한국인에서 CYP2C8 유전형에 따른 Rosiglitazone 약동학 연구

서울대학교 의과대학 약리학교실 및 서울대학교병원 임상약리실, ¹국립암센터, ²메타젠텍

조주연, 임형석¹, 서유신², 정재용, 홍경섭, 이소영, 유경상, 장인진, 신상구

=Abstract=

Pharmacokinetics of Rosiglitazone According to CYP2C8 Genotype in Korean Population

Joo-Youn Cho, Hyeong-Seok Lim¹, You-Sin Suh², Jae-Yong Chung, Kyoung-Sup Hong,
So-Young Yi, Kyung-Sang Yu, In-Jin Jang, Sang-Goo Shin

Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology Unit, College of Medicine, Seoul National University and Hospital, Seoul, Korea, ¹National Cancer Center, Ilsan, Korea, ²Metagentech Co., Seoul, Korea

Background: Cytochrome P450 (CYP) 2C8 is the major enzyme that metabolizes many xenobiotics, including the anti-cancer drug paclitaxel and anti-diabetic drug rosiglitazone. Genetic polymorphisms of the human *CYP2C8* gene were identified in Korean population, and their effects on the phenotype were evaluated on the basis of the in vivo pharmacokinetics of rosiglitazone.

Methods: We surveyed genetic variations in all exons, exon-intron junctions, and promoter region of human *CYP2C8* gene from 306 unrelated healthy Koreans by using fluorescence two-dimensional gene scanning (TDGS) and sequence analyses. Pharmacokinetic parameters of rosiglitazone after 8 mg single dose in relation to the corresponding polymorphisms were estimated.

Results: Genetic analysis revealed the existence of eleven single nucleotide polymorphisms (SNPs). Two synonymous SNPs, three non-synonymous SNPs and one nucleotide deletion were identified in the coding region, two SNPs in intron, and three SNPs in promoter region. Allele frequencies of 324A>G, 370C>T (R124W) in exon2, 475delA (*CYP2C8**5) in exon3, 917T>C (L306P) in exon6, 1171C>A (L391M), and 1230C>T in exon8 were 0.005, 0.002, 0.002, 0.002, 0.002, and 0.26, respectively. Three common SNPs, -411T>C, -370T>G, and -271C>A in the 5'-flanking region were frequent at 0.382, 0.330, and 0.116, respectively. The functional significance of the two upstream polymorphisms (*CYP2C8**1C and *1D) and R124W and 475delA alleles was investigated in pharmacokinetics of rosiglitazone. Pharmacokinetic characteristics of rosiglitazone were not different in single heterozygous subject for either 370C>T or 475delA and in homozygous subjects for *CYP2C8**1C and *CYP2C8**1D, compared with homozygous wild type subjects.

Conclusion: Although several genetic polymorphisms for *CYP2C8* were identified in Koreans, there was no evidence that either upstream and non-synonymous SNPs gave rise to altered pharmacokinetics of rosiglitazone.

Key words: *CYP2C8*, TDGS, Polymorphism, Haplotype, Rosiglitazone, Pharmacokinetics

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (A010110)

교신저자 : 신상구

서울대학교 의과대학 약리학교실 및 서울대학교병원 임상약리실

서울종로구 연건동 28, 서울대학교 의과대학 약리학교실 605호

Telephone : 02/740-8286 Fax : 02/745-7996 E-mail : capmed01@snu.ac.kr

서 론

Cytochrome P450 (CYP) 동위효소 (isozyme)는 대표적인 약물대사효소로서 체내에 유입된 약물의 체내동태에 가장 큰 비중을 차지하며, 임상적으로 사용되는 약물 대부분 CYP3A, CYP2D6, 또는 CYP2C 계열에 의하여 대사된다. 이들 CYP 동위효소들의 유전적 다형성은 동서양에서 꾸준히 연구되어 왔으며, 특히 CYP2C 계열의 2C9과 2C19은 single nucleotide polymorphism (SNP)에 따른 표현형 및 약동학적 연구가 활발히 보고되었다. 한편, CYP2C 계열의 동위효소인 CYP2C8는 그 유전자 구조가 비교적 최근에 보고되어, 유전자 변이에 따른 표현형 연구 및 약동학 연구가 활발히 진행되고 있다.¹

CYP2C8은 carbamazepine, diazepam, diclofenac, ibuprofen, mephobarbital, naproxen, omeprazole, tolbutamide, S-warfarin 및 paclitaxel 등의 치료약물의 대사를 담당하는 중요한 효소로서 in vitro 또는 in vivo metabolism 연구로부터 이들 약물의 대사경로에 주로 작용함이 보고되었다.² 당뇨병 치료보조제인 rosiglitazone과 troglitazone 등은 주로 CYP2C8에 의하여 hydroxylation 및 N-demethylation 되며, 일부는 CYP2C9, CYP3A4에 의하여 대사되는 것이 보고되어 있다.³ 또한 간, 신장에서 arachidonic acid를 내인성 생활성 물질인 epoxy-eicosatrienoic acid로 대사시키는 역할도 한다.⁴

현재까지 보고된 CYP2C8 유전자 변이는 CYP2C8*1에서 CYP2C8*10까지 총 12개의 allele로서 CYP allele nomenclature committee (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2c8.htm>)에 보고되어 있다. Dai 등이 보고한 CYP2C8*2 (I269F)와 CYP2C8*3 (R139K, K399R)의 발현빈도는 흑인에서 각각 0.18, 0.02이고 백인에서 각각 0.0, 0.13으로 나타났다.⁵ CYP2C8*2와 CYP2C8*3 allele은 in vitro에서 paclitaxel을 6-hydroxypaclitaxel로 대사시키는 능

력이 각각 50%, 100% 감소됨을 보였다. Bahadur 등은 영국인 107명에서 CYP2C8*4 (I264M), *1B, *1C 등을 보고 하였다.² 동양인을 대상으로 한 CYP2C8 유전자 변이에 대한 연구는 주로 일본에서 이루어졌다. Soyama 등은 73명의 일본인 cell line에서 CYP2C8*3 1명, P404A 1명의 non-synonymous SNP의 검출을 보고하였고⁶ 2002년도 논문에서는 early stop codon을 형성하는 CYP2C8*5 (475delA)을 보고하였다.⁷ 최근 Nakajima 등은 일본인에서의 유전형 분석결과, 서양인 및 흑인에서 보고된 non-synonymous SNP이 전혀 검출되지 않았고 오직 CYP2C8*5 allele이 0.0025의 빈도로 발현함을 보고하였다.⁸ 최근 Hichiya 등은 기존에 보고되지 않은 5종의 non-synonymous SNP과 그 기능을 in vitro 연구를 통해 연구하였다.⁹

한편 최근에 개발된 당뇨병 치료보조제인 rosiglitazone과 pioglitazone은 이미 본 연구실에서는 소수의 피험자를 대상으로 이들 약물들의 약동학 연구를 시행한 바 있다. 한국인에서 rosiglitazone 단위투여시 AUC 및 Cmax가 서양인에 비하여 각각 50%, 35% 증가하였다. 이러한 약동학적 특성의 차이는 한국인 고유의 내적, 외적 요인에 의한 차이에 기인하는데, rosiglitazone을 대사하는 CYP2C8의 유전자형의 변이에 의한 효소 활성의 저하가 원인일 가능성이 높다. 그러나 한국인에서의 CYP2C8 표현형 및 유전형에 대한 연구는 전무하다. 따라서 서양인에서 이미 보고된 SNP외에 알려져 있지 않는 한국인 특유의 유전형이 있는지를 확인할 필요가 있다. 또한 발견된 유전자형에 따라 기질약물인 rosiglitazone을 투여하였을 때의 약동학적 특성의 변화를 관찰하여 유전자형의 임상적 의의를 파악할 필요가 있다.

따라서 본 연구에서는 306명의 한국인을 대상으로 CYP2C8 유전자의 exon-intron junction을 포함하는 9개의 coding region과 -2kb upstream의 5'-flanking region을 검색하고, 비교적 발현빈도가

높은 haplotype의 homozygote인 피험자 또는 non-synonymous SNP를 갖는 피험자에서, 대사경로상 CYP2C8 유전적 변이의 영향을 받을 가능성이 높은 약물인 rosiglitazone을 단회투여한 후 약동학적 분석을 통하여 CYP2C8 haplotype 또는 유전자형과 표현형과의 관계를 연구하고자 하였다.

연구방법

1. 연구 대상 및 채혈

CYP2C8의 유전자 변이를 검색하기 위하여 306명의 친척관계가 없는 건강한 한국인 성인 남녀를 대상으로 하였다. 그 중 221명은 남자, 85명은 여자였고 나이는 평균 21.67세 (19-31세)였다. 피험자에게는 연구내용 및 불편사항 등에 대한 충분한 설명을 하고 난 후, 서면 동의서를 받았다. 피험자로부터 EDTA 처리된 전혈 5cc를 채혈하였으며, 인구학적 정보 외에 흡연여부, 음주량, 커피 섭취, 과거 병력, 약물복용 등의 연구에 관련된 정보를 얻었다.

대사경로상 CYP2C8에 의해 대사되는 rosiglitazone의 약동학 연구를 위하여 유전형 분석을 기실시한 사람 중에서 19-55세, 이상체중의 20% 이내이면서 알러지를 포함한 임상적으로 의미있는 급만성 병력, 약물남용, 60일 이내 타 임상연구참여, 1개월내 헌혈 경력, 과도한 음주 (일일 평균 50g 이상) 및 흡연 (일일 20개피 이상)에 해당하지 않는 자원자를 대상으로, 연구시작 3주 이내에 스크리닝 건강검진 (문진, 혈액검사)을 실시하여 연구에 적합하다고 판단된 건강한 남성 지원자를 대상으로 하였다. 의약품 임상시험관리기준에 준하여 이 연구에 참여하는 지원자들에게 임상연구를 위한 설명서 내용을 충분히 설명하고 피험자의 자유의사에 의하여 서면 동의서를 받았다. 본 연구를 위한 유전형 분석과 임상연구계획에 대하여 임상시험기관인 서울대병원의 임상시험심사위원회(IRB)의 심사를 받았다.

2. CYP2C8 유전형 분석

306여명의 피험자로부터 취한 전혈 중 200 μ l를 QIAamp DNA blood kit (Qiagen)를 사용하여 추출한 후 분주하여 -20℃에 보관하였다. CYP2C8 유전자는 exon 9개로 이루어져 있으며 그 크기는 exon과 intron을 포함하여 약 31 kb이고 chromosome 10q24에 (cent)-CYP2C18-CYP2C19-CYP2C9-CYP2C8-(tel) 순으로 존재한다. CYP2C8 유전자는 인접한 다른 CYP2C 유전자들과 염기서열의 유사성이 있어서 CYP2C8 유전자만을 증폭하는 것이 실험의 관건이었다. 본 연구에서는 (주)메타젠텍에서 제공하는 프로그램을 이용하여 long PCR을 위한 CYP2C8 특유의 primer를 제작하였고, two-dimensional gene scanning (TDGS)에 사용할 GC-Clamp 및 fluorescent dye가 부착된 short-PCR primer를 제작하였다. Long PCR을 위해 제작된 CYP2C8 특유의 primer를 이용하여 다음의 조건에서 long PCR을 수행한 결과, CYP2C8 유전자의 exon 1-5를 포함하는 11.3 kb의 PCR product (I)와 exon 6-10을 포함하는 9.4 kb의 PCR product (II)를 얻었다. Long PCR product I, II를 주형으로, GC-Clamp 및 fluorescent dye가 부착된 short-PCR primer를 이용하여 다음의 조건에서 multiplex PCR을 실행하였다. 그 결과, exon 1 (2개), exon 2, exon 3, exon 4 (2개), exon 5, exon 6 (2개), exon 7 (3개), exon 8, exon 9 (2개)의 PCR product를 얻었다. 0-80% UF (100 % UF=7 M urea, 40% formamide)가 포함된 polyacrylamide gradient gel을 multiple gel caster를 이용하여 한번에 8개씩 만들었다. Short multiplex PCR product를 각 gel에 loading한 후, OptiAnalyzer TM8000HT 장치에서 전압과 시간을 조절하여 high speed 2-dimensional electrophoresis를 수행하였고 그 pattern을 ReadImage program을 사용하여 관찰하였다. CYP2C8 유전자의 SNP를

TDGS로 관찰한 후, 이들의 정확한 위치를 확인하고자 다른 pattern을 보이는 샘플 및 대조군에서 direct sequencing으로 염기서열을 분석하여 SNP를 분석하였다. 이때, 각 TDGS fragment를 포함하는 PCR product는 long-PCR 수행 후, 새로 염기분석을 위하여 제작된 특이적 primer를 이용하여 exon 별로 증폭하였다. CYP2C8 유전자의 exon-intron junction을 포함하는 coding region의 SNP를 검출하였고 SNP의 발생빈도가 높은 경우는 TDGS의 결과만으로 heterozygous mutant와 homozygous mutant를 구분할 수 없으므로, 다시 1-DGGE (dimensional gel gradient electrophoresis)를 수행하여 발생빈도를 구하였다. CYP2C8 유전자 5'-flanking region에서의 SNP 검출하기 위하여 약 2.0 kb의 upstream region이 분석되었다. CYP2C8 유전자 5'-flanking region에 특이적인 primer set을 이용하여 약 500 bp의 PCR fragment를 4개 증폭한 후 direct sequencing 하였다.

3. CYP2C8 Haplotype 및 linkage disequilibrium 분석

한국인 306명에서 빈번하게 나타나는 CYP2C8의 유전자형의 분포로부터 Arlequin (version 2.000, Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland) software를 사용하여 expectation-maximization (EM) 알고리즘에 따라 CYP2C8의 haplotype 결정하고 haplotype 발생빈도를 예측하였다. 또한 각 SNP의 위치에 따라 linkage disequilibrium (LD)가 있는지를 likelihood-ratio test를 이용하여 분석하였다.

4. CYP2C8 유전형에 따른 rosiglitazone의 약동학 연구

CYP2C8 유전형 분석을 통하여 얻어진 결과로부

터 발현 빈도가 비교적 높은 haplotype의 homozygote인 피험자 또는 non-synonymous SNP를 갖는 피험자에서 rosiglitazone을 단회투여한 후 약동학적 분석을 통하여 CYP2C8 유전형과 표현형과의 관계를 연구하고자 하였다. 피험자는 투약일 저녁에 서울대병원 임상시험센터에 입원하여 다음날 공복상태에서 오전 9시경에 Rosiglitazone 8 mg (아반디아 4mg/tab 2정, 글락소스미스클라인)을 1회 경구투여 받았다. 연구기간동안 과격한 운동, 연구시작 48시간 전부터 종료시까지 음주, 투약 후 4시간동안 흡연, Xanthine계 함유 음식 및 음료는 첫번째 투약 24시간 전부터 마지막 채혈 때까지 금하게 하였다.

약물동태 분석을 위한 채혈은 투약전과 투약시작 후 15, 30, 45 분, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 14, 24시간까지 총 14회, sodium citrate를 함유한 10 ml vacutainer tube에 혈액 약 8 ml를 채취하였다. 혈장내 rosiglitazone의 농도를 분석하기 위하여 내부표준물질로 celecoxib를 사용하였고, rosiglitazone과 celecoxib 표준물질은 Dr. Reddy's Laboratories Ltd.에서 얻었다. 농도 분석 방법은 Dr. Reddy's Laboratories Ltd.의 Dr. Mamidi가 제공한 프로토콜에 따라 형광검출기를 이용하여 high-performance liquid chromatography (HPLC)로 측정하였다. 간단히 설명하자면, 사용한 컬럼은 Capcell Pak UG250 C18 (250x4.6 mm)이고 KH_2PO_4 (10 mM):acetonitrile:methanol (40:50:10, v/v) 혼합액 (triethylamine으로 pH6.5를 맞추)을 이동상으로 하여 유속 1.0 ml/min으로 분석하였다. 혈장 샘플은 ethyl acetate로 추출한 후 유기용매를 날려버린 잔사에 이동상으로 reconstitution하여 HPLC에 주입하였다. 샘플 측정하기 전에 분석방법의 validation을 수행하여 5-1000 ng/ml의 농도 범위에서 101.8-110.5%의 정확도와 8.5%이내의 정밀도를 갖는 방법으로 분석을 수행하였다. 약동학 파라미터는 rosiglitazone 농도로부터 WinNonlin 4.0.1 (Ph

Figure 1. TDGS patterns and sequencing results of SNPs in *CYP2C8* gene

arsight Co. CA, USA)을 이용하여 non-compartmental analysis에 의해 산출하였다. Cmax는 실측치를 사용하였고, AUC는 최종채혈시까지의 곡선하면적을 계산하였으며, 경구청소율(CL/F)은 투여용량을 AUC로 나누어 산출하였다.

5. 통계분석

피험자 수의 군간 분포가 동일하지 않고 적은 수임을 고려하여 비모수적 방법을 사용하여 통계적 분석을 시행하였다. 유전형에 따른 세 군간의 차이 검정은 Kruskal-Wallis test를 적용하였다. 분석에는 SAS 8.1 (Cary, USA)를 사용하였다. $P < 0.05$ 를 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

1. CYP2C8의 SNP 검출 및 발생빈도 분석

CYP2C8 유전자의 exon-intron junction을 포함하는 coding region을 한국인 306명의 혈액샘플에서 TDGS로 관찰한 결과, 총 8가지의 mutation이 발견되었다 (Figure 1). 이들의 정확한 위치를 확인하고자 다른 pattern을 보이는 샘플 및 대조군에서 automated sequencing으로 염기서열을 분석하여 확인하였다. 또한 발현빈도가 높은 경우, TDGS의 결과만으로 heterozygous mutant와 homozygous mutant를 구분할 수 없으므로 다시 1-DGGE (dimensional gel gradient electrophoresis)를 수행하여 발현빈도를 결정하였다 (Figure 2).

염기서열 분석 결과, exon 2의 324A>G와 exon 8의 1230C>T는 아미노산 서열의 변화가 없는 synonymous mutation이었고 각각 0.5%, 2.6%의 빈도로 나타났다. 3종의 non-synonymous mutation이 발견되었는데, exon 3의 370C>T (R124W), exon 6의 917T>C(L306P) 및 exon 8의 1171C>A (L391M)는 각각 한 명의 피험자에서 heterozygous 형태로 검출되어 그 발현빈도가 매우 낮음을 알 수

Figure 2. 1-DGGE patterns of SNPs in *CYP2C8* gene

Table 1. Frequencies of SNPs in the *CYP2C8* gene in Korean populations (n = 306)

Location	Nucleic acid substitution a	Nucleotide sequence	Amino acid substitution	Genotype			Allele frequencies	
				w/w	w/m	m/m	w	m
Promoter	-411 T>C	TTATA(T/C)ACAAA	-	113	152	41	0.617	0.382
Promoter	-370 T>G	ATAAA(T/G)TCCCA	-	138	134	34	0.670	0.330
Promoter	-271 C>A	TGGAA(C/A)AACCA	-	241	59	6	0.884	0.116
Intron 1	IVS1+10 G>A	AGTCT(G/A)CCTTA	-	305	1	0	0.998	0.002
Exon 2	324 A>G	ACTAA(A/G)GGACT	K108K	303	3	0	0.995	0.005
Intron 2	IVS2-13 insT	GCCCC(Tins)TTTTT	-	99	143	64	0.557	0.443
Exon 3	370 C>T	AGATC(C/T)GGCGT	R124W	305	1	0	0.998	0.002
Exon 3	475 delA	AAAAA(Adel)CCAAG	frameshift	305	1	0	0.998	0.002
Exon 6	917 T>C	CACTC(T/C)GAGAT	L306P	305	1	0	0.998	0.002
Exon 8	1171 C>A	CATTA(C/A)TGACT	L391M	305	1	0	0.998	0.002
Exon 8	1230 C>T	CCTGG(C/T)CACTT	G410G	290	16	0	0.974	0.026

^aNucleotide numbering starts from the translation start site of the *CYP2C8* gene, the A in ATG being +1 and the immediate 5' base from A in ATG being 1. Intron sequences are designed IVS (intervening sequences). A number followed by a plus represents the base pair position relative to the 5'-end of the intron, a number followed by a minus represents the base pair position relative to the 3'-end of the intron.

Figure 3. Direct sequencing results of the 5'-flanking region in *CYP2C8* gene

Table 2. Frequencies of haplotypes constructed from common four SNPs in *CYP2C8* gene

Position ^a	-411	-370	-271	IVS-13	Frequency of
Nucleotide	T/C	T/G	C/A	delT/insT	haplotype (%)
Haplotype					
H1	T	T	C	delT	6.95
H2	T	T	C	insT	10.37
H3(*1B)	T	T	A	delT	10.69
H4	T	T	A	insT	0.75
H5	T	G	C	delT	2.84
H6 (*1C)	T	G	C	insT	30.16
H7(*1D)	C	T	C	delT	35.24
H8	C	T	C	insT	3.00

^aNucleotide numbering starts from the translation start site of the *CYP2C8* gene, the immediate 5'-base from A in ATG being 1.

Frequencies of the haplotypes were determined in 306 Korean populations as described in Methods.

Table 3. Linkage disequilibrium between four polymorphic loci -411, -370, -271, IVS2-13

	-370T>G	-271C>A	IVS2-13insT
-411T>C	$\chi^2=147.32$ P<0.0001	$\chi^2=27.23$ P<0.0001	$\chi^2=135.16$ P<0.0001
-370T>G		$\chi^2=35.49$ P<0.0001	$\chi^2=184.92$ P<0.0001
-271C>A			$\chi^2=38.07$ P<0.0001

있었다 (<0.002) (Table 1). 한 명의 피험자에서 exon 3의 475A의 deletion (*CYP2C8**5)이 발견되었는데, 이 nucleotide deletion은 아미노산의 frameshift가 일어나서 codon 177에서 단백질 합성을 종결시킨다. 그 외에도 2개의 intron mutation이 발견되었는데, 그 중에서 intron 2에 존재하는 IVS2 (intervening sequence) -13 T insertion의 발현빈도는 0.443으로 매우 높았다. 이들 exon 및 intron의 mutation이 splicing site를 변경시키는지

를 확인하기 위하여 http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html web site에서 제공하는 프로그램을 이용하여 splice site를 분석한 결과, 관찰된 8개의 mutation 모두 splice site를 변경시키지 않았다.

2. *CYP2C8*의 5-flanking region의 SNP 검출 및 발현빈도 분석

CYP2C8 유전자의 5-flanking region 2.0 kb를 direct sequencing 방법을 사용하여 분석한 결과, 한국인 306명의 혈액샘플에서 3개의 SNP가 발견되었다 (Figure 3). 그 중에서 -271C>A와 -370T>G는 각각 *CYP2C8**1B와 *CYP2C8**1C로 *CYP* allele web site에 명명되어 있으며, -411T>C는 본 연구에서 *CYP2C8**1D로 명명하였다. 그 발현빈도는 각각 0.116, 0.33, 0.382로 나타났다 (Table 1). Promoter 부위에서의 SNP는 transcription factor binding site를 변화시킬 수 있으므로 MatInspector를 이용하여 database search를 수행하였다. 그 결

Table 4. Demographic data and pharmacokinetic parameters for rosiglitazone after single oral dose (8 mg) in 15 healthy subjects, who are classified to *CYP2C8* genotypes.

Genotype	*1A/*1A (n=3)	*1C/*1C (n=4)	*1D/*1D (n=6)	*1D/*1D 370C/T (n=1)	*1C/*1D 475A/delA (n=1)
Age (y) ¹	23.0 ± 0.0	24.0 ± 1.4	24.2 ± 1.5	22	23
Height (cm) ¹	178.0 ± 0.0	173.5 ± 6.4	176.3 ± 6.2	178	174
Weight (kg) ¹	67.5 ± 2.0	75.3 ± 10.8	71.3 ± 4.8	70.8	72.1
C _{max} (ng/ml) ¹	1280.8 ± 365.1	1344.7 ± 170.3	1180.0 ± 365.9	1141.1	998.8
AUC _{inf} (ng/ml·h) ¹	8224.2 ± 2579.1	6843.1 ± 1815.1	6538.7 ± 1441.4	8817.7	6448.9
AUC _{inf} ^{NL70} (ng/ml·h) ¹	7969.6 ± 2713.0	7246.4 ± 1649.3	6605.4 ± 1196.5	8918.5	6642.4
Oral clearance (L/h) ¹	1.04 ± 0.32	1.23 ± 0.29	1.27 ± 0.29	0.90	1.24
Oral clearance (L/h/kg) ¹	0.0155 ± 0.0050	0.0163 ± 0.0030	0.0178 ± 0.0032	0.0128	0.0172

Each value indicates mean ± SD.

C_{max}, peak plasma concentration; AUC_{inf}, area under the plasma drug concentration versus time curve from t=0 to t=∞; AUC_{inf}^{NL70}, normalized AUC_{inf} by body weight (70 kg).

¹Not significant from 3 homozygous groups (*1A/*1A, *1C/*1C, and *1D/*1D) by Kruskal-Wallis test (>0.05).

과 -370T>G를 제외한 다른 두 site의 경우, binding site를 변화시키지 않았다. -370T allele은 human muscle-specific Mt binding site의 core sequence로서 T>G polymorphism이 있을 때 transcription factor의 binding에 변화가 있을 것으로 예상되었다.

3. Haplotype 결정 및 linkage disequilibrium

한국인 306명에서 빈번하게 나타나는 SNP 4개, -411T>C, -370T>G, -271C>A 및 IVS2-13insT의 유전자형의 분포로부터 Arlequin software를 사용하여 haplotype을 분석하였다. 4개의 SNP로부터 만들어질 수 있는 haplotype 16개 중에서 오직 8개만이 존재하였으며 이는 4개의 SNP 위치간에 강한 linkage가 있음을 보여준다. 한국인에서 높은 빈도로 나타나는 haplotype은 H6 (*1C)와 H7 (*1D)로 약 65%를 차지하였다 (Table 2). -411,

-370, -271 및 IVS2-13의 4 polymorphic loci에서 Arlequin software를 사용하여 linkage disequilibrium (LD)을 분석한 결과, 모든 loci에서 강한 LD가 있음을 알 수 있었다 (Table 3).

4. Rosiglitazone 약동학 분석

본 연구는 발현 빈도가 비교적 높은 haplotype인 *1A/*1A, *1C/*1C, *1D/*1D의 homozygote인 피험자와 non-synonymous SNP를 갖는 피험자를 대상으로 공개적으로 모집하였으며, 피험자 선정기준에 합당하고 제외기준에 해당되지 않는 건강한 한국인 남성 자원자 15명이 본 연구에 참여하였다. *1A/*1A, *1C/*1C, *1D/*1D 군에 각각 3, 4, 6명이 참여하였으며, non-synonymous SNP인 370C>T와 475delA을 가지고 있는 heterozygote 각 1명이 참여하였다. 모든 피험자는 투약 후 중도탈락 없이 임상시험을 마쳤으며, 각 군별로 피험자의 일

반적인 특성은 Table 4에 표시하였다. 전체 피험자의 나이는 23.6 ± 1.3 세 (mean $\pm$ SD)였고, 키는 176.0 ± 5.2 cm였고, 체중은 71.6 ± 6.4 kg이었다. 연령, 신장, 체중 모두 *1A/*1A, *1C/*1C, *1D/*1D 세 군간에 유의한 차이는 없었다 (Table 4).

Rosiglitazone을 단회투여 후 혈중 약물농도 양상을 Figure 4에 나타냈다. 각 군별로 혈중 약물농도의 양상이 상이하지 않았고, 특히 frameshift가 생성되는 475delA를 가진 피험자에서 rosiglitazone이 대조군인 *1A/*1A에 비하여 천천히 소실될 것

으로 예상되었으나 차이를 보이지 않았다. 혈중 농도로부터 rosiglitazone의 약동학적 파라미터인 최고농도 도달시간(T_{max}), 최고농도(C_{max}), 혈중 농도곡선하면적($AUC_{0-\infty}$, AUC_{0-24}), 소실기반감기($T_{1/2}$), 분포용적(V_z/F), 청소율(CL/F)을 구하였다. 유전형별로 약동학 파라미터를 분석하였을 때, *1A/*1A, *1C/*1C, *1D/*1D 세 군에서 통계적으로 유의한 차이를 보이는 약동학 파라미터는 없었다 (Table 4). 370C>T heterozygot인 피험자의 경우, 다른 군에 비하여 AUC가 증가한 것처럼 보이나,

Figure 4. Mean (SD) plasma concentration-time curves of rosiglitazone after the oral administration of a 8 mg single dose in 15 subjects, who were classified to five different CYP2C8 genotypes; CYP2C8*1A/1A, *1C/*1C, *1D/*1D, 370C>T hetero, and 475delA hetero.

Figure 5. Relationships between CYP2C8 genotypes and pharmacokinetic parameter, AUC_{inf} for rosiglitazone after single oral dose (8 mg) in 15 healthy subjects. AUC_{inf} , area under the plasma drug concentration versus time curve from $t=0$ to $t=\infty$. Bars show the mean value of AUC_{inf} in each group.

*1A/*1A, *1C/*1C, *1D/*1D 군에서의 upper limit 근처의 값으로 유의한 차이는 없었다 (Figure 5).

고 찰

당뇨병 치료보조제인 rosiglitazone은 주로 CYP2C8에 의하여 대사되는 화합물로서 이미 본 연구실에서는 소수의 피험자를 대상으로 이들 약물들의 약동학 연구를 시행한 결과, 한국인에서의 약동학 파라미터인 AUC와 C_{max} 는 서양인에 비하여 유의하게 높은 것으로 나타났다. 이러한 약동학적 특성의 차이는 내인적, 외인적 요인의 차이에서 기인하는데, 내인적 요인 중에서 rosiglitazone을 대사하는 CYP2C8의 유전자형의 변이에 의한 효소 활성의 저하가 원인일 가능성이 제기되었다.

CYP2C8의 유전적 변이에 대한 연구는 Dai 등 (2001)에 의하여 백인, 흑인, 동양인을 대상으로 처음 보고되었다.⁵ 보고된 allele로는 CYP2C8*2 (805A>T, I269F)와 CYP2C8*3 (416G>A, R139K; 1196A>G, K399R)가 있으며, 그 발현빈도는 흑인에서 각각 0.18, 0.02이고 백인에서 각각 0.0, 0.13으로 나타난 반면 동양인에서는 이러한 유전적 변이가 발견되지 않았다. 이 연구에서 동양인은 인도-파키스탄인, 대만인, 중국인, 캄보디아인, 일본인, 말레이시아인 24명을 연구대상으로 하였는데, 이는 다양한 인종을 대상으로 하고 샘플 수가 작으므로 동양인에서 유전적 변이를 검출하지 못한 원인으로 사료되었다. 따라서 본 연구에서는 단일한 민족인 한국인을 대상으로 306명의 혈액 DNA로부터 CYP2C8 유전적 변이를 스크리닝 하였다.

본 연구에서 새로운 CYP2C8 변이를 검출하고 유전형을 검색하는데 사용한 유전자 scanning 방법으로 TDGS (two-dimensional gel scanning) 방법을 이용하였다. TDGS system은 DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)를 수정하여 정확성과 재현성을 증가시키면서 저비용과 고효율로 특정 유전자에서 새로운 변이를 검출하는 것을 가능하게 하였다. 특히 size가 커서 SNP 분석이 용이하지 않은 CFTR (fibrosis transmembrane conductance regulator), BRCA (breast and ovarian cancer susceptibility gene) 등의 유전자에서 성공적으로 사용되었다.¹¹ 본 연구에서 TDGS를 이용하여 유전자 변이를 검출하고자 한 CYP2C8 유전자는 9개의 exon을 가지고 있으며 각 exon 별로 PCR 증폭하였고 비교적 크기가 큰 exon에서 2,3 개의 fragment로 증폭하여 총 14개 fragment를 동시에 PCR 증폭하였다. 이러한 방법은 총 306개의 많은 수의 검체를 대상으로 유전자 변이를 찾는 데 있어 저비용 고효율의 방법으로서 direct sequencing에 비하여 약 30%에 해당하는 비용이 들었다.

한국인 306명의 혈액샘플에서 CYP2C8 유전자의 exon-intron junction을 포함하는 coding region 및 2 kb의 5'-flanking region을 TDGS 및 sequencing으로 관찰한 결과, 총 11가지의 SNP를 발견하였다. 5'-Flanking region에서 3개, intron에서 2개, exon에서 6개의 SNP가 발견되었고 특히 coding region에서는 3개의 non-synonymous SNP, 2개의 synonymous SNP, 1개의 nucleotide deletion이 나타났다. 본 연구에서 검출된 3종의 non-synonymous SNP (R124W, L306P, L391M)은 다른 연구에서 보고되지 않은 novel SNP이다. 이미 서양인 및 흑인에서 보고된 non-synonymous SNPs (CYP2C8*2, *3, *4)이 전혀 검출되지 않았고,²⁵ 최근 일본인에서 검출된 non-synonymous SNPs (CYP2C8*6, *7, *8, *9, *10)도 전혀 검출되지 않았다.⁹ 그러나 CYP2C8*5 (475delA)는 0.002 발현

빈도로 나타나 이전 일본인을 대상으로 한 연구와 유사한 결과를 얻었다.⁸ CYP2C8*5는 frameshift가 일어나 177번 아미노산 위치에서 premature stop codon 생성에 의한 단백질 합성을 종결시키므로 CYP2C8의 대사 활성 기능이 저하될 것으로 예상되나 그 발현빈도가 0.002로 매우 낮아서 임상적인 의의가 낮을 것으로 사료된다.

한국인에서 검출한 SNP중에서 가장 발현빈도가 높은 SNP는 intron 2에 존재하는 IVS2-13insT로 그 빈도가 0.443이었으나, T insertion이 됨으로 인하여 새로운 splice site가 생성되거나, 존재하는 splice site가 없어지지는 않았다. 이 SNP는 미국 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 SNP database인 dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>)에 이미 보고되어 있다. CYP2C8의 5'-flanking region에서 발견된 3개의 SNP는 모두 발현빈도가 10% 이상으로 이미 보고된 서양인의 발현 빈도와는 많이 다르게 나타났다. 즉, 서양인에서 CYP2C8*1B (-271C>A) 및 CYP2C8*1C (-370T>G)의 발현빈도는 각각 19.6% 및 6.1%였고 한국인에서는 각각 11.5% 및 33.0%였다.² -411T>C는 본 연구에서 처음 보고되는 것으로 본 연구에서는 CYP2C8*1D로 명명하였다. CYP2C8*1C allele을 갖는 경우, putative human muscle-specific Mt binding site가 생성되나, 이 전사조절 부위는 근육조직에서의 발현과 연관된 것으로 간조직에서 CYP2C8의 발현에 미치는 영향은 매우 약할 것으로 사료되었다. 또한 *1B 및 *1C allele을 가진 사람에서 CYP2C8의 protein의 발현이 wild type과 통계적으로 유의하지 않음을 보고하였다.² 그러나 *1C allele의 경우에 CYP2C8의 발현이 wild type에 비하여 다소 감소되는 경향을 볼 수 있었으므로 *1C/*1C homozygous mutant에서 표현형을 관찰할 필요가 있었다.

한국인에서 빈번하게 나타나는 SNP 4개, -411T>C, -370T>G, -271C>A 및 IVS2-13insT의 유전

자형의 분포로부터 8개의 haplotype이 나타났으며, 특히 H6 (*1C)와 H7 (*1D)는 약 65%를 차지하여 wild type인 H1,2 (*1A)의 빈도가 18% 정도에 이르렀다. 또한 -411, -370, -271 및 IVS2-13의 4 polymorphic loci에서 각각 강한 linkage disequilibrium (LD)이 있었다. 일반적으로 disequilibrium은 population size, time (generations), polymorphic loci 사이의 거리에 의해서 결정이 되는데,¹² 5'-flanking region의 3개의 SNP loci는 140 bp이하의 가까운 거리에 있으므로 완벽한 LD가 유지되고 있으며, 이들 loci와 IVS2-13insT와는 약 2.5 kb의 거리에 있으므로 LD가 약간 감소되어 있다.

Rosiglitazone을 기질약물로 투여하여 유전형에 따른 약동학 특성을 규명하고자 수행된 임상시험에서는 CYP2C8*1A/*1A, *1C/*1C, *1D/*1D의 homozygote인 피험자에서 rosiglitazone의 약동학적 파라미터들이 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 non-synonymous SNP인 370C>T heterozygote인 피험자의 경우에 다른 군에 비하여 AUC가 증가한 것으로 보이나, 다른 군의 upper limit와 유사한 수준으로 차이는 없었다. 특히 475delA는 염기서열의 frameshift가 일어나 단백질의 truncation이 있음에도 불구하고 약동학적 특성의 차이가 다른 군에 비하여 전혀 차이가 없었다. 이러한 결과는 475delA가 heterozygous로 존재하기 때문에 wild type인 다른 allele에 의해서 생성된 CYP2C8이 compensation하거나, rosiglitazone의 대사에 일부 작용하는 CYP3A4 및 CYP2C9이 보상 작용할 것으로 예상된다. 한편 promoter region의 haplotype인 *1A, *1C, *1D allele은 모두 homozygote인 경우의 피험자만 임상시험에 참여하였는데, 군간 차이가 발견되지 않은 것으로 보아 각 allele은 CYP2C8의 constitutive expression에는 영향을 미치는 않는 것으로 보인다. 최근 CYP2C8 효소가 primary culture에서 rifampicin 등에 의해서 유도됨이 보고되었는데,¹³ pro-

moter region의 SNP에 의한 inducible expression의 변화를 관찰하기 위해서는 유도제인 rifampicin으로 유도한 후 rosiglitazone 투여하는 추가적인 임상시험이 필요할 것으로 사료된다.

본 임상시험에 총 15명이 참여하였는데, *1A/*1A, *1C/*1C, *1D/*1D 군에 각각 3, 4, 6명이, non-synonymous SNP인 370C>T와 475delA을 가지고 있는 heterozygote 각 1명이 참여하였다. 군간 소수의 피험자만을 대상으로 하였기 때문에 본 연구의 결과로부터 군간 약동학적 특성이 다르지 않다는 결론을 내리기는 힘들다. 그러나 유전자형을 스크리닝한 후 유전자형에 맞는 소수의 피험자로부터 자발적으로 임상시험에 참여하는 피험자를 모집해야 하므로 많은 수의 피험자를 모집할 수 없었다. 한편 *1B/*1B의 경우 피험자를 모집할 수 없어 임상시험을 진행하지 못하였으나, 이전 연구에서 이미 *1B allele은 단백질 발현에 있어서 wild type과 전혀 다르지 않음을 보였다.²

기질약물로 사용된 rosiglitazone은 in vitro에서 주로 CYP2C8에 의하여 para-hydroxylation 및 N-demethylation 되고 이러한 대사과정은 CYP2C8 기질약물인 paclitaxel 6 α -hydroxylation과 매우 높은 상관성을 이루어 in vivo에서 기질약물로서 사용될 가능성이 있음을 시사하였다.³ 본 연구에서는 정상인에게 투여가능한 rosiglitazone을 기질약물로 선정하였고 CYP2C8 유전자형에 따라 rosiglitazone의 약동학적 특성의 차이가 있다면 동시에 rosiglitazone이 CYP2C8의 in vivo probe drug임을 입증할 수 있다. 그러나 본 연구에서 유전자형에 따른 약동학의 차이가 나타나지 않았으므로 rosiglitazone을 CYP2C8의 기질약물로서의 사용이 적절했는지는 의문점으로 남아 있다.

결론적으로 본 연구에서는 한국인 306명에서 CYP2C8 유전자형을 TDGS 및 direct sequencing을 사용하여 검색한 결과, coding region에서 370C>T, 475delA, 917T>C, 1171C>A의 non-synony-

mous SNP를 각각 1명에서 발견하였고, promoter region에서 높은 빈도로 나타나는 3종의 haplotype (CYP2C8*1B, *1C, *1D)을 발견하였다. 그러나 370C>T, 475delA heterozygous mutant와 *1A/*1A, *1C/*1C, *1D/*1D의 homozygous mutant에서 rosiglitazone을 단회투여 하였을 때 약동학적 특성의 변화를 관찰할 수 없었고 이는 한국인 특유의 CYP2C8의 SNP 및 haplotype에 의하여 CYP2C8의 constitutive expression에는 영향을 미치는 않는 것으로 보인다.

Acknowledgments

We thank Dr. N.V.S.Rao Mamidi at Dr. Reddy's Laboratories Ltd., India for a kind gift of pure standards of rosiglitazone and celecoxib and the assay methodology.

참 고 문 헌

1. Klose TS, Blaisdell J, Goldstein JA *Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs. J Biochem Mol Toxicol* 1999;13:289-295
2. Bahadur N, Leathart JBS, Mutch E, Steimel-Crespi D, Dunn SA, Gilissen R, Houdt JV, Hendrickx J, Mannens G, and Bohets H *CYP2C8 polymorphisms in Caucasian and their relationship with paclitaxel 6-hydroxylase activity in human liver microsomes. Biochem Pharmacol* 2002;64:1579-1589.
3. Baldwin SJ, Clarke SE, Chenery RJ *Characterization of the cytochrome P450 enzymes involved in the in vitro metabolism of rosiglitazone. Br J Clin Pharmacol.* 1999; 48(3):424-32.
4. Zeldin DC, Moomaw CR, Jesse N, Tomer KB, Beetham J, Hammock BD, and Wu S

Biochemical characterization of the human liver cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase pathway. Arch Biochem Biophys 1996;330:87-96.

5. Dai D, Zeldin DC, Blaisdell JA, Chanas B, Coulter SJ, Ghanayem BI, Goldstein JA *Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. Pharmacogenetics* 2001; 11:597-607.
6. Soyama A, Saito Y, Hanioka N, Murayama N, Nakajima O, Katori N, Ishida S, Ozawa S, Sawada J *Non-synonymous single nucleotide alterations found in the CYP2C8 gene result in reduced in vitro paclitaxel metabolism. Biol Pharm Bull* 2001;24:1427-1430.
7. Soyama A, Saito Y, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Ozawa S, and Sawada J *Five novel single nucleotide polymorphisms in the CYP2C8 gene, one of which induces a frame-shift. Drug Metab Pharmacokinet* 2002;17: 373-377.
8. Nakajima M, Fujiki Y, Noda K, Ohtsuka H, Ohkuni H, Kyo S, Inoue M, Kuroiwa Y, and Yokoi T *Genetic polymorphisms of CYP2C8 in Japanese population. Drug Metab Dispos* 2003;31:687-690.
9. Hichiya H, Tanaka-Kagawa T, Soyama A, Jinno H, Koyano S, Katori N, Matsushima E, Uchiyama S, Tokunaga H, Kimura H, Minami N, Katoh M, Sugai K, Goto Y, Tamura T, Yamamoto N, Ohe Y, Kunitoh H, Nokiha-ra H, Yoshida T, Minami H, Saijo N, Ando M, Ozawa S, Saito Y, Sawada J. *Functional characterization of five novel CYP 2C8 variants, G171S, R186X, R186G, K247R, and K383N, found in a Japanese population. Drug Metab Dispos.* 2005;33(5):630-636.
10. Slatkin M, Excoffier L *Testing for linkage disequilibrium in genotype data using the EM algorithm. Heredity* 1996;76:377-383.

11. Eng C, Brody LC, Wagner TM, Devilee P, Vijg J, Szabo C, Tavtigian SV, Nathanson KL, Ostrander E, Frank TS; Steering Committee of the Breast Cancer Information Core (BIC) Consortium. *Interpreting epidemiological research: blinded comparison of methods used to estimate the prevalence of inherited mutations in BRCA1. J Med Genet.* 2001;38(12):824-33.
12. Brookes AJ *The essence of SNPs Gene* 1999;234:177-186.
13. Rae JM, Johnson MD, Lippman ME, Flockhart DA. *Rifampin is a selective, pleiotropic inducer of drug metabolism genes in human hepatocytes: studies with cDNA and oligonucleotide expression arrays. J Pharmacol Exp Ther.* 2001;299(3):849-57.