

tube and coagulation procedures were consistent between patients to minimize the influence of differences in sampling conditions (see "Materials and methods"). Human serum samples from healthy volunteers contained Ig-NRG-LI with concentrations ranging from 0.4 to 14.0 ng/mL (Fig. 2). The concentrations in healthy women samples (mean 8.02 ± 1.33 ng/mL) were significantly higher than those in men (mean 5.61 ± 0.91 ng/mL, $P = 0.048$). Two-way ANOVA using subject factors of diagnosis (patient vs. control) and gender (men vs. women) revealed main effects for both diagnosis ($F_{(1,95)} = 11.50$; $P = 0.001$) and gender ($F_{(1,95)} = 9.23$; $P = 0.003$) without an interaction between these two factors ($F_{(1,95)} = 0.24$; $P = 0.627$). Mean Ig-NRG1 immunoreactivity in the schizophrenia group was 63.2% of the mean level observed in the control group. Mean Ig-NRG1 immunoreactivity in the women's group was 147.1% of that detected in the men's group.

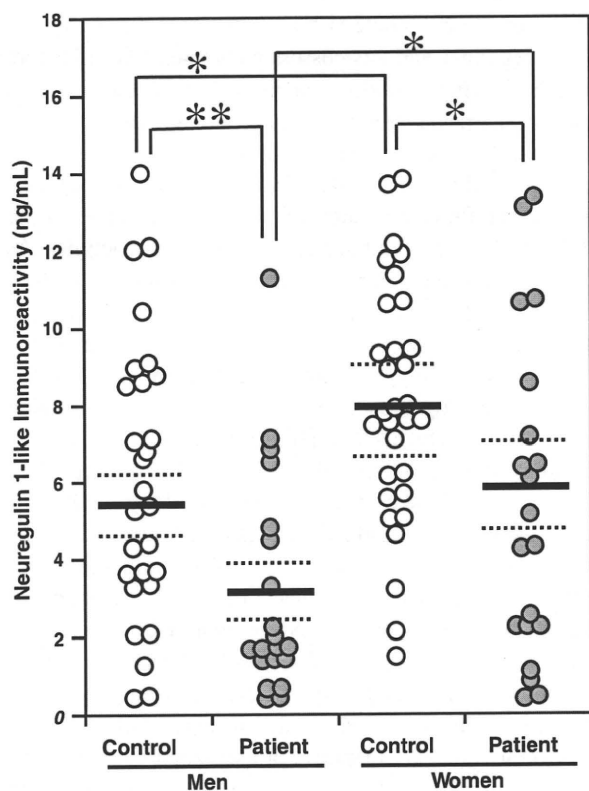


Fig. 2 Serum Ig-NRG1-LI levels in patients with schizophrenia and age-matched controls. Serum samples were collected from 40 patients with schizophrenia ($n = 20$ for men and $n = 20$ women) and 59 healthy volunteers ($n = 28$ for men and $n = 31$ women) and subjected to ELISA to detect Ig-NRG-LI. Mean levels are marked with thick horizontal lines, while SE levels are denoted by horizontal broken lines. Post hoc analysis detected a significant difference between groups; $**P < 0.01$ and $*P < 0.05$

Table 3 Correlations between levels of neuregulin and clinical parameters in patients with schizophrenia

Pearson correlation	<i>r</i>
Age ^a	0.340*
Age at onset	0.333*
Duration of illness	(0.114)
Duration of medication	(-0.006)
Dose of antipsychotic medication ^b	(-0.235)

* $P < 0.05$, parentheses indicates insignificance

^a In control subjects; $R = 0.432$, $P = 0.006$

^b Chlorpromazine-equivalent mg per day

To estimate the influence of patient clinical features on Ig-NRG-LI levels, we performed Pearson correlation analysis with compensation for gender effect (Table 3). There were modest correlations of both age ($R = 0.340$; $P = 0.032$) and disease onset ($R = 0.333$; $P = 0.036$) with Ig-NRG-LI. Neither disease duration nor medication length, however, correlated significantly with Ig-NRG-LI. As the prescribed antipsychotics differed between patients, we calculated chlorpromazine-equivalent doses based on an antipsychotic potency table of commercial drugs (Inada 2006) (Table 2). We did not find a significant correlation between chlorpromazine-equivalent dose and Ig-NRG-LI level ($R = -0.235$; $P = 0.144$). Although we also attempted to assess an interaction between DSM-IV category and Ig-NRG-LI, one-way ANOVA failed to detect a significant difference in Ig-NRG-LI levels among DSM-IV types ($F_{(2,39)} = 0.15$; $P = 0.865$).

Association between NRG1 immunoreactivity and SNP types

We examined the six SNP sites within the *NRG1* gene that are reported to be associated with schizophrenia risk: SNP8NRG221533, SNP8NRG241930, SNP8NRG243177, rs1081062, rs3924999 and rs2954041 (Bakker et al. 2004; Fukui et al. 2006; Hall et al. 2006; Ikeda et al. 2008; Iwata et al. 2004; Law et al. 2006; Li et al. 2004, 2006; McIntosh et al. 2008; Munafò et al. 2006; Nicodemus et al. 2009; Stefansson et al. 2002; Williams et al. 2003; Yang et al. 2003). The genotype distributions of the SNPs examined did not differ significantly from HWE in either group (patient: $P = 0.203-0.747$, control: $P = 0.096-0.678$), with the exception of SNP8NRG221533 (patient: $P = 0.016$, control: $P = 0.052$; χ^2 test). With the given sample sizes, we failed to detect any significant difference in genotype distributions at all SNP loci between patient and control groups ($P = 0.073-0.90$; χ^2 test). As there were significant gender differences in Ig-NRG-LI, we adopted ANCOVA with a covariate of gender to estimate SNP effects.

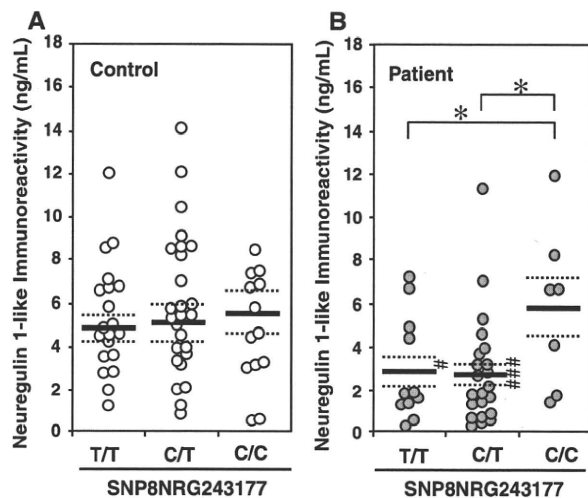


Fig. 3 Association between SNP8NRG243177 and serum Ig-NRG1-LI. Serum Ig-NRG-LI levels detected in individuals with each SNP genotype (SNP8NRG243177; T/T, C/T, C/C) were plotted for the control and patient groups. Mean levels are marked with *thick horizontal lines*, while SE levels are denoted by *horizontal broken lines*. * $P < 0.05$, compared between genotypes of patient group, and ### $P < 0.001$ and # $P < 0.05$, compared between patient and control groups of the same genotype

At the site of SNP8NRG243177, two-way ANCOVA revealed a main effect of diagnosis ($F_{(1,93)} = 4.78$; $P = 0.031$), but not that of genotype ($F_{(2,93)} = 2.00$; $P = 0.141$), with a significant interaction between the two subject factors ($F_{(2,93)} = 4.43$; $P = 0.015$), suggesting differential contribution of genotype to the disease-associated decreases in Ig-NRG1-LI levels (Fig. 3). Post hoc analysis revealed that patients with the SNP T allele (T/T or C/T) exhibited lower levels of Ig-NRG1-LI than schizophrenia patients bearing the homozygous C allele ($P = 0.038$ for T/T vs. C/C, $P = 0.016$ for T/C vs. C/C) or controls with the same allele ($P = 0.025$ for T/T, $P = 0.0003$ for T/C). The allelic difference in serum Ig-NRG1-LI levels was not observed in the control group. Thus, these results suggest that the T allele at SNP8NRG243177 is one of the biological contributors to the disease-associated decreases in serum Ig-NRG-LI levels. We also analyzed the influences of the other SNP genotypes on serum Ig-NRG-LI. However, there were no significant differences detected at these SNP loci ($F_{(2,93)} = 0.43$ – 2.28 ; $P = 0.108$ – 0.645) without interaction ($F_{(2,93)} = 0.28$ – 4.70 ; $P = 0.098$ – 0.753).

Influence of chronic haloperidol administration to monkeys

To estimate the potential influence of antipsychotic medications given to patients with schizophrenia, we administered haloperidol (0.25–0.50 mg/kg) to three cynomolgus

monkeys for 2 months and monitored Ig-NRG1-LI levels in serum before and during treatment. Serum concentrations of haloperidol were 4.00 ± 0.62 ng/mL after 4 weeks of treatment and 4.03 ± 0.52 ng/mL after 8 weeks of treatment. Mean levels of Ig-NRG1-LI were 7.0 ± 2.1 , 7.5 ± 2.6 and 8.4 ± 2.9 ng/mL before and 4 and 8 weeks after beginning treatment, respectively. One-way ANOVA failed to detect any significant difference during drug treatment ($F_{(2,5)} = 4.07$; $P = 0.865$).

Discussion

To evaluate the pathological influences of schizophrenia on NRG1 protein, we established ELISA for NRG1 and measured NRG1 immunoreactivity in serum. We found that the human sera contains high concentrations of Ig-NRG1-LI and that the concentrations are significantly lower in men as well as in patients with schizophrenia. In addition, the schizophrenia-associated decrease in serum Ig-NRG1-LI is apparent only in patients carrying the schizophrenia risk allele at the SNP8NRG243177 site.

Neuregulin-1 variants possess a common EGF-like core domain that is responsible for its biological activity, thus sharing significant structural similarity with other EGF-like peptides. It was thus important to evaluate the cross-reactivity of the ELISA system with other EGF-like peptides. Despite careful examination of six distinct peptides in the EGF family, none exhibited significant cross-reactivity. As multiple gene promoters and alternative splicing produce distinct structural variants of NRG1 precursors (Falls 2003; Harrison and Law 2006), it was essential to determine which NRG1 subtypes were recognized by this ELISA system. The antigen used to raise antibodies was a soluble mature form of type-1 NRG1 β 1 derived from mouse cerebellum, which contains only an Ig-like domain and EGF-like domain (Ozaki et al. 2004). Resulting antibodies derived from rabbits and guinea pigs failed to react with the EGF-like domain, leading to the assumption that these antibodies primarily recognize the Ig-like domain of NRG1. In support of this assumption, ELISA detected type-II NRG1, which contains the Ig domain with high efficiency. Reactivity to type-III NRG1, which lacks the Ig-like domain, was <10% of that to type-I NRG1.

Several clinical features of schizophrenia patients exhibited modest, but significant, correlations with Ig-NRG-LI levels using our novel ELISA. Serum Ig-NRG-LI levels weakly correlated with age ($R = 0.340$) and disease onset ($R = 0.333$) following gender compensation. To confirm the statistical results of ANOVA, we also performed ANCOVA, adopting each of these factors individually or together as covariate(s), and yet obtained the same statistical conclusion (data not shown). It is

noteworthy that our statistical analysis did not detect a significant correlation between antipsychotic medication and serum Ig-NGR-LI levels, although calculating chlorpromazine equivalents of second-generation antipsychotics is controversial among researchers (Woods 2003; Inada 2006). This statistical result of antipsychotic effects appeared to be supported by the present monkey experiment: the chronic treatment of monkeys with haloperidol had no significant effect on serum Ig-NGR1-LI. Pharmaceutical effectiveness of haloperidol in monkeys was controlled by measuring its blood concentrations. Concentrations of haloperidol in monkey serum corresponded to the human therapeutic range of the antipsychotic medication (3–17 ng/mL) (Guthrie et al. 1987). As the given species of antipsychotics to monkeys and patients were not fully identical, however, the interpretation of the present monkey results is limited and needs to be re-evaluated in drug-naïve schizophrenia patients.

In the present assay, we found that human serum contains markedly high concentrations of Ig-NGR1-LI (mean 5.97 ± 0.40 ng/mL, $\sim 213 \pm 14$ pM) in comparison to the concentrations of other growth factors and cytokines. Concentrations of EGF, HB-EGF and TGF α are 100–400 pg/mL in human serum (Futamura et al. 2002), and those of inflammatory cytokines such as interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha are also below 1 ng/mL (Akiyama 1999; Schmitt et al. 2005). Our preliminary study indicates that the concentrations of Ig-NGR1-LI in human plasma were as high as in serum (M. Shibuya, unpublished data). As NRG-1 concentrations in human blood are above the reported dissociation constant of the NRG-1 receptor (k_d ; ~ 60 pM for ErbB3) (Carraway et al. 1994), human NRG-1 peptides in circulation presumably exert a biological activity or influences on tissue targets.

There was a significant gender difference in serum Ig-NGR-LI levels between men and women. Ig-NGR-LI quantities in females were significantly higher than those observed in males, irrespective of the presence of schizophrenia. This trend contrasts the fact that another neurotrophic factor, nerve growth factor, is enriched in the serum of human males (Martocchia et al. 2002). LaCroix-Fralich et al. (2006, 2008) report that protein and mRNA expression levels of NRG1 are higher in female rats. As there were no significant gender differences in *NRG1* mRNA levels observed in postmortem brains (Hashimoto et al. 2004), this gender difference may be limited to NRG1 expression in the peripheral blood.

Although there are several studies examining the expression of *NRG1* mRNA in postmortem brains of patients with schizophrenia, most have reported an increase in mRNA levels. The hippocampus and prefrontal cortex of schizophrenia patients contain higher levels of type-I

mRNA than samples from control subjects (Hashimoto et al. 2004; Law et al. 2006). Petryshen et al. (2005) report an increase in mRNA encoding type-III NRG1 precursor (SMDF), while Zhang et al. (2008) detect decreases in type-I and type-II mRNAs encoding NRG1 precursors (HRG- β 3 and GGF2) in patient lymphocytes. The latter report is consistent with our present findings on NRG1 expression in blood, assuming that our novel ELISA primarily detected the type-I and type-II NRG1 peptides.

The schizophrenia-associated SNP sites within the *NRG1* gene are located in the 5'-flanking region of the gene promoter (Harrison and Law 2006; Lawrie et al. 2008; Mei and Xiong 2008). Of the six SNPs examined, patients with the T allele at the SNP8NRG243177 site displayed a reduction in serum Ig-NGR-LI levels. Brain imaging studies reveal that the T allele is associated with the reduction of white matter density in the anterior limb of the internal capsule (McIntosh et al. 2008). This finding is in agreement with the fact that NRG1 is a positive regulator for myelination and oligodendrocyte survival (Fernandez et al. 2000; Corfas et al. 2004). In this context, it is possible that the serum reduction in Ig-NGR1-LI might contribute to the white matter deficits of schizophrenia patients.

This SNP site is located at the 5' region of transcription initiation sites of type-II and type-IV mRNAs, which both encode Ig-NGR1 (Li et al. 2006). The T allele-specific reduction in Ig-NGR-LI was only found in the patient group and is therefore consistent with the finding that this allele is associated with schizophrenia susceptibility (Law et al. 2006; Steinhorsdottir et al. 2004). It is unknown, however, whether the allele-dependent Ig-NGR-LI reduction is ascribed to the difference in basal or regulated transcription rates of *NRG1* gene (Tan et al. 2007). A postmortem brain study combining RT-PCR for *NRG* mRNAs and SNP typing comes to a conclusion in conflict with our findings. The hippocampus of human subjects bearing the risk allele expresses higher levels of type-IV variants of *NRG1* mRNA, irrespective of the diagnosis (Law et al. 2006). Although it remains to be determined whether *NRG1* gene transcription is under the same regulation in both periphery and brain, the answer to this discrepancy awaits future experiments with a larger number and the combination of peripheral and brain samples. We hope that the ELISA system for NRG1 peptide will help to explore its biological role in schizophrenia pathogenesis or diagnosis.

Acknowledgments The authors thank the patients and healthy volunteers for their participation. This work was supported by Health and Labor Sciences Research Grants, a grant from the Promotion of Niigata University Research Projects, Core Research for Evolutional Science and Technology from the JST Corporation, and a grant-in-aid from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

References

- Addington AM, Gornick MC, Shaw P, Seal J, Gogtay N, Greenstein D et al (2007) Neuregulin 1 (8p12) and childhood-onset schizophrenia: susceptibility haplotypes for diagnosis and brain developmental trajectories. *Mol Psychiatry* 12:195–205
- Akiyama K (1999) Serum levels of soluble IL-2 receptor alpha, IL-6 and IL-1 receptor antagonist in schizophrenia before and during neuroleptic administration. *Schizophr Res* 37:97–106
- Bakker SC, Hoogendoorn ML, Selton JP, Verduijn W, Pearson PL, Sinke RJ et al (2004) Neuregulin 1: genetic support for schizophrenia subtypes. *Mol Psychiatry* 9:1061–1063
- Bellon A (2007) New genes associated with schizophrenia in neurite formation: a review of cell culture experiments. *Mol Psychiatry* 12:620–629
- Blouin JL, Dombroski BA, Nath SK, Lasseter VK, Wolyniec PS, Nestadt G et al (1998) Schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 13q32 and 8p21. *Nat Genet* 20:70–73
- Carraway KL 3rd, Sliwkowski MX, Akita R, Platko JV, Guy PM, Nuijens A et al (1994) The erbB3 gene product is a receptor for heregulin. *J Biol Chem* 269:14303–14306
- Chagnon YC, Roy MA, Bureau A, Mérette C, Maziade M (2008) Differential RNA expression between schizophrenic patients and controls of the dystrobrevin binding protein 1 and neuregulin 1 genes in immortalized lymphocytes. *Schizophr Res* 100:281–290
- Corfas G, Roy K, Buxbaum JD (2004) Neuregulin 1-erbB signaling and the molecular/cellular basis of schizophrenia. *Nat Neurosci* 7:575–580
- Corvin AP, Morris DW, McGhee K, Schwaiger S, Scully P, Quinn J et al (2004) Confirmation and refinement of an 'at-risk' haplotype for schizophrenia suggests the EST cluster, Hs.97362, as a potential susceptibility gene at the Neuregulin-1 locus. *Mol Psychiatry* 9:208–212
- Falls DL (2003) Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 284:14–30
- Fernandez PA, Tang DG, Cheng L, Prochiantz A, Mudge AW, Raff MC (2000) Evidence that axon-derived neuregulin promotes oligodendrocyte survival in the developing rat optic nerve. *Neuron* 28:81–90
- Fukui N, Muratake T, Kaneko N, Amagane H, Someya T (2006) Supportive evidence for *neuregulin 1* as a susceptibility gene for schizophrenia in a Japanese population. *Neurosci Lett* 396:117–120
- Futamura T, Toyooka K, Iritani S, Niizato K, Nakamura R, Tsuchiya K et al (2002) Abnormal expression of epidermal growth factor and its receptor in the forebrain and serum of schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* 7:673–682
- Gardner M, González-Neira A, Lao O, Calafell F, Bertranpetit J, Comas D (2006) Extreme population differences across Neuregulin 1 gene, with implications for association studies. *Mol Psychiatry* 11:66–75
- Guthrie S, Lane EA, Linnoila M (1987) Monitoring of plasma drug concentrations in clinical psychopharmacology. In: Meltzer HY (ed) *Psychopharmacology: the third generation of progress*. Raven Press, New York, pp 1323–1338
- Hall J, Whalley HC, Job DE, Baig BJ, McIntosh AM, Evans KL et al (2006) A neuregulin 1 variant associated with abnormal cortical function and psychotic symptoms. *Nat Neurosci* 9:1477–1478
- Harrison PJ, Law AJ (2006) Neuregulin 1 and schizophrenia: genetics, gene expression, and neurobiology. *Biol Psychiatry* 60:132–140
- Harrison PJ, Weinberger DR (2005) Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* 10:40–68
- Harrison PJ, Heath PR, Eastwood SL, Burnet PWJ, McDonald B, Pearson RCA (1995) The relative importance of premortem acidosis and postmortem interval for human brain gene expression studies: selective mRNA vulnerability and comparison with their encoded proteins. *Neurosci Lett* 200:151–154
- Hashimoto R, Straub RE, Weickert CS, Hyde TM, Kleinman JE, Weinberger DR (2004) Expression analysis of neuregulin-1 in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 9:299–307
- Ikeda M, Takahashi N, Saito S, Aleksic B, Watanabe Y, Nunokawa A et al (2008) Failure to replicate the association between *NRG1* and schizophrenia using Japanese large sample. *Schizophr Res* 101:1–8
- Inada T (2006) Pharmacologic treatment of schizophrenia: Summarized in various guidelines and algorithms. Aruta Shuppan Co, Tokyo
- Iwata N, Suzuki T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Inada T et al (2004) No association with the neuregulin 1 haplotype to Japanese schizophrenia. *Mol Psychiatry* 9:126–127
- Kendler KS, MacLean CJ, O'Neill FA, Burke J, Murphy B, Duke F et al (1996) Evidence for a schizophrenia vulnerability locus on chromosome 8p in the Irish Study of High-Density Schizophrenia Families. *Am J Psychiatry* 153:1534–1540
- LaCroix-Fralish ML, Tawfik VL, Spratt KF, DeLeo JA (2006) Sex differences in lumbar spinal cord gene expression following experimental lumbar radiculopathy. *J Mol Neurosci* 30:283–295
- LaCroix-Fralish ML, Tawfik VL, Nuttle-McMenemy N, DeLeo JA (2008) Neuregulin 1 is a pronociceptive cytokine that is regulated by progesterone in the spinal cord: implications for sex specific pain modulation. *Eur J Pain* 12:94–103
- Law AJ, Lipska BK, Weickert CS, Hyde TM, Straub RE, Hashimoto R et al (2006) Neuregulin 1 transcripts are differentially expressed in schizophrenia and regulated by 5' SNPs associated with the disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:6747–6752
- Lawrie SM, Hall J, McIntosh AM, Cunningham-Owens DG, Johnstone EC (2008) Neuroimaging and molecular genetics of schizophrenia: pathophysiological advances and therapeutic potential. *Br J Pharmacol* 153:S120–S124
- Li T, Stefansson H, Gudfinnsson E, Cai G, Liu X, Murray RM et al (2004) Identification of a novel neuregulin 1 at-risk haplotype in Han schizophrenia Chinese patients, but no association with the Icelandic/Scottish risk haplotype. *Mol Psychiatry* 9:698–704
- Li D, Collier DA, He L (2006) Meta-analysis shows strong positive association of the neuregulin 1 (*NRG1*) gene with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 15:1995–2002
- Marchionni MA, Goodearl AD, Chen MS, Bermingham-McDonogh O, Kirk C, Hendricks M et al (1993) Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* 362:312–318
- Martocchia A, Sigala S, Proietti A, D'Urso R, Spano PF, Missale C et al (2002) Sex-related variations in serum nerve growth factor concentration in humans. *Neuropeptides* 36:391–395
- McIntosh AM, Moorhead TWJ, Job D, Lymer GKS, Munoz Maniega S, McKirdy J et al (2008) The effects of a neuregulin 1 variant on white matter density and integrity. *Mol Psychiatry* 13:1054–1059
- Mei L, Xiong WC (2008) Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 9:437–452
- Morrison-Bogorad M, Zimmerman AL, Pardue S (1995) Heat-shock 70 messenger RNA levels in human brain: correlation with agonal fever. *J Neurochem* 64:235–246
- Munafò MR, Thiselton DL, Clark TG, Flint J (2006) Association of the *NRG1* gene and schizophrenia: a meta-analysis. *Mol Psychiatry* 11:539–546
- Nawa H, Carnahan J, Gall C (1995) BDNF protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain and after seizure:

- partial disagreement with mRNA levels. *Eur J Neurosci* 7:1527–1535
- Nicodemus KK, Law AJ, Luna A, Vakkalanka R, Straub RE, Kleinman JE et al (2009) A5' promoter region SNP in NRG1 is associated with schizophrenia risk and type III isoform expression. *Mol Psychiatry* 14:741–743
- Ozaki M, Tohyama K, Kishida H, Buonanno A, Yano R, Hashikawa T (2000) Roles of neuregulin in synaptogenesis between mossy fibers and cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 59:612–623
- Ozaki M, Itoh K, Miyakawa Y, Kishida H, Hashikawa T (2004) Protein processing and releases of neuregulin-1 are regulated in an activity-dependent manner. *J Neurochem* 91:176–188
- Petryshen TL, Middleton FA, Kirby A, Aldinger KA, Purcell S, Tahl AR et al (2005) Support for involvement of neuregulin 1 in schizophrenia pathophysiology. *Mol Psychiatry* 10:366–374
- Pulver AE, Lasserter VK, Kasch L, Wolyniec P, Nestadt G, Blouin JL et al (1995) Schizophrenia: a genome scan targets chromosomes 3p and 8p as potential sites of susceptibility genes. *Am J Med Genet* 60:252–260
- Schmitt A, Bertsch T, Tost H, Bergmann A, Henning U, Klimke A et al (2005) Increased serum interleukin-1beta and interleukin-6 in elderly, chronic schizophrenic patients on stable antipsychotic medication. *Neuropsychiatr Dis Treat* 1:171–177
- Sei Y, Ren-Patterson R, Li Z, Tunbridge EM, Egan MF, Kolachana BS et al (2007) Neuregulin1-induced cell migration is impaired in schizophrenia: association with neuregulin1 and catechol-*o*-methyltransferase gene polymorphisms. *Mol Psychiatry* 12:946–957
- Shirakabe K, Wakatsuki S, Kurisaki T, Fujisawa-Sehara A (2001) Roles of Meltrin beta/ADAM19 in the processing of neuregulin. *J Biol Chem* 276:9352–9358
- Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S et al (2002) Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71:877–892
- Steinthorsdottir V, Stefansson H, Ghosh S, Birgisdottir B, Bjornsdottir S, Fasquel AC et al (2004) Multiple novel transcription initiation sites for NRG1. *Gene* 342:97–105
- Takahashi M, Shirakawa O, Toyooka K, Kitamura N, Hashimoto T, Maeda K et al (2000) Abnormal expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor in the corticolimbic system of schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* 5:293–300
- Tan W, Wang Y, Gold B, Chen J, Dean M, Harrison PJ et al (2007) Molecular cloning of a brain-specific, developmentally regulated neuregulin1 (NRG 1) isoform and identification of a functional promoter variant associated with schizophrenia. *J Biol Chem* 282:24343–24351
- Tang JX, Chen WY, He G, Zhou J, Gu NF, Feng GY et al (2004) Polymorphisms within 5' end of the neuregulin 1 gene are genetically associated with schizophrenia in the Chinese population. *Mol Psychiatry* 9:11–12
- Thiselton DL, Webb BT, Neale BM, Ribble RC, O'Neill FA, Walsh D et al (2004) No evidence for linkage or association of neuregulin-1 (NRG1) with disease in the Irish study of high-density schizophrenia families (ISHDSF). *Mol Psychiatry* 9:777–783
- Thomson PA, Christoforou A, Morris SW, Adie E, Pickard BS, Porteous DJ et al (2007) Association of Neuregulin 1 with schizophrenia and bipolar disorder in a second cohort from the Scottish population. *Mol Psychiatry* 12:94–104
- Tomita H, Vawter MP, Walsh DM, Evans SJ, Choudary PV, Li J et al (2004) Effect of agonal and postmortem factors on gene expression profile: quality control in microarray analyses of postmortem human brain. *Biol Psychiatry* 55:346–352
- Toyooka K, Asama K, Watanabe Y, Muratake T, Takahashi M, Someya T et al (2002) Decreased levels of brain-derived neurotrophic factor in serum of chronic schizophrenic patients. *Psychiatry Res* 110:249–257
- Toyooka K, Watanabe Y, Iritani S, Shimizu E, Iyo M, Nakamura R et al (2003) A decrease in interleukin-1 receptor antagonist expression in the prefrontal cortex of schizophrenic patients. *Neurosci Res* 46:299–307
- Williams NM, Preece A, Spurlock G, Norton N, Williams HJ, Zammit S et al (2003) Support for genetic variation in neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Mol Psychiatry* 8:485–487
- Woods SW (2003) Chlorpromazine equivalent doses for the newer atypical antipsychotics. *J Clin Psychiatry* 64:663–667
- Yang JZ, Si TM, Ruan Y, Ling YS, Han YH, Wang WL et al (2003) Association study of neuregulin 1 gene with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 8:706–709
- Yokozeki T, Wakatsuki S, Hatsuzawa K, Black RA, Wada I, Sehara-Fujisawa A (2007) Meltrin beta (ADAM19) mediates ectodomain shedding of Neuregulin beta1 in the Golgi apparatus: fluorescence correlation spectroscopic observation of the dynamics of ectodomain shedding in living cells. *Genes Cells* 12:329–343
- Zhang HX, Zhao JP, Lv LX, Li WQ, Xu L, Ouyang X et al (2008) Explorative study on the expression of neuregulin-1 gene in peripheral blood of schizophrenia. *Neurosci Lett* 438:1–5

特集 統合失調症—最近の話題—

統合失調症と遺伝—環境相互作用*

● 功刀 浩**

Key Words: schizophrenia, gene-environment interaction, obstetric complications, molecular genetics

はじめに

病気の原因は、大きく遺伝要因と環境要因とに分けられるが、両者は発症において原則的に相互作用するのであり、どちらかの要因が単独で働くということはありません。極端な例として、フェニルケトン尿症のようなメンデル遺伝を示す疾患でさえ、低フェニルアラニン食という人工的な環境下では、発症を予防することができる。つまり、遺伝要因がその表現型を現すかどうかは環境に依存する。一方、感染症のような環境要因によると考えられる病気も、遺伝要因によって感染や発症が左右されている。

家系研究、双生児研究、養子研究などの遺伝疫学的研究によって、統合失調症の病因において遺伝要因が強く働いていることが明らかにされている。双生児研究によれば、一卵性双生児の一致率がおよそ50%であるのに対し、二卵性双生児のそれは17%とかなり低くなる¹⁾。しかし、一卵性双生児の一致率が100%よりはるかに低いことから、環境要因も重要な働きをなすことは明らかである。統合失調症の遺伝様式に関しては、単純なメンデル遺伝では説明できず、遺伝

的異質性を示す複雑な遺伝様式を持つと考えられている。すなわち、ごく一部はメンデル遺伝を示す家系が存在するかもしれないが、大部分は複数の遺伝子、環境などが種々の程度に関与するいわゆる多因子・ポリジーン遺伝であると考えられる。

本稿では、統合失調症の遺伝的要因と環境要因について、それぞれ具体的なリスク因子について概観し、両者の相互作用に関する最近の知見について述べる。

統合失調症の遺伝要因

統合失調症の病因において遺伝要因と環境要因とがどの程度強く働くかについて推定すると、遺伝率(ある表現型において遺伝と環境のうち、遺伝がどの程度関与するかについての数字であり、患者の子供の何%が発症するかを示すものではない)はおおよそ80%とされ、他の精神疾患に比べて高い部類に入る²⁾。それに基づいて、1980年代から分子遺伝学的研究が精力的に行われてきたが、統合失調症のリスク遺伝子として確立した遺伝子多型はほとんどない。

統合失調症の系統的な分子遺伝学的研究は、初期の連鎖研究から、有力な染色体領域の詳細な検討、そして全ゲノム解析(genome-wide association study; GWAS)へと進み、今後は次世代シーケンサーによる全シーケンスによる解析へと向かって

* Schizophrenia and gene-environment interaction.

** Hiroshi KUNUGI, M.D., Ph.D.: 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第三部(〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1); Department of Mental Disorder Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan.

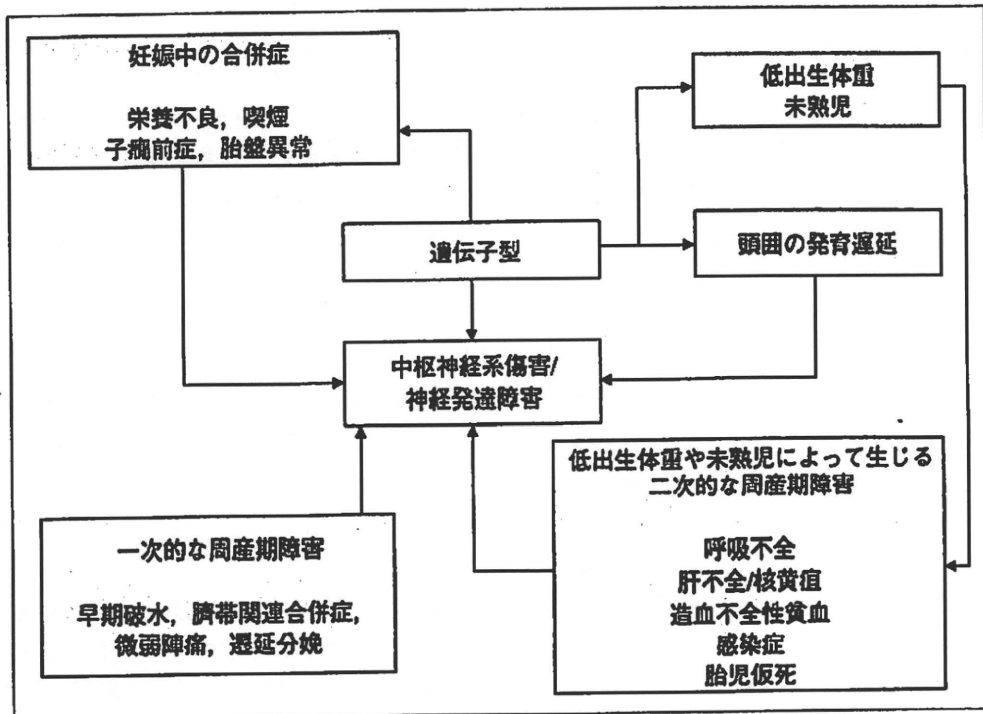


図1 産科合併症による中枢神経障害/神経発達障害メカニズム(文献⁹⁾より)

いる。GWAS以前の5年ほど前に有力とされていた遺伝子には、DISC1(Disrupted-In-Schizophrenia 1), dysbindin(dystrobrevin-binding protein 1; DTNBP1), neuregulin 1(NRG1), PPP3CC (protein phosphatase 3, catalytic subunit γ isoform), DAO(D-amino acid oxidase), DAOA(D-amino acid oxidase activator), RGS4(regulator of G protein signalling-4), COMT(catechol-O-methyl transferase), PRODH(proline dehydrogenase), 染色体22q11欠失などがあった³⁴⁾。しかし、どの遺伝子多型がどのようなメカニズムでリスクを与えるかについて明確にされた遺伝子はない。その後、GWASの時代に入り、ZNF804(zinc finger protein 804A), MHC(major histocompatibility complex; 主要組織適合抗原)などの遺伝子多型やコピー数異常が有力候補となっている。詳細は、本特集の松永らの総説を参照されたい。

遺伝要因の中で、現時点で最も有望であると考えられる所見は、染色体22q11の欠失によって生じるvelo-cardio-facial症候群(DiGeorge症候群; CATCH22)の患者に統合失調症を含んだ精神疾患が多いこと⁵⁾、また、1番染色体と11番染色体との相互平衡転座(1; 11)(q42; q14.3)を持つス

コットランドの大家系では、染色体異常によってDISC1と命名された遺伝子が分断された者に統合失調症や気分障害、行為障害、不安障害などの精神疾患が多発していたことであろう⁶⁾。両者に共通しているのは、稀な染色体異常であることと、統合失調症に限らず種々の精神疾患と関連している点である。

統合失調症の環境要因

遺伝要因では確立された知見がほとんどないが、環境要因では再現性の高いリスク因子がいくつか指摘されている。統合失調症の出生季節性(冬生まれが多い)や産科合併症(低酸素を伴うものや低出生体重)が多いこと、都市部で生育した者が多い、などの疫学的所見は古くから知られており、近年では、胎児期の母親のストレス、幼少期のトラウマ体験、大麻使用、ストレス(たとえば、人種差別によるもの)などが注目されている⁷⁸⁾。しかし、これらが純粋に環境要因であるとは言い切れない。たとえば、産科合併症を例にとってみても、それ自体が複雑な遺伝-環境要因の相互作用によって、中枢神経障害のリスクを与えるものと考えられる(図1)⁹⁾。

統合失調症と遺伝-環境相互作用

精神疾患の発病しやすさ(罹病性liability)に対する遺伝と環境との作用の形式には大きく3つの様式があり、①遺伝子型と環境要因とが相加的に作用する場合、②遺伝要因が環境要因への感受性を規定する場合、③遺伝要因が環境要因への曝露に影響を与える場合、に分けられる¹⁰⁾。

①は遺伝要因と環境要因が独立に作用するモデルであるが、冒頭に述べたように、遺伝と環境とが完全に独立に作用することは理論的なものであって、現実には存在しないであろう。後2者は遺伝環境相互作用を想定したモデルである。統合失調症のリスク遺伝子(G)が見つかり A/A, A/a, a/a の遺伝子型に従ってリスクが高まることを想定する。ここで大麻使用が統合失調症の発病リスクを高める環境要因であると仮定しよう。①のモデルでは、A/A, A/a, a/a のいずれの場合も大麻使用による罹病性の上昇は同じになる。しかし、たとえばGが大麻の成分の受容体遺伝子である場合などでは、大麻による脳障害への影響の強さが遺伝子型によって異なり、したがって、罹病性を高める度合いが遺伝子型によって異なってくるかもしれない(②のモデル)。また、大麻によって得られる多幸感が遺伝子型によって異なってくれば、多幸感を強く得られる遺伝子型を持つ者が大麻使用という環境要因への曝露が増えるように働き、それによって大麻による影響が増えることになる(③のモデル)。

近年になり、具体的な遺伝子多型と環境要因との相互作用に関する知見が出始めており、以下に紹介する。

1. 産科合併症と遺伝子の相互作用

Nicodemusら¹¹⁾は、116組のトリオ(患者とその両親)および134人のコントロール群のDNAサンプルと、McNeil-Sjostromによる産科合併症スケールを用いて、13個の候補遺伝子(AKT1, BDNF, CAPON, CHRNA7, COMT, DTNBP1, GAD1, GRM3, NOTCH4, NRG1, PRODH, RGS4, TNF- α)と産科合併症とが遺伝-環境相互作用するかどうか検討した。その結果、重度の産科合併症は、AKT1, BDNF(brain-derived neurotrophic factor), DTNBP1, GRM3(glutamate receptor,

metabotropic, type 3)の遺伝子多型と有意な相互作用をしてリスク要因となることが示唆されたという。これらの遺伝子はいずれも神経保護作用があることから、産科合併症による海馬などの脳の傷害作用と遺伝的に規定された神経保護作用が相互作用してリスクを与えるのではないかと述べている。ただし、この研究は290の一塩基多型(single nucleotide polymorphisms; SNPs)について検討しているにもかかわらず多重比較による補正をしていないことや、産科合併症に関する情報は親の記憶に基づいているなどの方法論的問題点がある。Haukvikら¹²⁾は、54人の統合失調症患者と52人のコントロール群を対象として、MRIによって測定した海馬の体積が、産科合併症やBDNF, DTNBP1, GRM3, NRG1の32個のSNPsの影響をどのように受けるかについて検討した。その結果、重度の産科合併症を持つ場合、海馬体積への影響はGRM3のSNP(rs13242038)と相互作用することが示唆された。ただし、この相互作用は統合失調症患者群だけに特異的にみられたのではなかった。

2. 都市部での出生/生育

都市部に出生/生育することが田舎で出生/生育することに比べて統合失調症を発病するリスクを高めることはすでに多数の研究によって再現されており、メタアナリシスによれば、都市部での出生/生育は、田舎と比べて統合失調症発病のリスクがおよそ2倍になるという¹³⁾。しかし、どのようなメカニズムでリスクを高めるかについてはよくわかっていない。この都市での出生/生育の影響は、精神病ないし統合失調症の遺伝負因が高い者ほど強いという結果が示されており¹⁴⁾、遺伝要因と都市部の環境要因が相乗的に作用する可能性が示唆されている。しかし、都市部の生育と相互作用する具体的な遺伝子多型については、筆者の知る限り、今のところ報告されていない。

3. 大麻使用と遺伝子の相互作用

Caspiら¹⁵⁾は、ニュージーランドの3歳から26歳まで定期的に面接調査を行ったコホートを対象に、COMT遺伝子多型(158番目のアミノ酸がバリンからメチオニンに置換しているVal158Met多型)と大麻使用との相互作用について検討を行っ

た(n=803)。その結果、COMTの遺伝子多型は発症に有意な影響を与えていなかったが、大麻使用(特に成人後に使用し始めたのではなく、青年期から使用していた場合)は有意な影響があり、しかも、遺伝子型と大麻使用は有意に相互作用していたという。すなわち、青年期からの大麻使用はVal/Val型の者では統合失調症様障害のリスクを非常に高める結果であったが(オッズ比10.9)、Val/Met型ではオッズ比は2.5に低下し、Met/Met型では1.1であった。COMTはドーパミンなどのカテコラミンを代謝する酵素であり、統合失調症の発症リスクや高次脳機能に関連する候補遺伝子として古くから注目されている。脳では、Val/Val型の遺伝子型を持つ者はMet/Met型に比べてCOMT活性が40%高いと報告されている¹⁶⁾。Henquetら¹⁷⁾は、統合失調症患者、患者の親族、健常者の3群に大麻の主成分であるテトラヒドロカンナビノールを実験的に投与して、それによる精神病症状の誘発や認知機能障害をみたところ、COMTのVal158Met多型のVal型を持つ者は、持たない者と比較して、精神病症状を誘発しやすく、記憶や注意の障害が大きかったという。

van Winkelら¹⁸⁾は、801人の統合失調症患者と740人の健常同胞を対象にして、最近の大麻使用と相互作用する遺伝子多型に関して、42の候補遺伝子(152個のSNPs)について検討した。多重比較による補正も行った結果、AKT1の遺伝子多型(rs2494732)の遺伝子型(C/C型)は、大麻使用歴があると精神病性障害のリスクをおよそ2倍に高めることが示唆された。研究者たちは、ドーパミン受容体の下流に存在するAKT1/GSK-3シグナルの遺伝的個人差が、大麻使用後の精神病性障害発症リスクを規定しているのではないかと考察している。

4. ストレス感受性と遺伝子の相互作用

van Winkelら¹⁹⁾は、大麻乱用を併発している統合失調症患者と健常者を対象に、COMTのVal158Met多型の日常生活におけるストレスへの感受性やそれに伴う精神病症状誘発に関する検討を行った。その結果、患者群では、Met型を持つ者は持たない者と比較して、ストレスに対する負の情動(不快)反応が大きく、精神病症状

の誘発も大きかったという。これは、上記の大麻への影響とは逆に、Val型でなくMet型の影響が大きい結果であるが、Met型は、ストレスホルモン反応が大きい²⁰⁾、不快刺激に対する辺縁系の活動の活性化が大きい²¹⁾という報告もあり、これらの知見に一致するという。

Keriら²²⁾は、200人の統合失調症患者を対象に統合失調症発症のリスクを高めることが示唆されているNRG1の機能的遺伝子多型(rs6994992)と家族の葛藤的感情表出への反応について検討したところ、リスクを高めるとされる遺伝子型(T/T)を持つ者は、そうでない遺伝子型(C/T型やC/C型)を持つ者と比較して、患者が葛藤状況の中で思考の異常を呈しやすいくこと示唆する結果を報告した。

おわりに

統合失調症と遺伝要因と環境要因について概観し、具体的な遺伝-環境相互作用に関する最近の研究を紹介した。

筆者は、疫学的所見や発症前の早期介入などの知見から、統合失調症の発病は、図2のようなスキーマが成立すると考えている。すなわち、胎生期を含めた人生早期においては、胎生期の母親のストレス、低出生体重やインフルエンザなどへのウイルス感染、低酸素などの産科合併症、都市部での生育、幼少期のトラウマを含む人生早期の環境要因と、BDNF、COMT、AKT1、NRG1などの神経発達に関与する遺伝要因との相互作用によって、神経発達障害とストレス脆弱性が形成される(第1ヒット)。その脆弱性によって、児童期以降にストレスを受けやすくなる、あるいは通常はストレスとならないような出来事が慢性的なストレスとなったり、強い否定的感情を生みやすくなったりすることによって、うつ状態を伴う前駆期に至る。統合失調症の前駆症状の研究によれば、統合失調症患者のほとんどは幻覚妄想状態になる3~4年前から抑うつ症状や陰性症状・不安症状が出現することが明らかにされている。この時期では、思春期/青年期の大きなホルモン環境の変化とともにおそらくストレスホルモン(視床下部-下垂体-副腎系)の異常やそれに伴うグルココルチコイドの過剰

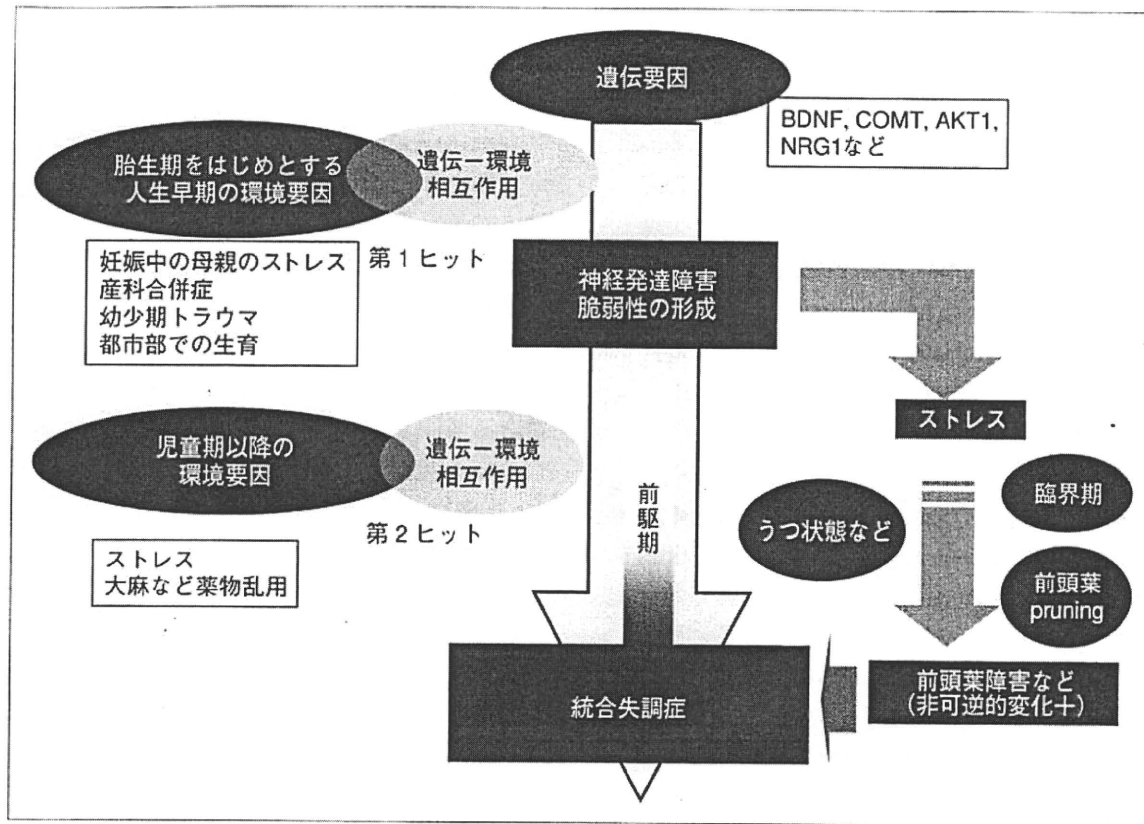


図2 統合失調症の発病スキーマと遺伝-環境相互作用

などによる脳内の変化が生じており、それが前頭葉の刈り取り (pruning) が完成する時期に重なる。ストレスホルモンなどの脳内変化は遺伝要因との相互作用によって、前頭葉を中心とした神経ネットワークの過剰な脱落などの傷害を与えると考えられる(第2ヒット)。これは、統合失調症を発症したものでは、青年期における前頭葉などの皮質体積の減少が大きいというMRIによる観察によって裏づけられる。

本稿で述べたように、上記のスキーマに合致するような具体的な遺伝子多型と環境との相互作用が報告され始めている。しかし、いまだにこのような研究はごく一部の研究者に限られている。今後、さらに大規模な研究がなされることによって、リスク遺伝子と環境要因との相互作用が明らかにされることが期待される。

文 献

1) Gottesman II. Schizophrenia Genesis ; The Origin of Madness. New York : W. H. Freeman and Company ; 1991. [内沼幸雄, 南光進一郎・監訳. 分裂

病の起源. 東京 : 日本評論社 ; 1992.]

2) Owen MJ, Cardno AG, O'Donovan MC. Psychiatric genetics : back to the future. Mol Psychiatry 2000 ; 5 : 22-31.
 3) 功刀 浩. 統合失調症の分子遺伝学. 神経研究の進歩 2006 ; 50 : 693-702.
 4) 功刀 浩. 統合失調症と遺伝的リスクファクター. 精神科 2006 ; 8 : 269-75.
 5) Karayiorgou M, Gogos JA. The molecular genetics of the 22q11-associated schizophrenia. Brain Res Mol Brain Res 2004 ; 132 : 95-104.
 6) Blackwood DH, Fordyce A, Walker MT, et al. Schizophrenia and affective disorders—cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes : clinical and P300 findings in a family. Am J Hum Genet 2001 ; 69 : 428-33.
 7) Krabbendam L, van Os J. Can the social environment cause schizophrenia? In : McDonald C, Schulze K, Murray RM, et al, editors. Schizophrenia : Challenging the Orthodox. London : Taylor &

- Francis ; 2004. p. 47-55. [功刀 浩, 堀 弘明・訳. 統合失調症の常識は本当か? : 研究と治療の最前線から. 東京: 培風館; 2009. p. 47-56.]
- 8) van Os J, Kenis G, Rutten BPF. The environment and schizophrenia. *Nature* 2010 ; 468 : 203-12.
 - 9) Kunugi H, Nanko S, Murray RM. Obstetric complications and schizophrenia : prenatal underdevelopment and subsequent neurodevelopmental impairment. *Br J Psychiatry* 2001 ; 40 Suppl : s25-9.
 - 10) Kendler KS, Eaves LJ. Models for the joint effect of genotype and environment on liability to psychiatric illness. *Am J Psychiatry* 1986 ; 143 : 279-89.
 - 11) Nicodemus KK, Marengo S, Batten AJ, et al. Serious obstetric complications interact with hypoxia-regulated/vascular-expression genes to influence schizophrenia risk. *Mol Psychiatry* 2008 ; 13 : 873-7.
 - 12) Haukvik UK, Saetre P, McNeil T, et al. An exploratory model for G x E interaction on hippocampal volume in schizophrenia ; obstetric complications and hypoxia-related genes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010 ; 34 : 1259-65.
 - 13) Krabbendam L, van Os J. Schizophrenia and urbanicity : a major environmental influence—conditional on genetic risk. *Schizophr Bull* 2005 ; 31 : 795-9.
 - 14) van Os J, Pedersen CB, Mortensen PB. Confirmation of synergy between urbanicity and familial liability in the causation of psychosis. *Am J Psychiatry* 2004 ; 161 : 2312-4.
 - 15) Caspi A, Moffitt TE, Cannon M, et al. Moderation of the effect of adolescent-onset cannabis use on adult psychosis by a functional polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene : longitudinal evidence of a gene X environment interaction. *Biol Psychiatry* 2005 ; 57 : 1117-27.
 - 16) Chen J, Lipska BK, Halim N, et al. Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): Effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet* 2004 ; 75 : 807-21.
 - 17) Henquet C, Rosa A, Krabbendam L, et al. An experimental study of catechol-O-methyl transferase val(158)met moderation of delta-9-tetrahydrocannabinol-induced effects on psychosis and cognition. *Neuropsychopharmacology* 2006 ; 31 : 2748-57.
 - 18) van Winkel R. Genetic Risk and Outcome of Psychosis (GROUP) Investigators. Family-based analysis of genetic variation underlying psychosis-inducing effects of cannabis : sibling analysis and proband follow-up. *Arch Gen Psychiatry* 2010 Nov 1 [Epub ahead of print].
 - 19) van Winkel R, Henquet C, Rosa A, et al. Evidence that the COMT(Val158Met) polymorphism moderates sensitivity to stress in psychosis : an experience-sampling study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008 ; 147B : 10-7.
 - 20) Oswald LM, McCaul M, Choi L, et al. Catechol-O-methyltransferase polymorphism alters hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to naloxone : A preliminary report. *Biol Psychiatry* 2004 ; 55 : 102-5.
 - 21) Smolka MN, Schumann G, Wrase J, et al. Catechol-O-methyltransferase val158met genotype affects processing of emotional stimuli in the amygdala and prefrontal cortex. *J Neurosci* 2005 ; 25 : 836-42.
 - 22) Keri S, Kiss I, Seres I, et al. A polymorphism of the neuregulin 1 gene (SNP8NRG243177/rs6994992) affects reactivity to expressed emotion in schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2009 ; 150B : 418-20.

* * *

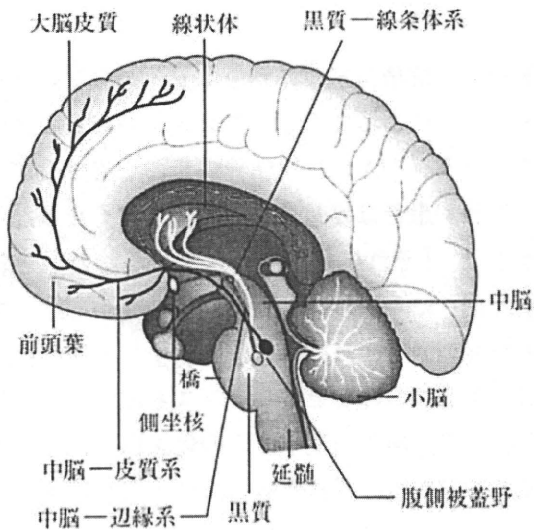


図1 脳におけるドーパミン系

ットのような動物であれ、プレパルスインヒビションという感覚情報処理機能が減弱する。プレパルスインヒビションについての詳細は略すが、感覚情報の「フィルター障害仮説」に関するものであり、統合失調症患者ではこの機能が低下していることは多くの研究によって立証されている。統合失調症患者は人混みに出るのが苦手であったり、音に過敏であったりするのは、この障害と関係があると考えられる。

第2に、統合失調症の治療に用いられる抗精神病薬の臨床効果は、ドーパミン拮抗作用と相関する。陽電子放射断層撮影 (PET) を用いた脳画像研究から、殆どの抗精神病薬において、薬によって脳のドーパミン D₂ 受容体が少なくとも 60% 占拠されると臨床効果が現れ、80% を超えると黒質—線条体系に対する阻害効果によって錐体外路系副作用 (EPS) が起こりやすくなることがわかっている。

以上から、統合失調症患者ではドーパミン系の過剰が存在するのではないかと考えられてきた。事実、統合失調症患者の線条体においてドーパミン量やその放出量が増加していることが、近年の脳画像研究の進歩によって明らかになっている。放射線で標識した L-ドーパ (ドーパミンの前駆物質) を被験者に投与して PET で観察すると、中脳から線条体に伸びているドーパミン神経の神

経終末 (プレシナプス) に蓄えられているドーパミン量は、統合失調症患者、特に急性期の精神病状態にある患者では、健常者と比較して増加していることが明らかになった。また、単光子放射断層撮影 (SPECT) によって少量のアンフェタミン服用に誘発されるドーパミン放出量をみると、統合失調症患者では健常者と比較して増加していることが報告された。

修正ドーパミン仮説

以上のように〈元祖〉ドーパミン仮説はドーパミンの過剰 (過活動) が統合失調症の本態であるという仮説であり、事実、線条体におけるドーパミンの過剰は近年の PET や SPECT 研究によって立証された。しかし、それがどのようにして起きるのかについては説明していないし、脳の全ての領域でドーパミンが過剰であるという証拠もない。また、抗精神病薬は陽性症状に対しては効果があるが、陰性症状や認知機能障害に対してはあまり効果がないという事実がある。つまり、線条体のドーパミン過剰だけが統合失調症の本態であるとは考えにくい。

統合失調症では、実行機能や作動記憶などの前頭葉機能が低下しており、前頭葉機能を調べる神経心理学的テスト (ウィスコンシンカード分類テストなど) を施行すると、前頭葉の局所脳血流の低下がみられる (hypofrontality)。また、ドーパミン代謝回転 (特に前頭葉) を反映するとされる脳脊髄液中のドーパミン代謝産物ホモバニリン酸の濃度は、統合失調症患者で低下しているという報告がある。さらに、アンフェタミンやアポモルフィンなどのドーパミン系の活動を高める薬物は、前頭葉の局所脳血流を増加させる。以上から、統合失調症患者では前頭葉のドーパミン系の活動は低下しており、線条体では亢進しているという〈修正〉ドーパミン仮説が提唱された³⁾。前頭葉のニューロンは中脳辺縁系のドーパミン活動を制御していることから、前頭葉のドーパミンの活動性低下が前頭葉機能低下と線条体の機能亢進の両者

を引き起こすと考えれば、陽性症状、陰性症状、認知機能障害などが一元的に説明できる。

前頭葉、特に前頭前皮質が統合失調症の一次的な〈病巣〉ではないかという考え方は、現在まで多くの研究者の支持を得ている。その病理については、後述するように、GABA ニューロンの障害によるという仮説が注目されている。

異常なセイリアンス仮説

それでは、線条体での過剰なドーパミンはどのようにして精神病症状を引き起こすのであろうか。

ドーパミン神経系は、報酬や動機づけといった情動行動において中心的役割を果たす。ドーパミン神経系の活動は外的刺激を中立的あるいは「客観的な」感覚情報から、「魅力的な」求める対象へ、あるいは「嫌悪を伴う」回避したい対象へと変換させる働きがあると考えられている。また、中脳辺縁系のドーパミンは“salience”に反応して放出されるという。Salienceとは、「際立っていること」「目立つこと」「突出(物)」などと訳されるが、神経科学や精神医学の分野では〈顕出性〉とか〈顕現性〉、あるいは〈セイリアンス〉とそのまま書く場合もあり、まだ統一されていないようである。

Kapur らは、統合失調症ないし精神病症状における「異常なセイリアンス仮説」を提唱している⁷⁾。すなわち、統合失調症患者では、上述のように線条体でのドーパミンの異常興奮があり、それによって通常は気にならないような中立的な刺激に対して「セイリアンス」が付与されてしまうために、そのような刺激が何か自分にとってとても意味のあるものに感じてしまうようになる。そして、その意味づけをしているうちに妄想が形成されるという。事実、統合失調症の急性期では、周囲にあるいろいろなものが意味を帯びているように感じるようになる。例えば、人ごみの中で他人の会話や笑い声がきこえると、自分について話されているとか笑われていると(自分にとって何か意味があると)感じてしまう(関係念慮や関係

妄想)。

そして、抗精神病薬の効果はドーパミン系を阻害することによってセイリアンスを弱めることによるという。確かに、抗精神病薬の治療効果が出てくると、患者は妄想や幻覚が全て無くなったというより、「それほど気にならなくなった」と報告するようになる。他方、抗精神病薬がセイリアンスを弱めるとすれば、症状が弱まると同時に、通常の生活におけるセイリアンスも減弱させてしまう可能性がある。従ってこの仮説によれば、抗精神病薬が人生の正常な動機づけや楽しみまで一部奪ってしまっている可能性がある。

統合失調症の脳画像所見に関する仮説

統合失調症の障害の基盤となる脳の画像研究(特にMRIによる研究)も進歩がめざましく、これまでにおびただしい数の研究報告がなされている。軽度の脳室拡大が最も頻繁に観察される所見であり、さまざまな脳領域において概して軽度ではあるが、種々の程度の脳構造の体積縮小がみられる。記憶を司る側頭葉や、実行機能・作動記憶を司る前頭葉などの体積の減少は比較的共通にみられるが、その他にも頭頂葉や脳梁、視床、小脳などで体積減少が報告されている。

また、拡散テンソル画像によって、統合失調症では皮質間のネットワークが広範に障害されていることが明らかにされた。筆者らのデータでも、前頭葉や側頭葉の白質や、^{こうじょうせき}鉤状束(前頭葉と側頭葉の前部とを連絡する線維束)、^{たいじょうせき}帯状束(前頭葉や頭頂葉の脳領域と^{かいぼうかい}海馬傍回やその周辺領域とを連絡する線維束)などの白質の広汎な領域において障害がみられた。すなわち、統合失調症患者では大脳半球内の各領域を繋ぐ連合線維の広汎な障害が存在することが示唆される(「神経ネットワーク障害仮説/ connectivity 異常仮説」)。

上述のような脳構造異常は、脳梗塞や脳の炎症が生じることによって組織が死滅することによるのではなく、人生早期からの発達障害によるとする「神経発達障害仮説」が提唱された⁸⁾。という

のも、統合失調症患者の死後脳には「グリオース」(脳梗塞や炎症が起きると脳が死滅してグリア細胞に置き換わる現象)がみられない。かわりに神経細胞の樹状突起や軸索によるネットワーク(神経網 [neuropil])の体積が減少していることが示唆されている。また、統合失調症患者には出生季節性(冬生まれが多く夏生まれが少ない)がみられること、産科合併症(低出生体重や出生時仮死など)や身体小奇形が多いこと、幼少期から言語・運動発達の偏りがみられることが多いこと、などから人生早期からの脳の発達障害が存在することが示唆されるからである。

メルボルン大学のグループは、統合失調症前駆期に相当する「発症リスクが高い精神状態 (at risk mental state: ARMS)」にある者に早期介入による発症予防の先駆的な試みを行い、いまや統合失調症の発症予防は世界的に広がっている。彼らはこの試みの中でMRI画像を縦断的に検討したところ、12カ月以上経て統合失調症に移行した者は、発症前の「発症リスクが高い精神状態」に該当する時期において、すでに右海馬・海馬傍回、右上側頭回・側頭極、右下前頭回・腹外側前頭前皮質・基底核、両側前・後部帯状回の灰白質体積が小さかったという¹⁰⁾。さらに、統合失調症に移行した者は、移行する過程で左海馬傍回、紡錘状回、左眼窩前頭皮質、左小脳、両側帯状回の灰白質体積が減少した。このような結果から、脳の発達障害によって「発症リスクが高い精神状態」が生じ、さらに脳に障害が加わって統合失調症に移行する可能性が考えられる。

近年、統合失調症の脳構造異常は発症後(特に発病初期)にも「進行する」ことを示す研究結果が蓄積されている。ヒトは健常者であっても年齢を経るに従って脳が萎縮していくが、その速度は統合失調症患者の方が健常者より早いことを示唆する研究結果が増えている。健常者の脳が萎縮していく速度は毎年0.2%であるのに対し、統合失調症患者は0.5%であり、およそ2倍速く、前頭葉と側頭葉においてその度合いが強いという⁶⁾。拡散テンソル画像において観察される神経ネット

ワーク障害も、年齢にともなう進行性の変化がみられる。

以上から、統合失調症の脳構造異常は、人生早期からのリスク因子(遺伝的リスクや産科合併症などの第1ヒット)による発達障害と発症脆弱性が形成され、その後、発症に移行する障害(第2ヒット)が加わって発症し(「2ヒット仮説」)、発症後も進行性変化を辿るというプロセスを経ると考えられる。

統合失調症の発症は、典型的には思春期ないし成人早期であるが、この時期は統合失調症の〈病巣〉とされる前頭前野が完成する時期でもある。その際、過剰なシナプスの刈り取り(pruning)が行われる。すなわち、脳の発達においては、児童期にはニューロンから神経突起がどんどん伸びて過剰なシナプスを形成しているが、使われていない余分なものは刈り取られることによって、脳が完成する。それによって新たな能力を獲得することができなくなる面があるいっぽう、余分なシナプスがなくなる分、効率が高まる。統合失調症は、シナプス刈り取りが過剰に行われる結果生じるという「刈り取り異常仮説」は古くからあるが⁶⁾、現在も有力である。というのも、統合失調症の第2ヒットが刈り取り過剰によるとすれば、思春期ないし成人早期という発症時期も説明できるし、統合失調症の脳障害が非可逆的な変化を引き起こすことの説明にもなるからである。

刈り取りが過剰になる理由としては、ストレスの影響が考えられており、視床下部-下垂体-副腎系(ストレスホルモン)の異常などが関与する可能性が注目されつつある。これは、統合失調症の前駆期にはうつ状態や不安症状などの症状を呈することが多いことが近年の早期発見・早期介入研究によってわかってきていることと符合する。

死後脳研究によるミクロな変化に関する仮説

脳画像で捉えられる統合失調症のマクロな脳構造異常の基盤となるミクロなレベルの変化については、主に死後脳を用いて研究されている。特に、

マイクロアレイなどによる遺伝子発現解析を併せることによって、分子病理学的研究が飛躍的に進んだ。

脳構造の体積減少の要因として、細胞数の減少はあまり報告されていないが、背外側前頭前皮質で神経細胞の細胞体の大きさが減少していたという報告があり、シナプスを形成する樹状突起 棘 (スパイン) が減少しているという報告もある。また、海馬ではシナプスに発現するタンパク (synaptophysin など) が減少していることから、シナプス数が減少していることが示唆されている。これらは、上記の「神経ネットワーク障害仮説 / connectivity 異常仮説」を支持する。

拡散テンソル画像で捉えられるような神経ネットワーク障害に関連して、神経細胞の軸索を覆っているミエリン (髓鞘 = オリゴデンドログリアで形成される) の障害が考えられるが、事実、背外側前頭前皮質などにおいてオリゴデンドログリアが減少しているという報告や、障害されたオリゴデンドログリアが多くみられるという報告がある。また、マイクロアレイで検討すると、同皮質においてオリゴデンドログリア発現遺伝子が減少していたことから、統合失調症患者ではオリゴデンドログリア / ミエリンの障害が強く示唆される⁹⁾。

ピッツバーグ大学のグループは、背外側前頭前皮質の障害について、近年注目されている仮説を提唱している。彼らは、背外側前頭前皮質第3層の錐体細胞のスパイン数が減少していることを見出したが、その後の遺伝子発現解析などによって、統合失調症患者では、錐体細胞の軸索起始領域に抑制性のシグナルを与えている GABA 系の介在ニューロンの一部 (パルバルブミン陽性のシャンデリア細胞) の GABA 合成酵素の発現が低下しており、それによる機能障害によって錐体細胞の同期的活動が障害されているのではないかという仮説を提唱した¹⁰⁾。さらに、この GABA 系ニューロンの機能低下の原因の1つとして、背外側前頭前皮質における脳由来神経栄養因子 (BDNF) の受容体 TrkB の発現低下が

関与している可能性を指摘した。パルバルブミン陽性 GABA 細胞は、知覚、注意、記憶などの幅広い認知機能に伴って出現する γ 帯域オシレーション (脳波や脳磁図で測定することができる 30 ~ 100Hz の神経細胞の周期的な電気活動) の発生において中心的な役割を果たすとされ、事実、統合失調症患者では、前頭前野の認知課題施行中の γ 帯域オシレーションのパワー増加が健常者と比較して低下している。

遺伝子研究における仮説

統合失調症の発症には遺伝要因が強く働いていることは古くから明らかにされており、分子遺伝学的研究も精力的になされてきた。しかし、統合失調症のようなありふれた病気は、ありふれた遺伝子多型によって発症するという「common variant-common disease 仮説」に基づいた遺伝子研究による結果は、ドーパミン D₂ 受容体遺伝子多型が統合失調症と関連するという報告¹¹⁾がおそらく正しいであろうこと以外、確かな研究結果は今のところ見当たらない。大規模なゲノムワイド関連研究が行われているが、リスク遺伝子であることが明確に示されたありふれた遺伝子多型 (common variant) は見出されていない。

他方、染色体 22q11 領域の微小欠失によって発症する velo-cardio-facial 症候群では、統合失調症を含む種々の精神疾患を発症するリスクが非常に高いという報告は古くからある。それと軌を一にして、他の染色体の微小欠失や重複によるコピー数異常 (copy number variation) が統合失調症に多いという所見が報告されている。染色体の微小欠失や重複のそれぞれは、“rare variant”であることから、多数の稀な遺伝子変異によってありふれた病気が発症するという「multiple rare variant-common disease 仮説」が、にわかに脚光を浴びつつある。

Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) 遺伝子が染色体転座によって分断されることが統合失調症などの精神疾患と連鎖していることがスコッ

トランドの家系で報告されたが²⁾、これも稀な変異 (rare variant) の1つである。DISC1はその遺伝子名が統合失調症の遺伝子であるがごとくに命名されたものの、この家系においてDISC1を分断する染色体異常をもっていて精神疾患を発症した者の中には、統合失調症ではなくうつ病や双極性障害、あるいは行為障害を発症した者も多く存在した。従って、上述の22q11領域の微小欠失についても言えることであるが、これらは統合失調症の特異的な遺伝子というわけではなく、関連があるとしても気分障害を含む広い範囲での精神疾患のリスク遺伝子ということになろう。これは冒頭で述べた単一精神病仮説に符合しよう。

おわりに

現時点で上述の仮説を有機的につなげるシナリオについては、以下のようなものが考えられよう。すなわち、統合失調症は人生早期の侵襲（産科合併症）や稀な遺伝子異常などの第1ヒットによって発達障害を生じ、思春期～成人早期の脳の完成期（シナプスの刈り取りがなされる時期）にストレスに脆弱となり、ストレスホルモンなどによる影響を強く受けることによってうつ状態などを生じ、その際、シナプス刈り取り過剰やミエリン障害などによって前頭葉などの種々の脳構造に障害を受け、ドーパミン系、GABA系などが障害される（第2ヒット）。前頭葉の障害は認知機能障害や陰性症状を生じ、線条体のドーパミン系の過活動によってセイリアンスの異常や感覚フィルター障害を通じて陽性症状を生じる。このような病理過程における鍵分子として、BDNFやその受容体TrkBシグナルの障害が重要な役割を果たしていると考えられる。

なお、本稿では筆者が重要と考える統合失調症の有力仮説についていくつか紹介したが、統合失調症に関する興味深い仮説は多数あり、紙数の関係上、省略せざるを得なかったものも少なからず存在することを追記しておく。

- 1) Arinami, T., Itokawa, M., Enguchi, H. et al : Association of dopamine D2 receptor molecular variant with schizophrenia. *Lancet*, 343 : 703-704, 1994.
- 2) Blackwood, D.H., Fordyce, A., Walker, M.T. et al : Schizophrenia and affective disorders — cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes : clinical and P300 findings in a family. *Am. J. Hum. Genet.*, 69 : 428-433, 2001.
- 3) Davis, K.L., Kahn, R.S., Ko, G. et al : Dopamine in schizophrenia : a review and reconceptualization. *Am. J. Psychiatry*, 148 : 1474-1486, 1991.
- 4) Davis, K.L., Stewart, D.G., Friedman, J.I. et al : White matter changes in schizophrenia : evidence for myelin-related dysfunction. *Arch. Gen. Psychiatry*, 60 : 443-456, 2003.
- 5) Feinberg, I. : Schizophrenia : caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *J. Psychiatr. Res.*, 17 : 319-334, 1982-1983.
- 6) Hulshoff Pol, H.E., Kahn, R.S. : What happens after the first episode? a review of progressive brain changes in chronically ill patients with schizophrenia. *Schizophr. Bull.*, 34 : 354-366, 2008.
- 7) Kapur, S., Mamo, D.C. : Why antipsychotics are anti-'psychotic'. In : (eds.), McDonald, C., Schulze, K., Murray, R.M. et al. *Schizophrenia : Challenging the Orthodox* Taylor & Francis, London and New York, 2004. (功刀浩, 堀弘明訳 : 統合失調症の常識は本当か? — 研究と治療の最前線から —, 階風館, 東京, p.121-134, 2009.)
- 8) Lewis, D.A., Hashimoto, T., Volk, D.W. : Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat. Rev. Neurosci.*, 6 : 312-324, 2005.
- 9) Murray, R.M., Lewis, S.W. : Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder? *Br. Med. J.*, 295 : 681-682, 1987.
- 10) Pantelis, C., Velakoulis, D., McGorry, P.D. et al. Neuroanatomical abnormalities before and after onset of psychosis : a cross-sectional and longitudinal MRI comparison. *Lancet*, 361 : 281-288, 2003.

