用いて TBE 緩衝液中で電気泳動を行い、312 nm の紫外線照射により検出した。

ダイレクトシーケンスによる解析は、得られた PCR 産物を Wizard[®] SN Gel and PCR Clean-Up System を用いて精製し、その約 0.1 pmol と Appendix 2 に示した primer (5 pmol)を用いて CEQTM DTCS-Quick Start Kit によるサイクルシーケンス反応を行い、CEQTM 2000 XL DNA Analysis System に適用することにより行った。得られたシーケンスの解析は、GenBank より得た各遺伝子のリファレンスシーケンスと照合することにより行った。

第五項 統計解析

症例/対照群における統計量の有意差検定は以下の方法で行った。年齢およびスタチン服用量の平均値について Mann-Whitney's U-test を、男女比については χ^2 検定を行った。症例/対照群間のアレル頻度の差は Fisher's exact test により検定した。有意差の判定は P<0.05 であった場合とした。Odds 比および Odds 比の 95%信頼区間は以下の式を用いて算出した。

$$Odds_ratio = \frac{ad}{bc}$$

a: case 群における危険因子保有者数

b: control 群における危険因子保有者数

c: case 群における危険因子非保有者数

d: control 群における危険因子非保有者数

$$95\%CI = \exp \left[\ln(OR) \pm 1.96 \sqrt{\frac{1}{A} + \frac{1}{B} + \frac{1}{C} + \frac{1}{D}} \right]$$

CI : Confidence interval

OR : Odds ratio

A, B, C, D : 2x2 分布表における各セルの値

また、各座位の遺伝子頻度の実測値とアレル頻度から求めた遺伝子頻度の予測値の間で χ^2 検定を行い、有意差がないことを確認することにより Hardy-Weinberg 平衡の成立を確認した。

統計解析は Statcel for Excel 2001 Macintosh edition (オーエムエス)を用いて行った。

第三節 結果

第一項 先天性横紋筋融解症原因遺伝子の既知変異の解析

症例群 10 例で行った先天性横紋筋融解症原因遺伝子の解析結果を Table I-3 に示した。*ACAD9* の 128G>A の変異が検出された以外、症例群で *ACAD9* のその他の既知変異、および *PYGM*, *LDHA*, *CPT2* の既知変異は検出されなかった。

Table I-3 Allele frequencies of inherited rhabdomyolysis-related genes in case patients treated with statins for hypercholesterolemia

Gene	Position	Genotype frequency (Number)				Allele frequency			Gene	Position	Genotype frequency (Number)				Allele frequency				
		n	w/w	w/m	m/m	n	w	m			n	w/w	w/m	m/m	n	w	m		
VLCAD	G128A	10	6	4	0	20	0.800	0.200	<i>continued from PYGM</i>	1162insA;del	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	C473A	10	10	0	0	20	1.000	0.000		PYGM	T1187C	10	10	0	0	20	1.000	0.000	
	A476G	10	10	0	0	20	1.000	0.000		C1463A	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	G520A	10	10	0	0	20	1.000	0.000		1530delG	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	G553A	10	10	0	0	20	1.000	0.000		1601delA	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	G637A	10	10	0	0	20	1.000	0.000		G1621T	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	G552A	10	10	0	0	20	1.000	0.000		A1628C	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	T728G	10	10	0	0	20	1.000	0.000		C1726T	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	A740C	10	10	0	0	20	1.000	0.000		G1768+1A	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	C779T	10	10	0	0	20	1.000	0.000		C1804T	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	A790G	10	10	0	0	20	1.000	0.000		G1805A	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	830-832del	10	10	0	0	20	1.000	0.000		G1963A	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	C842A	10	10	0	0	20	1.000	0.000		C1979A	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	T948C	10	10	0	0	20	1.000	0.000		C1996G	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	G869A	10	10	0	0	20	1.000	0.000		A2053T	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	G881A	10	10	0	0	20	1.000	0.000		G2056C	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	G897T	10	10	0	0	20	1.000	0.000		G2059C	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	T950C	10	10	0	0	20	1.000	0.000		C2111T	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	G1054A	10	10	0	0	20	1.000	0.000		2125-7del	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	C1096T	10	10	0	0	20	1.000	0.000		2260delA	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	G1097A	10	10	0	0	20	1.000	0.000		C2263T	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	1141-43del	10	10	0	0	20	1.000	0.000		G2312A	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	G1213C	10	10	0	0	20	1.000	0.000		2385-6delAA	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	G1246A	10	10	0	0	20	1.000	0.000		T2392C	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	A1309G	10	10	0	0	20	1.000	0.000		LDHA	58insC	10	10	0	0	20	1.000	0.000	
	G1322A	10	10	0	0	20	1.000	0.000			G244C	10	10	0	0	20	1.000	0.000	
	G1349A	10	10	0	0	20	1.000	0.000			369-71delTG'	10	10	0	0	20	1.000	0.000	
	G1358A	10	10	0	0	20	1.000	0.000			C511T	10	10	0	0	20	1.000	0.000	
	G1360A	10	10	0	0	20	1.000	0.000			638-9delCT	10	10	0	0	20	1.000	0.000	
	G1367A	10	10	0	0	20	1.000	0.000		755-74del	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	C1375T	10	10	0	0	20	1.000	0.000		G985T	10	10	0	0	20	1.000	0.000		
	G1388A	10	10	0	0	20	1.000	0.000		CPTII	C149A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	
	C1405T	10	10	0	0	20	1.000	0.000			C338T	10	10	0	0	20	1.000	0.000	
	G1406A	10	10	0	0	20	1.000	0.000			C370T	10	10	0	0	20	1.000	0.000	
	T1505C	10	10	0	0	20	1.000	0.000			G452A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	
	C1804A	10	10	0	0	20	1.000	0.000			G520A	10	10	0	0	20	1.000	0.000	
	PYGM	A1C/G	10	10	0	0	20	1.000			0.000	533insT;del	10	10	0	0	20	1.000	0.000
		G46TT	10	10	0	0	20	1.000			0.000	T641C	10	10	0	0	20	1.000	0.000
		74-87del	10	10	0	0	20	1.000			0.000	C680T	10	10	0	0	20	1.000	0.000
		C148T	10	10	0	0	20	1.000			0.000	907-918ins	10	10	0	0	20	1.000	0.000
		C159G	10	10	0	0	20	1.000			0.000	G1145A	10	10	0	0	20	1.000	0.000
C255A		10	10	0	0	20	1.000	0.000	T1148A	10	10	0	0	20	1.000	0.000			
C280T		10	10	0	0	20	1.000	0.000	1238-9delAG	10	10	0	0	20	1.000	0.000			
T347C		10	10	0	0	20	1.000	0.000	T1342C	10	10	0	0	20	1.000	0.000			
G373T		10	10	0	0	20	1.000	0.000	A1436T	10	10	0	0	20	1.000	0.000			
C415T		10	10	0	0	20	1.000	0.000	C1507T	10	10	0	0	20	1.000	0.000			
C580T		10	10	0	0	20	1.000	0.000	G1646A	10	10	0	0	20	1.000	0.000			
G613A		10	10	0	0	20	1.000	0.000	A1649G	10	10	0	0	20	1.000	0.000			
G622T		10	10	0	0	20	1.000	0.000	G1657A	10	10	0	0	20	1.000	0.000			
C808T		10	10	0	0	20	1.000	0.000	C1810T	10	10	0	0	20	1.000	0.000			
T875C		10	10	0	0	20	1.000	0.000	A1883C	10	10	0	0	20	1.000	0.000			
G1045A		10	10	0	0	20	1.000	0.000	C1891T	10	10	0	0	20	1.000	0.000			
G1086A		10	10	0	0	20	1.000	0.000											

第二項 症例群に見いだされた ACAD9, 128G>A の頻度解析

症例群において変異の検出された ACAD9, 128G>A について対照群についても解析を行いその頻度を症例群と比較したが、アレル頻度に症例/対照間で有意差は認められなかった (0.150 vs 0.341, $P=0.343$, Table I-4).

Table I-4 Genotype and allele frequencies of ACAD9 variants in case and control patients treated with statins for hypercholesterolemia

Position	Amino acid	Myopathy	Genotype frequency (Number)				Allele frequency			Hardy-Weinberg equilibrium (P value)	Fisher's exact test (P value)
			n	w/w	w/m	m/m	n	w	m		
128G>A	G43D	+	10	7	3	0	20	0.850	0.150	0.461	0.343
		-	26	16	8	2	52	0.769	0.231	0.497	

Hardy-Weinberg equilibrium was evaluated by Chi-square test.

Allele frequency differences were examined by Fisher's exact test.

第四節 考察

先天性横紋筋融解症原因遺伝子から選択した、*ACAD9*, *CPT2*, *PYGM*, *LDHA* の4 遺伝子については、先天性横紋筋融解症の既知変異は *ACAD9*, 128G>A (V128A) 以外、症例 10 例中に見いだされなかった。この変異は、機能低下を伴うアレルに連鎖したセカンドミューテーションであり、それ自体機能に影響を及ぼさないと考えられている[43]。本研究においても、*ACAD9*, 128G>A の症例および対照群の頻度に差は認められなかったことから、この変異は少なくとも単独ではスタチンによるミオパチーの感受性に影響を及ぼさない可能性が考えられた。

先天性横紋筋融解症は非常に稀な疾患で、その変異の殆どが先天性横紋筋融解症の症例の遺伝子解析により検出されているため一般の集団における頻度は不明である物が多いが、その患者数から考えて本研究で候補遺伝子として選択した先天性横紋筋融解症の原因遺伝子の既知変異の頻度は、非常に稀であり SNP (>1%) の基準を満たさないものが多いと考えられる。このような頻度の低い多型の関連性を case-control study で検出するには非常に多くの症例を収集する必要がある。先天性横紋筋融解症原因遺伝子の変異がスタチンによる横紋筋融解症の重要な決定要因であった場合は、症例中に変異を検出できる可能性を考え検討を行ったがミオパチーと関連性のある変異の検出には至らなかった。今回は、既知変異のみを対象としたが、疾患との関連性のないイントロン領域も含めた比較的頻度の高い SNPs を対象とした case-control study を行うことにより、今回選択した候補遺伝子 whole でのスタチンによるミオパチーへの寄与を推定できる可能性があり、そこから連鎖領域を検索することにより原因 SNP を決定できる可能性もあるため、今後検討していく必要があると考えられた。

第五節 小括

先天性横紋筋融解症の原因遺伝子から *ACAD9*, *PYGM*, *LDHA*, *CPT2* を候補遺伝子として選択し、その遺伝子多型および変異とスタチンによるミオパチーとの関連性について検討した。

1. スタチンよりミオパチーを発症した 10 症例における既知変異を検索したところ、*ACAD9* における *128G>A* が 4 例に heterozygote で検出された。しかし、その他の *ACAD9* の既知変異および *PYGM*, *LDHA*, *CPT2* の既知変異は検出されなかった。
2. 症例群に検出された *ACAD9*, *129G>A* について対照群 26 例についても解析を行い、そのアレル頻度を比較したが、有意な差は認められなかった ($P=0.343$)。

以上のことから、先天性横紋筋融解症の原因遺伝子から選択した 4 つの候補遺伝子における既知変異は、スタチンによるミオパチーに共通の要因ではない可能性が示唆された。

第二章 薬物動態関連遺伝子に関する検討

第一節 序文

ロバスタチンの臨床試験 (Extended Clinical Evaluation of Lovastatin: EXCEL)[16]において、筋症状と 10xULN 以上の CK 上昇と定義されたミオパチーの頻度は、0% (20mg/d, or 20mg did), 0.1% (40mg/d), 0.2% (80mg/d)と用量依存的に増加することが示されている。またセリバスタチン単独投与による横紋筋融解症の発症率も用量依存的に増加していたことが報告されている[5]。さらに、スタチンによる横紋筋融解症の頻度は薬物間相互作用により上昇することが知られている。FDA に報告のあったスタチンによる横紋筋融解症の 59%でスタチンの代謝に影響を及ぼす薬物との併用が認められており[17]、併用薬としてはミベフラジル (16%)、シクロスポリン (8%)、フィブラート (13%)、マクロライド (7%)、ワルファリン (5%)、ジゴキシシン (4%)、アゾール系抗真菌薬 (2%) が報告されている。特にセリバスタチンによる横紋筋融解症による死亡例の約半数で併用されていたゲムフィブロジルにより、セリバスタチンの血漿中濃度がプラセボ併用時の約3倍に上昇することが報告されている[56]。

これらのことから、横紋筋融解症のリスクはスタチンの血漿中濃度の上昇に伴い増大すると考えられる。また、薬物代謝酵素やトランスポーターの多型も薬物の血中濃度やその薬理毒性効果の個人間差の原因となることが知られている。そこで、スタチンのクリアランスへの寄与が大きいと考えられる薬物代謝酵素、トランスポーターから候補遺伝子を選択した。

候補遺伝子として、*cytochrome P450 3A4 (CYP3A4)*、*ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP) member 1 (ABCB1 or MDR1)*、*ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP) member 2 (ABCC2 or MRP2)*、*solute carrier organic anion transporter family, member 1B1 (SLCO1B1, OATP-C, SLC21A6 or OATP1B1)* を選択した。シンバスタチンおよびアトルバスタチンは主に CYP3A4 により代謝される[18]。また CYP3A4 の強力な阻害剤である HIV プロテアーゼ阻害剤、エリスロマイシン、アゾール系抗真菌薬はアトルバスタチン、シンバスタチンの血中濃度を上昇させるがプラバスタチンの体内動態には無影響であることが報告されている[18]。さらに、シンバスタチン、アトルバスタチンは ABCB1 の特異的基質であるジゴキシシンの血漿中濃度を上昇させるが、プラバスタチンは無影響である[18]。またプラバスタチンの体内動態において SLCO1B1 による肝臓への取り込みと ABCC2 による胆汁中排泄が重要な役割を果たしており[25]、肝特異的な分布や腸肝循環などのプラバスタチンに特徴的な体内動態の原因になっている。アトルバスタチンも SLCO1B1 の基質として輸送される[31]。以上により選択した4つの薬物動態関連遺伝子の多型とスタチンによるミオパチーの関連性を case-control study により検討した。

第二節 実験材料および方法

第一項 対象患者

第一章に記載した患者を対象とした。薬物動態関連遺伝子に関しては、各々の遺伝子の基質となるスタチンで患者をサブグループ化した場合についても解析を行ったため、各サブグループにおける年齢の平均、性別の構成比について症例/対照群間での有意差検定を行ったが、症例、対照群の年齢構成、男女比に有意差は認められなかった (Table II-1)。

Table I-1 Demographic comparison between patients with and without myopathy

		With myopathy			Without myopathy		
Age (years)	SMV or ATV	63	±	5	58	±	6
	PRV or ATV	58	±	6	57	±	10
	PRV	58	±	6	57	±	11
Sex male/female (total No)	SMV or ATV	2/4 (6)			2/6 (8)		
	PRV or ATV	3/4 (7)			7/15 (22)		
	PRV	2/4 (6)			7/11 (18)		

Data are expressed as mean \pm S.D. There were no significant differences in the mean values for age (Mann-Whitney's U test) and distribution of sex between the patients with and without myopathy (Chi-square analysis).

第二項 材料および機器

第一章に記載した材料および機器を用いた。

第三項 解析遺伝子およびその多型

薬物動態関連遺伝子から 4 遺伝子(*CYP3A4*, *ABCB1*, *ABCB1*, *ABCC2*, *SLCO1B1*) を選択し、総計 37 箇所の多型解析を行った (Table II-2)。

Table II-2 Candidate genes of statin-induced myopathies selected from statin-metabolizing enzymes and transporters

Symbol	Gene name	Location	Accession ID	Analyzed loci
<i>CYP3A4</i>	<i>cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4</i>	7q21.1	NM_000927	18
<i>ABCB1</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1</i>	7q21.1	NM_017460	3
<i>ABCC2</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2</i>	10q24	NM_000392	10
<i>SLCO1B1</i>	<i>solute carrier organic anion transporter family, member 1B1</i>	12p12	NM_006446	16

CYP3A4 の多型解析は coding 領域に報告されている 18 座位の多型 (www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp3a4.htm) について行った。対象とした多型は以下の通りである：44T>C, 167G>A, 352A>G, 389G>A, 485G>A, 508G>A, 520G>C, 554C>G, 566T>C, 664T>C, 653C>G, 831insA, 878T>C, 1088C>T, 1117C>T, 1247C>T, 1334T>C, 1399C>T

ABCC2 の多型解析は日本人 Dubin-Johnson 症候群患者で報告のある 5 座位の変異 [57] および健常日本人で報告されている 5 座位の SNPs [58] について行った。対象とした多型は以下の通りである：1815+2T>A, 1967+2T>C, 2439+2T>C, 3928C>T, 4145A>G, 1249G>A, 2302C>T, 2366C>T, 3972C>T, 4348G>A

SLCO1B1 の多型解析は報告のある 16 座位の nonsynonymous SNPs[59-61]について行った。対象とした多型は以下の通りである：217T>C, 245T>C, 388A>G, 452A>G, 455G>A, 463C>A, 467A>G, 521T>C, 578T>G, 1007C>G, 1058T>C, 1294A>G, 1385A>G, 1463G>C, 1964A>G, 2000A>G

ABCB1 の多型解析は表現型との関連が多く研究されている 3 座位の SNPs (1236C>T, 2677G>T/A, 3435C>T)に注目して行った[62]。

第四項 多型解析

多型解析は第一章に記載した方法と同様に行った。

なお *SLCO1B1* のハプロタイプ解析を以下の方法により行った。ダイレクトシーケンスの結果、*SLCO1B1* の 388A>G および 521T>C の両方が heterozygote であった場合、ハプロタイプは *SLCO1B1**1a/*15 または *1b/*5 の両方の可能性が考えられる。この場合のハプロタイプの判別を Nozawa らの報告に従って allele-specific PCR-RFLP 法により行った[63]。具体的には、521C (mt)と 521T (wt)に特異的なプライマーを用い、388A>G と 521T>C を含む 1945 bp の領域を増幅した。この PCR 産物を用い 388A>G の多型について *TaqI* による RFLP を行うことによりハプロタイプを決定した。つまり、*SLCO1B1**1b または *15 の場合には、各々 wt primer (*1b) または mt primer (*15) で増幅した PCR 産

物を *TaqI* 処理することにより 1875, 47, 23bp の断片が得られる。一方、*SLCO1B1**1a および*5 の場合には、wt primer (*1a) または mt primer (*5) で増幅した PCR 産物の各々で 1875, 70 bp の断片が得られるので、47bp または 70 bp の断片の生成を検出することによりハプロタイプを決定した。

521C(wt)プライマー (reverse) の配列は 5'-ATATTACCCATGAACA-3'、521T(mt)の配列(reverse)は 5'-ATATTACCCATGAACG-3'、sense プライマーの配列は 5'-CATGTGGATATATGT-3'を用いた。得られた断片長は、50ng/mL のエチジウムブロマイドを含む 5% アガロースゲル(NuSieve / SeaKem=1/3)を用いて電気泳動を行い、312 nm の紫外線照射により検出した。

第五項 統計解析

第一章に記載した方法と同様に行った。

第三節 結果

第一項 *CYP3A4*

CYP3A4 の 18 箇所の多型を調べた結果、*CYP3A4**18 が症例および対照群の各々 1 例が heterozygote で検出された (Table II-3)。*CYP3A4**18 の症例 (n=10) および対照 (n=26) 群におけるアレル頻度は、各々 0.050, 0.019 であった。しかし両群のアレル頻度に有意な差は認められなかった ($P=0.481$)。また、対象を *CYP3A4* の基質であるシンバスタチンおよびアトルバスタチン服用患者に限定して解析を行ったが、症例 (n=6) および対象 (n=8) 群のアレル頻度に有意な差は認められなかった ($P=0.683$)。なお、対照群 (n=26) における *CYP3A4**18 のアレル頻度 0.019 は、健常日本人におけるアレル頻度 0.013-0.028 と一致した[64, 65]。

Table II-3 Genotype and allele frequencies of *CYP3A4* variants in case and control patients treated with statins for hypercholesterolemia

Subject	Loci	Amino acid	Myopathy	Genotype frequency				Allele frequency			Hardy-Weinberg equilibrium (P value)	Allele frequency difference (P value)	
				n	w/w	w/m	m/m	n	w	m			
All	878T>C	*18	L293P	+	10	9	1	0	20	0.950	0.050	0.868 0.920	0.481
				-	26	25	1	0	52	0.981	0.019		
SMV or ATV	878T>C	*18	L293P	+	6	5	1	0	12	0.917	0.083	0.824 0.850	0.683
				-	8	7	1	0	16	0.938	0.063		

Hardy-Weinberg equilibrium was evaluated by Chi-square test.

Allele frequency differences were examined by Fisher's exact test.

SMV, simvastatin; ATV, atorvastatin

第二項 *ABCB1 (MDR1)*

2677G>A/T, 1236C>T および 3435C>T について解析した結果を Table II-4 に示した。1236C>T および 3435C>T においては症例および対象群のアレル頻度に有意な差は認められなかったが、2677G/T>A のアレル頻度が症例群で有意に高かった(0.250 vs 0.058, $P=0.033$)。

次に対象を *ABCB1* の基質であるシンバスタチンおよびアトルバスタチン服用患者に限定して解析を行ったところ、同様の結果が得られ、対象全体で解析した場合よりも低い危険率が得られた (0.250 vs 0.000, $P=0.024$)。

プラバスタチンによるミオパチーとこの変異の関連性を調べるため、プラバスタチン服用患者 (症例 $n=6$ /対照 $n=19$) とプラバスタチン服用患者からさらにプラバスタチン、アトルバスタチンの両方でミオパチーを起こした患者を除いた場合 (症例 $n=4$ /対照 $n=18$) について解析した。その結果、どちらのサブグループにおいても 2677G/T>A の頻度に関して症例および対照群で有意な差が認められなかった (0.250 vs 0.079, $P=0.141$ and 0.125 vs 0.083, $P=0.566$, respectively)。対照群におけるアレル頻度は、健常日本人で報告されている頻度とほぼ一致したが、2677A のアレル頻度は健常日本人で報告されている頻度 (0.15-0.22) [62] より低い傾向が認められた。

第三項 *ABCC2 (MRP2)*

健常日本人で報告されている5座位のSNPs および日本人 Dubin-Johnson 症候群患者で報告されている5座位の変異について検討したところ、健常日本人で報告されている 1249G>A および 3972C>T が検出された。しかしながら、いずれのSNPにおいても症例/対照群間でアレル頻度に有意な差は認められなかった (0.150 vs 0.154, $P=0.640$ and 0.300 vs 0.231, $P=0.373$, respectively, Table II-5)。また、基質であるプラバスタチンで対象をサブグループ化して解析した場合においても同様であった (0.250 vs 0.132, $P=0.287$ and 0.160 vs 0.237, $P=0.472$, respectively)。対照群における 1249G>A および 3972C>T のアレル頻度は、健常日本人で報告されている頻度 (0.125 および 0.219) [58] と近い値が得られた。

Table II-4 Genotype and Allele frequencies of *ABCB1* SNPs in case and control patients treated with statins for hypercholesterolemia

Subject	Loci	Amino acid	Myopathy	Genotype frequency (Number)				Allele frequency			Hardy-Weinberg equilibrium (P value)	Allele frequency difference (P value)					
				n	w/w	w/m	m/m	n	w	m							
All	1236C>T	synonymous	+	10	2	5	3	20	0.450	0.550	0.975	0.920					
			-	26	3	10	13	52	0.308	0.692	0.620						
	2677G>T/A	A893S/T	+	10	2	G/G	4	G/T	0	T/T	20	0.450	0.300	T	0.975	1) 0.296	T
			-	26	8	G/G	10	G/T	5	T/T	52	0.538	0.404	T	0.716	1)	
	3435C>T	synonymous	+	10	2		6	2	20	0.500	0.500	0.527	0.429				
			-	26	5		13	8	52	0.442	0.558	0.945					
SMV or ATV	1236C>T	synonymous	+	6	2	2	2	12	0.500	0.500	0.414	0.391					
			-	8	1	4	3	16	0.375	0.625	0.850						
	2677G>T/A	A893S/T	+	6	1	G/G	2	G/T	0	T/T	12	0.417	0.250	T	0.944	1) 0.528	T
			-	8	4	G/G	3	G/T	1	T/T	16	0.688	0.313	T	0.719	1)	
	3435C>T	synonymous	+	6	1	4	1	12	0.500	0.500	0.414	0.391					
			-	8	1	4	3	16	0.375	0.625	0.850						
PRV	1236C>T	synonymous	+	6	1	4	1	12	0.500	0.500	0.414	0.120					
			-	19	2	6	11	38	0.263	0.737	0.418						
	2677G>T/A	A893S/T	+	6	1	G/G	3	G/T	0	T/T	12	0.417	0.333	T	0.819	1) 0.425	T
			-	19	5	G/G	7	G/T	4	T/T	38	0.500	0.421	T	0.944	1)	
	3435C>T	synonymous	+	6	2	3	1	12	0.583	0.417	0.944	0.312					
			-	19	4	9	6	38	0.447	0.553	0.855						
PRV-(PRV/ATV)	1236C>T	synonymous	+	4	0	3	1	8	0.375	0.625	0.230	0.836					
			-	18	2	6	10	36	0.278	0.722	0.473						
	2677G>T/A	A893S/T	+	4	1	G/G	2	G/T	0	T/T	8	0.375	0.375	T	1.000	1) 0.519	T
			-	18	4	G/G	7	G/T	4	T/T	36	0.472	0.444	T	0.990	1)	
	3435C>T	synonymous	+	4	1	2	1	8	0.500	0.500	1.000	0.596					
			-	18	4	9	5	36	0.472	0.528	0.990						

Allele frequency differences were examined by Fisher's exact test.

Table II-5 Genotype and Allele frequencies of *ABCC2* SNPs in case and control patients treated with statins for hypercholesterolemia

Subject	Position	Amino acid	Myopathy	Genotype frequency (Number)				Allele frequency			Hardy-Weinberg equilibrium (P value)	Allele frequency difference (P value)
				n	w/w	w/m	m/m	n	w	m		
All	1249G>A	V417I	+	10	7	3	0	20	0.850	0.150	0.577	0.640
			-	26	20	4	2	52	0.846	0.154	0.037	*
	3972C>T	Synonymous	+	10	4	6	0	20	0.700	0.300	0.175	0.373
			-	26	14	12	0	52	0.769	0.231	0.126	
Pravastatin	1249G>A	V417I	+	6	3	3	0	12	0.750	0.250	0.414	0.287
			-	19	15	3	1	38	0.868	0.132	0.178	
	3972C>T	Synonymous	+	6	4	2	0	12	0.833	0.167	0.624	0.472
			-	19	10	9	0	38	0.763	0.237	0.176	

Hardy-Weinberg equilibrium were examined by Chi-square test.
Allele frequency differences were examined by Fisher's exact test.

第四項 *SLCO1B1* (OATP-C)

症例群において、*SLCO1B1* のアミノ酸置換を伴う 16 箇所の既知 SNPs を調べた結果、388A>G, 521T>C, 1007C>G の変異が検出され、その他 13 箇所の SNPs は全て wild type であった。症例 (n=10) および対象 (n=26) 群間のアレル頻度を比較したところ、いずれの SNPs においても有意な差は認められなかった ($P=0.182$, $P=0.068$ and $P=0.278$, respectively, Table II-6)。しかしながら、対象を *SLCO1B1* の基質[31]であるプラバスタチンおよびアトルバスタチン服用患者に限定して解析したところ、521T>C の症例群におけるアレル頻度 (n=7, 0.659) が対照群 (n=22, 0.130) に比較して高いことが明らかとなった ($P=0.017$, Table II-6)。

Table II-6 Genotype and Allele frequencies of *SLCO1B1* SNPs in case and control patients treated with statins for hypercholesterolemia

Subject	Position	Amino acid	Myopathy	Genotype frequency (Number)				Allele frequency			Hardy-Weinberg equilibrium (P value)	Allele frequency difference (P value)
				n	w/w	w/m	m/m	n	w	m		
All	388A>G	N130D	+	10	0	3	7	20	0.150	0.850	0.577	0.182
			-	26	3	9	14	52	0.288	0.712	0.424	
	521T>C	V174A	+	10	4	5	1	20	0.650	0.350	0.754	0.068
			-	26	20	4	2	52	0.846	0.154	0.037	
	1007C>G	P336R	+	10	9	1	0	20	0.950	0.050	0.868	0.278
			-	26	26	0	0	52	1.000	0.000	ND	
PRV or ATV	388A>G	N130D	+	7	0	2	5	14	0.143	0.857	0.659	0.331
			-	22	1	9	12	44	0.250	0.750	0.670	
	521T>C	V174A	+	7	2	4	1	14	0.571	0.429	0.659	0.017
			-	22	18	3	1	44	0.886	0.114	0.130	
	1007C>G	P336R	+	7	5	1	0	14	0.917	0.083	0.824	0.241
			-	22	22	0	0	44	1.000	0.000	ND	

Hardy-Weinberg equilibrium were examined by Chi-square test.
Allele frequency differences were examined by Fisher's exact test.
PRV, pravastatin; ATV, atorvastatin

521T>C は 388A>G と連鎖しているため、521T>C のみを含む *SLCO1B1**15 と 388A>G と 521T>C の両方を含む*15 の 2 つのハプロタイプを生じる。そこで、ハプロタイプ解析を行い、521T>C の属するハプロタイプを決定した。その結果、本研究における症例および対照群のすべての 521T>C を含むハプロタイプは *SLCO1B1**15 であることが明らかとなった (Table II-7, II-8)。また、症例群の*15 を homozygote で有する 1 例において 1007C>G が heterozygote で検出されたことから、1007G と*15 が連鎖した新規のハプロタイプを heterozygote で保有することが明らかとなった。この新規のハプロタイプの機能は*15 とほぼ同等であるため[31]、*15 に含めて頻度解析を行ったところ、*15 のハプロタイプ頻度はプラバスタチンまたはアトルバスタチンを服用した症例群 (n=14) で対照群 (n=44) に比較して有意に高いことが明らかとなった (0.429 vs 0.114, $P=0.017$)。

Table II-7 Diplotype frequencies of *SLCO1B1* in case and control patients treated with statins for hypercholesterolemia

Subject	Diplotype	Myopathy		Control	
		Number	ratio	Number	ratio
All	*1a/*1a	0	0.000	3	0.120
	*1a/*1b	1	0.100	9	0.360
	*1b/*1b	3	0.300	7	0.280
	*1a/*15	2	0.200	0	0.000
	*1b/*15	3	0.300	4	0.160
	*15/*15	1	0.100	2	0.080
	total	10	1.000	25	1.000
PRV or ATV	*1a/*1a	0	0.000	1	0.045
	*1a/*1b	1	0.143	9	0.409
	*1b/*1b	1	0.143	8	0.364
	*1a/*15	1	0.143	0	0.000
	*1b/*15	3	0.429	3	0.136
	*15/*15	1	0.143	1	0.045
	total	7	1.000	22	1.000

Table II-8 Haplotype frequencies of *SLCO1B1* in case and control patients treated with statins for hypercholesterolemia

Subject	Haplotype	Myopathy		Control		Fisher's exact test P value
		Number	ratio	Number	ratio	
All	*1a	3	0.150	15	0.288	0.182
	*1b	10	0.500	29	0.558	0.429
	*5	0	0.000	0	0.000	
	*15	7	0.350	8	0.154	0.068
	total	20	1.000	52	1.000	
ARV or ATV	*1a	2	0.143	11	0.250	0.331
	*1b	6	0.429	28	0.636	0.144
	*5	0	0.000	0	0.000	
	*15	6	0.429	5	0.114	0.017
	total	14	1.000	44	1.000	

次に、プラバスタチンおよびアトルバスタチン服用患者において *SLCO1B1**15 を 1 アレル以上有する患者の頻度を比較したところ、症例群における *SLCO1B1**15 の保持率(71.4%)は対照群(18.2%)に比較して有意に高かった ($P=0.0164$, Fig. II-1)。Odds 比は 11.3 (95% Confidence interval=1.58–80.3) であった。

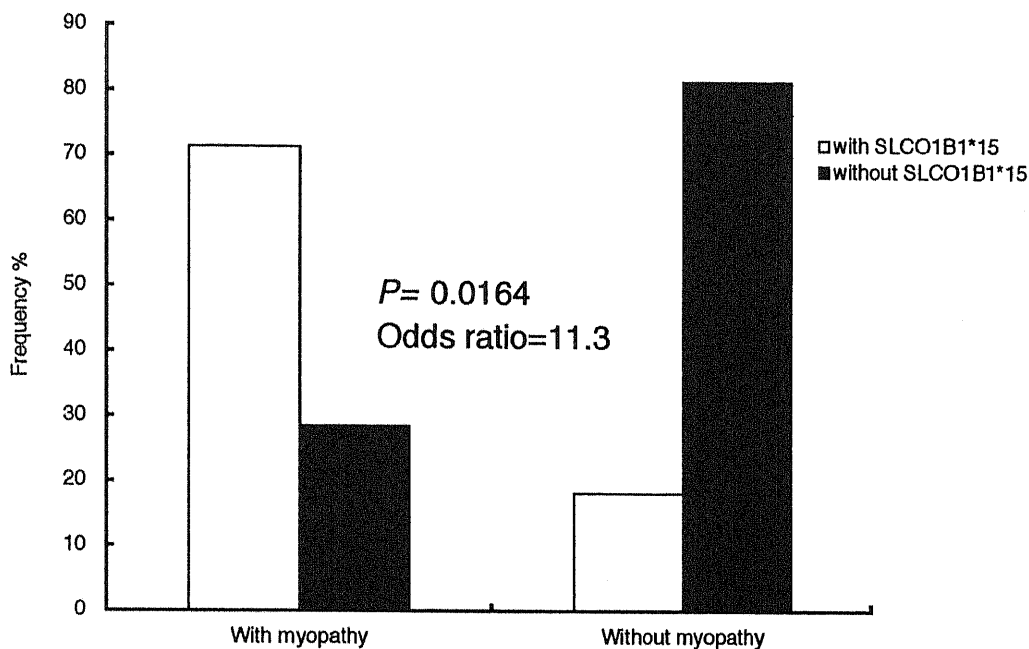


Fig. II-1 Association between *SLCO1B1**15 and myopathy in patients receiving pravastatin or atorvastatin

The percentage of carriers of one or more *SLCO1B1**15 in the patients who experienced pravastatin- or atorvastatin-induced myopathy was significantly ($P < 0.05$) higher than that of the control patients without myopathy. An odds ratio of 11.3 (95% confidence interval, 1.6 – 80.3, $P < 0.05$) was obtained, when the possession of one or more *SLCO1B1**15 was compared.

第四節 考察

*SLCO1B1**15 とプラバスタチンおよびアトルバスタチンによるミオパチーとの関連性が本研究により明らかとなった。*SLCO1B1**15 保有者がこれらのスタチンによりミオパチーを起こす危険性は*15 非保有者に比較して 11.3 倍大きいと推定された (case, n=7; control, n=22; $P=0.016$, OR=11.3, 95%CI=1.58 – 80.3) ことから、*SLCO1B1**15 がこれらのスタチンによるミオパチーの大きな危険因子の一つであることが明らかとなった。

SLCO1B1 は肝臓特異的な有機アニオントランスポーターであり、プラバスタチン、タウロコール酸、ロイコトリエン、メトトレキサート、エストラジオール-17 β グルクロニド、エストロン硫酸、プロスタグランジン E2 等の様々な内因性および外因性基質の血液中から肝細胞内への輸送に重要な役割を果たしている[66]。

521T>C (V174A)を含む *SLCO1B1* のハプロタイプには 388A>G と 521T>C を同時に含む*15 と

388A>G を含まない*5 が存在する。日本人およびフィンランド人においては*15 が多く検出されるが[59, 63, 67]、ドイツ人および European-American においては N130D 変異を伴わない*5 が多く検出されている[60, 68]。本研究においても*5 は検出されず、日本人における報告と一致した。SLCO1B1 は 12 回膜貫通型のトランスポーターで、N130D および V174A は各々、細胞外ループ領域および第 4 膜貫通領域に存在している。SLCO1B1 の機能ドメインに関しては報告がないが、SLCO1B1*5 を含む SLCO1B1 の膜貫通領域に存在する多型および変異は、エストロン硫酸、エストラジオールの輸送能を極端に低下させる[60]。これはタンパクの形質膜へのソーティング異常により形質膜上での発現量が低下しているためであることが示されている[60]。また Km には影響がないことから、この領域は基質認識領域ではない可能性が考えられる[60]。SLCO1B1*15 の輸送能に関しては不明であったが、最近プラバスタチンおよびアトルバスタチンの輸送能(V_{max})がリファレンスタイプである*1a の 1/4 - 1/5 に低下することが示された[31]。

さらに SLCO1B1*15 は in vivo においてもプラバスタチンの体内動態に大きな影響を及ぼすことが、日本人[59]およびフィンランド人[67]において示されている。健常日本人におけるプラバスタチンの腎外クリアランスは、日本人で最も頻度の高いハプロタイプである SLCO1B1*1b の homozygote(n=4)に比較し SLCO1B1*15/*15(n=1)で 87%、SLCO1B1*1b/*15(n=4)で約 50%低いことが示されている[59]。フィンランド人においても、その AUC が SLCO1B1*15 の heterozygote(n=4)で非保有者の 1.9 倍に上昇することが示されている。

またプラバスタチンの筋肉移行性は少なくとも実験動物においては血漿中濃度に比例して線形的に増加することが示されている[69]ことから、SLCO1B1*15 保有者ではプラバスタチンの血漿中濃度のみならず筋肉組織におけるプラバスタチンの暴露量も SLCO1B1*15 非保有者に比較して増大していると考えられ、このことが原因となってプラバスタチンによるミオパチーに対する感受性が増大している可能性が推察された。

一方、SLCO1B1*15 がアトルバスタチンの体内動態に及ぼす影響については報告がないが、最近 SLCO1B1 一過性発現細胞におけるアトルバスタチンの膜透過クリアランスもプラバスタチンと同様、*1a の 1/2 以下に低下していることが示されている[31]。また、その報告の中でシンバスタチンは SLCO1B1 の基質としては輸送されないことが示されている。シンバスタチンは脂溶性が高いため、受動拡散により十分速やかに細胞膜を通過すると考えられる。従って、本研究において、プラバスタチンおよびアトルバスタチンによるミオパチーと SLCO1B1*15 の関連性が認められたことと合わせて考えると、SLCO1B1 の多型はアトルバスタチンの体内動態にも少なからず影響を及ぼしている可能性が推察された。また、本研究における症例群の 2 例はプラバスタチンとアトルバスタチンの両方でミオパチーを経験しており、その 2 症例が SLCO1B1*15 の保有者であったことから、SLCO1B1*15 がプラバスタチンとアトルバスタチンによるミオパチーに共通の遺伝要因である可能性が推察される。

SLCO1B1 の 521T>C は日本人[59, 63]、フィンランド人[67]、ドイツ人[68]、European-American[60]に共通して比較的高い頻度で認められる SNP であるが (各々の人種におけるアレル頻度は、0.11-0.16、0.14、0.15、0.14)、ハプロタイプは人種間で異なっており、日本人、フィンランド人では*15 が主要なハプロタイプであるのに対し (ハプロタイプ頻度は各々0.10-0.15 および0.18) [59, 63, 67]、ドイツ人、European-American においては*5 (ハプロタイプ頻度は各々0.15 および0.14) [60, 68]が報告されている。ドイツ人で*5 を保有する個体でプラバスタチンのクリアランスが非保有者の約 1/2 に低下することが示されていることから、Caucasian においては*5 が*15 と同様にプラバスタチンおよびアトルバスタチンによるミオパチーの危険因子となる可能性があると考えられた。

ABCB1 における 2677G>A のアレル頻度がシンバスタチンまたはアトルバスタチン服用患者の症例群で有意に高かったことから、この多型もシンバスタチンまたはアトルバスタチンによるミオパチーに何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。しかし、*ABCB1* の 2677G>A の輸送活性に及ぼす影響については 3435G>T との連鎖の有無に関わらず輸送能に影響を及ぼさないことが LLC-PK1 細胞を用いた変異導入 *ABCB1* 安定発現系で4種類の基質の輸送実験により示されている[70]。

2677G>A は細胞内ドメインに近接した第 10 膜貫通ドメイン (MSD10)上の 893 番目の Ala から Thr への置換を伴う SNP である[71]。この領域は *ABCB1* の基質認識に重要と考えられる領域[71, 72]で、MSD10 上の Pro866 を Ala に置換することにより、ビンブラスチンに対する抵抗性は変化しないがコルヒチン等への抵抗性およびトランスポート活性が消失することが報告されている[72]。A893T が細胞内に面していた場合、サイトゾル中のキナーゼによるリン酸化を受け、活性が変動する可能性も考えられる。実際、*ABCB1* はプロテインキナーゼ C によりリン酸化を受けて活性化されていることを示唆する報告もある[73]。

MDR1 の genotype-phenotype の関連性については、基質輸送能、*MDR1* の発現量、他の遺伝子との連鎖、基質の体内動態、薬物の治療効果、疾病との関連性などについて多くの報告があるが、一致した知見が得られておらず混沌としている[65]。ミオパチーとの関連の示唆された 2677A のアレル頻度は日本人においては 9-22%と比較的高い頻度で認められるが、コーカシアンにおいては 2-10%と比較的稀な SNP である[62]。そのためか、2677G>A の影響を 2677G>T と合わせて一つの変異として評価した報告が多いが、最近韓国人において、2677A の homozygote では 2677G の homozygote に比較してフェキソフェナジンの血漿中濃度が 17%低く、2677T の homozygote では 47%高かったことが報告されている[74]。この結果がシンバスタチンやアトルバスタチンにもあてはまる場合、今回検出された関連性は血漿濃度の上昇では説明できない。一方、メカニズムは不明であるものの、*ABCB1* を発現している細胞の方が発現していない細胞に比較してロバスタチンによるアポトーシスに対する感受性が高いという報告があることから、単純に血中濃度や細胞内濃度ではなくメカニズムに *ABCB1* の多型が影

響を及ぼしている可能性も考えられた[75]。いずれにしても、今回の得られた結果は少数例での結果であり、偶然誤った関連性を検出した可能性もあるため、今後多数の症例を収集して確認する必要がある。

また、今回は対象としなかったが、MDR1 上流領域の多型がその発現量に大きな影響を及ぼしていることが最近示された[76]。この多型はこれまでの報告の中で最も影響が大きいことが示されているため、今後検討する必要があると考えられる。

なお本研究における対象群患者の 2677G>A 頻度が日本人で報告されている頻度[62]よりも低値を示した原因は不明であるが、最近、ABCB1 がコレステロールの形質膜から細胞内膜への輸送に関わっている可能性も示唆されてきているため[77-80]、この SNP が高コレステロール血症に関連している可能性も推察された。

ABCC2 および CYP3A4 の多型とスタチンによるミオパチーの関連性は検出することができなかった。最近、健常フィンランド人においてプラバスタチンの血中濃度の高濃度側逸脱例と非逸脱例の間で ABCC2 の SNP のアレル頻度を比較したところ、逸脱例に多い SNP は認められなかったと報告されている[67]。このことから、健常人に検出されるような頻度の高い多型は少なくともプラバスタチンの血中濃度には影響を及ぼさない可能性が推察された。一方、ABCC2 欠損ラットである Eisai Hyperbilirubinemic Rat (EHBR) は SD ラットに比較してプラバスタチンによる横紋筋融解症に高感受性であり、これは ABCC2 の欠損によりプラバスタチンの胆汁中排泄が遅延し、血中濃度が上昇するためであることが示されている[81]。Dubin-Johnson 症候群 (DJS) は ABCC2 の遺伝的欠損のため起こる高ビリルビン血症であるが、日本人においても 30 万人に 1 人の割合で DJS 患者が存在すると推定されている[82]。DJS 患者に検出されている変異は頻度が低く本研究においては検出されなかったが、ABCC2 はヒトにおいてもプラバスタチンの胆汁中排泄に重要な役割を果たしていることや EHBR における結果を合わせて考えると、ABCC2 の機能低下を伴う多型保有者はプラバスタチンによるミオパチーに感受性が高い可能性があると考えられる。また、健常日本人でのアレル頻度が 1% と報告されている SNP である 2302C>T, 2366C>T, 4348G>A について本研究でも検討したが検出されなかった。しかし、これらは ABCC2 の nucleotide binding domain (NBD) に存在しておりアミノ酸の極性変化を伴うため、大きな機能低下を伴う可能性がある。従って、今後も症例数を増やして続けて検討する必要があると考えられた。

CYP3A4 に関しては coding 領域の 18 種の多型について検討したが、スタチンによるミオパチーとの関連性は見いだせなかった。CYP3A4 の見かけの固有クリアランスには 35-50 倍の個人差があることが報告されており、その 66-98% は遺伝的要因によるものである可能性が示唆されている[83, 84]。ス

タチンによるミオパチーは CYP3A4 と相互作用がある薬物の併用で多く報告されている[18]ことから、CYP3A4 の活性低下を伴う遺伝多型もミオパチーの原因となり得る。日本人においては coding 領域に、*6, *11, *16, *18 が検出されており、*11 は発現量の低下、*6 は代謝活性の低下を伴うことが報告されているが、そのアレル頻度は*11 で 0.002、*6 で 0.001 と非常に低い[64, 65, 84, 85]。このことが原因で関連性を検出できなかった可能性が考えられる。今回は解析の対象とはしなかったが、CYP3A4 のプロモーター[85]およびエンハンサー[86]領域の多型、CYP3A4 の発現量の調節に関与する PXR[87-89], VDR[90], GH[91, 92], GR[93, 94]等の遺伝子多型は全て CYP3A4 の固有クリアランスの個人差の原因となる可能性がある。しかし、CYP3A4 プロモーターおよびエンハンサー領域の多型は日本人では検出されていない。PXR の多型頻度は 0.2% である。また白人において PXR の発現量と CYP3A4 の発現量の間には良好な相関関係があることが示されている[89]が、VDR, GH, GR の多型と in vivo における CYP3A4 の発現量との直接の相関関係は現在のところ不明である。CYP3A4 の発現量ならびに代謝活性の個人差を決定づける遺伝要因の解明が待たれる。

本研究において、*SLCO1B1**15 がプラバスタチンおよびアトルバスタチンによるミオパチーの危険因子の一つであることが明らかとなった。スタチンは高脂血症治療の第一選択薬となっている。さらに、日本における心疾患、脳血管疾患による死亡率が全体の 30% を占めていることから非常に多くの高脂血症患者がスタチンを服用していることが想像できる。このように日常的に使用されているが致死的な副作用を起こすことがある薬物をより安全に使用するための手段の一つとして、遺伝子診断による副作用の予測は有用であると考えられる。プラバスタチンおよびアトルバスタチンによるミオパチーの予測を目的とした遺伝子診断を考えた場合、*SLCO1B1**15 のタイピングを行うことは有用であると考えられる。しかし、日本人においては 4 人に 1 人がこのハプロタイプ保有者である一方、スタチンによる筋肉障害の発症率は自覚症状のみの軽症の場合においても 5% (20 人に 1 人) と報告されている。従って、*SLCO1B1**15 のみで診断した場合、実際には副作用を起こさない患者まで本来安全性の高い水溶性スタチンによる治療から除外してしまうことになる。このことから、プラバスタチンおよびアトルバスタチンによるミオパチーの発症にはさらに付加的な要因が重なっていることが推測される。付加的な要因には併用薬との相互作用なども含まれると考えられるが、遺伝的要因も関与している可能性があるため、今後明らかにしていく必要がある。

また本研究では、シンバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン服用患者を対象としたが、ピタバスタチン[29, 30]、ロスバスタチン[28]、セリバスタチン[26]も *SLCO1B1* の基質となることが報告されている。特にピタバスタチンは体内で殆ど代謝を受けず、腸肝循環を繰り返す特徴を有しており、その肝臓への取り込みの約 90% は *SLCO1B1* で説明できると推定されている[29, 30]。従って、これらのスタチンによるミオパチーの発症にも *SLCO1B1**15 が関与している可能性があるため、注意す

る必要があると考えられた。

第五節 小括

スタチンによるミオパチーと薬物動態関連遺伝子の多型との関連性を明らかにする目的で、スタチンのクリアランスにおいて主要な役割をはたしている *CYP3A4*、*ABCB1*、*ABCC2*、*SLCO1B1* を候補遺伝子として選択し、その多型とスタチンによるミオパチーとの関連性について case-control study を行い、以下の結果を得た。

1. *CYP3A4* の多型とミオパチーとの関連性は検出されなかった。
2. *ABCB1* 2677G>A のアレル頻度はシンバスタチンおよびアトルバスタチンによるミオパチーの症例群(n=6, 0.333)で対照群(n=8, 0.000)に比較して有意に高かった ($P=0.024$)。
3. *ABCC2* の多型とミオパチーとの関連性は検出されなかった。
4. *SLCO1B1**15 の頻度はプラバスタチンおよびアトルバスタチンによるミオパチーの症例群(n=7, 0.429)で対照群(n=22, 0.114)に比較して有意に高かった ($P=0.017$)。また、1 アレル以上の*15 保有率から求めた Odds 比は 11.3 ($P=0.0164$, 95% CI: 1.58 - 80.3)であった。

以上の結果から、*ABCB1* 2677G>A 多型はシンバスタチンおよびアトルバスタチンによるミオパチーの発症に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。また、*SLCO1B1**15 はプラバスタチンおよびアトルバスタチンによるミオパチーの危険因子の一つである可能性が強く示唆された。

第三章 プラバスタチンによりミオパチーを起こした一症例における *SLCO1B1* の新規変異

第一節 序文

SLCO1B1 (OATP-C) は様々な内因性および外因性有機アニオンの肝取り込みに重要な役割を果たしている[95]。また、*SLCO1B1* の膜貫通領域に存在する多型の一つである *SLCO1B1**15 は、プラバスタチンの全身クリアランスを低下させることが報告されている[59, 67]。第二章で、*SLCO1B1**15 の保有者がプラバスタチンまたはアトルバスタチンでミオパチーを起こした症例中に多いことが明らかとなった。また、*SLCO1B1* 一過性発現 HEK293 細胞におけるプラバスタチンおよびアトルバスタチンの膜透過クリアランスは、そのリファレンスタイプである *1a に比較して *15 で著しくて以下していることが示されている[31]。これらのことから、*SLCO1B1**15 保有者はプラバスタチンおよびアトルバスタチンの血漿中濃度が *15 非保有者に比較して高いため、筋肉におけるスタチン暴露量も非保有者に比較して増大しており、これにより筋肉障害に対する感受性が高くなっている可能性が示唆される。

しかしながら、本研究ではこれらのスタチンでミオパチーを発症した患者の 7 例中 2 例は *SLCO1B1**15 および機能低下を伴う既知変異を保有していなかった。そこで我々は、この 2 症例の *SLCO1B1* の全エクソンおよびエクソン-イントロン結合部位のシークエンスを行い、その 1 症例からエクソン 12 に存在する新規の変異を検出した。

第二節 実験材料および方法

第一項 ゲノム DNA 試料

プラバスタチンまたはアトルバスタチンによりミオパチーを発症した患者で *SLCO1B1**15 が検出されなかった 2 症例の末梢血ゲノム DNA を用いた。また健常日本人ボランティア 50 人より得たゲノム DNA を用いて、ミオパチー患者 1 症例より検出された新規変異のアレル頻度を検討した。いずれの場合も実験の目的、方法、結果から得られる情報の取り扱い等について口頭および文章による説明を行い、同意を得た。また本研究は千葉大学薬学研究院倫理委員会の承認を得た。

第二項 材料および機器

対象患者の血液からのゲノム DNA の抽出は、(株) エスアールエルに委託して Phenol-Chloroform 抽出法により行った。DNA polymerase は、Ampli Taq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster, CA,

USA)、TaKaRa LA Taq™ (Takara, Shiga, Japan)、KOD-plus-(Toyobo, Osaka, Japan) を用いた。サーマルサイクラーは、PTC-100™ (MJ Research, INC., Waltham, MA, USA)、Mini Cyclor™ (MJ Research, INC)、GeneAmp 2700 (Applied Biosystems) を用いた。電気泳動装置は Mupid-2 (Advance. Co, Ltd, Tolyo, Japan) を用いた。ダイレクトシーケンスは CEQ™ DTCS-Quick Start Kit (BECKMAN COULTER, Fullerton, CA, USA) を用いてサイクルシーケンス反応を行い、CEQ™ 2000 XL DNA Analysis System (BECKMAN COULTER) に適用して解析を行った。PCR 産物の精製には Wizard® SN Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corp., Madison, WI, USA) を用いた。

第三項 遺伝子解析

プラバスタチンまたはアトルバスタチンでミオパチーを発症した 2 症例のゲノム DNA を用いて全エキソンおよびエキソン-イントロン結合部位のシーケンスを行った。PCR およびダイレクトシーケンスに用いたプライマーは Table III-1 に示した。

Table III-1 に示した特異的プライマーを用いて、エキソン-イントロン結合部位をふくむ各エキソンを PCR により増幅した。PCR 反応液の組成はゲノム DNA 1-2 ng/μL、sense/antisense primer 200 nM、deoxynucleotide triphosphate 各 200 nM、KOD-plus-polymerase 0.02 U/μL、MgSO₄ 2.5 mM とし、10x KOD-plus-buffer と滅菌蒸留水で総量 50 μL として反応を行った。PCR は 96 °C、20 sec (変性)、57 °C (3 サイクル毎に -2°C を 2 回行い、その後 51°C で 26 サイクル行った)、30sec (アニーリング)、68°C、25 sec (伸長) を計 35 サイクル行い、最後に 68°C で 2 分反応を行い伸長反応を完結させた。

ダイレクトシーケンスは、得られた PCR 産物を Wizard® SN Gel and PCR Clean-Up System を用いて精製し、CEQ™ DTCS-Quick Start Kit を用いてサイクルシーケンス反応を行い、CEQ™ 2000 XL DNA Analysis System に適用することにより行った。得られたシーケンス結果の解析は、GenBank より得た *SLCO1B1* のリファレンスシーケンス (NT_000042.9) と照合することにより行った。

Table III-1. Primer sequences used for the analysis of *SLCO1B1*

Exon	Forward Primer (5' →3')	Reverse Primer (5'→3')	Note
2	CATTGACCTAGCAGAGTGGTAACG	CGTGATCAATCCAAAACCAAAGAG	PCR and sequence
3	GAAATGATGCTTTATCAGTGTAGTGA	CCTGTGCAGTTATGACAACCAC	PCR and sequence
4	CATCTCCATTTTTCTTCATTCCA CATTGTCTTTGAGGGAAGGCACT	GTACACACTTAGTGGGTATCTTC	PCR and sequence sequence
5	GTACTCTGGTAATTTGGGGAAGA	CTGTGTTGTTAATGGGCGAACT	PCR and sequence

	GTACTCTGGTAATTTGGGGAAGA		sequence
6-7	GGACTAATACACCATATTGTCAAAG	GCTGGATTTTATATTTATTCTGATT	PCR and sequence
6	TTGTAATAGAAATGCTAAAAT		sequence
7	TCCCTTTGTCTACTTTTGAA		sequence
8	CCTAGACAGTATCTGTTGCATTATGTCA	CTTCCACTTGTTATGTGCTCAAGA	PCR and sequence
9	TGTAAAGTACCCAGGATAACC	CAGAGCAATAGTGACATCACAAGT	PCR and sequence
10	TTGATAGGTGCAGCAAACCAC	CAACCTATGTTGCTTCTCTTTAG	PCR and sequence
11	CTCTGCTTTCACTTTACTTC	CCTGATTGTGCCCTAAGCAGAC	PCR and sequence
12	GTCCAAAAGAGTATGTGCTCTGC	CAGCCTTGAGAGTTCATAGTA	PCR and sequence
	TGTATTTGCAGCACTGTTAGG		sequence

第三節 結果

第一項 プラバスタチンまたはアトルバスタチンでミオパチーを起こした症例における *SLCO1B1* 遺伝子の解析

プラバスタチンまたはアトルバスタチンでミオパチーを起こした 2 症例の *SLCO1B1* 遺伝子の全エクソンおよびエクソン-イントロン結合部位のシーケンスを行ったところ、プラバスタチンでミオパチーを起こした 1 症例において新規変異が heterozygote で検出された。

新規変異はエクソン 12 における 1528 番目の Guanine から Adenine への一塩基置換であった。タンパクレベルでは第 10 膜貫通領域で 543 番目の Leu から Trp へのアミノ酸置換を伴うものであった (Fig.III-1)。

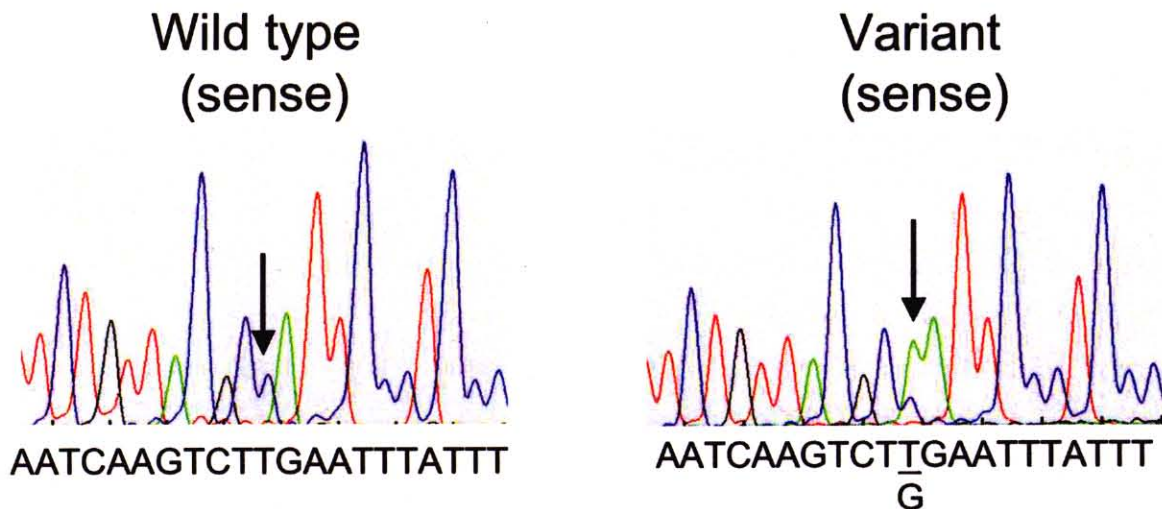


Fig. III-1. Nucleotide sequences of *SLCO1B1* containing novel variant 1628T>G in exon 12. Arrows indicate the positions of the nucleotide change.

第二項 健常日本人 50 人におけるアレル頻度の推定

検出された新規変異 1528G>A の日本人 50 人における頻度を検討したところ、1 例からも検出されなかった。このことから、1528G>A は日本人においては非常にまれな変異(<1%)であることが明らかとなった。

第四節 考察

本検討により検出された新規変異 1528G>A の機能への影響は現段階では不明であるが、*SLCO1B1* の膜貫通領域でアミノ酸置換を伴う変異および多型はすべて膜へのソーティング異常により機能低下を伴っていることが報告されている[60]。今回検出した 1528G>A も第 10 膜貫通領域において Leu から Trp へのアミノ酸置換を伴うことから、*SLCO1B1* の機能に影響を及ぼす可能性があると考えられる。

また、この新規変異は日本人においては非常に頻度の低い (<1%) ものであることが明らかとなった。このような稀な変異がプラバスタチンによりミオパチーを起こした患者から検出されたことから、*SLCO1B1* 1528G>A においても *SLCO1B1**15 と同様にプラバスタチンの輸送能が低下している可能性が考えられ、*SLCO1B1**15 のみならず *SLCO1B1* の機能低下を伴う多型および変異はすべて、

プラバスタチンによるミオパチーの感受性に大きな影響を及ぼし得る可能性が推察された。

SLCO1B1 はプラバスタチンやアトルバスタチン以外にも様々な生体内外物質の輸送に関わっているため、今後、1528G>A の SLCO1B1 の機能に及ぼす影響を明らかにしていく必要があると考えられる。現在検討段階ではあるが、1528G>A を導入した SLCO1B1 一過性発現 HEK293 細胞で特異的基質の輸送能が低下しているという結果が得られている。1528G>A においてもプラバスタチンの輸送能が低下していた場合、スタチンによるミオパチーと SLCO1B1 の case-control study におけるプラバスタチンおよびアトルバスタチンによるミオパチー発症者の 7 例中 6 例(85.7%)が SLCO1B1 の機能低下を伴う多型および変異で説明可能になると推定される。このことから、SLCO1B1 の機能低下を伴う多型および変異はプラバスタチンおよびアトルバスタチンによるミオパチーの大きな危険因子の一つである可能性が示唆された。

第五節 小括

プラバスタチンおよびアトルバスタチンでミオパチーを発症した患者の7例中2例は *SLCO1B1**15 および機能低下を伴う既知変異を有していなかった。この2症例の *SLCO1B1* の全エクソンおよびエクソン-イントロン結合部位のシークエンスの解析を行った。

1. プラバスタチンでミオパチーを起こした1症例において新規変異が *heterozygote* で検出された。新規変異はエクソン12における1528番目の *Guanine* から *Adenine* への一塩基置換であった。タンパクレベルでは第10膜貫通領域で543番目の *Leu* から *Trp* へのアミノ酸置換を伴うものであった (Fig. III-1)。
2. 検出された新規変異 1528G>A の日本人50人における頻度を検討したところ、1例からも検出されなかった。このことから、1528G>A は日本人においては非常に稀な変異 (<1%) であることが明らかとなった。

1528G>A は第10膜貫通領域において *Leu* から *Trp* へのアミノ酸置換を伴うことから、*SLCO1B1* の機能に影響を及ぼす可能性があると考えられた。このような稀な変異がプラバスタチンによりミオパチーを起こした患者から検出されたことから、*SLCO1B1* 1528G>A においても *SLCO1B1**15 と同様にプラバスタチンの輸送能が低下している可能性が考えられた。

総括

スタチンによる横紋筋融解症発症の個人差に関わる遺伝的要因を明らかにすることを目的としてスタチンによるミオパチーと遺伝子多型の関連を候補遺伝子アプローチ (case-control study) により検討した。

1. 先天性横紋筋融解症の原因遺伝子とスタチンによるミオパチーとの関連性について検討した。*ACAD9*, *PYGM*, *LDHA*, *CPT2* を候補遺伝子として選択し、症例群 10 例におけるその遺伝子多型および変異を検索した。*ACAD9* における *128G>A* が症例群 4 例に heterozygote で検出されたが、そのアレル頻度を対照群と比較したが有意な差は認められなかった。その他の *ACAD9* の既知変異および *PYGM*, *LDHA*, *CPT2* の既知変異は検出されなかった。このことから、先天性横紋筋融解症の原因遺伝子から選択した 4 つの候補遺伝子における既知変異は、スタチンによるミオパチーに共通の要因ではない可能性が示唆された。
2. スタチンの薬物動態関連遺伝子とスタチンによるミオパチーの関連性について検討した。*CYP3A4*, *ABCB1*, *ABCC2*, *SLCO1B1* を候補遺伝子として選択し、その多型の頻度を症例/対照群間で比較した。その結果、シンバスタチンまたはアトルバスタチン服用患者において、*ABCB1* *2677G/T>A* の頻度が、対照群 (n=8) に比較して症例群(n=6)で有意に高いことが明らかとなった (0.250 vs 0.000, $P=0.024$)。また、プラバスタチンまたはアトルバスタチン服用患者において *SLCO1B1* *521T>C* および *SLCO1B1*15* の頻度が対照群 (n=22) に比較して症例群 (n=7) で有意に高いことが明らかとなった (0.429 vs 0.114, $P=0.017$)。 *SLCO1B1*15* の 1 アレル以上の保有率から求めた Odds 比は 11.3 ($P=95\%$ CI: 1.58 - 80.3) であった。
3. プラバスタチンによりミオパチーを発症したが *SLCO1B1*15* を保有していなかった 1 症例において新たな変異 (*1628T>G*, *L543W*) が検出され、この変異は膜貫通領域に存在していたことから機能低下を伴う可能性が示唆された。この変異の健常日本人(n=50)におけるアレル頻度は 1%以下であることが明らかとなった。

以上の結果から、*SLCO1B1* はプラバスタチンやアトルバスタチンに代表される水溶性スタチンの体内動態において中心的な役割を果たしており、その機能低下はスタチンの全身暴露量の増大を介してミオパチー等の副作用の感受性増大の原因となっている可能性が示唆された。

参考文献

1. Warren JD, Blumbergs PC, Thompson PD. Rhabdomyolysis: a review. *Muscle Nerve* 2002; **25**:332-347.
2. Omar MA, Wilson JP, Cox TS. Rhabdomyolysis and HMG-CoA reductase inhibitors. *Ann Pharmacother* 2001; **35**:1096-1107.
3. Harriston S. A review of rhabdomyolysis. *Dimens Crit Care Nurs* 2004; **23**:155-161.
4. Topol EJ. Intensive statin therapy--a sea change in cardiovascular prevention. *N Engl J Med* 2004; **350**:1562-1564.
5. Staffa JA, Chang J, Green L. Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis. *N Engl J Med* 2002; **346**:539-540.
6. Jamal SM, Eisenberg MJ, Christopoulos S. Rhabdomyolysis associated with hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. *Am Heart J* 2004; **147**:956-965.
7. Bregestovski PD, Bolotina VN. Membrane fluidity and kinetics of Ca²⁺-dependent potassium channels. *Biomed Biochim Acta* 1989; **48**:S382-387.
8. Matzno S, Yamauchi T, Gohda M, Ishida N, Katsuura K, Hanasaki Y, *et al*. Inhibition of cholesterol biosynthesis by squalene epoxidase inhibitor avoids apoptotic cell death in L6 myoblasts. *J Lipid Res* 1997; **38**:1639-1648.
9. Chariot P, Abadia R, Agnus D, Danan C, Charpentier C, Gherardi RK. Simvastatin-induced rhabdomyolysis followed by a MELAS syndrome. *Am J Med* 1993; **94**:109-110.
10. Phillips PS, Haas RH, Bannykh S, Hathaway S, Gray NL, Kimura BJ, *et al*. Statin-associated myopathy with normal creatine kinase levels. *Ann Intern Med* 2002; **137**:581-585.
11. De Pinieux G, Chariot P, Ammi-Said M, Louam F, Lejone JL, Astier A, *et al*. Lipid-lowering drugs and mitochondrial function: effects of HMG-CoA reductase inhibitors on serum ubiquinone and blood lactate/pyruvate ratio. *Br J Clin Pharmacol* 1996; **42**:333-337.
12. Schaefer WH, Lawrence JW, Loughlin AF, Stoffregen DA, Mixson LA, Dean DC, *et al*. Evaluation of ubiquinone concentration and mitochondrial function relative to cerivastatin-induced skeletal myopathy in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; **194**:10-23.
13. Li X, Liu L, Tupper JC, Bannerman DD, Winn RK, Sebti SM, *et al*. Inhibition of protein geranylgeranylation and RhoA/RhoA kinase pathway induces apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem* 2002; **277**:15309-15316.
14. Masters BA, Palmoski MJ, Flint OP, Gregg RE, Wang-Iverson D, Durham SK. In vitro myotoxicity of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, pravastatin, lovastatin, and simvastatin,

- using neonatal rat skeletal myocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; **131**:163-174.
15. Insull W, Jr, Isaacsohn J, Kwiterovich P, Ra P, Brazg R, Dujovne C, *et al.* Efficacy and safety of cerivastatin 0.8 mg in patients with hypercholesterolaemia: the pivotal placebo-controlled clinical trial. Cerivastatin Study Group. *J Int Med Res* 2000; **28**:47-68.
 16. Bradford RH, Shear CL, Chremos AN, Dujovne CA, Franklin FA, Grillo RB, *et al.* Expanded Clinical Evaluation of Lovastatin (EXCEL) study results: two-year efficacy and safety follow-up. *Am J Cardiol* 1994; **74**:667-673.
 17. Omar MA, Wilson JP. FDA adverse event reports on statin-associated rhabdomyolysis. *Ann Pharmacother* 2002; **36**:288-295.
 18. Williams D, Feely J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin Pharmacokinet* 2002; **41**:343-370.
 19. Schmitz G, Drobnik W. Pharmacogenomics and pharmacogenetics of cholesterol-lowering therapy. *Clin Chem Lab Med* 2003; **41**:581-589.
 20. Tseng GN. I_{Kr} : the hERG channel. *J Mol Cell Cardiol* 2001; **33**:835-849.
 21. Usami S, Koda E, Tsukamoto K, Otsuka A, Yuge I, Asamura K, *et al.* Molecular diagnosis of deafness: impact of gene identification. *Audiol Neurootol* 2002; **7**:185-190.
 22. Kanno T, Maekawa M. Lactate dehydrogenase M-subunit deficiencies: Clinical features, metabolic background, and genetic heterogeneities. *Muscle Nerve* 1995; **Suppl.3**:S54-S60.
 23. Sakaeda T, Takara K, Kakumoto M, Ohmoto N, Nakamura T, Iwaki K, *et al.* Simvastatin and lovastatin, but not pravastatin, interact with MDR1. *J Pharm Pharmacol* 2002; **54**:419-423.
 24. Kivisto KT, Zukunft J, Hofmann U, Niemi M, Rekersbrink S, Schneider S, *et al.* Characterisation of cerivastatin as a P-glycoprotein substrate: studies in P-glycoprotein-expressing cell monolayers and *mdr1a/b* knock-out mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; **370**:124-130.
 25. Yamazaki M, Akiyama S, Niinuma K, Nishigaki R, Sugiyama Y. Biliary excretion of pravastatin in rats: contribution of the excretion pathway mediated by canalicular multispecific organic anion transporter. *Drug Metab Dispos* 1997; **25**:1123-1129.
 26. Shitara Y, Hirano M, Sato H, Sugiyama Y. Gemfibrozil and its glucuronide inhibit the organic anion transporting polypeptide 2 (OATP2/OATP1B1:SLC21A6)-mediated hepatic uptake and CYP2C8-mediated metabolism of cerivastatin: analysis of the mechanism of the clinically relevant drug-drug interaction between cerivastatin and gemfibrozil. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; **311**:228-236.
 27. Shitara Y, Itoh T, Sato H, Li AP, Sugiyama Y. Inhibition of transporter-mediated hepatic uptake as a mechanism for drug-drug interaction between cerivastatin and cyclosporin A. *J Pharmacol Exp Ther*

- 2003; **304**:610-616.
28. Simonson SG, Raza A, Martin PD, Mitchell PD, Jarcho JA, Brown CD, *et al.* Rosuvastatin pharmacokinetics in heart transplant recipients administered an antirejection regimen including cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **76**:167-177.
 29. Hirano M, Maeda K, Shitara Y, Sugiyama Y. Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; **311**:139-146.
 30. Shimada S, Fujino H, Morikawa T, Moriyasu M, Kojima J. Uptake Mechanism of Pitavastatin, a New Inhibitor of HMG-CoA Reductase, in Rat Hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet* 2003; **18**:245-251.
 31. Kameyama Y, Yamashita K, Kobayashi K, Hosokawa M, Chiba K. Functional characterization of OATP-C (SLCO1B1) variants, OATP-C*5, OATP-C*15 and OATP-C*15+C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells. *Eighteen JSSX annual meeting* 2003:8PE-33.
 32. Danoff TM, Campbell DA, McCarthy LC, Lewis KF, Repasch MH, Saunders AM, *et al.* A Gilbert's syndrome UGT1A1 variant confers susceptibility to tranilast-induced hyperbilirubinemia. *Pharmacogenomics J* 2004; **4**:49-53.
 33. Jurkat-Rott K, McCarthy T, Lehmann-Horn F. Genetics and pathogenesis of malignant hyperthermia. *Muscle Nerve* 2000; **23**:4-17.
 34. Sauret JM, Marinides G, Wang GK. Rhabdomyolysis. *Am Fam Physician* 2002; **65**:907-912.
 35. Tonin P, Lewis P, Servidei S, DiMauro S. Metabolic causes of myoglobinuria. *Ann Neurol* 1990; **27**:181-185.
 36. DiMauro S, DiMauro PM. Muscle carnitine palmityltransferase deficiency and myoglobinuria. *Science* 1973; **182**:929-931.
 37. Kelly KJ, Garland JS, Tang TT, Shug AL, Chusid MJ. Fatal rhabdomyolysis following influenza infection in a girl with familial carnitine palmityl transferase deficiency. *Pediatrics* 1989; **84**:312-316.
 38. Ogilvie I, Pourfarzam M, Jackson S, Stockdale C, Bartlett K, Turnbull DM. Very long-chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency presenting with exercise-induced myoglobinuria. *Neurology* 1994; **44**:467-473.
 39. Bonnefont JP, Demaugre F, Prip-Buus C, Saudubray JM, Brivet M, Abadi N, *et al.* Carnitine palmitoyltransferase deficiencies. *Mol Genet Metab* 1999; **68**:424-440.
 40. Bartram C, Edwards RH, Beynon RJ. McArdle's disease-muscle glycogen phosphorylase deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1272**:1-13.
 41. Tsurui S, Sugie H, Ito M, Igarashi Y. Clinical and biochemical analysis of 27 patients with myoglobinuria of unknown causes. *Rinsho Shinkeigaku* 1995; **35**:24-28.

42. Saudubray JM, Martin D, de Lonlay P, Touati G, Poggi-Travert F, Bonnet D, *et al.* Recognition and management of fatty acid oxidation defects: a series of 107 patients. *J Inherit Metab Dis* 1999; **22**:488-502.
43. Andresen BS, Olpin S, Poorthuis BJ, Scholte HR, Vianey-Saban C, Wanders R, *et al.* Clear correlation of genotype with disease phenotype in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Am J Hum Genet* 1999; **64**:479-494.
44. Kitamura M, Iijima N, Hashimoto F, Hiratsuka A. Hereditary deficiency of subunit H of lactate dehydrogenase. *Clin Chim Acta* 1971; **34**:419-423.
45. Thompson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-associated myopathy. *Jama* 2003; **289**:1681-1690.
46. von Keutz E, Schluter G. Preclinical safety evaluation of cerivastatin, a novel HMG-CoA reductase inhibitor. *Am J Cardiol* 1998; **82**:11J-17J.
47. Mackawa M, Kanda S, Sudo K, Kanno T. Estimation of the gene frequency of lactate dehydrogenase subunit deficiencies. *Am J Hum Genet* 1984; **36**:1204-1214.
48. Dimaur S, Andreu AL, Bruno C, Hadjigeorgiou GM. Myophosphorylase deficiency (glycogenosis type V; McArdle disease). *Curr Mol Med* 2002; **2**:189-196.
49. Bruno C, Lanzillo R, Biedi C, Iadicicco L, Minetti C, Santoro L. Two new mutations in the myophosphorylase gene in Italian patients with McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* 2002; **12**:498-500.
50. Bruno C, Lofberg M, Tamburino L, Jankala H, Hadjigeorgiou GM, Andreu AL, *et al.* Molecular characterization of McArdle's disease in two large Finnish families. *J Neurol Sci* 1999; **165**:121-125.
51. Ito M, Sugie H, Fukuda T, Sugie Y. Molecular genetic analysis of Japanese patients with myophosphorylase deficiency (McArdle's disease). *J Inherit Metab Dis* 2000; **23**:169.
52. Hadjigeorgiou G, Sadeh M, Musumeci O, Dabby R, Girolami L, Naini A, *et al.* Molecular genetic study of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease) in two Yemenite-Jewish families. *Neuromuscul Disord* 2002; **12**:824-827.
53. Vorgerd M, Kubisch C, Burwinkel B, Reichmann H, Mortier W, Tettenborn B, *et al.* Mutation analysis in myophosphorylase deficiency (McArdle's disease). *Ann Neurol* 1998; **43**:326-331.
54. Straussberg R, Strauss AW. A novel mutation of late-onset very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Neurol* 2002; **27**:136-137.
55. Takusa Y, Fukao T, Kimura M, Uchiyama A, Abo W, Tsuboi Y, *et al.* Identification and characterization of temperature-sensitive mild mutations in three Japanese patients with nonsevere forms of very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab* 2002; **75**:227-234.
56. Backman JT, Kyrklund C, Neuvonen M, Neuvonen PJ. Gemfibrozil greatly increases plasma

- concentrations of cerivastatin. *Clin Pharmacol Ther* 2002; **72**:685-691.
57. Tate G, Li M, Suzuki T, Mitsuya T. A new mutation of the ATP-binding cassette, sub-family C, member 2 (ABCC2) gene in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome. *Genes Genet Syst* 2002; **77**:117-121.
 58. Ito S, Ieiri I, Tanabe M, Suzuki A, Higuchi S, Otsubo K. Polymorphism of the ABC transporter genes, MDR1, MRP1 and MRP2/cMOAT, in healthy Japanese subjects. *Pharmacogenetics* 2001; **11**:175-184.
 59. Nishizato Y, Ieiri I, Suzuki H, Kimura M, Kawabata K, Hirota T, *et al.* Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2003; **73**:554-565.
 60. Tirona RG, Leake BF, Merino G, Kim RB. Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans. *J Biol Chem* 2001; **276**:35669-35675.
 61. Iida A, Saito S, Sekine A, Mishima C, Kondo K, Kitamura Y, *et al.* Catalog of 258 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding three organic anion transporters, three organic anion-transporting polypeptides, and three NADH:ubiquinone oxidoreductase flavoproteins. *J Hum Genet* 2001; **46**:668-683.
 62. Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **75**:13-33.
 63. Nozawa T, Nakajima M, Tamai I, Noda K, Nezu J, Sai Y, *et al.* Genetic polymorphisms of human organic anion transporters OATP-C (SLC21A6) and OATP-B (SLC21A9): allele frequencies in the Japanese population and functional analysis. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; **302**:804-813.
 64. Yamamoto T, Nagafuchi N, Ozeki T, Kubota T, Ishikawa H, Ogawa S, *et al.* CYP3A4*18: It is not rare allele in Japanese population. *Drug Metab Pharmacokin* 2003; **18**:267-268.
 65. Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Watanabe H, Shiseki K, Saeki M, Nakamura T, *et al.* Haplotypes of CYP3A4 and their close linkage with CYP3A5 haplotypes in a Japanese population. *Hum Mutat* 2004; **23**:100.
 66. Tirona RG, Kim RB. Pharmacogenomics of organic anion-transporting polypeptides (OATP). *Adv Drug Deliv Rev* 2002; **54**:1343-1352.
 67. Niemi M, Schaeffeler E, Lang T, Fromm MF, Neuvonen M, Kyrklund C, *et al.* High plasma pravastatin concentrations are associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide-C (OATP-C, SLCO1B1). *Pharmacogenetics* 2004; **14**:429-440.
 68. Mwinyi J, Johne A, Bauer S, Roots I, Gerloff T. Evidence for inverse effects of OATP-C (SLC21A6) 5 and 1b haplotypes on pravastatin kinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **75**:415-421.

69. Hatanaka T, Honda S, Sasaki S, Katayama K, Koizumi T. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation for tissue-selective inhibition of cholesterol synthesis by pravastatin. *J Pharmacokinet Biopharm* 1998; **26**:329-347.
70. Morita N, Yasumori T, Nakayama K. Human MDR1 polymorphism: G2677T/A and C3435T have no effect on MDR1 transport activities. *Biochem Pharmacol* 2003; **65**:1843-1852.
71. Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 2003; **22**:7468-7485.
72. Loo TW, Clarke DM. Functional consequences of proline mutations in the predicted transmembrane domain of P-glycoprotein. *J Biol Chem* 1993; **268**:3143-3149.
73. Zhan M, Yu D, Liu J, Hannay J, Pollock RE. Transcriptional repression of protein kinase Calpha by wild-type p53 via Sp1 is involved in inhibition of MDR1 P-glycoprotein phosphorylation. *J Biol Chem* 2004.
74. Yi SY, Hong KS, Lim HS, Chung JY, Oh DS, Kim JR, *et al.* A variant 2677A allele of the MDR1 gene affects fexofenadine disposition. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **76**:418-427.
75. Dimitroulakos J, Yeager H. HMG-CoA reductase mediates the biological effects of retinoic acid on human neuroblastoma cells: lovastatin specifically targets P-glycoprotein-expressing cells. *Nat Med* 1996; **2**:326-333.
76. Taniguchi S, Mochida Y, Uchiumi T, Tahira T, Hayashi K, Takagi K, *et al.* Genetic polymorphism at the 5V regulatory region of multidrug resistance 1 (MDR1) and its association with interindividual variation of expression level in the colon. *Mol Cancer Ther* 2003; **2**:1351-1359.
77. Batetta B, Dessi S, Putzolu M, Sanna F, Spano O, Mulas MF, *et al.* MDR1 gene expression in normal and atherosclerotic human arteries(1). *J Vasc Res* 1999; **36**:261-271.
78. Batetta B, Pani A, Putzolu M, Sanna F, Bonatesta R, Piras S, *et al.* Correlation between cholesterol esterification, MDR1 gene expression and rate of cell proliferation in CEM and MOLT4 cell lines. *Cell Prolif* 1999; **32**:49-61.
79. Troost J, Lindenmaier H, Haefeli WE, Weiss J. Modulation of cellular cholesterol alters P-glycoprotein activity in multidrug-resistant cells. *Mol Pharmacol* 2004; **66**:1332-1339.
80. Wang E, Casciano CN, Clement RP, Johnson WW. Cholesterol interaction with the daunorubicin binding site of P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **276**:909-916.
81. Naba H, Kuwayama C, Kakinuma C, Ohnishi S, Ogihara T. Eisai hyperbilirubinemic rat (EHBR) as an animal model affording high drug-exposure in toxicity studies on organic anions. *Drug Metab Pharmacokin* 2004; **19**:339-351.

82. Suzuki H, Sugiyama Y. Single nucleotide polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2): its impact on drug disposition. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; **54**:1311-1331.
83. Ozdemir V, Kalowa W, Tang BK, Paterson AD, Walker SE, Endrenyi L, *et al.* Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method. *Pharmacogenetics* 2000; **10**:373-388.
84. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; **54**:1271-1294.
85. Lamba JK, Lin YS, Thummel K, Daly A, Watkins PB, Strom S, *et al.* Common allelic variants of cytochrome P4503A4 and their prevalence in different populations. *Pharmacogenetics* 2002; **12**:121-132.
86. Matsumura K, Saito T, Takahashi Y, Ozeki T, Kiyotani K, Fujieda M, *et al.* Identification of a novel polymorphic enhancer of the human CYP3A4 gene. *Mol Pharmacol* 2004; **65**:326-334.
87. Koyano S, Kurose K, Ozawa S, Saeki M, Nakajima Y, Hasegawa R, *et al.* Eleven Novel Single Nucleotide Polymorphisms in the NR1I2 (PXR) Gene, Four of which Induce Non-synonymous Amino Acid Alterations. *Drug Metab Pharmacokinet* 2002; **17**:561-565.
88. Koyano S, Kurose K, Saito Y, Ozawa S, Hasegawa R, Komamura K, *et al.* Functional characterization of four naturally occurring variants of human pregnane X receptor (PXR): one variant causes dramatic loss of both DNA binding activity and the transactivation of the CYP3A4 promoter/enhancer region. *Drug Metab Dispos* 2004; **32**:149-154.
89. Wolbold R, Klein K, Burk O, Nussler AK, Neuhaus P, Eichelbaum M, *et al.* Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology* 2003; **38**:978-988.
90. Kishi S, Yang W, Boureau B, Morand S, Das S, Chen P, *et al.* Effects of prednisone and genetic polymorphisms on etoposide disposition in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004; **103**:67-72.
91. Liddle C, Goodwin BJ, George J, Tapner M, Farrell GC. Separate and interactive regulation of cytochrome P450 3A4 by triiodothyronine, dexamethasone, and growth hormone in cultured hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**:2411-2416.
92. Horan M, Millar DS, Hedderich J, Lewis G, Newsway V, Mo N, *et al.* Human growth hormone 1 (GH1) gene expression: complex haplotype-dependent influence of polymorphic variation in the proximal promoter and locus control region. *Hum Mutat* 2003; **21**:408-423.
93. Fleury I, Primeau M, Doreau A, Costea I, Moghrabi A, Sinnett D, *et al.* Polymorphisms in genes involved in the corticosteroid response and the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pharmacogenomics* 2004; **4**:331-341.

94. van Rossum EF, Roks PH, de Jong FH, Brinkmann AO, Pols HA, Koper JW, *et al*. Characterization of a promoter polymorphism in the glucocorticoid receptor gene and its relationship to three other polymorphisms. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; **61**:573-581.
95. Kim RB. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins) and genetic variability (single nucleotide polymorphisms) in a hepatic drug uptake transporter: what's it all about? *Clin Pharmacol Ther* 2004; **75**:381-385.

Appendix 1. Concomitant drugs

No.	Myopathy	Statin	Dose	Concomitant drugs
1	+	pravastatin	5	prednisolone
	+	atorvastatin	5	
2	+	pravastatin	10	eperisone, diclofenac, probucol
	+	atorvastatin	10	aspirin, probucol
3	+	pravastatin	10	
4	+	pravastatin	10	famotidine, enalapril
6	+	simvastatin	2.5	
7	+	simvastatin	20	tocopherol nicotinate
8	+	atorvastatin	10	prednisolone, allopurinol, dilazep, famotidine, isoniazid, dimethicon
9	+	pravastatin	10	
10	+	simvastatin	5	
12	+	pravastatin	5	amlodipine
101	-	atorvastatin	10	scurfate, prednisolone, perindopril erbumine
102	-	pravastatin	5	potassium citrate, benzbromarone, dipyridamole, furosemide, nicardipine, perindopril erbumine
103	-	atorvastatin	10	furosemide, alfalcidol, azosemide, sulindac, magnesium acetate, beraprost sodium, ranitidine, prednisolone, isophane insulin, theophylline, prazosin
104	-	pravastatin	10	amlodipine, warfarin, nicardipine, sucralfate, prednisolone
105	-	simvastatin	5	aspirin
106	-	pravastatin	5	amlodipine, quinapril, mefruside, voglibose
107	-	simvastatin	5	isophane insulin, glibenclamide
108	-	simvastatin	2.5	
109	-	pravastatin	2.5	voglibose, neutral insulin
110	-	pravastatin	10	amlodipine
111	-	pravastatin	10	
	-	pravastatin	10	amlodipine, temocapril, allopurinol
112	-	pravastatin	10	NA
	-	atorvastatin	10	
113	-	simvastatin	10	
114	-	pravastatin	5	glibenclamide, perindopril erbumine
115	-	pravastatin	10	temocapril, glibenclamide, pioglitazone, magnesium alminosilicate
116	-	atorvastatin	10	prednisolone, teprenone, tocopherol nicotinate, methotrexate, alfalcidol, amlodipine, methotrexate
	-	pravastatin	10	dilazep, amlodipine
118	-	pravastatin	5	dipyridamole, warfarin, allopurinol, prednisolone, potassium citrate, probucol
119	-	pravastatin	10	prednisolone, aspirin, alfarcidol, magnesium alminosilicate
120	-	pravastatin	10	epinastine, nitrazepam
121	-	pravastatin	7.5	sulpiride, flurazepam
122	-	pravastatin	5	levothyroxine Na
123	-	pravastatin	5	nifedipine, voglibose, glibencramide, enalapril
124	-	pravastatin	10	
125	-	pravastatin	5	glicrazide, nicardipine
126	-	pravastatin	5	

NA: not available

Appendix 2 Primer sequences used in polymerase chain reaction

Gene	Exon	Forward Primer (5' → 3')	Reverse Primer (5' → 3')	Method**	
CPT2	1	CPT103 GCGGAGAAGTGCCTCAGAGT	CPT106R TGCTAGGAGATTGTGAAAAGTCCCA	PCR(B)	
	3	S113L-F ACAAACAGAATAAACATACAAACCAACACATTT*	CPT304A TACTTCATTTGCTGTCACCC	PCR(B)	
	4	CPT4F CTCTGGAGGTTGATGCCATT	CPT4R ACCCAAAGCAGCTGAGGACAAAG	PCR(A)	
		CPT14_116F GATGCCA1TTCCCTTTGTC1ATGC	CPT14_332R GCAGAAACAGTCATGTTGTTGC	PCR(B)	
		CPT11_875F TAAGAACCTTGTCCACCTTGTCCCA	CPT11_938F TTGGCGATAA1TGAGGTTAAAGGATTTA	PCR(B)	
		F383Y-F TGGGGTGA1TGGTGGCAGTGTCCAAT*	F383Y-R AGCTGGCTGGCTCTGTGGAGTGAC	PCR(C)	
		CPT4F383 TACTGCCCTCCACCTTTGAGC	CPT14_151R AAGCACTGAGGACAAGACCAGAA	PCR(B)	
		CPT5F TTTCCTGAGGTCCCTTTCCATCCCTG	CPT5R ATGAGGAAAGTGA1TGGT1AGCTTTTCA	PCR(B)	
	ACAD9	2	GCTCGGGGGCGGAAGGTCCT	CCAAGGCTGCGGTGACTTAC	B
		6	GGTGAGGTGTTTGGAGATGT	ATACTGGGATGTGCGATAGG	B
6-10		GGTGAGGTGTTTGGAGATGT	TCACCCGCTTAGCAATGATGCC	A	
9-14		AATA1TCCCAT1TCTCCACAG	CCTCTACCCCCACCACCAAT1CTC	A	
15		CATAAGACAAAGGAAAGGAGC	TGAGAGGAAAGAGGAGGAATGA	B	
19		GCCCAGATTTATTTTCATC	ACCA1CCCGCTCCACCAAGG	B	
LDHA		1	TTTCCCTCCCTTTTTCAGTCA1TCT	GACCC1TCC1TTTCA1TGGT1AGTCA	A
		2	GAGGGTCA1GTGCT1ATCT1ATG1TAGGG	TGTGAGGGGGGTGGGGT1AAT	A
		3	GGTTTGTGGAGCATT1ATGGAACA	CAACCTGGGGGACAAAGAGCA	A
		4	TGTCATGCCAGCCAAACTA	GGGAAACCA1TCCATCC1TACTGA	A
	5	ACCAAAAT1TGA1T1TCT1TCC1CCG	GGCAAGAT1TGTCTCA1AAACAA1AAC	A	
	6	ACTTGGTGGCATT1ATTTTACC1TTGT	TCCACCTA1CTGAGCA1TAAT1TGAAC	A	
	7	AACTCCATCTCA1AAGAAA1AAAA1AAGCGG	TGCA1GGG1TGGCC1AAGA1ATAG	B	
PYGM	1-2	CAGGTGGCAGGAAGAAGTGAAGAAGG	GCCCCAGG1T1TCC1CTCAGA	B	
	2-5	CCTGGCTGAGTGTGGTGTGTG	CTCCCTGTGTCCCTGTCTCCAGTCT	B	
	6-9	GCTTATCA1CCTGCC1TCC1TCCAT1TTCC	CAGGCTCTGATCC1TCC1TCCAT1TCCAT	B	
	10-12	CTGGTGA1CCTGGA1ACGGATGACT	CCCCCTTCCAGGCTCA1CTCAGATGT	B	
	13-17	AGGTCA1TGTGGCGT1TAGGAAAAG	ATTGCTGT1AAGCGCC1CT1AAAGT	A	
	18-20	GTTGTACCTGT1TAGCTGTCTTGTGCTGC	ACTCCAGTAC1CC1CCTCTGCATGAG	B	

Appendix 2 - Continued

<i>SLCO1B1</i>	2	CATTGACCTAGCAGAGTGGTAACG	CGTGAATCAATCCAAAACCAAGAG
	3	GAAATGATGCTTATCAAGTGTGA	CCTGTGCAGTIATGACAACCAC
	4	CATCCCATTTTCTTCATTCCA	GTACACACTIAGTGGTATCTTC
	5	GTACTCTGGTAATTTGGGGAAGA	CTGTGTGTIAATGGGCGAACT
	6-7	GGACTAATACACCATATGTCAAAG	GCTGGATTTIATATTTAATCTGATTT
	8	CCTAGACAGTATCTGTGGCATTATGTCA	CTTCCACTGTIATGTGCTCAAGA
	9	TGTAAGTACCCGAGATAACC	CAGAGCAATAGTGACATCACAAGT
	10	TTGATAGGTGACAGCAAAACCAC	CAACGTATGTGGTCTCTTTAG
	11	CTCTGCTTTCACCTTACTTC	CCTGATTTGTGCCCTAAGCAGAC
	12	GTCCAAAAGAGTATGTGCTCTGC	CAGCCTTGAGAGTTCAITAGTA
	13	TTGATAGGTGACAGCAAAACCAC	GGTCCATCACTCAATTTTACTC
	14	CTCTGCTTTCACCTTACTTC	GAGATTTGCTTGATACCATACTGC
	15	GTCCAAAAGAGTATGTGCTCTGC	AACTCTIACCTGTIATGAIACCTC
<i>ABCB1</i>	12	TGTTCACTTCAGTTACCACATCTCG	GTCTGTGAATTTGCCCTTGAAGTTT
	21	TGCAGGCTATAGGTTCCAGG	GGAGGAAGGAAGAACAACAGTGTG
	26	TGATGGCAAAAGAAAATAAAGCGA	AGAGACTTACATTAAGGCAGTGACTCG
<i>ABCC2</i>	10	GGGTCCTAATTTCAATCCCTTA	TAITCTTCTGGGTGACTTTT
	13	AAGGATTTGGCTTAGGAGGC	AGTCAITCTGGACTCCAAGG
	15	GCACCTTAGCAGAAAACAATCC	AOCGAAAGACATGCACATAGC
	18	GGAGTAGTGTCTTAATATGAAT	CCCACCCCACCTTATATCTCT
	18-19	TCACAGGGGTGACAAGCAAC	TTTAACCATTTCCACCATFGGC
	28	TGCTAACCCCTTCTCCTGTTCTA	ATCGAAGCCTTCCCTTCACTCC
	28	TCTATGACACGAGTCTCTGGG	CAAATGATGAAGGCTTAGGG
	29	AGAGATGGAGTAGCCAGTCCAC	CAGCCACAATGCAITATTACC
	31	AGGAGCTAACACATGTTGCT	GGGTTAAGCCATCCGTGTCAA
			A
			B
			B
			A
			C
			A
			B
			B
			A

Appendix 2 - Continued

CTP3A4			
1	ACAAGGGCAAGAGAGAGGGCG	AGAGTTAAGCAAGAGAGCCCTT	1st
1	ACAAGGGCAAGAGAGAGGGCG	CCACGCCCGGCCCTGAACATCT	2nd
2-3	TGTAACCTTTTGGTGTCTCATGTGG	AGACTGTCTCTGTGCAGTGGGGTAA	1st
2	GGTGTCTCATGTGGAGG	AGAGTTAAGCAAGAGAGCCCTT	2nd
3	CCTTAACTGCCAGCAAGTCTG	GGGCTGAGACTGTCTCTGTG	2nd
4-9	ATATGAAGACTTGGGTGGCTCCTGTG	GAGCCATATTTCTCAGAAAGGAGATCAAG	1st
4	AGTCTGGCTTCTGGGTTGGGCTC	GGGGACAGGATGAAAGTGGACG	2nd
5	CATCACCCAGTAGACAGTTCAC	GGCAGCTCAAAATTCAGTGGAC	2nd
6	CCCTTCCAAGGGGTAGTCC	GCTGGTCACTGGAATAAACCAAGCAGCAGG	2nd
7	TGTTGCATGCATAGAGGAAAGGATGG	GATTAGTGGTTGCATATGATG	2nd
8	GGCTTCCAGTTGAGAACTTGATGTC	GCTTAAACATGAGCAGTCTTC	2nd
9	GAGCCATATTTCTCAGAAAGGAGATCAAG	CAAAACATGTGTCTGTTCTGCTATGTGG	2nd
10-13	AGATACACATCAGAAATGAAACCACCC	CGTGAGAAAGCAGAGAGCCAAATCTA	1st
10	CCCAAGTACCTCTGAATTGC	CAGAGCCCTTCCTACATAG	2nd
11	CAGTATGAGTTAGTCTCTGG	CATAACTGATGACCCTTCATCG	2nd
12	CCTGTGTACTACTAGTTGAGGG	CACAGATGGGCCCTAATG	2nd
13	GGAGTGTCTCACTCACTTTGATGC	TGGATGAAAGCCCATCTTC	2nd

* : Mismatch introduced primer for PCR-RFLP (Bold bases represents introduced mismatch-bases).

** : Thermocycling condition were described in appendix 2.

Appendix 3. Thermocycling conditions for PCR reaction

Gene	condition ¹⁾	initial denaturation	Amplification			Terminal extension	Taq Polymerase
			denaturation	annealing	extension		
<i>ACAD9</i>	A	94 °C x 3min	96 °C x 20sec	55 °C x 30sec	68 °C x 2min	68 °C x 10min	KOD-plus-
	No of cycles	1		35		1	
	B	94 °C x 3min	96 °C x 20sec	55 °C x 30sec	68 °C x 15sec	68 °C x 2min	KOD-plus-
	No of cycles	1		35		1	
<i>CPTII</i>	A	94 °C x 3min	96 °C x 20sec	63 °C x 30sec	68 °C x 90sec	68 °C x 2min	KOD-plus-
	No of cycles	1		35		1	
	B	94 °C x 3min	96 °C x 20sec	55 °C x 30sec	68 °C x 30sec	68 °C x 2min	KOD-plus-
	No of cycles	1		35		1	
	C	95 °C x 15min	95 °C x 1min	56 °C x 1min	72 °C x 1min	72 °C x 7min	AmpliTaq Gold
	No of cycles	1		40		1	
	A	94 °C x 3min	96 °C x 20sec	56 °C x 30sec	68 °C x 2.5min	68 °C x 10min	KOD-plus-
	No of cycles	1	(annealing: reduce 2 °C to every 3 cycles for 3 times)			1	
	B	94 °C x 3min	96 °C x 20sec	62 °C x 30sec	68 °C x 3min	68 °C x 10min	KOD-plus-
	No of cycles	1	(annealing: reduce 2 °C to every 3 cycles for 4 times)			1	
	A	94 °C x 3min	96 °C x 20sec	51 °C x 30sec	68 °C x 80sec	68 °C x 2min	KOD-plus-
	No of cycles	1	(annealing: reduce 1 °C after 9 cycles)			1	
	B	94 °C x 3min	96 °C x 20sec	62 °C x 30sec	68 °C x 80sec	68 °C x 2min	KOD-plus-
	No of cycles	1	(annealing: reduce 2 °C to every 3 cycles for 4 times)			1	
	A	94 °C x 3min	96 °C x 20sec	57 °C x 30sec	68 °C x 25sec	68 °C x 2min	KOD-plus-
	No of cycles	1	(annealing: reduce 2 °C to every 3 cycles for 3 times)			1	
	A	94 °C x 3min	96 °C x 20sec	57 °C x 30sec	68 °C x 30sec	68 °C x 2min	KOD-plus-
	No of cycles	1		35		1	
	A	94 °C x 3min	96 °C x 20sec	50 °C x 30sec	68 °C x 25sec	68 °C x 2min	KOD-plus-
	No of cycles	1		35		1	
	B	94 °C x 2min	96 °C x 20sec	60 °C x 30sec	68 °C x 25sec	68 °C x 2min	KOD-plus-
	No of cycles	1		35		1	
	C	94 °C x 3min	96 °C x 20sec	63 °C x 30sec	68 °C x 45sec	68 °C x 2min	KOD-plus-
	No of cycles	1		35		1	
	1st	94 °C x 10min	94 °C x 30sec	66 °C x 30sec	72 °C x 7min	72 °C x 10min	LA Taq LA PCR buffer II
	No of cycles	1	(annealing: reduce 3 °C to every 3 cycles for 4 times)			1	
	2nd	94 °C x 10min	94 °C x 40sec	62 °C x 45sec	72 °C x 1min	72 °C x 10min	AmpliTaq Gold
	No of cycles	1	(annealing: reduce 3 °C to every 3 cycles for 4 times)			1	

¹⁾ Used primers were described in appendix 2.

Appendix 4. Methods for PCR-RFLP analysis

Gene	Mutation/SNP	Primers ¹⁾	PCR prod Size (bp)	Restriction Enzyme	Fragment Length (bp)	
					wt/wt	mut/mut
<i>CPT2</i>	C149A	1	448	<i>Bsg</i> I	448	251 / 197
	C338T	2	151	<i>BstX</i> I	151	122 / 29
	C370T	3	241	<i>Taq</i> I	133 / 108	241
	G452A	3	241	<i>Sma</i> I	213 / 28	241
	533insT;del8	4	92	-	92	103
	T1148A	5	92	<i>Ssp</i> I	92	67 / 26
	G1145A	6	604	<i>Apo</i> I	338 / 266	338 / 216 / 50
	1238-9delAG	6	602	<i>Bsg</i> I	443 / 161	602
	T1342C	6	604	<i>Bsr</i> I	360/184/60	420/184
	A1436T	6	604	<i>Afa</i> I	341/177/86	518/86
<i>ACAD9</i>	G128A	7	186	<i>Nla</i> IV	100/57/29	129/57
	C473A	8	230	<i>Sma</i> I	230	198/32
	C476G	8	230	<i>BsaJ</i> I	135/61/34	169/61
	T1505C	9	179	<i>Mva</i> I	123/56	76/56/47
	C1804A	10	294	<i>Dpn</i> II	51/100/43	108/100/43/43
<i>ABCBI</i>	C1236T	11	412	<i>Hae</i> III	218/157/35	253/157
	C3435T	12	212	<i>Dpn</i> II	212	144/68
<i>ABCC2</i>	C2302T	12	788	<i>Aci</i> I	505/283	788
	T2439+2C	13	788	<i>Hph</i> I	414/355/19	769/19
	C3928T	14	322	<i>Ban</i> I	161/81/80	241/81
	A4145G	15	473	<i>Mva</i> I	222/199/52	421/52

¹⁾ PCR primers were listed in appendix 2.

主論文目録

本学位論文内容は下記の発表による。

1. Morimoto K, Oishi T, Ueda S, Ueda M, Hosokawa M and Chiba K. A novel variant allele of *OATP-C* (*SLCO1B1*) found in a Japanese patient with pravastatin-induced myopathy. *Drug Metab Pharmacokin* (in press)
2. Morimoto K, Ueda S, Seki N, Igawa Y, Kameyama Y, Shimizu A, Oishi T, Hosokawa M, Mori S, Iesato K, Saito Y and Chiba K. Association of *OATP-C* *15 in patients with hypercholesterolemia receiving pravastatin or atorvastatin. (submitted)

謝辞

本研究を通じて終始懇切丁寧なご指導とご鞭撻を賜り、さらにご校閲を戴きました千葉大学薬学研究院薬物学教室 千葉寛 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、終始懇篤なるご指導ならびに有益なご助言を賜りました千葉大学薬学研究院薬物学教室 細川正清 助教授、小林カオル 助手に深く感謝申し上げます。

共同研究者として本研究にご協力戴きました千葉大学薬学研究院医薬品情報学教室 上田志朗 教授、同医学研究院細胞治療学教室 関直人 博士、同薬学研究院薬物学教室 井川佳之 氏（現第一サントリーファーマ株式会社）、亀山良雄 氏、清水敦子 氏、大石智春 氏、上田窓 氏に心より感謝申し上げます。

また、本研究を行うにあたり多くのご指導とご助言を戴き、活力を与えてくださった千葉大学薬学研究院薬物学教室の皆様には感謝いたします。

最後に私事では有りますが、これまで私を支え、かつ、励ましてくれた家族に心から感謝致します。

主査、副査名

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究科で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学薬学部 医学博士 上田志朗 教授

副査 千葉大学医学部 薬学博士 北田光一 教授

副査 千葉大学薬学部 薬学博士 上野光一 教授