

笑うラット

—陽性刺激によりオン/オフする遺伝子—

Laughing Rat: Positive Emotion Regulates the Gene Expression in Brain of Tickled Rats

堀 美代* 大西 淳之* 林 隆志* 中川 嘉** 坂本 成子* 浦山 修**
村上 和雄*

Miyo Hori Junji Ohnishi Takashi Hayashi Yoshimi Nakagawa Shigeko Sakamoto Osamu Urayama
and Kazuo Murakami

要旨

本稿では、一時的又は継続的な陽性刺激が脳に及ぼす効果について、ラットを用いた遺伝子発現調節の解析に焦点を当てて報告する。ここではラットの快情動を引き起こす手法として Tickling(くすぐり)刺激法を活用した。その結果、情動行動に密接に関与する線条体と生命維持の中枢である視床下部において、加える陽性刺激の期間によって遺伝子発現の調節が異なることが明らかとなった。線条体では一時的な陽性刺激で制御される遺伝子群の種類が多いことから、この部位を經由して一過性の陽性刺激が感知された結果であると思われた。線条体で発現が誘導された遺伝子群には、細胞内シグナル伝達系、血圧調節系、生体リズムおよび食行動に関連した各種因子が含まれていた。対して視床下部では、継続的な陽性刺激により発現制御される遺伝子群の種類が多く、特に神経伝達経路や食行動に関係する各種遺伝子群の発現が誘導された。このことは持続性の陽性刺激が脳内ネットワークを介して生命維持の中枢に作用した結果であることが推察された。興味深いことに、視床下部において陽性刺激の与える期間にかかわらず快刺激の伝達に関与するドーパミントランスポータをコードする Slc6a3 の発現が誘導された。

以上の結果より、陽性刺激を与えられたラットでは、刺激の受容に応じて脳内ネットワークを変化させながら陽性刺激に対する生体応答の変容がもたらされる可能性が示唆された。

キーワード：陽性刺激(positive stimulation) 快情動(positive emotion) Tickling 刺激(tickled stimulation)
遺伝子発現(gene expression) 食行動(feeding behavior)

*) 財団法人 国際科学振興財団・バイオ研究所
Foundation for Advancement of International Science, Bio-Laboratory,

***) 筑波大学大学院人間総合科学研究科
Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba,
連絡先：堀 美代

〒305-0062 茨城県つくば市赤塚牛ヶ淵 586-9
586-9 Akatsuka Tsukuba, Ibaraki 305-0062, Japan.
Tel.: +81 29 836 6830; fax: +81 29 836 6831.
E-mail address: hori@fais.or.jp

1 はじめに

生体は、身体の内部又は外部環境より与えられる情報・刺激に対し、神経・内分泌-免疫系から形成されるネットワークを介して応答しながらその恒常性を維持している。生体の恒常性に影響を及ぼす因子としては、生物学的な要因、物理的な要因、食べ物や栄養素を含む化学的な要因のほかに精神的な要因も挙げられる^{1) 2)}。我々はこのころと身体の間にある相互作用機序の解明を目指して、特に「笑い」という情動表出手段が身体に及ぼす作用・影響について医学的および分子生物学的な検証を試みてきている^{3) 4) 5) 6) 7)}。

「笑い」の身体機能に及ぼす効果に関する報告として、アメリカ人ジャーナリスト カズンズの論文⁸⁾が有名である。治療困難とされていた難病(硬直性脊椎炎)を患っていた彼は、自ら積極的に笑うことによりその症状が緩和され難病を克服することができた。その後、職場への復帰を果たしたことから、そのことを論文として公表した。また、「笑い」が免疫系に及ぼす作用に関する初期の報告として、バークらの論文が挙げられる⁹⁾。彼らは「笑い」が腫瘍免疫に重要なNK細胞(ナチュラル・キラー)の活性を上昇させること、さらにはACTH(副腎皮質刺激ホルモン)、コルチゾールなどのストレス関連ホルモン、 β エンドルフィンの適正な濃度調節にも作用することを明らかにした。

我々の研究グループは、糖尿病患者が自らの陰性ストレスにより高血糖状態を増長させ、それが要因で糖尿病を悪化させることに注目し、快情動の表出行動である「笑い」が糖尿病患者の血糖値を改善させるのではないかと仮説をたてた。そこで「笑い」を引き起こす陽性刺激として2型糖尿病患者に漫才を鑑賞してもらったところ、同被験者が漫才を鑑賞していない時に比べて食後血糖値上昇が有意に抑制された。また、患者群と健常群との間ではどちらも漫才鑑賞時における食後の血中インシュリン濃度の増加が緩慢であったことから、「笑い」による食後血糖値上昇の抑制はインスリン非依存的であることが示唆された³⁾。さらに「笑い」が2型糖尿病患者の末梢白血球において特異的遺伝子の発現を変化させること⁴⁾、糖尿病の合併症進展の抑制に関与する遺伝子⁵⁾や耐糖能に関連する遺伝子⁶⁾の発現を上昇させることを明らかにした。以上の結果をもとに、我々は2型糖尿病患者が陽性刺激を受けた場合に、快情動から引き起こされる「笑い」とともに、その効果がインシュリンの作用に依存せずに自律神経系

や内分泌系の変化を伴いながら食後血糖値を調節したのではないかと予想し、その詳細な機序解明について現在検討している最中である。

一般に身体が受ける外部刺激(視覚、聴覚、触覚刺激など)や内部刺激(臓器から伝わる刺激)が大脳辺縁系の扁桃体に伝わると、本能的に「快」か「不快」かの情動評価がされる。ここでの情動評価がこころの動きや行動の動機付けの基本となる。「快」と評価された場合、視床下部一下位脳幹系(報酬系)を刺激して、喜びや楽しさとしての「情動反応」が表出される。そして「接近行動」や「笑い」も含む情動行動につながると考えられている。こうした情動の脳内メカニズムの解明には様々な実験動物が用いられており、脳の特定の部位の破壊や電気刺激の負荷、さらには特定の遺伝子の機能を欠損させることにより引き起こされる情動の変化が、特定ニューロンの活性化、情報伝達経路の制御や関連遺伝子の発現調節、そして行動学的な解析などに関連付けて評価されてきた。その結果、中脳腹側被蓋野を起始部とするドーパミン神経系が投射する腹側線条体(側坐核)の関与が明らかとなった^{10) 11)}。

ラットは様々な社会的行動の違いや外部刺激に応じて特異的な高周波領域の啼鳴反応を示し情動を表出する。たとえば仔ラットが母ラットに対して呼びかける場合に40kHzの音声を、恐怖などの不快な刺激に対して陰性感情を表す場合には20kHzの音声を、また陽性刺激に対する快情動としては50kHzの音声を発する。Pankseppらは50kHzの音声を発するような陽性刺激として、仔ラット同士のじゃれ合う遊びを模倣した触覚刺激であるTickling刺激法を確立し¹²⁾、ラットが啼鳴するこの50kHzの音声はヒトにおける「笑い」の原型であると提唱した¹³⁾。

我々の研究では、このTickling刺激法を改変して、離乳直後の仔ラットに対して4週間にわたる継続的なTickling刺激を陽性刺激として与えたところ、刺激の受容が生命活動維持の中枢である視床下部に作用して摂食調節物質関連の遺伝子の発現変化をもたらすことが明らかとなった¹⁴⁾。本実験では、更に一時的(2日間)なTickling刺激と継続的(4週間)なTickling刺激のそれぞれが脳に及ぼす効果の違いについて、DNAチップ解析結果をもとに比較解析した。その結果、一時的な陽性刺激と継続的な陽性刺激では、視床下部および線条体における遺伝子発現の調節が異なっていることが判明した。

2 実験方法

1) 実験動物及び飼育法

本研究におけるすべての動物実験は、筑波大学動物実験委員会の承認を得て実施した。実験動物として離乳直後の 21 日齢の Wistar SPF ラット(日本 SLC) オスを使用し、ポリカーボネート製のケージ(W270×L440×H187mm)で個別飼育した。個々のケージはお互いに見えないようについでで遮蔽した。床敷きは wood chip を使用し、水と飼料は不断給餌とした。飼育環境は、室温(21 ± 1° C)、湿度(50-60%)、12 時間の明暗周期(朝 7:00 点灯)とし、本実験期間中は常にこの条件を維持した。

2) 触覚刺激負荷法

一時的な触覚刺激負荷群は 6 週齢に達するまで、また継続的な触覚刺激負荷群は 4 週齢に達するまで、仔ラットを上記の方法で個別飼育した。体重を計測した後それぞれの群において 4 匹ずつのラットに対し Tickling 刺激処理、又は対照としての Light-touch 刺激処理を施した。どちらの刺激処理も 1 日 1 回行い、一時的な刺激負荷群では 2 日間にわたって、長期刺激負荷群では 4 週間(5 回/週×4 週=計 20 回の刺激負荷)にわたって刺激処理を実施した。

(1) Tickling 刺激処理

Tickling 刺激は、Panksepp らの方法¹²⁾を改変して実施した。Tickling 刺激はラットを背後からつかんだ後首筋を指でくすぐり、素早くひっくり返して仰向けにした状態で床に押し付けながらお腹全体を激しくくすぐり、その後開放する。ラットを刺激負荷用テストボックス(W270×L440×H187mm)に移し、15 秒間放置した後に 15 秒間の Tickling 刺激を行う操作を 4 回繰り返した。1 分間の休憩をはさみ、さらにもう一度一連の刺激負荷行程を繰り返した(合計 5 分間)。刺激負荷用テストボックスは、Tickling 刺激(又は Light-touch 刺激)以外の外部から刺激を遮蔽するため、さらに音声以外の雑音(摩擦音等)が生じないように、床と 4 つの側面を黒いフェルト生地ですらった。

(2) Light-touch 刺激処理

Light-touch 刺激はラットにとって Tickling 刺激に対する弁別刺激¹²⁾として 3 秒間に 1 回ラット背部に軽く触れ、Tickling 刺激の対照実験とした。

3) 行動解析

(1) 高周波音声の収録および解析

ラットの陽性感情の指標である 50kHz の音声を解析するため、刺激処理時と休憩時に、個々のラット

の音声を高周波マイクロフォン(小野測器社製 MI-3140)で収録し、超広帯域音響解析システム(小野測器社製 DS-2100)で周波数成分の解析を行った。それぞれの音声収録時の時間軸波形をフーリエ変換の後、15 秒間ごとの周波数成分のピーク値(dB)をグラフ化した。

(2) 接近待機時間

ヒトでも動物でも、外敵や有害なものに対しては恐怖が生じそれらを避ける行動にでる(回避行動)。一方、自己の欲求を満たしてくれるものに対しては接近行動を示す。このように与えられた刺激がラットにとって快か不快かの評価は、刺激に対する接近待機時間を測定することで行うことができる。今回の実験では、Tickling(又は Light-touch) 刺激終了後に、ラットをテストボックスの角に置き、対角にある験者の手に接近接触するまでの接近待機時間を測定した。30 秒以上たっても接触しない場合は、30 秒と記録した。刺激が快である場合は、接近待機時間がより短くなる¹²⁾。

4) 遺伝子発現解析

(1) 組織の摘出・RNA 調製

遺伝子発現解析のための脳組織の摘出は、一時的な刺激を負荷したラットは 2 日目の刺激 2 時間半後に行い、継続的な刺激を負荷したラットは刺激最終日の翌日に行った。ラットをエーテル麻酔下で生理食塩水にて還流し、断頭後に開頭して脳を摘出した。摘出した脳を Glowinski の脳 7 分割法¹⁵⁾に従い素早く分割し、視床下部と線条体を採取した。取り出した組織を RNA later RNA Stabilization Reagent (キアゲン社製)に浸漬し、-80°C で保存した。保存組織からのトータル RNA の調製には、RNeasy Mini Kit (キアゲン社製)を使用した。

(2) DNA チップ解析

それぞれの刺激負荷で用いた 4 匹のラットから個々に調製したトータル RNA を等重量ずつ混合したものを cDNA 合成用の鋳型として用いた。トータル RNA 混合物 500ng から、T7RNA プロモーター配列を付加したオリゴ(dT)₂₄プライマーを用いて cDNA 合成を行った。これを鋳型として T7RNA ポリメラーゼを用いてアミノ基が導入された cRNA を合成し、Cyanine 3[Cy3 と略](Light-touch 群)あるいは Cyanine 5[Cy5 と略](Tickling 群)のサクシニミド誘導体とカップリング反応させることにより蛍光標識を行った¹⁶⁾¹⁷⁾。Cy3 で標識した Light-touch 群由来の cRNA と Cy5 で標識した Tickling 群由来の cRNA を等重量ずつ混合し、この混合液を 41, 012 の遺伝子

(トランスクリプトを含む)がスポットされたラット用マイクロアレイ (G4131A, アジレント社製) 上で 65°C、17 時間ハイブリダイゼーション反応を行い各色素に由来する蛍光強度を測定した。データ補正と正規化は既報の手法で行い Cy5/Cy3 比を求めた⁴⁾。Light-touch 群と比較して Tickling 群で 1.5 倍超又は 0.67 未満の発現差を認めた遺伝子を抽出した。データは GEO (Gene Expression Omnibus) に登録した。

5) Gene Ontology 解析

Gene Ontology (GO) 解析¹⁸⁾とは、DNA チップ解析により抽出された遺伝子群に対して生物学的な特性を対応させる手法である。GO で定義された用語は GO Term と呼ばれ、「生物学的プロセス」、「分子機能」、「細胞の構成要素」の3つのカテゴリーに分類・階層化される。Gene ID と GO の対応付けは Biological Network Gene Ontology tool (<http://www.psb.ugent.be/cbd/papers/BiNGO/>) を用いて行い、GO の階層図は Cytoscape¹⁹⁾ (<http://www.cytoscape.org/>) を用いて描画した。各 GO Term について、DNA チップ上の全遺伝子中での出現頻度に比べて抽出遺伝子群で出現頻度が高くなっているか Hypergeometric test を用いて有意水準 FDR (False Discovery rate) < 0.1 で検定した。当検定で有意と判定された GO Term を抽出遺伝子に特徴的な GO とした。

3 結果

1) 行動解析

本実験で Tickling 刺激を負荷したラットはすべて、初回の刺激時から刺激負荷期間中にわたって、快情動の指標である 50kHz 近傍の音声を発した(図 1A, B)。対して Light-touch 対照群では全期間を通して当音声の発声は確認されず(図 1C, D)、このことは先行研究と同じであった¹²⁾。Tickling 群における接近待機時間は対照群に比べて有意に短かったことから ($p < 0.01$)、Tickling 刺激がラットにとって報酬であることも再現された¹²⁾ (図 2)。以上2点から、今回我々が改変した Tickling 刺激処理においてもラットの快情動を引き起こすことができていると評価した。

2) 遺伝子発現解析

DNA チップ上の 41,012 遺伝子のうち Light-touch 対照群と比較して Tickling 群で相対的に発現が増加(1.5 倍超)又は減少(0.67 倍未満)した遺伝子群を抽出し、以下の GO 解析に供した。その結果、一時的

な Tickling 刺激において線条体で検出された遺伝子は 155 あり、視床下部では 32 あった。対して、継続的な Tickling 刺激において線条体で発現変動した遺伝子は 59 あり、視床下部で発現変動した遺伝子は 321 検出された(表 1)。

その中で、一時的および継続的な Tickling 刺激に対して共通して発現変動が見られた遺伝子は、視床下部では 5 (発現増加: ヒドロキシアシルグルタチオン加水分解酵素、LanC-like1 (ランチビオティックス合成酵素構成因子様 1)、ドーパミントランスポータ、発現減少: トランスサイレチン、テラトサイト特異的カルボキシエステル分解酵素)、線条体では 2 (発現増加: LanC-like1、発現減少: テラトサイト特異的カルボキシエステル分解酵素) が検出された。

3) Gene Ontology 解析

(1) 一時的な Tickling 刺激により発現変動した遺伝子群

線条体において発現増加した遺伝子群が割り当てられた特徴的な GO Term は 132 種類 ($FDR < 0.1$) あった。「生物学的プロセス」のカテゴリーでは 90 種類あり、有意に ($FDR < 0.01$) 割り当てられた GO Term は 16 種類あった。中でも $FDR < 0.0001$ で割り当てられた GO Term は、「細胞間シグナル伝達」(GO ID: 7267)、「血圧調節関連」(GO ID: 50880)、「シナプス伝達」(GO ID: 7268)、「神経インパルス伝達」(GO ID: 19226) の4種類であった。これらのカテゴリーの中で2倍以上の発現上昇が見られた遺伝子として Adra1d ($\alpha 1d$ アドレナリン受容体)、Avp (アルギニンバソプレシン)、Slc17a7 (ナトリウム依存性リン酸トランスポータ)、Vip (血管作動性消化管ペプチド)、Wnt10a、Sstr1 (ソマトスタチン受容体 1)、Cort (コルチスタチン)、Nppa (ナトリウム利尿ペプチド前駆体 A)、Nptx1 (神経ペントラキシン) の各遺伝子が抽出された(表 2)。また、その他線条体で発現上昇した遺伝子群が有意に ($FDR < 0.01$) 割り当てられたものは、シグナル伝達、神経伝達関連、サーカディアンリズム、食行動関連の GO Term であった(図 3)。一方、線条体において発現減少した遺伝子群が割り当てられた GO Term は 80 種類 ($FDR < 0.1$) あったが、有意に ($FDR < 0.01$) 割り当てられた GO Term はなかった。

一時的な Tickling 刺激を負荷した場合に、視床下部で発現変動した遺伝子群が割り当てられた特徴的な GO Term は 114 種類 ($FDR < 0.1$) あり、発現上昇した遺伝子群が割り当てられた GO Term は 65 種類あった。しかし、「生物学的プロセス」のカテゴリーでは有意に ($FDR < 0.01$) 割り当てられた GO Term はなかった。

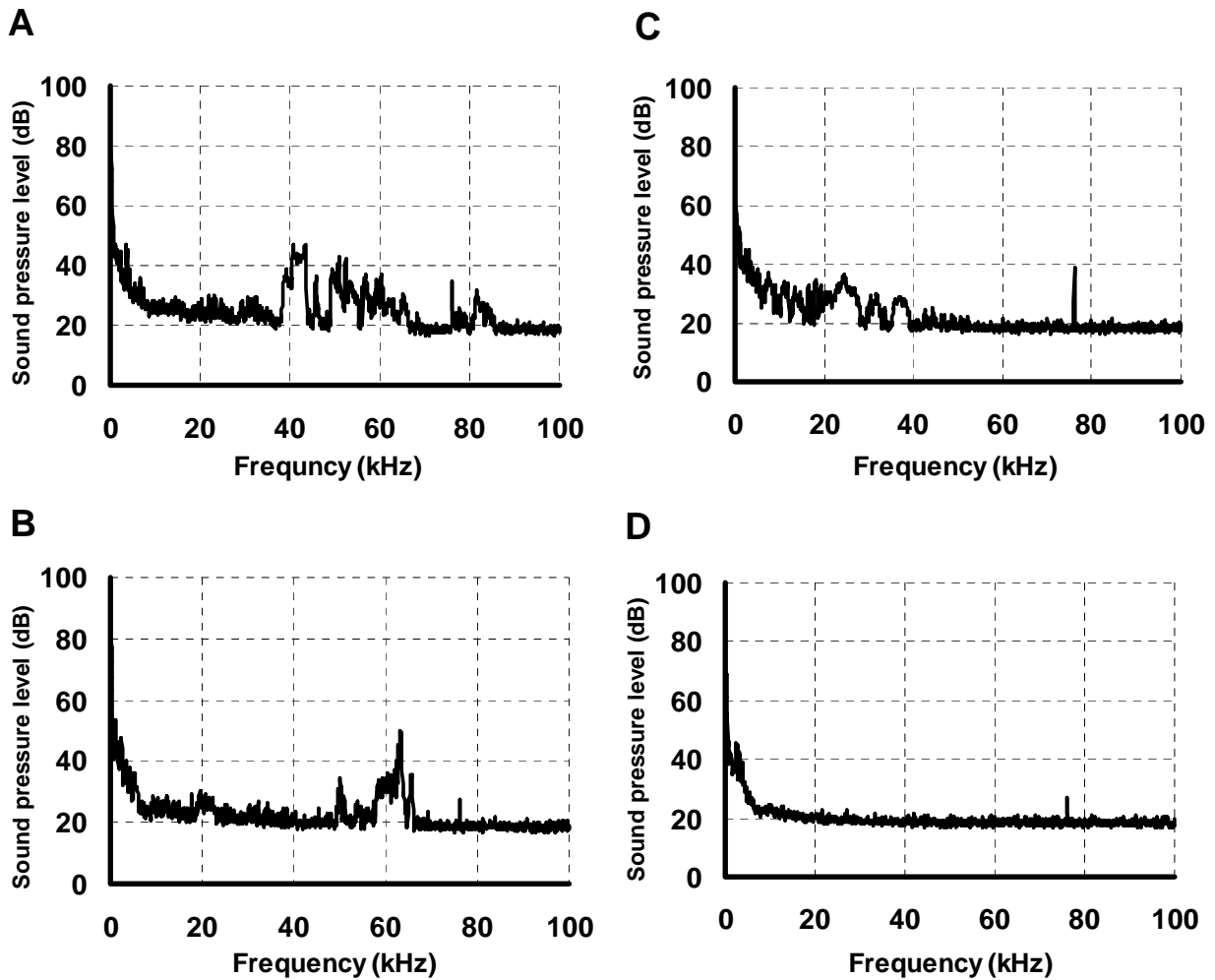


図1 ラットの音声解析

刺激によりラットが発した音声の各周波数成分のピーク値(15秒間)を示した。Tickling 群の実験開始日の音声をグラフ A に、4 週間目の音声をグラフ B に示した。Light-touch 群の実験初日の音声をグラフ C に、4 週間目の音声をグラフ D に示した。

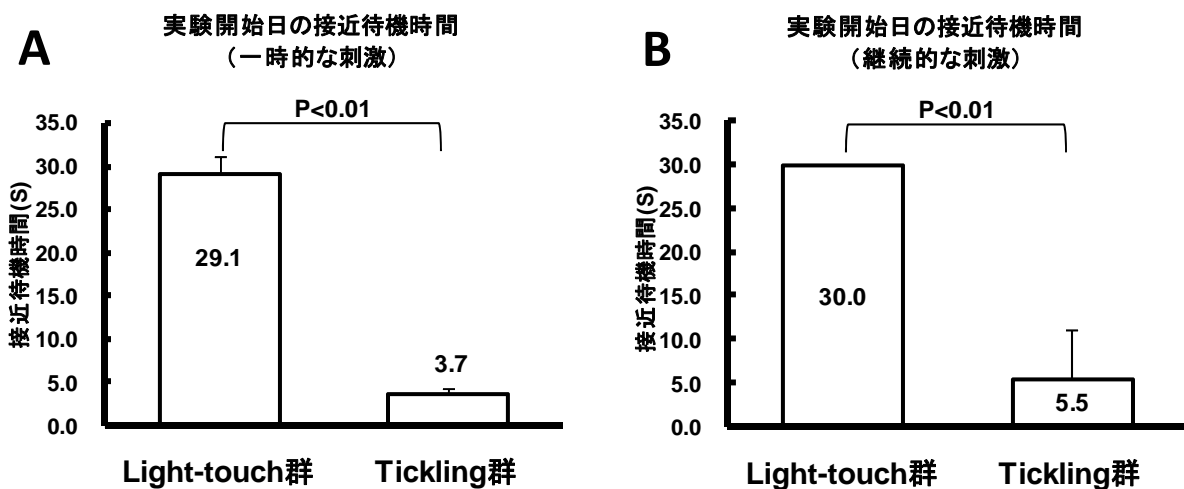


図2 接近待機時間

実験開始日の刺激終了時に測定した接近待機時間を示す。一時的な刺激時の接近待機時間をグラフ A に、継続的な刺激実験の接近待機時間をグラフ B に示した。

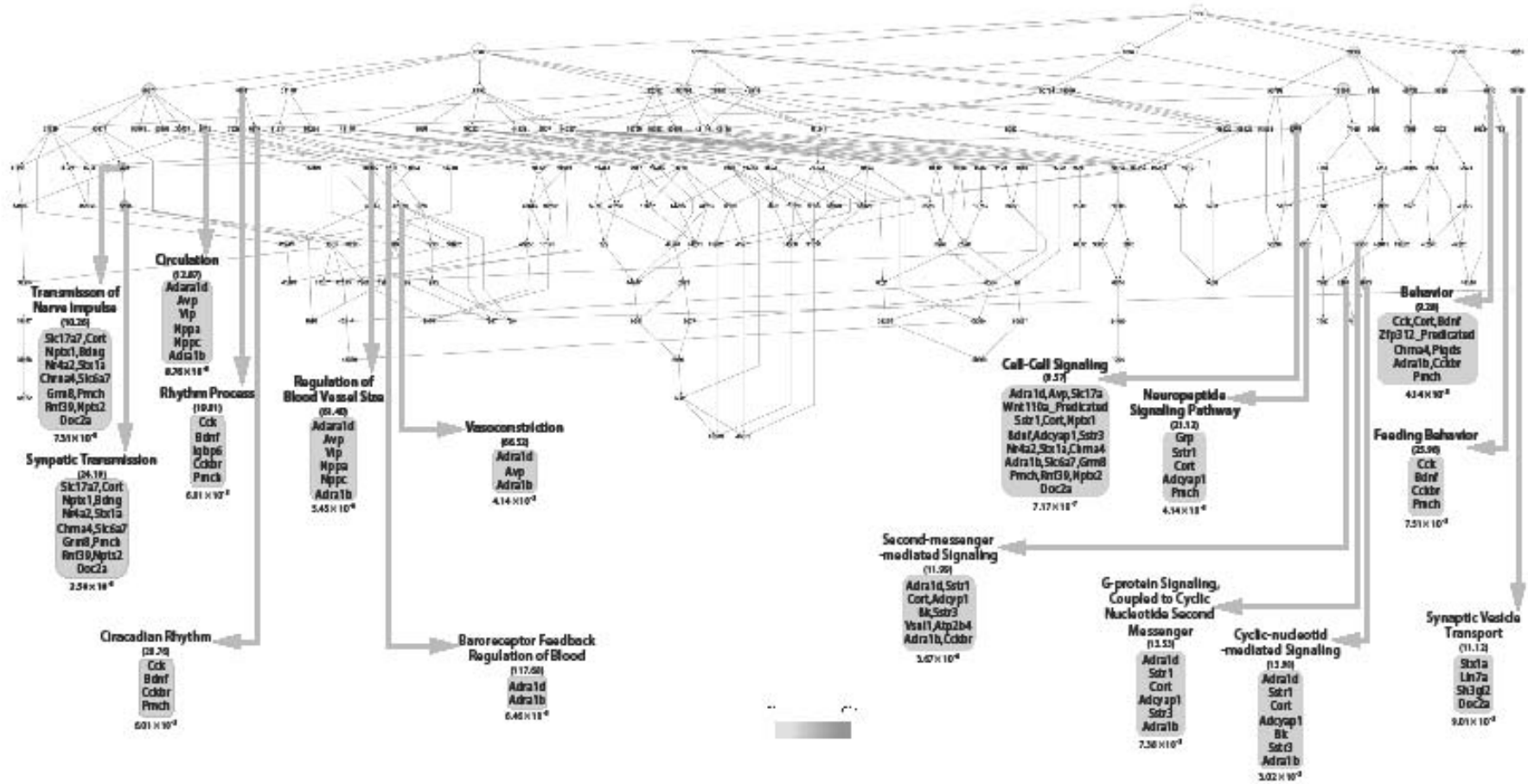


図3 一時的な Tickling 刺激で、Light-touch 群と比較して発現増加(1.5 倍超)した線条体の遺伝子群が割り当てられた GO カテゴリー「生物学的プロセス」(FDR<0.1)の階層図。階層図中、GO ID を丸で示す。色の濃さは有意差の程度を表し(図下の color bar 参照)、濃いほど有意性が高いことを示し、大きさは GO Term に含まれる遺伝子の数を表す。有意差(FDR<0.01)を示した GO Term に割り当てられた遺伝子の Gene Symbol を階層図外に引き出し四角内に示している。この四角の上部()内に出現頻度倍率を、下部に FDR を表す。

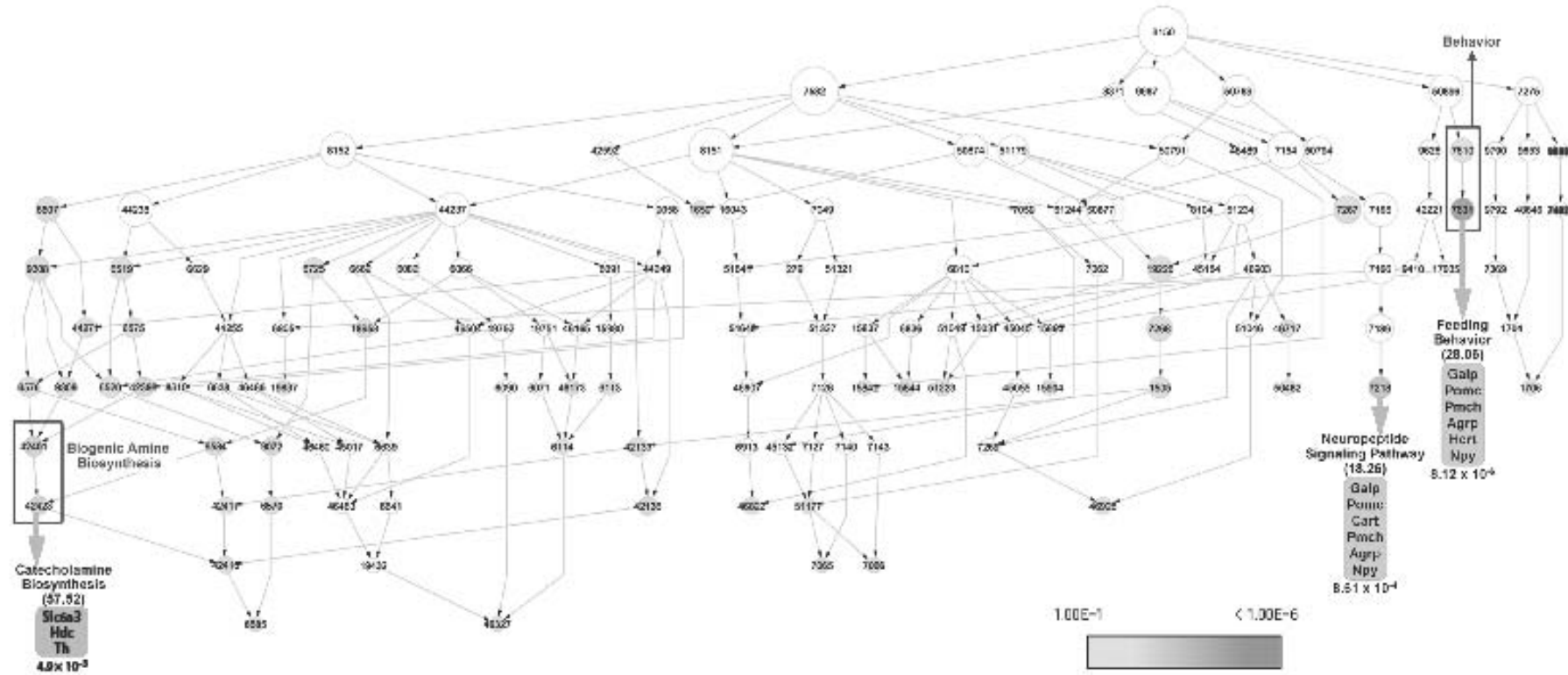


図 4 継続的な Tickling 刺激で、Light-touch 群と比較して発現増加(1.5 倍超)した視床下部の遺伝子群が割り当てられた GO カテゴリー「生物学的プロセス」(FDR<0.1)の階層図。階層図中、GO ID を丸で示す。色の濃さは有意差の程度を表し(図下の color bar 参照)、濃いほど有意性が高いことを示し、大きさは GO Term に含まれる遺伝子の数を表す。有意差 (FDR<0.01)を示した GO Term に割り当てられた遺伝子の Gene Symbol を階層図外に引き出し四角内に示している。この四角の上部()内に出現頻度倍率を、下部に FDR を表す。

表 1 Tickling 刺激で抽出された遺伝子数および GO Term の数 (1.5 倍超、0.67 倍未満)

組 織	組み合わせ	Light-touch 群に対する Tickling 群の発現量	遺伝子数 (トランスクリプトを含む)	GO Term 数(FDR)		
				<0.1	<0.05	<0.01
一時的	線条体	UP	140	132	61	22
		DOWN	15	80	46	0
	視床下部	UP	21	65	6	0
		DOWN	11	49	28	11
継続的	線条体	UP	15			
		DOWN	44			
	視床下部	UP	136	78	31	7
		DOWN	185	19	8	2

表 2 一時的な Tickling 刺激において GO カテゴリー「生物学的プロセス」(FDR<0.0001) で抽出された線条体の遺伝子

GenBank ID	発現比	Gene Title	GO カテゴリー
29413	2.9797	adrenergic receptor, alpha 1d	細胞間シグナル伝達、血圧調節関連
24221	2.77	arginine vasopressin	細胞間シグナル伝達、血圧調節関連
116638	2.37	solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic	細胞間シグナル伝達、シナプス伝達、神経インパルス伝達
117064	2.33	vasoactive intestinal polypeptide	血圧調節関連
316527	2.24	wingless related MMTV integration site 10a (predicted)	細胞間シグナル伝達
25033	2.21	somatostatin receptor 1	細胞間シグナル伝達
25305	2.18	cortistatin	細胞間シグナル伝達、シナプス伝達、神経インパルス伝達
24602	2.08	natriuretic peptide precursor type A	血圧調節関連
266777	2.02	neuronal pentraxin 1	細胞間シグナル伝達、シナプス伝達、神経インパルス伝達
24225	1.99	brain derived neurotrophic factor	細胞間シグナル伝達、シナプス伝達、神経インパルス伝達
24166	1.91	adenylate cyclase activating polypeptide 1	細胞間シグナル伝達
171044	1.80	somatostatin receptor 3	細胞間シグナル伝達
54278	1.79	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	細胞間シグナル伝達、シナプス伝達、神経インパルス伝達
116470	1.78	syntaxin 1A (brain)	細胞間シグナル伝達、シナプス伝達、神経インパルス伝達
25590	1.77	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4	細胞間シグナル伝達、シナプス伝達、神経インパルス伝達
114592	1.72	natriuretic peptide precursor type C	細胞間シグナル伝達、血圧調節関連
24173	1.60	adrenergic receptor, alpha 1b	細胞間シグナル伝達、血圧調節関連
117100	1.55	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter,	細胞間シグナル伝達、シナプス伝達、神経インパルス伝達
60590	1.52	glutamate receptor, metabotropic 8	細胞間シグナル伝達、シナプス伝達、神経インパルス伝達
24659	1.52	pro-melanin-concentrating hormone	細胞間シグナル伝達、シナプス伝達、神経インパルス伝達
171384	1.51	ring finger protein 39	細胞間シグナル伝達、シナプス伝達、神経インパルス伝達
288475	1.51	neuronal pentraxin II	細胞間シグナル伝達、シナプス伝達、神経インパルス伝達
65031	1.50	double C2, alpha	細胞間シグナル伝達、シナプス伝達、神経インパルス伝達

(2) 継続的な Tickling 刺激で発現変動した遺伝子群

継続的な Tickling 刺激を負荷した場合に、線条体で抽出された遺伝子数は少なく GO 解析に適さなかった。それに対して、視床下部では多数の遺伝子が抽出され、多くの GO Term に割り当てられた(表 1)。視床下部で発現上昇した遺伝子群は 78 種類 (FDR<0.1) の GO Term に割り当てられた。「生物学的プロセス」のカテゴリーでは 46 種類あり、有意に (FDR<0.01) 割り当てられた GO Term として「食行動」(GO ID: 7631)、「神経シグナル伝達経路」(GO ID: 7218)、「生体アミン生合成」(GO ID: 42401)、「カテコールアミン生合成」(GO ID: 42423)、「アミノ酸誘導体生合成」(GO ID: 42398)があった。「食行動」に割り当てられる遺伝子として Galp(ガラニン様ペプチド、2.41 倍)、Pomc(プロオピオメラノコルチン、2.13 倍)、Pmch(メラニン濃縮ホルモン、1.87 倍)、Agrp(Agouti 関連蛋白、1.80 倍)、Hcrt(ハイポクレチン: 別名オレキシン、1.60 倍)、Npy(ニューロペプチド Y、1.59 倍)の発現が上昇し、「神経シグナル伝達経路」に割り当てられる Pomc、Agrp、Npy、Galp、Pmch、Cart(コカイン-アンフェタミン調節転写産物、1.94 倍)の各遺伝子、「カテコールアミン生合成」に割り当てられる Slc6a3(ドーパミントランスポータ、2.46 倍)、Hdc(ヒスチジン脱炭酸酵素、1.80 倍)、Th(チロシン水酸化酵素、1.58 倍)をコードする各遺伝子の発現が上昇した(図 4)。一方、Tickling 刺激を負荷することで視床下部において発現抑制された遺伝子群が割り当てられる GO Term は 19 種類(FDR<0.1)あり、「生物学的プロセス」のカテゴリーとしては 9 種類であったが、有意に (FDR<0.01) 割り当てられた GO Term はなかった¹⁴⁾。

4 考察

本稿では、仔ラットに対して Tickling 陽性刺激を一時的又は継続的に与えた場合の身体の応答を、脳における部位特異的な遺伝子発現の調節という視点で比較解析した。

生後間もない仔ラットは、母親から引き離されると分離直後から 20~60kHz の超音波領域の周波数で啼鳴反応を示す。この啼鳴反応は、自然界において鳥などの外敵・捕食者には検知できない超音波領域にあり、ラットにとってひとつの防御機構として発達させてきた。ストレスにより生じた免疫系および内分泌系を介した生体反応は、脳内システムにより統合・処理され自律神経機能や情動の変化として表

出されるが、この幼若期に特異的な啼鳴反応も母仔間におけるストレス応答した情動表出のひとつと考えられている²⁰⁾。ストレス応答にかかわる脳内システムは、成長過程に応じて動的に形成される²¹⁾。このことから、離乳直後(生後3週齢)の仔ラットの社会的隔離による不安ストレスが与え続けられると、前頭前野および海馬の委縮やシナプス可塑性の減少を伴って、新奇性忌避反応、不安行動や攻撃性の上昇などの情動表出に強い影響が出る²²⁾。今回用いた Tickling 刺激は仔ラット同士のじゃれ合いを模倣した触覚刺激であり、快情動の表出として 50kHz での啼鳴反応を引き起こす。今回の実験で、一時的な Tickling 刺激では快情動(報酬系の情動)の経路である線条体において「神経伝達系」および「細胞内情報伝達系」に関わる因子群の遺伝子発現が上昇した。仔ラットの社会的隔離という不安ストレスにより変容した脳内ネットワークを回復させるためには、不安ストレスを凌駕するほどの快情動を増強させるか、又は変容により減弱したシグナル伝達系を正常な状態に修復する必要がある。一時的な Tickling という陽性刺激の負荷で遺伝子発現が誘導されてきた情報伝達因子群が、線条体においてどのように快情動の誘発に関与するかが今後の検討課題のひとつといえる。

一方、継続的な陽性刺激では視床下部における食行動関連の遺伝子群の発現変動が見られた¹⁴⁾。食行動には皮質から脳幹にいたる様々な脳部位が関与しているが、もっとも重要な部位は生存本能をつかさどる視床下部であり、外側視床下部(LHA)に摂食中枢が、視床下部腹内側核(VMH)に満腹中枢が存在し、室旁核、弓状核(ARC)も重要な役割を果たしていることが報告されている²³⁾²⁴⁾²⁵⁾。今回、継続的な陽性刺激を受けて視床下部で遺伝子発現が上昇した AgRP、HCRT、NPY、GALP、PMCH、POMC、CART は摂食調節に関わる神経ペプチドであり、これらは相互に作用しながら摂食行動やエネルギー消費を制御しているものと思われる²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾。HCRT に関しては、摂食調節のほかに覚醒、睡眠、情動にも関わることが知られている²⁸⁾。また、上記以外で発現の上昇が確認された遺伝子群として、「カテコールアミン生合成」系に含まれるドーパミンの取り込みに関与するドーパミントランスポータ(DAT1)、ヒスタミン合成に関与するヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)、ノルアドレナリンなどのカテコールアミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素(TH)があった。これらの遺伝子発現上昇は、視床下部におけるモノアミン作動性神経が腹側被蓋野を起点とする報酬系や、睡眠-覚醒サイクル

の維持など多様な神経機能、内分泌系の制御にも関与していること、ドーパミンは摂食を亢進させ、ヒスタミンは摂食を抑制することから、食行動にも関連があることが報告されている²⁹⁾³⁰⁾。

また、この実験系で単離・同定される特異的な遺伝子やたんぱく質の機能を解析すれば、他者との関係から惹起される快情動と脳内ネットワークに関する機序の解明につながるものと予想している。そしてそれらの成果をもとに、外環境との関わりの欠如で生じた情動形成の歪みから生じる様々な疾患に対する対処法・予防・治療法などの開発に向けたヒトへの応用が期待できる。今後は、薬物に依存するだけではなく、自ら分泌する脳内の神経伝達物質を活性化させて副作用のない自然治癒力を高める治療法の開発に繋がることを期待したい。

5 まとめ

ラットの快情動を引き起こす手法として Tickling 刺激法を活用した。その結果、情動行動に密接に関与する線条体と生命維持の中枢である視床下部において、陽性刺激を与える期間によって遺伝子発現の調節が異なることが明らかとなった。線条体では一時的な陽性刺激で制御される遺伝子群の種類が多いことから、この部位を経由して一過性の陽性刺激を感知した結果であると思われる。対して視床下部では、継続的な陽性刺激により発現制御される遺伝子群の種類が多く、特に神経伝達経路や食行動に関係する各種遺伝子群の発現が誘導された。さらに視床下部において、与える陽性刺激の期間にかかわらず快刺激の伝達に関与するドーパミントランスポートをコードする Slc6a3 の発現が誘導された。以上の結果より、ラットは与えられた陽性刺激負荷の期間に応じて動員する脳内ネットワークを変化させ、快情動の表出行動を変容させる可能性が示唆された。

なお、本研究は「心と遺伝子研究会」の支援のもと実施された。

謝辞

この研究を遂行するにあたり、多大なるご支援、ご助言を頂きました筑波大学大学院人間総合科学研究科一谷幸男教授に感謝申し上げます。

文献

- 1) Rossi EL: The Psychobiology of Mind-Body Healing: New Concepts of Therapeutic Hypnosis. WW Norton, New York, (1993)
- 2) Murakami K, Hayashi T: Interaction between mind-heart and gene. J Intl Soc Life Info Sci 20: 122-130, (2002)
- 3) Hayashi K, Hayashi T, Iwanaga S, Kawai K, Ishii H, Shoji S, Murakami K: Laughter lowered the increase in postprandial blood glucose. Diabetes Care 26: 1651-1652, (2003)
- 4) Hayashi T, Urayama O, Kawai K, Hayashi K, Iwanaga S, Ohta M, Saito T, Murakami K: Laughter regulates gene expression in patients with type 2 diabetes. Psychother Psychosom 75: 62-65, (2006)
- 5) Hayashi T, Urayama O, Hori M, Sakamoto S, Nasir UM, Iwanaga S, Hayashi K, Suzuki F, Kawai K, Murakami K: Laughter modulates prorenin receptor gene expression in patients with type 2 diabetes. J Psychosom Res 62: 703-706, (2007)
- 6) Hayashi T, Tsujii S, Iburi T, Tamanaha T, Yamagami K, Ishibashi R, Hori M, Sakamoto S, Ishii H, Murakami K: Laughter up-regulates the genes related to NK cell activity in diabetes. Biomed Res 28: 281-285, (2007)
- 7) Hayashi T, Murakami K: The effects of laughter on post-prandial glucose levels and gene expression in type 2 diabetic patients. Life Sci (in print 2009).
- 8) Cousins N: Anatomy of an illness (as perceived by the patient). N Engl J Med 295: 1458-1463, (1976)
- 9) Berk LS, Felten DL, Tan SA, Bittman BB, Westengard J: Modulation of neuroimmune parameters during the eustress of humor-associated mirthful laughter. Altern Ther Health Med 7: 62-72, 74-76, (2001)
- 10) Olds J, Milner P: Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. J Comp Physiol Psychol 47 (6): 419-27 (1954)
- 11) Ikemoto S: Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. Brain Res Rev 56 (1): 27-78. (2007)

- 12) Burgdorf J, Panksepp J: Tickling induces reward in adolescent rats. *Physiol Behav* 72: 167-173, (2001)
- 13) Panksepp J, Burgdorf J: 'Laughing' rats and the evolutionary antecedents of human joy? *Physiol Behav* 79: 533-547, 2003.
- 14) Hori M, Hayashi T, Nakagawa Y, Sakamoto S, Urayama O, Murakami K: Positive emotion-specific changes in gene expression profile in tickling rat. *Mol Med Rep* 2:157-161, (2009)
- 15) Glowinski J, Iversen LL: Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [3H]norepinephrine, [3H]dopamine and [3H]dopa in various regions of the brain. *J Neurochem* 13: 655-669, (1966)
- 16) Luo L, Salunga RC, Guo H, Bittner A, Joy KC, Galindo JE, Xiao H, Rogers KE, Wan JS, Jackson MR, Erlander MG: Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. *Nat Med* 5: 117-122, (1999)
- 17) Hughes TR, Mao M, Jone AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, Lefkowitz SM, Ziman M, Schelter JM, Meyer MR, Kobayashi S, Davis C, Dai H, He YD, Stephanians SB, Cavet G, Walker WL, West A, Coffey E, Shoemaker DD, Stoughton R, Blanchard AP, Friend SH, Linsley PS: Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol* 19: 342-347, (2001)
- 18) Ashburner M, Bal CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G: Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25: 25-29, (2000)
- 19) Maere S, Heymans K, Kuiper M: BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* 21: 3448-3449, (2005)
- 20) Kikusui T, Mori Y: Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents. *J Neuroendocrinol* 21 (4): 427-431, (2009)
- 21) Schmidt MV, Enthoven L, van der Mark M, Levine S, de Kloet ER, Oitzl MS: The postnatal development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the mouse. *Int J Dev Neurosci*. 21 (3): 125-132, (2003)
- 22) Fone KC, Porkess MV: Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 32 (6): 1087-1102, (2008)
- 23) Anand BK, Brobeck JR: Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 77: 323-324, (1951)
- 24) Stellar E: The physiology of motivation. *Psychol Rev* 101: 301-311, (1994)
- 25) Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG: Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661-671, (2000)
- 26) Kuramochi M, Onaka T, Kohno D, Kato S, Yada T: Galaninlike peptide stimulates food intake via activation of neuropeptide Y neurons in the hypothalamic dorsomedial nucleus of the rat. *Endocrinology* 147: 1744-1752, (2006)
- 27) Konturek PC, Konturek JW, Czesnikiewicz-Guzik M, Brzozowski T, Sisto E, Konturek SJ: Neuro-hormonal control of food intake: basic mechanisms and clinical implications. *J Physiol Pharmacol* 56 (Suppl 6): 5-25, (2005)
- 28) Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M: Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98: 437-451, (1999)
- 29) Meguid MM, Fetissov SO, Varma M, Sato T, Zhang L, Laviano A, Rossi-Fanelli F: Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. *Nutrition* 16: 843-857, (2000)
- 30) Morimoto T, Yamamoto Y, Yamatodani A: Brain histamine and feeding behavior. *Behav Brain Res* 124: 145-150, (2001)