

陽性刺激による遺伝子の発現変動 —ラットの精神・神経・内分泌系に対する Tickling 効果—

浦山 修

つくば国際大学医療保健学部理学療法学科

【要 旨】 陽性刺激に伴う生体反応は、eustress、good stress、あるいは positive stress と呼ばれている。その生理的な意味とメカニズムを明らかにするために、ラットに Tickling(くすぐり)刺激をくり返し与え、陽性感情の表出を50kHzの音声により確認し、いくつかの組織と脳内各部位の遺伝子の発現変動と新たな表現型の出現について検討した。視床下部の網羅的な遺伝子発現の解析において、Tickling 刺激によりラットの食行動に関連する遺伝子の発現が増加した。無刺激ラットとの比較では摂食量は増加したが体重増加に差はなかった。末梢組織の唾液腺の遺伝子発現の定量的解析では、タンパク分解酵素の一つであるカリクレイン・ファミリー遺伝子の増加が顕著であった。また海馬では、Tickling 刺激により歯状回の神経細胞の増殖と分化(神経新生)の促進が見られた。Tickling 刺激の感覚受容と中枢神経系における情報処理は、陽性感情を生じ、エピソードとして記憶される一方で、内分泌系や自律神経系を介して末梢組織の機能に影響したと考えられる。

(医療保健学研究 第4号：61-66頁／2013年1月8日採択)

キーワード： 陽性感情, Tickling, 遺伝子発現, 食行動, カリクレイン, 神経新生

序 論

Selye H(1937)はストレス学説を提唱し、ストレスは外的刺激に対する生体の適応であると定義した。不快や苦痛などのストレスが長期にわたるとストレスホルモンが過剰に分泌され、本来は生体をまもるはずの適応の仕組みが破綻し、最終的には病気になってしまう。糖尿病の療養においても辛いこと(陰性ストレス)があると患者の血糖値は上昇する。そこで、我われは、

その逆の楽しいこと(陽性ストレス)があれば血糖値は下がるのではないかと予想し、分子生物学的立場から“笑い与健康”の研究を始めた。糖尿病の患者に漫才鑑賞により大いに笑ってもらったところ、食後の血糖値の上昇が抑制されて(Hayashi et al., 2003)、さらに笑いと白血球の遺伝子の発現変化がリンクして(Hayashi et al., 2006)いることが明らかになった。この笑いの効果には中枢神経系や自律神経系の関与が示唆された。ラットは不快や恐怖に出会ったときには20kHzの声を発するが、快を感じたときには50kHzの声を発する。本研究では、Tickling 刺激に対して50kHzの声をもって応答する Laughing rat(笑うラット)(Knutson et al., 1998; Panksepp and Burgdorf, 2003)を用いて、

連絡責任者：浦山 修
〒300-0051 茨城県土浦市真鍋6-8-33
つくば国際大学医療保健学部理学療法学科
TEL: 029-883-6014
Email: o-urayama@tius.ac.jp

視床下部、海馬そして唾液腺(特に顎下腺)の遺伝子の発現変動と新たな表現型の出現について検討した。

材料と方法

動物

離乳直後の Wistar ラットを1匹ずつ隔離したものを購入し、そのまま1ケージ1匹で個別飼育した。本研究は、実施に先立ち、筑波大学動物実験委員会の承認を得た。実験に使用した動物の飼育及び処置は筑波大学の定める実験動物の取り扱い倫理規定に従った。

Tickling 刺激

ラットに、4週齢から始めて、2週間 Tickling 刺激を1日5分間行った。ラットをテストボックスの中に置き、15秒間の無刺激の後、後頸部と腹部を交互にくすぐる刺激を15秒間与え、その30秒間の無刺激と刺激の操作を4度(2分間)繰り返し、1分間休憩し、再び2分間の刺激操作を行った(Hori et al., 2009)。Tickling 刺激(Tickled)に対して、対照は、軽く触れるだけの軽刺激(Lightly touched)と全く触れない無刺激(Untouched)とした。

陽性感情の評価

高周波マイクロホン(MI-3140、小野測器)を用いて、ラットが発する50kHz(35-70kHz)の超音波を、15秒間の刺激と15秒間の無刺激について(計16回/5分間)、それぞれ収録し、50kHzの音声の採取できたときを1ポイントとして陽性感情の表出を定量化した。刺激群では 9.3 ± 0.6 ポイント、軽刺激群では 0.6 ± 0.2 ポイント、無刺激群では 0.0 ± 0.0 ポイントで、対照群では50kHzの発声は認められなかった(Yamamuro et al., 2013)。

全 RNA 分画の調製

ラットはジエチルエーテルで麻酔し、生理食塩水で経心灌流し、組織を取り出し、RNAlater (Quiagen)中で、4℃、一晚インキュベーション後、-80℃に保存した。全 RNA 分画の抽出には RNAeasy lipid Tissue Mini Kit (Quiagen)を使用した。

DNA マイクロアレイ解析

全 RNA 分画を出発材料として、cRNA を合成し増幅した。Cyanine-5(Tickling刺激)と Cyanine-3(対照)の2種類の蛍光色素標識を行い、DNA チップ解析に供した。Agilent 社の Whole Rat Genome DNA Microarray 上で会合反応を行い、共焦点レーザースキャナーでそれぞれの色素に由来する蛍光強度を測定し、Cyanine-5/Cyanine-3 比を遺伝子の発現変動として求めた。1.5倍以上変動している遺伝子について解析を進めた。発現変動した遺伝子群の機能を推定するために、全遺伝子中での出現頻度に比べてある遺伝子群中での出現頻度が高くなっているかを検定し、有意と判定された Gene ontology(GO)term をその遺伝子群に特徴的な GO として割り当てた(Hori et al., 2009)。

カリクレイン(Klk)遺伝子の定量 PCR 解析

High capacity cDNA reverse transcription kit (Quiagen)を用いて全 RNA 分画から cDNA を合成した。TaqMan Gene Expression Assay (18個の Klk 分子種について、Applied Biosystems)と Applied Biosystems 7300 Sequence Detection System を使用して Real-time PCR 法により、Klk の発現変動の定量化を行った。各遺伝子の発現量はアクチン(Actb)を内部標準として $\Delta\Delta Ct$ 法によって算出した(Yamamuro et al., 2013)。

新生神経細胞の可視化

チミジン誘導体の BrdU (5-bromo-3'-deoxyuridine, 50mg/kg) をラットの腹腔内に 4 日間連続投与し、それが取り込まれた神経細胞を免疫組織学的に検討した。抗 BrdU ヒツジ抗体と抗 NeuN (神経細胞特異的) マウス抗体、次に Cyanine-3 結合抗ヒツジ抗体と Alexa fluor 488 結合抗マウス抗体のカクテルを作用させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて二重染色細胞を観察した (Yamamuro et al., 2010)。

統計解析

解析結果は平均±SEで示した。統計的に有意差があるかどうかは Scheffe テストで検討した。p 値が<0.05のときに有意と見なした。

結 果

食行動関連遺伝子群の発現増加

Tickling 刺激の遺伝子発現に対する影響を、大脳皮質、視床下部、海馬、線条体、白血球、唾液腺の各組織について検討した。DNA マイ

クロアレイ法により、軽刺激に対して Tickling のくり返し刺激で1.5倍以上発現増加した遺伝子を抽出した。視床下部では136 (全遺伝子数 26,075) の遺伝子の発現増加が見られた。それらの遺伝子の特徴的な GO term は、食行動関連、神経ペプチド伝達関連、ホルモン活性であった (Hori et al., 2009)。有意の発現変動を示した食行動関連遺伝子を表 1 に挙げる。食欲促進に関係する遺伝子が 5 個 (Galp, Orexin, Pmch, Agrp, Npy)、抑制に関係する遺伝子が 2 個 (Pomc, Cart) 含まれていた。

食行動関連遺伝子の変動が認められたので、Tickling 刺激を 2 週間継続し、無刺激群との間で摂食量と体重の変化を比較したところ、Tickled ラットの摂食量は増加したが体重増加に差はなかった。Tickling 効果は、カロリーの蓄積を伴わないものと考えられた。

唾液腺の Klk ファミリー遺伝子の発現増加

唾液腺 (顎下腺、耳下腺) の網羅的遺伝子解析では、Tickling 刺激により 593 (全遺伝子数 41,012) の遺伝子の発現増加が見られた。特徴的な GO term は MAP キナーゼ脱リン酸酵素と組織カリクレイン活性であった。そこで、Real-time PCR 法によって顎下腺の 18 個の Klk ファミリー

表 1. Tickling 刺激による視床下部の食行動関連遺伝子の発現変動

摂食への作用	遺伝子	発現増加 (倍)
促進	Galp (ガラニン様ペプチド)	2.14
	Orexin (オレキシン、別名ハイポクレチン)	1.60
	Pmch (メラニン濃縮ホルモン)	1.87
	Agrp (Agouti 関連タンパク)	1.80
	Npy (ニューロペプチド Y)	1.59
抑制	Pomc (プロオピオメラノコルチン)	2.13
	Cart (コカイン・アンフェタミン調節転写物)	1.94

網羅的な遺伝子発現解析で抽出された GO term “食行動関連” 遺伝子。

遺伝子について定量的な解析を行った(表2)。

Klk7(Klk1l)と GK11 は4.6倍の増加、他の Klk1、Klk2(Klk1c2, Tonin)、Klk1b3(Nerve growth factor, gamma)、Klk1c10、Klks3(Klk1c9)も2～3倍の発現増加が見られた。Klk タンパクに変化があるのかどうか、抗 Klk7 抗体を用いたウエスタンブロット解析では、刺激群において Klk7 タンパク・バンドの増加が認められ、さらに免疫組織化学では、顎下腺の腺管細胞に Klk タンパクの増加が観察された(Yamamuro et al., 2013)。

海馬の神経新生の促進

学習や記憶に関係する海馬の歯状回の顆粒細胞層では、生後も1日に約9千個の前駆細胞が産生され、その増殖細胞の一部が成熟ニューロンに成長することが知られている(adult neurogenesis)。BrdU法を用いて、Tickling 刺激の神経新生に対する影響を検討した。初めに細胞の増殖過程への影響をみるために、5日間 Tickling 刺激を行い、BrdUの最終投与後18時間放置し、抗 BrdU 抗体と神経細胞特異的な抗 NeuN 抗体で二重染色される細胞をカウントした。二重染色細胞数が、Tickling 刺激群(1165.0±163.5)ではコントロール群(743.3±69.5)と比較して、57%まで有意の増加(p<0.05)

を示した。次に細胞の分化・成熟過程への影響をみるために、Tickling 刺激を行い、BrdUの最終投与後3週間放置し二重染色される細胞をカウントした。刺激群では2305.0±145.1、コントロール群では1641.7±235.4(p<0.05)と、Tickling 刺激は成熟細胞への成長も促進した(Yamamuro et al., 2010)。

考 察

視床下部では、Tickling 応答遺伝子として食行動関連遺伝子が同定され、食行動の変容が観察された。摂食行動は、胃が空腹になる、あるいは延髄のグルコース感受性ニューロンが活性化されると、空腹信号が視床下部弓状核の NPY ニューロンを活性化し、次に外側野の OREXIN や PMCH の働きにより、引き起こされる。この食欲促進系に対して、レプチン・レプチン受容体は食欲抑制に働くことが知られている。そこで Tickling 刺激によりレプチン受容体遺伝子の変動するかどうか Real-time PCR 法で検討したが、大きな発現変動は見られず、食行動遺伝子への影響はレプチン受容体を介さないと考えられた。

視床下部は脳辺縁系と神経線維連絡があり、本能行動を制御し、内分泌系や自律神経系の中核として働く。Tickling 刺激の感覚受容と中枢

表2. Real-time PCR 法による顎下腺の Klk ファミリー遺伝子の変動の定量的解析

	Tickling 刺激 (%)	軽刺激 (%)	無刺激 (%)
Klk1	191.6±21.8 *	63.9±56.7 *	100.0±47.7
Klk2	224.4±22.2 *	74.5±58.8 *	100.0±45.7
Klk7	280.6±28.9 **	60.4±64.2 **	100.0±59.1
Klk1b3	162.4±19.0 *	99.4±33.1 *	100.0±31.1
Klk1c10	233.5±27.5 *	56.6±68.2 *	100.0±50.4
Klks3	228.6±26.2 *	55.2±59.7 *	100.0±52.1
GK11	241.3±28.7 **	53.0±73.1 **	100.0±60.1

無刺激群の値を100%として平均±SEを算出した(各群ともn=14)。

* p<0.05, ** p<0.01.

神経系における情報処理が内分泌系や自律神経系を介して顎下腺の Klk 遺伝子の発現に影響したものと考えられる。Klk はセリプロテアーゼ活性を有する。Klk1 は Kininogen に働いて Bradykinin を産生し、その Bradykinin は血管を拡張し降圧作用を示す。他方、Klk2 (Tonin) は Angiotensinogen を分解して Angiotensin を生じる。Angiotensin II は昇圧作用を示す。Tickling 刺激に伴う Klk 増加の生理的意味については、Klk 活性の増加によりどのような生理活性ペプチドが産生されるのかを観察するなど、さらに検討する必要がある。

顎下腺は神経免疫調節系の重要な器官の一つとなっている。顎下腺の Klk 遺伝子及びタンパクの発現増加により、唾液組成と精神神経免疫調節機能の変化が示唆された。唾液中の Klk タンパクは陽性ストレスの評価のためのマーカーとして利用できる可能性がある。

Tickling 刺激により、海馬の歯状回顆粒細胞層の神経新生が促進された。このことは陽性刺激に対する応答がエピソードとして記憶された可能性を示唆する。このような神経新生は“豊かな環境”で起きることが知られている (Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 1999)。豊かな環境とは、ラットがケージの中に入れた遊び道具で遊びそして運動するような人工的空間をいう。Tickling 刺激も、遊びや運動と同じ効果を示したことになる。陽性刺激の負荷が生体にどんな表現型の変化をもたらすのか、生物学的理解をさらに深める必要がある。

本研究は、筑波大学人間総合科学研究科・基礎医学系の診断生化学グループ、神経生物学グループそして(財)国際科学振興財団・バイオ研究所との共同研究としてなされた。

参考文献

Hayashi K, Hayashi T, Iwanaga S, Kawai K, Ishii H,

Shoji S, Murakami K (2003) Laughter lowered the increase in postprandial blood glucose. *Diabetes care* 26:1651-1652.

Hayashi T, Urayama O, Kawai K, Hayashi K, Iwanaga S, Ohta M, Saito T, Murakami K (2006) Laughter regulates gene expression in patients with type 2 diabetes. *Psychother Psychosom* 75:62-65.

Hori M, Hayashi T, Nakagawa Y, Sakamoto S, Urayama O, Murakami K (2009) Positive emotion-specific changes in the gene expression profile of tickled rats. *Mol Med Rep* 2:157-161

Kempermann G, Kuhn G, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.

Knutson B, Burgdorf J, Panksepp J (1998) Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. *J Comp Psychol* 112:65-73.

Panksepp J, Burgdorf J (2003) “Laughing” rats and the evolutionary antecedents of human joy? *Physiol Behav* 79:533-547.

Selye H (1937) Studies on adaptation. *Endocrinology* 21:169-188.

Van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2:266-270.

Yamamuro T, Hori M, Nakagawa Y, Hayashi T, Sakamoto S, Ohnishi J, Takeuchi S, Mihara Y, Shiga T, Murakami K, Urayama O (2013) Tickling stimulation causes the up-regulation of the kallikrein family in the submandibular gland of the rat. *Behav Brain Res* 236:236-243.

Yamamuro T, Senzaki K, Iwamoto S, Nakagawa Y, Hayashi T, Hori M, Sakamoto S, Murakami K, Shiga T, Urayama O (2010) Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat hippocampus enhanced by tickling stimulation with positive emotion. *Neurosci Res* 68:285-289.

Proceedings

The expression change of genes by positive stimulation: The effect of tickling on the psychoneuroendocrine system of the rat

Osamu Urayama

Department of Physical Therapy, Faculty of Medical and Health Sciences,
Tsukuba International University

Abstract

An event that leads to positive emotion is called eustress, good stress or positive stress. In order to see the physiological meaning and mechanism of the positive stress, we picked up the 50 kHz ultrasonic vocalizations of rats during tactile stimulation (tickling) and then studied the changes of phenotype and gene expression in the brain and other tissues of the rat by DNA microarray technique. In the hypothalamus, the expression of genes related to feeding regulation was altered. Food uptake increased more in the tickled group than in the untickled control group, but the increase of body weight was not different between two groups. In the submandibular gland, the expression of several genes of the kallikrein (a serine protease) was quantitatively up-regulated after tickling stimulation in real-time PCR analysis using the total RNA fraction. In the hippocampus, tickling stimulation enhanced neurogenesis, the proliferation and survival of newly divided cells, in the dentate gyrus. These results suggest that tactile sensory processing in the central nervous system is memorized in the hippocampus as an episode with positive emotion and affects the gene expressions in the peripheral tissue probably via hormonal and/or autonomic neural activities. (Med Health Sci Res TIU 4: 61-66 / Accepted 8 Jan 2013)

Key words: Positive emotion, Tickling, Gene expression, Feeding behavior, Kallikrein, Neuro genesis