

200907002A

厚生労働科学研究研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

(ヒトゲノムテーラーメイド研究)

抗精神病薬と抗うつ薬のファーマコジェネティクス

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 功刀 浩

平成 22 (2010) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業：ヒトゲノムテーラーメイド研究)

総括研究報告書

抗精神病薬と抗うつ薬のファーマコジェネティクス

研究代表者 功刀 浩

国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第三部 部長

研究要旨

本研究は、精神疾患の病態に関与する可能性のある遺伝子や薬物代謝に関わる遺伝子の多型と抗精神病薬・抗うつ薬への薬物応答（治療反応性、重大な副作用）との関連を検討し、効率的で薬害の少ないテーラーメイド医療の実現につながる知見を得ることを目的とする。今年度は、次のような主要な成果が得られ、臨床応用に結び付き得る所見も多数得られた。

①今年度は、抗うつ薬で治療されている気分障害患者の DNA サンプルをおよそ 120 例収集した。健常者の DNA サンプルもおよそ 70 例収集した。これは、今後、テーラーメイド医療実現のための遺伝子研究の貴重なリソースとなる。

②抗うつ薬に対する治療反応性が明らかなうつ病患者の DNA サンプルを用いて 37 万 SNPs チップを用いたゲノムワイド関連解析データの詳細な解析を行い、治療反応性と強く関連する 7 遺伝子を同定した。これは治療反応性予測キットなどの作成に有用な知見となる。また、うつ病の 100 万 SNPs チップによる全ゲノム解析を行い、関連が強く示唆される領域に関するデータを得た。

③抗うつ薬の反応性を規定する遺伝子について候補遺伝子研究を行い、セロトニン 2 A 受容体遺伝子多型、CLOCK 遺伝子多型と抗うつ薬の反応性が関連していることを示唆する結果を得た。

④パニック障害では、パロキセチン血中濃度が高値、5HTTR L 型を保有していることが負の相関因子として、正の相関因子として 5-HT1A 受容体遺伝子型 C/C 型が治療反応性と有

意な相関がみられた。

⑤613人の抗うつ薬治療を受けている患者を対象に向精神薬と心電図上のQT間隔を比較した結果、女性、高齢、三環系抗うつ薬の服用、抗精神病薬の併用が、QT間隔と有意に関連していた。個別の抗うつ薬との関連を調べるとクロミプラミンがQT間隔と有意に関連しており、アミトリプチリンとトラゾドンが関連する傾向が認められた。

⑥DPP6 遺伝子が遅発性ジスキネジアの発症脆弱性に関わっている可能性を示唆する所見を得た。

分担研究者

岩田伸生 藤田保健衛生大学医学部・教授
下田和孝 獨協医科大学・教授
尾関祐二 獨協医科大学・准教授
稲田俊也 神経研究所附属晴和病院・副院長

A. 研究目的

本研究は、抗精神病薬や抗うつ薬の治療反応性と重大な副作用と関連する遺伝的要因について明らかにすることで、テーラーメイド医療の実現に向けた知見を得ることを目的とする。統合失調症は、およそ人口の1%が罹患する common disease であり、幻覚や妄想などの精神病症状に加え、意欲低下や自閉などの社会的機能の低下を生じ、約15%の患者は、自殺という不幸な転帰をたどる。抗精神病薬の個々の患者に対する有効性はケースバイケースであり、薬物選択の基準となる客観的な指標やエビデンスは殆どなく、医療者の「経験と勘」に基づいて行われているのが現状である。また、抗精神病薬は重大な副作用が生じることが少なくなく、中でも非可逆的な錐体外路系副作用である遅発性ジスキネジアをしばしば

生じる（定型的抗精神病薬ではおよそ15%）。近年開発された非定型抗精神病薬では、これらの錐体外路系副作用は少ない一方、耐糖能異常や肥満などのメタボリック症候群をしばしば生じる。また、抗精神病薬によって心電図上QTc延長を生じる場合があり、突然死のリスクを高めることが知られている。

うつ病は、およそ人口の10~20%が罹患する頻度の高い疾患であり、自殺の主要な原因疾患である。本邦では、自殺者は1990年代後半から急増し、年間3万人以上にのぼり、20~40歳代では死因の第一位であり、多くはうつ病/うつ状態と関連している。うつ病患者の約2/3は抗うつ薬の反応者であり症状の少なくとも50%が改善するが、残りの1/3の非反応者を前もって予測する客観的な指標がないため、4~6週間の経過をみて薬効を判断するほか有効な手段がないのが現状である。非反応者の場合、その6週間の間に症状が悪化し、自殺にいたる場合も少なくない。また、SSRIなどの新規抗うつ薬の副作用として嘔気・嘔吐があり、それによって薬物服用のコンプ

ライアンスが低下することが知られており、これも予後を悪化させる要因となる。また、抗うつ薬でも心電図上 QTc 延長を生じる場合があり、突然死のリスクを高めることが知られている。

さらに、抗うつ薬はパニック障害の主要な治療薬でもあるが、パニック障害では、外出恐怖などの症状によって社会活動が制限を受けることもあり、やはりゲノム情報によって治療反応性を予測することができれば、臨床的に有用である。

このように向精神薬による治療の特徴として、患者によって治療への反応性が大きく異なり、今のところ反応性を予測できる明らかな臨床的要因が少ないこと、重大な副作用を生じる可能性が少ないことが挙げられる。したがって、ゲノム情報を用いて、あらかじめ薬効や重大な副作用発現の予測を行うことが可能になることが期待される。

B. 研究方法

1) ヒト研究試料の収集： 国立精神・神経センター病院において治療中のうつ病患者と健常者を対象として、ゲノム DNA、血液中の RNA、血漿サンプルを多数収集した。

2) 抗うつ薬の薬理遺伝学的解析： 抗うつ薬に対する治療反応性が明らかなうつ病患者の DNA サンプルを用いて候補遺伝子研究や 37 万 SNPs チップを用いたゲノムワイド関連解析を行った。また、詳細な臨床情報のあるうつ病患者と健常者を用いて 100 万 SNPs チップによるゲノムワイド

関連解析も行った。

3) 分担研究者の岩田らは、抗うつ薬の治療反応性を規する遺伝子に関し、候補遺伝子研究として、セロトニン 1A 受容体 (HTR1A)、セロトニン 2A 受容体(HTR2A)、circadian rhythm 関連の clock gene として、CLOCK、SIRT1、PROK2、PROKR2、NR1D1、2 型代謝型グルタメート受容体 (GRM2、GRM3) を候補遺伝子として選んで検討した。

4) パニック障害に対するパロキセチンの治療反応性に関する薬理遺伝学的解析

分担研究者の下田らは、パロキセチン血中濃度、セロトニントランスポーター(5-HTTLPR)遺伝子型、C (-1019) G 5-HT1A 受容体遺伝子多型の、パニック障害の治療反応性に与える影響について検討を行った。パニック障害患者 65 名を対象に PAX による治療(10mg/日×4 週間)を行った。病状評価尺度には Panic Agoraphobia Scale (PAS) を使用した。重回帰分析により、2 週間後と 4 週間後の治療反応性 (PAS 改善率) に影響を与えている因子の分析を行った。

5) 向精神薬によるQT延長に関する解析

分担研究者の尾関らは、抗うつ薬で治療を受けている患者を対象に、QT 間隔を測定し、統計処理することで、各種薬剤が QT 間隔にどの程度影響を及ぼしているのかを検討した。昨年度までに引

き続き、さらに対象人数を増やして検討を行った。613 人の抗うつ薬治療を受けている患者を対象に検討し、性、年齢、薬剤投与などの臨床要因に関して重回帰分析を行い、リスクを同定した。

6) 遅発性ジスキネジアのリスク遺伝子に関する検討

分担研究者の稲田らは、遅発性ジスキネジアのリスクに関するゲノムワイド関連解析の結果に基づき、DPP6 遺伝子について詳細な解析を行った。群 86 人と非遅発性ジスキネジア群 188 人を対象とした。GABRG3 遺伝子の 110 の 1 塩基多型 (SNPs) を用いて詳細に関連を検討した。死後脳はオーストラリアブレインバンクよりの 17 例(コントロール 9, 統合失調症 8)と新潟大より提供の 17 人(コントロール 11, 統合失調症 6)を対象とした。マウスは C57/BJ6 雄で 40 週ハロペリドール投与と生食投与で比較した。遺伝子型判定は, TaqMan 法, 遺伝子発現は real-time PCR を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究は、精神疾患患者を対象とした遺伝子解析研究である。試料提供者およびその血縁者の遺伝的素因を研究するため、その取り扱いによっては、さまざまな倫理的、社会的問題を招く可能性がある。したがって、文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示第 1 号の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した研究計画書を作成し、研究施設での倫理委員会において承認

を受けた上で研究を行う。試料提供者への説明とインフォームド・コンセント、個人情報の厳重な管理 (匿名化) などを徹底している。

C. D. 研究結果、考察

1) ヒト研究試料の収集: 国立精神・神経センター武蔵病院において治療中のうつ病患者およそ 120 名のゲノム DNA、血液中の RNA、血漿サンプルを収集した。健常者はおおよそ 70 名収集した。これは、今後、テーラーメイド医療実現のための遺伝子研究の貴重なリソースとなる。

2) 抗うつ薬の薬理遺伝学的研究

抗うつ薬に対する治療反応性が明らかうつ病患者の DNA サンプルを用いて 37 万 SNPs チップを用いたゲノムワイド関連解析データの詳細な解析を行い、治療反応性と強く関連する 7 遺伝子を同定した。結果が独立サンプルで再現されれば、治療反応性予測キットなどの作成に有用な知見となる。

うつ病のリスク遺伝子に関する全ゲノム解析を行い、関連が強く示唆される領域に関するデータを得た (例えば 6 番染色体短腕など)。ゲノムワイド関連解析のデータは膨大であり、解析が現在も進行中であるが、うつ病遺伝子を同定するための極めて貴重な基盤的データベースとなる。

3) 抗うつ薬の治療反応性を規定する遺伝子の候補遺伝子研究

候補遺伝子として検討したもののうち、HTR2AおよびCLOCKとSSRI反応性と関連を示した。他の遺伝子との関連は認めなかった。セロトニンが直接作用するセロトニン受容体のみでなく、circadian rhythm関連の時計遺伝子であるCLOCKと関連を示したことは極めて興味深い。最近の研究では、気分障害の病態に、サーカディアンリズムが関連していることも示唆されており、治療反応予測のみならず、病態にまで迫ることができる可能性を本研究では示しているかもしれない。今後は更にサンプル数を増やし、結果が再現されるか否か確認する必要がある。

4) パニック障害に対するパロキセチンの治療反応性に関する薬理遺伝学的解析

パロキセチン血中濃度、5-HTTLPR 遺伝子型、C (-1019) G 5-HT1A 受容体遺伝子多型の、パニック障害の治療反応性に与える影響について検討を行った。副作用とコンプライアンス不良等により脱落した例を除いた2週間後の44例を分析したところ、パロキセチン血中濃度、5-HTTLPR 遺伝子型L型が負の相関因子として、正の相関因子として5-HT1A 受容体遺伝子型C/C型が治療反応性と有意な相関がみられた。同じく4週間後(17例)においては、5-HT1A 受容体遺伝子型C/C型が治療効果に対する正の相関因子であることが判明した。パロキセチン血中濃度高値が治療反応性を損なうことは、パロキセチン血中濃度に上限

閾値が存在することを示唆している。また、C/C型の個体が2、4週間後に治療反応性が良く、5-HTTLPR 遺伝子多型は2週間後の治療効果に有意な影響を与えた。今回の結果からは、各5-HT関連遺伝子多型が与える影響が5-HT神経における作用部位や、SSRIの治療時期において違いがある可能性が考えられた。

5) 向精神薬によるQT延長に関する解析

613人の抗うつ薬治療を受けている患者を対象に検討し、重回帰分析を行った。その結果、女性であること、高齢であること、三環系抗うつ薬を服用していること、抗精神病薬を併用していることが、QT間隔と有意に関係していた(共に $p < 0.01$)。個別の抗うつ薬との関連を調べるとクロミプラミンがQT間隔と有意に関連しており($p < 0.001$)、アミトリプチリンとトラゾドンが関連する傾向が認められた(共に $p < 0.05$)。

以上の結果から、気分障害患者に薬物治療を行う際、QT間隔延長予防という観点からは、これまで知られている通り、高齢者や女性で特に注意することに加えて、抗精神病薬の併用や三環系抗うつ薬の使用、とりわけクロミプラミンの使用には注意する必要があることが見出された。

6) 遅発性ジスキネジアにおけるDPP6遺伝子の役割

ハロペリドールを長期投与したマウスにおいて、DPP6遺伝子の発現レベルが、前頭前野、線

条体、海馬、中脳脳室において有意な差が認められた。また rs6977820 SNP と DPP6 の発現との関連性を調べるため、ヒト死後脳由来の cDNA をジェノタイプピングしたところ、アレルの違いが発現の上昇に反映していることが観察された。これらの結果は DPP6 遺伝子が遅発性ジスキネジアの発症脆弱性に関わっている可能性を示唆する所見であると考えられた。

E. 結論

①今年度は、抗うつ薬で治療されている気分障害患者の DNA サンプルをおよそ 120 例収集した。健常者の DNA サンプルもおよそ 70 例収集した。これは、今後、テーラーメイド医療実現のための遺伝子研究の貴重なリソースとなる。

②抗うつ薬に対する治療反応性が明らかなうつ病患者の DNA サンプルを用いて 37 万 SNPs チップを用いたゲノムワイド関連解析データの詳細な解析を行い、治療反応性と強く関連する 7 遺伝子を同定した。これは治療反応性予測キットなどの作成に有用な知見となる。また、うつ病の 100 万 SNPs チップによる全ゲノム解析を行い、関連が強く示唆される領域に関するデータを得た。

③抗うつ薬の反応性を規定する遺伝子について候補遺伝子研究を行い、セロトニン 2 A 受容体遺伝子多型、CLOCK 遺伝子多型と抗うつ薬の反応

性が関連していることを示唆する結果を得た。

④パニック障害では、パロキセチン血中濃度が高値、5HTTR L 型を保有していることが負の相関因子として、正の相関因子として 5-HT1A 受容体遺伝子型 C/C 型が治療反応性と有意な相関がみられた。

⑤613 人の抗うつ薬治療を受けている患者を対象に向精神薬と心電図上の QT 間隔を比較した結果、女性、高齢、三環系抗うつ薬の服用、抗精神病薬の併用が、QT 間隔と有意に関係していた。個別の抗うつ薬との関連を調べるとクロミプラミンが QT 間隔と有意に関連しており、アミトリプチリンとトラゾドンが関連する傾向が認められた。

⑥DPP6 遺伝子が遅発性ジスキネジアの発症脆弱性に関わっている可能性を示唆する所見を得た。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

それぞれの分担研究報告書に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

抗うつ薬の薬理遺伝学的解析

分担研究者 功刀 浩
国立精神・神経センター 神経研究所
疾病研究第三部 部長

研究要旨

①今年度はうつ病患者 120 名、健常者 70 名のゲノム DNA 等試料を収集した。②抗うつ薬に対する治療反応性が明らかなうつ病患者の DNA サンプルを用いて 37 万 SNPs チップを用いたゲノムワイド関連解析データの詳細な解析を行い、治療反応性と強く関連する 7 遺伝子を同定した。これは治療反応性予測キットなどの作成に有用な知見となる。③うつ病の全ゲノム解析を行い、関連が強く示唆される領域に関するデータを得た。

A. 研究目的

気分障害は、躁状態とうつ状態とを呈する双極性障害とうつ状態だけを呈する単極性うつ病とに大別される。双極性障害は、人口のおよそ 1～2% に発症し、単極性はその数倍～十数倍頻度の高い疾患である。近年、自殺者は年間 35000 人のぼっているが、自殺者の大多数はうつ病ないしうつ状態に罹患しており、抗うつ薬による薬物療法の成否は自殺予防に直結する重要な問題である。抗うつ薬は古くから三環系抗うつ薬などがあるが、近年、SSRI (選択的セロトニン再取り込み阻害薬) や SNRI (セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬) などの新しい抗うつ薬が次々に発売されてきている。これらの薬物に対して反応する患者と非反応者とが存在するが、今のところ治療反応性を予測する臨床的指標は乏しく、薬物投与後に 4～6 週間経過をみないと効果が判

断できないのが現状である。治療に反応しない場合、患者の苦痛が持続する上、自殺の危険性が高まることにもなる。

抗うつ薬の治療反応性は遺伝的要因が関与することが明らかにされているが、具体的な遺伝子多型については不明の部分が多い。近年、ヒト遺伝子多型に関するデータベースが急ピッチで蓄積されており、本研究は、このゲノム情報を用いて、抗うつ薬 (特に SSRI である fluvoxamine と paroxetine、SNRI である milnacipran を中心とする抗うつ薬) への治療反応性を規定する薬物代謝遺伝子や薬力学的因子となる遺伝子の多型 (SNPs: single nucleotide polymorphisms) を同定することを目的とする。患者のゲノム情報からあらかじめ抗うつ薬への治療反応性を予測することが可能となれば、効率的なオーダーメイド医療が可能となり、自殺予防にもつながることが期

待される。

薬理遺伝学的研究は、薬物の吸収・代謝に関与する遺伝子の個体差に関する研究を行う薬物動態学的研究と、薬物の標的タンパクを制御する遺伝子の個体差に関する研究を行う薬力学的研究とに大別される。抗うつ薬に関する薬理遺伝学的研究は内外に少なくないが、これまでに行われてきたものは、cytochrome P450 系などの遺伝子に関する薬物動態学的研究が多く、CYP2D6 や CYP2C19 の遺伝子多型と血中濃度、治療効果との関連などについて明らかになってきている。しかし、薬力学的研究に関しては、セロトニン神経系を制御する遺伝子（セロトニン・トランスポーターなど）の遺伝子多型との関連が探られているが、いまだに検討された遺伝子はそれほど多くない。

昨年度までに、代謝型グルタミン酸受容体 (metabotropic glutamate receptors: mGluRs) の 1 つ mGluR3 (GRM3) や種々の精神疾患のリスク遺伝子として注目されている DISC1 (Disrupted in Schizophrenia 1) が、抗うつ薬への治療反応性と関連すること、薬物代謝や脳血液関門に関わる遺伝子、すなわち、pharmacokinetics に関連する遺伝子に関する候補遺伝子研究をおこなったほか、37 万 SNPs チップを用いた全ゲノム解析を行い、データ解析を行っている。

B. 研究方法

1) ヒト研究試料の収集： 国立精神・神経センター病院において治療中のうつ病患者と健

常者を対象として、ゲノム DNA、血液中の RNA、血漿サンプルを多数収集した。

2) 抗うつ薬への治療反応性に関する全ゲノム解析

対象は、米国精神医学会の診断基準 DSM-IV によって大うつ病ないし双極性障害のうつ病相と診断され、fluvoxamine (SSRI)、paroxetine (SSRI), milnacipran (SNRI), nortriptyline (三環系) のいずれか単剤によって治療されていた患者である。これらの患者については、服薬歴、うつ病治療経過（治療後 1、2、4、6、8、12 週後のハミルトンうつ病症状評価尺度 [HAMD] スコア）、副作用、治療中断、自殺企図歴などの詳細な臨床データを得た。その情報に基づき、治療開始時点から治療 8 週間後まで服薬を継続し、症状評価を行うことにより抗うつ薬への治療反応性が明らかにされていた患者 106 例を解析対象とした。

抗うつ薬への反応性は、治療開始時の HAMD スコアが 15 点以上であり、8 週間後のスコアが治療開始時の 50% 以下にまで減少した患者をレスポンド、そうでない者をノンレスポンドと定義した。

全ゲノム解析は、37 万 SNPs (Illumina Human CNV370 BeadChip) を用いてタイピングを行った。本 Chip によるタイピングにより、HapMap 由来の 317000 の tag SNPs と 55000 のコピー数変化 (CNV) に関する情報が得られる。ジェノタ

イピングは昨年度までに終了しており、今年度はデータの詳細な解析を行った。

3) 詳細な臨床情報をもつうつ病患者に関する全ゲノム解析

大うつ病 72 例と年齢・性のマッチした健常者 72 例について 100 万 SNPs(イルミナ HumanOmni1-Quad BeadChip)を用いてタイピングを行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示第1号の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した研究計画書を作成し、研究施設での倫理委員会において承認を受けた上で研究を行った。

C. 研究結果

1) ヒト研究試料の収集： 国立精神・神経センター病院において治療中のうつ病患者およそ 120 名のゲノム DNA、血液中の RNA、血漿サンプルを収集した。健常者はおよそ 70 名収集した。

2) 抗うつ薬への治療反応性に関する全ゲノム解析

抗うつ薬に関する反応性が明らかな 106 例のうち、レスポンドは 65 名 (61%)、ノンレスポンドが 41 名(39%)であった。年齢、性、投与薬剤

に関して両群間に有意差を認めなかったが、レスポンドはノンレスポンドと比較して治療開始時の HAMD スコアが有意に高く、また、当然のことながら治療 8 週間における HAMD スコアの変化が有意に大きかった。

また、抗うつ薬によって HAMD スコアが 7 点以下にまで低下した群を寛解群とすると、50%以上のスコア低下・寛解の両者と強く関連する 45 の SNPs を同定した。それらは 7 つの遺伝子座に存在していた (表 1)。

<表 1> 全ゲノム解析による抗うつ薬反応性を規定する遺伝子

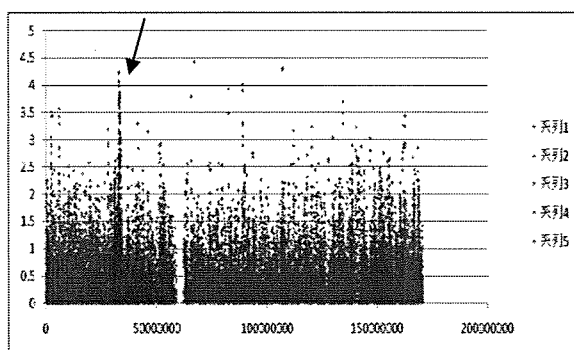
遺伝子	染色体	作用	P 値
A	2	リポタンパク受容体	0.0006
B	4	海馬に多くタンパク質相互作用に関与	0.0003
C	7	転写因子	0.0002
D	7	グルタミン酸受容体	0.003
E	7	ユビキチンタンパクリガアーゼ	0.02
F	12	遺伝子Bと相同性をもつ転写因子	0.0001
G	16	RNA 結合タンパク(神経変性と関連)	0.0009

3) 詳細な臨床情報をもつうつ病患者に関する全ゲノム解析

極めて精度の高いジェノタイプピング結果が得られた。100 万 SNPs のデータであることから、このデータも極めて膨大な貴重なものであり、解析中である。その結果、染色体 6 番などにリスク

遺伝子が存在することを強く示唆する p 値のピークが見られた (図 1)。

図 1 うつ病の全ゲノム解析による 6 番染色体のロッド値プロット



また、抗うつ薬への反応性と関連した 7 つの遺伝子は、うつ病のリスクとは関連しなかった。このことから、抗うつ薬への反応性を規定する遺伝子とうつ病リスク遺伝子とは別であることが示唆される。すなわち、うつ病は抗うつ薬に反応する群と非反応群に分かれ、heterogenous なものである。従って、反応性を規定するベクトルとうつ病のリスクを規定するベクトルは相関しないということを示唆していると思われる。

D. 考察

37 万 SNPs チップによる解析から、膨大なデータが得られ、抗うつ薬の治療メカニズムを探るうえでデータの宝庫であるといえる。これは、今後抗うつ薬のテーラーメイド医療を実現するうえできわめて貴重なデータベースである。今回、そのデータの詳細な解析によって 7 つの遺伝子を

特定した。現在、この結果が再現されるか否かについて独立のサンプルを用いて検証中である。結果が再現されれば、抗うつ薬への治療反応性を予測する遺伝子チップ作成につながる知見となる。

今年度は、さらにはうつ病の 100 万遺伝子による全ゲノム解析を終了した。このサンプルはストレスホルモン応答性などの臨床情報を含んでおり、極めて貴重なデータベースとなる。

E. 結論

抗うつ薬に対する治療反応性が明らかでないうつ病患者の DNA サンプルを用いて 37 万 SNPs チップを用いた全ゲノム解析を行い、治療反応性と関連する可能性のある遺伝子を極めて多数見出したが、そのうち特に有望なもの 7 遺伝子を同定した。これは、オーダーメイド医療実現に寄与する遺伝子を同定するための極めて貴重な基盤的データベースとなる。

また、うつ病の 100 万遺伝子による全ゲノム解析を終了した。このサンプルはストレスホルモン応答性などの臨床情報を含んでおり、極めて貴重なデータベースとなる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表 (主なもの)

1. 論文発表

- 1) Nunokawa A, Watanabe Y, Kaneko N, Sugai T, Yazaki S, Arinami T, Ujike H, Inada T, Iwata N,

- Kunugi H, Sasaki T, Itokawa M, Ozaki N, Hashimoto R, Someya T. The dopamine D3 receptor (DRD3) gene and risk of schizophrenia: case-control studies and an updated meta-analysis. *Schizophr Research* 116(1):61-67, 2010.
- 2) Hashimoto R, Hashimoto H, Shintani N, Ohi K, Hori H, Saitoh O, Kosuga A, Tatsumi M, Iwata N, Ozaki N, Kamijima K, Baba A, Takeda M, Kunugi H. Possible association between the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene and major depressive disorder. *Neurosci Letters* 468(3):300-302, 2010. Epub 2009 Nov 13.
- 3) Ishiguro H, Horiuchi Y, Ishikawa M, Koga M, Imai K, Suzuki Y, Morikawa M, Inada T, Watanabe Y, Takahashi M, Someya T, Ujike H, Iwata N, Ozaki N, Onaivi ES, Kunugi H, Sasaki T, Itokawa M, Arai M, Niizato K, Iritani S, Naka I, Ohashi J, Kakita A, Takahashi H, Nawa H, Arinami T. Brain Cannabinoid CB2 Receptor in Schizophrenia. *Biological Psychiatry*. 67(10):974-982, 2010.
- 4) Kajiyama Y, Iijima Y, Chiba S, Furuta M, Ninomiya M, Izumi A, Shibata S, Kunugi H. Prednisolone causes anxiety- and depression-like behaviors and altered expression of apoptotic genes in mice hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biological Psychiatry* 34(1):159-165, 2010. Epub 2009 Oct 30.
- 5) Okahisa Y, Ujike H, Kunugi H, Ishihara T, Kodama M, Takaki M, Kotaka T, Kuroda S. Leukemia inhibitory factor gene is associated with schizophrenia and working memory function. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34(1):172-176, 2010. Epub 2009 Oct 30.
- 6) Iwayama Y, Hattori E, Maekawa M, Yamada K, Toyota T, Ohnishi T, Iwata Y, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Kikuchi M, Hashimoto K, Iyo M, Inada T, Kunugi H, Ozaki N, Iwata N, Nanko S, Iwamoto K, Okazaki Y, Kato T, Yoshikawa T. Association analyses between brain-expressed fatty-acid binding protein (FABP) genes and schizophrenia and bipolar disorder. *American Journal of Medical Genetics B Neuropsychiatric Genetics* 153B(2):484-493, 2010.
- 7) Fukumoto N, Fujii T, Combarros O, Kamboh MI, Tsai SJ, Matsushita S, Nacmias B, Comings DE, Arboleda H, Ingelsson M, Hyman BT, Akatsu H, Grupe A, Nishimura AL, Zatz M, Mattila KM, Rinne J, Goto Y, Asada T, Nakamura S, Kunugi

- H. Sexually dimorphic effect of the Val66Met polymorphism of BDNF on susceptibility to Alzheimer's disease: New data and meta-analysis. *American Journal of Medical Genetics B Neuropsychiatric Genetics* 153B(1): 235-242, 2010.
- 8) Hashimoto R, Noguchi H, Hori H, Nakabayashi T, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Kosuga A, Tatsumi M, Kamijima K, Harada S, Takeda M, Saitoh O, Kunugi H. A genetic variation in the dysbindin gene (DTNBP1) is associated with memory performance in healthy controls. *World Journal of Biological Psychiatry* 11(2 Pt2): 431-438, 2010.
- 9) Hashimoto R, Noguchi H, Hori H, Nakabayashi T, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Kosuga A, Tatsumi M, Kamijima K, Harada S, Takeda M, Saitoh O, Kunugi H. A genetic variation in the dysbindin gene (DTNBP1) is associated with memory performance in healthy controls. *World Journal of Biological Psychiatry*. 2009 Apr 7:1-8. [Epub ahead of print]
- 10) Hashimoto R, Noguchi H, Hori H, Ohi K, Yasuda Y, Takeda M, Kunugi H. Association between the dysbindin gene (DTNBP1) and cognitive functions in Japanese subjects. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 2009 63(4):550-556, 2009. Epub 2009 May 22.
- 11) Hashimoto R, Mori T, Nemoto K, Moriguchi Y, Noguchi H, Nakabayashi T, Hori H, Harada S, Kunugi H, Saitoh O, Ohnishi T. Abnormal microstructures of the basal ganglia in schizophrenia revealed by diffusion tensor imaging. *World Journal of Biological Psychiatry* 2009;10(1):65-9.
- 12) Hashimoto R, Ohi K, Okada T, Yasuda Y, Yamamori H, Hori H, Hikita T, Taya S, Saitoh O, Kosuga A, Tatsumi M, Kamijima K, Kaibuchi K, Takeda M, Kunugi H. Association analysis between schizophrenia and the AP-3 complex genes. *Neuroscience Research* 65(1): 113-115, 2009. Epub 2009 May 27.
- 13) Hattori E, Toyota T, Ishitsuka Y, Iwayama Y, Yamada K, Ujike H, Morita Y, Kodama M, Nakata K, Minabe Y, Nakamura K, Iwata Y, Takei N, Mori N, Naitoh H, Yamanouchi Y, Iwata N, Ozaki N, Kato T, Nishikawa T, Kashiwa A, Suzuki M, Shioe K, Shinohara M, Hirano M, Nanko S, Akahane A, Ueno M, Kaneko N, Watanabe Y, Someya T, Hashimoto K, Iyo M, Itokawa M, Arai M, Nankai M, Inada T, Yoshida S, Kunugi H, Nakamura M, Iijima Y, Okazaki Y,

- Higuchi T, Yoshikawa T. Preliminary genome-wide association study of bipolar disorder in the Japanese population. *American Journal of Medical Genetics B Neuropsychiatric Genetics* 150B(8): 1110-1117, 2009.
- 14) Kazuno AA, Munakata K, Mori K, Nanko S, Kunugi H, Nakamura K, Mori N, Yamada K, Yoshikawa T, Kato N, Kato T. Mitochondrial DNA haplogroup analysis in patients with bipolar disorder. *American Journal of Medical Genetics B Neuropsychiatric Genetics* 150B(2):243-247, 2009.
- 15) Kawashima K, Ikeda M, Kishi T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Okochi T, Aleksic B, Tomita M, Okada T, Kunugi H, Inada T, Ozaki N, Iwata N. BDNF is not associated with schizophrenia: data from a Japanese population study and meta-analysis. *Schizophrenia Research* 112(1-3): 72-79, 2009. Epub 2009 Apr 29.
- 16) Koga M, Ishiguro H, Yazaki S, Horiuchi Y, Arai M, Niizato K, Iritani S, Itokawa M, Inada T, Iwata N, Ozaki N, Ujike H, Kunugi H, Sasaki T, Takahashi M, Watanabe Y, Someya T, Kakita A, Takahashi H, Nawa H, Muchardt C, Yaniv M, Arinami T. Involvement of SMARCA2/BRM in the SWI/SNF chromatin-remodeling complex in schizophrenia. *Human Molecular Genetics* 18(13): 2483-2494, 2009. Epub 2009 Apr 10.
- 17) Kubota K, Inoue K, Hashimoto R, Kumamoto N, Kosuga A, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H, Iwata N, Ozaki N, Takeda M, Tohyama M. Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 regulates cell adhesion and synaptic morphology via modulation of N-cadherin expression. *Journal of Neurochemistry* 110(2): 496-508, 2009. Epub 2009 Apr 20.
- 18) Numata S, Iga J, Nakataki M, Tayoshi S, Taniguchi K, Sumitani S, Tomotake M, Tanahashi T, Itakura M, Kamegaya Y, Tatsumi M, Sano A, Asada T, Kunugi H, Ueno S, Ohmori T. Gene expression and association analyses of the phosphodiesterase 4B (PDE4B) gene in major depressive disorder in the Japanese population. *American Journal of Medical Genetics B Neuropsychiatric Genetics* 150B(4): 527-534, 2009.
- 19) Nunokawa A, Watanabe Y, Kaneko N, Sugai T, Yazaki S, Arinami T, Ujike H, Inada T, Iwata N, Kunugi H, Sasaki T, Itokawa M, Ozaki N, Hashimoto R, Someya T. The dopamine D3 receptor (DRD3) gene and risk of schizophrenia: Case-control studies and an updated

meta-analysis. Schizophr Research 116: 61–67, 2009

20) Ohi K, Hashimoto R, Yasuda Y, Yamamori H, Hori H, Saitoh O, Tatsumi M, Takeda M, Iwata N, Ozaki N, Kamijima K, Kunugi H. No association between the Bcl2-interacting killer (BIK) gene and schizophrenia. Neuroscience Letters 463(1):60-63, 2009. Epub 2009 Jul 24.

21) Watanabe Y, Nunokawa A, Kaneko N, Arinami T, Ujike H, Inada T, Iwata N, Kunugi H, Itokawa M, Otowa T, Ozaki N, Someya T. A two-stage case-control association study of PADI2 with schizophrenia. Journal of Human Genetics 54(7): 430-432, 2009. Epub 2009 May 29.

2. 学会発表

1) Hattori K, Iijima Y, Uchiyama H, Yamamoto N, Fujii T, Hashimoto R, Hori H, Teraishi T, Kinoshita Y, Matsuo J, Kawamoto Y, Arima K, Kunugi H: Genetic variations of fyn-tyrosine kinase and schizophrenia. 第5回日本統合失調症学会、福岡、3月27日、2010.

2) Ohi K, Hashimoto R, Yasuda Y, Yamamori H, Hori H, Saitoh O, Tatsumi M, Takeda M, Iwata N, Ozaki N, Kamijima K, Kunugi H: No association between the Bcl2-interacting Killer (BIK) gene

and schizophrenia. 第5回日本統合失調症学会、福岡、3月26日、2010.

3) Hashimoto R, Ohi K, Yasuda Y, Fukumoto M, Yamamori H, Takahashi H, Saitoh O, Tatsumi M, Iwata N, Ozaki N, Kamijima K, Kunugi H, Takeda M: RELA Gene is associated with risk for schizophrenia and deficits in prepulse inhibition. 第5回日本統合失調症学会、福岡、3月27日、2010.

4) 有波忠雄、石黒浩毅、功刀浩、佐々木司、氏家寛、染矢俊幸、渡部雄一郎、橋本亮太: MTHFR 遺伝子多型と統合失調症との関連. 第5回日本統合失調症学会、福岡、3月27日、2010.

5) Teraishi T, Fujii T, Uchiyama H, Yamamoto N, Iijima Y, Hori H, Hattori K, Hashimoto R, Arima K, Matsuo J, Kawamoto Y, Kinoshita Y, Kunugi H: Association analysis of the phenylalanine hydroxylase and 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase genes with schizophrenia and cognitive functions. 第5回日本統合失調症学会、福岡、3月27日、2010.

6) 篠山大明、若林千里、内山博文、山本宜子、飯嶋良味、藤井崇、有馬邦正、功刀浩: 統合失調症と IL-6: 血中濃度と遺伝子多型との関連.

- 第 17 回日本精神・行動遺伝医学会、大阪、
2月11日2010.
- 7) 服部功太郎、田中治子、内山博文、山本宜子、
飯嶋良味、藤井崇、堀弘明、寺石俊也、木下
裕紀子、松尾淳子、川本由実子、有馬邦正、
功刀浩：統合失調症・気分障害のゲノム・死
後脳を用いた Fyn チロシンキナーゼの解析。
第 17 回日本精神・行動遺伝医学会、大阪、
2月11日2010.
- 8) Hashimoto R, Ohi K, Yasuda Y, Fukumoto M,
Yamamori H, Takahashi H, Tanimukai H, Tagami
S, Morihara T, Okochi M, Okochi T, Tanaka T,
Kudo T, Kazui H, Saitoh O, Tatsumi M, Iwata N,
Ozaki N, Kamijima K, Kunugi H, Takeda M:
RELA Gene is associated with risk for
schizophrenia and deficits in prepulse inhibition.
第 17 回日本精神・行動遺伝医学会、大阪、
2010年2月11日
- 9) Hattori K, Iijima Y, Uchiyama H, Yamamoto N,
Fujii T, Hori H, Teraishi T, Tatsumi M, Omori M,
Okamoto N, Arima K, Higuchi T, Kunugi H:
Genetic variations of fyn-tyrosine kinase in
Psychiatric disorders. The 15th Biennial Winter
Workshop in Psychoses, Barcelona, 11.15-16,
2009.
- 10) Teraishi T, Fujii T, Uchiyama H, Yamamoto N,
Iijima Y, Hori H, Hattori K, Hashimoto R,
Tatsumi M, Omori M, Okamoto N, Arima K,
Higuchi T, Kunugi H: Genetic association
analysis of phenylalanine hydroxylase and
6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase in Japanese
patients with schizophrenia and mood disorders.
The 15th Biennial Winter Workshop in Psychoses,
Barcelona, Spain, 11.15-16, 2009.
- 11) 岡安寛明、尾関祐二、藤井久彌子、大栗有
美子、佐伯吉規、功刀浩、下田和孝：気分障
害、不安障害、適応障害患者に対する抗うつ
薬治療における QT 延長リスクの検討。第 19
回日本臨床精神神経薬理学会、2009年11月
14日、京都
- 12) 藤井崇、福本典子、後藤雄一、朝田隆、中
村俊、功刀浩：BDNF 遺伝子の機能多型
Val66Met とアルツハイマー病発症との女性
特異的関連。日本人類遺伝学会 第 54 回大
会、東京、2009年9月26日
- 13) 矢崎沙織、古賀農人、石黒浩毅、糸川昌成、
染谷俊幸、渡部雄一郎、稲田俊也、岩田仲生、
尾崎紀夫、氏家寛、功刀浩、佐々木司、那波
宏之、高橋均、柿田昭義、有波忠雄：Dymeclin
遺伝子と統合失調症との関連解析。日本人類
遺伝学会第 54 回大会、東京、2009年9月26

日

- 14) 服部功太郎、内山博文、山本宜子、飯嶋良味、藤井崇、堀弘明、寺石俊也、巽雅彦、大森まゆ、岡本長久、有馬邦正、樋口輝彦、功刀浩：Fyn チロシンキナーゼの統合失調症・気分障害における解析。第 28 回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会、北海道、2009 年 7 月 11 日
- 15) 寺石俊也、藤井崇、内山博文、山本宜子、飯嶋良味、堀弘明、服部功太郎、巽雅彦、大森まゆ、岡本長久、有馬邦正、樋口輝彦、功刀浩：躁うつ病患者におけるドーパミン及びセロトニン代謝に関わる酵素の関連解析。第 28 回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会、北海道、2009 年 7 月 11 日
- 16) 藤井崇(Takashi Fujii), 福本典子(Noriko Fukumoto), 後藤雄一(Yu-ichi Goto), 朝田隆(Takashi Asada), 中村俊(Shun Nakamura), 功刀浩(Hiroshi Kunugi): BDNF 遺伝子の Val66Met 多型とアルツハイマー病発症との女性特異的関連(Sexually dimorphic effect of the Val66Met polymorphism of BDNF on susceptibility to Alzheimer's disease). 第 32 回日本神経科学会, 名古屋, 9 月 16 日, 2009.
- 17) 橋本亮太、高雄啓三、服部聡子、室谷知孝、遠山桂子、中西和男、松崎伸介、石塚智子、熊本奈都子、高村明孝、大井一高、福本素由巳、山森英長、安田由華、遠山正彌、大和谷厚、功刀浩、宮川剛、武田雅俊：統合失調症脆弱性遺伝子ディスバインジンと記憶との関連。第 31 回日本生物学的精神医学会、京都、4.24, 2009
- 18) 堀之内和広、泉愛子、藤井崇、遠山正彌、塩坂貞夫、有馬邦正、功刀浩：精神疾患患者脳における細胞接着分子 L1 の発現解析。第 31 回日本生物学的精神医学会、京都、4.24, 2009.
- 19) 金子尚史、渡部雄一郎、布川綾子、村竹辰之、有波忠雄、氏家寛、稲田俊也、岩田仲生、功刀浩、糸川昌成、音羽健司、尾崎紀夫、染矢俊幸：二段階サンプルによる関節リウマチ感受性遺伝子と統合失調症との関連研究 (Case-control study of polymorphisms in rheumatoid arthritis susceptibility genes with schizophrenia). 第 31 回日本生物学的精神医学会、京都、4.25, 2009
- 20) 尾関祐二, Benjamin S. Pickard, 藤井久彌子, Mary P. Malloy, 本多真, 白山幸彦, 涌井敬子, 福島義光, 功刀浩, Walter J. Muir, 橋本謙二, Douglas H. Blackwood, 澤明 : t(3;9)(q13.12;q21.2)染色体転座を持つ統合失

調症患者とその子ではリンパ芽球における
PSAT1 mRNA の発現量低下と血清低 L-セリ
ンおよび低グルタミン酸が認められた。第 31
回日本生物学的精神医学会、平成 21 年 4 月 2
4 日、京都

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

抗うつ薬のファーマコジェネティクス

分担研究者 岩田 仲生 藤田保健衛生大学医学部 教授

研究要旨

様々な抗うつ薬が臨床の場面で使用できるようになってきた。また、それぞれの抗うつ薬の薬理学的プロファイルも異なり、薬理学的な多面的なアプローチが行えるようになってきた。しかしながら、現実の臨床では、治療のために選択した抗うつ薬が有効かどうかは使用してみないと分からない。また、薬物反応性に関する遺伝率は50～60%と見積もられている。一方で最近の大規模なうつ病の研究では、うつ病治療に重要なことは、早期に寛解に導くことが再発防止につながることを示された。そのため、我々はうつ病患者における抗うつ薬の治療反応性を予測すべく薬理遺伝学的研究を行った。我々はいくつかの遺伝子を candidate gene として、関連解析を行った結果、セロトニン2A受容体遺伝子多型、CLOCK 遺伝子多型と抗うつ薬の反応性が関連していることを見出した。しかしながら、サンプル数が少ないための統計学的エラーの可能性があり、今後はさらにサンプル数を増やした研究が必要である。

A. 研究目的

選択的セロトニン再取り込み阻害薬（Selective serotonin reuptake inhibitor: SSRI）は従来の抗うつ薬のみられた抗コリン作用などの有害事象が少なく、十分な抗うつ効果を認める薬剤として知られている。また、様々な抗うつ薬が臨床の場面で使用できるようになってきた。また、それぞれの抗うつ薬の薬理学的プロファイルも異なり、薬理学的な多面的なアプローチが行えるようになってきた。しかしながら、現実の臨床では、治療のために選択した抗うつ薬が有効かどうかは使用してみないと分からない。また、薬物反応性に関する遺伝率は50～60%と見積もられている。一方で最近の大規模なうつ病の研究では、うつ病治療に重要なことは、早期に寛解に導くことが再発防止につながることを示された。そのため、我々はうつ病患者における抗うつ薬の治療反応性を予測すべく薬理遺伝学的研究を行った。

B. 研究方法

対象

対象はDSM-IV-TRによって診断された大うつ病患者121から265名。うち184例はMini-International Neuropsychiatric Interview (MINI)を使用し構造化面接を受け、すべての患者はStructured Interview Guide for Hamilton Rating Scale for Depression (SIGH-D)にてbaseline(0週目)と8週目に評価した。患者は、フルボキサミン、セルトラリン、パロキセチンのいずれかのSSRIを服用した。それぞれ、0週目は50mg、25mg、10mgで治療を開始し、その後の薬物量の増減は患者の体調に合わせて慎重に行い、最大量はそれぞれ150mg、100mg、40mgとした。重篤な不安、不眠に関してはベンゾジアゼピン系薬物を使用した。

サンプルの調整

末梢血からBリンパ球を分離精製しEBウィルスを感染させることにより不死化させ株化を行った。株化Bリンパ球より通常の方法でDNAを抽出

し以後の解析に使用した。

Candidate genes approach

いくつかの Candidate genes を選出し、HapMap databaseに公開されているそれぞれのSNP情報をgene-wideに選出した。次にその中から common variantのみ選び、Haploview softwareにて連鎖不平衡を評価し、Tagger softwareにて Tagging SNPsを選出した。

SNP genotyping

Applied biosystem の TaqMan SNP genotyping assayを用いた。

統計学的解析

8週目においてSIGH-Dの点数が50%以下に改善した患者群を反応群、それ以外の患者を非反応群と定義した。それぞれのグループ間での関連解析は、single marker 関連解析は χ^2 乗テストを用い、haplotype 関連解析は尤度比を用いて検定した。

(倫理面への配慮)

本研究課題は、大うつ病性障害患者を対象とした遺伝子解析研究である。したがって、文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示第1号の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に即して編成された藤田保健衛生大学倫理委員会において本研究課題に直結するゲノム研究に関する課題、「遺伝子解析によるこころの健康とこころの病気に対するかかりやすさ（発症脆弱性）や薬の効きめや副作用（治療反応性）等の解明に関する研究」の研究計画書を提出し、承認を受け、これまでも研究を遂行してきた。

平成18年度も（平成19年度以降も）、試料提供者へのインフォームド・コンセント、個人情報の厳重な管理（匿名化）などを徹底し、倫理的配慮を持って研究を進める。

また申請者は日本人類遺伝学会の臨床遺伝専門医として藤田保健衛生大学病院遺伝医療相談を担当しており、本研究のみならず様々な遺伝相

談に応じる体制を構築し対応する環境を整備している。

C. 研究結果

我々は、セロトニン 1A 受容体 (HTR1A)、セロトニン 2A 受容体 (HTR2A)、circadian rhythm 関連の clock gene として、CLOCK、SIRT1、PROK2、PROKR2、NR1D1、2 型代謝型グルタメート受容体 (GRM2、GRM3) を candidate genes として選んだ。我々は、HTR2A および CLOCK と SSRI 反応性と関連を示した。他の遺伝子との関連は認めなかった。

	Global P-value ^a		
	2 window	3 window	4 window
rs6311	0.518		
rs6313	0.0101	0.000707	0.0136
rs1928040	0.0535	0.106	
rs7997012			

TABLE 3. Haplotype-wise analysis between *HTR2A* and SSRIs response in MDD
a Bold numbers represent significant P-value

	Global P-value ^a		
	2 window	3 window	4 window
rs6311	0.736		
rs6313	0.0451	0.0324	0.0400
rs1928040	0.0604	0.0423	
rs7997012			

TABLE 4. Haplotype-wise analysis between *HTR2A* and SSRIs remission in MDD
a Bold numbers represent significant P-value

SNP ^a	Phenotype	MAF	N	genotype distribution ^b			P-value ^c			Corrected P-value ^{d,e}	
				M/M	M/m	m/m	HWE ^e	genotype	allele	genotype	allele
rs3736544	Responders	0.267	60	30	28	2	0.135				
	Nonresponders	0.115	61	48	12	1	0.804	0.00434	0.00261	0.00130	0.00738
	Remission	0.289	45	21	22	2	0.203				
rs1801260	Nonremission	0.132	76	57	18	1	0.751	0.00651	0.00257	0.0195	0.00771
	Responders	0.133	60	46	12	2	0.297				
	Nonresponders	0.189	61	39	21	1	0.328	0.187	0.243		
rs749474	Remission	0.156	45	33	10	2	0.301				
	Nonremission	0.164	76	52	23	1	0.378	0.390	0.855		
	Responders	0.417	60	19	32	9	0.452				
T>C	Nonresponders	0.336	61	27	27	7	0.949	0.358	0.196		
	Remission	0.467	45	12	24	9	0.632				
	Nonremission	0.322	76	34	35	7	0.637	0.0734	0.0151		0.0752

TABLE 2. Association analysis of tagging SNPs in *CLOCK*

a major allele > minor allele

b M: major allele, m: minor allele

c HWE: Hardy-Weinberg equilibrium

d Bold numbers represent significant P-value

e Calculated by Bonferroni's correction