

cultures, in which all neurons showed no Ca^{2+} oscillations as previously reported (Numakawa et al. 2002). Then, the glutamate-evoked increase in intracellular Ca^{2+} concentration was also checked using such resting neurons (Fig. 8D,E and Supplementary Fig. 5A). Importantly, PCP treatment for 3 h repressed the glutamate-stimulated Ca^{2+} (Fig. 8D,E and Supplementary Fig. 5A). Such suppression of Ca^{2+} elevation was still observed at 6 h after PCP addition (Supplementary Fig. 5B). In line with the low expression level of glutamate receptors, immature neurons at DIV 5 did not respond to glutamate with or without PCP (Fig. 8E). In the DIV 5 immature neurons, PCP had no effect on intracellular BDNF expression (Supplementary Table 1). Furthermore, we confirmed a positive effect of other noncompetitive and competitive antagonists for NMDA receptors (MK-801 and APV, respectively) on intracellular BDNF levels in DIV 12 neurons (but not in DIV 5 neurons) (Supplementary Table 2), indicating that the effect is not specific to PCP but it holds true for NMDA receptor antagonists in general. These results suggest that inhibition of Ca^{2+} influx via NMDA receptors was involved in the decrease in BDNF secretion by PCP.

Discussion

In the present study, we found that intracellular BDNF protein was transiently increased by 3-h PCP exposure. Despite such a BDNF increase, activation of Trks and downstream signaling pathways (ERK1/2 and Akt) were diminished. Importantly, the number of synaptic sites and expression of synaptic proteins were reduced 48 h after PCP application. Furthermore, both basal and depolarization-evoked glutamate release were decreased in PCP-treated neurons, and the electrophysiological studies also revealed a reduced frequency of mEPSCs by PCP. Interestingly, we discovered suppression in BDNF secretion after PCP treatment both in cortical cultures and acute slices. Application of exogenous BDNF prevented the PCP-induced reduction in expression of synaptic proteins in cortical cultures. It is possible that the PCP-induced impairment of BDNF secretion results in the transient accumulation of intracellular BDNF and leads to down regulation of BDNF/TrkB signaling, which is required for maintenance of synaptic protein expression. As PCP treatment significantly inhibited the spontaneous Ca^{2+} activity and evoked Ca^{2+} influx by glutamate, the inhibition of Ca^{2+} mobilization may contribute to the PCP-induced impairment of BDNF secretion.

In hippocampal and cortical neurons, BDNF showed a vesicular expression pattern in dendrites and axons and appeared to be sorted into a regulated pathway in which BDNF is secreted in response to neuronal activity (Goodman et al. 1996; Farhadi et al. 2000; Hartmann et al. 2001; Kojima et al. 2001; Kohara et al. 2001; Gartner and Staiger 2002; Lessmann et al. 2003; Wu et al. 2004; Adachi et al. 2005). The activity-dependent secretion of BDNF is triggered by an increase in intracellular Ca^{2+} concentration via ionotropic glutamate receptors, voltage-gated Ca^{2+} channels, and internal Ca^{2+} stores (Hartmann et al. 2001; Lessmann et al. 2003). In the present study, we examined the possibility that PCP attenuated an increase of intracellular Ca^{2+} concentration at basal and evoked conditions, contributing to the transient increase of intracellular BDNF and suppression of its secretion. In mature cortical neurons, we found that PCP induced an inhibition of Ca^{2+} mobilization, and that BDNF protein released into the culture

medium was reduced after PCP application compared with control. This reduction in BDNF secretion was demonstrated by both immunoblotting and ELISA methods after immunoprecipitation with anti-BDNF antibody. Interestingly, when we examined the effect of PCP on de novo synthesis of BDNF, we found decreased levels of BDNF mRNA (Supplementary Fig. 1B), suggesting that PCP-dependent BDNF increase is not due to transcriptional activity. Resultant down regulation of BDNF protein levels might appear as a reduction in the amount of intracellular BDNF at 6 h or later. Importantly, other NMDA antagonists, MK-801 (noncompetitive) and APV (competitive), also elevated BDNF levels in neurons, suggesting that the PCP-increased BDNF would be due to the inhibitory effect of PCP on NMDA receptors. Furthermore, such an increase of BDNF by NMDA antagonists occurred only in mature cortical neurons (DIV 12) that express adequate glutamate receptors. PCP-dependent impairment of BDNF secretion and subsequent decrease in synaptic function may only occur in mature fully developed neurons that express adequate NMDA receptors.

The reduction of BDNF secretion is considered to be a neuronal response to PCP, as we confirmed that the majority of cultured cells in the experiment were indeed neurons. Furthermore, PCP did not cause an intracellular increase of BDNF in pure astroglial cultures. In our cortical cultures, vesicular expression of BDNF was observed only in GAD-negative neurons. If this vesicular pattern of BDNF expression reflects the activity-dependent population of BDNF secretion, it is possible that PCP specifically impacts the regulatory release of BDNF from glutamatergic (not GAD-positive) neurons. Importantly, some reports suggest that preferential binding of PCP to NMDA receptors on GABAergic interneurons results in the activation of glutamatergic pyramidal neurons *in vivo* (Homayoun and Moghaddam 2007; Kargieman et al. 2007). Homayoun and Moghaddam reported that firing rates in ~69% of GABAergic neurons and 86% of pyramidal neurons were decreased after PCP injection (Homayoun and Moghaddam 2007). Interestingly, Kargieman et al. showed that PCP increases and decreases the activity of 45% and 33% of the pyramidal neurons, respectively (Kargieman et al. 2007). Our results indicated a decreased synaptic activity in cultured cortical neurons after 48 h PCP exposure. Furthermore, PCP-dependent decrease in the secretion of BDNF from acute cortical slices, in which local neuronal circuits remain intact, was confirmed. It is possible that differences in experimental conditions including dose of PCP and neuronal maturity may influence such a different neuronal response to PCP, although future studies will be needed using *in vivo* and *in vitro* systems.

Secretion of BDNF to the extracellular space is required to generate its biological effects via activation of TrkB. Indeed, activation of Trk receptors and downstream signaling cascades (ERK1/2 and Akt) were reduced by PCP. In our system, BDNF and NT-4/5 functioned as major contributors for the activation of Trk receptors, suggesting that TrkB signaling is predominant. A subset of the BDNF/TrkB downstream signaling molecules, especially ERK1/2 activity, is known to be regulated by NMDA receptor-mediated Ca^{2+} influx (Xia et al. 1996; Sutton and Chandler 2002). Therefore, it is possible that decreased activity of ERK1/2 may be attributable, at least in part, to the blockade of the NMDA receptor by PCP directly. However, simultaneous application of exogenous BDNF blocked the PCP-dependent suppression of synaptic protein levels as well as ERK1/2 and Akt signaling pathways even when NMDA receptors were

blocked in the presence of PCP. Recently, we reported that ERK1/2 activity is involved in the maintenance of synaptic protein expression (Kumamaru et al. 2011). Furthermore, delayed application of exogenous BDNF reversed the suppression of some synaptic proteins inhibited by PCP. All things considered, impaired BDNF secretion substantially contributed to the down regulation of ERK1/2 activity and synaptic protein expression.

The number of synaptic sites was decreased when chronic PCP exposure was administered. There are 2 lines of evidence: 1) the reduced expression of pre- and postsynaptic proteins assessed with Western blotting and 2) the decreased number of presynaptic sites estimated with immunostaining. We also obtained evidence for functional changes, showing a marked reduction in glutamate release as well as a decreased frequency of mEPSCs mediated by NMDA and AMPA receptors. Taken together, excitatory neurotransmission is suppressed by 48 h of PCP treatment.

It is well known that BDNF/TrkB signaling plays an important role in synaptic plasticity. BDNF stabilizes and increases dendritic synapse density in the optic tectum (Hu et al. 2005; Sanchez et al. 2006). BDNF increases spine density in hippocampal neurons through ERK1/2 activation (Alonso et al. 2004). We also reported that BDNF increases the expression of pre- and postsynaptic proteins via ERK1/2 signaling in cultured cortical neurons (Kumamaru et al. 2011). Overexpression of TrkB or activation of PI3K/Akt signaling enhances motility of dendritic filopodia and synaptic density (Luikart et al. 2008). These findings, including our current results, suggest that decreased BDNF secretion caused by PCP is one of the major factors for loss of synaptic connections and/or overall neuronal function.

In the present study, 48 h of PCP treatment did not change both the number of MAP2-positive cells and mitochondrial activity in cortical cultures. Mitochondrial activity was not influenced even when a critically high concentration of PCP (25 μ M) was applied. Furthermore, expression levels of both an antiapoptotic protein Bcl-2 and a proapoptotic protein Bad were unchanged after PCP application. These data suggest that PCP has no major influence on survival of cultured cortical neurons, although it does inhibit synaptic connectivity and function. Interestingly, Lei et al. (2008) reported that PCP causes apoptosis in cultured cortical neurons through suppression of Akt activity and activation of GSK3 β and caspase-3. This discrepancy between Lei et al. (2008) and our study may be attributable to differences in culture conditions, as their neurobasal medium contained B27 while our 5/5 DF medium contained serums.

PCP induces schizophrenia-like behaviors in humans (Allen and Young 1978; Javitt and Zukin 1991) and rodents (Noda et al. 1995; Furuta and Kunugi 2008). In vivo administration of PCP causes extensive reduction in the number of spines in the rat prefrontal cortex (Hajszan et al. 2006) and suppression of glutamate release in the prefrontal cortex of mice (Nabeshima et al. 2006; Murai et al. 2007). Postmortem brain studies from schizophrenia patients demonstrate that the number of neurons in the prefrontal cortex is not decreased (Pakkenberg 1993; Akbarian et al. 1995), although synaptophysin immunoreactivity and dendritic spine density of pyramidal cells are reduced (Glantz and Lewis 1997; Glantz and Lewis 2000; Knable et al. 2004). These findings are consistent with our observation of synaptic loss and decreased glutamatergic

transmission without any change in cell viability in PCP-treated cortical neurons. Therefore, impairment in BDNF secretion and downstream signaling may be involved in the pathogenesis of schizophrenia-like behaviors. In fact, altered expression of BDNF and TrkB has been reported in postmortem brains of schizophrenia patients in several studies (e.g., Takahashi et al. 2000; Durany et al. 2001; Weickert et al. 2003; Weickert et al. 2005; Hashimoto et al. 2005; Altar et al. 2009). Recently, biological functions of proneurotrophins through the p75 receptor were revealed (Lee et al. 2001; Dechant and Barde 2002; Pagadala et al. 2006). Considering this, it may be valuable to study not only TrkB-stimulated signaling but also p75-stimulated signaling, during PCP exposure.

In conclusion, our results suggest that impaired secretion of BDNF and the resultant decrease in activation of Trk receptor signaling pathways are responsible, at least in part, for the PCP-dependent reduction in synaptic connectivity and function, which may be involved in PCP's ability to elicit schizophrenia-like behaviors. Our experimental system might be a "cell model" suitable for studies to clarify the molecular mechanisms of schizophrenia.

Supplementary Material

Supplementary material can be found at: <http://www.cercor.oxfordjournals.org/>

Funding

Core Research for Evolutional Science and Technology Program (CREST) Japan Science and Technology Agency (JST) (to N.A., T.N., E.K., and H.K.); Ichiro Kanehara Foundation (to T.N.); Takeda Science Foundation (to T.N.); Hokuto Foundation for Bioscience (to T.N.); Health and Labor Sciences Research Grants (Comprehensive Research on Disability, Health, and Welfare H21-kokoro-002 to H.K.); and Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (Grant-in-Aid for Scientific Research [B]: grant 20390318 to H.K. and for Young Scientists [A]: grant 21680034 to T.N.).

Notes

We thank Regeneron Pharmaceutical Co., Takeda Chemical Industries, Ltd., and Daiippon Sumitomo Pharma Co. Ltd. for donating the BDNF. *Conflict of Interest*: None declared.

References

- Adachi N, Kohara K, Tsumoto T. 2005. Difference in trafficking of brain-derived neurotrophic factor between axons and dendrites of cortical neurons, revealed by live-cell imaging. *BMC Neurosci*. 6:42-52.
- Akbarian S, Kim JJ, Potkin SG, Hagman JO, Tafazzoli A, Bunney WE Jr, Jones EG. 1995. Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry*. 52:258-266.
- Allen RM, Young SJ. 1978. Phencyclidine-induced psychosis. *Am J Psychiatry*. 135:1081-1084.
- Alonso M, Medina JH, Pozzo-Miller L. 2004. ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learn Mem*. 11:172-178.
- Altar CA. 1999. Neurotrophins and depression. *Trends Pharmacol Sci*. 20:59-61.
- Altar CA, Vawter MP, Ginsberg SD. 2009. Target identification for CNS diseases by transcriptional profiling. *Neuropsychopharmacology*. 34:18-54.

- Andreasen NC. 1995. Symptoms, signs, and diagnosis of schizophrenia. *Lancet*. 346:477-481.
- Angelucci F, Brenè S, Mathé AA. 2005. BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Mol Psychiatry*. 10:345-352.
- Arancio O, Chao MV. 2007. Neurotrophins, synaptic plasticity and dementia. *Curr Opin Neurobiol*. 17:325-330.
- Chen WG, Chang Q, Lin Y, Meissner A, West AE, Griffith EC, Jaenisch R, Greenberg ME. 2003. Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science*. 302:885-889.
- Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall C, Varon S. 1997. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci*. 17:2295-2313.
- Danysz W, Wroblewski JT, Costa E. 1988. Learning impairment in rats by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Neuropharmacology*. 27:653-656.
- Davis MI. 2008. Ethanol-BDNF interactions: still more questions than answers. *Pharmacol Ther*. 118:36-57.
- Dechant G, Barde YA. 2002. The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci*. 5:1131-1136.
- Durany N, Miche T, Zochling R, Boissl KW, Cruz-Sanchez FF, Riederer P, Thome J. 2001. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 in schizophrenic psychoses. *Schizophr Res*. 52:79-86.
- Durany N, Thome J. 2004. Neurotrophic factors and the pathophysiology of schizophrenic psychoses. *Eur Psychiatry*. 19:326-337.
- Ernfors P, Wetmore C, Olson L, Persson H. 1990. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron*. 5:511-526.
- Farhadi HF, Mowla SJ, Petrecca K, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA. 2000. Neurotrophin-3 sorts to the constitutive secretory pathway of hippocampal neurons and is diverted to the regulated secretory pathway by coexpression with brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*. 20:4059-4068.
- Frankle WG, Lerma J, Laruelle M. 2003. The synaptic hypothesis of schizophrenia. *Neuron*. 39:205-216.
- Furuta M, Kunugi H. 2008. Animal models for schizophrenia: a brief overview. In: Truck CW, editor. *Biomarkers for psychiatric disorders*. New York: Springer. p. 163-184.
- Gartner A, Staiger V. 2002. Neurotrophin secretion from hippocampal neurons evoked by long-term-potential-inducing electrical stimulation patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:6386-6391.
- Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pagès M, Dompierre JP, Rangone H, Cordelières FP, De Mey J, MacDonald ME, Lessmann V, Humbert S, et al. 2004. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell*. 118:127-138.
- Glantz LA, Lewis DA. 1997. Reduction of synaptophysin immunoreactivity in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. Regional and diagnostic specificity. *Arch Gen Psychiatry*. 54:943-952.
- Glantz LA, Lewis DA. 2000. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 57:65-73.
- Goodman LJ, Valverde J, Lim F, Geschwind MD, Federoff HJ, Geller AI, Hefti F. 1996. Regulated release and polarized localization of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci*. 7:223-228.
- Hajszan T, Leranth C, Roth RH. 2006. Subchronic phencyclidine treatment decreases the number of dendritic spine synapses in the rat prefrontal cortex. *Biol Psychiatry*. 60:639-644.
- Handelmann GE, Contreras PC, O'Donohue TL. 1987. Selective memory impairment by phencyclidine in rats. *Eur J Pharmacol*. 140:69-73.
- Harrison PJ, Weinberger DR. 2005. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry*. 10:40-68.
- Harte MK, Cahir M, Reynolds GP, Gartlon JE, Jones DN. 2007. Sub-chronic phencyclidine administration increases brain-derived neurotrophic factor in the RAT hippocampus. *Schizophr Res*. 94:371-372.
- Hartmann M, Heumann R, Lessmann V. 2001. Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J*. 20:5887-5897.
- Hashimoto R, Numakawa T, Ohnishi T, Kumamaru E, Yagasaki Y, Ishimoto T, Mori T, Nemoto K, Adachi N, Izumi A, et al. 2006. Impact of the DISC1 Ser704Cys polymorphism on risk for major depression, brain morphology and ERK signaling. *Hum Mol Genet*. 15:3024-3033.
- Hashimoto T, Bergen SE, Nguyen QL, Xu B, Monteggia LM, Pierri JN, Sun Z, Sampson AR, Lewis DA. 2005. Relationship of brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB to altered inhibitory prefrontal circuitry in schizophrenia. *J Neurosci*. 25:372-383.
- Hatanaka H, Tsukui H, Nihonmatsu I. 1988. Developmental change in the nerve growth factor action from induction of choline acetyltransferase to promotion of cell survival in cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal rats. *Brain Res*. 467:85-95.
- Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. 1990. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J*. 9:2459-2464.
- Homayoun H, Moghaddam B. 2007. NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J Neurosci*. 27:11496-11500.
- Hu B, Nikolakopoulou AM, Cohen-Cory S. 2005. BDNF stabilizes synapses and maintains the structural complexity of optic axons in vivo. *Development*. 132:4285-4298.
- Javitt DC, Zukin SR. 1991. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 148:1301-1308.
- Jentsch JD, Roth RH. 1999. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 20:201-225.
- Ji Y, Lu Y, Yang F, Shen W, Tang TT, Feng L, Duan S, Lu B. 2010. Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in neurons. *Nat Neurosci*. 13:302-309.
- Kalinichev M, Robbins MJ, Hartfield EM, Maycox PR, Moore SH, Savage KM, Austin NE, Jones DN. 2008. Comparison between intraperitoneal and subcutaneous phencyclidine administration in Sprague-Dawley rats: a locomotor activity and gene induction study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 32:414-422.
- Kargieman L, Santana N, Mengod G, Celada P, Artigas F. 2007. Antipsychotic drugs reverse the disruption in prefrontal cortex function produced by NMDA receptor blockade with phencyclidine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:14843-14848.
- Katoh-Semba R, Takeuchi IK, Semba R, Kato K. 1997. Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. *J Neurochem*. 69:34-42.
- Kesner RP, Hardy JD, Novak JM. 1983. Phencyclidine and behavior. II. active avoidance learning and radial arm maze performance. *Pharmacol Biochem Behav*. 18:351-356.
- Knable MB, Barci BM, Webster MJ, Meador-Woodruff J, Torrey EF, Stanley Neuropathology Consortium 2004. Molecular abnormalities of the hippocampus in severe psychiatric illness: postmortem findings from the Stanley Neuropathology Consortium. *Mol Psychiatry*. 9:609-620.
- Kohara K, Kitamura A, Morishima M, Tsumoto T. 2001. Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to post-synaptic neurons. *Science*. 291:2419-2423.
- Kojima M, Takei N, Numakawa T, Ishikawa Y, Suzuki S, Matsumoto T, Katoh-Semba R, Nawa H, Hatanaka H. 2001. Biological characterization and optical imaging of brain-derived neurotrophic factor-green fluorescent protein suggest an activity dependent local release of brain-derived neurotrophic factor in neurites of cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res*. 64:1-10.
- Kuczewski N, Porcher C, Lessmann V, Medina I, Gaiarsa JL. 2009. Activity-dependent dendritic release of BDNF and biological consequences. *Mol Neurobiol*. 39:37-49.
- Kumamaru E, Numakawa T, Adachi N, Kunugi H. 2011. Glucocorticoid suppresses BDNF-stimulated MAPK/ERK pathway via inhibiting interaction of Shp2 with TrkB. *FEBS Lett*. 585:3224-3228.

- Kunugi H, Ida I, Owashi T, Kimura M, Inoue Y, Nakagawa S, Yabana T, Urushibara T, Kanai R, Aihara M, et al. 2006. Assessment of the dexamethasone/CRH test as a state-dependent marker for hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis abnormalities in major depressive episode: a multicenter study. *Neuropsychopharmacology*. 31:212-220.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. 2001. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*. 294:1945-1948.
- Lei G, Xia Y, Johnson KM. 2008. The role of Akt-GSK-3 β signaling and synaptic strength in phencyclidine-induced neurodegeneration. *Neuropsychopharmacology*. 33:1343-1353.
- Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M. 2003. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol*. 69:341-374.
- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. 2005. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci*. 6:312-324.
- Lu B. 2003. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem*. 10:86-98.
- Luikart BW, Zhang W, Wayman GA, Kwon CH, Westbrook GL, Parada LF. 2008. Neurotrophin-dependent dendritic filopodial motility: a convergence on PI3K signaling. *J Neurosci*. 28:7006-7012.
- Mansbach RS, Geyer MA. 1989. Effects of phencyclidine and phencyclidine biologs on sensorimotor gating in the rat. *Neuropsychopharmacology*. 2:299-308.
- McCullumsmith RE, Clinton SM, Meador-Woodruff JH. 2004. Schizophrenia as a disorder of neuroplasticity. *Int Rev Neurobiol*. 59:19-45.
- Mirnic K, Middleton FA, Lewis DA, Levitt P. 2001. Analysis of complex brain disorders with gene expression microarrays: schizophrenia as a disease of the synapse. *Trends Neurosci*. 24:479-486.
- Murai R, Noda Y, Matsui K, Kamei H, Mouri A, Matsuba K, Nitta A, Furukawa H, Nabeshima T. 2007. Hypofunctional glutamatergic neurotransmission in the prefrontal cortex is involved in the emotional deficit induced by repeated treatment with phencyclidine in mice: implications for abnormalities of glutamate release and NMDA-CaMKII signaling. *Behav Brain Res*. 180:152-160.
- Nabeshima T, Mouri A, Murai R, Noda Y. 2006. Animal model of schizophrenia: dysfunction of NMDA receptor-signaling in mice following withdrawal from repeated administration of phencyclidine. *Ann N Y Acad Sci*. 1086:160-168.
- Nelson ED, Kavalali ET, Monteggia LM. 2008. Activity-dependent suppression of miniature neurotransmission through the regulation of DNA methylation. *J Neurosci*. 28:395-406.
- Noda Y, Yamada K, Furukawa H, Nabeshima T. 1995. Enhancement of immobility in a forced swimming test by subacute or repeated treatment with phencyclidine: a new model of schizophrenia. *Br J Pharmacol*. 116:2531-2537.
- Numakawa T, Chiba S, Richards M, Wakabayashi C, Adachi N, Kunugi H. 2011. Production of BDNF by stimulation with antidepressant-related substances. *J Biol Med*. 3:1-10.
- Numakawa T, Kumamaru E, Adachi N, Yagasaki Y, Izumi A, Kunugi H. 2009. Glucocorticoid receptor interaction with TrkB promotes BDNF-triggered PLC-gamma signaling for glutamate release via a glutamate transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:647-652.
- Numakawa T, Yagasaki Y, Ishimoto T, Okada T, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Taguchi T, Tatsumi M, Kamijima K, et al. 2004. Evidence of novel neuronal functions of dysbindin, a susceptibility gene for schizophrenia. *Hum Mol Genet*. 13:2699-2708.
- Numakawa T, Yamagishi S, Adachi N, Matsumoto T, Yokomaku D, Yamada M, Hatanaka H. 2002. Brain-derived neurotrophic factor-induced potentiation of Ca(2+) oscillations in developing cortical neurons. *J Biol Chem*. 277:6520-6529.
- Olney JW, Farber NB. 1995. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 52:998-1007.
- Pagadala PC, Dvorak LA, Neet KE. 2006. Construction of a mutated pro-nerve growth factor resistant to degradation and suitable for biophysical and cellular utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:17939-17943.
- Pakkenberg B. 1993. Total nerve cell number in neocortex in chronic schizophrenics and controls estimated using optical disectors. *Biol Psychiatry*. 34:768-772.
- Sams-Dodd F. 1996. Phencyclidine-induced stereotyped behaviour and social isolation in rats: a possible animal model of schizophrenia. *Behav Pharmacol*. 7:3-23.
- Sanchez AL, Matthews BJ, Meynard MM, Hu B, Javed S, Cohen Cory S. 2006. BDNF increases synapse density in dendrites of developing tectal neurons in vivo. *Development*. 133:2477-2486.
- Semba J, Wakuta M, Suhara T. 2006. Different effects of chronic phencyclidine on brain-derived neurotrophic factor in neonatal and adult rat brains. *Addict Biol*. 11:126-130.
- Stoop R, Poo MM. 1996. Synaptic modulation by neurotrophic factors: differential and synergistic effects of brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor. *J Neurosci*. 16:3256-3264.
- Sutton G, Chandler LJ. 2002. Activity-dependent NMDA receptor-mediated activation of protein kinase B/Akt in cortical neuronal cultures. *J Neurochem*. 82:1097-1105.
- Takahashi M, Kakita A, Futamura T, Watanabe Y, Mizuno M, Sakimura K, Castren E, Nabeshima T, Someya T, Nawa H. 2006. Sustained brain-derived neurotrophic factor up-regulation and sensorimotor gating abnormality induced by postnatal exposure to phencyclidine: comparison with adult treatment. *J Neurochem*. 99:770-780.
- Takahashi M, Shirakawa O, Toyooka K, Kitamura N, Hashimoto T, Maeda K, Koizumi S, Wakabayashi K, Takahashi H, Someya T, 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.
- Wass C, Archer T, Palsson E, Fejgin K, Klamer D, Engel JA, Svensson L. 2006. Effects of phencyclidine on spatial learning and memory: nitric oxide-dependent mechanisms. *Behav Brain Res*. 171:147-153.
- Weickert CS, Hyde TM, Lipska BK, Herman MM, Weinberger DR, Kleinman JE. 2003. Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 8:592-610.
- Weickert CS, Ligons DL, Romanczyk T, Ungaro G, Hyde TM, Herman MM, Weinberger DR, Kleinman JE. 2005. Reductions in neurotrophin receptor mRNAs in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 10:637-650.
- Wu YJ, Krüttgen A, Möller JC, Shine D, Chan JR, Shooter EM, Cosgaya JM. 2004. Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 are sorted to dense-core vesicles and released via the regulated pathway in primary rat cortical neurons. *J Neurosci Res*. 75:825-834.
- Xia Z, Dudek H, Miranti CK, Greenberg ME. 1996. Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *J Neurosci*. 16:5425-5436.
- Yan Q, Rosenfeld RD, Matheson CR, Hawkins N, Lopez OT, Bennett L, Welcher AA. 1997. Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*. 78:431-448.
- Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, et al. 2001. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science*. 293:493-498.

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見解について述べる。

統合失調症の遺伝的要因

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.

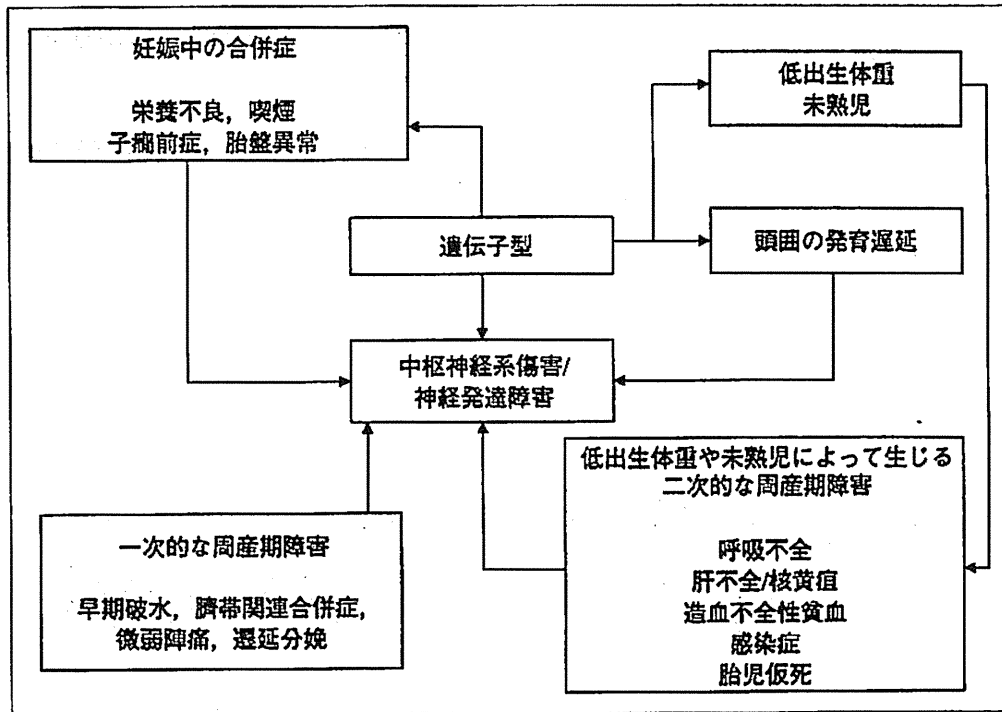


図1 産科合併症による中枢神経障害/神経発達障害メカニズム(文献⁹⁾より)

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現しており、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

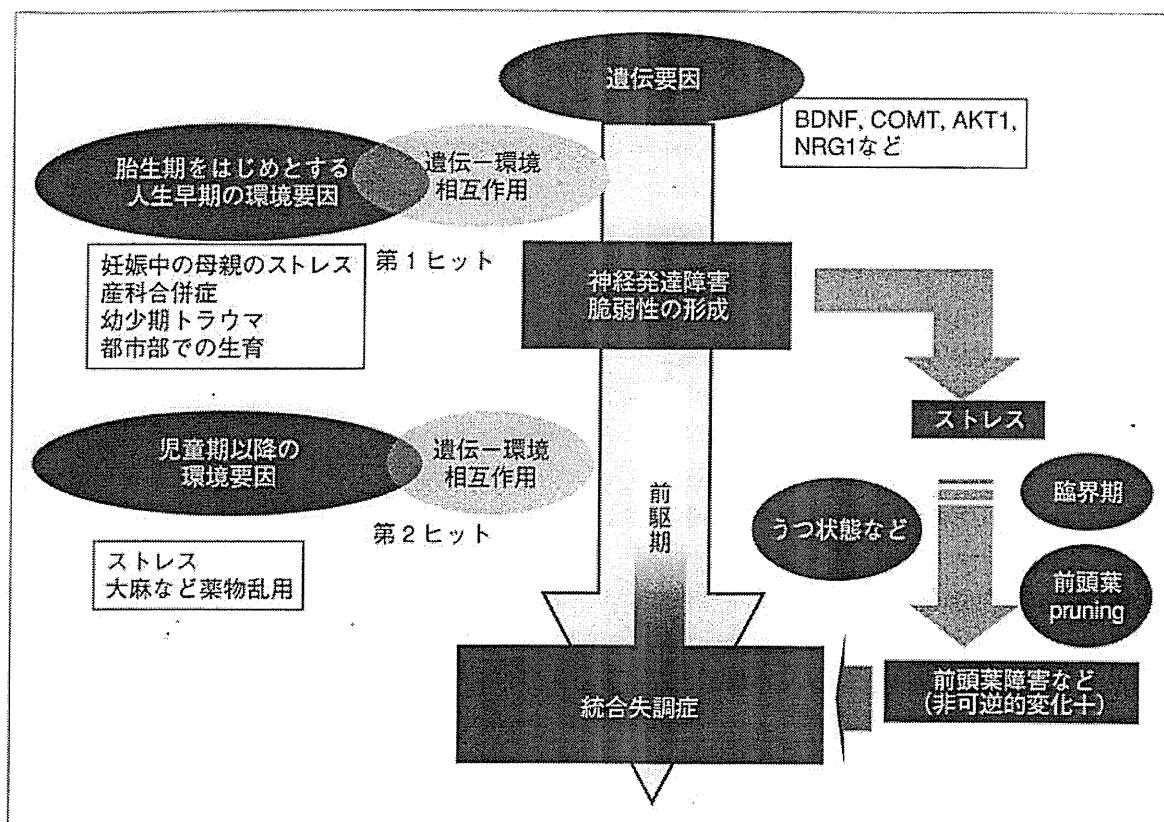


図2 統合失調症の発病スキーマと遺伝-環境相互作用

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.

* * *

近年注目されている 統合失調症の仮説について

功刀 浩*

はじめに

統合失調症の本態や成因はいまだに不明の部分が多いが、近年の生理学的解析、分子生物学的解析、脳画像解析などの研究方法には長足の進歩があり、統合失調症における種々の生理学的異常、生化学的異常、形態学的異常が明らかになってきている。しかし、いずれの異常も平均値でみると統合失調症患者群と健常対照群との間に有意差はあっても、両群の値の分布にかなりの重なりがある。そして、他の精神疾患においても同様の異常がある程度みられ、統合失調症だけにみられる特異的な異常は、今のところ無い（今後もおそらくみつからないのではないか）。特に、躁うつ病（双極性障害）と統合失調症との間に種々の点でオーバーラップがみられることは、近年のトピックスの1つになっている。統合失調症と躁うつ病とが一連のつながりをもつという考え方は「単一精神病仮説」として古くからあり、生物学的知見が蓄積されるにつれて、再評価されてきていると言ってよい。従って、統合失調症を1つの疾患として考えるべきかどうかということさえ、仮説の範囲を出ていないことをまず指摘しておくべきだろう。

それはさておき、近年の神経科学的研究によって「統合失調症」の種々の異常が明らかになってきていることから、それらに基づいて統合失調症を説明しようとする仮説は「群盲象を評す」が如くである。しかし、何が一次的で何が二次的な異常かということを示唆する知見も次第に増えてきていることから、これらの多数の仮説が1つのシナリオとして収斂してきている感もなくはない。本稿では、近年の統合失調症のいくつかの有力仮説について述べるとともに、それらを統合的に理解するシナリオについても考えてみたい。

ドーパミン仮説

ドーパミン仮説（図1参照）は統合失調症の最も有力な仮説の1つであることは今も昔も変わりはない。しかし、その仮説の中身は進化を遂げている。

元来、ドーパミン仮説の根拠となっているのは、以下の2点である。第1に、ドーパミンの放出を促す覚醒剤（アンフェタミン、メタンフェタミン）、コカインなどの薬物を摂取すると統合失調症の陽性症状（幻覚・妄想、興奮など）が悪化することは古くから知られている。覚醒剤やコカインは快感を引き起こすこともあり、依存症が問題になっているが、これは中脳辺縁系のドーパミン系の活性化が寄与している。動物にこれらの薬物を投与すると側坐核のドーパミン濃度が上昇する。また、これらの薬物を投与すると、ヒトであれラ

* 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]
Hiroshi Kunugi, M.D., Ph.D. : Department of Mental Disorder
Research, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1
Ogawahigashi, Kodaira-shi, Tokyo, 187-8502 Japan.

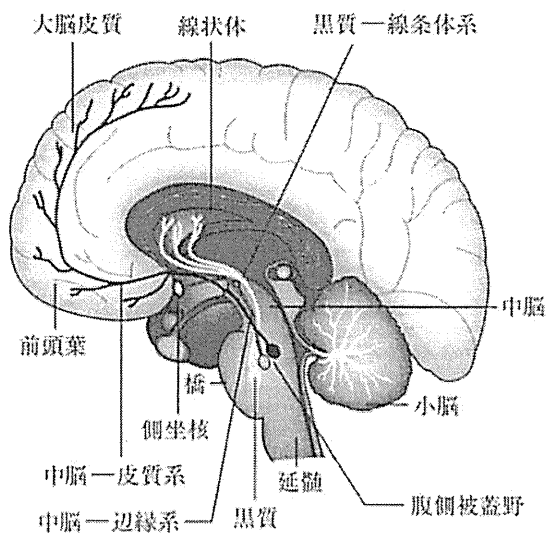


図1 脳におけるドーパミン系

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を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聞こえると、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り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、^{こうじょうそく}鉤状束（前頭葉と側頭葉の前部とを連絡する線維束）、^{かいばほうかい}帯状束（前頭葉や頭頂葉の脳領域と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⁹⁾。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、右下側頭回・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⁹⁾。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。ヒトは健康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康者より早いことを示唆する研究結果が増えている。健康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⁹⁾。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、効率は高まる。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ふ「刈り取り異常仮説」は古くからあるが⁹⁾、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^{トコ}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^{すいせう}=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γアミノ酪酸（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⁸⁾。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¹⁾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、にわかには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 —. 陪風館, 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.

Neuroimaging study in subjects at high risk of psychosis revealed by the Rorschach test and first-episode schizophrenia

Ota M, Obu S, Sato N, Asada T. Neuroimaging study in subjects at high risk of psychosis revealed by the Rorschach test and first-episode schizophrenia.

Objective: There is increasing evidence of neuroanatomical pathology in schizophrenia, but it is unclear whether changes exist prior to disease onset. This study aimed to examine whether changes exist prior to disease onset, especially in the temporal lobes.

Methods: T1-weighted and diffusion tensor magnetic resonance imaging were performed on 9 first-episode schizophrenia patients, 10 patients who were at high risk of schizophrenia and 10 healthy controls. Voxel-based analysis using the normalised images of cortical volume data was examined, and the fractional anisotropy value at three component fibres of the temporal lobes, inferior longitudinal fasciculus, superior longitudinal fasciculus (SLF) and cingulum hippocampal part was compared among the three groups.

Results: There were statistically significant volume differences at the bilateral temporal lobe between the healthy subjects and high-risk group. Between the schizophrenic group and healthy subjects, statistically significant volume differences were detected at the bilateral temporal lobes and anterior cingulate cortex. The fractional anisotropy values of the SLF in the schizophrenic and high-risk groups were significantly lower than in the healthy subjects.

Conclusion: Our findings indicate that some brain alterations may progress in patients at psychosis pre-onset, possibly because of disrupted developmental mechanisms, and these pathological changes may be predictive of functional outcome.

Miho Ota^{1,2}, Satoko Obu²,
Noriko Sato¹, Takashi Asada³

¹Department of Radiology, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo, Japan;

²Department of Psychiatry, Hospital Bando, Bando, Ibaraki, Japan; and ³Department of Neuropsychiatry, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan

Keywords: diffusion tensor imaging; magnetic resonance imaging; Rorschach test; schizophrenia; voxel-based morphometry

Miho Ota, Department of Radiology, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1, Ogawa-Higashi, Kodaira, Tokyo 187-8551, Japan.
Tel: +81 42 341 2711;
Fax: +81 42 346 2094;
E-mail: ota@ncnp.go.jp

Introduction

Structural brain abnormalities have consistently been shown to be present in people with schizophrenia (1–3), and how the brain abnormalities observed in schizophrenia develop is of great interest. Some behavioural features can be observed in patients with schizophrenia years before the onset of illness (4,5), suggesting that there are neural differences from a very early age that may make these individuals more vulnerable to later insults. Early detection and prevention strategies for schizophrenia have led to investigations of individuals at the high risk of psychosis, who present with a constellation of clinical symptoms

thought to be characteristic of the psychosis in the ‘prodromal period’, when the onset of schizophrenia would be expected to occur. Such studies seek to characterise the developmental processes that lead to disturbances of the brain structure and function associated with the onset of psychosis, and to find baseline traits that are predictive of later diagnostic conversion or functional decline. Previous studies mainly used the PACE criteria for the identification of those high risk of development psychosis (6). However, the previous neuroimaging studies adopting showed inconsistent results (7–11).

The Rorschach test has been used historically as a way to identify psychological processes associated

with thought and perceptual disturbance, and to aid in the differential diagnosis of schizophrenia. For the differential diagnosis, the Perceptual Thinking Index (PTI) comprised of eight Rorschach variables that are arranged based on a combination of different values on five empirical criteria was developed (12,13). It measures both perceptual oddities and cognitive slippage, and sufficient (Intraclass Correlation Coefficient >0.8) reliability and validity was also investigated (14). This supports the notion of applying it to the detection of psychosis risk in a clinical population. The preceding studies showed that individuals at clinical high risk for psychosis established using the Structured Interview for Prodromal Symptoms and the Scale of Prodromal Symptoms (SIPS/SOPS; 15) displayed substantial deficits in visual form perception prior to the onset of psychosis revealed by Rorschach test (16,17). Ilonen et al. showed that the PTI distinguished patients at clinical high risk for psychosis from those diagnosed as having non-psychotic disorders (16). The deficits in visual form perception revealed by the PTI fell under the group 1; the attenuated psychotic symptoms of the PACE criteria. In this study, we used the PTI to evaluate patients without delusion, hallucination and catatonic behaviour, but at high-risk mental state for schizophrenia.

Previous cross-sectional imaging studies in schizophrenia found reduced grey matter volume compared to controls, particularly in the temporal lobes, and some studies showed that there were significant differences in temporal lobes between the healthy subjects and pre-onset or at high genetic risk of schizophrenia groups (11,18,19). However, no study investigated the impairment of the component fibres at temporal regions coupled with volume data. In this study, therefore, we first evaluated the cortical volume difference among the pre-onset group, first-episode schizophrenic group and healthy controls. We then investigated the microstructural change among the three groups at three component fibres of the temporal lobes, the inferior longitudinal fasciculus (ILF), superior longitudinal fasciculus (SLF) and cingulum hippocampal part that runs along the ventral aspect of the hippocampus.

Method

Subjects

Five male and four female first-episode schizophrenia patients, defined according to the criteria described in the fourth edition of the *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-IV), were recruited at Hospital Bando (Ibaraki, Japan). Their mean age was 29.0 ± 4.3 years (ranging from 23 to 34 years). Only one patient was drug naive, while

the other eight were being treated with antipsychotic medication. The mean interval between the first patient contact and magnetic resonance imaging (MRI) scan was 33.9 ± 21.7 days (ranging from 0 to 70 days).

We also recruited patients who were regarded as having a clinical high risk for schizophrenia but who did not fulfill the schizophrenia criteria. Patients showing the presence of at least one of the following symptoms were tested with the Rorschach test: ideas of reference, magical thinking, perceptual disturbance, paranoid ideation, odd thinking and speech. The individual PTI was scored, and a score of ≥ 1 was regarded as showing perceptual disturbance (16). As a consequence, four male and six female patients (mean age 25.5 ± 11.1 years, ranging from 16 to 46 years, mean PTI score 3.6 ± 0.8) were regarded as at high risk for the developing psychosis.

Exclusion criteria included a history of head injury, neurological symptoms, speech or hearing difficulties, significant cerebrovascular diseases (cortical infarctions, multiple lacunar lesions or leukoariosis) and fulfilment of the DSM-IV criteria for abuse of illicit drugs or alcohol at any point during their lifetime.

Ten sex- and age-matched healthy subjects (four males and six females, mean age 26.1 ± 3.8 years, ranging from 16 to 30 years) were also included in the study.

All participants provided their written informed consent, and the local ethics committee approved the study protocol.

Data acquisition and processing

MRI was performed on a 1.5 Tesla Siemens Magnetom Harmony (Erlangen Germany). Diffusion tensor imaging (DTI) was carried out on the axial plane (echo time (TE)/repetition time (TR) = 100/7000 ms; field of view (FOV), 262×262 mm; matrix 128×128 ; 40 continuous transverse slices; slice thickness, 4 mm with no slice gap). To enhance the signal-to-noise ratio, acquisition was repeated four times. Diffusion was measured along 12 non-collinear directions with the use of a diffusion-weighted factor b in each direction of 1000 s/mm^2 , and one image was acquired without the use of a diffusion gradient. High-spatial-resolution, 3-dimensional (3D) T1-weighted images of the brain were obtained for morphometric study. 3D T1-weighted images were scanned on the sagittal plane [TE/TR, 3.93/1460 ms; flip angle, 15° ; effective section thickness, 1.5 mm; slab thickness, 168 mm; matrix, 256×256 ; FOV, 250×250 ; 1 number of excitations (NEX)], yielding 112 contiguous slices through the head. In addition to DTI and 3D T1-weighted images, we also acquired

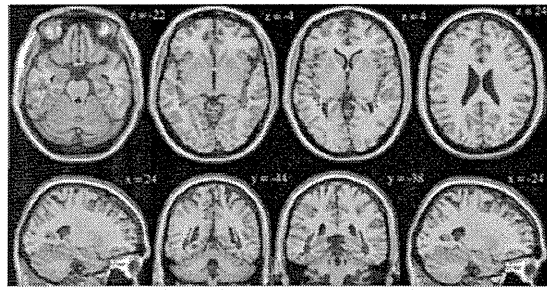
axial T2-weighted turbo spin echo images (TE/TR, 95/3800 ms; slice thickness, 6 mm; intersection gap, 1.2 mm; matrix, 384×288 ; FOV, 220×175 mm; acquisition, 1) and fluid attenuation inversion recovery (FLAIR) images on the axial plane (TE/TR, 104/9000 ms; flip angle, 170° ; slice thickness, 6 mm; intersection gap, 1.2 mm; matrix, 256×192 ; FOV, 220×175 mm; acquisition, 1) to rule out cerebral vascular disease.

The raw diffusion tensor and 3D T1-weighted volume data were transferred to the workstation and the DTI data sets were analysed using DtiStudio (H. Jiang and S. Mori; Johns Hopkins University). The diffusion tensor parameters were calculated on a pixel-by-pixel basis, and the FA map, $b = 0$ image and finally 3D fibre tracts were calculated (20).

To clarify volume differences among the two patient groups and healthy subjects, structural 3D T1-weighted MR images were analysed using an optimised voxel-based morphometry (VBM) technique. Data were analysed using Statistical Parametric Mapping 5 (SPM5) software (Wellcome Department of Imaging Neuroscience, London, UK) running on MATLAB 7.0 (Math Works, Natick, MA, USA). Images were processed using optimised VBM script. Details of this process are described elsewhere (21). Normalised segmented images were modulated by multiplication with Jacobian determinants of spatial normalisation function to encode the deformation field for each subject as tissue density changes in normal space. Images were smoothed using an 8-mm full-width half-maximum of an isotropic Gaussian kernel.

To exclude some of the subjectivity involved in defining regions of interest (ROIs), we made fibre ROIs normalised to the standard space, and then placed the ROIs on all of the individual FA images normalised to the standard space for the evaluation of FA. First, each individual 3D-T1 image was coregistered and resliced to its own $b = 0$ image. Next, the coregistered 3D-T1 image was normalised to the 'avg152T1' image regarded as the anatomically standard image in SPM5. Finally, the transformation matrix was applied to the FA map. Each map was then spatially smoothed by a 6-mm full-width half-maximum Gaussian kernel in order to decrease spatial noise and compensate for the inexact nature of normalisation following the 'rule of thumb' developed for functional MRI and positron emission tomography studies (22).

Fibre tractography was performed on the data of 10 healthy subjects with a threshold value of fibre-tracking termination of $FA = 0.2$ and a trajectory angle of 50° (23). The definition of the bilateral ILF, SLF and cingulum hippocampal part was described in detail in a previous publication (24), and we used



Green; Cingulum hippocampus part
Red; Inferior longitudinal fasciculus
Yellow; Superior longitudinal fasciculus

Fig. 1. Diffusion tensor tractography of three fibres. Red, yellow and green fibres represent the inferior longitudinal fasciculus, superior longitudinal fasciculus and cingulum hippocampus part, respectively.

these bilateral fibres within the temporal lobe as ROIs. Then, each six fibre tracts of 10 subjects were normalised to the standard space as mentioned above. The normalised six fibre tracts of 10 subjects were averaged respectively, and regarded as the normalised fibre ROIs. Figure 1 shows the fibre ROIs for SLF, ILF and the cingulum hippocampal part on the anatomically standard space.

Statistical analysis

Statistical analyses for the grey matter volume were performed using SPM2 software. First, we evaluate the difference among the three groups using the one-way analysis of variance (ANOVA). Only correlations that met these criteria were deemed statistically significant. In this case, seed levels of $p < 0.001$ (uncorrected) were selected. Then, the *post hoc* analysis, the differences in regional grey matter volume between first-episode schizophrenic patients and healthy subjects, high-risk groups and healthy subjects and first-episode schizophrenia and the high-risk groups were assessed using the mask image derived from the result of first-level ANOVA, respectively. Only correlations that met these criteria [seed levels of $p < 0.001$ (uncorrected), and cluster levels of $p < 0.05$ (uncorrected)] were deemed statistically significant.

Statistical analysis for the FA value was performed with SPSS for Windows 11.0 (SPSS Japan, Tokyo, Japan). Group differences of regional FA values among the three groups were compared with repeated measures of ANOVA. When significant group or group \times region interactions were obtained with ANOVA, follow-up *t*-tests were performed for regional FA values of individual ROIs. The least significant difference method was used to avoid type 1 errors in the statistical analysis of multiplicity.

Results

There were significant volume differences in cortical volume among the two patient groups and healthy subjects. First, there were statistically volume differences in the bilateral temporal cortices between the high-risk patients and healthy subjects (Figure 2, upper column; Table 1). Second, volume losses in the bilateral temporal cortices and anterior cingulate cortex (ACC) were detected between the first-episode schizophrenia group and healthy subjects (Figure 2, lower column; Table 1). The locations of the bilateral temporal cortices detected by these analyses were almost the same coordinate (Figure 2). No differences were detected between the high-risk patients and first-episode schizophrenia patients in our study (data not shown).

The ANOVA of FA values for the healthy subjects and patient groups showed a significant main effect of group and regions. Follow-up unpaired *t*-tests revealed that the mean FA value of the healthy subjects was significantly higher in the bilateral SLF regions (Table 2) than in the two patient groups.

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first investigation of brain alterations in a clinical high-risk sample showing perceptual disturbance revealed by Rorschach test. Perceptual and thought disorders are commonly associated with psychiatric disorders

Table 1. Regions of statistically significant cerebral grey matter volume change among the three groups: one-way ANOVA among the schizophrenia, high-risk patient and healthy subject

Cluster size	T score	x	y	z	Brain region
<i>Post hoc analysis</i>					
Healthy subject > high-risk patient					
1024	5.20	-57	-53	-6	Left middle temporal region
730	5.45	66	-33	-9	Right middle temporal region
Healthy subject > first-episode schizophrenia					
1372	5.77	-60	-53	-7	Left middle temporal region
465	5.48	-57	-38	6	Left middle temporal region
807	5.55	66	-35	-8	Right middle temporal region
600	4.69	8	48	-7	Right anterior cingulate
	4.68	-5	48	3	Left anterior cingulate

and are particularly considered a primary feature of schizophrenia. Some preceding studies showed that the high-risk populations present disorders of thought, perceptual abnormalities and disorganised speech (16,17,25,26). In this study, we pointed on the perceptual disturbance as the major symptom of the high-risk patients. Furthermore, we found that there were precedent changes in the brains of high-risk patients revealed by 3D-volume data and DTI. This

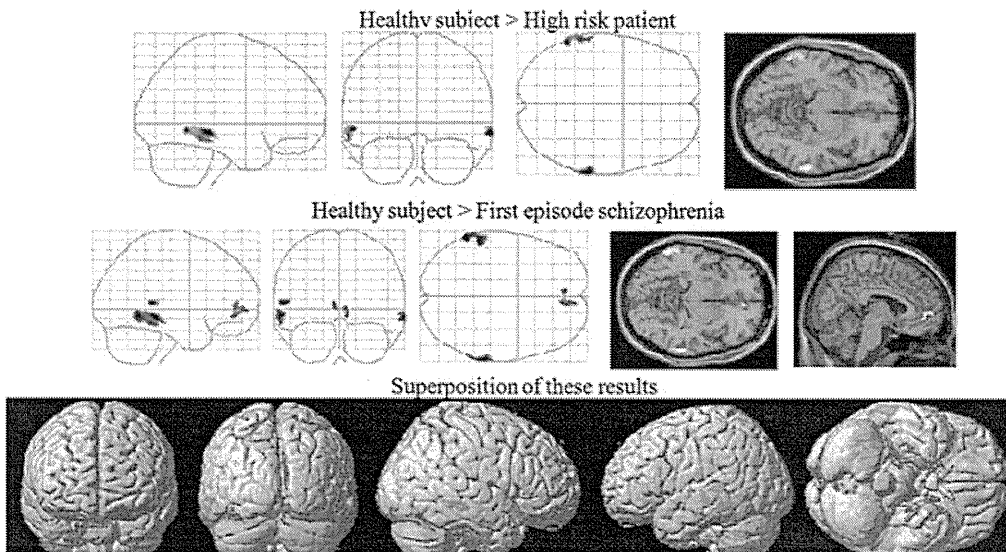


Fig. 2. Cortical grey matter volume loss was detected among the high-risk patients, first-episode schizophrenia and healthy subjects. Upper column: significant volume differences were detected in the bilateral temporal areas between the healthy subjects and high-risk patients (one-way ANOVA). Middle column: significant volume losses were detected not only in the bilateral temporal area but in the anterior cingulate cortex between the first-episode schizophrenia patients and healthy subjects. Lower column: superposition of upper two results. Yellow showed the difference between the healthy subjects and high-risk patients, green pointed the difference between the first-episode schizophrenia patients and healthy subjects and dark green showed the layered region.